Nouvelles perspectives pour les complexes de lanthanides dérivés du squelette PCTA[12] : synthèse, propriétés photophysiques et relaxométriques

Morgane Enel

▶ **To cite this version:**

Morgane Enel. Nouvelles perspectives pour les complexes de lanthanides dérivés du squelette PCTA[12] : synthèse, propriétés photophysiques et relaxométriques. Chimie organique. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2017. Français. NNT : 2017TOU30337 . tel-02001072

HAL Id: tel-02001072
https://theses.hal.science/tel-02001072

Submitted on 1 Feb 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Morgane ENEL

Le mardi 19 décembre 2017

Nouvelles perspectives pour les complexes de lanthanides dérivés du squelette PCTA[12] :

Synthèse, propriétés photophysiques et relaxométriques

École doctorale et discipline ou spécialité :
ED SDM : Chimie, Biologie, Santé – CO 042

Unité de recherche :
Laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie des Molécules d'Intérêt Biologique – UMR CNRS 5068

Directeur/trice(s) de thèse :
M. Claude PICARD
Mme. Chantal GALAUP

Jury :

Mme. Françoise CHUBURU	Pr., Université de Reims	Rapporteur
M. Raphaël TRIPIER	Pr., Université de Bretagne Occidentale	Rapporteur
Mme. Célia BONNET	CR CNRS, Université d'Orléans	Examinateur
M. Christophe COUDRET	DR CNRS, Université de Toulouse	Examinateur

Merci à tous !

Merci, tout d'abord, au Docteur Yves Génisson de m'avoir accueillie durant ces trois années de thèse au sein du Laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique (LSPCMIB) de l'Université Paul Sabatier de Toulouse.

Merci au Docteur Christophe Coudret d'avoir accepté de présider ce jury de thèse. Un grand merci également à tous les autres membres de ce jury ayant accepté de juger ce travail : les professeurs Françoise Chuburu et Raphaël Tripier en qualité de rapporteurs ainsi que le Docteur Célia Bonnet en tant qu'examinateur. Merci à vous pour votre disponibilité, vos connaissances, vos précieux conseils et remarques le jour de la soutenance.

Merci à mes deux directeurs de thèse, le Docteur Claude Picard et le Docteur Chantal Galaup, de m'avoir encadrée durant ces trois ans et de m'avoir fait confiance. Merci pour toutes nos discussions scientifiques, ainsi que (surtout !) votre patience.

Merci également aux autres membres de l'équipe SOMAB ! Nadine (pour m'avoir avancée sur certaines étapes de synthèses présentées dans ce manuscrit), Suzy (pour vos conseils et votre bonne humeur), et Chantal C. Merci à mes collègues de paillasse : Jin-Hui (Jin-Jin !), Romain, et Aritz, d'avoir été là pendant ces trois années.

Merci à Éric et Isabelle, d'avoir été d'un énorme soutien pendant ce projet. Éric, merci de m'avoir laissée avoir accès à ton tiroir à goûter, je dois être endettée à vie maintenant ! Isa, merci de m'avoir autant écoutée, de m'avoir fait rire et sourire quand

le moral n'était pas forcément au beau fixe. Et merci à vous deux d'avoir tenté de m'initier à la course !

Merci à toutes les personnes qui ont été impliquées de près ou de loin dans ces travaux de thèse, notamment les professeurs Luce Vander Elst et Sophie Laurent pour m'avoir initiée à la relaxométrie.

Merci à tous ceux qui ont fait mon quotidien au laboratoire, et plus à particulièrement Tessa (Tessi-coeur !), de m'avoir écoutée parler de nombreuses heures de la thèse ou d'autres sujets plus personnels. J'espère qu'on pourra très vite faire de la moto ensemble ! Merci à Caroline, de m'avoir permise de m'échapper de la dure réalité de la paillasse (pourquoi ça marche paaaas !) le temps de nos conversations ou de nos restos ! Merci à Cécile, d'avoir su me donner goût à la recherche lors de mon stage de M2 et de m'avoir aidée à avoir un peu plus confiance en moi (oui, il y a encore du travail !). Merci à Muriel, d'avoir été une seconde maman, spécialement lors de mes déplacements en congrès. Merci à Lucie, pour ta joie de vivre communicative et tes « couuucouuu ! ».

Merci à Florian, ami nancéen retrouvé par hasard, pour toutes nos conversations, tes remontages de moral et tes petits plats quand je déprimais. Merci de toujours avoir été là quand j'en avais besoin, tu as vraiment été l'un pilier de ma vie ces quatre dernières années ! Merci aussi de m'avoir fait connaître Laura, Anthony et Sophie ! Laura, merci pour tes nombreux câlins qui m'ont réchauffé le cœur. Fais toi confiance, tu as la force de réussir tout ce que tu entreprends ! Anthony, merci pour ces souvenirs inoubliables (on pense tous très fort au dessert japonais à la noix de coco), pour ces fous-rires et pour ton soutien sans faille ! Je n'oublierai jamais notre botlane de qualitey ! Merci à Sophie, la petite dernière mais qui compte beaucoup ! Merci mille fois d'avoir été là à m'envoyer des messages tous les jours en fin de rédaction, et de t'être déplacée à pas d'heure pour me faire répéter la soutenance. Merci pour tes mots rassurants, pour ton humour, et de t'être toujours rendue disponible pour moi.

Merci à Marion et Sébastien (aka. Lamasticot), membres de l'éternelle Team Rocket, pour toutes nos soirées film d'horreur (spéciale dédicace au Projet Blairwitch !), le

collage de stickers partout dans le labo, tous nos fous-rires et nos tentatives avortées de domination du monde. Que celle-ci s'envole vers d'autres cieux !

Merci à Etienne et Arthur (les gros !), beaucoup trop loin des yeux mais jamais loin du cœur (que de guimauverie quand je pense à vous !). Je vous ai enfin rattrapés !

Merci à mes parents. Maman, pour m'avoir poussée jusque-là et pour ton soutien à distance, surtout la dernière année. Papa, merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir encouragée à donner le maximum de moi-même. Merci pour toutes les pizzas et tous les moments réconfortants passés ensemble, et merci de m'avoir comprise même quand les mots ne me venaient pas.

Merci, finalement, à Valentin (se reconnaîtra-t-il ?), d'avoir su me supporter et d'être resté malgré cette expérience ! Merci pour ton épaule sur laquelle j'ai pu me reposer dans mes moments (très/trop nombreux !) de doute (j'y arriverai jamaaaaiiis !), pour tes sourires qui ont toujours su m'apaiser, et tous tes mots gentils. C'est maintenant à nous, ensemble, d'écrire la suite.

Introduction générale

Chapitre 1 : Le PCTA[12] - Une plateforme polyvalente pour la complexation d'ions métalliques

1 Complexes métalliques et choix de la structure chélatante 9

1.1 Les lanthanides 11

1.1.1 Propriétés électroniques et chimiques des ions Ln(III) 11

1.1.2 Propriétés spectroscopiques et magnétiques des ions Ln(III) 13

1.1.3 A la recherche de ligands efficaces 14

1.2 Les ligands polyaminocarboxyliques 15

1.2.1 Les ligands polyaminocarboxyliques linéaires 15

1.2.2 Les ligands polyaminocarboxyliques macrocycliques 16

1.2.2.1 Généralités sur les ligands macrocycliques 16

1.2.2.2 Les macrocycles polyaminocarboxyliques en imagerie 17

1.2.3 Les agents bifonctionnels chélatants 22

1.3 La place du PCTA[12] parmi les ligands polyaminocarboxyliques 24

1.3.1 Considérations thermodynamiques et cinétiques 25

1.3.1.1 Stabilité thermodynamique 25

1.3.1.2 Inertie cinétique 27

1.3.1.3 Cinétique de formation 28

1.3.2 Autres considérations 29

1.4 Conclusion : intérêt de la plateforme 30

2 Les complexes dérivés du PCTA[12] et leurs applications … 31

2.1 … en imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM) 31

2.1.1 Principe de l'imagerie par résonance magnétique 31

2.1.2 Les agents de contraste 34

2.1.2.1 Les agents de contraste de type T_2 34

2.1.2.2 Les agents de contraste de type T_1 35

2.1.3 Paramètres influençant la relaxivité 39

2.1.4 Les complexes dérivés du PCTA[12] en tant qu'agents de contraste 40

2.2 … en médecine nucléaire 42

2.2.1 La tomographie par émission de positrons (TEP) 43

2.2.2 La tomographie par émission monophotonique (TEMP) 43

2.2.3 La radiothérapie interne vectorisée (RIV) 44

2.2.4 Les complexes de radionucléides dérivés du PCTA[12] 44
2.2.4.1 Applications en imagerie 45
2.2.4.2 Applications en radiothérapie 47

2.3 … en imagerie optique de fluorescence 48
2.3.1 Concepts généraux sur la luminescence 48
2.3.1.1 Fluorescence et phosphorescence 49
2.3.1.2 Caractéristiques optiques des fluorophores 50
2.3.2 Les fluorophores organiques et leurs limites 51
2.3.3 Les complexes d'ions Ln(III) luminescents 52
2.3.3.1 La luminescence en temps résolu 52
2.3.3.2 Sensibilisation des ions Ln(III) : effet d'antenne 53
2.3.3.3 Prérequis d'un complexe d'ion Ln(III) luminescent 55
2.3.4 Les complexes dérivés du PCTA[12] en tant que sondes luminescentes 56

3 Synthèse de la plateforme : revue bibliographique 59

3.1 Introduction générale sur la synthèse de polyamines macrocycliques 59
3.1.1 Principe de haute dilution 59
3.1.2 Effet de matrice ou « effet template » 59
3.1.3 Considérations structurelles du précurseur 60

3.2 Voies de synthèse du PCTA[12] 60
3.2.1 Richman-Atkins et premières synthèses du PCTA[12] 60
3.2.2 Utilisation des groupements nosyle 63
3.2.3 Autres méthodes de protection des amines 64
3.2.4 Autres méthodes de cyclisation 65

3.3 Synthèse de ligands bifonctionnels chélatants dérivés du PCTA[12] 67

3.4 Synthèse de dérivés du PCTA[12] à différentes fonctions complexantes 70
3.4.1 Synthèse de dérivés symétriques 70
3.4.2 Synthèse de dérivés à fonctions mixtes 70

4 Objectifs du projet 73

5 Références 81

Chapitre 2 : Synthèse et caractérisation des ligands

1 Introduction 91

2 Séquence « d'alkylation/cyclisation » et synthèse du PCTA[12] 93

2.1 Synthèse du précurseur triamine 95

2.1.1 A partir de la diéthylènetriamine 95

2.1.2 A partir de la *N*-benzyléthanolamine 97

2.2 Réaction de macrocyclisation et formation du PCTA[12] 100

3 Synthèse de ligands bifonctionnels chélatants *C*-fonctionnalisés dérivés du PCTA[12] 107

3.1 Introduction d'une fonction acide carboxylique aromatique 107

3.2 Introduction d'une fonction phénol 112

4 Synthèse de ligands bifonctionnels chélatants *N*-fonctionnalisés dérivés du PCTA[12] 119

4.1 Introduction d'une fonction ester de méthyle 119

4.2 Introduction d'une fonction acide carboxylique aliphatique en α-position de la fonction coordinante centrale 120

4.3 Introduction d'une fonction amine primaire aromatique en α-position de la fonction coordinante centrale 122

5 Synthèse de ligands à fonctions mixtes 127

5.1 Préparation des précurseurs triamine 127

5.2 Macrocyclisation et formation des ligands H_2L_4, H_3L_5 et H_4L_6 129

6 Vers l'amélioration de l'effet d'antenne 135

6.1 A partir du noyau pyridine 135

6.1.1 Synthèse du dérivé PCTA[12]-cs124-CF_3 136

6.1.2 Synthèse du dérivé PCTA[12]-HBim 140

6.2 Synthèse de ligands à noyau(x) phénol : H_4L_9 et H_8L_{10} 144

7 Références 151

Chapitre 3 : Synthèse et évaluation physico-chimique des complexes de lanthanides

1 Préparation et caractérisation des complexes de lanthanides Ln(III) (Ln = Eu, Gd, Tb) 159

2 Etude de la sphère de coordination des complexes de lanthanides 165

2.1 Propriétés d'absorption des complexes de lanthanides 165

2.2 Propriétés de luminescence des complexes Eu(III) et Tb(III) 167

2.2.1 Spectres d'émission de luminescence 167

2.2.2 Spectres d'excitation de luminescence : mise en évidence de l'effet d'antenne 170

2.2.3 Durées de vie de luminescence et nombre de molécules d'eau 171

3 Etude relaxométrique des complexes de gadolinium 179

3.1 Généralités théoriques sur la relaxivité 179

3.2 Evaluation relaxométrique des complexes Gd(III) 184

3.2.1 Mesure de la relaxivité 184

3.2.2 Détermination du temps moyen de résidence des molécules d'eau τ_M 189

3.2.3 Profils NMRD et détermination du temps de corrélation rotationnel τ_R 200

3.2.4 Transmétallation : stabilité vis-à-vis des ions Zn^{2+} 205

3.3 Conclusion 207

4 Vers l'amélioration de l'effet d'antenne 209

4.1 Etude photophysique des ligands à noyau pyridine H_3L_7 et H_3L_8 et des complexes dérivés 209

4.1.1 Evaluation photophysique des chromophores modèles 209

4.1.2 Evaluation photophysique des ligands H_3L_7 et H_3L_8 et de leurs complexes Ln(III) 213

4.1.3 Etude de la stabilité du complexe L_8.Eu 223

4.2 Etude de la luminescence des ligands à noyau(x) phénol 226

4.2.1 Stœchiométrie des complexes 226

4.2.2 Propriétés d'absorption des ligands et de leurs complexes Ln(III) 227

4.2.3 Propriétés de luminescence des complexes Ln(III) 229

4.2.4 Stabilité des complexes Tb(III) en solution aqueuse 236

4.3 Conclusion 240

5 Références 241

Experimental section

1 Materials and equipment 247

1.1 Chemicals and reagents 247

1.2 Chromatography 247

1.3 Characterization 247

2 Synthesis of compounds 1 → 72 249

3 Synthesis of ligands H_3PCTA[12], H_4L_1 → H_8L_{10} 299

4 Synthesis and characterization of Ln(III) complexes 311

5 Relaxometric experiments 319

6 Photophysical experiments 321

7 References 323

Conclusion générale

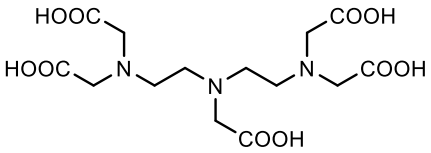
INTRODUCTION GENERALE

Plusieurs techniques d'imagerie sont actuellement utilisées dans le domaine biomédical ou médical, que ce soit l'imagerie par tomodensitométrie à rayons X, l'imagerie par résonance magnétique (IRM), l'imagerie optique, ou encore l'imagerie nucléaire, dont font partie la tomographie par émission monophotonique (TEMP) et la tomographie par émission de positrons (TEP). Malgré leurs avantages respectifs, des limitations en termes de sensibilité, de résolutions spatiale et temporelle, ou de profondeur de pénétration subsistent cependant, et restreignent leur degré de performance.

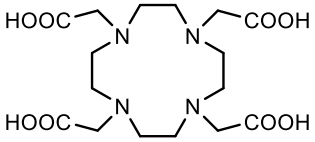
En vue de l'obtention d'une image ou de l'amélioration de sa qualité, la majeure partie de ces techniques d'imagerie repose sur l'utilisation de petits chélateurs organiques associés à un ion métallique. Parmi les plus utilisés, les radiopharmaceutiques basés sur l'indium-111 ou le technécium-99m pour la TEMP, le cuivre-64 ou le gallium-68 pour la TEP (niveau recherche) peuvent être cités, mais également les complexes de gadolinium(III) pour l'IRM ou les complexes de lanthanides(III) (Eu, Tb, Yb, Nd) pour l'imagerie optique. D'autres complexes métalliques (yttrium-90, lutécium-177) sont employés dans le domaine de la radiothérapie.

Les complexes métalliques actuellement engagés dans ces différentes modalités d'imagerie ou de thérapie sont essentiellement basés sur des chélateurs classiques (DTPA, DOTA, NOTA), dont de nombreux dérivés sont disponibles commercialement. Ces chélateurs permettent de complexer différents ions métalliques à partir d'une structure chélatante unique. Par simple échange du métal complexé et suivant sa nature, des signaux physico-chimiques différents peuvent être obtenus, et des techniques d'imagerie complémentaires peuvent alors être utilisées : il s'agit du concept de « sondes d'imagerie bimodale ». De telles sondes peuvent également permettre de coupler tests de diagnostic et thérapie : le concept de théranostique peut alors être évoqué.

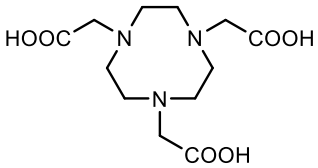
Dans ce cadre, le ligand PCTA[12], un macrocycle à 12 chaînons intégrant dans sa structure un noyau pyridine intracyclique et trois groupes aminoacide acétique, constitue une alternative séduisante comme ligand vecteur d'imagerie bimodale ou de théranostique. Ce ligand, synthétisé pour la première fois en 1981, a retrouvé au cours de ces dernières années un regain d'intérêt notamment dans les domaines de l'imagerie nucléaire ou de la radiothérapie.



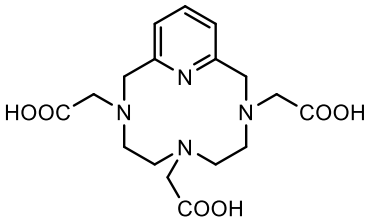
DTPA



DOTA



NOTA



PCTA[12]

(12-membered Pyridine containing Cyclen Triacetic Acid)

Les travaux de thèse présentés seront consacrés au développement de familles de ligands dérivés du PCTA[12] et de leurs complexes lanthanide(III) (Ln = Gd, Eu, Tb). Ceux-ci associeront des travaux de synthèse organique multi-étape et des études physico-chimiques dans les domaines de la relaxométrie (complexes Gd(III)) ainsi que de la fluorescence (complexes Eu(III) et Tb(III)).

CHAPITRE 1

LE PCTA[12] : UNE PLATEFORME POLYVALENTE POUR LA COMPLEXATION D'IONS METALLIQUES

Après une partie introductive décrivant les propriétés magnétiques et spectroscopiques des ions lanthanides et sur l'intérêt des ligands polyaminocarboxyliques dans la complexation d'ions métalliques, les particularités du ligand PCTA[12] dans le vaste domaine des chélatants sera exposé.

Les différentes modalités d'imagerie, et dans une moindre mesure de radiothérapie, ainsi que les différents types de complexes impliqués dans ces domaines seront ensuite présentés. Les paramètres physico-chimiques permettant d'évaluer un complexe métallique pour ces différentes applications seront également abordés. Cet ensemble de données sera illustré dans chaque cas par la présentation de complexes métalliques dérivés du PCTA[12], mettant en évidence le caractère polyvalent de ce ligand pour des applications biologiques ou médicales.

Une revue bibliographique sera ensuite consacrée aux différentes voies de synthèse du ligand PCTA[12] et de ses dérivés bifonctionnels, ou incorporant d'autres fonctions complexantes que des fonctions acide carboxylique. Une première base sera alors établie en vue de l'élaboration d'une nouvelle stratégie de synthèse permettant d'accéder à ces ligands.

Le chapitre introductif sera clos par l'exposé des objectifs des travaux de ce projet, ainsi que par la description des ligands qui y seront étudiés.

1 Complexes métalliques et choix de la structure chélatante

L'une des caractéristiques des éléments métalliques est de facilement perdre des électrons pour former des espèces positivement chargées et solubles dans les milieux aqueux. C'est sous cette forme cationique qu'ils jouent un rôle essentiel dans les processus biologiques. Alors que les métaux sont électro-déficients, de nombreuses molécules naturelles sont, quant à elles, riches en électrons. L'interaction entre ces deux espèces forme des complexes métalliques, à l'origine de nombreuses fonctions vitales. Pour ne citer que quelques exemples, l'hémoglobine est une protéine ferrique responsable du transport de l'oxygène vers les tissus, *via* sa coordination à l'atome de fer. Les minéraux contenant du calcium sont la base des os, le zinc est essentiel à la croissance et au développement, et est une substance cruciale pour la régulation du métabolisme du sucre. En plus de ceux précédemment cités, d'autres métaux tels que le sodium, le potassium ou le cuivre, sont responsables de l'homéostasie, facilitent le transport d'électrons ou catalysent certaines transformations enzymatiques.[1]

Puisque la nature recourt spontanément aux métaux pour le bon fonctionnement des systèmes biologiques, ces derniers ne pourraient-il pas être utilisés à des fins diagnostiques ou thérapeutiques ? D'après Peter J. Sadler, la plupart des éléments de la classification périodique allant jusqu'au bismuth (Z = 83), peuvent être utilisés dans la conception de nouveaux médicaments ou en vue d'applications diagnostiques.[2]

Actuellement, la liste d'agents thérapeutiques basés sur des métaux inclut des complexes de platine (Cisplatine, anticancéreux), d'or (Auranofine, antiarthritique) ou encore d'antimoine (antiprotozoaire). D'un point de vue diagnostique, des agents de contraste contenant des isotopes métalliques radioactifs sont produits et administrés quotidiennement dans de nombreux hôpitaux. Parmi les plus connus, le technétium et l'indium sont utilisés pour la tomographie par émission monophotonique (SPECT), et le cuivre et le gallium sont utilisés en recherche pour la tomographie par émission de

positrons (TEP). L'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM) utilise également des complexes métalliques basés essentiellement sur le gadolinium afin d'améliorer le contraste des images obtenues. La famille des métaux lanthanidiques, dont le gadolinium fait partie, s'est particulièrement démarquée en raison de sa polyvalence. Réactivités particulières, propriétés optiques et magnétiques exceptionnelles, leur panel d'applications est considérable tant d'un point de vue thérapeutique (samarium, lutécium), que diagnostique (gadolinium, europium, terbium) (**Figure 1.1**).

Si les métaux présentent de nombreux aspects bénéfiques, ils peuvent cependant perturber l'équilibre biologique. Pour éviter cette potentielle toxicité, les ions sont administrés sous forme de chélates. Les ligands employés peuvent alors également faire varier l'efficacité du complexe, sa biodistribution, ainsi que son excrétion.

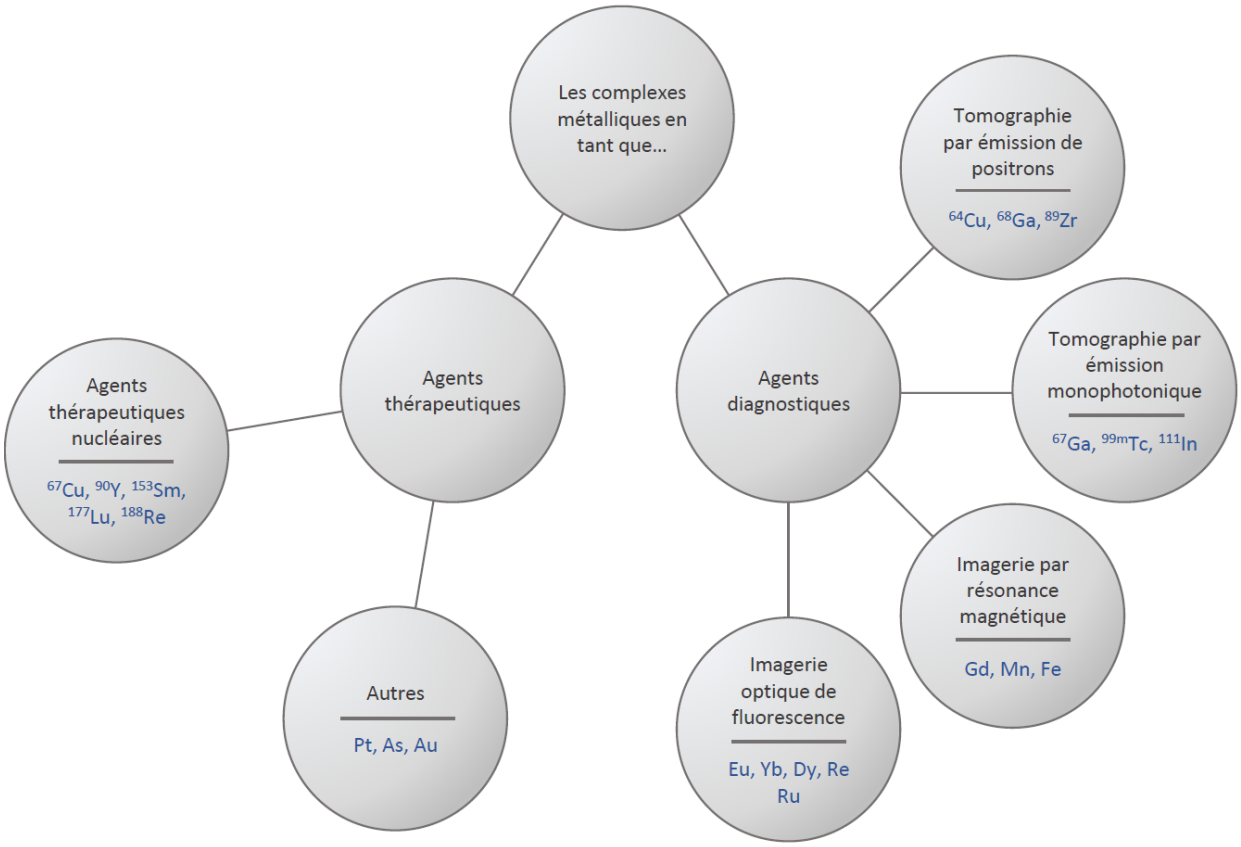


Figure 1.1. Exemples et applications de métaux en diagnostic et en thérapie. Adapté de l'article de Gaynor *et al.*[3]

1.1 Les lanthanides

L'appellation lanthanide regroupe une famille de 15 éléments de la classification périodique allant du lanthane (Z = 57) au lutécium (Z = 71). La série des lanthanides peut être étendue à l'yttrium et au scandium du fait de leurs propriétés chimiques et physiques quasiment similaires : l'ensemble s'appelant alors les « terres rares ».

1.1.1 Propriétés électroniques et chimiques des ions Ln(III)

Les lanthanides se caractérisent par le remplissage progressif de la sous-couche 4f. La perte d'un électron 4f et des deux électrons 6s conduit à l'ion lanthanide trivalent (Ln(III) ou Ln^{3+}) de configuration électronique [Xe] $4f^n$, qui est le degré d'oxydation le plus stable pour l'ensemble de la série (**Tableau 1.1**). D'autres degrés d'oxydation peuvent cependant être observés comme pour le cérium (+III et +IV) ou encore l'europium (+II et +III).

Nom	Numéro atomique	Symbole	Configuration électronique (Ln)	Configuration électronique (Ln^{3+})
Lanthane	57	La	[Xe] $4f^0$ $5d^1$ $6s^2$	[Xe] $4f^0$
Cérium	58	Ce	[Xe] $4f^1$ $5d^1$ $6s^2$	[Xe] $4f^1$
Praséodyme	59	Pr	[Xe] $4f^3$ $5d^0$ $6s^2$	[Xe] $4f^2$
Néodyme	60	Nd	[Xe] $4f^4$ $5d^0$ $6s^2$	[Xe] $4f^3$
Prométhium	61	Pm	[Xe] $4f^5$ $5d^0$ $6s^2$	[Xe] $4f^4$
Samarium	62	Sm	[Xe] $4f^6$ $5d^0$ $6s^2$	[Xe] $4f^5$
Europium	63	Eu	[Xe] $4f^7$ $5d^0$ $6s^2$	[Xe] $4f^6$
Gadolinium	64	Gd	[Xe] $4f^7$ $5d^1$ $6s^2$	[Xe] $4f^7$
Terbium	65	Tb	[Xe] $4f^9$ $5d^0$ $6s^2$	[Xe] $4f^8$
Dysprosium	66	Dy	[Xe] $4f^{10}$ $5d^0$ $6s^2$	[Xe] $4f^9$
Holmium	67	Ho	[Xe] $4f^{11}$ $5d^0$ $6s^2$	[Xe] $4f^{10}$
Erbium	68	Er	[Xe] $4f^{12}$ $5d^0$ $6s^2$	[Xe] $4f^{11}$
Thulium	69	Tm	[Xe] $4f^{13}$ $5d^0$ $6s^2$	[Xe] $4f^{12}$
Ytterbium	70	Yb	[Xe] $4f^{14}$ $5d^0$ $6s^2$	[Xe] $4f^{13}$
Lutécium	71	Lu	[Xe] $4f^{14}$ $5d^1$ $6s^2$	[Xe] $4f^{14}$

Tableau 1.1. Configuration électronique des lanthanides et de leurs ions trivalents

Le blindage imparfait du noyau des lanthanides par les électrons 4f entraîne une augmentation progressive de sa charge nucléaire. Une diminution lente du rayon ionique est donc observée avec l'augmentation du numéro atomique (contraction des sous-couches $5s^2$ et $5p^6$). Cette tendance est également dépendante du nombre de coordination du métal et est connue sous le nom de « contraction lanthanidique ». Les propriétés singulières des lanthanides, tant d'un point de vue chimique que spectroscopique, s'expliquent par le comportement de leurs orbitales de valence 4f. Ces orbitales subissent un fort effet de blindage par les sous-couches $5s^2$ et $5p^6$, les transformant alors en "orbitales de cœur". Enfouies dans le nuage électronique, elles sont peu sensibles à leur environnement chimique. Les orbitales 4f se recouvrent peu avec celles des ligands de sorte que la part de covalence dans l'établissement des liaisons chimiques soit très faible. L'interaction métal-ligand de leurs complexes est donc décrite par un modèle purement ionique. Du fait de la profondeur de ces électrons, l'effet de champ des ligands est très faible (de l'ordre de 500 cm^{-1} contre 5 000 à 30 000 cm^{-1} pour les métaux de transition) entraînant une absence de directionnalité des liaisons métal-ligand. L'organisation des complexes est donc gouvernée par (i) la minimisation de l'énergie électrostatique et (ii) la minimisation des contraintes stériques, sans réelle préférence en termes de nombre de coordination ou de géométrie. Le nombre de coordination le plus souvent observé est de 8 ou 9 en milieu aqueux, mais celui-ci peut varier de 6 à 12.[4] Généralement, une décroissance du nombre de coordination associée à la contraction lanthanidique est observée le long de la série (10 pour La^{3+}, 8 pour Lu^{3+}).

Les ions Ln(III) ont une densité de charge élevée et se comportent comme des acides de Lewis forts. Ils sont donc capables d'activer les molécules d'eau qui leurs sont coordinées, conduisant à la formation, à pH basique, d'hydroxocomplexes de lanthanides $Ln(OH)_3$ insolubles. D'après la classification de Pearson, les ions trivalents lanthanides sont des acides durs.[5] Ils formeront donc des édifices stables préférentiellement avec des ligands contenant des atomes donneurs durs tels que les atomes d'oxygène plutôt qu'avec des atomes donneurs mous comme l'azote ou le soufre. Ainsi, les ligands contenant des fonctions anioniques de types carboxylate, phosphonate, ou alcoolate sont de parfaits candidats. En tant que donneurs neutres, les amines polarisables seront préférées aux oxygènes des éthers.

1.1.2 Propriétés spectroscopiques et magnétiques des ions Ln(III)

Au sein de leurs complexes, les ions lanthanides expriment des propriétés spectroscopiques et magnétiques remarquables. Les transitions f-f, faisant intervenir des orbitales de même symétrie, sont formellement interdites par les règles de sélection (règle de Laporte et règle de spin). Elles apparaissent donc sous forme de fines raies d'émission de faible intensité ($\varepsilon < 10\ M^{-1}.cm^{-1}$), et sont caractéristiques de chaque ion. A l'exception du lanthane et du lutécium, tous les ions trivalents Ln(III) sont luminescents et leurs bandes d'émission couvrent une large gamme spectrale, de l'ultra-violet (Gd^{3+}) au proche infra-rouge (Nd^{3+}, Er^{3+}, Yb^{3+}), en passant par le visible (Sm^{3+}, Eu^{3+}, Tb^{3+}, Dy^{3+}) (**Figure 1.2**). Le retour à l'état fondamental des ions excités étant un processus également interdit, les lanthanides possèdent une durée de vie d'émission très longue : de l'ordre de la microseconde pour Nd^{3+} et Yb^{3+}, et pouvant aller jusqu'à la milliseconde pour Eu^{3+} et Tb^{3+}.

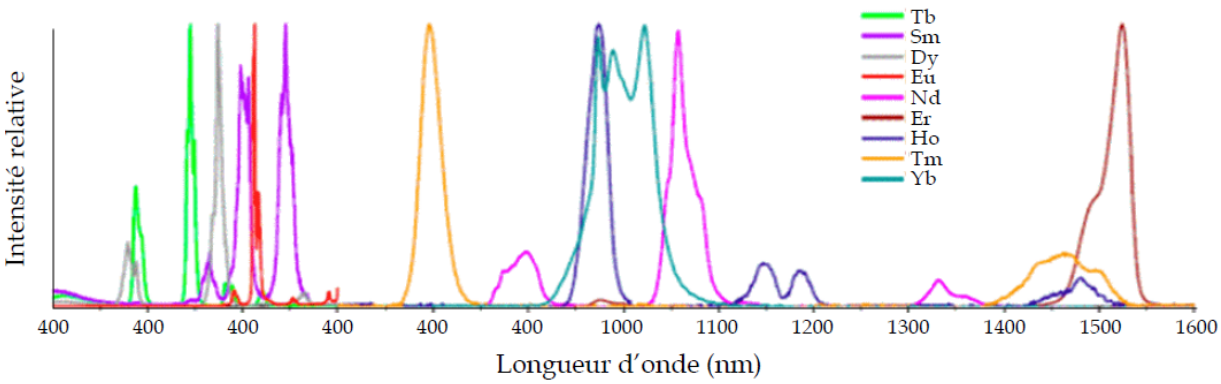


Figure 1.2. Spectres d'émission de différents complexes de lanthanides en solution [6-7]

Comme précisé précédemment, en raison du blindage par les orbitales $5s^2$ et $5p^6$, le champ des ligands a une faible influence sur les orbitales 4f. La longueur d'onde d'émission du métal ne sera donc pas influencée par la nature du ligand qui lui est coordiné.

Tous les ions lanthanides possédant des électrons 4f non appariés sont paramagnétiques. Le nombre maximum d'électrons célibataires n'est cependant atteint qu'avec l'ion Gd^{3+}, ce qui lui confère un moment magnétique élevé (S = 7/2). La symétrie de son état orbital S lui permet de proposer un temps de relaxation électronique long ($T_{1e} > 10^{-9}$ s) en comparaison à d'autres ions lanthanides (~ 10^{-13} s

pour Eu^{3+}, Yb^{3+} et Dy^{3+}). Ces deux caractéristiques font des complexes de gadolinium des agents de contraste largement utilisés pour l'imagerie par résonance magnétique.

1.1.3 A la recherche de ligands efficaces

Si la similitude des éléments de la série des lanthanides était autrefois un problème en regard de leur extraction sélective des minerais, elle peut aujourd'hui présenter des avantages majeurs. En effet, le cation d'un complexe de Ln(III) peut être remplacé par un autre lanthanide aux propriétés spectroscopiques et magnétiques différentes, permettant ainsi l'utilisation de techniques d'analyse complémentaires, et sans modifier le comportement chimique de l'édifice moléculaire.[8,9,10] Les propriétés de ces complexes dépendent cependant fortement du contrôle de la sphère de coordination du métal. Une attention particulière doit donc être portée à la conception des ligands.

La formation d'un complexe est le résultat de l'attraction entre un ligand et un cation métallique, impliquant la désolvatation partielle ou totale de ce dernier. En d'autres termes, les sites de coordination du ligand vont interagir avec la surface de l'ion métallique, excluant alors les molécules d'eau coordinées et modifiant ainsi sa première sphère de coordination. D'un point de vue thermodynamique, l'énergie mise en jeu lors de la formation d'un complexe doit être la plus faible possible. La diminution du degré d'hydratation du métal et du ligand génère une entropie positive, ce qui est un facteur favorable à la réaction de complexation. L'étape de déshydration est cependant un processus endothermique ($\Delta H > 0$) défavorable, car l'énergie nécessaire pour briser les liaisons Ln-solvant et ligand-solvant est rarement compensée par la formation des liaisons électrostatiques ligand-Ln. La réaction de complexation est donc gouvernée par l'entropie et ne deviendra compétitive que par l'utilisation de ligands polydentes, qui, en raison de l'effet chélate (effet entropique), peuvent surmonter cette difficulté et former des complexes très stables même en milieu aqueux.[11]

Afin d'augmenter la stabilité thermodynamique et l'inertie cinétique du complexe, l'interaction ligand-métal doit être optimisée. Ainsi, puisque les ions Ln(III)

sont des acides durs, la stabilité de l'édifice sera d'autant plus forte que le nombre de sites anioniques (bases dures) du ligand sera grand et complétera la sphère de coordination du métal. Les β-dicétonates et les cryptands forment des chélates de lanthanides stables, mais les dérivés polyaminocarboxylates restent les ligands les plus répandus pour la complexation de ces éléments en milieu aqueux.

1.2 Les ligands polyaminocarboxyliques

Les ligands polyaminocarboxyliques possèdent une structure linéaire ou cyclique polydentée anionique permettant de former des complexes particulièrement stables et solubles en milieu aqueux avec une large gamme de cations métalliques. La stabilité de ces complexes provient de la combinaison de plusieurs effets tels que (i) la basicité des fonctions amine, (ii) la compensation de la charge positive du cation par les fonctions carboxylate, ainsi que (iii) la formation de cycles à cinq chaînons entre le ligand et le centre métallique.[12]

1.2.1 Les ligands polyaminocarboxyliques linéaires

Le ligand acyclique le plus couramment employé en imagerie est probablement le DTPA, dont la synthèse a été décrite pour la première fois en 1956 (**Figure 1.3**).[13] Le complexe de gadolinium du DTPA, a été le premier agent de contraste pour l'IRM approuvé pour une utilisation clinique (Magnevist®), et est toujours utilisé aujourd'hui. Ce ligand permet également la coordination de radionucléides (^{111}In, ^{90}Y, ^{99m}Tc ou encore $^{67/68}$Ga) pour des applications en médecine nucléaire.

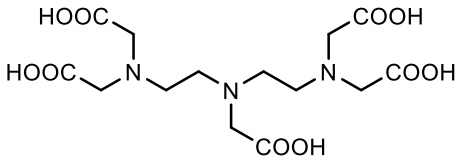


Figure 1.3. Structure du DTPA

Les ligands acycliques ne nécessitent généralement pas de conditions drastiques pour la complexation d'ions métalliques (cinétique de complexation rapide à température ambiante), mais sont cependant plus enclins à libérer l'ion métallique *in*

vivo par réaction de transmétallation ou de transchélation. Par exemple, Thomas Grobner met en évidence en 2006 le lien entre le développement de fibroses néphrogéniques systémiques et l'administration d'agents de contraste de gadolinium dérivés du DTPA (DTPA-BMA) chez les patients atteints d'insuffisance rénale.[14,15] Cette toxicité serait due au relargage de l'ion Gd^{3+} lié à la dissociation du chélate, ce qui montre qu'en plus de la stabilité thermodynamique, l'inertie cinétique est un facteur à ne pas négliger lors de la conception de complexes métalliques en tant que sondes diagnostiques pour l'imagerie. L'utilisation de ligands à structure macrocyclique plutôt que linéaire est cependant susceptible de pallier cet handicap.

1.2.2 Les ligands polyaminocarboxyliques macrocycliques

1.2.2.1 Généralités sur les ligands macrocycliques

Par définition, les ligands macrocycliques sont des ligands polydentes, synthétiques ou naturels, incorporant dans leur structure au moins trois atomes donneurs et dont la cavité est constituée d'au moins neuf atomes.[16] La caractéristique principale des complexes macrocycliques est qu'ils possèdent de très fortes stabilités thermodynamiques et cinétiques, en comparaison de leurs homologues linéaires.

Effet chélate

L'effet chélate reflète la stabilité accrue des complexes de ligands bidentes ou polydentes face à celle de complexes de ligands monodentes à nombre de fonctions coordinantes égal. Plus grand est le nombre de sites donneurs du ligand polydente, plus le complexe formé sera stable (**Tableau 1.2**).

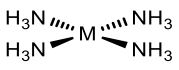
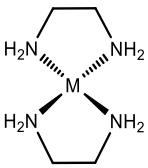
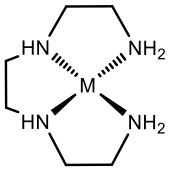
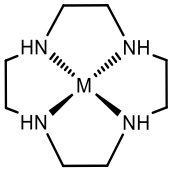
	Coordination	**Effet chélate**		**Effet macrocyclique**
				
log K_{LPb}	3,4	8,8	10,4	15,9
log K_{LCu}	13,0	19,6	20,1	23,3

Tableau 1.2. Constantes de stabilité de complexes de Pb^{2+} et Cu^{2+} suivant la nature du ligand [17]

Effet macrocyclique

De la même manière, les ligands polydentes de type macrocyclique forment des complexes plus stables que leurs parents acycliques.[18] Cette plus forte stabilité viendrait de la combinaison de l'effet entropique lié à l'effet chélate ainsi que de la contribution énergétique provenant de la nature préorganisée du ligand. Plus celui-ci sera contraint dans une symétrie adaptée au métal, plus le complexe résultant sera stable.

Si les ligands macrocycliques forment des complexes thermodynamiquement plus stables, ils sont également cinétiquement plus inertes, tant d'un point de vue de la dissociation que de la complexation, ce qui peut poser problème dans le cas de l'utilisation de radionucléide à courte durée de demi-vie. Plusieurs paramètres peuvent expliquer ce comportement : la répulsion électrostatique, la rigidité du squelette macrocyclique et la gêne stérique liée à la substitution des hétéroatomes par des fonctions coordinantes supplémentaires.

1.2.2.2 Les macrocycles polyaminocarboxyliques en imagerie

Comme précisé précédemment, malgré le fait que les ligands polyamino-carboxyliques macrocycliques possèdent les mêmes types d'atomes donneurs que leurs analogues linéaires (azote de fonctions amine et oxygène de fonctions carboxylate dans ce cas), leurs propriétés de coordination diffèrent grandement. Les principaux représentants de ce type de ligands sont probablement le NOTA, le DOTA et le TETA, qui sont des dérivés fonctionnalisés des structures TACN, cyclène et cyclame respectivement (**Figure 1.4**). Ces trois plateformes montrent des propriétés de coordination exceptionnelles vis-à-vis d'une large gamme de cations métalliques de degrés d'oxydation +II ou +III.

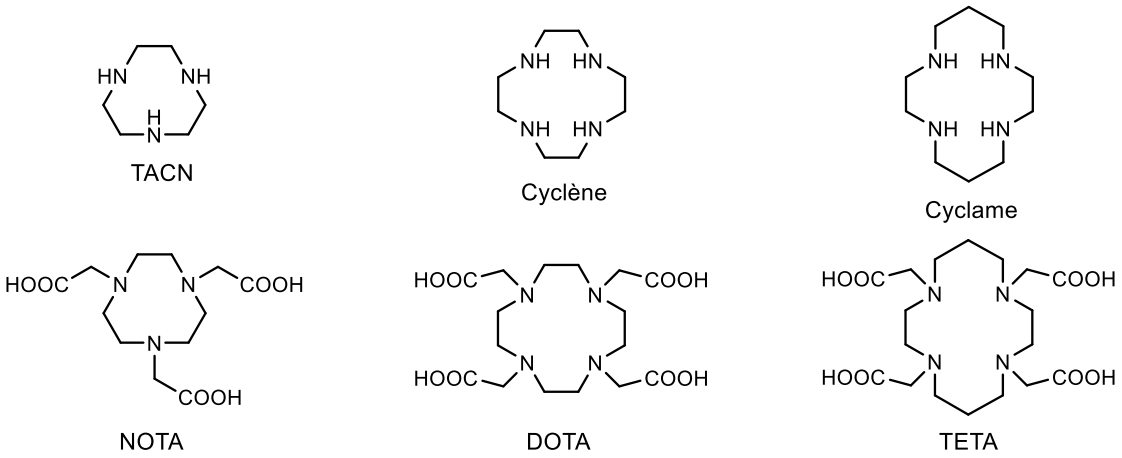


Figure 1.4. Agents chélatants macrocycliques les plus utilisés

Le NOTA et ses dérivés

Le NOTA (1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid), dont la synthèse a été décrite pour la première fois en 1977, est par définition le plus petit membre de la famille des ligands macrocycliques. La petite taille de sa cavité et la présence de six fonctions coordinantes (hexadenticité) en font un très bon agent complexant pour les métaux tels que le cuivre, le gallium ou l'indium. Le NOTA est considéré comme étant la référence pour la chélation de l'ion Ga^{3+} avec des conditions de radiomarquage favorables (30 à 60 minutes à température ambiante), une constante de stabilité thermodynamique élevée (log K_{GaL} = 31,0 contre 21,3 pour le DOTA), et une excellente stabilité *in vivo*.[19,20] Ce ligand montre également des propriétés de radiomarquage envers le cuivre-64 supérieures à celles des ligands courants tels que le DOTA ou le TETA (30 à 60 minutes à température ambiante), le rendant compatible pour des couplages avec des biovecteurs sensibles à la température (anticorps). En raison de ces propriétés exceptionnelles vis-à-vis de métaux à forts potentiels cliniques, plusieurs ligands bifonctionnels chélatants basés sur le NOTA ont été développés par des méthodes de *N*- ou de *C*- fonctionnalisation (**Figure 1.5**).

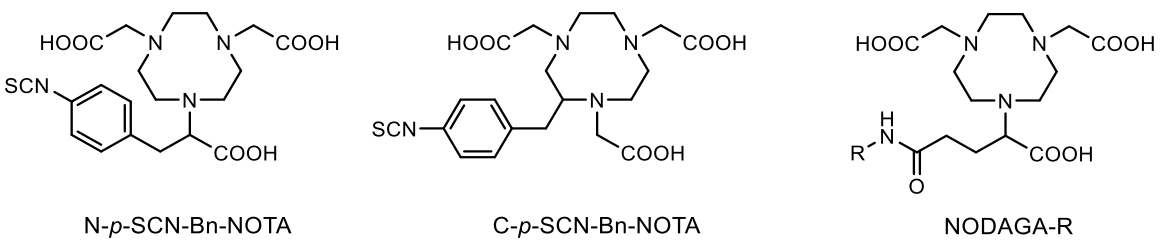


Figure 1.5. Ligands bifonctionnels chélatants dérivés du NOTA

La synthèse du complexe de cuivre-64 dérivé du C-*p*-SCN-Bn-NOTA couplé au RGD (peptide cyclique ciblant les récepteurs $\alpha_v\beta_3$ intégrines) ou à la bombesine (peptide ciblant les récepteurs peptidiques libérant la gastrine) a été reportée.[21] Bien que le marquage de ces bioconjugués soit rapide (15 minutes à 40°C), ils présentent cependant une forte absorption par le foie, suggérant une faible stabilité *in vivo*. Le NODAGA-R conserve une sphère de coordination hexadente et possède les mêmes propriétés de radiomarquage et de stabilité que le NOTA. En 2011, son conjugué ^{64}Cu-NODAGA-c(RGDfK), a montré une radiosynthèse aisée, une stabilité *in vivo* prometteuse ainsi qu'une bonne absorption par les cellules tumorales.[22]

Le DOTA et ses dérivés

En raison de sa capacité à très fortement chélater un grand nombre de cations métalliques et en particulier les lanthanides, le DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid) est probablement le ligand polyaminocarboxylique macrocyclique octadentate le plus polyvalent et le plus utilisé en imagerie.[23] Sa première application a été sous forme de complexe de gadolinium pour une utilisation en imagerie par résonance magnétique (DOTAREM®). La rigidité et la préorganisation fournies par l'anneau macrocyclique, ainsi que l'adéquation entre la taille de la cavité et le rayon ionique du cation Gd^{3+}, conduisent à la formation d'un complexe monoaqua très stable (log K_{GdDOTA} = 24,7) et cinétiquement inerte,[24] faisant du Gd-DOTA l'une des références actuelles en termes d'agent de contraste (**Figure 1.6**).

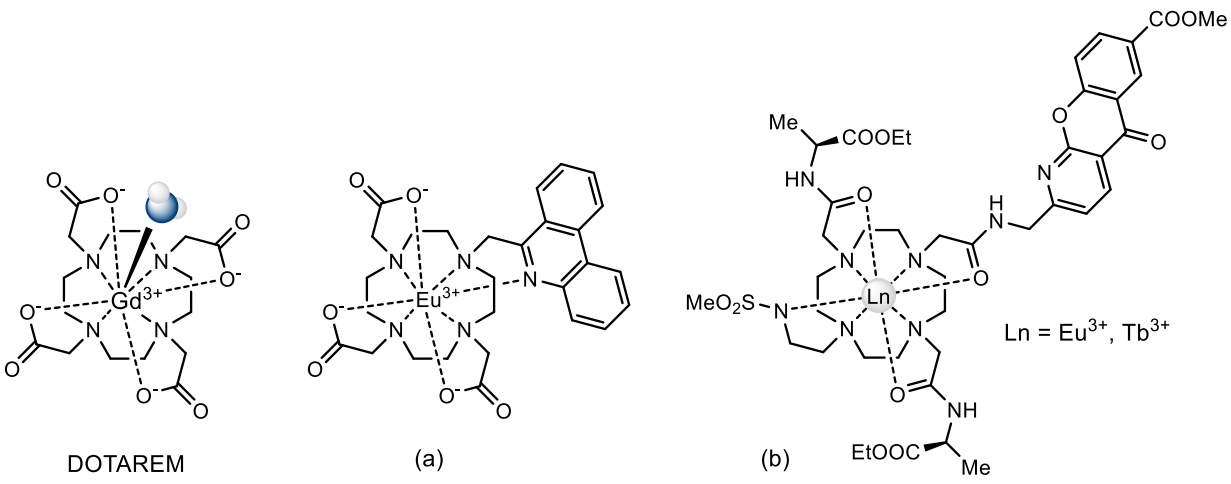


Figure 1.6. Complexes de lanthanides basés sur le DOTA (a) réf. 25 (b) réf. 26

Les dérivés du cyclène ont également été largement exploités pour l'imagerie de fluorescence grâce aux complexes de lanthanides luminescents. La facilité avec laquelle cette plateforme peut être fonctionnalisée a non seulement donné lieu au développement de ligands capables de saturer la sphère de coordination du métal, mais également d'incorporer des chromophores (antennes) permettant alors la sensibilisation d'ions lanthanide. Ainsi, Beeby *et al*. ont mis au point des complexes d'europium dérivés du DOTA dans lequel une fonction carboxylique est substituée par un motif phénanthridine. Ces structures permettent de visualiser la surface de particules de silice en s'affranchissant du signal de fond grâce à l'utilisation de la microscopie de fluorescence en temps résolu (**§ 2.3.3.1**).[25] L'équipe de Parker a développé une large gamme de complexes monométalliques de lanthanides luminescents (principalement Eu^{3+} et Tb^{3+}) pour une application en imagerie cellulaire. L'un d'entre eux, basé sur l'utilisation d'azaxanthone en tant qu'antenne permet notamment de rendre compte de la variation du pH lysosomal.[26]

Malgré un nombre de coordination généralement autour de six, le DOTA permet également la chélation de nombreux radionucléides trivalents (^{68}Ga, ^{90}Y) et divalents (^{64}Cu) pour des applications en imagerie nucléaire et en radiothérapie. Si la géométrie de coordination n'est pas optimale, les complexes formés n'en restent pas moins stables et les fonctions non-coordinées au centre métallique peuvent être employées à des fins de vectorisation (**Tableau 1.3**). Bien que les conditions de radiomarquage (cinétique et chauffage) ne soient pas compatibles avec certains vecteurs biologiques, le DOTA demeure néanmoins une référence pour la complexation des radioisotopes ^{177}Lu, ^{111}In et ^{90}Y.

	$^{64}Cu^{2+}$	$^{67/68}Ga^{3+}$	$^{111}In^{3+}$	$^{177}Lu^{3+}$	$^{90}Y^{3+}$
log K_{MDOTA}	22,2 ; 22,7	21,3	23,9	23,5 ; 21,6	24,3 ; 24,9
Conditions de radiomarquage	25-90 °C 30-60 min	37-90 °C 10-30 min	37-100 °C 15-60 min	25-100 °C 15-90 min	25-100 °C 15-90 min

Tableau 1.3. Constantes de stabilité et conditions de radiomarquage de quelques complexes issus du DOTA [27]

Comme précisé précédemment, plusieurs paramètres sont à prendre en compte lors de la conception d'un agent bifonctionnel chélatant : les stabilités thermodynamique et cinétique, mais également l'influence du ligand sur le vecteur. Ainsi, bien que le NOTA soit la référence en ce qui concerne la complexation du ^{68}Ga, le DOTA peut parfois présenter de meilleures propriétés pour des applications *in vivo*.[28] Pour un descriptif plus détaillé des applications du DOTA et de ses dérivés, le lecteur est invité à consulter la revue de Stasiuk *et al*.[29]

Le TETA et ses dérivés

Le TETA (1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane-1,4,8,11-tetracetic acid) est un analogue octadentate à 14 chaînons du DOTA dont la première synthèse a été décrite par Stetter en 1981.[30] Si sa plus grande cavité permet d'élargir la gamme de cations métalliques complexés par les ligands polyaminocarboxylates, l'augmentation de la taille de l'anneau macrocyclique de deux carbones entraîne la formation de complexes de lanthanides jusqu'à 10 ordres de grandeur moins stables que le DOTA (log K_{GdTETA} = 15,8 et log K_{GdDOTA} = 24,7). Les ligands bifonctionnels chélatants dérivés du TETA sont donc essentiellement employés pour la complexation du cuivre-64 et du cuivre-67 pour l'imagerie et la radiothérapie (log K_{CuTETA} = 21,9). Le TETA propose des conditions de radiomarquage intéressantes à température ambiante, cependant son manque d'inertie cinétique et sa stabilité globale *in vivo* ont fait que d'autres agents chélatants tels que le CB-TE2A, ont dû être envisagés (**Figure 1.7**).

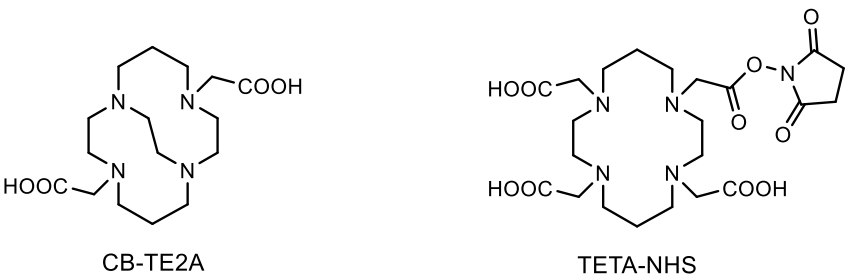


Figure 1.7. Exemples de ligands dérivés du TETA

Malgré des conditions de radiomarquage difficiles pour le ^{64}Cu (60 minutes à 95 °C) et la perte de deux fonctions complexantes par rapport au ligand TETA, le CB-TE2A possède, grâce à la rigidité apportée par le pont éthylénique intracyclique, une meilleure stabilité *in vivo* que les ligands courants comme le DOTA ou le NOTA.[31]

D'autre part, la conversion du TETA en son dérivé mono-ester de NHS a permis le couplage du ligand à l'octréotide (peptide synthétique dérivé de la somatostatine), et une fois complexé au ^{64}Cu, ce bioconjugué a montré de très bonnes sélectivité et sensibilité.[32] Cette stratégie permet de cibler des récepteurs cellulaires spécifiques dans l'organisme, en plus de la complexation du cation métallique. Elle s'inscrit dans le cadre plus général des agents bifonctionnels chélatants.

1.2.3 Les agents bifonctionnels chélatants

La nécessité de mettre en évidence des processus biologiques spécifiques ou de cibler un certain type de cellules ou de tumeurs a conduit à la conception de sondes dites vectorisées. Ces sondes peuvent être divisées en trois parties : un vecteur biologique, un agent bifonctionnel chélatant et un ion métallique (**Figure 1.8**).

Les biomolécules employées sont généralement des peptides, des anticorps monoclonaux ou des nanoparticules permettant le transport du métal vers un site spécifique. Le choix de l'ion métallique va définir le type d'application de la sonde vectorisée. A des fins diagnostiques, les composés contenant des ions paramagnétiques (Gd^{3+}, Mn^{2+}) sont largement utilisés en tant qu'agents de contraste dans l'imagerie par résonance magnétique,[33,34] alors que les complexes de radionucléides émettant des rayons gamma (^{99m}Tc, ^{111}In) ou des positrons (^{68}Ga, ^{64}Cu) sont employés en imagerie nucléaire. Les radionucléides produisant des particules bêta moins (^{90}Y, ^{177}Lu) sont, quant à eux, utilisés en thérapie.[27] Des bioconjugués lanthanidiques luminescents (Eu^{3+}, Tb^{3+}) ont également été développés pour le ciblage spécifique d'analytes dans les bioanalyses, et pour l'imagerie cellulaire ou tissulaire grâce à la microscopie de fluorescence basée sur la technique de détection en temps résolu.[35,36]

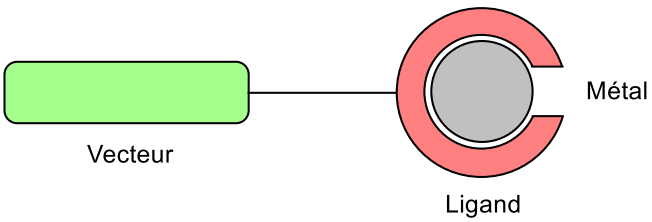


Figure 1.8. Structure d'une sonde vectorisée

La méthode classique pour lier un ion métallique à une biomolécule est au moyen d'un agent bifonctionnel chélatant (LBC). Les LBC sont des espèces capables de chélater l'ion métallique d'une part, et disponsant d'une fonction réactive permettant le couplage covalent à un vecteur biologique d'autre part. Pour cette dernière fonction, les techniques de bioconjugaison communément employées utilisent des groupes fonctionnels capables de réagir facilement avec ceux présents sur les vecteurs, tels que des acides carboxyliques ou des esters activés (par exemple un ester de *N*-hydroxysuccinimide) pour des couplages amides, des isothiocyanates pour des couplages *via* un lien thiourée et des maléimides pour former des liens thioéther (**Tableau 1.4**). Les réactions de « click chemistry », formant un lien triazole par cycloaddition catalysée au cuivre(I) entre un alcyne et un azoture, sont également de plus en plus utilisées.

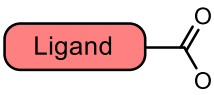
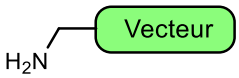
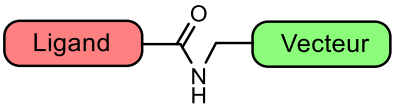
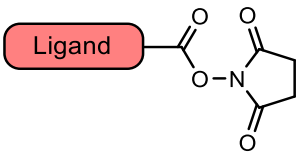
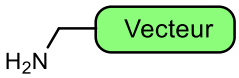
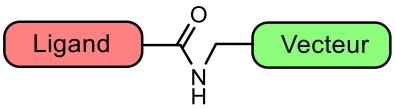
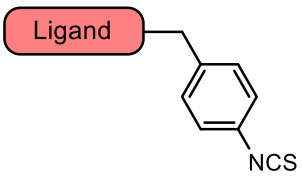
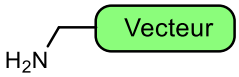
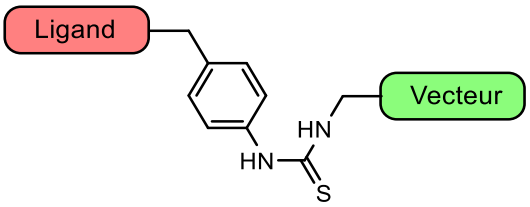
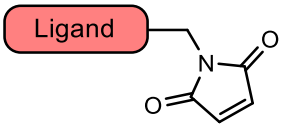
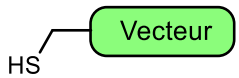
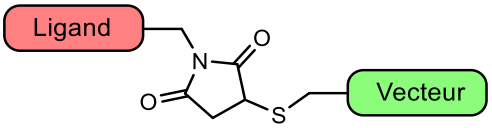
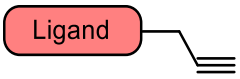
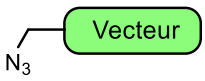
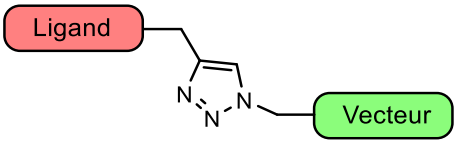
LBC	Fonction cible	Produit de couplage	Lien
			Amide
			Amide
			Thiourée
			Thioéther
			Triazole

Tableau 1.4. Exemples de réactions de bioconjugaison. Inspiré de la revue de Price *et al.*[27]

Parmi le grand nombre de LBC décrits dans la littérature, ceux basés sur les ligands polyaminocarboxyliques sont les plus utilisés. La principale raison est que ces ligands forment des complexes très stables avec une grande variété d'ions métalliques, empêchant alors leur relargage *in vivo*. Lors de la conception d'agents bifonctionnels

chélatants, une attention particulière doit également être portée au maintien de la sphère de coordination de l'agent chélatant : son couplage à la biomolécule vectrice ne doit pas se faire au détriment de la stabilité du complexe. Ainsi, les réactions de conjugaison sont plutôt réalisées *via* des fonctionnalisations présentes sur le squelette carboné ou en α-position d'une fonction coordinante. L'introduction d'un vecteur à partir d'une fonction acétate coordinante par le biais d'une fonction amide est également décrite dans la littérature. Toutefois, la substitution d'une fonction acétate par une fonctions amide dans la sphère de coordination d'un ion lanthanide se traduit par une diminution de la constante de stabilité thermodynamique du complexe correspondant. Par exemple, la substitution de deux fonctions acétate par deux fonctions amide se traduit par une chute de la valeur de la constante de stabilité de plus de cinq ordres de grandeur dans le cas du complexe Gd-DTPA (log K_{GdDTPA} = 22,46 et log $K_{GdDTPA\text{-}BMA}$ = 16,85).[37] Un autre paramètre à prendre en compte lors de la conception de bioconjugués est la conservation de l'efficacité et de la sélectivité du vecteur employé.

1.3 La place du PCTA[12] parmi les ligands polyaminocarboxyliques

La recherche de composés visant à pallier la cinétique de formation lente des complexes macrocycliques basés sur le DOTA ou le TETA a conduit à la synthèse d'autres structures au degré de préorganisation plus élevé, parmi lesquelles le PCTA[12] (Pyridine containing Cyclen Triacetic Acid), un dérivé du cyclène ou un motif aminodiéthylène est remplacé par un motif 2,6-méthylènepyridine (**Figure 1.9**). Costa *et al.* ont montré que l'incorporation d'une pyridine au sein de tétraamines cycliques abaissait les constantes de stabilité des complexes formés avec des ions divalents, tout en augmentant leur cinétique de complexation.[38]

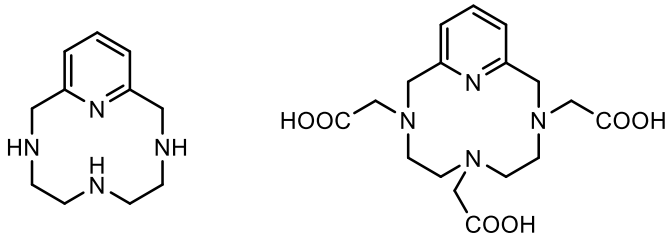


Figure 1.9. Structure du pyclène (à gauche) et du PCTA[12] (à droite)

Stetter *et al.* ont été les premiers à proposer la synthèse et à déterminer les paramètres thermodynamiques de complexes du PCTA[12] avec un certain nombre de métaux divalents.[30] Delgado *et al.* ont repris et élargi ces recherches à quelques métaux de transition trivalents, puis Tircsó *et al*. se sont finalement intéressés aux complexes de lanthanides du PCTA[12] une dizaine d'années plus tard.[39,40]

1.3.1 Considérations thermodynamiques et cinétiques

Afin de permettre une meilleure approche des potentialités du PCTA[12], d'autres ligands polyaminocarboxyliques linéaires ou cycliques sont présentés ci-après pour une étude comparative. En plus du DTPA, du NOTA et du DOTA déjà évoqués, deux autres chélatants heptadentes sont considérés (**Figure 1.10**). Le chélatant Py a initialement été développé en tant que sonde bimodale IRM/imagerie optique, et est l'homologue acyclique du PCTA[12].[41,42,43,44] Le second est le DO3A, un dérivé heptadente du DOTA proposant seulement trois groupements acide acétique.

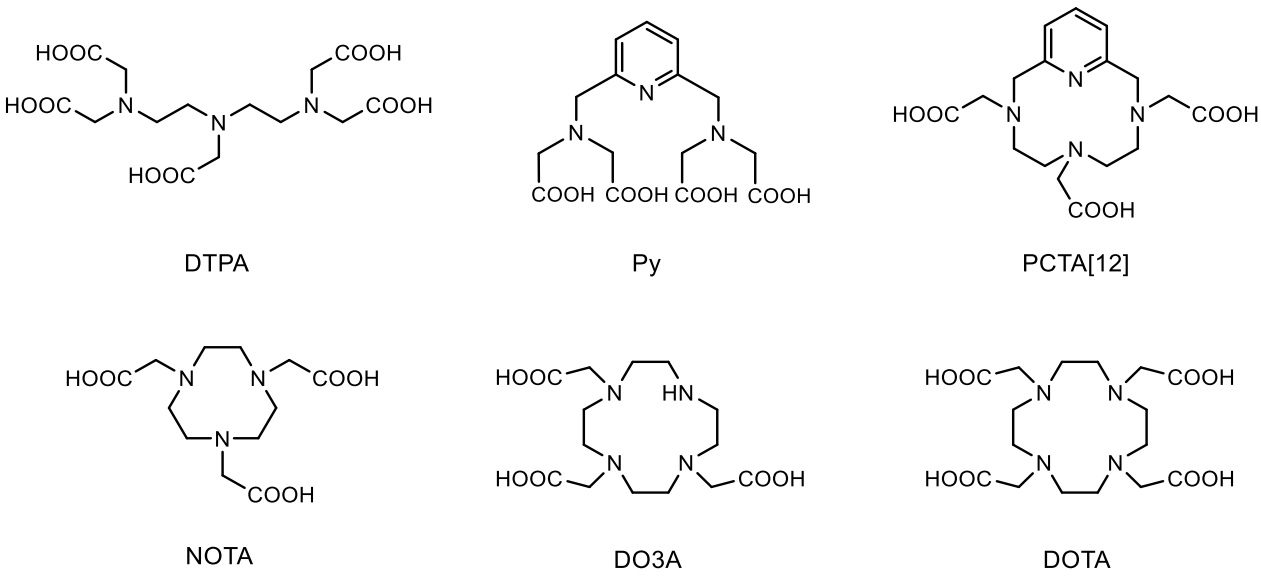


Figure 1.10. Différents ligands polyaminocarboxyliques présentés à des fins de comparaison

1.3.1.1 Stabilité thermodynamique

La stabilité thermodynamique d'un complexe reflète la force de l'interaction entre un ligand et un métal donné. Cette grandeur est caractérisée par une constante (log K_{ML}), et est dépendante de plusieurs paramètres tels que la basicité totale ou la

denticité du ligand. De manière générale, les ligands macrocycliques ayant le plus d'atomes donneurs basiques forment les complexes les plus stables thermodynamiquement.[45] De plus, la stabilité des complexes de lanthanides est relative à la basicité totale du ligand ($\Sigma \log K_i$), il est donc à prévoir que les chélates dérivés du PCTA[12] soient moins stables que ceux du DO3A, du DTPA, ou du DOTA (**Tableau 1.5**).

	NOTA [40]	**Py** [43]	**PCTA** [40]	**DO3A** [40]	**DTPA** [12]	**DOTA** [40]
$\log K_1$	11,96	8,95	**11,36**	11,59	10,58	12,09
$\log K_2$	5,65	7,85	**7,35**	9,24	8,60	9,70
$\log K_3$	3,17	3,38	**3,83**	4,43	4,30	4,50
$\log K_4$	-	2,48	**2,12**	3,48	2,59	4,14
$\log K_5$	-	-	**1,29**	-	1,08	2,32
$\Sigma \log K_i$	20,78	22,66	**25,95**	28,74	27,15	32,75
$\log K_{CaL}$	8,92	9,43	**12,72**	12,6	10,8	17,23
$\log K_{CuL}$	21,63	15,69	**18,79**	25,6	21,5	22,25
$\log K_{ZnL}$	18,3	15,84	**20,48**	21,8	18,6	21,1
$\log K_{YL}$	-	-	**20,3**	21,1	22,1	24,3
$\log K_{CeL}$	13,2	-	**18,2**	19,7	20,5	23,4
$\log K_{EuL}$	13,9	-	**20,3**	-	22,4	23,5
$\log K_{GdL}$	14,3	18,60	**20,4**	21,1	22,5	24,7
$\log K_{YbL}$	15,4	-	**20,6**	23,0	22,6	25,0
Fonctions coordinantes	6	7	**7**	7	8	8

Tableau 1.5 Constantes de protonation et constantes de stabilité de complexes polyamino-carboxyliques vis-à-vis de cations divalents et trivalents en milieu aqueux

En prenant le gadolinium comme exemple, les constantes de stabilité thermodynamique ($\log K_{GdL}$) du PCTA[12], du DO3A et du DOTA sont respectivement de 20,4, 21,1, et 24,7, pour des valeurs de constantes de basicité totale de 25,95, 28,74 et 32,75. Les complexes de métaux de transition et le complexe de gadolinium du PCTA[12] sont respectivement jusqu'à quatre ordres de grandeur et près de deux ordres de grandeur plus élevés que leurs homologues acycliques issus du ligand Py ($\log K_{GdPy} = 18,6$), mettant en évidence l'influence de l'effet macrocyclique

sur la stabilité des complexes. Trois autres considérations peuvent également être observées :

- parmi tous les ligands heptadentes, donc à nombre de fonctions coordinantes égal, le PCTA[12] forme des complexes cent fois plus stables que son homologue linéaire, et presque aussi stables que ceux du DO3A,

- bien que plus rigide, la cavité du PCTA[12] semble être parfaitement adaptée à la coordination des lanthanides et forme des complexes dont les constantes de stabilité sont jusqu'à six ordres de grandeur plus élevées que celles du NOTA (log K_{GdNOTA} = 14,3),

- la plus haute stabilité (opposée à ce qu'aurait prédit la série d'Irving-William) de $[Zn(PCTA)]^-$ comparée à celle de $[Cu(PCTA)]^-$ montre que le PCTA[12] pourrait être utilisé à des fins de complexation sélective du cation Zn^{2+},

- dans le cas du PCTA[12], Tircsó *et al.* rapportent des valeurs de constantes de stabilité des complexes d'ions lanthanides similaires à celle du complexe de zinc (log K_{ZnPCTA} = 20.48) contrairement à ce qu'avait rapporté Delgado *et al*. (log K_{ZnPCTA} = 18.22).[39,40] Des réactions de transmétallation entre ces complexes ne sont donc pas à exclure.

1.3.1.2 Inertie cinétique

La détermination de la constante de stabilité thermodynamique est un critère incontournable pour la caractérisation d'un complexe métallique. Plusieurs publications ont cependant mis en évidence l'importance de l'évaluation de la stabilité cinétique de ces complexes si une application *in vivo* est envisagée. D'autres facteurs tels que le pH, la résistance à la transmétallation ou à la transchélation sont en effet à prendre en compte lorsque la stabilité des complexes d'ions lanthanides en milieux biologiques est évoquée. La présence d'ions endogènes compétiteurs comme le zinc, le cuivre ou le fer, ou la grande affinité des lanthanides pour les ions phosphates, citrates ou carbonates peuvent déplacer l'équilibre de complexation et conduire au relargage *in vivo* du métal. La manière la plus simple d'appréhender l'inertie cinétique d'un complexe est de le placer en milieu acide (*i.e*. dans un état thermodynamiquement

instable), et de mesurer, suivant les techniques employées, l'évolution de sa concentration ou celle de l'ion dissocié en fonction du temps. Une constante de vitesse de dissociation peut alors être déterminée, caractérisant la capacité du complexe à se dissocier. Plus la valeur de cette constante sera grande, plus le complexe se dissociera facilement (**Tableau 1.6**).

	DTPA	DO3A	PCTA	DOTA
Ce^{3+}	-	$1{,}1.10^{-1}$	**$9{,}6.10^{-4}$**	8.10^{-4}
Eu^{3+}	-	-	**$5{,}1.10^{-4}$**	$1{,}5.10^{-5}$
Gd^{3+}	0,6	$1{,}6.10^{-3}$	**-**	$8{,}4.10^{-6}$

Tableau 1.6 Constantes de vitesse ($M^{-1}.s^{-1}$) caractérisant la dissociation de complexes issus de ligands polyaminocarboxyliques linéaires ou cycliques (I = 1,0 M KCl 25 °C pour le PCTA)[40,46]

Comme attendu, le chélate de gadolinium basé sur le ligand linéaire DTPA est celui qui se dissocie le plus rapidement. En ce qui concerne les macrocycles, la comparaison des données montre que la perte d'une des fonctions acétate du DOTA, donc le passage d'un ligand octadente à un ligand heptadente, engendre une augmentation drastique de la constante de vitesse de dissociation. Cependant, si un noyau pyridine est introduit dans le macrocycle comme dans le cas du PCTA[12], les complexes formés restent cinétiquement inertes.

Bien qu'important, ce type d'études ne doit cependant pas exclure le recours à des tests permettant d'évaluer une stabilité cinétique à pH physiologique, notamment vis-à-vis des réactions de transmétallation et de transchélation.

1.3.1.3 Cinétique de formation

La cinétique de complexation est également un critère important, notamment dans le cadre de la conception de radiopharmaceutiques. Celle-ci dépend de plusieurs facteurs facilement contrôlables tels que le pH, la température ou la concentration des réactifs, mais également de la structure du ligand. Si les complexes issus de ligands linéaires se dissocient plus facilement, ils présentent l'avantage d'une cinétique de formation rapide du fait de la plus haute flexibilité de leur structure. Lorsqu'un

complexe basé sur un ligand polyaminocarboxylique acyclique se forme, l'ion lanthanide est d'abord électrostatiquement attiré par les charges négatives des fonctions acétate, puis, en s'organisant autour de lui, le squelette aminé permet d'exclure les molécules d'eau de sa première sphère de coordination. Dans le cas d'un ligand macrocyclique, la même étape d'attraction de l'ion par les fonctions acétate a lieu mais le ligand étant plus rigide, l'encapsulation de l'ion dans la cavité est plus longue. De plus, les amines macrocycliques ont tendance à être plus basiques que les amines linéaires, une première étape de déprotonation peut donc être nécessaire, abaissant encore la vitesse de complexation.[47] Egalement, il est possible de mesurer la vitesse de formation d'un complexe en suivant l'évolution de sa concentration en fonction du temps. Plus la valeur de la constante de vitesse sera grande, plus la cinétique de formation sera rapide (**Tableau 1.7**).

	DOTA	**DO3A**	**PCTA**
Ce^{3+}	$3{,}5.10^{6}$	-	**$9{,}7.10^{7}$**
Eu^{3+}	$1{,}1.10^{7}$	-	**$1{,}7.10^{8}$**
Gd^{3+}	$5{,}9.10^{6}$	$2{,}1.10^{7}$	**$1{,}1.10^{8}$**

Tableau 1.7 Constantes de vitesse ($M^{-1}.s^{-1}$) caractérisant la formation de complexes issus de ligands polyaminocarboxyliques cycliques (I = 1,0 M KCl 25 °C pour le PCTA)[40]

Les fonctions amine du PCTA[12] sont moins basiques que celles du DO3A ou du DOTA, il formerait donc, *a priori*, des complexes plus facilement. Les valeurs de constantes de formation confirment cette hypothèse, et montrent que la cinétique de complexation du PCTA[12] peut aller jusqu'à près de vingt fois plus vite que celle du DOTA dans le cas du gadolinium. La nature préorganisée du ligand due à la présence du noyau pyridine expliquerait, au moins en partie, ces résultats.

1.3.2 Autres considérations

En plus de paramètres thermodynamiques et cinétiques largement acceptables, le PCTA[12] propose d'autres avantages tels que (i) la présence d'un chromophore intracyclique rendant possible l'effet d'antenne pour la sensibilisation d'ions lanthanidiques luminescents en vue d'applications en imagerie optique, et (ii) la coordination de deux molécules d'eau dans la première sphère de coordination des

lanthanides, un paramètre important pour une utilisation en imagerie par résonance magnétique.[48]

1.4 Conclusion : intérêt de la plateforme

Si le PCTA[12] est un ligand moins étudié que ses homologues macrocycliques, il n'en reste pas moins très compétitif et attractif. Les complexes de lanthanides dérivés du PCTA[12] présentent une haute stabilité thermodynamique (log K_{ML} > 20 excepté pour le cérium) et une inertie cinétique largement compatibles avec des applications *in vivo*. Malgré des constantes de stabilité légèrement plus faibles que celles de la référence, le DOTA, la basicité totale plus faible du PCTA[12] permet à ses complexes de présenter une cinétique de formation plus rapide, les rendant particulièrement intéressants en vue de leur utilisation en imagerie nucléaire.

Ces chélates possèdent également deux molécules d'eau dans leur première sphère de coordination, un avantage majeur lorsqu'il s'agit de considérer leur utilisation en tant qu'agent de contraste pour l'IRM, et l'incorporation d'un chromophore au sein de la structure chélatante permet d'envisager une sensibilisation efficace des ions lanthanides luminescents.

Comme il le sera évoqué dans le Chapitre 2, la possibilité d'introduire des fonctions réactives en positions méta ou para du noyaux pyridine lors de la synthèse de dérivés du PCTA[12] constitue un autre avantage intéressant en vue d'accéder à des ligands bifonctionnels chélatants.

2 Les complexes dérivés du PCTA[12] et leurs applications …

Depuis sa synthèse et ses premières évaluations en 1981, les complexes du PCTA[12] ou de ses dérivés ont trouvé leur place dans de nombreuses applications : de l'imagerie par résonance magnétique à l'imagerie optique, en passant par l'imagerie nucléaire.

2.1 … en imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM)

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est l'un des outils diagnostiques les plus puissants et polyvalents et est basée sur le principe de résonance magnétique nucléaire (RMN). Décrite pour la première fois en 1946 par Purcell et Bloch, la RMN est d'abord devenue une technique d'analyse chimique avant d'être appliquée à l'imagerie des organismes vivants par Lauterbur à la fin des années 1970. Les améliorations apportées par Mansfield dans le domaine de l'acquisition et du traitement du signal ont ensuite permis une meilleure visualisation des détails anatomiques et une application clinique plus large de l'IRM.

2.1.1 Principe de l'imagerie par résonance magnétique

Nombre de noyaux atomiques possèdent un nombre quantique de spin non nul (^{1}H, ^{2}H, ^{13}C, ^{31}P) et peuvent donc interagir avec les champs magnétiques. Parmi eux, l'hydrogène ^{1}H est de loin le noyau le plus utilisé pour une application en IRM en raison de sa forte abondance isotopique et de sa présence dans l'eau, qui constitue environ 60 % du corps humain, les protéines ou les tissus adipeux.

En l'absence de champ magnétique statique, les dipôles magnétiques des noyaux d'hydrogène d'un échantillon sont orientés de manière aléatoire. Le moment magnétique total est donc nul. Sous l'influence d'un champ magnétique ($\mathbf{B_0}$), les spins nucléaires des protons vont s'aligner de façon parallèle ou antiparallèle à celui-ci,

suivant un mouvement de précession autour de $\mathbf{B_0}$ d'une fréquence caractéristique au noyau considéré appelée fréquence de Larmor (**Figure 1.11**). La population de chaque niveau énergétique (parallèle ou antiparallèle) est régie par la loi de distribution de Boltzmann avec un faible excès de spins peuplant le niveau de plus faible énergie. Cette faible différence de population, expliquant la faible sensibilité de la technique d'IRM, va finalement induire une aimantation macroscopique, encore appelé moment magnétique total **M**.

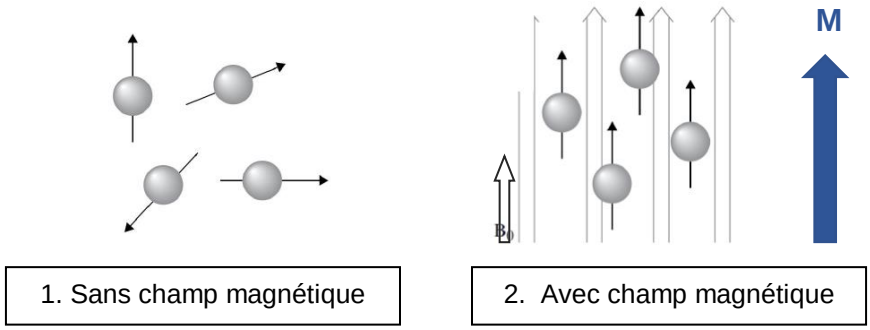


Figure 1.11. Comportement des noyaux sous l'action d'un champ magnétique [49]

Lorsqu'une impulsion radiofréquence ($\mathbf{B_{rf}}$), de fréquence spécifique aux noyaux d'hydrogène, est appliquée perpendiculairement au champ magnétique $\mathbf{B_0}$, les spins entrent alors en résonance et l'équilibre est perturbé. L'aimantation macroscopique va basculer et sera alors constituée d'une composante longitudinale ($\mathbf{M_z}$) et d'une composante transverse ($\mathbf{M_{xy}}$) (**Figure 1.12**).

Le retour des spins à l'équilibre (relaxation), s'accompagne d'une perte d'énergie qui est alors restituée sous forme d'une onde radiofréquence. D'un point de vue magnétique, le retour de l'aimantation à sa position d'équilibre se traduit par la restauration de sa composante longitudinale $\mathbf{M_Z}$, et la disparition de la composante transverse $\mathbf{M_{xy}}$ (définie par les composantes $\mathbf{M_x}$ et $\mathbf{M_y}$ dans le xOy). Ces deux mécanismes ont lieu simultanément et sont définis par deux temps de relaxation indépendants :

- le temps de relaxation longitudinale (ou relaxation spin-réseau) $\mathbf{T_1}$, correspondant au temps nécessaire à l'aimantation longitudinale pour atteindre 63 % de sa valeur finale,

- le temps de relaxation transversale (ou relaxation spin-spin) **T_2**, correspondant au temps mis par l'aimantation transversale pour revenir à 37 % de sa valeur initiale.

Les valeurs de T_1 et T_2 définissent la manière avec laquelle les protons reviennent à leur état initial suite à l'impulsion radiofréquence, et sont caractéristiques des tissus observés.

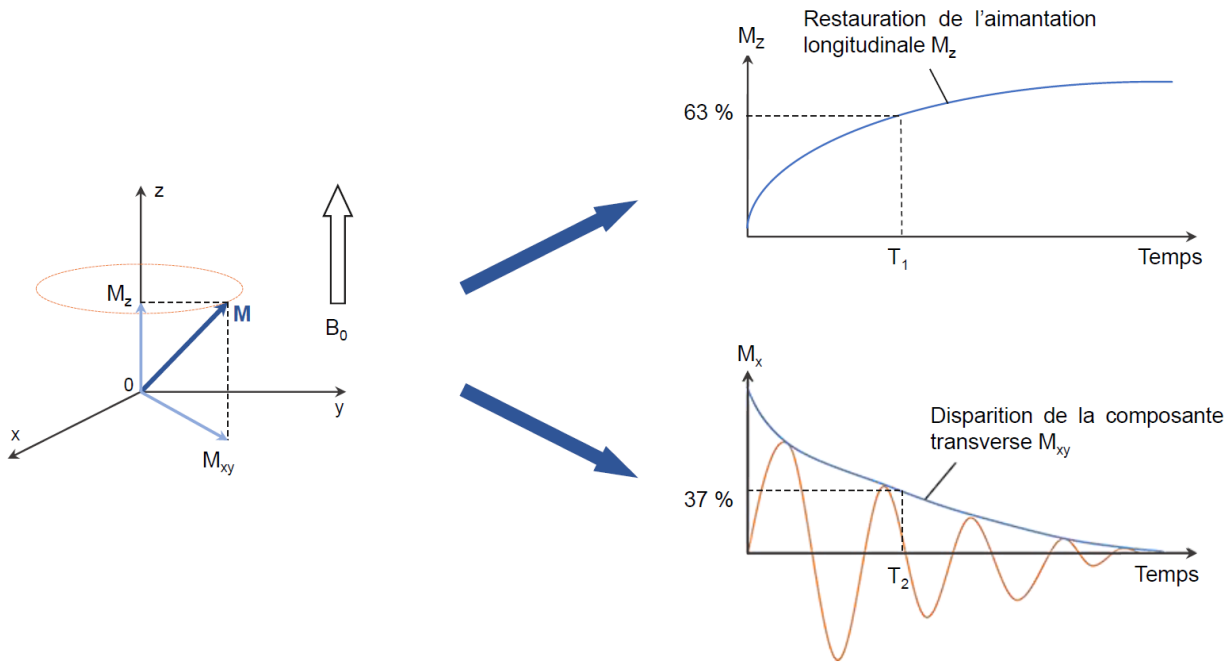


Figure 1.12. Basculement de l'aimantation et retour à l'équilibre

Le signal lié à l'acquisition de l'onde radiofréquence résultant de la perte d'énergie accompagnant les mécanismes de relaxation, dont la fréquence et l'amplitude sont dépendantes de la densité de protons dans un volume donné, est ensuite traité par double transformée de Fourier conduisant alors la reconstitution de l'image. La différence de densité protonique va générer une différence de contraste permettant ainsi la distinction des différents tissus.

Si l'IRM dispose d'une excellente résolution spatiale, elle reste néanmoins une technique d'imagerie très peu sensible. Lorsque deux tissus présentent des temps de relaxation proches, il peut être difficile de les différencier. En vue de pallier cet inconvénient, deux moyens peuvent être mis en œuvre : (i) augmenter le temps d'acquisition pour améliorer le rapport signal sur bruit, la durée de l'analyse peut alors devenir relativement longue, ou (ii) utiliser un agent de contraste, qui, en diminuant

le temps de relaxation des protons de l'eau, va permettre d'améliorer le contraste de l'image.

2.1.2 Les agents de contraste

Jusqu'à 40 % des examens IRM nécessitent l'utilisation d'agents de contraste. Suivant leur mode d'action, deux grandes familles peuvent être distinguées : les agents de contraste de type T_1 et les agents de contraste de type T_2.[50] De manière générale, leur efficacité est définie par leur valeur de relaxivité. Explicitée plus en détail dans le paragraphe **2.1.3**, retenons ici que plus sa valeur est élevée, plus l'agent de contraste est efficace.

2.1.2.1 Les agents de contraste de type T_2

Les agents de contraste T_2, sont des agents de type « superparamagnétiques » composés de cristaux d'oxyde de fer (Fe_2O_3 ou Fe_3O_4). Ces derniers induisent une diminution du temps de relaxation transversale du proton, se traduisant par une baisse du signal et un contraste dit « négatif ». Ces particules sont modifiées en surface par des polymères (dextran, polyéthylène glycol) ou de petites molécules chargées (citrate, aspartate) afin d'assurer la stabilité de la suspension en milieu biologique ainsi que la biodistribution. Quatre grandes familles peuvent être distinguées selon leur taille :

- Les MION (Monocrystalline Iron Oxyde Nanoparticles) dont le diamètre est compris entre 20 et 30 nm,
- Les USPIO (Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxyde nanoparticles) sont des particules de taille inférieure à 50 nm,
- Les SPIO (SuperParamagnetic Iron Oxyde nanoparticles) présentant un diamètre supérieur à 50 nm et pouvant aller jusqu'à 200 nm,
- Les MPIO (Micrometer Particles of Iron Oxide) de diamètre supérieur à 200 nm.

La taille, la fonctionnalisation (enrobage) et le mode d'administration de ces agents de contraste déterminent leurs propriétés de biodistribution et de pharmacocinétique. Ainsi, la prise en charge du Sinerem® (USPIO) par les macrophages du système lymphatique lui permet de mettre en évidence spécifiquement les ganglions lymphatiques. L'Endorem® (SPIO), quant à lui, est internalisé par les cellule de Kupffer d'où son utilisation en tant qu'agent hépatobiliaire. Administré par voie orale et non intraveineuse, le Lumirem® (MPIO) est utilisé pour l'exploration des voies gastro-intestinales (**Tableau 1.8**). Si leur relaxivité est plus élevée en T_2, les nanoparticules d'oxyde de fer peuvent également être utilisées à bas champ en tant qu'agent T_1, mais les valeurs de relaxivité deviennent équivalentes à celles des complexes de gadolinium.

Nom (surface)	Diamètre (nm)	Type	Biodistribution	Relaxivité ($mM^{-1}.s^{-1}$)
MION-46L (dextran)	8-20	MION	-	r_1 = 3,95 **r_2 = 19,6**
Sinerem® (dextran)	17-30	USPIO	Ganglions lymphatiques	r_1 = 19,5 **r_2 = 87,6**
Endorem® (dextran)	80-150	SPIO	Foie	r_1 = 10,1 **r_2 = 158**
Lumirem® (silicone)	300	MPIO	Gastro-intestinale	r_1 = 2 **r_2 = 47**

Tableau 1.8. Exemples d'agents de contraste en T_2 et relaxivité associée (37 °C, 60 MHz)[51]

2.1.2.2 Les agents de contraste de type T_1

Les agents de contraste de type T_1 sont des chélates comportant un centre paramagnétique induisant une diminution du temps de relaxatione longitudinal du proton, se traduisant par une augmentation du signal et un contraste dit « positif ». Si le développement de chélates de manganèse (II) commence à émerger, la plupart des contrastophores employés dans le domaine clinique sont, à l'heure actuelle, des complexes de gadolinium.

Chélates de gadolinium

En raison de sa toxicité aux concentrations nécessaires à l'obtention d'un contraste significatif (C = 0,1 mM), l'ion gadolinium ne peut être injecté sous sa forme ionique libre. Du fait de la similarité de leur rayon ionique, l'ion Gd^{3+} libre peut conduire à l'inhibition compétitive des processus biologiques impliquant le calcium. La formation d'hydroxocomplexes $Gd(OH)_3$ insolubles à pH physiologique et pouvant se fixer sur les os et le foie, représente également un inconvénient majeur. Pour ces raisons, l'utilisation de ligands capables de séquestrer l'ion gadolinium et de diminuer sa toxicité en l'empêchant d'interagir avec les espèces du milieu biologique est primordiale. Si les ligands affectent quelque peu les propriétés de l'ion, la présence d'au moins une molécule d'eau dans sa sphère de coordination est suffisante pour induire l'effet paramagnétique. Puisque la liaison métal-ligand ne se fait pas de manière covalente, le risque de relargage de gadolinium *in vivo* est cependant présent. De ce fait, deux propriétés essentielles sont à prendre en compte : la stabilité thermodynamique, reflétant l'affinité du métal pour le ligand, et l'inertie cinétique caractérisant la résistance du complexe face aux phénomènes de transmétallation et de transchélation. Comme évoqué précédemment, les ligands polyaminocarboxyliques répondent favorablement à ces critères (**§ 1.1.3**), ainsi la plupart des agents de contraste sont basés sur leur structure. Suivant qu'ils soient linéaires ou macrocycliques, ioniques ou non-ioniques, plusieurs formulations commerciales peuvent être distinguées (**Figure 1.13**).

La majorité des agents de contraste commerciaux sont des complexes de première génération et sont dits non spécifiques (Gd-DTPA, Gd-DTPA-BMA, Gd-DOTA, Gd-HP-DO3A et Gd-DO3A-butriol) (**Tableau 1.9**). Ces derniers se distribuent dans le plasma, et l'espace extracellulaire, ne possèdent pas de spécificité tissulaire et sont rapidement excrétés par voie rénale. L'utilisation de ce type d'agents de contraste trouve tout son intérêt lors de la détection de tumeurs cérébrales ou de lésions hépatiques. De manière générale, le chélate de gadolinium ne peut pas franchir la barrière hémato-encéphalique. Lorsqu'une tumeur est présente, la vascularisation est plus importante que celle des tissus environnants et la barrière hémato-encéphalique est localement poreuse, permettant ainsi le passage du contrastophore et son accumulation dans les zones malades hypervascularisées.

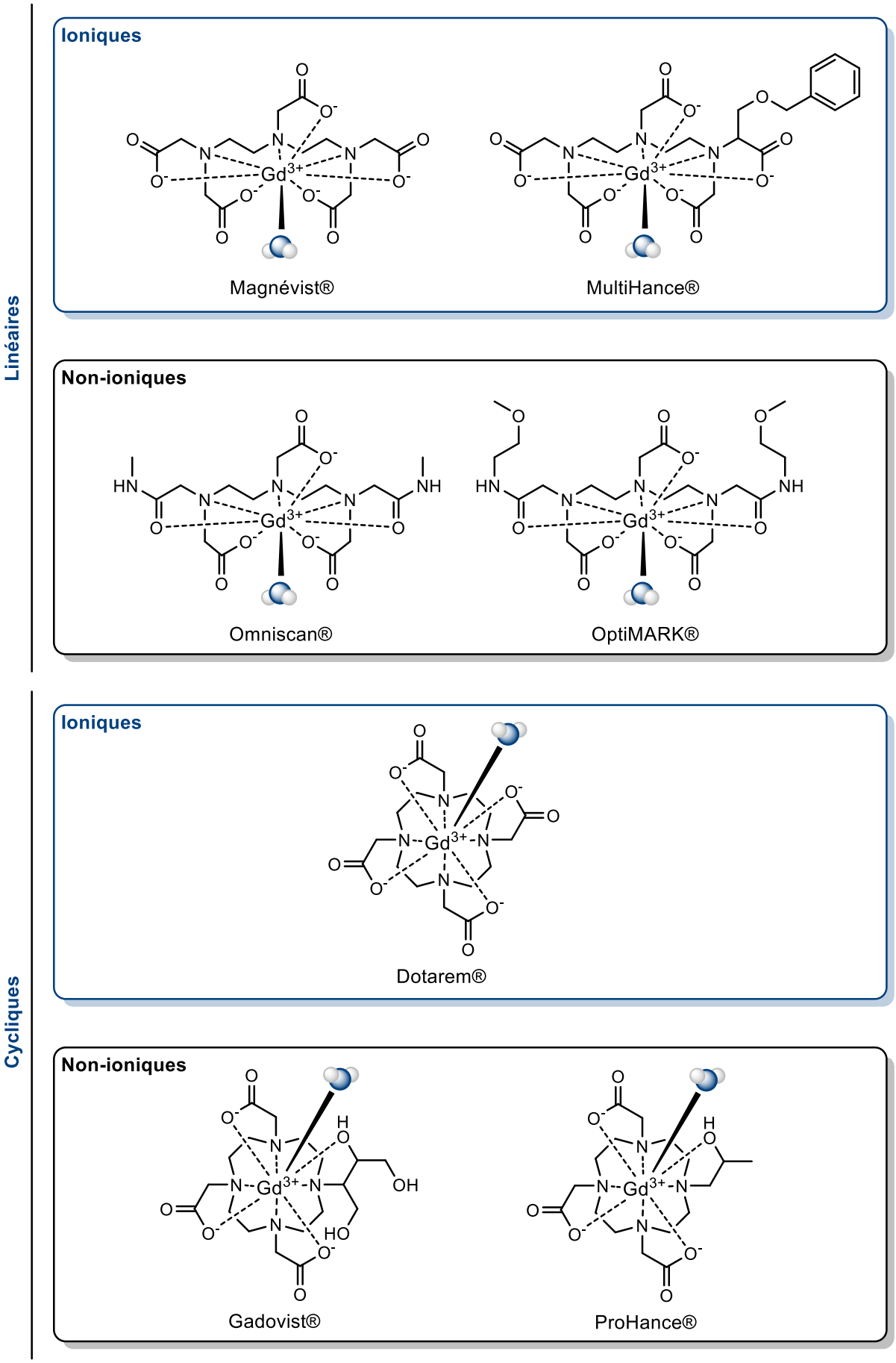


Figure 1.13. Agents de contraste commerciaux à base de gadolinium

	Complexe	Catégorie	Biodistribution	r_1 ($mM^{-1}.s^{-1}$)
Magnévist®	Gd-DTPA	Linéaire ionique	Extracellulaire	4,3
MultiHance®	Gd-BOPTA	Linéaire ionique	Extracellulaire, hépatobiliaire	5,2
Omniscan®	Gd-DTPA-BMA	Linéaire non-ionique	Extracellulaire	4,4
OptiMARK®	Gd-DTPA-BMEA	Linéaire non-ionique	Extracellulaire, hépatobiliaire	4,7 (313 K)
Dotarem®	Gd-DOTA	Cyclique ionique	Extracellulaire	4,2
Gadovist®	Gd-DO3A-butriol	Cyclique non-ionique	Extracellulaire	5,6
ProHance®	Gd-HP-DO3A	Cyclique non-ionique	Extracellulaire	3,7 (313 K)

Tableau 1.9. Principaux agents de contraste et relaxivité associée (25 °C, 20 MHz)[50]

La deuxième génération d'agents de contraste (Gd-BOPTA) sont des agents hépato-spécifique. L'introduction de chaînes lipophiles leur permet d'être pris en charge par les hépatocytes sains, conduisant ainsi à la mise en évidence spécifique de lésions hépatiques. D'autres exemples de complexes gadoliniés dérivés du DTPA tels que le MS-325 (Vasovist ®) peuvent être cités. La forte affinité de ce dernier pour l'albumine sérique humaine (HSA) lui permet d'avoir un temps de résidence relativement long dans les vaisseaux, et d'être employé en tant qu'agent angiographique.[51]

Contrairement aux nanoparticules d'oxyde de fer ayant des valeurs de relaxivité en T_2 pouvant aller jusqu'à 200 $mM^{-1}.s^{-1}$, les complexes de gadolinium proposent une relaxivité T_1 qui se situe aux alentours de 5 $mM^{-1}.s^{-1}$. La théorie prévoyant de pouvoir atteindre des valeurs de 100 $mM^{-1}.s^{-1}$, une large marge de progression quant à la modification de la structure chélatante est présente.

Chélates de manganèse

Suite à la mise en évidence du lien entre l'apparition de la fibrose systémique néphrogénique et l'injection d'agents de contraste gadolinié chez les patients insuffisants rénaux, la prospection d'autres métaux en tant qu'alternative au

gadolinium a été envisagée. Le manganèse est un métal de transition possédant cinq électrons célibataires et une relaxation électronique relativement lente. Le chlorure de manganèse est le premier exemple d'utilisation du manganèse en tant qu'agent de contraste (Lumenhance®) et possède une valeur de relaxivité de 8,0 $mM^{-1}.s^{-1}$ (37 °C, 20 MHz).[52] Comme l'ion Gd^{3+}, le manganèse est toxique sous sa forme ionique libre : l'utilisation d'un ligand est donc nécessaire. Cependant, malgré de nombreuses recherches, seul le Teslascan® est à ce jour commercialisé en tant qu'agent de contraste basé sur le manganèse pour l'imagerie hépatique (**Figure 1.14**).

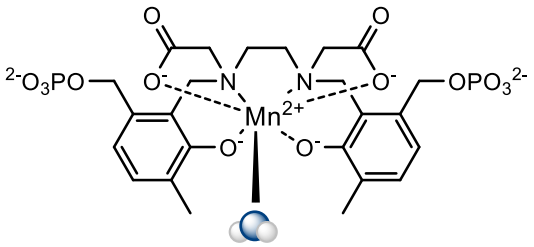


Figure 1.14. Structure du Teslascan ® (Mn-DPDP)

2.1.3 Paramètres influençant la relaxivité

La capacité des agents de contraste à augmenter la vitesse de relaxation des protons des molécules d'eau environnantes est mesurée par une grandeur appelée relaxivité. Cette-dernière est définie comme l'augmentation paramagnétique de la vitesse de relaxation normalisée par la concentration de l'agent de contraste, et est dépendante de certains paramètres tels que la température ou le champ magnétique. Lors de la conception d'agents de contraste, plusieurs paramètres sont à prendre en compte afin d'obtenir une relaxivité optimisée (**Figure 1.15**).

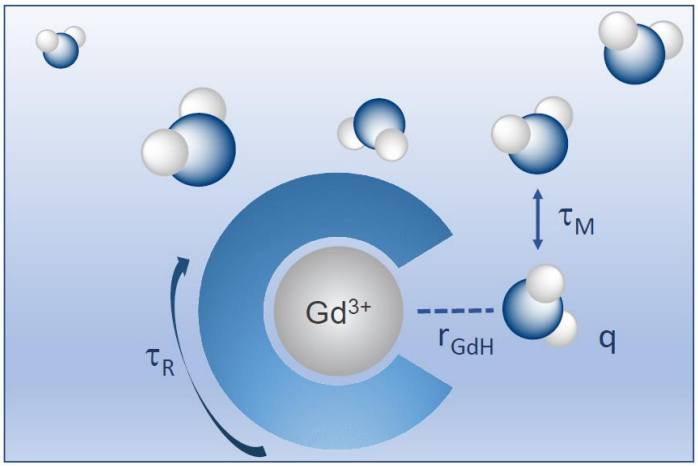


Figure 1.15. Complexe de gadolinium et paramètres influençant la relaxivité

Nombre d'hydratation du complexe (q)

Le nombre d'hydratation correspond au nombre de molécules d'eau coordinées au centre métallique et est uniquement dépendant de la structure du ligand. Plus sa valeur est grande, plus la relaxivité sera grande. L'augmentation du nombre d'hydratation s'effectue cependant au détriment de la stabilité du complexe puisqu'elle s'effectue par la substitution d'un site de coordination du ligand par une molécule d'eau. Un équilibre minutieux doit donc être trouvé entre denticité du ligand et stabilité du complexe.

Temps de résidence moyen des molécules d'eau (τ_M)

Afin de pouvoir transmettre l'effet paramagnétique, les molécules d'eau du solvant et la(les) molécule(s) d'eau présente(s) dans la sphère interne de coordination du chélate de gadolinium doivent s'échanger. Plus cet échange est rapide, plus le temps de résidence est court, et plus le nombre de molécules d'eau affectées par ce paramagnétisme sera grand. D'après la littérature, un temps de résidence moyen des molécules d'eau optimal est compris entre 10 et 100 ns.

Temps de corrélation rotationnel (τ_R)

Le temps de corrélation rotationnel décrit la rotation du complexe sur lui-même et constitue le paramètre limitant des agents de contraste commerciaux actuels. Plus ce temps est long, plus la relaxivité est élevée. L'augmentation du poids moléculaire ou la liaison (covalente ou non) des chélates de gadolinium à des macromolécules permettent de ralentir le temps de corrélation.

D'autres paramètres tels que la distance entre le centre paramagnétique et les protons de l'eau (r_{GdH}) ou les temps de relaxation électronique peuvent également avoir une influence sur la relaxivité. Les mécanismes mis en jeu sont cependant encore mal compris et/ou leur modification est difficile.

2.1.4 Les complexes dérivés du PCTA[12] en tant qu'agents de contraste

Le PCTA[12] forme un complexe de gadolinium stable (log K_{GdL} > 20) et permet la coordination de deux molécules d'eau (q = 2) expliquant sa haute valeur de

relaxivité (r_1 = 5,4 $mM^{-1}.s^{-1}$ à 20 MHz et 310 K) comparée au complexe de DTPA (r_1 = 3,8 $mM^{-1}.s^{-1}$) ou de DOTA (r_1 = 3,5 $mM^{-1}.s^{-1}$) dans les mêmes conditions de champ magnétique et de température (**Tableau 1.10**).[53,54] Le temps de résidence moyen des molécules d'eau coordinées au gadolinium (τ_M = 82 ns) est également plus court et dans l'intervalle optimal 10-100 ns (τ_M (Gd-DTPA) = 143 ns et τ_M (Gd-DOTA) = 122 ns), un facteur important lors de la conception d'un contrastophore.

	q	**Conditions**	**r_1 ($mM^{-1}.s^{-1}$)**	**τ_M (ns)**	**τ_R (ps)**	**log K_{GdL}**
Gd-DTPA[54]	1	20 MHz, 310 K	3,8	143	54	22,5
Gd-DOTA[54]	1	20 MHz, 310 K	3,5	122	53	24,7
Gd-DO3A[48]	2	20 MHz, 298 K	6,0	160	66	21,1
Gd-Py[42,44]	2	20 MHz, 298 K 20 MHz, 310 K	- 5,7	108 35,2	92 56	18,6
Gd-PCTP[48]	1	20 MHz, 298 K	7,5	6	106	-
Gd-PCTA[48,53]	2	20 MHz, 298K 20 MHz, 310 K	6,9 5,4	70 82	70 56	20,4

Tableau 1.10. Valeurs de relaxivité, de τ_M et de τ_R de différents complexes de gadolinium

Parmi les ligands capables de former des complexes de gadolinium bishydratés (Gd-DO3A et Gd-Py), le PCTA[12] se situe dans la même gamme de relaxivité. De manière générale, les complexes de gadolinium négativement chargés favorisent un échange de molécules d'eau rapide, et possèdent par conséquent des valeurs de τ_M significativement plus courtes que les complexes globalement neutres. Ainsi, il était à prévoir que la valeur de τ_M du complexe Gd-PCTA[12] soit plus élevée que celle obtenue pour le dérivé acyclique Py (τ_M (Gd-Py) = 35,2 ns). La nature plus rigide du PCTA[12] permet cependant d'obtenir un τ_M quasiment deux fois plus court que le celui du complexe Gd-DO3A, à charge globale équivalente (τ_M (Gd-DO3A) = 160 ns).

Dans la famille du PCTA[12], la substitution des trois bras acétate par trois bras phosphonate (Gd-PCTP) conduit à la formation d'un complexe octa-coordiné

(**Figure 1.16**), qui, malgré la perte d'une molécule d'eau dans la sphère de coordination du gadolinium, possède une relaxivité légèrement plus élevée (r_1 = 5,7 $mM^{-1}.s^{-1}$) que le PCTA[12]. La réelle particularité de ce complexe est qu'il dispose d'une vitesse d'échange significativement plus rapide (τ_M = 6 ns) que le ligand de référence.

La relaxivité d'un agent de contraste est également liée à la valeur du temps de corrélation rotationnel τ_R. Ainsi, les contrastophores à faible poids moléculaire possèdent en général une rotation rapide défavorable à cette relaxivité, l'une des manières de ralentir cette libre rotation est d'augmenter le poids moléculaire du composé, soit par greffage covalent à une macromolécule, soit par interaction non covalente. Ainsi, Hovland *et al*. ont synthétisé un dérivé amphiphile du Gd-PCTA[12] capable de former des micelles en solution aqueuse grâce à une chaîne lipophile introduite en position méta de la pyridine.[55] La relaxivité de ce composé évolue en fonction de sa concentration pour atteindre un maximum à 1 mM (r_1 = 29,2 $mM^{-1}.s^{-1}$ à 20 MHz et 298 K). Cette valeur élevée est une conséquence de la conservation des deux molécules d'eau dans la sphère de coordination du gadolinium, ainsi que d'un temps de corrélation rotationnel relativement long (τ_R = 473 ns).

Figure 1.16. Exemples de complexe et de ligand évalués pour une application IRM. (a) réf. 55

2.2 … en médecine nucléaire

L'imagerie nucléaire est une technique d'imagerie fonctionnelle non-invasive basée sur l'administration d'un traceur radioactif (radiotraceur ou radiopharmaceutique) au patient, puis en la détection du rayonnement émis. L'emploi du terme « traceur » vient du fait que le composé est injecté à l'état de traces (10^{-9}-10^{-12} M). Suivant le type d'émission, deux techniques peuvent être distinguées : la Tomographie par Emission de Positrons (TEP), et la Tomographie par Emission

MonoPhotonique (TEMP). Leurs avantages communs sont une très haute sensibilité, une bonne résolution spatiale et une excellente profondeur de pénétration.

2.2.1 La tomographie par émission de positrons (TEP)

La TEP repose sur l'utilisation de radioéléments émetteurs de positrons β^+. Les noyaux instables émettent des particules chargées électropositivement (positrons) qui, après un parcours de quelques millimètres dans les tissus, s'annihilent par interaction avec un électron. L'énergie libérée est transmise sous la forme de deux photons γ incidents (dont l'énergie est de 511 keV) collectés par deux détecteurs placés de manière opposée autour du patient, permettant ainsi la construction de l'image. Les isotopes tels que le ^{13}N, ^{15}O ou le ^{18}F ont traditionnellement été développés en vue de leur intégration au sein de petites molécules (telles que le [^{18}F]-FDG, un analogue radiopharmaceutique du glucose), mais leur radiosynthèse parfois longue et leur courte période radioactive limitent la visualisation de processus biologiques dans le temps. La production de radionucléides avec des demi-vies plus longues a donc été nécessaire, laissant alors place à l'utilisation de radiométaux tel que le cuivre-64, le gallium-68 ou le zirconium-89 (**Tableau 1.11**).

Radioélément	$t_{1/2}$ (h)
^{64}Cu	12,7
^{68}Ga	1,1
^{86}Y	14,7
^{89}Zr	78,5

Tableau 1.11. Exemples de radiométaux à émission β^+

2.2.2 La tomographie par émission monophotonique (TEMP)

Contrairement à la TEP, les radioisotopes employés pour la TEMP n'émettent qu'un seul photon γ, détecté par une caméra en rotation autour du patient. Si cette technique est moins sensible que la TEP, son utilisation est également moins coûteuse du fait d'une obtention plus aisée des isotopes ainsi que de leur temps de demi-vie plus long. Le technétium-99m est l'isotope le plus utilisé en TEMP du fait de son mode

de production facile (générateur par désintégration β^- du ^{99}Mo) et une période radioactive d'environ 6h compatible avec la préparation du radiopharmaceutique. L'indium-111 et l'iode-123 sont également couramment employés (**Tableau 1.12**).

Radioélément	$t_{1/2}$ (h)
^{67}Ga	78,2
^{99m}Tc	6,0
^{111}In	67,2

Tableau 1.12. Exemples de radioéléments à émission γ

2.2.3 La radiothérapie interne vectorisée (RIV)

Les radionucléides peuvent également être utilisés en thérapie. La RIV consiste en l'irradiation spécifique d'une cible au moyen de l'utilisation d'une sonde vectorisée (**§ 1.2.1**) portant un radioélément. Cette technique repose sur l'utilisation de noyaux émetteurs de particules ionisantes de type β^-, α ou Auger (**Tableau 1.13**). Ces radioéléments sont caractérisés par un transfert d'énergie linéique élevé (rapport de l'énergie de la particule émise sur la pénétration tissulaire) et une faible portée permettant une irradiation de la cible sans atteinte des tissus avoisinants.

Radioélément	$t_{1/2}$ (h)	Mode de décomposition
^{67}Cu	32,0	β^-
^{90}Y	64,1	β^-
^{177}Lu	159,4	β^-
^{225}Ac	240	α

Tableau 1.13. Exemples de radioéléments potentiellement utilisables en thérapie

2.2.4 Les complexes de radionucléides dérivés du PCTA[12]

En raison de la cinétique de formation rapide des complexes qui lui sont dérivés, le PCTA[12] a été exploité comme ligand pour la complexation des métaux présentés dans les paragraphes précédents en vue de leur application en imagerie nucléaire ou en radiothérapie.

2.2.4.1 Applications en imagerie

Gallium-68

Le dérivé bifonctionnel *p*-NO_2-Bn-PCTA[12] a été évalué pour la chélation du gallium par Ferreira *et al.* (**Figure 1.17**).[56] Ses conditions de radiomarquage (5 à 10 minutes à T.A.) sont équivalentes celles du NOTA (30 à 60 minutes à T.A.), et surpassent celles du DOTA (10 à 30 minutes entre 37 et 90 °C). Les études de stabilité et de biodistribution ont montré que le ^{68}Ga-*p*-NO_2-Bn-PCTA[12] présentait une inertie cinétique supérieure à celle de son équivalent fonctionnalisé dérivé du DOTA, et des propriétés de clairance (notamment une activité rénale jusqu'à cinq fois moindre comparée au NOTA) compatible avec une application *in vivo*.

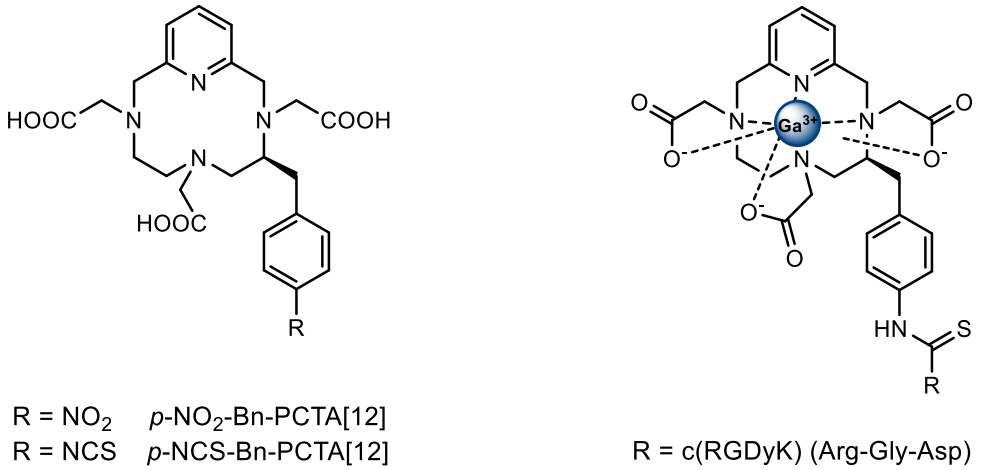


Figure 1.17. Agents bifonctionnels chélatants dérivés du PCTA[12] et exemple d'application de son complexe de ^{68}Ga [56,57]

Le bioconjugué radiomarqué ^{68}Ga-*p*-NCS-Bn-PCTA[12]-c(RGDyK) a ensuite été synthétisé et évalué par la même équipe.[57] En plus de la conservation de l'affinité du peptide pour les récepteurs $\alpha_v\beta_3$, l'étude a montré que le radiopharmaceutique présentait les mêmes caractéristiques de radiomarquage et d'inertie cinétique que le ^{68}Ga-*p*-NCS-Bn-PCTA[12], ainsi qu'une plus faible absorption rénale que son analogue dérivé du NOTA.

Le radiomarquage efficace, la bonne inertie cinétique ainsi que les propriétés *in vivo* favorables du PCTA[12] en font une alternative intéressante pour le développement de radiopharmaceutiques basés sur le ^{68}Ga.

Cuivre-64

Le cuivre-64 est probablement le radioélément ayant reçu le plus d'attention en ce qui concerne l'application du PCTA[12] en imagerie nucléaire. Comme précisé précédemment, les ligands les plus utilisés pour la complexation du ^{64}Cu sont le DOTA, le NOTA et le CB-TE2A. Cependant, le premier ligand propose une stabilité *in vivo* modérée et les deux derniers des conditions de radiomarquage difficiles (températures élevées). En 2008, Ferreira *et al*. ont montré que le dérivé bifonctionnel *p*-NO_2-Bn-PCTA[12] possédait des conditions de radiomarquage pour le ^{64}Cu particulièrement intéressantes (5 minutes à T.A.) et indépendantes du pH.[58] Du fait de sa très bonne inertie cinétique dans le sérum et de sa clairance rénale rapide, ce dérivé bifonctionnel du PCTA[12] a par la suite fait l'objet de nombreuses bioconjugaisons.

Plusieurs radiopharmaceutiques basés sur des anticorps,[59,60] des peptides,[61,62,63] voire des aptamères de l'ARN[64] ont alors été évalués avec succès (**Tableau 1.14**). Tous ont montré des conditions de radiomarquage favorables vis-à-vis de leur biovecteur, et une bonne inertie cinétique a été observée pour la majorité d'entre eux.

Biomolécule	Conditions	Rendement	Réf.
Trastuzumab (anticorps)	30 minutes à T.A.	> 95 %	59
A10-3.2 (aptamère)	30 minutes à 50 °C	> 96 %	64
Bombésine (peptide)	15 minutes à 100 °C	> 90 %	61
Rituximab (anticorps)	20 minutes à T.A.	> 97 %	60
c(RGDyK) (peptide)	10 minutes à T.A.	> 98 %	62
Urée basée sur la lysine et l'acide glutamique (peptide)	30 minutes à 65 °C	70-90 %	63

Tableau 1.14. Récapitulatif des conditions de radiomarquage du ^{64}Cu de bioconjugués basés sur le PCTA[12]

Dans leur publication, Banerjee *et al*. Comparent, de plus, plusieurs radiopharmaceutiques permettant la mise en évidence d'antigènes membranaires spécifiques de la prostate. Si le bioconjugué basé sur le macrocycle CB-TE2A (**Figure 1.7**) montre l'inertie cinétique la plus favorable ainsi que le meilleur contraste, ses conditions de radiomarquage sont difficiles (60 minutes à 95 °C avec un rendement de

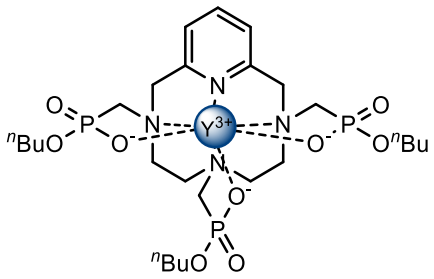
complexation inférieur à 45 %) et peuvent ne pas être compatibles avec tous les biovecteurs.[63] Malgré une légère perte de spécificité due à une plus forte absorption par le foie, le bioconjugué basé sur le PCTA[12] propose un rendement de radiomarquage allant jusqu'à 90 % et des conditions plus favorables (30 minutes à 65 °C), se montrant alors comme une alternative intéressante pour la chélation du ^{64}Cu.

2.2.4.2 Applications en radiothérapie

Yttrium-90

Si le *p*-NCS-Bn-PCTA[12] a montré des conditions douces pour le radiomarquage de l'yttrium-90 (30 minutes à T.A.), la stabilité du complexe dans le sérum et vis-à-vis d'autres cations (Fe^{3+}, Cu^{2+}, Zn^{2+} et Ca^{2+}) est modérée. Les absorptions rénale et hépatique du complexe sont également plus élevées qu'avec d'autres ligands standards tels que le DOTA ou le DTPA, laissant penser qu'il n'est pas le ligand optimal pour ce radionucléide.[65]

Evalué pour la première fois pour la complexation de l'Eu^{3+}, du Tb^{3+} et du Gd^{3+}, le PCTMB, un ester de phosphonate dérivé du PCTA[12], a présenté des conditions de radiomarquage favorables pour différents isotopes tels que le ^{64}Cu, le $^{67/68}$Ga et le ^{111}In.[66,67] Suite à ses résultats, Le Fur *et al*. ont montré que l'utilisation de ce ligand pour la chélation de l'yttrium-90 permettait d'obtenir un complexe thermodynamiquement stable dans des conditions de radiomarquage relativement douces (15 minutes à 45-60 °C), avec une inertie cinétique dans le sérum comparable à celle du DOTA ou du DTPA (**Figure 1.18**).[68]



^{90}Y-PCTMB

Figure 1.18. Complexe d'yttrium-90 basé sur le PCTMB [68]

Lutécium-177

La première référence concernant la complexation du ^{177}Lu au PCTA[12] a été rapportée par Novy *et al.* en 2014.[69] Cette publication présente la vectorisation du *p*-NCS-Bn-PCTA[12] à des anticorps monoclonaux et met en évidence le fait que le choix de l'agent chélatant (DOTA, NOTA ou PCTA) n'a pas d'influence sur les propriétés de radiomarquage ou sur la sélectivité des vecteurs employés. L'étude du dérivé *p*-NCS-Bn-PCTA[12] non conjugué a ensuite été entreprise par Pandey *et al*. et montre que ce ligand propose des conditions de radiomarquage très favorables (> 95 % en 15 minutes à T.A.) avec le ^{177}Lu, de bonne stabilités thermodynamique et cinétique malgré une légère absorption par le foie, le rendant compatible avec une utilisation thérapeutique.[70]

2.3 … en imagerie optique de fluorescence

L'imagerie optique de fluorescence exploite les différentes propriétés de la lumière émise après une excitation lumineuse afin de générer un contraste. Cette technique non-invasive est largement employée pour l'étude de structures cellulaires ou de processus biologiques, et présente l'avantage de ne pas employer de rayonnements ionisants. Le contraste peut être issu de molécules biologiques possédant des propriétés de fluorescence (hémoglobine, acides aminés aromatiques) ou d'agents exogènes appelés fluorophores ou fluorochromes. Ces derniers peuvent être de trois types, il peut s'agir de molécules organiques (fluorescéine, BODIPY, Alexa fluor), de structures inorganiques (quantum dots) ou de complexes de coordination tels que les complexes de lanthanides luminescents.

2.3.1 Concepts généraux sur la luminescence

Le phénomène de luminescence, par opposition à celui d'incandescence, fait référence à l'émission d'un rayonnement d'origine non-thermique. Celui-ci peut être défini comme un processus au cours duquel un rayonnement lumineux, absorbé par une substance à une longueur d'onde spécifique ($\lambda_{abs} = \lambda_{exc}$), est réémis à une longueur d'onde différente caractéristique de cette substance ($\lambda_{ém}$). Selon le mode d'excitation, différents types de luminescence sont observés. La fluorescence et la phosphorescence

sont deux exemples de photoluminescence, processus durant lequel l'émission du rayonnement provient d'une excitation par onde lumineuse.

2.3.1.1 Fluorescence et phosphorescence

Suite à l'excitation d'une substance par absorption d'un rayonnement lumineux, les électrons se trouvant au niveau d'énergie fondamental (S_0) sont amenés à peupler les niveaux d'énergie supérieurs (S_1, S_2). Les électrons sont alors dans un état dit « excité » instable, et leur retour à l'état fondamental peut s'effectuer *via* des processus radiatifs (fluorescence, phosphorescence) ou non radiatifs (conversion interne, relaxation vibrationnelle ou croisement inter-système…) (**Figure 1.19**).

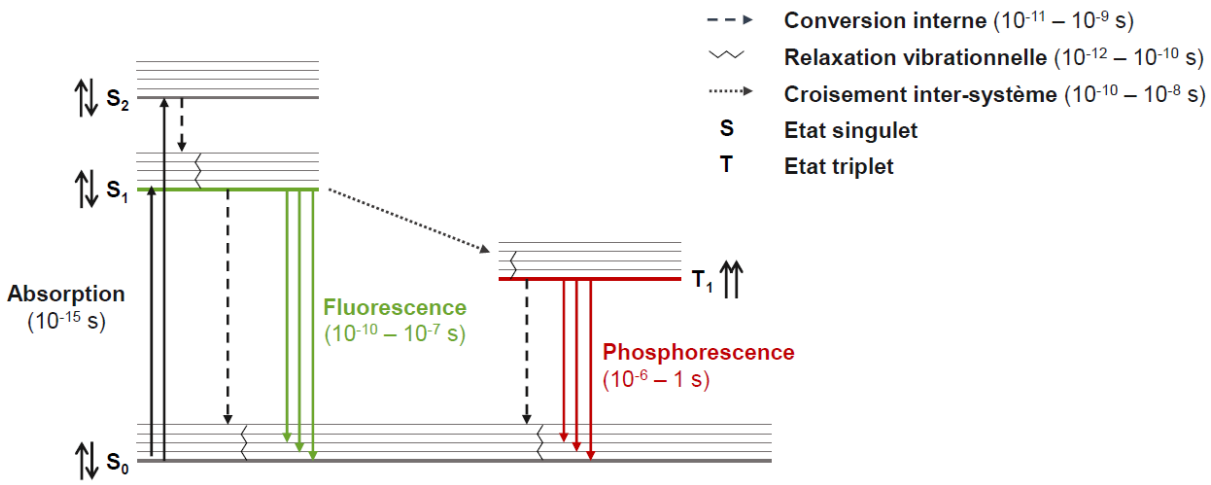


Figure 1.19. Diagramme de Jablonski simplifié

La fluorescence est observée lorsqu'un photon est émis à partir du plus bas niveau vibrationnel de l'état singulet excité S_1 (transition $S_1 \rightarrow S_0$). Ce processus fait suite à d'éventuelles désactivations non-radiatives (conversion interne et relaxation vibrationnelle) issues d'états vibrationnels et excités supérieurs et peut entrer en compétition avec le phénomène de croisement inter-système. Ce dernier engendre le passage des électrons de l'état singulet vers l'un des niveaux vibrationnels de l'état triplet T_1 et implique une inversion de spin. Si le retour à l'état fondamental est accompagné de l'émission d'un photon à partir de cet état triplet, la désactivation radiative mise en jeu est appelée phosphorescence (transitions $T_1 \rightarrow S_0$). Comme les transferts impliquant des états de multiplicités différentes sont interdits par les règles de sélection (*i.e.* sont défavorisés), les durées de vie de phosphorescence sont

relativement longues comparées aux durées de vie de fluorescence : de 10^{-6} à 1 seconde pour la phosphorescence contre 10^{-10} à 10^{-7} seconde pour la fluorescence.

2.3.1.2 Caractéristiques optiques des fluorophores

L'efficacité d'un agent de contraste pour l'imagerie optique de fluorescence est relative à ses propriétés d'absorption et d'émission, caractérisées par :

- le coefficient d'extinction molaire $\varepsilon(\lambda)$ ($cm^{-1}.M^{-1}$), représentant la capacité du fluorophore à absorber l'énergie du rayonnement lumineux à une longueur d'onde donnée (λ_{abs}),

- le rendement quantique Φ, qui reflète la probabilité qu'un fluorophore excité émette un photon donc l'efficacité d'émission de la molécule, et correspond au rapport du nombre de photons réémis sur le nombre de photons absorbés,

- la brillance $\varepsilon(\lambda).\Phi$ ($cm^{-1}.M^{-1}$), correspond à l'intensité de fluorescence à une longueur d'onde donnée, et est déterminée par le produit du coefficient d'extinction molaire et du rendement quantique. Sa valeur tient compte des propriétés d'absorption et d'émission de la sonde, et permet de réduire à un paramètre efficace, la comparaison des chromophores,

- la durée de vie de fluorescence τ (ns-ms), qui définit la durée de vie moyenne de l'état excité avant son retour à l'état fondamental,

- le déplacement de Stokes (cm^{-1}), représente l'écart énergétique entre le maximum d'absorption correspondant à la transition $S_0 \rightarrow S_1$ et le maximum d'émission correspondant à la transition de l'état excité vers le niveau fondamental S_0 (**Figure 1.20**). Si ce déplacement est trop faible, la sensibilité sera moindre et le recouvrement des spectres d'absorption et d'émission sera important, induisant une diminution de l'intensité de fluorescence.

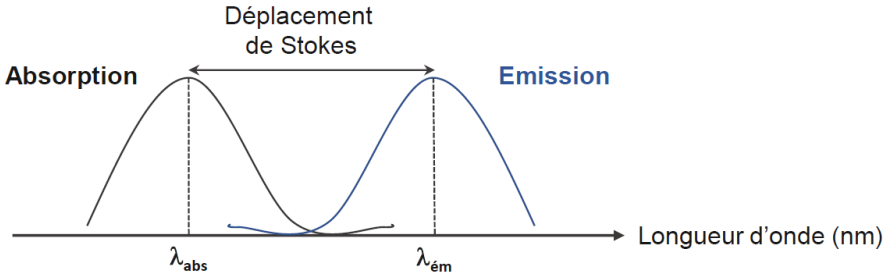
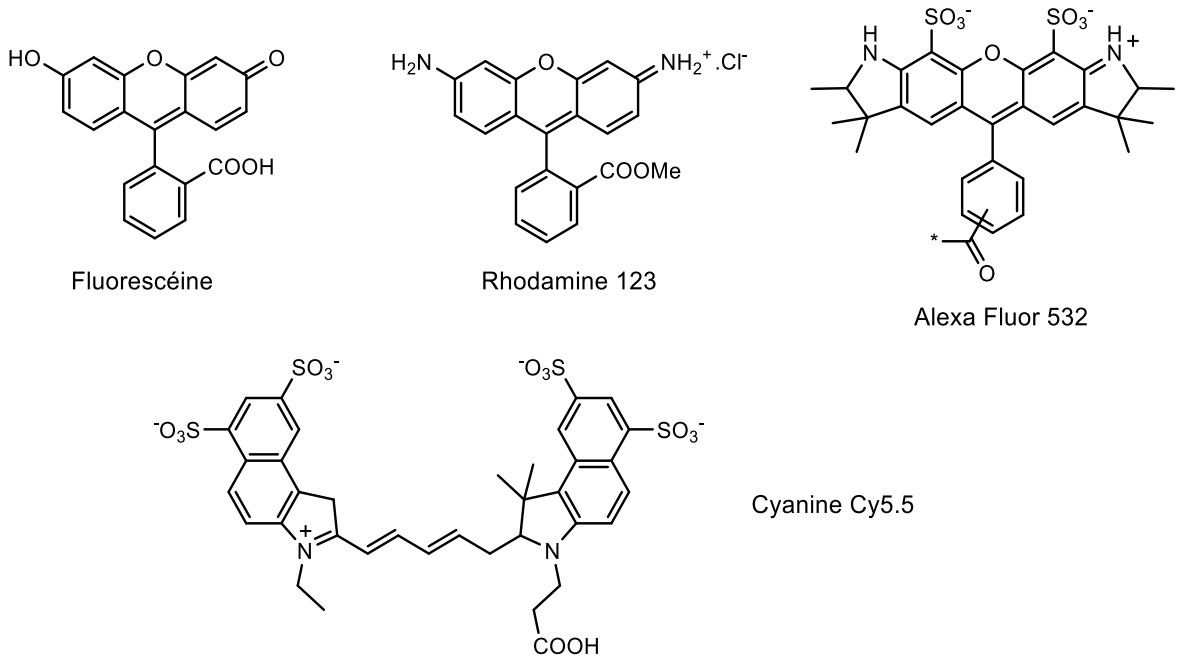


Figure 1.20. Spectres d'absorption et d'émission, et déplacement de Stokes

2.3.2 Les fluorophores organiques et leurs limites

Les sondes fluorescentes organiques sont de loin les plus utilisées dans le domaine des bioanalyses en raison de leur disponibilité commerciale. Basées sur des structures rigides conjuguées et polyaromatiques, ces fluorochromes permettent de couvrir toute la gamme spectrale, du proche ultra-violet au proche infra-rouge (**Figure 1.21**).



Fluorophore	λ_{ex} / $\lambda_{ém}$ (nm)	ε ($cm^{-1}.M^{-1}$)	Φ	Brillance ($cm^{-1}.M^{-1}$)	τ (ns)
Fluorescéine	495 / 517	83 000	0,93	77 200	4
Rhodamine 123	505 / 529	75 000	0,90	67 500	4
Alexa Fluor 532	531 / 554	81 000	0,61	49 410	2,5
Cyanine Cy5.5	675 / 694	250 000	0,23	57 500	1

Figure 1.21. Exemples et caractéristiques photophysiques de fluorophores organiques couramment utilisés

Bien que ces fluorophores possèdent une forte brillance liée à un coefficient d'extinction molaire élevé, leur utilisation peut être limitée du fait de certaines de leurs propriétés optiques telles que :

- un faible déplacement de Stokes, impliquant une certaine difficulté à séparer la lumière incidente diffusée et la lumière émise au moyen de filtres. Détecter le signal de fluorescence sans bruit parasite lié à l'excitation (diffusion Rayleigh) peut être alors être compromis,

- un recouvrement spectral, lié à un faible déplacement de Stokes ainsi qu'à des bandes d'émission et d'aborption larges. La réabsorption des photons émis pourra alors induire un phénomène de quenching de la fluorescence,

- des durées de vie de fluorescence courtes, ne permettant pas forcément de distinguer les fluorophores organiques exogènes des fluorophores intrinsèques tels que les acides aminés ou les bases nucléiques,

- une certaine sensibilité au photoblanchiment, conséquence de réactions chimiques intervenant entre le fluorophore à l'état excité et les molécules de son environnement, et entraînant la perte de sa capacité à fluorescer.

2.3.3 Les complexes d'ions Ln(III) luminescents

2.3.3.1 La luminescence en temps résolu

La technique basée sur la luminescence en temps résolu permet de distinguer les processus à longues et courtes durées de vie d'émission. En appliquant un délai entre l'excitation et l'acquisition du signal, une émission longue telle que la phosphorescence peut être dissociée du signal issu de la diffusion ou de l'autofluorescence du milieu biologique, dont les durées de vie sont plus courtes (**Figure 1.22**).

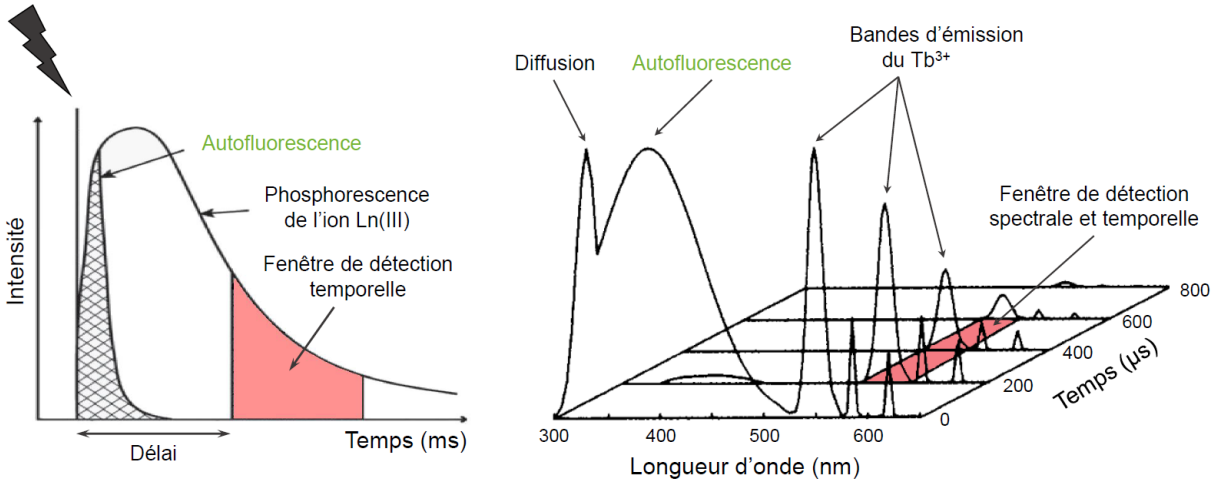


Figure 1.22. Principe de la luminescence en temps résolu

En plus de présenter des bandes d'émission et d'absorption étroites, les lanthanides (notamment les ions Eu(III) et Tb(III)) possèdent une durée de vie de luminescence très largement supérieure à celles des fluorophores organiques : ils sont donc de parfaits candidats pour des applications basées sur la luminescence en temps résolu.

Comme précisé précédemment (**§ 1.1.2**), le revers de médaille à la luminescence exceptionnelle des lanthanides est leur faible coefficient d'extinction molaire. Leur excitation directe nécessite alors des concentrations élevées en métal incompatible avec des applications biologiques : une alternative indirecte a donc été envisagée.

2.3.3.2 Sensibilisation des ions Ln(III) : effet d'antenne

L'excitation indirecte la plus adaptée aux ions lanthanides est obtenue grâce à l'utilisation d'une antenne capable de collecter les photons d'une part, et de transférer l'énergie reçue au métal d'autre part. Ce mécanisme, désigné sous le terme de processus A.TE.E (Absorption, Transfert d'Energie et Emission) ou « effet d'antenne » a été découvert en 1942.[71] Des ligands possédant un ou plusieurs systèmes π conjugués (chromophores) et des coefficients d'extinction molaire élevés sont utilisés dans ce but. D'autres voies de sensibilisation peuvent être employées, notamment *via* les bandes de transfert de charge ou *via* les transitions d-f depuis un métal de transition, mais ces

dernières ne seront pas détaillées. L'effet d'antenne, impliquant l'état triplet du chromophore, se déroule en quatre étapes (**Figure 1.23**).

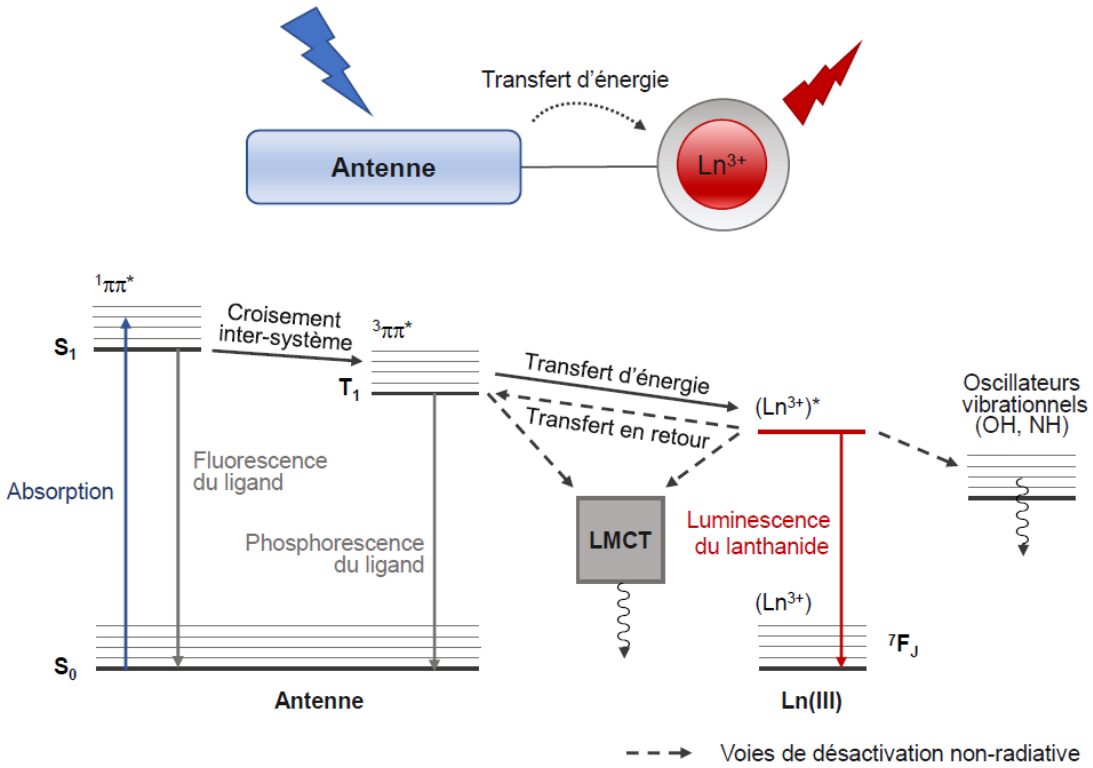


Figure 1.23. Principe de la sensibilisation des lanthanides par le ligand via son état triplet (à gauche) et transitions f-f luminescentes de l'europium (à droite)

Dans un premier temps, le chromophore organique absorbe l'énergie lumineuse et passe de l'état fondamental singulet S_0 à l'état excité singulet S_1. Favorisé par l'effet d'atome lourd dû au lanthanide paramagnétique,[72] le ligand passe de l'état singulet S_1 à l'état triplet T_1 par un processus de croisement inter-système ($^1\pi\pi^* \rightarrow {}^3\pi\pi^*$) puis le transfert d'énergie de l'état triplet du chromophore vers l'état émissif de l'ion ($^5D_0$ pour Eu(III), $^5D_4$ pour Tb(III)) a lieu. La transition radiative des électrons peuplant l'état excité vers les différents états ^7F_J, plus bas en énergie, entraîne une émission de luminescence caractéristique de l'ion lanthanide chélaté.

L'efficacité du transfert d'énergie $^3\pi\pi^* \rightarrow (Ln^{3+})^*$ dépend de la différence d'énergie entre le niveau de l'état triplet du ligand et le niveau de l'état excité du métal. Un état émissif du métal trop haut en énergie (cas du gadolinium) ne sera pas accessible pour les chromophores organiques courants. *A contrario*, si la différence d'énergie est trop faible, un transfert en retour vers l'état triplet du ligand peut avoir lieu, diminuant ainsi l'efficacité de l'effet d'antenne.

En plus de cette voie de désactivation non-radiative entrant en compétition avec la luminescence de l'ion lanthanide peuvent s'ajouter :

- la fluorescence et la phosphorescence du ligand,
- une dissipation de l'énergie par les vibrateurs OH en cas de présence de molécules d'eau dans la première sphère de coordination du métal, ou par des vibrateurs NH présents sur le ligand,
- une désactivation par transfert de charge ligand-métal (LMCT). Ces bandes LMCT impliquent un transfert d'électrons du ligand excité vers le métal, conduisant à la réduction photo-induite de ce dernier.

2.3.3.3 Prérequis d'un complexe d'ion Ln(III) luminescent

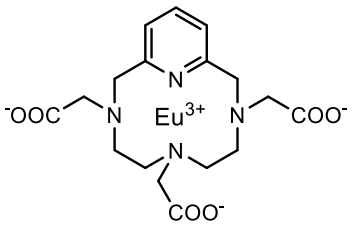
Au vu de ces différentes propriétés, le ligand et le complexe de lanthanide doivent pouvoir répondre à plusieurs critères. D'un point de vue structural, le ligand doit pouvoir saturer la sphère de coordination de l'ion lanthanide afin de minimiser les désactivations non-radiatives liées à la présence de molécules d'eau conduisant à un quenching de la luminescence. Le complexe résultant doit être soluble en milieu aqueux (pH = 7,4), et y présenter de fortes stabilités thermodynamique et cinétique. Le structure chélatante doit de plus intégrer un motif chromophore afin de sensibiliser l'ion lanthanide de la manière la plus efficace possible en jouant un rôle d'antenne.

D'un point de vue photophysique, la longueur d'onde d'absorption du chromophore doit être la plus élevée possible afin de ne pas endommager le matériel biologique par la photoexcitation des fluorophores endogènes. Le niveau énergétique de l'état triplet de l'antenne doit également être correctement positionné par rapport aux états excités de l'ion lanthanide étudié en vue d'optimiser le processus de transfert énergétique. Concrètement, la longueur d'onde d'absorption doit être inférieure à 385 nm dans le cas d'un complexe d'europium et inférieure à 346 nm dans le cas d'un complexe de terbium.[73] Comme pour les fluorophores organiques, les complexes d'ion Ln(III) doivent avoir une brillance la plus élevée possible et présenter une longue

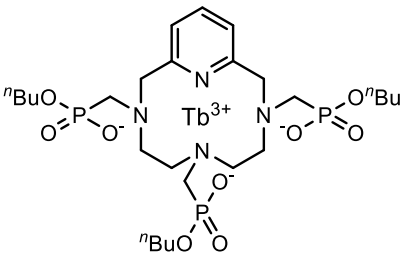
durée de vie de luminescence (de l'ordre de la milliseconde) afin d'être compatibles avec la technique de luminescence en temps résolu.

2.3.4 Les complexes dérivés du PCTA[12] en tant que sondes luminescentes

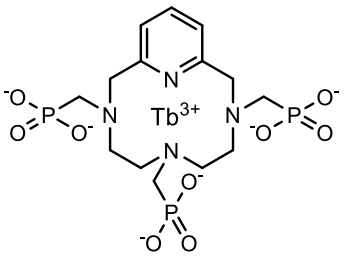
Malgré la présence d'un chromophore intracyclique laissant imaginer un transfert d'énergie efficace de antenne vers l'ion lanthanide, un nombre limité de travaux sur les complexes luminescents des ions Eu^{3+} et Tb^{3+} du PCTA[12] ou de ses dérivés a été relevé (**Figure 1.24**).[74,75,76] Les données reportées démontrent cependant que le noyau pyridine peut agir comme une antenne efficace pour la luminescence de l'ion terbium (Φ > 20 %). L'énergie élevée de l'état triplet du chromophore entraîne un transfert d'énergie moins efficace dans le cas du complexe d'europium.



Eu-PCTA



Tb-PCTMB



Tb-PCTMP

	q	λ_{ex} (nm)	ε ($cm^{-1}.M^{-1}$)	Φ	Brillance ($cm^{-1}.M^{-1}$)	τ (ms)
Eu-PCTA	2	269	4 600	0,029	133	0,37
Tb-PCTMB	-	270	3 400	0,51	1734	2,67
Tb-PCTMP	1	270	2 500	0,22	550	-

Figure 1.24. Caractéristiques photophysiques de complexes luminescents du PCTA[12] et dérivés

Ainsi, en utilisant la technique d'imagerie consistant à nébuliser une sonde colorée sur une muqueuse malade, le complexe Tb-PCTMB a été exploité par Bornhop *et al*. pour la mise évidence de cellules cancéreuses dans la muqueuse intestinale.[77] Cette publication souligne les potentialités de sondes luminescentes lanthanidiques comme support à l'acte chirurgical.

La longueur d'onde d'absorption du chromophore pyridine (λ_{exc} ~ 270 nm) n'est toutefois pas satisfaisante pour une application biologique, et le coefficient d'extinction molaire de ces sondes luminescentes (ε < 4600 $cm^{-1}.M^{-1}$) ne permet pas d'atteindre des valeurs de brillance élevées : ces chromophores présentent donc une limite de détection faible. En vue d'optimiser ces deux paramètres, une alternative consiste à étendre la conjugaison du noyau pyridine.

Dans ce contexte, des ligands dérivés de l'analogue acyclique du PCTA[12] sur lesquels une extension de conjugaison a été introduite en para-position du noyau pyridine ont été synthétisés. (**Figure 1.25**).[42,44,78,79] Ces modifications permettent de déplacer la longueur d'onde d'excitation de l'antenne vers les longueurs d'onde de plus faible énergie (jusqu'à 335 nm) et d'obtenir des coefficients d'extinction molaires jusqu'à dix fois plus élevés.

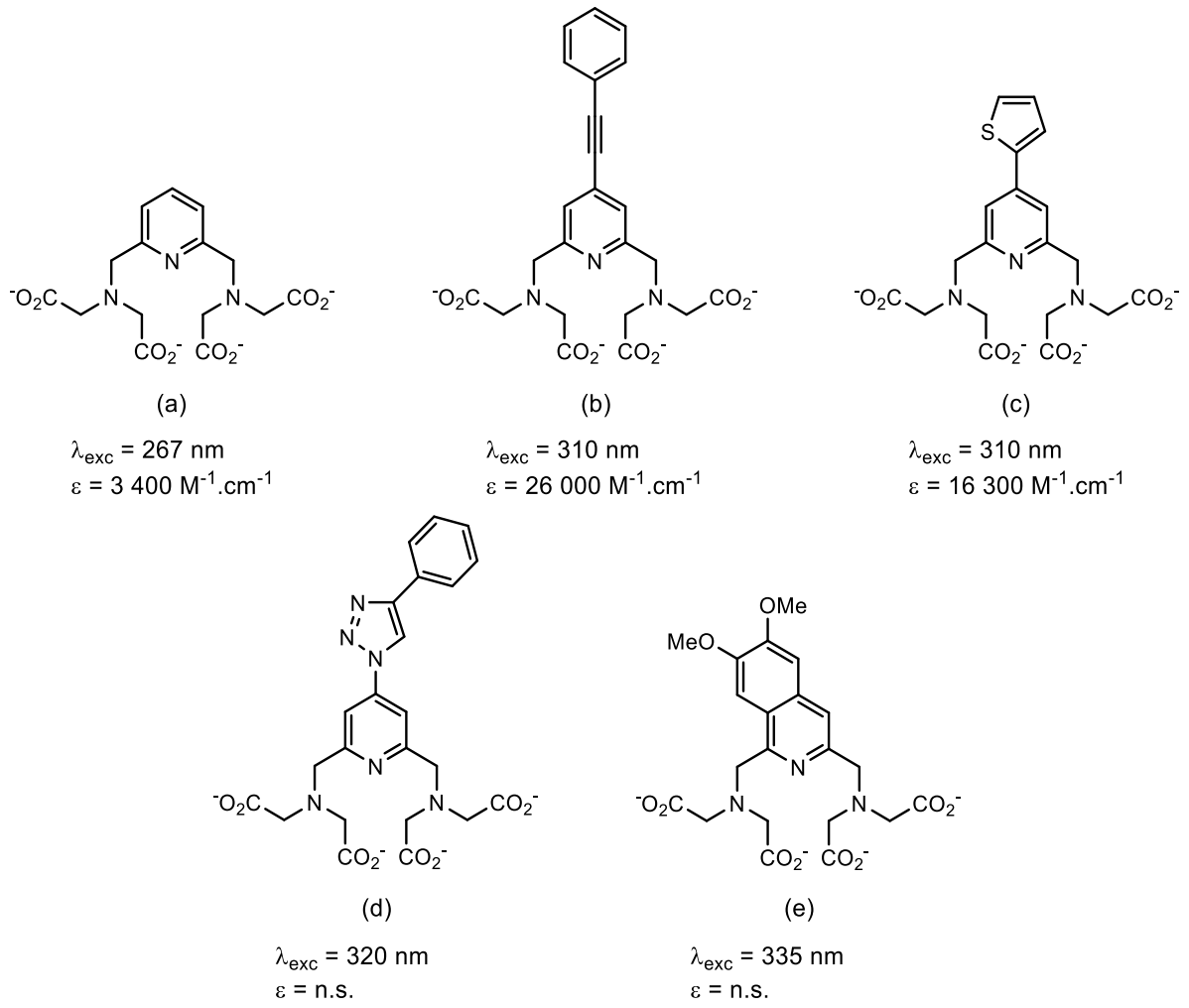


Figure 1.25. Structure et propriétés d'absorption de dérivés du ligand Py. (a) réf. 42 (b) réf. 78 (c) réf. 78 (d) réf. 44 (e) réf. 79

En conclusion, le ligand PCTA[12] semble être adapté à la complexation de nombreux métaux tels que les lanthanides ou les métaux de transition. Au cours de cette partie, ses potentialités pour la complexation du gadolinium(III) en vue d'une application en tant qu'agent de contraste IRM de type T_1, de radiométaux tels que le gallium-68, le cuivre-64, l'yttrium-90 ou le lutécium-177 pour des applications en médecine nucléaire, ou de lanthanides luminescents pour des applications en imagerie optique ont été détaillées. La présentation des différentes voies d'accès conduisant à l'obtention de ce ligand particulièrement polyvalent constituera la troisième partie de ce chapitre.

3 Synthèse de la plateforme : revue bibliographique

3.1 Introduction générale sur la synthèse de polyamines macrocycliques

Lors de la synthèse de polyazamacrocycles, la réaction de cyclisation est en général l'étape critique. Les conditions de réaction doivent être conçues pour privilégier la cyclisation intramoléculaire aux dépens de réactions intermoléculaires telles que l'oligomérisation et la polymérisation. Pour ce faire, plusieurs stratégies peuvent être envisagées : le recours au principe de haute dilution, la cyclisation par « effet template », ou la préorganisation de la structure du précurseur.[80]

3.1.1 Principe de haute dilution

Les conditions de haute dilution défavorisent les collisions entre les molécules de réactifs. L'intermédiaire réactionnel aura donc *a priori* plus de temps pour réagir sur lui-même avant de rencontrer une autre molécule. Cet effet peut être obtenu soit en utilisant un large excès de solvant, soit par addition lente des réactifs. Les conditions de haute dilution sont généralement caractérisées par le maintien d'une concentration instantanée des réactifs de l'ordre de 10^{-6} M. Les principaux inconvénients de cette technique sont les temps de réaction nécessaires et les grands volumes de solvant utilisés.

3.1.2 Effet de matrice ou « effet template »

Une façon d'éviter le recours à la technique de haute dilution consiste en l'utilisation d'un ion métallique qui, par interactions électrostatiques, va préorganiser le précurseur polyamine dans une conformation pseudo-cyclique. La réaction entre les deux extrémités fonctionnelles est privilégiée, conduisant préférentiellement à la formation du monomère macrocyclique. Les rendements de cyclisation sont cependant dépendants de la taille de la cavité et de l'ion métallique utilisé. Une étape supplémentaire de décomplexation, parfois difficile, peut également être nécessaire.

3.1.3 Considérations structurelles du précurseur

Si le précurseur polyamine présente des groupements rigides, tels que des liaisons multiples ou des noyaux aromatiques, celui-ci sera contraint dans une conformation pouvant être plus favorable à la cyclisation. La présence de substituants volumineux à proximité des groupements réactifs peut également influencer la probabilité de cyclisation en limitant les réactions intermoléculaires par gêne stérique.

3.2 Voies de synthèse du PCTA[12]

3.2.1 Richman-Atkins et premières synthèses du PCTA[12]

La première synthèse du PCTA[12] a été rapportée par Stetter *et al*. en 1981 et se base sur la méthode de cyclisation selon Richman et Atkins.[30,81] Développée en 1974, cette dernière permet la préparation de polyamines macrocycliques par la réaction de sels dimétalliques de bis-sulfonamides sur des disulfonates ou des dihalogénures (**Figure 1.26**). La publication originale montre que l'utilisation d'un solvant aprotique polaire (DMF) et d'esters sulfoniques en tant que groupements partants permet d'éviter le recours à la technique de haute dilution. La méthode employée permet la synthèse d'un grand nombre de macrocycles mais est également dépendante de plusieurs paramètres tels que la longueur des chaînes à cycliser ou la nature des groupements partants. Ainsi, lorsque des dihalogénures sont employés à la place des disulfonates, le rendement de cyclisation chute considérablement.

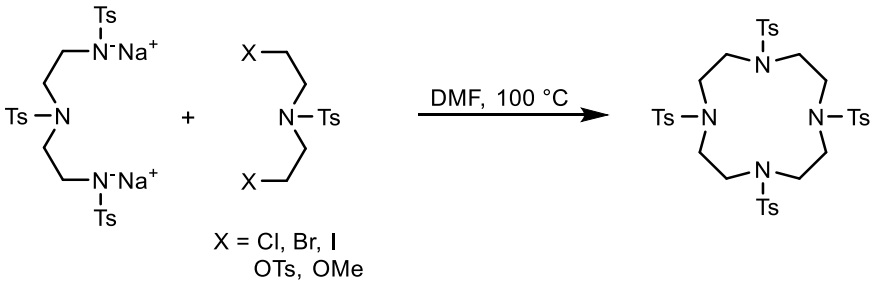


Figure 1.26. Méthode de cyclisation selon Richman et Atkins

La substitution du contre-ion sodium du sel de bis-sulfonamides par un cation organique tétraméthylammonium n'empêche pas la formation du macrocycle, même si un rendement plus faible est observé : la présence d'un effet template peut donc être exclue lors de ces synthèses. Dans la méthode de Richman et Atkins, les groupements

tosyle présents sur la chaîne polyaminée permettent en fait : (i) d'augmenter l'acidité des fonctions amine, (ii) la préorganisation d'un état de transition favorable à la macrocyclisation et (iii) la protection des fonctions amine secondaire.

La première synthèse du PCTA[12] est donc basée sur l'emploi des groupements tosyle et fait réagir le sel de bis-sulfonamides sur la 2,6-dibromométhylpyridine dans du diméthylformamide (DMF) anhydre. En évitant les conditions de haute dilution (C = 0,2 mM), le macrocycle protégé est obtenu avec un rendement de cyclisation correct de 70 % (**Figure 1.27**). Puisque la rigidité de l'espèce électrophile est apportée par le noyau pyridine, l'encombrement stérique apporté par les esters de sulfonate n'est plus nécessaire et les dihalogénures sont alors préférés en tant que groupements partants. L'intermédiaire déprotégé est obtenu par hydrolyse des fonctions tosyle par un mélange acide bromhydrique/phénol et conduit à la formation du pyclène avec un rendement de déprotection de 67 %. Ce dernier est ensuite alkylé par action de l'acide chloroacétique à pH = 10 pour former le PCTA[12] avec un rendement global de la réaction de 26 % en partant de la polyamine tritosylée.

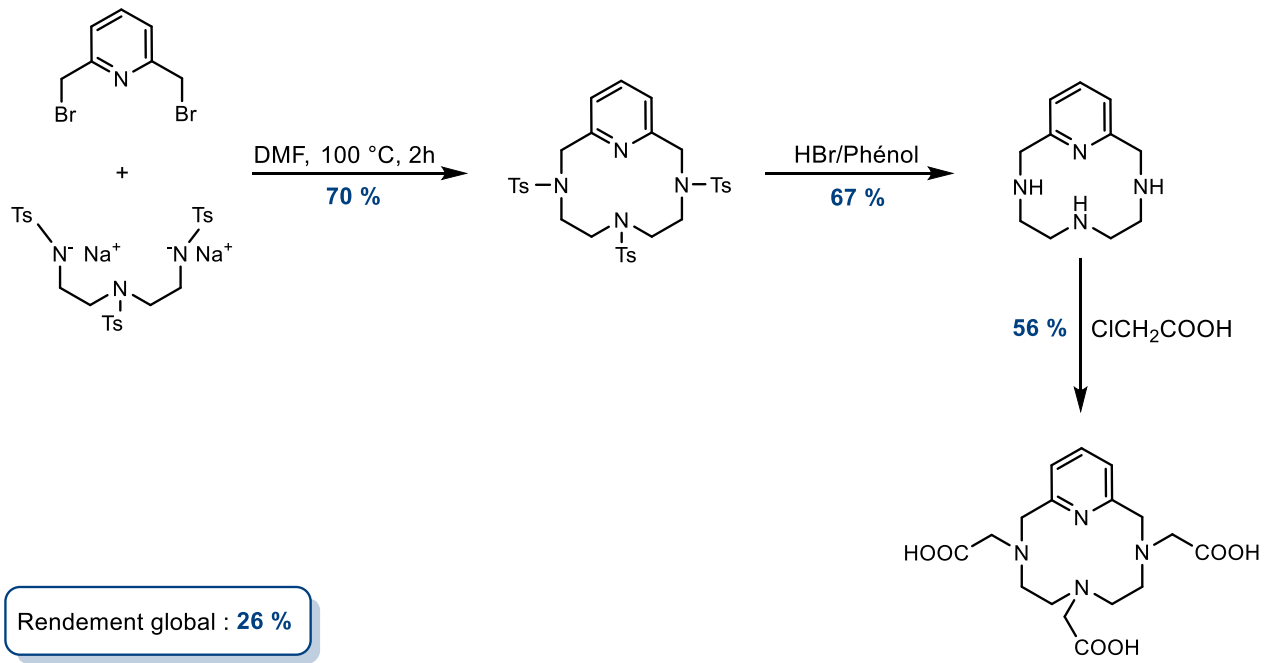


Figure 1.27. Première synthèse du PCTA[12][30]

En 1994, Xue *et al*. modifient la procédure de Richman et Atkins en réalisant la condensation directe du tritosylate de diéthylènetriamine (et non plus du sel de bis-sulfonamides) sur la 2,6-dibromométhylpyridine, cette fois en présence de carbonate

de potassium en tant que base et à température ambiante.[82] Ces conditions, plus douces puisqu'aucun chauffage n'est nécessaire, permettent un rendement de cyclisation de 93 % en pyclène tritosylé. Si l'étape d'alkylation conduisant à la formation du PCTA[12] n'a pas été décrite, cette publication propose tout de même un rendement de déprotection conduisant à la plateforme pyclène de 90 %, en utilisant les mêmes conditions que la publication de référence (*i.e.* HBr/phénol).

Korovin *et al.* reprennent cette modification et montrent que l'utilisation de chlorures à la place de bromures en tant que groupements partants fait chuter le rendement de cyclisation de 30 % et ce, malgré un chauffage à reflux pendant 8h.[83] L'hydrolyse des groupements tosyle par action de l'acide sulfurique puis l'alkylation des amines secondaires par l'acide chloroacétique présentent sensiblement les mêmes rendements que ceux reportés par l'équipe de Stetter. Le rendement global de formation du PCTA[12] est ici de 22 % en partant de la diéthylènetriamine.

En gardant le carbonate de potassium en tant que base et en faisant réagir le tritosylate de diéthylènetriamine sur la 2,6-dichlorométhylpyridine dans de l'acétonitrile (ACN) anhydre à reflux cette fois, Aime *et al.* obtiennent un très bon rendement de cyclisation de 94 %.[84] Les étapes suivantes de déprotection et d'alkylation s'opèrent dans les conditions standards, et conduisent à la formation du PCTA[12] avec un rendement global de 36 % (**Figure 1.28**).

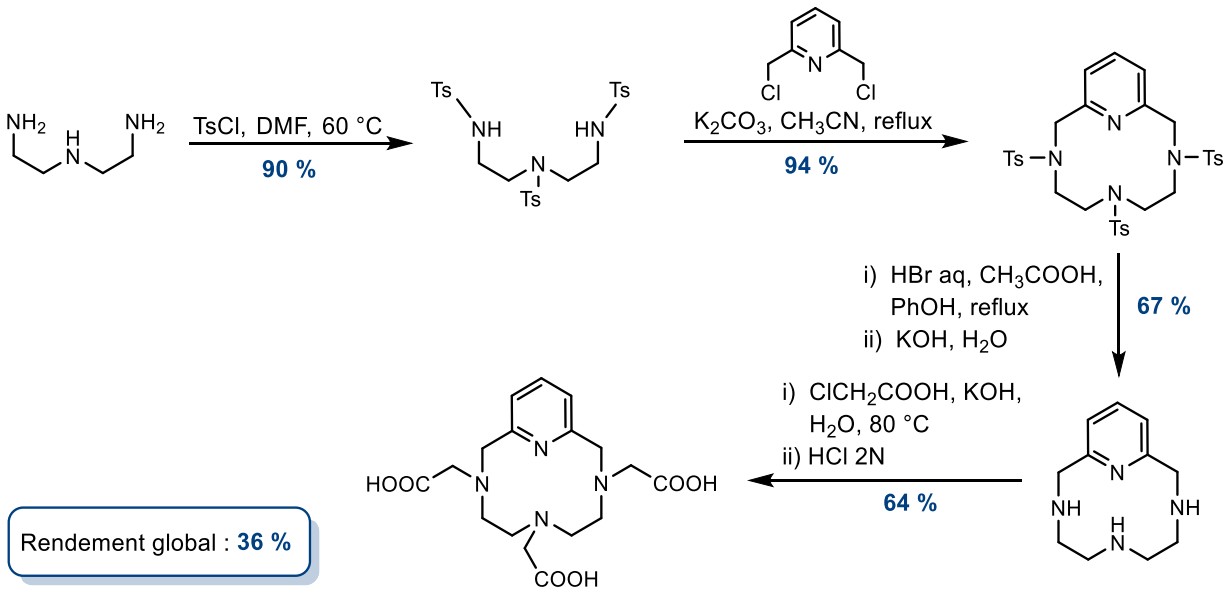


Figure 1.28. Synthèse du PCTA[12] selon Aime *et al.*[84]

L'ensemble des données issues de ces synthèses est reporté dans le tableau suivant (**Tableau 1.16**). Comme précisé précédemment, la méthode de Richman et Atkins comporte une deuxième étape. Après une première réaction de macrocyclisation, la régénération des fonctions amine secondaire par déprotection des groupements tosyle est nécessaire. L'hydrolyse de ces groupements protecteurs nécessite cependant des conditions réactionnelles drastiques (acide sulfurique à 100 °C, acide bromhydrique en solution dans l'acide acétique à 90 °C) pas toujours compatibles avec la présence de groupements fonctionnels labiles sur le noyau pyridine. Une alternative aux groupements tosyle a donc été envisagée.

X	Base	Solvant	Chauffage	$R_{cycl.}$	Conditions de déprotection	$R_{dép}$	R_{global}	Réf.
Br	-	**DMF**	Oui	**70 %**	HBr/Phénol	**67 %**	**26 %**	30
Br	K_2CO_3	**DMF**	Non	**93 %**	HBr (33%) dans AcOH/Phénol puis NaOH	**90 %**	**-**	82
Cl	K_2CO_3	**DMF**	Oui	**63 %**	H_2SO_4 concentré	**65 %**	**22 %**	83
Cl	K_2CO_3	**ACN**	Oui	**94 %**	HBr (48%) dans AcOH/Phénol puis KOH	**67 %**	**36 %**	84

Tableau 1.16. Récapitulatif des rendements de cyclisation, de déprotection et des rendements totaux, conduisant à la formation du PCTA[12]

3.2.2 Utilisation des groupements nosyle

Fukuyama *et al.* ont montré que l'utilisation de groupements nosyle (2-nitrobenzène sulfonyle) en tant que groupements protecteurs/activateurs de fonctions amine permettait le recours à des protocoles de déprotection en conditions douces et à température ambiante ($HSCH_2COOH/LiOH$, $PhSH/Na_2CO_3$ ou K_2CO_3).[85,86]

An *et al.* ont été les premiers à appliquer ce protocole à la synthèse de pyridinophanes en vue de la création d'une bibliothèque pour la chimie combinatoire et suite à ces travaux, Burguete *et al.* ont mis au point la synthèse one-pot de polyamines cycliques contenant des noyaux aromatiques.[87,88] Si Aime *et al.* apportent la preuve de concept sur un dérivé du PCTA[12] ayant une fonction ester labile sur le noyau hétéroaromatique,[89] l'équipe de Guy propose cependant la première synthèse

de la plateforme PCTA[12] utilisant les groupements nosyle à proprement parler (**Figure 1.29**).[90] Ces derniers montrent également que l'utilisation de ces groupements nosyle n'a pas d'influence sur le rendement de cyclisation, et élargissent la diversité des macrocycles dérivés du PCTA[12] en faisant varier la nature de la fonctionnalisation sur l'azote central de la polyamine activée.[91]

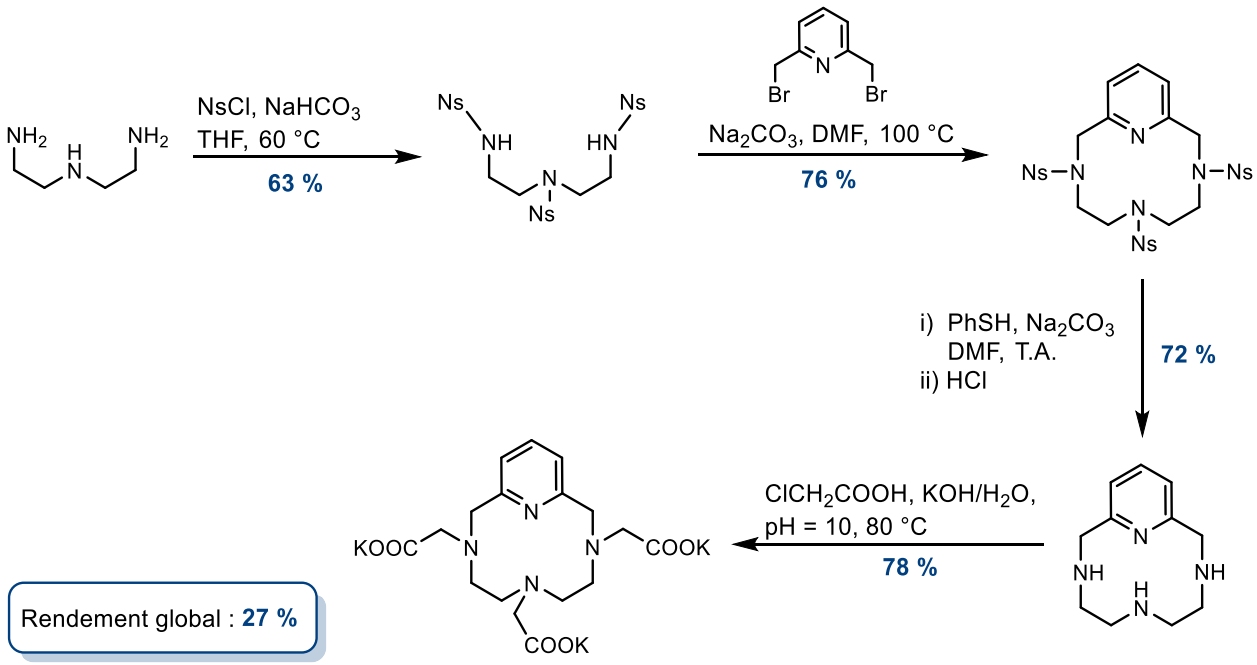


Figure 1.29. Synthèse du PCTA[12] selon Siaugue *et al.*[90]

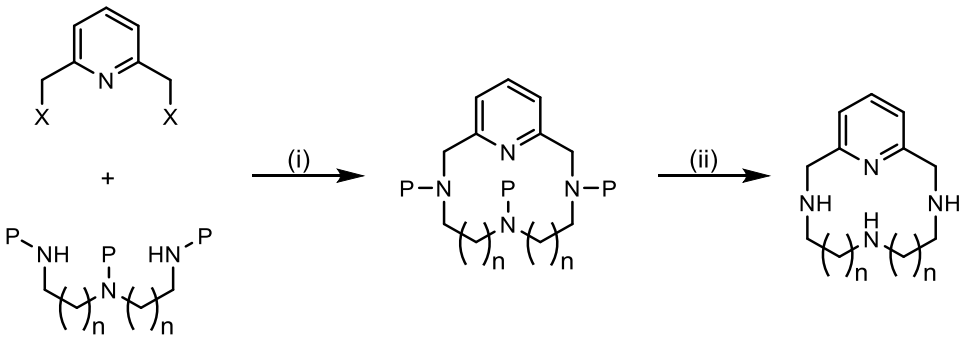
Dans les deux approches de la synthèse du PCTA[12] mettant en œuvre la méthodologie de macrocylisation de Richman-Atkins et l'utilisation de dérivés tosylés ou nosylés de la diéthylènetriamine, il est important de souligner le fait que les réactions de déprotection et de trialkylation subséquentes à l'étape de cyclisation induisent une chute considérable de rendement global de la synthèse.

3.2.3 Autres méthodes de protection des amines

L'utilisation du groupement diéthoxyphosphoryle ($PO(OEt)_2$) a été rapportée par Chellini *et al.*[92] Ses avantages sont nombreux (solubilité des polyamines protégées et récupération aisée du macrocycle d'intérêt, bons rendements de cyclisation) et propose un mode de déprotection à température ambiante par action d'HCl gazeux dans du dioxane. Ce procédé nécessite cependant le recours à un système biphasique

(toluène – soude aqueuse à 50 %) en présence d'un catalyseur de transfert de phase ($Bu_4N(HNO_4)$) lors de la réaction de macrocyclisation (**Figure 1.30**).

Hoye *et al.* ont également rapporté la synthèse du PCTA[14] par la méthode de Richman-Atkins *via* l'utilisation de β-triméthylsilyléthylsulfonyle (SES-sulfamide), un groupement protecteur pouvant être facilement clivé par traitement du macrocycle au fluorure de césium.[93]



Conditions de Chellini *et al.* :

X = Cl, P = $PO(OEt)_2$, n = 1
(i) $Bu_4N(HSO_4)$, Toluène/$NaOH_{aq}$ (50%), reflux, 4h, **82 %**
(ii) Dioxane/HCl_g, 12h, T.A., **75 %**

Conditions de Hoye *et al.* :

X = Br, P = $Me_3SiCH_2CH_2SO_2$, n = 2
(i) $CsCO_3$, DMF, 48h, T.A., **61 %**
(ii) CsF, DMF, 24h, 95 °C, **83 %**

Figure 1.29. Autres groupements protecteurs utilisés pour la réaction de Richman et Atkins

3.2.4 Autres méthodes de cyclisation

Par la voie des imines

Cette méthode est basée sur l'effet template et permet la condensation d'un dialdéhyde (ou d'une dicétone) sur un précurseur aux fonctions amine terminale non protégées. L'imine ainsi formée est réduite puis l'ion métallique servant à la cyclisation est décomplexé (**Figure 1.31**). La voie des imines a été employée pour la réaction de la dipropylènetriamine sur la 2,6-dicarbaldéhydepyridine en présence de nitrate de cuivre, pour la synthèse de dérivé du PCTA à 14 chaînons. Des essais de synthèse du PCTA[12] et de son analogue à 13 chaînons ont été réalisés sans succès, montrant l'importance de l'ion métallique employé et de la taille de la chaîne lors de l'utilisation de cette méthode de cyclisation.[74]

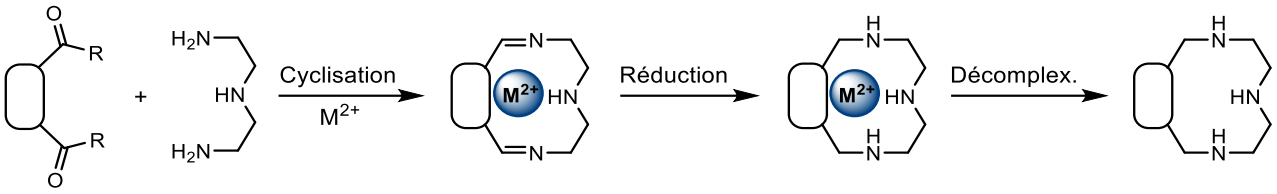


Figure 1.31. Réaction de macrocyclisation mettant en jeu la formation de diimines

Par la voie des amides

Les diamides macrocycliques sont préparés par condensation d'un précurseur polyamine non-protégé sur des groupements diacide activés (en général des dichlorures de diacides), puis par réduction des deux liaisons amides formées (**Figure 1.32**). Une seule référence porte sur la condensation de la diéthylènetriamine sur du dichlorure de 2,6-dicarbonylepyridine (rendement de cyclisation de 70 %), mais aucune publication ne mentionne la réduction de cet intermédiaire diamide macrocyclique en vue de former la plateforme pyclène.[94] L'inconvénient de cette méthode est l'emploi de réducteur puissant (BH_3) incompatible avec certains groupements fonctionnels.

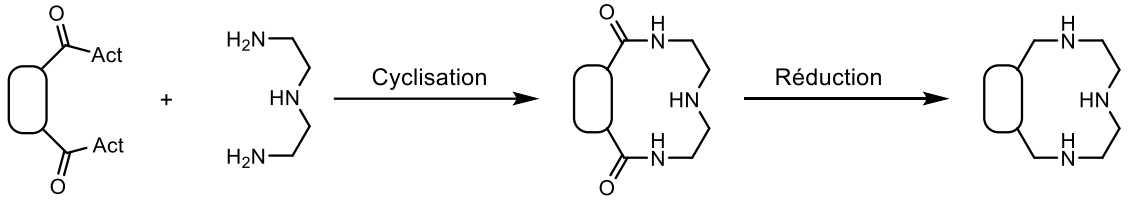


Figure 1.32. Réaction de macrocyclisation mettant en jeu la formation de diamides

Par la réaction de Mitsunobu

Suite aux travaux de Kan *et al.* sur la préparation d'amines cycliques *via* l'utilisation des conditions de Mitsunobu, Hovinen *et al.* ont développé la synthèse one-pot d'azamacrocycles dont des dérivés du PCTA[12] fonctionnalisés en position para de la pyridine (**Figure 1.33**).[95,96] Lin *et al.* modifient cette procédure en utilisant de la tributylphosphine à la place de la triphénylphosphine et rapportent des rendements de cyclisation allant de 54 % à 93 % pour des macrocycles fonctionnalisés en position méta de la pyridine.[97] L'inconvénient majeur de cette méthode de cyclisation est la génération d'oxyde de triphénylphosphine et d'hydrazinedicarboxylate en tant que sous-produits, ne permettant pas toujours d'isoler le produit de couplage facilement.

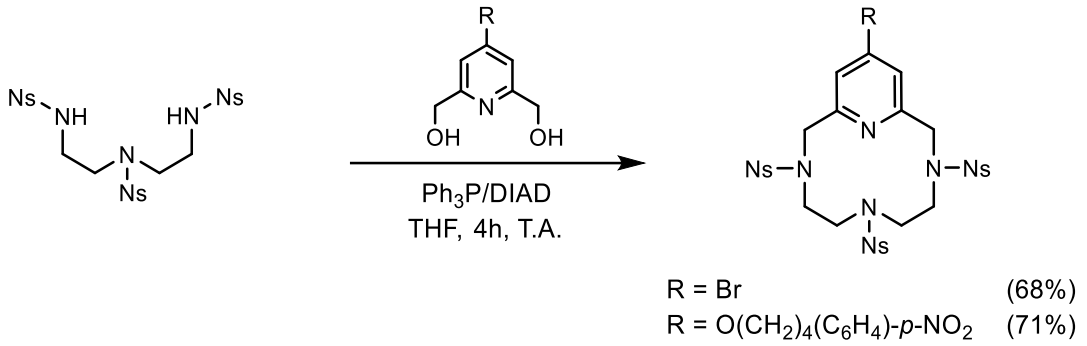


Figure 1.33. Cyclisation par réaction de Mitsunobu [96]

Par la réaction de Mannich

En 2004, Aime *et al.* proposent la synthèse d'un dérivé fonctionnalisé du PCTA[12] portant deux fonctions hydroxyle en position méta de la pyridine.[98] L'étape de cyclisation fait intervenir une double réaction de Mannich entre le 3,5-dihydroxypyridine et un précurseur triaminé protégé par des groupements ester de *tertio*-butyle, en présence de paraformaldéhyde et d'un acide organique (**Figure 1.34**). Ce procédé permet d'obtenir le macrocycle protégé avec un rendement correct de 62 %.

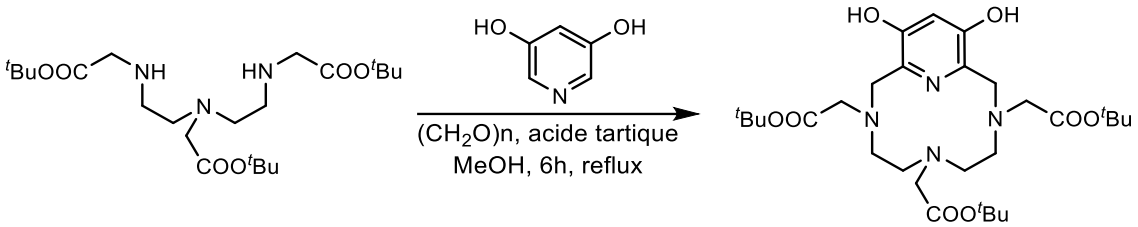


Figure 1.34. Cyclisation par double réaction de Mannich

3.3 Synthèse de ligands bifonctionnels chélatants dérivés du PCTA[12]

Plusieurs méthodes peuvent être envisagées lors de la conception d'un ligand bifonctionnel chélatant. Dans le cas de la plateforme PCTA[12] le groupement fonctionnel peut se situer sur (i) le noyau hétéroaromatique en diverses positions,[97,99] (ii) le squelette carboné,[100,101] ou (iii) un bras complexant.[102] Contrairement à certains LBC dérivés du DOTA, il convient de noter que la fonction réactive ne pourra en aucun cas être l'un des groupements acétate coordinant au risque de faire chuter la stabilité des complexes formés. Les modifications seront donc apportées soit par la synthèse préalable de pyridines substituées ou de précurseurs polyaminés modifiés, soit par une alkylation sélective d'une des fonctions amine secondaire. A partir de ces

stratégies, plusieurs agents bifonctionnels chélatants dérivés du squelette PCTA[12] ont été synthétisés (**Figure 1.35**).

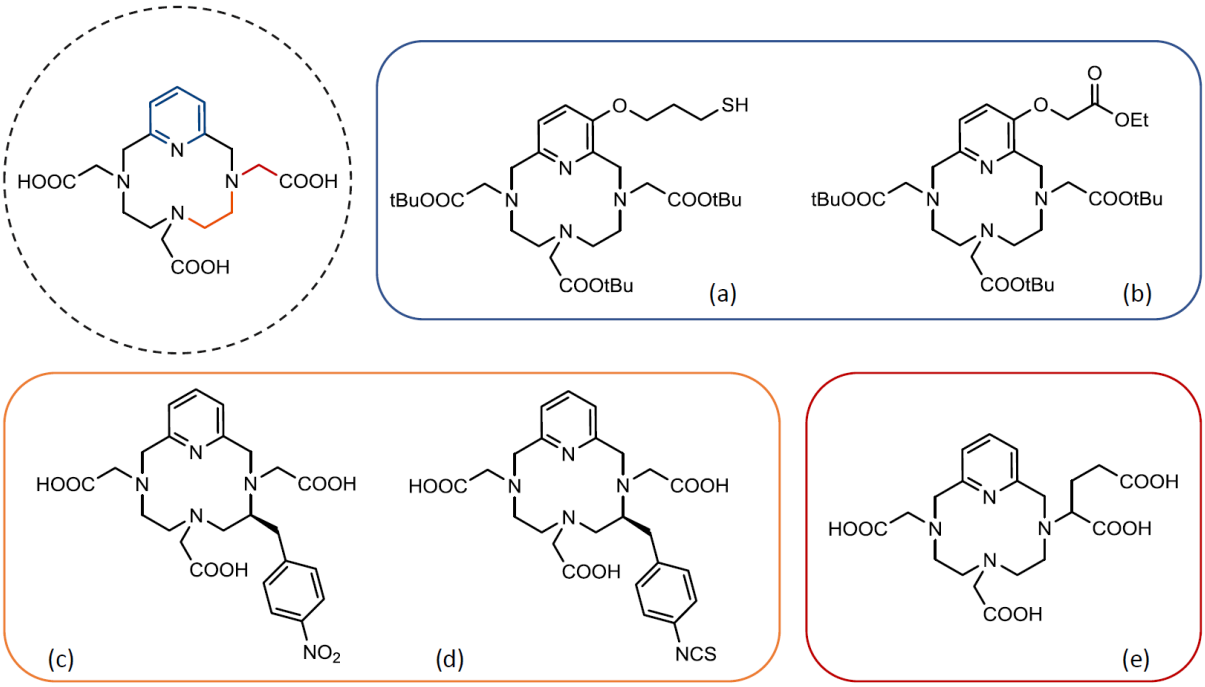


Figure 1.35. Exemples de ligands bifonctionnels chélatants dérivés du PCTA[12] (a) réf. 97 (b) réf. 99 (c) réf. 100 (d) réf. 101 (e) réf. 102

A titre d'exemple, la synthèse du ligand PCTA[12] fonctionnalisé par un groupement isothiocyanate au niveau du squelette carboné, le *p*-NCS-Bn-PCTA[12], est ici détaillée (**Figure 1.36**). Comme décrit précédemment, ce ligand a été largement utilisé pour l'évaluation de bioconjugués, notamment en raison de sa commercialisation par la société Macrocyclics (USA).

La synthèse de ligands fonctionnalisés sur le squelette carboné nécessite dans un premier temps la préparation du précurseur dérivé de la diéthylènetriamine portant la fonctionnalisation. Ce dernier est obtenu en trois étapes par condensation de l'éthylènediamine sur la *p*-nitrophénylalanine commerciale préalablement estérifiée. La réduction de l'amide formé conduit à la 1-(*p*-NO_2-Bn)diéthylènetriamine d'intérêt.[103]

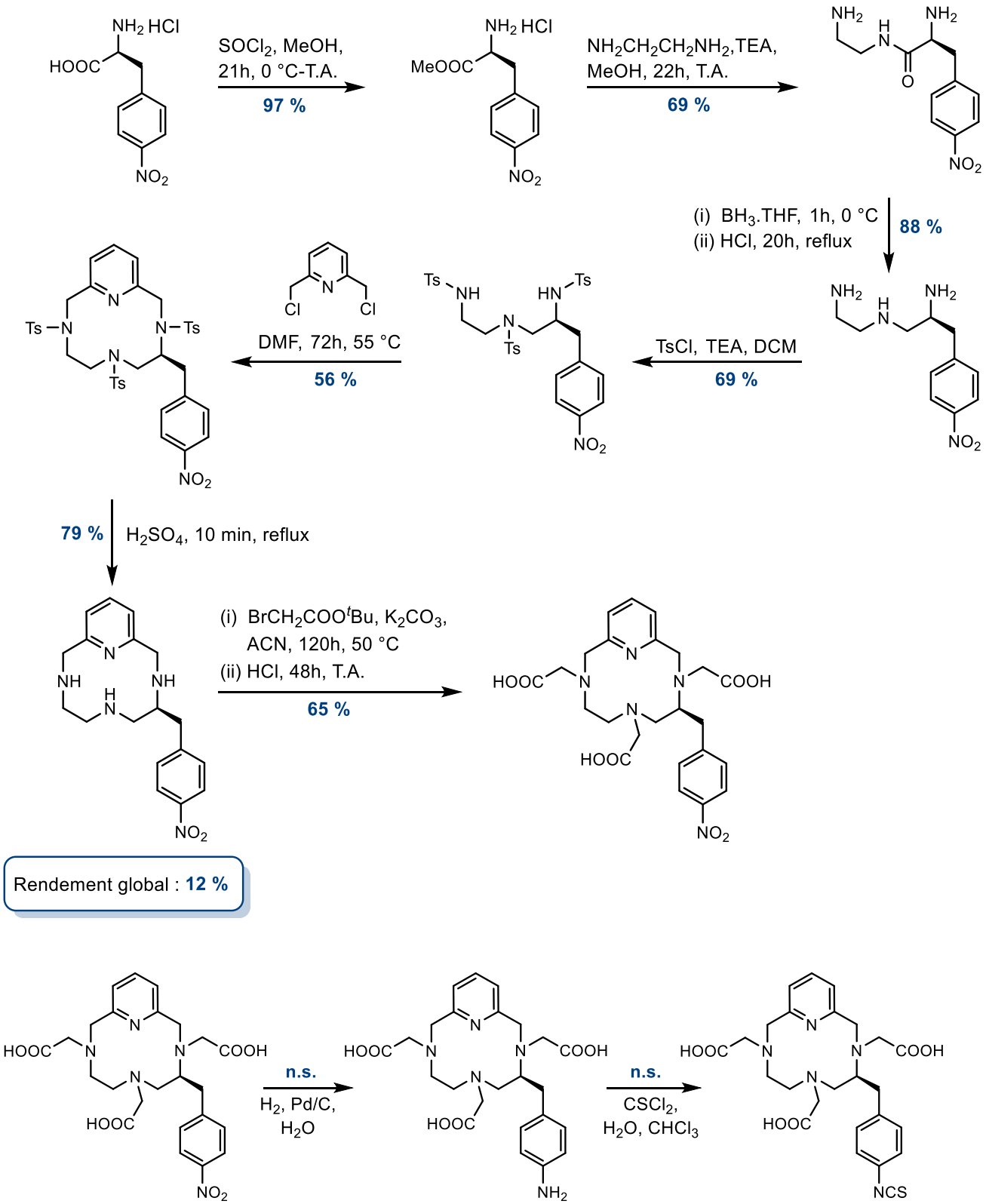


Figure 1.36. Synthèse du dérivé *p*-NCS-Bn-PCTA[12] par la méthode de Richman et Atkins[100,101,103] (n.s. = non spécifié)

La formation de la plateforme macrocyclique protégée est réalisée dans les conditions de cyclisation usuelles de Richman et Atkins, puis les groupements tosyle sont clivés en milieu acide concentré et à reflux. Les amines secondaires ainsi régénérées sont ensuite alkylées par action du bromoacétate de *tertio*-butyle et le triester correspondant est hydrolysé pour conduire au *p*-NO_2-Bn-PCTA[12] sous sa forme chlorhydratée. Les rendements concernant les étapes de réduction du groupement nitro et de transformation de la fonction amine résultante en fonction isothiocyanate n'étant pas disponibles, cette stratégie propose un rendement global pour la synthèse du *p*-NO_2-Bn-PCTA[12] de 20 % **à partir du précurseur triaminé**.[100,101]

3.4 Synthèse de dérivés du PCTA[12] à différentes fonctions complexantes

3.4.1 Synthèse de dérivés symétriques

Deux stratégies peuvent être employées pour la synthèse de dérivés du pyclène *N*-substitués par trois fonctions complexantes autres que des fonctions acétate. Dans le cas d'une substitution symétrique, la première étape consiste en la synthèse de la plateforme pyclène, et la seconde en l'introduction des fonctions pendantes par simple réaction d'alkylation. Cette stratégie a été utilisée pour la synthèse de ligands présentant des fonctions acétate (**§ 3.2.1**), glutarate,[104] propionate,[91] ou acétamide.[105] Des dérivés aux fonctions phosphonate ont également été synthétisés.[48,66]

3.4.2 Synthèse de dérivés à fonctions mixtes

Une stratégie alternative doit être envisagée pour l'introduction de substitutions mixtes. Si la fonction différente est introduite sur l'azote central du macrocycle, la première étape est alors la synthèse d'un précurseur polyaminé portant cette modification. La triamine peut être obtenue par une double nosylation sélective des fonctions amine terminale suivie de l'alkylation de l'azote central. Pour la synthèse des dérivés diéthylènetriamine, une autre approche consiste en la réaction de la fonction pendante désirée portant une amine primaire sur des *N*-sulfonylaziridines (**Figure 1.37**). La formation du macrocycle est ensuite réalisée en utilisant la méthode standard de Richman et Atkins et après hydrolyse des fonctions tosyle, les deux autres fonctions latérales peuvent être introduites.[106]

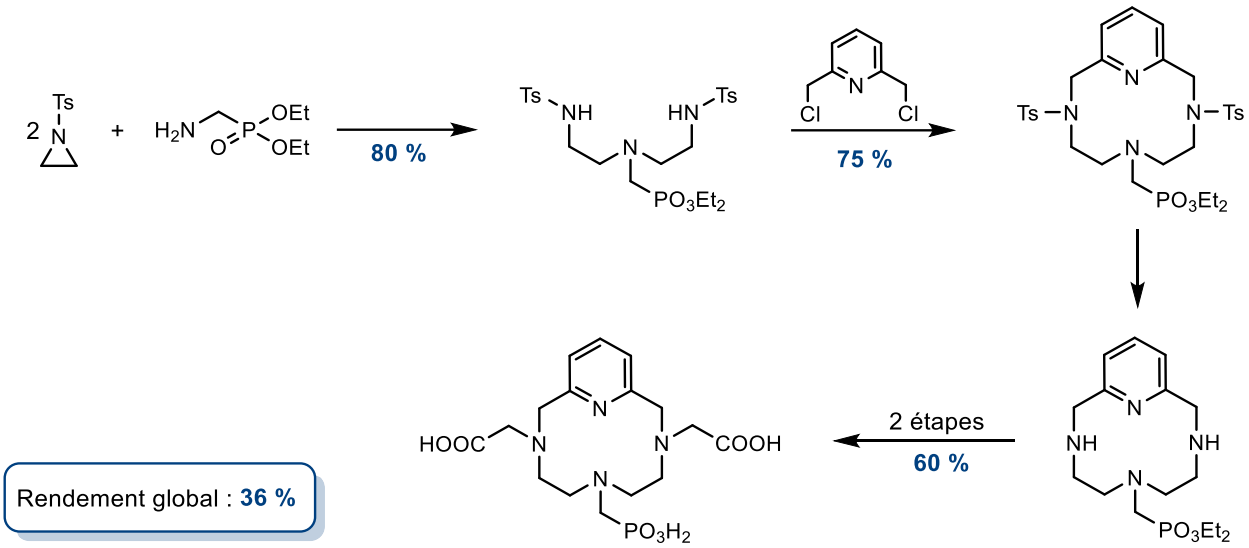


Figure 1.37. Synthèse du dérivé PC2AP [106]

Une deuxième stratégie, développée récemment, permet la fonctionnalisation séléctive de l'une des deux fonctions amine latérales (**Figure 1.38**).[107,108] La première étape consiste en la protection de deux amines secondaires par action d'un diester d'acide oxalique sur la plateforme pyclène. Suite à l'introduction sélective de la fonction pendante sur l'amine secondaire restante, le pont oxalamide est clivé et les deux fonctions amine ainsi libres peuvent alors être fonctionnalisées. Cette méthode de synthèse a notamment permis l'obtention d'un chélatant dissymétrique portant une fonction picolinate sur l'une des fonctions amine latérales avec un rendement global de 17 %.

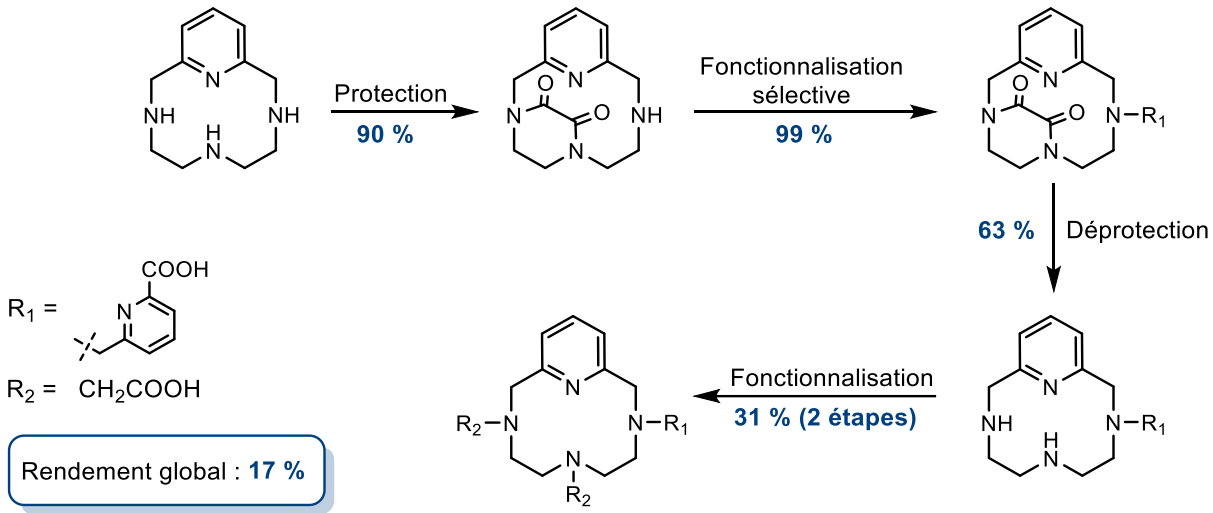


Figure 1.38. Fonctionnalisation spécifique de la plateforme pyclène

4 Objectifs du projet

Les travaux présentés dans ce mémoire s'inscrivent dans le cadre de l'étude du ligand PCTA[12] et de ses dérivés. Les potentialités de ce ligand à agir comme agent de contraste paramagnétique, comme fluorophore ou comme radiopharmaceutique ont précédemment été évoquées. Au vu des données de la littérature, le ligand PCTA[12] et ses dérivés peuvent constituer une alternative à la famille des ligands traditionnels dont le DTPA, le DOTA, ou NOTA et leurs dérivés respectifs font partie.

Dans cette optique, la conception d'outils de synthèse organique permettant d'étendre les potentialités de ce ligand dans les domaines de la bioanalyse, de l'imagerie médicale ou de la radiothérapie a dû être envisagée. Les travaux décrits dans le cadre de cette thèse ont tenté de répondre à quatre objectifs distincts qui ont été :

- d'améliorer l'accès au PCTA[12] en termes de rendement global de synthèse,
- de diversifier les dérivés bifonctionnels du PCTA[12] aptes à des réactions de conjugaison,
- de diversifier la nature des fonctions complexantes,
- d'améliorer les propriétés fluorescentes des complexes Eu(III) et Tb(III) de cette famille de ligands heptadentes.

Dans un premier temps, une nouvelle stratégie de synthèse du PCTA[12] a été développée. Comme évoqué précédemment, les synthèses rapportées jusqu'à présent mettent en œuvre la méthodologie de « Richman-Atkins », classiquement utilisée pour l'obtention de polyazamacrocycles. Cette approche a recours à des dérivés arylsulfonamides (Ts ou Ns) de la diéthylènetriamine permettant d'obtenir des rendements élevés (60 – 80 %) dans l'étape clé qu'est celle de la réaction de macrocyclisation. La méthodologie de « Richman-Atkins » nécessite toutefois une

déprotection des groupes arylsulfonamide et une triple réaction d'alkylation pour introduire les bras acétate de *tertio*-butyle ou acide acétique. Ces réactions post-macrocyclisation contribuent à une chute du rendement de synthèse dans le cas du PCTA[12], et conduisent à des rendements globaux de 36 % (Ts) et 27 % (Ns) à partir de la diéthylènetriamine. De plus, cette méthodologie de synthèse ne permet pas de modifier aisément la structure du noyau pyridine, à moins de régénérer entièrement la plateforme macrocyclique.

Une stratégie de synthèse permettant de limiter le nombre d'étapes de synthèse post-macrocyclisation a donc été envisagée. Celle-ci repose sur l'utilisation d'un synthon triamine acyclique incorporant des groupements acétate protégés sous forme d'esters. L'étape de synthèse post-macrocyclisation se résume alors à une réaction de déprotection de fonctions ester. Dans le cas de cette approche, l'étape clé (potentiellement limitante) de la réaction de macrocyclisation ne bénéficie pas de la présence de groupements volumineux tels que les groupes tosyle ou nosyle permettant de restreindre la mobilité conformationnelle de l'intermédiaire réactionnel. Toutefois, la présence de fonctions coordinantes (atomes d'azote aliphatique, azote pyridinique, fonctions ester) au niveau de l'intermédiaire réactionnel est susceptible d'engendrer un effet de matrice dû à un ion métallique (**Figure 1.39**).

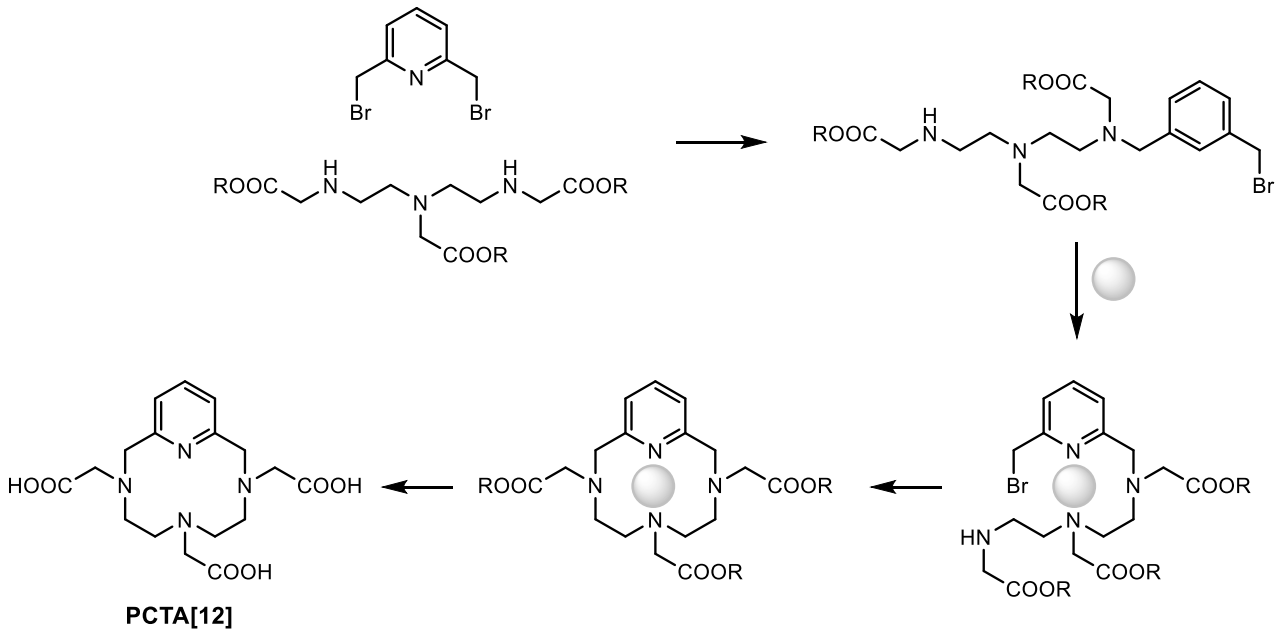


Figure 1.39. Approche envisagée pour la synthèse du PCTA[12]

L'introduction d'une fonction réactive permettant le couplage covalent du ligand PCTA[12] ou de ses complexes Ln(III) à des entités d'intérêt biologique (molécules bioactives, peptides, protéines, anticorps) ou supramoléculaires (dendrimères, nanoparticules) a constitué le second point d'intérêt de ces travaux. Il est à noter que les travaux décrits dans la littérature faisant intervenir un PCTA[12] bioconjugué sont uniquement basés sur un dérivé commercial (Société Macrocyclics, USA) fonctionnalisé par une fonction isothiocyanate introduite sur la chaîne carbonée intracyclique du macrocycle.

De manière générale, l'introduction d'une fonction réactive peut s'effectuer sur plusieurs sites du ligand PCTA[12] : (i) sur le noyau pyridine, (ii) sur la chaîne carbonée intracyclique, (iii) ou sur la chaîne carbonée d'une fonction de coordination (chaîne extracyclique) (**Figure 1.40**). Deux autres possibilités peuvent également être envisagées, mais peuvent être responsables d'une moindre stabilité thermodynamique des complexes Ln(III) correspondants. Il s'agit de l'introduction d'une chaîne du type amide dont le *N*-substituant intègre une fonction réactive, ou d'une chaîne latérale non coordinante fonctionnalisée par un groupe apte à une conjugaison.

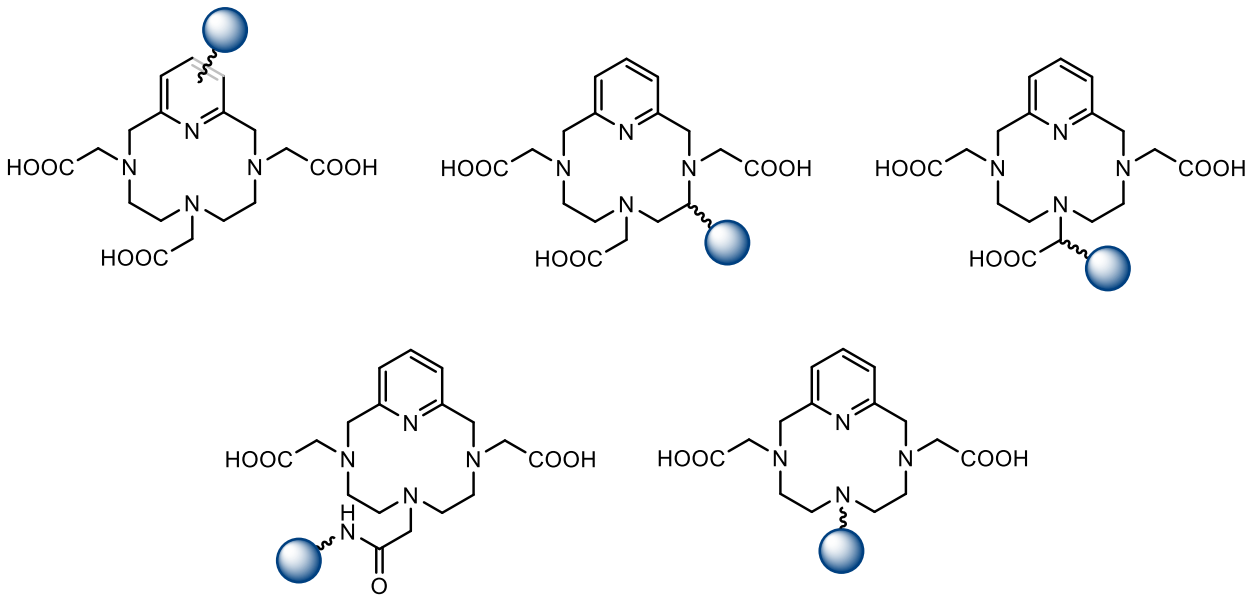


Figure 1.40. Sites de conjugaison disponibles sur le squelette PCTA[12]

Dans le cadre de ces travaux, ces fonctions réactives ont été introduites sur le noyau pyridine ou sur la chaîne extracyclique centrale. Différentes fonctions ont été privilégiées de manière à couvrir un large spectre de réactions de conjugaison :

fonctions ester de méthyle, acide carboxylique, amine, alcool, isothiocyanate ou maléimide. Les composés bifonctionnels synthétisés sont rassemblés dans la figure suivante (**Figure 1.41**).

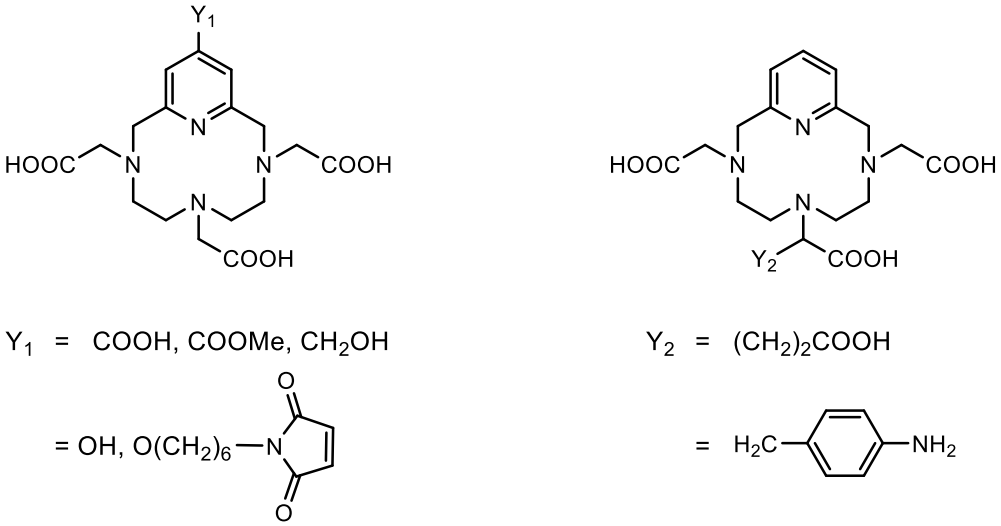


Figure 1.41. Dérivés bifonctionnels du PCTA[12] cibles

Le remplacement d'une ou plusieurs fonctions acide carboxylique de ligands polyaminocarboxyliques par des groupements amide, acide phosphinique ou acide phosphonique a été décrit dans de nombreuses publications. Cette substitution est susceptible d'influencer plusieurs propriétés des complexes Ln(III) telles que la stabilité thermodynamique, la charge globale électrique, le nombre d'hydratation q, ou encore la vitesse d'échange k_{ex} des molécules d'eau coordinées au métal.

Dans ce contexte, et en appliquant la méthodologie de synthèse mise au point au laboratoire, des ligands dérivés du PCTA[12] intégrant une chaîne extracyclique centrale à fonction amide ou acide phosphinique ont été synthétisés. Les structures de ces dérivés à fonctions complexantes mixtes sont présentées dans la figure suivante (**Figure 1.42**).

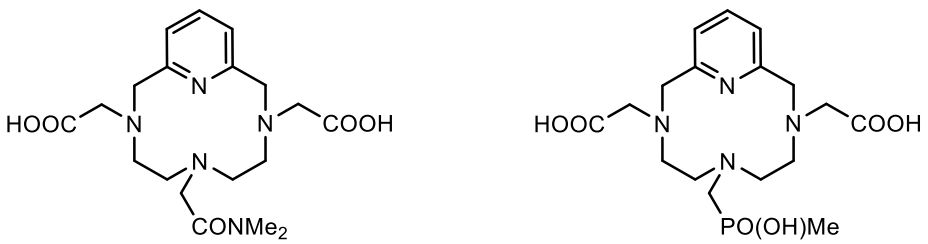


Figure 1.42. Dérivés du PCTA[12] à fonctions complexantes mixtes

La dernière partie de ces travaux envisage l'amélioration des propriétés fluorescentes des complexes Eu(III) et Tb(III) de dérivés du PCTA[12]. Il s'agit d'introduire, au niveau du noyau pyridine, un chromophore plus adéquat en termes d'efficacité d'effet d'antenne, notamment en ce qui concerne la longueur d'onde d'excitation et le coefficient d'absorption molaire directement impliqué dans la brillance des complexes. Deux dérivés incorporant un motif carbostyrile ou benzimidazole ont été évalués (**Figure 1.43**).

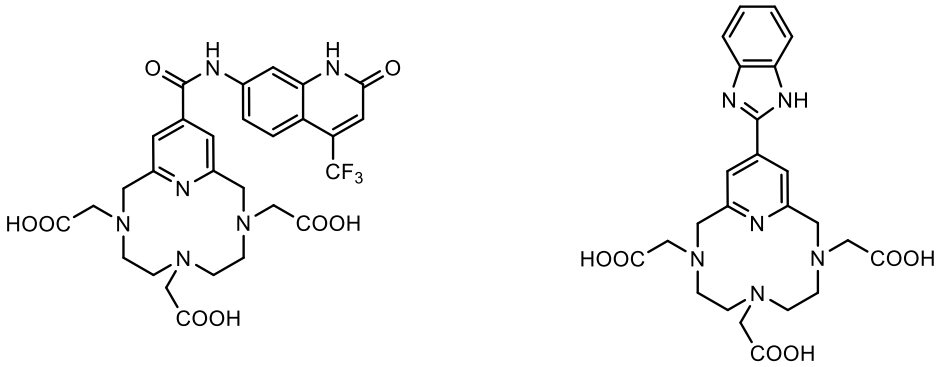


Figure 1.43. Dérivés du PCTA[12] à motifs carbostyrile et benzimidazole

Le recours au chromophore carbostyrile-124 (cs124) comme antenne pour la photosensibilisation des ions Eu(III) et Tb(III) a été initié par l'équipe de Selvin. Les auteurs ont introduit ce chromophore sur un squelette DTPA ou DOTA par le biais d'une fonction acide carboxylique.[109,110] Bien que le motif carbostyrile ne participe pas directement à la coordination des ions Ln(III) dans ces complexes, leurs propriétés de fluorescence se sont révélées être particulièrement attrayantes (**Figure 1.44**).

Par la suite, l'équipe de Parker a introduit le motif carbostyrile-124 sur un dérivé tétraamide du DOTA.[111] Leurs travaux modèrent l'intérêt de ce chromophore en tant qu'antenne en raison de la présence de deux phénomènes de désactivation imputables à ce motif : la présence d'états LMCT pour le complexe Eu(III) et d'un transfert d'énergie en retour pour le complexe Tb(III).

Il est intéressant de noter que les complexes Ln(III) incorporant l'antenne cs124 ont fait l'objet de plusieurs études[112,113,114] et que le complexe de terbium dérivé du ligand fonctionnalisé DTPA-cs124 est actuellement commercialisé par la société Thermo Fischer Scientific sous la dénomination Lanthascreen.[115]

D'autres travaux ont montré que la substitution du groupe méthyle du carbostyrile-124 par un groupe trifluorométhyle permettait d'améliorer sensiblement ses propriétés d'absorption.[116] Naturellement, l'introduction de ce chromophore fluoré sur le squelette PCTA[12] a donc été privilégiée.

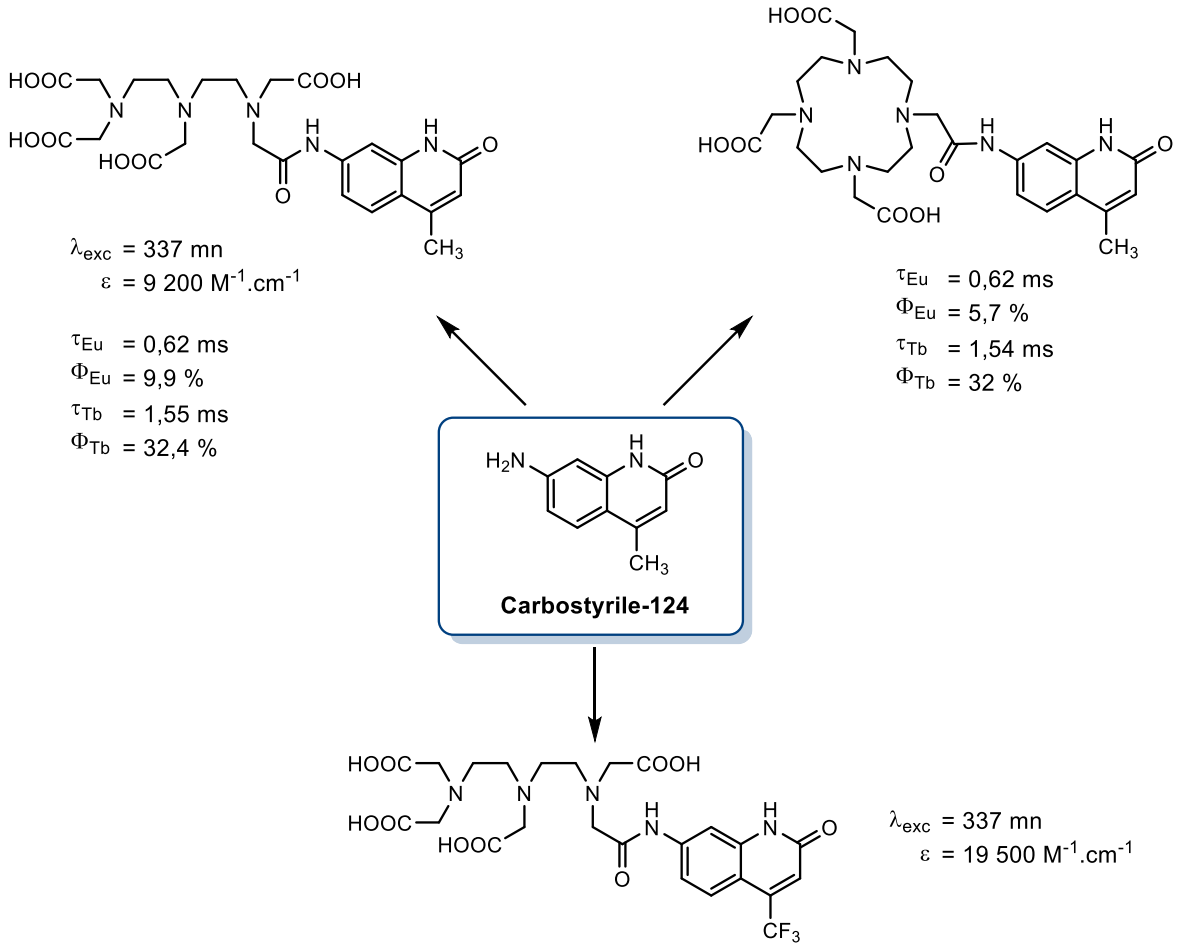


Figure 1.44. Dérivés du DTPA et DOTA incorporant un motif carbostyrile

Le chromophore benzimidazole a, quant à lui, été introduit par l'équipe de Bünzli en position 6 de l'acide picolinique afin de développer des complexes de lanthanide fluorescents de stœchiométrie 3:1 (3 ligands pour 1 métal) (**Figure 1.45**).[117] Cette fois-ci, le motif benzimidazole participe à la complexation du métal par l'intermédiaire de son atome d'azote aromatique. Il a également été démontré que ces ligands sensibilisent efficacement les ions europium et ce, quelle que soit la nature du substituant R, avec des durées de vie et des rendements quantiques d'émission de l'ordre de 2,8 ms et 52 %. Ces mesures ont cependant été réalisées dans le dichlorométhane en raison de l'insolubilité des complexes en milieu aqueux.

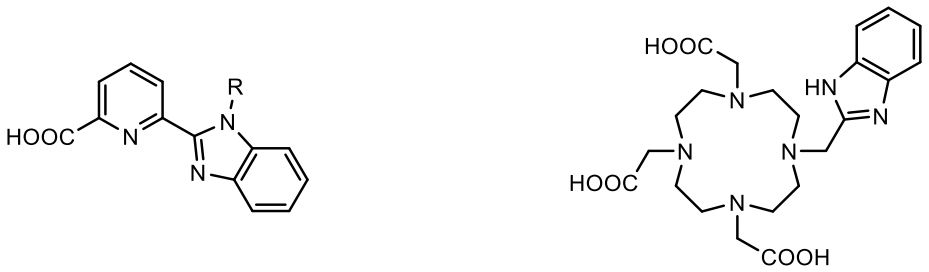


Figure 1.45. Exemples de la littérature de ligands à motif benzimidazole.

Le motif benzimidazole a également été introduit sur le squelette DOTA par l'équipe de Chuburu et Archibald.[118] De la même manière, ce chromophore participe directement à la complexation de l'ion lanthanide et cette coordination est, de plus, fonction du pH. Les propriétés photophysiques en milieu aqueux des complexes de cette étude (Eu(III), Tb(III) et Yb(III)) sont essentiellement basées sur des durées de vie de fluorescence et ne donnent cependant pas accès aux rendements quantiques.

Si l'introduction du motif benzimidazole en position para du noyau pyridine du PCTA[12] n'autorise pas, *a priori*, sa coordination avec l'ion lanthanide, celle-ci devrait tout de même permettre d'améliorer efficacement les propriétés d'absorption du motif pyridine.

Pour finir, la possibilité de substituer le noyau pyridine du PCTA[12] par un noyau phénol a été explorée (**Figure 1.46**). La déprotonation d'une fonction phénol permet, en effet, de disposer d'une longueur d'onde d'absorption proche de 300 nm, autorisant l'utilisation d'une longueur d'onde d'excitation plus en adéquation avec le milieu biologique.

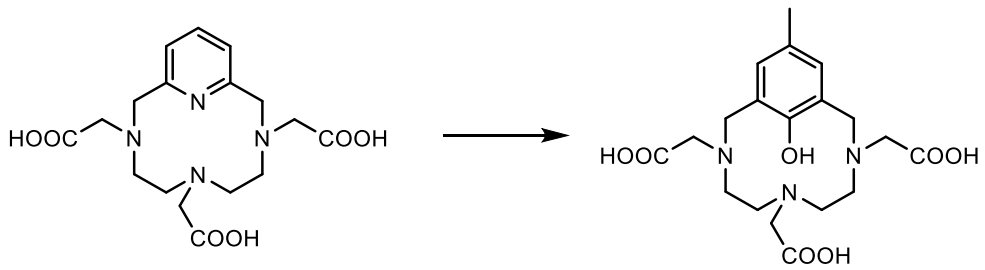


Figure 1.46. Analogue du PCTA[12] à fonction phénol

D'autre part, ce ligand heptadentate permettrait, *a priori*, de conserver deux molécules d'eau en première sphère de coordination de l'ion Ln(III). Les propriétés

relaxométriques du complexe Gd(III) correspondant peuvent donc présenter un intérêt conséquent.

Dans le cadre de cette dernière étude, il est important de souligner le nombre restreint de travaux concernant des ligands macrocycliques incorporant dans leur structure un motif phénol susceptibles de complexer des ions Ln(III) en milieu aqueux. Les travaux des équipes de Sherry ou de Faulkner, portant respectivement sur l'introduction d'une chaîne latérale *p*-nitrophénol sur une structure DOTA (étude relaxométrique) ou d'un groupement *p*-nitrophénol pontant deux structures DO3A (étude photophysique) peuvent cependant être cités.[119,120] Bünzli *et al*. ont également brièvement rapporté les propriétés photophysiques et relaxométriques de cryptates Ln(III) du type iminophénolate.[121]

5 Références

[1] Roat-Malone, R. M. *Bioinorganic Chemistry: A Short Course*; Wiley-Interscience, **2007**.

[2] Sadler, P. J. *Adv. Inorg. Chem.* **1991**, *36*, 1.

[3] Gaynor, D.; Griffith, D. M. *Dalton. Trans.* **2012**, *41* (43), 13239.

[4] Cotton, S. *Lanthanide and Actinide Chemistry*; John Wiley, Chichester, **2006**.

[5] Pearson, R. G. *J. Chem. Sci.* **2005**, *117* (5), 369.

[6] Petoud, S.; Cohen, S. M.; Bünzli, J.-C. G.; Raymond, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (44), 13324.

[7] Zhang, J.; Badger, P. D.; Geib, S. J.; Petoud, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (17), 2508.

[8] Louie, A. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (5), 3146.

[9] Bonnet, C. S.; Tóth, É. *Comptes Rendus Chim.* **2010**, *13* (6–7), 700.

[10] Debroye, E.; Parac-Vogt, T. N. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (23), 8178.

[11] Armelao, L.; Quici, S.; Barigelletti, F.; Accorsi, G.; Bottaro, G.; Cavazzini, M.; Tondello, E. *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254*, 487.

[12] Anderegg, G.; Arnaud-Neu, F.; Delgado, R.; Felcman, J.; Popov, K. *Pure Appl. Chem.* **2005**, *77* (8), 1445.

[13] Frost, A. E. *Nature* **1956**, *178*, 322.

[14] Grobner, T. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2006**, *21* (6), 1104.

[15] Grobner, T. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2006**, *21* (6), 1745.

[16] Lindoy, L. F. *The Chemistry of Macrocyclic Ligand Complexes*, Cambridge University Press, Cambridge, **1989**.

[17] Hancock, R. D.; Martell, A. E. *Comments Inorg. Chem.* **1988**, *6* (5–6), 237.

[18] Cabbiness, D. K.; Margerum, D. W. *J. Am. Chem. Soc.*, **1969**, *91*, 6540.

[19] Clarke, E. T.; Martell, A. E. *Inorg. Chim. Acta* **1991**, *181* (2), 273.

[20] Velikyan, I.; Maecke, H.; Langstrom, B. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19* (2), 569.

[21] Liu, Z.; Yan, Y.; Liu, S.; Wang, F.; Chen, X. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20* (5), 1016.

[22] Dumont, R. A.; Deininger, F.; Haubner, R.; Maecke, H. R.; Weber, W. A.; Fani, M. *J. Nucl. Med.* **2011**, *52* (8), 1276.

[23] Heffern, M. C.; Matosziuk, L. M.; Meade, T. J. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4496.

[24] Clarke, E. T.; Martell, A. E. *Inorg. Chim. Acta* **1991**, *190* (1), 37.

[25] Beeby, A.; Botchway, S. W.; Clarkson, I. M.; Faulkner, S.; Parker, A. W.; Parker, D.; Williams, J. A. G. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2000**, *57* (2–3), 83.

[26] Smith, D. G.; McMahon, B. K.; Pal, R.; Parker, D. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (68), 8520.

[27] Price, E. W.; Orvig, C. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (1), 260.

[28] Kilian, K. *Reports Pract. Oncol. Radiother.* **2014**, *19*, S13.

[29] Stasiuk, G. J.; Long, N. J. *Chem. Commun* **2013**, *49*, 2732.

[30] Stetter, H.; Frank, W.; Mertens, R. *Tetrahedron* **1981**, *37*, 767.

[31] Boswell, C. A.; Sun, X.; Niu, W.; Weisman, G. R.; Wong, E. H.; Rheingold, A. L.; Anderson, C. J. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (6), 1465.

[32] Anderson, C. J.; Dehdashti, F.; Cutler, P. D.; Schwarz, S. W.; Laforest, R.; Bass, L. A; Lewis, J. S.; McCarthy, D. W. *J. Nucl. Med.* **2001**, *42* (2), 213.

[33] Strijkers, G. J.; Mulder, W. J. M.; Tilborg, G. A. F. Van; Nicolay, K. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2007**, *7*, 291.

[34] Bottrill, M.; Kwok, L.; Long, N. J. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35* (6), 557.

[35] Bünzli, J. C. G. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (5), 2729.

[36] Coogan, M. P.; Fernández-Moreira, V. *Chem. Commun*. **2014**, *50* (4), 384.

[37] Paul-Roth, C.; Raymond, K. N. *Inorg. Chem.* **1995**, *34* (6), 1408.

[38] Costa, J.; Delgado, R. *Inorg. Chem.* **1993**, *32* (23), 5257.

[39] Delgado, R.; Quintino, S.; Teixeira, M.; Zhang, A. *J. Chem. Soc. Dalton. Trans.* **1997**, 55.

[40] Tircsó, G.; Kovács, Z.; Sherry, A. D. *Inorg. Chem.* **2006**, *45* (23), 9269.

[41] Laurent, S.; Vander Elst, L.; Wautier, M.; Galaup, C.; Muller, R. N.; Picard, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (22), 6230.

[42] Laurent, S.; Vander Elst, L.; Galaup, C.; Leygue, N.; Boutry, S.; Picard, C.; Muller, R. N. *Contrast Media Mol. Imaging* **2014**, *9* (4), 300.

[43] Pellegatti, L.; Zhang, J.; Drahos, B.; Villette, S.; Suzenet, F.; Guillaumet, G.; Petoud, S.; Tóth, É. *Chem. Commun.* **2008**, *60* (48), 6591.

[44] Bonnet, C. S.; Buron, F.; Caillé, F.; Shade, C. M.; Drahoš, B.; Pellegatti, L.; Zhang, J.; Villette, S.; Helm, L.; Pichon, C.; Suzenet, F.; Petoud, S.; Tóth, É. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18* (5), 1419.

[45] Kumar, K.; Chang, C.; Tweedle, M. *Inorg. Chem.* **1993**, *32* (5), 587.

[46] Braddock, M. *Biomedical Imaging: The Chemistry of Labels, Probes and Contrast Agents;* The Royal Society of Chemistry, **2012.**

[47] Sherry, A. D.; Caravan, P.; Lenkinski, R. E. *J. Magn. Reson. Imaging* **2009**, *30* (6), 1240.

[48] Aime, S.; Botta, M.; Crich, S. G.; Giovenzana, G.; Pagliarin, R.; Sisti, M.; Terreno, E. *Magn. Reson. Chem.* **1998**, 36 (S1), S200.

[49] Long, N.; Wong W.-T. *The Chemistry of Molecular Imaging*, John Wiley & Sons, **2015**

[50] Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B. *Chem. Rev.* **1999**, *99* (9), 2293.

[51] Laurent, S.; Henoumont, C.; Stanicki, D.; Boutry, S.; Lipani, E.; Belaid, S.; Muller, R. N.; Vander Elst, L. *MRI Contrast Agents*; Springer Verlag Singapore, **2017**.

[52] Pan, D.; Schmieder, A. H.; Wickline, S. A.; Lanza, G. M. *Tetrahedron* **2011**, *67* (44), 8431.

[53] Port, M.; Raynal, I.; Vander Elst, L.; Muller, R. N.; Dioury, F.; Ferroud, C.; Guy, A. *Contrast Media Mol. Imaging* **2006**, *1* (3), 121.

[54] Laurent, S.; Elst, L. Vander; Muller, R. N. *Contrast Media Mol. Imaging* **2006**, *1* (3), 128.

[55] Hovland, R.; Gløgård, C.; Aasen, A. J.; Klaveness, J. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 644.

[56] Ferreira, C. L.; Lamsa, E.; Woods, M.; Duan, Y.; Fernando, P.; Bensimon, C.; Kordos, M.; Guenther, K.; Jurek, P.; Kiefer, G. E. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21* (2), 531.

[57] Ferreira, C. L.; Yapp, D. T. T.; Mandel, D.; Gill, R. K.; Boros, E.; Wong, M. Q.; Jurek, P.; Kiefer, G. E. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23* (11), 2239.

[58] Ferreira, C. L.; Yapp, D. T.; Lamsa, E.; Gleave, M.; Bensimon, C.; Jurek, P.; Kiefer, G. E. *Nucl. Med. Biol.* **2008**, *35* (8), 875.

[59] Ferreira, C. L.; Yapp, D. T. T.; Crisp, S.; Sutherland, B. W.; Ng, S. S. W.; Gleave, M.; Bensimon, C.; Jurek, P.; Kiefer, G. E. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2010**, *37* (11), 2117.

[60] Cooper, M. S.; Ma, M. T.; Sunassee, K.; Shaw, K. P.; Williams, J. D.; Paul, R. L.; Donnelly, P. S.; Blower, P. J. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23* (5), 1029.

[61] Ait-Mohand, S.; Fournier, P.; Dumulon-Perreault, V.; Kiefer, G. E.; Jurek, P.; Ferreira, C. L.; Bénard, F.; Guérin, B. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22* (8), 1729.

[62] Yapp, D. T. T.; Ferreira, C. L.; Gill, R. K.; Boros, E.; Wong, M. Q.; Mandel, D.; Jurek, P.; Kiefer, G. E. *Mol. Imaging* **2013**, *12* (4), 263.

[63] Banerjee, S. R.; Pullambhatla, M.; Foss, C. A.; Nimmagadda, S.; Ferdani, R.; Anderson, C. J.; Mease, R. C.; Pomper, M. G. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (6), 2657.

[64] Rockey, W. M.; Huang, L.; Kloepping, K. C.; Baumhover, N. J.; Giangrande, P. H.; Schultz, M. K. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19* (13), 4080.

[65] Chakravarty, R.; Chakraborty, S.; Dash, A. *J. Label. Compd Radiopharm.* **2014**, *57* (2), 65.

[66] Kiefer, G. E.; Woods, M. *Inorg. Chem.* **2009**, *48* (24), 11767.

[67] Ferreira, C. L.; Holley, I.; Bensimon, C.; Jurek, P.; Kiefer, G. E. *Mol. Pharmarceutics* **2012**, *9* (8), 2180.

[68] Le Fur, M.; Beyler, M.; Lepareur, N.; Fougère, O.; Platas-Iglesias, C.; Rousseaux, O.; Tripier, R. *Inorg. Chem.* **2016**, *55* (16), 8003.

[69] Novy, Z.; Laznickova, A.; Mandikova, J.; Barta, P.; Laznicek, M.; Trejtnar, F. *J. Label. Compd Radiopharm.* **2014**, 57 (7), 448.

[70] Pandey, U.; Gamre, N.; Kumar, Y.; Shetty, P.; Sarma, H. D.; Dash, A. *J. Radioanal. Nucl. Chem*. **2016**, 307 (1), 187.

[71] Weissman, S. I. *J. Chem. Phys.* **1942**, 10 (1942), 214.

[72] Tobita, S.; Arakawa, M.; Tanaka, I. *J. Phys. Chem.* **1985**, *89* (6), 5649.

[73] Steemers, F. J.; Verboom, W.; Reinhoudt, D. N.; Vandertol, E. B.; Verhoeven, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (37), 9408.

[74] Siaugue, J. M.; Segat-Dioury, F.; Favre-Réguillon, A.; Wintgens, V.; Madic, C.; Foos, J.; Guy, A. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2003**, *156*, 23.

[75] Houlne, M. P.; Agent, T. S.; Kiefer, G. E.; McMillan, K.; Bornhop, D. J. *Appl. Spectrosc.* **1996**, *50* (10), 1221.

[76] Bornhop, D. J.; Griffin, J. M. M.; Goebel, T. S.; Sudduth, M. R.; Bell, B.; Motamedi, M. *Appl. Spectrosc.* **2003**, *57* (10), 1216.

[77] Bornhop, D. J.; Hubbard, D. S.; Houlne, M. P.; Adair, C.; Kiefer, G. E.; Pence, B. C.; Morgan, D. L. *Anal. Chem.* **1999**, *71* (14), 2607.

[78] Latva, M.; Takalo, H.; Mukkala, V.-M.; Matachescu, C.; Rodríguez-Ubis, J. C.; Kankare, J. *J. Lumin.* **1997**, *75* (2), 149.

[79] Caillé, F.; Bonnet, C. S.; Buron, F.; Villette, S.; Helm, L.; Petoud, S.; Suzenet, F.; Tóth, É. *Inorg. Chem.* **2012**, *51* (4), 2522.

[80] Martí-Centelles, V.; Pandey, M. D.; Burguete, M. I.; Luis, S. V. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (16), 8736

[81] Richman, J. E.; Atkins, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96* (7), 2268.

[82] Xue, G. P.; He, Y. B.; Wu, C. T. *Chin. Chem. Lett.* **1994**, *5* (1), 23.

[83] Korovin, Y. V.; Popkov, Y. A.; Rusakova, N. V. *Mendeleev Commun.* **1996**, *1* (3), 7.

[84] Aime, S.; Botta, M.; Geninatti Crich, S.; Giovenzana, G. B.; Jommi, G.; Pagliarin, R.; Sisti, M. *Inorg. Chem.* **1997**, *36* (14), 2992.

[85] Fukuyama, T.; Jow, C. K.; Cheung, M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36* (36), 6373.

[86] Fukuyama, T.; Cheung, M.; Jow, C. K.; Hidai, Y.; Kan, T. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38* (33), 5831.

[87] An, H.; Cook, P. D. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37* (40), 7233.

[88] Burguete, M. I.; Escuder, B.; Luis, S. V.; Miravet, J. F.; Querol, M.; García-España, E. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39* (22), 3799.

[89] Aime, S.; Botta, M.; Frullano, L.; Crich, S. G.; Giovenzana, G. B.; Pagliarin, R.; Palmisano, G.; Sisti, M. *Chem. Eur. J.* **1999**, *5* (4), 1253.

[90] Siaugue, J.-M.; Segat-Dioury, F.; Favre-Réguillon, A.; Madic, C.; Foos, J.; Guy, A. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41* (39), 7443.

[91] Siaugue, J. M.; Segat-Dioury, F.; Sylvestre, I.; Favre-Réguillon, A.; Foos, J.; Madic, C.; Guy, A. *Tetrahedron* **2001**, *57* (22), 4713.

[92] Chellini, A.; Pagliarin, R.; Giovenzanna, G. B.; Palmisano, G.; Sisti, M. *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83* (4), 793.

[93] Hoye, R. C.; Hoye, R. C.; Richman, J. E.; Dantas, G. A.; Lightbourne, M. F.; Scott Shinneman, L. *J. Org. Chem.* **2001**, *66* (8), 2722.

[94] Yadav, N.; Chuttani, K.; Yadav, A. K.; Singh, B. *Chem. Biol. Drug Des.* **2016**, *87*, 430.

[95] Kan, T.; Fujiwara, A.; Kobayashi, H.; Fukuyama, T. *Tetrahedron* **2002**, *58* (32), 6267.

[96] Hovinen, J.; Sillanpää, R. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46* (25), 4387.

[97] Lin, Y.; Favre-Réguillon, A.; Pellet-Rostaing, S.; Lemaire, M. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48* (19), 3463.

[98] Aime, S.; Cavallotti, C.; Gianolio, E.; Giovenzana, G. B.; Palmisano, G.; Sisti, M. *Org. Lett.* **2004**, *6* (8), 1201.

[99] Ferroud, C.; Borderies, H.; Lasri, E.; Guy, A.; Port, M. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49* (41), 5972.

[100] Tircsó, G.; Benyó, E. T.; Suh, E. H.; Kiefer, G. E.; Sherry, A. D. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 565.

[101] Kovács, Z.; Kiefer, G. E.; Bensimon, C.; Sherry, A. D.; Tircsó, G., **2007**, PCT WO 2007/104135 A1

[102] Port, M.; Corot, C.; Gautheret, T., **2007**, PCT WO 2007/042504 A2

[103] Ansari, M. H.; Ahmad, M.; Dicke, K. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3* (6), 1067.

[104] Moreau, J.; Pierrard, J.-C.; Rimbault, J.; Guillon, E.; Port, M.; Aplincourt, M. *Dalton Trans.* **2007**, *16*, 1611.

[105] Rojas-Quijano, F. A.; Benyó, E. T.; Tircsó, G.; Kálmán, F. K.; Baranyai, Z.; Aime, S.; Sherry, A. D.; Kovács, Z. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15* (47), 13188.

[106] Aime, S.; Botta, M.; Frullano, L.; Crich, S. G.; Giovenzana, G.; Pagliarin, R.; Palmisano, G.; Sirtori, F. R.; Sisti, M. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (21), 4017.

[107] Le Fur, M.; Tripier, R.; Rousseaux, O.; Beyler, **2017**, FR 3 046 172.

[108] Le Fur, M.; Beyler, M.; Molnar, E.; Fougère, O.; Esteban-Gómez, D.; Tircsó, G.; Platas-Iglesias, C.; Lepareur, N.; Rousseaux, O.; Tripier, R. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (69), 9534.

[109] Li, M.; Selvin, P. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (31), 8132.

[110] Xiao, M.; Selvin, P. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (29), 7067.

[111] Parker, D.; Williams, J. A. G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1996**, 1581.

[112] Hammell, J.; Buttarazzi, L.; Huang, C. H.; Morrow, J. R. *Inorg. Chem.* **2011**, *50* (11), 4857.

[113] Mohamadi, A.; Miller, L. W. *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27* (10), 2540.

[114] Kovacs, D.; Lu, X.; Mészáros, L. S.; Ott, M.; Andres, J.; Borbas, K. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (16), 5756.

[115] https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/industrial/pharma-biopharma/drug-discovery-development/target-and-lead-identification-and-validation/kinasebiology/kinase-activity-assays/lanthascreen-tr-fret-toolbox/lanthascreen-tr-fret-technology-overview.html

[116] Chen, J.; Selvin, P. R. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2000**, *135* (1), 27.

[117] Shavaleev, N. M.; Eliseeva, S. V.; Scopelliti, R.; Bünzli, J. C. G. *Chem. - A Eur. J.* **2009**, *15* (41), 10790.

[118] Fisher, C. M.; Fuller, E.; Burke, B. P.; Mogilireddy, V.; Pope, S. J. A.; Sparke, A. E.; Déchamps-Olivier, I.; Cadiou, C.; Chuburu, F.; Faulkner, S.; Archibald, S. J. *Dalton Trans.* **2014**, *43*, 9567.

[119] Woods, M.; Kiefer, G. E.; Bott, S.; Castillo-Muzquiz, A.; Eshelbrenner, C.; Michaudet, L.; McMillan, K.; Mudigunda, S. D. K.; Ogrin, D.; Tircsó, G.; Zhang, S.; Zhao, P.; Sherry, A. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (30), 9248.

[120] Blackburn, O. A.; Tropiano, M.; Natrajan, L. S.; Kenwright, A. M.; Faulkner, S. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (36), 6111.

[121] Platas, C.; Avecilla, F.; de Blas, A.; Rodríguez-Blas, T.; Geraldes, C. F. G. C.; Tóth, É.; Merbach, A. E.; Bünzli, J.-C. G. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2000**, No. 4, 611.

CHAPITRE 2

SYNTHESE ET CARACTERISATION DES LIGANDS

1 Introduction

Une nouvelle voie d'accès pour la synthèse du PCTA[12] constituera le point de départ de ce chapitre. Le schéma de synthèse mis au point aura notamment pour objectif de permettre une diversification aisée de la structure du ligand. Cette nouvelle approche sera par la suite appliquée à la synthèse de plusieurs séries de macrocycles dérivés tels que des ligands bifonctionnels chélatants fonctionnalisés en position para du noyau pyridine ou en position alpha de la fonction coordinante centrale du squelette carboné. La préparation de ligands à fonctions de complexation mixtes sera également présentée, ainsi que les premières synthèses de ligands dérivés du PCTA[12] intégrant un chromophore permettant d'améliorer les propriétés photophysiques de la structure (**Figure 2.1**).

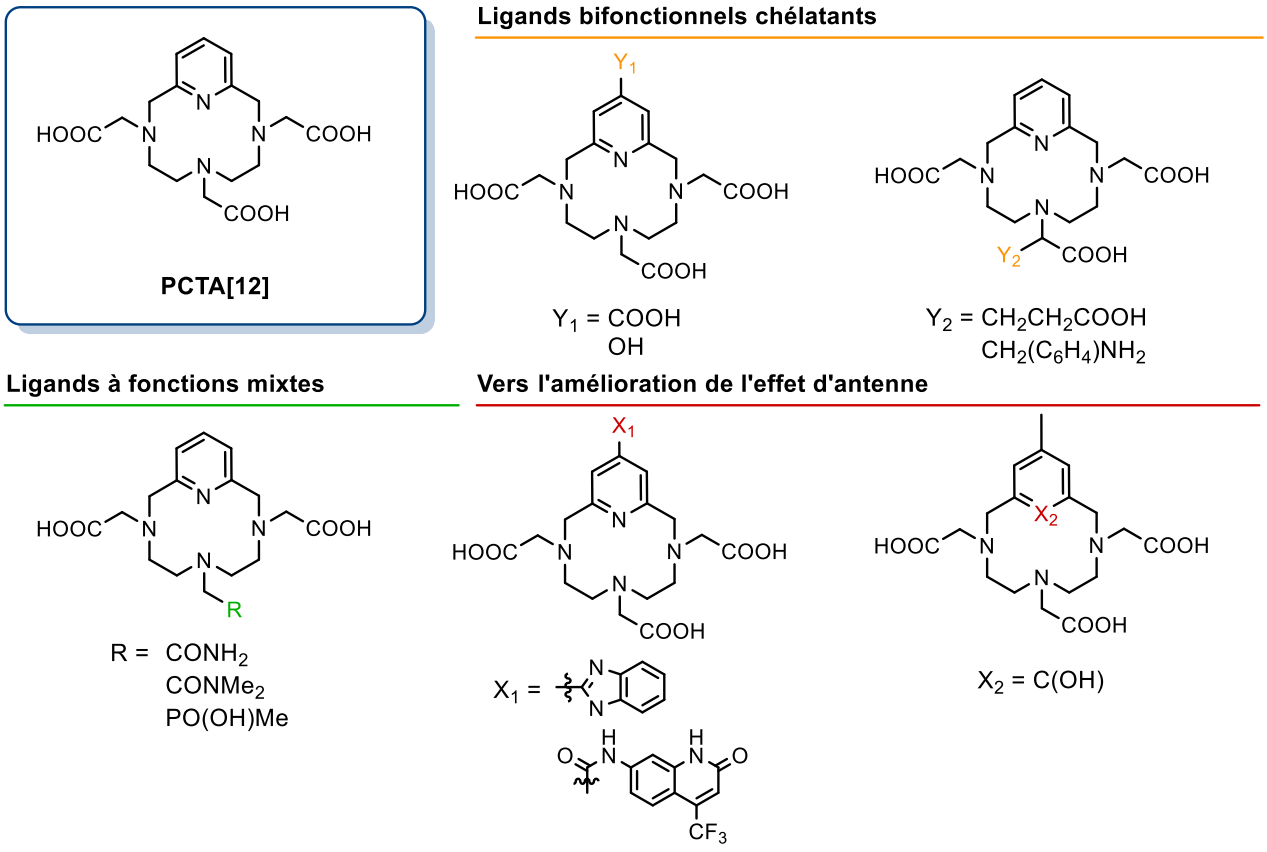


Figure 2.1. Structures du ligand PCTA[12] et des ligands cibles

2 Séquence « d'alkylation/cyclisation » et synthèse du PCTA[12]

Au vu des données de la littérature, deux voies de synthèse peuvent être envisagées pour la préparation du macrocycle PCTA[12] (**Figure 2.2**). La première repose sur la séquence classique dite de « cyclisation/alkylation », où le macrocycle pyclène est d'abord formé et où les fonctions coordinantes sont ensuite introduites (Voie 1).

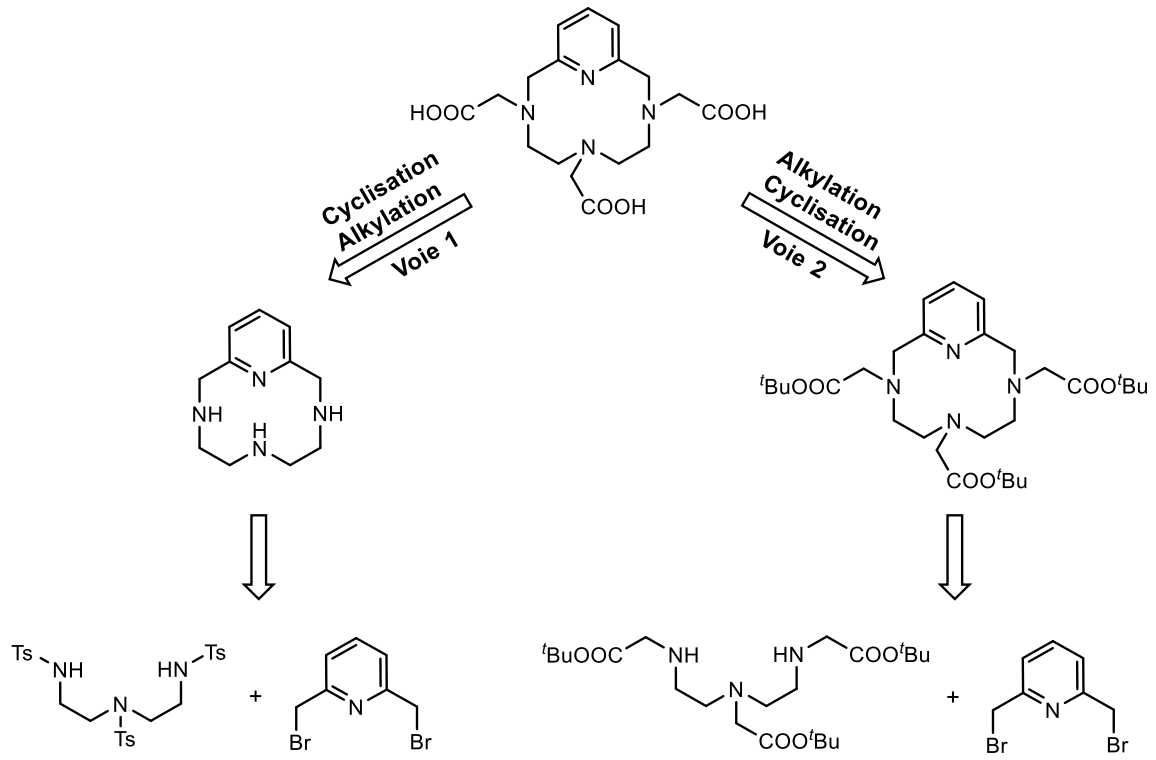


Figure 2.2. Voies de synthèse du PCTA[12]

Cette stratégie bénéficie de la méthodologie de Richman et Atkins impliquant un dérivé diéthylènetriamine trisubstitué par des groupements protecteurs arylsulfonamide et est caractérisée par des rendements de macrocyclisation élevés. Comme précisé précédemment, si cette méthode est la plus employée, les étapes de déprotection de la plateforme et de tri-alkylation des fonctions amine secondaire résultantes peuvent toutefois être limitantes. Cette approche permet cependant de

diversifier plus facilement la nature des fonctions coordinantes au-delà des fonctions acide carboxylique (fonctions amide, phosphonate, phosphinate, …).

La séquence dite « d'alkylation/cyclisation », basée sur l'utilisation d'un dérivé diéthylènetriamine trifonctionnalisé par des fonctions acétate protégées sous forme d'esters, constitue une alternative permettant de réduire le nombre d'étapes post-cyclisation, et de diversifier plus aisément la nature du noyau aromatique (Voie 2). Cette stratégie a été exploitée par notre équipe dans le cadre de la synthèse de macrocycles à 15 et 18 chaînons intégrant dans leur structure un squelette diéthylènetriamine triacétate et un motif 2,2'-bipyridine ou 2,2':6',2''-terpyridine.[1,2] La présence d'atomes d'azote et de fonctions ester sur le précurseur triamine acyclique est de plus susceptible de générer un « effet template » par leur coordination à un ion alcalin, permettant ainsi de faciliter la réaction de macrocyclisation, l'étape clé de cette séquence.

L'étude de cet outil sera par la suite illustrée à travers son application pour la synthèse du macrocycle PCTA[12]. Dans ce cadre, trois grandes étapes peuvent être distinguées lors de son utilisation (**Figure 2.3**).

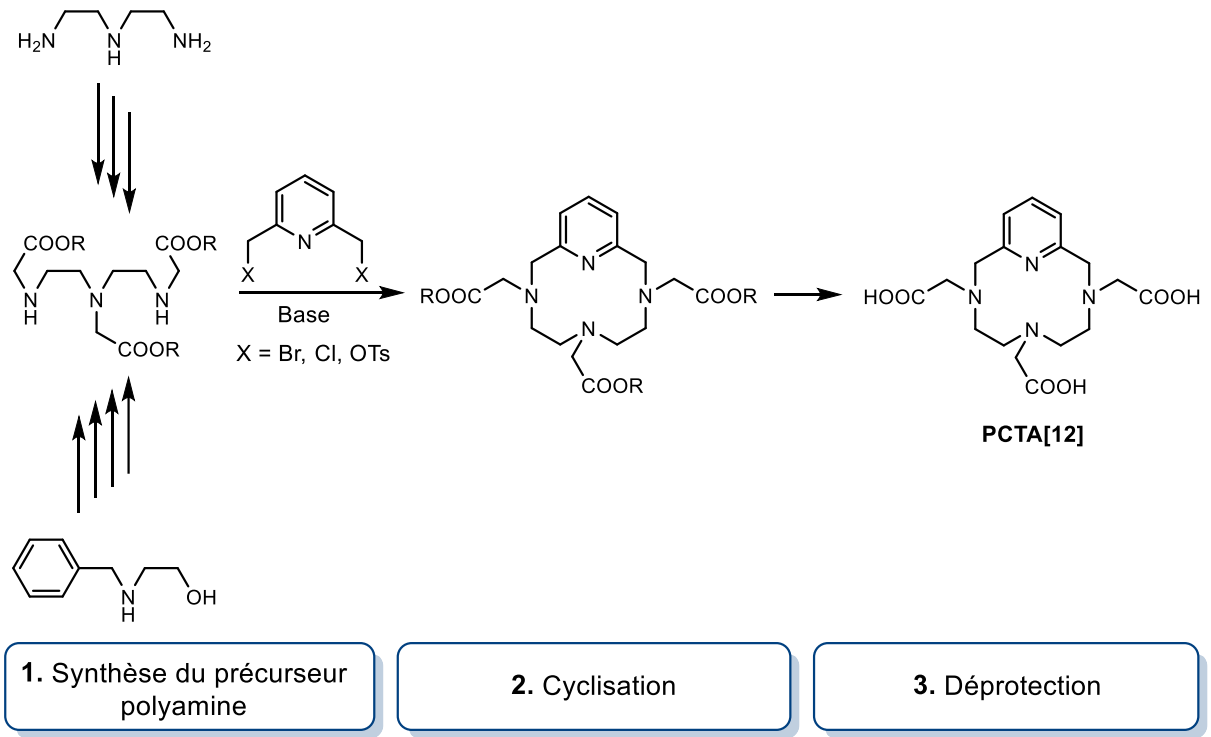


Figure 2.3. Schéma général de la synthèse du PCTA[12] selon la voie alkylation/cyclisation

La première étape consiste en la synthèse du précurseur triamine portant les fonctions acide protégées sous forme d'esters. Selon le produit de départ utilisé, deux stratégies nécessitant trois ou quatre étapes peuvent être employées. La macrocyclisation par condensation de cette triamine acyclique sur un dérivé bis-électrophile de la pyridine constitue la deuxième étape de cette synthèse, puis la déprotection des fonctions ester du macrocycle ainsi formé conduit à la formation du PCTA[12].

2.1 Synthèse du précurseur triamine

2.1.1 A partir de la diéthylènetriamine

La première voie d'accès au précurseur triamine est basée sur l'utilisation de la diéthylènetriamine en tant que produit de départ commercial, suivant un protocole déjà décrit au laboratoire.[3] Suite à la protection des amines primaires latérales par des groupements benzyle, l'intermédiaire est soumis à une réaction de tri-alkylation permettant l'insertion des fonctions coordinantes. Le clivage des groupements protecteurs benzyle permet ensuite de régénérer les fonctions amine secondaire terminales et d'accéder au précurseur triamine d'intérêt **3** (**Figure 2.4**).

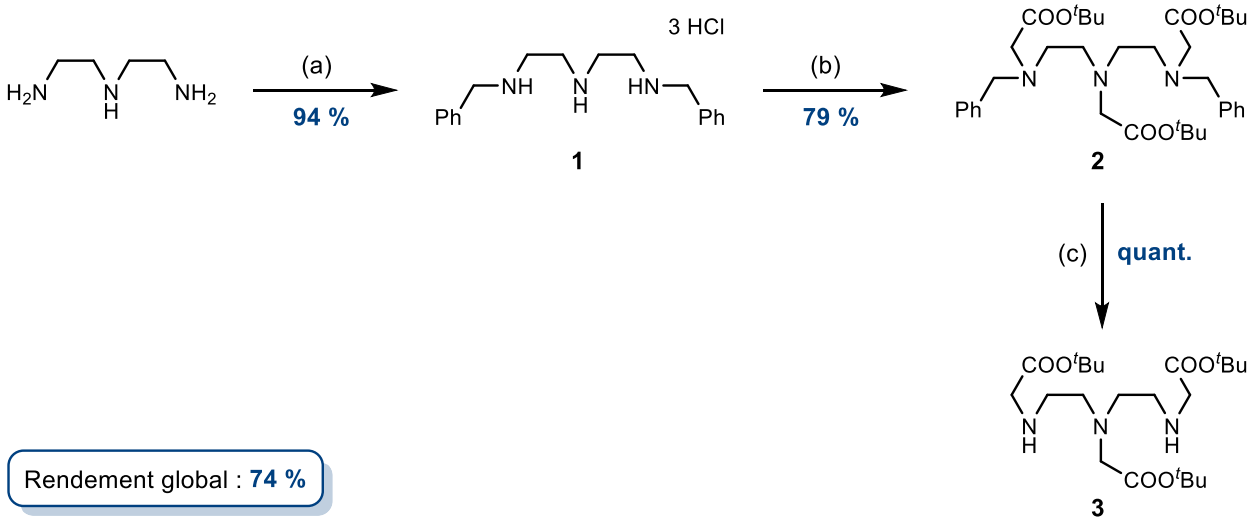


Figure 2.4. Synthèse du précurseur triamine à partir de la diéthylènetriamine. **(a) (i)** PhCHO, EtOH, 2h, 0 °C **(ii)** $NaBH_4$, EtOH, 18h, 50 °C **(b)** $BrCH_2COO^tBu$, DIPEA, DMF, 48h, T.A. **(c)** Pd/C, H_2 (6 bars), MeOH, 12h, T.A.

La première étape met en jeu une double réaction d'amination réductrice. L'action du benzaldéhyde sur la diéthylènetriamine dans l'éthanol conduit à la

formation d'une diimine intermédiaire, réduite *in situ* par du borohydrure de sodium. Après traitement acide, la triamine **1** est isolée sous forme de chlorhydrate avec un rendement de 94 %. La tri-alkylation des fonctions amine secondaire par action du bromoacétate de *tertio*-butyle en présence de *N*,*N*-diisopropyléthylamine (DIPEA) dans du DMF permet de conduire au composé **2** avec un rendement de 79 %.

Le clivage des groupements benzyle par hydrogénation catalysée au palladium sur charbon sous 6 bars de dihydrogène dans le méthanol conduit à la triamine d'intérêt **3** avec un rendement quantitatif. En employant ces conditions expérimentales d'hydrogénation, aucun clivage du squelette diéthylènetriamine, comme l'a reporté l'équipe d'Orvig lors de l'utilisation du système Pd/C (5 %)/acide acétique glacial, n'a été observé.[4] La triamine **3** est finalement obtenue avec un rendement global de 74 %. Pour des raisons d'instabilité, ce composé est engagé dans la réaction de macrocyclisation sans purification et dans les quelques heures après sa synthèse.

Le même schéma de synthèse a été envisagé avec des esters de méthyle en tant que fonctions acide protégées. La deuxième étape de tri-alkylation des amines secondaires présente cependant un faible rendement du fait de réactions parasites de cyclisations intramoléculaires entre les fonctions amine et ester de méthyle des intermédiaires réactionnels, conduisant à la formation de cétopipérazines (**Figure 2.5**).[5] L'encombrement stérique lié à la présence du groupement *tertio*-butyle empêcherait ces réactions de lactamisation.[6]

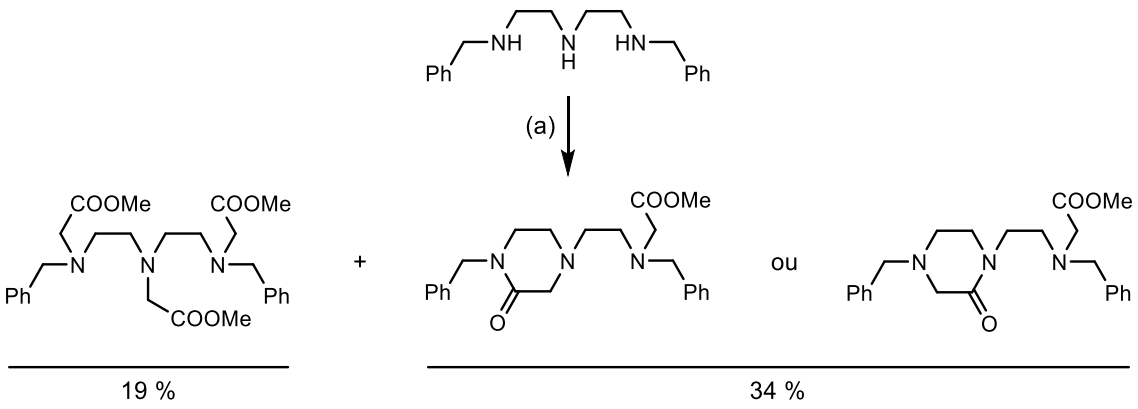


Figure 2.5. Tri-alkylation et produits secondaires **(a)** $BrCH_2COOMe$, DIPEA, DMF, 48h, T.A.

2.1.2 A partir de la *N*-benzyléthanolamine

Afin de pouvoir diversifier la nature de la fonction coordinante centrale par rapport aux fonctions latérales au sein d'une même triamine, une deuxième voie d'accès, cette fois-ci basée sur l'utilisation de la *N*-benzyléthanolamine en tant que produit de départ, a été développée au laboratoire.

Avec des groupements protecteurs ester de *tertio*-butyle

A des fins de comparaison, une séquence en quatre étapes a été appliquée à la synthèse du composé **3** et implique l'intervention de deux amines pré-alkylées par des groupements acétate de *tertio*-butyle : le dérivé **5** issu de la *N*-benzyléthanolamine et un α-aminoester dérivé de la glycine (**Figure 2.6**).

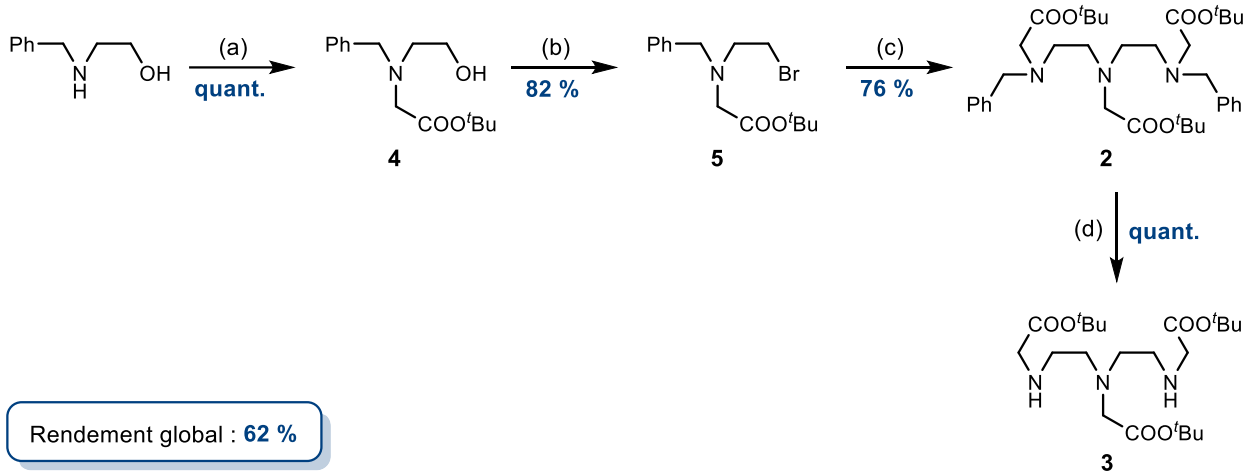


Figure 2.6. Synthèse du précurseur triamine à partir de la *N*-benzyléthanolamine. **(a)** $BrCH_2COO^tBu$, DIPEA, DMF, 24h, T.A. **(b)** NBS, PPh_3, DCM, 4h, T.A. **(c)** $NH_2CH_2COO^tBu$, K_2CO_3, ACN, 24h, reflux **(d)** Pd/C, H_2 (6 bars), MeOH, 12h, T.A.

La première étape de cette stratégie consiste en l'alkylation de la *N*-benzyléthanolamine commerciale par le bromoacétate de *tertio*-butyle en présence de DIPEA dans du DMF, pour former l'intermédiaire **4** avec un rendement quantitatif.

Lors de la synthèse de ce même composé **4**, Chong *et al.* ont montré que la nature de l'ester employé comme agent alkylant avait une forte influence sur l'orientation de la réaction.[7] Si l'utilisation de bromoacétate de *tertio*-butyle conduit bien à la formation du produit attendu, celle du bromoacétate de benzyle génère,

quant à elle, la formation de la *N*-benzylmorpholine-2-one **7** résultant d'une réaction de lactonisation entre les fonctions alcool et ester de benzyle (**Figure 2.7**).

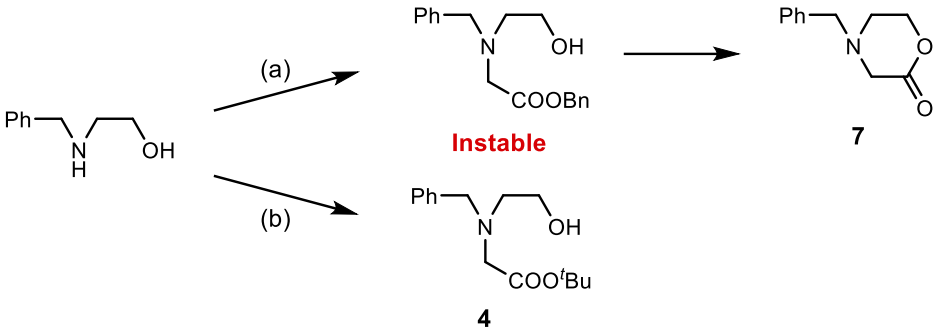


Figure 2.7. Réactifs et conditions. **(a)** $BrCH_2COOBn$, K_2CO_3, ACN, 24h, T.A. **(b)** $BrCH_2COOtBu$, K_2CO_3, ACN, 66h, T.A.

La bromation de la fonction alcool du dérivé **4** est réalisée par action du système neutre *N*-bromosuccinimide (NBS)/triphénylphosphine (PPh_3) dans du DCM à température ambiante, et conduit à la formation du produit **5** avec un rendement de 82 %. L'utilisation d'autres systèmes classiques tels que PBr_3 ou HBr dans l'acide acétique est évitée en raison de l'éventuelle hydrolyse de la fonction ester de *tertio*-butyle.

La double condensation de deux équivalents du dérivé **5** sur le glycinate de *tertio*-butyle en présence de K_2CO_3 dans l'acétonitrile permet d'obtenir la triamine protégée **2** avec un rendement de 76 %. Finalement, bien que cette stratégie présente une étape supplémentaire, elle permet d'obtenir le précurseur triamine **3** avec un rendement global correct de 62 % contre 74 % à partir de la diéthylènetriamine. De plus, la possibilité d'insertion d'une fonction coordinante sur l'azote central, différente des deux fonctions latérales, en fait une voie de synthèse intéressante pour la diversification structurelle des macrocycles.

Avec des groupements protecteurs ester de méthyle

Cette méthode a également été envisagée avec des acétates de méthyle en tant que fonctions acide protégées (**Figure 2.8**). Suite aux observations rapportées par l'équipe de Chong *et al*. sur la première étape d'alkylation, l'équipe a étudié l'influence de différents paramètres tels que la nature de la base (DIPEA, TEA, ou K_2CO_3) et des

dérivés bromoacétates (de méthyle, benzyle ou *tertio*-butyle) ou le solvant (DMF ou ACN) utilisés, sur l'orientation de la réaction.[8]

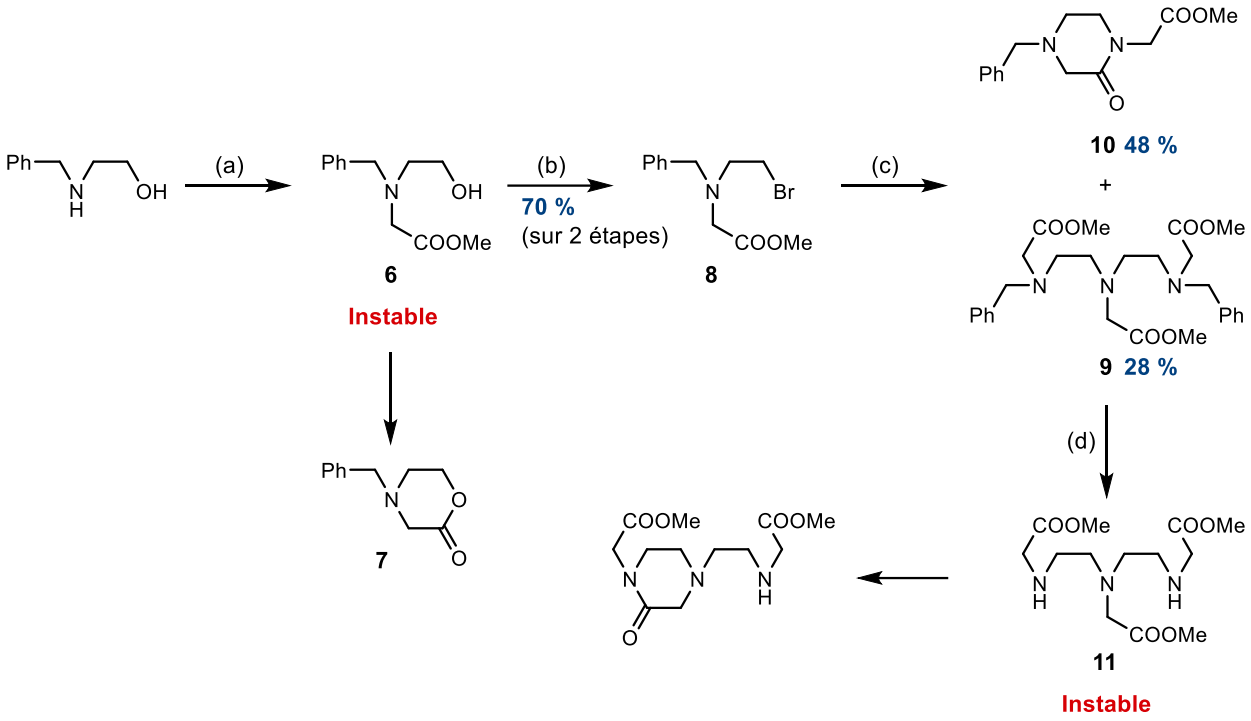


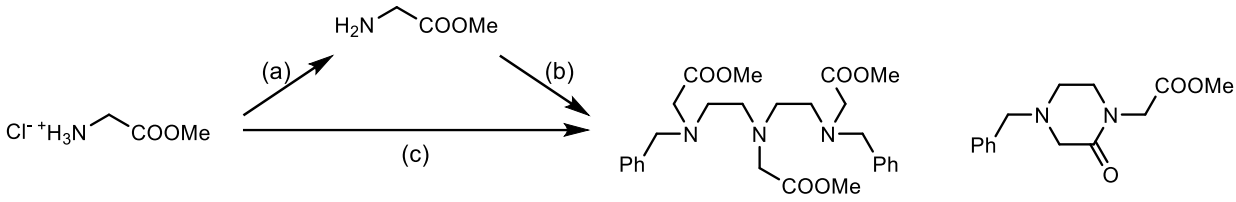
Figure 2.8. Réactifs et conditions. **(a)** $BrCH_2COOMe$, DIPEA, DMF, 24h, T.A. **(b)** NBS, PPh_3, DCM, 4h, T.A. **(c)** NH_2CH_2COOMe, DIPEA, DMF, 12h, T.A. **(d)** Pd/C, H_2 (6 bars), MeOH, 12h, T.A.

Cette étude a montré que le bromoacétate de *tertio*-butyle permettait de former uniquement le produit d'alkylation **8** au détriment de la lactone **7** quelles que soient les conditions envisagées. La gêne stérique apportée par le groupement *tertio*-butyle empêcherait encore une fois toute réaction intramoléculaire parasite.

L'utilisation conjointe de la DIPEA et du DMF en tant que base et solvant permet d'éviter la formation de la lactone **7** et conduit exclusivement au produit d'alkylation dans le cas des dérivés esters de benzyle et de méthyle. Dans ces conditions et après bromation par le système NBS/PPh_3, le composé **8** est obtenu avec un rendement de 70 % sur deux étapes.

La synthèse de la triamine **9** par condensation de deux équivalents du dérivé **8** sur le glycinate de méthyle génère également la formation de la cétopipérazine **10** en tant que produit secondaire, par réaction intramoléculaire de la fonction amine sur la

fonction ester de méthyle de l'intermédiaire réactionnel mono-alkylé. Si la nature chlorhydratée ou non du glycinate de méthyle permet de faire varier le rapport triamine/lactame formés, la formation du composé **10** reste majoritaire (**Figure 2.9**).



	9	**10**
(a) et (b)	28	48
(c)	13	51

Figure 2.9. Réaction de double *N*-alkylation et pourcentages en triamine et en cétopipérazine formées. **(a)** Na_2CO_3, H_2O/DCM, 10 min, T.A. 85 % **(b) 8**, DIPEA, DMF, 12h, T.A. **(c) 8**, DIPEA, DMF, 12h, 60 °C

Ainsi, après action préalable du carbonate de sodium sur le glycinate de méthyle dans un système H_2O/DCM (1:1), 28 % de triamine **9** et 48 % de cétopipérazine **10** ont été obtenus, contre 13 et 51 % respectivement sans cette étape de déchlorhydratation.

L'hydrogénation catalytique de l'intermédiaire **9** conduisant au composé **11** donne lieu à de nombreuses réactions secondaires, ne permettant pas au produit d'intérêt d'être isolé. Si la formation de cétopipérazine est suspectée, celle-ci n'a pas pu être confirmée par analyse RMN.

2.2 Réaction de macrocyclisation et formation du PCTA[12]

La réaction de macrocyclisation a été conduite suivant une procédure dite « batchwise », avec une concentration initiale en réactants de 2.10^{-3} M. Le précurseur protégé du PCTA[12], le composé **12**, a initialement été obtenu par condensation de la triamine **3** sur la 2,6-dibromométhylpyridine commerciale en présence de Na_2CO_3 dans l'acétonitrile à reflux pendant 16h (**Figure 2.10**).

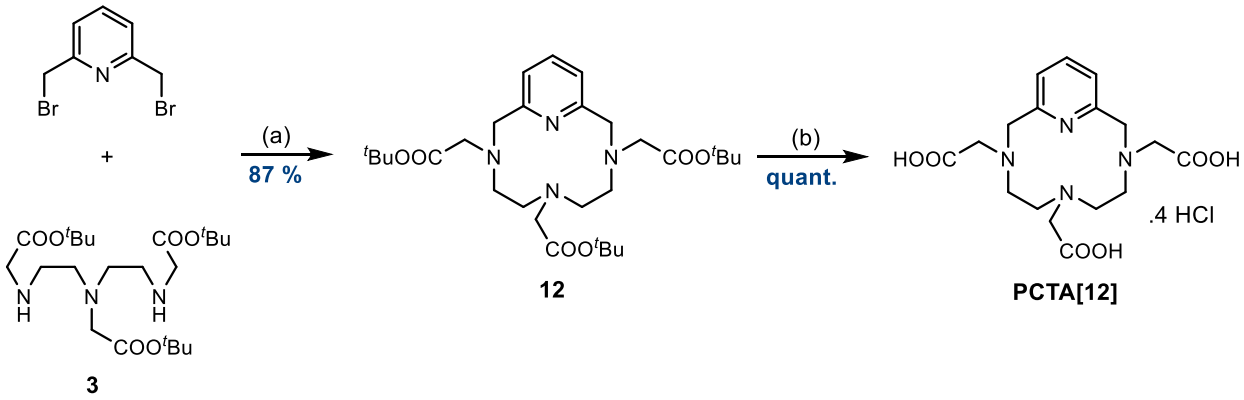


Figure 2.10. Formation du PCTA[12]. **(a)** Na_2CO_3, ACN, 16h, reflux **(b)** HCl (1M), 12h, T.A.

A l'issue de la réaction, l'analyse du milieu réactionnel brut par RMN ^{1}H ne révèle la présence que d'une seule forme macrocyclique identifiée comme étant le complexe de sodium. Une purification par chromatographie sur colonne d'alumine entraîne cependant la dissociation du complexe et les formes libre et complexée sont isolées en proportion 5/95 respectivement. L'addition, à une solution de ce mélange, d'un excès de NaCl dans l'acétonitrile à reflux permet d'obtenir la forme sodée pure. Le traitement du mélange initial par une solution aqueuse saturée d'EDTA permet quant à lui de n'obtenir que la forme libre. De cette manière, les deux structures ont pu être parfaitement caractérisées par spectroscopies RMN, IR, et UV.

Les deux formes libre et complexée du macrocycle **12** peuvent être facilement distinguées par RMN ^{1}H (**Figure 2.11**). Les spectres des deux espèces montrent, en effet, des différences significatives au niveau des protons méthyléniques, traduisant l'existence d'une conformation bloquée dans le cas du complexe de sodium. Ce dernier est caractérisé par la présence de deux systèmes AB : le premier pour les quatre protons pseudo-benzyliques (δ = 3,66 et 4,02 ppm, J = 14,4 Hz) et le second centré à 3,42 ppm (J = 17,6 Hz) pour les quatre protons méthyléniques des deux chaînes latérales acétate de *tertio*-butyle, et d'un singulet pour la chaîne centrale acétate de *tertio*-butyle. Dans le cas du ligand libre la présence de ces dix protons se traduit par l'apparition de deux singulets.

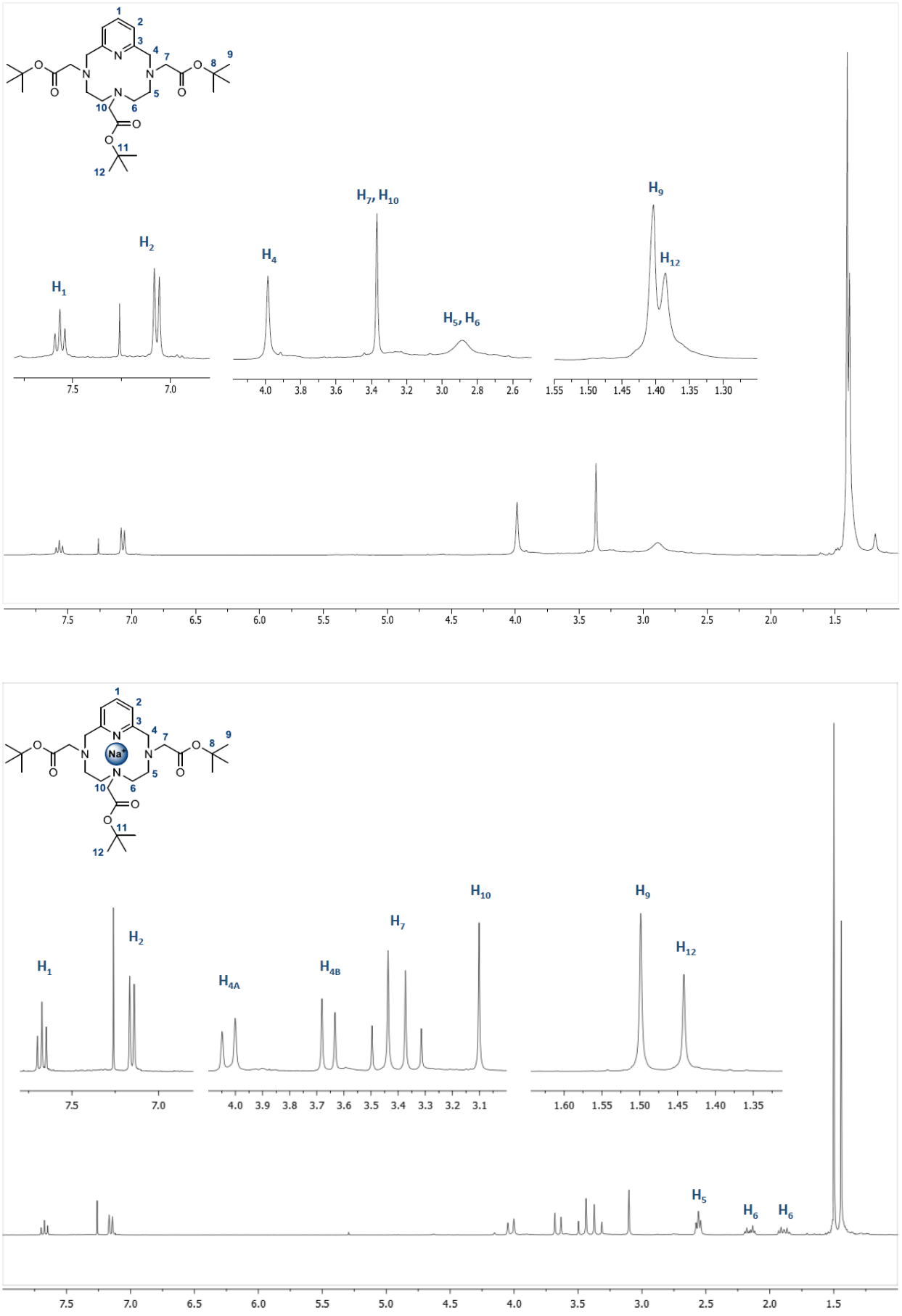


Figure 2.11. Spectres RMN ^{1}H du composé **12** sous ses formes libre et complexée au sodium ($CDCl_3$, 300 MHz)

Pour la forme libre, les protons aromatiques H_1 et H_2 résonnent sous forme de triplet et de doublet à 7,57 et 7,07 ppm respectivement, tandis que ceux de la forme complexée sont plus déblindés et se situent à 7,67 (H_1) et 7,15 (H_2) ppm (**Tableau 2.1**). Pour les signaux de plus grande intensité correspondants aux groupements *tertio*-butyle, deux singulets résonant à 1,39 et 1,40 ppm sont observés pour la forme libre alors que ceux de la forme complexée se situent à 1,44 et 1,50 ppm. Ces données suggèrent la participation du noyau pyridine et des fonctions latérales esters à la coordination de l'ion sodium.

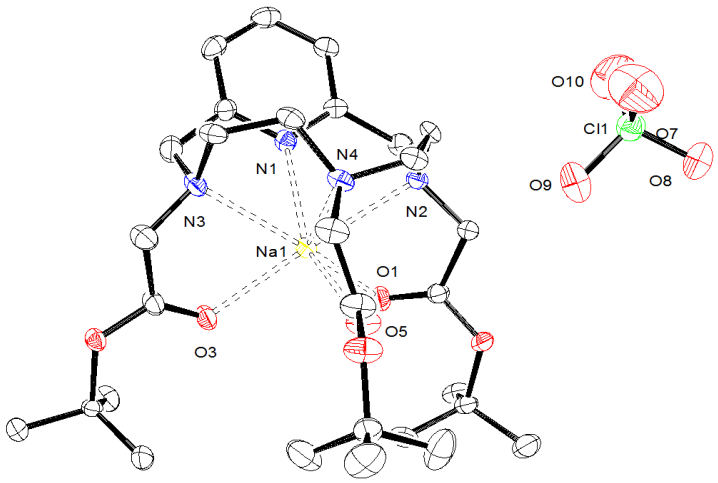
	H_1		**H_2**		**H_9**	**H_{12}**
	δ (ppm)	***J* (Hz)**	**δ (ppm)**	***J* (Hz)**		
Forme libre	7,57	7,6	7,07	7,6	1,40	1,39
Forme sodée	7,67	7,7	7,15	7,7	1,50	1,44

Tableau 2.1. Déplacements chimiques de protons des formes libre et complexée du composé **12**

Si aucun effet bathochrome n'est observé en spectroscopie UV (λ_{abs} = 266 nm pour les deux formes), la spectroscopie infra-rouge met en évidence un déplacement d'environ 10 cm^{-1} de la fréquence d'élongation υ(C=O) des fonctions ester vers les basses fréquences sous l'effet de la complexation de l'ion sodium.

La structure monomérique du ligand **12** en solution a été établie par spectrométrie de masse en mode électrospray positif. La présence du pic de base correspondant à l'ion quasi-moléculaire $[M+H]^+$ et celle de trois pics correspondant aux pertes de un à trois groupements *tertio*-butyle (pertes successives de 56 u.m.a.), en accord avec la présence de trois fonctions acétate de *tertio*-butyle, a été observée.

Afin de confirmer l'existence du complexe **12.**Na, la détermination de sa structure à l'état solide a été réalisée. Ainsi, la cristallisation lente d'un mélange équimolaire de ligand libre **12** et de perchlorate de sodium dans le méthanol a permis d'obtenir un cristal de bonne qualité pour une étude par diffraction des rayons X. Cette étude met en évidence la présence d'un complexe de sodium heptacoordiné, cristallisé avec son contre-ion perchlorate (**Figure 2.12**).



Na – N1 = 2,421 (6) Å
Na – N2 = 2,616 (5) Å
Na – N3 = 2,641 (5) Å
Na – N4 = 2,547 (6) Å
Na – O1 = 2,460 (5) Å
Na – O3 = 2,382 (4) Å
Na – O5 = 2,398 (6) Å

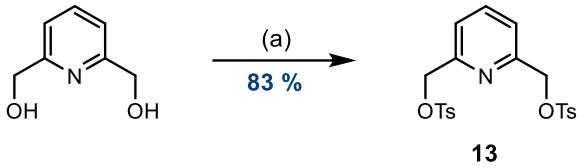
Figure 2.12. Structure cristallographique du complexe **12.**Na(ClO_4) et longueurs de liaisons sélectionnées

L'ion sodium est coordiné par les quatre atomes d'azote intracycliques et les trois atomes d'oxygène des fonctions carbonyle latérales. Les distances Na – N sont comprises entre 2,421 et 2,641 Å, avec la liaison Na – N(pyridine) la plus courte, tandis que les liaisons Na – O sont comprises entre 2,382 et 2,460 Å. Ces longueurs de liaison sont en adéquation avec celles reportées pour un complexe de sodium issu d'un dérivé du cyclène comportant trois groupements acétate de *tertio*-butyle latéraux.[9]

De nombreux facteurs peuvent être impliqués lors de l'étape que constitue la réaction de macrocyclisation. Dans le cadre de cette synthèse, l'influence de la nature du groupement partant (Br, Cl, OTs) et de la base (organique ou inorganique) employés, ainsi que l'influence d'un chauffage à micro-ondes sur le rendement de cyclisation ont été étudiées.

Le premier facteur à avoir été évalué étant la nature du groupement partant, la synthèse de la plateforme hétéroaromatique non commerciale portant deux fonctions ester de tosyle a dû être réalisée. Cette dernière est obtenue par action du chlorure de tosyle sur la 2,6-diméthanolpyridine, d'après le protocole décrit par

Cabezon *et al.* (**Figure 2.13**).[10] Après purification par chromatographie sur colonne d'alumine, le composé **13** a été obtenu avec un rendement de 83 %.



13

Figure 2.13. Réactifs et conditions. **(a)** TsCl, NaOH, H_2O/THF, 8h, 0 °C

Initialement, l'utilisation d'esters de tosyle permettait de rigidifier le synthon électrophile dans une conformation particulière en vue de faciliter l'étape de cyclisation. Puisque la rigidité de l'électrophile est ici apportée par le noyau pyridine, l'encombrement stérique lié aux esters de tosyle n'est plus nécessaire, voire est défavorable à la réaction de cyclisation. Il est admis que la capacité nucléofuge des halogènes décroît du fluor à l'iode : l'emploi de bromures plutôt que de chlorures en tant que groupements partants favorise donc la formation du macrocycle protégé (**Tableau 2.2, Entrées 1-3**).

Entrée	Groupement partant (X)	Base	Chauffage	Durée	$R_{cyclisation}$ (*)
1	OTs	Na_2CO_3	100 °C	64h	56 %
2	Cl	Na_2CO_3	100 °C	64h	35 %
3	**Br**	**Na_2CO_3**	**100 °C**	**16h**	**87 %**
4	Br	Li_2CO_3	100 °C	64h	59 %
5	Br	K_2CO_3	100 °C	64h	48 %
6	Br	DIPEA	100 °C	64h	53 %
7	Br	Na_2CO_3	Micro-ondes	2h	77 %

Tableau 2.2. Influence de différents paramètres sur le rendement de cyclisation. (*) Rendements en produit isolé

Si l'utilisation de micro-ondes à la place du chauffage à reflux traditionnel ne permet pas d'améliorer le rendement de cyclisation, ce mode de chauffage présente l'avantage de réduire le temps de réaction à 2h au lieu des 16h nécessaires dans le meilleur des cas **(Entrées 3 et 7**).

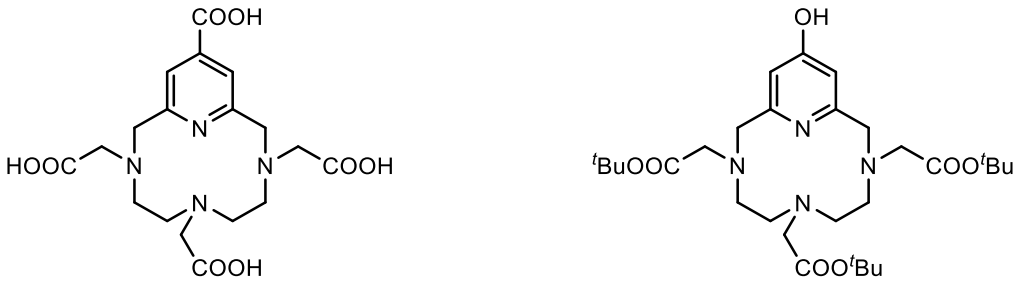
L'influence de plusieurs bases a finalement été étudiée pour cette réaction : des bases carbonatées, dont la taille du cation varie du plus petit (Li^+) au plus grand (K^+) d'une part, à une base organique (DIPEA) d'autre part **(Entrées 3-6**). Lorsque que le carbonate de sodium est utilisé, la réaction présente un rendement maximum de 87 %, mettant en évidence l'importance du cation. L'ion sodium semble être particulièrement adapté à la préorganisation du synthon triamine, et permet d'induire l'étape de cyclisation de manière plus efficace. Ces résultats sont confirmés et l'hypothèse validée puisqu'un rendement modéré est obtenu lors de l'utilisation d'une base organique telle que la DIPEA. Au niveau de la nature du cation, la séquence suivante est observée : $Na^+ > Li^+ > K^+$. Ainsi, l'utilisation conjointe de la 2,6-dibromométhylpyridine et du carbonate de sodium permet d'obtenir un rendement de macrocyclisation (87 %) comparable à ceux obtenus pour l'obtention du pyclène porteur de fonction tosyle (95 %) ou nosyle (76 %).

La dernière étape d'hydrolyse des fonctions ester de *tertio*-butyle par action d'acide chlorhydrique (1N) pendant une nuit à température ambiante permet d'obtenir le PCTA[12] sous sa forme chlorhydratée avec un rendement quantitatif pour cette étape, et un rendement total de 64 % à partir de la diéthylènetriamine et 54 % à partir de la *N*-benzyléthanolamine (**Figure 2.10**).

La séquence « d'alkylation/cyclisation » développée au sein du laboratoire peut donc se révéler très compétitive vis-à-vis de la stratégie classique de « cyclisation/alkylation ». Suivant le produit de départ employé pour la synthèse préalable du précurseur triamine tri-alkylé, cette stratégie permet de limiter le nombre d'étapes postérieures à l'étape de macrocyclisation et permet, *a priori*, de diversifier les fonctions complexantes latérales portées par la chaîne intracyclique diéthylènetriamine. Si la réaction de macrocyclisation était initialement un facteur limitant l'utilisation de cette approche, l'optimisation des conditions réactionnelles de cette étape permet maintenant d'atteindre des rendements équivalents à ceux proposés par les stratégies classiques. En partant de la diéthylènetriamine, le rendement global obtenu par la séquence « d'alkylation/cyclisation » est de 64 %, contre un rendement maximal de 36 % pour la séquence de « cyclisation/alkylation » traditionnellement employée pour l'obtention du PCTA[12].[11]

3 Synthèse de ligands bifonctionnels chélatants *C*-fonctionnalisés dérivés du PCTA[12]

La première série de ligands synthétisée propose une *C*-fonctionnalisation du macrocycle en position para du noyau pyridine. Cette position particulière sur l'hétérocycle aromatique est retenue afin d'éviter toute interférence avec la sphère de coordination de l'ion lanthanide. En utilisant la méthodologie basée sur la séquence « d'alkylation/cyclisation », deux types de groupements réactifs ont été introduits : une fonction acide carboxylique aromatique, ainsi qu'une fonction phénol (**Figure 2.14**). La synthèse du ligand bifonctionnel chélatant portant la fonction acide carboxylique permettra également de confirmer certaines observations rapportées pour la synthèse du PCTA[12].



H_4L_1

Figure 2.14. Structures des ligands bifonctionnels chélatants *C*-fonctionnalisés visés

3.1 Introduction d'une fonction acide carboxylique aromatique

La synthèse de ligands présentant une fonction réactive sur le noyau aromatique nécessite la préparation préalable du dérivé bisélectrophile issu de la pyridine correspondante. Ici, la fonction acide carboxylique portée par la pyridine est d'abord introduite sous la forme d'un ester de méthyle afin de pouvoir différencier ce groupement réactif, destiné à des réactions de bioconjugaison, par rapport aux fonctions ester de *tertio*-butyle du squelette triaminé nécessaires à la complexation ultérieure de l'ion lanthanide.

Synthèse des précurseurs dérivés du 2,6-diméthylisonicotinate de méthyle

En vue de confirmer l'importance de la nature du groupement partant lors de la réaction de macrocyclisation, deux dérivés disubstitués en positions 2 et 6 de l'isonicotinate de méthyle ont été préparés (**Figure 2.15**).

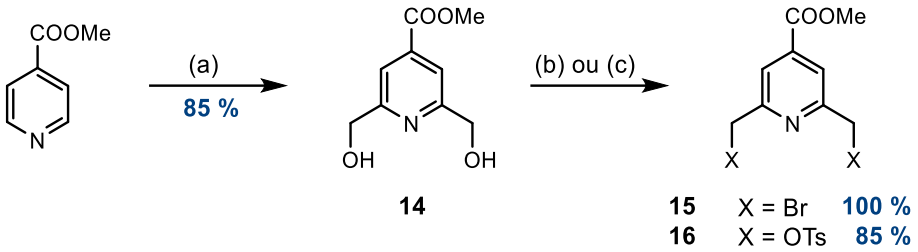


Figure 2.15. Réactions et conditions. **(a)** H_2SO_4, $(NH_4)_2S_2O_8$, H_2O/MeOH, 3h, reflux **(b)** PBr_3 (1 M dans DCM), DCM, 24h, 0 °C à T.A. **(c)** TsCl, Ag_2O, KI, DCM, 16h, T.A.

La dialkylation de l'isonicotinate de méthyle est réalisée par substitution radicalaire *via* une réaction de Minisci dans un mélange méthanol/eau en milieu acide, et en présence de persulfate d'ammonium.[12] Une purification par chromatographie sur colonne de silice permet de séparer les produits mono- et dialkylés et d'isoler le composé **14** avec des rendements variables compris entre 36 et 85 %. Si la qualité des différents lots de persulfate d'ammonium utilisés (issus d'un même fournisseur) n'a pas été évaluée, le rendement de cette réaction semble vraisemblablement en dépendre.

Deux méthodes d'activation du diol ont par la suite été réalisées. L'action du tribromure de phosphore dans le dichlorométhane permet l'obtention du composé **15** avec un rendement quantitatif. En raison de la présence du groupement ester de méthyle, la réaction de sulfonylation des deux fonctions hydroxyle du composé **14** a été effectuée en milieu neutre. L'utilisation conjointe d'un léger excès de chlorure de tosyle, d'oxyde d'argent en tant que base et d'iodure de potassium en tant que catalyseur a permis d'atteindre le dérivé ditosylé **16** avec un rendement de 85 % après purification sur colonne de silice. Ce protocole expérimental s'appuie sur les travaux de Bouzide *et al*.[13] Le mécanisme de cette réaction ferait intervenir la complexation de l'ion argent par les fonctions alcool, ce qui augmenterait leur acidité, et la présence d'iodure de potassium engendrerait la transformation du chlorure de tosyle en iodure de tosyle, plus réactif.

Macrocyclisation, déprotections sélectives et formation du ligand H_3L_1

Les réactions de macrocyclisation avec chacune de ces deux plateformes hétéro-aromatiques et la triamine **3** sont réalisées dans les conditions optimales obtenues pour la synthèse du PCTA[12], à savoir en utilisant le carbonate de sodium dans l'acétonitrile à reflux (**Figure 2.16**).

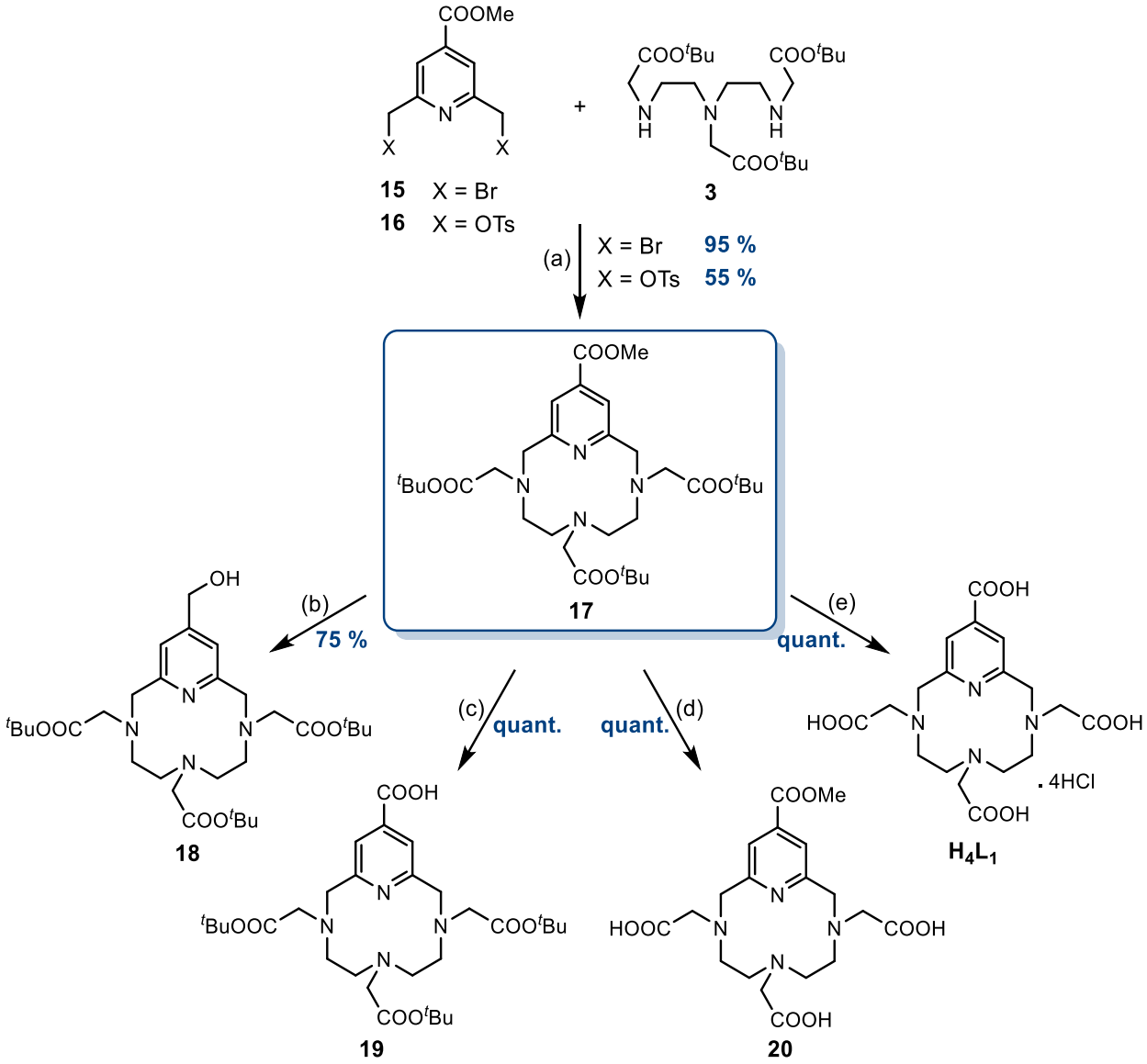


Figure 2.16. Déprotections sélectives et formation du ligand $\mathbf{H_3L_1}$. **(a)** Na_2CO_3, ACN, 48h, reflux **(b)** $NaBH_4$, MeOH, 168h, T.A. **(c)** Na_2CO_3, MeOH/H_2O, 12h, T.A. **(d)** TFA, DCM, 12h, T.A. **(e)** HCl (6N), 12h, reflux

De la même manière, l'utilisation de tosylates en tant que groupements partants sur le dérivé bisélectrophile semble défavoriser la réaction puisqu'un rendement de cyclisation plus modeste de 55 % est obtenu. L'emploi du dérivé dibromé **15** permet quant à lui la formation du macrocycle d'intérêt **17** avec un très

bon rendement de 95 % confirmant les résultats obtenus lors de la synthèse du PCTA[12].

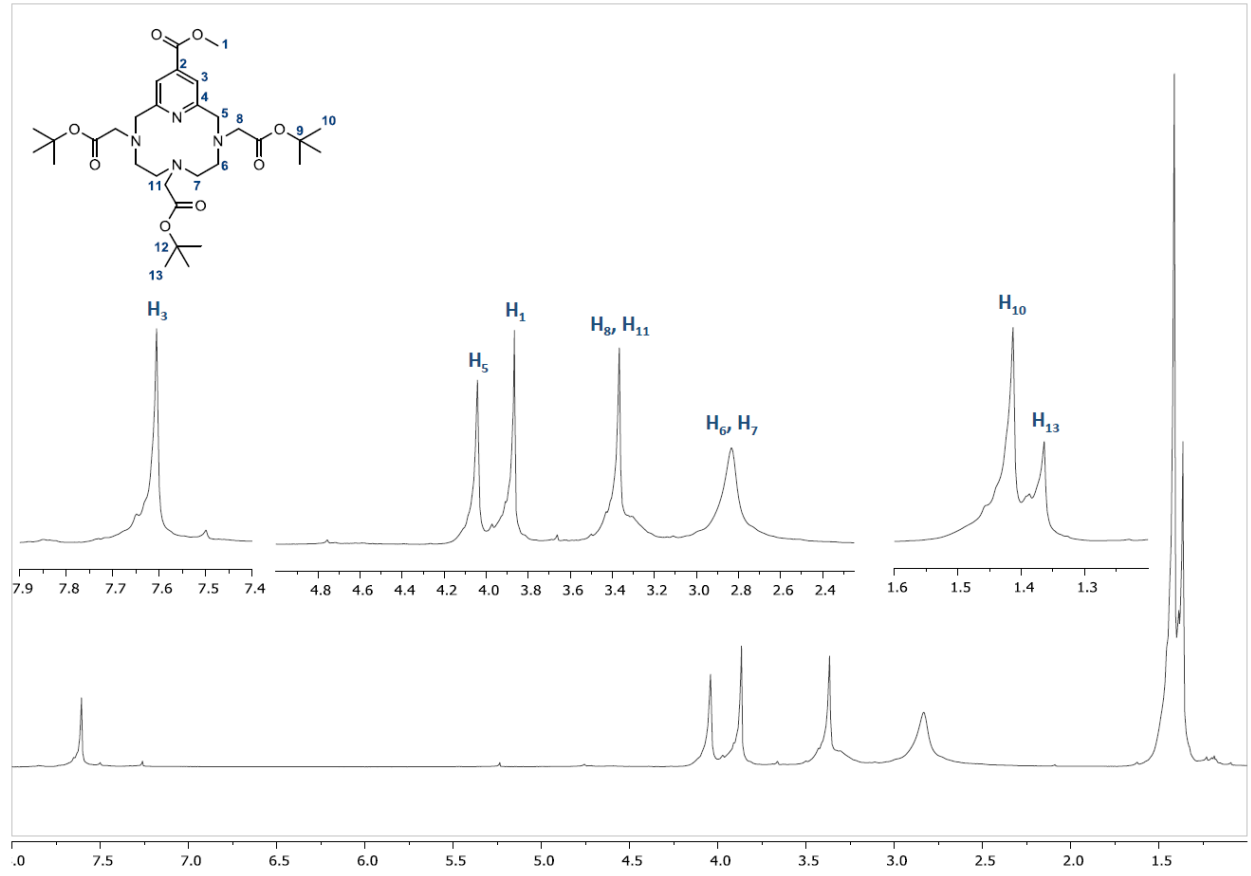
L'effet de matrice induit par la présence du cation sodium de la base carbonatée a été mis en évidence une nouvelle fois lors de cette réaction de macrocyclisation. Comme dans le cas du macrocycle **12**, précurseur du ligand PCTA[12], l'analyse du milieu réactionnel par RMN ^{1}H et spectrométrie de masse met en évidence la formation du complexe de sodium du macrocycle **17** comme seule forme macrocyclique. La dissociation partielle de ce complexe lors de la purification par chromatographie sur colonne d'alumine est une nouvelle fois observée, et les deux formes libre et complexée se différencient parfaitement en RMN ^{1}H (**Figure 2.17**).

Les protons aromatiques et *tertio*-butyliques sont déplacés de l'ordre de 0,03 ppm vers les champs forts dans le cas de la forme libre (**Tableau 2.3**). La forme sodée est également caractérisée par la présence de deux systèmes AB correspondant aux quatre protons en alpha du noyau pyridine (H_5) (δ = 3,92 ppm, J = 14,9 Hz) et aux quatre protons des deux chaînes latérales acétate de *tertio*-butyle (H_8) (δ = 3,44 ppm, J = 17,7 Hz), et d'un singulet à 3,09 ppm correspondant à la chaîne acétate centrale (H_{11}). Deux singulets à 3,37 et 4,04 ppm représentent ces dix protons dans le cas de la forme libre.

δ (ppm)	**H_3**	**H_{10}**	**H_{13}**
Forme libre	7,61	1,41	1,36
Forme sodée	7,64	1,44	1,39

Tableau 2.3. Déplacements chimiques de protons des formes libre et complexée du composé **17**

Comme évoqué précédemment, l'intérêt de l'utilisation conjointe d'esters de méthyle et de *tertio*-butyle en tant que groupements protecteurs de fonctions acide est de permettre leur déprotection sélective en vue d'une bioconjugaison ultérieure. Une famille de ligands bifonctionnels chélatants a donc pu être synthétisée à partir du macrocycle protégé **17** (**Figure 2.16**).



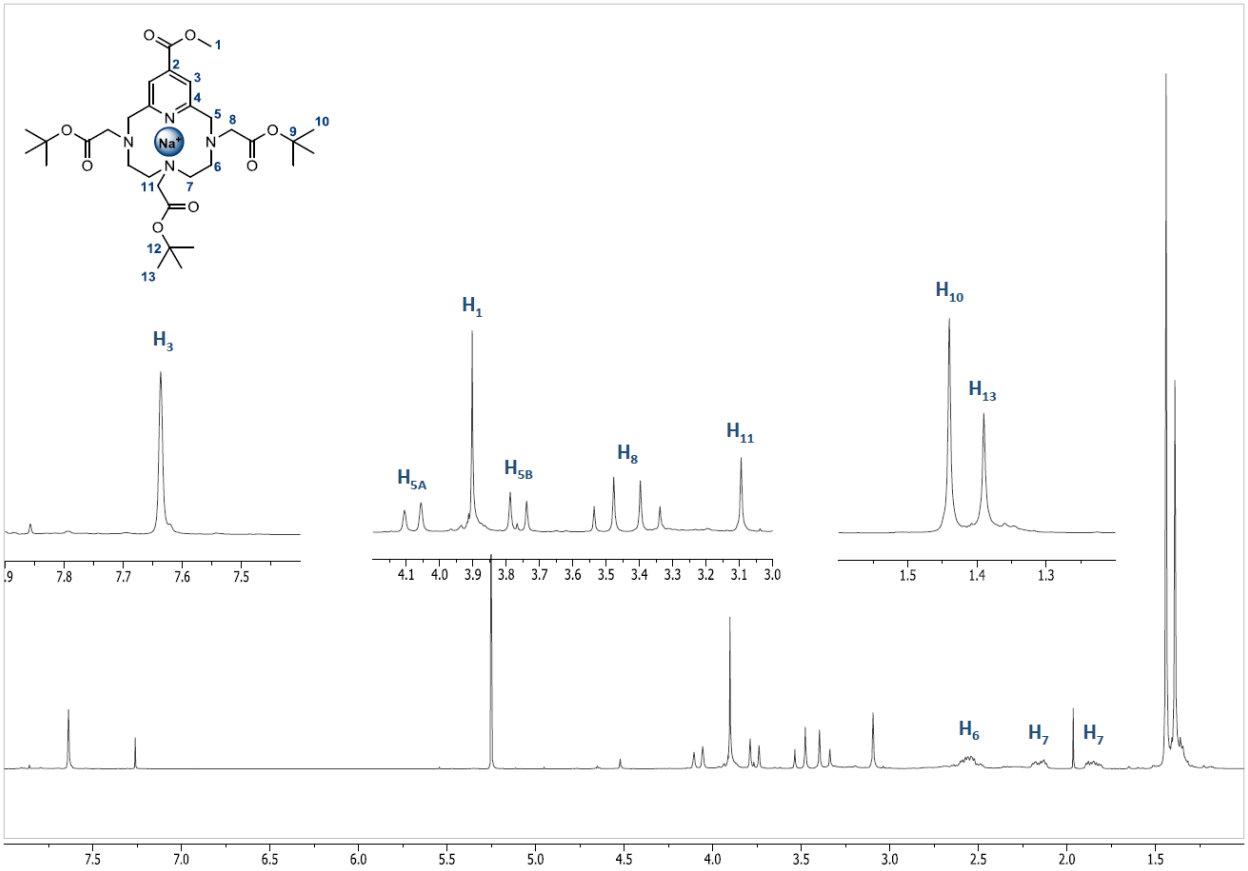


Figure 2.17. Spectres RMN ^{1}H du composé **17** sous ses formes libre et complexée au sodium ($CDCl_3$, 300 MHz)

Ainsi, la réduction de l'ester de méthyle du composé **17** en alcool primaire est réalisée en présence d'un excès de borohydrure de sodium dans le méthanol et conduit à la formation du composé **18** avec un rendement de 75 %. Les composés **19** et **20** sont obtenus respectivement, quantitativement et sans purification par (i) hydrolyse sélective de l'ester de méthyle en utilisant le carbonate de sodium dans un mélange eau/méthanol et (ii) hydrolyse sélective des esters de *tertio*-butyle en présence d'un excès d'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane. L'hydrolyse totale du composé **17** en milieu acide chlorhydrique (6N) à reflux permet finalement de former le ligand **H_3L_1** avec un rendement quantitatif et sans purification.

3.2 Introduction d'une fonction phénol

L'introduction d'une fonction phénol a, quant à elle, été retenue en vue de diversifier facilement la nature de la fonction réactive du ligand bifonctionnel chélatant par utilisation ultérieure de la réaction de Mitsunobu sur le macrocycle préalablement formé. Cette dernière permet le couplage entre un alcool (R-OH) et un nucléophile (Nu-H), en présence de triarylphosphine (généralement de la triphénylphosphine – PPh_3) et d'azodicarboxylate de dialkyle (généralement de l'azodicarboxylate de diéthyle – DEAD ou de diisopropyle – DIAD) (**Figure 2.18**). Cette réaction présente l'avantage de pouvoir s'opérer dans des conditions douces et est compatible avec une large gamme de groupements fonctionnels.[14]

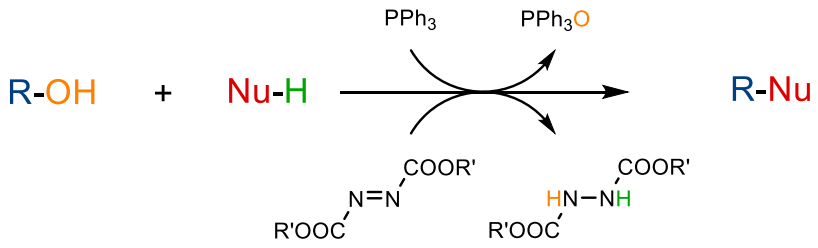


Figure 2.18. Illustration de la réaction de Mitsunobu. Adapté de l'article de But *et al.*[15]

D'un point de vue mécanistique, un intermédiaire zwitterionique est d'abord rapidement formé par l'action du DIAD sur PPh_3, puis celui-ci se protone en présence du nucléophile conduisant alors à la formation d'un sel de phosphonium. L'activation de l'alcool s'opère par la formation d'un sel d'oxyphosphonium, sur lequel va réagir le nucléophile déprotoné et finalement conduire au produit de couplage.

Cette méthode a été exploitée avec succès par Hovinen pour la dérivatisation de la terpyridine, sur laquelle différents groupements fonctionnels tels que des fonctions amine, ester, hydroxy, alcyne, ou acide carboxylique ont été introduits sous leur forme protégée (**Figure 2.19**).[16]

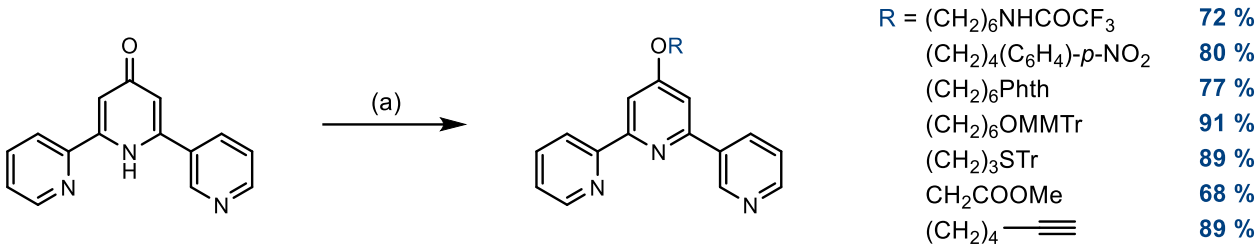


Figure 2.19. Exemples d'applications de la réaction de Mitsunobu sur le noyau terpyridine.[16] **(a)** ROH, DIAD, PPh_3, THF, 2h, T.A.

L'équipe montre, de plus, que cette stratégie de couplage peut également être employée à la préparation de dérivés de la pyridine avec un rendement satisfaisant.

Synthèse du précurseur dérivé de la 2,6-diméthanol-4-hydroxypyridine

Suite à ces résultats encourageants, le couplage entre la fonction phénol et le composé portant la nouvelle fonction réactive peut être envisagé non pas sur la plateforme hétéroaromatique, mais après l'étape de macrocyclisation. Le dérivé trisubstitué de la pyridine portant une fonction hydroxyle en position 4 a alors été synthétisé (**Figure 2.20**).

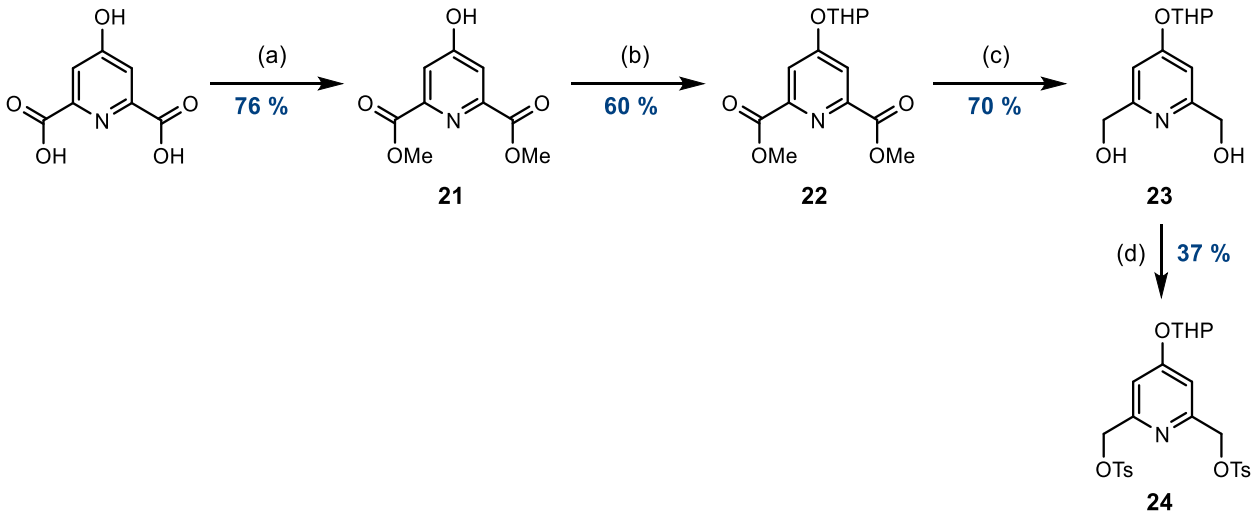


Figure 2.20. Réactions et conditions. **(a)** $SOCl_2$, MeOH, 6h, reflux **(b)** 3,4-dihydropyrane, PPTS, DCM, 16h, T.A. **(c)** $NaBH_4$, $CaCl_2$, EtOH, 2h (0 °C) puis 1h (T.A.) **(d)** TsCl, KOH (aq)/DCM, 16h, T.A.

Dans une première étape, l'action du chlorure de thionyle sur l'acide chélidamique permet la transformation des acides carboxyliques en fonctions chlorure d'acide. La présence de méthanol dans le milieu réactionnel permet l'introduction des fonctions ester de méthyle sur le composé intermédiaire et conduit à la formation du composé **21** avec un rendement de 76 %. Cette réaction a été réalisée d'après un protocole adapté de la publication de Lincoln *et al*.[17]

La dernière étape du schéma de synthèse consistant en l'activation des groupements alcool, la différenciation de la fonction phénol du composé **21** par rapport aux deux fonctions alcool primaire du composé **23** est nécessaire. La seconde étape de la synthèse consiste donc en sa protection sous la forme d'un éther de tétrahydropyranyle par action de dihydropyrane en présence catalytique de *p*-toluènesulfonate de pyridinium dans le dichlorométhane.[18] Le choix de ce groupement est orienté par sa stabilité face aux milieux réducteurs tels que les hydrures, par ses conditions de déprotection douces et compatibles avec l'utilisation des esters de *tertio*-butyle, et offre une certaine solubilité au produit protégé.[19] Le composé **22** est obtenu sans purification avec un rendement de 60 %.

Si le borohydrure de sodium seul ne permettait initialement pas d'obtenir le composé **23**, son utilisation conjointe avec du chlorure de calcium a permis de réduire les fonctions ester de méthyle du composé **22** avec un rendement acceptable de 70 %.[20]

Plusieurs méthodes ont ensuite été envisagées pour l'activation des fonctions hydroxyle (**Figure 2.21**). La première a consisté en leur substitution par des bromures par action classique de PBr_3, mais les conditions acides de la réaction ont cependant conduit à la déprotection de l'éther de tétrahydropyranyle. L'emploi de systèmes neutres tels que NBS/PPh_3 ou l'utilisation de chlorure de tosyle en présence d'oxyde d'argent et d'iodure de potassium a alors été considéré, sans pour autant permettre d'isoler le composé d'intérêt.

La tosylation des fonctions alcool par action de chlorure de tosyle dans un mélange DCM/KOH à 40 % (*i.e.* dans des conditions basiques),[21] a finalement permis l'obtention du composé **24**, malgré un faible rendement de 37 %.

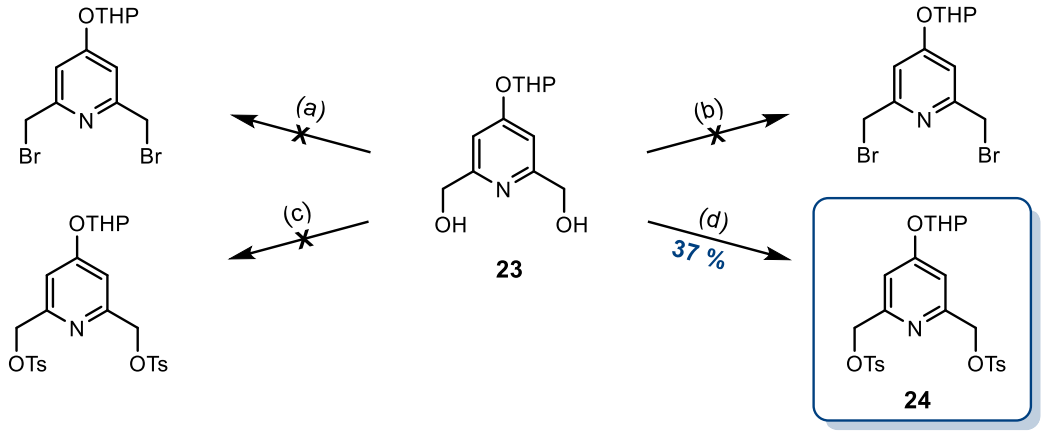


Figure 2.21. Réactions et conditions. **(a)** PBr_3 (1 M dans DCM), DCM, 12h, 0 °C à T.A. **(b)** NBS, PPh_3, DCM, 12h, 0 °C à T.A. **(c)** TsCl, Ag_2O, KI, DCM, 3h, T.A. **(d)** TsCl, KOH/DCM, 16h, T.A.

Macrocyclisation et formation du composé 25

La réaction de macrocyclisation entre la polyamine tri-alkylée **3** et la plateforme hétéroaromatique **24** est réalisée dans les conditions usuelles (**Figure 2.22**). En RMN ^{1}H, le spectre du brut réactionnel montre cependant de nombreux signaux liés à la présence des formes libre et complexée au sodium. L'intégration des signaux correspondants suggère également le clivage partiel du groupement protecteur THP. L'intermédiaire réactionnel est donc repris dans un mélange ternaire AcOH/THF/H_2O (4:2:1) afin de permettre la régénération totale de la fonction phénol.[22]

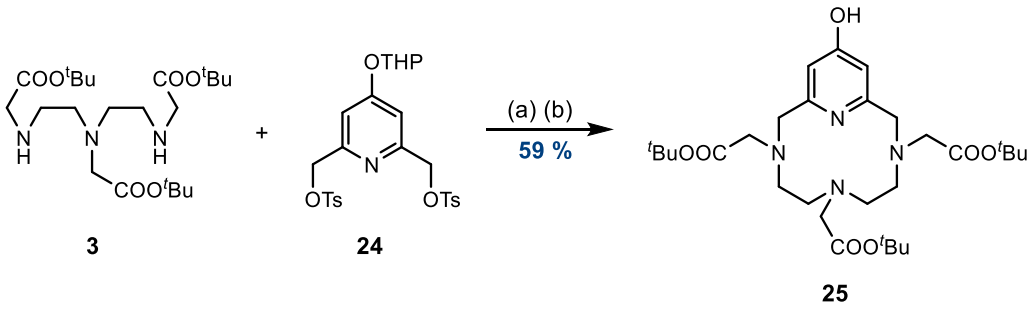


Figure 2.22. Réactions et conditions. **(a)** Na_2CO_3, ACN, 48h, reflux **(b)** AcOH/THF/H_2O (4:2:1), 1,5h, T.A.

Après purification par chromatographie sur colonne d'alumine, le macrocycle **25** a pu être isolé avec un rendement modéré de 59 %, expliqué, *a priori*, par l'utilisation des esters de tosyle en tant que groupements partants.

A titre de comparaison, Lincoln *et al*. ont rapporté la préparation d'un dérivé du pyclène à partir de la diéthylènetriamine trinosylée et d'un dérivé pyridol dont la fonction alcool est protégée par un groupement benzyle (**Figure 2.23**).[17] Cette synthèse en trois étapes se traduit par un rendement global de 54 %.

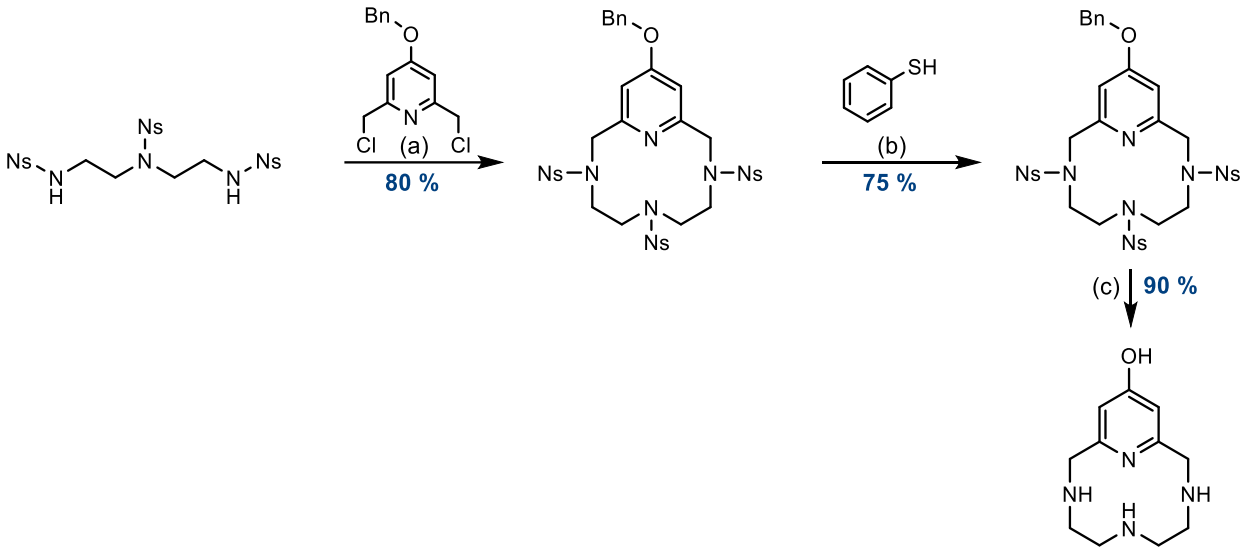
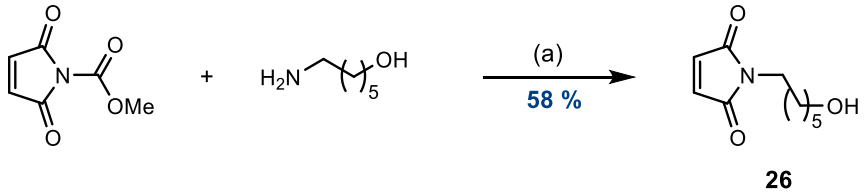


Figure 2.23. Synthèse d'un dérivé du pyclène portant une fonction phénol [23]

Essais d'introduction d'un groupement maléimide par la réaction de Mitsunobu

Comme évoqué précédemment, plusieurs fonctions réactives peuvent être employées à des fins de bioconjugaison. Le choix du groupement maléimide est ici retenu en vue de diversifier la nature des fonctions réactives introduites sur la plateforme PCTA[12].

Ainsi, la première étape de cette stratégie consiste en la synthèse du précurseur maléimide portant à son extrémité une fonction alcool par condensation du 6-amino-1-hexanol sur le *N*-(méthoxycarbonyl)maléimide dans une solution saturée d'hydrogéno-carbonate de sodium (**Figure 2.24**).[23] Après purification par chromatographie sur colonne de silice, le composé **26** est isolé avec un rendement de 58 %.



26

Figure 2.24. Réactions et conditions. **(a)** $NaHCO_3$ (sat.), 30 min (0 °C) puis 20 min (T.A.)

Le premier essai de couplage a été réalisé de manière directe par action du système DIAD/PPh_3 sur le macrocycle **25** et le composé **26** précédemment synthétisé dans le THF à reflux (**Figure 2.25**). Malgré la disparition des signaux des produits de départ en RMN ^1H, ces conditions se sont cependant révélées être insatisfaisantes. L'analyse du brut réactionnel par spectrométrie de masse confirme, de plus, l'absence de formation du produit de couplage.

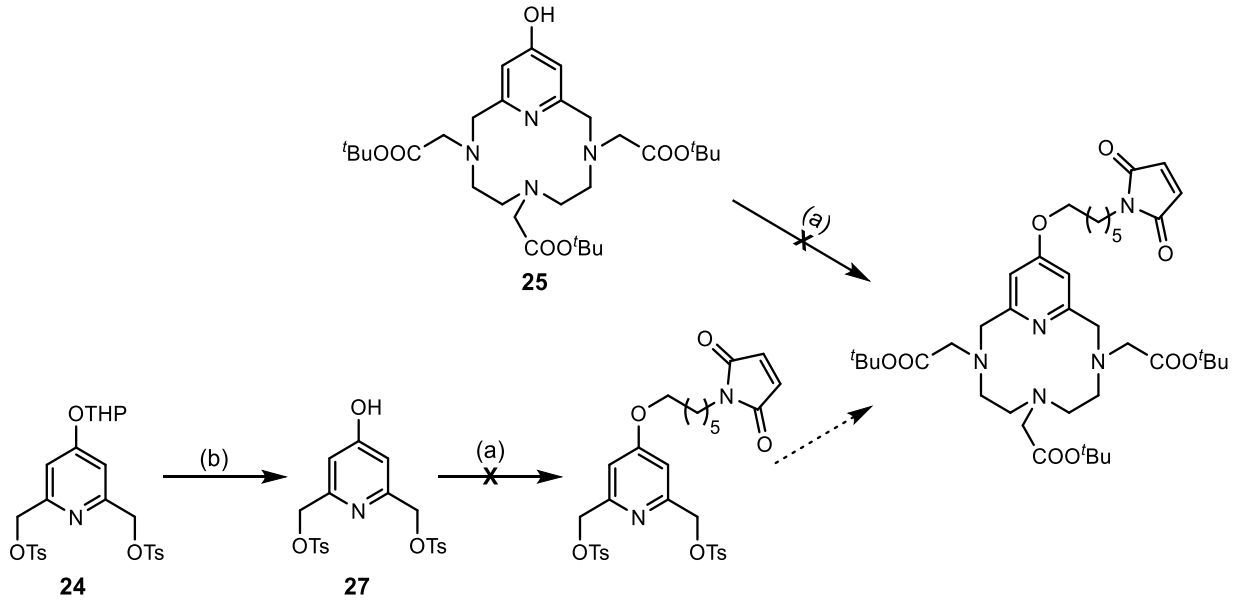


Figure 2.25. Réactions et conditions. **(a) 26**, DIAD, PPh_3, THF, 16h, reflux **(b)** AcOH/THF/H_2O (4:2:1), 1,5h, T.A.

Le deuxième essai a consisté en l'introduction du groupement maléimide sur la plateforme hétéroaromatique avant l'étape de macrocyclisation. Le composé **27**, obtenu par déprotection du groupement THP du composé **20** par action du mélange ternaire AcOH/THF/H_2O, est soumis aux mêmes conditions expérimentales de couplage avec l'alcool **26** mais également, aucune formation du produit de couplage n'a été observée ni par RMN ^1H ni par spectrométrie de masse.

Si aucun autre essai n'a été mené par manque de temps, il aurait été intéressant de réaliser le couplage entre le nucléophile **26** et le composé **21** comme le décrit la publication de référence d'Hovinen.[16]

4 Synthèse de ligands bifonctionnels chélatants *N*-fonctionnalisés dérivés du PCTA[12]

La méthodologie de synthèse des précurseurs triamines à partir de la *N*-benzyl-éthanolamine développée au laboratoire permet d'envisager la préparation d'une série de ligands bifonctionnels chélatants *N*-fonctionnalisés. Comme évoqué précédemment, la fonctionnalisation peut s'effectuer soit à travers la différenciation d'une fonction acétate de *tertio*-butyle par une fonction acétate de méthyle soit par introduction d'une fonction réactive en α-position d'un bras complexant. Ces deux approches seront exploitées pour la synthèse des ligands présentés dans cette partie (**Figure 2.26**).

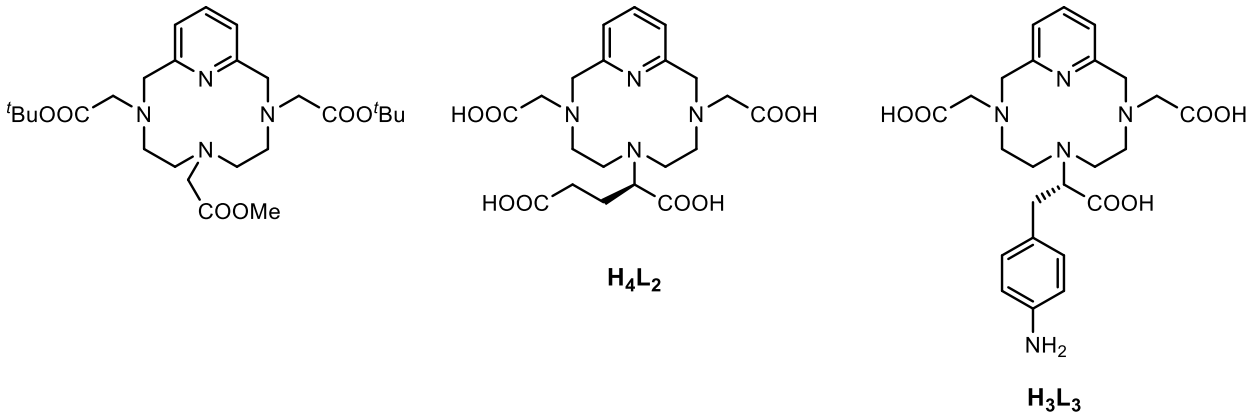


Figure 2.26. Structures des ligands bifonctionnels chélatants *N*-fonctionnalisés visés

4.1 Introduction d'une fonction ester de méthyle

L'introduction d'une fonction ester de méthyle à la place d'une fonction ester de *tertio*-butyle sur l'azote central de la chaîne triamine constitue un choix intéressant pour l'élaboration d'un ligand bifonctionnel chélatant *N*-fonctionnalisé au regard des possibilités de déprotections sélectives.

En employant la stratégie basée sur l'utilisation de la *N*-benzyléthanolamine en tant que produit de départ pour la synthèse de la triamine, le composé **28** a pu être

obtenu par double condensation du précurseur **5** préalablement synthétisé sur le glycinate de méthyle en présence de Na_2CO_3 dans l'acétonitrile à reflux, avec un rendement de 55 % (**Figure 2.27**).

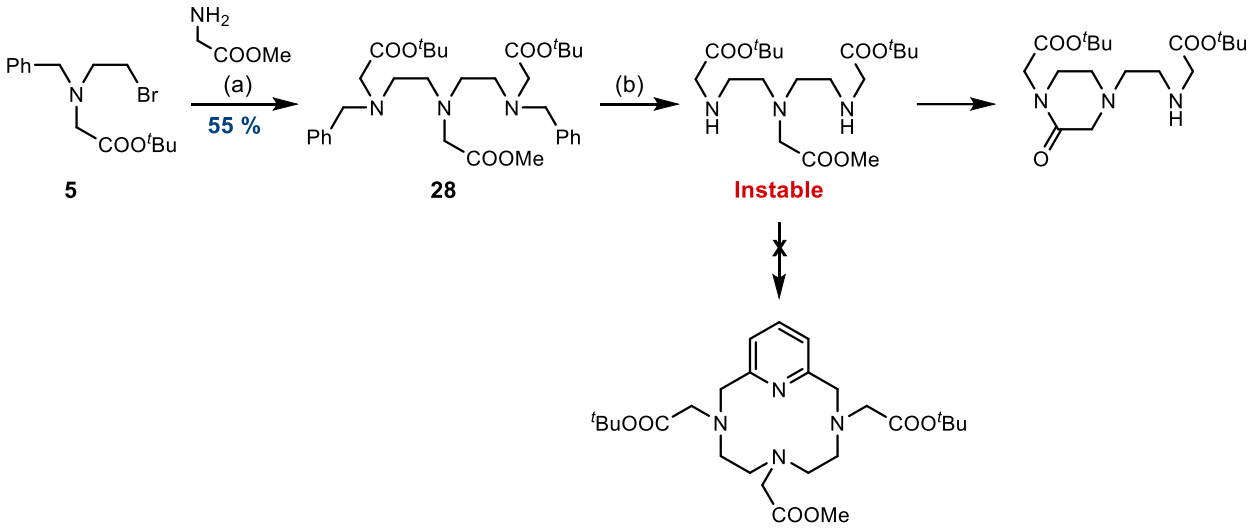


Figure 2.27. Réactifs et conditions. **(a)** $NH_2CH_2COO^tBu$, Na_2CO_3, ACN, 24h, reflux **(b)** Pd/C, H_2 (6 bars), MeOH, 12h, T.A.

Le clivage des groupements protecteurs benzyle par action de palladium sur charbon dans le méthanol sous pression d'hydrogène conduit cependant à la formation d'un composé instable ayant tendance à se cycliser. La réaction de macrocyclisation conduisant au macrocycle correspondant n'a donc pas pu être réalisée.

4.2 Introduction d'une fonction acide carboxylique aliphatique en α-position de la fonction coordinante centrale

Synthèse du précurseur triamine portant la fonction coordinante centrale

En ayant pour objectif la déprotection sélective de la fonction réactive par rapport aux fonctions complexantes, la première étape de la synthèse consiste en la protection de la fonctionnalisation sous la forme d'un ester de méthyle (**Figure 2.28**). L'action du triméthylsilyle dans le méthanol sur l'acide glutamique permet l'obtention du composé chlorhydraté **29** avec un rendement quantitatif.[24] La protection de la fonction acide carboxylique restante par de l'acétate de *tertio*-butyle en milieu acide conduit au composé **30** avec un rendement correct de 75 %. Ce dernier est cependant instable et se cyclise rapidement par réaction intramoléculaire entre les fonctions

amine et ester de méthyle, conduisant à la formation du lactame **31**. Après purification par chromatographie sur colonne de silice, l'ensemble du composé s'est cyclisé : la caractérisation a donc été effectuée sur le milieu réactionnel brut.

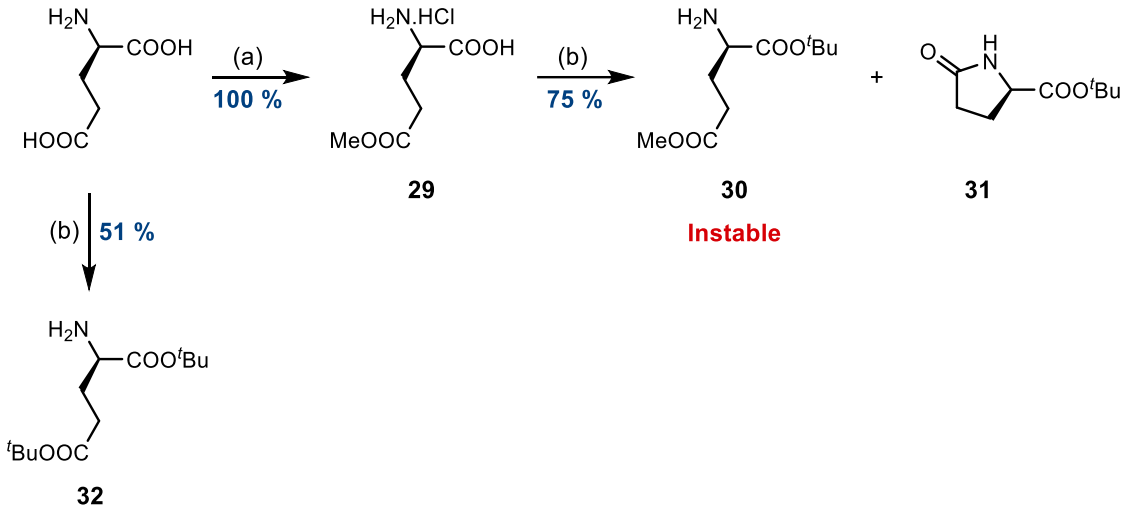


Figure 2.28. Réactions et conditions. **(a)** $ClSiMe_3$, MeOH, 0°C **(b)** $MeCOO^tBu$, $HClO_4$, 12h, T.A.

Pour éviter ces réactions parasites, la transformation simultanée des deux fonctions acide en esters de *tertio*-butyle a alors été préférée, permettant d'accéder au composé **32** avec un rendement de 51 %.

Macrocyclisation et formation du ligand H_4L_2

La double condensation du composé **32** sur le composé **5** en présence de Na_2CO_3 dans l'acétonitrile à reflux, permet la formation de la triamine protégée **33** avec un rendement modeste de 34 % (**Figure 2.29**).

Le clivage des groupements protecteurs benzyle par action du palladium sur charbon sous pression d'hydrogène conduit à la formation du composé **34**, qui, par condensation sur la 2,6-dibromométhylpyridine dans les conditions de cyclisation usuelles permet l'obtention du macrocycle **35** avec un rendement de 75 %. La dernière étape d'hydrolyse des quatre fonctions ester de *tertio*-butyle par action d'acide chlorhydrique (1N) pendant une nuit à température ambiante permet d'obtenir le ligand $\mathbf{H_4L_2}$ avec un rendement global de 21 % à partir de la *N*-benzyléthanolamine.

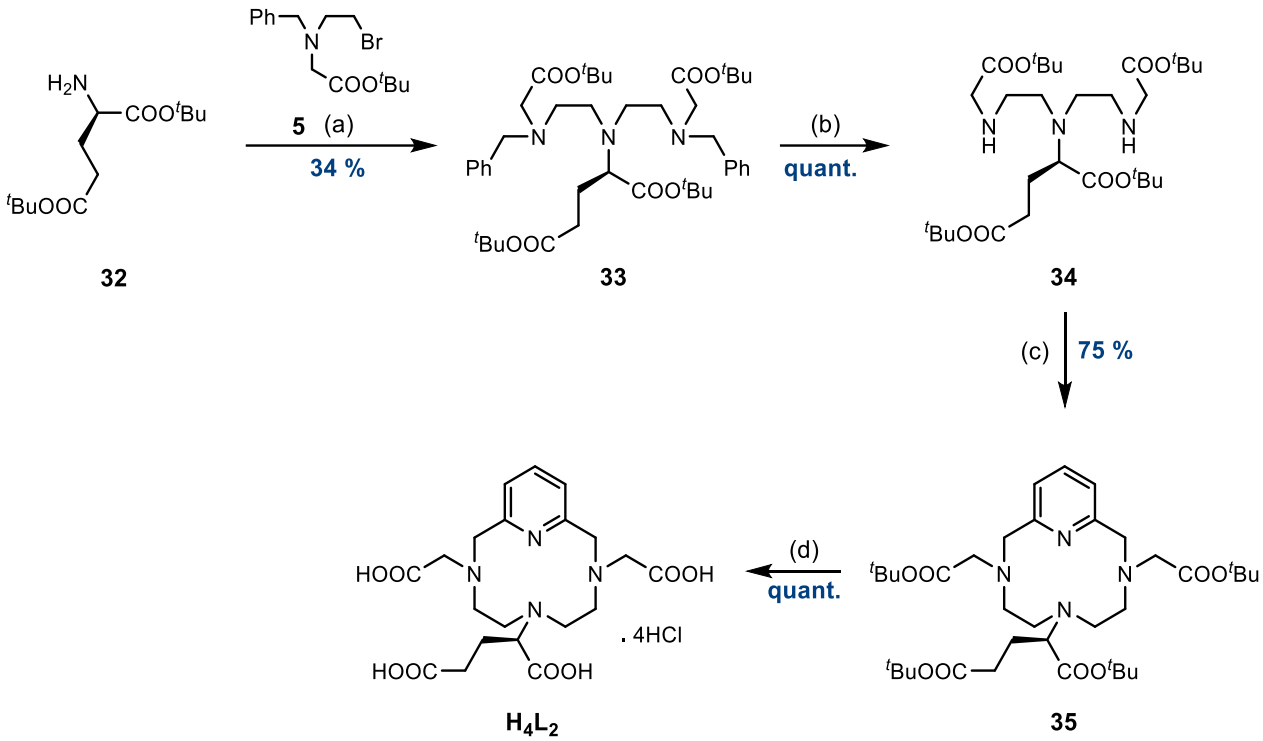


Figure 2.29. Formation du ligand $\mathbf{H_4L_2}$. **(a)** Na_2CO_3, ACN, 20h, reflux **(b)** Pd/C, H_2 (6 bars), MeOH, 12h, T.A. **(c)** 2,6-dibromométhylpyridine, Na_2CO_3, ACN, 72h, reflux **(d)** HCl (1N), 12h, T.A.

4.3 Introduction d'une fonction amine primaire aromatique en α-position de la fonction coordinante centrale

La version fonctionnalisée du PCTA[12], où une fonction amine primaire aromatique (et son équivalent isothiocyanate) est introduite sur la chaîne polyamine du squelette carboné a déjà été évoquée (**Chapitre 1 § 3.3**). Le complexe d'yttrium-90 issu de cette structure montre cependant des propriétés de radiomarquage et de stabilité moins favorables que celles du ligand non fonctionnalisé, laissant penser qu'une perturbation est générée par l'introduction d'une fonctionnalisation sur le squelette carboné.[25] L'équipe a donc exploité la méthodologie mise en place au laboratoire pour la synthèse d'un dérivé équivalent portant la fonction amine primaire aromatique en α-position de la fonction coordinante centrale.

Premiers essais de synthèse du précurseur triamine

La première étape de la synthèse consiste en l'estérification de la fonction acide de la 4-nitro-L-phénylalanine commerciale par action de l'acétate de *tertio*-butyle en présence d'acide perchlorique. Cette étape permet l'obtention du composé **36** avec un rendement quantitatif (**Figure 2.30**).

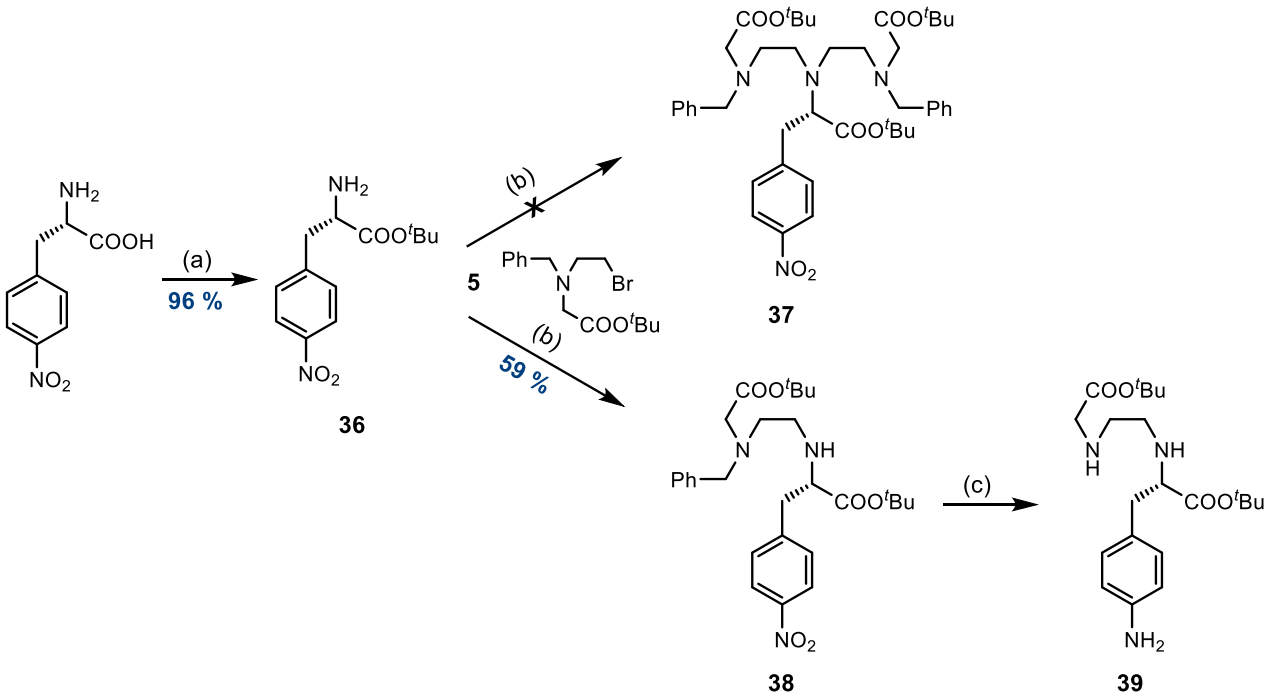


Figure 2.30. Réactions et conditions. **(a)** MeCOO^{t}Bu, $HClO_4$, 12h, T.A. **(b)** Na_2CO_3, ACN, 12h, reflux **(c)** Pd/C, H_2, MeOH, 30 min, T.A.

La double condensation du composé **5** sur l'aminoester dérivé de la phénylalanine **36** dans les conditions usuelles, à savoir en présence de carbonate de sodium dans l'acétonitrile à reflux, ne permet cependant pas d'obtenir la triamine correspondante **37** et seul le composé mono-alkylé **38** est formé.

Dans le but de déterminer si les conditions de réduction du groupement nitro sont compatibles avec l'utilisation des groupements protecteurs benzyle, le composé **38** est mis en présence de palladium sur charbon sous pression d'hydrogène. Après trente minutes sous agitation, la fonction nitro est réduite mais le groupement benzyle est également clivé, conduisant à la formation du composé **39**. La présence du groupement benzyle du composé **5** n'est donc pas compatible avec celle de la fonction nitro du composé **36** : un autre groupement *N*-protecteur résistant aux conditions de réduction du groupement nitro a donc été envisagé.

La seconde stratégie a recours à l'utilisation du groupement nosyle à la place du groupement benzyle pour la *N*-protection de l'éthanolamine commerciale (**Figure 2.31**).

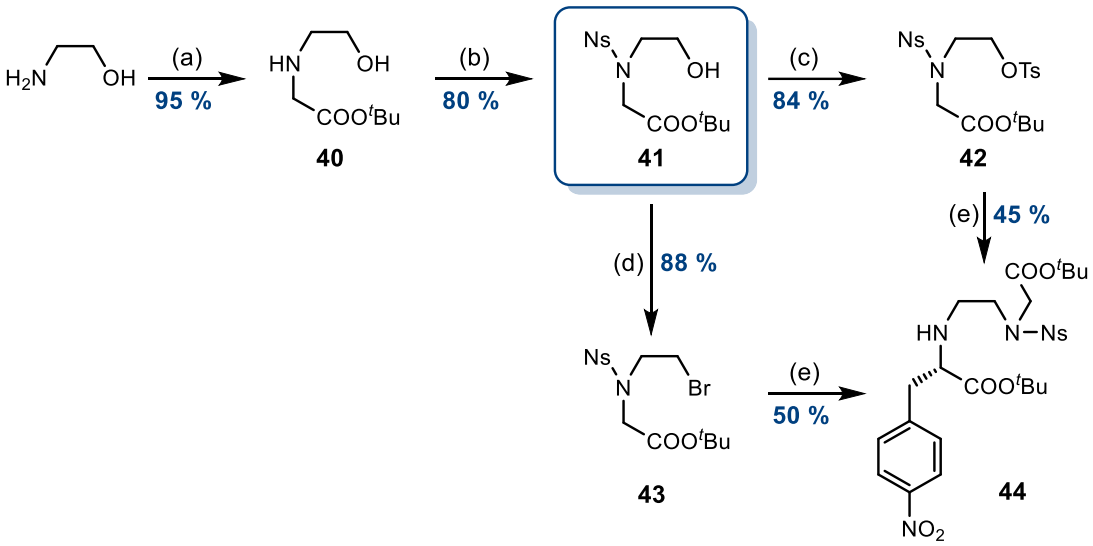


Figure 2.31. Réactions et conditions. **(a)** $BrCH_2COO^tBu$, TEA, 64h, T.A. **(b)** NsCl, $NaHCO_3$, THF, 12h, T.A. **(c)** TsCl, TEA, DCM, 12, T.A. **(d)** NBS, PPh_3, DCM, 4h, T.A. **(e)** **36**, Na_2CO_3, ACN, 20h, reflux

L'alkylation de la 2-éthanolamine par le bromoacétate de *tertio*-butyle en présence de triéthylamine dans l'éther conduit au composé **40** avec un rendement de 95 %. La nosylation du composé **40** effectuée dans le THF en présence d'hydrogénocarbonate de sodium et de chlorure de nosyle conduit à l'intermédiaire **41** avec 80 % de rendement suivant un protocole de nosylation d'amines primaires établi par Siaugue *et al.*[26] L'activation de la fonction alcool primaire par action du chlorure de tosyle et de triéthylamine permet d'obtenir le composé **42** avec un rendement de 84 %. L'intermédiaire **41** a également pu être bromé par le système NBS/PPh_3 pour conduire au composé **43** avec un rendement de 88 %. La condensation de deux équivalents des composés **42** et **43** sur le dérivé de la phénylalanine **36** conduisent cependant à la formation unique du produit de mono-alkylation **44** avec des rendements respectifs de 45 et 50 %.

Formation du précurseur triamine, macrocyclisation, et formation du ligand H_3L_3

Cette approche a amené l'équipe à envisager la réduction préalable du groupement nitro de la 4-nitro-L-phénylalanine puis la protection de la fonction amine secondaire résultante (**Figure 2.32**).

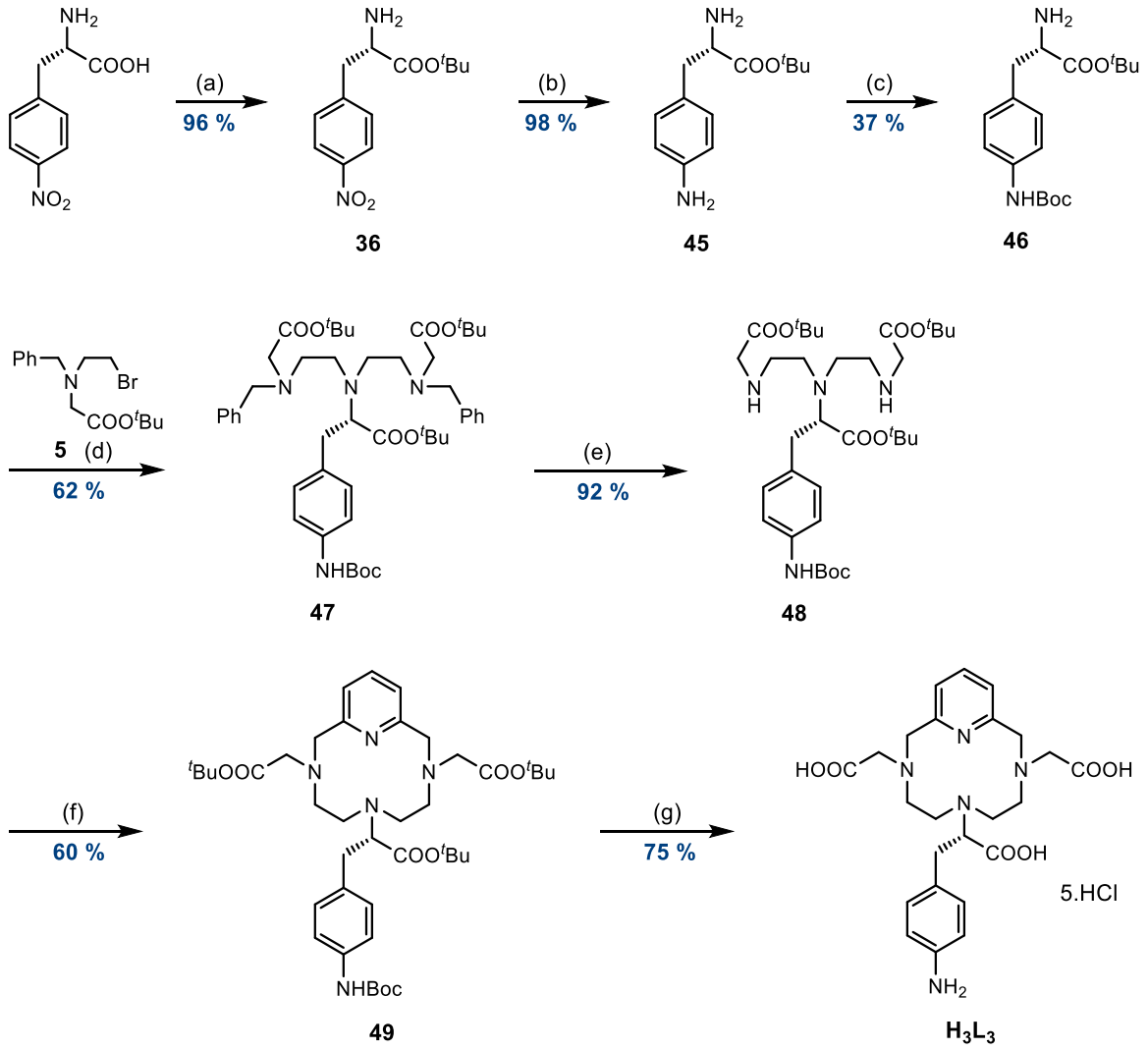


Figure 2.32. Formation du ligand **H_3L_3.a)** $MeCOO^tBu$, $HClO_4$, 12h, T.A. **(b)** Pd/C, H_2 (6 bars), MeOH, 12h, T.A. **(c)** Boc_2O, AcOH (10 %)/dioxane, 12h, T.A. **(d)** Na_2CO_3, ACN, 20h, reflux **(e)** Pd/C, H_2 (6 bars), MeOH, 12h, T.A. **(f)** Na_2CO_3, ACN, 24h, reflux **(g)** HCl (6N), 12h, T.A.

Ainsi, l'agitation une nuit à température du composé **36** en présence de palladium sur charbon sous pression d'hydrogène permet d'obtenir le composé **45** avec un rendement quasi-quantitatif. La protection de l'amine aromatique est ensuite réalisée par action du dicarbonate de di-*tertio*-butyle dans un mélange dioxane/acide acétique 10 % et conduit à la formation du composé **46** avec un rendement de 37 % après purification. Ce rendement modeste s'explique en partie par la présence du dérivé doublement protégé. Il est cependant à noter que cette étape limitante pour l'obtention du composé désiré n'a pas été optimisée.

Finalement, la double condensation du composé **5** sur l'aminoester portant la fonctionnalisation d'intérêt **46**, en présence de carbonate de sodium dans l'acétonitrile à reflux, permet d'obtenir la polyamine **47** avec un rendement de 62 %. Le clivage des

groupements benzyle par hydrogénation catalysée au palladium sur charbon conduit au composé **48**, qui, par condensation sur la 2,6-dibromométhyl-pyridine, permet la formation du macrocycle **49** avec un rendement de 60 %. La déprotection des fonctions acide et amine a été effectuée en milieu acide et à température ambiante, et a permis d'isoler le ligand **H_3L_3** avec un rendement de 75 %, pour un rendement global de 9 % à partir de la 4-nitro-L-phénylalanine.

5 Synthèse de ligands à fonctions mixtes

En vue d'étudier l'influence de la nature d'une seule fonction coordinante sur la sphère de coordination et les propriétés relaxométriques des complexes de lanthanides correspondants, une série de ligands à fonctions mixtes a été synthétisée en exploitant la stratégie de synthèse des triamines à partir de la *N*-benzyléthanolamine (**Figure 2.33**).

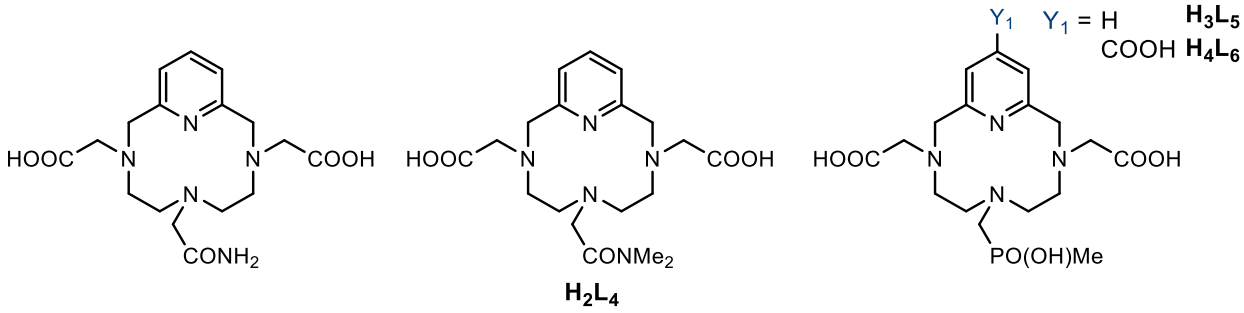


Figure 2.33. Structures des ligands à fonctions mixtes visés

5.1 Préparation des précurseurs triamine

Comme dans le cas des ligands bifonctionnels chélatants portant la fonctionnalisation sur l'azote central, la synthèse de ce type de ligands nécessite dans un premier temps la préparation des triamines portant les différentes fonctions mixtes.

Synthèse du synthon amine centrale portant la fonction phosphinate

Lorsque celle-ci n'est pas disponible commercialement, la synthèse préalable de l'amine portant la fonction pendante centrale est également nécessaire. Ainsi, la préparation du composé **51** est réalisée en deux étapes avec un rendement global de 75 % (**Figure 2.34**). La réaction de la diéthoxyméthylphosphine sur le *N*-(bromométhyl)phtalimide dans le xylène permet d'obtenir le composé **50** avec un rendement de 77 %.[27] La pression réduite et l'utilisation d'un piège par bain d'azote

liquide permet d'extraire le bromure d'éthyle généré en continu et de déplacer l'équilibre réactionnel vers la formation du composé attendu.

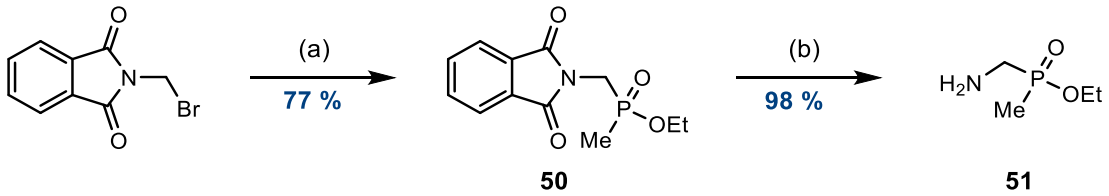


Figure 2.34. Réactions et conditions. **(a)** $P(OEt)_2Me$, xylène, 2h (80 °C, 300 mbar) puis 12h (7 °C, 1 bar) **(b)** Hydrazine, EtOH, 5h, reflux

L'hydrolyse du groupement phtalimide par action de 1,2 équivalents d'hydrazine selon le protocole décrit par Kálmán *et al*. n'a pas permis d'isoler le composé **51** avec une pureté suffisante.[28] Les spectres RMN ^1H des bruts réactionnels montraient, de plus, de nombreux signaux ne correspondant pas au produit de départ dans la région des aromatiques. La modification du nombre d'équivalents d'hydrazine (1,8 au lieu de 1,2 éq) ainsi qu'un temps de chauffage à reflux plus long a finalement permis la déprotection de la fonction amine et l'obtention du produit d'intérêt **51** avec un rendement quasi-quantitatif.

Synthèse des précurseurs triamines à fonctions mixtes

Une fois les synthons de l'amine centrale obtenus, la stratégie usuelle est employée à la synthèse des différentes triamines (**Figure 2.35**). L'étape limitante de cette méthode reste la double condensation du dérivé aminé portant les fonctions latérales **5** sur l'amine secondaire portant la fonction de coordination centrale. La formation des composés **52** et **54** par dialkylation des chlorhydrates de glycinamide et de *N*,*N*-diméthylacétamide disponible commercialement en présence de K_2CO_3 dans l'acétonitrile à reflux s'opère avec des rendements corrects de 72 et 67 % respectivement. Le plus faible rendement de 37 % obtenu pour le composé **56** s'explique par le nombre de purifications par chromatographie sur colonne d'alumine nécessaires pour obtenir le produit désiré avec une pureté supérieure à 95 %. Si les conditions mettant en jeu le carbonate de potassium en tant que base semblent présenter le rendement de dialkylation le plus élevé en RMN ^1H, l'utilisation de DIPEA permet cependant une purification plus aisée (20 %).

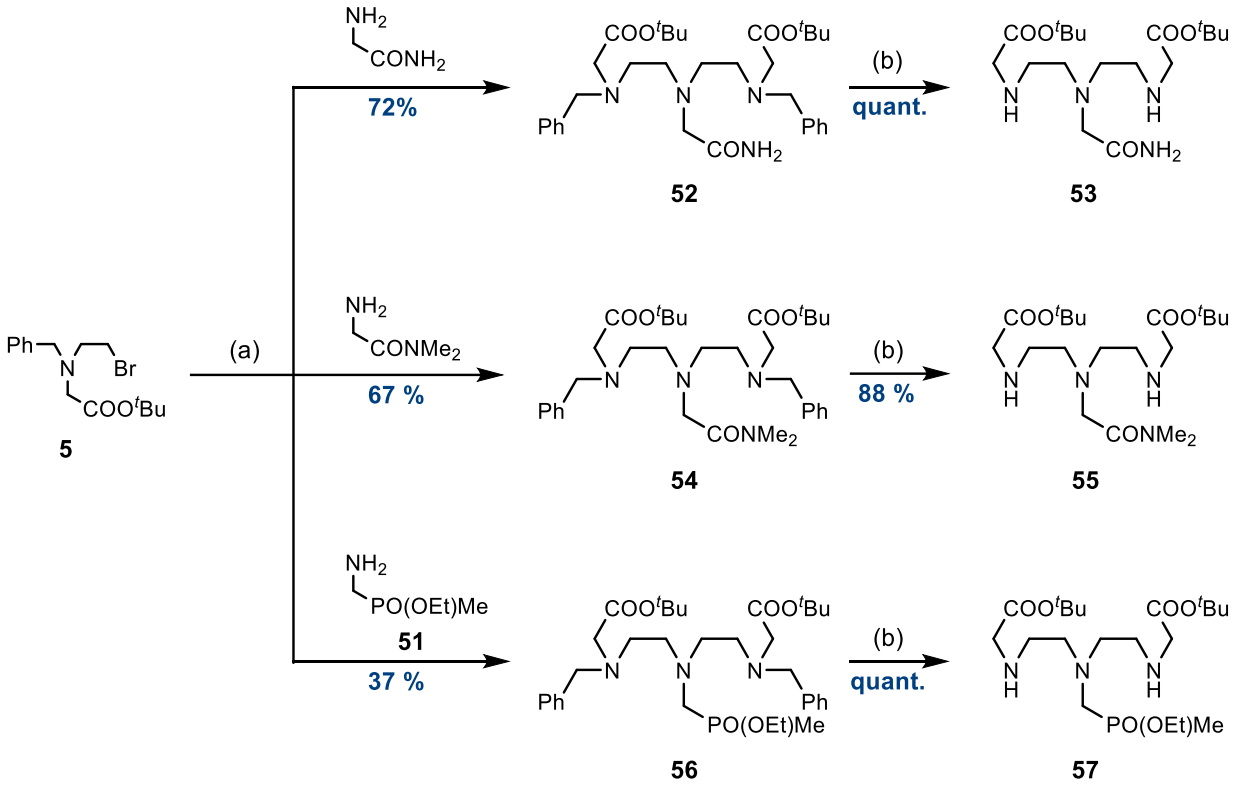


Figure 2.35. Réactions et conditions. **(a)** K_2CO_3, ACN, 24h, reflux **(b)** Pd/C, H_2 (6 bars), MeOH, 12h, T.A.

Le clivage des groupements benzyle par hydrogénation catalysée au palladium sur charbon sous 6 bars d'hydrogène conduit aux polyamines d'intérêt **53**, **55** et **57** avec de très bons rendements allant de 88 à 100 %. Ces précurseurs seront également engagés dans la réaction de macrocyclisation sans purification.

5.2 Macrocyclisation et formation des ligands H_2L_4, H_3L_5 et H_4L_6

La réaction de macrocyclisation entre la 2,6-dibromométhylpyridine et le composé **53** n'a pas permis de conduire à la formation du macrocycle correspondant **58** de manière satisfaisante (**Figure 2.36**).

Malgré la mise en évidence de la formation du composé d'intérêt par spectrométrie de masse sur le brut réactionnel, la purification par chromatographie sur colonne d'alumine ne permet ni d'isoler le produit en quantité suffisante, ni de manière pure. Les sous-produits isolés semblent provenir de réactions de polymérisation puisque de masses élevées ont pu être observées. Bien que celle-ci n'ait

pas été menée, une stratégie pour contourner cette difficulté aurait été la protection préalable du groupement amide.

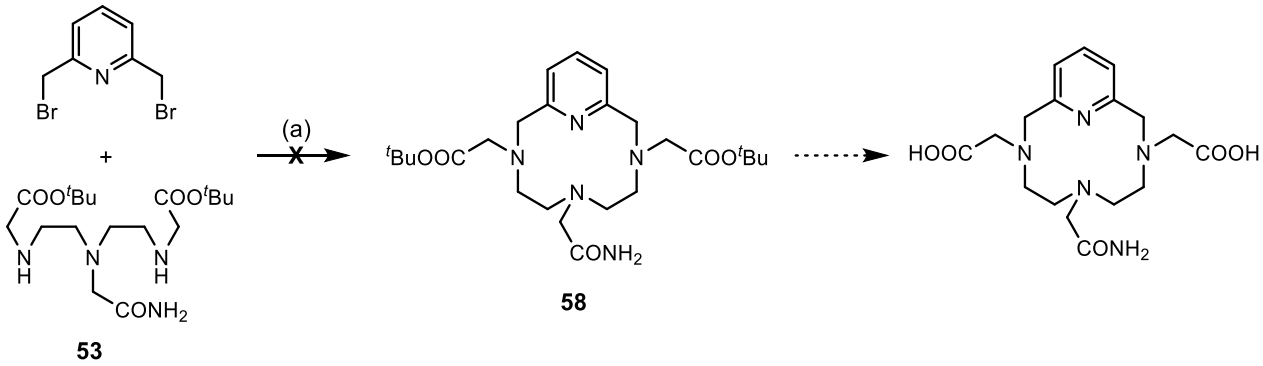


Figure 2.36. Réactions et conditions. **(a)** Na_2CO_3, ACN, 72h, reflux

La condensation du composé **55** sur la 2,6-dibromométhylpyridine dans les mêmes conditions de cyclisation permet d'obtenir le macrocycle protégé **59** avec un rendement satisfaisant de 73 % (**Figure 2.37**). Comme dans le cas du PCTA[12], la RMN ^{1}H du milieu réactionnel brut ne révèle la présence que du complexe de sodium. L'étape de purification par chromatographie sur colonne d'alumine entraîne également la dissociation du complexe et les formes libre et complexée sont isolées en proportion 15/85 respectivement. Le traitement de ce mélange par une solution saturée d'EDTA ne permet cependant pas de n'obtenir que la forme libre.

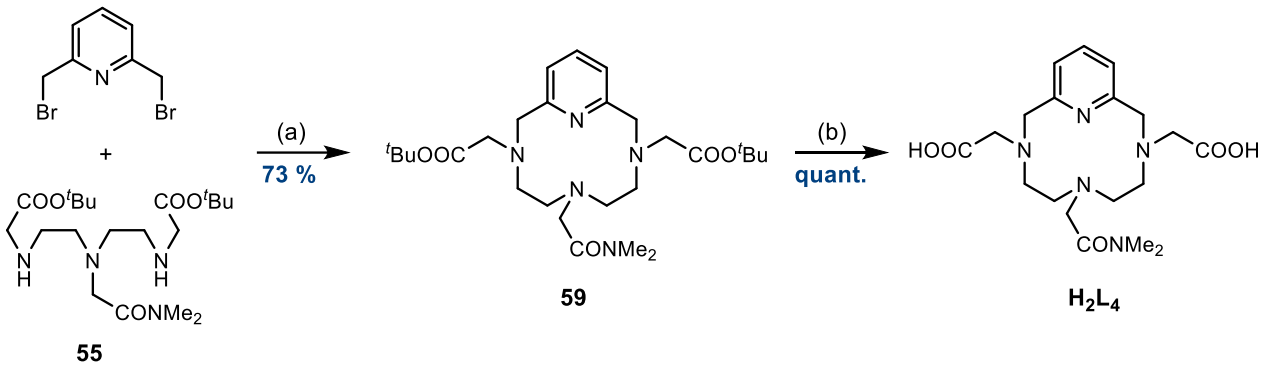


Figure 2.37. Formation du ligand $\mathbf{H_2L_4}$. **(a)** Na_2CO_3, ACN, 72h, reflux **(b)** HCl (1N), 12h, T.A.

La déprotection de l'intermédiaire **59** par un mélange HCl (1N)/DCM conduit à la formation du ligand $\mathbf{H_2L_4}$ avec un rendement quantitatif pour un rendement global de 35 % à partir de la *N*-benzyléthanolamine.

La condensation du composé **57** sur la 2,6-dibromométhylpyridine conduit quant à elle au macrocycle protégé **60** avec un rendement correct de 48 % (**Figure 2.38**). Dans ce cas, la RMN ^{1}H du milieu réactionnel brut révèle la présence des formes libre et complexée. Le passage sur colonne de chromatographie conduit à la décomplexation totale du ligand, et seule la forme non-sodée est observée.

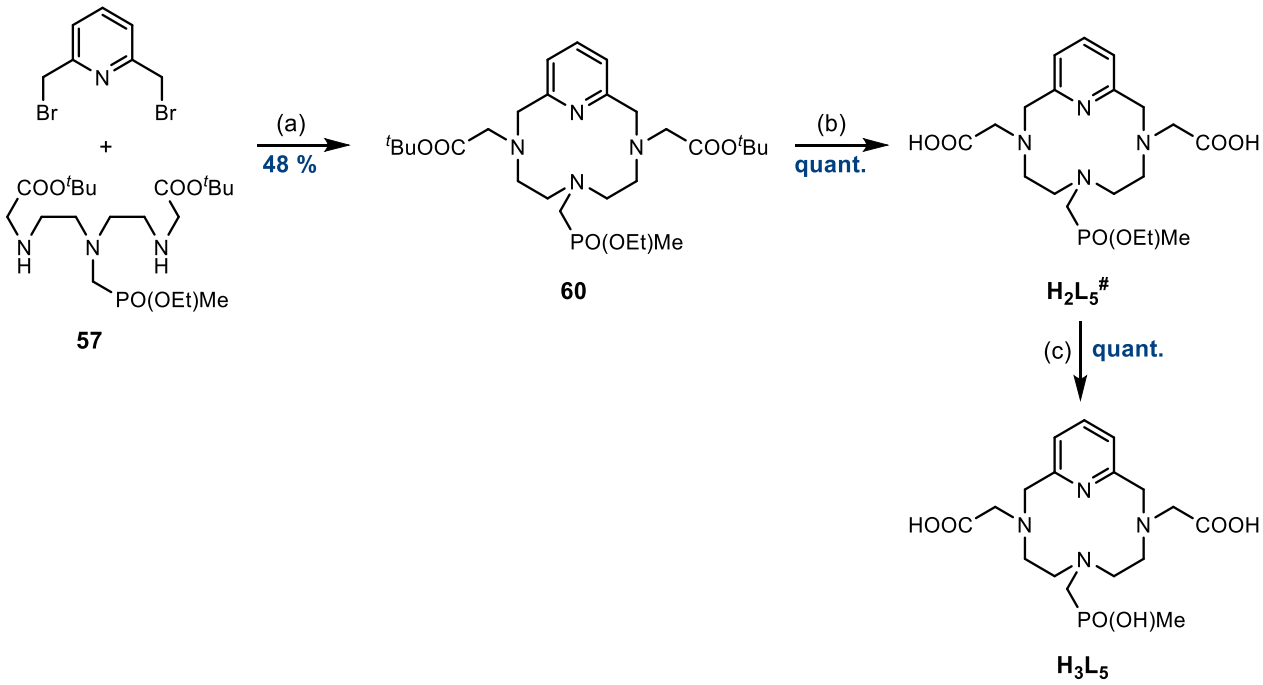
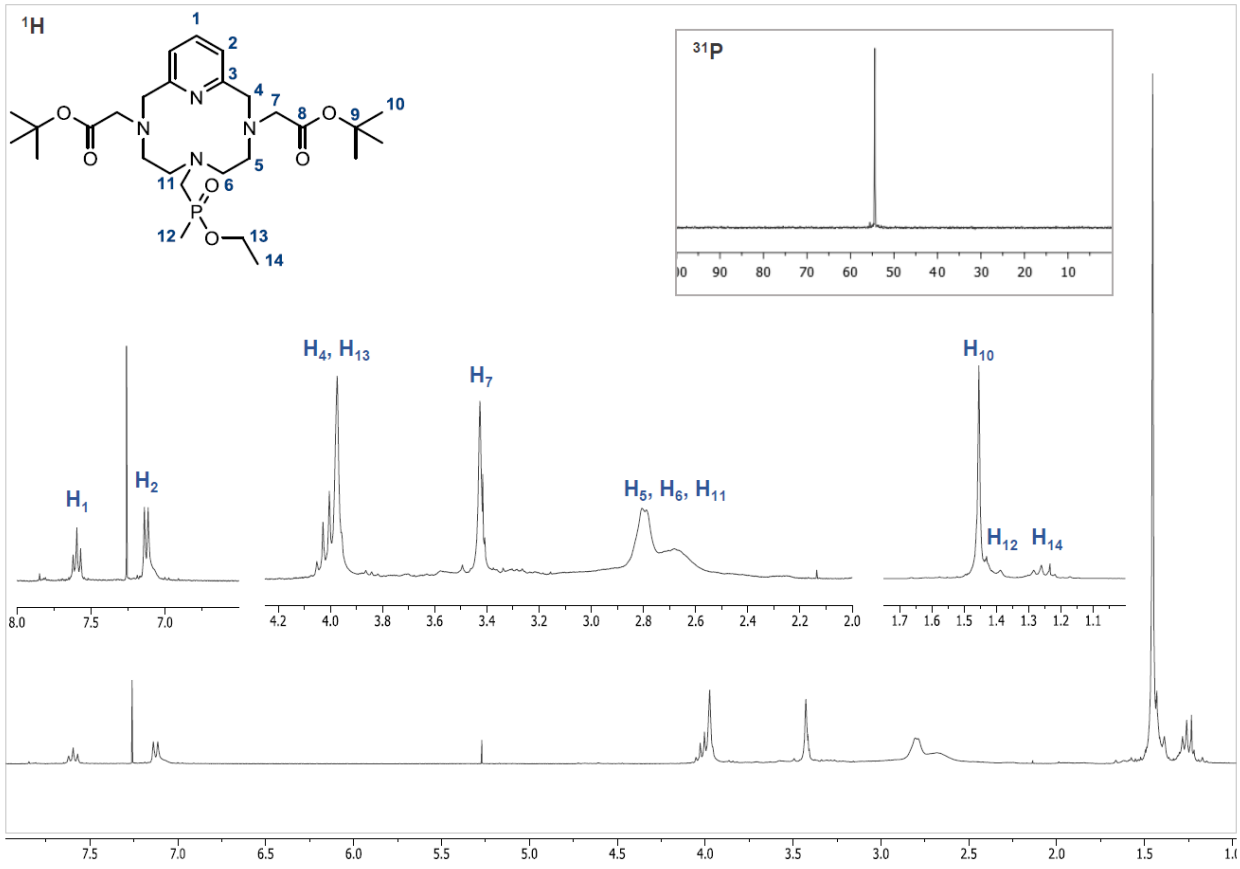


Figure 2.38. Formation du ligand H_3L_5. **(a)** Na_2CO_3, ACN, 24h, reflux **(b)** HCl (1N), 12h, T.A. **(c)** HCl (6N), 12h, reflux

Le traitement du ligand libre par une solution saturée de perchlorate de sodium ne permet pas l'obtention unique de la forme complexée, ainsi seule la forme libre a été parfaitement caractérisée. Du point de vue de la RMN ^{1}H, deux singulets à 3,43 et 3,97 ppm représentent les quatre protons en alpha des fonctions acétate ainsi que les quatre protons pseudo-benzyliques du composé **60**. La présence de ces singulets (et non plus de systèmes AB ou AX) met en évidence une structure macrocyclique non complexée. Le spectre se caractérise également par un dédoublement des signaux des protons en alpha du phosphore expliqué par leur couplage avec l'atome de phosphore ^{31}P de spin S = ½. Bien que celui-ci soit moins visible dans le cas des protons H_{11}, les protons H_{11} et H_{12} apparaissent sous la forme de deux doublets à 2,80 et 1,41 ($^{1}J_{H\text{-}P}$ = 12.8 Hz) ppm respectivement (**Figure 2.39**).



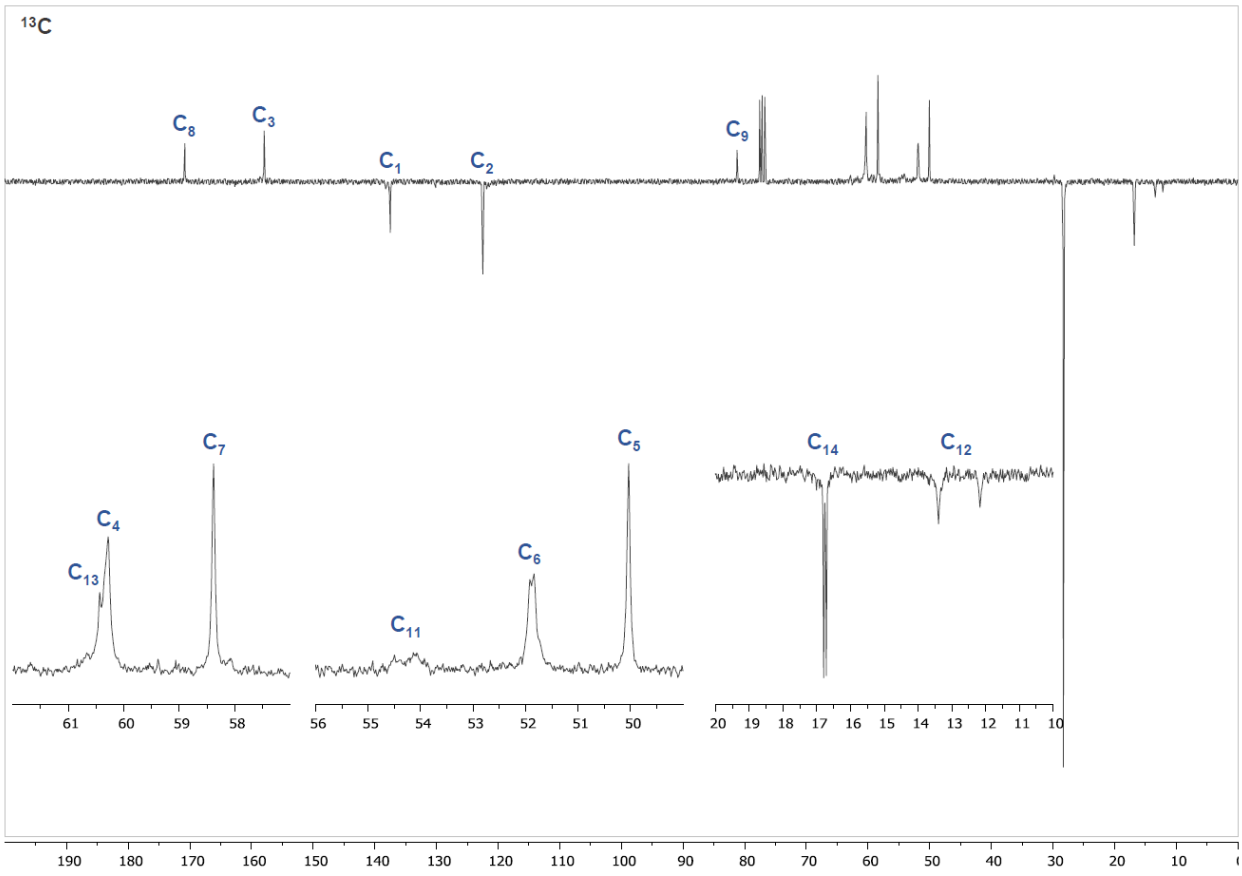


Figure 2.39. Spectres RMN ^{1}H, ^{13}C et ^{31}P du composé **60** ($CDCl_3$, 300 Hz)

Le couplage à l'atome phosphore peut également être observé en RMN du carbone. De la même manière, si le dédoublement est moins visible pour le carbone C_{11} (δ = 54,3 ppm), il est parfaitement résolu dans le cas du carbone C_{12} et est centré sur 12.8 ppm ($^1J_{C\text{-}P}$ = 92.9 Hz). Le spectre RMN ^{31}P du composé **64** apparaît, quant à lui, sous la forme d'un seul pic caractéristique à 54,37 ppm.

La déprotection sélective des groupements ester de *tertio*-butyle par action de l'acide chlorhydrique (1N) permet l'obtention du composé semi-protégé **$H_2L_5^{\#}$**, qui, après hydrolyse du phosphoester d'éthyle par de l'acide chlorhydrique (6N) à reflux, conduit au ligand **H_3L_5** avec un rendement quantitatif. Le rendement global de la synthèse de ce ligand est de 15 % à partir de la *N*-benzyléthanolamine.

Le précurseur triamine **57** a également servi à l'élaboration d'un ligand bifonctionnel chélatant à fonctions coordinantes mixtes (**Figure 2.40**). Ainsi, sa condensation sur le dérivé bisélectrophile issu de l'isonicotinate de méthyle **15** dans les conditions standards de cyclisation conduit au composé protégé **61** avec un rendement de 86 %.

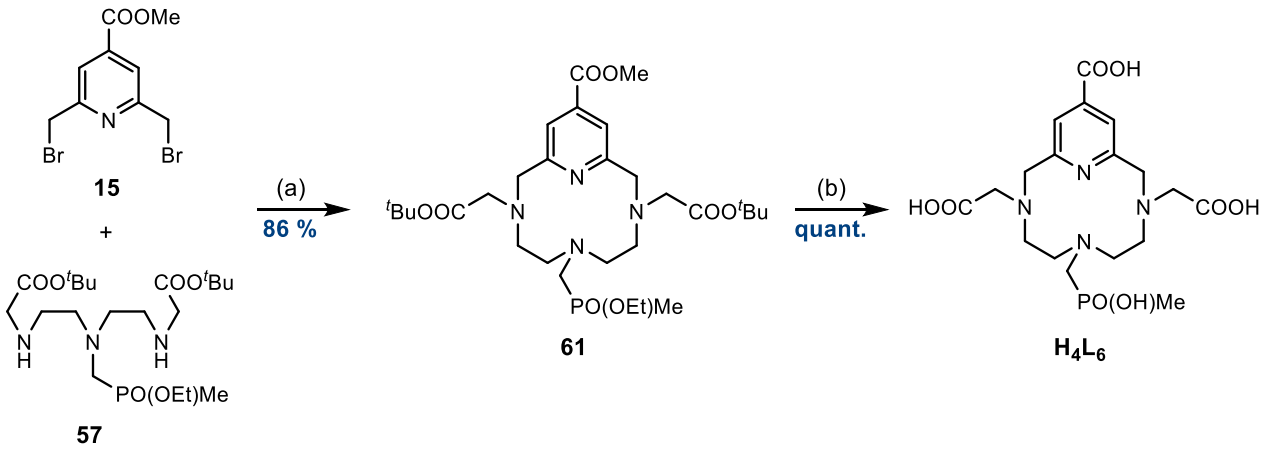


Figure 2.40. Formation du ligand **H_4L_6**. **(a)** Na_2CO_3, ACN, 24h, reflux **(b)** HCl (6N), 12h, reflux

La déprotection des groupements ester de *tertio*-butyle ainsi que du phosphoester d'éthyle par action de l'acide chlorhydrique (6N) à reflux conduit au ligand **H_3L_6** avec un rendement quantitatif pour un rendement global de 26 % à partir de la *N*-benzyléthanolamine.

6 Vers l'amélioration de l'effet d'antenne

Comme évoqué précédemment, si la pyridine permet un transfert efficace de l'énergie nécessaire à la sensibilisation de l'ion lanthanide, sa longueur d'onde d'absorption ainsi que son faible coefficient d'extinction molaire restent des paramètres limitant son utilisation pour des applications biologiques en fluorescence. Pour pallier ces inconvénients, plusieurs alternatives sont alors possibles, telles qu'étendre la conjugaison du noyau pyridine ou coupler ce dernier à un second chromophore répondant favorablement aux critères précédemment cités.

6.1 A partir du noyau pyridine

Le choix de l'antenne s'est orienté selon deux conditions. La première est la présence d'un coefficient d'absorption molaire acceptable à une longueur d'onde d'absorption de 337 nm. Cette longueur d'onde particulière correspond à la longueur d'émission d'un laser à azote, potentielle source excitatrice dans le cadre d'une application bioanalytique. Le second prérequis est la présence d'une unité pyridine au sein même du chromophore, ou d'une fonction réactive permettant son couplage au noyau hétéro-aromatique. Dans ce cadre, deux structures pouvant agir comme des chromophores modèles ont été dégagées (**Figure 2.41**).

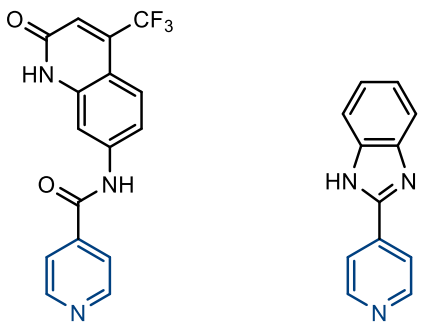


Figure 2.41. Structures des chromophores modèles envisagés

La première propose une antenne fluorée dérivée du carbostyrile couplée à la pyridine, et la seconde présente une extension de conjugaison avec un motif pyridine-benzimidazole. Non disponibles commercialement, ces deux chromophores modèles ont dû être synthétisés. Leur préparation a ainsi deux objectifs distincts : (i) permettre d'évaluer l'efficacité de l'antenne dans son ensemble et (ii), mettre au point les conditions de couplage qui seront par la suite utilisées sur le macrocycle fonctionnalisé.

6.1.1 Synthèse du dérivé PCTA[12]-cs124-CF_3

Synthèse du modèle pyridine-carbostyrile (Py-cs124-CF_3)

La synthèse du chromophore modèle Py-cs124-CF_3 nécessite la préparation préalable du précurseur **62** portant la fonction amine qui sera engagée dans la réaction de couplage. Pour cela, deux voies de synthèse basées sur l'utilisation de la *m*-phénylènediamine et du trifluoroacétoacétate d'éthyle ont été testées (**Figure 2.42**).

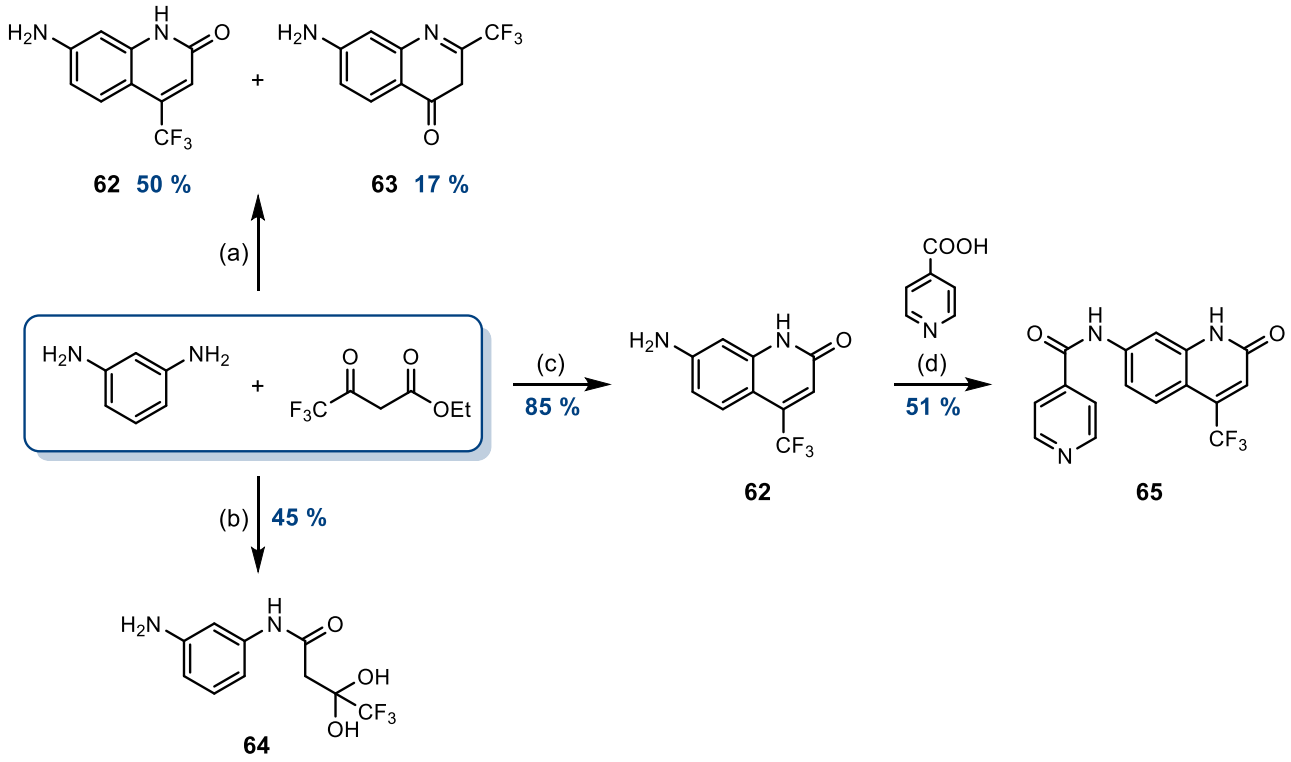


Figure 2.42. Réactions et conditions. **(a)** TsOH, EtOH 36h, reflux **(b)** sans solvant, 24h, 150 °C **(c)** sans solvant, 24h, 200 °C **(d)** CDI, DMF, 76h, 40 °C

La première méthode, décrite par Oeveren *et al*. fait réagir les deux produits de départ en présence d'acide *p*-toluènesulfonique dans l'éthanol à reflux.[29] Malgré un

temps de chauffage plus long (36h au lieu de 8h), la synthèse du composé **62** a été obtenue avec un rendement de 50 % plus faible que celui rapportée dans la publication originale (75 %). La présence du composé **63**, obtenu avec un rendement de 17 % a, de plus, été mise en évidence.

Deux sites d'attaque nucléophile sont en fait possibles sur le β-céto ester fluoré : le groupement cétone, très réactif, et le groupement ester, moins réactif (**Figure 2.43**). Ainsi, l'attaque de l'une des fonctions amine de la *m*-phénylènediamine sur le groupement cétone du trifluoroacétoacétate d'éthyle conduit à la formation du composé cinétique **63**,[30] tandis qu'une attaque sur le groupement ester conduit à la formation du produit thermodynamique attendu **62**.

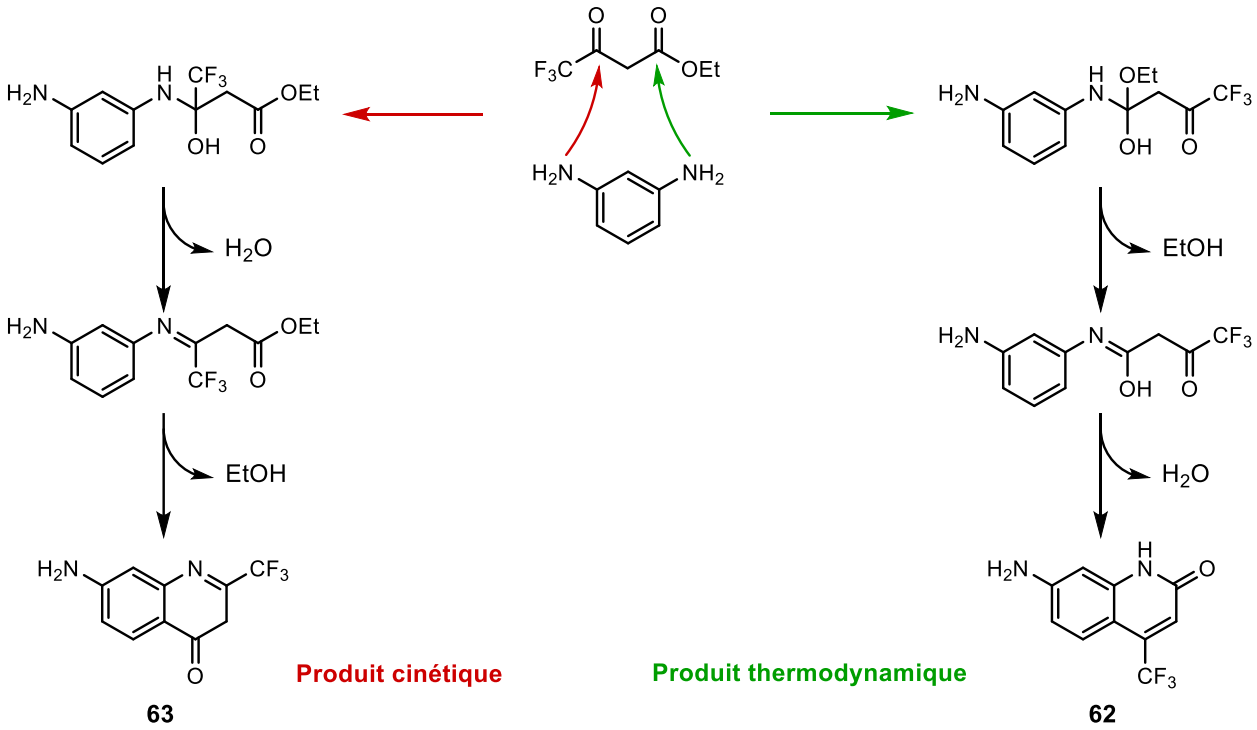


Figure 2.43. Formation des produits cinétique et thermodynamique issus de la condensation de la *m*-phénylènediamine sur le trifluoroacétoacétate d'éthyle

En vue d'améliorer le rendement de formation du composé **62**, un autre protocole, décrit par Kathuria *et al.*, a été reproduit.[31] Ce dernier fait réagir la *m*-phénylènediamine sur le trifluoroacétoacétate d'éthyle sans solvant avec un chauffage à 150 °C, et permet, d'après les auteurs, d'obtenir le composé attendu avec un rendement de 70 %. Ces conditions n'ont cependant pas permis d'obtenir le composé attendu, et seul le composé non cyclisé **64** a été formé avec un rendement de 45 %. Le

milieu réactionnel a finalement été chauffé à 200 °C et après 24h d'agitation, 85 % du produit désiré **62** a pu être obtenu. Un chauffage plus intense permettrait de faciliter l'élimination de la molécule d'eau, force motrice nécessaire à la réaction.

L'étape suivante consiste en le couplage du chromophore **62** sur l'acide isonico-tinique par action de carbonyldiimidazole (CDI) dans le DMF. L'usage d'un tel agent de couplage permet de générer un intermédiaire acide activé *in situ* favorisant la réaction de couplage au détriment de la réaction acido-basique. De ces conditions, le chromophore modèle Py-cs124-CF_3 **65** a été obtenu avec un rendement acceptable de 51 %.

Synthèse du ligand PCTA[12]-cs124-CF_3 (H_3L_7)

Les conditions de couplage utilisées pour la synthèse du modèle Py-cs124-CF_3 ont par la suite été employées, sans succès, sur le macrocycle semi-déprotégé **19** proposant une fonction acide carboxylique aromatique (**Figure 2.44**).

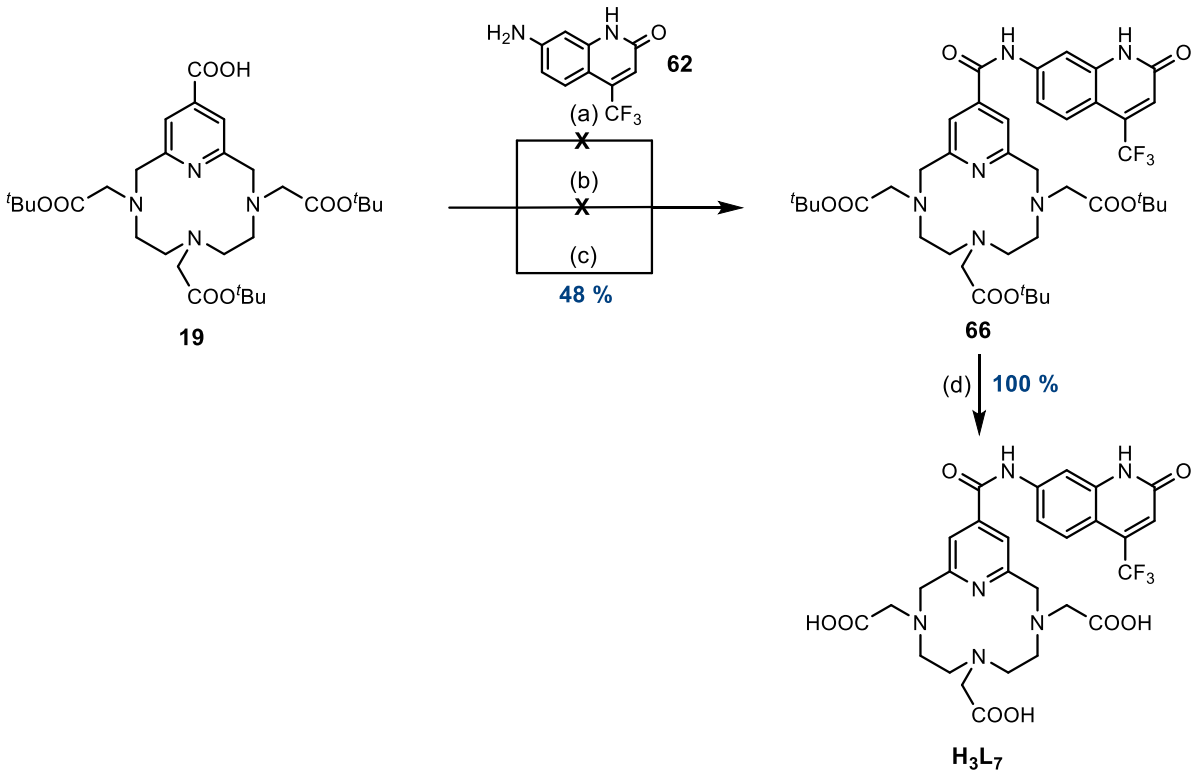


Figure 2.44. Formation du ligand H_3L_7. **(a)** CDI, DMF, 100h, 40 °C **(b)** PyBOP, DIPEA, DCM, 28h, T.A. **(c)** HBTU, TEA, DMSO, 48h, T.A. **(d)** DCM/TFA/TES (5:5:1,8), 24h T.A.

La seconde méthode de couplage à avoir été testée est basée sur l'utilisation de PyBOP (hexafluoro-phosphate de benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidino-

phosphonium) en présence de DIPEA dans le DCM. L'utilisation d'une base permet d'arracher le proton acide du composé **19** et ainsi favoriser sa réaction avec l'agent de couplage. Si des traces de produit de couplage ont pu être isolées, les quantités obtenues ne permettent pas de donner suite à cette stratégie.

La dernière stratégie repose sur l'utilisation de HBTU (hexafluorophosphate de 2-1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium), un autre réactif utilisé en synthèse peptidique, en présence de triéthylamine (TEA) dans le DMSO. Cet agent de couplage fonctionne de façon similaire à ses analogues phosphonium mais contrairement à eux, le HBTU peut bloquer de manière irréversible la fonction amine sous forme de dérivés tétraméthylguanidinium (**Figure 2.45**). Pour éviter cette réaction secondaire, il est nécessaire de générer le carboxylate de la fonction acide avant d'ajouter le réactif de couplage.

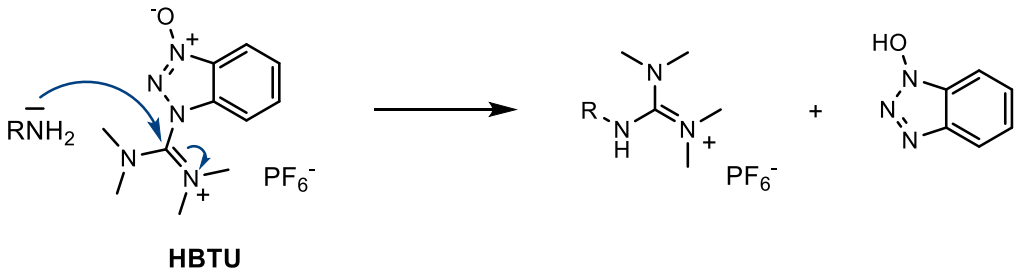


Figure 2.45. Formation de guanidinium par l'utilisation de HBTU. Adapté des publications de Valeur *et al.*[32] et de Carpino *et al.*[33]

Les conditions initiales mettent en présence 3,5 équivalents du couple HBTU/TEA par rapport au macrocycle **19** et au chromophore **62**, introduits de manière stœchiométrique, sous agitation dans le DMSO pendant 24h. Ce protocole n'a cependant permis d'obtenir que 20 % de produit de couplage. Lorsque sept équivalents d'agent de couplage et de base sont engagés et que le temps d'agitation est prolongé, cette méthode de synthèse permet d'obtenir jusqu'à 48 % du macrocycle protégé couplé **66**. Bien que l'influence de la température ait été étudiée lors de cette étape de couplage (réaction conduite à température ambiante ou à reflux), celle-ci ne semble vraisemblablement pas améliorer son rendement.

L'étape de déprotection des fonctions ester de *tertio*-butyle génère la formation du carbocation *tertio*-butyle pouvant conduire à des réactions secondaires en subissant une attaque nucléophile de l'un des deux atomes d'azote présents. L'hydrolyse acide est donc conduite dans un mélange ternaire DCM/acide trifluoroacétique/triéthylsilane (5:5:1,8) où le triéthylsilane joue le rôle de piège à carbocation et permet de conduire au macrocycle PCTA[12]-cs124-CF_3 **H_3L_7** avec un rendement quantitatif.[34]

6.1.2 Synthèse du dérivé PCTA[12]-HBim

La plupart des méthodes de synthèse du benzimidazole et de ses dérivés impliquent la condensation de l'*o*-phénylènediamine sur des composés présentant des fonctions acide carboxylique, ester ou aldéhyde.[35]

Synthèse du modèle pyridine-HBim

Plusieurs stratégies basées sur deux produits de départ différents, l'un proposant une fonction acide aromatique et l'autre une fonction ester de méthyl, ont été employées à la synthèse du modèle pyridine-benzimidazole (Py-HBim) (**Figure 2.46**).

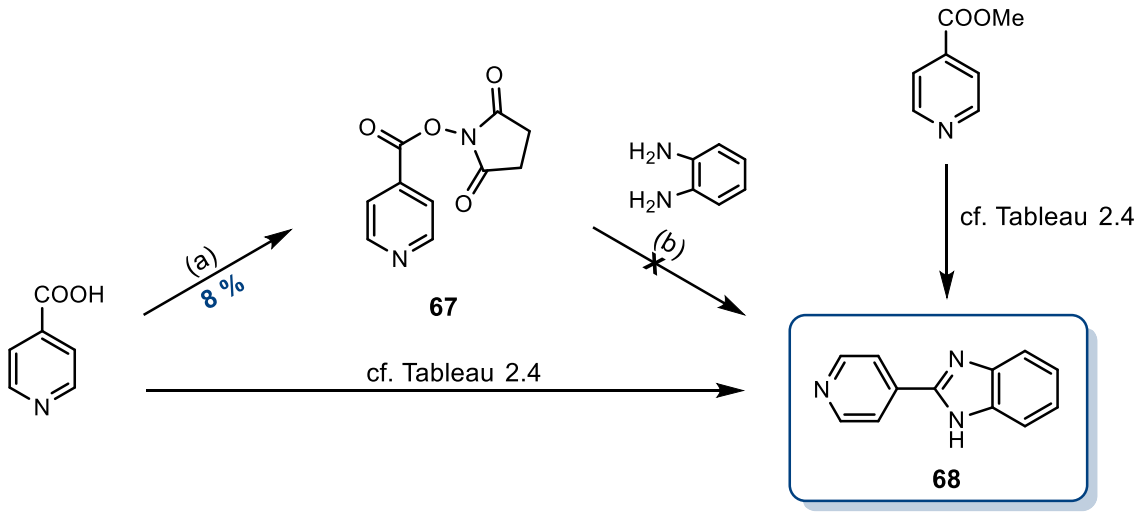


Figure 2.46. Réactions et conditions. **(a)** *N*-hydroxysuccinimide, EDCI, DMF, 2h, 0 °C **(b)** DCM, 240h, T.A. à reflux

La première voie de synthèse repose sur l'activation préalable de l'acide isonicotinique par la formation d'un ester de *N*-hydroxysuccinimide. Cette étape

s'opère par action de la *N*-hydroxysuccinimide en présence d'EDCI (1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide) dans le DMF. Bien qu'un rendement de 60 % ait été rapporté dans la publication de Wood *et al*, la formation du composé **67** n'a pu être reproduite avec un rendement aussi satisfaisant.[36]

La fraction de produit récupérée par extraction a tout de même été engagée dans la réaction de couplage avec l'*o*-phénylènediamine dans le DCM, mais malgré huit jours d'agitation à température ambiante, le suivi CCM montre la présence majoritaire du produit de départ. Après trois jours de reflux supplémentaires des traces de produit attendu sont observées, cependant la présence de produit de départ et la formation de produit mono-couplé restent majoritaires. Cette voix d'accès a donc été abandonnée.

Deux autres méthodes à partir de l'acide isonicotinique ont été expérimentées pour la synthèse du modèle pyridine-benzimidazole **68**. La première est basée sur l'utilisation d'Amberlyst-15, une résine capable d'agir en tant que catalyseur acide et dont l'élimination est aisée puisqu'elle s'effectue par simple filtration du milieu réactionnel.[37] Cette stratégie ne permet cependant de former le produit de couplage que sous forme de traces et malgré deux modes de chauffage différents, seuls les produits de départ sont majoritairement récupérés (**Tableau 2.4, Entrées 1 et 2**).

La seconde méthode propose une synthèse one-pot assistée par micro-ondes mettant en jeu l'acide isonicotinique et l'*o*-phénylènediamine en présence de triphénylphosphite dans la pyridine.[38] Si le composé Py-HBim **68** a pu être isolé (pour 40 % dans la publication originale) avec un rendement de 20 %, la purification par colonne de chromatographie sur gel de silice est difficile et ne permet pas d'obtenir le composé d'intérêt avec une pureté supérieure à 95 % (**Entrée 3**).

Suite à ces résultats décevants, l'utilisation d'un autre produit de départ, l'isonicotinate de méthyle, a été envisagée. La formation directe de benzimidazoles à partir d'un ester et d'une diamine nécessite un agent de couplage capable d'agir à la fois comme un acide de Lewis pour favoriser la formation du lien amide, et comme un agent déshydratant pour faciliter la formation du cycle benzimidazole. L'utilisation de

DABAL-Me_3 (bis(triméthylaluminum)-1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane), source de triméthyl-aluminium stable à l'air, a récemment été reportée dans l'optique de répondre à de telles conditions.[39]

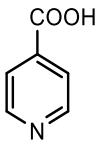
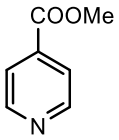
Produit de départ	Entrée	Réactif	Solvant	Chauffage	Durée	%	Réf.
	1	Amberlyst-15	H_2O	Ultrasons	3h	Traces	37
	2	Amberlyst-15	H_2O	Reflux T.A.	2h 12h	Traces	37
	3	$P(OPh)_3$	Pyridine	Micro-ondes 160 °C 140 °C	30 min 1h	20 % (*)	38
	4	DABAL.Me_3 Traitement HCl	Toluène	40 °C 110 °C	30 min 16h	Traces	39
	5	DABAL.Me_3 Traitement HCl	THF	70 °C	120h	36 % (*)	39
	6	DABAL.Me_3 Sans traitement	THF	70 °C	120h	15 % (*)	39

Tableau 2.4. Conditions réactionnelles utilisées pour l'obtention du composé **68** (*) pureté < 95 % en produit isolé

Le premier essai de couplage est mené dans les conditions réactionnelles optimales de la publication de référence. Ainsi, l'isonicotinate de méthyle est mis en présence d'un excès d'*o*-phénylènediamine et de DABAL-Me_3 dans le toluène, et la réaction est conduite à 40 °C pendant trente minutes puis à reflux pendant 16h. Après traitement acide (précipitation des sels d'aluminium en excès) et purification sur colonne de chromatographie, seules des traces de produit attendu sont observées (**Entrée 4**). En faisant varier la nature du solvant (utilisation de THF à la place de toluène), ces conditions permettent d'obtenir 36 % de produit de couplage **68** après cinq jours de reflux avec une pureté inférieure à 95 % en produit isolé (**Entrée 5**). La présence du produit mono-couplé est également observée. En raison de l'extraction difficile du composé pyridine-benzimidazole, le même protocole, cette fois-ci sans traitement acide a été réalisé, mais seulement 15 % du composé attendu a pu être isolé par chromatographie sur colonne (**Entrée 6**).

Synthèse du ligand PCTA[12]-HBim (H_3L_8)

Bien que les conditions ne soient pas optimales et ne permettent pas d'atteindre les rendements rapportés par la littérature, un premier essai de couplage mettant en jeu le macrocycle fonctionnalisé par un ester de méthyle et le réactif DABAL-Me_3 a tout de même été réalisé (**Figure 2.45**).

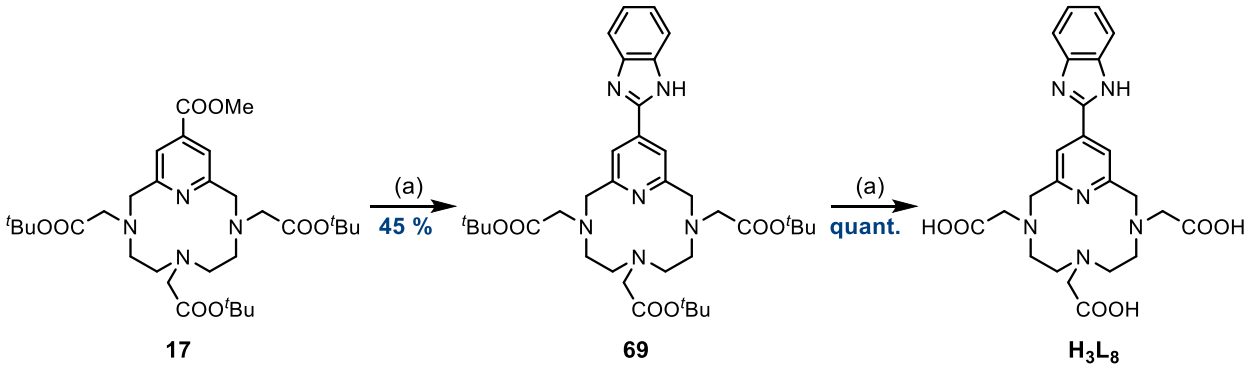


Figure 2.47. Formation du ligand $\mathbf{H_3L_8}$. **(a)** *o*-phénylènediamine, DABAL.Me_3, THF, 16h, reflux **(b)** DCM/TFA/TES (5:5:1,8), 24h T.A.

Ainsi, l'*o*-phénylènediamine est mise en présence d'un excès de composé **17** et de DABAL-Me_3 dans du THF, et l'ensemble est porté à reflux pendant 16h. En raison de la présence des groupements protecteurs ester de *tertio*-butyle sensibles à un milieu acide, le traitement du brut réactionnel par une solution saturée de sels de Rochelle a été préféré au traitement à l'acide chlorhydrique initial (1N).[40] La purification par chromatographie sur colonne d'alumine s'est cependant révélée être difficile puisque le produit de couplage présente sensiblement la même polarité que le macrocycle de départ **17**. Pour faciliter l'étape de purification, le macrocycle et l'*o*-phénylènediamine sont finalement tous deux introduits en quantité stœchiométrique. La réaction est arrêtée lorsque que le suivi par chromatographie sur couche mince indique que l'intégralité du produit de départ macrocyclique **17** est consommé. Le produit de couplage protégé **69** a finalement pu être obtenu avec un rendement de 45 %.

L'étape de déprotection des fonctions ester de *tertio*-butyle reprend les conditions expérimentales utilisées pour l'obtention du macrocycle PCTA[12]-cs124-CF_3 $\mathbf{H_3L_7}$, et est donc conduite dans le mélange ternaire DCM/acide trifluoroacétique/triéthylsilane (5:5:1,8). Ce protocole permet de conduire au macrocycle PCTA[12]-HBim $\mathbf{H_3L_8}$ avec un rendement quantitatif.

6.2 Synthèse de ligands à noyau(x) phénol : H_4L_9 et H_8L_{10}

La dernière série de ligands à avoir été synthétisée repose sur des structures à 12 et 24 chaînons présentant un ou deux noyaux phénol remplaçant l'unité hétéroaromatique pyridine du PCTA[12] (**Figure 2.48**). Initialement, deux stratégies ont été envisagées en vue de l'obtention du ligand **H_4L_9** : la première *via* la réaction de Mannich, et la seconde basée sur l'alkylation directe du précurseur tri-alkylé sur le dérivé disubstitué phénol. Cette dernière méthode a cependant permis l'obtention conjointe des ligands **H_4L_9** et **H_8L_{10}** lors de la réaction de macrocyclisation, de structures monomère et dimère respectivement.

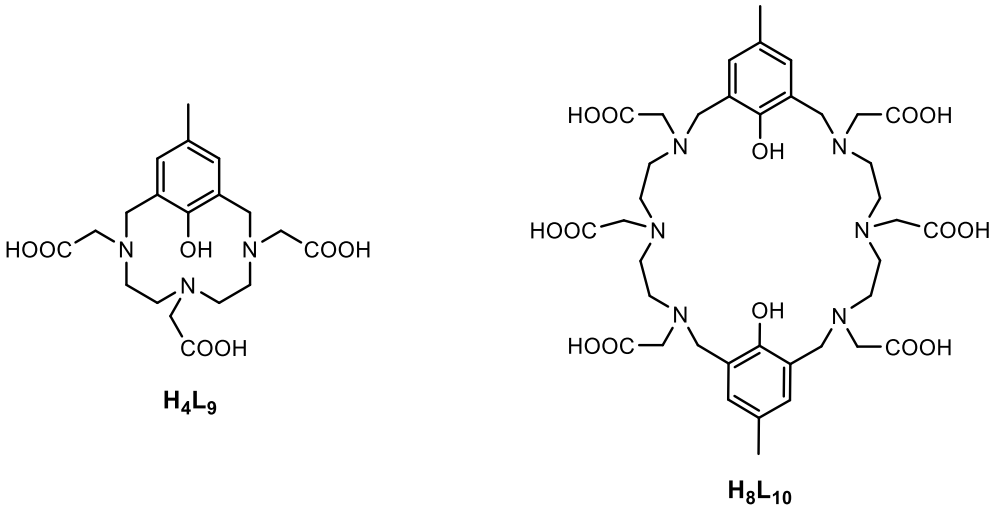


Figure 2.48. Structures des ligands à noyau(x) phénol

Par la réaction de Mannich

La séquence de double aminométhylation entre un dérivé iminodiacétate et le paraformaldéhyde sous la forme d'une réaction de Mannich a été employée de manière efficace pour la synthèse d'analogues acycliques du ligand **H_4L_9** (**Figure 2.48**).[41,42]

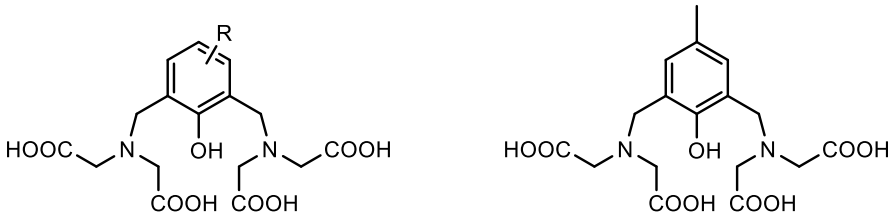


Figure 2.49. Structures acycliques possédant un noyau phénol

Dans cette optique, les premiers essais de macrocyclisation visant l'obtention de ce ligand ont été basés sur la réaction entre le précurseur polyamine tri-alkylé **3** précédemment synthétisé, et le *p*-crésol (**Figure 2.50**). Toutefois, cette méthode ne permet pas de former le composé d'intérêt, et seul le composé acyclique intermédiaire a pu être isolé.

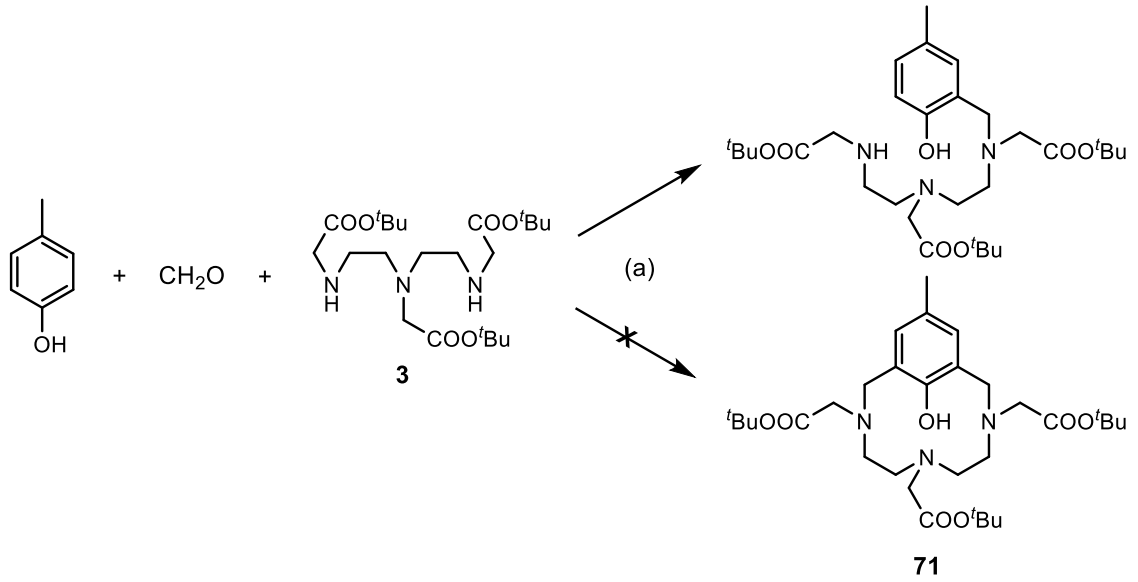


Figure 2.50. Synthèse du ligand $\mathbf{H_4L_9}$ par la réaction de Mannich. **(a)** MeOH, 5h, reflux

En voulant accéder à un macrocycle à douze chaînons dérivés du PCTA[12], Aime *et al*. ont rapporté les mêmes observations lors de l'utilisation de la 3-hydroxypyridine au lieu du *p*-crésol (**Figure 51**).[43] Dans leur cas, le manque de nucléophilie de l'hétérocycle de départ empêcherait la réaction de double aminométhylation.

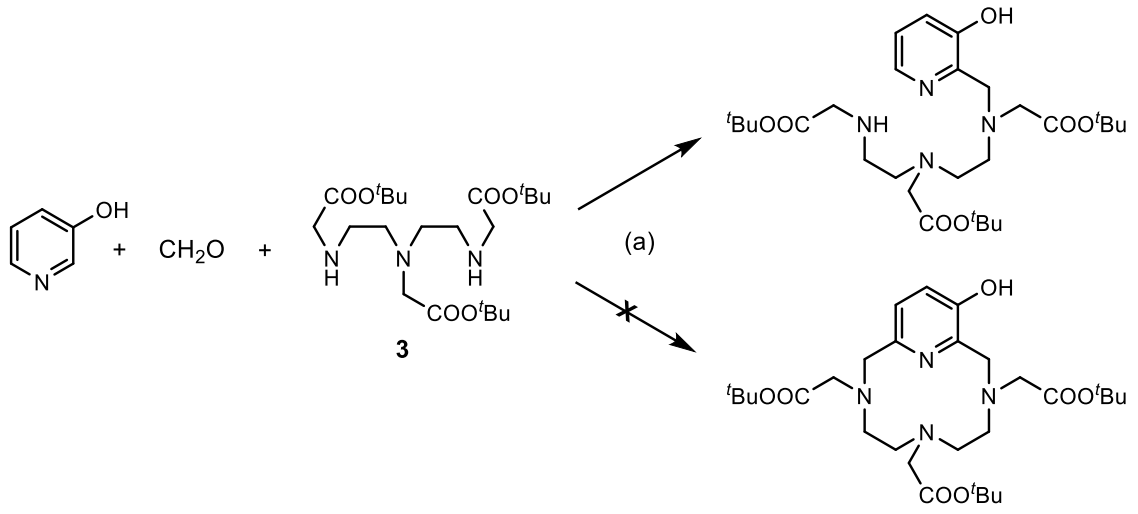


Figure 2.51. Réactions et conditions.[44] **(a)** EtOH, reflux

Par la séquence « d'alkylation/cyclisation »

Les précurseurs macrocycliques protégés des ligands **H_4L_9** et **H_8L_{10}** ont donc été synthétisés *via* la séquence « d'alkylation/cyclisation » développée au laboratoire. La plateforme hétéroaromatique **70** a d'abord été obtenue en une seule étape par action de l'acide bromhydrique à 33 % dans l'acide acétique sur le 2,6-bishydroxyméthyl-4-méthylphénol avec un rendement de 71 % (**Figure 2.52**).[44]

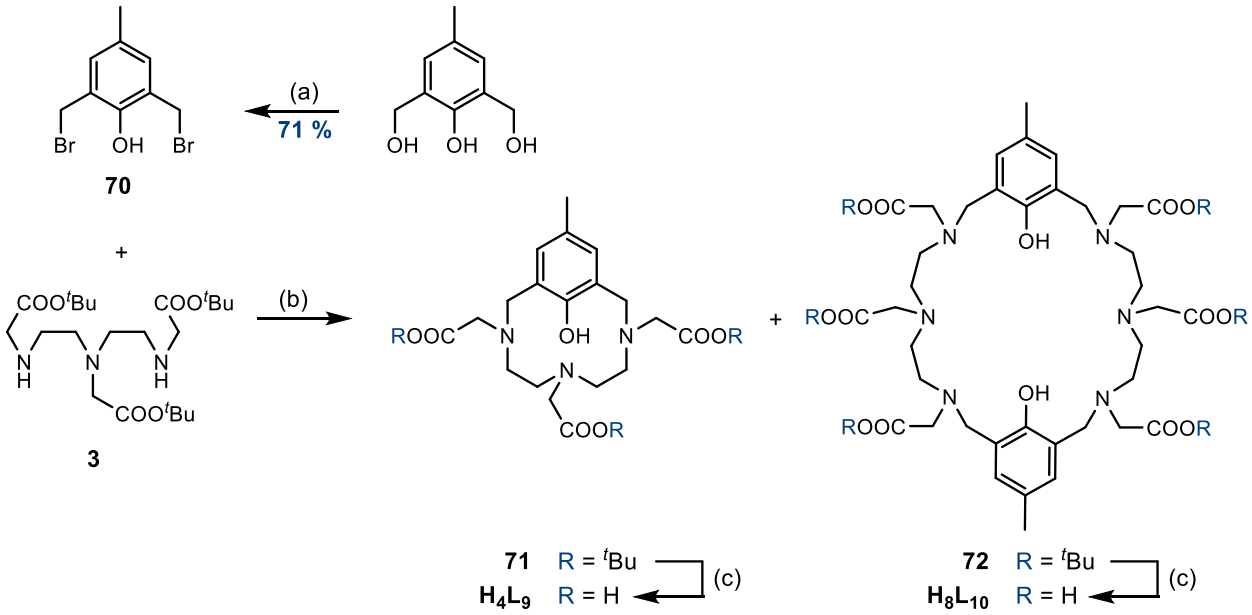


Figure 2.52. Formation des ligands **H_4L_9** et **H_8L_{10}**. **(a)** HBr (33 %)/AcOH, 0,1h, T.A. **(b)** Na_2CO_3, ACN, 16h, reflux **(c)** HCl (2N), 12h, T.A.

La condensation de la polyamine **3** sur le dérivé **70** en présence de Na_2CO_3 dans l'acétonitrile à reflux conduit à la formation conjointe des macrocycles **71** et **72**. Une analyse par RMN ^{1}H DOSY a été réalisée sur le brut réactionnel de l'étape de cyclisation. Cette technique permet de séparer virtuellement les signaux RMN des molécules dans le solvant en fonction de leur vitesse de diffusion. Ainsi, plus une molécule aura une masse moléculaire élevée, plus son coefficient de diffusion sera faible. Bien que la stratégie employée eût initialement pour but la synthèse unique du précurseur **71**, cette expérience montre la présence de deux composés de coefficients de diffusion respectifs 710 et 560 $\mu m^2.s^{-1}$ dans ces conditions de réaction (**Figure 2.53**).

Ce résultat est confirmé en spectroscopie de masse en mode électrospray positif, mettant en évidence la formation du monomère à 12 chaînons **71** (m/z = 578,4, 100 %) et du dimère à 24 chaînons **72** correspondant (m/z = 1155,7, 100 %).

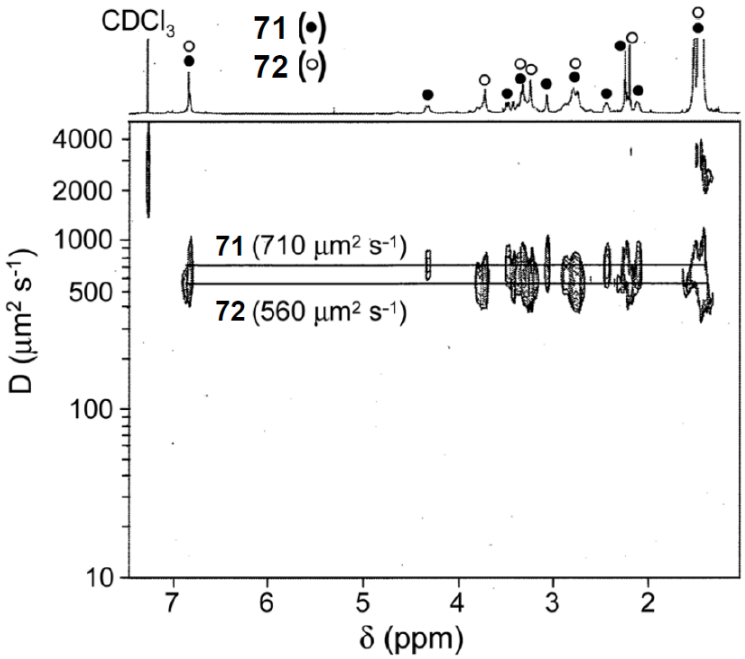


Figure 2.53. Spectre RMN ^{1}H DOSY du milieu réactionnel brut de l'étape de cyclisation conduisant aux composés **71** et **72**

Après purification par chromatographie sur colonne d'alumine, les composés **71** et **72** ont pu être isolés avec des rendements respectifs de 31 % et 55 %. Différentes bases carbonatées ont également été testées pour cette réaction de cyclisation. Dans ce cas, non seulement la nature du cation de la base employée va influencer le rendement global de cyclisation, mais il va également orienter la réaction vers la formation de monomère ou de dimère (**Tableau 2.5**).

Ainsi, l'emploi de carbonate de lithium, dont le cation alcalin est plus petit, privilégiera la formation du macrocycle monomérique **71**. L'utilisation d'autres bases alcalines (K_2CO_3 ou $CsCO_3$) conduit à la formation majoritaire du dimère **72** mais favorise également les réactions secondaires, impactant alors le rendement global de la réaction de macrocyclisation.

Base	$R_{monomère}$	$R_{dimère}$
Li_2CO_3	63 %	23 %
Na_2CO_3	31 %	55 %

Tableau 2.5. Influence de la base sur l'orientation monomère/dimère

Les deux macrocycles à 12 et 24 chaînons ont des signatures bien distinctes en RMN du proton (**Figure 2.54**). La présence d'un système AX (δ = 4,32 et 3,47 ppm, *J* = 12,9 Hz) correspondant aux protons pseudo-benzyliques et d'un système AB (δ = 4,32 et 3,47 ppm, *J* = 16,8 Hz) associé aux protons acétiques sur le spectre du composé **71** met en évidence la rigidité de la structure monomérique. A l'opposé, le spectre du composé **72** ne montre que quatre séries de signaux pour les protons méthyléniques suggérant une structure plus flexible.

L'hydrolyse des fonctions ester de *tertio*-butyle par action de l'acide chlorhydrique (2N) pendant une nuit à température ambiante permet finalement d'obtenir les ligands $\mathbf{H_4L_9}$ et $\mathbf{H_8L_{10}}$ avec des rendements de 92 et 85 % respectivement.

A titre d'exemple, le chromatogramme UPLC obtenu par détection UV-visible en phase HILIC ainsi que le spectre de masse Electrospray en mode positif du macrocycle $\mathbf{H_4L_9}$ sont présentés ci-après afin d'attester de la pureté analytique des ligands (**Figure 2.55**).

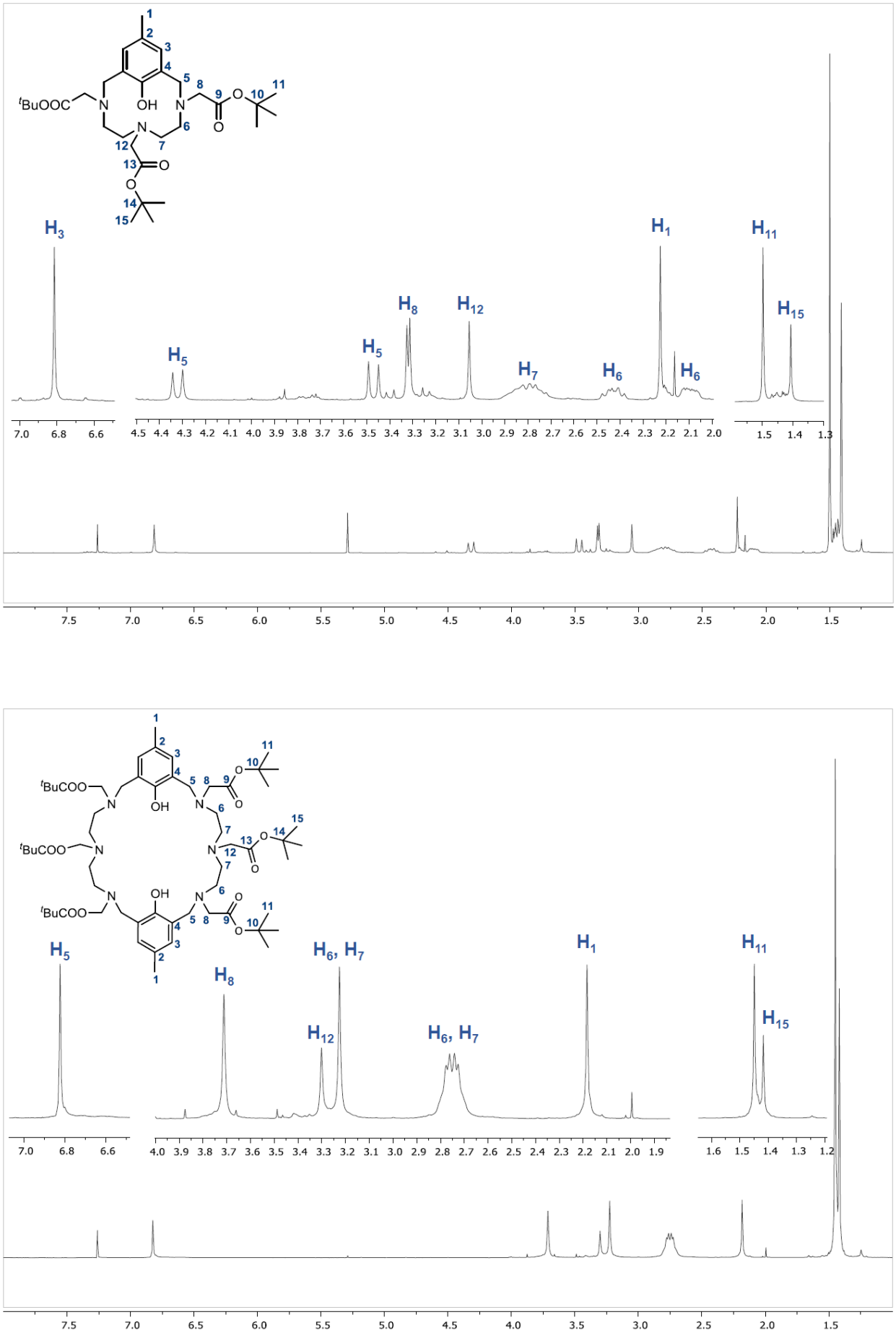


Figure 2.54. Spectres RMN ^{1}H des composés **71** et **72** ($CDCl_3$, 300 MHz)

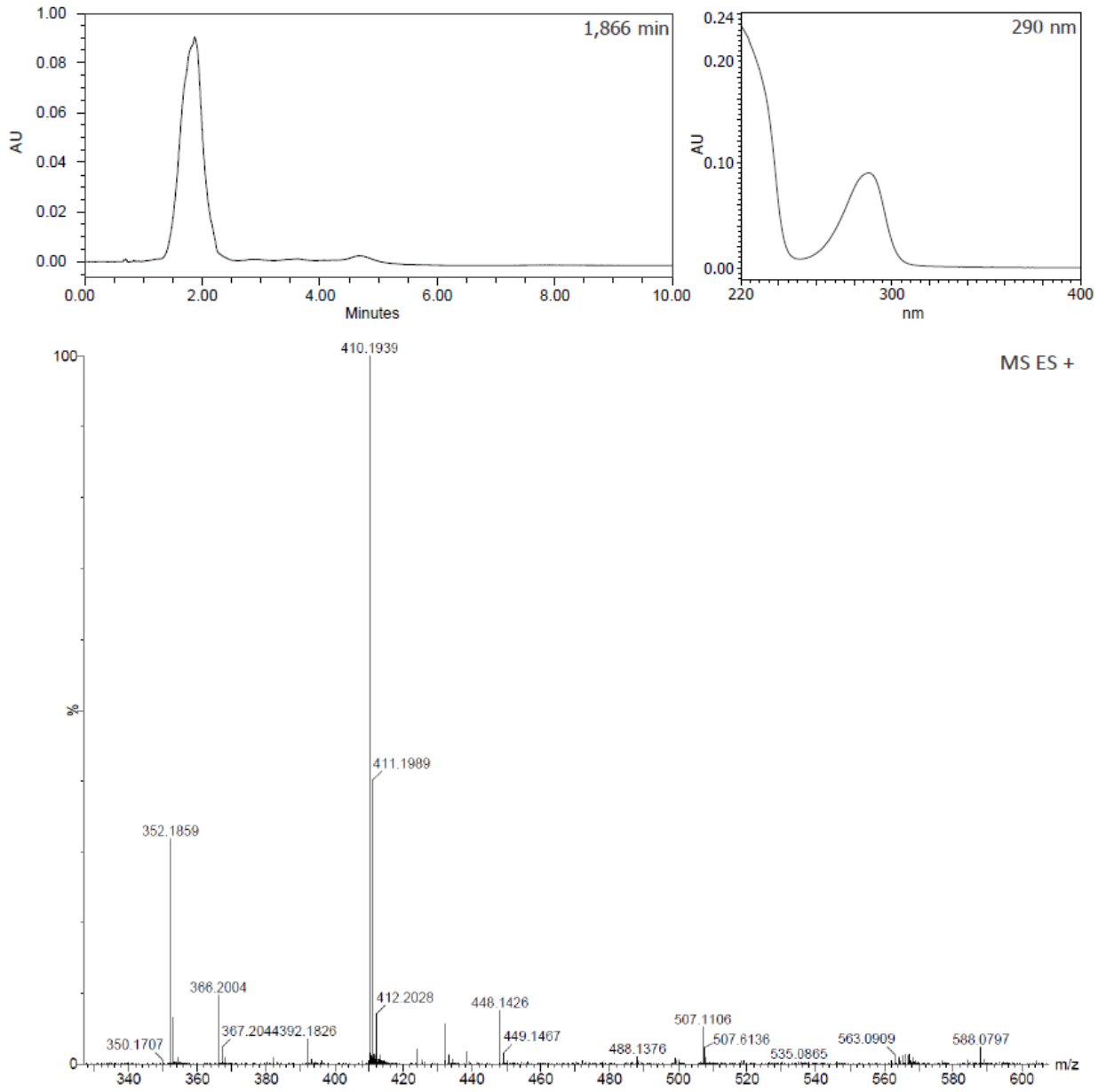


Figure 2.55. Chromatogramme UPLC-HILIC (détection UV-visible) et spectre de masse du ligand **H_4L_9**. Conditions : colonne Acquity BEH HILIC (1,7 µm 2,1x100mm), 0,4 mL/min, gradient d'élution avec solvant A = H_2O (0,1 % HCOOH, pH = 2) et solvant B = ACN, A:B de 5:95 à 50:50 (7 min), stabilisation 50:50 (3 min), et rinçage de 50:50 à 5:95 (0,5 min)

En conclusion, plusieurs séries de ligands ont pu être synthétisées par la méthodologie développée au laboratoire. L'évaluation de leurs propriétés photophysiques et relaxométriques fera l'objet du prochain chapitre.

7 Références

[1] Galaup, C.; Couchet, J.-M.; Bedel, S.; Tisnès, P.; Picard, C. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (6), 2274.

[2] Nasso, I.; Galaup, C.; Havas, F.; Tisnès, P.; Picard, C.; Laurent, S.; Elst, L. Vander; Muller, R. N. *Inorg. Chem.* **2005**, *44* (23), 8293.

[3] Galaup, C.; Couchet, J. M.; Picard, C.; Tisnès, P. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42* (36), 6275.

[4] Price, E. W.; Cawthray, J. F.; Bailey, G. A.; Ferreira, C. L.; Boros, E.; Adam, M. J.; Orvig, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (20), 8670.

[5] Durrieu M. P. Mémoire de DEA Chimie des Biomolécules et Applications, Université Paul Sabatier, **2004**

[6] Pickersgill, I. F.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **2000**, *65* (13), 4048.

[7] Chong, H.; Ma, X.; Lee, H.; Bui, P.; Song, H. A.; Birch, N. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (7), 2208.

[8] Bechara, G. Ligands macrocycliques d'ions Lanthanide : Synthèse et évaluation comme marqueurs luminescents, **2010.**

[9] Koullourou, T.; Natrajan, L. S.; Bhavsar, H.; Pope, S. J. A.; Feng, J.; Narvainen, J.; Shaw, R.; Scales, E.; Kauppinen, R.; Kenwright, A. M.; Faulkner, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (7), 2178.

[10] Cabezon, B.; Cao, J.; Raymo, F. M.; Stoddart, J. F.; White, A. J. P.; Williams, D. J. *Chem. Eur. J.* **2000**, *6* (12), 2262.

[11] Aime, S.; Botta, M.; Geninatti Crich, S.; Giovenzana, G. B.; Jommi, G.; Pagliarin, R.; Sisti, M. *Inorg. Chem.* **1997**, *36* (14), 2992.

[12] Du Preez, J. G. H.; Wentzel, M.; Knoetze, S., **2012**, PCT WO 2012/153253 A2.

[13] Bouzide, A.; LeBerre, N.; Sauvé, G. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42* (50), 8781.

[14] Swamy, K. C. K.; Kumar, N. N. B.; Balaraman, E.; Kumar, K. V. P. P. *Chem. Rev.* **2009**, 2551.

[15] But, T. Y. S.; Toy, P. H. *Chem. Asian J.* **2007**, *2* (11), 1340.

[16] Hovinen, J. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45* (29), 5707.

[17] Lincoln, K. M.; Gonzalez, P.; Richardson, T. E.; Julovich, D. A; Saunders, R.; Simpkins, J. W.; Green, K. N. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (10), 2712.

[18] Scrimin, P.; Tecilla, P.; Tonellato, U.; Vendrame, T. *J. Org. Chem.* **1989**, *54* (25), 5988.

[19] Sharma, A.; Ramos-Tomillero, I.; El-Faham, A.; Nicolas, E.; Rodriguez, H.; de la Torre, B. G.; Albericio, F. *Chemistry Open* **2017**, *6* (2), 168.

[20] Skaddan, M. B.; Katzenellenbogen, J. A. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10* (1), 119.

[21] Horváth, G.; Rusa, C.; Köntös, Z.; Gerencsér, J.; Huszthy, P. *Synth. Commun.* **1999**, *29*, 3719.

[22] Wuts, P. G. M.; Greene, T. W. *Greene's protective groups in organic synthesis*, Wiley-Interscience, **2007**.

[23] Constant, C.; Albert, S.; Zivic, N.; Baczko, K.; Fensterbank, H.; Allard, E. *Tetrahedron* **2014**, *70* (18), 3023.

[24] Ager, D. J.; Babler, S.; Erickson, R. A.; Froen, D. E.; Kittleson, J.; Pantaleone, D. P.; Prakash, I.; Zhi, B. *Org. Process Res. Dev.* **2004**, *8*, 72.

[25] Chakravarty, R.; Chakraborty, S.; Dash, A. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2014**, *57* (2), 65.

[26] Siaugue, J.-M.; Segat-Dioury, F.; Favre-Réguillon, A.; Madic, C.; Foos, J.; Guy, A. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41* (39), 7443.

[27] Popoff, I. C.; Huber, L. K.; Block, B. P.; Morton, P. D.; Riordan, R. P. *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 2898.

[28] Kálmán, F. K.; Woods, M.; Caravan, P.; Jurek, P.; Spiller, M.; Tircsó, G.; Király, R.; Brücher, E.; Sherry, A. D. *Inorg. Chem.* **2007**, *46* (13), 5260.

[29] Van Oeveren, A.; Pio, B. A.; Tegley, C. M.; Higuchi, R. I.; Wu, M.; Jones, T. K.; Marschke, K. B.; Negro-Vilar, A.; Zhi, L. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (6), 1523.

[30] Sloop, J. C. *J. Phys. Org. Chem.* **2009**, *22* (2), 110.

[31] Kathuria, A.; Priya, N.; Chand, K.; Singh, P.; Gupta, A.; Jalal, S.; Gupta, S.; Raj, H. G.; Sharma, S. K. *Bioorganic Med. Chem.* **2012**, *20* (4), 1624.

[32] Valeur, E.; Bradley, M. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (2), 606.

[33] Carpino, L. A.; Imazumi, H.; Ferrer, F. J.; Zhang, C.; Lee, Y.; Foxman, B. M.; Henklein, P.; Hanay, C.; Clemens, M.; Wenschuh, H.; Klose, J.; Beyermann, M.; Bienert, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41* (3), 441.

[34] Mohamadi, A.; Miller, L. W. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27* (10), 2540.

[35] Alaqeel, S. I. *J. Saudi Chem. Soc.* **2017**, *21* (2), 229.

[36] Wood, M. E.; Bissiriou, S.; Lowe, C.; Windeatt, K. M. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11* (16), 2712.

[37] Rambabu, D.; Murthi, P. R. K.; Dulla, B.; Basaveswara Rao, M. V.; Pal, M. *Synth. Commun.* **2013**, *43* (22), 3083.

[38] Lin, S.-Y.; Isome, Y.; Stewart, E.; Liu, J.-F.; Yohannes, D.; Yu, L. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 2883.

[39] Pinder, J. L.; Davis, R. E.; Charrier, J. D. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55* (35), 4853.

[40] Dubois, N.; Glynn, D.; McInally, T.; Rhodes, B.; Woodward, S.; Irvine, D. J.; Dodds, C. *Tetrahedron* **2013**, *69* (46), 9890.

[41] Kankare, J.; Karppi, A.; Takalo, H. *Anal. Chim. Acta* **1994**, *295* (1–2), 27.

[42] Natrajan, L. S.; Timmins, P. L.; Lunn, M.; Heath, S. L. *Inorg. Chem.* **2007**, *46* (25), 10877.

[43] Aime, S.; Cavallotti, C.; Gianolio, E.; Giovenzana, G. B.; Palmisano, G.; Sisti, M. *Org. Lett.* **2004**, *6* (8), 1201.

[44] Trost, B. M.; Yeh, V. S. C.; Ito, H.; Bremeyer, N. *Org. Lett.* **2002**, *4* (16), 2621.

CHAPITRE 3

SYNTHESE ET EVALUATION PHYSICO-CHIMIQUE DES COMPLEXES DE LANTHANIDES

Ce chapitre est consacré aux complexes d'ions lanthanides Ln(III) (Ln = Eu, Gd et Tb) dérivés des ligands $\mathbf{H_4L_1} \rightarrow \mathbf{H_8L_{10}}$ dont la synthèse a été décrite dans le précédent chapitre.

Dans un premier temps, la préparation de ces complexes et leur caractérisation sera décrite. Leur pureté a été déterminée par analyses UPLC/MS et leur structure établie par spectrométrie de masse haute résolution. La spectroscopie de fluorescence (analyses des intensités relatives des raies d'émission et durées de vie de fluorescence) a également permis de compléter leur caractérisation. Une des caractéristiques essentielles de ces chélatants heptadentes, à savoir le nombre d'hydratation q, a été évalué par le biais de cette technique.

Dans un second temps, l'étude relaxométrique de plusieurs complexes Gd(III) a été réalisée : les principaux paramètres r_1, τ_M et τ_R ont notamment été déterminés. Ces résultats sont basés sur des mesures de relaxivité en fonction du champ magnétique ou de la température ainsi que sur des analyses RMN de l'oxygène-17. Des études de transmétallation vis-à-vis des ions Zn(II) ont également été effectuées.

Dans une dernière partie, les études photophysiques des complexes Eu(III) et Tb(III) relatifs aux ligands porteurs d'un motif carbostyrile, benzimidazole ou de fonction phénol seront développées. Ces études ont non seulement eu pour but de déterminer les caractéristiques essentielles des complexes (durées de vie et rendements quantiques d'émission) en milieu aqueux, mais également de mieux comprendre les phénomènes de désactivation non-radiative mis en jeu tels que la présence d'un transfert d'énergie en retour (état émissif Ln* $\rightarrow$ $^3\pi\pi^*$ état triplet du ligand) ou la présence d'états LMCT. La possibilité de substitution des molécules d'eau présentes dans la première sphère de coordination de ces complexes par des dianions biologiques (citrate, carbonate, phosphate) a également été envisagée.

1 Préparation et caractérisation des complexes de lanthanides Ln(III) (Ln = Eu, Gd, Tb)

Tous les complexes de lanthanides ont été synthétisés selon une même procédure, à savoir par mise en présence du ligand avec 1,1 équivalent de sel de lanthanide $LnCl_3.6H_2O$ en milieu aqueux (ou 2,2 équivalents dans le cas du ligand **H_8L_{10}**), puis par ajustement du pH à 4 – 5 à l'aide d'une solution de NaOH (0,1 M). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 16h, puis le pH est de nouveau ajusté à 6 – 7 et le solvant est évaporé.

La durée d'incubation employée (16h) pour la formation des différents complexes est basée sur l'évaluation de la cinétique de formation du complexe PCTA[12].**Eu** (**Figure 3.1**). Cette étude a été réalisée par fluorescence, en observant l'augmentation de l'intensité de la transition $^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ de l'ion Eu(III) à 615 nm d'un mélange équimolaire $EuCl_3.6H_2O$ et **H_3PCTA[12]** dans le tampon Tris (50 mM, pH = 7,4) en fonction du temps. Dans ces conditions, un degré de complexation de 90 % au bout de quatre heures à température ambiante est observé, en accord avec une cinétique de complexation rapide pour les complexes Ln(III) dérivés de ce ligand (**Chapitre 1**).

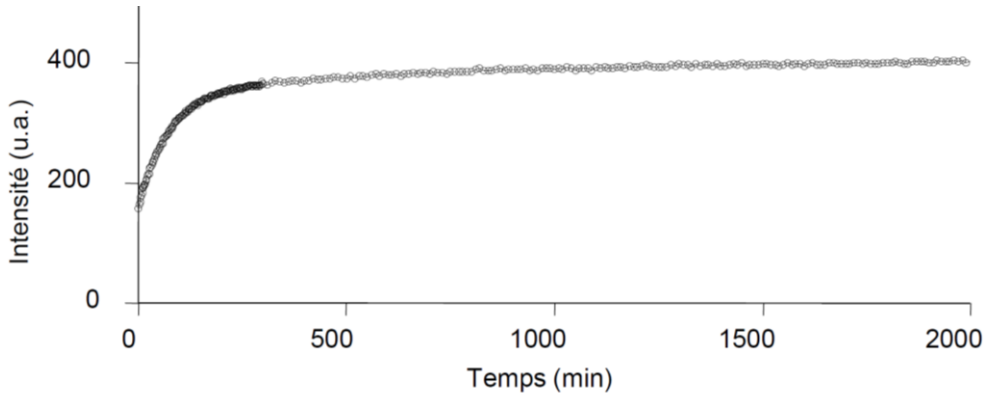


Figure 3.1. Cinétique de complexation du ligand **H_3PCTA[12]** en présence d'un équivalent de $EuCl_3.6H_2O$ à température ambiante dans le tampon Tris (50 mM, pH = 7,4)

Contrairement aux complexes d'europium et de terbium, les complexes de gadolinium ont, de plus, été purifiés sur colonne de type SEP-PAK (C_{18}) pour éliminer l'excès de sel. L'absence d'ions Gd(III) libres est vérifiée par le test à l'arsenazo[1] et dans le cas d'un résultat positif, une purification supplémentaire sur résine Chelex® 100 est réalisée jusqu'à l'obtention d'un résultat négatif. Après dessalage, les rendements de complexation ont pu être déterminés et sont compris entre 40 et 72 %. La pureté de l'ensemble des complexes a été vérifiée par analyse UPLC et leur caractérisation a été réalisée par spectrométrie de masse.

L'analyse par spectrométrie de masse en mode Electrospray (négatif ou positif selon les complexes) montre la formation de complexes mononucléaires (LLn), où les fonctions acide carboxylique et/ou acide phosphinique, ainsi que la ou les fonctions phénol pour les ligands **H_4L_9** et **H_8L_{10}** sont déprotonées pour la complexation de l'ion lanthanide. Dans le cas du ligand **H_8L_{10}**, un complexe métallique de stœchiométrie 1:2 (LLn_2) est formé. La présence d'une espèce monochargée attribuée à l'ion $[(L_{10}.Ln_2)+H]^-$ et d'une espèce dichargée $[L_{10}.Ln_2]^{2-}$ caractérisée par une séparation de ses différentes composantes de 0,5 u.m.a. est, de plus, observée. L'absence du signal correspondant au ligand libre atteste, de plus, de la stabilité de ces complexes dans les conditions de l'analyse (généralement pH = 2).

Les profils isotopiques expérimentaux des espèces monochargées (et dichargée dans le cas du ligand **H_8L_{10}**) correspondent parfaitement aux profils isotopiques théoriques. Dans le cas des complexes d'europium(III) et de gadolinium(III), la présence de l'ion peut, de plus, être aisément mise en évidence en raison de l'abondance relative des deux isotopes de l'europium (^{151}Eu/^{153}Eu) et des sept isotopes du gadolinium (^{152}Gd/^{154}Gd/^{155}Gd/^{156}Gd/^{157}Gd/^{158}Gd/^{160}Gd) (**Figure 3.2**). Une analyse par spectrométrie de masse Electrospray haute résolution réalisée sur l'ensemble des complexes (à l'exception de ceux dérivés du ligand **H_3L_7**) a permis d'établir sans ambiguïté la structure des différents complexes. Ces résultats sont regroupés dans la partie expérimentale.

La pureté des complexes a été déterminée par analyse chromatographique UPLC-PAD-SQD (Photodiode Array Detector et Simple Quadripole Detector), dans

des conditions de gradient et de colonne similaires (gradient H_2O + 0,1 % HCOOH/ACN, colonne HILIC). Dans ces mêmes conditions, les signaux correspondant au ligand **H_8L_{10}** et à ses différents complexes se sont révélés être mal résolus : un autre système de solvants a donc été utilisé (gradient formiate d'ammonium (10 mM, pH = 8)/ACN:formiate d'ammonium (100 mM, pH = 8) 90:10).

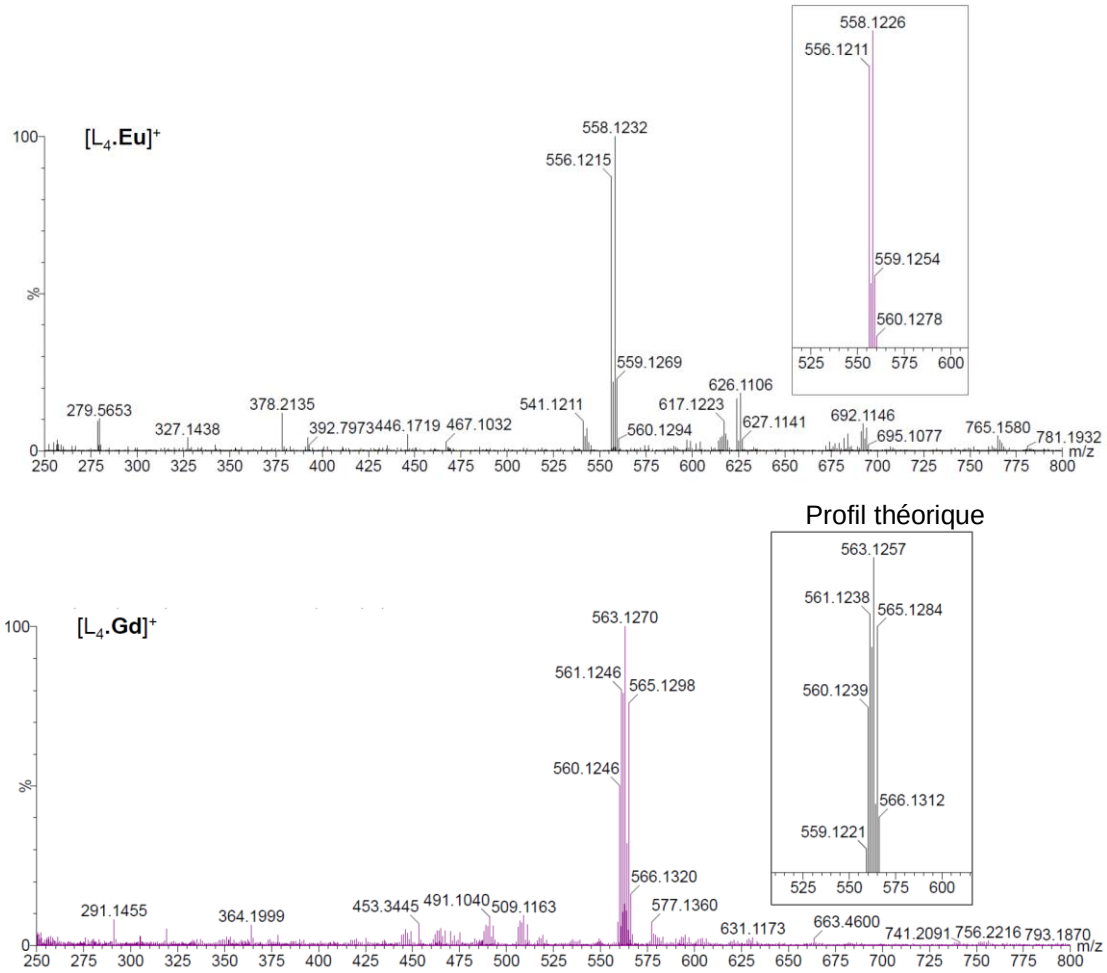


Figure 3.2. Spectres de masse haute résolution ESI+ des complexes $[L_4.Eu]^+$ et $[L_4.Gd]^+$

De manière générale, les complexes possèdent une plus forte affinité chromato-graphique que le ligand correspondant, permettant de distinguer les deux espèces libre et complexée par leur temps de rétention significativement distinct (Δt_R = 0,44-2,36 min). Seuls les complexes positivement chargés (*i.e.* plus polaires que leur ligand) issus des ligands **H_2L_4** et **$H_2L_5^{\#}$** et les complexes issus du ligand **H_8L_{10}** (conditions d'élution différentes) dérogent à cette observation (**Tableau 3.1**).

Ligand/Complexe	t_R (min)	Ligand/Complexe	t_R (min)
H_3PCTA[12]	2,13	H_4L_6	4,01
PCTA[12].**Eu**	4,44	[L_6.**Eu**]Na	5,30
PCTA[12].**Gd**	4,49	[L_6.**Gd**]Na	4,95(**)
PCTA[12].**Tb**	4,47	[L_6.**Tb**]Na	5,30
H_4L_1	3,21	H_3L_7	2,86
[L_1.**Eu**]Na	4,21	L_7.**Eu**	3,85
[L_1.**Gd**]Na	4,25	L_7.**Gd**	3,86
[L_1.**Tb**]Na	4,26	L_7.**Tb**	3,86
H_4L_2	3,35	H_3L_8	3,17
[L_2.**Eu**]Na	3,79	L_8.**Eu**	4,12
[L_2.**Gd**]Na	3,88	L_8.**Gd**	4,14
[L_2.**Tb**]Na	3,82	L_8.**Tb**	4,14
H_2L_4	4,59	H_4L_9	1,87
[L_4.**Eu**]Cl	3,85	[L_9.**Eu**]Na	3,46
[L_4.**Gd**]Cl	3,79	[L_9.**Gd**]Na	3,47
[L_4.**Tb**]Cl	3,88	[L_9.**Tb**]Na	3,43
H_2L_5#	4,56	H_8L_{10}	4,47(*)
[L_5#.**Eu**]Cl	3,58	[L_{10}.**Eu_2**]Na_2	4,09(*)
[L_5#.**Tb**]Cl	3,61	[L_{10}.**Gd_2**]Na_2	4,05(*)
H_3L_5	4,56	[L_{10}.**Tb_2**]Na_2	3,88(*)
L_5.**Eu**	5,42		
L_5.**Gd**	5,48		
L_5.**Tb**	5,45		

Tableau 3.1. Analyses UPLC-HILIC des ligands et de leurs complexes Eu(III), Gd(III), et Tb(III).
Colonne Acquity BEH HILIC (1,7 µm 2,1x100 mm), 0,4 mL/min.

Conditions : Gradient d'élution avec solvant A = H_2O (0,1 % HCOOH, pH = 2) et solvant B = ACN (0,1 % HCOOH, pH = 2), A:B de 5:95 à 50:50 (7 min), stabilisation 50:50 (3 min), et rinçage de 50:50 à 5:95 (0,5 min).

(*) Conditions : Gradient d'élution avec solvant A = Tampon NH_4HCO_2 (10 mM, pH = 8) et solvant B = Tampon NH_4HCO_2 (100 mM, pH = 8)/ACN (10:90), A:B de 5:95 à 50:50 (7 min), stabilisation 50:50 (3 min), et rinçage de 50:50 à 5:95 (0,5 min).

(**) Complexe issu d'un lot différent

En raison de la similarité des ions lanthanidiques étudiés (charge, rayon ionique et nombre de coordination), les complexes issus d'une même série présentent des temps de rétention comparables entre eux. Ces données suggèrent que les différents ions partagent la même sphère de coordination au sein du même ligand (**Figure 3.3**).

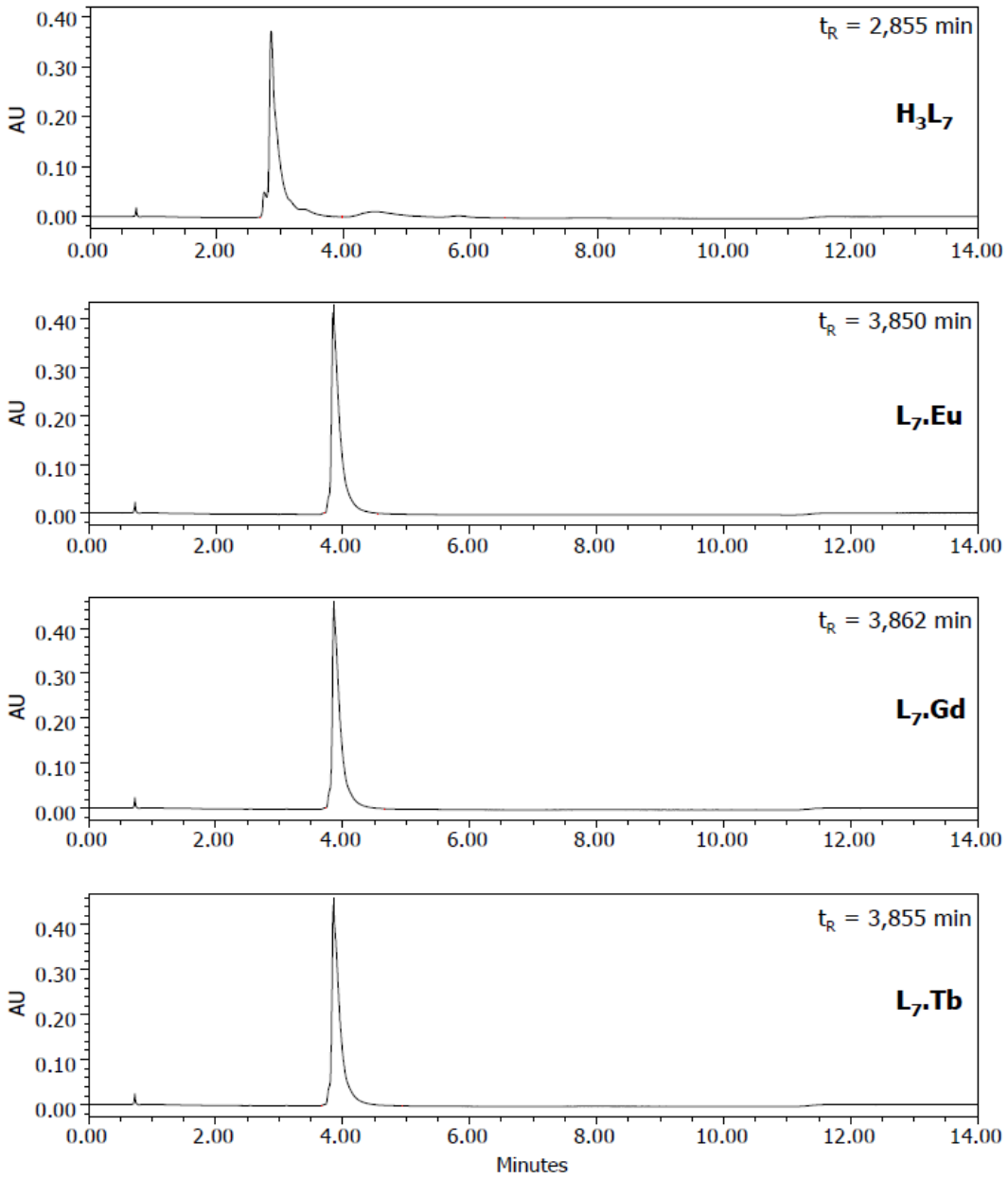


Figure 3.3. Chromatogrammes UPLC-HILIC du ligand **H_3L_7** et de ses complexes L_7.**Eu,** L_7.**Gd** et L_7.**Tb**. Colonne Acquity BEH HILIC (1,7 µm 2,1x100 mm), 0,4 mL/min.

Conditions : Gradient d'élution avec solvant A = H_2O (0,1 % HCOOH, pH = 2) et solvant B = ACN (0,1 % HCOOH, pH = 2), A:B de 5:95 à 50:50 (7 min), stabilisation 50:50 (3 min), et rinçage de 50:50 à 5:95 (0,5 min)

Plusieurs autres observations peuvent également être énoncées. Le ligand **H_3PCTA[12]** (t_R = 2,13 min) portant un noyau pyridine (pK_a(pyridinium) ~ 5,2) est plus retenu que son analogue à noyau phénol **H_4L_9** (t_R = 1,87 min) en raison des conditions acides de l'analyse (pH = 2).

De plus, pour les trois séries de complexes PCTA[12].**Ln**, [L_4.**Ln**]$^+$ et L_5.**Ln**, l'ordre d'élution évolue suivant la polarité de la fonction coordinante centrale **R**, et ce, malgré la charge globale positive des complexes [L_4.**Ln**]$^+$: t_R (**R** = PO(O^-)Me) > t_R (**R** = COO^-) > t_R (**R** = $CONMe_2$).

Les complexes issus des ligands **H_2L_4** et **H_2L_5**$^{\#}$ possèdent des temps de rétention similaires, expliqué, *a priori*, par leur charge globale positive.

2 Etude de la sphère de coordination des complexes de lanthanides

L'étude photophysique des complexes issus des différents ligands a permis, dans un premier temps, d'évaluer leurs propriétés d'absorption, d'émission et d'excitation de luminescence. Comme évoqué dans le premier chapitre, le nombre de molécules d'eau (q) directement coordinées au métal représente un facteur déterminant au niveau des propriétés photophysiques des complexes d'europium et de terbium et des propriétés relaxométriques des complexes de gadolinium. Si la présence de ces molécules d'eau provoque une extinction partielle de luminescence des complexes Eu(III) et Tb(III), l'exaltation de la relaxivité des complexes Gd(III) en est également une conséquence directe. La détermination de ce paramètre d'hydratation pour les complexes dérivés des ligands **H_3PCTA[12]**, **H_4L_1**, **H_4L_2**, **H_2L_4**, **$H_2L_5^{\#}$**, **H_3L_5**, **H_4L_6** et **H_4L_9**, sera reportée. La description photophysique complète des complexes dérivés des ligands **H_3L_7**, **H_3L_8**, **H_4L_9** et **H_8L_{10}** sera décrite en quatrième et dernière partie de ce chapitre.

2.1 Propriétés d'absorption des complexes de lanthanides

Les propriétés d'absorption des ligands et de leurs différents complexes ont été déterminées dans le tampon Tris (50 mM) à pH physiologique. La concentration en solutions utilisées est de l'ordre de 10^{-4} M afin de respecter la loi de Beer-Lambert. Dans un souci de clarté, seules les caractéristiques d'absorption des ligands libres ainsi que de leur complexe de gadolinium(III) sont rapportées (**Tableau 3.2**). Des caractéristiques d'absorption similaires sont observées dans le cas des complexes Eu(III) et Tb(III).

Le spectre d'absorption des ligands libres à motif pyridine **H_3PCTA[12]**, **H_4L_2**, **H_2L_4** et **H_3L_5** se traduit par la présence d'une bande d'absorption unique (transition $\pi \rightarrow \pi^*$) centrée sur une longueur d'onde de 266 nm. Si l'introduction d'une fonction

acide carboxylique en position para du noyau pyridine (**H_4L_1, H_4L_6**) n'a que peu d'influence sur la valeur du coefficient d'absorption molaire (~ 4 000 $M^{-1}.s^{-1}$), celle-ci génère néanmoins un déplacement bathochrome d'une douzaine de nanomètres. Ce déplacement vers les longueurs d'onde de plus faible énergie traduit l'augmentation de la conjugaison résultant de l'introduction d'un groupement électroattracteur au sein du chromophore. Le ligand à motif phénol (**H_4L_9**) présente, quant à lui, une bande d'émission de basse énergie centrée sur 288 nm, ainsi qu'un épaulement vers les plus hautes énergies centré sur 229 nm (transitions $\pi \rightarrow \pi^*$).

Ligand/Complexe	**λ nm (ε $M^{-1}.cm^{-1}$)**
H_3PCTA[12]	266 (3 700)
PCTA[12].**Gd**	270 (4 200)
H_4L_1	278 (4 000)
L_1.**Gd**	282 (3 900)
H_4L_2	265 (4 100)
L_2.**Gd**	270 (4 400)
H_2L_4	263 (3 600)
L_4.**Gd**	270 (3 700)
H_3L_5	266 (3 800)
L_5.**Gd**	269 (3 600)
H_4L_6	278 (4 000)
L_6.**Gd**	281 (4 500)
H_4L_9	$229^{ép}$ (5 990), 288 (2 490)
L_9.**Gd**	245 (5 960), 296 (2 810)

Tableau 3.2. Caractéristiques d'absorption des ligands et de leurs complexes de gadolinium(III) dans le tampon Tris (50 mM, pH = 7,4)

Dans le cas des ligands à motif pyridine, la complexation des cations lanthanidiques se traduit par un léger déplacement bathochrome (~3 – 7 nm) de la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ (**Figure 3.4**). Ce déplacement met en évidence l'augmentation de la polarisation de l'atome d'azote pyridinique due à sa coordination à l'ion lanthanide (*i.e.* la participation directe du chromophore à la complexation). De tels déplacements sont typiques de ceux observés lors de la complexation d'ions lanthanides par des

ligands à noyau pyridine.[2,3,4] Pour les complexes issus du ligand **H_4L_9**, la complexation induit des déplacements distincts de l'épaulement d'une quinzaine de nanomètres vers le rouge d'une part, ainsi que de 8 nm pour la bande de plus faible énergie. De plus, le même déplacement bathochrome est observé pour les différents complexes dérivés d'un même ligand.

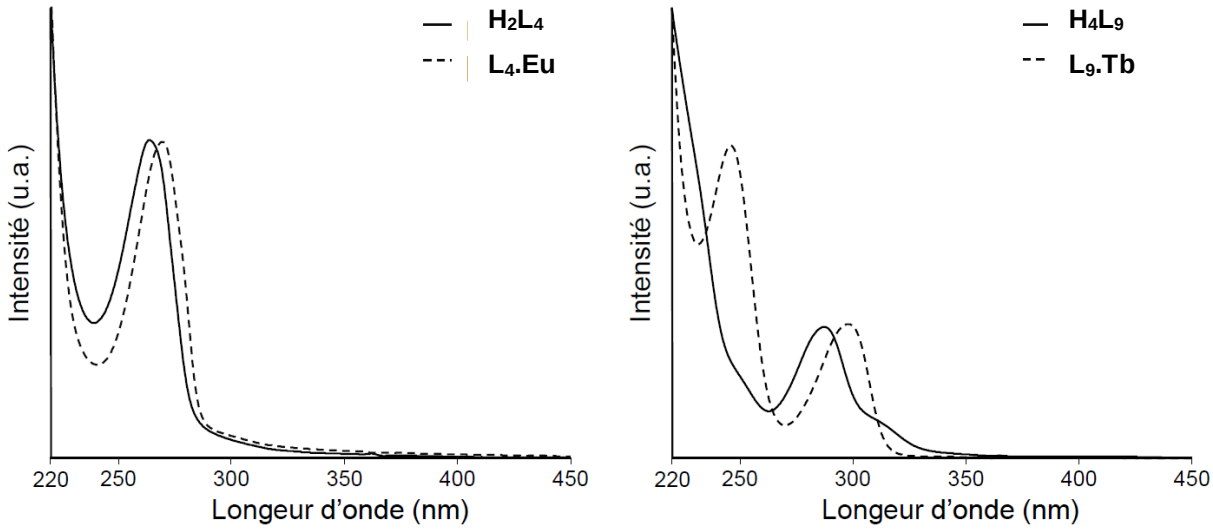


Figure 3.4. Spectres d'absorption des ligands **H_2L_4** et **H_4L_9** et de leurs complexes L_4.**Eu** et L_9.**Tb**

2.2 Propriétés de luminescence des complexes Eu(III) et Tb(III)

2.2.1 Spectres d'émission de luminescence

Les complexes d'europium et de terbium synthétisés ont également été caractérisés par leurs spectres d'émission de luminescence en milieu tampon Tris (pH = 7,4), en utilisant des solutions de concentration de l'ordre de 10^{-5} – 10^{-6} M. Ces spectres d'émission ont été obtenus en mettant en jeu l'effet d'antenne, c'est-à-dire après excitation des complexes au niveau des bandes d'absorption ($\pi \rightarrow \pi^*$) des ligands. Il est important de noter qu'en raison de leur faible coefficient d'extinction molaire, des solutions 10^3 à 10^4 plus concentrées ainsi qu'une excitation à une longueur d'onde en rapport avec les bandes f–f du lanthanide étudié sont nécessaires à l'acquisition des spectres relatifs aux sels $LnCl_3$ (soit 393 nm pour la transition $^7F_0 \rightarrow {}^7F_6$ de l'ion Eu(III) et 369 nm pour la transition $^7F_6 \rightarrow {}^5L_{10}$ de l'ion Tb(III)).

Les spectres d'émission des complexes d'europium sont caractérisés par la présence d'une bande intense située vers 615 nm et correspondant à la transition $^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$. Cette bande est associée à quatre autres bandes d'émission également

caractéristiques des transitions de l'ion europium, et situées à 580 nm ($^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$), 590 nm ($^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$), 650 nm ($^5D_0 \rightarrow {}^7F_3$) et 695 nm ($^5D_0 \rightarrow {}^7F_4$) (**Figure 3.5**). Plusieurs bandes d'émission sont observées dans la plage 470 – 640 nm dans le cas des complexes de terbium : il s'agit des bandes d'émission correspondant aux transitions $^5D_4 \rightarrow {}^7F_J$ avec J = 6 – 2. Ces spectres sont dominés par la transition $^5D_4 \rightarrow {}^7F_5$ centrée sur 545 nm.

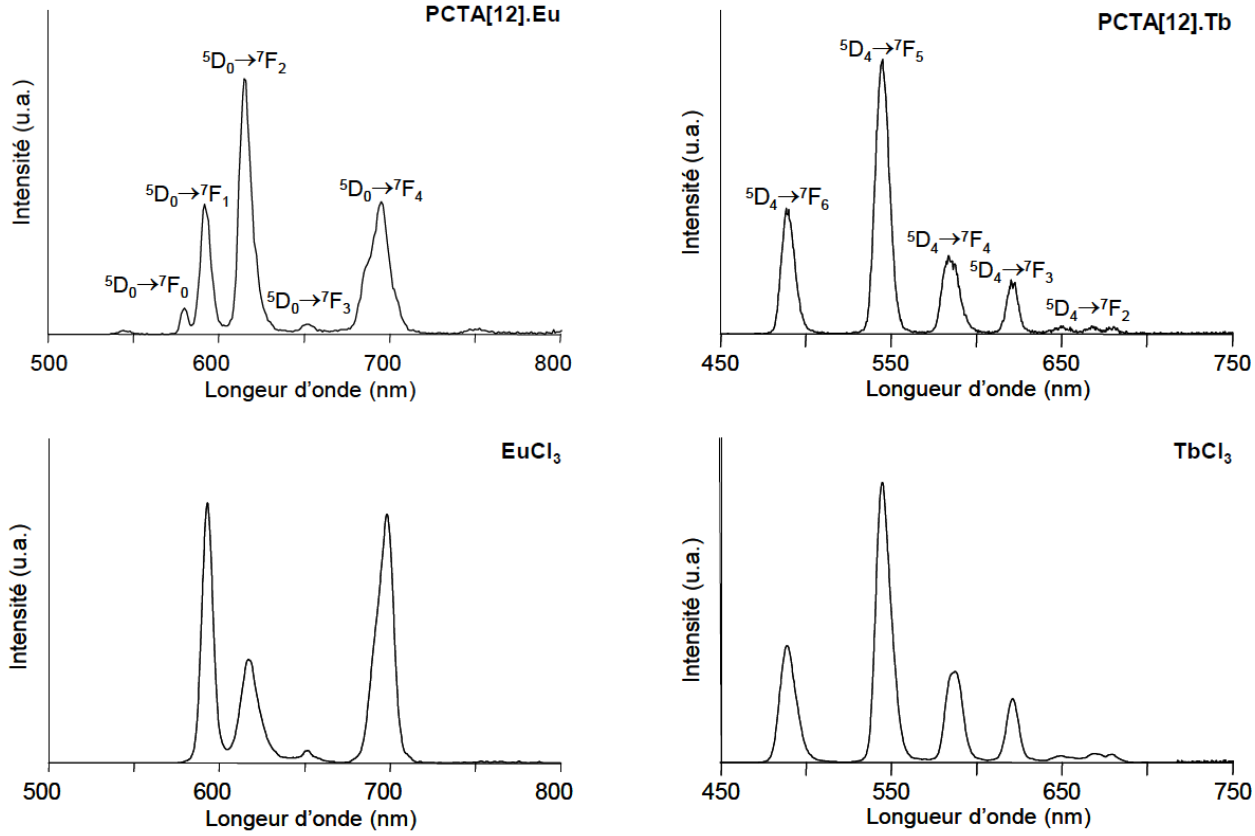


Figure 3.5. Spectres d'émission de luminescence corrigés des complexes PCTA[12].**Eu** et PCTA[12].**Tb** (λ_{exc} = 270 nm) en tampon Tris (50 mM, pH = 7,4) et des sels $LnCl_3.6H_2O$ (Ln = Eu avec λ_{exc} = 393 nm et Ln = Tb avec λ_{exc} = 369 nm) dans l'eau

Dans le cas des complexes Eu(III), l'intensité relative des transitions $^5D_0 \rightarrow {}^7F_J$ reflète l'environnement de l'ion lanthanide créé par le ligand. En particulier la transition $^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ qui, en raison de son caractère dipôle électrique, est hypersensible à cet environnement. La transition $^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ peut, quant à elle, agir comme une référence interne dans un spectre d'émission d'un complexe Eu(III) puisque celle-ci n'est pas affectée par l'environnement du ligand du fait de son fort caractère dipôle magnétique.[5] La différence de sensibilité de ces deux transitions permet de refléter la symétrie de la sphère de coordination du métal par l'intermédiaire du rapport $I(^7F_2)/I(^7F_1)$. Pour un système centrosymétrique ce rapport sera inférieur à 1 tandis que

dans le cas d'un complexe avec une sphère de coordination asymétrique, ce rapport se situe dans l'intervalle 8 – 12 (cas des complexes tris(β-dicétonate)).

Ainsi, la complexation effective des ions Eu(III) par le ligand **H_3PCTA[12]** peut être établie par une simple comparaison du spectre d'émission du complexe avec celui du sel de chlorure d'europium $EuCl_3$. En effet, une inversion des intensités des raies $^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ et $^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ est observée lors du passage de $EuCl_3$ à PCTA[12].**Eu** (**Figure 3.5**). Le rapport $I(^7F_2)/I(^7F_1)$ de 0,66 pour le sel $EuCl_3$ en solution aqueuse indique que l'ion europium(III) présente un environnement centrosymétrique en accord avec sa coordination avec neuf molécules d'eau, alors qu'il est de 2,34 pour le complexe PCTA[12].**Eu** (**Tableau 3.3**). Ces données indiquent clairement une modification de l'environnement autour de l'ion lors de sa complexation avec un ligand.

	$^5D_0 - {}^7F_0$	$^5D_0 - {}^7F_1$	$^5D_0 - {}^7F_2$	$^5D_0 - {}^7F_3$	$^5D_0 - {}^7F_4$	$I(^7F_2)/ I(^7F_1)$
$EuCl_3$	0,1	31,6	20,9	1,9	45,5	0,66
PCTA[12].**Eu**	2,5	18,0	42,0	2,1	35,4	2,34
L_1.**Eu**	2,4	17,8	41,7	2,2	35,9	2,35
L_2.**Eu**	2,5	16,4	43,8	2,3	35,0	2,67
L_4.**Eu**	2,5	17,3	42,4	2,5	35,3	2,44
$L_5^{\#}$.**Eu**	2,2	16,7	43,0	2,5	35,6	2,57
L_5.**Eu**	2,5	17,1	42,7	2,4	35,3	2,49
L_6.**Eu**	2,4	17,4	42,0	2,6	35,6	2,41
L_9.**Eu**	0,3	16,3	50,2	1,7	31,5	3,07

Tableau 3.3. Intensités relatives des raies de l'ion Eu(III) libre (dans l'eau) et complexé calculées à partir des spectres d'émission corrigés dans le tampon Tris (50 mM, pH = 7,4)

La raie $^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ présente une intensité relative similaire dans le cas des complexes dérivés des ligands à motif pyridine indiquant un environnement structural quasi-identique pour tous ces composés. Bien que la moindre résolution du spectre d'émission relatif au complexe H_9.**Eu** soit à prendre en compte, la substitution du noyau pyridine (fonctionnalisé ou non) par un motif phénol semble générer une augmentation sensible du rapport $I(^7F_2)/I(^7F_1)$. Ce résultat suggère la présence d'un

environnement structural différent du complexe, avec une augmentation de la distorsion de symétrie autour de l'ion lanthanide.

La comparaison des spectres d'émission du chlorure de terbium $TbCl_3$ et de PCTA[12].**Tb** met en évidence de légères différences d'intensité des différentes transitions impliquées. Cependant, les transitions $^5D_4 \rightarrow {}^7F_J$ ne sont pas hypersensibles dans le cas des complexes de terbium. De ce fait, leurs intensités relatives n'apportent pas une claire indication de l'environnement du métal.

2.2.2 Spectres d'excitation de luminescence : mise en évidence de l'effet d'antenne

Les composés luminescents sont caractérisés par deux spectres de luminescence distincts : un spectre d'émission, indiquant les variations de l'intensité de luminescence à une longueur d'onde d'excitation (= longueur d'onde d'absorption du chromophore) fixe, et un spectre d'excitation reflétant l'efficacité des différentes longueurs d'onde d'excitation à exciter le complexe à une longueur d'onde d'émission (= maximum d'intensité de luminescence) fixe. Comme évoqué précédemment, ce maximum d'intensité correspond à la raie $^5D_4 \rightarrow {}^7F_5$ vers 545 nm dans le cas d'un complexe de terbium(III), et à la raie $^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ vers 616 nm dans le cas d'un complexe d'europium(III). Le spectre d'excitation permet notamment de rendre compte de l'origine des transitions de l'état fondamental conduisant au peuplement des différents états émissifs de l'ion luminescent.

Une fois corrigé des variations d'intensité de la lumière incidente, l'allure du spectre d'excitation reproduit généralement celle du spectre d'absorption à condition qu'une seule espèce ne soit présente à l'état fondamental. Cette observation est valable pour l'ensemble des complexes d'europium(III) et de terbium(III) reportés dans cette étude, et met en évidence la présence d'un transfert d'énergie efficace du chromophore vers l'état émissif de l'ion. Quelques exemples de ces spectres superposés aux spectres d'absorption des complexes sont présentés dans la figure suivante (**Figure 3.6**).

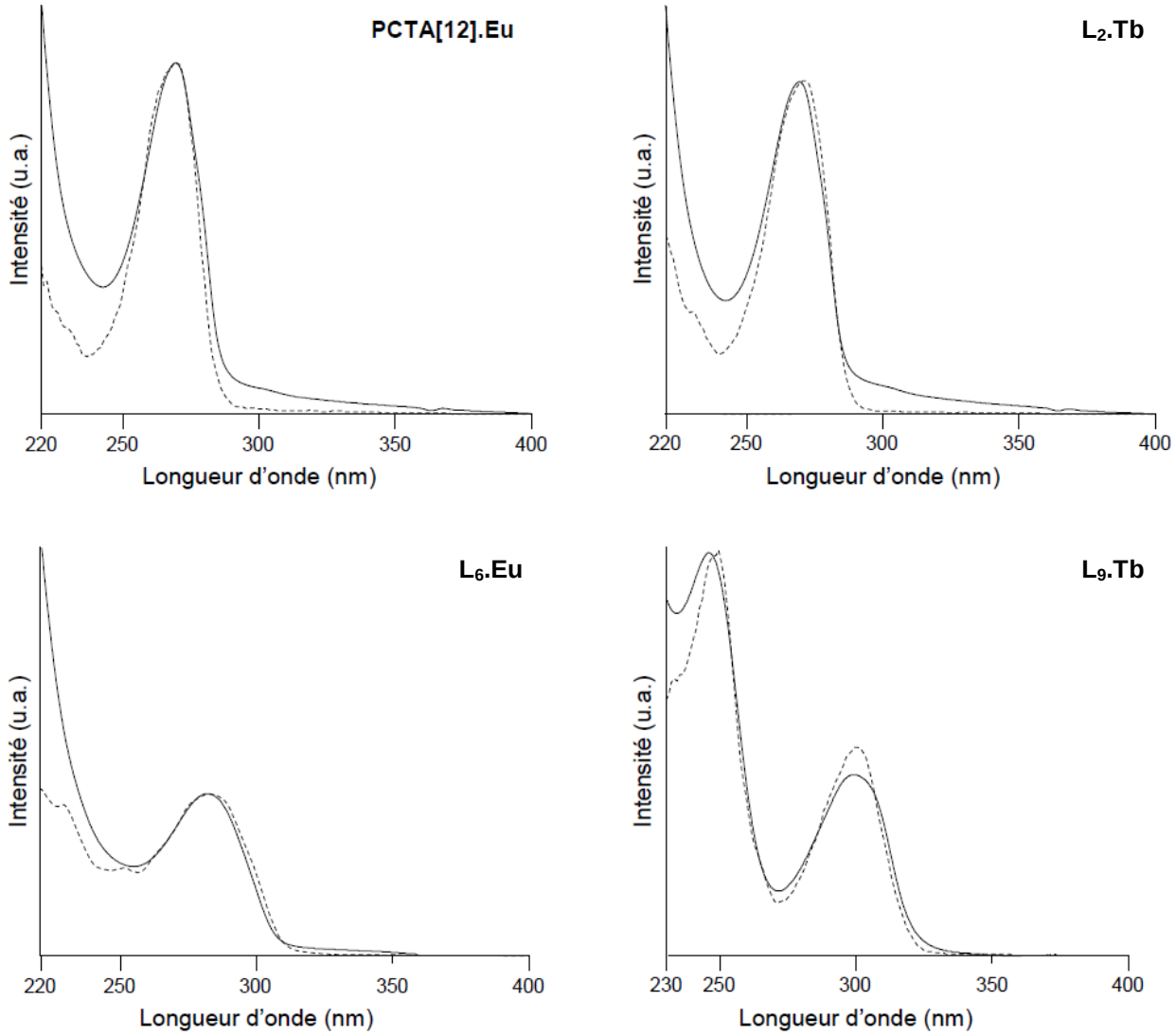


Figure 3.6. Spectres d'absorption (——) et d'excitation de luminescence (---) normalisés des complexes d'europium(III) et de terbium(III) en tampon Tris (50 mM, pH = 7,4)

Il est également intéressant de noter que si la luminescence de l'ion lanthanide est observée grâce à l'effet d'antenne des noyaux pyridine et phénol, aucune transition liée aux niveaux d'absorption propres aux ions Eu(III) et Tb(III) n'apparaît sur les spectres d'excitation à ces faibles concentrations (10^{-5} – 10^{-6} M).

2.2.3 Durées de vie de luminescence et nombre de molécules d'eau

En plus de leurs spectres d'excitation et d'émission, les complexes de lanthanides sont caractérisés par une durée de vie de luminescence τ, correspondant au temps moyen pendant lequel le complexe reste à l'état excité avant de revenir à son état fondamental. L'obtention de ce paramètre s'effectue par mesure de l'intensité

d'émission de luminescence I en fonction du temps. La diminution de l'intensité lumineuse suit une loi de décroissance mono-exponentielle de type :

$$I = I_0 e^{(-\frac{t}{\tau})} \qquad \textbf{[3.1]}$$

où I_0 représente l'intensité de luminescence au temps t = 0. La durée de vie de luminescence est alors définie comme étant le temps au bout duquel cette intensité d'émission est égale à 1/e de sa valeur initiale.

La détermination de ce paramètre sous différentes conditions permet d'accéder à des informations quantitatives relatives aux processus de désactivations, parmi lesquelles le nombre de molécules d'eau présentes en première sphère de coordination du centre métallique. En effet, la présence de ces molécules d'eau dans l'environnement proche du métal induit des processus de désactivation non-radiative et par conséquent, une diminution de la durée de vie de luminescence τ.

Les ions Eu(III) et Tb(III) sont, en effet, fortement sensibles à la présence d'oscillateurs moléculaires de type O-H dans leur première sphère de coordination : les modes vibrationnels de ces oscillateurs peuvent interagir avec les niveaux électroniques émissifs des ions ($^5D_0$ pour Eu(III) et $^5D_4$ pour Tb(III)), conduisant alors à un quenching de la luminescence.

De manière générale, la probabilité de peuplement d'un état vibrationnel ν_n est d'autant plus faible que la différence énergétique entre cet état ν_n et l'état fondamental ν_0 est grande (*i.e.* que l'indice n est grand). En prenant pour exemple le cas du terbium(III), le couplage vibrationnel s'effectue entre l'état émissif $^5D_4$ de l'ion et l'état ν_4 pour le vibrateur O-H, ou l'état ν_7 pour le vibrateur O-D (**Figure 3.7**). La désactivation par les vibrateurs O-H est donc supérieure à celle provoquée par les vibrateurs O-D.

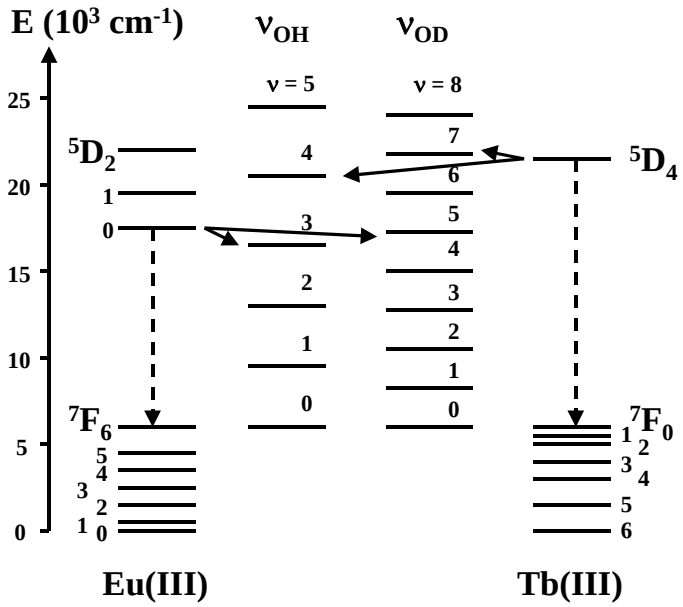


Figure 3.7. Désexcitation non radiative des ions Eu(III) et Tb(III) par les oscillateurs O-H et O-D. D'après l'article de Horrocks *et al*.[6]

Il est important de noter que d'autres types d'oscillateurs vibrationnels d'énergie élevée, tels que les liaisons N-H ou C-H, peuvent également être impliqués dans ce type de désactivation non-radiative et inhiber la luminescence.

En toute logique, la durée de vie de luminescence d'un complexe est d'autant plus faible que les phénomènes de désactivation non-radiative sont efficaces. Dans le cas de la présence de molécules d'eau liées au lanthanide, la durée de vie d'émission de l'ion sera donc plus élevée dans un solvant deutéré que dans un solvant hydrogéné (**Figure 3.8**).

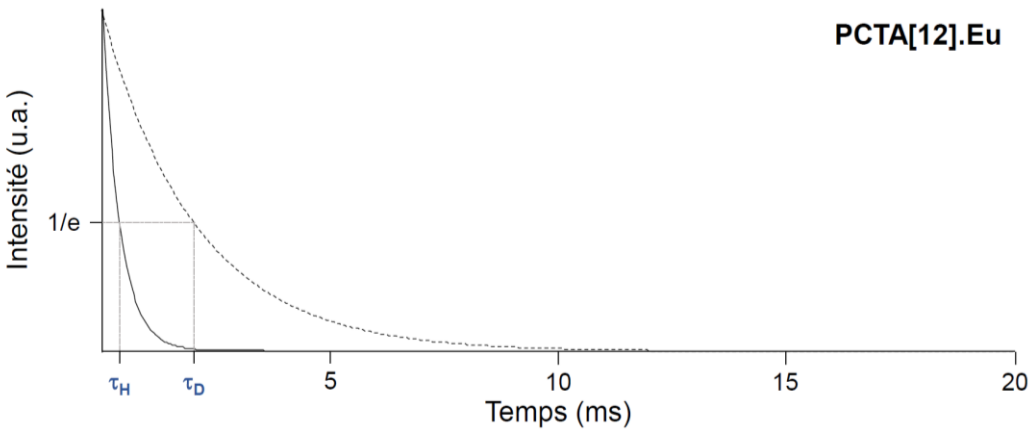


Figure 3.8. Courbe de décroissance de l'intensité de luminescence en fonction du temps pour le complexe PCTA[12].**Eu** dans le tampon Tris (50 mM, pH = 7,4) hydrogéné (——) ou deutéré (---)

La détermination du paramètre d'hydratation q peut alors être effectuée en enregistrant les durées de vie d'émission de complexes Eu(III) et Tb(III) en solution hydrogéné (τ_H) et deutéré (τ_D), et en considérant que la contribution des vibrateurs O-D au quenching de la fluorescence est négligeable.

Si différentes équations empiriques ont été développées dans ce but, seules celles tenant compte des facteurs correctifs inhérents à l'influence de vibrateurs O-H présents dans la seconde sphère de coordination du centre métallique (*i.e.* établissant des liaisons hydrogène avec les atomes donneurs du ligand) en plus des molécules d'eau directement coordinées à l'ion Ln(III) seront ici retenues.

Dans ce cadre, les relations mises au point par Parker pour les ions Eu(III) et Tb(III) peuvent être citées (**éq 3.2** et **3.3**).[7]

$$q(Eu) = 1{,}2 \times (1/\tau_H - 1/\tau_D - 0{,}25) \qquad \textbf{[3.2]}$$

$$q(Tb) = 5 \times (1/\tau_H - 1/\tau_D - 0{,}06) \qquad \textbf{[3.3]}$$

avec τ en ms

Les constantes 1,2 et 5 d'une part, et 0,25 et 0,06 d'autre part, reflètent la plus grande sensibilité de l'europium(III) par rapport au terbium(III) vis-à-vis de ce processus de désactivation. Le couplage de l'état émissif $^5D_0$ implique, en effet, l'état vibrationnel ν_3(OH) (**Figure 3.7**). Le nombre d'hydratation déterminé à partir de ces équations est estimé à ± 0,2 molécules d'eau. En tenant compte de cette incertitude, un nombre fractionnaire de molécules d'eau calculé à partir de ces équations peut signifier l'existence d'un équilibre entre deux espèces dont q diffère d'une unité.

La relation d'Horrocks et de Supkowski, établie seulement pour les complexes d'europium(III) mais déterminée à partir de structures de ligands plus variées sera également retenue (**éq. 3.4**).[8]

$$q(Eu) = 1{,}11 \times (1/\tau_H - 1/\tau_D - 0{,}31) \qquad \textbf{[3.4]}$$

avec τ en ms

L'équation de Choppin, malgré des mesures de durée de vie d'émission réalisées uniquement en milieu hydrogéné, permet également d'obtenir un résultat correct en première approximation (**éq. 3.5**).[9]

$$q(Eu) = 1{,}05 \times {}^{1}/_{\tau_H} - 0{,}70 \qquad [3.5]$$

avec τ en ms

Les ions Eu(III) et Tb(III) se situant de part et d'autre de l'ion Gd(III) dans le tableau périodique des éléments, il est généralement admis que la nature de la première sphère d'hydratation est identique au sein de complexes de ces trois ions dérivés d'un même ligand. Dans ce but, l'utilisation de complexes Eu(III) dans les études relaxométriques de complexes Gd(III) est bien établie.[10]

Ces équations empiriques peuvent être illustrées par des données expérimentales disponibles au laboratoire, et relatives à la famille de ligands dérivés du PCTA[12] (**Figure 3.9**).

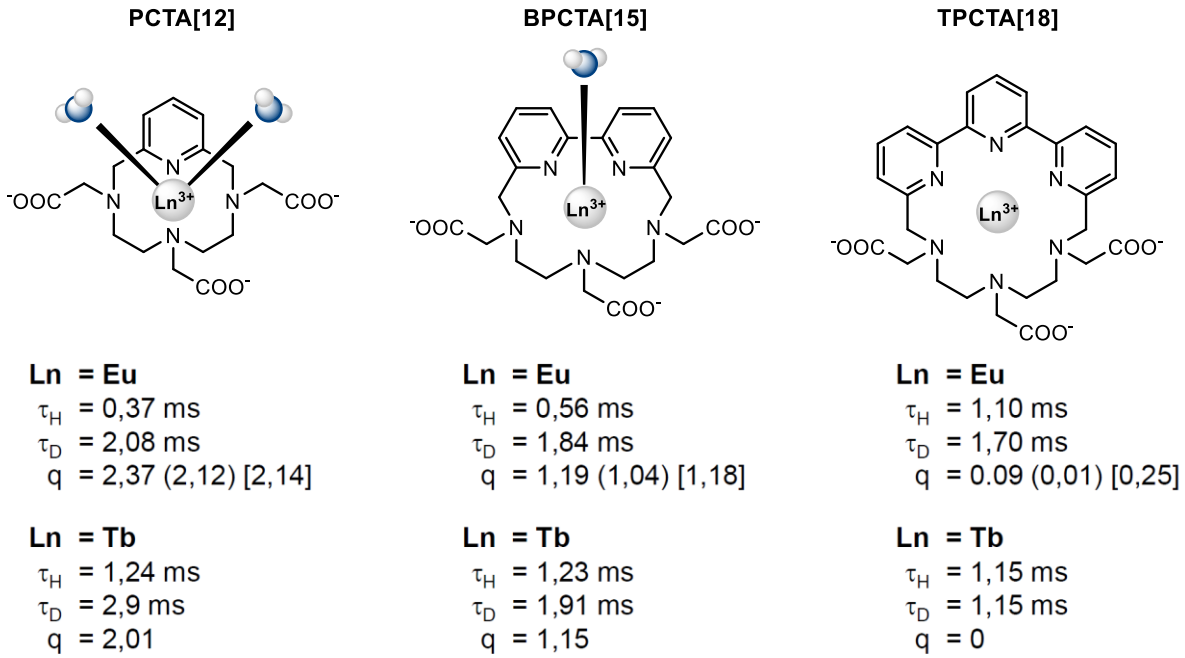


Figure 3.9. Durées de vie d'émission à 298 K en tampon Tris (50 mM, pH = 7,4) et nombres de molécules d'eau déterminés par l'équation de Parker (par l'équation de Horrocks) [par l'équation de Choppin]

Si les valeurs de q(Eu) = 2,12 et q(Tb) = 2,01 observées pour les complexes du PCTA[12] diffèrent de celles rapportées par Kim *et al*. (2,7 et 2,2 respectivement), ces dernières sont cependant en adéquation avec le nombre d'hydratation de 2 rapporté par Aime *et al*. pour le complexe PCTA[12].**Gd**, et calculé à partir de données RMN de l'oxygène-17 de la molécule d'eau liée au métal.[11,12]

Les données extraites des durées de vie des complexes Eu(III) et Tb(III) indiquent, en accord avec un nombre de coordination de 9 pour les deux ions lanthanides, que le passage d'un ligand heptadente à un ligand octadente, puis nonadente, entraîne la perte successive d'une molécule d'eau dans la sphère de coordination du centre métallique.

Dans le cadre de cette étude, les durées de vie d'émission ont été déterminées en mesurant la variation d'intensité de la transition $^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ pour les complexes d'europium et la transition $^5D_4 \rightarrow {}^7F_5$ pour les complexes de terbium(III), en fonction du temps. Les mesures ont été effectuées dans le tampon Tris (50 mM, pH = 7,4) et son analogue deutéré à température ambiante, et le nombre de molécules d'eau coordinées a pu être calculé à partir des différentes équations pour chacun des complexes (**Tableau 3.4**).

Dans tous les cas, les durées de vie calculées sont indépendantes des longueurs d'onde d'excitation et d'émission, et la décroissance de l'intensité de luminescence peut être représentée par une courbe de type mono-exponentielle. En supposant l'absence de plusieurs espèces en échange rapide par rapport à l'échelle de temps des états excités $^5D_0$ ou $^5D_4$, ces données suggèrent la présence d'un seul type de complexe en solution.

Les durées de vie d'émission des complexes Eu(III) et Tb(III) (de l'ordre de 0,4 et 1,25 ms respectivement) dans le tampon Tris hydrogéné sont significativement plus élevées que celles des sels de lanthanide correspondants (τ = 0,11 ms pour $EuCl_3$ et τ = 0,43 ms pour $TbCl_3$). Ces valeurs traduisent la substitution, tout du moins partielle, des neuf molécules d'eau entourant l'ion par les atomes donneurs des différents ligands.

Complexe	τ_H^{298K} (ms)	τ_D^{298K} (ms)	$\tau_D^{298K}/\tau_H^{298K}$	q(Parker)	q(Horrocks)	q(Choppin)
L_1.**Eu**	0,38	2,15	5.7	2,30	2,01	2,06
L_1.**Tb**	1,22	2,90	2.4	2,07	-	-
L_2.**Eu**	0,36	1,93	5.4	2,41	2,16	2,22
L_2.**Tb**	1,21	2,98	2.5	2,15	-	-
L_4.**Eu**	0,42	2,03	4.8	1,97	1,75	1,80
L_4.**Tb**	1,31	3,12	2.4	1,91	-	-
$L_5^{\#}$.**Eu**	0,39	1,93	4.9	2,16	1,93	1,99
$L_5^{\#}$.**Tb**	1,30	3,17	2.4	1,97	-	-
L_5.**Eu**	0,38	2,06	5.4	2,28	2,04	2,06
L_5.**Tb**	1,25	3,09	2.5	2,08	-	-
L_6.**Eu**	0,38	2,07	5.4	2,28	2,04	2,06
L_6.**Tb**	1,32	3,17	2.4	1,91	-	-
L_9.**Eu**	0,31	0,87	2.8	2,19	1,96	2,69
L_9.**Tb**	1,16	2,43	2.1	1,95	-	-

Tableau 3.4. Durées de vie de luminescence (ms) des complexes Eu(III) et Tb(III) dans le tampon Tris (50 mM, pH = 7,4) hydrogéné ou deutéré à température ambiante, et détermination du nombre de molécules d'eau coordinées au lanthanide

De manière générale, les durées de vie de luminescence augmentent lors du passage du milieu hydrogéné au milieu deutéré (d'un facteur de 2,8 à 5,7 pour les complexes Eu(III) et de 2,1 à 2,5 pour les complexes Tb(III)), en accord avec une désactivation plus forte en présence de vibrateurs O-H (rapport $\tau_D^{298K}/\tau_H^{298K}$). Ceci indique, de plus, la présence d'au moins une molécule d'eau résiduelle dans la première sphère de coordination des lanthanides. Ces données confirment également la plus grande sensibilité de l'europium(III) face aux processus de désactivation non-radiative par les oscillateurs O-H.

Bien que ces mesures de durées de vie de luminescence permettent de mettre en évidence la présence ou non de molécules d'eau dans la première sphère de coordination du lanthanide, les relations empiriques développées ci-avant vont permettre de quantifier leur nombre de manière précise (± 0,2 molécules d'eau).

L'ensemble des résultats relatifs aux complexes Eu(III) et Tb(III) de cette étude, quelle que soit la relation utilisée, met en évidence la coordination de deux molécules d'eau au centre métallique. En considérant un nombre de coordination de 9 pour ces ions lanthanidiques, les valeurs sont parfaitement en adéquation avec la présence de structures heptadentes où tous les atomes donneurs participent à la complexation de l'ion, laissant alors deux sites vacants pour la coordination des molécules d'eau.

La présence de deux molécules d'eau pour les complexes L_2.**Ln** implique que la fonction acide carboxylique ω de la chaîne centrale ne participe pas à la coordination du métal. Ce résultat était attendu puisque la participation de cette fonction à la coordination se traduirait par la formation non favorable d'un pseudocycle chélatant à sept chaînons.

Bien que les mesures effectuées sur le complexe L_9.**Eu** indique la présence de deux molécules d'eau, les durées de vie τ_H (0,87 ms) mais surtout τ_D (0,87 ms) sont anormalement faibles, suggérant la présence d'un autre phénomène de désactivation que celui des oscillateurs O-H pour ce complexe. Dans ce cas, l'utilisation de l'équation [**3.5**] conduit, de plus, à un nombre de molécules d'eau vraisemblablement erroné pouvant être expliqué par le fait que celle-ci ne tienne compte que d'une mesure de durée de vie en milieu hydrogéné contrairement aux autres relations.

Il est également intéressant de remarquer que le passage d'un ester phosphinique à un acide phosphinique, comme dans le cas des complexes dérivés des ligands $\mathbf{H_2L_5^{\#}}$ et $\mathbf{H_3L_5}$ ne modifie en rien la sphère de coordination du lanthanide.

3 Etude relaxométrique des complexes de gadolinium

Si la présence de deux molécules d'eau en première sphère de coordination peut nuire aux propriétés de luminescence des complexes de lanthanides présentés dans la partie précédente, celle-ci les rend particulièrement intéressants pour une application en tant qu'agents de contraste pour l'IRM. Ainsi, après une courte introduction théorique sur la relaxivité, l'étude relaxométrique des complexes de gadolinium dérivés des ligands **H_3PCTA[12]**, **H_4L_2**, **H_2L_4**, **H_3L_5**, **H_4L_6** et **H_4L_9**, sera décrite.

3.1 Généralités théoriques sur la relaxivité

Comme évoqué précédemment, l'efficacité d'un agent de contraste est exprimée en termes de relaxivité. Cette notion représente la capacité d'un contrastophore à augmenter les vitesses de relaxations longitudinale ($1/T_1$) et transversale ($1/T_2$) des protons de l'eau environnants, et est définie selon les équations suivantes :

$$\left(\frac{1}{T_i}\right)_{obs} = \left(\frac{1}{T_i}\right)_{dia} + \left(\frac{1}{T_i}\right)_{p} \quad \text{avec i = 1,2} \qquad [\mathbf{3.6}]$$

$$R_i^{obs} = R_i^{dia} + R_i^{p} \quad \text{avec i = 1,2} \qquad [\mathbf{3.7}]$$

où R_i^{obs} est la vitesse de relaxation observée en présence d'un agent de contraste, et où les indices « dia » et « p » se réfèrent aux contributions diamagnétique et paramagnétique respectivement. En pratique, R_i^{dia} correspond à la valeur déterminée pour le solvant pur dans les mêmes conditions de pH, de température et de fréquence (R_1^{dia} = 0,2826 s^{-1} pour l'eau à 20 MHz et 310 K).

L'augmentation de la relaxivité des protons de l'eau résulte du couplage dipolaire entre le moment magnétique électronique du centre métallique et le moment

magnétique nucléaire des protons de l'eau. Cette interaction dipolaire met en jeu trois mécanismes distincts : le mécanisme de sphère interne (IS), le mécanisme de sphère externe (OS) et le mécanisme de seconde sphère (SS). Elle peut alors s'écrire :

$$R_i^p = \left(R_i^p\right)^{IS} + \left(R_i^p\right)^{OS} + \left(R_i^p\right)^{SS} \quad \text{avec } i = 1,2 \qquad [3.8]$$

Le mécanisme de sphère interne implique les molécules d'eau directement liées au centre métallique. Le mécanisme de sphère externe provient, quant à lui, des molécules d'eau qui ne sont pas directement coordinées au centre métallique mais qui diffusent autour de celui-ci, et le mécanisme de seconde sphère est basé sur les molécules d'eau le plus souvent liées au complexe par des liaisons hydrogène avec le ligand (**Figure 3.10**).

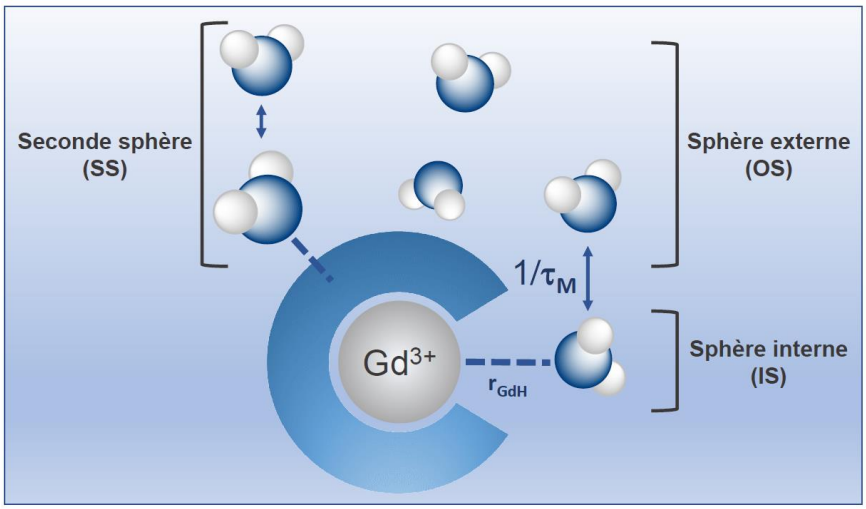


Figure 3.10. Schéma représentatif d'un complexe de Gd(III) et de ses différentes sphères de coordination

Pour les complexes de gadolinium à faible poids moléculaire, les mécanismes de sphère interne et de sphère externe sont prépondérants. Ce dernier effet étant difficile à appréhender en raison de la diffusion aléatoire des molécules d'eau autour du complexe, la suite de cette introduction théorique sera limitée à l'étude des paramètres permettant d'influencer le mécanisme de sphère interne. De plus, les complexes de Gd(III) agissant principalement sur le temps de relaxation longitudinale T_1, seule la description de la relaxivité longitudinale r_1 sera présentée. La relation [**3.7**] devient alors :

$$R_1^{obs} = R_1^{dia} + \left(R_1^p\right)^{IS} \qquad [3.9]$$

Le mécanisme de relaxivité de sphère interne permet la propagation de l'effet paramagnétique du centre métallique vers le solvant, et est basé sur l'échange de molécules d'eau de la première sphère de coordination de l'ion gadolinium et les molécules d'eau constituant le milieu environnant. Ce mécanisme est décrit par la théorie de Solomon-Bloembergen-Morgan (SBM)[13,14] et est défini, dans le cas des agents paramagnétiques en solution diluée, par la relation suivante :

$$\left(R_1^p\right)^{IS} = \left(\frac{1}{T_1}\right)^{IS} = P_M \frac{q}{T_{1M} + \tau_M} = \frac{C}{55{,}5} \frac{q}{T_{1M} + \tau_M} \qquad [3.10]$$

Avec :

- P_M la fraction molaire des molécules de solvant coordinées au centre paramagnétique,
- q le nombre de molécules d'eau en première sphère de coordination,
- T_{1M} le temps de relaxation longitudinale de la (des) molécule(s) d'eau coordinée(s),
- τ_M le temps moyen de résidence de la (des) molécule(s) d'eau en première sphère de coordination,
- C la concentration molaire en espèce paramagnétique.

La relaxation longitudinale des protons de la (des) molécule(s) d'eau coordinée(s) T_{1M} est gouvernée par deux types d'interaction : une interaction dipolaire (DD) et une interaction scalaire ou « de contact » (SC). Cette dernière peut cependant être négligée en raison de la nature ionique de l'interaction entre le centre paramagnétique et la molécule d'eau.[15] La variation de T_{1M} en fonction du champ magnétique peut être décrite par un ensemble d'équations résultant de la théorie de Solomon-Bloembergen modifiée, où :

$$\frac{1}{T_{1M}} = \frac{1}{T_{1M}^{DD}} = \frac{2}{15} \gamma_H^2 g^2 \mu_B^2 S(S+1) \frac{1}{(r_{GdH})^6} \left[\frac{3\,\tau_{c1}}{1 + \omega_H^2 \tau_{c1}^2} + \frac{7\,\tau_{c2}}{1 + \omega_S^2 \tau_{c2}^2} \right] \qquad [3.11]$$

Avec :

- γ_H le rapport gyromagnétique de spin électronique,
- g le facteur de Landé pour l'électron libre,
- μ_B le magnéton de Bohr,
- S le nombre quantique de spin électronique
- r_{GdH} la distance effective entre l'ion métallique et le(s) proton(s) de la(des) molécule(s) d'eau coordinée(s),
- ω_H et ω_S les fréquences de Larmor du proton et de l'électron respectivement.
- τ_{ci} avec i = 1 ou 2, le temps de corrélation modulant l'interaction entre les deux spins.

L'interaction entre le spin nucléaire du proton et le spin électronique de l'ion paramagnétique est influencée par plusieurs facteurs : le temps de corrélation rotationnelle du complexe τ_R, le temps moyen de résidence des molécules d'eau dans la première sphère de coordination τ_M, et le temps de relaxation électronique T_{ie}. Ces différents termes sont liés par la relation **3.12** :

$$\frac{1}{\tau_{ci}} = \frac{1}{\tau_R} + \frac{1}{\tau_M} + \frac{1}{T_{ie}} \qquad \text{avec i = 1,2} \qquad \textbf{[3.12]}$$

Chacun des termes relatifs au temps de relaxation électronique longitudinale T_{1e} et au temps de relaxation électronique transversale T_{2e} peut être exprimé sous la forme d'une équation :

$$\frac{1}{T_{1e}} = 2B\left[\frac{1}{1+\omega_S^2\tau_V^2} + \frac{4}{1+4\omega_S^2\tau_V^2}\right] \text{ avec } B = \frac{1}{10\,\tau_{S0}} \qquad \textbf{[3.13]}$$

$$\frac{1}{T_{2e}} = B\left[\frac{5}{1+\omega_S^2\tau_V^2} + \frac{2}{1+4\omega_S^2\tau_V^2} + 3\right] \text{ avec } B = \frac{1}{10\,\tau_{S0}} \qquad \textbf{[3.14]}$$

Avec :

- B le terme relatif à l'amplitude du « Zero Field Splitting » (ZFS) responsable de la levée de dégénérescence des niveaux électroniques de spin de l'ion Gd(III) occupés par les électrons célibataires,
- τ_{S0} le temps de relaxation électronique à champ nul,

- τ_V le temps de corrélation relatif aux temps de relaxation électronique.

La contribution paramagnétique de sphère interne $\left(R_1^p\right)^{IS}$ dépend donc, d'une part, du champ magnétique, mais également de plusieurs paramètres importants à contrôler en vue de maximiser la relaxivité globale d'un agent de contraste, parmi lesquels :

- q le nombre d'hydratation du complexe,
- τ_M le temps moyen de résidence des molécules d'eau dans la première sphère de coordination du complexe,
- τ_R le temps de corrélation rotationnelle du complexe,
- T_{ie} les temps de relaxation électronique,
- r_{GdH} la distance spin nucléaire - spin électronique.

Si la contribution des trois premiers paramètres sur la relaxivité d'un agent de contraste sera détaillée dans les paragraphes suivants, une brève description de l'influence du temps de relaxation électronique ainsi que de la distance Gd(III)-proton sur la relaxivité d'un agent de contraste sera développée ici.

L'équation **3.11** montre, en effet, que la relaxivité de sphère interne est une fonction de $(r_{GdH})^{-6}$. Si la distance r_{GdH} semble avoir une forte influence sur la relaxivité, elle reste cependant difficile à contrôler expérimentalement. Ce paramètre est souvent déduit de la distance Gd(III)-O, dont une bonne estimation peut être déterminée à l'état solide par l'examen des structures cristallographiques. De plus, une étude réalisée par spectrométrie ENDOR (Electron Nuclear Double Resonance) sur l'ion Gd-aqua et sur une série de quatre agents de contraste commerciaux dérivés de ligands polyamino-carboxylates montre que les cinq complexes possèdent une distance r_{GdH} identique égale à 3,1 $\pm$ 0,1 Å.[16,17] En première approximation, ce paramètre peut donc être considéré comme étant indépendant de la structure du complexe, et fixé à une valeur de 0,31 nm.

Le temps de relaxation électronique T_{ie} gouverne, quant à lui, la relaxivité à champ faible (0,01 – 1 MHz). Il faut que ce temps soit le plus long possible pour avoir une relaxivité élevée. La compréhension des termes de relaxation électronique τ_{S0} et τ_V est cependant difficile en raison du manque de représentations théoriques valides quelles que soient les conditions expérimentales. Leur détermination est la plus souvent réalisée par ajustement théorique des profils de dispersion de relaxation magnétique nucléaire (NMRD) (**§ 3.2.3**), mais des précautions quant aux résultats doivent être prises compte tenu du nombre de paramètres ajustés simultanément. Il est donc important d'en déterminer le plus grand nombre indépendamment par des techniques d'analyse complémentaires. Le temps de relaxation électronique T_{ie} peut également être calculé à partir de la relaxation électronique transversale obtenue par des mesures de résonance paramagnétique électronique (RPE).

3.2 Evaluation relaxométrique des complexes Gd(III)

Cette étude porte sur les complexes L_2.**Gd**, L_4.**Gd**, L_5.**Gd**, L_6.**Gd** et L_9.**Gd**, et a été réalisée à partir de solutions dont les concentrations exactes en ion gadolinium(III) ont été déterminées par relaxométrie (cf. partie expérimentale).

3.2.1 Mesure de la relaxivité

Le premier paramètre à être évalué lors de l'étude relaxométrique d'un complexe de gadolinium est celui de la relaxivité longitudinale r_1. D'après la relation **3.7**, la vitesse de relaxation observée R_1^{obs} correspond à la somme des contributions diamagnétique et paramagnétique de l'échantillon. Or, la contribution paramagnétique R_1^p est linéairement proportionnelle à la concentration en espèce paramagnétique, correspondant ici au complexe de gadolinium, soit :

$$R_1^p = R_1^{obs} - R_1^{dia} = r_1[Gd^{3+}] \qquad [3.15]$$

En pratique, la relaxivité r_1 peut donc être définie comme étant le coefficient directeur de la droite représentant la vitesse de relaxation longitudinale observée en fonction de la concentration en espèce paramagnétique. Cette valeur permet

notamment de comparer les propriétés relaxométriques de complexes Gd(III) entre elles, puisqu'elle est ramenée à une concentration en ion Gd(III) de 1 mM. Les valeurs de r_1 indiquées dans la littérature sont donc exprimées en $s^{-1}.mM^{-1}$. Dans cette optique, les temps de relaxation longitudinale T_1 de tous les complexes ont été mesurés à 20 MHz et 310 K et à différentes concentrations. La variation des valeurs R_1^p correspondantes en fonction de la concentration en complexe est reportée dans la figure suivante, sur laquelle sont également reportés les résultats des analyses par régression linéaire (**Figure 3.11**).

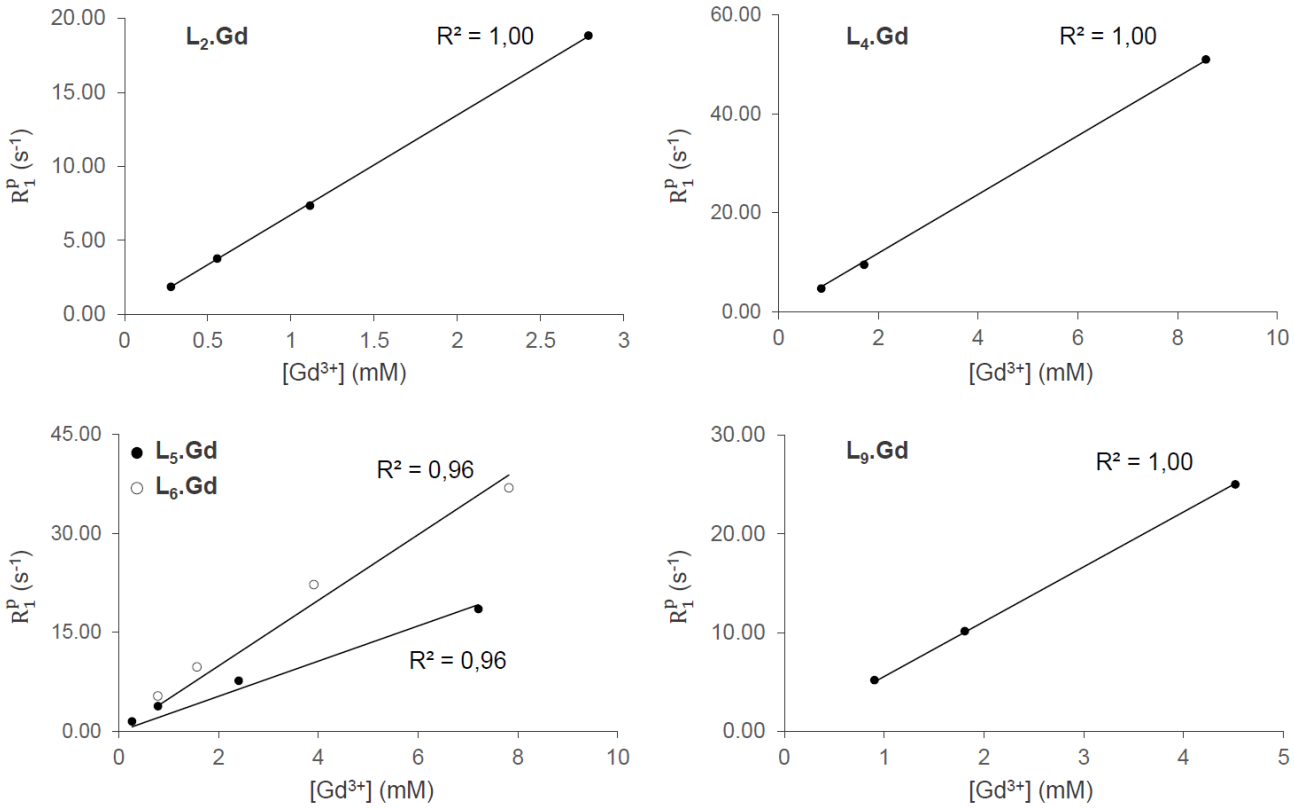


Figure 3.11. Evolution de la relaxation en fonction de la concentration en Gd(III) à 20 MHz et 310 K

A l'exception des complexes L_5.**Gd** et L_6.**Gd**, l'évolution de la relaxivité en fonction de la concentration est parfaitement linéaire (R^2 = 1,00), ce qui permet d'exclure la présence de tout phénomène de stacking π, lié à la présence d'un noyau aromatique. Dans le cas des complexes L_5.**Gd** et L_6.**Gd** présentant une fonction de coordination acide phosphinique, une chute de la valeur de la relaxivité lorsque la concentration en complexe augmente est observée. Ce comportement est plus visible lorsque que les valeurs R_1^p (s^{-1}) sont traduites en valeurs r_1 ($s^{-1}.mM^{-1}$), c'est-à-dire

rapportées à une concentration en complexes de 1 mM (**Figure 3.12**). Ainsi le passage d'une solution de 0,262 mM de L_5.**Gd** à une solution près de 10 fois plus concentrée (2,403 mM) se traduit par une baisse de la relaxivité r_1 de 5,79 à 3,2 $s^{-1}.mM^{-1}$. Une diminution moins drastique de la relaxivité avec la concentration est observée pour les échantillons L_6.**Gd**.

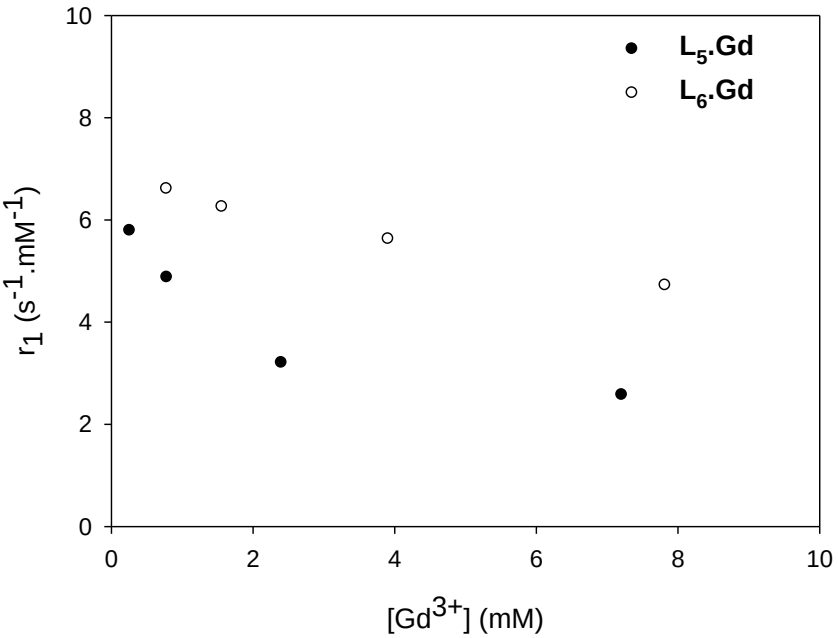


Figure 3.12. Evolution de la relaxivité r_1 en fonction de la concentration en ions Gd(III) des complexes L_5.**Gd** et L_6.**Gd** à 20 MHz et 310 K

Ces résultats suggèrent un changement structural de ces complexes lorsque la concentration est élevée, altérant la valeur de la relaxivité. Afin de répondre à ces données expérimentales, l'hypothèse d'une interaction entre deux molécules de complexe, mettant en jeu la fonction P=O du groupe acide phosphinique d'une molécule et l'ion gadolinium d'une molécule voisine, peut être émise. Ce type d'interaction induirait la formation d'une espèce dimérique excluant une molécule d'eau dans la sphère de coordination de l'ion gadolinium, se traduisant donc par une diminution de la valeur de la relaxivité. Ce changement structural est sans doute accompagné par une diminution de la solubilité des complexes en milieu aqueux, entrainant une diminution de la valeur de la relaxivité observée. Un dépôt blanc est en effet observé pour les concentrations les plus élevées (7 mM).

Un comportement similaire a été reporté pour le complexe dérivé d'un analogue du ligand **H_3L_5** portant trois fonctions ester phosphonique, le PCTMB

(**Figure 3.13**).[18] Les auteurs ont mis en évidence la formation d'une espèce dimérique à des concentrations supérieures à 2 mM excluant la coordination d'une molécule d'eau, et abaissant ainsi la valeur de la relaxivité. Cependant, aucun phénomène de ce type n'a été reporté pour le complexe dérivé du PCP2A, l'analogue direct du ligand **H_3L_5** présentant une seule fonction acide phosphonique.[19]

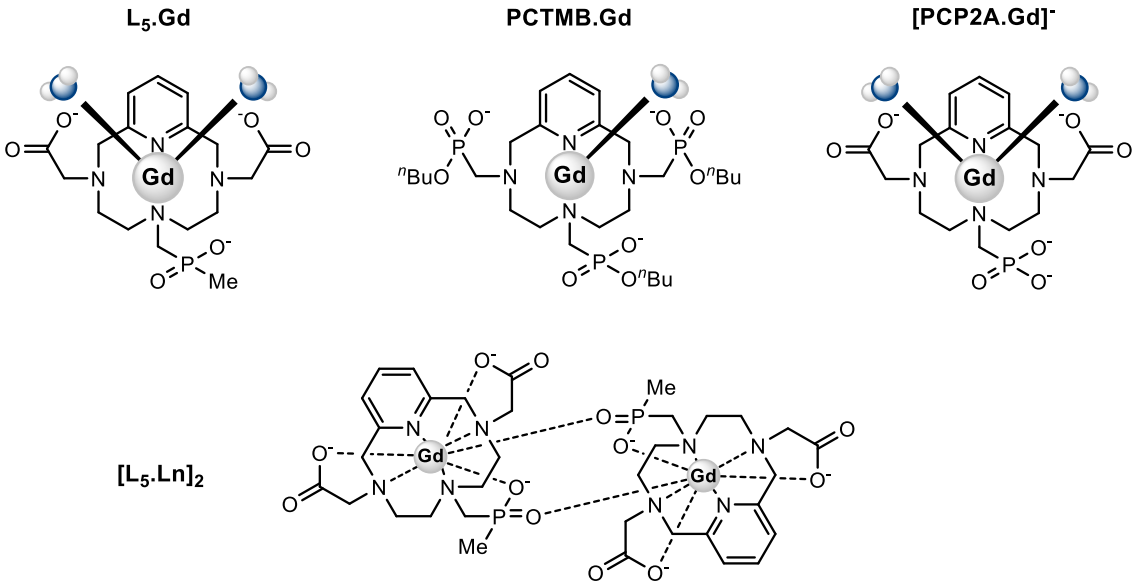


Figure 3.13. Structures des complexes Gd(III) dérivés d'analogue du PCTA[12] à fonctions phosphinate, phosphonate ou ester phosphonique. La charge de l'ion Gd(III) a volontairement été omise pour plus de clarté

A partir des données photophysiques des complexes Eu(III) et Tb(III) correspondant à ces deux ligands à motif acide phosphonique, l'existence d'une espèce unique en solution (décroissance mono-exponentielle de l'intensité de fluorescence en fonction du temps) avait été établie. La divergence des résultats relaxométriques/photophysiques trouve sans aucun doute son origine dans les concentrations en complexes Ln(III) utilisées pour ces deux techniques d'analyse, à savoir de l'ordre du micromolaire pour les données photophysiques et de l'ordre du millimolaire pour les données relaxométriques.

Les valeurs de relaxivité (longitudinale ou transversale) obtenues à 20 ou 60 MHz, et à 298 ou 310 K, sont regroupées et comparées à celles du parent PCTA[12], de la référence commerciale DOTA, ainsi que d'autres complexes bis-hydratés dérivés de ligands macrocycliques polyaminocarboxyliques dont les structures sont représentées dans la figure suivante (**Figure 3.14**).

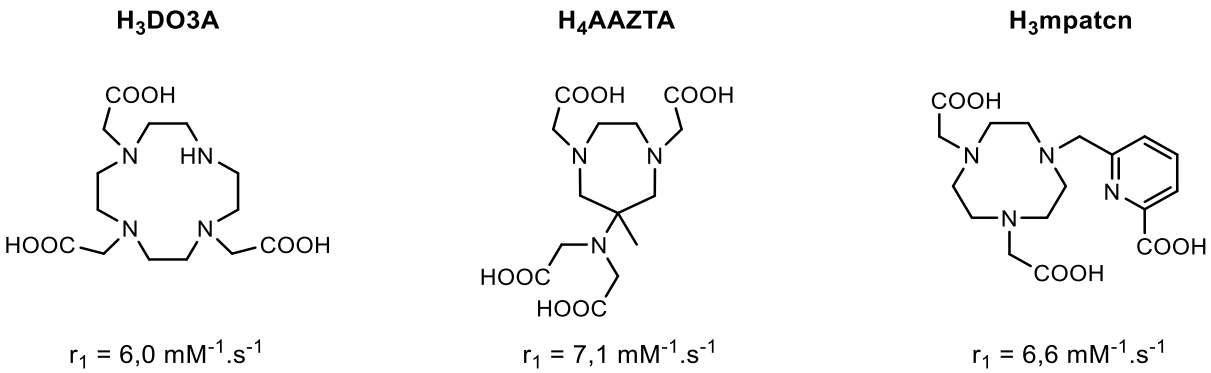


Figure 3.14. Structures de ligands macrocyclique heptadentes polyaminocarboxyliques et valeurs de relaxivité de leurs complexes Gd(III) bis-hydratés correspondants à 20 MHz et 298 K

D'après la relation **3.10**, la relaxivité est directement proportionnelle au nombre d'hydratation q. De ce fait, le passage d'un complexe monohydraté (q = 1) à des complexes bis-hydratés (q = 2) présente un avantage évident en termes de relaxivité. En effet, les relaxivités des complexes PCTA[12].**Gd** et DO3A.**Gd** sont de 6,9 et 6,0 $mM^{-1}.s^{-1}$ respectivement (à 20 MHz et 298 K).[20,12] Ces valeurs sont largement supérieures à celle reportée pour le complexe DOTA.**Gd** de 4,7 $mM^{-1}.s^{-1}$ obtenue dans les mêmes conditions (**Tableau 3.5**).[21]

De manière générale, la relaxivité r_1 de tous les complexes Gd(III) issus de ce travail est du même ordre de grandeur voire supérieure à celle du parent PCTA[12].**Gd**, en accord avec la présence de deux molécules d'eau en première sphère de coordination. Il apparaît également que ces valeurs de relaxivité sont au moins équivalentes à celles reportées pour des analogues macrocycliques polyaminocarboxyliques bis-hydratés tels que le DO3A.**Gd**, AAZTA.**Gd**,[22] et mpatcn.**Gd**,[23] voire leur sont jusqu'à 50 % supérieures.

	q	310 K			298 K
		r_1 ($s^{-1}.mM^{-1}$)		r_2 ($s^{-1}.mM^{-1}$)	r_1 ($s^{-1}.mM^{-1}$)
		20 MHz	60 MHz	20 MHz	20 MHz
L_2.**Gd**	2	6,7	5,9	8,9	8,7
L_4.**Gd**	2	5,5	4,8	5,9	7,1
L_5.**Gd** (*)	2	5,8	5,1	7,2	8,2
L_6.**Gd** (**)	2	6,9	5,7	-	9,1
L_9.**Gd**	2	5,7	4,9	5,9	7,2
PCTA[12].**Gd** [20]	2	5,4	5,5	6,3	6,9
DOTA.**Gd** [21]	1	3,5	3,1	-	4,7
DO3A.**Gd** [12]	2	-	-	-	6,0
AAZTA.**Gd** [22]	2	-	-	-	7,1
mpatcn.**Gd** [23]	2	-	-	-	6,6

Tableau 3.5. Relaxivités des complexes. (*) valeurs obtenues à C = 0,262 mM (**) valeurs obtenues à C = 0,782 mM. Les valeurs q indiquées pour les complexes L_2.**Gd** → L_9.**Gd** ont été déterminées sur la base de leurs complexes Eu(III)

3.2.2 Détermination du temps moyen de résidence des molécules d'eau τ_M

Le temps moyen de résidence des molécules d'eau en première sphère de coordination τ_M constitue un autre paramètre crucial à déterminer pour évaluer l'efficacité d'un agent de contraste. Il est également important d'introduire la notion de vitesse d'échange des molécules d'eau k_{ex}, définie comme étant l'inverse du temps moyen de résidence de ces molécules d'eau en première sphère de coordination ($k_{ex} = 1/\tau_M$ exprimé en s^{-1}).

La relation **3.10** met en évidence l'influence de ce paramètre sur le temps de relaxation paramagnétique. Ainsi, la relaxivité r_1 sera donc, *a priori*, d'autant plus élevée que le temps de résidence τ_M sera court, c'est-à-dire que la vitesse d'échange k_{ex} sera grande.

L'appréhension qualitative de la vitesse d'échange des molécules d'eau peut être réalisée au moyen de l'étude de l'évolution de la relaxivité r_1 des complexes

Gd(III) en fonction de la température. En effet, la relaxivité correspond à la somme des contributions des sphères interne et externe. Or, la relaxation de sphère externe dépend de la température mais ne dépend pas du temps de résidence de la(des) molécule(s) d'eau en première sphère de coordination. Pour ce mécanisme, plus la température sera élevée, plus la diffusion translationnelle du complexe sera grande et plus la relaxivité sera faible. A l'inverse, et comme l'indique la relation **3.10**, la relaxation de sphère interne dépend de ce temps de résidence. Deux types d'échange peuvent alors être distingués :

- si l'échange est rapide ($T_{1M} \gg \tau_M$), le temps de relaxation longitudinale de la molécule d'eau coordinée limitera la relaxivité. La diminution de la température entraîne une augmentation de la contribution de la sphère interne et donc une augmentation de la relaxivité observée.

- si l'échange est lent ($T_{1M} \ll \tau_M$), la vitesse d'échange de la molécule d'eau devient le paramètre limitant la relaxivité. Une diminution de la température entraîne une baisse de cette vitesse d'échange, et la contribution de la sphère interne à la relaxivité observée décroît. Dans ce cas, les deux contributions des sphères interne et externe peuvent se compenser et la relaxivité observée atteindra un plateau ou diminuera.

Dans ce but, la relaxivité des différents complexes de cette étude a été mesurée en fonction de la température, sur une plage de 278 à 318 K (**Figure 3.15**). Les profils obtenus montrent une augmentation exponentielle de leur relaxivité lorsque la température diminue. Par exemple, la relaxivité du complexe L_2.**Gd** est multipliée par un facteur 2,3 entre 318 et 278 K et celle du complexe L_9.**Gd** par un facteur 2,75. Ce comportement est typique des chélates de Gd(III) dont la relaxivité n'est pas limitée par le temps moyen de résidence de la molécule d'eau, mais est largement dominée par le temps de corrélation rotationnelle du complexe. Ce même comportement est observé à différentes concentrations pour le complexe L_5.**Gd**, suggérant de prime abord que la vitesse d'échange des molécules d'eau en première sphère de coordination n'est pas corrélée à la chute de la relaxivité.

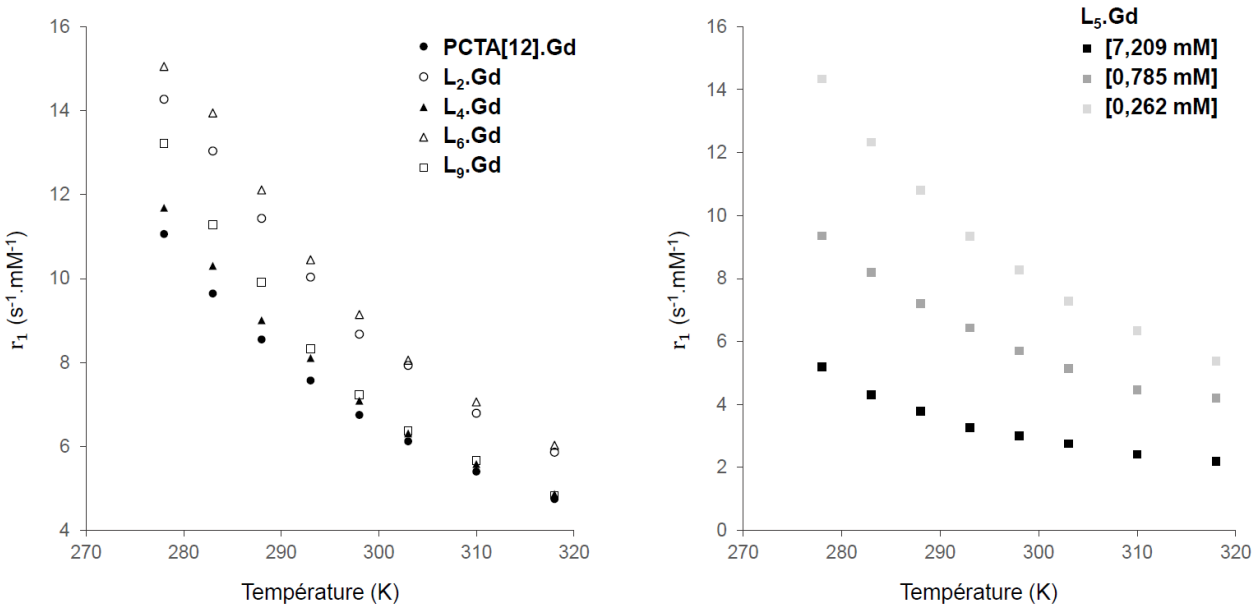


Figure 3.15. Evolution de la relaxivité en fonction de la température à 20 MHz entre 278 et 318 K

La détermination quantitative de la vitesse d'échange des molécules d'eau en première sphère de coordination peut être réalisée par la mesure de la vitesse de relaxation transversale ($1/T_2$) de l'oxygène-17 en fonction de la température. Cette technique, basée sur les travaux de Swift et Connick,[24] n'est valable que dans le cas d'espèces paramagnétiques en solution diluée. En théorie, la vitesse de relaxation transversale de l'oxygène-17 est égale à la somme des contributions des sphères interne et externe, soit :

$$\frac{1}{T_2^P} = \left(\frac{1}{T_2}\right)^{IS} + \left(\frac{1}{T_2}\right)^{OS} \qquad [3.16]$$

En pratique, l'utilisation de la vitesse de relaxation transversale de l'oxygène-17 réduite lors de ces mesures est préférée puisqu'elle permet de s'affranchir de la concentration en agent paramagnétique, il vient donc :

$$\frac{1}{T_2^R} = \frac{\frac{1}{T_2^P}}{P_M\, q} \qquad [3.17]$$

La contribution paramagnétique de sphère externe relative à la relaxation transversale est négligeable.[25] La vitesse de relaxation réduite ne dépend donc que de la contribution de sphère interne :

$$\frac{1}{T_2^R} = \frac{\left(\frac{1}{T_2}\right)^{IS}}{P_M\, q} = \frac{1}{\tau_M}\frac{T_{2M}^{-2} + \tau_M^{-1}\, T_{2M}^{-1} + \Delta\omega_M^2}{(\tau_M^{-1} + T_{2M}^{-1})^2 + \Delta\omega_M^2} \qquad \textbf{[3.18]}$$

Avec :

- T_{2M} le temps de relaxation transversale de la (des) molécule(s) d'eau coordinée(s),
- $\Delta\omega_M$ la différence de déplacement chimique entre le noyau ^{17}O de la molécule d'eau libre et la molécule d'eau liée au centre paramagnétique.

Le déplacement chimique de l'oxygène de la molécule d'eau coordinée, $\Delta\omega_M$, est déterminé par l'interaction hyperfine entre le spin électronique de l'ion paramagnétique et le noyau ^{17}O suivant l'équation :

$$\Delta\omega_M = \frac{g\,\mu_B\, S(S+1)\, B_0}{3k_B T}\,\frac{A}{\hbar} \qquad \textbf{[3.19]}$$

avec B_0 le champ magnétique, k_B la constante de Boltzmann, T la température, et $A/\hbar$ la constante de couplage hyperfin. En raison du faible déplacement chimique observé pour les complexe de gadolinium(III), ce terme est souvent négligé.

Le temps de relaxation transversale T_{2M} est, quant à lui, défini par la relation :

$$\frac{1}{T_{2M}} = \frac{S(S+1)}{3}\left(\frac{A}{\hbar}\right)^2 \tau_{e1} \qquad \textbf{[3.20]}$$

Dans cette équation, $1/\tau_{e1}$ correspond à la somme de la vitesse d'échange de la molécule d'eau coordinée et du temps de relaxation électronique longitudinale :

$$\frac{1}{\tau_{e1}} = \frac{1}{\tau_M} + \frac{1}{T_{1e}} \qquad \textbf{[3.21]}$$

Au vu de ces différentes équations, il apparaît que la vitesse de relaxation transversale réduite $1/T_2^R$ est fonction de plusieurs paramètres tels que le temps de relaxation électronique T_{e1} (lui-même dépendant de B et de τ_V), de la constante de couplage hyperfin $A/\hbar$ et du temps moyen de résidence de la molécule d'eau. Si les deux paramètres $A/\hbar$ et B sont indépendants de la température, la vitesse d'échange k_{ex} est gouvernée par l'équation d'Eyring, et τ_V par la loi d'Arrhenius :

$$k_{ex} = \frac{1}{\tau_M} = \frac{k_B\, T}{h} \exp\left(\frac{\Delta S^{\neq}}{R} - \frac{\Delta H^{\neq}}{RT}\right) \qquad [\mathbf{3.22}]$$

$$\tau_V = \tau_V^{298K} \exp\left(\frac{E_V}{R}\left[\frac{1}{T} - \frac{1}{298{,}15}\right]\right) \qquad [\mathbf{3.23}]$$

où $\Delta S^{\neq}$ et $\Delta H^{\neq}$ représentent l'entropie et l'enthalpie d'activation pour le processus d'échange respectivement, τ_V^{298K} correspond au temps de corrélation relatif à la relaxation électronique à 298,15 K, et E_V reflète l'énergie d'activation relative à τ_V.

Trois zones d'échange peuvent être distinguées lors de la représentation de l'évolution de $1/T_2^R$ en fonction de la température (**Figure 3.16**). Dans la région des basses températures, la vitesse de relaxation transversale réduite augmente avec la température. Dans cette zone d'échange lent, $\tau_M \gg T_{2M}$, et $1/T_2^R$ est directement déterminé par la vitesse d'échange de la molécule d'eau k_{ex} :

$$\frac{1}{T_2^R} = \frac{1}{\tau_M} \qquad [\mathbf{3.24}]$$

Dans la région des températures élevées, la vitesse de relaxation transversale réduite diminue avec la température. Dans cette zone d'échange rapide, $\tau_M \gg T_{2M}$, et $1/T_2^R$ est déterminé par la vitesse de relaxation transversale de l'oxygène de la molécule d'eau coordinées :

$$\frac{1}{T_2^R} = \frac{1}{T_{2M}} \qquad [\mathbf{3.25}]$$

Dans la zone d'échange intermédiaire où $\tau_M \sim T_{2M}$, l'équation **3.18** ne peut être simplifiée et tous les termes doivent être considérés.

La dépendance de $1/T_2^R$ en fonction de la température prend généralement la forme d'une parabole (**Figure 3.16**). Dans le cas d'un échange très rapide, aucune zone d'échange lent n'est observée.

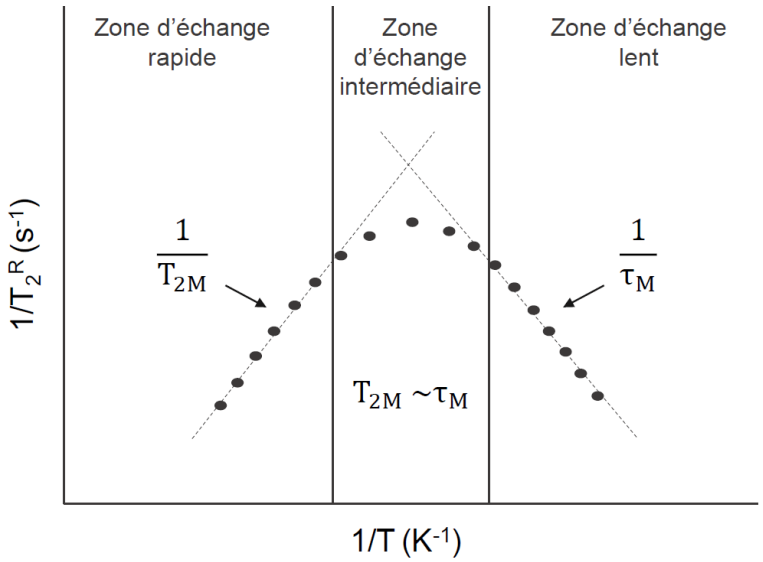


Figure 3.16. Représentation schématique de l'évolution de $1/T_2^R$ en fonction de la température [10]

Finalement, d'après la relation **3.17**, la vitesse de relaxation réduite peut simplement s'écrire de la manière suivante :

$$\frac{1}{T_2^R} = \frac{55{,}55}{q\,[Gd^{3+}]}\,\frac{1}{T_2^P} \qquad \textbf{[3.26]}$$

Dans le cadre de cette étude, le nombre d'hydratation q a préalablement été déterminé par la technique de fluorescence pour les complexes Eu(III) et Tb(III) dérivés d'un même ligand. Ainsi, la présence de deux molécules d'eau dans la première sphère de coordination pour l'ensemble des complexes Gd(III) est établie.

L'évolution de la vitesse de relaxation transversale réduite de l'oxygène-17 en fonction de la température (1000/T) des complexes L_2.**Gd**, L_4.**Gd** et L_9.**Gd** est reportée ci-après (**Figure 3.17**). Ces mesures n'ont pu être réalisées sur les complexe Gd(III)

dérivés des ligands possédant une fonction de coordination phosphinate en raison des fortes concentrations nécessaires à l'expérience. A des fins de comparaison, les profils du complexe parent PCTA[12].**Gd** ainsi que de la référence DOTA.**Gd** sont également présentés.

Les deux courbes relatives aux complexes L_2.**Gd** et L_4.**Gd** observent la même allure parabolique que celle du parent PCTA[12].**Gd** avec des maxima compris entre 290 et 295 K caractéristiques d'une vitesse d'échange intermédiaire à rapide. Le profil du complexe L_9.**Gd** diffère quant à lui nettement de celui du PCTA[12].**Gd** ou de la référence DOTA.**Gd**, puisqu'aucune zone de diminution de la vitesse de relaxation transversale réduite n'est observée sur cette gamme de température. Une analyse qualitative de ces données indique, de prime abord, que la vitesse d'échange de la(les) molécule(s) d'eau évolue dans l'ordre DOTA.**Gd** < PCTA[12].**Gd** < L_9.**Gd**.

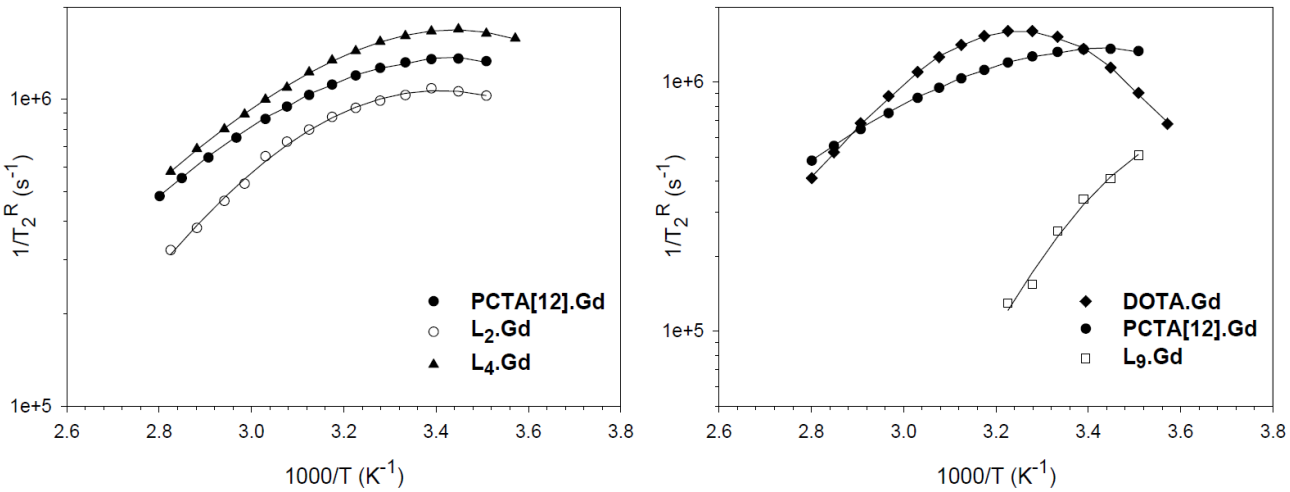


Figure 3.17. Evolution de la vitesse de relaxation transversale réduite de l'oxygène-17 en fonction de la température

Au vu des équations présentées précédemment, il est possible de quantifier le temps moyen de résidence des molécules d'eau τ_M ainsi que différents paramètres intervenant dans la vitesse de relaxation transversale réduite par ajustement théorique des données expérimentales.[26,27,28] En raison du faible nombre de points expérimentaux relatifs au complexe L_9.**Gd**, les valeurs de constante de couplage hyperfin $^{A}/_{\hbar}$ et d'énergie d'activation relative à τ_V ont été fixées pour un meilleur ajustement théorique. L'ensemble des résultats est rassemblé dans le tableau suivant (**Tableau 3.6**).

	DOTA.Gd	PCTA[12].Gd	L_2.Gd	L_4.Gd	L_9.Gd
τ_M^{310} (ns)	122 ± 10	82 ± 5	68,5 ± 3,8	69,7 ± 4,5	3,1 ± 0,2
${k_{ex}}^{310K}$ (10^6 s^{-1})	8,2	12,2	14,6	14,3	322,6
$\Delta H^{\#}$ ($kJ.mol^{-1}$)	50,1 ± 0,2	30,50 ± 0,09	38,8 ± 0,07	31,3 ± 0,09	65,5 ± 0,1
$\Delta S^{\#}$ ($J.mol^{-1}.K^{-1}$)	48,7 ± 0,2	-11,00 ± 0,02	17,1 ±0,2	-7,06 ± 0,3	129,0 ± 0,28
$A/\hbar$ (10^6 $rad.s^{-1}$)	-3,42 ± 0,03	-3,01 ± 0,02	-2,85 ± 0,19	-3,45 ± 0,02	-3,0(*)
B (10^{20} s^{-2})	1,94 ± 0,09	1,04 ± 0,03	3,97 ± 0,1	20,5 ± 0,5	8,8 ± 0,5
τ_V^{298} (ps)	11,4 ± 0,5	14,5 ± 0,4	6,30 ± 0,16	37,9 ± 0,9	6,5 ± 0,4

Tableau 3.6. Paramètres obtenus par ajustement théorique des points expérimentaux de la vitesse de relaxation transversale réduite de l'oxygène-17. (*) Paramètre fixé

Différents paramètres tels que le nombre d'hydratation, la charge globale du complexe, l'encombrement stérique du site de coordination, la nature des fonctions de coordination ou encore le mécanisme d'échange des molécules d'eau peuvent en fait influer sur la valeur du temps de résidence τ_M. Concernant les mécanismes d'échange, ceux-ci peuvent être de deux types (**Figure 3.18**) :

- un mécanisme dissociatif (D) pour lequel la molécule d'eau de première sphère est d'abord dissociée du cation paramagnétique puis remplacée par une molécule d'eau du solvant,
- un mécanisme associatif (A) pour lequel la molécule d'eau du solvant se coordine d'abord au cation paramagnétique puis la molécule d'eau de première sphère est dissociée.

Le mécanisme réel est souvent intermédiaire (I) à ses deux formes limites, et aucun intermédiaire cinétique ne peut être identifié. Les complexes de gadolinium(III) possédant un nombre de coordination de 9 ont tendance à avoir un mécanisme à caractère dissociatif ou intermédiaire-dissociatif, tandis que le complexe $Gd(H_2O)_n$ suit un mécanisme à caractère associatif en raison de son nombre de coordination de 8 ou 9 et la présence d'une sphère de coordination flexible.[29]

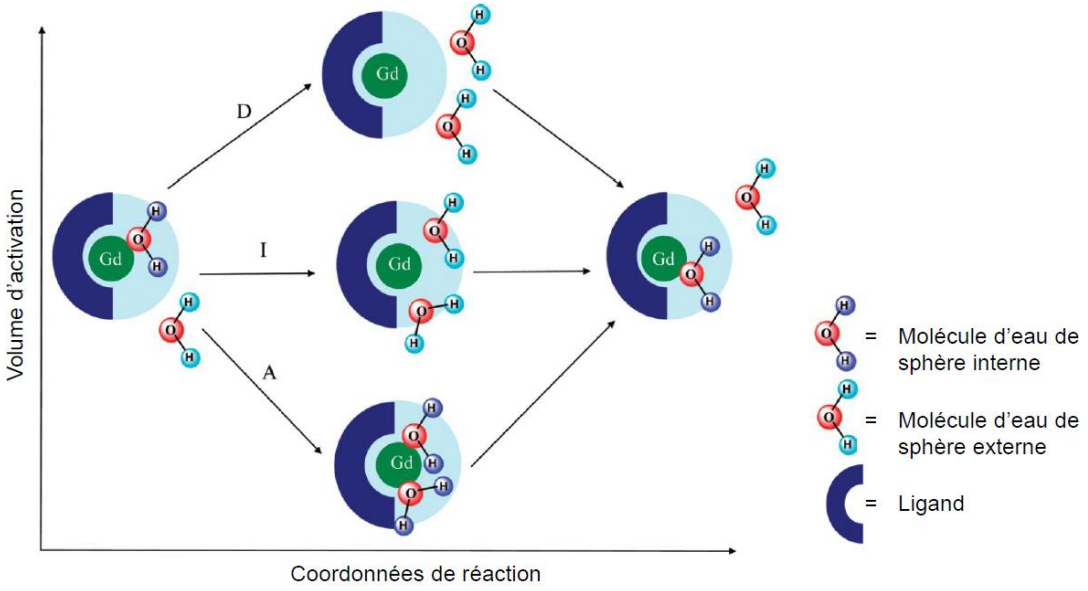
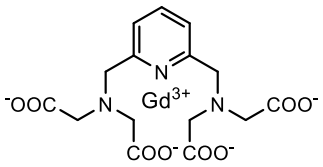


Figure 3.18. Représentation schématique des mécanismes d'échange d'une molécule d'eau de solvant. D'après l'article de Datta *et al.*[30]

De manière générale, les complexes bis-hydratés PCTA[12].**Gd**, L_2.**Gd**, L_4.**Gd** et L_9.**Gd** présentent des vitesses d'échanges au moins 50 % plus élevées que la référence DOTA.**Gd**. En effet, la présence de deux molécules d'eau rend la sphère de coordination plus flexible, facilitant le mécanisme dissociatif.

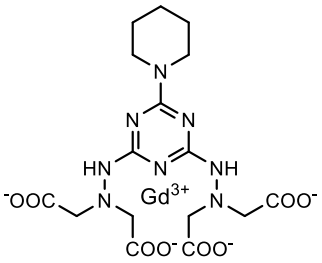
Ainsi, les temps de résidence obtenus pour les complexes L_2.**Gd** et L_4.**Gd** sont légèrement inférieurs à ceux obtenus pour le complexe PCTA[12].**Gd**, et correspondent à 68,5 et 69,7 ns à 310 K respectivement. Si la plus faible valeur de τ_M du complexe L_2.**Gd** était à prévoir en raison de la charge globale négative du complexe, celle du complexe L_4.**Gd** est toutefois surprenante. En effet, ce résultat est contraire à ce qui a été démontré dans le cas du DTPA, où une fonction carboxylate a été substituée par une fonction amide. Le complexe Gd(III) dérivé du ligand monoamide possède une vitesse d'échange deux fois moins élevée que celle du complexe DTPA.**Gd** (k_{ex} = 1,9.10^6 s^{-1} contre 4,1.10^6 s^{-1} pour le DTPA).[31]

Le complexe L_9.**Gd** se démarque, quant à lui, des ligands à noyau pyridine par ses valeurs de τ_M de 3,1 ns (k_{ex} = 323.10^6 s^{-1}) à 310 K et 9,0 ns (k_{ex} = 111.10^6 s^{-1}) à 298 K particulièrement faibles. Ces valeurs sont bien inférieures à celles observées pour la plupart des complexes heptadentates bis-hydratés, dont quelques exemples sont représentés dans la figure ci-après (**Figure 3.19**), et se rapprochent de celles de l'ion gadolinium ($[Gd(H_2O)_8]^{3+}$: τ_M^{298K} = 1,2 ns).



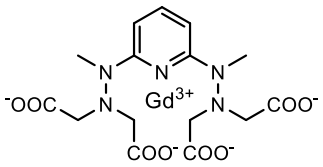
[PMNTA.Gd]$^-$

r_1 = 5,7* $mM^{-1}.s^{-1}$
τ_M = 107,5 ; 35,2* ns
k_{ex} = 9,3 ; 28,4* x 10^6 s^{-1}



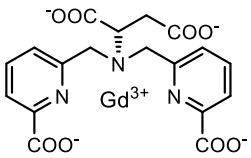
[PTDITA.Gd]$^-$

r_1 = 10,2 ; 8,1* $mM^{-1}.s^{-1}$
τ_M = 299 ns
k_{ex} = 3,3 x 10^6 s^{-1}



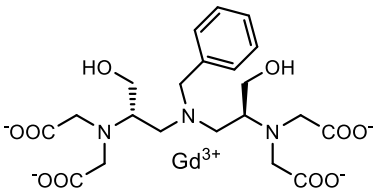
[HYD.Gd]$^-$

r_1 = 7,7 $mM^{-1}.s^{-1}$
τ_M = 128 ns
k_{ex} = 7,8 x 10^6 s^{-1}



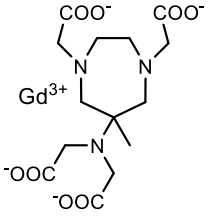
[dpaba.Gd]$^-$

r_1 = 7,2 $mM^{-1}.s^{-1}$
τ_M = 82 ns
k_{ex} = 12,2 x 10^6 s^{-1}



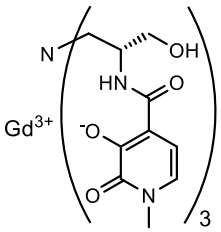
[DTTA(CH_2OH)$_2$-Bn.Gd]$^-$

r_1 = 8,7* $mM^{-1}.s^{-1}$
τ_M = 13 ns
k_{ex} = 77 x 10^6 s^{-1}



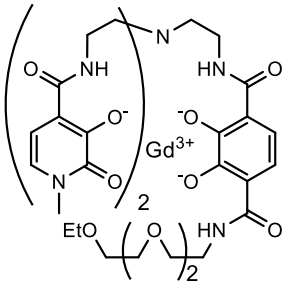
[AAZTA.Gd]$^-$

r_1 = 7,1 $mM^{-1}.s^{-1}$
τ_M = 90 ns
k_{ex} = 11,1 x 10^6 s^{-1}



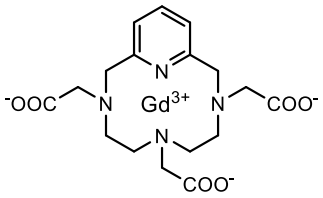
[tris(2-hydroxymethyl)-TREN-Me-3,2-HOPO.Gd]^0

r_1 = 9,0 $mM^{-1}.s^{-1}$
τ_M = 16 ns
k_{ex} = 62,5 x 10^6 s^{-1}



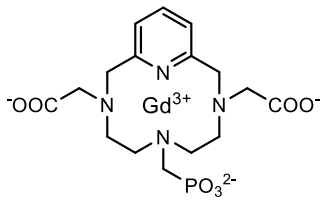
[TREN-bis(6-Me-HOPO-(TAM-TRI).Gd]$^-$

r_1 = 8,9 $mM^{-1}.s^{-1}$
τ_M = 19 ns
k_{ex} = 52,6 x 10^6 s^{-1}



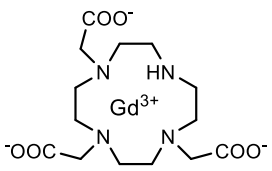
[PCTA[12].Gd]^0

r_1 = 6,9 ; 5,4* $mM^{-1}.s^{-1}$
τ_M = 70 ; 82* ns
k_{ex} = 14,3 ; 12,2* x 10^6 s^{-1}



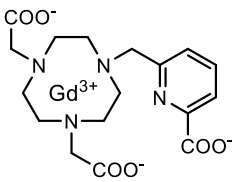
[PCP2A.Gd]$^-$

r_1 = 8,3 $mM^{-1}.s^{-1}$
τ_M = 50 ns
k_{ex} = 14,3 ; 12,2* x 10^6 s^{-1}



[DO3A.Gd]^0

r_1 = 6,0 $mM^{-1}.s^{-1}$
τ_M = 160 ns
k_{ex} = 6,25 x 10^6 s^{-1}



[mpatcn.Gd]^0

r_1 = 6,6 $mM^{-1}.s^{-1}$
τ_M = 16,7 ns
k_{ex} = 60 x 10^6 s^{-1}

Figure 3.19. Paramètres relaxométriques à 298 K (310 K*) de complexes Gd(III) bis-hydratés : PMNTA.**Gd**,[32,33] PTDITA.**Gd**,[34] HYD.**Gd**,[35] dpaba.**Gd**,[23] DTTA(CH_2OH)$_2$-Bn.Gd,[36] AAZTA.**Gd**,[22,37] Tris(2-hydroxymethyl)-TREN-Me-3,2-HOPO.**Gd**,[38] TREN-bis(6-Me-HOPO-(TAM-TRI).**Gd**,[34,39] PCTA[12].**Gd**,[12,21] PCP2A.**Gd**,[18] DO3A.**Gd**,[12] mpatcn.**Gd**.[22] Les valeurs de relaxivité r_1 sont données à 20 MHz

La vitesse d'échange k_{ex} pour L9.**Gd** est notamment 27 fois plus élevée que celle du complexe PCTA[12].**Gd** à 298 K. Le seul effet de la présence d'une charge globale négative au niveau du complexe L9.**Gd** ne permet pas d'expliquer totalement cette forte augmentation de k_{ex}. L'augmentation dans la vitesse d'échange entre ces deux complexes peut être attribuée à l'augmentation de l'encombrement stérique au niveau du site de coordination des molécules d'eau résultant de la présence de deux pseudocycles chélatants à 6 chaînons dans L9.**Gd**. Cet argument repose sur les travaux de Merbach *et al.*, qui ont démontré que l'augmentation d'un chaînon de l'un des groupes éthylène du ligand DOTA se traduisait par une vitesse d'échange 66 fois plus élevée.[40]

Cette différence stérique entre pseudocycles à 5 et 6 chaînons a également été observée au niveau de la modification des chaînes latérales coordinantes du DOTA. Le remplacement d'un noyau pyridine par des noyaux pyridine *N*-oxyde ou phénol se traduit par une accélération de la vitesse d'échange par un facteur 10 ou 710 respectivement (**Figure 3.20**).[41,42,43]

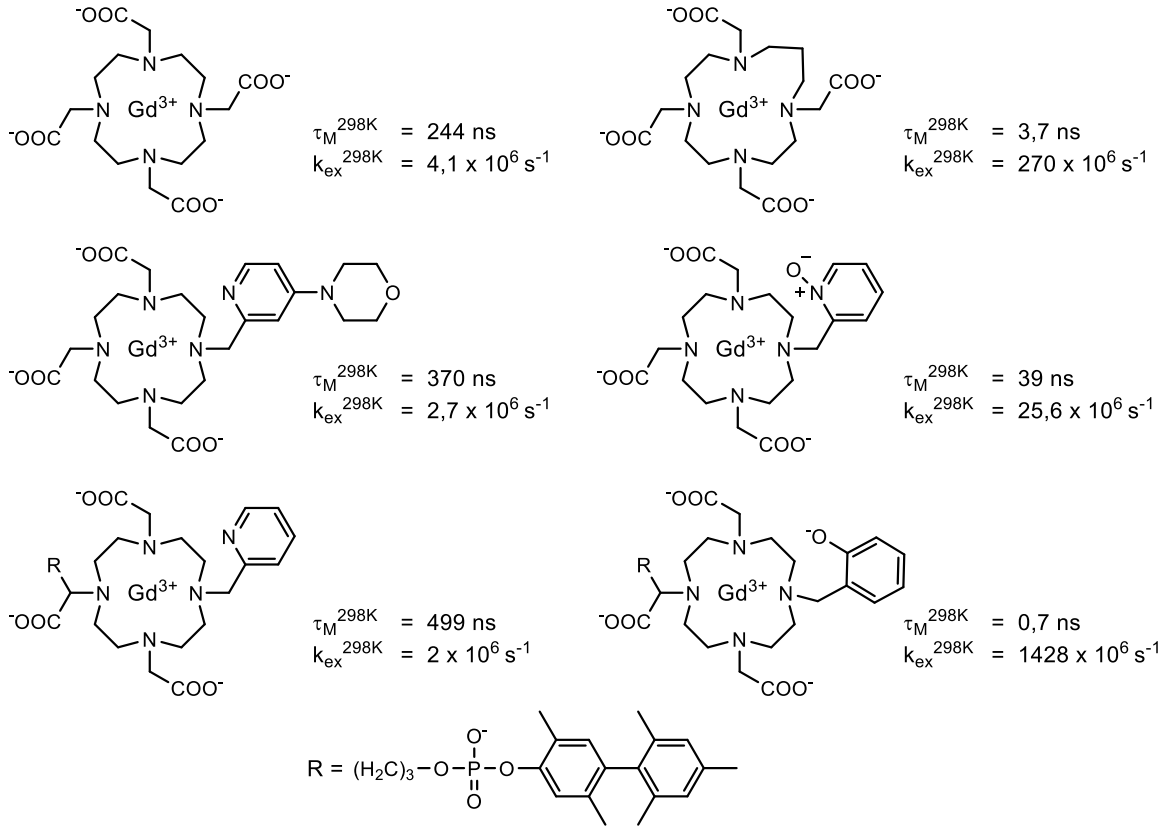


Figure 3.20. Temps de résidence et vitesse d'échange de complexes de gadolinium monohydratés dérivés du ligand DOTA

Cette valeur de τ_M a toutefois un impact limité sur la valeur de la relaxivité. A 20 MHz et 310 K, sa relaxivité est de 5,7 $mM^{-1}.s^{-1}$, soit une augmentation de seulement 7 % par rapport à celle de PCTA[12].**Gd**. Ce résultat est en accord avec le fait que la relaxivité de ces petits chélates est essentiellement gouvernée par la valeur de temps de corrélation τ_R, et confirme les résultats obtenus lors de l'étude de la variation du r_1 en fonction de la température. Il est également à noter qu'en raison du faible nombre de points expérimentaux, il serait ici nécessaire d'obtenir des informations supplémentaires sur la relaxation électronique, accessibles par des mesures de résonance paramagnétique électronique (RPE). Néanmoins, cette valeur de τ_M (9 ns à 298 K) se situe dans la zone des valeurs optimales de τ_M (10 – 30 ns) pour des applications d'imagerie à faible champ (0,5 Tesla).[44] Celle-ci devrait notamment permettre d'atteindre des valeurs de relaxivité r_1 plus élevées si le complexe L_9.**Gd** venait à être conjugué à des édifices macromoléculaires (dendrimères, polysaccharides, nanoparticules) permettant d'augmenter de manière significative la valeur du temps de corrélation rotationnel du système.

3.2.3 Profils NMRD et détermination du temps de corrélation rotationnel τ_R

La relaxivité d'un agent de contraste dépend de plusieurs variables physiques parmi lesquelles la température et le champ magnétique. Comme évoqué précédemment, l'étude de la relaxivité d'un complexe en fonction de la température permet d'obtenir des informations essentielles relatives à la vitesse d'échange des molécules d'eau en première sphère de coordination. Le champ magnétique n'affectant pas l'état chimique de l'échantillon étudié, l'étude de la relaxivité d'un complexe en fonction de celui-ci constitue, quant à elle, un outil particulièrement intéressant pour l'appréhension des mécanismes d'interaction et des processus dynamiques influençant le comportement de relaxation.

En utilisant la technique de relaxométrie à champ cyclé, il est possible de mesurer les vitesses de relaxation du spin du noyau étudié en fonction du champ magnétique, sur une gamme de fréquence allant de 0,01 à 40 MHz. Le profil obtenu est appelé profil relaxométrique ou profil NMRD (Nuclear Magnetic Relaxation

Dispersion), et permet notamment d'accéder à une bonne estimation de plusieurs paramètres tels que le temps de corrélation rotationnelle τ_R, le temps de corrélation relatif à la relaxation électronique τ_V, ou encore τ_M et q. Les profils NMRD sont cependant dépendants de nombreux paramètres relatifs aux contributions des sphères interne et externe, rendant leur analyse complexe. De ce fait, plusieurs de ces paramètres sont préalablement déterminés par des techniques complémentaires, et sont fixés lors de l'ajustement théorique. Il s'agit notamment du nombre d'hydratation q, obtenu par luminescence, du temps moyen de résidence des molécules d'eau obtenu par RMN de l'oxygène-17, et parfois du temps de relaxation électronique T_{ie} obtenu par mesures de RPE, ainsi que de la distance spin nucléaire - spin électronique r_{GdH} (**§ 3.1**).

La relaxivité dépend donc du champ magnétique, que ce soit de manière directe (**éq. 3.11**) ou indirecte, à travers la dépendance des temps de relaxation électronique (**éq. 3.13** et **3.14**). Ainsi, à bas champs ($\leq 3-4$ MHz), la relaxivité est déterminée par le temps de relaxation électronique. A hauts champs, c'est le temps de corrélation rotationnelle qui détermine la relaxivité, entraînant un extremum autour de 30 MHz. La valeur de ce maximum est, de plus, largement influencée par le temps moyen de résidence des molécules d'eau en première sphère de coordination. Aux champs cliniques actuellement utilisés, la relaxivité de complexes de gadolinium de faible poids moléculaire est largement dominée par leur temps de corrélation rotationnelle, et par la vitesse d'échange des molécules d'eau dans une moindre mesure. La relaxivité sera alors d'autant plus élevée que le temps de corrélation rotationnelle sera long (**Figure 3.21**).

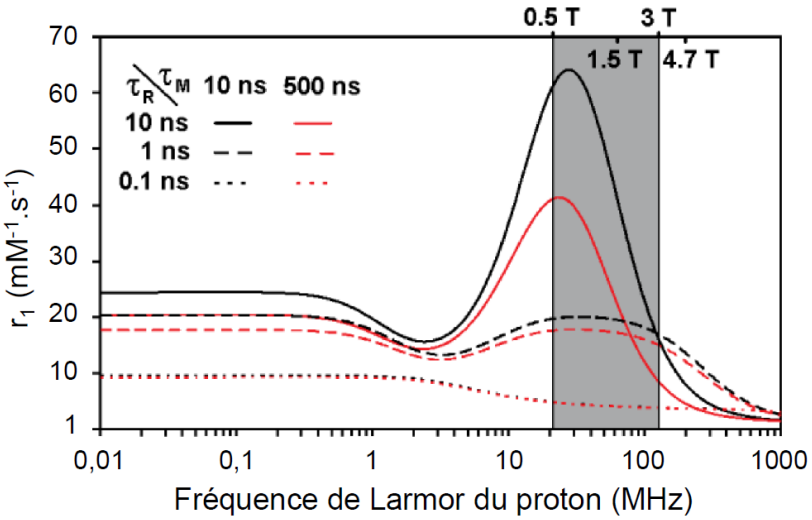


Figure 3.21. Simulation de la relaxivité en fonction de la fréquence de Larmor du proton (profils NMRD calculés) à T = 310 K, τ_V^{298} = 40 ps, $\Delta^2 = 10^{19}\ s^{-2}$ et r_{GdH} = 0,31 nm. La zone grise représente la gamme de champs magnétique actuellement utilisés en clinique [45]

L'évolution de la relaxivité longitudinale a donc été mesurée en fonction du champ magnétique à 310 K (**Figure 3.22**). Les valeurs de relaxivité obtenues à 20 MHz et 310 K (**§ 3.2.1**) et celles obtenues à la même fréquence par les profils NMRD sont identiques pour tous les complexes.

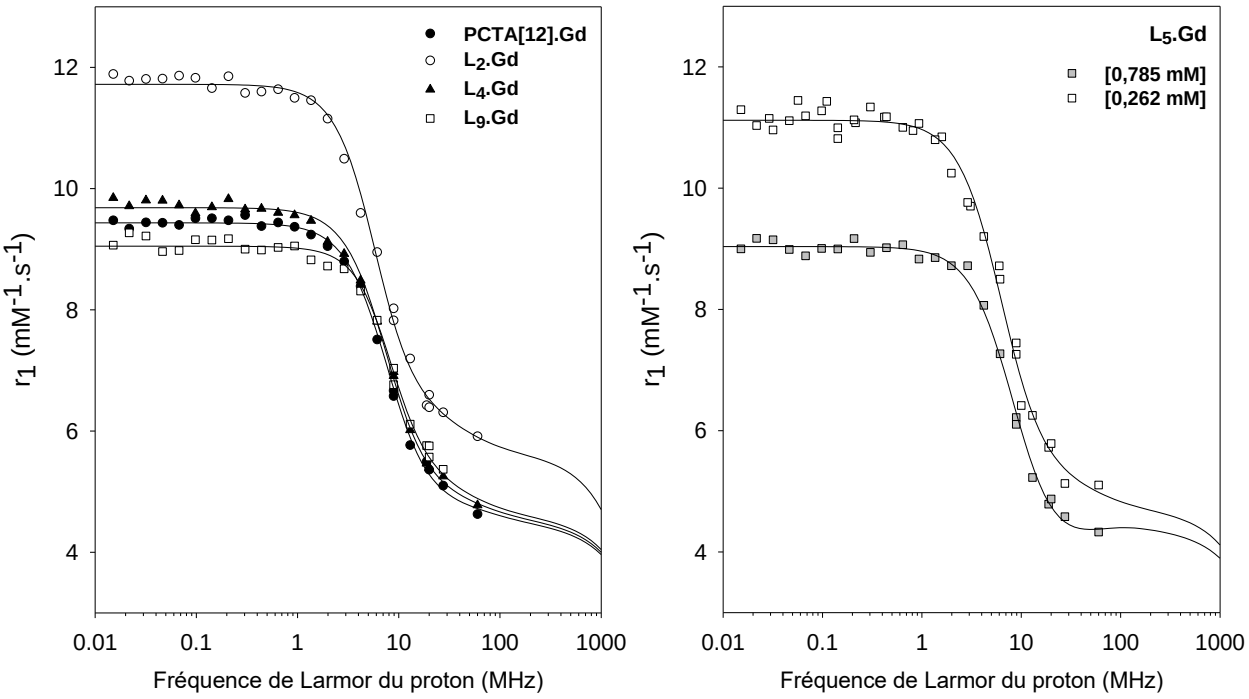


Figure 3.22. Profils de relaxivité ^{1}H NMRD des complexes PCTA[12].**Gd**, L_2.**Gd**, L_4.**Gd** et L_9.**Gd** (à gauche) et profils de relaxivité ^{1}H NMRD du complexe L_5.**Gd** à différentes concentration obtenus (à droite) à 310 K. Les lignes représentent les ajustements théoriques

Tous les profils relaxométriques des complexes étudiés possèdent la même allure caractéristique des complexes de faible poids moléculaire, à savoir deux régions avec des valeurs de r_1 semblables, une à bas champ et l'autre à haut champ, ainsi qu'une dispersion de ces valeurs entre 1 Hz et 20 MHz. Les profils des composés PCTA[12].**Gd**, L4.**Gd** et L9.**Gd** sont quasiment identiques, malgré une plus forte relaxivité pour les complexes PCTA[12].**Gd** et L4.**Gd** par rapport à L9.**Gd** à bas champs. Ceci démontre une nouvelle fois que la valeur de τ_M n'a que peu d'influence sur la relaxivité à 310 K de petits chélates de gadolinium. La relaxivité des composés L2.**Gd** et L6.**Gd** est, quant à elle, supérieure à celles des trois autres complexes quelle que soit la valeur du champ magnétique. Ce résultat est parfaitement cohérent avec un poids moléculaire plus élevé pour ces composés.

Dans le cas du complexe L5.**Gd**, les profils NMRD enregistrés à différentes concentrations révèlent une baisse de la relaxivité sur toute la gamme de champs magnétiques lorsque la concentration augmente.

Pour l'ajustement théorique des données expérimentales, les paramètres suivants ont été fixés : q = 2 déterminé par fluorescence ; d = 0,36 nm la distance d'approche minimale ; r_{GdH} = 0,31 nm la distance entre le proton de la molécule d'eau liée et l'ion Gd(III) ; D = 3300 $\mu m^2.s^{-1}$ la constante de diffusion relative et τ_M déterminée pour chacun des complexes par RMN de l'oxygène-17. Les valeurs des paramètres τ_R, τ_{S0} et τ_V, ont ainsi pu être déterminées et sont regroupées dans le tableau suivant (**Tableau 3.7**). L'ajustement théorique des complexes L5.**Gd** et L6.**Gd** n'a cependant pas été réalisé puisque le paramètre τ_M, nécessaire au fitting, n'a pu être obtenu.

De manière générale, les valeurs du temps de corrélation τ_R sont voisines (entre 50 et 70 ps) pour l'ensemble des complexes présentés dans cette étude. Comme attendu, le complexe dérivé du ligand **H_4L_2**, à plus fort poids moléculaire, possède une valeur de τ_R la plus élevée, égale à 68,5 ps.

	τ_M^{310} (ns)	τ_R^{310} (ps)	τ_{S0}^{310} (ps)	τ_V^{310} (ps)	r_1^{310} ($s^{-1}.mM^{-1}$)
DOTA.**Gd**	122 ± 10 (244)	53,0 ± 1,3 (77)	404 ± 24	7 ± 1	3,5 (4,7)
DO3A.**Gd**	(160)	(66)	-	-	(6,0)
AAZTA.**Gd**	(90)	(74)	-	-	(7,1)
PMNTA.**Gd**	35,2 (108)	56 (92)	205	12,9	5,7
PCTA[12].**Gd**	82 ± 5	56	129	19	5,4 (6,9)
L_2.**Gd**	68,5 ± 3,8	68,5 ± 1,5	106,0 ± 3,3	21,9 ± 2,2	6,7 (8,7)
L_4.**Gd**	69,7 ± 4,5	51,3 ± 1,6	87,2 ± 3,8	14,8 ± 1,6	5,5 (7,1)
L_9.**Gd**	3,1 ± 0,2 (9,0)	52,8 ± 1,4	69,2 ± 2,0	19,4 ± 1,7	5,7 (7,2)

Tableau 3.7. Valeurs de τ_M, de τ_R, de τ_{S0} et de τ_V obtenues par ajustement théorique des profils NMRD. Les valeurs entre parenthèses ont été obtenues à 298 K

Les valeurs présentées dans ce tableau permettent d'illustrer de manière pertinente l'influence des différents paramètres sur la relaxivité globale du complexe. Ainsi, le premier paramètre ayant un rôle prépondérant sur la relaxivité est le nombre de molécules d'eau en première sphère de coordination. En effet, le fait de passer d'un complexe monohydraté tel le DOTA.**Gd** (r_1 = 4,7 $mM^{-1}.s^{-1}$ à 298 K) à des complexes bis-hydratés entraîne une augmentation significative de la relaxivité (r_1 = 6,0 $mM^{-1}.s^{-1}$ à 298 K pour DO3A.**Gd**).

Pour chacun des complexes bis-hydratés, la relaxivité globale semble, de plus, être directement proportionnelle au temps de corrélation rotationnelle. En effet, en prenant les exemples des complexes PCTA[12].**Gd** et L_2.**Gd**, la relaxivité est de 5,4 $mM^{-1}.s^{-1}$ pour une valeur de τ_R de 56 ps dans le premier cas, tandis qu'elle est égale à 6,7 $mM^{-1}.s^{-1}$ pour une valeur de τ_R de 68,5 ps à 310 K dans le deuxième, c'est-à-dire une progression de 1,2 pour r_1 et τ_R pour L_2.**Gd**.

Il est également intéressant de constater que les valeurs de relaxivité de tous les complexes varient de 4,9 à 6,7 $mM^{-1}.s^{-1}$ quelle que soit la valeur du temps de résidence des molécules d'eau en première sphère de coordination τ_M. Ainsi, malgré une valeur de τ_M 27 fois plus faible, le composé L_9.**Gd** présente une relaxivité de 5,7 $mM^{-1}.s^{-1}$ du même ordre de grandeur que celle du complexe PCTA[12].**Gd**.

Ces différents résultats sont une nouvelle fois en accord avec le fait que la relaxivité est limitée par le temps de corrélation rotationnelle des complexes de gadolinium à faible poids moléculaire.

3.2.4 Transmétallation : stabilité vis-à-vis des ions Zn^{2+}

En vue de l'utilisation d'un complexe de gadolinium en tant qu'agent de contraste, une attention particulière doit être portée à son inertie cinétique, en raison de la forte toxicité de l'ion gadolinium libre. Si de nombreux cations endogènes tels que le fer, le cuivre, ou le calcium peuvent conduire au relargage *in vivo* de l'ion gadolinium(III), seul le zinc peut efficacement déplacer l'équilibre de complexation en raison de sa forte abondance dans le sérum (supérieure à 50 µM). Il constitue donc un élément de choix lors d'une étude de transmétallation.

Dans ce cadre, la résistance à la transmétallation des complexes L_2.**Gd** et L_9.**Gd** a été évaluée suivant un protocole basé sur la technique de relaxométrie en milieu tampon phosphate décrit par Laurent *et al*.[46] Cette méthode a, de plus, été employée par de nombreux groupes de recherche.[47,48,49,50,51] La stabilité du complexe L_4.**Gd** n'a pas été étudiée en raison de l'excès de ligand présent dans l'échantillon. La transmétallation des complexes de Gd(III) par les ions diamagnétiques Zn(II) entraîne le relargage d'ions gadolinium en solution (**éq. 3.26 – 3.28**). En présence des ions phosphates apportés par le tampon, les ions Gd(III) libres vont former un sel $GdPO_4$ insoluble et ne contribueront plus à la relaxivité de la solution : une chute de la vitesse de relaxation sera alors observée. L'évolution de cette vitesse de relaxation en fonction du temps permet donc d'estimer ce processus de transmétallation.

$$\mathrm{Gd-L^{(n)-} \rightleftharpoons L^{(n+3)-} + Gd^{3+}} \qquad \textbf{[3.26]}$$

$$\mathrm{L^{(n+3)-} + Zn^{2+} \rightleftharpoons Zn- L^{(n+1)-}} \qquad \textbf{[3.27]}$$

$$\mathrm{Gd^{3+} + {PO_4}^{3-} \rightarrow Gd(PO_4)_{insoluble}} \qquad \textbf{[3.28]}$$

Les temps de relaxation longitudinale pour les complexes [L_2.**Gd**]$^-$ et [L_9.**Gd**]$^-$ ont été mesurés à 20 MHz et à 310 K sur une période de dix jours, en présence de $ZnCl_2$ en concentration équimolaire et dans le tampon phosphate. Afin de pouvoir comparer

plus facilement les complexes entre eux, deux indices ont été définis arbitrairement. L'indice « cinétique » correspond au temps nécessaire pour atteindre 80 % de la vitesse de relaxation initiale $R_1^P(0)$ et l'indice « thermodynamique » représente le rapport $R_1^P(t)/R_1^P(0)$ après 72 heures d'incubation. La stabilité des complexes Gd(III) en présence du tampon phosphate et en absence du compétiteur zincique a préalablement été vérifiée. Dans ces conditions, aucune baisse du rapport $R_1^P(t)/R_1^P(0)$ n'a été observée sur trois jours, ce qui atteste de la stabilité des complexes face aux anions phosphate, et exclut la formation de complexes ternaires avec ces anions.

Les cinétiques de transmétallation des complexes L_2.**Gd** et L_9.**Gd** en présence d'ions Zn(II) sont reportées dans la figure suivante (**Figure 3.23**) ainsi que celles du parent PCTA[12].**Gd** et de la structure acyclique DTPA.**Gd**.

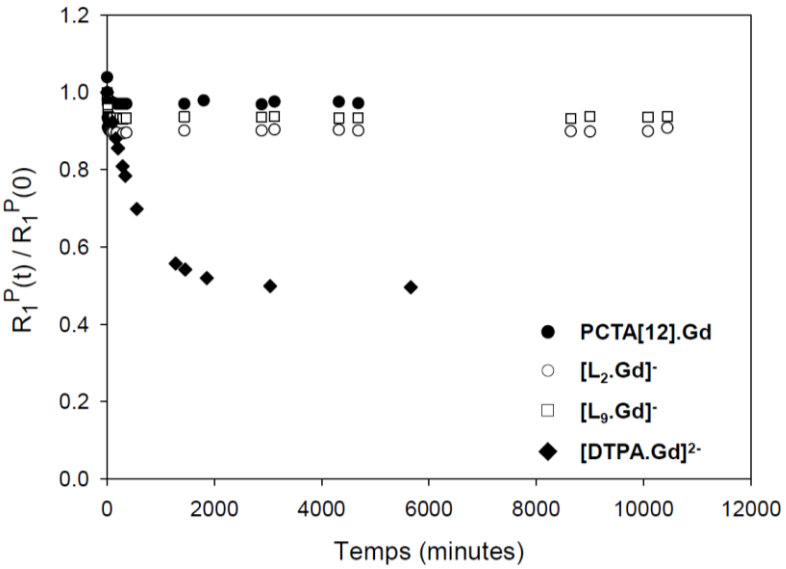


Figure 3.23. Evolution du rapport $R_1^P(t)/R_1^P(0)$ en fonction du temps des solutions de complexes Gd(III) (2,5 mM) en présence de Zn^{2+} (2,5mM) dans le tampon phosphate (pH = 7). Les mesures sont réalisées à 20 MHz et 310 K

Contrairement à celle du complexe DTPA.**Gd**, la vitesse de relaxation des complexes dérivés de ligands macrocycliques varie très peu tout au long de la période de mise en présence d'ions compétiteurs Zn^{2+}. Si l'indice cinétique est atteint en moins de 5 heures pour le chélate acyclique, le rapport $R_1^P(t)/R_1^P(0)$ des complexes PCTA[12].**Gd**, L_2.**Gd** et L_9.**Gd** reste supérieur à 90 % après 3 jours d'observation, et jusqu'à 10 jours pour certains d'entre eux (**Tableau 3.8**). Comme attendu, ces résultats

coïncident parfaitement avec une inertie cinétique élevée dans le cas de complexes dérivés de ligands macrocycliques.

	DTPA.Gd	**PCTA[12].Gd**	**L_2.Gd**	**L_9.Gd**
$R_1^P(t)/R_1^P(0) = 0,80$ (en minutes)	290	-	-	-
$R_1^P(t)/R_1^P(0)$ à 72h	0,48	0,98	0,90	0,93

Tableau 3.8. Valeurs des indices cinétique et thermodynamique des complexes DTPA.**Gd**, PCTA[12].**Gd**, L_2.**Gd** et L_9.**Gd**

3.3 Conclusion

En conclusion, cette étude relaxométrique aura permis de montrer que la substitution d'une fonction de coordination acide acétique du ligand PCTA[12] par une fonction amide ne semble pas avoir de réelle influence sur les valeurs de relaxivité du complexes Gd(III) correspondant. En ce qui concerne les complexes Gd(III) dérivés des ligands **H_3L_5** et **H_4L_6**, présentant une fonction acide phosphinique, une baisse de la relaxivité est observée lorsque la concentration augmente. L'hypothèse de la formation d'espèces dimériques aux concentrations élevées, excluant alors une molécule d'eau de la sphère de coordination du lanthanide et entrainant une chute de la relaxivité, a été avancée. L'ensemble des complexes Gd(III) de cette étude présente cependant des valeurs de relaxivité r_1 comprises entre 5,5 et 6,9 $mM^{-1}.s^{-1}$ à 20 MHz et 310 K, parfaitement en adéquation avec un nombre d'hydratation de deux.

A l'exception du complexe L_9.**Gd**, les temps de résidence des molécules d'eau τ_M des complexes Gd(III) présentés sont légèrement inférieurs à celui du complexe parent PCTA[12].**Gd** et sont de l'ordre de 70 ns. Les valeurs de τ_M des complexes L_5.**Gd** et L_6.**Gd** n'ont, quant à elles, pas pu être déterminées en raison de la faible solubilité de ces composés en solution aqueuse. Le complexe L_9.**Gd** se démarque particulièrement par la vitesse d'échange des molécules d'eau de sa première sphère de coordination avec celles du solvant (k_{ex}^{298K} = 111.10^6 s^{-1}), très proche de celle de l'ion gadolinium coordiné uniquement par des molécules d'eau $[Gd(H_2O)_8]^{3+}$ (k_{ex}^{298K} = 833.10^6 s^{-1}).

Les temps de corrélation rotationnelle τ_R de tous les complexes Gd(III) sont comparables entre eux et sont compris entre 50 et 70 ps. Ces valeurs, relativement faibles, sont en accord avec la présence de chélates de gadolinium de faible poids moléculaire. Le couplage de ces complexes à des macromolécules devrait permettre d'augmenter les temps de corrélation rotationnelle, et donc la relaxivité globale.

Pour finir, les complexes L_2.**Gd** et L_9.**Gd** présentent une très bonne stabilité cinétique vis-à-vis au zinc, un des ions les plus abondants dans le sang humain. Cette résistance à la transmétallation est extrêmement importante dans le cadre d'une utilisation de ces complexes en tant qu'agent de contraste pour l'IRM.

4 Vers l'amélioration de l'effet d'antenne

Cette dernière partie se concentrera sur l'amélioration des propriétés de luminescence des complexes Eu(III) et Tb(III) du macrocycle PCTA[12]. En effet, malgré des rendements quantiques de 3 et 13 % pour PCTA[12].**Eu** et PCTA[12].**Tb**, ces complexes présentent une longueur d'excitation maximale située à 270 nm, non optimale pour une utilisation dans un contexte biologique. Deux stratégies, basées sur deux types de chromophores intracycliques ont été envisagées dans le but de pallier cette limitation. Tout en gardant le noyau pyridine du ligand PCTA[12], la première fait intervenir le couplage d'un second chromophore sur l'unité aromatique ou l'extension de sa conjugaison. La seconde stratégie est basée sur la substitution du noyau pyridine par un noyau phénol.

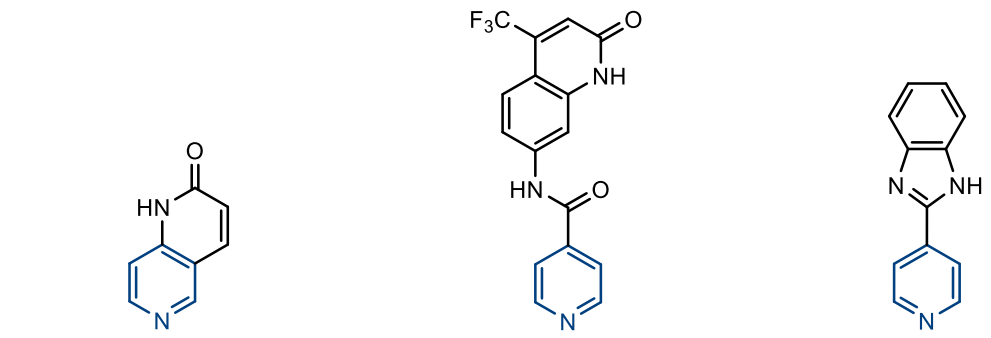
4.1 Etude photophysique des ligands à noyau pyridine H_3L_7 et H_3L_8 et des complexes dérivés

Comme précisé dans le Chapitre 2, une première évaluation photophysique de chromophores modèles a d'abord été effectuée avant d'envisager la substitution du noyau pyridine du ligand **H_3PCTA[12]**. Les chromophores retenus ont ensuite été intégrés à la structure macrocyclique et l'évaluation des ligands **H_3L_7** et **H_3L_8** et de leurs complexes de lanthanides a été réalisée.

4.1.1 Evaluation photophysique des chromophores modèles

Trois chromophores modèles ont initialement été retenus pour cette étude préliminaire. Ces chromophores possèdent tous un noyau pyridine au sein de leur structure, auquel est couplé une seconde antenne comme pour le composé Py-cs124-

CF_3 **65**, ou présentent une extension de conjugaison comme pour les composés 1,6-naphthyridine-2(*1H*)-one ou Py-HBim **68** (**Figure 3.24**).



1,6-Naphthyridine-2(*1H*)-one | Py-cs124-CF_3 **65** | Py-HBim **68**

Figure 3.24. Structure des chromophores envisagés

Propriétés d'absorption des chromophores modèles

Les chromophores modèles ont d'abord été caractérisés par leurs propriétés d'absorption dans le méthanol et à température ambiante. Les données obtenues sont rassemblées dans le tableau ci-dessous (**Tableau 3.9**). Le critère essentiel auquel doivent répondre ces chromophores est un coefficient d'extinction molaire acceptable à 337 nm, longueur d'onde d'excitation d'un laser à azote.

	λ (nm)	**ε ($M^{-1}.cm^{-1}$)**
Naphthyridine	241 / 308 337	9 400 / 5 800 300
Py-cs124-CF_3 **65**	243 / 305 / 348 337	13 400 / 8 700 / 14 000 11 200
Py-HBim **68**	243 / 312 337	8 300 / 22 800 6 000

Tableau 3.9. Caractéristiques d'absorption des chromophores modèles dans le méthanol

Les spectres d'absorption sont caractérisés par la présence de plusieurs bandes d'absorption dans le domaine UV (transitions $\pi \rightarrow \pi^*$) centrées sur les plages 241 – 243 nm et 305 – 312 nm pour les trois chromophores, ainsi que d'une bande supplémentaire à 348 nm dans le cas du composé Py-cs124-CF_3 **65**. La bande caractéristique du chromophore benzimidazole non substitué à 275 nm est déplacée vers les longueurs d'onde de plus faible énergie (312 nm) dans le spectre d'absorption,

mettant en évidence la présence de l'extension de conjugaison.[52] Les propriétés d'absorption du motif cs124-CF_3 n'apparaissent pas modifiées par l'introduction du noyau pyridine, suggérant l'absence d'une délocalisation des électrons entre ces deux motifs.[53]

Au vu des données rapportées, le dérivé de la naphthyridine ne semble pas être adapté en raison d'un faible coefficient d'extinction molaire de 300 $M^{-1}.cm^{-1}$ à 337 nm. Seuls les chromophores Py-cs124-CF_3 **65** et Py-HBim **68** répondent favorablement au critère de sélection et possèdent des coefficients d'extinction molaire corrects de 11 200 et 6 000 $M^{-1}.cm^{-1}$ respectivement à cette longueur d'onde : ces deux composés ont donc été évalués de manière plus approfondie.

Fluorescence et phosphorescence des chromophores modèles

Comme évoqué précédemment, la luminescence de l'ion lanthanide résulte d'un mécanisme en plusieurs étapes impliquant le premier état singulet excité S_1 et l'état triplet T_1 du chromophore, ainsi que les états émissifs de l'ion considéré. La position de ces différents niveaux énergétiques est donc un paramètre essentiel à prendre en compte en vue d'évaluer l'efficacité et la compatibilité d'un chromophore vis-à-vis d'un ion lanthanide luminescent. Pour une sensibilisation efficace et irréversible de l'ion Eu(III), l'état triplet du chromophore doit se situer à une énergie d'au moins 20 300 cm^{-1}, tandis qu'il doit se situer autour de 22 500 cm^{-1} dans le cas de l'ion Tb(III).

L'excitation des deux chromophores modèles Py-cs124-CF_3 **65** et Py-HBim **68** au niveau de leur bande d'absorption de plus faible énergie se traduit par une large bande structurée dont le maximum d'émission se situe à 389 nm pour le premier, et par une large bande d'émission non structurée centrée sur 382 nm pour le second (**Figure 3.25**).

La position des premiers états excités singulet S_1 ($^1\pi\pi^*$) peut être déterminée par superposition des spectres d'absorption et d'émission de fluorescence, réalisés à température ambiante. Le point d'intersection de ces deux spectres (λ_{0-0}) permet

d'estimer la position énergétique de l'état singulet excité, qui est de 26 900 cm^{-1} pour le chromophore **65** et de 29 300 cm^{-1} pour le chromophore **68**.

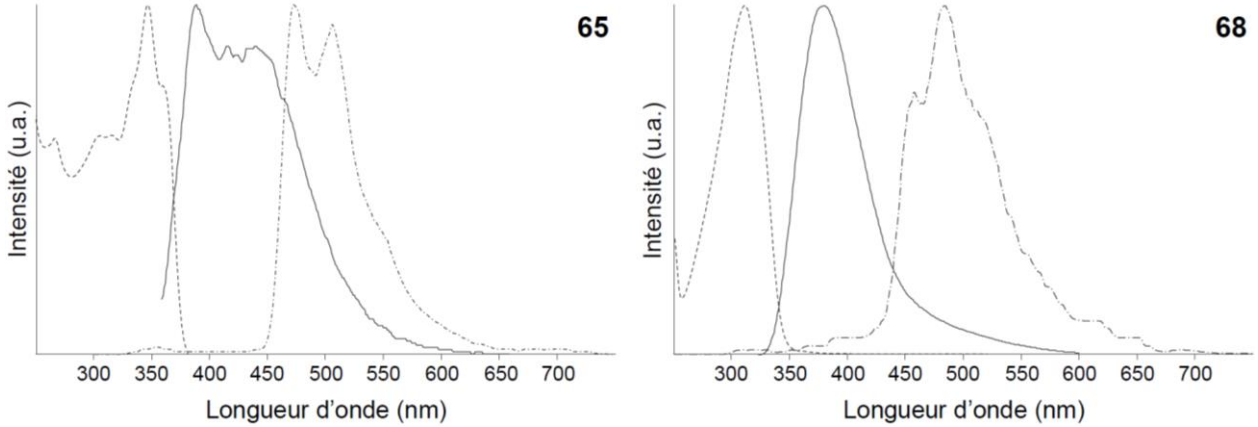


Figure 3.25. Spectres d'absorption (- - - -) à 298 K, d'émission de fluorescence (——) à 298 K et d'émission de phosphorescence (— · — ·) à 77 K des chromophores Py-cs124-CF_3 **65** et Py-HBim **68** dans le méthanol

Les états triplets ($^3\pi\pi^*$) ont, quant à eux, nécessité l'acquisition de spectres d'émission de phosphorescence dans le méthanol et à basse température (77 K). La position énergétique de l'état triplet correspond à la raie d'émission de plus haute énergie, donc de plus courte longueur d'onde (λ_{0-0}). Ces mesures ont permis d'estimer les énergies des états triplets des composés Py-cs124-CF_3 **65** et Py-HBim **68** à 21 200 cm^{-1} et 21 900 cm^{-1} respectivement. L'ensemble des résultats relatifs à la fluorescence et à la phosphorescence de ces chromophores modèles est rassemblé dans le tableau suivant (**Tableau 3.10**).

	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}]
Py-cs124-CF_3 **65**	389	372 [26 900]	486	471 [21 200]
Py-HBim **68**	382	341 [29 300]	483	457 [21 900]

Tableau 3.10. Données de fluorescence et de phosphorescence des chromophores modèles Py-cs124-CF_3 **65** et Py-HBim **68** dans le méthanol. [a] à 298 K. [b] à 77 K

Les écarts énergétiques entre les niveaux d'énergie des états triplets des chromophores et le niveau émissif $^5D_0$ de l'ion Tb(III) (20 500 cm^{-1}) semblent

insuffisants pour une sensibilisation efficace et irréversible de cet ion (ΔE = 700 et 1400 cm^{-1} pour les chromophores Py-cs124-CF_3 **65** et Py-HBim **68** respectivement). En revanche, les positions énergétiques des états triplets se trouvent bien au-dessus du niveau émissif $^5D_0$ de l'ion Eu(III) (17 300 cm^{-1}), ce qui devrait permettre une sensibilisation efficace de l'ion europium(III) par ces deux antennes.

4.1.2 Evaluation photophysique des ligands H_3L_7 et H_3L_8 et de leurs complexes Ln(III)

La préparation des complexes de lanthanides dérivés des ligands **H_3L_7** et **H_3L_8** a été réalisée *in situ* par ajout d'un léger excès de chlorure de lanthanide (1,1 équivalent) à une solution mère de ligand dans D_2O, puis par dilution de cette solution dans le tampon Tris (50 mM, pH = 7,4).

Propriétés d'absorption des ligands H_3L_7 et H_3L_8 et de leurs complexes

Les ligands et leurs différents complexes de lanthanides ont été caractérisés par leurs propriétés d'absorption dans le tampon Tris (50 mM) à pH physiologique et à température ambiante (**Tableau 3.11**). La concentration des solutions utilisées est de l'ordre de 10^{-4} M pour l'ensemble des composés. Les données d'absorption relatives au ligand **H_3PCTA[12]** et à ses complexes sont également rapportées à des fins de comparaison.

Les spectres d'absorption du ligand **H_3L_7** et de ses complexes Ln(III) se traduisent par la présence de trois bandes d'absorption dans le domaine UV attribuées aux transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ centrées sur les noyaux aromatiques vers 261 – 263 nm, 291 et 344 nm. Le déplacement bathochrome de 3 nm de la bande à 261 nm met en évidence l'augmentation de la polarisation de l'atome d'azote du noyau pyridine du fait de sa coordination à l'ion lanthanide. Ce déplacement bathochrome n'est pas observé pour les bandes à 291 et 344 nm, confirmant l'absence de conjugaison entre l'antenne cs124-CF_3 et le noyau pyridine.

	Ln(III)	λ(nm)	ε ($M^{-1}.cm^{-1}$)
PCTA[12]	-	266	3 700
	-	337	140
	Eu	270	3 900
	Gd	270	4 200
	Tb	270	4 100
H_3L_7	-	261 / 291 / 344	11 000 / 11 500 / 14 400
	-	337	12 700
	Eu	264 / 291 / 344	9 800 / 11 200 / 13 400
	Gd	264 / 291 / 344	10 100 / 11 800 / 14 300
	Tb	264 / 291 / 344	10 100 / 11 700 / 14 000
H_3L_8	-	315	15 500
	-	337	7 700
	Eu	322	14 800
	Gd	322	14 400
	Tb	322	14 600

Tableau 3.11. Caractéristiques d'absorption des ligands **H_3PCTA[12]**, **H_3L_7** et **H_3L_8** et de leurs complexes Eu(III), Gd(III) et Tb(III) dans le tampon Tris (50 mM, pH = 7,4)

A 337 nm, les coefficients d'extinction molaire sont de 12 700 et 7 700 $M^{-1}.cm^{-1}$ pour les ligands **H_3L_7** et **H_3L_8** respectivement, soit plus de 50 à 90 fois plus élevés que celui du PCTA[12] à la même longueur d'onde, et légèrement supérieurs à ceux obtenus pour les chromophores modèles.

Les spectres d'absorption du ligand **H_3L_8** et de ses complexes sont, quant à eux, caractérisés par la présence d'une bande d'absorption unique centrée sur une longueur d'onde de 315 nm dans le cas du ligand, et de 322 nm pour les complexes. Ce déplacement bathochrome met en évidence l'augmentation de la polarisation sur l'ensemble du chromophore Py-HBim **68**.

Propriétés de fluorescence des ligands libres et de leurs complexes Gd(III)

Les spectres d'émission de fluorescence ont été obtenus par excitation des ligands ou des complexes Gd(III) correspondants au niveau de leur bande d'absorption de plus faible énergie. La concentration des solutions utilisées est de l'ordre de 10^{-5} M pour l'ensemble des composés, et les mesures sont réalisées dans le tampon Tris (50 mM, pH = 7,4) à température ambiante. Les spectres d'émission de phosphorescence ont, quant à eux, été enregistrés à basse température (77 K) et en

temps résolu (t_D = 0,1 ms) dans un mélange méthanol:éthanol (1:4). Ces spectres ont permis d'accéder aux données relatives à l'état triplet des différents ligands et de leurs complexes Gd(III).

De manière générale, le complexe Gd(III) est utilisé comme modèle pour la détermination des états singulet et triplet d'un ligand complexé par un ion Eu(III) ou Tb(III) car son niveau émissif, trop haut en énergie, n'est pas accessible ($^6P_{7/2}$ E = 32 200 cm^{-1}). De plus, la présence de cet atome lourd favorise le processus de croisement inter-système ($^1\pi\pi^* \rightarrow {}^3\pi\pi^*$) et permet donc l'observation de la phosphorescence du ligand dans un environnement semblable à celui où il serait complexé par un ion Eu(III) ou Tb(III).

L'ensemble des données de fluorescence et de phosphorescence des ligands **H_3L_7** et **H_3L_8** et de leurs complexes Gd(III) est rassemblé dans le tableau suivant (**Tableau 3.12**).

		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}]
H_3L_7	-	392 / 470	371 [27 000]	485	471 [21 200]
	Gd(III)	395^{ép} / 471	377 [26 500]	487	473 [21 100]
H_3L_8	-	405	350 [28 600]	486	460 [21 700]
	Gd(III)	414	359 [27 900]	496	466 [21 500]

Tableau 3.12. Données de fluorescence et de phosphorescence des ligands **H_3L_7** et **H_3L_8** et de leurs complexes de gadolinium. [a] Dans le tampon Tris (50 mM, pH = 7,4) à 298 K. [b] Dans un mélange méthanol:éthanol (1:4) à 77 K

Le spectre d'émission de fluorescence du ligand **H_3L_7** apparaît sous la forme de deux bandes d'émission centrées sur des longueurs d'onde de 392 nm et 470 nm dont la seconde est de plus forte intensité (**Figure 3.26**). Le spectre d'émission de fluorescence de son complexe L_7.**Gd** est, quant à lui, largement dominé par la bande d'émission centrée sur 471 nm, malgré la présence d'un épaulement visible à 395 nm.

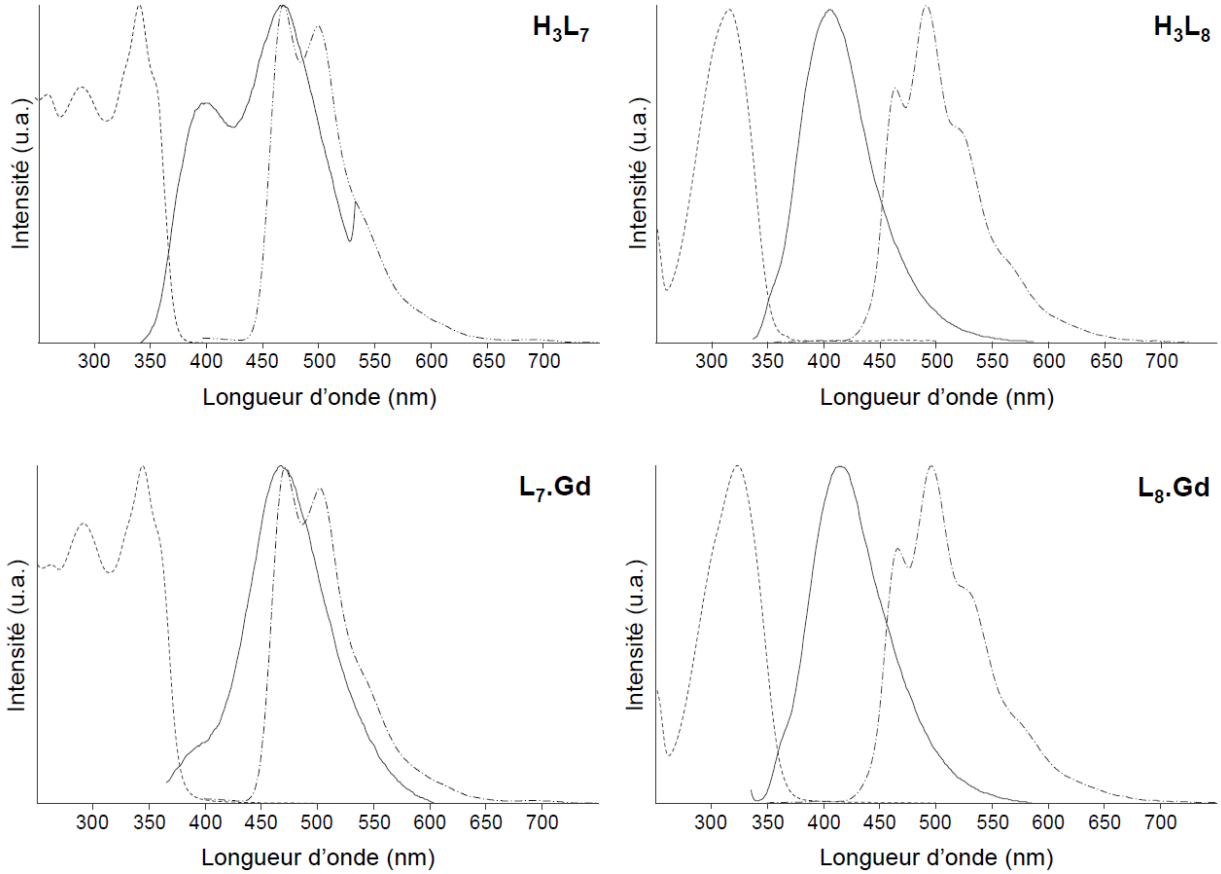


Figure 3.26. Spectres d'absorption (- - -) et d'émission de fluorescence (——) dans le tampon Tris (50 mM, pH = 7,4) et à 298 K, et spectre d'émission de phosphorescence (— · —) dans un mélange MeOH:EtOH (1:4) à 77 K, des ligands **H_3L_7** et **H_3L_8** et de leurs complexes Gd(III)

Les spectres d'émission de phosphorescence de **H_3L_7** et L_7.**Gd** apparaissent quant à eux sous la forme de deux bandes d'émission centrées autour de 485–487 nm, dont la première bande est similaire à celle observée dans les spectres de fluorescence de ces deux entités. Cette observation suggère la persistance à température ambiante d'une émission de phosphorescence concomitante avec l'émission de fluorescence dont l'intensité est exacerbée dans le cas du complexe L_7.**Gd** en raison de la présence de l'atome lourd.

Les spectres d'émission de fluorescence du ligand **H_3L_8** et du complexe L_8.**Gd** apparaissent tous deux sous la forme d'une large bande non structurée et centrée autour de 405 – 415 nm, bien distinctes de la bande de phosphorescence mesurée à 77 K centrée autour 486 – 496 nm.

A partir de ces données spectrales, les valeurs des états singulet et triplet ont été déterminées. Plusieurs observations peuvent être énoncées à partir de ces résultats.

Pour les deux ligands, le premier état singulet excité est déplacé vers les plus faibles énergies suite à la complexation de l'ion Gd(III). Cet effet, lié à la complexation, est moins marqué dans le cas de l'état triplet.

La différence énergétique entre l'état singulet et l'état triplet est comprise entre 5 400 et 6 900 cm^{-1} quel que soit le ligand ou le complexe Gd(III) considéré. Ces données sont en accord avec une règle empirique énoncée par Parker selon laquelle une différence énergétique inférieure à 7 000 cm^{-1} garantit l'efficacité du processus de croisement inter-système.[54]

Une étude réalisée par Latva *et al*. a montré qu'une différence d'énergie ΔE entre les états triplet du ligand et émissifs des ions Eu(III) et Tb(III) supérieure à 3 000 et 1 750 cm^{-1} respectivement, permet d'assurer un transfert d'énergie efficace et irréversible entre ces deux niveaux d'énergie.[55,56]

Les niveaux énergétiques des états triplets des ligands dans les complexes Gd(III) sont estimés à 21 100 et 21 500 cm^{-1} pour les complexes L_7.**Gd** et L_8.**Gd** respectivement. Comparés aux niveaux émissifs des ions Eu(III), ces valeurs se situent à une différence d'énergie ΔE de 3 700 à 4 200 cm^{-1}, soit bien au-dessus de son état émissif $^5D_0$. En revanche, une plus faible différence ΔE entre les états triplet du ligand et émissif de l'ion Tb(III) est observée : $500 < \Delta E < 1\,000$ cm^{-1}, confirmant les résultats observés sur les chromophores modèles Py-cs124-CF_3 **65** et Py-HBim **68**.

Les valeurs mesurées pour les complexes L_7.**Gd** et L_8.**Gd** indiquent donc que les ligands $\mathbf{H_3L_7}$ et $\mathbf{H_3L_8}$ seront uniquement adaptés à la sensibilisation efficace et irréversible de l'ion Eu(III), tandis qu'un transfert en retour devrait être observé pour les complexes Tb(III) (**Figure 3.27**).

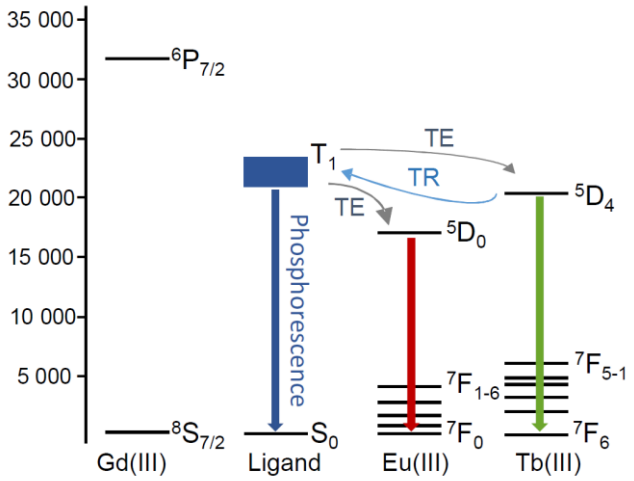


Figure 3.27. Représentation schématique du processus de transfert en retour. TE = Transfert d'énergie, TR = Transfert en retour

Propriétés de luminescence des complexes Eu(III) et Tb(III)

Les spectres d'émission de luminescence des différents complexes Eu(III) et Tb(III) ont été obtenus par excitation de leur bande d'absorption de plus faible énergie, à savoir 344 et 322 nm pour les complexes L_7.**Ln** et L_8.**Ln** respectivement.

Les spectres d'excitation ont été enregistrés, en maintenant la longueur d'onde d'émission fixe à 616 et 545 nm dans le cas des complexes Eu(III) et Tb(III) respectivement, et superposés à leur spectre d'absorption. Une bonne adéquation entre ces deux spectres permet de montrer sans ambiguïté que l'émission de de luminescence de l'ion complexé s'effectue indirectement *via* un processus de transfert d'énergie du chromophore vers l'état émissif de l'ion (**Figure 3.28**). Si l'allure des émissions caractéristiques des ions Eu(III) et Tb(III) sont observées, de très faibles intensités sont obtenues dans le cas du complexes L_7.**Tb**.

En ce qui concerne les complexes d'europium, les spectres d'excitation se superposent aux spectres d'absorption, même si l'intensité relative des bandes à 291 et 344 nm du spectre d'absorption varie dans le cas du spectre d'excitation du complexe L_7.**Eu**. Ce phénomène met en évidence une participation distincte des deux antennes pyridine et carbostyrile à la sensibilisation de l'ion Eu(III) dans ce complexe. Le spectre d'excitation du complexe L_8.**Eu** se superpose, quant à lui, parfaitement à celui d'absorption, indiquant que le peuplement de l'état émissif de l'ion Eu(III) s'effectue par un transfert efficace de l'énergie absorbée par le chromophore dans son ensemble.

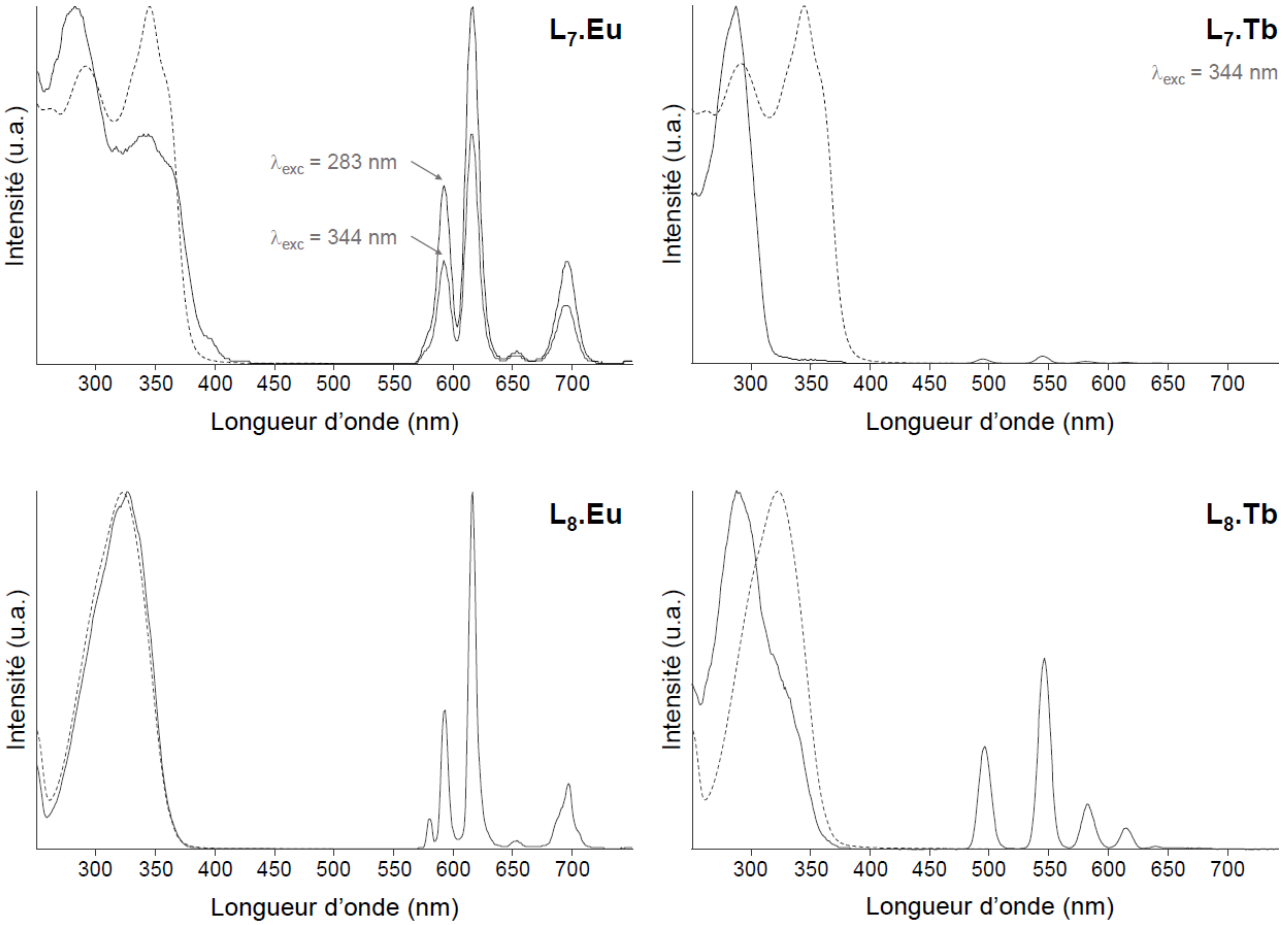


Figure 3.28. Spectres d'absorption (- - -), d'émission et d'excitation de fluorescence (——) des complexes Eu(III) et Tb(III) dérivés des ligands **H_3L_7** et **H_3L_8** dans le tampon Tris (50 mM, pH = 7,4)

Dans le cas des complexes de terbium, les spectres d'absorption et d'excitation ne sont pas superposables : le maximum de la longueur d'onde d'excitation est observé à 287 nm dans le cas du complexe L_7.**Tb**, et 291 nm (avec un épaulement vers 345 nm) dans celui du complexe L_8.**Tb**. Ces longueurs d'onde d'excitation maximales, relatives aux longueurs d'onde d'absorption du noyau pyridine, indiquent que le peuplement de l'état émissif de l'ion Tb(III) s'effectue principalement *via* l'excitation du noyau pyridine. Cette observation est en accord avec les positions énergétiques des états triplet précédemment déterminées. En effet, du fait de la proximité de ces états avec l'état émissif de l'ion Tb(III), un transfert d'énergie en retour est probablement opérant dans le cas de ces complexes. La mise en évidence de ce phénomène activé thermiquement peut être réalisée au moyen de l'acquisition du spectre d'excitation des complexes à basse température, où l'allure du spectre d'absorption est, en effet, en partie retrouvée dans le spectre d'excitation réalisé à 77K (**Figure 3.29**).

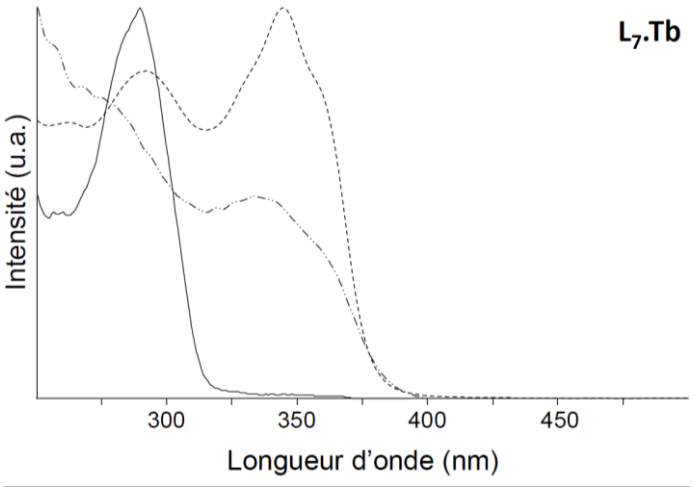


Figure 3.29. Spectres d'absorption (- - -) et d'excitation (——) à 298 K, et spectre d'excitation (— · -) à 77 K du complexe L_7.**Tb** dans le tampon Tris (50 mM, pH = 7,4)

Les durées de vie de luminescence des quatre complexes L_7.**Ln** et L_8.**Ln** (Ln = Eu(III), Tb(III)) ont été mesurées dans le tampon Tris hydrogéné et deutéré, et suivent une courbe de type mono-exponentielle (**Tableau 3.13**).

	τ_H^{298K} (ms)	τ_D^{298K} (ms)	q(Parker)	q(Horrocks)
L_7.**Eu**	0,340	1,448	2,40	2,15
L_7.**Tb**	1,378	3,095	1,71	-
L_8.**Eu**	0,406	1,978	2,05	1,83
L_8.**Tb**	1,141	2,653	2,20	-

Tableau 3.13. Durées de vie de luminescence des complexes Eu(III) et Tb(III) dérivés des ligands $\mathbf{H_3L_7}$ et $\mathbf{H_3L_8}$ dans le tampon Tris (50 mM, pH = 7,4) hydrogéné ou deutéré à 298 K, et nombres de molécules d'eau.

Les nombres d'hydratation calculés à partir des relations de Parker et de Horrocks mettent en évidence la présence de deux molécules d'eau en première sphère de coordination pour l'ensemble de ces complexes. Ces résultats sont en accord avec la coordination d'un ion lanthanide par une structure heptadente, pour lequel deux molécules d'eau viennent compléter la sphère de coordination.

Rendements quantiques du ligand H_3L_8 et des complexes L_7.Ln et L_8.Ln

Le rendement quantique de fluorescence reflète la capacité d'une sonde luminescente à réémettre l'énergie qu'elle absorbe sous la forme de photons. Ce terme

peut donc être décrit comme le rapport du nombre de photons émis, sur le nombre de photons absorbés :

$$\Phi = \frac{\text{nombre de photons émis par fluorescence}}{\text{nombre de photons absorbés}} \qquad [\mathbf{3.27}]$$

En pratique, le rendement quantique est obtenu par rapport à une substance de référence pour laquelle le rendement quantique absolu est connu. Il s'agit ici du sulfate de quinine pour la détermination des rendements quantiques de **fluorescence** du ligand et de ses complexes Eu(III), Tb(III) et Gd(III) (Φ = 54,6 % dans H_2SO_4 à 0,5 M).[57] La référence sulfate de quinine est aussi utilisée pour la détermination des rendements quantiques de **luminescence** des complexes Tb(III) tandis que le complexe de ruthénium $Ru(Bpy)_3Cl_2$ (Φ = 4,0 % dans H_2O)[58] sert de référence pour les complexes Eu(III). Le rendement quantique de l'espèce X est alors déterminé selon la relation suivante :

$$\Phi_X = \Phi_{réf} \left(\frac{DO_{réf}}{DO_X}\right)\left(\frac{S_X}{S_{réf}}\right)\left(\frac{{n_x}^2}{{n_{réf}}^2}\right) \qquad [\mathbf{3.28}]$$

Avec :

- DO la densité optique à la longueur d'onde d'excitation λ_{ex} de l'échantillon ou de la référence,
- S la surface du spectre d'émission,
- n l'indice de réfraction des milieux de l'échantillon et de la référence.

Les rendements quantiques de fluorescence du ligand $\mathbf{H_3L_7}$ et des complexes qui lui sont dérivés n'ont pas pu être calculés en raison de la présence d'une bande de phosphorescence sur les spectres d'émission de fluorescence. Les valeurs de surface d'émission de fluorescence ne peuvent donc pas être déterminées précisément. Les rendements quantiques de fluorescence du ligand $\mathbf{H_3L_8}$ et de ses complexes Ln(III) ont, quant à eux, été calculés à partir des spectres d'émission de fluorescence, obtenus à température ambiante et dans le tampon Tris (50 mM, pH = 7,4) (**Tableau 3.14**).

	Ln(III)	λ_{ex} (nm)	$\lambda_{ém}$ (nm)	Φ_F (%)
H_3L_8	-	315	405	45,5
	Eu	316	415	1,4
	Gd	320	414	4,8
	Tb	319	417	2,1

Tableau 3.14. Rendements quantiques de fluorescence du ligand **H_3L_8** et de ses complexes Eu(III), Gd(III) et Tb(III) dans le tampon Tris (50 mM, pH = 7,4)

En solution aqueuse, le ligand libre **H_3L_8** présente un rendement quantique de fluorescence élevé (Φ_F = 45,5 %). L'introduction d'un ion lanthanide dans cette structure complexante induit une chute drastique de cette voie de désactivation radiative, puisque des rendements quantiques de fluorescence centrée sur le ligand de l'ordre de 1 – 5 % sont mesurés pour les trois complexes L_8.**Ln** (Ln = Eu, Tb, Gd). Ces résultats mettent en évidence la présence d'une autre voie de désactivation plus efficace due à l'ion Ln(III), notamment celle favorisant le croisement inter-système et inhibant ainsi le processus de fluorescence centrée sur le ligand.

Les rendements quantiques de luminescence en milieu tampon Tris (50 mM, pH = 7,4) deutéré ou hydrogéné ont également été déterminés. Les valeurs obtenues pour L_7.**Ln** et L_8.**Ln** (Ln = Eu, Tb) sont reportées dans le tableau suivant (**Tableau 3.15**).

	Ln(III)	λ_{ex} (nm)	$\lambda_{ém}$ (nm)	Φ_P^H (%)	Φ_P^D (%)
H_3L_7	Eu	282	616	< 1	-
H_3L_8	Eu	322	615	9,2	42,4
	Tb	322	544	< 1	< 1

Tableau 3.15. Rendements quantiques de luminescence des complexes L_7.**Eu**, L_8.**Eu** et L_8.**Tb** en milieu tampon Tris (50 mM, pH = 7,4) hydrogéné ou deutéré

Les complexes Eu(III) et Tb(III) dérivés du ligand **H_3L_7** et le complexe L_8.**Tb** présentent des rendements quantiques de luminescence très faibles, inférieurs à 1 % à température ambiante. Dans le cas des complexes Tb(III), la présence d'un phénomène de transfert d'énergie en retour rend inefficace le processus de désactivation radiative à partir de l'état émissif de l'ion luminescent. Dans le cas du complexe L_7.**Eu**, la

possibilité d'un transfert d'énergie en retour n'est pas envisageable en raison de la position énergétique de l'état triplet du chromophore. Il est probable que le motif cs124-CF_3, du fait de son éloignement, soit limité dans son transfert d'énergie vers l'état émissif de l'ion Eu(III). Un autre phénomène de désactivation non-radiative est également envisageable, comme la présence d'un état LMCT (Transfert d'Energie Ligand-Métal), observée dans le cas de complexes Eu(III) incorporant un chromophore carbostyrile (cs124).[59] Cette voie de désactivation sera décrite plus en détail dans le paragraphe **4.2.2.**

Finalement, seul le complexe L_8.**Eu** présente un rendement quantique de luminescence correct de 9,2 % en milieu aqueux malgré la présence des deux molécules d'eau coordinées à l'ion dans sa première sphère de coordination. Cette valeur est par ailleurs plus de 3 fois supérieure à celle reportée pour le complexe de référence PCTA[12].**Eu**.[2] A 337 nm, une brillance $\Phi_{L_8Eu}.\varepsilon_{337}$ de 700 $M^{-1}.cm^{-1}$ est déterminée, valeur bien au-dessus de la valeur limite de 300 $M^{-1}.cm^{-1}$ d'après Bazin et coll. Permettant d'envisager une utilisation du complexe dans un contexte biologique.[60]

La valeur mesurée en milieu deutéré de 42,4 % est particulièrement élevée, et met en évidence l'efficacité de cette nouvelle antenne Py-HBim pour la sensibilisation de l'ion Eu(III).

4.1.3 Etude de la stabilité du complexe L_8.Eu

En raison des résultats photophysiques encourageants du complexe L_8.**Eu**, la cinétique de complexation ainsi que la stabilité de ce complexe de lanthanide ont été évaluées dans le tampon Tris et à pH physiologique. Ces mesures ont été effectuées par spectroscopie de luminescence, par le suivi de l'évolution de l'intensité de la raie d'émission $^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ de l'europium en fonction du temps. La stabilité du complexe vis-à-vis du ligand compétiteur DTPA, et en milieu sérique a également été évaluée.

Cinétique de complexation et stabilité en milieu tampon Tris

L'évaluation de la cinétique de complexation du ligand **H_3L_8** vis-à-vis de l'ion Eu(III) a été réalisée à température ambiante après addition d'un équivalent de chlorure d'europium à une solution de ligand (**Figure 3.30**).

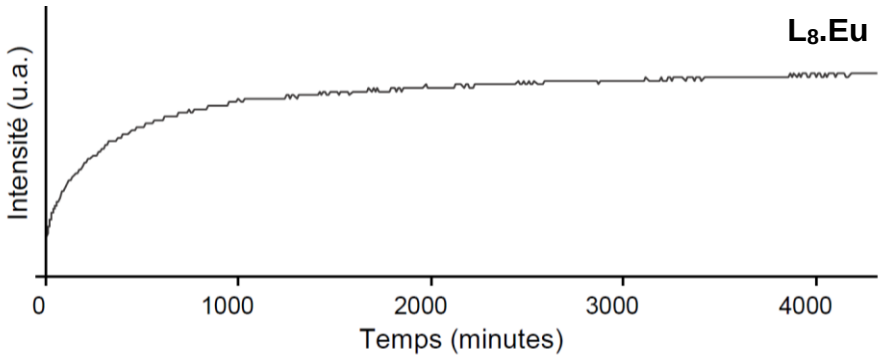


Figure 3.30. Cinétique de complexation du ligand H_3L_8 avec l'ion Eu(III) dans le tampon Tris (50 mM, pH = 7,4) à 298 K

Si un degré de complexation de 90 % est atteint au bout d'un temps relativement long de 35h, les caractéristiques d'absorption et de luminescence (intensité d'émission et durée de vie) de ce complexe restent cependant inchangées après plusieurs jours d'incubation.

Stabilité vis-à-vis du DTPA

La stabilité du complexe L_8.**Eu** en présence d'un ligand compétiteur polyamino-carboxylique tel que le DTPA (log K_{Eu} = 22,4) a par la suite été évaluée. Cette étude est également réalisée par suivi de l'intensité de la raie d'émission $^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ de l'europium en fonction du temps, après addition d'un ou de dix équivalents de DTPA (**Figure 3.31**). Le ligand compétiteur ne possédant pas de chromophore, une baisse de l'intensité de luminescence traduit la présence d'une réaction de transchélation.

Au vu de ces données, il apparaît que le complexe L_8.**Eu** est parfaitement stable vis-à-vis du DTPA puisqu'un taux de dissociation très faible est observé (< 1 %) et ce après plus de trois jours d'observation. De plus, les durées de vie de luminescence sont identiques à celles obtenues en l'absence de compétiteur. La formation d'un complexe ternaire L_8.**Eu**.DTPA, qui modifierait la sphère d'hydratation de l'ion métallique et se traduirait par une augmentation de la durée de vie d'émission, est donc à exclure.

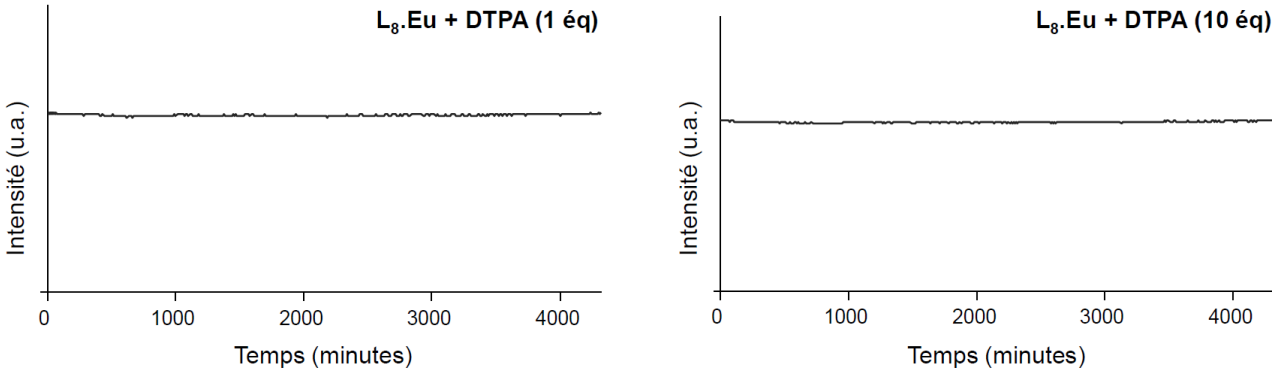


Figure 3.31. Courbes des cinétiques de compétition de L8.**Eu** en présence de 1 et 10 équivalents de DTPA dans le tampon Tris (50 mM, pH = 7,4)

Stabilité dans le sérum

La stabilité du complexe L8.**Eu** en milieu sérique est un paramètre important à prendre en compte notamment dans le cadre d'une utilisation pour des applications biologiques. Dans un mélange tampon Tris/sérum fœtal bovin (2:1) à température ambiante, celui-ci présente un taux de dissociation de seulement 12 % et les durées de vie d'émission restent inchangées après 74h d'incubation (**Figure 3.32**). Ces observations permettent d'affirmer que le complexe L8.**Eu** est relativement stable dans le sérum, et qu'aucune interaction entre le complexe et les protéines du sérum n'a lieu.

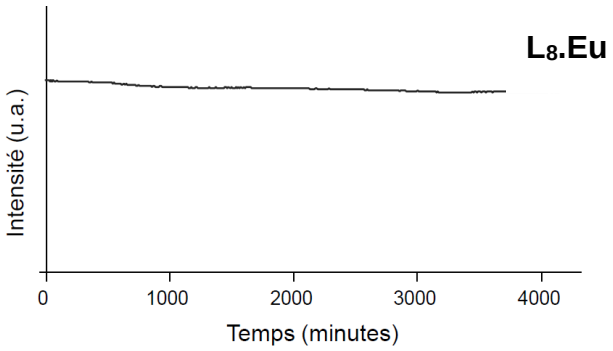


Figure 3.32. Cinétique de stabilité du complexe L8.**Eu** dans un mélange tampon Tris:sérum fœtal bovin (2:1) à 298 K (λ_{exc} = 322 nm)

Pour conclure, et malgré le besoin d'une étude plus approfondie, ces premiers résultats de stabilité cinétique du complexe L8.**Eu** vis-à-vis du ligand compétiteur DTPA et des constituants du sérum sont particulièrement encourageants pour une utilisation de ce complexe en milieu biologique.

4.2 Etude de la luminescence des ligands à noyau(x) phénol

La seconde série de ligands synthétisés dans le but d'améliorer les propriétés de luminescence de la plateforme PCTA[12] repose sur les structures **H_4L_8** et **H_8L_{10}**. Ces macrocycles à 12 et 24 chaînons possèdent une ou deux unités phénolates intracycliques respectivement. Après avoir établi la stœchiométrie des complexes qui leurs sont dérivés, l'évaluation des propriétés de luminescence de leurs complexes de Ln(III) ainsi que l'étude de leur stabilité sera décrite.

4.2.1 Stœchiométrie des complexes

La stœchiométrie des complexes dérivés des ligands **H_4L_9** et **H_8L_{10}** a été évaluée par une méthode de titration. L'évolution de l'intensité de la raie d'émission relative à la transition $^5D_4 \rightarrow {}^7F_5$ du terbium en fonction du nombre d'équivalent de sel $TbCl_3$ ajouté à une solution de ligand dans le tampon Tris (50 mM, pH = 7,4) est suivie par spectroscopie de luminescence (**Figure 3.33**).

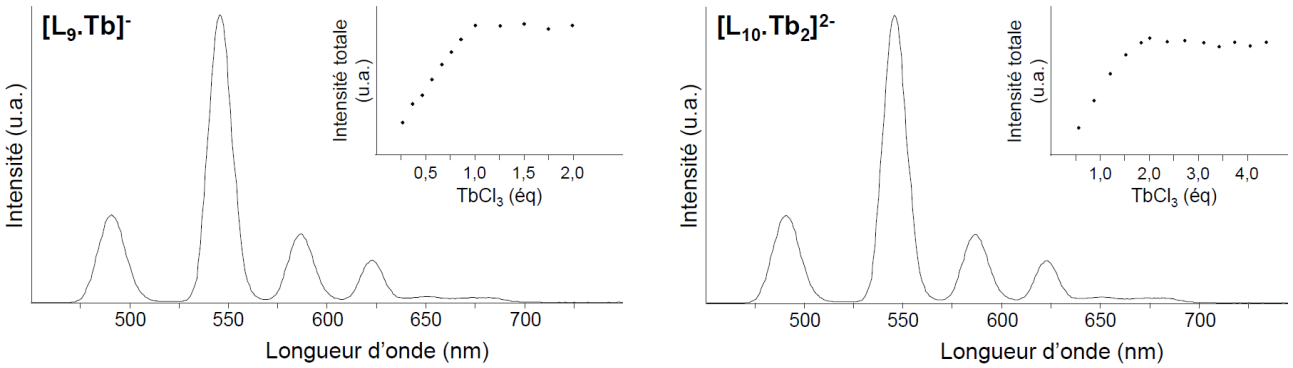


Figure 3.33. Spectres d'émission des complexes L_9.**Tb** et L_{10}.**Tb_2** dans le tampon Tris (50 mM, pH = 7,4) à 298 K et évolution de l'intensité totale en fonction du nombre d'équivalent de $TbCl_3$ pour ces complexes.

L'intensité totale d'émission augmente jusqu'à l'addition d'un équivalent de $TbCl_3$ pour le ligand **H_4L_9** et de deux équivalents pour le ligand **H_8L_{10}**, après quoi un plateau de l'intensité d'émission est atteint. Ces données mettent en évidence la formation d'une seule espèce pour chaque complexe, de stœchiométrie ligand:lanthanide de 1:1 pour le ligand **H_4L_9** et de 1:2 pour le ligand **H_8L_{10}**, en accord avec les données de spectrométrie de masse reportées précédemment (**§ 1**).

4.2.2 Propriétés d'absorption des ligands et de leurs complexes Ln(III)

Les caractéristiques d'absorption des ligands **H_4L_9** et **H_8L_{10}** et de leurs complexes Ln(III) ont également été évaluées en tampon Tris (50 mM, pH = 7,4) à température ambiante. L'ensemble des résultats est rassemblé dans le tableau suivant (**Tableau 3.16**).

	Ln(III)	λ(nm)	ε ($M^{-1}.cm^{-1}$)
H_4L_9	-	229 / 288	5 990 / 2 490
	Eu	245 / 296 / 360	7 680 / 3 650 / 80
	Gd	245 / 296	5 960 / 2 810
	Tb	245 / 296	6 480 / 2 980
H_8L_{10}	-	224 / 288	15 120 / 6 510
	Eu	242 / 296 / 360	15 250 / 6 390 / 260
	Gd	242 / 296	15 790 / 6 740
	Tb	242 / 296	16 850 / 6 920

Tableau 3.16. Caractéristiques d'absorption des ligands **H_4L_9** et **H_8L_{10}** et de leurs complexes Eu(III), Gd(III) et Tb(III) dans le tampon Tris (50 mM, pH = 7,4)

L'allure des spectres des deux ligands monomère et dimère est similaire et présente une bande d'émission de basse énergie centrée sur 288 nm, ainsi qu'un épaulement vers les plus hautes énergies centré sur 229 nm (transitions $\pi \rightarrow \pi^*$) (**Figure 3.34**).

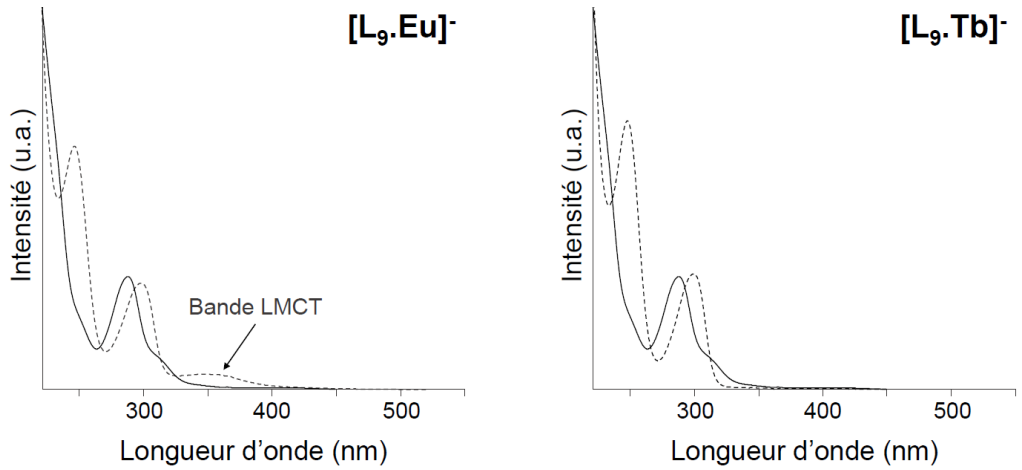


Figure 3.34. Spectres d'absorption du ligand H_4L_9 (——) des complexes L_9.**Eu** et L_9.**Tb** (- - ·), et mise en évidence de l'état LMCT

Dans le cas des complexes d'europium(III), une large bande additionnelle et de faible intensité (80 et 260 M^{-1} cm^{-1} respectivement pour L_9.**Eu** et L_{10}.**Eu₂**) vers 360 nm, est également mesurée. Celle-ci est particulièrement visible lorsque les spectres d'absorption des complexes Eu(III) et Tb(III) sont comparés. Cette bande d'absorption, également observée par l'équipe de Heath dans le cas du complexe d'europium dérivé de l'analogue acyclique 5-Me-HXTA à motif phénolate, est attribuée à une transition LMCT (**Figure 3.35**).[61]

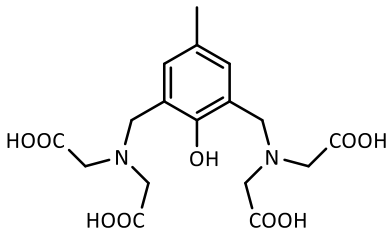


Figure 3.35. Structure du ligand 5-Me-HXTA

La présence d'un état LMCT est observée lors d'un transfert d'électron photo-induit du chromophore phénolate (dont le pouvoir oxydant à l'état excité est exacerbé) vers le métal (entrainant sa réduction transitoire en Eu^{2+}). Cet état est présent uniquement avec l'ion Eu(III) en raison de son potentiel d'oxydo-réduction particulièrement accessible comparé à l'ion Tb^{3+} ($[Eu^{3+}/Eu^{2+}]_{aq} = -0.35$ V *vs.* $[Tb^{3+}/Tb^{2+}]_{aq} = -3.47$ V). La vitesse d'un tel transfert est proportionnelle au terme $\exp\left(-\Delta E/kT\right)$: l'abaissement de la température de 298 K à 77 K permet donc de minimiser ce processus de désactivation non-radiative et de mettre en évidence son existence.

Le rendement quantique d'un complexe d'europium dépend fortement de la position de cet état LMCT par rapport aux niveaux d'énergie du ligand (S_1 et T_1). L'extinction de luminescence par transfert d'énergie LMCT-Eu^{3+} est particulièrement prononcée lorsque le niveau d'énergie de l'état LMCT est proche de celui de l'état triplet de plus basse énergie du ligand (**Figure 3.36**).[62,63,64]

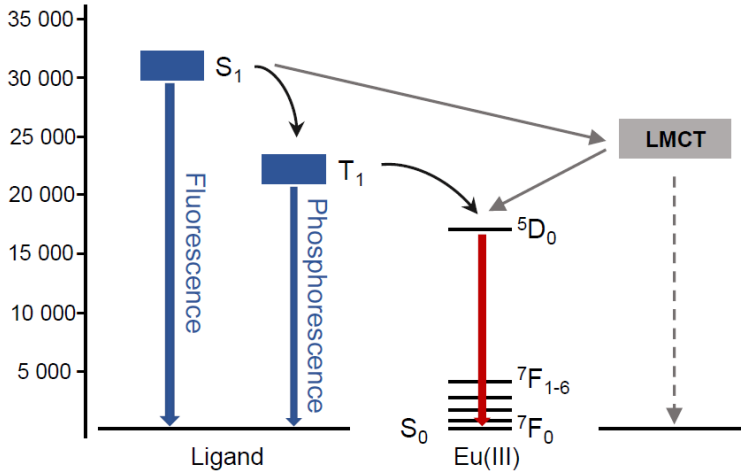


Figure 3.36. Représentation schématique du processus de transfert photo-induit lié à la présence d'un état LMCT

4.2.3 Propriétés de luminescence des complexes Ln(III)

L'étude de la fluorescence et de la phosphorescence des ligands libres et de leurs complexes Ln(III), permettant de mettre en évidence les phénomènes de désactivations radiative ou non-radiative, a par la suite été réalisée.

Propriétés de luminescence des complexes Gd(III)

La détermination de la position énergétique des états singulet et triplet des ligands **H_4L_9** et **H_8L_{10}** complexés a été réalisée par l'acquisition des spectres de fluorescence à 298 K et de phosphorescence à 77 K des complexes Gd(III) correspondants (**Figure 3.37**).

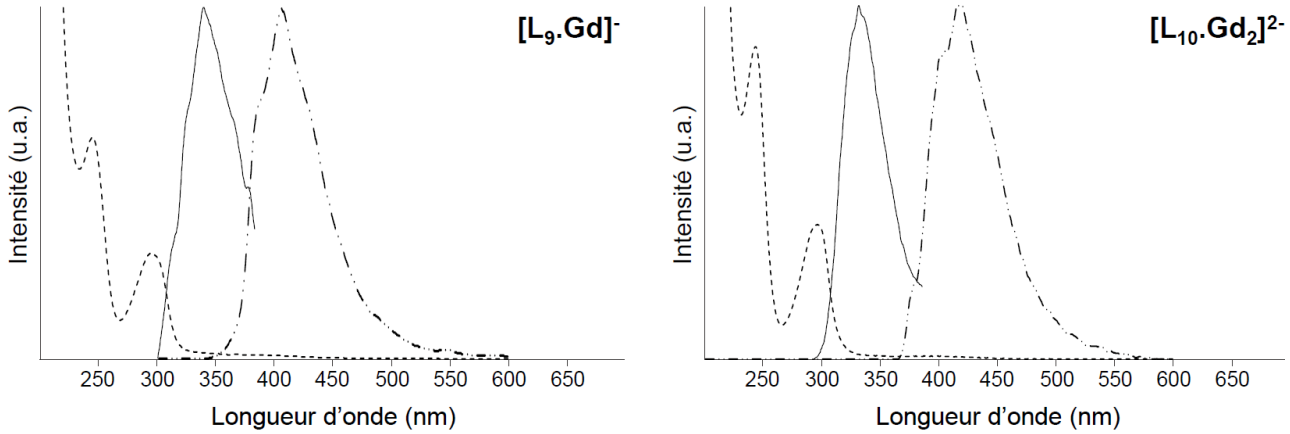


Figure 3.37. Spectres d'absorption (- - -) et d'émission de fluorescence (——) dans le tampon Tris (50 mM, pH = 7,4) à 298 K, et spectre d'émission de phosphorescence (— · · —) dans un mélange tampon Tris:glycérol (4:1) à 77 K, des complexes Gd(III) dérivés des ligands **H_4L_9** et **H_8L_{10}**

L'excitation des complexes L_9.**Gd** et L_{10}.**Gd_2** à 296 nm se traduit par une large bande d'émission non structurée avec des maxima à 338 et 329 nm, respectivement. La disparition de cette bande d'émission lors de l'application d'un délai de 10 µs entre l'excitation et l'acquisition du spectre permet d'assigner cette bande de fluorescence à des transitions $^1\pi\pi^*$. Une bande d'émission de fluorescence similaire ($\lambda_{ém}$ = 345 nm, λ_{exc} = 290 nm) a été rapportée pour le noyau phénol anionique en solution aqueuse.[65]

Une seconde bande d'émission centrée autour de 405 et 416 nm et correspondant à une bande de phosphorescence à partir de l'état triplet ($^3\pi\pi^*$) est observée à basse température (77 K) dans un mélange tampon Tris:glycérol (4:1) pour les deux complexes. Ces différents spectres ont permis d'estimer les positions énergétiques des états singulet et triplet, et l'ensemble des données de fluorescence et de phosphorescence issues de ces complexes est rassemblé dans le tableau suivant (**Tableau 3.17**).

	Fluorescence ($^1\pi\pi^*$)[a]		**Phosphorescence ($^3\pi\pi^*$)**[b]		**ΔE** ($^1\pi\pi^* - {}^3\pi\pi^*$)	**ΔE** ($^3\pi\pi^* - {}^5D_4$)
	λ_{max} (nm)	λ_{0-0} (nm) [cm^{-1}]	λ_{max} (nm)	λ_{0-0} (nm) [cm^{-1}]	(cm^{-1})	(cm^{-1})
L_9.**Gd**	338	307 [32 600]	405	385 [26 000]	6 200	5 500
L_{10}.**Gd_2**	329	307 [32 700]	416	377 [26 500]	6 500	6 000

Tableau 3.17. Données de fluorescence et de phosphorescence des complexes L_9.**Gd** et L_{10}.**Gd_2** [a] Dans le tampon Tris (50 mM, pH = 7,4) à 298 K. [b] Dans un mélange tampon Tris:glycérol (4:1) à 77 K.

Des niveaux énergétiques similaires ont pu être estimés pour les états excités singulet et triplet des deux complexes L_9.**Gd** et L_{10}.**Gd_2**. Le niveau énergétique calculé pour l'état triplet dans le cas du complexe L_9.**Gd** (26 000 cm^{-1}) est, de plus, en accord avec ceux rapportés par l'équipe de Latva pour le parent acyclique 5-Me-HXTA (26 600 cm^{-1}) et par Nakai *et al*. pour le complexe [(^{MeMe}ArO)$_3$tacn].**Gd** (26 460 cm^{-1}).[66,67]

Comme évoqué précédemment, la sensibilisation de l'ion terbium(III) est moins aisée que celle de l'europium(III) en raison de la position énergétique de son

état émissif ($^5D_4$ = 20 500 cm^{-1}) élevée. Les deux complexes L_9.**Gd** et L_{10}.**Gd$_2$** possèdent cependant des écarts énergétiques entre l'état singulet et l'état triplet ΔE ($^1\pi\pi^* - {}^3\pi\pi^*$) de 6 200/6 500 cm^{-1}, et entre l'état triplet et le niveau émissif du terbium(III) ΔE ($^3\pi\pi^* - {}^5D_4$) de 5 500/6 000 cm^{-1}. Ces données sont parfaitement en adéquation avec les règles empiriques garantissant un croisement inter-système efficace (ΔE ($^1\pi\pi^* - {}^3\pi\pi^*$) < 7000 cm^{-1}), ainsi qu'un transfert d'énergie irréversible entre l'état triplet de l'antenne et le niveau émissif $^5D_4$ du terbium(III) (ΔE ($^3\pi\pi^* - {}^5D_4$) > 2000 cm^{-1}) et donc, *a fortiori*, celui de l'europium(III). L'existence, dans le cas des complexes Eu(III), d'un état LMCT à 360 nm (soit 27 800 cm^{-1}) donc un niveau énergétique proche de l'état triplet (~26 000 cm^{-1}) peut cependant affecter le processus de luminescence de cet ion. Une étude approfondie des propriétés de luminescence de ces complexes est donc nécessaire.

Propriétés de luminescence des complexes Eu(III) et Tb(III)

Les spectres d'excitation et d'émission de luminescence des complexes L_9.**Ln** et L_{10}.**Ln$_2$** (Ln = Eu et Tb) ont été enregistrés dans le tampon Tris (50 mM, pH = 7,4) à température ambiante. Si seuls les spectres de luminescence des complexes dérivés du ligand **H_4L_9** sont présentés pour plus de clarté, l'allure des spectres d'excitation et d'émission des complexes dérivés du ligand **H_8L_{10}** est similaire (**Figure 3.38**).

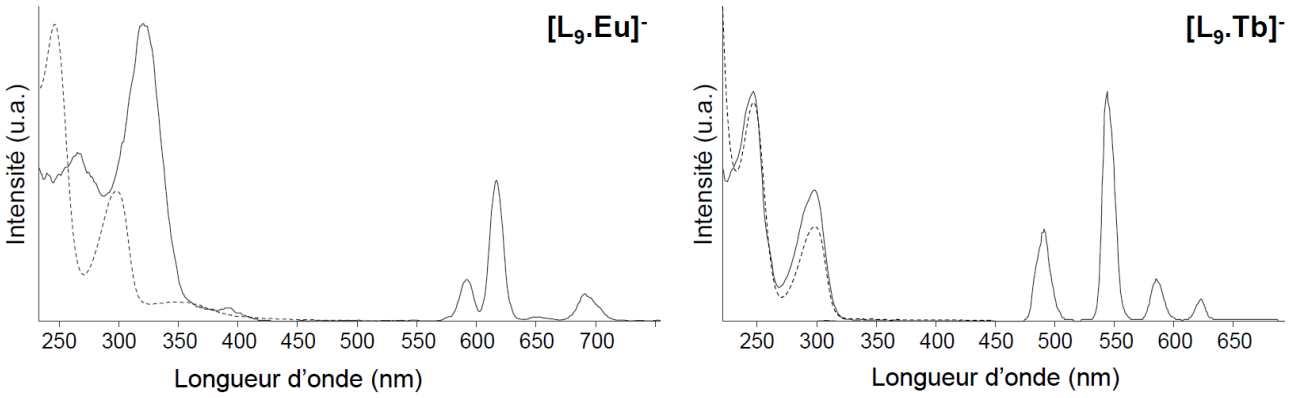


Figure 3.38. Spectres d'absorption (- - -), d'excitation et d'émission de fluorescence (——) des complexes L_9.**Eu** et L_9.**Tb** dans le tampon Tris (50 mM, pH = 7,4) à 298 K

Les spectres d'émission des complexes L_9.**Tb** et L_{10}.**Tb$_2$** montrent l'émission caractéristique de l'ion Tb(III) avec la bande la plus intense (correspondant à environ 50 % dans l'intensité totale) attribuée à la transition $^5D_4 \rightarrow {}^7F_5$ à 545 nm. Dans le cas de ces deux complexes, les spectres d'excitation se superposent parfaitement aux spectres

d'absorption : les ligands **H_4L_9** et **H_8L_{10}** assurent donc leur rôle d'antenne et transfèrent efficacement l'énergie absorbée à l'ion Tb(III).

En revanche, pour les complexes L_9.**Eu** et L_{10}.**Eu_2**, après excitation à 296 nm, seule une très faible émission de luminescence caractéristique de l'ion dans la région attendue du visible (500 – 800 nm) est observée. Les spectres d'excitation de ces complexes révèlent par ailleurs la présence d'une bande additionnelle autour de 360 nm, confirmant la présence de l'état LMCT, déjà mis en évidence dans le spectre d'absorption UV. Cet état LMCT, *via* un transfert d'énergie LMCT-Eu^{3+}, semble ainsi offrir une voie de désactivation non-radiative particulièrement efficace, puisqu'une extinction pratiquement totale de la luminescence à température ambiante est observée.

Plus d'informations sur la nature de la sphère de coordination des ions lanthanides peuvent être obtenues à partir des durées de vie d'émission. Celles-ci ont donc été mesurées dans le tampon Tris hydrogéné et deutéré, et à 298 et 77 K, pour l'ensemble des complexes L_9.**Ln** et L_{10}.**Ln_2** (Ln = Eu(III), Tb(III)) (**Tableau 3.18**).

		τ_H^{298K} (ms)	τ_D^{298K} (ms)	τ_D^{77} (ms)	q(Parker)
H_4L_9	Eu	0,31	0,87	-	2,19
	Tb	1,16	2,43	2,50	1,95
H_8L_{10}	Eu	0,55	0,70	-	0,17
	Tb	2,02	2,48	2,60	0,16

Tableau 3.18. Durées de vie de luminescence des complexes L_9.**Ln** et L_{10}.**Ln_2** dans le tampon Tris (50 mM, pH = 7,4) hydrogéné ou deutéré à 298 K, et nombre d'hydratation

De manière générale, la décroissance de luminescence de ces complexes est de type mono-exponentielle, suggérant la présence d'une seule espèce émissive en solution, et la présence de deux sites métalliques d'environnement similaire dans le cas des complexes L_{10}.**Ln_2**. Les valeurs des durées de vie τ_H^{298K} du complexe dinucléaire L_{10}.**Ln_2** (Ln = Eu : 0,55 ms ; Ln = Tb : 2,02 ms) sont deux fois plus élevées que celle de son analogue mononucléaire L_9.**Ln** (Ln = Eu : 0,31 ms ; Ln = Tb : 1,16 ms), traduisant

un environnement bien distinct du lanthanide complexé au sein de ces deux types de complexes.

Le nombre de molécules d'eau coordinées au métal a été calculé pour chacun des complexes à partir des relations de Parker. Cette analyse indique que deux molécules d'eau sont présentes dans la première sphère de coordination du métal pour les complexes L_9.**Ln**, alors qu'aucune molécule d'eau n'est présente dans le cas des complexes L_{10}.**Ln_2**.

Il est admis que les ions Eu(III) et Tb(III) présentent des nombres de coordination de 8 ou 9 en solution aqueuse. Avec ses sept fonctions complexantes et la présence de deux molécules d'eau, le ligand **H_4L_9** conduit à des complexes mononucléaires nonacoordinées où la fonction phénolate intervient de manière monodentate. Pour le ligand **H_8L_{10}** et ses 14 atomes donneurs, l'absence de molécules d'eau dans la première sphère de coordination des complexes L_{10}.**Ln_2** suppose l'intervention du motif phénolate de manière bidentate pour atteindre à un nombre de coordination de 8 où les deux ions lanthanide sont pontés par chaque noyau phénolate (μ^2-PhO) (**Figure 3.39**). Un comportement similaire a été observé à l'état solide et en solution pour le complexe dinucléaire (5-Me-HXTA)$_2$.**Ln_2**.[67]

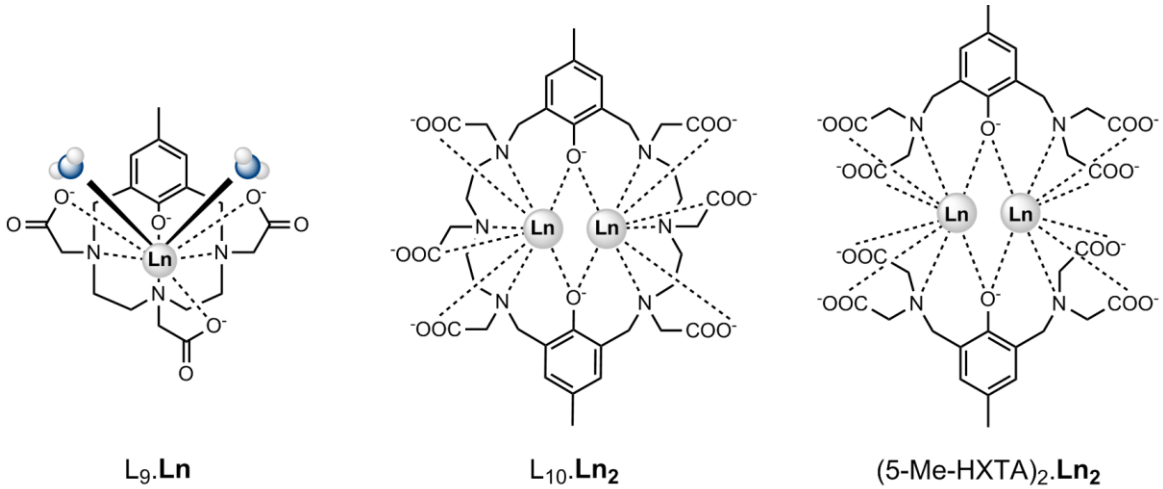


Figure 3.39. Structures des complexes L_9.**Ln**, L_{10}.**Ln_2** et (5-Me-HXTA)$_2$.**Ln_2**

L'acquisition des durées de vie des complexes à basse température est un moyen de rendre compte des phénomènes de désactivation non-radiative activés thermiquement. Dans le cas des complexes Tb(III), les durées de vie dans le tampon

Tris à 298 et 77 K sont quasiment identiques, suggérant qu'aucun processus de désactivation tel qu'un transfert d'énergie en retour (transfert entre le niveau émissif de l'ion Tb(III) et l'état triplet du ligand) n'est opérant.

Rendements quantiques des complexes Eu(III) et Tb(III)

Comme évoqué au paragraphe précédent (**§ 4.1.2**), l'efficacité du processus de luminescence d'un complexe de lanthanide est caractérisée par son rendement quantique. Le rendement quantique global Φ_{LLn} reflète le produit des différents mécanismes impliqués dans le processus d'effet d'antenne, à savoir :

- le croisement inter-système entre les états singulet et triplet du ligand (Φ_{CIS}),
- le transfert énergétique entre l'état triplet du ligand et l'état émissif de l'ion lanthanide (Φ_{ET}),
- le processus d'émission de luminescence de l'ion lanthanide complexé (Φ_{Ln}) (**Figure 3.40**).

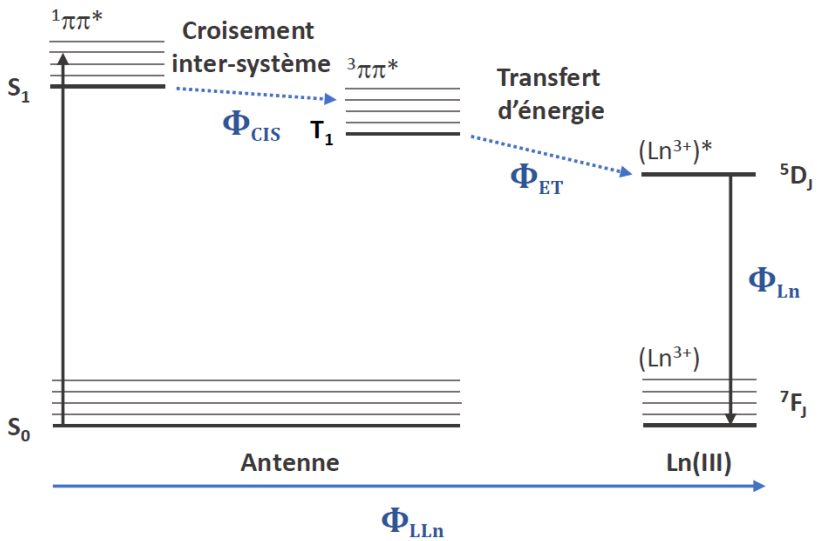


Figure 3.40. Processus impliqués dans l'effet d'antenne d'un complexe de lanthanide et rendements quantiques correspondants

Le rendement quantique global Φ_{LLn} peut alors s'écrire de la manière suivante :

$$\Phi_{LLn} = \Phi_{CIS} \cdot \Phi_{ET} \cdot \Phi_{Ln} \qquad [3.29]$$

Le rendement Φ_{Ln} peut, quant à lui, être déterminé à partir du rapport entre la durée de vie de luminescence observée à température ambiante en milieu hydrogéné et la durée de vie de luminescence observée à basse température en milieu deutéré (*i.e.* en l'absence de tout phénomène de désactivation non-radiative) :

$$\Phi_{Ln} = \frac{\tau_H^{298K}}{\tau_D^{77K}} \qquad [3.30]$$

A partir de ces rendements déterminés de manière expérimentale, il est possible d'accéder au produit $\Phi_{CIS} \cdot \Phi_{ET}$ reflétant l'efficacité de sensibilisation de l'ion lanthanide par l'antenne. L'ensemble des résultats obtenus est regroupé dans le tableau suivant (**Tableau 3.19**).

	Ln(III)	$\boldsymbol{\Phi_{LLn}}$ **(%)**	$\boldsymbol{\Phi_{Tb}}$ **(%)**	$\boldsymbol{\Phi_{CIS} \cdot \Phi_{ET}}$ **(%)**
H_4L_9	Eu	0,03	-	-
	Tb	22 [48]	46	48
H_8L_{10}	Eu	0,55	-	-
	Tb	43 [54]	78	55
5-Me-HXTA (*)	Tb	50	-	-
PCTA[12]	Eu	4,3	-	-
	Tb	8,3 [23]	41	20

Tableau 3.19. Rendements quantiques globaux $\boldsymbol{\Phi_{LLn}}$, d'émission du lanthanide $\boldsymbol{\Phi_{Tb}}$ et efficacité du produit $\boldsymbol{\Phi_{CIS} \cdot \Phi_{ET}}$ dans le tampon Tris (50 mM, pH = 7,4). (*) Données obtenues dans l'eau.

Les rendements quantiques globaux Φ_{LLn} des complexes L_9.**Ln** et L_{10}.$\mathbf{Ln_2}$ ont été déterminés par excitation du ligand (λ_{ex} = 296 nm) en milieu tampon Tris hydrogéné et à température ambiante. Comme attendu, les complexes L_9.**Eu** et L_{10}.$\mathbf{Eu_2}$ sont caractérisés par des rendements quantiques très faibles, respectivement de 0,03 % et 0,55 %, par rapport à ceux de PCTA.**Eu** (4,3 %).

Malgré la présence de deux molécules d'eau coordinées, le rendement quantique de luminescence du complexe L_9.**Tb** est de 22 % en milieu hydrogéné, une

valeur significativement plus élevée que celle du complexe bis-hydraté PCTA[12].**Tb** (8,3 %).

Le complexe L_{10}.**Tb_2** possède, quant à lui, un rendement quantique de 43 %, proche voire supérieure à ceux rapportés pour des sondes luminescentes commerciales à base de terbium (32 % pour (DTPA-cs124).**Tb**[68] et 50 % pour (Lumi4TM).**Tb**[69]). Il est également intéressant de noter que ce rendement quantique est similaire à celui rapporté pour le complexe dinucléaire correspondant (5-Me-HXTA)$_2$.**Tb_2**.[67] A notre connaissance, il s'agit seulement du deuxième complexe dinucléaire de Tb(III) dérivé d'un ligand macrocyclique dont les propriétés de luminescence ont été évaluées en solution aqueuse.[70]

L'efficacité de sensibilisation de l'ion lanthanide par l'antenne, caractérisée par le produit $\Phi_{CIS} \cdot \Phi_{ET}$, est comparable pour les deux complexes L_9.**Tb** et L_{10}.**Tb_2** (~50 %) et indique un processus de sensibilisation efficace. Ces résultats sont en accord avec le fait que l'efficacité de sensibilisation est indépendante de la présence de molécule d'eau en première sphère de coordination.

De plus, le processus de transfert d'énergie ligand-métal semble être sensible à la substitution du noyau pyridine par un noyau phénol. Une augmentation de la valeur du produit $\Phi_{CIS} \cdot \Phi_{ET}$ d'un facteur 2,4 entre le complexe PCTA[12].**Tb** et le complexe L_9.**Tb** est, en effet, observée. Puisque le rendement Φ_{Tb} est quasiment identique dans le cas de ces deux complexes, la différence entre les valeurs des rendements quantiques globaux Φ_{LLn} est due à la différence d'efficacité de sensibilisation par l'antenne.

4.2.4 Stabilité des complexes Tb(III) en solution aqueuse

Au vu de leurs caractéristiques de luminescence particulièrement intéressantes, la stabilité des complexes L_9.**Tb** et L_{10}.**Tb_2** a également été évaluée. Le point de départ de cette étude a consisté en l'évaluation de leurs propriétés d'émission dans le milieu tampon Tris (50 mM, pH = 7,4) à température ambiante. Celles-ci se sont révélées être inchangées après plusieurs jours d'incubation, mettant en évidence la

stabilité de ces complexes en milieu aqueux. L'investigation de la stabilité de ces complexes a également été réalisée par des études cinétiques vis-à-vis d'un ligand compétiteur (DTPA). Les propriétés de luminescence (surfaces d'émission et durées de vie) ont également été déterminées dans différents milieux (tampons et sérum).

Stabilité vis-à-vis du DTPA

La cinétique de stabilité des complexes L_9.**Tb** et L_{10}.**Tb_2** vis-à-vis du ligand DTPA a été évaluée par spectroscopie de luminescence dans le tampon Tris à température ambiante. Après addition d'un équivalent de ligand compétiteur, l'intensité de la raie d'émission relative à la transition $^5D_4 \rightarrow {}^7F_5$ du terbium est suivie en fonction du temps (**Figure 3.41**).

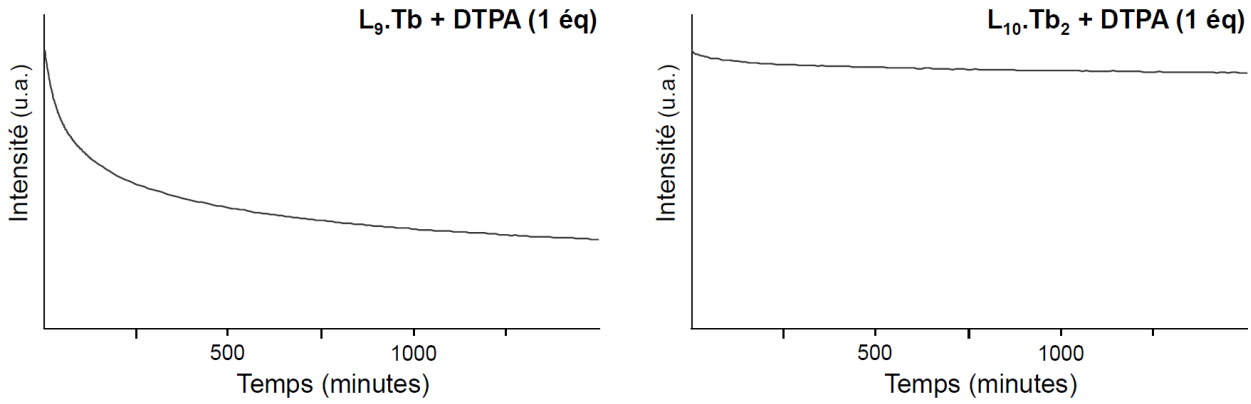


Figure 3.41. Courbes des cinétiques de compétition des complexes L_9.**Tb** et L_{10}.**Tb_2** en présence d'un et de dix équivalents de DTPA dans le tampon Tris (50 mM, pH = 7,4) à 298 K

Le complexe L_{10}.**Tb_2** est relativement stable en présence d'un équivalent de DTPA puisqu'un taux de dissociation de seulement 8,5 % est observé après 24h d'incubation. Le complexe L_9.**Tb** présente, quant à lui, une inertie cinétique plus faible puisque 77 % de celui-ci est dissocié au bout du même temps. Ce résultat pourrait être expliqué par la présence de deux molécules d'eau en première sphère de coordination. Cependant, le complexe PCTA[12].**Tb** bis-hydraté n'est dissocié qu'à 6 % dans les mêmes conditions expérimentales : des mesures complémentaires de potentiométrie devront être réalisées en vue d'obtenir une compréhension quantitative de la stabilité de ces complexes.

Stabilité du complexe L_9.Tb dans différents tampons

Le déplacement partiel ou total des molécules d'eau présentes en première sphère de coordination par des anions bidentes endogènes (phosphate, carbonate, lactate) a souvent été observé dans le cas des complexes bis-hydratés de lanthanides.[71,72,73] Dans cette optique, le comportement du complexe L_9.**Tb** a été évalué. Si l'une ou les deux molécules d'eau sont remplacées pour ces oxoanions, l'intensité ainsi que la durée de vie de luminescence sont augmentées. Le complexe L_9.**Tb**, en solution dans le tampon Tris (50 mM, pH = 7,4), a été mis en présence d'un excès de ces anions par rapport à leur concentration physiologique dans le plasma humain,[74] et leur influence sur les durées de vie d'émission des complexes PCTA[12].**Tb** et L_9.**Tb** est représentée sur la figure suivante (**Figure 3.42**).

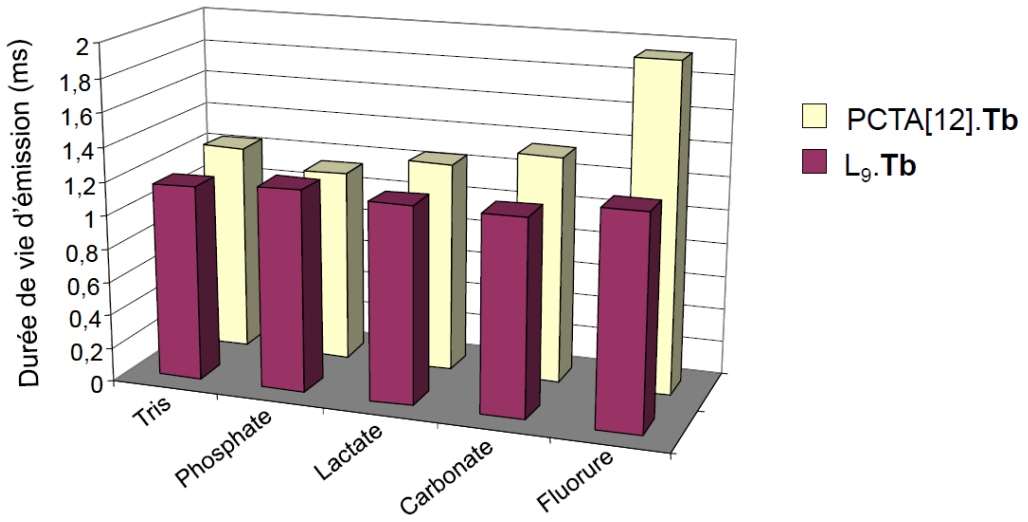


Figure 3.42. Influence de différents oxoanions sur la durée de vie de luminescence des complexes PCTA[12].**Tb** et L_9.**Tb** dans le tampon Tris (50 mM, pH = 7,4) à 298 K. [Phosphate] = 1,1 mM, [Lactate] = 2,3 mM, [Carbonate] = 26 mM, [Fluorure] = 0,1 M.

De manière générale, la légère augmentation des durées d'émission ($1{,}17 < \tau < 1{,}25$ ms) est en adéquation avec la rétention des deux molécules d'eau coordinées au centre métallique, et donc l'absence d'interaction entre le complexe L_9.**Tb** et ces dianions, et ce de manière mono- ou bidentée.

Bien que non représentés ici, les résultats liés aux intensités d'émission suggèrent qu'aucun changement dans la sphère de coordination n'est observé lors de l'addition de l'anion phosphate, tandis qu'une légère variation est présente dans les cas du citrate ou du carbonate (~10 %). Un comportement similaire a été observé pour

le complexe PCTA[12].**Tb** dans les mêmes conditions expérimentales. Contrairement aux complexes de type DO3A, dans lesquels les molécules d'eau sont adjacentes dans le polyèdre de coordination et entraine une substitution totale des deux molécules d'eau par ces oxoanions, la position relative des deux molécules d'eau dans la première sphère ne semble pas adaptée aux interactions bidentées dans le cas de ces deux complexes.

Le déplacement des molécules d'eau de la sphère interne a également été étudié vis-à-vis des ions fluorures. En présence d'un large excès de ces anions, la durée de vie d'émission de luminescence augmente d'un facteur de 1,08 dans le cas de L_9.**Tb** et d'un facteur de 1,57 dans le cas du complexe PCTA[12].**Tb**. Le déplacement de l'eau de la sphère de coordination du métal est donc plus marqué pour PCTA[12].**Tb**. La présence d'une charge globale négative pour le complexe L_9.**Tb**, limitant les interactions électrostatiques entre les ions Tb(III) et F^-, pourrait expliquer ce résultat.

Stabilité en milieu sérique

Finalement, la stabilité des complexes L_9.**Tb** et L_{10}.**Tb$_2$** a été évaluée en milieu sérique dans un mélange tampon Tris/sérum fœtal bovin (9:1) et à température ambiante. Les mesures ont été réalisées par excitation à 296 nm et par suivi de l'intensité de la raie d'émission relative à la transition $^5D_4 \rightarrow {}^7F_5$ à 545 nm du terbium en fonction du temps (**Figure 3.43**).

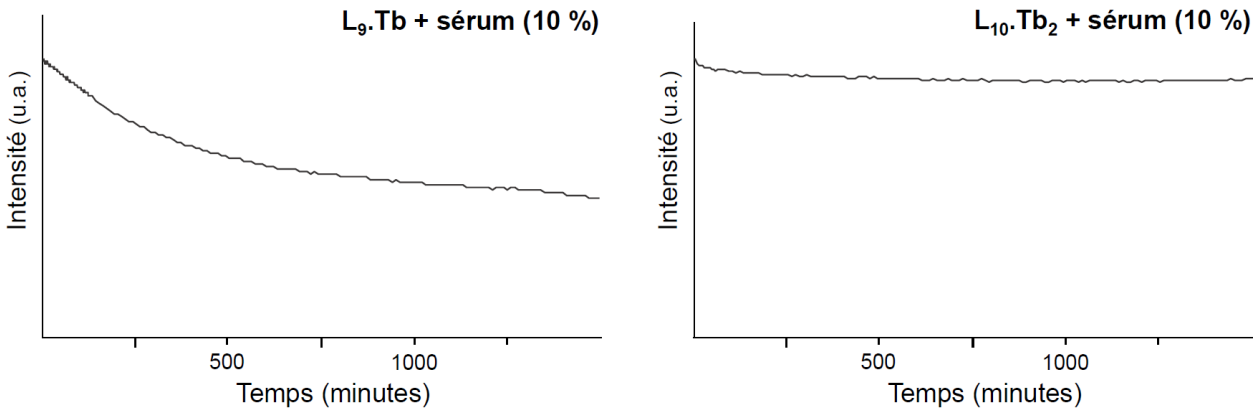


Figure 3.43. Cinétique de stabilité des complexes L_9.**Tb** et L_{10}.**Tb$_2$** dans un mélange tampon Tris:sérum fœtal bovin (9:1) à 298 K (λ_{exc} = 296 nm)

Après 24h d'incubation, des taux de dissociation de 49 % et 10 % sont observés pour les complexes L_9.**Tb** et L_{10}.**Tb_2** respectivement. Ces résultats permettent d'affirmer que le complexe L_{10}.**Tb_2** est stable en milieu sérique, et viennent appuyer le fait que les complexes dérivés du ligand **H_8L_{10}** font preuve d'une plus grande stabilité que ceux dérivés du ligand **H_4L_9**. Les durées de vie d'émission de luminescence étant identiques en début et en fin de mesure, il est également possible de supposer qu'aucune interaction entre ces complexes et les protéines du sérum n'a lieu.

4.3 Conclusion

En conclusion, cette étude photophysique a permis de dégager trois structures aptes à sensibiliser efficacement l'europium (cas du ligand **H_3L_8**) et le terbium (cas des ligands **H_4L_9** et **H_8L_{10}**).

Si l'antenne dérivée du carbostyrile cs124-CF_3 du complexe L_7.**Eu** ne permet pas une sensibilisation efficace de l'europium (Φ < 1 %), le chromophore benzimidazole conjugué au noyau pyridine du complexe L_8.**Eu** remplit parfaitement son rôle d'antenne. En plus de présenter un bon rendement quantique de 9,2 %, celui-ci possède une brillance de 700 $M^{-1}.cm^{-1}$ à 337 nm, compatible avec une application biologique.

Les complexes mononucléaire L_9.**Tb** et dinucléaire L_{10}.**Tb_2** présentent, quant à eux, des rendements quantiques élevés (22 et 43 % respectivement) avec une sensibilisation efficace du lanthanide par le noyau phénol ($\Phi_{CIS} \cdot \Phi_{ET}$ ~ 50 %) et de longues durées de vie de luminescence (1,16 et 2,02 ms respectivement) en milieu aqueux et à température ambiante. Le complexe L_{10}.**Tb_2** possède une très bonne inertie cinétique que ce soit dans le sérum ou vis-à-vis d'un ligand compétiteur tel que le DTPA. De son côté, le complexe L_9.**Tb** est particulièrement stable vis-à-vis d'oxoanions bidentates tels que le citrate, le phosphate ou le carbonate, et sa structure ainsi que sa charge globale n'autorisent pas le remplacement des molécules d'eau de sa sphère de coordination par des ions fluorure. Ce dernier aspect est, par ailleurs, important pour une application en tant qu'agent de contraste pour l'IRM, et démontre ainsi la potentielle polyvalence de cette structure.

5 Références

[1] Onishi, H.; Sekine, K. *Talanta* **1972**, *19* (4), 473.

[2] Siaugue, J. M.; Segat-Dioury, F.; Favre-Réguillon, A.; Wintgens, V.; Madic, C.; Foos, J.; Guy, A. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2003**, *156*, 23.

[3] Bechara, G.; Leygue, N.; Galaup, C.; Mestre-Voegtlé, B.; Picard, C. *Tetrahedron* **2010**, *66* (45), 8594.

[4] Laurent, S.; Vander Elst, L.; Galaup, C.; Leygue, N.; Boutry, S.; Picard, C.; Muller, R. N. *Contrast Media Mol. Imaging* **2014**, *9* (4), 300.

[5] Richardson, F. S. *Chem. Rev.* **1982**, *82* (5), 541.

[6] Horrocks, W. D.; Sudnick, D. R. *Acc. Chem. Res.* **1981**, *14* (12), 384.

[7] Beeby, A.; Clarkson, I. M.; Dickins, R. S.; Faulkner, S.; Parker, D.; Royle, L.; de Sousa, A. S.; Williams, J. A. G.; Woods, M. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1999**, *2* (3), 493.

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

[9] Barthelemy, P. P.; Choppin, G. R. *Inorg. Chem.* **1989**, *28* (17), 3354.

[10] Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B. *Chem. Rev.* **1999**, *99* (9), 2293.

[11] Kim, W. D.; Kiefer, G. E.; Maton, F.; Mcmillan, K.; Muller, R. N.; Sherry, D. *Inorg. Chem.* **1995**, *34* (8), 2233.

[12] Aime, S.; Botta, M.; Crich, S. G.; Giovenzana, G.; Pagliarin, R.; Sisti, M.; Terreno, E. *Magn. Reson. Chem.* **1998**, 36 (S1), S200.

[13] Solomon, I. *Phys. Rev.* **1955**, 99 (2), 559.

[14] Bloembergen, N.; Morgan, L. O. *J. Chem. Phys.* **1961**, 34 (3), 842.

[15] Toth, E.; Helm, L.; Merbach, A. E. *The chemistry of contrast agents in medical magnetic resonance imaging*; Merbach, A. E., Toth, E., Eds.; Wiley: Chichester, **2001**.

[16] Caravan, P.; Astashkin, A. V.; Raitsimring, A. M. *Inorg. Chem.* **2003**, *42* (13), 3972.

[17] Astashkin, A. V.; Raitsimring, A. M.; Caravan, P. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108* (11), 1990.

[18] Kiefer, G. E.; Woods, M. *Inorg. Chem.* **2009**, *48* (24), 11767.

[19] Aime, S.; Botta, M.; Frullano, L.; Crich, S. G.; Giovenzana, G.; Pagliarin, R.; Palmisano, G.; Sirtori, F. R.; Sisti, M. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (21), 4017.

[20] Port, M.; Raynal, I.; Vander Elst, L.; Muller, R. N.; Dioury, F.; Ferroud, C.; Guy, A. *Contrast Media Mol. Imaging* **2006**, *1* (3), 121.

[21] Laurent, S.; Elst, L. Vander; Muller, R. N. *Contrast Media Mol. Imaging* **2006**, *1* (3), 128.

[22] Kálmán, F. K.; Tircsó, G. *Inorg. Chem.* **2012**, *51* (19), 10065.

[23] Nonat, A. M.; Gateau, C.; Fries, P. H.; Helm, L.; Mazzanti, M. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, 2049.

[24] Swift, T. J.; Connick, R. E. *J. Chem. Phys.* **1962**, *37* (1962), 307.

[25] Micskei, K.; Powell, D. H.; Helm, L.; Brücher, E.; Merbach, A. E. *Magn. Reson. Chem.* **1993**, *31* (11), 1011.

[26] Vander Elst, L.; Maton, F.; Laurent, S.; Seghi, F.; Chapelle, F.; Muller, R. N. *Magn. Reson. Med.* **1997**, *38* (4), 604.

[27] Laurent, S.; Elst, L. Vander; Houzé, S.; Guérit, N.; Muller, R. N. *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83* (2), 394.

[28] Laurent, S.; Botteman, F.; Vander Elst, L.; Muller, R. N. *Magn. Reson. Mater. Physics, Biol. Med.* **2004**, *16* (5), 235.

[29] Siriwardena-Mahanama, B. N.; Allen, M. J. *Molecules* **2013**, *18* (8), 9352.

[30] Datta, A.; Raymond, K. N. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42* (7), 938.

[31]Tóth, É.; Burai, L.; Brücher, E.; Merbach, A. E. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1997**, 1587.

[32] Laurent, S.; Vander Elst, L.; Wautier, M.; Galaup, C.; Muller, R. N.; Picard, C. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (22), 6230.

[33] Bonnet, C. S.; Buron, F.; Caillé, F.; Shade, C. M.; Drahoš, B.; Pellegatti, L.; Zhang, J.; Villette, S.; Helm, L.; Pichon, C.; Suzenet, F.; Petoud, S.; Tóth, É. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18* (5), 1419.

[34] Baranyai, Z.; Tei, L.; Giovenzana, G. B.; Kálmán, F. K.; Botta, M. *Inorg. Chem.* **2012**, *51* (4), 2597.

[35] Bonnet, C. S.; Laine, S.; Buron, F.; Tircsó, G.; Pallier, A.; Helm, L.; Suzenet, F.; Tóth, É. *Inorg. Chem.* **2015**, *54* (12), 5991.

[36] Silvério, S.; Torres, S.; Martins, A. F.; Martins, J. a; André, J. P.; Helm, L.; Prata, M. I. M.; Santos, A. C.; Geraldes, C. F. G. C. *Dalton Trans.* **2009**, 4656.

[37] Aime, S.; Calabi, L.; Cavallotti, C.; Gianolio, E.; Giovenzana, G. B.; Losi, P.; Maiocchi, A.; Palmisano, G.; Sisti, M. *Inorg. Chem.* **2004**, *43* (24), 7588.

[38] Hajela, S.; Botta, M.; Giraudo, S.; Xu, J.; Raymond, K. N.; Aime, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (45), 11228.

[39] Thompson, M. K.; Botta, M.; Nicolle, G.; Helm, L.; Aime, S.; Merbach, A. E.; Raymond, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (47), 14274.

[40] Laus, S.; Ruloff, R.; Tóth, É.; Merbach, A. E. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9* (15), 3555.

[41] Polášek, M.; Sedinová, M.; Kotek, J.; Elst, L. Vander; Muller, R. N.; Hermann, P.; Lukes, I. *Inorg. Chem.* **2009**, *48* (2), 455.

[42] Aime, S.; S. Batsanov, A.; Botta, M.; A. K. Howard, J.; P. Lowe, M.; Parker, D. *New J. Chem.* **1999**, *23* (7), 669.

[43] Dumas, S.; Jacques, V.; Sun, W.-C.; Troughton, J. S.; Welch, J. T.; Chasse, J. M.; Schmitt-Willich, H.; Caravan, P. *Invest. Radiol.* **2010**, *45* (10), 600.

[44] Aime, S.; Botta, M.; Fasano, M.; Terreno, E. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27* (1), 19.

[45] Hermann, P.; Kotek, J.; Kubícek, V.; Lukes, I. *Dalton Trans.* **2008**, *9226* (23), 3027.

[46] Laurent, S.; Vander Elst, L.; Henoumont, C.; Muller, R. N. *Contrast Media Mol. Imaging* **2010**, *5* (6), 305.

[47] Yu, J.; Martins, A. F.; Preihs, C.; Clavijo Jordan, V.; Chirayil, S.; Zhao, P.; Wu, Y.; Nasr, K.; Kiefer, G. E.; Sherry, A. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (44), 14173.

[48] Moula Karimdjy, M.; Tallec, G.; Fries, P. H.; Imbert, D.; Mazzanti, M.; Karimdjy, M. M.; Tallec, G.; Fries, P. H.; Imbert, D.; Mazzanti, M. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 6836.

[49] Mendonça, A. C.; Martins, A. F.; Melchior, A.; Marques, S. M.; Chaves, S.; Villette, S.; Petoud, S.; Zanonato, P. L.; Tolazzi, M.; Bonnet, C. S.; Tóth, É.; Di Bernardo, P.; Geraldes, C. F. G. C.; Santos, M. A. *Dalton Trans.* **2013**, *42* (17), 6046.

[50] Polasek, M.; Caravan, P. *Inorg. Chem.* **2013**, *52* (7), 4084.

[51] Jung, K. H.; Kim, H. K.; Lee, G. H.; Kang, D. S.; Park, J. A.; Kim, K. M.; Chang, Y.; Kim, T. J. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (15), 5385.

[52] Fisher, C. M.; Fuller, E.; Burke, B. P.; Mogilireddy, V.; Pope, S. J. A.; Sparke, A. E.; Déchamps-Olivier, I.; Cadiou, C.; Chuburu, F.; Faulkner, S.; Archibald, S. J. *Dalton Trans.* **2014**, *43*, 9567.

[53] Chen, J.; Selvin, P. R. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2000**, *135* (1), 27.

[54] Montgomery, C. P.; Murray, B. S.; New, E. J.; Pal, R.; Parker, D. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42* (7), 925.

[55] Latva, M.; Takalo, H.; Mukkala, V.-M.; Matachescu, C.; Rodríguez-Ubis, J. C.; Kankare, J. *J. Lumin.* **1997**, *75* (2), 149.

[56] Steemers, F. J.; Verboom, W.; Reinhoudt, D. N.; Van Der Tol, E. B.; Verhoeven, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117 (37), 9408.

[57] Meech, S. R.; Phillips, D. *J. Photochem*. **1983**, 23 (2), 193.

[58] Ishida, H.; Tobita, S.; Hasegawa, Y.; Katoh, R.; Nozaki, K. *Coord. Chem. Rev*. **2010**, 254 (21–22), 2449.

[59] Parker, D.; Williams, J. A. G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1996**, 1581.

[60] Mathis, G.; Bazin, H. In *Lanthanide Luminescence: Photophysical, Analytical and Biological Aspects*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2011**, 47.

[61] Natrajan, L. S.; Timmins, P. L.; Lunn, M.; Heath, S. L. *Inorg. Chem.* **2007**, *46* (25), 10877.

[62] Napier, G. D. R.; Neilson, J. D.; Shepherd, T. M. *Chem. Phys. Lett.* **1975**, *31* (2), 328.

[63] Carlos, L. D.; Fernandes, J. A.; Sá Ferreira, R. A.; Malta, O. L.; Gonçalves, I. S.; Ribeiro-Claro, P. *Chem. Phys. Lett.* **2005**, *413* (1–3), 22.

[64] Pasatoiu, T. D.; Madalan, A. M.; Kumke, M. U.; Tiseanu, C.; Andruh, M. *Inorg. Chem.* **2010**, *49* (5), 2310.

[65] Tchaikovskaya, O. N.; Sokolova, I. V.; Kuznetsova, R. T.; Swetlitchnyi, V. A.; Kopylova, T. N.; Mayer, G. V. *J. Fluoresc.* **2000**, *10* (4), 403.

[66] Ala-Kleme, T.; Haapakka, K.; Latva, M. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *395* (1–2), 205.

[67] Nakai, H.; Goto, T.; Kitagawa, K.; Nonaka, K.; Matsumoto, T.; Ogo, S. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (99), 15737.

[68] Xiao, M.; Selvin, P. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (29), 7067.

[69] Xu, J.; Corneillie, T. M.; Moore, E. G.; Law, G. L.; Butlin, N. G.; Raymond, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (49), 19900.

[70] Brunet, E.; Juanes, O.; Sedano, R.; Rodríguez-Ubis, J. C. *Org. Lett.* **2002**, *4* (2), 213.

[71] Bruce, J. I.; Dickins, R. S.; Govenlock, L. J.; Gunnlaugsson, T.; Lopinski, S.; Lowe, M. P.; Parker, D.; Peacock, R. D.; Perry, J. J. B.; Aime, S.; Botta, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (40), 9674.

[72] Pierre, V. C.; Botta, M.; Aime, S.; Raymond, K. N. *Inorg. Chem.* **2006**, *45* (20), 8355.

[73] Imperio, D.; Giovenzana, G. B.; Law, G.-L.; Parker, D.; Walton, J. W. *Dalton Trans.* **2010**, *39* (41), 9897.

[74] Nikolaeva, L. S.; Chirkov, V. V.; Dobrynina, N. A.; Lyapina, L. A.; Pastorova, V. E. *Pharm. Chem. J.* **2005**, *39* (2), 57.

EXPERIMENTAL SECTION

1 Materials and equipment

1.1 Chemicals and reagents

Solvents and starting materials were purchased from Aldrich, Alfa Aesar, Fluka or Acros: they were of the highest commercially available purity and used without further purification, except for acetonitrile which was distilled over P_2O_5. The water used in the syntheses was obtained from a Purelab Flex purification system. The reactions under anhydrous conditions were performed under argon, using materials previously over dried at 70°C overnight followed by 3 vacuum/argon cycles.

1.2 Chromatography

The thin layer chromatographies (TLC) were performed on silica gel plate 60 F 254 (Machery-Nagel) or neutral aluminum oxide 150 F 254 (Merck) sheets when specified. Visualization was accomplished by UV light (254 or 360 nm) and revelation by potassium permanganate, 2,4-dinitrophenylhydrazine or phosphomolybdic acid. Flash column chromatography were carry out on silica gel column (60 M – 40-63 µm – Machery-Nagel) or aluminum oxide 90 active neutral (activity stage III – 63-200 µm – Merck), and the eluent composition is expressed as a v/v ratio.

1.3 Characterization

When this is not specified, NMR spectra were recorded on a Brucker Avance 300 spectrometer operating at 300 MHz for ^{1}H, 75 MHz for ^{13}C, 202 MHz for ^{31}P and 282 MHz for ^{19}F. In the spectra's description, chemical shifts are reported in ppm and were referenced internally to the residual solvent resonance, and coupling constants (*J*) are given in Hertz (Hz). Abbreviations used to described multiplicity of the NMR

signals are: s - singlet, d - doublet, dd - doublet of doublet, t - triplet, q - quartet, hept - heptet and m - multiplet.

Electrospray (ES) mass spectra were obtained on a Q TRAP Applied Biosystems spectrometer and High-Resolution Mass Spectra (HRMS) on a LCT Premier Waters spectrometer.

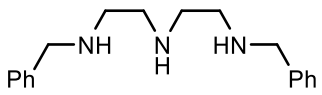
The analytical HILIC-UPLC analyses were performed on a Waters UPLC Acquity apparatus with PDA (photodiode array) and SQ (simple quadripole) detectors, and using an Acquity BEH HILIC column (1.7 μm, 100 × 2.1 mm) with a flow rate of 0.4 $mL.min^{-1}$.

System 1 : Solvent A = H_2O (0.1 % HCOOH) and solvent B = CH_3CN (0.1 % HCOOH), A:B gradient from 5/95 to 50/50 over 7 min, then an isocratic elution 50/50 for 10 min.

System 2 : Solvent A = NH_4HCO_2 buffer (10 mM, pH = 8) and solvent B = NH_4HCO_2 buffer (10 mM, pH = 8)/CH_3CN (10:90), A:B gradient from 5/95 to 50/50 over 7 min, then an isocratic elution 50/50 for 10 min.

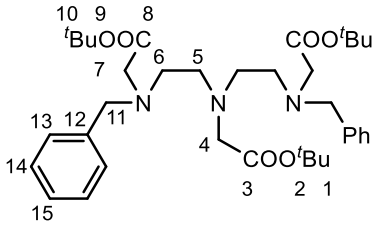
2 Synthesis of compounds 1 → 72

N_1-benzyl-N_2-(2-(benzylamino)ethyl)ethane-1,2-diamine (1)



This compound was synthesized as in reference[1]

Di-tert-butyl 2,2'-((((2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)azanediyl)bis(ethane-2,1-diyl))bis(benzyl-azanediyl))diacetate (2)



From compound **1**: To a solution of N^1,N^7-dibenzyl diethylenetriamine (1.79 g, 6.32 mmol) and DIPEA (6 mL, 34.4 mmol) in anhydrous DMF (26 mL) was added *tert*-butyl bromoacetate (3.6 mL, 24.4 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 48h. DMF was removed under vacuum and water (20 mL) was added on the residue. The mixture was extracted with diethyl ether (3 × 20 mL), the combined organic layers were dried over $MgSO_4$ and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography (SiO_2, petroleum ether/EtOAc: 98/2) to give **2** as a yellow oil (3.12 g, 79 %).

From compound **5**: Commercial *tert*-Butylglycinate (534 mg, 3.20 mmol, 1 eq) and K_2CO_3 (4.39 g, 31.79 mmol, 10 eq) were heated in anhydrous CH_3CN (54 mL) and after one hour **5** (2.09 g, 6.36 mmol, 2 eq) was added. The reaction mixture was stirred for

24h at reflux, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by column chromatography (SiO_2, petroleum ether/EtOAc: 98/2) to give **2** as a yellow oil (1.55 g, 76 %).

TLC (SiO_2, petroleum ether/ EtOAc (98/02) R_f = 0.13.

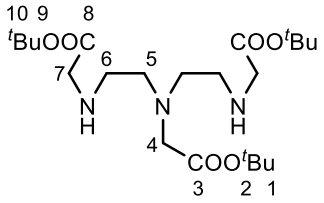
IR (cm^{-1}): 2900, 1733, 1580.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.37-7.31 (m, 10H, **H^{13}**, **H^{14}**, and **H^{15}**), 3.77 (s, 4H, **H^{11}**), 3.29 (s, 2H, **H^{11}**), 3.22 (s, 4H, **H^4**), 2.74 (s, 8H, **H^5** and **H^6**), 1.45 (s, 18H, **H^{10}**), 1.42 (s, 9H, **H^6**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 171.0 (**C^3**), 170.8 (**C^8**), 139.2 (**C^{12}**), 128.9 (**C^{14}**), 128.2 (**C^{13}**), 126.9 (**C^{15}**), 80.7 (**C^9**), 80.6 (**C^2**), 58.3 (**C^{11}**), 56.0 (**C^7**), 55.2 (**C^4**), 52.5 (**C^6**), 52.0 (**C^5**), 28.2 (**C^{10}**), 28.1 (**C^1**).

MS (ESI$^+$) m/z (%): 648.7 (19) $[M+Na]^+$, 626.7 (100) $[M+H]^+$.

Di-*tert*-butyl 2,2'-((((2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)azanediyl)bis(ethane-2,1-diyl))bis(azane-diyl))diacetate (3)



Polyamine **2** (290 mg, 0.46 mmol, 1 eq) was solubilized in MeOH (15 mL) then Pd/C (87 mg, 30 % wt.) was added. The black suspension was hydrogenated under 6 bars of hydrogen pressure for 12h at room temperature. The resulting mixture was filtered through a Celite® pad and the filtrate was concentrated *in vacuo* to give the expected product **3** as a yellow oil (206 mg, 100 %), which was engaged in the next step without further purification.

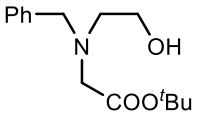
TLC (SiO_2, CH_2Cl_2/MeOH: 97/3) R_f = 0.3.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 3.30 (s, 2H, **H^7**), 3.26 (s, 4H, **H^4**), 2.80-2.77 (m, 4H, **H^5** or **H^6**), 2.68-2.65 (m, 4H, **H^5** or **H^6**), 1.35 (s, 18H, **H^{10}**), 1.34 (s, 9H, **H^1**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 171.2 (**C^3**), 171.0 (**C^8**), 81.2 (**C^9**), 80.9 (**C^2**), 55.7 (**C^7**), 53.6 (**C^4**), 51.2 (**C**H_2), 47.2 (**C**H_2), 28.2 (**C^{10}**), 28.1 (**C^1**).

MS (ESI+) m/z (%): 468.3 (5) $[M+Na]^+$, 446.3 (100) $[M+H]^+$.

Tert-butyl 2-(benzyl(2-hydroxyethyl)amino)acetate (4)



Under inert atmosphere, at 0°C and to a solution of *N*-benzylethanolamine (2 g, 13.2 mmol, 1 eq) and K_2CO_3 (1.826 g, 13.2 mmol, 1 eq) in anhydrous CH_3CN (50 mL) was added *tert*-butyl bromoacetate (2.580 g, 13.2 mmol, 1 eq) dropwise. The solution was allowed to stir at room temperature for 24h then was filtrated and concentrated *in vacuo* to give **4** as a colorless oil (3.510 g, 100 %), which was used in the next step without further purification.

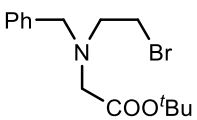
TLC (SiO_2, CH_2Cl_2/MeOH: 99/1) R_f = 0.24.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.33-7.23 (m, 5H, **Ph**), 3.80 (s, 2H, C**H$_2$**Ph), 3.58 (t, $^3J_{H-H}$ = 7.0 Hz, 2H, C**H$_2$**OH), 3.27 (s, 1H, OH), 3.21 (s, 2H, C**H$_2$**COOtBu), 2.84 (t, $^3J_{H-H}$ = 7.0 Hz, 2H, C**H$_2$**CH_2OH), 1.44 (s, 9H, C**H$_3$**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 171.1 (C_{IV} **C**OOtBu), 138.4 (C_{IV} **Ph**), 128.9 (**C**H Ar), 128.5 (**C**H Ar), 127.4 (**C**H Ar), 81.4 (C_{IV} **tBu**), 59.0 (**C**H_2COOtBu), 58.6 (**C**H_2Ph), 56.6 (**C**H_2OH), 55.4 (**C**H_2CH_2OH), 28.1 (**C**H_3).

MS (DCI/CH_4) m/z (%): 266.2 (24) $[M+H]^+$, 210.1 (100) $[M+2H-tBu]^+$.

Tert-butyl 2-(benzyl(2-bromoethyl)amino)acetate (5)



Under inert atmosphere, at 0°C and to a solution of **4** (3.51 g, 13.2 mmol, 1 eq) and PPh_3 (4.51 g, 17.2 mmol, 1.3 eq) in anhydrous CH_2Cl_2 (70 mL) was added *N*-bromosuccinimide (3.06 g, 17.2 mmol, 1.3 eq) as a solid in several portions. The solution was allowed to stir at room temperature overnight, then was filtrated and

concentrated *in vacuo*. The resulting oil was dissolved in Et_2O, filtrated again and the solvent was removed under reduced pressure several times. The crude product was purified by column chromatography (SiO_2, petroleum ether/ EtOAc: 98/2) to give **5** as a transparent oil (2.55 g, 82 %).

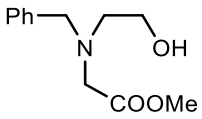
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.40-7.25 (m, 5H, C**H** Ph), 3.90 (C$\mathbf{H_2}$Ph), 3.40 (t, $^3J_{H-H}$ = 7.0 Hz, 2H, C$\mathbf{H_2}$Br), 3.33 (s, 2H, C$\mathbf{H_2}$COOtBu), 3.16 (t, $^3J_{H-H}$ = 7.0 Hz, 2H, C$\mathbf{H_2}$$CH_2$Br), 1.50 (C$\mathbf{H_3}$).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 170.5 (C_{IV} **C**OOtBu), 138.8 (C_{IV} **Ph**), 128.8 (**C**H Ar), 128.4 (**C**H Ar), 127.3 (**C**H Ar), 81.1 (C_{IV} **tBu**), 58.1 (**C**H_2Ph), 55.9 (**C**$H_2$$CH_2$Br), 55.2 **C**$H_2$COOtBu), 30.6 (**C**$H_2$Br), 28.2 (**C**$H_3$).

IR (cm^{-1}) KBr pellet: 3085, 3063, 2977, 2930, 2856, 1733 (CO), 1494, 1455, 1368, 1153.

MS (DCI/CH_4) m/z (%): 330.1 (19) [^{329}M+H]$^+$, 328.1 (25) [^{327}M+H]$^+$, 274.0 (76) [^{329}M+2H-tBu]$^+$, 272.0 (84) [^{327}M+2H-tBu]$^+$, 248.2 (100) [^{327}M-Br]$^+$.

Methyl 2-(benzyl(2-hydroxyethyl)amino)acetate (6)



A stirred solution of *N*-benzylethanolamine (1 g, 6.6 mmol) and diisopropylethylamine (0.85 g, 6.6 mmol) in DMF (7 mL) was cooled at 0°C and methyl bromoacetate (1 g, 6.6 mmol) was added dropwise. The mixture was then stirred 24h at room temperature. After DMF removal under high vacuum, the residue was dissolved in CH_2Cl_2 (10 mL) and the solution was washed with H_2O (3 × 5 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo* to give **6** as a yellow oil (1,47 g, 100 %), which was used in the next step without further purification.

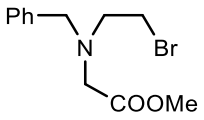
TLC (SiO_2, CH_2Cl_2/MeOH: 99/01) R_f = 0.66.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.26-7,33 (m, 5H, **Ph**), 3.82 (s, 2H,C$\mathbf{H_2}$Ph), 3.69 (s, 3H, CH_3), 3.60 (t, 2H, $^3J_{H-H}$ = 5 Hz, C$\mathbf{H_2}$OH), 3.35 (s, 2H, C$\mathbf{H_2}$COOMe), 287 (t, 2H, $^3J_{H-H}$ = 5 Hz, C$\mathbf{H_2}$$CH_2$OH).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.2 (C_{IV} **C**OOMe), 138.1 (C_{IV} **Ph**), 128.9 (**C**H Ar), 128.5 (**C**H Ar), 127.5 (**C**H Ar), 58.9 (**C**H_2OH), 58.4 (**C**H_2Ph), 56.5 (**C**H_2CH_2OH), 54.2 (**C**H_2COOMe), 51.7 (**C**H_3).

MS (ESI+) m/z (%): 262.0 (11) $[M+K]^+$, 246.0 (100) $[M+Na]^+$, 224.0 (52) $[M+H]^+$.

Methyl 2-(benzyl(2-bromoethyl)amino)acetate (8)



A stirred solution of **6** (1 g, 4.5 mmol) and triphenylphosphine (1.4 g, 5.3 mmol) in CH_2Cl_2 (20 mL) was cooled at 0°C and *N*-bromosuccinimide (1 g, 5.7 mmol) was added as a solid in several portions. The mixture was then stirred 16h at room temperature and concentrated *in vacuo*. The orange residue was triturated in the presence of diethyl ether and then filtered. The filtrate was concentrated *in vacuo* and the residue was subjected to purification by column chromatography on silica (diethyl ether) to afford **8** as a yellowish oil (0.9 g, 70 %).

TLC (SiO_2, petroleum ether/EtOAc: 95/05) R_f = 0.38.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.24-7.33 (m, 5H, **Ph**), 3.90 (s, 2H, C**H**$_2$Ph), 3.70 (s, 3H, C**H**$_3$), 3.44 (s, 2H, C**H**$_2$COOMe), 3.40 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.2 Hz, C**H**$_2$Br), 3.16 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.2 Hz, 2H, C**H**$_2$$CH_2$Br).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 171.6 (C_{IV} **C**OOMe), 138.4 (C_{IV} **Ph**), 128.8 (**C**H Ar), 128.4 (**C**H Ar), 127.4 (**C**H Ar), 58.1 (**C**H_2Ph), 55.8 (**C**H_2CH_2Br), 54.0 (**C**H_2COOMe), 51.4 (**C**H_3), 30.3 (**C**H_2Br).

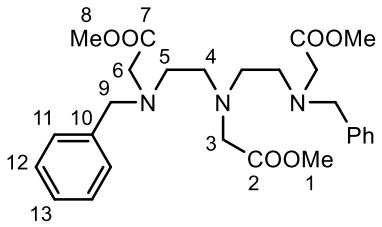
MS (ESI+) m/z (%): 288.0 (35) $[M+H]^+$, 286.0 (44) $[M+H]^+$, 206.1 (100) $[M+H\text{-}HBr]^+$.

Dimethyl 2,2'-(2,2'-(2-methoxy-2-oxoethylazanediyl)bis(ethane-2,1-diyl))bis(benzylazanediyl)diacetate (9) and methyl 2-(4-benzyl-2-oxopiperazin-1-yl)acetate (10).

A stirred solution of methylglycinate (156 mg, 1.75 mmol) and diisopropylethylamine (453 mg, 3.50 mmol) in DMF (2 mL) was cooled at 0°C and bromide **8** (1 g, 3.50 mmol)

was added. The mixture was then stirred 16h at room temprature and and concentrated *in vacuo*. Water (10 mL) was added to the residue and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 (3× 20 mL). The combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was subjected to purification by column chromatography on silica (CH_2Cl_2, then CH_2Cl_2/EtOAc 85:15 and CH_2Cl_2/EtOAc 70:30) to afford **9** and **10**.

Compound **9**: (242 mg, 28 %)



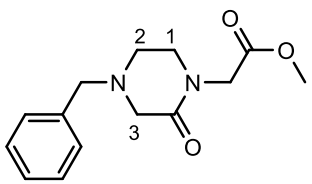
TLC (SiO_2, CH_2Cl_2/EtOAc: 70/30) Rf = 0.42.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.24-7.31 (m, 10H, **H^{11}**, **H^{12}**, and **H^{13}**), 3.76 (s, 4H, **H^9**), 3.66 (s, 6H, **H^8**), 3.64 (s, 3H, **H^1**), 3.43 (s, 2H, **H^3**), 3.35 (s, 4H, **H^6**), 2.75 (s, 8H, **H^4** and **H^5**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 171.9 (**C^2**), 171.8 (**C^7**), 138.7 (**C^{10}**), 128.9 (**C^{12}**), 128.2 (**C^{11}**), 127.0 (**C^{13}**), 58.4 (**C^9**), 54.8 (**C^6**), 54.0 (**C^3**), 52.4 (**C^4**), 51.8 (**C^5**), 51.4 (**C^8**) 51.2 (**C^1**).

MS (ESI+) m/z (%): 500.3 (100) $[M+H]^+$.

Compound **10**: (222 mg, 48 %)



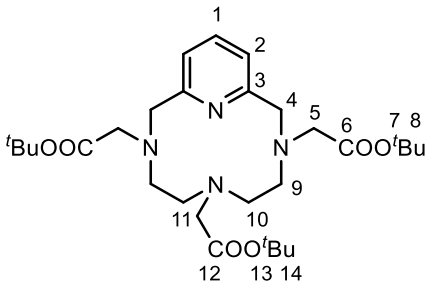
TLC (SiO_2, CH_2Cl_2/EtOAc: 70/30) Rf = 0.26.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.21-7.33 (m, 5H, **Ph**), 4.10 (s, 2H, NC**H$_2$**COOMe, 3.71 (s, 3H, COO**Me**), 3.56 (s, 2H, NC**H$_2$**Ph), 3.36 (dd, 2H, $^3J_{H\text{-}H}$ = 6.2 Hz and $^3J_{H\text{-}H}$ = 4.8 Hz, **H^2**), 3.19 (s, 2H, **H^3**), 2.71 (dd, 2H, $^3J_{H\text{-}H}$ = 6.2, 4.8 Hz, **H^1**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 169.2 (C_{IV} N**C**O), 167.7 (C_{IV} **C**OOMe), 136.7 (C_{IV} **Ph**), 128.9 (**C**H Ar), 128.3 (**C**H Ar), 127.4 (**C**H Ar), 61.5 (N**C**H$_2$Ph), 57.0 (**C^3**), 52.1 (COO**Me**), 48.9 (**C^1**), 47.6 (**C^2**), 47.4 (N**C**H$_2$COOMe).

MS (ESI+) m/z (%): 285.1 (99) $[M+Na]^+$, 263.1 (100) $[M+H]^+$.

Protected macrocycle (12)



To a solution of triamine **3** (330 mg, 0.74 mmol) in anhydrous CH_3CN (360 mL) was added Na_2CO_3 (784 mg, 7.4 mmol) and the suspension was heated at reflux for 1h30. 2,6-bis(bromomethyl)pyridine (195 mg, 0.74 mmol) was added in one portion and the reaction mixture was heated at reflux for 64 h and then was cooled to room temperature. The inorganic salts were filtered off and the filtrate was concentrated under vacuum. The residue was subjected to purification by column chromatography on alumina (CH_2Cl_2/MeOH, 98:02) to give a mixture of sodium complex and free ligand. This mixture was dissolved in CH_2Cl_2 (30 mL) and stirred overnight in the presence of a saturated Na_2EDTA aqueous solution (10 mL). The organic layer was dried ($MgSO_4$) and evaporated *in vacuo* to give free compound **12** as a grey amorphous powder (353 mg, 87 %).

Free ligand

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.57 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.7 Hz , 1H, **H^1**), 7.07 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.7 Hz, 2H, **H^2),** 3.99 (s, 4H, **H^4**), 3.63-2.28 (m, 14H, **H^5**, **H^9**, **H^{10}**, and **H^{11}**), 1.40 (s, 18H, **H^8**), 1.39 (s, 9H, **H^{14}**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 170.0 (**C^6** and **C^{12}**), 157.9 (**C^3**), 137.6 (**C^1**), 121.5 (**C^2**), 81.1 (**C^7** and **C^{13}**), 58.6 (**C^4**), 58.2 (**C^5**), 51.6 (**C^{11}**), 51.2 (**C^9**), 49.9 (**C^{10}**), 27.85 (**C^8**), 27.78 (**C^{14}**).

MS (ESI+) m/z (%): 549.5 (100) $[M+H]^+$.

Sodium complex

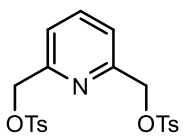
To a stirred solution of a mixture of sodium complex and ligand (27 mg) was added Na_2CO_3 (41 mg) in CH_3CN (25 mL) and the suspension was heated at reflux for 20h. The inorganic salts were filtered off and the filtrate was concentrated under vacuum to give **12**.Na complex as a brown oil.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.67 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.7 Hz, 1H, **H^1**), 7.15 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.7 Hz, 2H, **H^2),** 4.02 (d, 2H, $^3J_{A\text{-}B}$ = 14.1 Hz, A part of AB system, **H^4**), 3.66 (d, 2H, $^3J_{A\text{-}B}$ = 14.4 Hz, B part of AB system, **H^4**), 3.48 (d, 2H, $^3J_{A\text{-}B}$ = 17.6 Hz, A part of AB system, **H^5**), 3.35 (d, 2H, $^3J_{A\text{-}B}$= 17.6 Hz, B part of AB system, **H^5**), 3.10 (s, 2H, **H^{11}**), 2.59-2.56 (m, 4H, **H^{10}**), 2.20-2.12 (m, 2H, **H^9**), 1.98-1.85 (m, 2H, **H^9**), 1.50 (s, 18H, **H^8**), 1.44 (s, 9H, **H^{14}**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 173.5 (**C^{12}**), 172.9 (**C^6**), 157.9(**C^3**), 138.5 (**C^1**), 121.8 (**C^2**), 82.8 (**C^7**), 82.6 (**C^{13}**), 62.2 (**C^4**), 59.4 (**C^5**), 56.1 (**C^{11}**), 53.6 (**C^9**), 53.2 (**C^{10}**), 27.9 (**C^8**), 27.8 (**C^{14}**).

MS (ESI+) m/z (%): 549.5 (100) $[M+H]^+$, 493.5 (25) $[M+H\text{-}tBu]^+$, 437.5 (12) $[M+H\text{-}2tBu]^+$, 381.3 (7) $[M+H\text{-}3tBu]^+$.

Pyridine-2,6-diylbis(methylene) bis(4-methylbenzenesulfonate) (13)



To a stirred solution of 2,6-bis(hydroxymethyl)pyridine (5 g, 36 mmol) and NaOH (4.32 g, 108 mmol) in a mixture of water (18 mL) and tetrahydrofuran (18 mL), at 0°C, was added dropwise a solution of tosyl chloride (13.7 g, 72 mmol) in tetrahydofuran (30 mL). The mixture was stirred at 0°C for 9h and at room temperature 16h. After addition of water (60 mL), the mixture was extracted with CH_2Cl_2 (2 × 50 mL). The

organic extract was dried over $MgSO_4$ and evaporated under vacuum. The residue was purified by column chromatography over alumina eluting with CH_2Cl_2 to afford the title compound **5** as a white solid (14.2 g, 83 %).

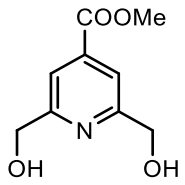
TLC (Al_2O_3, CH_2Cl_2/petroleum ether 80/20) R_f = 0.47.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.66-7.82 (m, 4H, C**H** Ts), 7.69 (t, 1H, $^3J_{H-H}$ = 7.7 Hz, NCCHC**H**), 7.33 (m, 5H, NCC**H** and C**H** Ts), 5.05 (s, 4H, C**H$_2$**OTs), 2.44 (s, 6H, C**H$_3$** Ts).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 153.5 (C_{IV} N**C**), 145.1 (C_{IV} **Ts**), 137.9 (**C**H Ar), 132.7 (**C**H Ar), 129.9 (**C**H Ar), 128.0 (**C**H Ar), 121.4 (**C**H Ar), 73.3 (**C**H_2OTs), 21.6 (**C**H_3).

IR (cm$^-$): 3062, 2944, 2922, 1598, 1579, 1461, 1362, 1188, 1174, 1096, 1023, 952.

Methyl 2,6-bis(hydroxymethyl)isonicotinate (14)



To a solution of methyl-isonicotinate (0.92 mL, 7.79 mmol, 1 eq) in MeOH (40 mL) was added H_2SO_4 (100 µL). The mixture was stirred at a gentle reflux for 30 minutes then $(NH_4)_2S_2O_8$ (17.841 g, 78.2 mmol, 10 eq) in H_2O (40 mL) was added dropwise over one hour. After 2 more hours of reflux, the yellow solution was allowed to cool to room temperature, and the excess of MeOH was removed under reduced pressure to give a dark yellow oil. The mixture was neutralized with $NaHCO_3$ and the organic layer was extracted five times with EtOAc, dried over $MgSO_4$ then the solvent was removed *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography (Al_2O_3, CH_2Cl_2/MeOH : 97/3) to give **14** as a pale yellow powder (338 mg, 85 %).

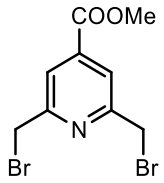
TLC (Al_2O_3, CH_2Cl_2/MeOH : 97/3) R_f = 0.30.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.78 (s, 2H, NCC**H**)), 4.86 (s, 4H, C**H$_2$**OH), 3.96 (s, 3H, C**H$_3$**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 165.5 (**C**$OOCH_3$), 160.1 (C_{IV} N**C**), 138.9 (C_{IV} **C**$(COOCH_3)$), 118.6 (**C**H), 64.4 (**C**H_2OH), 52.8 (**C**H_3).

MS (ESI$^+$) m/z (%): 220 (100) $[M+Na]^+$, 198.1 (24)$[M+H]^+$.

Methyl 2,6-bis(bromomethyl)isonicotinate (15)



At 0°C and to a solution of **14** (100 mg, 0.51 mmol, 1 eq) in anhydrous CH_2Cl_2 (10 mL) was added dropwise a solution of PBr_3 (1M in CH_2Cl_2, 1.02 mmol, 2 eq). The mixture was stirred for 20h from 0°C to room temperature then the reaction was stopped with $NaHCO_3$ (10 mL) at 0°C. The aqueous layer was extracted four times with CH_2Cl_2 and the combined organic layers were dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated *in vacuo* to give **15** as a white solid (165 mg, 100 %). The crude product was engaged in the next step without any purification.

Mp: 92°C.

TLC (SiO_2, petroleum ether/EtOAc: 90/10) R_f = 0.33.

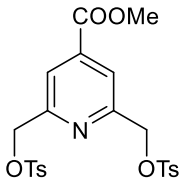
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.92 (s, 2H, NCC**H**)), 4.58 (s, 4H, C**H_2**Br), 3.98 (s, 3H, COOC**H_3**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 164.8 (**C**$OOCH_3$), 158.0 (C_{IV} N**C**), 139.8 (C_{IV} **C**$(COOCH_3)$), 122.3 (**C**H), 53.0 (**C**H_3), 32.8 (**C**H_2Br).

IR (cm^{-1}): 3074, 3049, 2964, 1721, 1565.

MS (DCI/NH_3) m/z (%): 323.9 (100) $[M+H]^+$, 321.8 (54) $[M+H]^+$, 325.9 (47) $[M+H]^+$.

Methyl 2,6-bis((tosyloxy)methyl)isonicotinate (16)



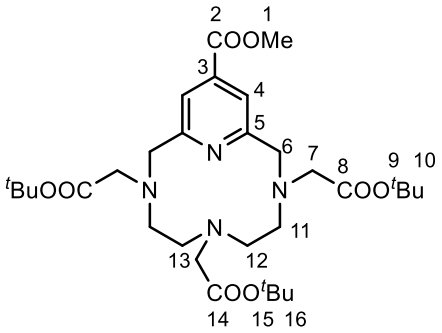
To a solution of diol **14** (200 mg, 1.015 mmol), potassium iodide (64 mg , 0.38 mmol) and Ag_2O (640 mg, 2.76 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (12 mL) was added at -20°C tosyl chloride (480 mg, 2.5 mmol). The reaction mixture was then stirred for 24 h at room temperature and concentrated under vacuum. The residue was purified by column chromatography (SiO_2, petroleum ether/CH_2Cl_2 80:20) to give **16** as a white solid (320 mg, 68 %)

TLC (SiO_2, petroleum ether/CH_2Cl_2: 80/20) R_f = 0.22.

^{1}H NMR (300 MHz, CDCl3) δ (ppm): 7.80 (s, 2H, C**H**), 7.78 (d, 4H, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, C**H** Ts), 7.31 (d, 4H, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, C**H** Tos), 5.08 (s, 4H, C**H$_2$**OTs), 3.94 (s, 3H, C**H$_3$**) 2.42 (s, 6H, C**H$_3$** Ts).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl$_3$) δ (ppm): 164.6 (C_{IV} **C**OOMe), 154.7(C_{IV} N**C**), 145.2 (C_{IV} **Ts**), 139.4 (**C**H Ar), 132.5 (**C**H Ar), 129.9 (**C**H Ar), 128.0 (**C**H Ar), 120.2 (**C**H Ar), 70.8 (**C**H_2OTs), 52.9 (**C**H_3), 21.6 (**C**H_3).

Protected macrocycle (17)



Compound **17** was synthesized as above for **12** from triamine **3** (150 mg, 0.34 mmol), Na_2CO_3 (350 mg, 3.37 mmol) and dibromide **15** (109 mg, 0.34 mmol) in CH_3CN (350 mL). After purification by column chromatography (Al_2O_3, CH_2Cl_2/MeOH: 100/2 to 98/2) and treatment with EDTA, free macrocycle **17** was obtained as a yellow oil (194 mg, 95 %).

Free ligand:

TLC (Al_2O_3, CH_2Cl_2/MeOH: 98/2) R_f = 0.3.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.61 (s, 2H, **H^{4}**), 4.04 (s, 4H, **H^{6}**), 3.87 (s, 3H, **H^{1}**), 3.37 (s, 6H, **H^{7}** and **H^{13}**), 2.83 (broad s, 8H, **H^{11}** and **H^{12}**), 1.41 (s, 18H, **H^{10}**), 1.36 (s, 9H, **H^{16}**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 170.4 (**C^{8}** and **C^{14}**), 165.5 (**C^{2}**), 159.3 (**C^{5}**), 138.5 (**C^{3}**), 121.1 (**C^{4}**), 81.1 (**C^{9}**), 81.2 (**C^{15}**), 59.6 (**C^{6}**), 58.2 (**C^{7}**), 56.0 (**C^{13}**), 52.5 (**C^{1}**), 51.0 (**C^{11}**), 50.2 (**C^{12}**), 28.1 (**C^{10}**), 28.0 (**C^{16}**).

IR (cm^{-1}) KBr pellet: 2977, 2934, 2856, 1729, 1676, 1571, 1368, 1224, 1153.

HRMS (ESI+) m/z (%): 629.3528 (15) $[M+Na]^+$, 607.3712 (100) $[M+H]^+$, 551.3083 (62) $[M+2H-tBu]^+$, 495.2456 (22) $[M+3H-2tBu]^+$, 439.1828 (5) $[M+4H-3tBu]^+$.

HRMS (ESI+) calcd. (found): 607.3707 (607.3712).

Sodium complex:

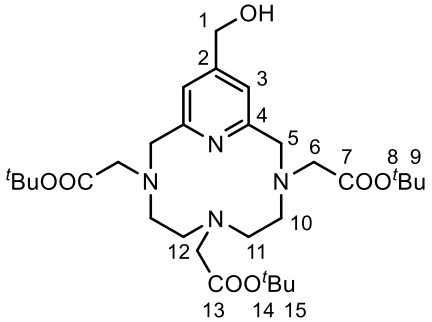
It was obtained as above for **12**.Na.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.64 (s, 2H, **H^{4}**), 4.22 (d, 2H, $^{3}J_{A\text{-}B}$ = 14.9 Hz, A part of an AB system, **H^{6}**), 3.94 (s, 3H, **H^{1}**), 3.82 (d, 2H, $^{3}J_{A\text{-}B}$ = 14.9 Hz, B part of an AB system, **H^{6}**), 3.57 (d, 2H, $^{3}J_{A\text{-}B}$ = 17.7 Hz, A part of an AB system, **H^{7}**), 3.48 (d, 2H, $^{3}J_{A\text{-}B}$ = 17.7 Hz, B part of an AB system, **H^{7}**), 3.15 (s, 2H, **H^{13}**), 2.71-2.46 (m, 4H, **H^{11}**), 2.27-1.79 (m, 4H, **H^{12}**), 1.48 (s, 18H, **H^{10}**), 1.44 (s, 9H, **H^{16}**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.9 (**C^{14}**), 172.5 (**C^{8}**), 165.0 (**C^{2}**), 159.5 (**C^{5}**), 139.2 (**C^{3}**), 120.5 (**C^{4}**), 82.5 (**C^{9}**), 82.3 (**C^{15}**), 62.0 (**C^{6}**), 59.1 (**C^{7}**), 55.8 (**C^{13}**), 53.4 (**C^{11}**), 53.1 (**C^{12}**), 52.8 (**C^{1}**), 27.9 (**C^{10}**), 27.8 (**C^{16}**).

IR (cm^{-1}) KBr pellet: 2974, 2933, 2856, 1731, 1671, 1572, 1369, 1228, 1158.

Protected macrocycle (18)



To a stirred solution of **17** (50 mg, 0.0844mmol) in methanol (4 mL) was added $NaBH_4$ (223 mg, 5.9 mmoles). The reaction was followed by TLC analysis. The mixture was stirred at room temperature for 48h and methanol was removed under reduced pressure. A saturated aqueous solution of NH_4Cl (2 mL) and water (4 mL) were added to the residue and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 (3 × 4 mL). The combined organic layers were dried on $MgSO_4$ and concentrated under vacuum to give **18.Na** as an oil (36 mg, 75 %).

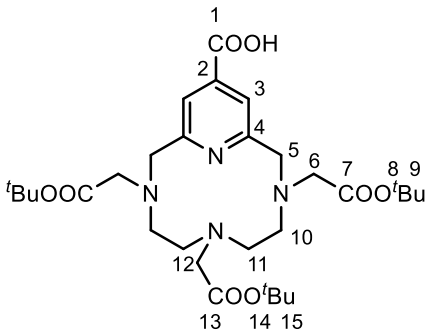
TLC (Al_2O_3, CH_2Cl_2/MeOH: 95/5) R_f = 0.37.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.24 (s, 2H, **H^3**), 4.73 (s, 2H, **H^1**), 3.95 (d, 2H, $^3J_{A\text{-}B}$ = 14.1 Hz, A part of AB system, **H^5**), 3.54 (d, 2H, $^3J_{A\text{-}B}$ = 14.1 Hz, B part of AB system, **H^5**), 3.41 (d, 2H, $^3J_{A\text{-}B}$ = 17.5 Hz, A part of AB system, **H^6**), 3.25 (d, 2H, $^3J_{A\text{-}B}$ = 17.5 Hz, B part of AB system, **H^6**), 3.00 (s, 2H, **H^{12}**), 2.60-1.79 (m, 8H, **H^{10}** and **H^{11}**), 1.47 (s, 18H, **H^9**), 1.41 (s, 9H, **H^{15}**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 173.2 (**C^{13}**), 172.7 (**C^7**), 157.0 (**C^4**), 155.7 (**C^2**), 119.7 (**C^3**), 82.8 (**C^8**), 82.5 (**C^{14}**), 62.3 (**C^5**), 62.2 (**C^1**), 59.5 (**C^6**), 55.9 (**C^{12}**), 53.6 (**C^{10}**), 53.0 (**C^{11}**), 27.9 (**C^9**), 28.7 (**C^{15}**).

MS (ESI+) m/z (%): 579.4 (100) $[M+H]^+$.

Protected macrocycle (19)



To a solution of macrocyclic ligand **17** (202 mg, 0.33 mmol, 1eq) in MeOH was added Na_2CO_3 (141 mg, 1.33 mmol, 4 eq) preliminarily dissolved in H_2O. The mixture was stirred for 12h at room temperature and MeOH was evaporated. The solution was then neutralized with HCl (0.1 N) and concentrated *in vacuo*. The resulting solid was dissolved in CH_2Cl_2 then filtered through a Celite® pad and the filtrate was

concentrated under vacuum to give the corresponding deprotected ligand **19.**Na as a pale yellow powder (195 mg, 100 %).

TLC (Al_2O_3, CH_2Cl_2/MeOH: 96/4) R_f = 0.46.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.76 (s, 2H, **H^3**), 3.98 (d, $^3J_{A\text{-}B}$ = 13.8 Hz, A part of AB system, 2H, **H^5**), 3.53 (d, $^3J_{A\text{-}B}$ = 13.9 Hz, B part of AB system, 2H, **H^5**), 3.42 (d, $^3J_{A\text{-}B}$ = 17.5 Hz, A part of AB system, 2H, **H^6**), 3.25 (d, $^3J_{A\text{-}B}$ = 17.5 Hz, B part of AB system, 2H, **H^6**), 2.98 (s, 2H, **H^{12}**), 2.55-2.31 (m, 4H, **H^{10}**), 2.05-1.70 (m, 4H, **H^{11}**), 1.48 (s, 18H, **H^9**), 1.42 (s, 9H, **H^{15}**).

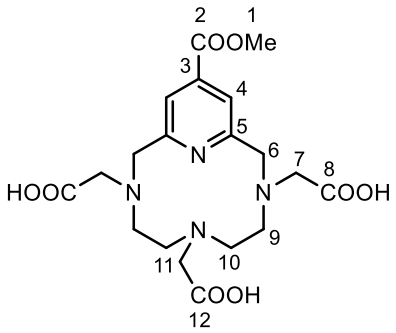
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 173.1 (**C^{13}**), 172.6 (**C^7**), 168.5 (**C^1**), 156.8 (**C^4**), 144.7 (**C^2**), 122.4 (**C^3**), 82.7 (**C^8**), 82.6 (**C^{14}**), 62.5 (**C^5**), 59.6 (**C^6**), 55.9 (**C^{12}**), 53.7 (**C^{11}**), 53.0 (**C^{10}**), 28.0 (**C^9**), 27.8 (**C^{15}**).

IR (cm^{-1}) KBr pellet: 2974, 1727, 1616, 1564, 1454, 1369, 1233 1159.

HRMS (ESI+) m/z (%): 615.3375 (21) $[M+Na]^+$, 593.3554 (87) $[M+H]^+$, 537.2927 (100) $[M+2H\text{-}tBu]^+$, 537.2300 (32) $[M+3H\text{-}2tBu]^+$, 425.1670 (8) $[M+4H\text{-}3tBu]^+$.

HRMS (ESI+) calcd. (found): 593.3550 (593.3554).

Protected macrocycle (20)

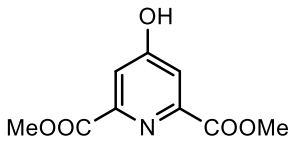


To a solution of macrocycle **17** (30 mg, 0.05 mmol) in CH_2Cl_2 (2 mL) was added trifluoroacetic acid (2 mL). The mixture was stirred at room temperature for 16h and was concentrated under vacuum to give **20** as an orange oil (22 mg, 100 %).

^{1}H NMR (300 MHz, D_2O) δ (ppm): 7.97 (s, 2H, **H^4**), 5.00 (s, 4H, **H^6**), 4.38 (s, 4H, **H^7**), 3.96 (s, 7H, CH_3 **1, H^9**), 3.63 (broad s, 6H, **H^9** and **H^{11}**), 2.90 (broad s, 4H, **H^{10}**).

^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) δ (ppm): 175.1 (**C^{12}**), 168.5(**C^{8}**), 165.9 (**C^{2}**), 151.2 (**C^{5}**), 140.8 (**C^{3}**), 121.6 (**C^{4}**), 59.7(**C^{6}**), 56.8 (**C^{7}**), 55.1 (**C^{10}**), 54.4 (**C^{11}**), 53.5 (**C^{1}**), 50.6 (**C^{9}**).
MS (ESI+):*m/z* (%): 477.5 (100) $[M+K]^+$, 381.5 (64) $[M-CH_2COOH+2H]^+$.

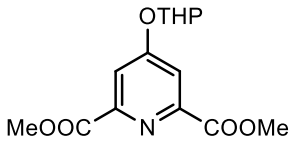
Dimethyl 4-hydroxypyridine-2,6-dicarboxylate (21)



This compound was synthesized as described by Froidevaux *et al*.[2]
To a solution of chelidamic acid (5 g, 27.3 mmol, 1 eq) in MeOH (200 mL) was slowly added $SOCl_2$ (5 mL, 68.5 mmol, 2.5 eq). The mixture was brought to reflux for 6h then the solvent was removed *in vacuo*. Toluene (100 mL), Et_2O (100 mL) then water (100 mL) were added to the resulting white paste and the suspension was filtered and concentrated *in vacuo* to give **21** as a white solid (4.373 g, 76 %). The crude product was engaged in the next step without any purification.

TLC (SiO_2, CH_2Cl_2/MeOH: 95/5) R_f = 0.28.
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.54 (s, 2H, C**H**), 4.03 (s, 6H, C**H$_3$**).

Dimethyl 4-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)pyridine-2,6-dicarboxylate (22)



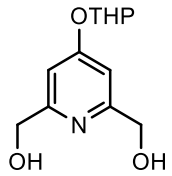
This compound was synthesized as described by Izatt *et al*.[3]
To a solution of **21** (0.999 g, 4.73 mmol, 1 eq) and PPTS 119 mg, 0.47 mmol, 0.1 eq) in CH_2Cl_2 (20 mL) was added dihydropyran (1.6 mL, 18.9 mmol, 4 eq). The reaction mixture was stirred for 16h at room temperature then heated at 50 °C for 4h. The reaction was washed twice with brine (10 mL) and the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2. The organic layer was dried over Na_2SO_4, filtered, and concentrated *in vacuo*. The resulting product was washed with Et_2O (20 mL) and filtered, and the

remaining solid was dissolved in CH_2Cl_2, and then concentrated to give **22** as a white solid (832 mg, 60 %). The crude product was engaged in the next step without any purification.

TLC (SiO_2, CH_2Cl_2/MeOH: 99/1) R_f = 0.27.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.94 (s, 2H, NCC**H**), 5.68 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 3.0 Hz, OC**H**), 4.00 (s, 6H, COO**Me**), 3.82-3.63 (m, 2H, OCHC**H$_2$**), 2.08-1.48 (m, 6H, C**H$_2$**).

4-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)pyridine-2,6-diyl)dimethanol (23)



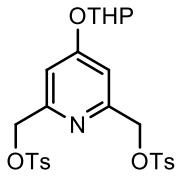
This compound was synthesized as described by Bradshaw *et al*.[4]

To a solution of **22** (100 mg, 0.34 mmol, 1 eq) and $CaCl_2$ (112 mg, 1.01 mmol, 3 eq) in absolute EtOH (7 mL) was added slowly a solution of $NaBH_4$ (38 mg, 1.00 mmol, 3eq) in absolute EtOH (7 mL). After being stirred 2h at 0 °C and 1h at room temperature, the mixture was quenched with H_2O (10 mL) and the solvent was evaporated. The solution was extracted five times with CH_2Cl_2 and the organic layers were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and the solvent was removed *in vacuo* to give **23** as a pale yellow solid (57 mg, 70 %). The crude product was engaged in the next step without any purification.

TLC (Al_2O_3, CH_2Cl_2/MeOH: 98/2) R_f = 0.30.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 6.84 (s, 2H, NCC**H**), 5.53 (t, 1H, $^3J_{H\text{-}H}$ = 3.0 Hz), 4.66 (s, 4H, C**H$_2$**OH), 3.84-3.56 (m, 2H, OCHC**H$_2$**), 2.03-1.38 (m, 6H, C**H$_2$**).

2,6-bis((tosyloxy)methyl)-4-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)pyridine (24)



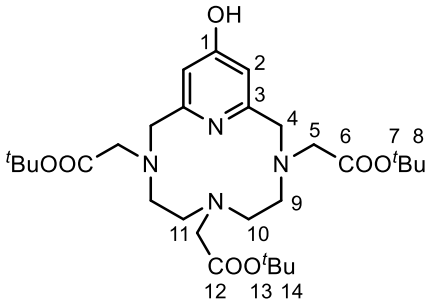
This compound was synthesized as described by Howáth *et al*[5]

To a solution of **23** (100 mg, 0.42 mmol, 1 eq) in CH_2Cl_2 (2 mL) was added an aqueous solution of KOH (40 %, 2 mL). After being cooled down to 0 °C, TsCl (176 mg, 0.92 mmol, 2.2 eq) was added in one portion and the mixture was stirred overnight. The reaction was stopped with CH_2Cl_2 (2 mL) and H_2O (2 mL), and the aqueous layer was extracted five times with CH_2Cl_2. The organic layers were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and the solvent was removed *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography (Al_2O_3, CH_2Cl_2) to give **24** as a colorless oil (84 mg, 37 %).

TLC (SiO_2, CH_2Cl_2/petroleum ether: 75/25) R_f = 0.32.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.80-7.77 (m, 4H, SCC**H**), 7.33-7.29 (d, 4H SCCHC**H**), 6.94 (s, 2H, NCC**H**), 5.48-5.46 (s, 1H, OC**H**), 4.97 (s, 4H, C**H$_2$**OTs), 3.76-3.57 (m, 2H, OCHC**H$_2$**), 2.43 (s, 6H, C**H$_3$**), 2.05-1.50 (m, 6H, C**H$_2$**).

Protected macrocycle (25)

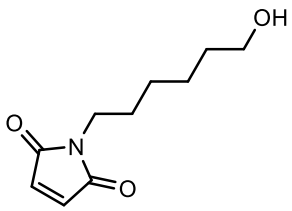


To a stirred solution of **3** (68 g, 0.15 mmol, 1 eq) in anhydrous CH_3CN (160 mL) was added solid Na_2CO_3 (162 g, 1.53 mmol, 10 eq). The suspension was refluxed for 1h under argon, then pyridine derivative moiety (84 mg, 0.15 mmol, 1 eq) was added in one portion and the mixture was stirred at reflux for 24h. The mixture was then cooled

down to room temperature, filtered and concentrated *in vacuo*. After being dissolved in a AcOH/THF/H_2O (1:2:1) mixture, the reaction system was stirred for 1h30, then concentrated. The resulting product was dissolved in water again, then the aqueous layer was extracted five times with CH_2Cl_2. The organic layers were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and the solvent was removed *in vacuo*. The crude product was finally purified by column chromatography (Al_2O_3, CH_2Cl_2/MeOH: 99/1 to 97/3) to give free ligand **25** as a yellow oil (51 mg, 59 %).

TLC (Al_2O_3, CH_2Cl_2/MeOH: 96/4) R_f = 0.33.
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 12.37 (s large, 1H, O**H**), 6.07 (s, 2H, **H^1**), 3.76 (s, 4H, **H^4**), 3.35 (s, 4H, **H^5**), 3.29 (s, 2H, **H^{11}**), 2.90-2.87 (m, 4H, **H^9**), 2.74-2.71 (m, 4H, **H^{10}**), 1.44 (s, 18H, **H^8**), 1.42 (s, 9H, **H^{14}**).
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 180.1 (**C^1**), 170.4 (**C^{12}**), 169.8 (**C^6**), 149.5 (**C^3**), 113.4 (**C^2**), 81.64 (**C^7**), 81.61 (**C^{13}**), 57.6 (**C^5**), 55.6 (**C^4**), 53.3 (**C^9**), 52.8 (**C^{10}**), 50.3 (**C^{11}**), 28.13 (**C^8**), 28.10 (**C^{14}**).
MS (ESI+) m/z (%): 565.36 (32) $[M+H]^+$, 509.30 (100) $[M+2H-tBu]^+$, 453.23 (28) $[M+3H-2tBu]^+$, 397.17 (6) $[M+4H-3tBu]^+$.
HRMS (ESI+) calcd. (found): 565.3601 (565.3591).

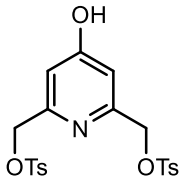
1-(6-hydroxyhexyl)-1H-pyrrole-2,5-dione (26)



At 0 °C, to a solution of 6-aminohexan-1-ol (380 mg, 3.24 mmol) in a saturated aqueous solution of $NaHCO_3$ (16 mL) was added *N*-(methoxycarbonyl)maleimide (0.5 g, 3.24 mmol) and the mixture was stirred for 30 min at 0 °C. At room temperature, the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 and the organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered, the solvent was removed *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography (SiO_2, CH_2Cl_2/EtOAc 50/50) to give **26** as a white solid (370 mg, 58 %).

^{1}H NMR (300 MHz, CDCl) δ (ppm): 6.63 (s, 2H, C**H**), 3.71 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 6.7 Hz, 2H, NC**H$_2$**), 3.51 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.3 Hz, 2H, C**H$_2$**OH), 2.39 (s, 1H, O**H**), 1.55-1.13 (m, 8H, C**H$_2$**).

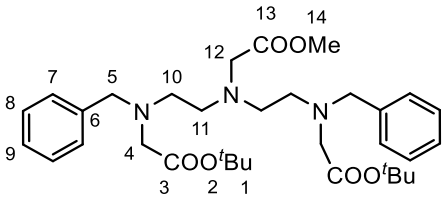
(4-hydroxypyridine-2,6-diyl)bis(methylene) bis(4-methylbenzenesulfonate) (27)



To a solution of **23** (140 mg, 0.58 mmol, 1 eq) in CH_2Cl_2 (3 mL) was added an aqueous solution of KOH (40 %, 3 mL). After being cooled down to 0 °C, TsCl (250 mg, 1.31 mmol, 2.2 eq) was added in one portion and the mixture was stirred overnight. The reaction was stopped with CH_2Cl_2 (3 mL) and H_2O (3 mL), and the aqueous layer was extracted five times with CH_2Cl_2. The organic layers were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and the solvent was removed *in vacuo*. The crude product was stirred for 2h with AcOH/THF/H_2O 1/2/1 and THF was removed. The mixture was extracted with CH_2Cl_2. CH_2Cl_2 was removed, Et_2O was added and the solid filtered to give **27** as a white solid (140 mg, 52 %).

TLC (Al_2O_3, CH_2Cl_2) R_f = 0.70.
^{1}H NMR (300 MHz, CDCl) δ (ppm): 7.76-7.73 (m, 4H, CH **Ts**), 7.33-7.29 (m, 4H, CH **Ts**), 6.68 (s, 2H, NCC**H**), 4.90 (s, 4H, C**H$_2$**), 3.37 (broad s, 1H, O**H**), 2.40 (s, 6H, C**H$_3$**).

Di-*tert*-butyl 2,2'-((((2-methoxy-2-oxoethyl)azanediyl)bis(ethane-2,1-diyl))bis(benzylazanediyl))diacetate (28)



To a solution of methylglycinate (78 mg, 0.47 mmol) in anhydrous CH_3CN (11 mL) was added in one portion solid K_2CO_3 (841 mg, 6.1 mmol). The suspension was

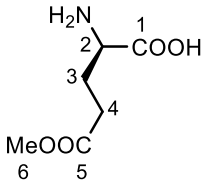
refluxed for 1h under argon, then bromide **5** (400 mg, 1.22 mmol) was added dropwise. The mixture was stirred at reflux for 24h, cooled to room temperature, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography (SiO_2, petroleum ether/EtOAc 90/10) to give **28** as a yellow oil (150 mg, 55 %).

TLC (SiO_2, petroleum Ether/EtOAc: 90/10) R_f = 0.60.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.33-7.17 (m, 10H, **H^7**, **H^8** and **H^9**), 3.75 (s, 4H, **H^5**), 3.62 (s, 3H, **H^{14}**), 3.43 (s, 2H, **H^{12}**), 3.21 (s, 4H, **H^4**), 2.74 (s, 8H, **H^{10}** and **H^{11}**), 1.44 (s, 18H, **H^1**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.0 (**C^{13}**), 170.7 (**C^3**), 140.0 (**C^6**), 128.8 (**C^8**), 128.1 (**C^7**), 126.9 (**C^9**), 80.5 (**C^2**), 58.3 (**C^5**), 55.1 (**C^4**), 54.9 (**C^{12}**), 52.5 (**C^{11}**), 51.8 (**C^{10}**), 51.1 (**C^{14}**), 28.1 (**C^1**).

2-amino-5-methoxy-5-oxopentanoic acid hydrochloride (29)

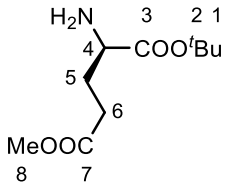


To a solution of glutamic acid (1.84 g, 12.5 mmol) in methanol (37 mL) cooled at 0°C was added dropwise trimethylsilyl chloride (3.5 mL, 27.7 mmol). Once addition was completed, methanol was removed under vacuum to give **29** as a white solid (2.4 g, 100 %). The crude product was used in the next step without any purification.

^{1}H NMR (300 MHz, D_2O) δ (ppm): 4.05-3.94 (m, 1H, **H^2**), 3.64 (s, 3H, **H^6**), 2.57 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.6 Hz, 2H, **H^4**), 2.22-2.19 (m, 2H, **H^3**).

^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) δ (ppm): 174.4 (**C^1**), 171.5 (**C^5**), 52.4 (**C^2**), 52.1 (6), 29.4 (**C^4**), 24.8 (**C^3**).

1-*tert*-butyl 5-methyl 2-aminopentanedioate (30)



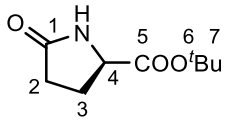
To a solution of **29** (300 mg, 1.52 mmol) in *tert*-butyl acetate (21 mL) was added $HClO_4$ (0.15 mL). The mixture was stirred for 12h at room temperature then cooled down to 0 °C and extracted with a cold solution of HCl 0.5 N (2 × 15 ml). The aqueous layer was neutralized with $NaHCO_3$ then extracted three times with EtOAc. The organic layers were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and the solvent was removed *in vacuo* to give **30** as a colorless oil (250 mg, 75 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 3.66 (s, 3H, **H^9**), 3.32 (dd, $^3J_{H\text{-}H}$ = 5.3 Hz, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.2 Hz, 1H, **H^4**), 2.44 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ =7.6 Hz, 2H, **H^6**), 2.10-1.90 (m, 1H, **H^5**), 1.90-1.70 (m, 3H, **H^5** and N**H$_2$**), 1.45 (s, 9H, **H^1**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 174.8 (**C^3**), 173.7 (**C^7**), 81.3 (**C^2**), 54.3 (**C^4**), 51.7 (**C^8**), 30.5 (**C^6**), 29.8 (**C^5**), 24.0 (**C^1**).

The crude product **30** was purified by column chromatography (Al_2O_3, CH_2Cl_2) to give **31** as a white solid (96 mg, 60 %).

Tert-butyl 5-oxopyrrolidine-2-carboxylate (31)



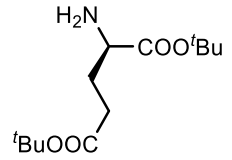
TLC (Al_2O_3, CH_2Cl_2) R_f = 0.21.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 6.00 (broad s, 1H, N**H**), 4.15-4.10 (m, 1H, **H^4**), 2.42-2.31 (m, 4H, **H^2** and **H^3**), 1.47 (s, 9H, **H^7**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 178.0 (**C^1**), 171.2 (**C^5**), 82.3 (**C^6**), 56.1 (**C^4**), 29.4 (**C^2**), 28.0 (**C^7**), 24.8 (**C^3**).

MS (ESI+) m/z (%): 203.1 (100) $[M+H]^+$.

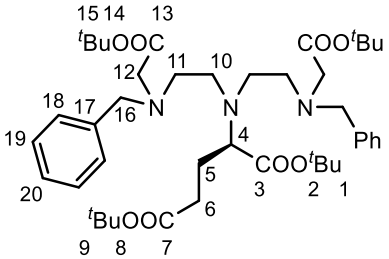
Di-*tert*-butyl glutamate (32)



To a solution of glutamic acid (896 mg, 6.1 mmol) in *tert*-butyl acetate (84 mL) was added $HClO_4$ (0.6 mL). The mixture was stirred for 12h at room temperature then cooled down to 0 °C and extracted with a cold solution of HCl (0.5 N). The aqueous layer was neutralized with $NaHCO_3$ then extracted three times with EtOAc. The organic layers were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and the solvent was removed *in vacuo* to give **32** as a pale yellow solid (805 mg, 51 %). The crude product was used in the next step without any purification.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 3.35 (dd, $^3J_{H\text{-}H}$ = 5.4 Hz and $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.7 Hz, 1H, C**H**), 2.33 (s, 2H, N**H$_2$**), 2.33 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.6 Hz, 2H, C**H$_2$**COOtBu), 2.02-1.91 (m, 1H, C**H$_2$**), 1.82-1.69 (m, 1H, C**H$_2$**), 1.44 (s, 9H, C**H$_3$**), 1.41 (s, 9H, C**H$_3$**).
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 174.4 (C_{IV} **C**OOtBu), 172.5 (C_{IV} **C**OOtBu), 81.3 (C_{IV} **tBu**), 80.4 (C_{IV} **tBu**), 54.1 (**C**H), 31.8 (**C**H$_2$COOtBu), 29.7 (**C**H$_2$), 28.0 (**C**H$_3$), 27.9 (**C**H$_3$).

Di-*tert*-butyl *N,N*-bis(2-(benzyl(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)amino)ethyl)glutamate (33)



Polyamine **33** was prepared as above for **2** from **32** (118 mg, 0.457 mmol, 1 eq), K_2CO_3 (630 mg, 4.57 mmol, 10 eq) and **5** (300 mg, 0.91 mmol, 2 eq) in CH_3CN (14 mL). The crude product was purified by column chromatography (Al_2O_3, CH_2Cl_2/EtOAc: 98/2) to give **33** as a yellow oil (116 mg, 34 %).

TLC (SiO2, CH_2Cl_2/MeOH: 98/2) R_f = 0.31.

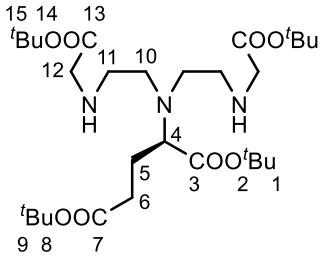
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.35-7.10 (m, 10H, **H^{18}**, **H^{19}**, and **H^{20}**), 3.74 (s, 4H, **H^{16}**), 3.22 (dd, 1H, $^3J_{H\text{-}H}$ = 3.9 Hz and $^3J_{H\text{-}H}$ = 5.6 Hz, **H^4**), 3.18 (s, 4H, **H^{12}**), 2.60-2.80 (m, 8H, C**H$_2$**), 2.37-2.11 (m, 2H, **H^5**), 1.61-1.95 (m, 2H, **H^5**), 1.45 (s, 18H, C**H$_3$**), 1.42 (s, 18H, C**H$_3$**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.8 (**C^3**), 172.3 (**C^{13}**), 170.7 (**C^7**), 139.1 (**C^{17}**), 128.9 (**C^{19}**), 128.2 (**C^{18}**), 126.9 (**C^{20}**), 80.7 (**C^{14}**), 80.6 (**C^2**), 80.0 (**C^8**), 63.4 (**C^4**), 58.3 (**C^{16}**), 55.2 (**C^{12}**), 53.4 (**C**H_2), 50.0 (**C**H_2), 32.0 (**C^5**), 28.23 (**C^{15}**), 28.17 (**C^1**), 28.08 (**C^9**), 25.0 (**C^6**).

MS (ESI$^+$) m/z (%): 754.5 (100) $[M+H]^+$, 698.4 (24) $[M+2H–tBu]^+$, 642.4 (35) $[M+3H-2tBu]^+$, 586.3 (54) $[M+4H-3tBu]^+$, 530.3 (49) $[M+5H-4tBu]^+$.

HRMS (ESI+) calcd. (found): 754.5007 (754.5018).

Di-*tert*-butyl 2-(bis(2-((2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)amino)ethyl)amino)pentanedioate (34)



Polyamine **34** was prepared as above for **3** from **33** (330 mg, 0.44 mmol) and Pd/C (115 mg, 30 % wt.) in methanol (15 mL). The crude product **34** was obtained as a yellow oil (251 mg, 100 %) and was used in the next step without further purification.

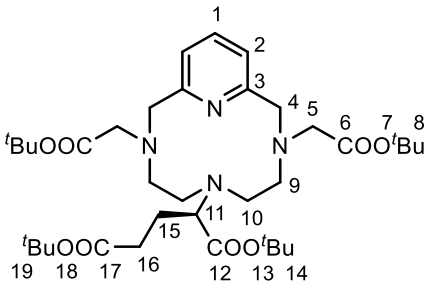
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 3.33 (s, 1H, **H^4**), 3.27-3.15 (m, 4H, **H^{12}**), 2.77-2.48 (m, 8H, **H^{10}** and **H^{11}**), 2.35-2.09 (m, 4H, **H^5** and N**H**), 1.99-1.64 (m, 2H, **H^6**), 1.37 (s, 18H, **H^{15}**), 1.36 (s, 9H, **H^1**), 1.35 (s, 9H, **H^9**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.5 (**C^3**), 171.8 (**C^{13}**), 171.3 (**C^7**), 80.8 (**C^{14}**), 80.7 (**C^2**), 79.9 (**C^8**), 63.0 (**C^4**), 51.4 (**C**H_2), 51.0 (**C**H_2), 47.9 (**C**H_2), 31.9 (**C^5**), 28.08 (**C^1** and **C^1**), 27.92 (**C^9**), 24.9 (**C^6**).

IR (cm^{-1}) KBr pellet: 2977, 2929, 1729, 1456, 1393, 1368, 1249, 1233, 1154.

MS (ESI+) m/z (%): 574.4 (100) $[M+H]^+$, 518.3 (13) $[M+2H\text{-}tBu]^+$, 462.3 (10) $[M+3H\text{-}2tBu]^+$.

Protected macrocycle (35)



Compound **35** was synthesized as above for **12** from triamine **34** (220 mg, 0.38 mmol), Na_2CO_3 (406 mg, 3.83 mmol) and 2,6-bromomethyl pyridine (100 mg, 0.38 mmol) in CH_3CN (190 mL). After purification by column chromatography (Al_2O_3, CH_2Cl_2/MeOH: 98/2) and treatment with EDTA, free macrocycle **35** was obtained as a yellow oil (218 mg, 75 %).

TLC (Al_2O_3, CH_2Cl_2/MeOH: 98/2) R_f = 0.2.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.56 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.6 Hz, 1H, **H^1**), 7.10 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.7 Hz, 2H, **H^2**), 3.96 (s, 4H, **H^4**), 3.34 (s, 4H, **H^5**), 3.00-2.87 (m, 1H, **H^{11}**), 2.81-2.49 (m, 8H, **H^9** and **H^{10}**), 2.26-1.98 (m, 2H, **H^{15}**), 1.85-1.57 (m, 2H, **H^{16}**), 1.43 (s, 18H, **H^8**), 1.37 (s, 9H, **H^{14}**), 1.36 (s, 9 H, **H^{19}**).

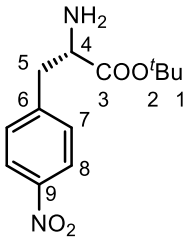
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.8 (**C^{12}**), 172.7 (**C^6**), 170.5 (**C^{17}**), 157.3 (**C^3**), 136.9 (**C^1**), 122.3 (**C^2**), 80.8 (**C^7**), 80.5 (**C^{13}**), 79.8 (**C^{18}**), 65.0 (**C^{11}**), 59.8 (**C^4**), 58.1 (**C^5**), 51.4 (**C**H_2), 48.9 (**C**H_2), 31.7 (**C^{15}**), 28.1 (**C^8** and **C^{14}**), 28.0 (**C^{19}**), 25.4 (**C^{16}**).

IR (cm^{-1}) KBr pellet: 2977, 2929, 1729, 1456, 1393, 1368, 1249, 1233, 1154.

MS (ESI+) m/z (%): 677.4 (100) $[M+H]^+$, 621.4 (6) $[M+2H\text{-}tBu]^+$, 565.3 (5) $[M+3H\text{-}2tBu]^+$, 509.3 (3) $[M+4H\text{-}3tBu]^+$.

HRMS (ESI+) calcd. (found): 677.4489 (677.4502).

Tert-butyl 2-amino-3-(4-nitrophenyl)propanoate (36)

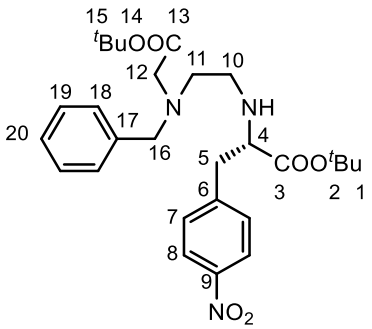


To a solution of 4-nitrophenylalanine (694 mg, 3.04 mmol) in *tert*-butyl acetate (42 mL) was added $HClO_4$ (0.3 mL). The mixture was stirred for 12h at room temperature then cooled down to 0 °C and extracted with a cold solution of HCl (0.5 N). The aqueous layer was neutralized with $NaHCO_3$ and then extracted three times with EtOAc. The organic layers were combined, dried over $MgSO_4$, filtered and the solvent was removed *in vacuo* to give **36** as a pale yellow solid (780 mg, 96 %). The crude product was used in the next step without further purification.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 8.19-8.14 (m, 2H, **H^8**), 7.43-7.38 (m, 2H, **H^7**), 3.64 (dd, $^3J_{H\text{-}H}$ = 5.4 Hz and $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.7 Hz, 1H, **H^4**), 3.12 (dd, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.7 Hz and $^3J_{H\text{-}H}$ = 13.6 Hz, 1H, **H^5**), 2.93 (dd, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.7 Hz and $^3J_{H\text{-}H}$ = 13.6 Hz, 1H, **H^5**),1.64 (s, 2H, N**H$_2$**), 1.42 (s, 9H, **H^1**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 173.6 (**C^3**), 146.8 (**C^6**), 145.6 (**C^9**), 130.2 (**C^7**), 123.5 (**C^8**), 81.7 (**C^2**), 55.8 (**C^4**), 40.7(**C^5**), 29.7 (**C^1**).

Tert-butyl 2-((2-(benzyl(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)amino)ethyl)amino)-3-(4-nitrophenyl)propanoate (38)



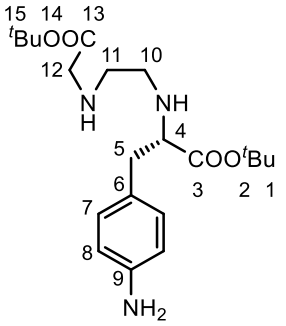
To a solution of amine **36** (0.196 g, 0.74 mmol) in anhydrous CH_3CN (13 mL) was added Na_2CO_3 (0.790 g, 7.4 mmol) and the mixture was stirred for 1.5h at reflux before addition of bromide **5** (0.488 g, 1.48 mmol). The reaction mixture was stirred for 88h at reflux, then cooled to room temperature and filtered. The crude product was purified by column chromatography (Al_2O_3, petroleum ether/EtOAc: 1/1) to give **38** (300 mg, 59 %).

TLC (Al_2O_3, petroleum ether/EtOAc: 90/10) R_f = 0.30.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ (ppm): 8.10 (d, 2H, $^3J_{H-H}$ = 8,7 Hz, **H^8**), 7.37 (d, 2H, $^3J_{H-H}$ = 8,7 Hz, **H^7**), 7.19-7.38 (m, 5H, **H^{18} H^{19}** and **H^{20}**), 3.81 (d, 1H, $^3J_{H-H}$ =13.5 Hz, **H^{16}**), 3.70 (d, 1H, $^3J_{H-H}$ = 13.4 Hz, **H^{16}**), 3.39 (t, 1H, $^3J_{H-H}$ = 6.8 Hz, **H^4**), 3.16 (s, 2H, **H^{12}**), 2.98 (d, 2H, $^3J_{H-H}$ = 6.8Hz, **H^5**), 2.45-2.84 (m, 4H, **H^{10}** and **H^{11}**), 1.47 (s, 9H, **H^1**), 2.10 (broad s, 1H, N**H**), 1.38 (s, 9H, **H^{14}**).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) δ (ppm): 173.0 (**C^{13}**), 170.6 (**C^3**), 146.6(**C^9**), 145.7(**C^6**), 138.9(**C^{17}**), 130.2(**C^7**), 128.8(**C^{18}**), 128.1(**C^{19}**), 127.0 (**C^{20}**), 123.2 (**C^8**), 81.4 (**C^{14}**), 80.7 (**C^2**), 62.8(**C^4**), 58.0 (**C^{16}**), 54.5 (**C^{12}**), 53.3 (**C^{11}**), 45.3 (**C^{10}**), 39.3 (**C^5**), 28.1 (**C^{15}**), 27.9 (**C^1**).

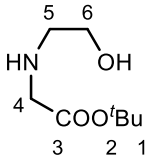
Tert-butyl 3-(4-aminophenyl)-2-((2-((2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)amino)ethyl)amino) propanoate (39)



A solution of **38** (0.15 g, 0.29 mmol) in methanol (6 mL) under hydrogen atmosphere was stirred for 30 min at room temperature. The resulting mixture was filtered through a Celite® pad and the filtrate was concentrated *in vacuo* to give the expected product **39** as a pale beige oil (110 mg, 78 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 6.93 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8,7 Hz, 2H, **H^7**), 6.54 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8,7 Hz, 2H, **H^8**), 3.60 (broad s, 2H, N**H**), 3.29-3.24 (m, 1H, **H^4**), 3.21 (s, 2H, **H^{12}**), 2.88-2.44 (m, 6H, **H^5 H^{10}** and **H^{11}**), 2.10 (broad s, 2H, N**H$_2$**), 1.42 (s, 9H, **H^{15}**), 1.31 (s, 9H, **H^1**).

Tert-butyl 2-((2-hydroxyethyl)amino)acetate (40)



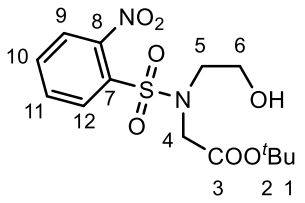
To a solution of ethanolamine (6.25 g, 100.2 mmol) and triethylamine (7.2 mL) in anhydrous diethylether (100 mL) cooled at 0°C was added dropwise *tert*-butyl bromoacetate (2 g, 10.25 mmol). The reaction mixture was then stirred for 16h at room temperature and concentrated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography (Al_2O_3, CH_2Cl_2/MeOH: 98/02) to give **40** as a colorless oil (1.7 g, 95 %).

TLC (Al_2O_3, CH_2Cl_2/MeOH: 98/2) R_f = 0.28.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 3.62-3.58 (m, 2H, **H^{6}**), 3.30 (s, 2H, **H^{4}**), 2.79-2.76 (m, 2H, **H^{5}**), 2.60-1.60 (broad s, 2H, NH, O**H**), 1.38 (s, 9H, **H^{1}**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.1(**C^{3}**), 81.4 (**C^{2}**), 60.9 (**C^{6}**), 51.1 (**C^{5}**), 51.0 (**C^{4}**), 28.0 (**C^{1}**).

Tert-butyl 2-(*N*-(2-hydroxyethyl)-2-nitrophenylsulfonamido)acetate (41)



To a solution of compound **40** (320 mg, 1.83 mmol) and $NaHCO_3$ (614 mg, 7.32 mmol) in THF (5 mL) cooled at 0°C was added 2-nitrobenzenesulfonyl chloride (406 mg, 1.83 mmol). The reaction mixture was stirred for 16h at room temperature, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography (Al_2O_3, CH_2Cl_2/EtOAc 90/10) to give **41** as a beige oil (520 mg, 80 %).

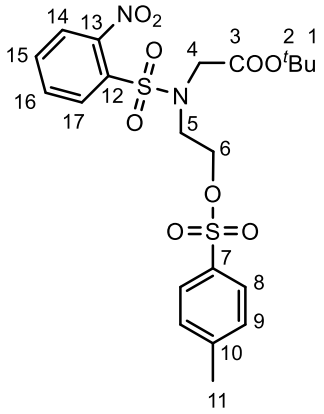
TLC (Al_2O_3, CH_2Cl_2) R_f = 0.13.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 8.08-8.11 (m, 1H, **H^{9}**), 7.69-7.72 (m, 2H, **H^{11}** and **H^{12}**), 7.59-7.63 (m, 1H, **H^{10}**), 4.11 (s, 2H, **H^{4}**), 3.70-3.76 (m, 2H, **H^{6}**), 3.50-3.53 (t, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 6.4 Hz, 2H, **H^{5}**), 2.90 (broad s, 1H, O**H**), 1.43 (s, 9H, **H^{1}**).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) δ (ppm): 169.1 (**C^{3}**), 133.7 (**C^{11}**), 132.8 (**C^{7}**), 131.7 (**C^{10}**), 131.1 (**C^{12}**), 124.0 (**C^{9}**), 82.9 (**C^{2}**), 60.2 (**C^{6}**), 52.0 (**C^{5}**), 50.3 (**C^{4}**), 27.8 (**C^{1}**).

IR (cm^{-1}) KBr pellet: 3457, 3095, 2981, 2929, 1739, 1547, 1371, 1247, 1159.

Tert-butyl 2-(2-nitro-*N*-(2-(tosyloxy)ethyl)phenylsulfonamido)acetate (42)



To a solution of alcohol **41** (210 mg, 0.583 mmol) and triethylamine (177 mg, 1.749mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (4 mL) cooled at 0°C was added tosyl chloride (227 mg, 1.106 mmol). The reaction mixture was stirred for 16h at room temperature and washed with water (10 mL). The organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography (SiO_2, CH_2Cl_2 then CH_2Cl_2/EtOAc 90/10) to give **42** as a colorless oil (250 mg, 84 %).

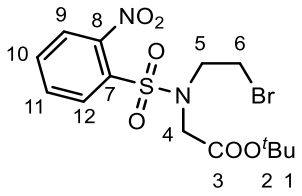
TLC (SiO_2, CH_2Cl_2) R_f = 0.10.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.96-7.93 (m, 1H, **H^{14}**), 7.71-7.61 (m, 4H, **H^8 H^{16}** and **H^{17}**), 7.57-7.54 (m, 1H, **H^{15}**), 7.31 (m, 2H, **H^9**), 4.16 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 5.4 Hz, 2H, **H^6**), 4.06 (s, 2H, **H^4**), 3.65 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 5.4 Hz, 2H, **H^5**), 2.40 (s, 3H, **H^{11}**), 1.31 (s, 9H, **H^1**).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) δ (ppm): 167.2 (**C^3**), 147.9 (**C^{13}**), 147.7 (**C^7**), 133.8 (**C^{16}**), 132.6 (**C^{10}**), 132.1 (**C^{12}**), 131.8 (**C^{15}**), 130.7 (**C^{17}**),129.9 (**C^9**), 127.7 (**C^8**), 124.0 (**C^{14}**), 82.4 (**C^2**), 68.6 (**C^6**), 50.0 (**C^4**), 47.3 (**C^5**), 27.6 (**C^1**), 21.5 (**C^{11}**).

IR (cm^{-1}) KBr pellet: 3084, 2983, 2929, 1728, 1604, 1546, 1520, 1367, 1347, 1156.

Tert-butyl 2-(*N*-(2-bromoethyl)-2-nitrophenylsulfonamido)acetate (43)



To a solution of **41** (0.46 g, 1.28 mmol) and PPh_3 (0.436 g, 1.66 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (20 mL) cooled at 0°C was added *N*-bromosuccinimide (0.3 g, 1.66 mmol) as a solid in three portions. The reaction mixture was stirred for 16h at room temperature and then concentrated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography (SiO_2, CH_2Cl_2) to give **43** as a colorless oil (480 mg, 88 %).

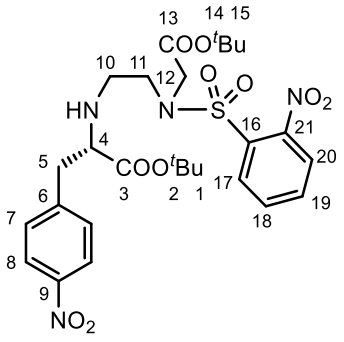
TLC (SiO_2, CH_2Cl_2) R_f = 0.80.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 8.04-8.11 (m, 1H, **H^9**), 7.67-7.74 (m, 2H, **H^{12}** and **H^{13}**), 7.60-7.65 (m, 1H, **H^{10})**, 4.18 (s, 2H, **H^4**), 3.76 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.2 Hz, 2H, **H^5**), 3.54 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.2 Hz, 2H, **H^6**), 1.38 (s, 9H, **H^1**).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) δ (ppm): 167.4 (**C^3**), 147.9 (**C^8**), 133.8 (**C^{11}**), 132.9 (**C^7)**, 131.8 (**C^{10}**), 130.9 (**C^{12}**), 124.2 (**C^9**), 82.7 (**C^2**), 50.3 (**C^4**), 50.0 (**C^5**), 28.9 (**C^6**), 27.8 (**C^1**).

IR (cm^{-1}) KBr pellet: 2980, 2929, 1741, 1545, 1371, 1164.

Tert-butyl 2-((2-(benzyl(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)amino)ethyl)amino)-3-(4-nitrophenyl)propanoate (44)



A mixture of **36** (151 mg, 0.568 mmol) and Na_2CO_3 (602mg, 5.68 mmol) in anhydrous CH_3CN (20 mL) was heated at reflux for 1h. Bromide **43** (530mg, 1.25 mmol) was then

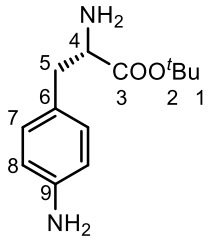
added and the reaction mixture was heated for 66h at reflux. The mixture was allowed to cool to room temperature, filtered, and the solvent was evaporated. The crude product was purified by column chromatography (SiO_2, CH_2Cl_2/EtOAc: 94/6) to give **44** as a yellow oil (180 mg, 50 %).

TLC (SiO_2, CH_2Cl_2/EtOAc: 94/6) R_f = 0.36.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 8.15-8.12 (m, 2H, **H^8**), 8.07-8.04 (m, 1H, **H^{20}**), 7.70-7.66 (m, 2H, **H^{17}** and **H^{18}**), 7.62-7.58 (m, 1H, **H^{19}**), 7.38-7.35 (m, 2H, **H^{17}**), 4.07 (s, 2H, **H^{12}**), 3.54-3.38 (m, 2H, **H^5**), 3.37 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.2 Hz, 1H, **H^4**), 3.00-2.84 (m, 3H, **H^{10}** or **H^{11}**), 2.65-2.57 (m, 1H, **H^{10}** or **H^{11}**), 1.38 (s, 9H, **H^{15}**), 1.35 (s, 9H, **H^1**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 172.8 (**C^{13}**), 167.6 (**C^3**), 147.9 (**C^{21}**), 146.7 (**C^9**), 145.5 (**C^6**), 133.4 (**C^{19}**), 133.3 (**C^{20}**), 131.6 (**C^{18}**), 130.9 (**C^{17}**), 130.3 (**C^7**), 124.0 (**C^{16}**), 123.3 (**C^8**), 82.3 (**C^{14}**), 81.9 (**C^2**), 62.6 (**C^4**), 48.9 (**C^{12}**), 48.0 (**C^{11}**), 45.8 (**C^{10}**), 39.3 (**C^5**), 27.9 (**C^{15}**), 27.8 (**C^1**).

Tert-butyl 2-amino-3-(4-aminophenyl)propanoate (45)



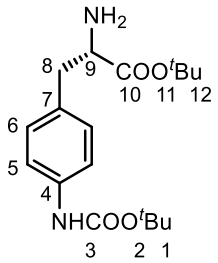
A mixture of nitro derivative **36** (0.55 g, 2.067 mmol) and Pd/C 10 % (190 mg) in methanol (15 mL) was stirred under a dihydrogen atmosphere for 16h at room temperature. The reaction mixture was filtered through a Celite® pad and concentrated under vacuum to give **45** as a beige powder (480 mg, 98 %).

TLC (SiO_2, EtOAc R_f = 0.13.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 6.98 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.3 Hz, 2H, **H^8**), 6.63 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.3 Hz, 2H, **H^7**), 3.77 (s, 4H, N**H**), 3.63 (dd, $^3J_{H\text{-}H}$ = 5.5 Hz and $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.3 Hz, 1H, **H^4**), 2.96 (dd, $^3J_{H\text{-}H}$ = 5.5 Hz and $^3J_{H\text{-}H}$ = 13.9 Hz, 1H, **H^5**), 2.80 (dd, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.7 Hz and $^3J_{H\text{-}H}$ = 13.6 Hz, 1H, **H^5**), 1.44 (s, 9H, **H^1**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 173.2 (**C^3**), 145.0 (**C^6**), 130.3 (**C^7**), 126.4 (**C^9**), 115.4 (**C^8**), 81.7 (**C^2**), 55.7 (**C^4**), 39.2(**C^5**), 28.0 (**C^1**).

Tert-butyl 2-amino-3-(4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)phenyl)propanoate (46)



To a solution of **45** (0.25 g, 1.058 mmol) in 10 % acetic acid solution (10 mL) was added Boc_2O (0.241 g, 1.104 mmol) in 1,4-dioxane (10 mL). The reaction mixture was stirred for 16h at room temperature and then water (100 mL) was added. The mixture was extracted with diethyl ether (30 mL). The aqueous layer was neutralized with a NaOH 2N solution and extracted with diethylether (4 × 30 mL). The organic layers were concentrated under vacuum and the crude product was purified by column chromatography (Al_2O_3, CH_2Cl_2/EtOAc 95:05) to give **46** as a beige powder (130 mg, 37 %).

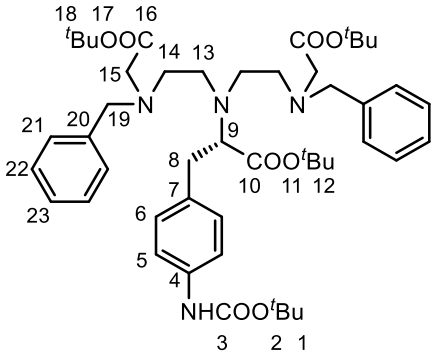
TLC (Al_2O_3, CH_2Cl_2/EtOAc: 95/5) R_f = 0.30.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.27 (d, 2H, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.3 Hz, **H^5**), 7.09 (d, 2H, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, **H^6**), 6.84 (s, 1H, N**H**), 3.57 (dd, $^3J_{H\text{-}H}$ = 5.5 Hz and $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.5 Hz, 1H, **H^9**), 2.97(dd, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.5 Hz and $^3J_{H\text{-}H}$ = 13.6 Hz, 1H, **H^8**), 2.78 (dd, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.5 Hz and $^3J_{H\text{-}H}$ = 13.6 Hz, 1H, **H^8**), 2.36 (s, 2H, N**H**), 1.48 (s, 9H, **H^1**), 1.40 (s, 9H, **H^{12}**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 173.8 (**C^{10}**), 152.8 (**C^3**), 137.1 (**C^7**), 131.5 (**C^4**), 129.8 (**C^6**), 118.6 (**C^1**), 81.3 (**C^2**), 80.3 (**C^{11}**), 55.9 (**C^4**), 40.0 (**C^8**), 28.2 (**C^1**), 27.9 (**C^{12}**).

MS (ESI$^+$) m/z (%): 359.2 (6) $[M+Na]^+$, 337.2 (3) $[M+H]^+$, 281.2 (8) $[M-t\text{Bu}+2H]^+$, 225.1 (100) $[M-2t\text{Bu}+3H]^+$.

Di-*tert*-butyl 2,2'-((((1-(*tert*-butoxy)-3-(4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)phenyl)-1-oxopropan-2-yl)azanediyl)bis(ethane-2,1-diyl))bis(benzylazanediyl))diacetate (47)



Polyamine **47** was prepared as described above for **2** from **46** (130 mg, 0.387 mmol), **5** (305 mg, 0.928 mmol) and Na_2CO_3 (410 mg, 3.87 mmol) in anhydrous CH_3CN (13 mL). The crude product was purified by column chromatography (Al_2O_3, CH_2Cl_2/petroleum Ether: 70/30) to give **47** as a yellow oil (116 mg, 62 %).

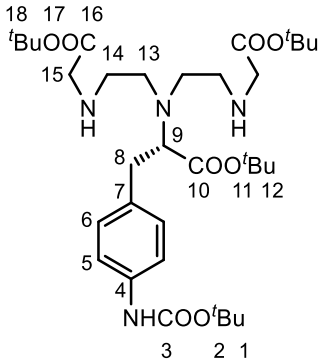
TLC (Al_2O_3, CH_2Cl_2/petroleum Ether: 70/30) R_f = 0.31.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.36-7.14 (m, 12H, **H^5**, **H^{21}**, **H^{22}** and **H^{23}**), 7.02 (d, 2H, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.4 Hz, **H^6**), 6.59 (s, 1H, N**H**), 3.74 (s, 4H, **H^{19}**), 3.51 (m, 1H, **H^9**), 3.19 (s, 4H, **H^{15}**), 3.95-2.57 (m, 10H, **H^8**, **H^{13}** and **H^{14}**), 1.51 (s, 9H, **H^1**), 1.45 (s, 18H, **H^{18}**), 1.35 (s, 9H, **H^{12}**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 171.7 (**C^{10}**), 170.8 (**C^{16}**), 152.7 (**C^3**), 139.1 (**C^{20}**), 136.3 (**C^7**), 133.3 (**C^4**), 129.7 (**C^6**), 128.9 (**C^{21}**), 128.1 (**C^{22}**), 126.9 (**C^{23}**), 118.2 (**C^5**), 80.7 (**C^2**), 80.6 (**C^{17}**), 80.2(**C^{11}**), 66.2 (**C^9**), 58.3 (**C^{19}**), 55.3 (**C^{15}**), 53.1 (**C^{14}**), 50.1 (**C^{13}**), 35.6 (**C^8**), 28.3 (**C^1**), 28.15 (**C^{18}**), 28.12 (**C^{12}**).

MS (ESI$^+$) m/z (%): 831.5 (100) $[M+H]^+$, 832.5 (54) $[M+H]^+$.

Di-*tert*-butyl 2,2'-((((1-(*tert*-butoxy)-3-(4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)phenyl)-1-oxopropan-2-yl)azanediyl)bis(ethane-2,1-diyl))bis(azanediyl))diacetate (48)



Polyamine **48** was prepared as described above for **3** from **47** (190 mg, 0.228 mmol) and Pd/C (65 mg, 30 % wt) in methanol (15 mL). **48** was obtained as a yellow oil (137 mg, 92 %) and the crude product was used for the next step without further purification.

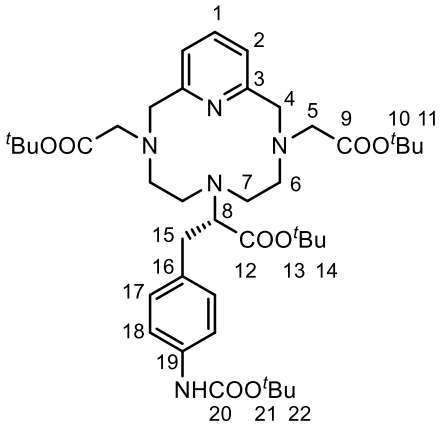
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.98 (broad s, 2H, N**H**), 7.24-7.10 (m, 4H, **H^{5}**, and **H^{6}**), 6.59 (s, 1H, N**H**), 3.83-2.54 (m, 15H, **H^{8}**, **H^{9}**, **H^{13}**, **H^{14}** and **H^{15}**), 1.45 (s, 18H, **H^{18}**), 1.43 (s, 9H, **H^{1}**), 1.27 (s, 9H, **H^{12}**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 170.5 (**C^{16}**), 166.2 (**C^{10}**), 152.6 (**C^{3}**), 136.7 (**C^{4}**), 132.3 (**C^{7}**), 130.0 (**C^{6}**), 118.4 (**C^{5}**), 83.4 (**C^{17}**), 81.7 (**C^{11}**), 80.2 (**C^{2}**), 64.8 (**C^{9}**), 48.0 (**C^{15}**), 47.7 (**C^{14}**), 45.9 (**C^{13}**), 35.5 (**C^{8}**), 28.23 (**C^{1}**), 28.03 (**C^{18}**), 27.94 (**C^{12}**).

IR (cm^{-1}) KBr pellet: 2977, 2929, 1729, 1456, 1393, 1368, 1249, 1233, 1154.

MS (ESI^{+}) m/z (%): 651.4 (100) $[M+H]^{+}$, 652.4 (37) $[M+H]^{+}$

Protected macrocycle (49)



Macrocycle **49** was prepared as described above for macrocycle **12** from triamine **48** (137 mg, 0.21 mmol), Na_2CO_3 (223 mg, 2.10 mmol) and 2,6-bromomethyl pyridine (56 mg, 0.21 mmol) in anhydrous CH_3CN (55 mL). After purification by column chromatography (Al_2O_3, CH_2Cl_2/MeOH: 98/02) and treatment with EDTA, free macrocycle **49** was obtained as a yellow oil (96 mg, 60 %).

TLC (Al_2O_3, CH_2Cl_2/MeOH: 98/2) R_f = 0.4.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.61 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.6 Hz, 1H, **H^1**), 7.18 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.6 Hz, 2H, **H^2**), 7.15 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 2H, **H^{18}**), 7.03 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.5 Hz, 2H, **H^{17}**), 6.40 (s, 1H, N***H***), 4.04 (d, $J_{A\text{-}B}$ = 13 Hz, 2H, A part of AB system, **H^4**), 3.99 (d, $J_{A\text{-}B}$ = 13 Hz, 2H, B part of AB system, **H^4**), 3.39 (s, 4H, **H^5**), 3.30-3.15 (m, 1H, **H^8**), 2.93-2.60 (m, 10H, **H^6**, **H^7** and **H^{15}**), 1.49 (s, 9H, **H^{22}**), 1.48 (s, 18H, **H^{11}**), 1.32 (s, 9H, **H^{14}**).

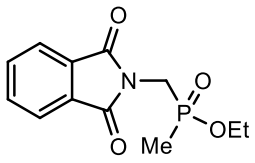
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.2 (**C^{12}**), 170.6 (**C^9**), 157.4 (**C^3**), 152.7 (**C^{20}**), 137.1 (**C^1**), 136.4 (**C^{19}**), 133.1 (**C^{16}**), 129.7 (**C^{18}**), 122.4 (**C^{17}**), 118.2 (**C^2**), 81.0 (**C^{21}**), 80.8 (**C^{10}**), 80.3 (**C^{13}**), 68.1 (**C^8**), 59.9 (**C^4**), 58.2 (**C^5**), 51.2 (**C^7**), 49.0(**C^6**), 36.3 (**C^{15}**), 28.3 (**C^{22}**), 28.2 (**C^{11}**), 28.1 (**C^{14}**).

IR (cm^{-1}) KBr pellet: 2974, 2936, 2863, 1723, 1598, 1528, 1458, 1365, 1240, 1155.

MS (ESI+) m/z (%):754.4 (100) $[M+H]^+$, 698.4 (35) $[M\text{-}t\text{Bu}+2H]^+$, 642.3 (24) $[M\text{-}2t\text{Bu}+3H]^+$, 586.3 (7) $[M\text{-}3t\text{Bu}+4H]^+$, 530.2 (3) $[M\text{-}4t\text{Bu}+5H]^+$.

HRMS (ESI+) calcd. (found): 754.4755 (754.4763).

Ethyl ((1,3-dioxoisoindolin-2-yl)methyl)(methyl)phosphinate (50)



This compound was synthesized as described by Popoff *et al*[6]

A solution of *N*-(bromomethyl)phtalimide (1.007 g, 4.19 mmol, 1 eq) and diethyl methylphosphonite (570 mg, 4.19 mmol, 1 eq) in xylene (8 mL) was placed under reduced pressure (300 mBar) and warmed at 80°C for 2h. The mixture was allowed to cool to room temperature, placed at 7°C overnight, and then the solvent was removed *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography (SiO_2, petroleum ether/EtOAc: 97/03) to give **50** as white solid (863 mg, 77 %).

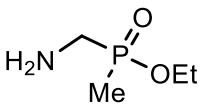
TLC (SiO_2, petroleum ether/EtOAc: 30/70) R_f = 0.26.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.66-7.49 (m, 4H, C**H**), 4.05-3.89 (m, 2H, OC**H$_2$**CH$_3$), 3.83 (d, $^2J_{H-P}$ = 8.6 Hz, 2H, NC**H$_2$**), 1.35 (d, $^2J_{H-P}$ = 14.5 Hz, 3H, C**H$_3$**), 1.08 (t, $^3J_{H-H}$ = 7.1 Hz, 3H, OCH$_2$C**H$_3$**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 166.6 (**C**O), 133.8 (**C**H Ar), 131.2(C$_{IV}$ **Ar**), 123.0 (**C**H Ar), 60.6 (d, $^2J_{C-P}$ = 6.4 Hz, O**C**H$_2$CH$_3$), 35.8 (d, $^1J_{C-P}$ = 97.7 Hz, N**C**H$_2$), 15.9 (d, $^3J_{C-P}$ = 6.3 Hz, OCH$_2$**C**H$_3$), 14.5 (d, $^1J_{C-P}$ = 96.7 Hz, **C**H$_3$).

^{31}P NMR (121 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 46.6.

Ethyl (aminomethyl)(methyl)phosphinate (51)



This compound was prepared by using a protocol as reported by Kálmán *et al*. for an analogous phosphorous derivative[7]

To a solution of **50** (255 mg, 0.95 mmol, 1 eq) in ethanol (15 mL) was added hydrazine (78 µL, 1.61 mmol, 1.7 eq). The mixture was stirred for 16h at room temperature, brought to reflux for 5h then filtrated over cotton, and the solvent was removed *in*

vacuo. The crude product was purified by column chromatography (SiO_2, CH_2Cl_2/MeOH: 87/13) to give **51** as a pale yellow oil (127 mg, 98 %).

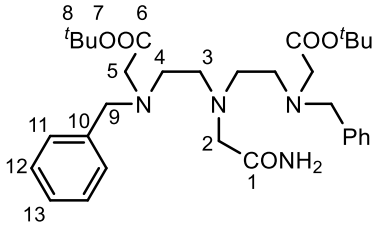
TLC (SiO_2, CH_2Cl_2/MeOH: 87/13) R_f = 0.30.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 4.10-4.00 (m, 2H, OC**H$_2$**CH_3), 2.97 (d, $^2J_{H\text{-}P}$ = 8.5 Hz, 2H, NC**H$_2$**), 1.45 (d, $^2J_{H\text{-}P}$ = 13.5 Hz, 3H, C**H$_3$**), 1.30 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.0 Hz, 3H, OCH_2C**H$_3$**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 60.4 (d, $^2J_{C\text{-}P}$ = 6.6 Hz, O**C**H_2CH_3), 41.0 (d, $^1J_{C\text{-}P}$ = 102.4 Hz, N**C**H_2), 16.6 (d, $^3J_{C\text{-}P}$ = 5.7 Hz, OCH_2**C**H_3), 11.7 (d, $^1J_{C\text{-}P}$ = 90.3 Hz, **C**H_3).

^{31}P NMR (121 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 52.8.

Di-*tert*-butyl 2,2'-((((2-(dimethylamino)-2-oxoethyl)azanediyl)bis(ethane-2,1-diyl))bis-(benzylazane-diyl))diacetate (52)



Polyamine **52** was prepared as described above for **2** from **5** (1.18 g, 3.62 mmol), commercial glycinamide (200 mg, 1.81 mmol) and K_2CO_3 (2.50 g, 18.1 mmol) in anhydrous CH_3CN (50 mL). The crude product was purified by column chromatography (Al_2O_3, CH_2Cl_2/MeOH: 95/5 to 90/10) to give **52** as a yellow oil (744 mg, 72 %).

TLC (SiO_2, CH_2Cl_2/MeOH: 90/10) R_f = 0.5.

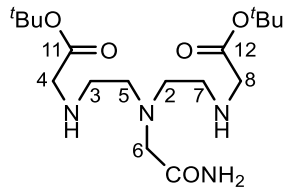
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 8.12 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 4.3 Hz, 1H, N**H**), 7.29-7.18 (m, 10H, **H^{11}**, **H^{12}**, and **H^{13}**), 5.55 (d, $^2J_{H\text{-}H}$ = 4.3 Hz, 1H, N**H**), 3.69 (s, 4H, **H^9**), 3.15 (s, 4H, **H^5**), 3.08 (s, 2H, **H^2**), 2.64-2.47 (m, 8H, **H^3** and **H^4**), 1.44 (s, 18H, **H^8**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm):175.2, 170.4 (**C^1** and **C^6**), 138.5 (**C^{10}**), 129.1 (**C^{12}**), 128.3 (**C^{11}**), 127.3 (**C^{13}**), 81.0 (**C^7**), 58.7 (**C^9**), 58.4 (**C^2**), 55.2 (**C^5**), 53.2 (**C^3**), 51.7 (**C^4**), 28.2 (**C^8**).

MS (ESI$^+$) m/z (%): 569.3704 (60) $[M+H]^+$, 513.3079 (100) $[M+2H\text{-}tBu]^+$, 457.2452 $[M+3H\text{-}2tBu]^+$.

HRMS (ESI⁺) m/z calc. (found): 569.3703 (569.3704).

Di-*tert*-butyl 2,2'-((((2-amino-2-oxoethyl)azanediyl)bis(ethane-2,1-diyl))bis-(azanediyl))diacetate (53)



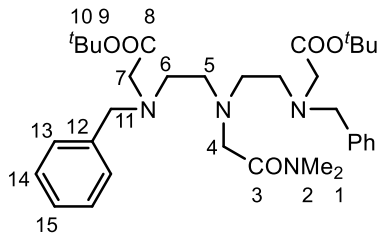
Polyamine **53** was prepared as described above for **3** from **52** (98 mg, 0.17 mmol) and Pd/C (29 mg, 30 % wt) in methanol (15 mL). **53** was obtained as a yellow oil (67 mg, 100 %) and the crude product was used for the next step without further purification.

TLC (SiO_2, CH_2Cl_2/MeOH: 97/3) R_f = 0.26.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 3.99 (s, 2H, **H⁴**), 3.40-3.39 (m, 2H, **H³**), 3.36 (s, 2H, **H⁶**), 3.21 (s, 2H, **H⁸**), 2.79-2.75 (m, 4H, **H²** and **H⁵**), 2.64-2.60 (m, 2H, **H⁷**), 1.44 (s, 9H, C**H₃**), 1.43 (s, 9H, C**H₃**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 170.6 (C_{IV} **C**ONH_2), 167.8 (**C¹²**), 167.4 (**C¹¹**), 82.0 (C_{VI} **tBu**), 81.7 (C_{VI} **tBu**), 56.9 (**C⁸**), 56.1 (**C⁷**), 50.9 (**C⁶**), 49.5 (**C⁵**), 48.2 (**C⁴**), 47.5 (**C³**), 45.4 (**C²**), 28.1 (**C**H_3).

Di-*tert*-butyl 2,2'-((((2-(dimethylamino)-2-oxoethyl)azanediyl)bis(ethane-2,1-diyl))bis(benzylazanediyl))diacetate (54)



Polyamine **54** was prepared as described above for **2** from **5** (627 mg, 1.92 mmol), glycinedimethylamide (98 mg, 0.96 mmol) and K_2CO_3 (1.324 g, 9.6 mmol) in anhydrous

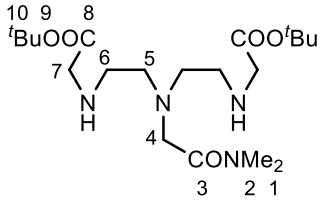
CH_3CN (45 mL). The crude product was purified by column chromatography (Al_2O_3, CH_2Cl_2/MeOH: 99/01 to 95/05) to give **54** as a yellow oil (386 mg, 67 %).

TLC (SiO_2, CH_2Cl_2/MeOH: 95/5) R_f = 0.38.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.35-7.20 (m, 10H, **H^{13}**, **H^{14}**, and **H^{15}**), 3.75 (s, 4H, **H^{11}**), 3.35 (s, 2H, **H^4**), 3.20 (s, 4H, **H^7**), 2.96 (s, 3H, **H^2**), 2.87 (s, 3H, **H^1**), 2.73 (s, 8H, **H^5** and **H^6**), 1.45 (s, 18H, **H^{10}**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 170.68 and 170.66 (**C^3** and **C^8**), 139.0 (**C^{12}**), 128.9 (**C^{14}**), 128.0 (**C^{13}**), 126.9 (**C^{15}**), 80.6 (**C^9**), 58.2 (**C^{11}**), 57.0 (**C^4**), 54.9 (**C^7**), 52.4 (**C^5**), 51.4 (**C^6**), 36.8 (**C^2**), 35.3 (**C^1**), 28.1 (**C^{10}**).

Di-*tert*-butyl 2,2'-((((2-(dimethylamino)-2-oxoethyl)azanediyl)bis(ethane-2,1-diyl))-bis(azanediyl))-diacetate (55)



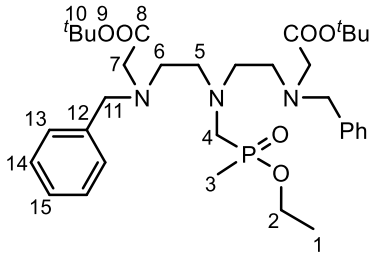
Polyamine **55** was prepared as described above for **3** from **54** (171 mg, 0.29 mmol) and Pd/C (51 mg, 30 % wt) in methanol (15 mL). **55** was obtained as a yellow oil (105 mg, 88 %) and the crude product was used for the next step without further purification.

TLC (SiO_2, CH_2Cl_2/MeOH : 97/3) R_f = 0.32.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 3.39 (s, 2H, **H^4**), 3.22 (s, 4H, **H^7**), 2.98 (s, 3H, **H^1**), 2.84 (s, 3H, **H^2**), 2.74-2.70 (m, 4H, **H^5** and **H^6**), 2.61-2.57 (m, 4H, **H^5** and **H^6**), 2.15 (s, 2H, N**H**), 1.38 (s, 18H, **H^{10}**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 170.7 (**C^3**), 168.9 (**C^8**), 82.1 (**C^9**), 55.4 (**C^4**), 52.3 (**C^5**), 49.6 (**C^7**), 46.7 (**C^6**), 36.3 (**C^2**), 35.3 (**C^1**), 27.9 (**C^{10}**).

Di-*tert*-butyl 2,2'-(((((ethoxy(methyl)phosphoryl)methyl)azanediyl)bis(ethane-2,1-diyl))bis-(benzyl-azanediyl))diacetate (56)



Polyamine **56** was prepared as described above for **2** from **51** (130 mg, 0.948 mmol), **5** (626 mg, 1.90 mmol) and K_2CO_3 (1.310 g, 9.48 mmol) in anhydrous CH_3CN (70 mL). The crude product was purified by column chromatography (Al_2O_3, CH_2Cl_2/MeOH: 99/01 to 98/02) to give **56** as a yellow oil (148 mg, 37 %).

TLC (SiO_2, CH_2Cl_2/MeOH: 98/2) R_f = 0.26.

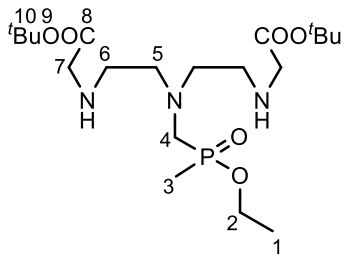
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.37-7.20 (m, 10H, **H^{13}**, **H^{14}**, and **H^{15}**), 4.03 (dq, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.1 Hz and $^2J_{H\text{-}P}$ = 7.6 Hz, 2H, **H^2**), 3.76 (s, 4H, **H^{11}**), 3.22 (s, 4H, **H^7**), 2.84 (d, $^2J_{H\text{-}P}$ = 9.4 Hz, 2H, **H^4**), 2.80-2.60 (m, 8H, **H^5** and **H^6**), 1.46 (s, 18H, **H^{10}**), 1.45-1.40 (m, 3H, **H^3**), 1.29 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.1 Hz, 3H, **H^1**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 170.6 (**C^8**), 138.8 (**C^{12}**), 128.9 (**C^{14}**), 128.2 (**C^{13}**), 127.0 (**C^{15}**), 80.7 (**C^9**), 60.1 (d, $^2J_{C\text{-}P}$ = 6.6 Hz, **C^2**), 58.3 (**C^{11}**), 55.1 (**C^7**), 53.65 (d, $^3J_{C\text{-}P}$ = 7.5 Hz, **C^5**), 53.60 (d, $^1J_{C\text{-}P}$ = 114.0 Hz, **C^4**), 51.4 (**C^6**), 28.1 (**C**H_3), 16.6 (d, $^3J_{C\text{-}P}$ = 5.7 Hz, **C^1**), 12.6 (d, $^1J_{C\text{-}P}$ = 92.1 Hz, **C^3**).

^{31}P NMR (121 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 53.6.

MS (ESI$^+$) m/z (%): 654.4 (12) $[M+Na]^+$, 632.4 (100) $[M+H]^+$, 576.3 (15) $[M+2H\text{-}tBu]^+$.

Di-*tert*-butyl 2,2'-(((((ethoxy(methyl)phosphoryl)methyl)azanediyl)bis(ethane-2,1-diyl))bis(azanediyl))diacetate (57)



Polyamine **57** was prepared as described above for **3** from **56** (148 mg, 0.23 mmol) and Pd/C (44 mg, 30 % wt) in methanol (15 mL). **57** was obtained as a yellow oil (105 mg, 100 %) and the crude product was used for the next step without further purification.

TLC (SiO_2, CH_2Cl_2 CH_2Cl_2/MeOH : 97/3) R_f = 0.35.

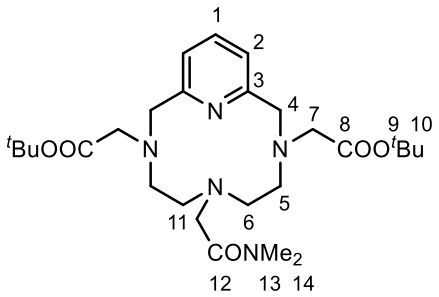
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 4.03 (dq, $^3J_{H-H}$ = 7.2 Hz and $^3J_{H-P}$ = 7.8 Hz, 2H, **H²**), 3.26 (s, 4H, **H⁷**), 2.83 (d, $^2J_{H-P}$ = 9.3 Hz, 2H, **H⁴**), 2.79 – 2.55 (m, 8H, **H⁵** and **H⁶**), 2.37 (s, 2H, N**H**), 1.51 (d, $^2J_{H-P}$ = 13.7 Hz, 3H, **H³**), 1.40 (s, 18H, **H¹⁰**), 1.27 (t, $^3J_{H-H}$ = 7.1 Hz, 3H, **H¹**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 171.5 (**C⁸**), 80.9 (**C⁹**), 60.1 (d, $^2J_{C-P}$ = 6.7 Hz, - **C²**), 55.5 (d, $^3J_{C-P}$ = 7.4 Hz, **C⁵**), 53.8 (d, $^1J_{C-P}$ = 112.1 Hz, **C⁴**), 51.4 (**C⁷**), 46.8 (**C⁶**), 28.0 (**C¹⁰**), 16.6 (d, $^1J_{C-P}$= 5.6 Hz, **C¹**), 13.0 (d, $^1J_{C-P}$ = 90.9 Hz, **C³**).

^{31}P NMR (121 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 53.0.

MS (ESI+) m/z (%): 474.3 (48) $[M+Na]^+$, 452.3 (100) $[M+H]^+$, 396.2 (23) $[M+2H-tBu]^+$, 340.2 (5) $[M+3H-2tBu]^+$.

Protected macrocycle (59)



Macrocycle **59** was prepared as described above for macrocycle **12** from triamine **55** (112 mg, 0.27 mmol), Na_2CO_3 (285 mg, 2.67 mmol) and 2,6-bromomethyl pyridine (71 mg, 0.27 mmol) in anhydrous CH_3CN (135 mL). After purification by column chromatography (Al_2O_3, CH_2Cl_2/MeOH: 97/03) and treatment with EDTA, free macrocycle **59** was obtained as a yellow oil (102 mg, 73 %).

Sodium-free ligand:

TLC (Al_2O_3, CH_2Cl_2/MeOH: 97/03) R_f = 0.27.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.60 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.7 Hz, 1H, **H^1**), 7.04 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.7 Hz, 2H, **H^2**), 4.79 (s, 2H, **H^{11}**), 4.03 (s, 4H, **H^4**), 4.01-3.06 (m, 12H, **H^5**, **H^6**, and **H^7**), 3.16 (s, 3H, **H^{14}**), 2.97 (s, 3H, **H^{13}**), 1.44 (s, 18H, (**H^{10}**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 170.5 (**C^8**), 164.9 (**C^{12}**), 159.1 (**C^3**), 137.8 (**C^1**), 120.9 (**C^2**), 81.8 (**C^9**), 58.4 (**C^7**), 58.2 (**C^4**), 54.8 (**C^6**), 50.5 (**C^{11}**), 50.2 (**C^5**), 37.0 (**C^{14}**), 35.6 (**C^{13}**), 28.1 (**C^{10}**).

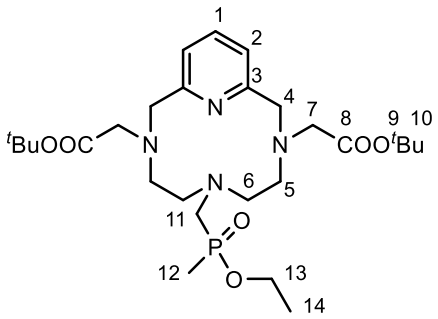
HRMS (ESI+) calcd. (found): 520.3499 (520.3491).

Sodium-complexed ligand:

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.62 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.6 Hz, 1H, **H^1**), 7.08 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.6 Hz, 2H, **H^2**), 3.96 (d, $J_{A\text{-}B}$ = 14.2 Hz, A part of an AB system, 2H, **H^3**), 3.52(d, $J_{A\text{-}B}$ = 14.2 Hz, B part of an AB system, 2H, **H^4**), 3.49 (d, $J_{A\text{-}B}$ = 17.6 Hz, A part of an AB system, 2H, **H^7**), 3.37 (d, $J_{A\text{-}B}$ = 17.6 Hz, B part of an AB system, 2H, **H^7**), 3.36 (s, 2H, **H^{11}**), 3.02 (s, 3H, **H^{14}**), 2.82 (s, 3H, **H^{13}**), 2.74-2.62 (m, 2H, **H^5**), 2.49-2.38 (m, 2H, **H^5**), 2.25-2.12 (m, 2H, **H^4**), 1.88-1.76 (m, 2H, **H^4**), 1.44 (m, 18H, **H^{10}**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.8 (**C^8**), 171.3 (**C^{12}**), 158.1 (**C^3**), 138.1 (**C^1**), 121.6 (**C^2**), 82.5 (**C^{10}**), 62.1 (**C^4**), 59.0 (**C^7**), 54.9 (**C^{11}**), 53.2 (**C^6**), 52.8 (**C^5**), 36.6 (**C^{14}**), 35.5 (**C^{13}**), 27.9 (**C^{10}**).

Protected macrocycle (60)



Macrocycle **60** was prepared as described above for macrocycle **12** from triamine **57** (105 mg, 0.23 mmol), Na_2CO_3 (246 mg, 2.33 mmol) and 2,6-bromomethyl pyridine (62 mg, 0.23 mmol) in anhydrous CH_3CN (200 mL). After purification by column chromatography (Al_2O_3, CH_2Cl_2/MeOH: 96/04), the free ligand **60** was obtained as a yellow oil (62 mg, 48 %).

Sodium-free ligand:

TLC (Al_2O_3, CH_2Cl_2/MeOH: 96/04) R_f = 0.33.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.60 (t, $^3J_{H-H}$ = 7.8 Hz, 1H, **H^1**), 7.13 (d, $^3J_{H-H}$ = 7.8 Hz, 2H, **H^2**), 4.05-3.95, (m, 2H, **H^{13}**), 3.97 (s, 4H, **H^4**), 3.43 (s, 4H, **H^7**), 3.23-2.20 (m, 8H, **H^5** and **H^6**), 2.80 (d, $^1J_{H-P}$ = 5.9 Hz, 2H, **H^{11}**), 1.46 (s, 18H, **H^{10}**), 1.41 (d, $^2J_{H-P}$ = 12.8 Hz, 3H, **H^{12}**), 1.26 (t, $^3J_{H-H}$ = 7.2 Hz, 3H, **H^{14}**).

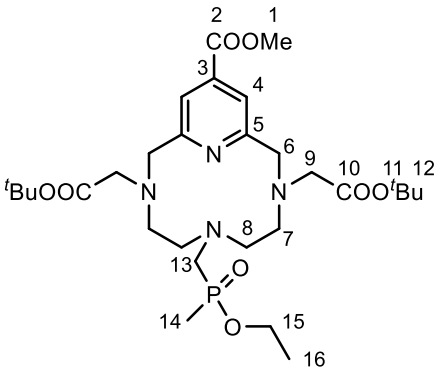
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 170.7 (**C^8**), 157.8 (**C^3**), 137.3 (**C^1**), 122.3 (**C^2**), 81.1 (**C^9**), 60.2 (d, $^2J_{C-P}$ = 6.6 Hz, **C^{13}**), 60.1 (**C^4**), 58.2 (**C^7**), 51.7 (d, $^1J_{C-P}$ = 6.1 Hz, **C^{11}**), 49.9 (**C^5** and **C^6**), 28.1 (**C^{10}**), 16.6 (d, $^3J_{C-P}$ = 5.8 Hz, **C^{14}**), 12.6 (d, $^1J_{C-P}$ = 93.1 Hz, **C^{12}**).

^{31}P NMR (121 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 54.4.

MS (ESI+) m/z (%): 577.31 (28) $[M+Na]^+$, 555.33 (88) $[M+H]^+$, 499.27 (100) $[M+2H-tBu]^+$, 443.21 (47) $[M+3H-2tBu]^+$.

HRMS (ESI+) calcd. (found): 555.3311 (555.3306).

Protected macrocycle (61)



Macrocycle **61** was prepared as described above for macrocycle **12** from triamine **57** (77 mg, 0.17 mmol), Na_2CO_3 (180 mg, 1.70 mmol) and dibromo compound **15** (55 mg, 0.17 mmol) in anhydrous CH_3CN (170 mL). After purification by column chromatography (Al_2O_3, CH_2Cl_2/MeOH: 99/01 to 97/03), the free ligand **61** was obtained as a yellow oil (90 mg, 86 %).

Sodium-free ligand:

TLC (Al_2O_3, CH_2Cl_2/MeOH : 98/02) R_f = 0.35.

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 7.67 (s, 2H, **H^{4}**), 4.05 (s, 4H, **H^{6}**), 4.03-3.94 (m, 2H, **H^{15}**), 3.91 (s, 3H, **H^{1}**), 3.42 (s, 4H, **H^{9}**), 2.84-2.48 (m, 10H, **H^{7}**, **H^{8}** and **H^{13}**), 1.46 (s, 18H, **H^{12}**), 1.37 (d, $^{2}J_{H\text{-}P}$ = 13.7, 3H, **H^{14}**), 1.25 (t, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 7.0 Hz, 3H, **H^{16}**).

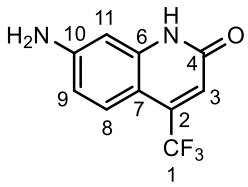
^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 170.6 (**C^{10}**), 165.7 (**C^{2}**), 159.1 (**C^{5}**), 138.6 (**C^{3}**), 121.5 (**C^{4}**), 81.1 (**C^{11}**), 60.16 (**C^{6}**), 60.04 (**C^{15}**), 58.0 (**C^{9}**), 52.6 (**C^{1}**), 51.8 (d, $^{1}J_{C\text{-}P}$ = 6.1 Hz, **C^{13}**), 50.1 (**C^{7}** and **C^{8}**), 28.2 (**C^{12}**), 16.6 (d, $^{3}J_{C\text{-}P}$ = 5.8 Hz, **C^{16}**), 12.6(d, $^{1}J_{C\text{-}P}$ = 93.1 Hz, **C^{14}**).

^{31}P NMR (202 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 53.7.

MS (ESI+) m/z (%): 635.32 (24) $[M+Na]^+$, 613.34 (100) $[M+H]^+$, 557.27 (77) $[M+2H\text{-}tBu]^+$, 501.21 (36) $[M+3H\text{-}2tBu]^+$.

HRMS (ESI+) calcd. (found): 613.3366 (613.3351).

7-amino-4-(trifluoromethyl)quinolin-2(1H)-one (62)



Under inert atmosphere and without any solvents, 1,3-phenylenediamine (0.416 g, 3.71 mmol) and ethyl 4,4,4-trifluoroacetoacetate (0.822 g, 4.46 mmol) were heated at 200 °C for 24h. The resulting yellow solid was purified by column chromatography (SiO_2, petroleum ether/ EtOAc: 70/30 to 50/50) then recrystallized in ethanol to give **62** as a pale yellow solid (0.720 g, 85 %).

TLC (SiO_2, EtOAc: 100) R_f = 0.42.

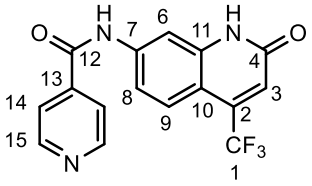
^{1}H NMR (300 MHz, MeOD) δ (ppm): 7.49 (dq, 1H, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 9.0 Hz and $^{5}J_{H\text{-}H}$ = 2.2 Hz, **H$_8$**), 6.68 (dd, 1H, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 9.0 Hz and $^{5}J_{H\text{-}H}$ = 2.2 Hz, **H$_9$**), 6.55 (s, 1H, **H$_3$**), 6.53 (d, $^{3}J_{H\text{-}H}$ = 2.3 Hz, 1H, **H$_{11}$**).

^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ (ppm): 164.2 (**C^{4}**), 153.9 (**C^{10}**), 143.3 (**C^{6}**), 140.4 (q, $^{2}J_{C\text{-}F}$ = 31 Hz, **C^{2}**), 126.9 (q, $^{4}J_{C\text{-}F}$ = 2.4 Hz, **C^{8}**), 124.3 (q, $^{1}J_{C\text{-}F}$ = 274 Hz, **C^{1}**), 114.0 (**C^{9}**), 113.8 ($^{3}J_{C\text{-}F}$ = 5.7 Hz, **C^{3}**), 106.8 (**C^{7}**), 98.6 (**C^{11}**).

^{19}F NMR (282 MHz, MeOD) δ (ppm): -64.72.

MS (ESI+) m/z (%): 229.0 (100) $[M+H]^+$.

Py-cs124-CF_3: *N*-(2-oxo-4-(trifluoromethyl)-1,2-dihydroquinolin-7-yl)isonicotinamide (65)



A solution of isonicotinic acid (123 mg, 1 mmol) and 1,1'-carbonyldiimidazol (CDI) (162 mg, 1 mmol) in anhydrous DMF (1 mL) was heated at 40 °C for 3 h. Amino derivative **62** (228 mg, 1 mmol) was added and the mixture was heated at 40 °C for 3 days. Water (1 mL) was added, the grey precipitate was filtered and purified by column chromatography (SiO_2, EtOAc then EtOAc/MeOH 90/10) to give **65** as a white solid (169 mg, 51 %).

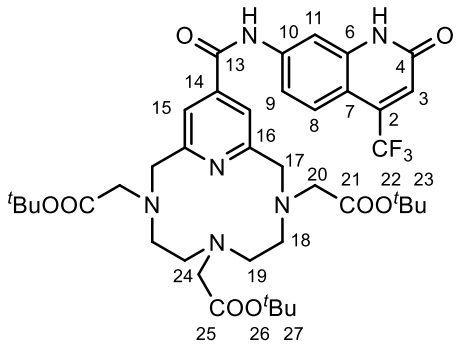
TLC (SiO_2, EtOAc: 40/60) R_f = 0.25.

^{1}H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 8.97-8.54 (m, 2H, **H^{15}**), 8.30 (d, 1H, $^5J_{H\text{-}H}$ = 2.1Hz, **H^6**), 7.97-7.88 (m, 2H, **H^{14}**), 7,80 (dq, 1H, $^3J_{H\text{-}H}$ = 9.0 Hz and $^5J_{H\text{-}H}$ = 2.2 Hz, **H^9**), 7.52 (dd, 1H, $^3J_{H\text{-}H}$ = 9.0 Hz and $^5J_{H\text{-}H}$ = 2.2 Hz, **H^8**), 6.92 (s, 1H, **H^3**).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 166.7 (**C^{12}**), 163.5 (**C^4**), 151.2 (**C^{15}**), 144.2 (**C^{13}**), 143.1 (**C^{11}**), 141.9 (**C^7**), 139.7 (q, $^2J_{C\text{-}F}$ = 31.5 Hz, **C^2**), 126.6 (**C^9**), 124.0 (q, $^1J_{C\text{-}F}$ = 274 Hz, **C^1**), 123.2 (**C^{14}**), 120.3 (q, $^3J_{C\text{-}F}$ = 5.6 Hz, **C^3**), 117.5 (**C^8**), 112.1 (**C^{10}**), 108.0 (**C^6**).

MS (ES+): 229 $[M+H]^+$ (100 %).

Protected PCTA[12]-cs124-CF_3 (66)



To a solution of macrocycle **19** (130 mg, 0.22 mmol, 1 eq) and carbostyrile **62** (50 mg, 0.22 mmol, 1 eq) in DMSO (2 mL) was added triethylamine (207 µL, 0.77 mmol, 3.5 eq) and HBTU (582 mg, 0.77 mmol, 3.5 eq), then the mixture was stirred at room temperature for 24h. The reaction was stopped with H_2O (3 mL) then CH_2Cl_2 (10 mL) was added. The organic layer was successively washed with NaOH (1M), H_2O, NH_4Cl (sat.) and H_2O, then dried over $MgSO_4$, filtered and the solvent was removed *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography (Al_2O_3, CH_2Cl_2/MeOH: 100/0 to 90/10) to give **66** as yellow powder (85 mg, 48 %).

TLC (Al_2O_3, CH_2Cl_2/MeOH: 97/3) R_f = 0.34.

^{1}H NMR (500 MHz, MeOD) δ (ppm): 8.32 (d, $^5J_{H\text{-}H}$ = 2.1 Hz, 1H, **H^{11}**), 7.83 (dq, $^3J_{H\text{-}H}$ = 9.0 Hz and $^5J_{H\text{-}H}$ = 2.1 Hz, 1H, **H^8**), 7.73 (s, 2H, **H$_{15}$**), 7.55 (dd, $^3J_{H\text{-}H}$ = 9.0 Hz and $^5J_{H\text{-}H}$ = 2.1 Hz, 1H, **H^9**), 6.94 (s, 1H, **H^3**), 4.22 (d, $J_{A\text{-}B}$ = 14.8 Hz, A part of an AB system, 2H, **H^{17}**), 3.84 (d, $J_{A\text{-}B}$ = 14.8 Hz, B part of an AB system, 2H, **H^{17}**), 3.56 (d, $J_{A\text{-}B}$ = 17.5 Hz, A part of an AB system, 2H, **H^{20}**), 3.46 (d, $J_{A\text{-}B}$ = 17.5 Hz, B part of an AB system, 2H, **H^{20}**), 3.15 (s, 2H, **H^{24}),** 2.66 – 2.46 (m, 4H, **H^{19}**), 2.29 – 2.17 (m, 2H, **H^{18}**), 2.08 – 1.97 (m, 2H, **H^{18}**), 1.57 (s, 18H, **H^{23}**), 1.54 (s, 9H, **H^{27}**).

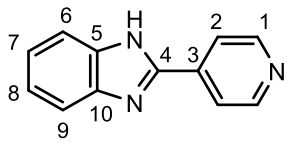
^{13}C NMR (126 MHz, MeOD) δ (ppm): 173.3 (**C^{25}**), 172.8 (**C^{21}**), 165.2 (**C^{13}**), 162.0 (**C^4**), 159.7 (**C^{16}**), 144.0 (**C^{14}**), 141.6 (**C^{10}**), 140.5 (**C^6**), 138.1 (q, $^2J_{C\text{-}F}$ = 31.7 Hz, **C^2**), 125.1 (d, $^4J_{C\text{-}F}$ = 1.3 Hz, **C^8**), 122.6 (q, $^1J_{C\text{-}F}$ = 274.5 Hz, **C^1**), 119.0 (**C^{15}**), 118.8 (q, $^3J_{C\text{-}F}$ = 5.5 Hz, **C^3**), 115.9 (**C^9**), 110.7 (**C^7**), 106.6 (**C^{11}**), 81.9 (**C^{22}**), 81.8 (**C^{26}**), 61.9 (**C^{17}**), 58.5 (**C^{20}**), 55.5 (**C^{24}**), 52.9 (**C^{18}**), 28.2 (**C^{23}** and **C^{27}**).

^{19}F NMR (282 MHz, MeOD) δ (ppm): -64.85.

HRMS (ESI+) m/z (%): 825.3779 (30) $[M+Na]^+$, 803.3966 (100) $[M+H]^+$, 747.3335 (5) $[M+2H\text{-}1tBu]^+$, 691.2708 (3.5) $[M+3H\text{-}2tBu]^+$.

HRMS (ESI+) calcd. (found): 803.3955 (803.3966).

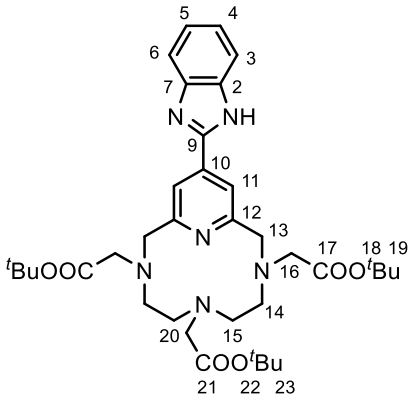
Py-HBim: 2-(pyridin-4-yl)-1H-benzo[d]imidazole (68)



To a solution of *o*-phenylenediamine (43.2 mg, 0.40 mmol) in anhydrous toluene (1.2 mL) was added DABAL.Me_3 (205 mg, 0.80 mmol, 2 eq). The mixture was stirred for 1/2h before addition of methyl isonicotinate (82 mg, 0.6 mmol, 1.5 eq) and then the resulting mixture was heated at 110 °C for 16h. After cooling to room temperature, 1 M HCl was added. The mixture was extracted with EtOAc and the organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered and the solvent was removed *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography (Reverse phase C18, H_2O/MeOH: 80/20 to 60/40) to give **68** as a white solid (30 mg, 38 %).

^{1}H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 8.72-8.71 (m, 2H, **H^1**), 8.09-8.07 (m, 2H, **H^2**), 7.68-7.65 (m, 2H, **H^6**), 7.31-7.34 (m, 2H, **H^7**).
^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 151.2 (**C^1**), 150.2 (**C^4**), 144.6 (**C^3**), 139.4 (**C^5**), 124.9 (**C^7**), 122.2 (**C^2**), 116.6 (**C^6**).

Protected PCTA[12]-HBim (69)



To a solution of *o*-phenylenediamine (16.8 mg, 0.16 mmol, 1 eq) in anhydrous THF (3 mL) was added DABAL.Me_3 (80 mg, 0.31 mmol, 2 eq). After being refluxed for one hour, macrocycle **17** (91 mg, 0.15 mmol, 1 eq) solubilized in THF (1 mL) was added in one portion. After two days of reflux, the solution was concentrated *in vacuo*. The resulting dark orange oil was solubilized in CH_2Cl_2 and washed three times with Rochel's salts. The organic layer was then dried over $MgSO_4$, filtered, and the solvent was removed *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography (Al_2O_3, CH_2Cl_2/MeOH: 98/2 to 95/5) to give **69** as a dark yellow oil (45 mg, 45 %).

TLC (Al_2O_3, CH_2Cl_2/MeOH: 95/5) R_f = 0.28.

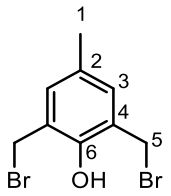
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 14.26 (broad s, 1H, N**H**), 8.48 (s, 2H, **H^{11}**), 7.78 (broad s, 2H, **H^3** and **H^6**), 7.25 – 7.17 (m, 2H, **H^4** and **H^5**), 3.96 (d, $J_{A\text{-}B}$ = 14.5 Hz, A part of an AB system, 2H, **H^{13}**), 3.70 (d, $J_{A\text{-}B}$ = 14.3 Hz, B part of an AB system, 2H, **H^{13}**), 3.36 (d, $J_{A\text{-}B}$ = 17.4 Hz, A part of an AB system, 2H, **H^{16}**), 3.19 (d, $J_{A\text{-}B}$ = 17.5 Hz, B part of an AB system, 2H, **H^{16}**), 2.96 (s, 2H, **H^{20}**), 2.61-2.47 (m, 2H, **H^{14}**), 2.46 – 2.27 (m, 2H, **H^{14}**), 2.10-1.93 (m, 2H, **H^{15}**), 1.93-1.73 (m, 2H, **H^{15}**), 1.48 (s, 18H, **H^{19}**), 1.41 (s, 9H, **H^{23}**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 173.1 (**C^{21}**), 172.7 (**C^{17}**), 158.1 (**C^{12}**), 157.9 (**C^9**), 148.6 (**C^{10}**), 140.4 (**C^2** and **C^7**), 122.7 (**C^4** and **C^5**), 119.7 (**C^3**, **C^6** and **C^{11}**), 82.9 (**C^{18}**) 82.7 (**C^{22}**), 62.2 (**C^{13}**), 59.5 (**C^{16}**), 55.9 (**C^{20}**), 53.8 (**C^{15}**), 53.2 (**C^{14}**), 27.9 (**C^{19}**), 27.7 (**C^{23}**).

HRMS (ESI+) m/z (%): 687.3858 (32) $[M+Na]^+$, 665.4036 (98) $[M+H]^+$, 609.3412 (17) $[M+2H-1tBu]^+$, 553.2785 (100) $[M+3H-2tBu]^+$, 497.2156 (58) $[M+4H-3tBu]^+$.

HRMS (ESI+) calcd. (found): 665.4026 (665.4036).

2,6-bis(bromomethyl)-4-methylphenol (70)



This compound was synthesized as described by Trost *et al*.[8] On the commercially available (2-hydroxy-5-methyl-1,3-phenylene)dimethanol (840 mg, 5 mmol) was added a solution of HBr in acetic acid at 33 % (4 mL). After few minutes, petroleum ether was added and the mixture was filtered. The filtrate was concentrated *in vacuo* and the residual solid was washed with water, dried under vacuum and sublimated to afford **70** as white solid (1,010 g, 69 %).

TLC (SiO_2, CH_2Cl_2/petroleum Ether: 40/60) R_f = 0.48.

Melting point: 116 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, CDCl) δ (ppm): 7.08 (s, 2H, **H^3**), 5.44 (s, 1H, O**H**), 4.54 (s, 4H, **H^5**), 2.26 (s, 3H, **H^1**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 151.0 (**C^6**) 131.9 (**C^3**), 130.7 (**C^2**), 125.0 (**C^4**), 29.5 (**C^5**), 20.3 (**C^1**).

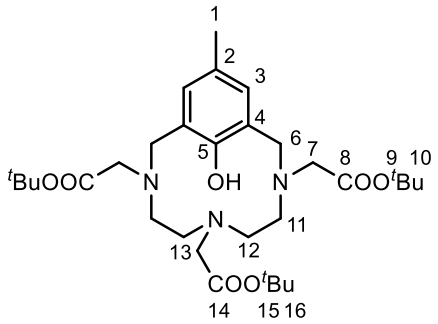
IR (cm^{-1}) KBr pellet: 3519, 2915, 2839, 1603, 1486, 1210.

MS (DCI/NH_3) m/z (%): 296.9 (23) $[M+H]^+$, 294.9 (46) $[M+H]^+$, 292.9 (31) $[M+H]^+$, 215.0 (98) $[M+2H-Br]^+$, 213.0 (100) $[M+2H-Br]^+$.

Protected macrocycles (71) and (72)

To a solution of triamine **3** (390 mg, 0.875 mmol) in anhydrous acetonitrile (440 mL), was added in one portion sodium carbonate (0.93 g, 8.77 mmol) and then dibromo compound **70** (258 mg, 0.877 mmol). The suspension was heated at reflux for 16h and was cooled to room temperature. The salts were filtered off and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The oily residue was purified by chromatography on alumina eluting first with CH_2Cl_2, then with CH_2Cl_2/methanol (98:02) to give the expected macrocycles **71** (155 mg, 3 1%) and **72** (280 mg, 55 %) as yellow oils.

Protected macrocycle (71)



TLC (Al_2O_3, CH_2Cl_2: 100) R_f = 0.35

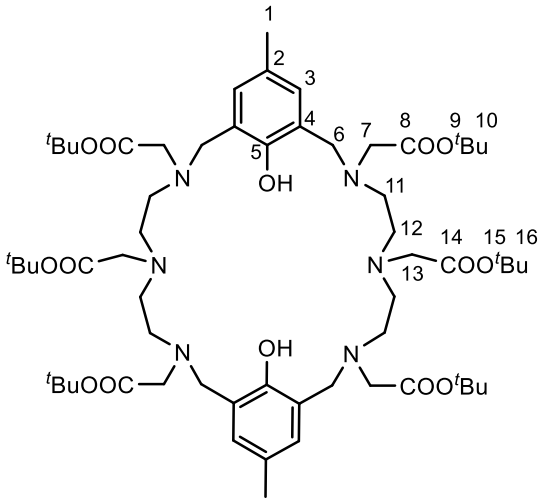
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 9.81 (broad s, 1H, O**H**), 6.81 (s, 2H, **H^3**), 4.32 (d, $J_{A\text{-}X}$ = 12.9 Hz, A part of an AX system, 2H, **H^6**), 3.47 (d, $J_{A\text{-}X}$ = 12.9 Hz, X part of an AX system 2H, **H^6**), 3.35 (d, $J_{A\text{-}B}$ = 16.8 Hz, A part of an AB system, 2H, **H^7**), 3.28 (d, $J_{A\text{-}B}$ = 16.8 Hz, B part of an AB system, 2H, **H^7**), 3.05 (s, 2H, **H^{13}**), 2.92-2.68 (m, 4H, **H^{11}**), 2.49-2.35 (m, 2H, **H^{12}**), 2.23 (s, 3H, **H^1**), 2.14-2.03 (m, 2H, **H^{12}**), 1.50 (s, 18H, **H^{10}**) 1.41 (s, 9H, **H^{16}**).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 170.3 (**C^{14}**), 170.2 (**C^{8}**), 154.1 (**C^{5}**), 130.4 (**C^{3}**), 128.2 (**C^{2}**), 125.8 (**C^{4}**), 81.2 (**C^{9}**), 80.6 (**C^{15}**), 56.5 (**C^{7}**), 55.7 (**C^{13}**), 51.1 (**C^{11}**), 51.0 (**C^{11}**), 49.7 (**C^{12}**), 28.1 (**C^{10}** and **C^{6}**), 20.5 (**C^{1}**).

IR (cm^{-1}) KBr pellet: 2977, 2932, 2841, 1734, 1367, 1155.

MS (ESI+) m/z (%): 578.4 (100) $[M+H]^+$.

Protected macrocycle (72)



TLC (Al_2O_3, AcOEt/MeOH: 97/3) R_f = 0.31

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 6.82 (s, 4H, **H^{3}**), 3.71 (s, 8H, **H^{6}**), 3.30 (s, 4H, **H^{13}**), 3.23 (s, 8H, **H^{7}**), 2.78-2.73 (m, 16H, **H^{11}** and **H^{12}**), 2.18 (s, 6 H, **H^{1}**), 1.45 (s, 36 H, **H^{10}**), 1.42 (s, 18H, **H^{16}**)

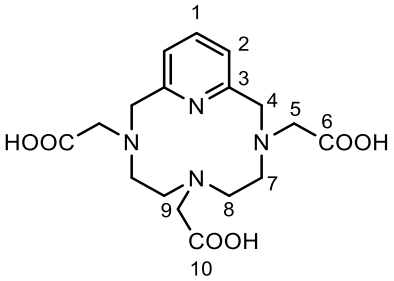
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 170.8 (**C^{14}**), 170.5 (**C^{8}**), 153.7 (**C^{5}**), 129.8 (**C^{3}**), 127.0 (**C^{2}**), 123.2 (**C^{4}**), 80.8 (**C^{9}**), 80.6 (**C^{15}**), 55.4 (**C**H_2), 55.3 (**C**H_2), 53.8 (**C**H_2), 51.4 (**C**H_2), 51.3 (**C**H_2), 28.1 (**C**H_2), 20.4 (**C^{1}**)

IR (cm^{-1}) KBr pellet: 2977, 2933, 2858, 1732, 1481, 1367, 1156.

MS (ESI+) m/z (%): 1155.7 (100) $[M+H]^+$, 578.4 (47) $[M+2H]^{2+}$, 578.9 (36) $[M+2H]^{2+}$, 579.4 (15) $[M+2H]^{2+}$.

3 Synthesis of ligands $H_3PCTA[12]$, $H_4L_1 \rightarrow H_8L_{10}$

3,6,9,15-Tetraazabicyclo [9.3.1] pentadeca-1(15),11,13-triene-3,6,9-triacetic acid, hydrochloride (1:4). Ligand $H_3PCTA[12]$



Free protected macrocycle **12** (30 mg, 0.054 mmol) in 6N HCl (10 mL) was heated at reflux for 12h. The solvent was removed under vacuum to give the hydrochloride salt of **$H_3PCTA[12]$** as a light beige solid (30 mg, 100 %).

^{1}H NMR (300 MHz, D_2O) δ (ppm): 8.05 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.5 Hz, 1H, **H^1**), 7.52 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.5 Hz, 2H, **H^2**), 4.87 (s, 4H, **H^4**), 4.32 (s, 4H, **H^5**), 3.67 (s, 2H, **H^9**), 3.60-3.53 (m, 4H, **H^8**), 2.95 (broad s, 4H, **H^7**).

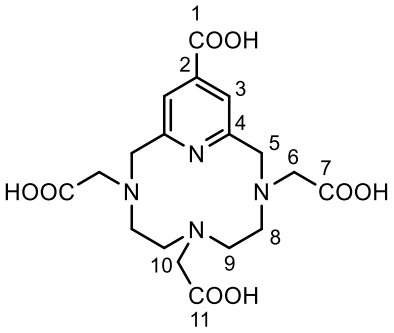
^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) δ (ppm): 174.5 (**C^{10}**). 169.0 (**C^6**), 149.7 (**C^3**), 140.9 (**C^1**), 122.4 (**C^2**), 59.6 (**C^4**), 56.4 (**C^5**), 54.5 (**C^7**), 54.4 (**C^9**), 50.9 (**C^8**).

MS (ESI+) m/z (%): 456.0 (21) $[M+Fe+Na]^+$, 434.0 (100) $[M+Fe+H]^+$, 381.1 (8) $[M+H]^+$.

HRMS (ESI+) calcd. (found): 381.1774 (381.1769).

Elemental Analysis: calculated for $C_{17}H_{24}N_4O_6$ + 4 HCl + 2 H_2O: C, 36.31, H, 5.74, N, 9.96. Found C, 36.20, H, 5.85, N, 9.79.

3,6,9,15-tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-triene-3,6,9-triacetic acid,13 (carboxylic acid), hydrochloride (1:4). Ligand H_4L_1



Macrocycle **H_4L_1** was obtained as described above for macrocycle **PCTA** from macrocycle **17** (100 mg, 0.16 mmol). It was obtained as a hydrochloride salt and a pale yellow powder (100 mg, 100 %).

^{1}H NMR (300 MHz, D_2O) δ (ppm): 7.93 (s, 2H, **H^3**), 4.99 (s, 4H, **H^5**), 4.37 (s, 4H, **H^6**), 3.59 (s, 6H **H^8** and **H^{10}**), 2.90 (broad s, 4H, **H^9**).

^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) δ (ppm): 175.2 (**C^{11}**), 168.3 (**C^7**), 166.9 (**C^1**), 151.0 (**C^4**), 141.4 (**C^2**), 121.8 (**C^3**), 59.7 (**C^5**), 56.7 (**C^6**), 55.3 (**C^8**), 54.4 (**C^{10}**), 50.6 (**C^9**).

MS (ESI+) m/z (%): 463.5 (100) $[M+K]^+$, 425.5 (43) $[M+H]^+$, 367.4 (98) $[M-CH_2COOH+2H]^+$.

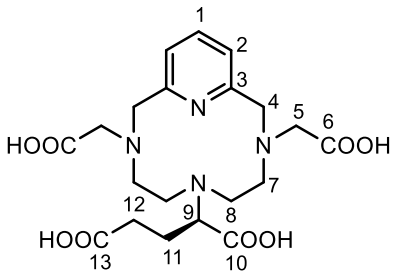
HRMS (ESI-) m/z (%): 476.0630 (20) $[M-H+Fe]^-$, 423.1518 (100) $[M-H]^-$.

HRMS (ESI+) calcd. (found): 425.1672 (425.1669).

HRMS (ESI-) calcd. (found): 423.1516 (423.1518).

Elemental Analysis: calculated for $C_{18}H_{24}N_4O_8$ + 4 HCl + 3 H_2O: C, 34.63, H, 5.49, N, 8.97. Found C, 34.31, H, 5.58, N, 8.82.

3,6,9,15-Tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-triene-3,6,9-triacetic acid, α6 (3 propionic acid)-, hydrochloride (1:4). Ligand H_4L_2



Macrocycle **H_4L_2** was obtained as described above for macrocycle **PCTA** from macrocycle **35** (20 mg, 29.5 μmol). It was obtained as a hydrochloride salt and a pale yellow powder (19 mg, 100 %).

^{1}H NMR (300 MHz, D_2O) δ (ppm): 7.95 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.8 Hz, 1H, **H^1**), 7.43 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.9 Hz, 2H, **H^2**), 4.87-4.74 (m, 4H, **H^4**), 4.26 (s, 4H, **H^5**), 3.63 – 3.56 (m, 1H, **H^9**), 3.54-3.44 (m, 4H, **H^7** or **H^8**), 3.01 (broad s, 4H, **H^7** or **H^8**), 2.57 – 2.49 (m, 2H, **H^{12}**), 2.17 – 1.83 (m, 2H, **H^{11}**)

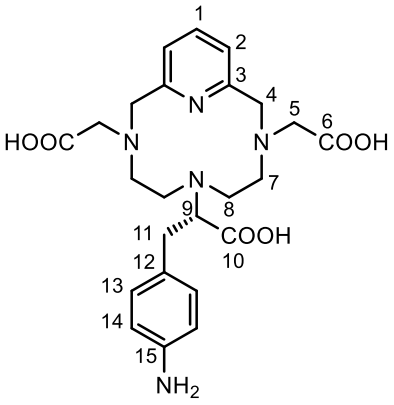
^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) δ (ppm): 177.1 (**C^{13}**), 175.1 (**C^{10}**), 168.9 (**C^6**), 149.4 (**C^3**), 140.5 (**C^1**), 123.0 (**C^2**), 61.6 (**C^9**), 59.5 (**C^4**), 55.7 (**C^5**), 53.6 (**C^7** or **C^8**), 46.8 (**C^7** or **C^8**), 30.8 (**C^{12}**), 21.6 (**C^{11}**)

HRMS (ESI+) m/z (%): 475.1806 (18) $[M+Na]^+$, 453.1980 (86) $[M+H]^+$.

HRMS (ESI+) calcd. (found): 453.1985 (453.1980).

Elemental Analysis: calculated for $C_{20}H_{28}N_4O_8$ + 4 HCl +3 H_2O: C, 36.82, H, 5.87, N, 8.59. Found C, 36.57, H, 6.06, N, 8.42.

3,6,9,15-Tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-triene-3,6,9-triacetic acid, α6-[(4-Aminophenyl)methyl]-(α6S)-,hydrochloride (1:5). Ligand H_3L_3



Free protected macrocycle **49** (50 mg, 66.3 µmol) in 6N HCl (10 mL) was stirred for 16 h at room temperature. The solvent was removed under vacuum to give the hydrochloride salt of **H_3L_3** as a light beige solid (48 mg, 100 %).

RMN ^{1}H (300 MHz, D_2O) δ (ppm): 7.91 (t, $^3J_{H-H}$ = 7.8 Hz, 1H, **H^1**), 7.37-7.41 (m, 4H, **H^{13}** and **H^{14}**), 7.26 (d, $^3J_{H-H}$ = 7.7 Hz, 2H, **H^2**), 4.77-4.83 (m, 4H, **H^4**), 4.31 (s, 4H, **H^5**), 3.77-3.82 (m, 1H, **H^9**), 3.50 (s, 4H, **H^7** or **H^8**), 2.70-3.30 (m, 6H, **H^7** or **H^8**, **H^{11}**).

RMN ^{13}C (75 MHz D_2O) δ (ppm): 174.8 (**C^{10}**) 168.6 (**C^6**), 149.2 (**C^3**), 140.3 (**C^1**), 138.6 (**C^{12}**), 130.8 (**C^{13}**), 128.5 (**C^{15}**), 123.3 (**C^{14}**), 123.0 (**C^2**), 64.7 (**C^9**), 59.6 (**C^4**), 55.5 (**C^5**), 53.8 (**C^7** or **C^8**), 47.0 (**C^7** or **C^8**), 32.8 (**C^{11}**).

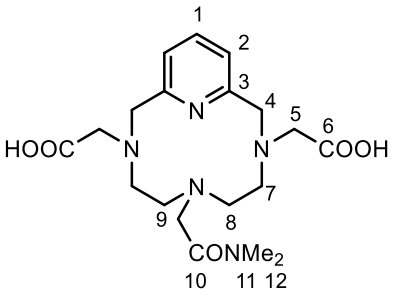
IR (cm^{-1}): 3362, 2927, 2853, 2589, 1734, 1622,1601, 1577, 1513, 1448, 1353, 1210.

SM (ESI$^+$):m/z (%): 486.2 (100) $[M+H]^+$.

HRMS (ESI$^+$) m/z calculée pour $[C_{24}H_{31}N_5O_6+H]^+$ = 486.2353, trouvée 486.2350 (100 %)

Elemental Analysis: calculated for $C_{24}H_{31}N_5O_6$ + 5 HCl +3 H_2O: C, 39.93, H, 5.86, N, 9.70. Found C, 39.99, H, 5.91, N, 9.42.

3,6,9,15-Tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-triene-3,6,9-triacetic acid,6-(*N*,*N*-dimethylamide)-, hydrochloride (1:4). Ligand H_2L_4



Free Macrocycle **59** (75 mg, 0.14 mmol) in 1N HCl (10 mL) was stirred for 16 h at room temperature. The solvent was removed under vacuum to give the hydrochloride salt of **H_2L_4** as a pale yellow powder (100 %).

TLC (Al_2O_3, CH_2Cl_2/MeOH: 95/5) R_f = 0.35

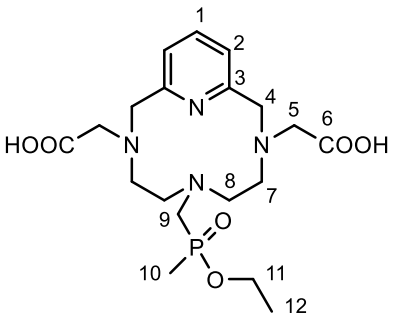
^{1}H NMR (300 MHz, D_2O) δ (ppm): 8.15 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.9 Hz, 1H, **H^1**), 7.60 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.9 Hz, 2H, **H^2**), 4.73 (s, 4H, **H^4**), 4.06 (s, 4H, **H^5**), 4.02 (s, 2H, **H^9**), 3.45 – 3.35 (m, 4H, **H^7** or **H^8**), 2.98 (s, 3H, **H^{11}**), 2.95 (s, 3H, **H^{12}**), 3.13 – 2.93 (m, 4H, **H^7** or **H^8**).

^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) δ (ppm): 170.5 (**C^6**), 169.2 (**C^{10}**), 150.8 (**C^3**), 142.6 (**C^1**), 123.1 (**C^2**), 58.6 (**C^4**), 56.2 (**C^5**), 55.4 (**C^9**), 53.5 (**C^7** or **C^8**), 53.0 (**C^7** or **C^8**), 36.0 (**C^{12}**), 35.9 (**C^{11}**).

MS (ESI+) m/z (%): 430.21 (58) $[M+Na]^+$, 408.22 (100) $[M+H]^+$.

HRMS (ESI+) calcd. (found) : 408.2247 (408.2238).

3,6,9,15-Tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-triene-3,9-diacetic acid, 6-[Methyl(methylphosphinic acid ethyl ester]-, hydrochloride (1:4). Ligand $H_2L_5^{\#}$



Macrocycle $\mathbf{H_2L_5^{\#}}$ was obtained as described above for macrocycle $\mathbf{H_2L_4}$ from **60** (47 mg, 0.08 mmol). It was obtained as a hydrochloride salt and a pale yellow powder (100 %).

TLC (Al_2O_3, CH_2Cl_2/MeOH: 94/6) R_f = 0.31

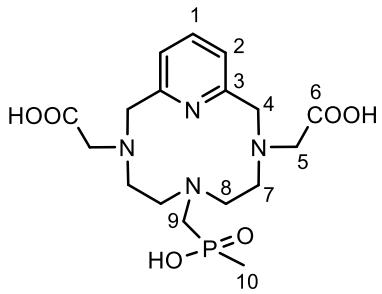
^{1}H NMR (300 MHz, D_2O) δ (ppm) : 8.07 (t, $^3J_{H-H}$ = 7.8 Hz, 1H, **H^1**), 7.56 (d, $^3J_{H-H}$ = 7.8 Hz, 2H, **H^2**), 4.99 (s, 4H, **H^4**), 4.51 (s, 2H, **H^5**) , 4.49 (s, 2H, **H^5**), 4.21 – 4.12 (m, 2H, **H^{11}**), 3.75 (dd, $^3J_{H-H}$ = 6.1, 4.5 Hz, 4H, **H^8**), 3.32 (d, $^2J_{H-P}$ = 7.8 Hz, 2H, **H^9**), 3.06 (large s, 4H, **H^7**), 1.70 (d, $^2J_{H-P}$ = 13.5 Hz, 3H, **H^{10}**), 1.37 (t, $^3J_{H-H}$ = 7.1 Hz, 3H, **H^{12}**).

^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) δ (ppm): 168.3 (**C^6**), 149.30 (**C^3**), 140.3 (**C^1**), 122.7 (**C^2**), 62.5 (d, $^2J_{C-P}$ = 7.0 Hz, **C^{11}**), 59.9 (**C^4**), 56.4 (**C^5**), 54.6 (**C^8**), 51.61 (d, $^1J_{C-P}$ = 19.7 Hz, **C^9**), 50.6 (**C^7**), 15.7 (d, $^3J_{C-P}$ = 5.5 Hz, **C^{12}**), 11.6 (d, $^1J_{C-P}$ = 86.1 Hz, **C^{10}**).

MS (ESI+) m/z (%): 496.1183 (7) $[M+Fe]^{+,}$ 443.21 (100) $[M+H]^+$.

HRMS (ESI+) calcd. (found): 443.2059 (443.2063).

3,6,9,15-Tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-triene-3,9-diacetic acid, 6-[Methyl(methylphosphinic acid]-, hydrochloride (1:4). Ligand H_3L_5



A solution of semi-protected macrocrocycle $\mathbf{H_2L_5^{\#}}$ (27 mg, 0.06 mmol) in 6*N* HCl (10 mL) was heated at reflux for 12h. The solvent was removed under vacuum to give the hydrochloride salt of $\mathbf{H_3L_5}$ as a pale yellow powder (100 %).

TLC (Al_2O_3, CH_2Cl_2/MeOH : 94/6) R_f = 0.27

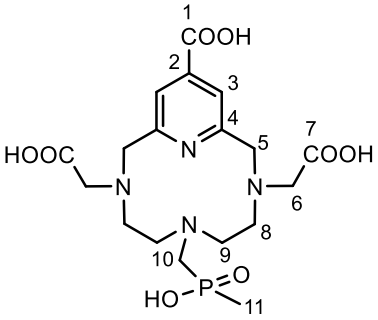
^{1}H NMR (300 MHz, D_2O) δ (ppm): 8.02 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.8 Hz, 1H, **H^1**), 7.49 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 7.8 Hz, 2H, **H^1**), 4.86 (s, 4H, **H^4**), 4.38 (s, 4H, **H^5**), 3.67 – 3.58 (m, 4H, **H^8**), 3.15 (d, $^2J_{H\text{-}P}$ = 5.7 Hz, 2H, **H^9**), 3.00 (large s, 4H, **H^7**), 1.51 (d, $^2J_{H\text{-}P}$ = 13.8 Hz, 3H, **H^{10}**).

^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) δ (ppm): 169.0 (**C^6**), 149.8 (**C^3**), 140.7 (**C^1**), 122.7 (**C^2**), 59.6 (**C^4**), 56.6 (**C^5**), 54.5 (**C^7**), 52.2 (d, $^1J_{C\text{-}P}$ = 105.2 Hz, **C^9**), 51.64 (d, $^1J_{C\text{-}P}$ = 5.3 Hz, **C^8**), 13.9 (d, $^1J_{C\text{-}P}$ = 88.6 Hz, **C^{10}**).

MS (ESI-) m/z (%): 466.07 (100) $[M\text{-}4H+Fe]^-$.

HRMS (ESI-) calcd. (found): $[M+Fe]^-$ 466.0908 (466.0912)

3,6,9,15-Tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-triene-3,9-diacetic acid, 6-[Methyl(methylphosphinic acid)]-13-(carboxylic acid)-, hydrochloride (1:4). Ligand H_4L_6



Macrocycle **H_4L_6** was obtained as described above for macrocycle **PCTA** from **61** (57 mg, 0.09 mmol). It was obtained as a hydrochloride salt and a pale yellow powder (100 %).

TLC (Al_2O_3, CH_2Cl_2/MeOH: 94/6) R_f = 0.24

^{1}H NMR (300 MHz, D_2O) δ (ppm): 7.92 (s, 2H, **H^3**), 4.97 (s, 4H, **H^5**), 4.42 (s, 4H, **H^6**), 3.67 (deformed t, 4H, **H^9**), 3.12 (d, $^2J_{H\text{-}P}$ = 5.1 Hz, **H^{10}**), 2.98 (large s, 4H, **H^8**), 1.50 (d, $^2J_{H\text{-}P}$ = 13.9 Hz, 1H, **H^{11}**).

^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) δ (ppm): 168.3 (**C^7**), 167.0 (**C^1**), 151.2 (**C^4**), 141.3 (**C^2**), 121.8 (**C^3**), 59.6 (**C^5**), 56.7 (**C^6**), 55.1 **C^9**), 52.18 (d, $^1J_{C\text{-}P}$ = 107.5 Hz, **C^{10}**), 51.4 (**C^8**), 13.6 (d, $^1J_{C\text{-}P}$ = 87.5 Hz, **C^{10}**).

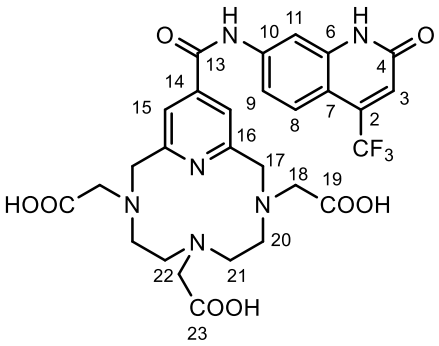
^{31}P NMR (121 MHz, D_2O) δ (ppm): 48.2.

MS (ESI-) m/z (%): 510.06 (46) $[M\text{-}4H+Fe]^-$, 457.15 (100) $[M\text{-}H]^-$.

HRMS (ESI-) calcd. (found): 457.1488 (457.1488).

HRMS (ESI+) calcd. (found): 459.1645 (459.1645).

3,6,9,15-tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-triene-3,6,9-triacetic acid, 13-[*N*-[1,2-dihydroxy-2-oxo-4-(trifluoromethyl)-7-quinolinyl]-acetamide]. Ligand H_3L_7



A solution of macrocycle **66** (85 mg, 106 μmol) in a ternary mixture of TFA/CH_2Cl_2/TES 5:5:1.8 (5 mL) was stirred at room temperature for 12h. The reaction was stopped with toluene (5 mL) then concentrated *in vacuo*. The resulting solid was washed three times with Et_2O then dried under vacuum to give $\mathbf{H_3L_7}$ as its hydrochloride salt and a pale yellow powder (100 %).

TLC (SiO_2, H_2O/CH_3CN: 25/75) R_f = 0.21

^{1}H NMR (300 MHz, CD_3CN) δ (ppm): 8.02 (s, 1H, **H^{11}**), 7.78 (dd, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.2 Hz and $^3J_{H\text{-}H}$ = 2.0 Hz, 1H, **H^8**), 7.75 (s, 2H, **H^{15}**), 7.53 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8.7 Hz, 1H, **H^9**), 6.93 (m, 1H, **H^3**), 4.68 (broad s, 4H, **H^{17}**), 3.94 (broad s, 4H, **H^{18}**), 3.68 (broad s, 2H, **H^{22}**), 3.42 (broad s, 4H, **H^{20}**), 3.15 (broad s, 4H, **H^{21}**).

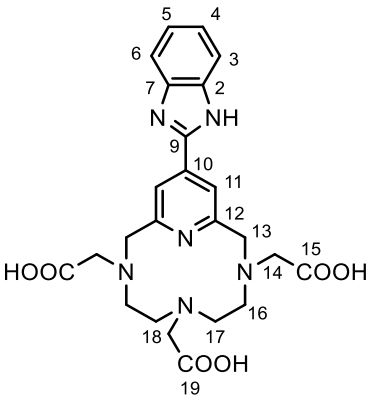
^{13}C NMR (75 MHz, CD_3CN) δ (ppm): 172.5 (**C^{23}**), 169.8 (**C^{19}**), 164.9 (**C^{13}**), 162.0 (**C^4**), 153.7 (**C^{16}**), 144.3 (**C^{14}**), 140.6 (**C^{10}**), 139.6 (**C^6**), 137.9 (q, $^2J_{C\text{-}F}$ = 31.8, Hz, **C^2**), 125.3 (**C^8**), 122.2 (d, $^1J_{C\text{-}F}$ = 274.5, Hz, **C^1**), 119.7 (**C^{15}**), 119.0 (d, $^3J_{C\text{-}F}$ = 5.5 Hz, **C^3**), 116.3 (**C^9**), 111.0 (**C^7**), 106.7 (**C^{11}**), 58.6 (**C^{17}**), 57.2 (**C^{18}**), 53.4 (**C^{22}**), 52.9 (**C^{20}**), 51.6 (**C^{21}**).

^{19}F NMR (282 MHz, CD_3CN) δ (ppm): -63.8.

HRMS (ESI-) m/z (%): 693.1956 (35) $[M\text{-}3H+Na+K]^-$, 686.1039 (20) $[M\text{-}4H+Fe]^-$, 633.1926 (100) $[M\text{-}H]^-$.

HRMS (ESI-) calcd. (found): 633.1921 (633.1926).

3,6,9,15-tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-triene-3,6,9-triacetic acid, 13-[*N*-[1,2-dihydroxy-2-oxo-4-(trifluoromethyl)-7-quinolinyl]-acetamide]. Ligand H_3L_8



Macrocycle $\mathbf{H_3L_8}$ was obtained as described above for macrocycle $\mathbf{H_3L_7}$ from **69** (85 mg, 127 μmol). It was obtained as a hydrochloride salt and a pale yellow powder (100 %).

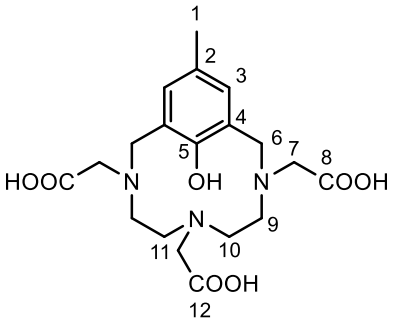
^{1}H NMR (300 MHz, D_2O) δ (ppm): 7.95 (s, 2H, **H^{11}**), 7.76 – 7.73 (m, 2H, **H^3** and **H^6**), 7.56 – 7.53 (m, 2H, **H^4** and **H^5**), 4.96 (s, 4H, **H^{13}**), 4.22 (s, 4H, **H^{14}**), 3.59 (s, 2H, **H^{18}**), 3.57-3.54 (m, 4H, **H^{16}**), 3.20 (s, 4H, **H^{17}**).

^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) δ (ppm): 174.7 (**C^{19}**), 168.9 (**C^{15}**), 152.8 (**C^{12}**), 144.7 (**C^{10}**), 133.7 (**C^9**), 131.5 (**C^2** and **C^7**), 127.5 (**C^4** and **C^5**), 119.8 (**C^{11}**), 114.3 (**C^3** and **C^6**), 59.4 (**C^{13}**), 57.1 (**C^{14}**), 54.7 (**C^{16}**), 54.4 (**C^{18}**), 50.9 (**C^{17}**).

HRMS (ESI-) m/z (%): 519.1964 (30) $[M+Na]^+$, 497.2154 (60) $[M+H]^+$, 249.1113 (100) $[M+2H]^{2+}$.

HRMS (ESI-) calcd. (found): 497.2148 (497.2154).

3,6,9-triazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-triene-3,6,9-triacetic acid,13-methyl-, -15-ol, hydrochloride (1:3). Ligand H_4L_9



Macrocycle **71** (100 mg, 0.173 mM) was stirred in a mixture of CH_2Cl_2 (5 mL) and 20 % HCl in water (5 mL) at room temperature for 24 h. The aqueous layer was evaporated under reduced pressure to give **H_4L_9** in the form of its hydrochloride salt as a beige powder (85 mg, 92 %).

^{1}H NMR (300 MHz, D_2O) δ (ppm): 7.28 (s, 2H, **H^3**), 4.98 (d, $J_{A\text{-}X}$ = 13.4 Hz, A part of an AX system, 2H, **H^6**), 4.23 (d, $J_{A\text{-}B}$ = 13.4 Hz, X part of an AX system, 2H, **H^6**), 4.14 (s, 4H, **H^7**), 3.47-3.11 (m, 6H, **H^{10} H^{11}**), 2.69-2.37 (m, 2H, **H^9**), 2.24 (s, 3H, **H^1**), 1.98-1.62 (m, 2H, **H^9**).

^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) δ (ppm): 175.0 (**C^{12}**), 168.8 (**C^8**), 150.7 (**C^5**), 134.7 (**C^3**), 133.6 (**C^2**), 122.7 (**C^4**), 58.5 (**C^6**), 57.4 (**C^7**), 54.7 (**C**H_2), 53.7(**C^{11}**), 52.4 (**C**H_2), 19.4 (**C^1**).

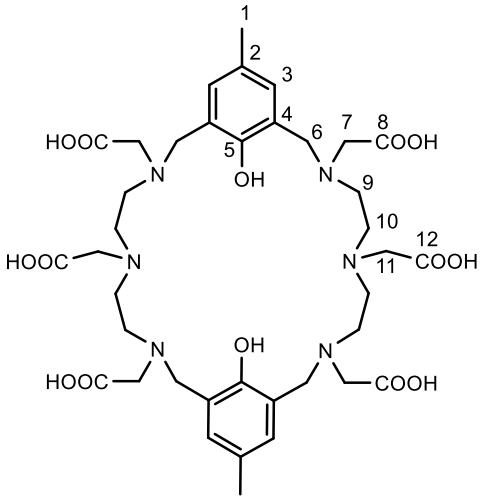
MS (ESI+) m/z (%): 410.1 (100) $[M+H]^+$

HRMS (ESI+) m/z (%): 448.14 (8) $[M+K]^+$, 410.1939 (100) $[M+H]^+$.

HRMS (ESI+) calcd. (found): 410.1927 (453.1939).

Elementary analysis calcd. (found) for $C_{19}H_{27}N_3O_7$ + 3 HCl + 1 H_2O: C 42.51, H 6.01, N 7.83 (C 42.30, H 5.69, N 7.45).

Ligand H_8L_{10}



The hexaester **72** (100 mg, 0.087 mmol) was stirred in a mixture of CH_2Cl_2 (5 mL) and 20 % HCl in water (5 mL) at room temperature for 1 day. The aqueous layer was evaporated under reduced pressure to give $\mathbf{H_8L_{10}}$ in the form of its hydrochloride salt as a beige powder (81 mg, 85 %).

^{1}H NMR (300 MHz, D_2O) δ (ppm): 7.21 (s, 4H, **H^3**), 4.33 (s, 8H, **H^6**), 3.76 (s, 8H, **H^7**), 3.44-3.26 (m, 8H, **H^{10}**), 3.21 (s, 4H, **H^{11}**), 3.11-2.92 (m, 8H, **H^9**), 2.18 (s, 6H, **H^1**).
^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) δ (ppm): 174.2 (**C^{12}**), 170.2 (**C^8**), 152.9 (**C^5**), 135.7 (**C^3**), 131.7 (**C^2**), 118.4 (**C^4**), 55.6 (**C^6**), 55.3 (**C^7**), 53.9 (**C^{11}**), 52.1 (**C**H_2), 49.0 (**C**H_2), 19.3 (**C^1**).
IR (cm^{-1}) KBr pellet: 3405, 3008, 2848, 2575, 1635,1490, 1402, 1205.
HRMS (ESI+) m/z (%): 841.3 (100) $[M+Na]^+$, 819.3 (35) $[M+H]^+$.
HRMS (ESI+) calcd. (found): 819.3776 (819.3807).

4 Synthesis and characterization of Ln(III) complexes

General procedure

To a solution of ligand in H_2O was added $LnCl_3,6H_2O$ (1.1 equiv.). After stirring at room temperature for 1h, pH was adjusted to 5-6 with NaOH 0.1 M and the mixture was then stirred for 16 h at room temperature. The pH was then adjusted to 7 with NaOH 0.1 M, the solvent was evaporated to a minimum and the solution was loaded on a Waters Sep-Pak® cartridge (C_{18}, 10 g). Cartridge was rinsed with H_2O to remove salts and the product was eluted with a H_2O/MeOH 1:1 mixture. The solvents were removed *in vacuo* to give the expected complexes with quantitative yields. The absence of free Ln^{III} ions in these complexes was verified using a classic test with an arsenazo indicator solution.

Characterization

[L_1·Eu]$^-$: UPLC analysis: t_R = 4.21 min (System 1), purity 98%; MS (ESI$^+$): *m/z* 597.0477 ([M+Na+H]$^+$, 37%) and *m/z* 575.0659/573.0643 ([M+2H]$^+$, 100/86%); ESI$^+$/HRMS Calcd for $C_{18}H_{22}N_4O_8Eu$ [M+2H]$^+$: *m/z* = 575.0651 (^{153}Eu) and *m/z* = 573.0636 (^{151}Eu), found: *m/z* = 575.0659 and *m/z* = 573.0643 respectively; UV/Vis λ_{max} (Tris buffer, pH 7.4)/nm: 281 (ε/dm^3.mol^{-1}.cm^{-1} 3 600); Luminescence λ_{em} (Tris buffer, pH 7.4, λ_{ex} = 281 nm)/nm: 580 (relative intensity, corrected spectrum 2.4), 592 (17.8), 615 (41.7), 651 (2.2), 695 (35.9).

[L_1·Gd]$^-$: UPLC analysis: t_R = 4.25 min (System 1), purity 98%; MS (ESI$^+$): *m/z* 602.0502 ([M+Na+H]$^+$, 15%) and *m/z* 580.0685/578.0670 ([M+2H]$^+$, 100/79%); ESI$^+$/HRMS Calcd for $C_{18}H_{22}N_4O_8Gd$ [M+2H]$^+$: *m/z* = 580.0683 (^{158}Gd) and *m/z* = 578.0663 (^{156}Gd), found: *m/z* 580.0685 and *m/z* = 578.0670 respectively; UV/Vis λ_{max} (Tris buffer, pH 7.4)/nm: 282 (ε/dm^3.mol^{-1}.cm^{-1} 3 900).

[L_1·Tb]$^-$: UPLC analysis: t_R = 4.26 min (System 1), purity 98%; MS (ESI$^+$): *m/z* 581.0698 ([M+2H]$^+$, 100%); ESI$^+$/HRMS Calcd for $C_{18}H_{22}N_4O_8Tb$ [M+2H]$^+$: *m/z* = 581.0691, found: *m/z* = 581.0698; UV/Vis λ_{max} (Tris buffer, pH 7.4)/nm: 282 (ε/dm^3.mol^{-1}.cm^{-1} 3

800); Luminescence λ_{em} (Tris buffer, pH 7.4, λ_{ex} = 282 nm)/nm: 489 (relative intensity, corrected spectrum 22.5), 545 (51.3), 585 (17.5), 621 (8.7).

[L$_2$·Eu]$^-$: UPLC analysis: t_R = 3.79 min (System 1), purity 88%; MS (ESI$^-$): *m/z* 601.0797/599.0787 ([M]$^-$, 100/88%); ESI$^-$/HRMS Calcd for $C_{20}H_{24}N_4O_8Eu$ [M]$^-$: *m/z* = 601.0808 (^{153}Eu) and *m/z* = 599.0793 (^{151}Eu), found: *m/z* = 601.0797 and *m/z* = 599.0787 respectively; UV/Vis λ_{max} (Tris buffer, pH 7.4)/nm: 270 (ε/dm^3.mol^{-1}.cm^{-1} 3 900); Luminescence λ_{em} (Tris buffer, pH 7.4, λ_{ex} = 270 nm)/nm: 580 (relative intensity, corrected spectrum 2.5), 592 (16.4), 615 (43.8), 651 (2.3), 695 (35.0).

[L$_2$·Gd]$^-$: UPLC analysis: t_R = 3.88 min (System 1), purity 88%; MS (ESI$^-$): *m/z* 606.0840/60.0817 ([M]$^-$, 100/81%); ESI$^-$/HRMS Calcd for $C_{20}H_{24}N_4O_8Gd$ [M]$^-$: *m/z* = 606.0840 (^{158}Gd) and *m/z* = 604.0820 (^{156}Gd), found: *m/z* 606.0840 and *m/z* = 60.0817 respectively; UV/Vis λ_{max} (Tris buffer, pH 7.4)/nm: 270 (ε/dm^3.mol^{-1}.cm^{-1} 4 400).

[L$_2$·Tb]$^-$: UPLC analysis: t_R = 3.82 min (System 1), purity 88%; MS (ESI$^-$): *m/z* 607.0868 ([M]$^-$, 100%); ESI$^-$/HRMS Calcd for $C_{20}H_{24}N_4O_8Tb$ [M]$^-$: *m/z* = 607.0848, found: *m/z* = 607.0868; UV/Vis λ_{max} (Tris buffer, pH 7.4)/nm: 270 (ε/dm^3.mol^{-1}.cm^{-1} 3 800); Luminescence λ_{em} (Tris buffer, pH 7.4, λ_{ex} = 270 nm)/nm: 489 (relative intensity, corrected spectrum 22.0), 545 (52.3), 585 (17.2), 621 (8.5).

[L$_4$·Eu]$^+$: UPLC analysis: t_R = 3.85 min (System 1), purity 100%; MS (ESI$^+$): *m/z* 558.1234/556.1216 ([M]$^+$, 100/88%); ESI$^+$/HRMS Calcd for $C_{19}H_{27}N_5O_5Eu$ [M]$^+$: *m/z* = 558.1226 (^{153}Eu) and *m/z* = 556.1211 (^{151}Eu), found: *m/z* = 558.1234 and *m/z* = 556.1216 respectively; UV/Vis λ_{max} (Tris buffer, pH 7.4)/nm: 270 (ε/dm^3.mol^{-1}.cm^{-1} 3 800); Luminescence λ_{em} (Tris buffer, pH 7.4, λ_{ex} = 270 nm)/nm: 580 (relative intensity, corrected spectrum 2.5), 592 (17.3), 615 (42.4), 651 (2.5), 695 (35.3).

[L$_4$·Gd]$^+$: UPLC analysis: t_R = 3.91 min (System 1), purity 100%; MS (ESI$^+$): *m/z* 563.1264/561.1244 ([M]$^+$, 100/78%); ESI$^+$/HRMS Calcd for $C_{19}H_{27}N_5O_5Gd$ [M]$^+$: *m/z* = 563.1257 (^{158}Gd) and *m/z* = 561.1238 (^{156}Gd), found: *m/z* = 563.1264 and *m/z* = 561.1244 respectively; UV/Vis λ_{max} (Tris buffer, pH 7.4)/nm: 270 (ε/dm^3.mol^{-1}.cm^{-1} 3 700).

[L$_4$·Tb]$^+$: UPLC analysis: t_R = 3.88 min (System 1), purity 100%; MS (ESI$^+$): *m/z* 564.1276 ([M]$^+$, 100%); ESI$^+$/HRMS Calcd for $C_{19}H_{27}N_5O_5Tb$ [M]$^+$: *m/z* = 564.1266, found: *m/z* = 564.1276; UV/Vis λ_{max} (Tris buffer, pH 7.4)/nm: 270 (ε/dm^3.mol^{-1}.cm^{-1} 4 000);

Luminescence λ_{em} (Tris buffer, pH 7.4, λ_{ex} = 270 nm)/nm: 489 (relative intensity, corrected spectrum 22.2), 545 (51.3), 585 (17.1), 621 (8.4).

L_5·Eu: UPLC analysis: t_R = 5.42 min (System 1), purity > 95%; MS (ESI$^+$): *m/z* 587.0554 ([M+Na]$^+$, 25%) and *m/z* 565.0729/563.0717 ([M+H]$^+$, 60/65%); ESI$^+$/HRMS Calcd for $C_{17}H_{25}N_4O_6PEu$ [M+H]$^+$: *m/z* = 565.0725 (^{153}Eu) and *m/z* = 563.0710 (^{151}Eu), found: *m/z* = 565.0729 and *m/z* = 563.0717 respectively; UV/Vis λ_{max} (Tris buffer, pH 7.4)/nm: 269 (ε/dm^3.mol^{-1}.cm^{-1} 3 600); Luminescence λ_{em} (Tris buffer, pH 7.4, λ_{ex} = 269 nm)/nm: 580 (relative intensity, corrected spectrum 2.5), 592 (17.1), 616 (42.7), 651 (2.4), 696 (35.3).

L_5·Gd: UPLC analysis: t_R = 5.48 min (System 1), purity > 95%; MS (ESI$^+$): *m/z* 592.0587 ([M+Na]$^+$, 8%) and *m/z* 570.0770/568.0748 ([M+H]$^+$, 75/62%); ESI$^+$/HRMS Calcd for $C_{17}H_{25}N_4O_6PGd$ [M+H]$^+$: *m/z* = 570.0757 (^{158}Gd) and *m/z* = 568.0737 (^{156}Gd), found: *m/z* = 570.0770 and *m/z* = 568.0748 respectively; UV/Vis λ_{max} (Tris buffer, pH 7.4)/nm: 269 (ε/dm^3.mol^{-1}.cm^{-1} 3 600).

L_5·Tb: UPLC analysis: t_R = 5.45 min (System 1), purity > 90%; MS (ESI$^+$): *m/z* 593.0590 ([M+Na]$^+$, 52%) and *m/z* 571.0770 ([M+H]$^+$, 100%); ESI$^+$/HRMS Calcd for $C_{17}H_{25}N_4O_6PTb$ [M+H]$^+$: *m/z* = 571.0765, found: *m/z* = 571.0770; UV/Vis λ_{max} (Tris buffer, pH 7.4)/nm: 269 (ε/dm^3.mol^{-1}.cm^{-1} 3 700); Luminescence λ_{em} (Tris buffer, pH 7.4, λ_{ex} = 269 nm)/nm: 490 (relative intensity, corrected spectrum 21.4), 544 (53.1), 585 (17.2), 621 (8.3).

[L_6·Eu]$^-$: UPLC analysis: t_R = 5.30 min (System 1), purity 85%; MS (ESI$^+$): *m/z* 631.0449/629.0434 ([M+Na+H]$^+$, 100/88%) and *m/z* 609.0629/607.0611 ([M+2H]$^+$, 26/23%); ESI$^+$/HRMS Calcd for $C_{18}H_{25}N_4O_8PEu$ [M+2H]$^+$: *m/z* = 609.0624 (^{153}Eu) and *m/z* = 607.0609 (^{151}Eu), found: *m/z* = 609.0629 and *m/z* = 607.0611 respectively; UV/Vis λ_{max} (Tris buffer, pH 7.4)/nm: 281 (ε/dm^3.mol^{-1}.cm^{-1} 4 200); Luminescence λ_{em} (Tris buffer, pH 7.4, λ_{ex} = 281 nm)/nm: 580 (relative intensity, corrected spectrum 2.4), 592 (17.4), 615 (42.0), 651 (2.6), 695 (35.6).

[L_6·Gd]$^-$: UPLC analysis: t_R = 4.95 min (System 1), purity 85%; MS (ESI$^+$): *m/z* 614.0666/612.0645 ([M+2H]$^+$, 100/78%); ESI$^+$/HRMS Calcd for $C_{18}H_{25}N_4O_8PGd$ [M+2H]$^+$: *m/z* = 614.0656 (^{158}Gd) and *m/z* = 612.0636 (^{156}Gd), found: *m/z* 614.0666 and

m/z = 612.0645 respectively; UV/Vis λ_{max} (Tris buffer, pH 7.4)/nm: 282 (ε/dm^3.mol^{-1}.cm^{-1} 4 500).

[L$_6$·Tb]$^-$: UPLC analysis: t_R = 5.30 min (System 1), purity 85%; MS (ESI$^+$): *m/z* 637.0482 ([M+Na+H]$^+$, 7%) and *m/z* 615.0666 ([M+2H]$^+$, 100%); ESI$^+$/HRMS Calcd for $C_{18}H_{25}N_4O_8PTb$ [M+2H]$^+$: *m/z* = 615.0663, found: *m/z* = 615.0666; UV/Vis λ_{max} (Tris buffer, pH 7.4)/nm: 282 (ε/dm^3.mol^{-1}.cm^{-1} 3 900); Luminescence λ_{em} (Tris buffer, pH 7.4, λ_{ex} = 282 nm)/nm: 489 (relative intensity, corrected spectrum 21.3), 545 (53.1), 585 (17.5), 621 (8.1).

L$_7$·Eu: UPLC analysis: t_R = 3.85 min (System 1), purity 100%; MS (ESI$^-$): *m/z* 783.1/781.1 ([M-H]$^-$, 92/73%); UV/Vis λ_{max} (Tris buffer, pH 7.4)/nm: 264 (ε/dm^3.mol^{-1}.cm^{-1} 9 800), 291 (11 200), 344 (13 400); Luminescence λ_{em} (Tris buffer, pH 7.4, λ_{ex} = 344 nm)/nm: 578 (relative intensity, corrected spectrum 1.3), 592 (18.4), 615 (41.7), 650 (2.8), 694 (35.8).

L$_7$·Gd: UPLC analysis: t_R = 3.86 min (System 1), purity 100%; MS (ESI$^-$): *m/z* 563.0778/561.0756 ([M-H]$^-$, 100/79%); UV/Vis λ_{max} (Tris buffer, pH 7.4)/nm: 264 (ε/dm^3.mol^{-1}.cm^{-1} 10 100), 291 (11 800), 344 (14 300); Fluorescence λ_{em} (Tris buffer, pH 7.4, λ_{ex} = 344 nm) nm: 471; Phosphorescence λ_{em} (éthanol/méthanol 4:1, 77 K, pH 7.4, λ_{ex} = 344 nm) nm: 487;

L$_7$·Tb: UPLC analysis: t_R = 3.86 min (System 1), purity 100%; MS (ESI$^-$): *m/z* 564.0800 ([M-H]$^-$, 100%); UV/Vis λ_{max} (Tris buffer, pH 7.4)/nm: 264 (ε/dm^3.mol^{-1}.cm^{-1} 10 100), 291 (11 700), 344 (14 000); Luminescence λ_{em} (Tris buffer, pH 7.4, λ_{ex} = 344 nm)/nm: 490 (relative intensity, corrected spectrum 22.5), 545 (51.0), 585 (17.8), 621 (8.7).

L$_8$·Eu: UPLC analysis: t_R = 4.12 min (System 1), purity 95%; MS (ESI$^+$): *m/z* 669.0953/667.0937 ([M+Na]$^+$, 42/35%), *m/z* 647.1132/645.1113 ([M+H]$^+$, 100/85%) and *m/z* 324.0602/323.0597 ([M+2H]$^{2+}$, 58/48%); ESI$^+$/HRMS Calcd for $C_{24}H_{26}N_6O_6Eu$ [M+H]$^+$: *m/z* = 647.1128 (^{153}Eu) and *m/z* = 645.1112 (^{151}Eu), found: *m/z* = 647.1132 and *m/z* = 645.1113 respectively; UV/Vis λ_{max} (Tris buffer, pH 7.4)/nm: 322 (ε/dm^3.mol^{-1}.cm^{-1} 14 800); Luminescence λ_{em} (Tris buffer, pH 7.4, λ_{ex} = 322 nm)/nm: 580 (relative intensity, corrected spectrum 2.2), 592 (14.6), 616 (48.8), 651 (2.5), 696 (31.1).

L$_8$·Gd: UPLC analysis: t_R = 4.14 min (System 1), purity 95%; MS (ESI$^+$): *m/z* 674.0984/672.0965 ([M+Na]$^+$, 41/32%), *m/z* 652.01163/650.1143 ([M+H]$^+$, 100/77%)

and *m/z* 326.5624/326.0637 ([M+2H]$^{2+}$, 75/64%); ESI$^+$/HRMS Calcd for $C_{24}H_{26}N_6O_6Gd$ [M+H]$^+$: *m/z* = 652.1160 (^{158}Gd) and *m/z* = 650.1141 (^{156}Gd), found: *m/z* = 652.01163 and *m/z* = 650.1143 respectively; UV/Vis λ_{max} (Tris buffer, pH 7.4)/nm: 322 (ε/dm^3.mol^{-1}.cm^{-1} 14 400); Fluorescence λ_{em} (Tris buffer, pH 7.4, λ_{ex} = 322 nm) nm: 414; Phosphorescence λ_{em} (éthanol/méthanol 4:1, 77 K, pH 7.4, λ_{ex} = 322 nm) nm: 496;

L$_8$·Tb: UPLC analysis: t_R = 4.14 min (System 1), purity 95%; MS (ESI$^+$): *m/z* 653.1179 ([M+H]$^+$, 55%) and *m/z* 327.0627 ([M+2H]$^{2+}$, 100%); ESI$^+$/HRMS Calcd for $C_{24}H_{26}N_6O_6Tb$ [M+H]$^+$: *m/z* = 653.1167, found: *m/z* = 653.1179; UV/Vis λ_{max} (Tris buffer, pH 7.4)/nm: 322 (ε/dm^3.mol^{-1}.cm^{-1} 14 600); Luminescence λ_{em} (Tris buffer, pH 7.4, λ_{ex} = 322 nm)/nm: 490 (relative intensity, corrected spectrum 20.1), 545 (51.5), 585 (18.8), 621 (9.6).

[L$_9$·Eu]$^-$: UPLC analysis: t_R = 3.43 min (System 1); MS (ESI$^-$): *m/z* 558.0756/556.0742 ([M]$^-$, 100/89%); ESI$^-$/HRMS Calcd for $C_{19}H_{23}N_3O_7Eu$ [M]$^-$: *m/z* = 558.0748 (^{153}Eu) and *m/z* = 556.0734 (^{151}Eu), found: *m/z* = 558.0756 and *m/z* = 556.0742 respectively; UV/Vis λ_{max} (Tris buffer, pH 7.4)/nm: 245 (ε/dm^3.mol^{-1}.cm^{-1} 7 680), 296 (3 650); Luminescence λ_{em} (Tris buffer, pH 7.4, λ_{ex} = 296 nm)/nm: 592 (relative intensity, corrected spectrum 0.3), 616 (50.2), 652 (1.7), 698 (31.5).

[L$_9$·Gd]$^-$: UPLC analysis: t_R = 4.95 min (System 1); MS (ESI$^-$): *m/z* 563.0778/561.0756 ([M]$^-$, 100/79%); ESI$^-$/HRMS Calcd for $C_{19}H_{23}N_3O_7Gd$ [M]$^-$: *m/z* = 563.0782 (^{158}Gd) and *m/z* = 561.0762 (^{156}Gd), found: *m/z* = 563.0778 and *m/z* = 561.0756 respectively; UV/Vis λ_{max} (Tris buffer, pH 7.4)/nm: 245 (ε/dm^3.mol^{-1}.cm^{-1} 5 960), 296 (2 810); Fluorescence λ_{em} (Tris buffer, pH 7.4, λ_{ex} = 296 nm) nm: 338; Phosphorescence λ_{em} (Tris buffer/glycerol 4:1, 77 K, pH 7.4, λ_{ex} = 296 nm) nm: 405;

[L$_9$·Tb]$^-$: UPLC analysis: t_R = 5.30 min (System 1); MS (ESI$^-$): *m/z* 564.0800 ([M]$^-$, 100%); ESI$^-$/HRMS Calcd for $C_{19}H_{23}N_3O_7Tb$ [M]$^-$: *m/z* = 564.0789, found: *m/z* = 564.0800; UV/Vis λ_{max} (Tris buffer, pH 7.4)/nm: 245 (ε/dm^3.mol^{-1}.cm^{-1} 6 480), 296 (2 980); Luminescence λ_{em} (Tris buffer, pH 7.4, λ_{ex} = 296 nm)/nm: 489 (relative intensity, corrected spectrum 28.4), 545 (53.8), 585 (12.6), 621 (5.2).

[L$_{10}$.Eu$_2$]$^{2-}$: UPLC analysis: t_R = 4.09 min (System 2); MS (ESI$^-$): *m/z* 1137.2 ([M+Na]$^-$, 100%) and *m/z* 1115.3 ([M+H]$^-$, 27%); UV/Vis λ_{max} (Tris buffer, pH 7.4)/nm: 242

(ε/dm^3.mol^{-1}.cm^{-1} 15 250), 295 (6 390); Luminescence λ_{em} (Tris buffer, pH 7.4, λ_{ex} = 296 nm)/nm: 593 (relative intensity, corrected spectrum 16.4), 617 (46.7), 652 (3.3), 697 (33.6).

[L$_{10}$.Gd$_2$]$^{2-}$: UPLC analysis: t_R = 4.05 min (System 2); MS (ESI$^-$): *m/z* 1149.1470 ([M+Na]$^-$, 91%), *m/z* 1127.1650 ([M+H]$^-$, 100%) and *m/z* 563.0786 ([M]$^{2-}$, 93%); ESI$^-$/HRMS Calcd for $C_{38}H_{46}N_6O_{14}Gd$ [M]$^{2-}$: *m/z* = 563.0786 (^{158}Gd), found: *m/z* = 563.0791; UV/Vis λ_{max} (Tris buffer, pH 7.4)/nm: 242 (ε/dm^3.mol^{-1}.cm^{-1} 15 790), 296 (6 740); Fluorescence λ_{em} (Tris buffer, pH 7.4, λ_{ex} = 296 nm) nm: 329; Phosphorescence λ_{em} (Tris buffer/glycerol 4:1, 77 K, pH 7.4, λ_{ex} = 296 nm) nm: 419;

[L$_{10}$.Tb$_2$]$^{2-}$: UPLC analysis: t_R = 2.88 min (System 2); MS (ESI$^-$): *m/z* 1129.1636 ([M+H]$^-$, 47%) and 564.0796 ([M]$^{2-}$, 100%); ESI$^-$/HRMS Calcd for $C_{38}H_{46}N_6O_{14}Tb_2$ [M]$^{2-}$: *m/z* = 564.0789, found: *m/z* = 564.0796; UV/Vis λ_{max} (Tris buffer, pH 7.4)/nm: 242 (ε/dm^3.mol^{-1}.cm^{-1} 16 850), 296 (6 920); Luminescence λ_{em} (Tris buffer, pH 7.4, λ_{ex} = 296 nm)/nm: 490 (relative intensity, corrected spectrum 19.9), 545 (53.7), 585 (14.5), 622 (8.1), 638-700 (3.8).

Complexe	m/z theorical	m/z observed	Attribution
[L_1.**Eu**]Na	573,0495	573,0497	$[(H_4L_1 - 3H)Eu - H]^-$
[L_1.**Gd**]Na	578,0522	578,0518	$[(H_4L_1 - 3H)Gd - H]^-$
[L_1.**Tb**]Na	579,0535	579,0540	$[(H_4L_1 - 3H)Tb - H]^-$
[L_2.**Eu**]Na	601,0808	601,0797	$[(H_4L_2 - 3H)Eu - H]^-$
[L_2.**Gd**]Na	606,0840	606,0840	$[(H_4L_2 - 3H)Gd - H]^-$
[L_2.**Tb**]Na	607,0848	607,0868	$[(H_4L_2 - 3H)Tb - H]^-$
[L_4.**Eu**]Cl	558,1226	558,1234	$[(H_2L_4 - 2H)Eu]^+$
[L_4.**Gd**]Cl	563,1257	563,1264	$[(H_2L_4 - 2H)Gd]^+$
[L_4.**Tb**]Cl	564,1266	564,1276	$[(H_2L_4 - 2H)Tb]^+$
[$L_5^{\#}$.**Eu**]Cl	593,1038	593,1032	$[(H_2L_5^{\#} - 2H)Eu]^+$
[$L_5^{\#}$.**Tb**]Cl	599,1078	599,1086	$[(H_2L_5^{\#} - 2H)Tb]^+$
L_5.**Eu**	443,2059	443,2063	$[(H_3L_5 - 3H)Eu + H]^+$
L_5.**Gd**	593,1038	593,1032	$[(H_3L_5 - 3H)Gd + H]^+$
L_5.**Tb**	599,1078	599,1086	$[(H_3L_5 - 3H)Tb + H]^+$
[L_6.**Eu**]Na	609,0624	609,0629	$[(H_4L_6 - 3H)Eu - H]^-$
[L_6.**Gd**]Na	614,0656	614,0666	$[(H_4L_6 - 3H)Gd - H]^-$
[L_6.**Tb**]Na	615,0663	615,0666	$[(H_4L_6 - 3H)Tb - H]^-$
L_7.**Eu**	-	783,1	$[(H_3L_7 - 3H)Eu - H]^-$
L_7.**Gd**	-	788,1	$[(H_3L_7 - 3H)Gd - H]^-$
L_7.**Tb**	-	789,1	$[(H_3L_7 - 3H)Tb - H]^-$
L_8.**Eu**	647,1128	647,1132	$[(H_3L_8 - 3H)Eu + H]^+$
L_8.**Gd**	652,1160	652,1163	$[(H_3L_8 - 3H)Gd + H]^+$
L_8.**Tb**	653,1167	653,1179	$[(H_3L_8 - 3H)Tb + H]^+$
[L_9.**Eu**]Na	560,0906	560,0914	$[(H_4L_9 - 3H)Eu - H]^-$
[L_9.**Gd**]Na	563,0782	563,0778	$[(H_4L_9 - 3H)Gd - H]^-$
[L_9.**Tb**]Na	564,0789	564,0800	$[(H_4L_9 - 3H)Tb - H]^-$
[L_{10}.**Eu_2**]Na_2	-	1137,2	$[(H_8L_{10} - 6H)2Eu + H]^-$
[L_{10}.**Gd_2**]Na_2	1127,1650	1127,1626	$[(H_8L_{10} - 6H)2Gd - H]^-$
	563,0786	563,0791	$[(H_8L_{10} - 6H)2Gd - 2H]^{2-}$
[L_{10}.**Tb_2**]Na_2	1129,1658	1129,1636	$[(H_8L_{10} - 6H)2Tb - H]^-$
	564,0789	564,0794	$[(H_8L_{10} - 6H)2Tb - 2H]^{2-}$

5 Relaxometric experiments

Determination of Gd(III) concentration

In these experiments, the exact Gd(III) concentration of solutions was determined by proton relaxivity measurements at 0.47 T and 37 °C after mineralization in concentrated HNO_3. For this purpose, 150 µl of an aqueous solution of Gd(III) complex is added to 150 µL of pure nitric acid (>90%). The exact free Gd(III) concentration is then determined by the equation :

$$[\mathrm{Gd(III)}] = \frac{R_1^p - 0.364}{11.76}$$

where

- 0.364 s^{-1} is the diamagnetic contribution of the proton water relaxation for a 1:1 H_2O/HNO_3 mixture,
- 11.76 $s^{-1}.mM^{-1}$ is the relaxivity of free Gd(III) in aqueous solution.

Arsenazo test

Arsenazo colorimetric test is performed before using any Ln(III) complex solution to check the absence of free Ln(III) ions. For this purpose, 1 mg of the Ln(III) complex is dissolved in a solution of 0.5 mL of acetate buffer (pH = 4.5 – 5) and one drop of pyridine 99 %. One drop of arsenazo solution ([Arsenazo] = 0 – 10 % m/v) is then added and the colour visually checked.

The ^{17}O transverse relaxation times were measured using the standard Carr-Purcell-Meiboom-Gill spin-echo pulse sequence on 0.35 mL samples contained in 5 mm o.d. tubes on a Bruker Avance 500 spectrometer. The temperature was regulated by air or nitrogen flow controlled by a Bruker BVT 3200 unit.

Proton nuclear magnetic relaxation dispersion (NMRD) profiles were recorded over a magnetic field range from 0.015 to 40 MHz on a Stelar Spinmaster FFC fast field cycling NMR relaxometer. Measurements were performed at 310 K on 0.6 mL of solutions contained in 10 mm o.d. Pyrex tubes. Additional relaxation rates at 20 and 60 MHz were obtained on a Bruker Minispec mq20 and a Bruker Minispec mq60, respectively.

Transmetallation by Zn(II) ions was evaluated from the decrease in the water proton longitudinal relaxation at 310 K and 20 MHz (Minispec mq20) of buffered solutions (pH 7, phosphate buffer: $[KH_2PO_4]$ = 26 mM, $[Na_2HPO_4]$ = 41 mM) containing the Gd^{III} complex (2.5 mM) and $ZnCl_2$ (2.5 mM).

6 Photophysical experiments

Absorption measurements were done with a Hewlett Packard 8453 temperature-controlled spectrometer in 10 mm quartz cuvette.

Emission, excitation spectra and luminescence decays at room temperature of lanthanide complexes were measured using a Cary Eclipse spectrofluorimeter equipped with a Xenon flash lamp source and a Hamamatsu R928 photomultiplier. At liquid-nitrogen temperature, a LS-50B Perkin-Elmer spectrofluorimeter equipped with a Xenon flash lamp source, a Hamamatsu R928 photomultiplier and the low-temperature accessory n^{o} L2250136 was used. Excitation spectra were corrected for the excitation light intensity, while emission spectra were corrected for the instrument response.

Lifetimes τ (uncertainty $\leq$ 5 %) are made by monitoring the decay at a wavelength corresponding to the maximum intensity of the emission spectrum, following pulsed excitation. They are the average values from at least five separate measurements covering two or more lifetimes. The luminescence decay curves were fitted by an equation of the form $I(t) = I(0).\exp(-t/\tau)$ by using a curve-fitting program.

Quantum yields were determined by a comparative method with a standard reference; estimated experimental errors for quantum yield determination are $\pm$ 10 %. They were calculated by using the following equation:

$$\Phi = \Phi_{st}\left(\frac{DO_{st}}{DO}\right)\left(\frac{S}{S_{st}}\right)\left(\frac{{n_x}^2}{n^2}\right)$$

where DO, S, n denote the absorbance at the excitation wavelength (λ), the integrated luminescence intensity, and the refractive index of solvent, respectively. Subscript "st" denotes the reference, and no subscript denotes the unknown sample. Quinine sulfate in 1N sulfuric acid (Φ = 54,6 %)[9] were used as standards for Tb complexes and $[Ru(bpy)_3]Cl_2$ (Φ = 4 % in water)[10] for Eu complexes.

7 References

[1] Nasso, I.; Galaup, C.; Havas, F.; Tisnès, P.; Picard, C.; Laurent, S.; Elst, L. Vander; Muller, R. N. *Inorg. Chem.* **2005**, *44* (23), 8293.

[2] Froidevaux, P.; Harrowfield, J. M.; Sobolev, A. N. *Inorg. Chem.* **2000**, *39* (21), 4678.

[3] Izatt, R. M.; Bradshaw, J. S.; Colter, M. L.; Nakatsuji, Y.; Spencer, N. O.; Brown, M. F.; Arena, G.; Tse, P. K.; Wilson, B. E.; Lamb, J. D.; Dailey, N. K.; Morin, F. G.; Grant, D. M. *J. Org. Chem.* **1985**, *50* (24), 4865.

[4] Bradshaw, J. S.; Nakatsuji, Y.; Huszthy, P.; Wilson, B. E.; Dalley, N. K.; Izatt, R. M. *J. Heterocycl. Chem.* **1986**, *23* (2), 353.

[5] Horváth, G.; Rusa, C.; Köntös, Z.; Gerencsér, J.; Huszthy, P. *Synth. Commun.* **1999**, *29*, 3719.

[6] Popoff, I. C.; Huber, L. K.; Block, B. P.; Morton, P. D.; Riordan, R. P. *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 2898.

[7] Kálmán, F. K.; Woods, M.; Caravan, P.; Jurek, P.; Spiller, M.; Tircsó, G.; Király, R.; Brücher, E.; Sherry, A. D. *Inorg. Chem.* **2007**, *46* (13), 5260.

[8] Trost, B. M.; Yeh, V. S. C.; Ito, H.; Bremeyer, N. *Org. Lett.* **2002**, *4* (16), 2621.

[9] Meech, S. R.; Phillips, D. *J. Photochem.* **1983**, *23* (2), 193.

[10] Ishida, H.; Tobita, S.; Hasegawa, Y.; Katoh, R.; Nozaki, K. *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254* (21–22), 2449.

CONCLUSION GENERALE

Les travaux de recherche présentés dans ce mémoire concernent la synthèse et l'étude de complexes d'ions lanthanide susceptibles de présenter un intérêt en tant qu'agent de contraste pour l'IRM ou en tant que fluorophore pour l'imagerie optique.

L'examen des données de la littérature a permis de dégager comme source d'intérêt le ligand PCTA[12]. Ce chélateur est caractérisé par des constantes de stabilité vis-à-vis des ions M^{2+} et M^{3+} supérieures à 10^{18} en milieu aqueux et des vitesses de complexation élevées à température ambiante. Sa structure heptadentate permet la formation de complexes Ln(III) possédant deux molécules d'eau coordinées au métal, (facteur favorable pour les propriétés relaxométriques des complexes de gadolinium), et présente un chromophore pyridine intracyclique (facteur favorable pour la photosensibilisation des ions europium et terbium). Le ligand PCTA[12] et ses dérivés ont également été utilisés comme vecteurs en imagerie nucléaire avec les ions ^{111}In, ^{64}Cu ou ^{69}Ga, ou en radiothérapie avec les ions ^{90}Y et ^{177}Lu. Ce ligand parait donc tout à fait approprié pour des approches d'imagerie bimodale ou de type théranostique.

Dans un premier temps, et sur la base de travaux précédents effectués au sein de l'équipe, la synthèse multi-étape du ligand PCTA[12] a été reconsidérée. La nouvelle méthodologie mise au point est basée sur l'utilisation d'une triamine incorporant trois fonctions acide acétique protégées sous forme d'esters en tant que synthon pivot. Lors de la synthèse de cet intermédiaire, la protection des fonctions acide ne peut être effectuée que par des groupements ester de *tertio*-butyle, puisque l'utilisation de fonctions ester de méthyle conduit, de manière prépondérante, à des réactions parasites de cyclisation intramoléculaire.

Une étude approfondie a d'autre part été menée sur l'étape clé de cette méthodologie, à savoir la réaction de macrocyclisation. Lors de cette réaction, l'influence des dérivés bis-électrophiles et de diverses bases inorganiques et

organiques a été évaluée. En raison de la présence d'un effet de matrice lié à l'ion alcalin, le résultat le plus concluant a été obtenu par l'association du dérivé dibromé/carbonate de sodium, conduisant à un excellent rendement de macrocyclisation de 87 %. Cet effet « template » a, de plus, été mis en évidence par des analyses RMN ^{1}H et ^{13}C et confirmé par la structure cristallographique du complexe de sodium. Cette nouvelle approche conduit à un rendement global de 64 % en ligand PCTA[12], rendement pouvant favorablement se comparer à ceux obtenus par les voies classiques décrites dans la littérature (26 – 36 %).

Ce schéma de synthèse a ensuite permis d'accéder à six dérivés bifonctionnels du PCTA[12] et d'élargir ses champs d'applications. Les dérivés synthétisés présentent une fonction réactive soit en position para du noyau pyridine (fonctions phenol, ester de méthyle, aromatique ou hydroxyméthyle), soit au niveau de la chaîne latérale centrale (fonctions acide carboxylique aliphatique ou amine aromatique, précurseur d'une fonction isothiocyanate).

Les deux outils de synthèse présentés devraient permettre de développer d'autres ligands bifonctionnels dérivés du PCTA[12], intégrant dans leur structure des fonctions complexantes autres que des fonctions acide carboxylique ou différents chromophores basés sur le noyau pyridine.

Des études relaxométriques et de fluorescence réalisées sur les complexes de gadolinium et d'europium ont montré que l'introduction de ces fonctions réactives n'induisait pas de modification au niveau de la sphère de coordination du métal, et permettait la conservation des deux molécules d'eau en première sphère de coordination de l'ion lanthanide.

Le complexe bifonctionnel L_2.**Gd**, du fait de sa charge globale négative et de son poids moléculaire plus élevé, présente une relaxivité r_1 supérieure à celle du PCTA[12] ainsi qu'un temps de résidence τ_M des molécules d'eau coordinées plus court, et ce d'un facteur de 1,2 pour ces deux paramètres.

Bien que non décrits dans ce mémoire, des résultats préliminaires ont montré que les complexes d'europium L_1.**Eu** et L_2.**Eu** présentant une fonction acide carboxylique aromatique ou aliphatique sont aptes à des réactions de conjugaison. Ces premiers essais ont été réalisés sur des particules de silice possédant des fonctions amine primaire terminales avec des rendements de couplage de l'ordre de 20 %. Nous avons également établi que ces conjugués L.**Eu**@silice possédaient des propriétés de fluorescence similaires à celles des complexes L.**Eu**, traduisant l'absence de modification de la sphère de coordination du métal une fois le complexe conjugué.

Dans la suite de l'étude et en faisant appel au même schéma de synthèse, des modifications structurales du ligand PCTA[12] ont été réalisées afin d'étudier leurs influences sur les propriétés relaxométriques des complexes Gd(III) correspondants. Une fonction amide ainsi qu'une fonction acide phosphinique sur la chaîne latérale centrale du squelette PCTA[12] ont ainsi été introduites. La substitution d'une fonction acide par une fonction amide ne se traduit pas par une grande variation des paramètres r_1 et τ_M. Dans le cas des complexes Gd(III) à fonction phosphinate, une variation de la relaxivité en fonction de la concentration en complexe a été observée, suggérant des associations intermoléculaires en solution. Le couplage de ce complexe à une macromolécule devrait permettre de réduire ce type d'interactions.

Dans le but d'accéder à une imagerie bimodale de type relaxométrie/fluorescence basée sur des complexes Gd(III)/Eu(III) ou Gd(III)/Tb(III), les propriétés de fluorescence des complexes Eu(III) et Tb(III) du PCTA[12] ont tenté d'être améliorées. Pour ce faire, plusieurs nouveaux ligands ont été développés.

L'introduction, dans la structure du PCTA[12], d'un motif carbostyrile-CF_3 en tant que chromophore efficace n'a pas conduit à des résultats probants en raison de la supposée présence d'états LMCT pour le complexe d'europium, et de transfert d'énergie en retour pour le complexe de terbium. L'augmentation de conjugaison du noyau pyridine par un motif benzimidazole a, quant à lui, permis d'optimiser les propriétés de fluorescence du complexe PCTA[12].**Eu**. Dans le cas du complexe d'europium, la longueur d'onde d'excitation (λ_{exc} = 322 nm) se situe dans la gamme de longueur d'onde des sources utilisées pour les tests biologiques (310 – 350 nm). De

plus, les valeurs du rendement quantique de fluorescence (Φ = 9,2 %) et du coefficient d'extinction molaire (ε = 14 800 $M^{-1}.cm^{-1}$) en milieu aqueux permettent d'atteindre une brillance (B = Φ × ε) de 1 350 $M^{-1}.cm^{-1}$ à une longueur d'onde d'excitation de 322 nm. L'une des suites de ces travaux consiste en l'introduction d'un groupement solubilisant (de type sulfonate ou ammonium) au niveau du chromophore benzimidazole afin d'améliorer la solubilité du complexe Gd(III) correspondant en milieu aqueux, et de pouvoir disposer d'une sonde relaxométrique et luminescente. D'autres groupements tels que les motifs phénylacétylène ou diméthoxyphényle peuvent également être envisagés pour l'extension du noyau pyridine.

La dernière modification a consisté en la substitution du noyau pyridine du ligand PCTA[12] par un noyau phénol, où une amélioration conséquente des propriétés relaxométriques et fluorescentes des complexes Gd(III) et Tb(III) correspondants a pu être mise en évidence.

En plus de présenter une relaxivité à 20 MHz légèrement plus élevée que celle du complexe PCTA[12].**Gd**, le complexe Gd(III) dérivé du ligand à fonction phénol présente surtout une vitesse d'échange entre les molécules d'eau coordinées au métal et les molécules du milieu environnant (k_{ex} = 322.10^6 s^{-1} à 310 K) qui lui est 27 fois supérieure. Cette valeur de k_{ex} est dans la gamme des valeurs requises pour atteindre des relaxivités très élevées une fois le chélate lié à une structure macromoléculaire. Le complexe Tb(III) correspondant est caractérisé par un rendement quantique de fluorescence élevé en milieu aqueux (Φ = 22 % contre 8,3 % pour PCTA[12].**Tb**) et un déplacement vers le rouge de 27 nm de la longueur d'onde d'excitation. De plus, les études de relaxométrie et de fluorescence ont permis de montrer que ces complexes sont insensibles à des réactions de transmétallation (notamment vis-à-vis des ions Zn^{2+}) ou au remplacement des molécules d'eau présentes en première sphère de coordination par des dianions biologiques (citrate, carbonate, phosphate). Il est à noter que ce dernier processus d'échange est présent dans la plupart des complexes Gd(III) bis-hydratés décrits dans la littérature et constitue un handicap sérieux au niveau des applications en imagerie.

Lors de la synthèse de ce macrocycle à fonction phénol intracyclique à 12 chaînons, le macrocycle dimère à 24 chaînons correspondant a également été isolé. Les complexes Ln(III) binucléaires de ce ligand ne possèdent pas de molécules d'eau coordinées au métal du fait du pontage des deux ions lanthanide par chaque unité phénolate. Cette caractéristique a permis d'obtenir une durée de vie d'émission de 2 ms et un rendement quantique d'émission de 43 % en milieu aqueux pour le complexe de terbium. Ce complexe constitue le second exemple de complexes binucléaires macrocycliques décrits pour leurs propriétés de fluorescence en milieu aqueux. Il constitue un point de départ pour une nouvelle famille de fluorophores pouvant fonctionner en milieu biologique, à condition d'étendre la conjugaison des noyaux phénol afin d'atteindre des longueurs d'onde d'excitation plus adéquates.

New perspectives for lanthanide complexes derived from the PCTA[12] scaffold: Synthesis, photophysical and relaxometric properties

The PCTA[12] ligand is a 12-membered macrocycle containing an intracyclic pyridine ring and three amino acid acetic groups in its structure, and is an interesting alternative to traditional ligands such as DTPA, NOTA or DOTA for biomedical imaging applications. Its potential to act as a contrast agent for MRI has already been reported, and some of its derivatives have been successfully evaluated for optical or nuclear imaging. Because of these encouraging results, the synthesis of families of derivatives of the PCTA[12] ligand has been undertaken in order to improve the properties of their derived Ln (III) complexes (Ln = Eu, Gd, Tb).

At first, the multi-step synthesis of PCTA[12] was reconsidered and able to reach an overall yield of 64% ligand against a maximum yield of 36% for conventional methodologies. The strategy developed was subsequently used to synthesize acetate/amide or acetate/phosphinate mixed-function ligands, but also chelating bifunctional ligands bearing hydroxyl, ester, carboxylic acid, hydroxymethyl or amine functions. The introduction of carbostyril or benzimidazole chromophores at the *para*-position of the pyridine moiety has been carried out and an improvement in the photophysical properties was observed in the case of the benzimidazole europium complex (λ_{ex} = 322 nm and Φ = 9.2%). The last modification consisted in the substitution of the pyridine moiety of the PCTA[12] ligand by a phenol core. The synthesis of the desired compound leads to the formation of the corresponding dimer. A consequent improvement of the relaxometric (r_1 = 5.7 $s^{-1}.mM^{-1}$ and τ_M = 3.1 ns) and fluorescence (Φ = 22%) properties of the Gd(III) and Tb(III) complexes of the monomeric form has been demonstrated. The terbium complex of the dimeric macrocycle has, for its part, made it possible to obtain an excellent fluorescence quantum yield of 43% in aqueous medium.

Key words: imaging, macrocyclic complexes, lanthanide, relaxometry, luminescence

Nouvelles perspectives pour les complexes de lanthanides dérivés du squelette PCTA[12] : Synthèse, propriétés photophysiques et relaxométriques

Le ligand PCTA[12], un macrocycle à 12 chaînons intégrant dans sa structure un noyau pyridine intracyclique et trois groupements aminoacide acétique, constitue une alternative intéressante aux ligands traditionnels tels que le DTPA, le NOTA ou le DOTA pour des applications en imagerie biomédicale. Sa potentialité à agir comme agent de contraste pour l'IRM a déjà été reportée, et certains de ses dérivés ont été évalués avec succès pour l'imagerie optique ou nucléaire. En raison de ces résultats encourageants, la synthèse de familles de dérivés du ligand PCTA[12] a été entreprise en vue de l'amélioration des propriétés des différents complexes Ln(III) (Ln = Eu, Gd, Tb) qui leurs sont issus.

Dans un premier temps, la synthèse multi-étape du PCTA[12] a été reconsidérée et a permis d'atteindre un rendement global de 64% en ligand contre un rendement maximum de 36% pour les méthodologies classiques. La stratégie développée a, par la suite, été employée à la synthèse de ligands à fonctions mixtes acétate/amide ou acétate/phosphinate, mais également de ligands bifonctionnels chélatants porteurs de fonctions hydroxyle, ester, acide carboxylique, hydroxyméthyle ou amine. L'introduction de groupements chromophores de type carbostyrile et benzimidazole en position *para* de la pyridine a pu être réalisée et une amélioration des propriétés photophysiques a été observée dans le cas du complexe d'europium à motif benzimidazole (λ_{ex} = 322 nm et Φ = 9,2%). La dernière modification a consisté en la substitution du noyau pyridine du ligand PCTA[12] par un noyau phénol. La synthèse du composé désiré conduit à la formation conjointe du dimère correspondant. Une amélioration conséquente des propriétés relaxométriques (r_1 = 5,7 $s^{-1}.mM^{-1}$ et τ_M = 3,1 ns) et fluorescentes (Φ = 22%) des complexes Gd(III) et Tb(III) de la forme monomère a été mise en évidence. Le complexe de terbium du macrocycle dimère analogue a, quant à lui, permis l'obtention d'un excellent rendement quantique de fluorescence de 43% en milieu aqueux.

Mots clés : imagerie, complexes macrocycliques, lanthanide, relaxométrie, luminescence