HAL
open science

Etude des propriétés de coordination du 64Cu par de nouveaux chélateurs acycliques de type polyaminophosphonate à fort potentiel en imagerie médicale

Sabah Abada

To cite this version:

Sabah Abada. Etude des propriétés de coordination du 64Cu par de nouveaux chélateurs acycliques de type polyaminophosphonate à fort potentiel en imagerie médicale. Autre. Université de Strasbourg, 2013. Français. NNT : 2013STRAF023 . tel-00997535

HAL Id: tel-00997535

https://theses.hal.science/tel-00997535v1

Submitted on 28 May 2014

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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Discipline : **Chimie**

Etude des propriétés de coordination du ^{64}Cu par de nouveaux chélateurs acycliques de type polyaminophosphonate à fort potentiel en imagerie médicale

Présentée et soutenue publiquement par

Sabah ABADA

Le 23 September 2013

Dr. Pascale DELANGLE	CEA Grenoble	Rapporteur externe
Prof. Josef HAMACEK	Université Orléans	Rapporteur externe
Dr. Gilles MONTAVON	Université de Nantes	Examinateur
Dr. Jean WEISS	Université de Strasbourg	Examinateur
Dr. Mourad ELHABIRI	Université de Strasbourg	Examinateur
Dr. Loïc CHARBONNIÈRE	CNRS Strasbourg	Directeur de thèse

A ma fille

Remerciement

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit à été réalisé au Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire Appliquée à l'Analyse (LIMAA) situé à l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC), université de Strasbourg.

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse le Dr. Loïc CHARBONNIÈRE de m'avoir accueilli au sein de son équipe. Merci de m'avoir guidé et épaulé tout au long de ma thèse. Grace à tes connaissance scientifique très riche, ta disponibilité et enthousiasme qui mon permet de mener à bien cette thèse.

Mes profonds remerciements s'adressent au Dr Mourad ELHABIRI pour sa grande contribution à ces travaux de thèse et de m'avoir fait partager son immense connaissance de la physico-chimie. Les innombrables discussions que nous avons partagées ont toujours été très enrichissantes. Merci pour le temps que tu m'as consacré, pour ta patience et ta disponibilité.

Je remercie également les membres de jury le Dr. Pascale DELANGLE, le Pr. Josef HAMACEK, le Dr. Gilles MONTAVON et le Dr. Jean WEISS qui me font l'honneur d'examiner mon travail de thèse.

Je tiens à remercier le Pr. Carlos Platas-Iglesias pour les calculs de DFT, le Dr. Isabelle Déchamps-Olivier pour les mesures RPE, le Dr. Marinella MAZZANTI et le Pr. Maura BOTTA pour les mesures de la relaxivité.
Je remercie également le Pr. Laurence SABATIER avec qui j'ai eu l'honneur de travailler pour les réactions de marquage de l'anticorps RAM1. Un grand merci aux Dr. David BRASSE et Dr. Ali OUADI pour les images SPECT et le Pr. Philipe CHOQUET pour les images IRM. Sans oublier Mattieu CHESSE pour la spectrométrie de masse des complexes métalliques.

Merci a touts les membres du laboratoire pour la participation à la bonne ambiance qui a régné durant ces années : Alexandre Lecointre (pour sa contribution dans ces travaux de thèse), Dr. Zouhair Asfari (pour ta présence et ton soutien), Dr. Câline Christine et le Dr. Aline NONAT (pour la bonne humeur et vos conseils précieux). Merci également à Pascale, Anne et Sylvie.

Je salue touts mes collègues que j'ai eu l'honneur de rencontrer et de côtoyer au laboratoire : Thiru, Katia, Tao, Bachir, Mama, Rachid, Tarik, Amandine, Akram, Mohamadou et Parastoo. Je n'oublie pas d'associer à mes remerciements toutes les autres personnes du laboratoire de chimie bioorganique et qui ont su rendre mon quotidien agréable.

Enfin, mes remerciements les plus chaleureux sont adressés à mes parents, à l'ensemble de ma famille, de ma belle famille à mes amis et bien sûr à mon mari et ma fille pour leur soutien et leur amour sans qui rien n'aurait été possible.

Sommaire

Chapitre I : Introduction

1. Introduction……1

2. Imagerie nucléaire……..2

2.1. Tomographie par émission de positron…… 3

2.2. Tomographie par émission monophotonique……...6

2.3. Agents radiopharmaceutiques…….. 7

2.3.1. Production des radioisotopes ……... 8

2.3.2. Temps de demi-vie……...10

2.3.3. Mode de désintégration……... 10

2.3.4. Détection par des gammas caméras……..11

3. Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) 13

3.1. Agents de contraste…… 14

4. Chélateurs bifonctionnels pour la complexation du ^{64}Cu..... 16

4.1. Stabilité thermodynamique..... 18

4.2. Inertie cinétique 20

4.3. Propriétés électrochimique 22

5. Marquage des biomolécules avec les complexes de ^{64}Cu 24

6. L'imagerie nucléaire dans l'approche multimodale..... 27

Bibliographie..... 29

Chapitre II : Synthèse des ligands polyaminophosphonatés

1. Synthèses des précurseurs 35

1.1. Synthèse de la plateforme pyridinique 35

1.2. Synthèse des amines mono et bisphosphonatés.....36

2. Synthèse du ligand tetraphosphonaté L^1..... 36

3. Synthèse du ligand bisphosphonaté L^2 38

4. Synthèse du ligand triphosphonaté L^3..... 39

5. Synthèse du ligand triphosphonaté L^4..... 40

Conclusion…… 43

Partie expérimentale 44

Bibliographie …… .. 53

Chapitre III : Propriétés de coordination des cations d'intérêt pour la TEP

I- Propriétés acido-basique des ligands libres

1. Etude potentiométrique……..54
2. Etude spectrophotométrique en fonction du pH…… 59
Conclusion…… 62

II- Propriétés de coordination des complexes de cuivre(II)

1. Propriétés physico-chimique du cuivre(II)……63
1.1. Propriétés d'oxydoréduction 64
1.2. Propriétés de coordination 65
1.3. Propriétés spectroscopiques..... 66
2. Coordination du cuivre(II) 68
2.1. Approche potentiométrique 68
2.2. Approche spectrophotométrique..... 72
2.2.1. Titrages spectrophotométriques en fonction du pH..... 72
2.2.2. Titrages spectrophotométriques à pH fixe 76
2.3. Sélectivité de la complexation du Cu(II) par rapport à Ni(II), Zn(II), Co(II) et Ga(III) 79
2.4. Etude par spectrométrie de masse en mode electrospra 81
2.5. Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)..... 83
2.6. Structure du complexe $[Cu\mathbf{L^1}]^{6-}$ par calcul DFT..... 87
Conclusion…… 89

III- Cinétique de formation et de dissociation des complexes de cuivre(II)

1. Cinétique de formation des complexes de cuivre(II) 90
2. Cinétique de dissociation des complexes du Cuivre(II)..... 100
Conclusion …… 108

IV- Propriétés électrochimique des complexes de cuivre(II)

1. Principe de la voltampérométrie 110

1.1. Principe de la Voltampérométrie Cyclique (CV) 110

1.2. Voltampérométrie à ondes carrées 112

2. Etudes des complexes monocuivriques à différentes valeurs de pH 114

3. Etudes des complexes monocuivriques en fonction de la vitesse de balayage 120

4. Réduction des complexes de Cu(II) avec des réducteurs biologiques 124

Conclusion…… 128

Partie expérimentale 129

Bibliographie 137

Chapitre IV : Propriétés de coordination des lanthanides

1. Généralités sur les lanthanides 144

1.1. Configuration électronique 145

1.2. Propriétés magnétiques 146

1.3. Propriétés spectroscopiques 147

2. Chimie de coordination des lanthanides 149

3. Luminescence des lanthanides 151

3.1. Paramètres de luminescence 152

3.1.1. Temps de vie de l'état excité τ et nombre d'hydratation q 152

3.1.2. Rendement quantique de luminescence Φ 153

4. Propriétés physicochimiques des complexes d'europium et de terbium 154

4.1. Titrages potentiométriques 155

4.2. Propriétés spectroscopiques des complexes d'Eu(III) et de Tb(III) 158

4.2.1. Titrage en absorption UV- visible du ligand L^1par l'Eu^{3+} et le Tb^{3+} 158

4.2.2. Titrage en émission du ligand L^1par l'Eu^{3+} et le Tb^{3+} 159

5. Titrage par spectrométrie de masse du ligand L^1par Eu(III) 160

6. Caractérisation des complexes de lanthanide 161

7. Etude de l'interaction avec Mg(II) et Ca(II) 165

8. Mécanisme de relaxivité des complexes de gadolinium 165

8.1. Paramètres influençant la relaxivité des complexes de Gd(III) 168

8.1.1. Nombre de molécules d'eau *q* coordinées en sphère interne 168

8.1.2. Distance Gd(III)-proton r_{Gd-H} 168
8.1.3. Temps de corrélation rotationnelle τ_R 169
8.1.4. Vitesse d'échange des molécules d'eau k_{ex} 169
8.1.5. Temps de relaxation électronique..... 169
8.2. Mesure de la relaxivité des complexes Gd**L**^{1}, Gd**L**^{2} et Gd**L**^{3}..... 170
8.2.1. Relaxivité du complexe Gd**L**^{1} 170
8.2.2. Relaxivité des complexes Gd**L**^{2} et Gd**L**^{3}..... 171
Conclusion..... 174
Partie expérimentale… 175
Bibliographie..... 178

Chapitre V : Marquage de biomolécule

1. Etude de la cinétique d'hydrolyse de la fonction activée 181
2. Mise au point de la réaction de couplage 182
2.1. Couplage avec une amine primaire..... 182
2.2. Réaction de couplage avec un peptide modèle A (SIINFEKL)..... 183
2.3. Réaction de couplage avec le peptide modèle B (KLTPLCVSL) 185
3. Marquage des anticorps 186
3.1. Marquage de l'anticorps B28-13..... 186
3.1.1. Détermination de la concentration de B28-13 187
3.1.2. Analyse par spectrométrie de masse de B28-13 187
3.1.3. Réaction de couplage..... 188
3.1.4. Immunofluorescence de l'anticorps B28-13 marqué 188
3.2. Marquage de l'anticorps RAM1..... 189
4. Applications en Imagerie..... 191
4.1. Imagerie TEMP 191
4.2. Imagerie IRM..... 191
Conclusion ……..... …..193
Partie expérimentale..... 194
Bibliographie..... 197

Conclusion générale..... 198

Avant propos

L'imagerie médicale est l'une des plus grandes révolutions de l'histoire de la médecine. Elle a commencé à la fin du 19^{éme} siècle avec la découverte de la radiographie. Elle regroupe l'ensemble des techniques non invasives d'acquisition et de restitution d'images du corps humain à partir de différents phénomènes physiques tels que l'absorption des rayons X, la réflexion d'ondes ultrasonores, la résonance magnétique nucléaire (IRM), l'émission de la radioactivité ainsi que les techniques d'imagerie optique. Ces différentes modalités d'imagerie sont utilisées par la médecine pour le diagnostic et le traitement d'un grand nombre de pathologies et dans plusieurs domaines comme la cancérologie et la cardiologie. Elles ne donnent pas une simple photographie du tissu ou de l'organe étudié mais une représentation visuelle fidèle basée sur des caractéristiques physiques ou chimiques particulières. Les appareillages utilisés sont aussi variés que les techniques elles-mêmes ; des techniques qui peuvent être complémentaires les unes des autres.

Pour chacune de ces modalité d'imagerie, des agents diagnostiques sont très largement utilisés afin d'augmenter le contraste et la spécificité. Ils sont classés en deux catégories : des produits de contrastes et des agents radiopharmaceutiques. La première catégorie regroupe les produits iodés pour l'imagerie RX, les chélates de gadolinium(III) pour l'IRM, les nanobulles ultrasonores pour l'imagerie ultrasons ou encore des colorants pour l'imagerie optique. La seconde catégorie est celle des agents radiopharmaceutiques qui sont des molécules qui contiennent un élément radioactif fixé, soit directement sur la molécule, soit sous forme de complexes. Ces produits radioactifs sont composés de molécules qui possède une affinité pour une cible bien spécifique (tissu, organe……). Leur principe d'action est basé sur la mesure de la désintégration de l'élément radioactif avec l'émission de rayons gamma : c'est l'imagerie TEMP (Tomographie à émission monophotonique) ou avec émission de positron : c'est l'imagerie TEP (Tomographie par émission de positron).

Si certains de ces traceurs sont largement utilisés et approuvés, de nombreuses améliorations peuvent être apportées dans la conception de ces molécules. L'arrivée du cyclotron Cyrcé sur le site de Strasbourg-Cronenbourg va encourager et stimuler ce domaine de recherche localement et compléter les plateaux techniques Strasbourgeois autour de l'imagerie médicale. L'un des objectifs majeurs est de produire des radio-isotopes pour le diagnostic, le suivi de médicament ou le traitement médical. Il permettra de fournir dans un

premier temps du ^{18}F (période de 109 min) et du ^{64}Cu (période de 12,7h) et plus tard du ^{89}Zr (période de 3,3 jours).

Contrairement au fluor 18 qui constitue le radioisotope le plus couramment utilisé en imagerie médicale avec un temps de demi-vie de 109 min, le ^{64}Cu avec une période de demi-vie de 12,7 heures, est un émetteur de positron de grand intérêt qui est envisagé pour une production routinière pour des applications en clinique. Le but de ce travail de thèse a été de synthétiser et d'étudier de nouveaux chélateurs bifonctionnels pour la complexation du $^{64}Cu(II)$ comme nouveaux traceurs radioactifs en imagerie TEP. Le développement et l'utilisation de nouveaux agents de contraste pour l'IRM basés sur ces nouveaux chélateurs bifonctionnels seront également abordés à la fin de ce manuscrit.

Chapitre I

Introduction

1. Introduction

L'imagerie médicale constitue l'un des piliers de la médecine, elle regroupe l'ensemble des techniques non invasives. Elles permettent le diagnostic de certaines pathologies, le suivi de l'évolution des anomalies biologiques et l'efficacité des traitements.

La première application d'imagerie médicale date de 1895 avec la découverte de la radiographie aux rayons X grâce aux travaux du physicien allemand Wilhelm Conrad Röntgen. Cette technique d'imagerie fournit essentiellement des images anatomiques et reste la plus utilisée. L'apport de l'informatique et du traitement numérisé des images a abouti à la mise au point de la tomodensitométrie (TDM) ou scanner en 1972. Le scanner repose également sur l'utilisation des rayons X mais permet d'obtenir des images tridimensionnelles des organes ou des tissus (os, muscles, vaisseaux, tumeurs….) sous forme de coupes. Dans certains cas, l'utilisation d'un agent de contraste pour améliorer la qualité d'image est nécessaire.

A coté des rayons X, d'autres principes physiques ont été découverts qui ont conduit à de nouvelles techniques d'imagerie médicales. L'échographie est la technique d'imagerie la plus utilisée en obstétrique, bien que les premières recherches sur l'ultrason n'étaient pas destinées à des applications médicale, mais avaient pour but de permettre la détection des sous marins pendant la guerre mondiale. Son principe est basé sur l'émission et la réception d'un signal ultrasonore à travers une sonde. Cette technique a des avantages, notamment le fait qu'elle n'est pas chère, indolore et n'utilise ni rayonnement, ni injection, ni ponction.

L'imagerie par résonance magnétique est une technique d'imagerie médicale permettant d'obtenir des images 2D ou 3D de la zone étudiée. Le premier signal RMN a été observé en 1946 par Bloch et Purcell.[1] Cette technique est depuis devenue une technique majeure de l'imagerie médicale moderne. Elle consiste à observer les tissus biologiques à travers les propriétés magnétiques de l'un de leurs constituants majoritaires, le noyau d'hydrogène, en particulier les noyaux d'hydrogène des molécules d'eau. En effet, l'eau constitue environ 70% du corps humain et le proton ^{1}H est naturellement abondant et très sensible en RMN.

Ces techniques (radiographie, échographie, tomodensitométrie et IRM) donnent des informations structurales sur l'anatomie des organes (volume, position, présence de lésions, pathologies …).

D'autres techniques ont fait leurs apparitions dans le domaine de l'imagerie médicale et s'intéressent à la fonction et aux métabolismes des organes, des tissus ou des cellules. Ce domaine est connu sous le nom d'imagerie fonctionnelle ou moléculaire; elle regroupe l'imagerie nucléaire et l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) ainsi que

l'imagerie optique. Ces techniques permettent la visualisation, la caractérisation et la mesure des processus biologiques au niveau moléculaire et cellulaire chez les humains et les autres systèmes vivants.

Dans ce chapitre, nous présenterons les différentes techniques d'imagerie médicales fonctionnelles plus particulièrement la Tomographie par Emission de Positron TEP, la Tomographie par émission monophotonique TEMP et l'Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle IRMf. Nous décrivons leurs principes de fonctionnement et les différents agents de diagnostique et de contraste utilisés dans ces techniques. Nous nous intéresserons également à la production des radioéléments utilisés en imagerie nucléaire, en particulier, le cuivre 64 ainsi que les différents chélateurs bifonctionnels développés à ce jour en imagerie.

2. Imagerie nucléaire

C'est l'une des techniques d'imagerie fonctionnelle qui a connu un essor fulgurant ces dernières décennies. Contrairement à ce que beaucoup de gens pensent, l'imagerie nucléaire est une discipline plutôt ancienne, puisque ses origines remontent à plus d'un siècle. La découverte de la radioactivité naturelle par Henri Becquerel (1896), Pierre et Marie Curie (1898), puis de la radioactivité artificielle par Irène et Frédéric Joliot-Curie en 1934 ont conduit au développement de la médecine nucléaire, avec la scintigraphie qui fait appel à la tomographie par émission monophotonique (TEMP) et la tomographie par émission de positron (TEP) dans les années 1990. Ces techniques se révèlent de plus en plus indispensables dans le domaine d'imagerie et de la radiothérapie. Elles permettent d'apporter des informations précises sur les organismes vivants de manière non traumatique, et sans en perturber les grands équilibres.

L'imagerie nucléaire se base sur l'injection au patient par voie intraveineuse d'un produit radioactif appelé radiotraceur composé d'un radio-isotope généralement fixé sur une molécule vectrice qui est choisi pour son affinité pour l'organe cible que l'on veut étudier.

La détection des rayonnements émis par cette distribution volumique de l'organe cible où va se concentrer ce radioélément va donner une image que l'on appelle scintigraphie. Les différents types d'imagerie nucléaire sont tous basés sur le principe de la scintigraphie et reposent, par conséquent, sur la détection de rayonnements gamma émis par un radioélément détectable par des caméras gammas.

L'imagerie nucléaire permet un diagnostic précoce de plusieurs pathologies et une étude du fonctionnement de la plupart des organes du corps humain dont elle donne une image fonctionnelle contrairement aux autres techniques d'imagerie structurale. Cette technique nécessite, d'une part, un bon isotope radioactif qui puisse s'intégrer facilement dans une molécule et d'autre part, un ensemble de détection performant. Les applications de la médecine nucléaire sont nombreuses et comprennent, notamment, les explorations osseuses, cardiaques, digestives, neurologiques et oncologiques.[2,3]

2.1. Tomographie par émission de positron

La Tomographie par Emission de Positron (TEP) est une technique d'imagerie médicale fonctionnelle moléculaire quantitative avec une résolution spatiale faible (< 2 mm pour ^{18}F).[4] Son principe de fonctionnement est basé sur la mesure d'émissions produites par les positrons issus de la désintégration d'un radio-isotope tel que ^{18}F, ^{15}O, ^{11}C, ^{13}N, ^{64}Cu, ^{68}Ga….. Le produit radioactif est injecté au patient par voie intraveineuse. Le positron β^+ émis va parcourir quelques millimètres dans l'organisme (1-3 mm) [5] et finit par se combiner avec un électron du milieu; les deux particules s'annihilent en émettant deux photons γ de 511 KeV dans deux directions opposées, c'est à dire à 180° l'un de l'autre (Figure 1.1). La détection de la trajectoire de ces photons par une caméra TEP permet de localiser le lieu de leurs émissions et avec un algorithme mathématique, l'ordinateur donne une image 3D de la zone étudiée.

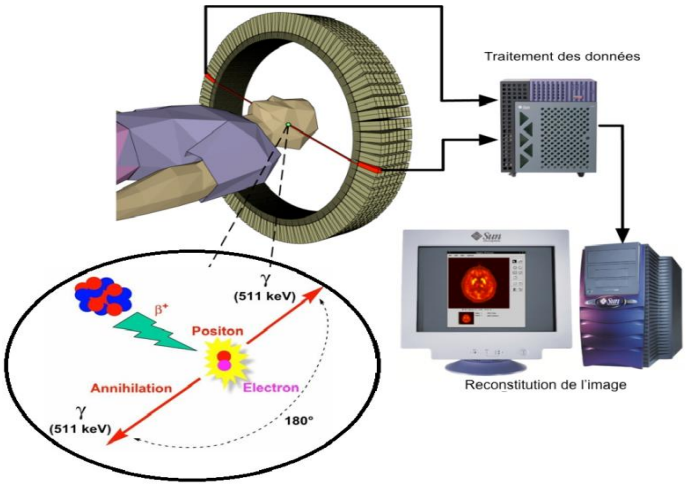


Figure 1.1. *Emission d'un positron par une molécule radioactive.*

La TEP permet d'utiliser un éventail d'éléments chimiques significatifs pour le marquage. Parmi les premiers radio-isotopes utilisés, l'oxygène 15 (^{15}O), est utilisé pour contrôler le débit sanguin par marquage des molécules d'eau. Ces dernières sont

particulièrement intéressantes du fait de leur simplicité et surtout de leur présence dans tous les tissus biologiques y compris le sang et les tissus cérébraux. D'autres radio-isotopes comme l'azote 13 (^{13}N) et le carbone 11 (^{11}C) ont depuis vu le jour et permettent désormais d'observer *in vivo* et de façon quantitative des processus biochimiques et physiologiques divers, autre que les variations du débit sanguin.

Ces radio-isotopes sont donc très importants pour les études du métabolisme car ce sont les éléments que l'on retrouve dans la matière vivante. De plus, ils sont non traumatisants à cause de leur durée de vie brève (^{15}O (2 min), ^{13} N (10 min) et ^{11}C (20 min)). Ces isotopes n'existant pas dans la nature, ils doivent être produits sur le lieu même de leur utilisation avant d'être intégrés dans des molécules supports, d'où la présence indispensable, si l'on veut utiliser ces traceurs, d'un cyclotron médical ainsi que d'un service de radiochimie pour permettre la fabrication et l'utilisation de ces radio-isotopes sur leur lieu d'utilisation.

L'arrivée des cyclotrons a permis de s'orienter vers d'autres isotopes radioactifs tels que le fluor 18 (^{18}F), qui est désormais le radio-isotope le plus utilisé en imagerie clinique avec une période de demi-vie de 109 min.[6] Il peut être incorporé dans certaines molécules sans trop altérer leurs caractéristiques physicochimiques et biologiques.

Le 2-[^{18}F]fluoro-2-déoxy-D-glucose (FDG) qui correspond à une molécule de glucose dans laquelle le groupement hydroxyle en position 2 a été remplacé par un atome de fluor radioactif (Figure 1.2) est le radiopharmaceutique émetteur de positrons le plus utilisé de nos jours en imagerie TEP (Figure 1.2).[7] L'administration de ce radiotraceur permet de suivre le métabolisme du glucose et de localiser ainsi les cellules fortement consommatrices de ce sucre telles que les cellules tumorales. La TEP au FDG constitue un outil précieux pour réaliser le bilan complet sur l'extension tumorale avant l'initialisation du traitement, pour évaluer l'action thérapeutique et particulièrement la réponse aux traitements.

Cependant, la fixation du FDG n'est pas spécifique aux cellules tumorales. Il peut être augmenté dans le cas de phénomène inflammatoires pathologiques ou de tumeurs bénignes ou encore lors de pathologie infectieuse, ce qui peut conduire à des faux positifs.[8, 9]

D'autres radiotraceurs fluorés ont été développés et utilisés en clinique tels que la FDOPA (L-6-[^{18}F]fluoro-3, 4-dihydroxyphenylalanine), la deuxième molécule fluorée mise sur le marché utilisée en neurologie dans la maladie de Parkinson et en oncologie pour détecter les tumeurs endocrines. La FLT (3'-deoxy-3'-fluorothymidine), adaptée pour évaluer l'efficacité des thérapeutiques anticancéreuses[10,11] et la FCH ([^{18}F]fluorocholine) est en cours d'évaluation pour la détection du cancer de prostate (Figure 1.2).[12,13]

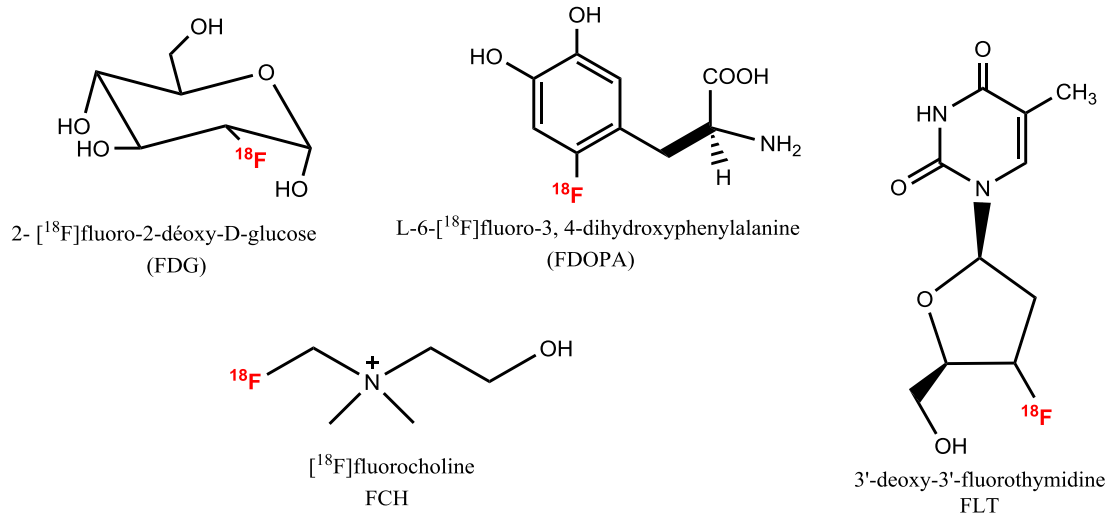


Figure 1.2. *Structures chimiques de quelques radiotraceurs fluorés : ^{18}FDG, ^{18}FDOPA, ^{18}FLT et ^{18}FCH.*

Le renforcement de l'implantation des cyclotrons a permis la variation de la nature des radio-isotopes utilisés en imagerie TEP et le développement de nouveaux radiopharmaceutiques émetteurs de positron. Le Tableau 1.1 regroupe les principaux radioéléments utilisés en TEP.

Emetteurs de positron	$t_{1/2}$	Energie des principaux β^+ (keV)	Intensités des principaux β^+ (%)
^{18}F	109,7min	634	100
^{68}Ga	1,13 h	1899	87,9
^{64}Cu	12,7h	653	17,4
^{76}Br	16,2h	871	6,3
^{86}Y	14,7h	1221	11,9
^{89}Zr	78,4h	902	22,7
^{94}Tc	52min	810	10,5
^{124}I	100,3	871	6,3

Tableau 1.1. *Exemples de quelques radioéléments utilisés en TEP.*

La TEP est de plus en plus utilisée en médecine. Même si elle utilise la radioactivité, elle ne présente aucun danger majeur pour l'organisme. La multiplicité des traceurs radioactifs lui permet de mieux caractériser chaque type de tumeurs. Enfin, son couplage récent avec différentes techniques d'imagerie médicale, comme le scanner aux rayons X ou

l'IRM, a permis d'élargir son champ d'application dans les différents services de médecine et donc de lui donner de bonnes chances d'avenir.

2.2. Tomographie par émission monophotonique

La tomographie par émission monophotonique (TEMP), ou SPECT en nomenclature anglo-saxonne (abréviation de Single Photon Emission Computed Tomography), est une technique d'imagerie moléculaire basée sur l'injection dans l'organisme d'une molécule marquée radioactive émettrice de rayonnements gamma détectés par une caméra comportant des détecteurs à scintillation.

Les isotopes émetteurs de photons gamma les plus utilisés sont le gallium 67, utilisé dans les lymphomes ou le technétium 99m, employé dans le dépistage du cancer du sein, qui fournissent des informations sur l'accroissement de la densité cellulaire ou le métabolisme des lésions tumorales. A la différence de la TEP, la tomographie par émission de simple photon n'est pas une méthode quantitative.

Les isotopes émetteurs de photons gamma (thallium 201, iode 123, indium 111, technétium 99m…) ne figurent pas dans les molécules biologiques comme le carbone, l'oxygène, l'azote, le phosphore ou le soufre. Ils peuvent donc modifier l'activité de la molécule d'intérêt biologique dans laquelle ils sont incorporés. De plus, leur période radioactive (quelques heures) est bien plus longue que celle des émetteurs de positrons. Le Tableau 1.2 présente les différents isotopes émetteurs de photons gamma utilisés pour l'imagerie SPECT.

Emetteurs de γ	**Energie (keV)**	**$t_{1/2}$**
^{99m}Tc	140	6h
^{123}I	159	13h
^{111}In	170 et 240	67h
^{201}Tl	77	72h
^{67}Ga	97, 180 et 390	78h

Tableau 1.2. *Quelques exemples d'isotopes émetteurs de γ utilisés en imagerie SPECT.*

La désintégration des radio-isotopes utilisés en imagerie SPECT conduit à l'émission d'un seul photon gamma mesurée directement par une caméra adaptée qui tourne autour du patient, appelée caméra gamma à scintillation (Figure 1.3). Comme dans le cas de l'imagerie TEP, le traitement informatique des données obtenues permet d'obtenir des cartes tomographiques de la zone étudiée.

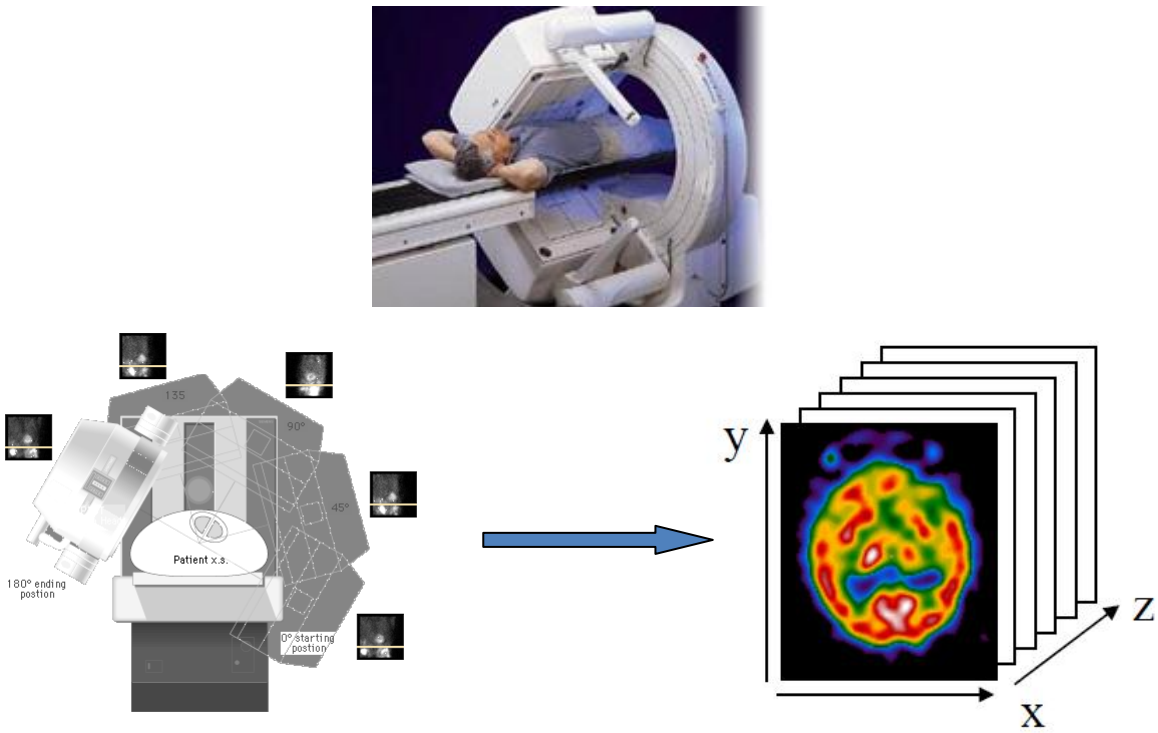


Figure 1.3. *Principe de la caméra SPECT et enregistrement des données à différents angles.*

Cependant, les gamma-caméras, plus simples techniquement et moins coûteuses que les caméras utilisées pour la TEP, sont beaucoup plus répandues en milieu hospitalier (cardiologie, scintigraphie osseuse…).

2.3. Agents radiopharmaceutiques

Les agents radiopharmaceutiques sont utilisés dans les techniques d'imagerie nucléaire**.** [14,15] Ce sont des médicaments contenants un isotope radioactif employés à des fins diagnostiques ou thérapeutiques. Leurs principes de fonctionnement sont basés sur la mesure de la désintégration du radioélément dans les tissus biologiques avec émission des rayonnements γ (TEMP) ou émission de photons (TEP). Un radiopharmaceutique peut être constitué par l'isotope seul sous forme d'ion qui joue le rôle de traceur et de vecteur, comme l'Iode 131 qui est utilisé sous forme d'iodure de sodium (NaI), ou le technétium 99m, sous forme de pertechnétate de sodium ($NaTcO_4$), pour le diagnostique des glandes thyroïdiennes et salivaires. La plupart du temps l'isotope radioactif est lié soit directement à la molécule soit sous forme de complexe à l'aide d'un chélateur bifonctionnel CBF relié à la molécule par un espaceur. Ce dernier est relié à des vecteurs spécifique d'un organe, d'une fonction physiologique ou d'une pathologie (anticorps, analogues de molécules biologiques et

molécules organiques). Cette molécule vectrice assure la biodistribution et permet d'évaluer la fonctionnalité de l'organe cible (Figure 1.4).

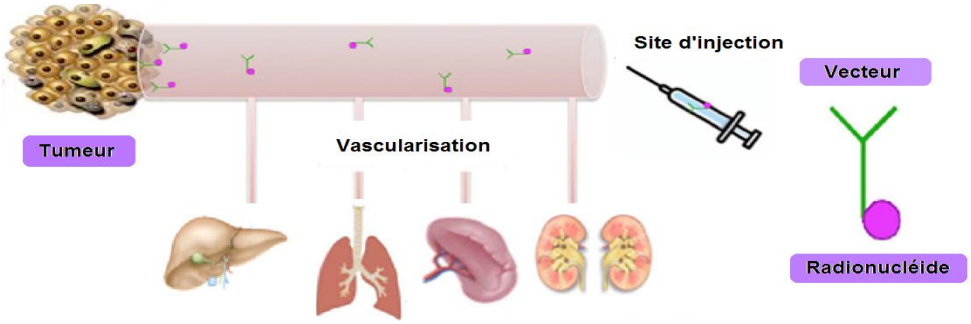


Figure 1.4. *Principe de fonctionnement des agents radiopharmaceutiques.*

L'isotope radioactif est un atome possédant les mêmes propriétés physicochimiques que l'atome stable dont il est l'isotope. Il est instable et se transforme par désintégration pour devenir d'autres atomes radioactifs ou des atomes stables. Il est choisi selon son mode de production, son temps de demi-vie et selon son mode de désintégration.

2.3.1. Production des radioisotopes

Les radio-isotopes utilisés en médecine nucléaire se caractérisent par des temps de vie qui varient de quelques minutes à quelques jours, ce qui pose un problème lors de la production et la livraison des éléments radioactifs. Les radio-isotopes peuvent être produits avec des cyclotrons ou avec des générateurs d'isotopes.

Les générateurs d'isotopes sont des dispositifs qui permettent d'obtenir sur le lieu d'utilisation et à partir d'un noyau père de longue période (quelques heures à quelques mois), un radio-isotope fils d'intérêt médical de courte durée (quelques secondes à quelques minutes). C'est l'exemple du gallium 68 (^{68}Ga) qui a une période de demi-vie de 68 minutes et dont le père est le germanium 68 (^{68}Ge) dont la période physique est longue de 271 jours. Le système générateur de ^{68}Ge/^{68}Ga fournit une source continue de ^{68}Ga pendant environ 1 an. La technique est en cours d'optimisation pour développer de nouveaux systèmes de production avec les générateurs d'isotopes.[16,17, 18]

Le cyclotron est un accélérateur circulaire inventé par Lawrence en 1931. Il permet d'accélérer des particules à une très grande vitesse. Son principe de fonctionnement est d'introduire des particules chargées de hautes énergies (1 à 100 MeV) entre les deux demi-cylindres où un champ électrique provenant d'une différence de potentiel est présent. Les particules sont poussées vers l'un des deux demi-cylindres. Lorsque les particules entrent dans l'un des demi-cylindres, il n'y a plus de force électrique appliquée sur les particules, mais la

présence d'un champ magnétique impose aux particules une trajectoire circulaire. Après avoir complété un demi-tour, les particules se retrouvent à l'intersection des deux demi-cylindres. On inverse à ce moment la différence de potentiel pour inverser l'orientation du champ électrique afin de permettre aux particules d'accélérer à nouveau. Elles effectuent plusieurs tours dans le cyclotron jusqu'à leur expulsion avec une énergie adéquate puis elles sont guidées et focalisées jusqu'à leur point d'utilisation (Figure 1.5).

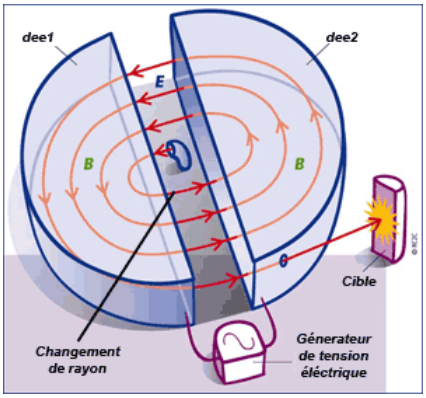


Figure 1.5. *Principe de fonctionnement du cyclotron.*

La réaction nucléaire qui conduit à l'obtention d'un radioélément peut être représenté selon l'écriture suivante : ${}^{A}_{Z}X\,(x,y)\,{}^{A'}_{Z'}Y'$ avec ${}^{A}_{Z}X, x, y$ et ${}^{A'}_{Z'}Y'$ désignent respectivement l'élément cible, la particule incidente, la particule émise et l'élément produit par la réaction.

<u>Production du cuivre 64</u> : Le ${}^{64}Cu$ constitue un radio-isotope d'intérêt en imagerie TEP avec un temps de demi-vie $t_{1/2}$ = 12,7 h. Sa désintégration en différents modes (Figure 1.6) permet de faire de l'imagerie TEP mais permet également d'envisager son utilisation pour la radiothérapie.

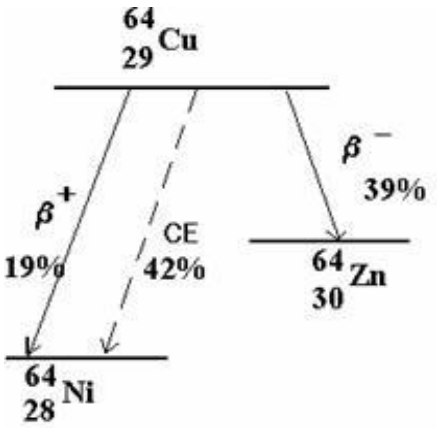


Figure 1.6. *Schéma de désintégration du cuivre 64.*

Le cuivre 64 est produit grâce à un cyclotron à partir d'une cible de nickel 64 selon les réactions nucléaires suivante : ^{64}Ni(p,n) ^{64}Cu et ^{64}Ni(d,2n) ^{64}Cu avec p : proton, n : neutron et d : deutéron.[19, 20] La cible en nickel enrichie doit être préalablement irradiée pour augmenter le rendement en ^{64}Cu. [21, 22] Une étape de purification par chromatographie échangeuse d'ions est nécessaire afin de séparer le ^{64}Cu des autres métaux comme le cobalt ou le nickel.[23, 24]

Le ^{64}Cu a été également produit à partir d'une cible de ^{68}Zn selon la réaction ^{68}Zn(p, αn) ^{64}Cu mais le produit final est impur et contient environ 25% de ^{67}Cu.[25] Une autre méthode de production du ^{64}Cu a été développée à partir du ^{64}Zn selon deux réactions nucléaires ^{64}Zn(d, 2p) ^{64}Cu et ^{64}Zn(d, 2pn) ^{64}Cu.[26] Le produit est ensuite purifié par chromatographie échangeuse de cations; le ^{64}Cu est enfin obtenu après élution à l'aide d'une solution d'acide chloridrique concentrée.

2.3.2. Temps de demi-vie

La radioactivité de l'isotope diminue avec le temps du fait de la disparition du noyau instable. Le temps de demi-vie, notée $t_{1/2}$ est le temps nécessaire pour que la moitié des atomes radioactifs présents dans l'échantillon se désintègrent naturellement. Cette période peut varier considérablement d'un isotope à l'autre, depuis une fraction de seconde à des millions ou des milliards d'années. Dans le domaine de l'imagerie médicale, cette période doit être suffisante grande pour permettre un maximum de fixation sur la cible mais également suffisamment courte pour éviter le phénomène de surirradiation.

2.3.3. Mode de désintégration

Les radio-isotopes peuvent être détectés grâce au rayonnement qu'ils émettent par désintégration. Selon le mode de désintégration, on distingue quatre types d'émetteurs:

Emetteurs γ : Après une transformation radioactive du noyau, le noyau fils est normalement dans un état excité (*) et se désexcite en émettant un (ou plusieurs) photons de haute énergie (gamma) selon la réaction suivante : $^{A}_{Z}Y^{*} \rightarrow {}^{A}_{Z}Y + \gamma$

Emetteurs β^+ : Les radioéléments avec surplus de protons émettent un positron qui provient de la décomposition d'un proton en un positron et un neutrino électronique ν_e : $^{A}_{Z}X \rightarrow {}_{Z-1}^{A}Y + \beta^+ + \nu_e$. Les rayonnements β^+ interagissent avec les électrons du milieu et s'annihilent en donnant deux photons γ de 511KeV.

Emetteurs β^- : Les radio-isotopes avec un surplus de neutrons émettent un électron qui provient de la décomposition d'un neutron en un proton et émission d'un électron (β^-) et d'un antineutrino $\bar{\nu}$ suivant l'équation : $^{A}_{Z}X \rightarrow {}_{Z-1}^{A}Y + \beta^- + \bar{\nu}$

L'émission d'électron est accompagnée d'une émission γ détectable par des caméras gamma. Il n'est pas recommandé d'utiliser des émetteurs de β^- pour les examens diagnostiques de médecine nucléaire car ils sont très ionisants. Toutefois, ils peuvent être employés à des fins thérapeutiques.

Capture électronique CE : Lorsqu'un noyau est instable à cause d'un trop plein de protons par rapport aux neutrons, il transforme l'un de ses protons en neutrons. Le noyau ainsi formé se trouve dans un état excité et retourne à l'état fondamental par une émission gamma. $^{A}_{Z}X + e^- \rightarrow {}_{Z-1}^{A}X + \gamma + \nu$ ou ν est un neutrino.

2.3.4. Détection par des gammas caméras

Comme son nom l'indique, la gamma caméra détecte les scintillations produites par les rayons gamma émis par un atome radioactif lorsqu'il se désintègre. Connaissant l'impact d'un de ces photons sur le détecteur, il faut connaître sa direction pour remonter au point d'origine de son émission s'il n'est pas absorbé par les tissus biologique. Les rayons γ émis vont être sélectionnés grâce à un collimateur (tube en plomb) situé au dessus du patient (Figure 1.7).

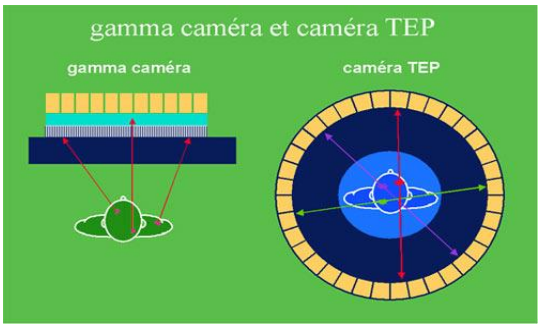


Figure 1.7. *Principe de détection d'une gamma caméra et d'une caméra TEP.*

La gamma caméra mesure l'énergie reçue si elle correspond à l'énergie attendue (140 keV pour le ^{99m}Tc). En scintigraphie mono-photonique, les scintillateurs les plus utilisés aujourd'hui sont composés de monocristaux de NaI ou de CsI dopé au thallium, qui font office de centres scintillants. Leur rôle est de transformer les rayons gamma en photon de lumière visible ou ultraviolette. Les photons qui atteignent le scintillateur seront détectés par un photomultiplicateur couplé au cristal afin d'amplifier le signal. Les autres photons non détectés seront absorbés par le plomb au niveau du collimateur.

Les caméras TEP sont très largement utilisées dans le domaine de l'imagerie médicale, Elles sont basées sur l'émission simultanée de deux photons d'énergie 511 keV provenant de la désintégration radioactive d'un positron. Ces caméras contiennent des détecteurs très sensibles capables de détecter une faible quantité de radioactivité dans l'organisme, et d'en faire une image. Le détecteur est sous forme d'anneau (Figure 1.7) de diamètre de l'ordre de 80 à 90 cm qui entoure le patient afin de récupérer l'émission simultanée des photons, de part et d'autre du corps. Les détecteurs utilisés sont des cristaux scintillateurs en germanate de bismuth (BGO) ou fluorure de baryum (BaF_2) couplés à des photomultiplicateurs.

La TEP étant une technique basée sur la détection des photons en coïncidence, toutes les coïncidences détectées par les caméras TEP ne sont pas forcement exploitables. Une coïncidence est dite vraie lorsque la ligne de réponse passe par la source d'émission et permet une interprétation raisonnée (Figure 1.8). Mais deux autres phénomènes de coïncidences peuvent venir limiter la résolution et dégrader la qualité de l'image (Figure 1.8). Ces phénomènes sont :

La coïncidence diffusée résultant de la déviation de l'un des deux photons par des radiations extérieures (par exemple des ondes radio) ou par le tissu biologique. Les photons ne sont pas alignés, et la ligne de réponses enregistrée est donc erronée.

La coïncidence fortuite qui résulte de l'arrivée quasi simultanée de deux photons non issus de la même annihilation et qui conduit à une mauvaise localisation.

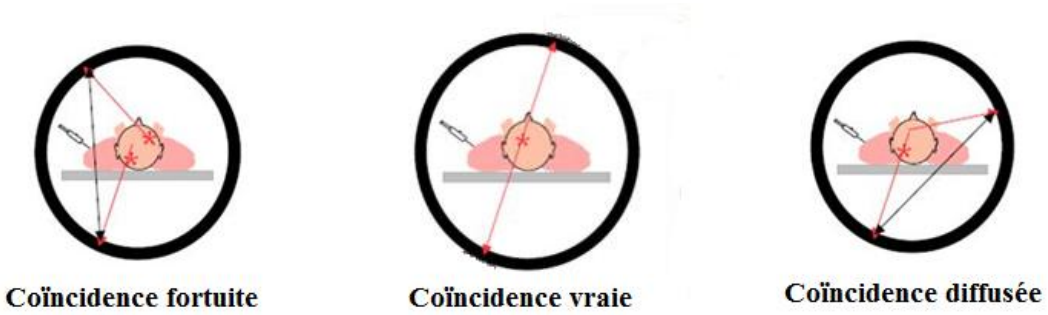


Figure 1.8. *Différents phénomènes de coïncidence qui peuvent intervenir en imagerie TEP.*

3. Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)

L'IRM est une technique radiologique récente, non invasive, basée sur le phénomène physique de résonance magnétique nucléaire. Il s'agit simplement d'observer la résonance magnétique nucléaire (RMN) des protons de l'eau contenus dans l'organisme lorsqu'ils sont soumis à un champ magnétique extérieur. A l'état normal, les spins sont orientés de façon aléatoire et lorsqu'on place un sujet dans un champ magnétique intense B_0 (0,5 à 3 Tesla en clinique), les spins des noyaux s'orientent de manière parallèle (basse énergie) ou anti parallèle (haute énergie) à la direction du champ B_0 (Figure 1.9). Les spins nucléaires des protons tournent autour de l'axe B_0 en décrivant un cône : c'est le mouvement de précession. On applique ensuite et pendant un temps très court, un second champ électromagnétique B_1 (onde radiofréquence) perpendiculaire à B_0 et de fréquence appropriée (fréquence de Lamor) qui se traduit par le passage des noyaux d'un état d'énergie à un autre. Une fois le second champ B_1 interrompu, les spins reviennent à une direction parallèle à B_0. Le retour à l'état initial est appelé : relaxation, elle est caractérisée par un temps de relaxation longitudinal (T_1) et un temps de relaxation transversal (T_2) (Figure 1.10).

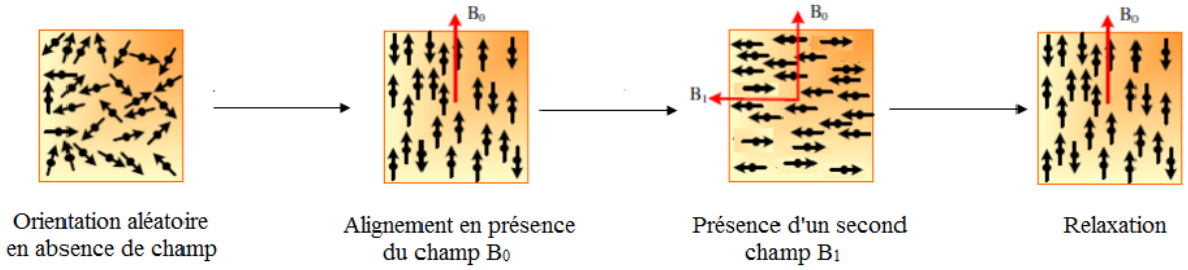


Figure 1.9. *Principe général de l'IRM.*

Temps de relaxation longitudinale (T_1) correspond au temps caractéristique de retour à l'équilibre de l'aimentation longitudinale après perturbation ($M_z = M_0$).

Temps de relaxation transversale (T_2) correspond au temps caractéristique de décroissance de l'aimentation transversale après perturbation ($M_y = 0$).

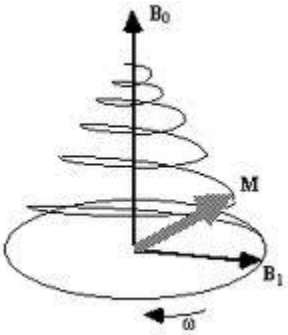


Figure 1.10. *Schéma de relaxation T_1 et T_2.*

Ces valeurs de T_1 et T_2 dépendent de l'intensité du champ magnétique B_0, mais aussi de la micro-viscosité du milieu, de la masse et de la taille des molécules constituants le tissu biologique. Ces valeurs sont plus longues dans les tissus les plus complexes comme les muscles et le foie et sont plus courtes dans les milieux fluides tels que le sang et le liquide céphalo-rachidien.

L'IRM fonctionnelle repose sur le même principe physique que l'IRM classique. Elle est basée sur l'observation en temps réel des variations d'oxygénation sanguine sans injection d'un traceur radioactif.[27] C'est une version moderne de l'IRM qui détecte l'oxygène consommé par les neurones, il sera possible de voir les neurones fonctionner en demandant au sujet de réaliser certaines tâches cognitives durant l'examen (ex : calcul mental, regard, bouger un membre…). Les images IRMf obtenues permettront de préciser quelle zone du cerveau fonctionne dans telle ou telle circonstance. Le domaine de l'IRMf s'intéresse exclusivement au cerveau, et reste du domaine de la recherche en neurologie, en neuropsychologie et en neuropsychiatrie.

3.1. Agents de contraste

Les produits de contraste sont des agents d'imagerie médicale utilisés en IRM. Ils permettent d'augmenter le signal observé en accélérant les vitesses de relaxation magnétique $1/T_1$ et $1/T_2$ des protons des molécules d'eau présents dans la zone étudiée. A peu prés 40% des images IRM sont enregistrées après injection d'un agent de contraste. Ces agents sont le plus souvent des complexes de métaux de transitions (Fe^{3+}, Mn^{2+}) ou d'ions lanthanide paramagnétique (Gd^{3+}). La Figure 1.11 présente des clichés IRM du cerveau d'un patient qui montre la différence entre une IRM sans et avec agent de contraste. Nous voyons clairement la présence d'une tumeur, tache claire à la base de l'hémisphère gauche du cerveau après l'injection d'un agent de contraste.

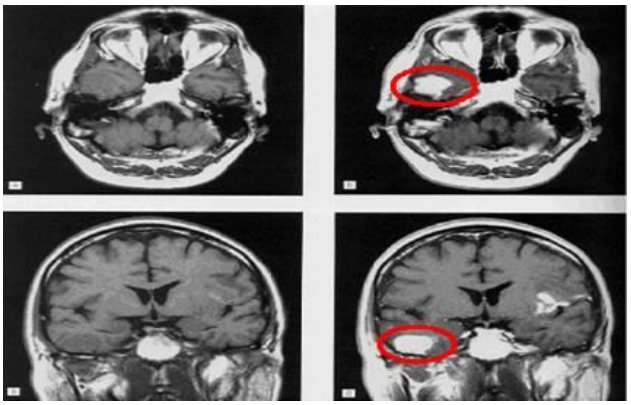


Figure 1.11. *Exemple de cliché IRM avant (à gauche) et après utilisation d'un agent de contraste (à droite).*

De nombreux agents de contraste ont été développés ces dernières années et plusieurs d'entre eux sont commercialisés. 95% des agents de contraste sont à base de gadolinium. [28, 29] L'efficacité d'un agent de contraste à diminuer le temps de relaxation des molécules d'eau se nomme la relaxivité et est défini par l'équation suivante :

$$(1/Ti)_{para} = r_i\,[Ln] \quad i = 1, 2$$

r_1 : relaxivité longitudinale et r_2 : relaxivité transversale (exprimé en $mmol^{-1}\,L\,s^{-1}$).

[Ln] : concentration totale en espèce paramagnétique exprimé en $mmol\,L^{-1}$.

Les agents de contraste sont de type T_1 ou de type T_2 selon qu'ils affectent la vitesse de relaxation longitudinale, $1/T_1$ ou transversale, $1/T_2$. L'intensité du signal augmente lorsque $1/T_1$ augmente et diminue lorsque $1/T_2$ augmente. Dans ce manuscrit, nous allons nous intéresser aux agents de contraste de type T_1, en particulier les complexes de Gd(III). Les mécanismes de relaxivité mis en jeu dans les complexes de gadolinium seront décrits dans le chapitre IV. Le Tableau 1.3 présente quelques agents de contraste utilisés actuellement pour le diagnostic médical.

Formule chimique	***Nom commerciale***	***Relaxivité r_1($mmol^{-1}.L.s^{-1}$)***
$[Gd(DTPA)(H_2O)]^{2-}$	Magnevist	4,3
$[Gd(DOTA)(H_2O)]^{-}$	Dotarem	4,2
$[Gd(DTPA\text{-}BMA)(H_2O)]$	Omniscan	4,39
$[Gd(DTPA\text{-}BMEA)(H_2O)]$	Optimark	4,3
$[Gd(EOB\text{-}BMEA)(H_2O)]^{-}$	Primovist(Eovist)	5,38
$[Gd(HP\text{-}DO3A)(H_2O)]$	ProHance	3,7*
$[Gd(DO3A\text{ -butrol})(H_2O)]$	Gadovist	5,6
$[Gd(BOPTA)(H_2O)]^{2-}$	MultiHance	5,2

*Valeur mesurée à 40 °C.

Tableau 1.3. *Relaxivité à 20 MHz, pH = 7,34 et à 25 °C des principaux agents de contraste commerciaux.*[30]

La dose maximale d'agent de contraste injectée est limitée par la stabilité de ce dernier une fois dans l'organisme. Des doses standards de 0,1 mM/kg de masse corporelle sont utilisées mais la relaxivité obtenue est ≤ 5 mM^{-1} s^{-1}, ce qui ne produit pas un contraste suffisant pour des applications en IRM. Dans ce but, nous nous sommes intéressés à développer des nouveaux chélateurs de Gd(III) de forte stabilité en milieu physiologique, possédant une bonne relaxivité afin d'améliorer le contraste.

Sur la base des performances clés attendues d'une méthode d'imagerie que sont la résolution spatiale, la résolution temporelle et la sensibilité de détection, chaque technique d'imagerie présente des avantages et des inconvénients justifiant leurs utilisations dans des domaines différents (Tableau 1.4).

Technique s d'imagerie	***Sensibilité (M)***	***Résolution Spatiale (mm)***	***Temporelle***
TEP	10^{-11} - 10^{-12}	Clinique = 6 - 10	+
TEMP	10^{-10} - 10^{-11}	µTEMP : 0,5 - 2 TEMP clinique : 7 - 15	+
IRM	10^{-3} - 10^{-5}	Petit animal = 0,01 - 0,1 Clinique = 0,5 - 1,5	++

Tableau 1.4. *Comparaison des performances techniques de différentes modalités d'imagerie.*

Les techniques d'imagerie nucléaire (TEP et TEMP) présentent la plus grande sensibilité par rapport à l'IRM mais leurs résolutions temporelles sont mauvaises et c'est ce qui limite leur utilisation dans quelques applications.

4. Chélateurs bifonctionnels pour la complexation du ^{64}Cu

Du fait de ses propriétés nucléaires et en particulier de son long temps de demi-vie, le ^{64}Cu présente un fort intérêt en imagerie TEP, qui justifie le nombre croissant d'études qui lui sont consacrées. Son utilisation nécessite qu'il soit incorporé dans un chélateur bifonctionnel (CBF) qui permet d'une part, de fixer le radio-isotope et d'autre part, de créer une liaison covalente avec une biomolécule vectrice, généralement des substrats pour des récepteurs surexprimés dans certaines pathologies, en particulier le cancer (Figure 1.12).

Figure 1.12. *Schéma général d'un chélateur bifonctionnel.*

Le chélateur bifonctionnel doit répondre à un certain nombre de critères :

- Stabilité thermodynamique très élevée du complexe du ^{64}Cu
- Cinétique de coordination du ^{64}Cu rapide (quelques minutes) et à des concentrations très faibles (10^{-6} à 10^{-9} M).
- Inertie cinétique très élevée afin d'éviter les phénomènes de transmétallation et de relargage du ^{64}Cu *in vivo* ainsi que sa réduction en présence des réducteurs biologiques.
- Coordination sélective du ^{64}Cu en présence d'autres contaminants métalliques (Zn, Co, Ni).
- Coordination du ^{64}Cu à des températures moyenne (20 à 37°C) afin d'éviter d'endommager les agents de ciblage (dégradation des protéines).

Les chélateurs du ^{64}Cu les plus développés sont des ligands acycliques de type polyaminocarboxylate ou macrocycliques de type tétraaza-polyaminocarboxylate et polyaminophosphonate. Cependant, ces chélateurs du cuivre(II) peuvent présenter une stabilité modeste *in vivo*, une faible stabilité vis-à-vis d'un milieu acide ou subissent un phénomène de réduction qui conduit à la dissociation du métal (Figure 1.13).[31]

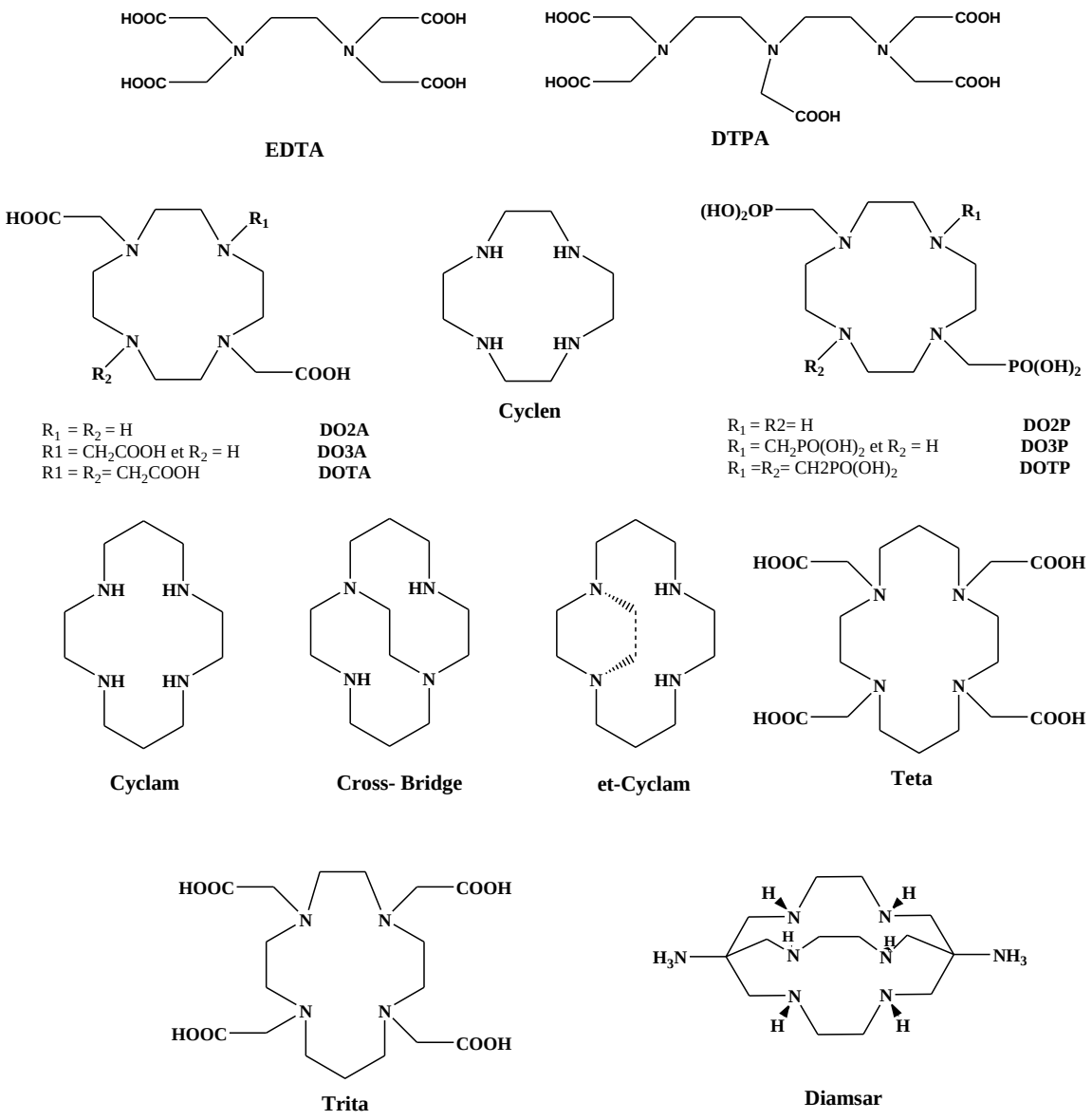


Figure 1.13. *Exemple de chélateurs bifonctionnels du ^{64}Cu.*

4.1. Stabilité thermodynamique

L'équilibre de complexation d'un métal par un ligand peut s'écrire selon l'équation suivante :

$$M_m + nL \underset{\leftarrow}{\rightarrow} M_m L_n$$

n et *m* correspondent aux coefficients stœchiométriques du métal et du ligand symbolisés par les lettres M et L respectivement.

La constante de stabilité thermodynamique de cet équilibre est donnée par la réaction :

$$\beta^0_{M_m L_n} = \frac{[\mathrm{M}_m \mathrm{L}_n]}{[\mathrm{M}]^m [\mathrm{L}]^n}$$

Pour m = n = 1 on utilise généralement la constante $K_{ML} = \beta^0_{11}$

Notons d'autre part que la connaissance de la stabilité des différents complexes métalliques ne permet pas de comparer directement l'affinité des ligands ayant des propriétés acido-basiques et une denticité différentes. Pour cela, Raymond et al. ont introduit la notion de pM, grandeur définie par la relation : $pM = - \log[M]_{libre}$

La concentration en métal libre non complexé est déterminée par la méthode de calcul par spéciation dans des conditions de pH et de concentrations données. Plus la valeur du pM est élevée, plus le ligand à une forte affinité pour le métal.[32]

De nombreuses études ont été consacrées aux propriétés de coordination du cuivre(II).[33,31] L'un des critères principaux pour le choix d'un CBF est la formation de complexes de Cu(II) thermodynamiquement très stables. La stabilité des complexes métalliques est représentée par le log*K* qui varie de 2 à 28 unités pour de très faibles à de très fortes constantes de stabilité. Le Tableau 1.5 représente les constantes de stabilité thermodynamique $\log K_{ML}$ de complexes de Cu(II) formés avec quelques ligands décrits dans la littérature.[36 - 41, 50] On observe que la structure des ligands influence la constante de stabilité du complexe formé et suit la séquence suivante : cages hexaazotés > tetrazamacrocycles polyaminophosphonatés > tetrazamacrocycles polyaminocarboxylatés > ligands à chaine ouverte polyaminocarboxylatés.

Certaines études se sont orientées vers les ligands macrocycliques et ont montré que cette famille de ligand forme des complexes de Cu(II) plus stables par rapport à leurs analogues linéaires à chaine ouverte.[34] Cette famille de ligand permet de modifier le nombre de groupements méthylène entre les atomes d'azote ou encore de créer des bismacrocycles comme pour diamsars ou les composés "cross briged" (Figure 1.13).

Ligands	log K_{CuL}
DTPA [35]	21,4
EDTA [36]	18,8 19,2
Cyclen [37]	24,6
Cyclam [38]	27,2
DO2P [39] DO3P [40] DOTP [40]	28,7 26,9 26,2
DO2A [40] DO3A [40] DOTA [40]	18,9 22,87 22,2 22,7
TETA[47]	21,1 21,9

Tableau 1.5. *Constante de stabilité de quelques complexes de Cu(II) déjà décrits dans la littérature.* [36-41, 50]

4.2. Inertie cinétique

L'inertie cinétique des complexes de Cu(II) vis-à-vis de la démétallation est un paramètre très important qu'il faut prendre en compte. Plus l'inertie cinétique est élevée, plus le risque de la démétallation et de transchélation est faible. Certaines études ont montré que les cinétiques de formation des complexes obtenus avec les ligands macrocycliques sont généralement plus lentes que celles des ligands acycliques.[41] Cela peut être expliqué par l'effet de la taille de la cavité et son degré de protonation, c'est l'exemple du complexe de Gd(III) formé avec le DOTA ou le TRITA (Figure 1.13) où le complexe ML est formé au bout de deux jours, tandis que le complexe protoné MLH se forme beaucoup plus lentement sur une période de 13 jours.[42, 43]

La vitesse de formation des complexes métalliques augmente lorsque le cyclen ou le cyclam portent des bras pendants coordinants (acétate ou méthylphosphonate). L'introduction des groupements acétates sur le macrocycle facilite la complexation du métal en raison d'une interaction électrostatique favorable.[44] La substitution des fonctions acétates par des groupements méthylphosphonates augmente la vitesse de complexation.[45, 46]

La cinétique de dissociation des complexes métalliques peut être facilitée par la présence d'un agent compétiteur tels que le proton, des cations métalliques ou d'autres ligands. Les mesures de temps de demi-vie du complexe en milieu acide nous permettent d'évaluer son inertie cinétique et de comparer les vitesses de dissociation entre les complexes. Le Tableau 1.6 montre quelques exemples des vitesses de dissociation des complexes de Cu(II) en milieu acide.[43]

Complexes de Cu(II)	***Température (°C)***	***Concentration d'acide***	$t_{1/2}$
Cu-DOTA	90	5 M HCl	< 3 min
Cu-TETA	90	5 M HCl	4,5 min
Cu-CB-Cyclam	90	5 M HCl	11,7 min
		12 M HCl	< 3 min
Cu-CB-TE2A	90	5 M HCl	145 h
		12 M HCl	1,62 h
Cu-CB-DO2A	90	5 M HCl	< 3 min
Cu-Cyclam	25	5 M HCl	20,9 min
Cu-TE2P	25	5 M HCl	2,5 min
Cu-Cyclen	25	5 M HCl	45,5 min
Cu-Diamsar	25	4 M HCl	> 6 mois

Tableau 1.6. *Vitesse de dissociation de quelques complexes de Cu(II) en milieu acide.*[47,48,49]

Les données présentées dans le Tableau 1.6 montrent que les complexes [Cu(CB-TE2A)], [Cu(CB-cyclame)] et [Cu(cyclame)] sont les plus inertes ainsi que le complexe [Cu-(3,6,10,13,16,19-hexaazabicyclo[6.6.6]eicosane-1,8-diamine)] (diamsar) où le cuivre(II) est entièrement encapsulé dans une cage tricyclique.[50]

La stabilité et l'inertie cinétique exceptionnelles des complexes de Cu(II) formés avec les ligands macrocycliques en font de très bons candidats pour des applications en imagerie médicale. Néanmoins, les principaux inconvénients avec ce type de ligand proviennent du fait qu'ils ne possèdent pas de fonctions de greffage pour les biomolécules et que la cinétique de complexation est extrêmement lente. L'obtention de ces complexes nécessite un chauffage

pendant plusieurs heures (t = 12 à 24 h), ce qui peut endommager le matériel biologique.[51,52, 53]

4.3. Propriétés électrochimiques

Une autre voie de dissociation des complexes de Cu(II) est la réduction du radioélément en présence de réducteurs biologiques. L'inertie des complexes de Cu(II) sera donc liée à la difficulté de réduire le Cu(II) en Cu(I). Ce mode de dissociation est la cause de la dissociation des complexes de cuivre(II) formés avec le ligand bis(thiosemicarbazone) et la libération du ^{64}Cu(II) dans les cellules hypoxiques (Figure 1.14).[54, 55]

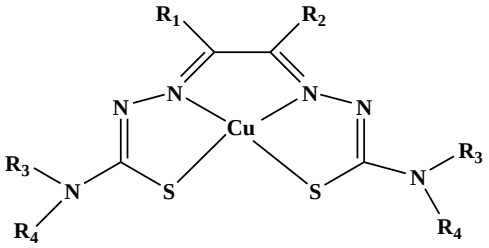


Figure 1.14 . *Complexe Cu^{2+}-bis(thiosemicarbazone).*

Des études électrochimiques ont montré que les dérivés du cyclen sont plus facilement réductibles que les dérivés du cyclam. Les voltampérogrammes enregistrés pour les complexes Cu^{2+}- CB-DO2A et Cu^{2+}- TETA présentent des systèmes irréversibles, tandis que le complexe Cu^{2+}-DOTA montre un large pic de réduction vers -1,00 V (Ag/AgCl) et un pic d'oxydation vers -0,39 V. Le complexe Cu^{2+}- CB-TE2A, quant à lui, se caractérise par un voltampérogramme quasi-réversible avec un potentiel de demi-vague situé à -1,08 V (Ag/AgCl).[43]Aucun des ligands DOTA, TETA ou CB-DO2A n'est capable de stabiliser le Cu(I). Le Tableau 1.7 rassemble les potentiels redox des complexes de Cu(II) issus de la littérature. [43,48,49]

Ligands	E_{pc} (mV)	$E_{1/2}$(NHE)	ΔE(mV)	Voltamètrie cyclique
DOTA	-	-0,74	61	quasi réversible
CB-DO2A	-0,72	-	-	irréversible
TETA	-0,98	-	-	irréversible
CB-TE2A	-	-0,88	120	quasi réversible

Tableau 1.7. *Potentiels redox des complexes de Cu(II) issus de la littérature. I = 0,1 M NaOAc ; pH = 7; ν = 100 mV s^{-1}.*

Le potentiel de réduction des complexes de Cu(II) doit être hors d'atteinte de celui des réducteurs biologiques présents dans l'organisme (Figure 1.15).

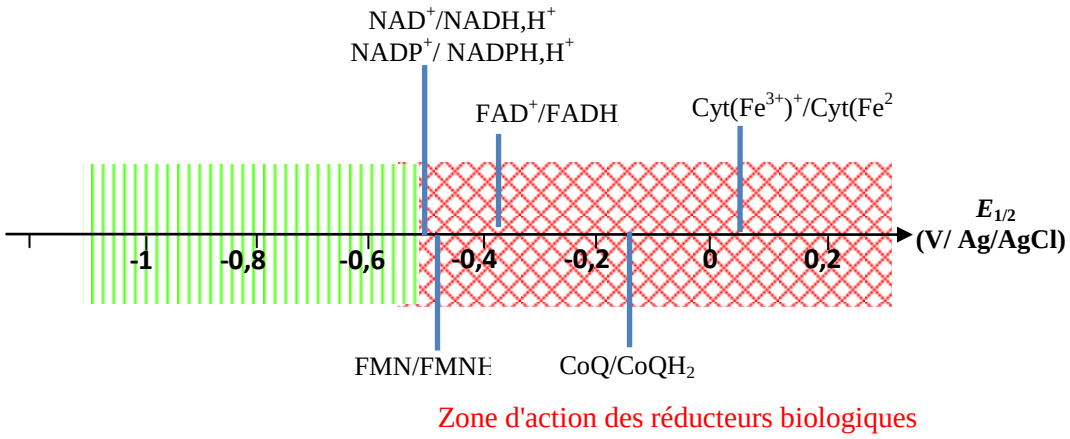


Figure 1.15. *Echelle du potentiel redox de réducteurs biologiques.*

Les réducteurs biologiques sont des coenzymes qui participent aux réactions d'oxydoréductions cellulaires en transportant des électrons ou des protons (NAD, FAD) ou uniquement des électrons (cytochrome). On distingue différents types de réducteurs :

Coenzyme nicotinique ou pyridinique : Ils sont présents dans la plupart des cellules, ils dérivent de la nicotinamide ou de la vitamine PP. On retrouve le NAD (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) et le NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide diphosphate). Le potentiel redox *E*° des couples $NAD^+/NADH,H^+$ et $NADP^+/NADPH,H^+$ est de –0,32 V/ENH soit -0,5 V/Ag/AgCl. Ce sont les coenzymes qui possèdent le potentiel le plus négatif.

Coenzyme flavinique : Ce sont des composés hydrosolubles; ils dérivent de la vitamine B_2 ou de la riboflavine. On distingue la Flavine MonoNucléotide (FMN), elle est membranaire et intervient dans le transport d'électron dans la chaine respiratoire. La Flavine Adénine Dinucléotide (FAD) cytosolique comporte un second nucléoside uni au premier par une liaison pyrophosphate. Le couple ($FAD/FADH_2$) présente un potentiel redox *E*° = –0,18 V/ENH soit -0,4 V/Ag/AgCl.

Coenzyme quinonique (coenzyme *Q*) : Ces coenzymes liposolubles sont des transporteurs d'hydrogène à partir des substrats organiques vers l'oxygène dans la chaine respiratoire mitochondriale. Le potentiel redox pour la coenzyme *Q* ou ubiquinone est de +0,04 V/ENH soit -0,16 V/Ag/AgCl.

Métalloporphyrine (Cytochrome) : Ce sont des chromoprotéines présentes dans toutes les cellules. Ils ont un rôle dans le transport séquentiel des électrons grâce au

changement de valence du fer. Les potentiels redox des cytochromes *b*, *c*, *a*, *a*3, sont de +0,33, +0,25, +0,38 et +0,55 V/ENH soit +0,12, +0,045, + 0,17 et +0,34 V/Ag/AgCl respectivement.

5. Marquage de biomolécules avec les complexes de ^{64}Cu

La seconde étape dans l'élaboration de radiotraceurs est de les amener jusqu'à leurs cibles d'intérêt. Pour cela l'utilisation d'une entité biologique ou vecteur qui va atteindre les zones cibles est nécessaire. Le vecteur peut être un peptide, un anticorps ou une autre molécule d'intérêt biologique. Le chélateur doit être chimiquement modifié pour introduire le groupement fonctionnel destiné au greffage sur la biomolécule vectrice. Ces fonctions réactives doivent avoir une grande sélectivité pour une fonction spécifique et la réaction de couplage doit être faite dans des conditions douces pour éviter la dégradation du matériel biologique.

Un grand nombre de techniques de bioconjugaison a été employé pour modifier une biomolécule vectrice par l'ajout d'un agent bifonctionnel. Les sites les plus visés sont des sites résiduels de type amine primaire en N-terminal de la chaine peptidique, des résidus lysine, des groupements thiols des cystéines et des groupements phénols de la tyrosine (Figure 1.16).[56]

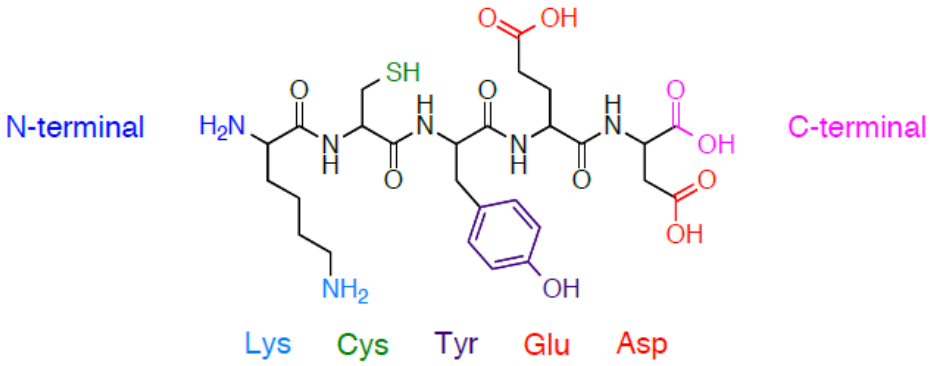


Figure 1.16 . *Principales fonctions ciblées pour le marquage des biomolécules.*

Les réactions de couplage sur la fonction acide carboxylique de l'acide aspartique ou de l'acide glutamique sont compliquées et conduisent souvent à la formation d'agrégats à cause de couplage croisées entre plusieurs protéines.

Les fonctions de greffage les plus utilisées sont des acides carboxyliques activés ou des isothiocyanates. Ils conduisent à la formation d'une liaison amide et thiourée par fixation sur les résidus amines. L'introduction d'un groupement halogéné est aussi envisageable pour un couplage via une réaction de substitution nucléophile (Figure 1.17).

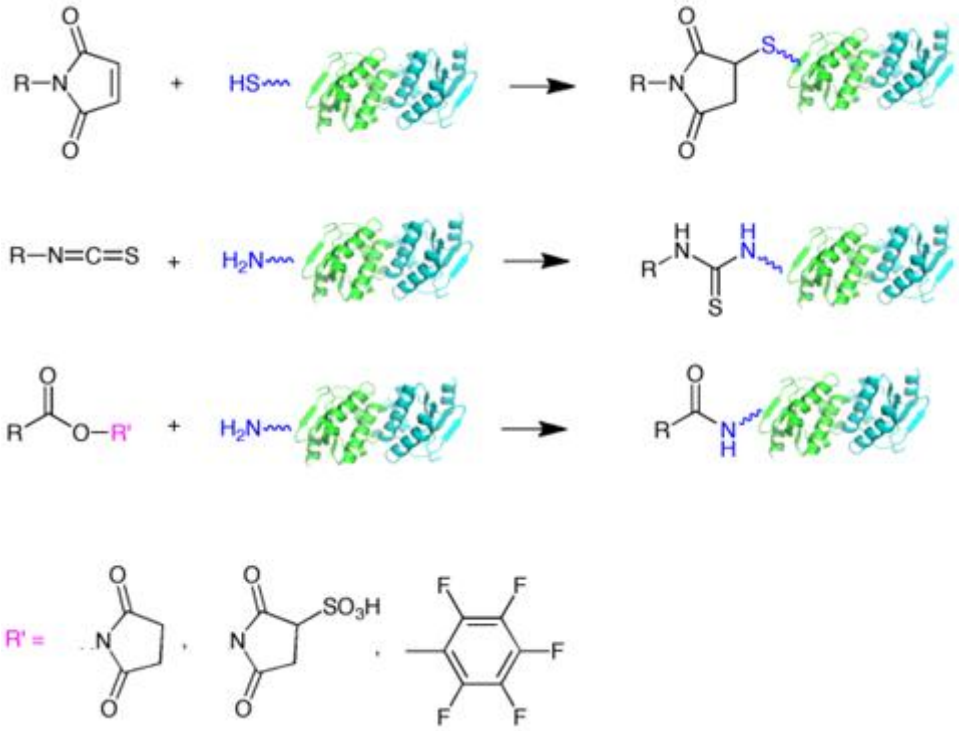


Figure 1.17. *Exemples de fonction de greffage aux biomolécules.*

Les esters activés les plus utilisés sont les esters *N*- hydroxysuccinimidyl (NHS), *N*-sulfo-hydroxysuccinimidyl (Sulfo-NHS), et pentafluorophényl.[57,58,59,60] Le principale probleme avec ces esters activés est leur hydrolyse rapide à pH neutre ou basique qui influence la réaction de coulage.

De nombreux systèmes bifonctionnels à base de macrocycles pour la complexation du ^{64}Cu ont été décrits dans la littérature. La Figure 1.18 regroupe les principaux chélateurs bifonctionnels du ^{64}Cu utilisés en imagerie médicale.[61,62,63,64]

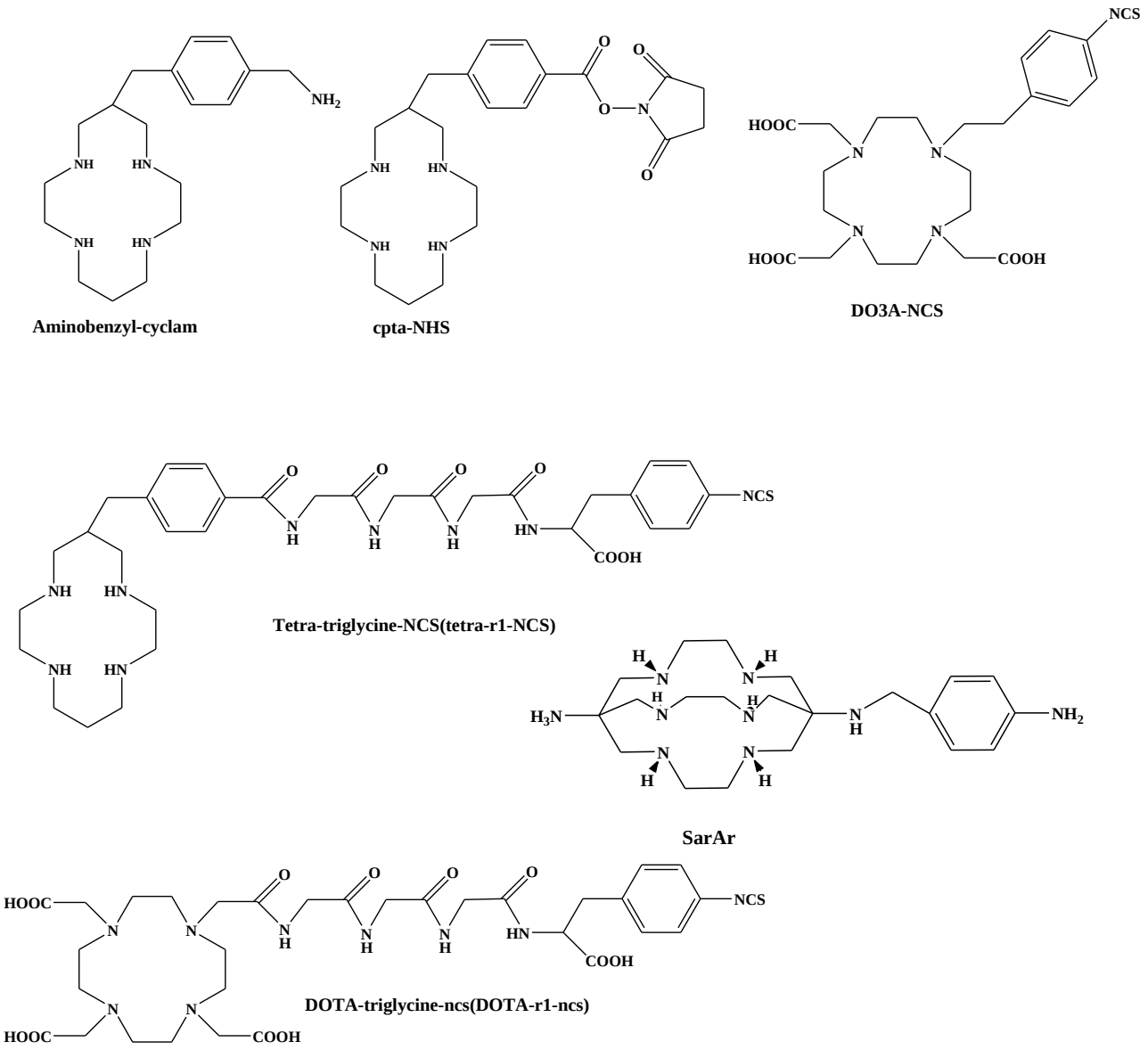


Figure 1.18. *Exemples d'agents chélateurs bifonctionnels du ^{64}Cu appliqués en imagerie médicale.*[58-61]

Le groupement isocyanate dans les CBFs DOTA et DO3A-r1-NCS et le groupement N-hydroxysuccinimide dans cpta-NHS ciblent les amines primaires des résidus lysines dans les biomolécules cibles. Le SarAr a été couplé à des anticorps en utilisant le N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide.HCl (EDC) comme agent de couplage pour activer les groupements carboxylates des résidus glutamates ou aspartates des biomolécules cibles.

Un chélateur bifonctionnel idéal pour le cuivre 64 doit complexer le métal radioactif d'une façon rapide et quantitatif à température ambiante. Le produit de couplage doit être cinétiquement très stable afin d'éviter la démétallation ou la transchélation. La coordination du ^{64}Cu doit être sélective par rapport à d'autres métaux endogènes et la réaction de couplage avec les biomolécules doit être facile à réaliser dans des conditions douces (37°C et t < 1 h) pour éviter la dégradation des biomolécules.

6. L'imagerie nucléaire dans l'approche multimodale

Le couplage des différentes techniques a permis de développer l'imagerie multimodale qui sert à visualiser l'anatomie, la fonction et l'activité d'une cible donnant accès à des informations de plus en plus précises. [65]

L'application de cette approche multimodale nécessite l'administration de deux agents de contraste, ce qui peut avoir un effet toxique sur le patient et aussi une biodistribution différentes pour les deux agents. Pour contourner ce problème, les recherches se sont orientées vers la synthèse d'un agent qui porte deux fonctions détectables par deux techniques d'imagerie différentes. Ce type d'agent est appelé : monomoléculaire ou MOMIA (MonOmolecular Multimodality Imaging Agent).[66]

L'imagerie nucléaire à été couplée à différentes techniques d'imagerie médicale tel que la tomodensitométrie, l'IRM ou l'imagerie optique. La première machine hybride TEP/CT (TEP Scan) a été conçue en 1998 par Townsend et est commercialisée depuis 2001. Elle apporte une nouvelle dimension à l'imagerie médicale, en permettant en un seul examen d'identifier et de localiser certains cancers. Les premières expériences cliniques avec la TEP/IRM suggèrent que cette méthode d'imagerie très sophistiquée possède un grand potentiel pour améliorer le diagnostic non invasif de différentes maladies (Figure 1.19).

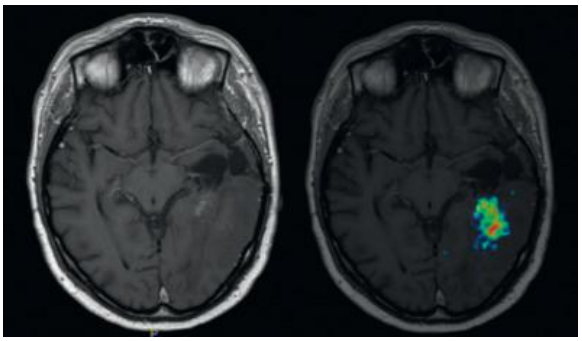


Figure 1.19. (*Gauche)IRM avec produit de contraste (gadolinium). (Droite)Fusion avec la TEP à l'éthyl-tyrosine marquée au ^{18}F spécifique pour les tissus tumoraux au niveau cérébral.*[67]

Les sensibilités comparables de l'imagerie nucléaire et de l'imagerie optique sont un argument de choix pour concevoir des agents détectables à la fois par fluorescence et par imagerie SPECT/PET. La sonde optique est utilisée pour valider et compléter les informations apportées par imagerie SPECT ou PET.[68] L'imagerie nucléaire est limitée par le temps de demi-vie du radioélément ne permettant pas de réaliser les examens sur des longues durées contrairement à la sonde optique qui peut être détectée après plusieurs jours. Les techniques (TEP/ imagerie optique) ou (SPECT/ imagerie optique) permettent une acquisition rapide des données grâce à l'imagerie nucléaire et toute évolution au cours du temps pourra être suivie par analyse optique. Cependant, l'imagerie optique est limitée par la profondeur de pénétration dans les tissus.

En conclusion, dans la première partie de ce manuscrit, nous avons apporté un bref descriptif des différentes techniques d'imagerie médicale et plus particulièrement les techniques d'imagerie nucléaire et l'IRM ainsi que les différents agents de diagnostique et thérapeutique utilisés.

Une deuxième partie de ce manuscrit sera consacrée à la synthèse et à l'étude physicochimique d'une nouvelle famille de ligand acyclique de type polyaminophosphonaté destiné à la complexation du cuivre 64 pour l'imagerie TEP et du gadolinium(III) pour l'IRM.

Dans une dernière partie, nous présenterons les différents essais de marquage de biomolécules et ainsi que quelques applications en imagerie sur le petit animal. Nous conclurons ce travail en faisant ressortir les principaux résultats de ces recherches ainsi que les futures perspectives.

Bibliographie

[1] Allen, M. J.; *Delivery and activation contrast agents for magnetic resonance imaging*, **2004**, Cours électronique.

[2] Montravers, F.; Nataf, V.; Balogova, S.; Kerrou, K.; Huchet, V.; Pascal, O.; Talbot, J.N. *Médecine Nucléaire*. **2009**,*33 (3)*, 152.

[3] Vallabhajosula, S. *Semin. Nucl. Med.* **2011**,*41*, 283.

[4] Pirot, S. *Apport de l'imagerie en découverte et développement*. *Neuropsychiatrie : Tendance et Débats*. **2008**, *33*, 37.

[5] Levin, C. S.; Hoffman, E. J. *Phys. Med. Biol*. **1999**, *44*, 781.

[6] Hawkins, R. A.; Hoh, C.; Glaspy, J.; Choi, Y.; Dahlbom, M.; Messa, C.; Nietszche, E.; Hoffman, E.; Seeger, L.; Maddahi, J.; Phelps, E. M. *Semin. Nucl. Med.* **1992,** *22*, 268.

[7] Stöcklin, G. *Eur. J. Nucl. Med*. **1998**, *25*, 1612.

[8] Cook, G.J.; Fogelman, I.; Maisey, M. N. *Semin. Nucl. Med*. **1996**, *26*, 308.

[9] Abouzied, M.; Crawford, E.; Nabi, H. *J. Nucl. Med. Technol.* **2005**, *33*,145

[10] Been, B.; Suurmeijer, A.; Cobben, D.; Jager, P.; Hoekstra, H.; Elsinga, P. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. **2004**, *31*, 1659.

[11] Couturier, O.; Leost, F.; Campone, M.; Carlier, T.; Chatal, J. F.; Hustinx, R. *Bull Cancer*. **2005**, *92*, 789.

[12] DeGrado, T.; Baldwin, S.; Wang, S.; Orr, M.; Liao, R.; Friedman, H.; Reiman, R.; Price, D.T.; Coleman, R. E. *J. Nucl. Med.* **2001**, *42*, 1805.

[13] Talbot, J. N.; Gutman, F.; Fartoux, L.; Grange, J. D.; Ganne, N.; Kerrou, K.; Grahek, D.; Montravers, F.; Poupon, R.; Rosmorduc, O. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* **2006**, *33*, 1285.

[14] *Guidance for industry: developing medical imaging drug and biological products. Part 1: Clinical indications.* June **2004**, http://www.fda.gov.

[15] *Guideline on clinical evaluation of diagnostic agents. Committee for medicinal products for human use (CHMP).* 23 July **2009** EMA; http://www.ema.europa.

[16] Lambrecht, R. M.; Sajjad, M. *Radiochim. Acta.* **1988**, *43*, 171.

[17] Mirzadeh, S.; Lambrecht, R. M. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **1996**, *202*, 7.

[18] Zhernosekov, K. P.; Filosofov, D. V.; Baum, R. P.; Aschoff, P.; Bihl, H.; Razbash, A. A.; Jahn, M.; Jennewein, M.; Roesch, F. *J. Nucl. Med.* **2007**, *48*, 1741.

[19] Kim, J. Y.; Park, H.; Lee, J. C.; Kim, K. M.; Lee, K. C.; Ha, H. J.; Choi, T. H.; An, G. I.; Cheon, G.J. *Appl. Radiat. Isot.* **2009**, *67*, 1190.

[20] Le, V. S.; Howse, J.; Zaw, M.; Pellegrini, P.; Katsifis, A.; Greguric, I.; Weiner, R. *Appl.Radiat. Isot.* **2009**, *67*, 1324.

[21] Hou, X.; Jacobsen, U.; Jorgensen, J. C. *Appl. Radiat. Isot*, **2002**, *57*, 773.

[22] Hermanne, A.; Tarkanyi, F.; Takacs, S.; Kovalev, S. F.; Ignatyuk, A. *Nucl. Instrum. Methods. Phys. Res. Sect. B.* **2007**, *258*, 308.

[23] McCarthy, D. W.; Shefer, R. E.; Klinkowstein, R. E.; Bass, L. A.; Margeneau, W. H.; Cutler, C. S.; Anderson, C. J.; Welch, M. J. *Nucl. Med. Biol.* **1997**, *24*, 35.

[24] Szajek, L. P.; Meyer, W.; Plascjak, P., Eckleman, W. C. *Radiochim. Acta.* **2005**, *93*, 239.

[25] Novak-Hofer, I.; Schubiger, P. A. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* **2002**, *29*, 821.

[26] Obata, A.; Kasamatsu, S. ; McCarthy, D. W.; Welch, M. J.; Saji, H. ;Yonekura, Y.; Fujibayashi, Y. *Nucl. Med. Biol.* **2003**, *30*, 535.

[27] Belliveau, J.W.; Kennedy, D. N. J. r.; McKinstry, R.C.; Buchbinder, B. R.; Weisskoff, R. M.; Cohen, M. S.; Vevea, J. M.; Brady, T. J.; Rosen, B. R. *Science*. **1991**, *254*, 716.

[28] Caravan, P. *Chem. Soc. Rev*, **2006**, *35*, 512.

[29] Toth, E.; Merbach, *A.The chemistry of contrast agents in medical magnetic resonance imaging*. John Wiley & Son, Ltd, Chichester; **2001**.

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

[31] Smith, S.V. *J. Inorg. Bio. chem.* **2004**, *98*, 1874.

[32] Harris, W. R.; Raymond, K. N.; Weitl, F. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2667.

[33] Woodin, K. S.; Heroux, K. J.; Boswell, C. A.; Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Niu, W.; Tomellini, S. A.; Anderson, C. J.; Zakharov, L. N.; Rheingold, A. L. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, 4829.

[34] Cabbiness, D.K.; Margerum, D.W. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 2151.

[35] Martell, A.E.; Smith, R.M. *Critical Stability Constants*; Plenum Press: New York. **1982**.

[36] (a) Martell, A.E.; Smith, R.M.; Eds.; *Critical Stability Constants, Vol. 1: Amino Acids*; Plenum Press: New York, **1974**. (b) Delgado, R.; De Carmo, F.M.; Quintino, S. *Talanta.* **1997**, *45*, 451.

[37] Smith, R.M.; Martell, A.E. *Critical Stability Contants*; Plenum Press: New York, **1989**.

[38] Wong, E.H.; Weisman, G.R.; Hill, D.C.; Reed, D.P.; Rogers, M.E.; Condon, J.P.; Fagan, M.A.; Calabrese, J.C.; Lam, K.C.; Guzei, I.A.; Rheingold, A.L. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10561.

[39] Sun, X.; Wuest, M.; Dovacs, Z.; Dean Sherry, A.; Motekaitis, R.; Wany, Z.; Martell, A.E.; Welch, M.J.; Anderson, C.J. *J. Biol. Chem.* **2003**, *8*, 217.

[40] (a) Delgado, R.; Frausto da Silva, J.J.R. *Talanta.* **1982**, *29*, 815. (b) Chaves, S.; Delgado, R.; Da silva, J.J.R.F. *Talanta.* **1992**, *39*, 249. (c) Martell, A.E.; Motekaitis, R.J.; Clarke, E.T.; Delgado, R.; Sun, Y.; Ma, R. *Supramol. Chem.* **1996**, *6*, 353.

[41] Kaden, T. *Helv. Chim. Acta.* **1970**, *53*, 617.

[42] Clarke, E. T.; Martell, A. E. *Inorg. Chim. Acta.* **1991**, *190*, 27.

[43] Clarke, E. T.; Martell, A. E. *Inorg. Chim. Acta.* **1991**, *190*, 37.

[44] Liang, X.; Sadler, P. J. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 246.

[45] Kotek, J.; Lubal, P.; Hermann, P.; Cisarová, I.; Lukes, I.; Godula, T.; Svobodová, I.; Táborsky, P.; Havel. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 233.

[46] Svobodová, I.; Havlicková, J.; Plutnar, J.; Lubal, P.; Kotek, J.; Hermann, P. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2009**, 3577.

[47] Woodin, K. S.; Heroux, K. J.; Boswell, C. A.; Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Niu, W. J.; Tomellini, S. A.; Anderson, C. J.; Zakharov, L. N.; Rheingold, A. L. *Eur. J. Inorg. Chem*. **2005**, 4829.

[48] Hay, R. W.; Pujari, M. P. *Inorg. Chim. Acta.* **1985**, *100*, L1.

[49] Chen, L. H.; Chung, C. S. *Inorg. Chem.* **1988**, *27*, 1880.

[50] Anderson, C. J.; Wadas, T. J.; Wong, E. H.; Weisman, G. R. Q. *J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. **2008**, *52*, 185.

[51] Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Hill, D. C.; Reed, D. P.;Rogers, M. E.; Condon, J. S.; Fagan, M. A. ; Calabrese, J. C.; Lam, K. C.; Guzei, I. A.; Rheingold, A. L. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 10561.

[52] Heroux, K. J.; Woodin, K. S.; Tranchemontagne, D. J.; Widger, P. C. B.; Southwick, E.; Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Tomellini, S. A.; Wadas, T. J.; Anderson, C. J.; Kassel, S.; Golen, J. A.; Rheingold, A. L. *Dalton Trans*, **2007**, 2150.

[53] Odendaal, A. Y.; Fiamengo, A. L.; Ferdani, R.; Wadas, T. J.; Hill, D. C.; Peng, Y.; Heroux, K. J.; Golen, J. A.; Rheingold, A. L.; Anderson, C. J.; Weisman, G. R.; Wong, E. H. *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 3078.

[54] Dearling, J. L. J.; Blower, P. J. *Chem. Commun.* **1998**, 2531.

[55] Blower, P. J.; Castle, T. C.; Cowley, A. R.; Dilworth, J. R.; Donnelly, P. S.; Labisbal, E. Sowrey, F. E.; Teat, S. J.; Went, M. J. *Dalton Trans*, **2003**, 4416.

[56] Hermanson, G. T. *Bioconjugate . Techniques*; *Academic press*. **1996**.

[57] Mease, R. C.; Mausner, L. F.; Srivastava, S. C. US5428156A. **1995**.

[58] Mukai, T.; Namba, S.; Arano, Y.; Ono, M.; Fujioka, Y.; Uehara, T.; Ogawa, K.; Konishi, J.; Saji, H. *J. Pharm. Pharmacol*. **2002,** *54*, 1073.

[59] Li, C.; Winnard, P. T.; Takagi, T.; Artemov, D.; Bhujwalla, Z. M. *J. Am. Chem. Soc*. **2006,** *128*, 15072.

[60] Kovacs, Z.; De Leon-Rodriguez, L. M. *Bioconjug. Chem*. **2008,** *19*, 391.

[61] Fichna, J.; Janecka, A. *Bioconjug. Chem*. **2003**, *14*, 3.

[62] Blower, P.J.; Lewis, J. S.; Zweit, *J. Nucl. Med. Biol*. **1996**, *23*, 957.

[63] Di Bartolo, N.; Sargeson, A.M.; Donlevy, T. M.; Smith, S.V. *J. Chem. Soc., Dalton. Trans*. **2001**, 2303.

[64] Anderson, C. J.; Connett, J. M.; Schwarz, S.W.; Rocque, P.A.; Guo, L.W.; Philpott, G.W.; Zinn, K. R.; Meares, C.F.; Welch, M.J. *J. Nucl. Med*. **1992**, *33*, 1685.

[65] Lee, S.; Chen, X. Y. *Mol. Imaging.* **2009**, *8*, 87.

[66] Jennings, L. E.; Long, N. J. *Chem. Commun.* **2009**, 3511.

[67] Felix, P.K. Highlights 2011: Médecine nucléaire. Forum Med Suisse. **2012**,*12*.

[68] Culver, J.; Akers, W.; Achilefu, S. *J. Nucl. Med.* **2008**, *49*, 169.

Chapitre II

Synthèse des ligands polyaminophosphonatés

Jusqu'à présent, la plupart des chélateurs bifonctionnels du cuivre(II) sont des dérivés de cyclam et de cyclen ou des chaines ouvertes de type polyaminophosphonate ou polyamino-carboxylate. [1] Les structures macrocycliques se caractérisent par des constantes de stabilité très élevées par rapport aux ligands acycliques, mais présentent également des inconvénients majeurs comme leurs protocoles synthétiques compliqués, une cinétique de complexation parfois lente et une plus faible stabilité en milieu acide, ce qui conduit à un phénomène de réduction et à la dissociation du métal. Afin d'optimiser les critères de complexation du Cu(II); une forte stabilité des complexes de Cu(II), c'est à dire une bonne sélectivité pour le Cu(II) par rapport à d'autres interférents métalliques, une cinétique de complexation rapide et une forte inertie vis-à-vis de la réduction en Cu(I), nous avons développé une série de ligands basée sur un chromophore pyridinique fonctionnalisé en position 2 et 6 par des groupements phosphonatés dont le caractère de base dure et la charge négative élevée devraient permettre d'accroitre la stabilité des complexes.

Dans un premier temps, nous présenterons la synthèse de cette série de ligand polyaminophosphonatés. Ces ligands ne sont pas les candidats idéaux pour le développement de chélateurs du ^{64}Cu, puisqu'ils ne possèdent pas de fonction de greffage vis-à-vis de matériels biologiques et leur application au marquage restera donc limitée. Cependant, ils serviront de modèles représentatifs car ils présentent l'avantage d'être plus facilement accessibles à travers une synthèse en quelques étapes, tandis que la stratégie synthétique permettant d'accéder aux ligands bifonctionnels est beaucoup plus longue.[2] De plus, à travers la complexation et la caractérisation de leurs complexes métalliques, il nous sera possible d'évaluer l'influence du remplacement des unités de coordination carboxylate[3] par des fonctions phosphonates sur l'ensemble des propriétés de cette famille de ligands.

Afin d'améliorer la compréhension des processus de coordination de notre ligand de base **L^1**, plusieurs analogues (**L^2**, **L^3** et **L^4**) ont été synthétisés. Nous avons varié le nombre des groupements phosphonates de 2 à 4 afin de mettre en évidence leur influence sur la stabilité des complexes de cuivre(II) formés. Les structures des ligands synthétisés **L^1- L^4** sont représentées sur la Figure 2.1.

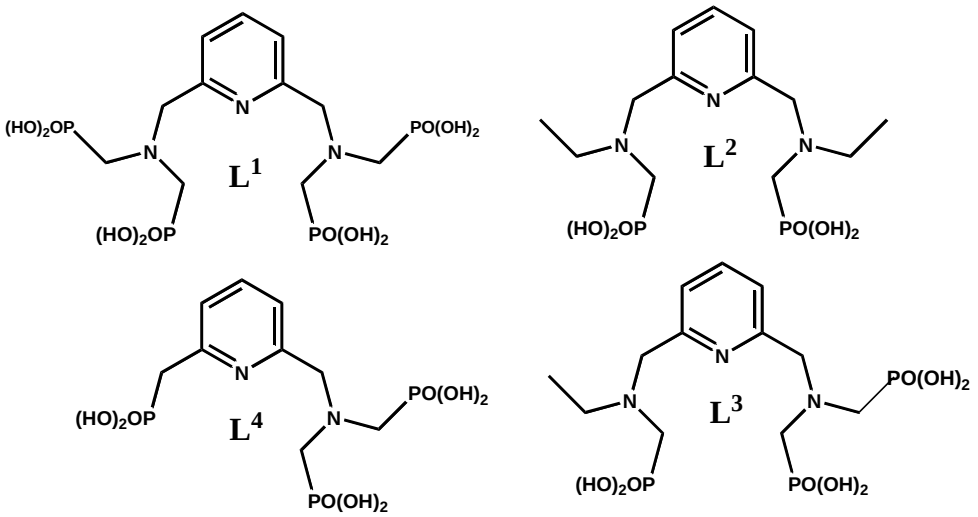


Figure 2.1. *Structure chimique des ligands* ***L***^{1}*,* ***L***^{2}*,* ***L***^{3} *et* ***L***^{4} *synthétisés*

1. Synthèses des précurseurs

L'obtention des ligands polyaminophosphonatés **L**^{1}**-L**^{4} nécessite la synthèse préalable de la plateforme pyridinique **1** qui constitue le support qui va porter les bras phosphonates, dont les précurseurs sont les composés **3** et **5**.

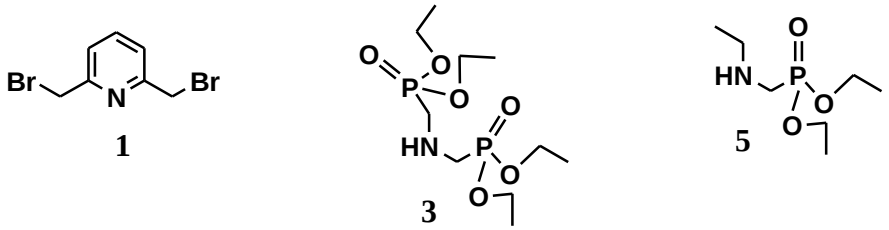


Figure 2.2. *Structures chimiques des précurseurs.*

1.1. Synthèse de la plateforme pyridinique

La première étape est la synthèse de la 2,6-dibromométhylpyridine **1**. Le dérivé 2,6-dibromométhylpyridine a été obtenu en une seule étape par réaction de PBr_3 sur la 2,6 hydroxyméthypyridine dans la DMF avec un rendement quasi quantitatif (schéma 2.1). Cette voie de synthèse à été mise au point au laboratoire et permet d'améliorer nettement le rendement de la synthèse en comparaison aux données de la littérature. [4]

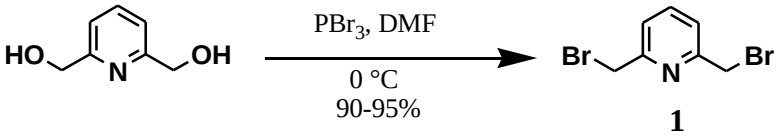


Schéma 2.1. *Synthèse de la 2,6-dibromométhylpyridine.*

1.2. Synthèse des amines mono et bisphosphonatés

L'amine bisphosphonaté **3** est synthétisée à partir de la benzylamine commerciale (Schéma 2.2). Cette dernière est engagée dans la réaction de Mannich avec le formaldéhyde,[5] qui conduit à la formation d'une imine. Cette dernière est transformée en amine secondaire par une réaction de condensation en présence du diethylphosphite ($HPO(OEt)_2$). Une seconde condensation de l'aldéhyde et de la diethylphosphite génère l'amine tertiaire (**2**). L'étape finale est une réaction d'hydrogénation catalysée par du palladium sur charbon pour conduire à l'ester tetraéthylaminobis(méthylphosphonate) souhaité **3** (schéma 2.2).[6]

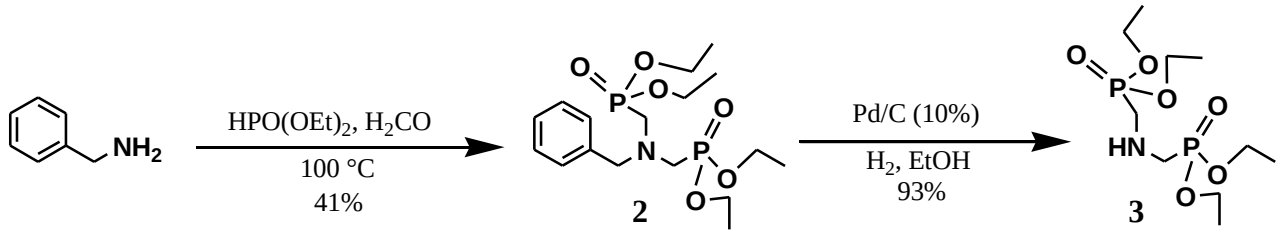


Schéma 2.2. *Schéma synthétique de la tétraéthyliminobis(méthylphosphonate).*

La tétraéthyliminobis(méthylphosphonate) a été synthétisée selon la même procédure précédente. La phosphorylation de la N-éthylbenzylamine commerciale avec le $HPO(OEt)_2$ en présence de formaldéhyde génère le composé **4**. Ce dernier est engagé dans la réaction d'hydrogénation catalytique en présence de Pd/C afin d'obtenir le composé **5** souhaité.

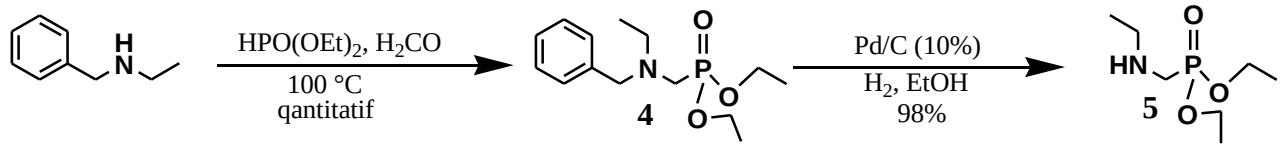


Schéma 2.3. *Schéma synthétique de la diéthyl(éthylamino)méthylphosphonate.*

2. Synthèse du ligand tetraphosphonaté L^1

Le ligand $\mathbf{L^1}$ à été synthétisé selon deux voies différentes :

<u>Première voie de synthèse</u> :

Dans cette voie de synthèse, le composé **1** est transformé en diamine correspondante **6** (Schéma 2.4).[7] La 2,6-diaminométhylpyridine **6** est engagée dans la réaction de phosphorylation avec la diethylphosphite en présence de formaldéhyde pour conduire au composé **7**. L'étape finale est la déprotection des groupements phosphonates, avec du bromotrimethysilane TMSBr dans le dichlorométhane à température ambiante suivie d'une

méthanolyse afin d'obtenir le ligand $\mathbf{L^1}H_8$ sous forme de sels hydrobromiques hydratés (Schéma 2.4).[8]

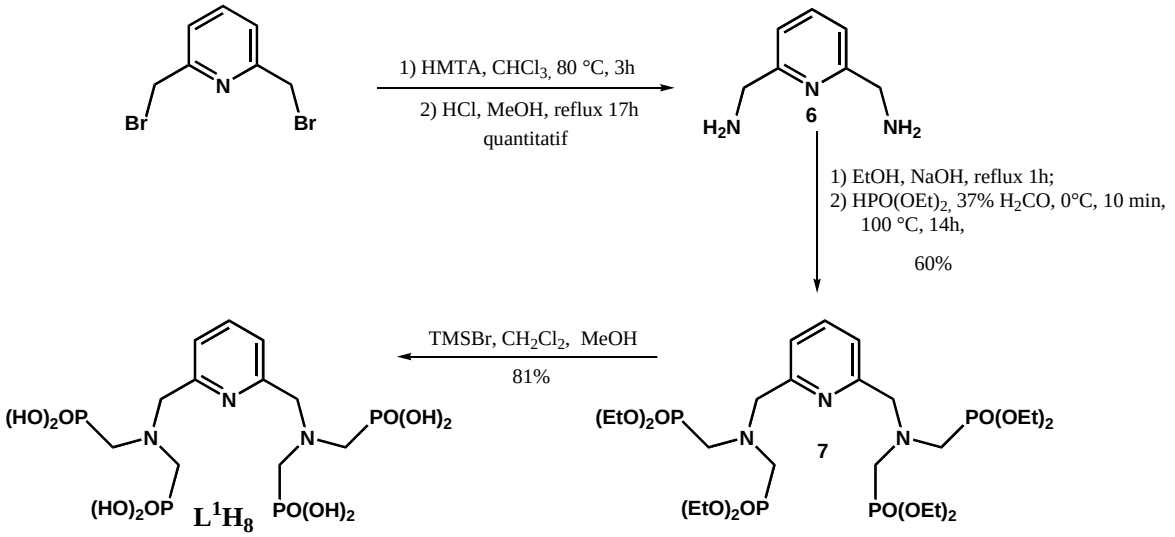


Schéma 2.4 . *Première voie de synthèse du ligand tetraphosphonaté* $\boldsymbol{L^1}$.

L'étape de phosphorylation étant parfois difficilement reproductible et aléatoire, nous avons envisagé une seconde voie de synthèse qui peut également être étendue aux dérivés non synthétiques $\mathbf{L^2}$ à $\mathbf{L^4}$.

<u>Seconde voie de synthèse</u> :

Le ligand $\mathbf{L^1}$ est obtenu selon une deuxième voie on faisant réagir la pyridine dibromé **1** avec le composé **3** dans l'acétonitrile en présence de K_2CO_3 pour donner le composé **7**. Dans cette voie de synthèse, la déprotection des groupements éthyles s'effectue en milieu HCl concentré. Malheureusement, le rendement de cette déprotection est moins bon que celui avec TMSBr (voie 1). En conclusion, nous avons effectué l'introduction des fonctions phosphonates selon la voie 2 et la déprotection des esters selon la voie 1 (TMSBr).

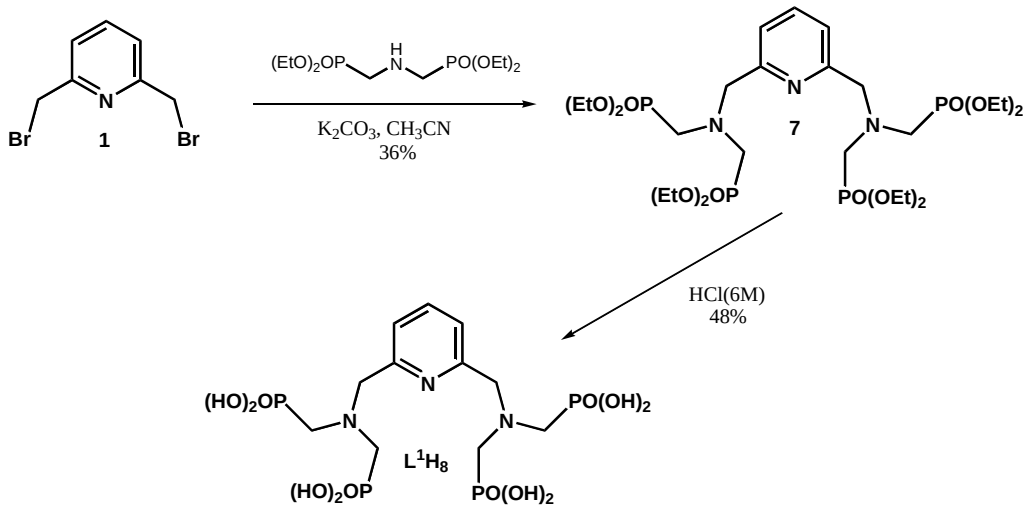


Schéma 2.5. *Seconde voie de synthèse du ligand* ***L¹***.

3. Synthèse du ligand bisphosphonaté L²

Comme le ligand tétraphosphonate **L¹**, le ligand bisphosphonaté **L²** a été également synthétisé selon deux voies :

<u>Première voie de synthèse</u> :

La synthèse de la 2,6-bis(éthylaminométhyle)pyridine, précurseur du ligand **L²**, a déjà été décrite dans la littérature.[9] La 2,6-bis(éthylaminométhyl)pyridine subit une réaction d'hydrophosphorylation avec du $HPO(OEt)_2$ en présence de formaldéhyde afin d'obtenir le composé **8**. L'étape finale, qui conduit au ligand $\mathbf{L^2}H_4$, est une déprotection des groupements phosphonates avec du TMSBr (Schéma 2.6). Cette voie de synthèse a été développée par Alexandre Lecointre au sein de notre laboratoire.

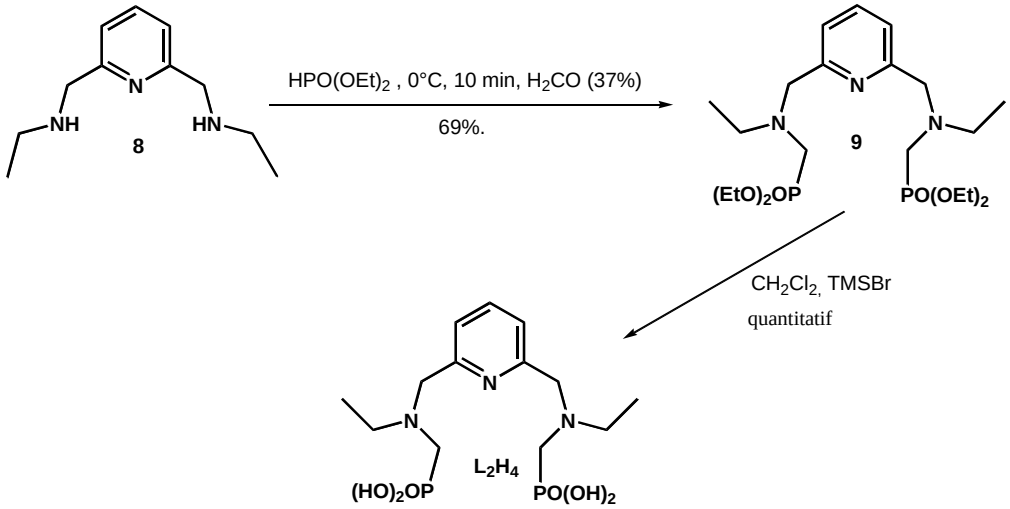


Schéma 2.6. *Première voie de synthèse du ligand bisphosphonatè* ***L²***.

La difficulté dans cette voie de synthèse est l'obtention du précurseur 2,6-bis(éthylaminométhyl)pyridine qui est accompagné de la formation de plusieurs produits secondaire difficiles à séparer par chromatographie sur colonne.

Seconde voie de synthèse :

Une voie alternative a été développée pour obtenir le ligand $\mathbf{L^2}$. La première étape de cette voie est la réaction de la pyridine dibromé avec la diéthyl (éthylamino)méthyl-phosphonate **5** dans l'acétonitrile en présence de carbonate de potassium K_2CO_3 pour donner le composé **8** avec un rendement de 24% après purification sur colonne de silice. Les groupements phosphonates de ce dernier ont été déprotégés par du TMSBr pour donner le ligand $\mathbf{L^2H_4}$ après précipitation par le diethylether avec un rendement quantitatif (Schéma 2.7).

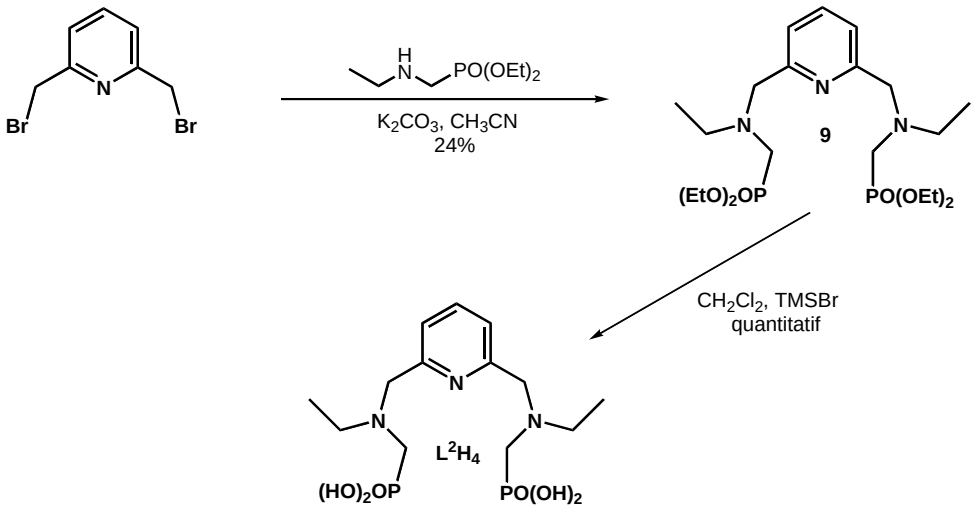


Schéma 2.7. *Seconde voie de synthèse du ligand bisphosphonaté* $\boldsymbol{L^2}$.

4. Synthèse du ligand triphosphonaté L^3

Le ligand $\mathbf{L^3}$ est obtenu à partir de la pyridine dibromé qui subi une première réaction de N-alkylation avec le composé **3** pour donner le composé **9** monobromé. Ce dernier génère le composé **10** après une deuxième réaction de N-alkylation avec cette fois ci l'amine monophosphorylée **5**. La dernière étape est la déprotection des esters phosphonique avec du TMSBr dans le CH_2Cl_2 pour obtenir le ligand $\mathbf{L^3H_6}$.

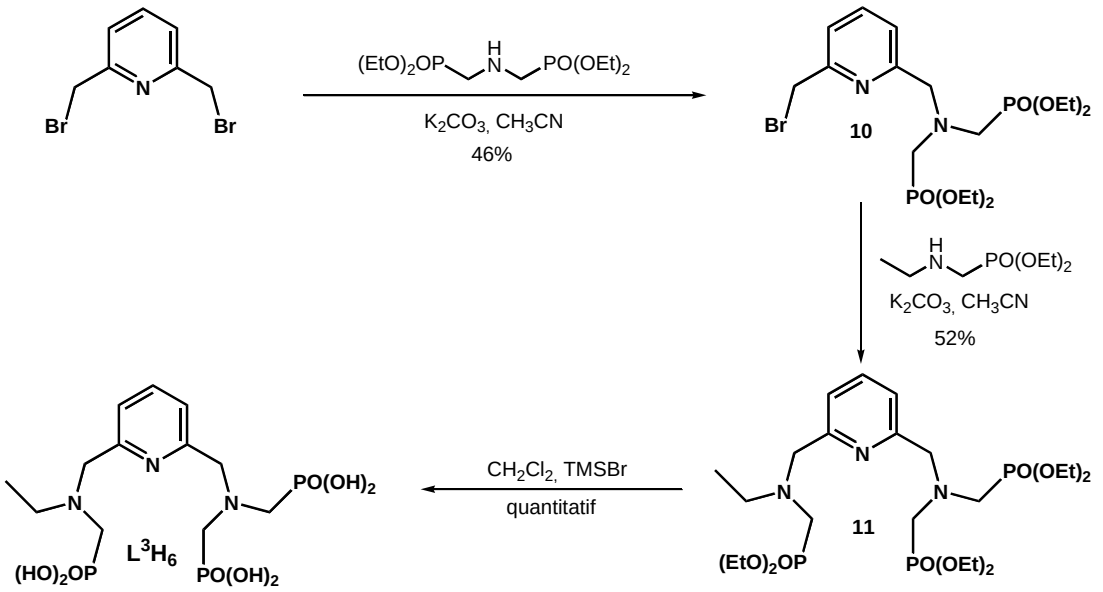


Schéma 2.8. *Synthèse du ligand triphosphonaté* ***L³***.

5. Synthèse du ligand triphosphonaté L^4

Le dernier ligand synthétisé est $\mathbf{L^4}$. La pyridine dibromée **1** subit une réaction de phosphorylation avec du triethylphosphite $P(OEt)_2$ à 135 C° afin d'obtenir la pyridine monophosphorylée **11** qui est ensuite engagée dans une réaction de N-Alkylation avec le composé **3** pour donner le composé **12**. La dernière étape est une réaction de déprotection des groupements phosphonate avec du HCl (6 M) pour donner le ligand $\mathbf{L^4H_6}$ sous forme de sels de chlorure d'ammonium.

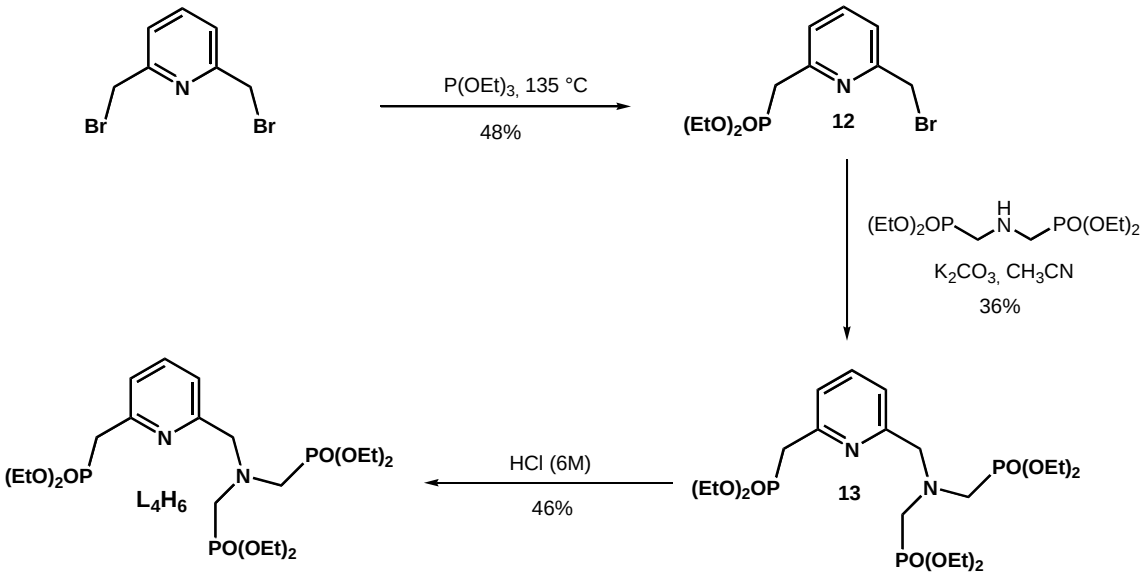


Schéma 2.9. *Synthèse du ligand triphosphonaté* ***L⁴***.

Les ligands **L^1-L^4** synthétisés ont tous été caractérisés par RMN ^{1}H, RMN ^{13}C, RMN ^{31}P, microanalyse et par spectrométrie de masse ESMS en mode négatif.

Les spectres RMN ^{1}H des ligands **L^1-L^4** se caractérisent par un dédoublement des signaux des protons en alpha du phosphore expliqué par un couplage avec l'atome de phosphore ^{31}P de spin S = 1/2. A titre d'exemple, nous détaillons ici le spectre du proton du ligand **L^3** (Figure 2.3). Les protons des –CH_2 en gamma des phosphonates sont déblindées et sortent sous la forme d'un singulet proche du pic de D_2O (4,79 ppm). Les 3 protons de la pyridine apparaissent sous la forme de deux doublets associés à un triplet à champs faibles.

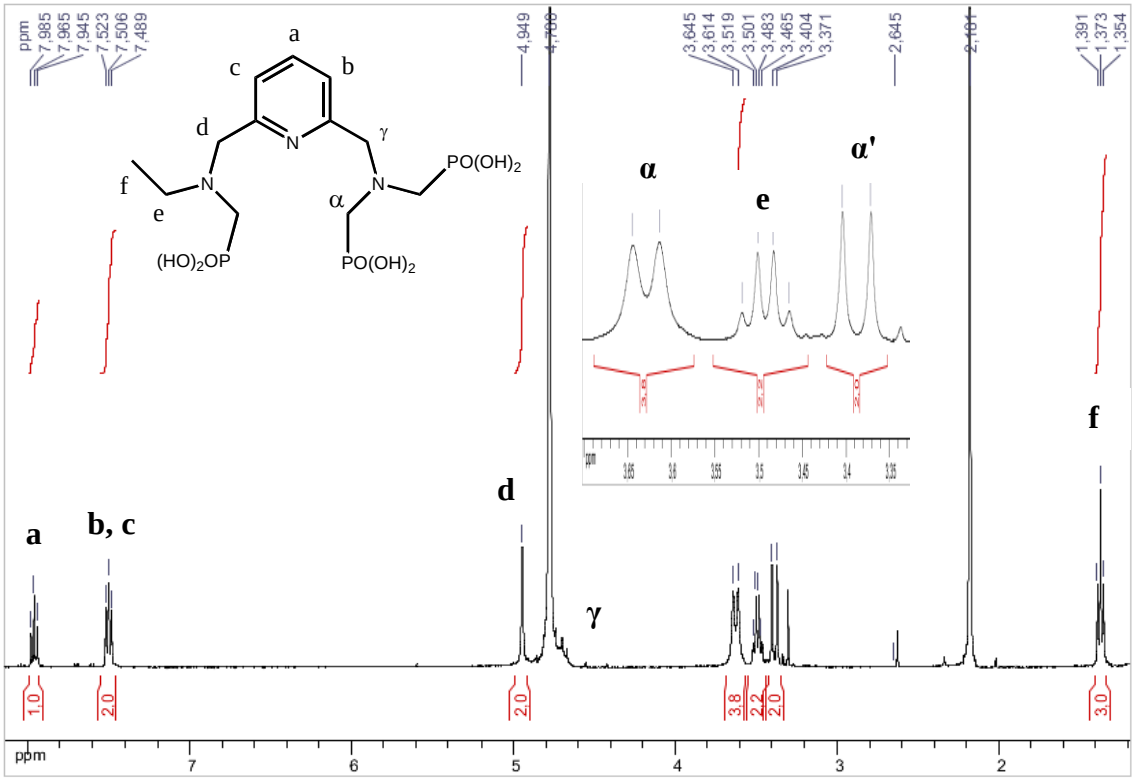


Figure 2.3. *Spectre RMN ^{1}H du ligand **L^3** (D_2O, 400 MHz, t.a.).*

Le spectre RMN du phosphore ne présente quant à lui qu'un seul pic à respectivement 7,98 et 8,37 ppm pour les ligands **L^1**, **L^2** du fait de la symétrie des deux molécules. Contrairement au ligand **L^1** et **L^2**, les spectres RMN du ^{31}P des ligands **L^3** et **L^4** qui sont asymétriques présentent deux pics à 17; 16,3 ppm et 13,65; 13,97 ppm respectivement (Figure 2.4).

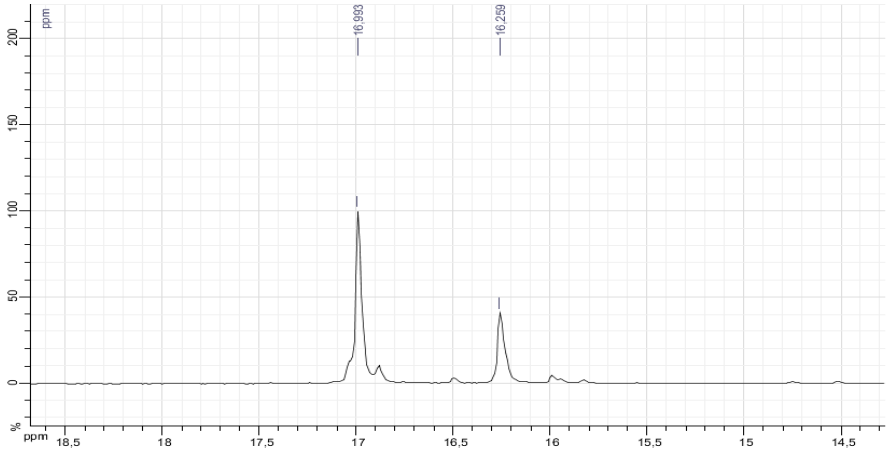


Figure 2.4. *Spectre RMN ^{31}P du ligand* ***L³*** *(D_2O, 161,9 MHz, t.a.).*

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté la synthèse d'une nouvelle famille de ligands acycliques de type polyaminophosphonaté. Cette famille est basée sur la plateforme pyridinique qui porte deux, trois ou quatre groupements phosphonates $\mathbf{L^1}$- $\mathbf{L^4}$.

La synthèse de ces ligands repose sur deux réactions principales : la première est la N-alkylation avec les groupements amino-méthylphosphonate sur un dérivé dibromé de la pyridine. La deuxième est la réaction de déprotection des esters phosphoniques avec du TMSBr dans CH_2Cl_2 suivie de méthanolyse ou dans HCl (6 M).

L'obtention de ces ligands polyaminophosphonatés a nécessité la synthèse préalable de deux précurseurs mono et diphosphonaté. La synthèse de ces deux derniers à impliqué deux type de réaction : une phosphorylation avec du diéthylphosphite et une phosphorylation avec le triethylphosphite pour le $\mathbf{L^4}$ suivie d'une réaction d'hydrogénation catalysée par du palladium sur charbon. Les ligands $\mathbf{L^1}$-$\mathbf{L^4}$ sont obtenus avec des rendements satisfaisants.

Nous avons donc réussi la synthèse de quatre ligands acycliques intégrant dans leur structure un chromophore pyridinique et des groupements phosphonates en vue de la complexation et de la photosensibilisation d'ions divalent (Cu(II), Zn(II), Ni(II)) et trivalent (Ln(III) et Ga(III)). Le chapitre suivant va être consacré à la détermination des propriétés de coordination en milieu aqueux des complexes métalliques, en particulier le Cu(II) et le Gd(III), pour des applications en imagerie médicale.

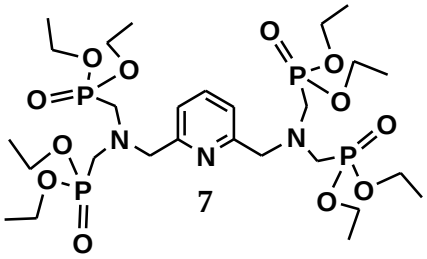
Partie expérimentale

Les spectres RMN ^{1}H et ^{13}C ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker AC 300 à 300 MHz pour le proton et à 75 MHz pour le carbone. Les spectres RMN ^{31}P (161,9 MHz) ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker Avance 400. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au solvant non deutérié résiduel.[10] Les purifications par chromatographie ont été effectuées avec du gel de silice (0,063-0,200 mm, Merck) et les chromatographies flash ont été effectuées avec du gel de silice (40-63 µm, Merck).

La *tétra*-éthylimino*bis*(méthanephosphonate) **3**[6] , la 2,6-diaminométhylpyridine **6**[7] et la 2,6-*bis*(éthylaminométhyl)pyridine **8**[9] ont été synthétisés selon les procédures déjà décrites dans la littérature.

<u>Synthése du ligand L[1]</u>

Composé 7



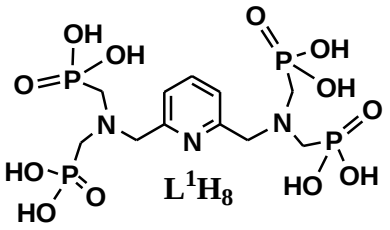
810 mg de 2,6-diaminométhylpyridine **6** (3,3 mmol) sont solubilisés dans l'éthanol (20 mL) et NaOH (395 mg, 9,9 mmol, 3 eq) est ajouté. Le mélange réactionnel est maintenu à reflux pendant 1 h. Le solvant est évaporé et $HPO(OEt)_2$ (1,82 g, 13,2 mmol) est ajouté à 0°C au résidu obtenu. Le mélange est refroidi pendant 10 min dans un bain de glace et 1,6 mL de formaldéhyde à 37% sont ajoutés lentement tout en maintenant la température sous 10 °C. Le mélange réactionnel est ramené à température ambiante pendant 30 min puis chauffé à 100 °C pendant 14 h. La solution est concentrée sous vide et le produit brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice (CH_2Cl_2/MeOH, gradient de 100:00 à 88:12) pour donner le composé **7** (1,42 g, 60 %) sous la forme d'une huile.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 200 MHz) : δ 7,62 (t, *J* = 7,7 Hz, 1 H); 7,43 (d, *J* = 7,5 Hz, 2 H); 4,08 (q, *J* = 7,3 Hz, 16 H); 4,05 (s, 4 H); 3,17 (d, *J* = 10,0 Hz, 8 H); 1,27 (t, *J* = 7,1 Hz, 24 H). **RMN ^{13}C** ($CDCl_3$, 50 MHz) : δ 157,8; 136,9; 122,1; 62,4 (t, *J* = 8,0 Hz); 61,9 (d, *J* = 7,0 Hz); 50,2 (dd, *J* = 158,7 Hz, 8,6 Hz); 16,4 (d, *J* = 6,5 Hz). **RMN ^{31}P** ($CDCl_3$, 161,9 MHz) : δ 24,4. IR (cm^{-1}, ATR) : ν 2979 (w), 2930 (w), 2909 (w), 1680 (s), 1442 (w), 1390 (w), 1230 (s, $\nu_{P=O}$), 1160 (m), 1013 (s), 957 (s). **ESI^{+}/MS** (MeOH/H_2O) : m/z = 738,3 ($[M+H]^{+}$, 100%). Anal. Cal. pour $C_{27}H_{55}O_{12}N_3P_4 \cdot 2H_2O$: C, 41,91; H, 7,68; N, 5,43 ; mesurées: C, 41,88; H, 7,30 ; N, 5,80.

2nde voie de synthèse :

Un mélange de pyridine dibromé **1** (2 g, 7,54 mmol), du composé **3** (2 éq, 15,08 mmol, 4,78 g) et de K_2CO_3 flambé (4 éq, 30,16 mmol, 4,17 g) est dissout dans l'acetonitrile anhydre. Le milieu réactionnel est agité pendant une nuit à reflux puis filtré pour éliminer le K_2CO_3, le filtrat est évaporé et le composé **7** est obtenu après purification sur colonne de silice avec un rendement de 9% (521 mg).

Ligand L[1]



Le composé **2** (650 mg, 0,88 mmol) est solubilisé dans CH_2Cl_2 (10 mL) et le TMSBr (4,7 mL, 35,2 mmol) est ajouté. Le mélange réactionnel est soumis à une agitation magnétique à température ambiante (24 h). Une seconde addition de TMSBr est ensuite effectuée (4,7 mL, 35,2 mmol) et le mélange est de nouveau agité à température ambiante pendant 24 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu obtenu est solubilisé dans 10 mL de MeOH et laissé sous agitation pendant 2 h à température ambiante. Le solvant est évaporé et le résidu est solubilisé dans 10 mL de MeOH et agité pendant 24 h à température ambiante. Le solvant est évaporé sous vide et le résidu est dissous dans un minimum de MeOH. Une addition de Et_2O aboutit à la formation d'un précipité, qui est collecté par centrifugation et séché sous vide pour obtenir le ligand $\mathbf{L^1}H_8$ (450 mg, 81%).
RMN ^{1}H (D_2O, 300 MHz) : δ 7,96 (t, *J* = 7,8 Hz, 1 H); 7,50 (d, *J* = 7,8 Hz, 2 H); 4,95 (s, 4 H); 3,64 (d, *J* = 12,4 Hz, 8 H). **RMN ^{13}C** (D_2O, 75 MHz) : δ 149,4; 139,9; 123,9; 59,3; 52,3 (d, *J* = 137,8 Hz). **RMN ^{31}P** (D_2O, 161,9 MHz) : δ 7,98 ; **IR** (cm^{-1}, ATR) : ν 2940 à 2580 (w, br, ν_{OH}), 1618 (m), 1426 (m), 1160 (s, ν_{P-O}), 919 (s, ν_{P-O}). Anal. Cal. pour $C_{11}H_{23}O_{12}N_3P_4 \cdot HBr \cdot 2H_2O$: C, 20,96; H, 4,48; N, 6,66 ; Mesurées : C, 21,06 ; H, 4,48 ; N, 6,11.

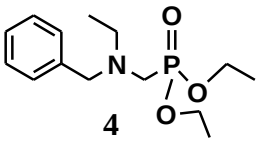
2nde voie de synthèse :

Le composé **7** (521 mg) est solubilisé dans HCl (6 M) et le mélange réactionnel est soumis à une agitation magnétique à reflux pendant une nuit. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu obtenu est solubilisé dans 10 mL de MeOH et laissé sous agitation pendant 2 h à température ambiante. Le solvant est évaporé et le résidu est solubilisé une deuxième fois dans 10 mL de MeOH et agité pendant 24 h à température ambiante. Le

solvant est évaporé sous vide et le résidu est dissous dans un minimum de MeOH. Une addition de Et_2O aboutit à la formation d'un précipité, qui est collecté par centrifugation et séché sous vide pour obtenir le ligand $\mathbf{L^1}H_8$ (172 mg, 48%).

<u>Synthése du ligand L^2</u>

Composé 4

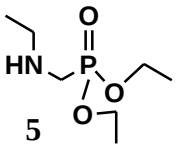


4

Un mélange de N-éthylbenzylamine (10 mL, 67,2 mmol) et de diéthylphosphite (1,3 eq, 87,4 mmol, 11,3 ml) est maintenu à 0°C, puis le formaldéhyde (2 eq, 134,4 mmol, 10 ml) est ajouté. Le mélange réactionnel est ramené à température ambiante puis chauffé à 60 °C pendant une nuit. Le solvant est évaporé et le produit est obtenu sous forme d'une huile incolore après purification par chromatographie sur colonne de silice (CH_2Cl_2/MeOH 97/3) avec un rendement quantitatif (19,65 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) : *δ* 7- 7,2 (m, 5 H); 3,97 (q, *J* = 7,3 Hz, 4H); 3,62 (s, 2H); 2,7 (d, *J* = 10,6 Hz, 2H); 2,55 (qd, *J* = 10 Hz, 2H); 1,17 (t, *J* = 6,9 Hz, 6H); 0,93 (t, *J* = 7 Hz, 3 H). **RMN ^{13}C** ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ 138,3; 128,3; 127,5; 126,4; 61,1 (d, *J* = 6,5 Hz); 58,6 (d, *J* = 8.8 Hz); 48,1; 48 (d, *J* = 161,9 Hz); 15,9 (d, *J* = 5,6 Hz); 11,2. **RMN ^{31}P** ($CDCl_3$, 161,9 MHz): δ 7,33. **ESI$^+$/ MS** *m/z* = 285,2 ($[M+H]^+$, 20%). **Anal**. Cal. pour $C_{14}H_{24}O_3NP{\cdot}H_2O$: C, 55,43; H, 8,64; N, 4,62 ; mesurées: C, 54,74; H, 8,35 ; N, 4,91.

Composé 5



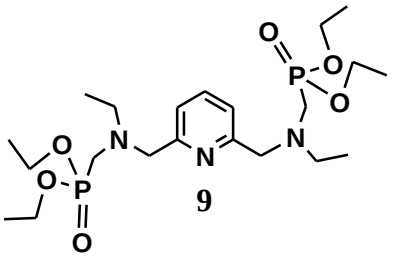
5

Le composé **4** (9 g, 31,5 mmol) est dissous dans 100 mL d'éthanol et le Pd/C (10%; 0,9 g) est ajouté. Le milieu réactionnel est mis sous un flux d'hydrogène et sous agitation pendant 8 h à reflux. Le milieu réactionnel est filtré pour éliminer le Pd/C, le filtrat est ensuite évaporé et le composé **5** est obtenu sous forme d'une huile légèrement jaune avec un rendement de 98% (6 g).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ 3,97 (q, *J* = 9,5 Hz, 4H); 2,80 (d, *J* = 12,1 Hz, 2H); 2,55 (q, *J* = 9,4 Hz, 2H); 1,19 (t, *J* = 6,8 Hz, 6H); 0,95 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H). **RMN ^{13}C** ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ 61,7 (d, *J* = 7,2 Hz); 45,2 (d, *J* = 16,3 Hz); 44,5 (d, *J* = 153,8 Hz); 16,1 (d, *J* = 6,2

Hz); 14,5. **RMN ^{31}P** ($CDCl_3$, 161,9 MHz): δ 25,88. **ESI$^+$/MS** (CH_2Cl_2) : *m/z* = 196,1 ($[M+H]^+$, 42%); 413,2 ($[2M+Na]^+$, 100%).

Composé 9



9

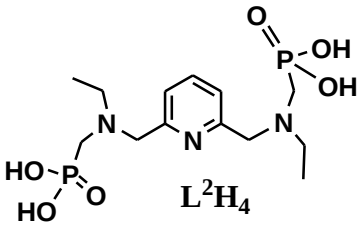
Un mélange de 2,6-bis(éthylaminométhyle)pyridine **8** (170 mg, 0,88 mmol) et de $HPO(OEt)_2$ (243 mg, 1,76 mmol) est refroidi pendant 10 min dans un bain de glace puis 220 µL de formaldéhyde (37% dans l'eau) sont ajoutés lentement en maintenant la température sous 10 °C. Le mélange réactionnel est ramené à température ambiante pendant 30 min et chauffé à reflux pendant 3 h. La solution est concentrée sous vide et le produit brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (CH_2Cl_2/MeOH, gradient de 100:00 à 92:8) pour donner le composé **9** (302 mg, 69%) sous forme d'huile.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ 7,57 (t, *J* = 7,7 Hz, 1 H); 7,35 (d, *J* = 7,6 Hz, 2 H); 4,08 (q, *J* = 7,3 Hz, 8 H); 3,83 (s, 4 H); 2,91 (d, *J* = 10,5 Hz, 4 H); 2,68 (q, *J* = 7,1 Hz, 4 H); 1,26 (t, *J* = 7,1 Hz, 12 H); 1,01 (t, *J* = 7,1 Hz, 6 H). **RMN ^{13}C** ($CDCl_3$, 75 MHz) : δ 158,8; 136,7; 121,2; 61,9 (d, *J* = 6,8 Hz); 61,2 (d, *J* = 8,8 Hz); 49,4 (d, *J* = 163,1 Hz); 49,5 (d, *J* = 8,8 Hz); 16,6 (d, *J* = 6,1 Hz); 12,0. **RMN ^{31}P** ($CDCl_3$, 161,9 MHz) : ν 25,6. **ESI$^+$/MS** (MeOH) : *m/z* = 493,2 ($[M+H]^+$, 100%). **Anal**. Cal. pour $C_{21}H_{41}O_6N_3P_2 \cdot 0.5\ H_2O$: C, 50,19 ; H, 8,42 ; N, 8,36 ; mesurées: C, 50,11 ; H, 8,45 ; N, 8,52.

2nde voie de synthèse :

La pyridine dibromé **1** (2 g, 7,55 mmol), le composé **5** (2,1 eq, 15,8 mmol, 3,1g) et du K_2CO_3 flambé (4 eq, 30,2 mmol, 4 g) sont mis en solution dans CH_3CN anhydre. Le mélange est laissé à 50 C° sous agitation continu et sous atmosphère inerte pendant une nuit. Le composé **9** est obtenu après purification par chromatographie flash sur silice (l'éluant : CH_2Cl_2/MeOH) sous forme d'une huile légèrement jaune (24%, 878 mg).

Ligand L²



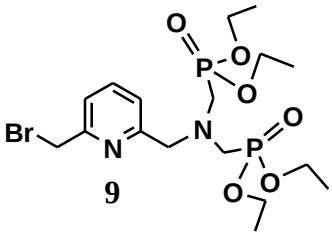
L²H₄

Le composé **9** (295 mg, 0,60 mmol) est solubilisé dans 10 mL de CH_2Cl_2, le TMSBr (1,6 mL, 12,0 mmol) est ajouté et le mélange est maintenu à température ambiante pendant 24 h. Une seconde addition de TMSBr (1,6 mL, 12,0 mmol) est ensuite effectuée et le mélange est maintenu à température ambiante pendant 24 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite, le résidu est solubilisé dans 5 mL de MeOH et agité à température ambiante pendant 2 h. Le solvant est évaporé, le résidu est solubilisé dans du MeOH (5 mL) et laissé sous agitation pendant 24 h à température ambiante. Pour finir, le solvant est évaporé et le résidu est dissous dans un minimum de MeOH. Une addition de Et_2O aboutit à la formation d'un précipité, qui est collecté par centrifugation et séché sous vide pour obtenir le ligand **L²**H_4 avec un rendement quantitatif (240 mg).

RMN ¹H (D_2O, 200 MHz) : δ 7,86 (t, J = 7,7 Hz, 1 H); 7,41 (d, J = 8,0 Hz, 2 H); 4,62 (s, 4 H); 3,43 (q, J = 7,3 Hz, 4 H); 3,31 (d, J = 12,4 Hz, 4 H); 1,27 (t, J = 7,1 Hz, 6 H). **RMN ¹³C** (D_2O, 75 MHz) : δ 149,8; 139,9; 124,2; 57,6 (d, J = 4,5 Hz); 51,6 (d, J = 3,8 Hz); 49,4 (d, J = 136,5 Hz); 8,2. **RMN ³¹P** ($CDCl_3$, 161,9 MHz): δ 8,37. **ESI⁺/MS** (MeOH/H_2O) *m/z* = 380,1 ([M-H]⁻, 100%). **Anal**. Cal. pour $C_{13}H_{25}O_6N_3P_2 \cdot H_2O \cdot HBr$: C, 32,51 ; H, 5,78 ; N, 8,75 ; mesurées: C, 31,92; H, 5,35; N, 8,34.

<u>Synthése du ligand L³</u>

Composé 10

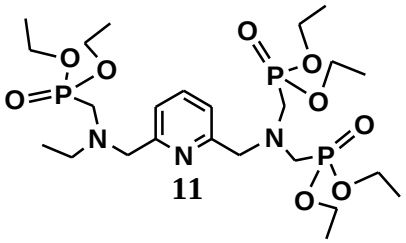


9

Un mélange de pyridine dibromé **1** (3,2 g, 12,1mmol), du composé **3** (3,07 g, 0,8 eq, 9,66 mmol) et de K_2CO_3 flambé (2,51 g, 1,5 eq, 18,15 mmol) est mis en solution dans CH_3CN anhydre. Le mélange est laissé à 50 C° sous agitation continue et sous atmosphère inerte pendant une nuit. Le solvant est évaporé et le brut est purifié par chromatographie flash sur silice, (CH_2Cl_2/MeOH 100/0 à 92/8). Le composé **10** est obtenu sous forme d'une huile légèrement jaune (2,81g, 46%).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ 7,60 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H); 7,43 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H); 7,25 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H); 4,44 (s, 2H); 4,04 (m, 10H); 3,16 (d, *J* = 9,9 Hz, 4H); 1,22 (t, *J* = 7,0 Hz, 12H). **RMN ^{13}C** ($CDCl_3$, 75 MHz) : δ 158,7; 155,9; 137,4; 122,9; 121,9; 62,0 (t, *J* = 3.3 Hz) ; 53,5; 50,3 (dd, *J* = 157,9 Hz, *J* = 8,2 Hz); 34,0; 16,5 (m). **RMN ^{31}P** ($CDCl_3$, 161,9 MHz): δ 24,4. **ESI$^+$ / MSI** (CH_2Cl_2): *m/z* = 502,8 ([M+H]$^+$, 14%); 504,8 ([M+H]$^+$, 14%); 523,1 ([M+Na]$^+$, 100%); 525,1 ([M+Na]$^+$, 100%).

Composé 11

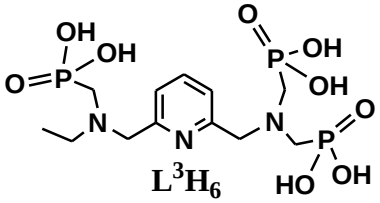


11

Un mélange du composé **10** (2,81 g, 5,6 mmol), composé ***5*** (1,2 eq, 6,7 mmol, 1,31 g) et de K_2CO_3 flambé (2 eq, 11,2 mmol, 1,55 g) mis en solution dans CH_3CN anhydre. Le mélange est chauffé à 80C° sous atmosphère inerte pendant une 5h. Le solvant est évaporé et le brut est purifier par chromatographie flash sur silice (éluant : CH_2Cl_2/MeOH 96/4). Le composé **11** est obtenu sous la forme d'une huile jaune (1,81 g, 52%).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ 7.57 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H); 7,36 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H); 4,10-3,99 (m, 12H); 3,81 (s, 4H); 3,20 (d, *J* = 9,2 Hz, 2H); 2,90 (d, *J* = 10,8 Hz, 4H); 2,60 (q, *J* = 7 Hz, 2H); 1,20 (t, *J* = 6,7 Hz, 18H); 1,00 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H). **RMN ^{13}C** ($CDCl_3$, 75 MHz) : δ 158,9; 157,6; 136,9; 121,5; 62,6 (m) ; 61,0 (d, *J* = 8,6 Hz); 50,3 (dd, *J* = 158,4 Hz, *J* = 8,7 Hz); 49,4 (d, *J* = 8,9 Hz); 49,3 (d, *J* = 163,3 Hz); 16,5 (m); 11,9. **RMN ^{31}P** ($CDCl_3$, 161,9 MHz): δ 24,3; 25,4. **ESI$^+$/MS** (CH_2Cl_2) *m/z* = 616,3 ([M+H]$^+$, 100%). **Anal**. Calc. for $C_{24}H_{48}O_9N_3P_3 \cdot 2H_2O$: C, 44,24 ; H, 8,04 ; N, 6,45 ; mesurées: C, 43,88; H, 7,79; N, 6.62.

Ligand L^3



L^{3}H$_6$

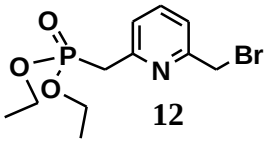
Le composé **11** (1,81 g, 2,93 mmol) est solubilisé dans CH_2Cl_2 (10 mL) et le TMSBr (11,62 mL, 88 mmol) est ajouté à 0 °C. Le mélange réactionnel est soumis à une agitation magnétique à température ambiante (24 h). Une seconde addition de

TMSBr est ensuite effectuée (11,62 mL, 88 mmol) et le mélange est de nouveau agité à température ambiante pendant 24 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu obtenu est solubilisé dans 10 mL de MeOH et laissé sous agitation pendant 2 h à température ambiante. Le solvant est évaporé et le résidu est solubilisé dans 10 mL de MeOH et agité pendant 24 h à température ambiante. Le solvant est évaporé sous vide et le résidu est dissous dans un minimum de MeOH. Une addition de Et_2O aboutit à la formation d'un précipité, qui est collecté par centrifugation et séché sous vide pour obtenir le ligand $\mathbf{L^3}H_6$ (1,71g) avec un rendement quantitatif.

RMN ^{1}H (D_2O, 300 MHz): δ 7,96 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H); 7,51 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H); 7,50 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H); 4,95 (s, 2H); 3,63 (d, *J* = 12,2 Hz, 4H); 3,49 (q, *J* = 7,2 Hz, 2H); 3,39 (d, *J* = 13,1 Hz, 2H); 1,37 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H). Un pic correspondant à 2 protons est attendu à 4,78 ppm, mais est caché par le signal de l'eau. **RMN ^{13}C** (D_2O, 75 MHz) : δ 159,0; 158,2; 138,0; 123,0; 122,6; 62,5 (m); 60,2 (d, *J* = 6 Hz); 55,4 (dd, *J* = 145,9 Hz, *J* = 8,8 Hz); 52,6 (d, *J* = 138,9 Hz); 48,1 (d, *J* = 8,0 Hz); 10,5. **RM N^{31}P** (D_2O, 161,9 MHz) : δ 17,15; 16,5. **ESI$^-$/MS** (D_2O) *m/z* = 446,1 ([M-H]$^-$, 100%). **Anal**. Calc. for $C_{12}H_{24}O_9N_3P_3 \cdot 2H_2O$. 2HBr : C, 22,34 ; H, 4,69 ; N, 6,51 ; mesurées : C, 22,80; H, 4,81; N, 6,24.

<u>Synthése du ligand L^4</u>

Composé 12

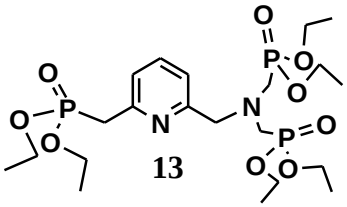


12

Un mélange de 2,6-dibromométhylpyridine **1** (480 mg, 1,81 mmol) et de $P(OEt)_3$ (315,2 µl, 1,81 mmol) est chauffé à 50°C pendant 4 jours sous atmosphère inerte et protégé de la lumière. Le mélange est refroidi à température ambiante puis l'excès de $PO(OEt)_3$ est évaporé sous pression réduite. Le brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice FPLC (CH_2Cl_2, MeOH, gradient de 94:6) pour donner le composé **12** sous la forme d'une huile orange (281 mg, 48%).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 7,55 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H); 7,21 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H); 4,42 (s, 2H); 3,98 (q, *J* = 9,8 Hz, 4H); 3,30 (d, *J* = 21,6 Hz, 2H); 1,20 (t, *J* = 7,0 Hz, 6H). **RMN^{13}C** ($CDCl_3$, 75 MHz): δ 155,7 (d, *J* = 2,7 Hz); 152,0 (d, *J* = 8,3 Hz); 136,7 (d, *J* = 2,2 Hz); 121,8 (dd, *J* = 147,9 Hz, *J* = 2,6 Hz); 61,4 (d, *J* = 6,5 Hz); 35,7 (d, *J* = 134,3 Hz); 33,2; 15,6 (d, *J* = 5,7 Hz). **RMN ^{31}P** ($CDCl_3$, 161,9 MHz) : δ 24,6.

Composé 13

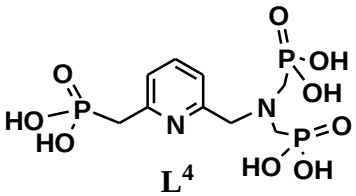


13

Un mélange du composé **12** (797 mg, 2,5 mmol), composé ***3*** (793,15 mg, 2,5 mmol, 1 eq) et de K_2CO_3 anhydre (4,95, 684 mg) est mis en solution dans le CH_3CN anhydre. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation magnétique à 50°C, sous argon et protégé de la lumière pendant 48 h. Le K_2CO_3 est filtré, le CH_3CN est évaporé et le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice (FPLC, CH_2Cl_2/MeOH, gradient de 100:0 à 96:4). On obtient le composé **13** sous la forme d'une huile (476 mg) avec un rendement de 36%

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 7,55 (t, *J* = 8,4 Hz, 1H); 7,40 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H); 7,20 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H); 4,00 (m, 14H); 3,31 (d, *J* = 22.0 Hz, 2H); 3,15 (d, *J* = 10,4 Hz, 4H); 1,23 (t, *J* = 7,2 Hz, 18H). **RMN ^{13}C** ($CDCl_3$, 75 MHz): δ 158,4 (d, *J* = 2,1 Hz); 151,9 (d, *J* = 8,2 Hz); 137,0; 122,8 (d, *J* = 4,8 Hz); 121,8 (d, *J* = 3,3 Hz); 62,5 (t, *J* = 7,9 Hz); 62,2 (d, *J* = 6,6 Hz); 62,1 (m); 50,4 (dd, *J* = 159,2 Hz, *J* = 8,3 Hz); 36,6 (d, *J* = 135,1 Hz); 16,6 (d, *J* = 3,0 Hz); 16,4 (m). **RMN ^{31}P** ($CDCl_3$, 161,9 MHz): δ 25,1; 24,4. **ESI$^+$/MS** (CH_2Cl_2) *m/z* = 559,21 ($[M+H]^+$, 100%). **Anal**. Calc. pour $C_{21}H_{41}O_9P_3N_2.2H_2O$: C, 42,43; H, 7,52; N, 4,70; mesurée: C, 42,90; H, 7,03; N, 5,06.

Ligand L^4



L^4

Le composé **13** (190 mg) est solubilisé dans HCl (6 M) et le mélange réactionnel est soumis à une agitation magnétique à reflux pendant une nuit. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu obtenu est solubilisé dans 10 mL de MeOH et laissé sous agitation pendant 2 h à température ambiante. Le solvant est évaporé et le résidu est solubilisé une deuxième fois dans 10 mL de MeOH et agité pendant 24 h à température ambiante. Le solvant est évaporé sous vide et le résidu est dissous dans un minimum de MeOH. Une addition de Et_2O aboutit à la formation d'un précipité, qui est collecté par centrifugation et séché sous vide pour obtenir le ligand **L^4**H_6 (60 mg, 46%).

RMN ^{1}H (D_2O, 200 MHz): δ 8,43 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H); 7,91 (dd, *J* = 7,3 Hz, *J* = 17,6 Hz, 2H); 4,77 (s, 2H); 3,57 (d, *J* = 20,2 Hz, 2H); 3,41 (d, *J* = 11,2 Hz, 4H). **RMN ^{13}C** (D_2O, 75 MHz): δ 151,9; 148,5; 146,2; 127,7 (d, *J* = 4,3 Hz); 125,7; 56,6 (m); 52,6 (dd, *J* = 144,7 Hz, *J* = 5,8 Hz); 34,8 (d, *J* = 123,4 Hz). **RMN ^{31}P** (D_2O, 161,9 MHz): δ 13,97; 13,65. **ESI$^-$/MS** (D_2O) *m/z* = 389,02 ($[M-H]^-$, 100%). **Anal**. Calc. for $C_9H_{17}O_9P_3N_2$.HCl : C, 25,34; H, 4,25; N, 6,56; mesurées: C, 25,07; H, 4,32; N, 6,40.

Bibliographie

[1] Smith, S.V. *J. lnorg. Bio. chem*. **2004**, *98*, 1874.

[2] Christine, C. ; Koubemba, M. ; Shakir, S. ; Clavier, S. ; Sabatier, L. ; Saupe, F. ; Orend, G. ; Charbonnière L.J. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 9183-9190.

[3] Pellegatti, L.; Zhang, J.; Drahos, B.; Villette, S.; Suzenet, F.; Guillaumet, G.; Petoud, S. ; Toth, E.; *Chem. Commun.* **2008**, 6591.

[4] Scheytza, H.; Rademacher, O.; Reibig, H. U. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, *9*, 2373.

[5] Mannich, C.; Krösche, W. *Arch. Pharm.* **1912**, *250*, 647.

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

[7] Valade, A.; Urban, D.; Welech, M.J.; Anderson, C.J. *Bionconj. Chem*. **2001**, *11*, 527.

[8] Abada, A.; Lecointre, A.; Elhabiri, M.; Charbonnière, L.J. *Dalton Trans.*, **2010**, *39*, 9055.

[9] Kobayashi, T.; Yaita, T.; Sugo, Y.; Suda, H.; Suzuki, S.; Fujii, Y.; Nakano,Y. *J. Heter. Chem*. **2006**, *43*, 549.

[10] Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512.

Chapitre III

Propriétés de coordination des cations d'intérêt pour l'imagerie TEP

I- Propriétés acido-basiques des ligands

Avant toute étude thermodynamique de la complexation d'un ion métallique, il est indispensable de connaître précisément les propriétés acido-basiques du ligand organique. En effet, une compétition a lieu lors de la complexation entre les protons et le métal au niveau des sites basiques donneurs tels que les amines et les groupes phosphonates des ligands étudiés. Dans un premier temps, il a été possible de déterminer précisément les constantes de protonation des différents ligands synthétisés dont les structures sont représentées sur la Figure 3.1 à partir de titrages potentiométriques et spectrophotométriques couplés à la potentiométrie.

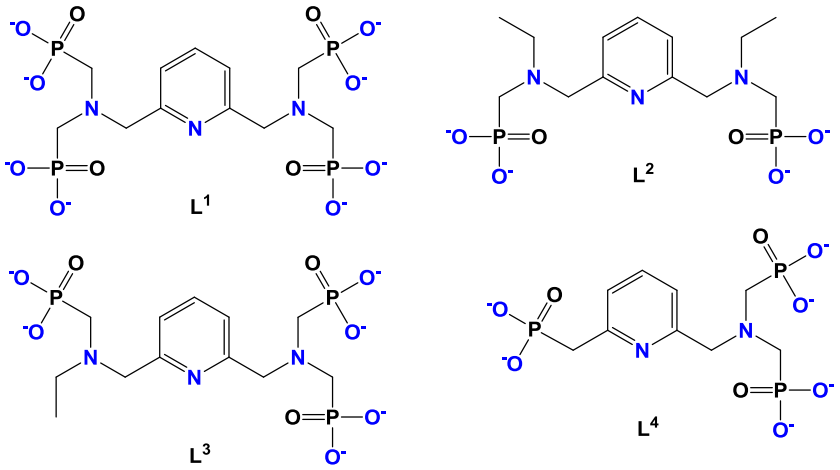


Figure 3.1. *Structures chimiques des ligands* ***L¹***, ***L²***, ***L³*** *et* ***L⁴*** *(formes entièrement déprotonées.*

1. Etude potentiométrique

La détermination des constantes de stabilité des complexes métalliques nécessite, au préalable, la caractérisation des propriétés acido-basiques des ligands $\mathbf{L^1}$-$\mathbf{L^4}$. Les ligands polyaminophosphonatés synthétisés sont constitués principalement d'un chromophore pyridinique et de deux amines tertiaires excepté le ligand $\mathbf{L^4}$ qui ne contient qu'une seule amine tertiaire. Le nombre des groupements méthanephosphonates terminaux varient d'un ligand à l'autre, le ligand $\mathbf{L^1}$ étant constitué de quatre sites phosphonates provenant des quatre unités méthanephosphonates terminaux, $\mathbf{L^2}$ n'ayant que deux fonctions phosphonates. Les ligands $\mathbf{L^3}$ et $\mathbf{L^4}$ sont constitués de trois sites phosphonates plus un groupement éthyle pour ligand $\mathbf{L^3}$. A titre d'exemple, la Figure 3.2 présente un titrage potentiométrique du ligand $\mathbf{L^1}$ réalisé dans l'eau à 25 °C en présence de 0,1 M de $NaClO_4$ jouant le rôle d'électrolyte support.

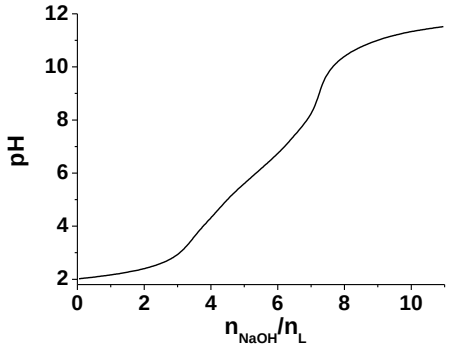


Figure 3.2. *Courbe potentiométrique du ligand* $\boldsymbol{L^1}$*. Solvant :* H_2O *; I = 0,1 M (*$NaClO_4$*) ; T = 25,0(2) °C ;* $[\boldsymbol{L^1}]_{tot} = 2{,}36 \times 10^{-3}$ *M.*

Le Tableau 3.1 rassemble les valeurs des constantes de protonation déterminées par potentiométrie et spectrophotométrie UV-visible des ligands $\mathbf{L^1}$, $\mathbf{L^2}$, $\mathbf{L^3}$ et $\mathbf{L^4}$ représentées sous leur forme logarithmique (log $K_{\mathrm{LH}x}$ avec $1 \leq x \leq 11$).

Equilibre	log K_{LHx}(3σ)			
	$\mathbf{L^1}$	$\mathbf{L^2}$	$\mathbf{L^3}$	$\mathbf{L^4}$
$\mathbf{L} + \mathrm{H}^+ \xrightleftharpoons{K_{\mathrm{LH}}} \mathbf{L}\mathrm{H}$	11,21(2)[a]/11,1(2)[b]	10,46(2)[a]	11,04(1)[a]	11,8(2)[a]
$\mathbf{L}\mathrm{H} + \mathrm{H}^+ \xrightleftharpoons{K_{\mathrm{LH}_2}} \mathbf{L}\mathrm{H}_2$	10,29(2)[a]/10,71(3)[b]	10,07(3)[a]/9,94(3)[b]	10,4(1)[a]/10,8(4)[b]	8,3(3)[a]/7,9(3)[b]
$\mathbf{L}\mathrm{H}_2 + \mathrm{H}^+ \xrightleftharpoons{K_{\mathrm{LH}_3}} \mathbf{L}\mathrm{H}_3$	8,04(4)[a]/8,5(2)[b]	6,56(4)[a]	6,9(2)[a]/6,8(2)[b]	6,5(5)[a]
$\mathbf{L}\mathrm{H}_3 + \mathrm{H}^+ \xrightleftharpoons{K_{\mathrm{LH}_4}} \mathbf{L}\mathrm{H}_4$	6,49(6)[a]/7(3)[b]	4,52(5)	5,7(3)[a]	5,1(6)[a]/5,37(4)[b]
$\mathbf{L}\mathrm{H}_4 + \mathrm{H}^+ \xrightleftharpoons{K_{\mathrm{LH}_5}} \mathbf{L}\mathrm{H}_5$	5,53(8)[a]		4,5(3)[a]	
$\mathbf{L}\mathrm{H}_5 + \mathrm{H}^+ \xrightleftharpoons{K_{\mathrm{LH}_6}} \mathbf{L}\mathrm{H}_6$	4,19(9)[a]			

Solvant : H_2O ; I = 0,1 M ; T = 25,0(2) °C. Erreur = 3σ avec σ = déviation standard. $K_{\mathrm{LH}_x} = [\mathrm{LH}_x]/[[\mathrm{LH}_{x-1}][\mathrm{H}]$. Les charges ont été omises pour des raisons de clarté. [a] Titrages potentiométriques. [b] Titrages spectrophotométriques *vs*. pH.

Tableau 3.1. *Constantes de protonation successives (log* K_{LHx}*) des ligands* $\boldsymbol{L^1}$*,* $\boldsymbol{L^2}$*,* $\boldsymbol{L^3}$ *et* $\boldsymbol{L^4}$*.*

Dans la gamme de pH étudiée (2,5 < pH < 12), seules six, quatre, cinq et quatre constantes de protonation sur les onze, sept, neuf et huit possibles ont pu être déterminées respectivement pour $\mathbf{L^1}$, $\mathbf{L^2}$, $\mathbf{L^3}$ et $\mathbf{L^4}$. Ces valeurs logarithmiques indiquent que les autres sites ionisables non caractérisés sont associés à des constantes de protonation beaucoup plus basses (log $K_{\mathrm{LHx}} << 2$), impossibles à évaluer avec précision dans nos conditions expérimentales. Les constantes de protonation les plus basiques K_{LH} et K_{LH2} pour $\mathbf{L^1}$– $\mathbf{L^3}$ et K_{LH} pour $\mathbf{L^4}$ peuvent être attribuées aux amines tertiaires, en accord avec des données qui existent dans la littérature pour de nombreux analogues de type polyaminométhanephosphonate

(Tableau 3.2).[1-6] Les constantes de protonation suivantes déterminées pour les ligands **L**^{1}, **L**^{2}, **L**^{3} et **L**^{4} sont associées aux premières constantes de protonation pour chacun des groupements méthanephosphonates.

Les valeurs de log K_{LH} et log K_{LH2} des ligands **L**^{1}, **L**^{2}, **L**^{3} et **L**^{4} synthétisés sont plus de deux ordres de grandeur supérieures à celles mesurées pour l'analogue **L**^{G} (log $K_{\mathbf{L}^{G}H}$= 8,95 et log $K_{\mathbf{L}^{G}H_2}$= 7,85) qui possèdent des unités carboxylates terminales (Figure 3.3).[1]

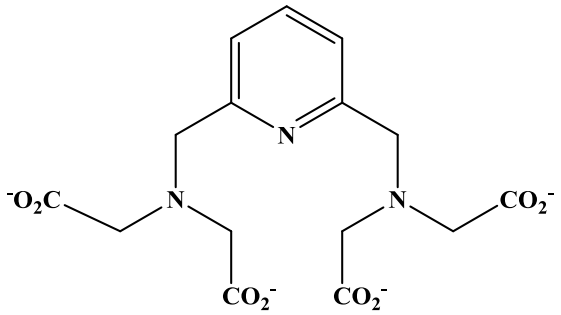


Figure 3.3. *Structure chimique de l'analogue pyridine tétracarboxylate (noté* ***L***^{G}*).*

Cette augmentation de basicité peut être expliquée par des effets électrostatiques plus forts entre les unités phosphonates ($-PO_3^{2-}$) doublement chargées négativement par rapport aux groupements carboxylates ($-CO_2^{-}$) chargés négativement. Ces effets peuvent prédominer par rapport à des facteurs inductifs.[2] D'autre part, il a été démontré pour une série de dérivés polyaminométhanephosphonate, que les valeurs des constantes de protonation des fonctions amines pouvaient être influencées par la longueur de l'espaceur qui relie les deux sites symétriques amino-N,N-*bis*(méthanephosphonate) (ligands : **L**^{B}, **L**^{C}, **L**^{D} et **L**^{E}; Tableau 3.2). En effet, lorsque un espaceur court est présent (**EDTPA** ou **L**^{B}, n = 2), de fortes interactions inter-unités de type liaison hydrogène entre l'unité ammonium et l'unité amine ($NH^{+\cdots}N$) prennent place au sein de l'espèce monoprotonée.[2] De ce fait, l'écart $\Delta\log K_{LHx}$ des sites amines tertiaires devient important. Lorsque la longueur de l'espaceur augmente (n = 3 **L**^{C} ou 6 **L**^{D}, Tableau 3.2) et, par conséquent lorsque la flexibilité s'accroit, ces interactions intramoléculaires sont défavorisées et l'écart entre les constantes de protonation entre les deux fonctions amines tertiaires diminue et tend vers une valeur proche de processus statistiques.[10]

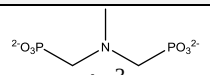
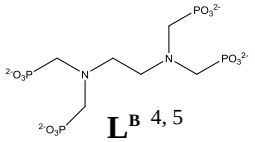
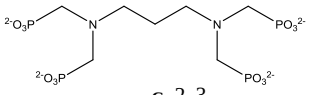
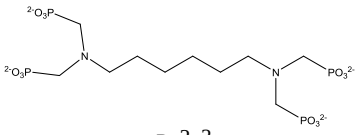
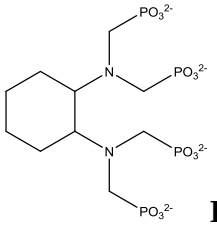
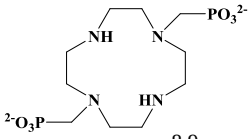
Ligand	Amines tertiaires		Méthanephosphonate		
	log K_{LHx}	Δlog K_{LHx}	log K_{LHx}	log $K_{LHx\ moy}$	Δlog K_{LHx}
 **L^A** [3]	12,1	-	6,1/4,95/1,3	5,52	1,15
 **L^B** [4, 5]	13,5 10,2	3,3	8,08/6,41/5,08/ 2,71	5,59	1,67/1,33/ 2,37
 **L^C** [2, 3]	13,0 11,15	1,85	6,99/6,07/5,18/ 4,37	5,65	0,92/0,89/ 0,81
 **L^D** [2, 3]	13,3 13,0	0,3	6,88/6,13/5,29/ 4,61	5,73	0,75/0,84/ 0,68
 **L^E** [6, 7]	10,89 9,39	1,5	7,69/6,97/6,46/ 5,32	6,61	0,72/0,51/ 1,14
 **DO2P** [8,9]	12,80(8) 10,92(2)		8,47(2)/6,39(2)	7,43	2,08
L^1	11,21(2) 10,29(2)	0,92	8,04/6,49/ 5,53/4,19	6,06	1,55/0,96/ 1,34
L^2	10,46(2) 10,07(3)	0,39	6,56(4)/4,52(5)	5,54	2,04
L^3	11,04(1)/ 10,4(1)	0,64	6,9(2)/5,7(3)/ 4,5(3)	5,7	1,2/1,2
L^4	11,8(2)		8,3(3) /6,5(5)/ 5,1(6)	6,63	1,8/1,4

Tableau 3.2. *Constante de protonation successive (log K_{LHx}) de dérivés polyaminophosphonatés issus de la littérature comparés aux données mesurées pour* ***L^1***, ***L^2***, ***L^3*** *et* ***L^4***.

Pour le dérivé **L^D** ((hexaméthylènedinitrilo)tétra(méthanephosphonate)), la valeur de Δlog K_{LHx} = 0,3 se rapproche de l'écart statistique attendu (Δlog K_{LHx}= 0,6) pour deux sites identiques et indépendants.[10] Du fait de leur long espaceur alkyl (n = 6), les deux unités amino-N,N-*bis*(méthanephosphonate) du ligand **L^D** se comportent alors de manière

indépendante l'une de l'autre. Lorsque des groupements pyridyle **L**$^{1\text{-}4}$ ou cyclohexyle (**L**^{E}) [4] sont insérés, les valeurs de $\Delta\log K_{LHx}$ associées aux amines tertiaires dévient significativement de la valeur statistique, mais sont néanmoins atténuées du fait de contraintes structurales et géométriques apportées par ces espaceurs rigides qui affaiblissent les liaisons hydrogènes ($NH^{+\cdots}N$).

Les constantes de protonation les moins basiques déterminées pour cette série de ligands étudiés sont associées aux premières constantes de protonation pour chacun des groupements méthanephosphonates. Ces valeurs sont comparables à celles déterminées pour les analogues **EDTPA** (**L**^{B}) (Tableau 3.2). Si la basicité moyenne ne varie pas significativement au cours d'une même série, des différences existent si l'on examine les valeurs de $\Delta\log K_{LHx}$ qui les caractérisent.

Ces différences rendent compte, au sein des espèces diprotonées (les deux amines tertiaires sont protonées), d'interactions inter-unités par ponts hydrogène qui peuvent exister entre les deux groupements méthanephosphonates d'une unité amino-N,N-*bis*(méthanephosphonate) terminale et le site ammonium de l'autre unité adjacente. Une structure à l'état solide de l'**EDTPAH$_8$** met en évidence des liaisons hydrogènes inter-unités à l'état solide.[11]Ainsi, au sein de la série polyaminométhanephosphonate (Tableau 3.2) les valeurs de $\Delta\log K_{LHx}$ des fonctions phosphonates diminuent avec la longueur de l'espaceur et indiquent l'atténuation de ces interactions par ponts hydrogènes lorsque l'espaceur est plus long et plus flexible. Les écarts $\Delta\log K^{H}$ tendent alors vers des valeurs statistiques attendues pour quatre sites identiques et indépendants ($\Delta \log K^{H}$ = 0,35 et 0,43). [10] Les valeurs de $\Delta\log K_{LHx}$ obtenues pour **L**^{1}, **L**^{2}, **L**^{3} et **L**^{4} semblent indiquer de fortes interactions inter-unités en accord avec la topologie de nos systèmes. Pour les quatre systèmes étudiés les autres constantes de protonation (protonation des unités $-PO_3H^-$ et protonation de la pyridine) n'ont pu être déterminées dans ces conditions expérimentales et leurs valeurs logarithmiques ont été estimées << 2, en accord avec des données de la littérature.[12,13,14]

Les diagrammes de distribution des espèces protonées des ligands **L**^{1}, **L**^{2}, **L**^{3} et **L**^{4} ont été calculés à l'aide du logiciel HYSS[15] et sont présentés à la Figure 3.4 Les espèces négativement chargées (**L**$^{1}H_3^{4-}$ et **L**$^{1}H_2^{5-}$), (**L**$^{2}H_3^{-}$ et **L**$^{2}H_2^{2-}$), (**L**$^{3}H_3^{4-}$ et **L**$^{3}H_2^{-5}$) et (**L**$^{4}H_2^{3-}$ et **L**$^{4}H_2^{-2}$) coexistent dans des conditions de pH physiologique.

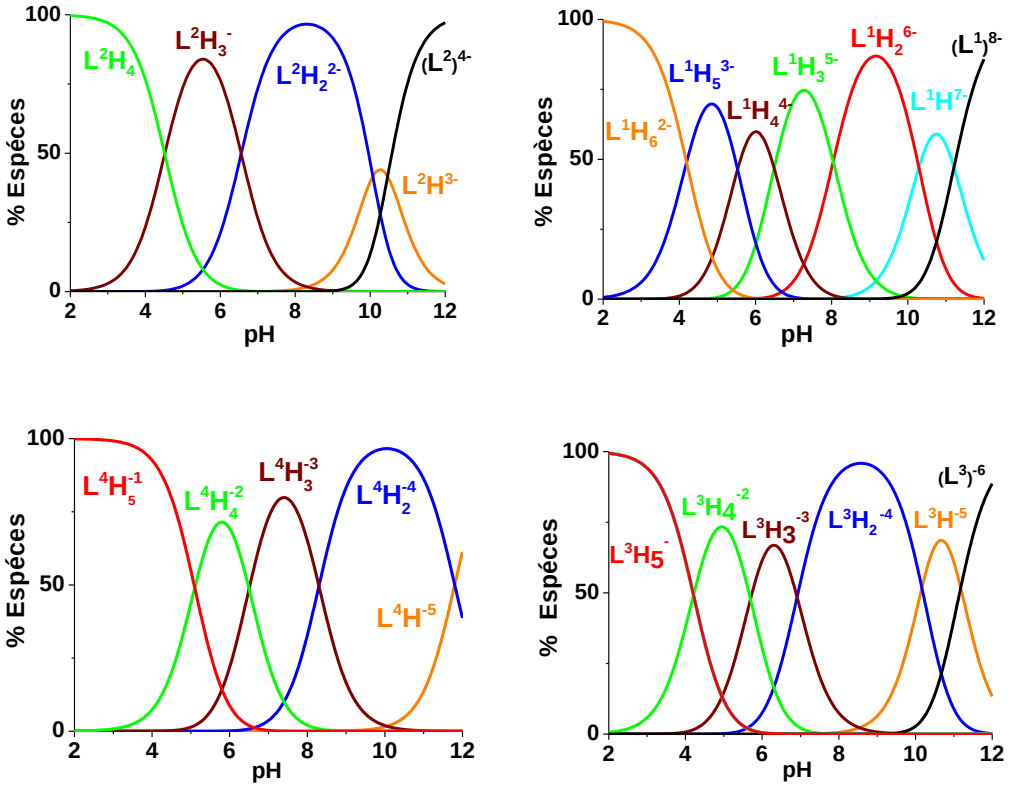


Figure 3.4. *Courbes de distribution des espèces protonées des ligands* **L**^{1}, **L**^{2}, **L**^{3} et **L**^{4}. *Solvant : H_2O; T = 25,0 °C ; I = 0,1 M ($NaClO_4$) ; $[L^1]_{tot}$ = 1× 10^{-3} M, $[L^2]_{tot}$ = 2,44× 10^{-3}M, $[L^3]_{tot}$ = 1,63 × 10^{-3} M et $[L^4]_{tot}$ = 1,12×10^{-3} M.*

2. *Etude spectrophotométrique en fonction du pH*

Dans le but d'évaluer les propriétés spectrophotométriques des ligands polyaminophosphonatés synthétisés **L**^{1}, **L**^{2}, **L**^{3} et **L**^{4} et de leurs espèces protonées, nous avons réalisé des titrages spectrophotométriques (200 nm < λ < 500 nm) en fonction du pH. Les variations spectrales obtenues pour les quatre ligands sont représenté à la Figure 3.5. La pyridine constitue le chromophore principal de nos quatre ligands.

Nous observons que les titrages des ligands **L**^{1}, **L**^{2}, **L**^{3} et **L**^{4} en fonction du pH présentent des comportements similaires. À pH > 7, un effet hyperchrome est observé sur les spectres d'absorption des quatre ligands. Cet effet peut être expliqué par la présence d'interactions entre l'azote pyridinique et les différentes unités protonées formées par protonation des deux premières unités méthanephosphonates. Le traitement des données par le logiciel SPECFIT[16,17] ne nous a permis de déterminer, que quatre de l'ensemble des constantes de protonation pour **L**^{1}, deux pour **L**^{3} et **L**^{4} et une seule constante de protonation pour le ligand bisphosphonaté **L**^{2}. Les valeurs obtenues sont en très bon accord avec celles déterminées par potentiométrie (Tableau 3.1).

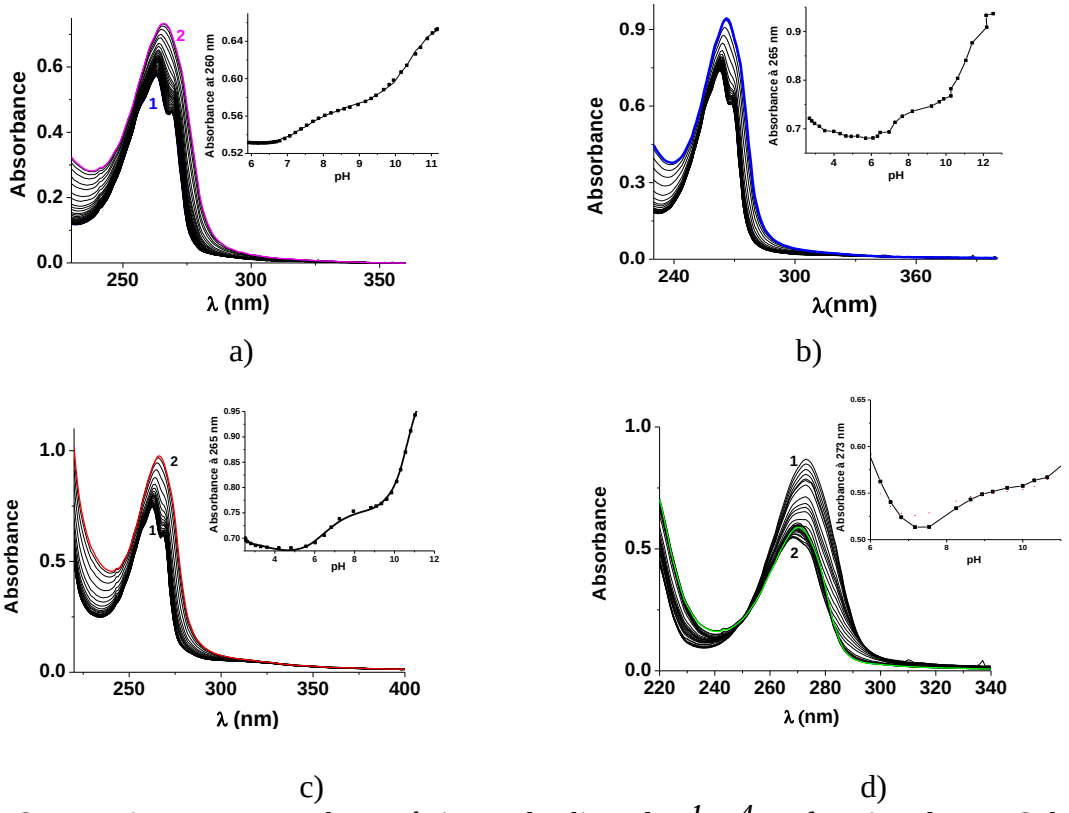


Figure 3.5. *Titrage spectrophotométriques des ligands* $\boldsymbol{L^1}$*-* $\boldsymbol{L^4}$ *en fonction du pH. Solvant :* H_2O *; T = 25,0(2) °C ; I = 0,1 M* ($NaClO_4$) *; l = 1 cm; a)* $[\boldsymbol{L^1}]_{tot} = 1{,}51 \times 10^{-4}$ *M ; b)* $[\boldsymbol{L^2}]_{tot} = 2{,}39 \times 10^{-4}$ *M ; c)* $[\boldsymbol{L^3}]_{tot} = 2{,}29 \times 10^{-4}$ *M ; d)* $[\boldsymbol{L^4}]_{tot} = 1{,}76 \times 10^{-4}$ *M.*

Ces données confirment donc les valeurs déterminées précédemment par pHmétrie et suggèrent que les réseaux de liaisons hydrogène évoqués précédemment impliquent également le chromophore pyridinique. En effet, l'azote de la pyridine est susceptible d'interagir par liaison hydrogène avec les sites ammoniums protonés, ce qui conduit aux effets les plus significatifs (effet hypochrome des transitions $\boldsymbol{\pi}$-$\boldsymbol{\pi}^*$ sous l'effet de la protonation) et permet d'expliquer sa faible constante de protonation qui n'a pas pu être déterminée dans nos conditions expérimentales. L'implication des unités méthanephosphonate dans la mise en place de liaisons hydrogène de type "croisé" semble également influencer le chromophore mais de façon plus modeste.

Les spectres électroniques calculés des espèces protonées des ligands **L**^{1}, **L**^{2}, **L**^{3} et **L**^{4} sont présentés à la Figure 3.6.

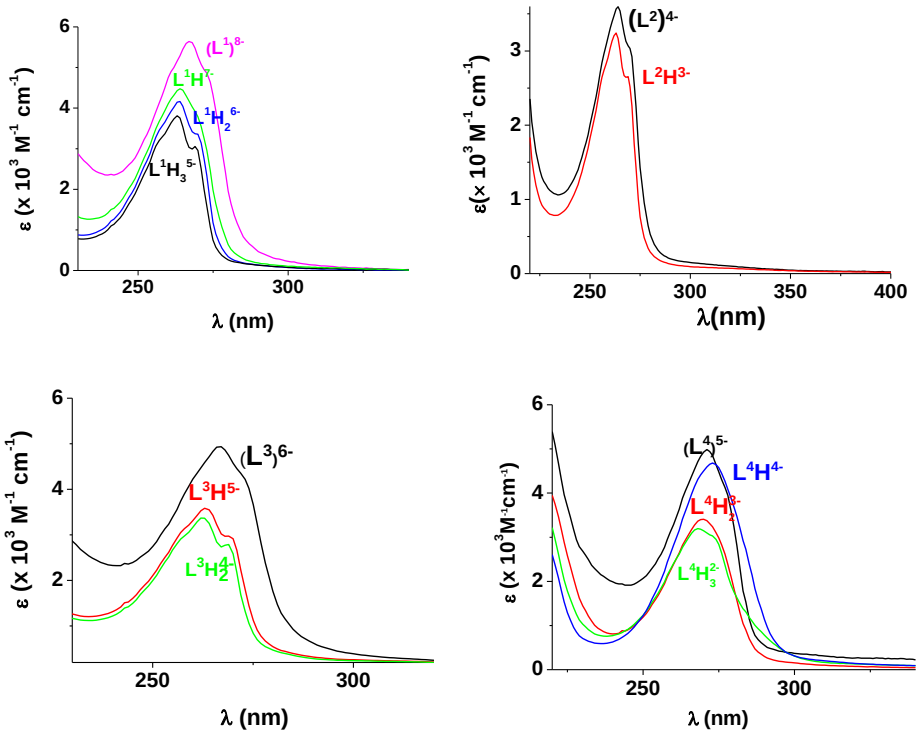


Figure 3.6. *Spectres électroniques des espèces protonées des ligands* ***L***^{1}, ***L***^{2}, ***L***^{3} *et* ***L***^{4}. *Solvant : H_2O ; T = 25,0(2) °C ; I = 0,1 M ($NaClO_4$) ; l = 1 cm.*

Les caractéristiques spectrophotométriques des espèces protonées des ligands **L**^{1}, **L**^{2}, **L**^{3} et **L**^{4} sont présentées dans le Tableau 3.3.

	L^1		**L**^{2}		**L**^{3}		**L**^{4}	
	λ_{max} (nm)	ε_{max} ($\times 10^3$ M^{-1} cm^{-1})	λ_{max} (nm)	ε_{max} ($\times 10^3$ M^{-1} cm^{-1})	λ_{max} (nm)	ε_{max} ($\times 10^3$ M^{-1} cm^{-1})	λ_{max} (nm)	ε_{max} ($\times 10^3$ $M^{-1}cm^{-1}$)
L	267	5,64	264	3,59	267	4,94	271	4,98
LH	264	4,48	263	3,24	263	3,58	273	4,68
LH_2	264	4,16	-	-	262	3,37	270	3,41
LH_3	263	3,81	-	-	-	-	268	3,19

Tableau 3.3. *Caractéristiques spectrales des espèces protonées des ligands* ***L***^{1}, ***L***^{2}, ***L***^{3} *et* ***L***^{4}

Conclusion

L'étude physico-chimique, basée sur des approches pHmétrique et spectrophotométrique, nous a tout d'abord permis de calculer et d'attribuer plusieurs valeurs de constantes de protonation. Les deux fonctions amines tertiaires sont les sites les plus basiques contrairement à la pyridine (site le plus acide), qui constitue le chromophore principale de notre série de ligands synthétisés $\mathbf{L^1}$, $\mathbf{L^2}$, $\mathbf{L^3}$ et $\mathbf{L^4}$. Les ligands présentent une bande d'absorption à environ 270 nm. Cette bande est attribuée aux transitions π-π^* centrées sur la pyridine.

La formation de ponts hydrogène entre l'azote pyridinique et les amines tertiaires protonées a été mise en évidence par une forte augmentation de l'acidité de la pyridine. La constante de protonation de la pyridine ainsi que les deuxièmes constantes de protonation des groupements phosphonates n'ont pas pu être déterminées dans nos conditions expérimentales ($\log K << 2$). Les constantes de protonation déterminées par spectrophotométrie sont en très bon accord avec celles déterminées par potentiométrie.

II- Propriétés de coordination du cuivre(II)

Cette partie du chapitre III est consacrée à l'étude des propriétés de coordination du cuivre (II) avec une série de ligands homogènes **L**^{1}, **L**^{2}, **L**^{3} et **L**^{4} tous basés sur un chromophore pyridinique et des unités méthanephosphonates dont le nombre varie d'un ligand à l'autre (Figure 3.7). Nous examinerons l'influence de ces groupements phosphonatés sur les propriétés de coordination du cuivre(II), ainsi que sur celles d'autres métaux tel que le nickel(II), le zinc(II), le cobalt(II) et le gallium(III). Nous allons très brièvement rappeler les propriétés physicochimiques et spectroscopiques du cuivre(II) ainsi que les propriétés géométriques des complexes cuivriques. Nous exposerons ensuite les différents résultats obtenus lors de l'étude de complexation du Cu(II), Ni(II), Zn(II), Co(II) et Ga(III) avec les quatre ligands synthétisés **L**^{1}-**L**^{4} dont les structures chimiques sont rappelées ci-dessous. La potentiométrique, la spectrophotométrie, la spectrométrie de masse, la résonance paramagnétique électronique (RPE) et la théorie de la fonctionnelle de la densité électronique (DFT) sont les méthodes et les outils qui ont été mise en œuvre afin de déterminer la stabilité thermodynamique des complexes formés ainsi que leurs géométries de coordination.

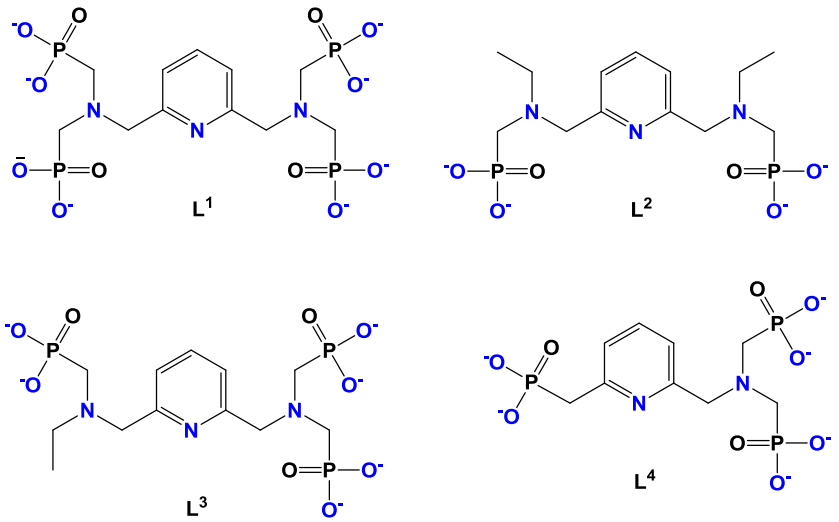


Figure 3.7. *Structure chimiques des ligands* ***L***^{1}, ***L***^{2}, ***L***^{3} *et* ***L***^{4} *sous leurs formes entièrement déprotonées.*

1. Propriétés physico-chimique du cuivre(II)

Le cuivre est un métal rougeâtre de configuration électronique [Ar]3d^{10}4s^{1}, de numéro atomique 29. Il est situé dans la colonne 11 et sur la 4ème période de la classification périodique de Mendeleïev. Il se trouve dans la colonne de l'or et de l'argent, métaux dont il se rapproche à de nombreux égards, au point d'être qualifié de métal semi-noble, voire de métal noble.

Le cuivre appartient à la famille des métaux de transition car il présente des degrés d'oxydation pour lesquels les sous-couches *d* sont incomplètes; il se caractérise par le rôle de ses orbitales *d* dans la formation des liaisons chimiques. Il existe essentiellement aux degrés d'oxydation 0 (métal), +I et +II. On le trouve plus rare aux degrés d'oxydation –I, +III et +IV.

Le Cu(II) est la forme la plus abondante que l'on trouve dans le sang contrairement au Cu(I) qui est principalement présent dans les cellules en raison de la présence de réducteurs biologiques dans le milieu cellulaire tel que le glutathion.[18,19] Dans l'eau, le seul degré d'oxydation stable est +II, sous la forme hexahydraté, $[Cu(H_2O)_6]^{2+}$, à partir de laquelle des édifices de coordination peuvent être formés par simple addition de ligand.[20] Le Cu(II) peut être considéré comme un cation acide dur dans la classification de Pearson.[21,22] Cette théorie est très utilisée en chimie de coordination pour expliquer la stabilité des composés et leurs réactivités. Pearson a classé les espèces métallique ou acides et base de Lewis en trois catégories, dur (Hard), mou (Soft) et intermédiaire (Borderline). Le terme acide dur s'applique aux acides ou aux ions qui ont un petit rayon ionique (< 90 pm), un état d'oxydation élevé; ils sont peu polarisables et ont une faible électronégativité de Pauling (0,7 – 1,6). Le Cu(I) est considéré comme un acide mou (rayon ionique de 0,74 Å pour CN = 4) tandis que le Cu(II) peut être assimilé à un acide intermédiaire (rayon ionique de 0,71 Å pour CN = 4). Par conséquent, les ligands les mieux adaptés à la coordination du Cu(II) peuvent contenir des atomes coordinants de type O, N ou Cl^-.[23,24,25]

Le Cu(I) possède une configuration (Ar) $3d^{10}$ qui lui confère une chimie très différente de celle du Cu(II). Il forme des complexes diamagnétiques, [3,7,26] contrairement au Cu(II) qui a une configuration (Ar) $3d^9$ qui fait que les complexes de Cu(II) sont colorés et paramagnétiques, ce qui permet de les étudier par résonance paramagnétique électronique.[27,28]

1.1. Propriétés d'oxydoréduction

Les propriétés d'oxydoréduction du cuivre sont fortement liées à la distribution de ses électrons sur ses orbitales électroniques. Dans l'eau, la stabilité relative du Cu(I) par rapport au Cu(II) est donnée par le potentiel d'oxydoréduction de ce couple.

$$Cu^+ + e^- \rightleftharpoons Cu \quad E^0 = 0{,}52V/\ ENH$$

$$Cu^{2+} + e^- \rightleftharpoons Cu^+ \quad E^0 = 0{,}16V/\ ENH$$

D'ou $$Cu + Cu^{2+} \rightleftharpoons 2Cu^+ \quad E^0 = -0{,}37V/\ ENH$$

Avec $K_{disproportionation} = [Cu^{2+}]/\ [Cu+]^2 = \sim 10^6$

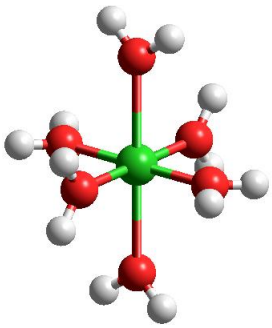
Le Cu(I) à une tendance à s'oxyder facilement et perdre un électron de sa couche *d*. C'est donc un réducteur très puissant qui, en biologie, peut réagir avec H_2O_2 selon un mécanisme de type Fenton (équation 1) et former un radical hydroxylé $HO^{\bullet}$ qui est un oxydant très puissant et extrêmement toxique pour l'organisme.

$$Cu^{+} + H_2O_2 \longrightarrow Cu^{2+} + OH^{-} + OH^{\bullet} \qquad (1)$$

1.2. Propriétés de coordination

La structure électronique d^{10}, permet une grande variété de géométries pour les dérivés du cuivre(I) tandis que la structure d^9 du cuivre(II) favorise de multiples géométries par distorsion de type Jahn-Teller de la géométrie octaédrique des complexes $(t_{2g})^6$ $(e_g)^3$. Les complexes de Cu(II) vont subir une distorsion le long de l'un des axes de symétrie quaternaire (axe z), ce qui a pour effet de diminuer la répulsion électrostatique entre le doublet libre du ligand et les électrons du métal central, de lever la dégénérescence orbitalaire $(e_g)^3$ et enfin de diminuer l'énergie totale du complexe. Cette déformation de la géométrie se traduit par une élongation des distances métal-ligand et peut occasionnellement provoquer des raccourcissements de cette liaison.

L'effet Jahn-Teller est responsable de la distorsion de la géométrie de l'espèce $[Cu(H_2O)_6]^{2+}$. Ce complexe qui devrait posséder une géométrie octaédrique est autant déformé en solution qu'a l'état cristallin.[29] A l'état solide, les deux liaisons Cu-O axiales sont égales à 2,45 Å, tandis que les quatre liaisons équatoriales ont pour distance 2Å, ce qui donne au cation $[Cu(H_2O)_6]^{2+}$ une géométrie octaédrique déformée avec un caractère rhombique[30] (Figure 3.8).



$[Cu(H_2O)_6]^{2+}$

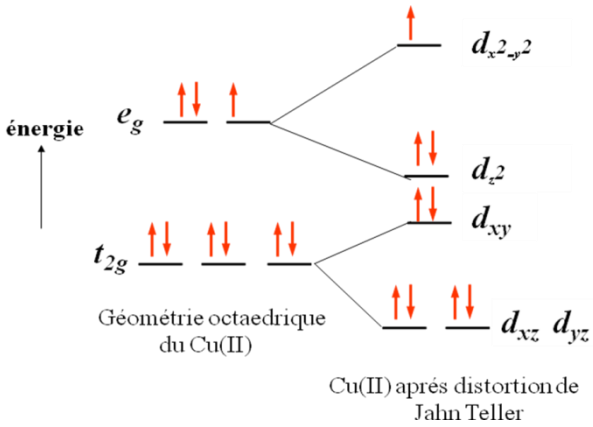


Figure 3.8. *Structure du complexe hexaaquacuivre(II) à l'état solide.*

Le Cu(II) forme des complexes cuivriques dont le nombre de coordination varie entre quatre et six (Tableau 3.4), mais contrairement aux autres métaux de transition, ces complexes de Cu(II) se caractérisent par des distorsions géométriques importantes.[10,31]

Nombre de coordination	Géométrie
4	Tétraédrique
	Plan Carrée
5	Bipyramide à base triangulaire (trigonale)
	Pyramide à base carrée
6	Octaédrique
	Octaédrique déformé

Tableau 3.4. *Nombre de coordination et stéréochimie des complexes de Cu(II).* [3]

La géométrie tétraédrique pour le Cu(II) implique toujours un aplatissement significatif le long de l'axe de symétrie C_4. Seuls les complexes plans carrés sont normalement réguliers. Les géométries pentacoordinées ne sont pas régulières, ce qui implique une élongation et une déformation du plan trigonal.[15] La géométrie bipyramide trigonale peut par exemple se déformer vers une pyramide à base carrée. En raison de la stabilisation énergétique exercée par le champ du ligand, le cuivre(II) est généralement moins labile que le cuivre(I). De ce fait, il s'avère être un meilleur candidat pour l'incorporation dans des produits radiopharmaceutiques.

1.3. Propriétés spectroscopiques

Le comportement spectroscopique du Cu(II) est souvent déterminé par la stéréochimie des complexes cuivriques formés.[32, 33, 34] La couleur des complexes de Cu(II) peut résulter de transitions intraconfigurationnelles entre orbitales *d*. Une transition électronique de type *d-d* est une transitions au cours de laquelle un électron passe du niveau t_{2g} au niveau e_g pour une géométrie octaédrique. Ces transitions résultent de l'absorption d'un photon de la lumière visible et la couleur observée correspond à la couleur complémentaire de la lumière absorbée.

En plus des transitions *d-d* centrées sur le métal et qui sont observées à partir de 500 nm, d'autres transitions peuvent prendre place dans un complexe de Cu(II) comme les transferts de charge. Ces transitions électroniques peuvent être de trois types : transfert de charge du métal vers le ligand (MLCT), transfert de charge du ligand vers le métal (LMCT), des transition internes centrées sur le ligand qui sont observées entre 260 et 500 nm et des transfert intervalence sur tout l'intervalle de longueurs d'onde. Pour le cuivre(II), ces transitions sont attribuées au transfert de charge du ligand vers le métal et elles permettent de

se renseigner sur la nature des ligands qui coordinent le cation cuivrique. [35] Toutes ces transitions prennent place principalement entre 220 et 2000 nm. Dans cet intervalle de longueurs d'onde, nous pouvons observer les transitions électroniques présentées à la Figure 3.9.

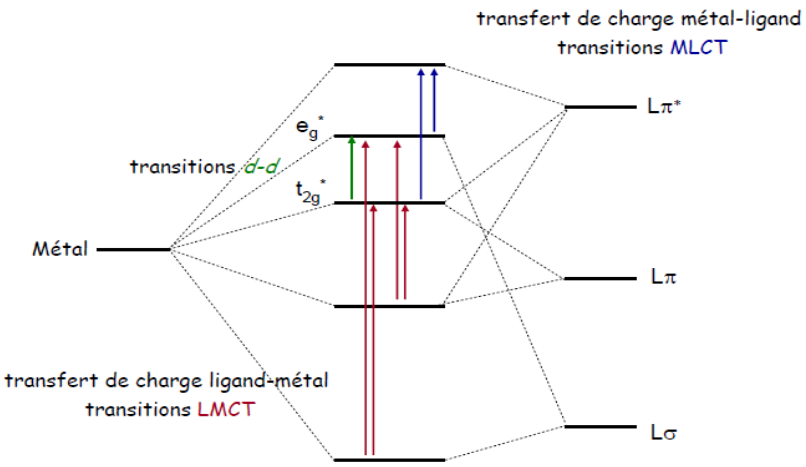


Figure 3.9. *Transitions électroniques observées pour un complexe de Cu(II).*

Parmi toutes ces transitions, seules les transitions *d-d* centrées sur le métal permettent de donner des informations sur la stéréochimie des complexes de Cu(II) formés. Dans le cas des chromophores de type CuN_x, il a été possible d'établir une corrélation entre les énergies des transitions *d-d* et les différentes géométries adoptées par ces complexes cuivriques (Figure 3.10).[36]

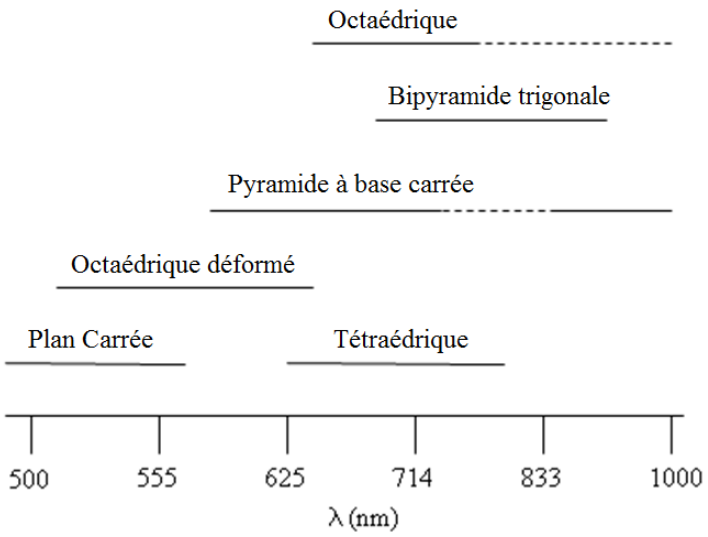


Figure 3.10. *Longueurs d'onde des transitions d-d pour des chromophores CuN_4 de différentes géométries.*[19]

2. Coordination du cuivre(II)

Des méthodes potentiométriques et spectrophotométriques couplées à la potentiométrie ont été mises en œuvre afin de déterminer la stabilité thermodynamique des complexes de Cu(II) formés avec les ligands **L**^{1}, **L**^{2}, **L**^{3} et **L**^{4} (Figure 3.7). Cette étude comprend également la détermination de la sélectivité de complexation du Cu(II) par rapport à d'autres métaux de tels que le Ni(II), le Zn(II), le Co(II) ou le Ga(III). La spectrométrie de masse en mode electrospray (ESMS) nous a également permis de caractériser et de déterminer la stœchiométrie des complexes métalliques formés en solution avec cette série de ligand étudiés. Enfin, des études par spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE) du complexe Cu**L**^{1} nous ont permis de suggérer la géométrie de coordination adoptée par les complexes de Cu(II) formés avec cette nouvelle famille de ligands.

2.1. Approche potentiométrique

Les titrages potentiométriques des complexes cuivriques formés avec les ligands **L**^{1}, **L**^{2}, **L**^{3} et **L**^{4} ont été réalisés pour des rapports [Ligand]/[Cu(II)] proche de 1. Nous présentons à la Figure 3.11 les données potentiométriques enregistrées pour les complexes Cu**L**^{1}, Cu**L**^{2}, Cu**L**^{3} et Cu**L**^{4}.

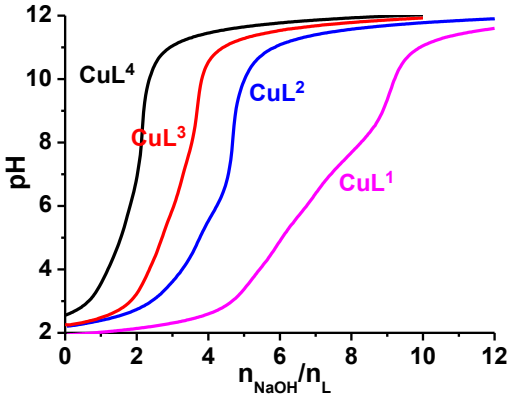


Figure 3.11. *Titrages potentiométriques des complexes cuivriques formé avec les ligands* ***L***^{1}, ***L***^{2}, ***L***^{3} *et* ***L***^{4}. *Solvant = H_2O ; T = (25,0 ± 0,2) °C ; I = 0,1 M ($NaClO_4$); $[\mathbf{L}^1]_{tot}$ = 1 ×10^{-3} M ; $[\mathbf{L}^2]_{tot}$ = 2,44× 10^{-3}M ;$[\mathbf{L}^3]_{tot}$ = 1,63 × 10^{-3} M et $[\mathbf{L}^4]_{tot}$ = 1,12 × 10^{-3} M.*

Les constantes de stabilité des complexes monocuivriques formés avec nos ligands sont rassemblées dans le Tableau 3.5. Le traitement statistique des données expérimentales a été réalisé à l'aide du logiciel Hyperquad.[37,38]

Equilibre	log $K_{CuLHx}(3\sigma)$			
	L^1	**L^2**	**L^3**	**L^4**
L + Cu $\xrightleftharpoons{K_{CuL}}$ Cu**L**	22,71(9) [a]	19,50(9)[a]	19,1 (3) [a]	19,3 (6) [a]
Cu**L** + H^+ $\xrightleftharpoons{K_{CuLH}}$ Cu**L**H	8,24(8)[a]/8,20(5)[b]	6,30(1) [a]	7,8(3)[a]/7,7(5)[b]	6,1(7)[a]/8,5(7)[b]
Cu**L**H + H^+ $\xrightleftharpoons{K_{CuLH2}}$ Cu**L**H_2	7,15(9)[a]/6,9(5)[b]	4,71(9) [a]	5,8(3)[a]/5,7(3)[b]	4,9(8)[a]/4,9(6)[b]
Cu**L**H_2 + H^+ $\xrightleftharpoons{K_{CuLH3}}$ Cu**L**H_3	5,7(1) [a]	-	4,3 (3) [a]	-
Cu**L**H_3 + H^+ $\xrightleftharpoons{K_{CuLH4}}$ Cu**L**H_4	4,0(2) [a]	-	-	-

Solvant : H_2O ; I = 0,1 M ; T = 25,0(2) °C. Erreur = 3σ avec σ = déviation standard. K_{MLHx} = [MLH_x]/[[MLH_x][H]. Les charges ont été omises pour des raisons de clarté. [a] Titrages potentiométriques. [b] Titrages spectrophotométriques en fonction du pH.

Tableau 3.5. *Constantes de stabilités des espèces monocuivriques formés avec les ligands **L^1**, **L^2**, **L^3** et **L^4***

Les ligands **L^1**, **L^2**, **L^3** et **L^4** forment essentiellement des monochélates monocuivriques comme la plupart des dérivés polyaminométhanephosphonates déjà décrits dans la littérature (Figure 3.12). Ceci a été vérifié grâce à la méthode des variations continues [39] à pH 2.

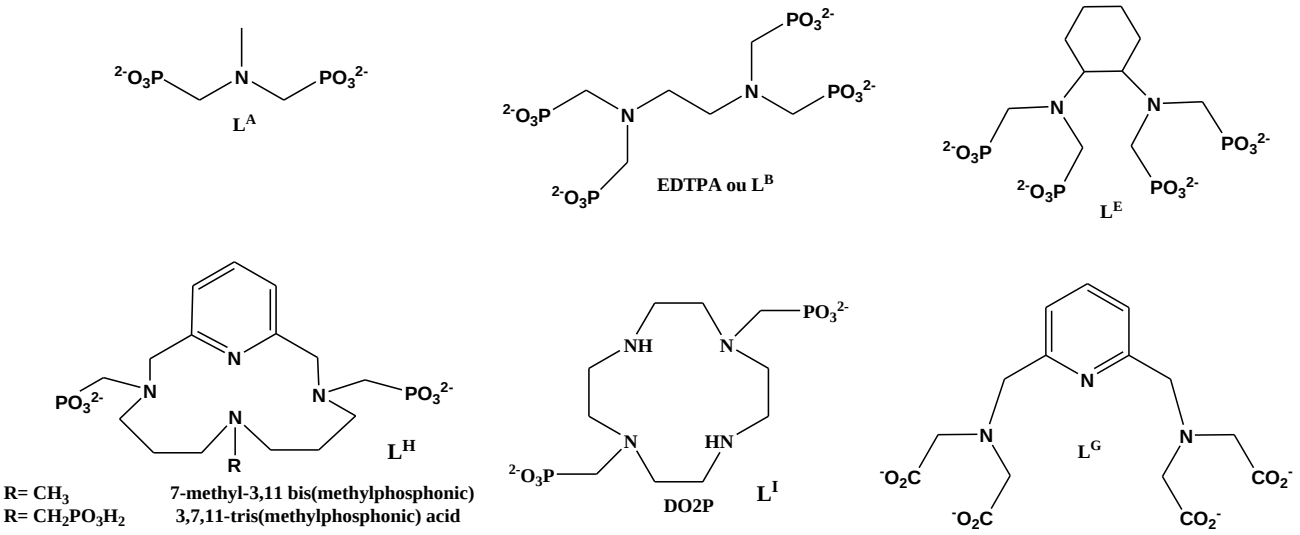


Figure 3.12. *Structures chimiques de différents chélateurs du Cu(II) de nature acyclique et cyclique.*

A titre d'exemple la Figure 3.13 illustre la détermination de la stœchiométrie du complexe Cu**L^1** par la méthode des variations continues.

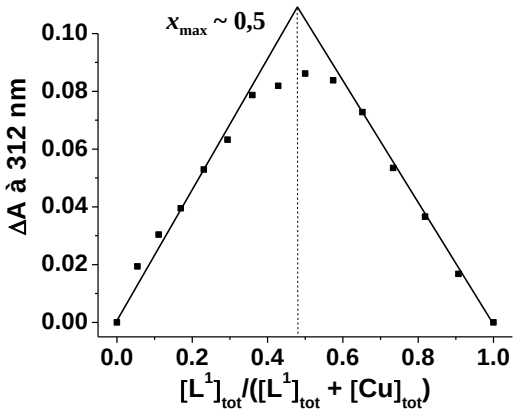


Figure 3.13. Tracé de *Job (ΔA/ΔAmax à 312 nm) obtenu en mélangeant : (**L**^{1} et Cu^{2+}). Solvant : H_2O; T = 25,0(2) °C ; I = 0,1M ($NaClO_4$) ; pH = 2,0 ; ($[L^1]_{tot}$ +$[Cu^{2+}]_{tot}$) = 3,5×10^{-4} M.*

Nous observons un maximum de la courbe à une valeur x_{max} = $[\mathbf{L^1}]_{tot}/([\mathbf{L^1}]_{tot}$ + $[Cu^{2+}]_{tot})$ ~ 0,5 qui pouvait correspondre à la présence d'un complexe de stœchiométrie 1:1. Les autres systèmes (**L**^{2}, **L**^{3} et **L**^{4}) montrent également la formation exclusive de complexes monocuivriques. Ces premières données seront confirmées par des études par spectrométrie de masse en mode électrospray que nous présenterons ultérieurement dans ce chapitre.

Les résultats obtenus par potentiométrie (Tableau 3.5) montrent que les complexes de Cu(II) formés avec les ligands polyaminophosphonatés synthétisés se caractérisent par de fortes stabilités, comparables à celles mesurées, par exemple, pour l'**EDTPA** ((éthylènediamine-N,N,N',N'-tétrakis(méthanephosphonate) noté **L**$^{\mathbf{B}}$). [40,41] Ces complexes monocuivriques avec les ligands **L**^{1}-**L**^{4} sont, en outre, beaucoup plus stables que le modèle **L**$^{\mathbf{A}}$ (acide *N*-méthylamino-*N*,*N*-bis(méthylènephosphonic)[42,43] qui représente une sous-unité de **L**^{1}, ainsi que **L**$^{\mathbf{G}}$ ((2,6-bis[bis((carboxyméthyl)amino)méthyl]pyridine)), analogue structurale de **L**^{1}, qui possède des fonctions carboxylates terminales.[44] Le ligand **L**^{1} tetraphosphonaté forme des complexes de Cu(II) très stables comparé à ceux formés avec les ligands **L**^{2}, **L**^{3} et **L**^{4}. L'absence d'une ou de deux unités phosphonates pour **L**^{2}, **L**^{3} et **L**^{4} se traduit par une déstabilisation de près de trois ordres de grandeur des complexes de Cu(II) (log $K_{\mathrm{Cu}\mathbf{L2}}$ = 19,5(9), log $K_{\mathrm{Cu}\mathbf{L3}}$ = 19,1(3), log $K_{\mathrm{Cu}\mathbf{L4}}$ = 19,3(6)) par rapport à ceux formés avec **L**^{1} (log $K_{\mathrm{Cu}\mathbf{L1}}$ = 22,71(7)). Ces résultats montrent très clairement l'importance de ces quatre groupements phosphonate sur la stabilité globale des complexes cuivriques.

En outre, les complexes Cu**L**^{1} sont capables de se protoner quatre fois successivement contrairement aux complexes Cu**L**^{3} qui ne se protone que trois fois de suite, tandis que les complexes formés avec **L**^{2} et **L**^{4} conduisent à des espèces mono et diprotonées. Les sites de

protonation des complexes monocuivriques correspondent probablement aux unités méthanephosphonates, ce qui implique que les azotes tertiaires sont toujours engagés dans la coordination du Cu(II). La participation de l'azote pyridinique à la coordination du Cu(II) n'est pas exclue. En effet, si nous comparons la constante de stabilité du complexe CuL^1 à celle de son analogue $\mathbf{L^E}$ contenant un groupement phényl[45] (Figure 3.12) au lieu de la pyridine, nous pouvons observer une stabilisation de plus de sept ordres de grandeur, qui indique clairement l'influence de l'azote pyridinique sur la coordination du Cu(II). De plus, des structures analogues linéaires ou macrocycliques comparables indiquent aussi la participation de l'azote pyridinique à la coordination du Cu(II).[46, 47]

Enfin, nous pouvons noter que si des différences existent entre les constantes de protonation des unités phosphonates $–PO_3^{2-}$ mesurées pour les ligands $\mathbf{L^1}$, $\mathbf{L^2}$, $\mathbf{L^3}$ et $\mathbf{L^4}$ et leurs complexes de Cu(II), la basicité moyenne de ces sites ionisables ne varie que très peu ($\mathbf{L^1}$: $\log K^{H}_{moy} = 6{,}06$, $\log K_{CuL}{}^{H}_{moy} = 6{,}27$, $\mathbf{L^2}$: $\log K^{H}_{moy} = 5{,}2$, $\log K_{CuL}{}^{H}_{moy} = 5{,}54$, $\mathbf{L^3}$: $\log K^{H}_{moy} = 5{,}71$, $\log K_{CuL}{}^{H}_{moy} = 5{,}96$, $\mathbf{L^4}$: $\log K^{H}_{moy} = 5{,}81$, $\log K_{CuL}{}^{H}_{moy} = 5{,}51$). Ceci est en accord avec les valeurs mesurées pour l'**EDTPA** ($\mathbf{L^B}$, $\log K^{H}_{moy} = 5{,}59$, $\log K_{CuL}{}^{H}_{moy} = 5{,}57$).

A partir des valeurs thermodynamiques présentées dans le Tableau 3.5, nous avons calculé les diagrammes de distribution des complexes monocuivriques en fonction du pH grâce au logiciel Hyss (Figure 3.14).[48]

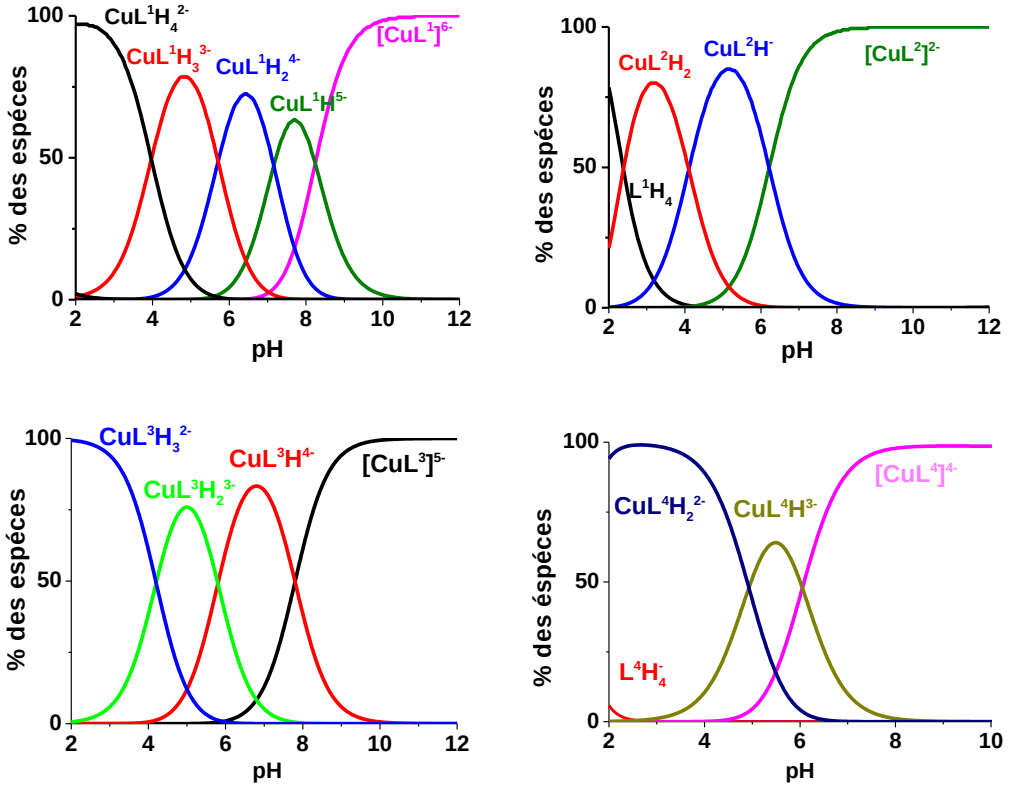


Figure 3.14. *Courbes de distribution des espèces protonées des complexes de Cu(II) formés les ligands* ***L***^{1}, ***L***^{2}, ***L***^{3} *et* ***L***^{4} *en fonction du pH. Solvant :* H_2O *; T = 25,0 °C ; I = 0,1 M (*$NaClO_4$*).*

A pH = 7,4, les espèces (Cu**L**^{1}H_2^{4-} et Cu**L**^{1}H^{5-}), (Cu**L**^{2}H^{-} et [Cu**L**^{2}]$^{2-}$), (Cu**L**^{3}H^{4-} et [Cu**L**^{3}]$^{5-}$) et (Cu**L**^{4}H^{3-}, [Cu**L**^{4}]$^{4-}$) sont les espèces prédominantes dans ces conditions de pH.

2.2. Approche spectrophotométrique

En complément à nos donnés potentiométriques, nous avons mené des études spectrophotométriques par absorption UV-Visible des complexes de cuivre(II) formé avec les ligands **L**^{1}-**L**^{4} en fonction du pH et à pH fixe.

2.2.1. Titrages spectrophotométriques en fonction du pH

Afin d'obtenir des informations structurales et spectrophotométriques sur les complexes de Cu(II) formés avec notre série de ligands, nous avons réalisé des titrages par absorption UV-visible en fonction du pH. Les spectres (230 nm – 800 nm) ont été enregistrés pour des rapports $[\mathbf{L}]_{tot}/[Cu(II)]_{tot}$ ~ 1 et dans une gamme de pH comprise entre 2 et 12 (Figure 3.15).

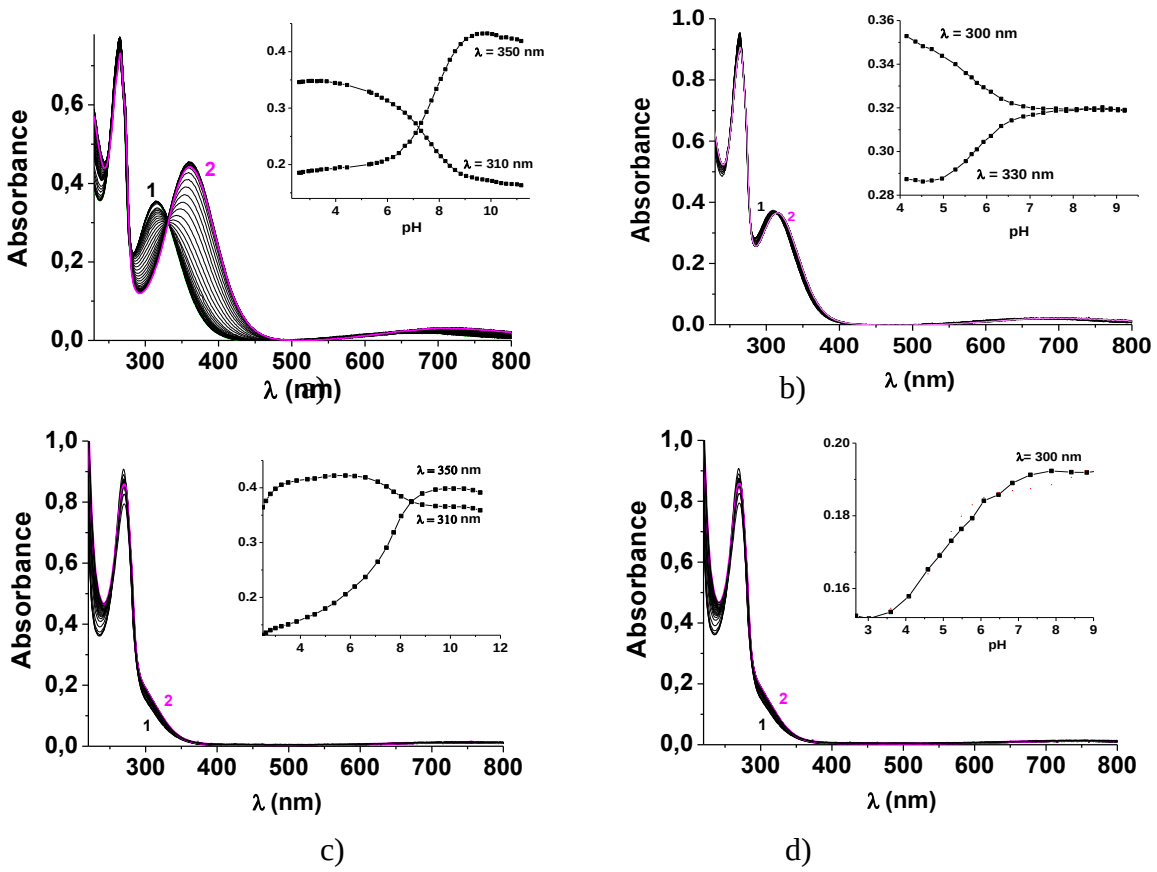


Figure 3.15. *Titrages spectrophotométriques (absorption UV-visible) des complexes cuivriques formés avec* $\mathbf{L^1}$, $\mathbf{L^2}$, $\mathbf{L^3}$ *et* $\mathbf{L^4}$ *en fonction du pH. Solvant :* H_2O *; I = 0,1 M (*$NaClO_4$*) ; T = 25,0 °C ; l = 1 cm ; a)*$[\mathbf{L^1}]_{tot} = [Cu]_{tot} = 1{,}41 \times 10^{-4}$ *M; b)*$[\mathbf{L^2}]_{tot} = 1{,}39 \times 10^{-4}$ *M ;* $[Cu]_{tot} = 1{,}30 \times 10^{-4}$ *M; c)* $[\mathbf{L^3}]_{tot} = [Cu]_{tot} = 1{,}78 \times 10^{-4}$*M ; d)* $[\mathbf{L^4}]_{tot} = [Cu]_{tot} = 1{,}3 \times 10^{-4}$ *M).*

Les complexes de Cu(II) avec les ligands polyaminophosphonatés possèdent des sondes spectroscopiques très informatives telles que les intenses bandes de transfert de charge amino-Cu(II) et les faibles transitions *d-d* centrées sur le cuivre divalent. Elles permettent de suivre la formation des complexes de cuivre et de donner des informations sur la géométrie de coordination du métal.

Les complexes monocuivriques formés avec les ligands $\mathbf{L^1}$, $\mathbf{L^2}$, $\mathbf{L^3}$ et $\mathbf{L^4}$ se caractérisent par une bande d'absorption structurée dont le maximum d'absorption est centrée à ~ 260 nm et qui correspond aux transitions π-π^* de la pyridine. Cette famille de ligand se caractérise, en outre par une large et intense bande d'absorption centrée à environ 315 nm qui correspond à un transfert de charge de type ligand → métal (amino → Cu(II)) et confirme l'implication des deux azotes tertiaires dans la coordination du Cu(II)[49,50] et, ce, dès les pH acides. Cette bande d'absorption est d'autant plus intense que le pH de la solution augmente. L'absorption vers 650 nm est caractéristique des transitions d-d centrées sur le Cu(II). Ces transitions d-d sont celles qui permettent de fournir le plus d'informations sur la stéréochimie et le nombre de

coordination des complexes de Cu(II).[19] Les transitions *d- d* observées dans la région visible (λ_{max} 500-700 nm) sont indicatives d'une géométrie octaédrique ou pyramide à base carré,[51] tandis que les transitons *d-d* observé au delà de 800 nm témoignent de la formation des complexes de géométrie bipyramidale à base trigonale.[52]

Lorsque le pH augmente, un déplacement bathochrome d'environ 40-50 nm est observé pour les absorptions centrées à 315 nm et à 650 nm pour $\mathbf{L^1}$ et $\mathbf{L^3}$, ce qui n'est pas le cas des deux ligands L^2 et L^4, tandis que l'absorption du chromophore pyridine varie peu. Ces variations spectrales témoignent de modifications géométriques et structurales importantes des complexes de Cu(II) lorsque les unités méthanephosphonates se déprotonent. Au-delà de pH 9-10, aucune autre variation spectrale n'est observée. Le traitement statistique des données spectrophotométriques et potentiométriques[53,54,55] nous a permis de déterminer les constantes de protonation des complexes de cuivre(II) formés avec nos quatre systèmes qui sont en bon accord avec celles déterminées précédemment par potentiométrie (Tableau 3.5). Les constantes d'hydrolyse du Cu(II) ont été prises en compte lors du calcul des constantes de protonation des complexes de Cu(II) (log $K_{Cu(OH)+}$ = - 6,29 et log $K_{Cu(OH)2}$ = - 13,31).[73] Nous avons également calculé les spectres électroniques des différentes formes protonées des complexes cuivriques formés avec $\mathbf{L^1}$, $\mathbf{L^2}$, $\mathbf{L^3}$ et $\mathbf{L^4}$ que nous présenterons à la Figure 3.16.

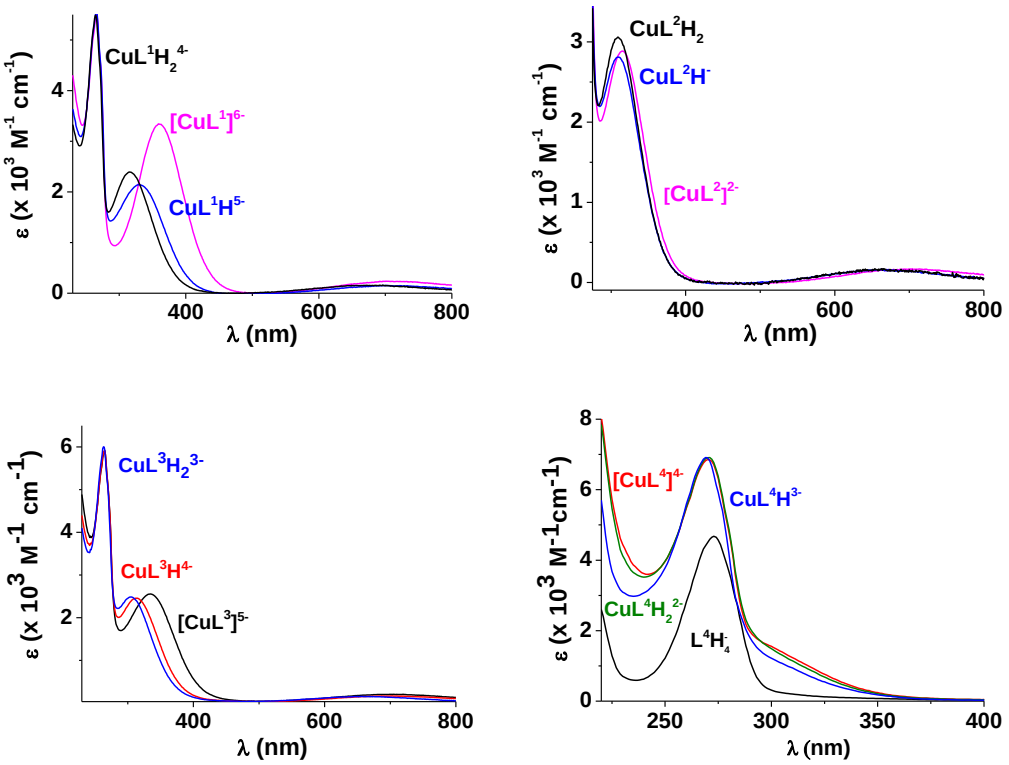


Figure 3.16. *Spectres électroniques calculés des espèces monocuivriques protonées formées avec* $\boldsymbol{L^1}$, $\boldsymbol{L^2}$, $\boldsymbol{L^3}$ *et* $\boldsymbol{L^4}$. *Solvant :* H_2O *; T = 25,0(2) °C ; I = 0,1 M* ($NaClO_4$).

Le Tableau 3.6 rassemble les caractéristiques spectrophotométriques (λ_{max} et ε_{max}) des divers complexes monocuivriques protonés formés avec les ligands **L**^{1}, **L**^{2}, **L**^{3} et **L**^{4}.

	L^1		**L**^{2}		**L**^{3}		**L**^{4}	
	λ_{max} (nm)	ε_{max} ($\times 10^3$ M^{-1} cm^{-1})	λ_{max} (nm)	ε_{max} ($\times 10^3$ M^{-1} cm^{-1})	λ_{max} (nm)	ε_{max} ($\times 10^3$ M^{-1} cm^{-1})	λ_{max} (nm)	ε_{max} ($\times 10^3$ M^{-1} cm^{-1})
	265	5,52	-	-	265	5,91	271	6,85
CuL	359	3,35	316	2,88	335	2,55	300	1,56
	703	0,24	701	0,17	702	0,20	-	-
	266	5,57	-	-	265	5,91	271	6,91
CuLH	333	2,14	309	2,81	314	2,46	300	1,49
	702	0,15	662	0,17	703	0,17	-	-
	264	5,49	-	-	263	6,01	269	6,91
CuLH$_2$	315	2,39	309	3,06	305	2,49	300	1,22
	653	0,15	663	0,17	658	0,15	-	-

Tableau 3.6. *Caractéristiques spectrales des espèces protonées des complexes cuivriques formés avec **L**^{1}, **L**^{2}, **L**^{3} et **L**^{4}. Solvant : H_2O ; T = 25,0(2) °C ; I = 0,1 M ($NaClO_4$). Les charges ont été omises pour plus de clarté.*

Nos données spectroscopiques sont en accord avec celles obtenues avec les bis - et tris(méthanephosphonate) tétraazamacrocycle contenant un groupement pyridine (ligand **L**^{H}) (Figure 3.12).[56] Dans le cas d'un système macrocyclique contenant deux bras méthanephosphonates (**DO2P** ou **L**^{I}) le Cu(II) est pentacoordiné avec quatre atomes d'azote incluant l'azote pyridinique et une unité phosphonate.[39] Que ce soit en solution ou à l'état solide, ces complexes adoptent une géométrie pyramidale à base carrée déformée avec les trois atomes d'azote et un atome d'oxygène d'une unité phosphonate formant la base du carré. La position apicale est occupée par une amine secondaire.

Les spectres électroniques des complexes de Cu(II) entièrement déprotonés formés avec les ligands **L**^{1}- **L**^{4} se caractérisent par des bandes d'absorption LMCT entre 300 et 360 nm avec des coefficients d'extinction molaire $\varepsilon \sim 3000$ $M^{-1}cm^{-1}$ pour les complexes Cu**L**^{1}, Cu**L**^{2} et Cu**L**^{3} contrairement au complexe Cu**L**^{4} qui se caractérise par un faible coefficient d'extinction molaire ($\varepsilon \sim 1550$ $M^{-1}cm^{-1}$). En plus des bandes LMCT, On observe les bandes *d-d* situées vers 700 nm avec des coefficients d'extinction molaire beaucoup plus faibles ($\varepsilon \sim 200$ $M^{-1}cm^{-1}$). Ces bandes LMCT sont conservées dans une large gamme de pH avec toutefois un déplacement hypsochrome de 44 nm et de 30 nm entre les espèces Cu**L**^{1} et Cu**L**$^1H_2$ et les complexes Cu**L**^{3} et Cu**L**$^3H_2$. Les bandes LMCT des complexes cuivriques avec **L**^{2} et **L**^{4} sont non affectées par la protonation. Ces déplacements vers les plus fortes énergies indiquent qu'au moins un groupement méthanephosphonate est protoné, ce qui renforce la liaison N→ Cu(II). Sur la base de toutes ces données spectroscopiques, des mêmes propriétés

de coordination similaires peuvent être proposées pour nos ligands. L'ion métallique Cu(II) forme très probablement des complexes de géométries pyramidales à base carrée déformées. En conséquence, les bandes *d-d* se déplacent vers les faibles énergies. Pour la deuxième protonation, les transitions *d-d* et LMCT sont déplacées vers les hautes énergies, ce qui indique un changement de la géométrie de coordination.[39] Les calculs DFT nous permettent de confirmer la géométrie de coordination pour le complexe $[Cu\mathbf{L^1}]^{6-}$; les résultats obtenus seront discutés dans la suite de ce chapitre.

2.2.2. Titrages spectrophotométriques à pH fixe

Dans l'objectif de confirmer la stœchiométrie des complexes cuivriques prédominants dans différentes conditions d'acidité et de calculer la valeur de leurs constantes de stabilité conditionnelles, nous avons réalisé des titrages spectrophotométriques à pH acide des ligands $\mathbf{L^1}$-$\mathbf{L^4}$ par le Cu(II). Cette étude à été réalisée en ajoutant des quantités croissante d'une solution de cuivre(II) à une solution de ligand à pH 1,0 ou pH 2,0. A titre d'exemple, les variations spectrales obtenues au cours du titrage spectrophotométrique de $\mathbf{L^1}$ par Cu(II) à pH 1,0 et à pH 2,0 sont données à la (Figure 3.17).

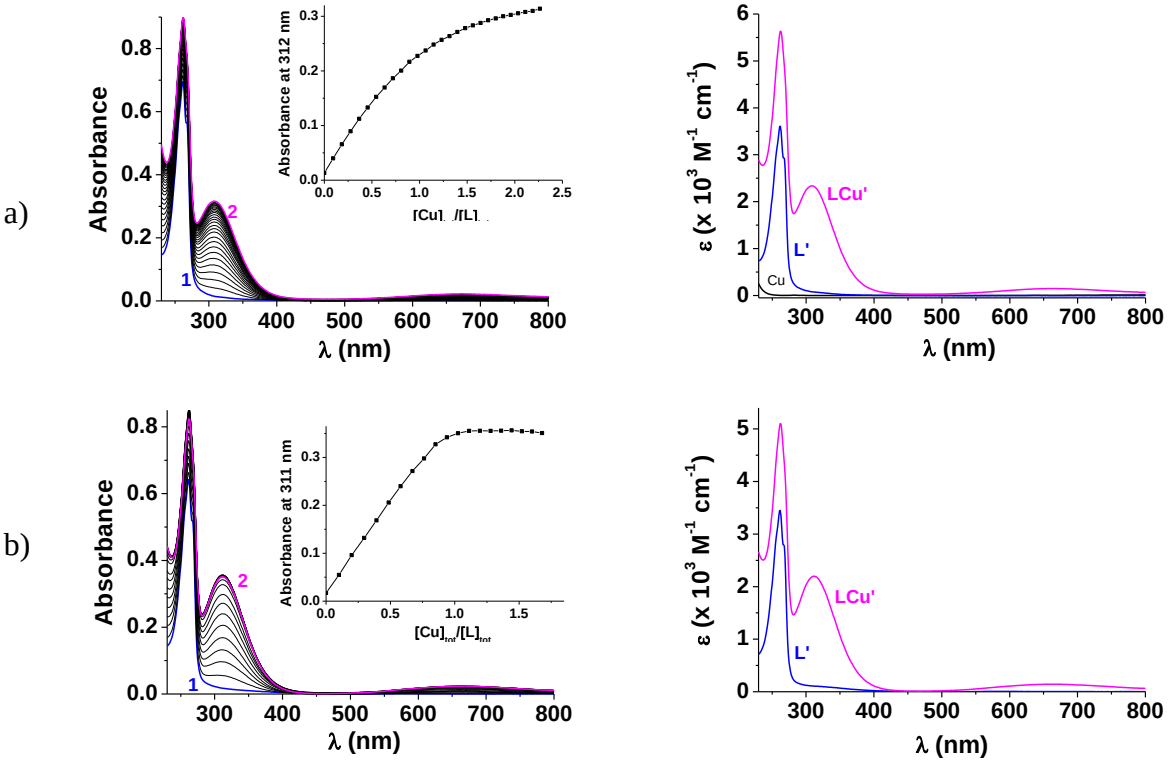


Figure 3.17. *Titrages spectrophotométriques du ligand* $\boldsymbol{L^1}$ *en fonction de* $[Cu(II)]_{tot}$ *et les spectres électroniques recalculés des complexes cuivriques formés avec le ligand* $\boldsymbol{L^1}$ *à a) pH = 1 et b) pH= 2. Solvant :* H_2O *; I = 0,1 M* ($NaClO_4$) *; T= 25,0(2) °C.*

Les données spectrophotométriques ont été traitées par des méthodes statistiques[31,36-38] et nous ont permis de calculer des constantes de stabilité conditionnelles log K^*_{CuL1} et log K^*_{CuL} (* désigne les conditions apparentes de pH), ainsi que les spectres électroniques apparents des complexes de Cu(II) dans ces conditions d'acidité (Figure 3.17). Nous avons recalculé la constante conditionnelle K^*_{CuL} à pH 2 des complexes monocuivrique formés avec les ligands $\mathbf{L^1}$-$\mathbf{L^4}$ à partir des données potentiométriques et spectrophotométriques des ligands libres et de leurs complexes de cuivre(II) à partir de l'équation suivante:

$$K^*_{CuL} = K_{CuL}\frac{\alpha_{CuL}}{\alpha_{Cu}\alpha_L}$$

Où α_{CuL}, α_{Cu} et α_L sont respectivement les coefficients de Schwarzenbach[15] des complexes monocuivriques, du cuivre(II) (log β_{11} = - 7,72, log β_{12} = -14,82 et log β_{22} = -10,75 [15,16]) et du ligand libre au pH considéré. Ces coefficients peuvent être calculés à partir des relations suivantes:

$$\alpha_{L} = 1 + \beta_1^H[H] + \beta_2^H[H]^2 + \beta_3^H[H]^3 + \ldots + \beta_i^H[H]^i$$

$$\alpha_{CuL} = 1 + \beta_{111}[H] + \beta_{112}[H]^2 + \ldots + \beta_{11i}[H]^i$$

$$\alpha_{Cu} = 1 + \beta_{1\text{-}1}[H]^{-1} + \beta_{1\text{-}2}[H]^{-2} + \beta_{2\text{-}2}[H]^{-2}$$

Les valeurs des constantes conditionnelles déterminées par cette approche (log $K^*_{Cu\mathbf{L1}}$ = 4,05(4) à pH 1,0 et log $K^*_{Cu\mathbf{L1}}$ = 5,8(3) à pH = 2.0) sont en bon accord avec celles qui sont recalculées (log $K^*_{Cu\mathbf{L1}}$ = 4,05 à pH 1,0 et log $K^*_{Cu\mathbf{L1}}$ = 6,04 à pH = 2.0) à partir des constantes de protonation du ligand libre[57] et des constantes de stabilité des complexes de Cu(II) (Tableau 3.5). Ces résultats nous permettent, en outre, de confirmer la stœchiométrie 1:1 des complexes cuivriques.

Les spectres électroniques obtenus à pH 2,0 et à pH 1,0 se caractérisent par une bande d'absorption intense centrée à 263 nm (ε_{263} = 5,40 × 10^3 M^{-1} cm^{-1} à pH 1 et ε_{263} = 5,1 × 10^3 M^{-1} cm^{-1} à pH 2,0) qui correspond aux transitions π–π^* de la pyridine. Une bande de transfert de charge N→Cu(II) à 312 nm (ε_{308} = 2,34 × 10^3 M^{-1} cm^{-1} à pH 1,0 et ε_{312} = 2,47 × 10^3 M^{-1} cm^{-1} à pH 2,0), ainsi qu'une bande d'absorption de plus faible intensité (transitions *d-d* du Cu(II), ε_{663} = 147 M^{-1} cm^{-1} à pH 1,0 et ε_{663} = 143 M^{-1} cm^{-1} à pH 2,0) sont également observées. Ces données sont en parfait accord avec les paramètres spectrophotométriques de l'espèce Cu$\mathbf{L^1}H_2^{4-}$ qui représente l'espèce prédominante dans ces conditions d'acidité (Figure 3.14).

Les titrages des ligands **L**^{2}, **L**^{3} et **L**^{4} par le Cu(II) ont été réalisés à pH 2,0 et les constantes de stabilités conditionnelles calculées sont présentées dans le Tableau 3.7.

Complexes	log K^*_{CuL} mesuré	log K^*_{CuL} recalculé
Cu**L**^{1}	5,8(3)	6,04
Cu**L**^{2}	3,5(2)	2,29
Cu**L**^{3}	3,58(1)	2,46
Cu**L**^{4}	/	2,6

Tableau 3.7. *Constantes de stabilité conditionnelles mesurées et calculées pour les complexes cuivriques formés avec les ligands* ***L***^{1}, ***L***^{2}, ***L***^{3} *et* ***L***^{4} *à pH 2,0. Solvant : H_2O ; T = 25,0(2) °C; I = 0,1 M ($NaClO_4$).*

Les complexes de Cu(II) formés avec cette famille de ligands polyaminophosphonatés se caractérisent par une forte stabilité en milieu acide et le ligand **L**^{1} qui contient quatre groupements phosphonates forme des espèces cuivriques plus stables que ceux formés avec les ligands bis et tris phosphonatés.

Pour mieux comprendre l'origine de la forte stabilité des complexes de cuivre(II) formés avec nos ligands phosphonatés **L**^{1}- **L**^{4}, nous nous sommes basés sur l'hypothèse proposée par Lukes et al. qui ont constaté que la structure chimique et la topographie du ligand ainsi que les deux pKa les plus basiques (qui correspondent aux amines) sont les paramètres prédominants dans la complexation du Cu(II).[58] Dans le cas de **L**^{4}, la seconde constante de protonation du ligand correspond à la première protonation d'une fonction phosphonate.

La Figure 3.18 représente l'ensemble des valeurs de p*K*a calculées pour plusieurs ligands linéaires et macrocycliques décrits dans la littérature dont les valeurs de pK_{CuL} et p*K*a sont bien définies. Par une simple régression linéaire, nous pouvons obtenir une estimation de la constante de stabilité des complexes de Cu(II) en appliquant l'équation suivante:

$$\log K_{CuL} = 1{,}13 \times (pK_1 + pK_2) - 2{,}53 \quad (R^2 = 0{,}88)$$

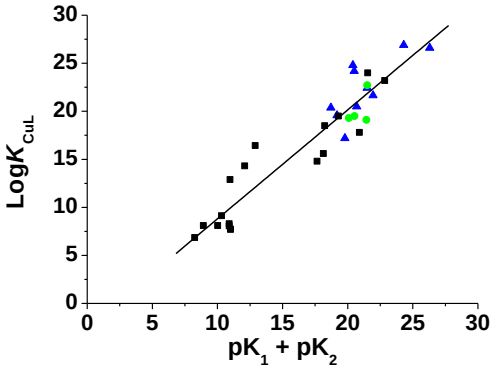


Figure 3.18. *Représentation des valeurs de log K_{CuL} en une fonction de la somme des deux premières valeurs de p*Ka *des amines pour les ligands linéaires* (■) *et cycliques* (▲). *Les valeurs déterminées pour nos ligands polyaminophosphonatés sont représentées par des points* (●).

Cette hypothèse est bien confirmée pour nos quatre ligands et une corrélation linéaire entre le log K_{CuL} et la somme des deux premiers p*K*a du ligand libre a été mise une évidence. Les valeurs des constantes de stabilité estimées des complexes de Cu(II) formés avec les ligands **L^1-L^4** sont ont bon accord avec celles déterminées par potentiométrie (Tableau 3.8).

	log K_{CuL}(potentiométrie)	**log K_{CuL} estimé**
CuL^1	22,71(9)	21,76
CuL^2	19,50(9)	20,67
CuL^3	19,10(3)	21,70
CuL^4	19,30(6)	20,18

Tableau 3.8. *Constantes de stabilité des complexes de Cu(II) formés avec les ligands **L^1-L^4** déterminées par potentiométrie et estimées.*[59]

2.3. Sélectivité de la complexation du Cu(II) par rapport à Ni(II), Zn(II), Co(II) et Ga(III)

Grâce à des titrages potentiométriques, il nous a été possible de déterminer les constantes de stabilité des complexes métalliques formés avec les cations Zn(II), Ni(II), Co(II) et Ga(III) avec les chélatants **L^1-L^4**. Toutes ces données thermodynamiques sont rassemblées dans le Tableau 3.9 et sont comparées à celles qui existent dans la littérature pour des ligands modèles tels que **L^G** (analogue de **L^1** avec des carboxylates terminaux) et **DO2P** (1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,7-bis(méthanephosphonate) (Figure 3.12). Le ligand **DO2P** constitue l'un des ligands phosphonatés les plus efficaces pour la complexation du Cu(II)) décrit à ce jour.

log K_{ML}(3σ)	**L^1**	**L^2**	**L^3**	**L^4**	**L^G**	**DO2P**
log K_{CuL}	22,71(7)	19,50(9)	19,1(3)	19,3(6)	15,69	**28,7**
log K_{NiL}	16,50(3)	14,34(6)	18,2(2)	18,1(4)	-	-
log K_{NiL2}	-	-	-	-	-	-
log K_{ZnL}	17,84(4)	11,99(6)	17,2(2)	12,1(3)	15,84	**21,2**
log K_{GaL}	16,31(9)	12,32(7)	-	-	-	-
log K_{CoL}	16,50(9)	13,9(1)	-	-	-	-

$\mathbf{L} + \mathrm{M} \xrightleftharpoons{K_{ML}} \mathrm{M}\mathbf{L}$, K_{ML} = [ML]/[[M][L] et $\mathrm{M}\mathbf{L} + \mathrm{M} \xrightleftharpoons{K_{ML_2}} \mathrm{M}\mathbf{L}_2$, K_{ML2} = [ML_2]/[[ML][L].
Solvant : H_2O ; I = 0,1 M ; T = 25,0 °C.

Tableau 3.9. *Constantes de stabilité des complexes métalliques de Cu(II), Zn(II), Ni(II), Co(II) ou Ga(III) formés avec les ligands **L^1-L^4** ainsi qu'avec quelques modèles (**L^G**, et **DO2P**).*

La complexation de Cu(II) par les ligands **L^1-L^4** est très sélective comparée à celle du Zn(II) ou du Ni(II). Cette sélectivité existe aussi pour d'autres ligands de type polyaminométhanephosphonate. Afin de comparer la stabilité des complexes monocuivriques formés avec ces ligands, nous avons calculé les valeurs de pCu pour chacun de ces systèmes. La notion de pM a été pour la première fois utilisée par K. N. Raymond pour le fer (III) et

peut être appliquée à tout cation métallique M^{z+}.[60] Le pM est égal au logarithme de l'inverse de la concentration en ion métallique libre dans des conditions données de pH et de concentrations analytiques en ligand et en métal.

$$pM = -\log[M^{n+}]_{libre} \qquad \text{pour } [\mathbf{L}]_{tot} = 10^{-5}\ M \text{ et } [M^{n+}]_{tot} = 10^{-6}\ M$$

Cette valeur tient compte des caractéristiques différentes des ligands comparés (propriétés acido-basiques du ligand et des complexes métalliques, stœchiométrie des complexes métalliques…) et permet une comparaison directe de leur pouvoir complexants pour un cation donné. Plus la valeur de pM est élevée, plus le ligand possède une forte affinité pour le métal. La Figure 3.19 montre la variation des valeurs de pM (M = Cu(II), Zn(II), Ni(II), Co(II) et Ga(III)) en fonction du pH et illustre parfaitement la sélectivité, sur une très large gamme de pH, du ligand $\mathbf{L^1}$ pour le Cu(II) par rapport à Zn(II), Ni(II), Co(II) ou Ga(III).

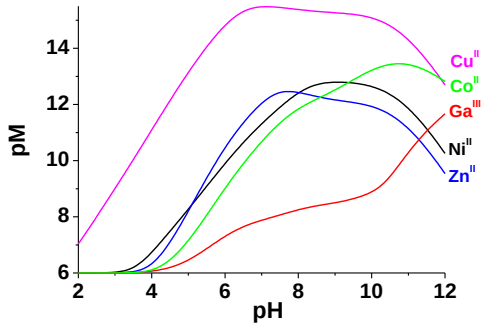


Figure 3.19. *Variation des valeurs de pM (M = Cu^{2+}, Zn^{2+}, Ni^{2+}, Co^{2+} et Ga^{3+} en fonction du pH pour le ligand $\mathbf{L^1}$. Solvant : H_2O ; I = 0,1 M ($NaClO_4$) ; T = 25,0(2) °C ; pM = $-\log[M^{n+}]_{libre}$, $[\mathbf{L^1}]_{tot}$ = 10^{-5} M et $[M]_{tot}$ = 10^{-6} M*

La Figure 3.20 permet de comparer le pouvoir complexant vis-à-vis du Cu(II) de $\mathbf{L^1}$, $\mathbf{L^2}$, $\mathbf{L^3}$ et $\mathbf{L^4}$ entre eux et par rapport à quelques systèmes issus de la littérature.

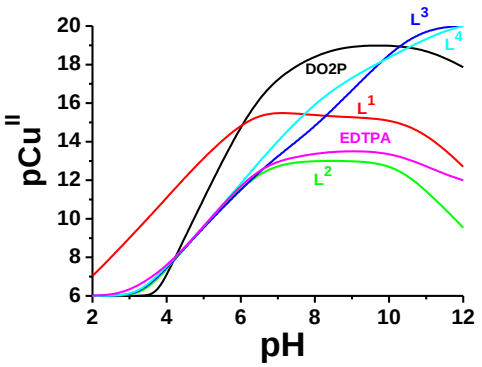


Figure 3.20. *Variation des valeurs du pCu^{II} pour les ligands $\mathbf{L^1}$, $\mathbf{L^2}$, $\mathbf{L^3}$, $\mathbf{L^4}$ **DO2P** et **EDTPA** (Figure 6). Solvant : H_2O ; I = 0,1 M ($NaClO_4$) ; T = 25,0(2) °C ; pCu = $-\log[Cu^{2+}]_{libre}$, $[\mathbf{L}]_{tot}$ = 10^{-5} M et $[M]_{tot}$ = 10^{-6} M.*

Comme nous pouvons l'observer sur la Figure 3.20, l'affinité des ligands **L^1-L^4** pour le Cu(II) augmente avec le pH de la solution. Ces systèmes possèdent une bonne affinité pour le Cu(II) à pH physiologique 7,4 (12 < pCu < 17) et la séquence de stabilité des complexes de Cu(II) à pH 7,4 est la suivante: **L^1** > **L^4** > **L^3** > **L^2**. Ces données montrent clairement, qu'excepté le composé **DO2P** qui constitue jusqu'à présent l'un des chélateurs phosphonatés les plus puissants du Cu(II), c'est la plateforme **L^1** qui conduit à des complexes cuivriques de très forte stabilité. L'influence de l'ancre pyridinique et des groupements méthanephosphonates sur la coordination du Cu(II) peut s'évaluer en comparant les données obtenues pour **L^1** à celles calculées pour l'**EDTPA** et **L^2**, **L^3** et **L^4**. Parmi l'ensemble des ligands considérés, **L^1** présente la meilleure affinité pour le Cu(II) à pH 7,4 ce qui peut s'expliquer par l'implication des quatre unités méthanephosphonate dans la stabilité des complexes de cuivre(II). Les ligands **L^3** et **L^4** forme des complexe de Cu(II) très stables à pH basique (pCu^{2+} ~ 20).

2.4. Etude par spectrométrie de masse en mode electrospray

La stœchiométrie des complexes cuivriques formés avec les ligands **L^1- L^4** a été déterminée par spectrométrie de masse en mode electrospray en mode positif (ESMS). Les spectres de masse ESMS ont été enregistrés pour des rapports $[Cu(II)]_{tot}/[L]_{tot}$ = 1,0. Cette étude nous a permis de suggérer la nature et la stœchiométrie des complexes de Cu(II), Ni(II) et Zn(II) formés avec les ligands **L^1-L^4** en solution. A titre d'exemple, nous présentons sur la Figure 3.21 les spectres de masse enregistrés respectivement pour les complexes de Cu^{2+} , Ni^{2+} et Zn^{2+} formés avec le ligand **L^1** ainsi que leurs spectres simulés.

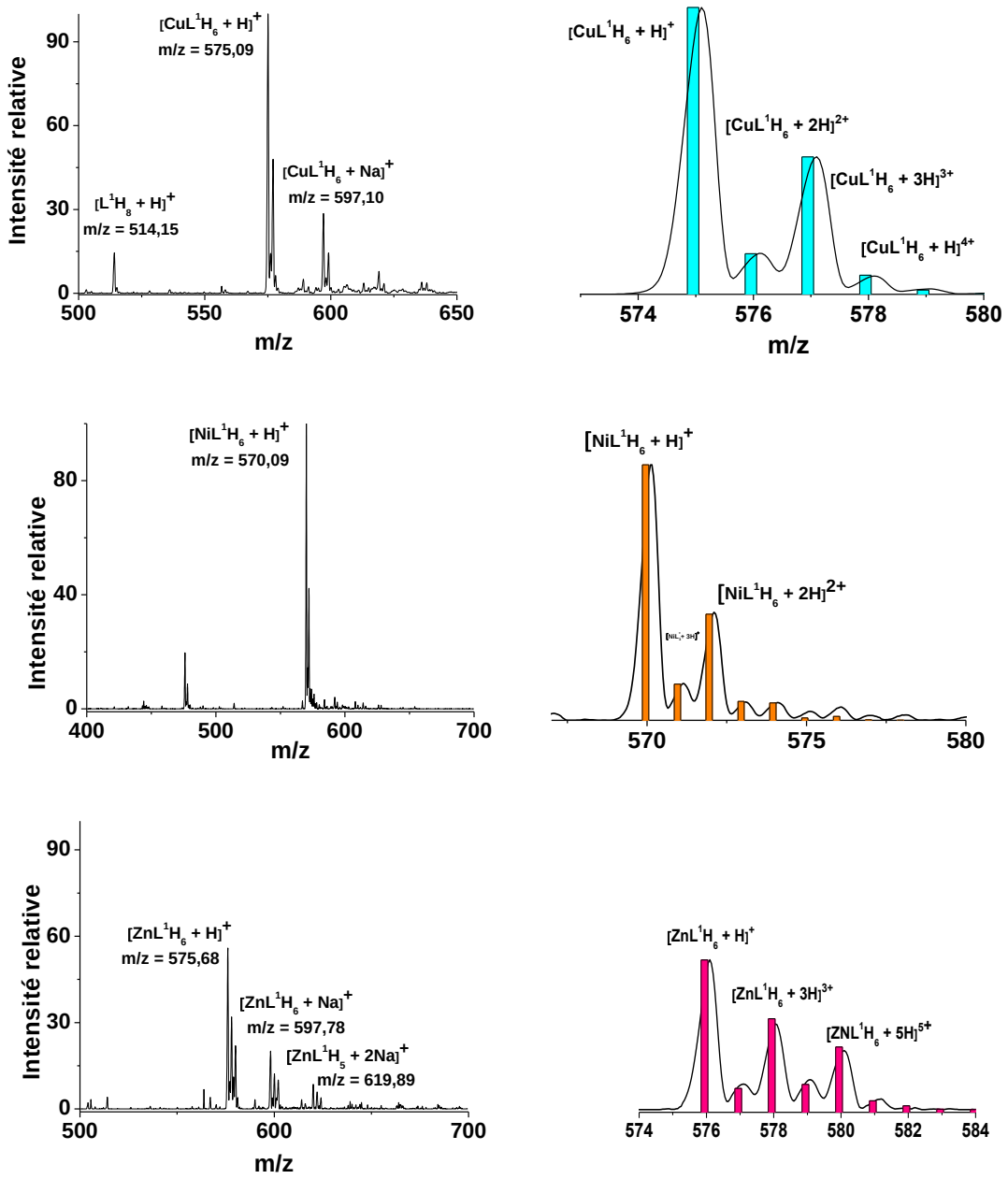


Figure 3.21. *Spectres de masse en mode electrospray des complexes de Cu^{2+}, Ni^{2+} et Zn^{2+} formés avec le ligand* ***L¹****. Solvant: H_2O; mode positif. a) $[Cu\mathbf{L^1}]_{tot} = 4{,}10 \times 10^{-4}$ M ; b) $[Ni\mathbf{L^1}]_{tot} = 3{,}3 \times 10^{-4}$ M, c) $[Zn\mathbf{L^1}]_{tot} = 4{,}5 \times 10^{-4}$M.*

L'étude par ESMS montre la présence d'un seul complexe M**L**^{1} pour chacun des ions métalliques Cu(II), Ni(II) et Zn(II). Dans le cas du Zn(II), le milieu a été tamponné avec de l'acétate d'ammonium afin de favoriser la formation du complexe Zn**L**^{1} moins stable. Les rapports m/z obtenus expérimentalement et calculés pour les complexes métalliques formés avec le ligand **L**^{1} sont rassemblés au Tableau 3.10.

Ions pseudomoléculaires	Rapports m/z expérimentaux	Rapports m/z calculés
$[\mathbf{L^1}H_8 + H]^+$	514,15	514,03
$[Cu\mathbf{L^1}H_6 + H]^+$	575,09	574,95
$[Cu\mathbf{L^1}H_6 + Na]^+$	597,10	596,93
$[Ni\mathbf{L^1}H_6 + H]^+$	570,09	569,96
$[Zn\mathbf{L^1}H_6 + \mathbf{H}]^+$	575,68	575,94
$[Zn\mathbf{L^1}H_6 + Na]^+$	597,78	597,92
$[Zn\mathbf{L1}H_5 + 2Na]^+$	619,89	619,90

Tableau 3.10. *Maxima d'intensité des complexes métalliques formés avec le ligand* $\boldsymbol{L^1}$ *observés en spectrométrie de masse en mode electrospray (ESMS*$^+$*). Solvant :* H_2O.

2.5. Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)

Nous avons mené, en collaboration scientifique avec le Dr. Isabelle Déchamps-Olivier (Institut de chimie moléculaire de Reims), une étude par spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE) des complexes de Cu(II) avec le ligand $\mathbf{L^1}$. Cette étude RPE a été réalisée en fonction du pH pour un rapport $[Cu(II)]_{tot}/[\mathbf{L^1}]_{tot} \sim 1$. Avant de discuter les résultats obtenus, nous allons rappeler brièvement le principe de la RPE.

Principe de la RPE

La résonance paramagnétique électronique est une technique qui permet l'étude des molécules contenant des électrons non appariés. Elle possède deux grandes applications : la détection de radicaux organiques et la caractérisation de métaux de transition ayant des propriétés paramagnétiques. Cette technique est très utilisée en chimie de coordination. Elle repose sur l'interaction entre un champ magnétique et un moment magnétique permanent d'origine électronique. Elle permet alors de détecter les espèces magnétiques caractérisées par la présence d'un électron non apparié sur la couche de valence et d'obtenir des informations sur la géométrie et la structure électronique des composés.[13,14]

L'effet du champ magnétique, appelé effet Zeeman électronique, sur un complexe de cuivre(II) de configuration électronique $3d^9$ et de spin électronique $S = ½$ est une levée de dégénérescence de l'état doublet de spin conduisant à une seule transition entre deux niveaux Zeeman ($M_s = –1/2 \rightarrow M_s = +1/2$). A la résonance, l'énergie de l'onde électromagnétique $h\nu$, s'écrit :

$$E = h\nu = g\beta H$$

Où *g:* facteur de Landé (2,0023 pour l'électron libre)

β : magnéton de Bohr ($9{,}274 \times 10^{-12}$ J.T^{-1} ou $4{,}66863 \times 10^{-5}$ G^{-1}.cm^{-1})

H: intensité du champ Zeeman (champs résonant) exprimée en Gauss (G)

h: constante de Planck ($6{,}6261 \times 10^{-34}$ J s)

ν: fréquence du champ micro-onde

D'une façon plus générale, lorsqu'il y a plus de 2 états, les transitions permises sont celles pour lesquelles les états (initial et final) satisfont aux conditions $\Delta S = 0$ et $\Delta m_S = \pm 1$. Les autres transitions sont généralement interdites, sauf s'il y a un mélange entre les niveaux. La condition de résonance exprimée ci-dessus peut également s'écrire :

$\nu = (g\, \mu_B / h)\, H = \gamma H$ où γ désigne le rapport gyromagnétique du noyau étudié.

Dans la pratique, la fréquence utilisée est mesurée à l'aide d'un fréquencemètre, le champ résonant H_{res} est déterminé expérimentalement : on peut donc en déduire le facteur spectroscopique *g* caractéristique du système étudié. Pour le centre paramagnétique, l'interaction électronique Zeeman est exprimée par l'intermédiaire du tenseur *g*. On distingue trois valeurs principales de *g* (g_x, g_y et g_z) orthogonales les unes aux autres. La déviation de ces valeurs de *g* par rapport au cas de l'électron libre (g = 2,0023) apporte des informations concernant la structure électronique du composé étudié.

Quand un ou plusieurs électrons sont au voisinage d'un noyau de spin nucléaire non nul, il y a interaction entre les moments magnétiques des électrons et du noyau. On observe un couplage hyperfin qui se traduit par une multiplication des raies du signal de RPE. On obtient ainsi (2I+1) raies de même intensité, avec I le spin nucléaire. Cette interaction entre le spin électronique et le spin nucléaire I du métal est exprimée par une constante A appelée constante de couplage hyperfin. Cette constante est également un tenseur caractérisé par les trois valeurs principales (A_x, A_y et A_z). L'hamiltonien de spin H, correspondant à l'énergie d'interaction d'une substance paramagnétique dans un champ magnétique H peut alors s'écrire avec une composante attribuée à l'énergie Zeeman (H_{Zeeman}, interaction spin électronique – champ magnétique statique) et une composante attribuée au couplage hyperfin (H_{HFS}, interaction spin électronique – spin nucléaire):

$$H = H_{Zeeman} + H_{HFS} = \sum(\mu_B g_j S_j H_j + A_j S_j I_j)$$

ou *j* représente la composante selon chacun des trois axes *x*, *y* et *z*.

Selon la géométrie des complexes étudiés, il existe des relations entre les différentes valeurs de *g* et entre les différentes valeurs de A. Le Tableau 3.11 présente le cas des systèmes isotropes, axiaux et rhombiques.

Système	Tenseur g	Tenseur A
Isotrope	$g_x = g_y = g_z$	$A_x = A_y = A_z$
Axial	$g_x = g_y \neq g_z$	$A_x = A_y \neq A_z$
Rhombique	$g_x \neq g_y \neq g_z$	$A_x \neq A_y \neq A_z$

Tableau 3.11. *Effet de la symétrie sur les valeurs des tenseurs g et A.*

Le cuivre(II) convient particulièrement bien aux études RPE, puisqu'il n'a qu'un seul électron célibataire. Il possède un spin effectif s = ½ et un spin angulaire ms = +½. De plus, les noyaux de ^{63}Cu (abondance naturelle = 69,17%) et ^{65}Cu (abondance naturelle = 30,83%, spin nucléaire I = 3/2) donnent lieu à un motif caractéristique à quatre raies, dû à des interactions hyperfines des spins nucléaire et électronique, et représenté par le paramètre A (

Figure 3.**22**)

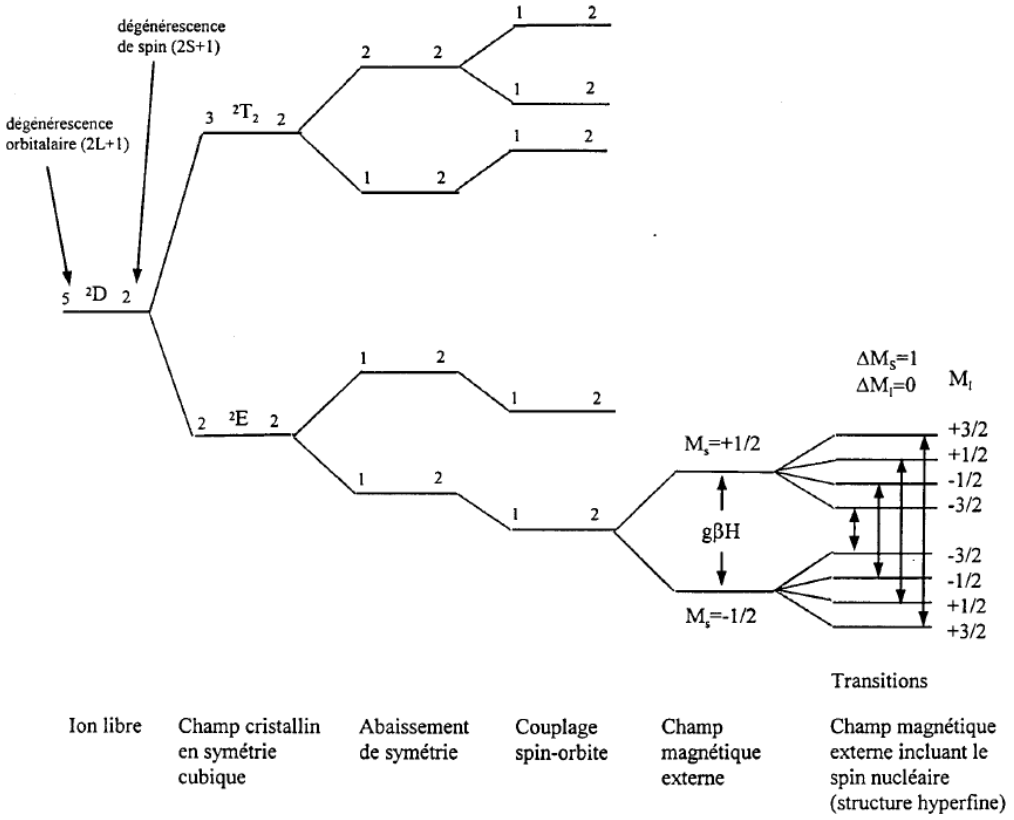


Figure 3.22. *Diagramme des niveaux d'énergie du cuivre(II) en champ cristallin et magnétique.* [61]

Les spectres RPE obtenus pour le complexe Cu**L**^{1} en fonction du pH pour un rapport $[Cu(II)]_{tot}/[\mathbf{L}^{1}]_{tot}$ = 1,0 sont présentés sur la Figure 3.23. Les mesures ont été faites dans un mélange EtOH/H_2O à basse température (150 K) qui permet de supprimer l'agitation moléculaire qui augmente l'anisotropie du facteur *g*.

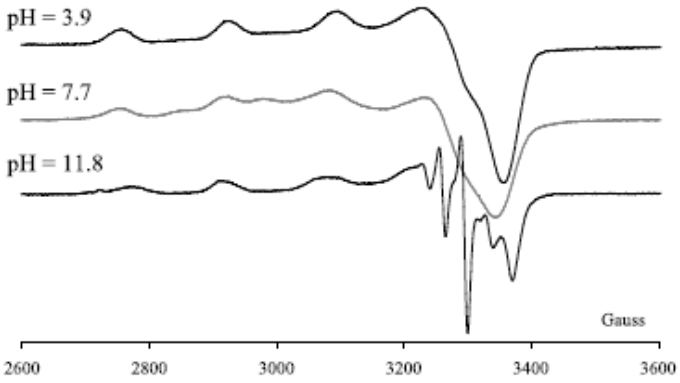


Figure 3.23. *Spectres RPE des complexes cuivriques de type Cu**L**^{1}en fonction du p[H]. Solvant : EtOH/H_2O (50% EtOH) ; T = 150 K ; $[Cu(II)]_{tot}/[\mathbf{L}^{1}]_{tot}$= 1,0.*

Les spectres RPE mesurés pour le complexe Cu**L**^{1} à différentes valeurs de pH sont composés de quatre raies équidistantes. Elles sont dues au couplage hyperfin entre le spin électronique de l'électron célibataire et le spin nucléaire du cuivre (I = 3/2).

Le complexe Cu**L**^{1} présente une forte absorption autour de 3300G, caractéristique pour un électron célibataire de spin s = ½, de la transition autorisée Δ_{ms} = 1. Les signaux présentent une symétrie axiale avec $g_{//} > g_{\perp}$ caractéristique de complexes de cuivre d^9, pour lesquels l'électron célibataire occupe l'orbitale d_{x2-y2} (Figure 3.8).

Dans la gamme de pH comprise entre 2 et 5, une seule espèce $[Cu\mathbf{L}^{1}H_4]^{2-}$ était présente, ce qui nous a permis d'obtenir les paramètres RPE suivant:

$g_x = g_y = 2{,}057$ $\quad$ $A_x = A_y = 21\times 10^{-4}$ cm^{-1}

$g_z = 2{,}240$ $\quad$ $A_z = 165 \times 10^{-4}$ cm^{-1}

Selon les exemples déjà décrit dans la littérature, des valeurs basses de A_z sont combinées à des valeurs élevées de g_z et sont associé à une diminution du champ équatorial du ligand avec une augmentation de la composante axial, observée lors du remplacement de l'atome d'azote par un atome d'oxygène du groupement méthanephosphonate dans le plan équatorial.[29]

Pour des valeurs de pH qui varient de 5 à 9, au moins deux espèces protonées du complexe Cu**L**^{1} sont présentes, ce qui n'a pas permis d'ajuster les données RPE. Au delà de pH 10,4 une quatrième espèce est observée avec un mélange des précédentes. Cette dernière espèce présente une structure superhyperfine avec au moins cinq raies associées au couplage de deux atomes d'azote (I_N=1). Malheureusement, la présence de plusieurs espèces complique le calcul des données RPE.

La présence d'un mélange de différentes espèces n'a pas parfaitement coïncidée avec celles obtenues par titrage potentiométrique. Le diagramme de spéciation obtenu par potentiométrie à montré qu'au delà de pH 10 une seule espèce est présente qui correspond à la formation du complexe de cuivre complètement déprotoné [Cu**L**^{1}]$^{6-}$, contrairement a ce que l'on a pu observer dans les mesures RPE qui montrent la présence d'un mélange d'espèces dans la même zone de pH. Cette différence de spéciation des espèces en fonction du pH peut être expliquée par le fait d'utiliser un mélange EtOH/H_2O et aussi par la grande différence entre les températures d'expériences (298K pour la potentiométrie et 150K pour la RPE).

2.6. Structure du complexe [CuL^{1}]$^{6-}$ par calcul DFT

L'obtention de monocristaux pour la diffraction des rayons X s'étant avérée infructueuse, une optimisation de la géométrie de complexe [Cu**L**^{1}]$^{6-}$ a été réalisée par calculs DFT en collaboration avec le Dr. Carlos Platas-Iglesias (Université de la Corogne, Espagne).
Pour obtenir des informations sur la géométrie de coordination en solution du Cu(II) par le ligand tétraphosphonaté **L**^{1}, des études de DFT pour lequel des calculs basés sur la répartition de la densité électronique ont été effectués en utilisant le modèle B3LYP.

Plusieurs études ont montré que les groupements phosphonates ont une tendance a crée une deuxième sphère d'hydratation autour des complexes métalliques.[62,63]Les effets du solvatation ont été évalués par un modèle contenant de l'eau comme solvant (PCM : polarised continuum model). Le processus d'optimisation a mené à une géométrie ou au moins un groupement méthanephosphonate est non coordiné au Cu(II). L'énergie minimale de conformation obtenue pour le complexe [Cu**L**^{1}]$^{6-}$ est présenté à la Figure 3.24.

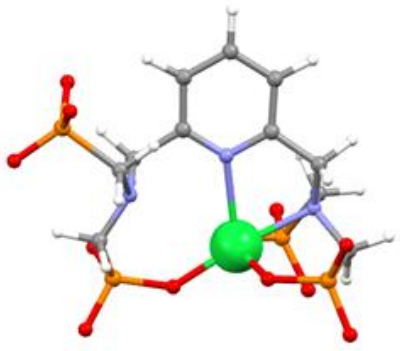


Figure 3.24. *Structure proposée pour le complexe $[Cu\mathbf{L^1}]^{6-}$ basé sur les calculs DFT en solution aqueuse en utilisant le modèle B3LYP.*

Les distances et les angles relatifs à la sphère de coordination sont représentés dans le Tableau 3.12 :

Distances de liaisons (Å)		**Angle(°)**			
$Cu_1–N_1$	2,488	$O_1–Cu_1–O_4$	151,50	$N_2–Cu_1–O_7$	173,56
$Cu_1–N_2$	2,273	$O_1–Cu_1–N_2$	84,27	$N_1–Cu_1–O_1$	102,55
$Cu_1–O_1$	1,987	$N_2–Cu_1–O_4$	85,76	$N_1–Cu_1–N_2$	73,14
$Cu_1–O_4$	1,979	$O_4–Cu_1–O_7$	95,71	$N_1–Cu_1–O_4$	99,96
$Cu_1–O_7$	1,975	$O_4–Cu_1–O_1$	91,57	$N_1–Cu_1–O7$	112,67

Tableau 3.12. *Longueurs de liaisons (Å) et angles (°) de l'environnement de coordination du métal calculés par DFT selon le modèle B3LYP pour le complexe $[Cu\mathbf{L^1}]^{6-}$.*

Ces données semblent indiquer que le Cu(II) est pentacoordiné. Sa coordination implique l'azote de l'unité pyridine, un des azotes des amines tertiaires [N_2] et trois atomes d'oxygène de trois unités méthanephosphonates. Le quatrième groupement méthanephosphonate et l'une des amines tertiaires restent non coordinés. Le complexe $[Cu\mathbf{L^1}]^{6-}$ indique que le Cu(II) adapte une géométrie pyramidale à base carrée déformée. La base carrée de la pyramide est constituée de l'atome N_2 et de trois atomes d'oxygène (O_1, O_4 et O_7) des groupements méthanephosphonates coordinés au Cu(II). La position apicale de la pyramide est occupée par l'atome d'azote de la pyridine. L'ion Cu(II) est situé à 0,29 Å au dessus de la base carrée de la pyramide. Les angles cis de la base carrée ont des valeurs entre 84,3 et 95,7° qui sont des valeurs très proches de celles d'une pyramide a base carrée parfaite (90°). Les angles définis par le vecteur N_1— Cu_1 sont également proches de 90°. Les distances Cu — O calculées pour le complexe $[Cu\mathbf{L^1}]^{6-}$ sont en bon accord avec celles observées à l'état solide pour un complexe de Cu(II) pentacoordiné contenant des

groupements méthanephosphonate.[64] L'environnement de coordination du Cu(II) est influencé par la charge négative élevée des groupements phosphonates pour se lier à l'ion métallique.

Conclusion

Les ligands polyaminophosphonatés $\mathbf{L^1}$-$\mathbf{L^4}$ forment avec le Cu(II) des monochélates de très forte stabilité. Plus particulièrement, le ligand $\mathbf{L^1}$, qui possède deux fonctions méthanephosphonates additionnelles par rapport à ses analogue $\mathbf{L^2}$, $\mathbf{L^3}$ et $\mathbf{L^4}$, peut être considéré, tout comme le composé macrocyclique **DO2P**, comme l'un des chélateurs les plus puissants du Cu(II) recensés à ce jour. Une étude spectrophotométrique nous a permis de démontrer que les azotes tertiaires étaient, quel que soit le pH considéré ($2,5 < pH < 11,5$), impliqués fortement dans la coordination du Cu(II). La sphère de coordination du cation cuivrique est alors complétée par des sites phosphonates dont le nombre et l'influence sont fortement dépendants des conditions d'acidité. Les ligands $\mathbf{L^2}$, $\mathbf{L^3}$ et $\mathbf{L^4}$ qui se caractérise par une ou deux unités méthanephosphonates en moins par rapport à $\mathbf{L^1}$, possède une affinité pour le Cu(II) plus faible. Le ligand tétrakis(méthanephosphonate) $\mathbf{L^1}$ forme des espèces monocuivriques plus stables que l'**EDTPA**, analogue phosphonaté de l'**EDTA**, ce qui permet de suggérer l'implication de la pyridine dans la complexation du Cu(II). La coordination du Cu(II) par cette famille de ligands est très sélective lorsqu'elle est comparée à d'autres métaux de transition voisins tels que le Zn(II), le Ni(II), le Co(II) ou le Ga(III).

Les calculs de DFT sur le complexe $[Cu\mathbf{L^1}]^{6-}$ a montrés que le Cu(II) adapte une géométrie pyramidale à base carrée déformée. La base carrée de la pyramide est constituée de l'atome d'azote des amines tertiaires et de trois atomes d'oxygène des groupements méthanephosphonates coordinés au Cu(II) et la position apicale de la pyramide est occupée par l'atome d'azote de la pyridine.

III- Cinétique de formation et de dissociation des complexes de cuivre(II)

Après l'étude thermodynamique des propriétés de coordination du Cu(II) par nos ligands polyaminophosphonatés, nous nous sommes intéressés dans ce chapitre à la cinétique de formation et de dissociation des complexes de Cu(II) formés par cette série homogène de ligands. Les structures chimiques de ligands **L**^{1}, **L**^{2}, **L**^{3} et **L**^{4} sont rappelés à la Figure 3.25.

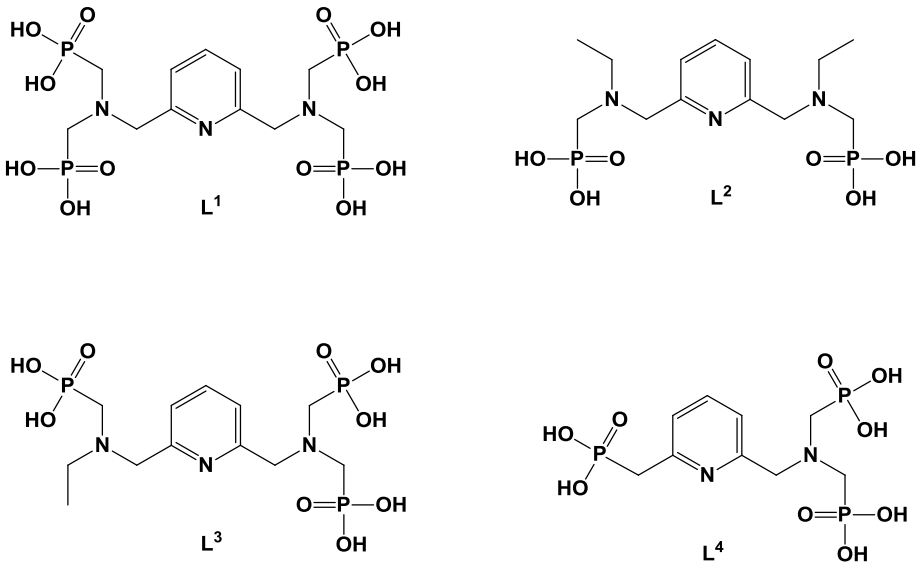


Figure 3.25. *Structures chimiques des ligands* ***L***^{1}, ***L***^{2}, ***L***^{3} *et* ***L***^{4}

1. Cinétique de formation des complexes de cuivre(II)

Compte-tenu de la durée de demi-vie moyenne des radioéléments ciblés dans ce travail ($t_{1/2}$ = 12,7 h pour ^{64}Cu et $t_{1/2}$ = 1,1 h pour ^{68}Ga). Une cinétique lente de complexation est un inconvénient majeur pour des chélateurs bifonctionnels en imagerie médicale. Selon plusieurs travaux décrits dans la littérature,[65] la cinétique de formation des complexes de cuivre(II) impliquant des ligands acycliques est beaucoup plus rapide que celle des espèces formées avec des ligands macrocycliques. De ce fait, les chélateurs acycliques, s'ils sont caractérisés par de fortes stabilités pour le Cu(II), possèdent un fort potentiel pour des applications en imagerie médicale.

D'une manière générale, la cinétique de formation des complexes métalliques et, en particulier celle des complexes de cuivre(II) avec différents ligands,[66,67] suit un processus à caractère dissociatif.[68,69] Ce mécanisme à été décrit pour la première fois par Eigen et Wilkins[70,71] et peut être schématisé de la façon suivante :

$$L(S) + M(s) \underset{}{\overset{K_{os}}{\rightleftharpoons}} ML(s) + S \overset{k_{ex}}{\rightleftharpoons} ML + s$$

Schéma 3.1. *Mécanisme de formation à caractère dissociatif de complexes métalliques.*

La première étape correspond à la formation d'un complexe à sphère externe ou le ligand est désolvaté. Cette étape est très rapide et conduit à la formation d'un complexe intermédiaire métastable (complexe à sphère externe) associé à une constante d'équilibre K_{os}.

La seconde étape est une étape limitante qui correspond à la perte d'une première molécule d'eau de la sphère de coordination de l'ion métallique avec k_{ex} = constante de vitesse d'échange d'une molécule de solvant de la première sphère de coordination de l'ion métallique. Dans le cas de ce mécanisme, la constante de vitesse associée à la formation du complexe métallique peut être évaluée selon l'équation (2):

$k_f = K_{os} \times k_{ex}$ avec k_f (M^{-1} s^{-1}), K_{os} (M^{-1}) et k_{ex}(s^{-1}) (2)

La comparaison des donnés théoriques et expérimentales permet alors de définir si le mécanisme de formation suit un mécanisme à caractère dissociatif ou s'il est régit par un autre processus. La détermination de la valeur de K_{os} est possible à partir d'un calcul théorique basé sur l'équation de Fuoss : [72]

$$K_{os} = \frac{4\pi N_a d^3}{3000} \exp\left(-\frac{U(d)}{k_B T}\right) \quad (3)$$

avec $$U(d) = \frac{Z_M Z_L e^2}{d' D} - \frac{Z_M Z_L e^2 K}{D(1+d' K)} \quad (4)$$

et $$K^2 = \frac{8\pi N_a e^2 I}{1000 D k_B T}$$

N_a : constante d'Avogadro (6,0221367(36) × 10^{23} mol^{-1})
Z_M et Z_L : charge des réactifs (+2 pour le Cu^{2+}, -2 pour **L**^{1}, 0 pour **L**^{2} et -1 pour **L**^{3} et **L**^{4} à pH 2)
d : distance minimale d'approche des deux ions (4 x 10^{-8} cm)
d' : distance entre le centre de la charge positive sur le métal et le centre de la charge sur le ligand entrant
D : constante diélectrique du milieu (78,3 pour H_2O)
k_B : constante de Boltzmann (1,380658(12) erg)
I : force ionique (0,1 M)
E : charge de l'électron (4,803 x 10^{-10} esu)
T : température (T = 298,3 K)

La valeur de la constante d'équilibre K_{os} est très dépendante des charges de l'ion métallique et du ligand, ce qui signifie que les interactions de type électrostatiques sont prédominantes dans le cadre de ce mécanisme.

Dans nos conditions d'étude (pH 2), le cuivre(II) n'existe que sous sa forme libre Cu^{2+} comme en atteste la valeur de sa constante d'hydrolyse (log K_{CuOH} = - 6,29 ; I = 0,1M).[73]

La charge du métal Z_M sera donc considérée égale à +2. La valeur de la constante d'échange (k_{ex}) d'une molécule d'eau de la sphère de coordination du Cu^{2+} est de l'ordre de 2×10^8 s^{-1} (Figure 3.26).[74,75]

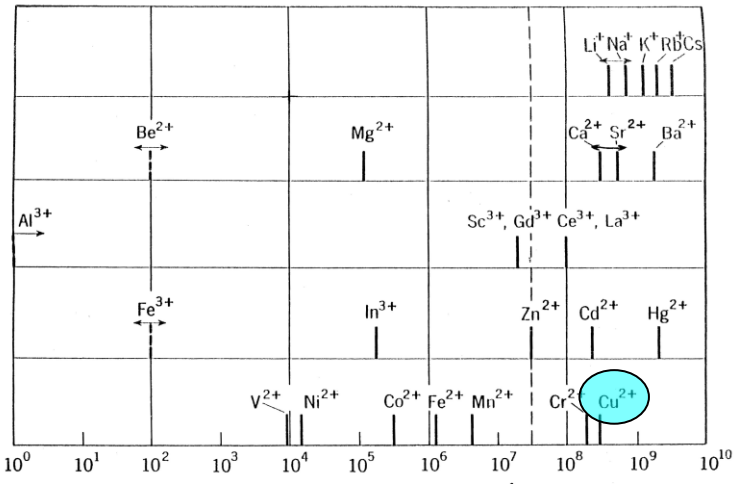


Figure 3.26. *Constante de vitesse d'échange (s^{-1}) d'une molécule d'eau de la sphère de coordination de divers cations métalliques.*

Pour évaluer la valeur de k_f selon l'équation (2) il faut donc tout d'abord définir la valeur de K_{os}. La difficulté dans ce calcul est surtout liée à la détermination du paramètre d (distance minimale d'approche des deux ions) qui est difficilement mesurable. C'est pourquoi, la comparaison directe des valeurs des constantes cinétiques de formation k_f pour un ensemble de chélateurs est généralement effectuée. Si le mécanisme suivi est de type Eigen-Wilkins, les valeurs de k_f devraient être constantes pour un ensemble de ligands de même charge et pour un même métal. Dans notre cas, nous avons calculé une valeur moyenne de la constante K_{os} à partir de l'équation (3) pour les ligands $\mathbf{L^1}$, $\mathbf{L^2}$, $\mathbf{L^3}$ et $\mathbf{L^4}$ pour une distance d'approche entre le centre du métal (Cu^{2+}) et du ligand comprise entre 4 et 8 Å. A partir des valeurs de K_{os} calculées, nous avons ensuite déterminé les valeurs moyennes de k_f selon l'équation (2). L'ensemble de ces valeurs sont présentées dans le Tableau 3.13.

Ligand	K_{os} **(M^{-1})**	k_{ex} **(s^{-1})**	k_f **($M^{-1}s^{-1}$)**
$\mathbf{L^1H_6^{2-}}$	1,14	2×10^8	$2{,}28 \times 10^8$
$\mathbf{L^2H}$	1,61	$3{,}23 \times 10^7$	$5{,}2 \times 10^7$
$\mathbf{L^3H_5^{-1}}$	0,43	$8{,}57 \times 10^7$	$3{,}68 \times 10^7$
$\mathbf{L^4H_5^{-1}}$	0,43	$8{,}57 \times 10^7$	$3{,}68 \times 10^7$

Tableau 3.13 *Valeurs moyennes des constantes K_{os}, k_{ex} et k_f pour les ligands $\boldsymbol{L^1}$, $\boldsymbol{L^2}$, $\boldsymbol{L^3}$ et $\boldsymbol{L^4}$.*

Ces constantes de vitesse de formation des complexes de cuivre(II) calculées pour les ligands **L**^{1}, **L**^{2}, **L**^{3} et **L**^{4} sont très élevées et suggèrent une cinétique de complexation trés rapide. Après ces premières considérations théoriques, nous avons mené une étude cinétique au moyen d'une technique de mélange rapide (accès à des vitesses de réaction de l'ordre de la dizaine de ms). Nous présenterons tout d'abord les résultats obtenus pour l'étude de la cinétique de complexation du Cu(II) par le ligand **L**^{1} puis nous les comparerons aux donnés obtenues pour les autres ligands (**L**^{2} - **L**^{4}).

La cinétique de formation des complexes de Cu(II) par le ligand **L**^{1} à été suivie à 312 nm et à pH ~ 2. L'étude spectrophotométrique et thermodynamique du complexe Cu**L**^{1} présentée précédemment nous a permis de caractériser la formation d'un complexe monocuivrique et de calculer sa stabilité apparente à pH 2 (log $K'_{\mathrm{Cu}\mathbf{L1}}$= 6,04). L'espèce [Cu**L**^{1}H$_4$]$^{2-}$ est l'espèce prédominante dans ces conditions d'acidité comme nous pouvons l'observer sur le diagramme de distribution des complexes cuivriques avec **L**^{1} présenté à la Figure 3.27. Dans la suite de ce chapitre, nous définirons [Cu**L**$^{1'}$] comme étant l'espèce majoritaire à pH 2, à savoir le complexe protoné [Cu**L**^{1}H$_4$]$^{2-}$ (**L**$^{1'}$ **= [L**^{1}H$_4$]$^{4-}$; les charges sont omises pour des raisons de simplicité).

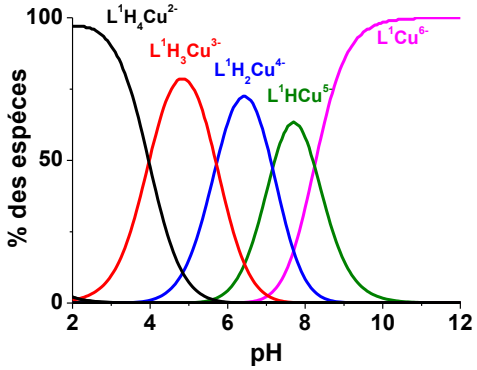


Figure 3.27. *Courbes de distribution des espèces protonées des complexes de Cu(II) formés avec le ligand* ***L***^{1}*. Solvant : H_2O ; T = 25,0 °C ; I = 0,1 M ($NaClO_4$) ; [**L**^{1}]$_{tot}$ =[Cu^{2+}]$_{tot}$ = 2 × 10^{-3} M.*

Le spectre électronique de l'espèce [Cu**L**$^{1'}$] obtenu à pH 2 se caractérise par une bande d'absorption intense centrée à 263 nm (ε_{263} = 5,4 × 10^3 M^{-1} cm^{-1}) qui correspond aux transitions π–π^* de la pyridine. Une bande de transfert de charge N→Cu(II) à 312 nm (ε_{312} = 2,47 × 10^3 M^{-1} cm^{-1}), ainsi qu'une bande d'absorption de plus faible intensité à 663 nm (transitions d-d du Cu(II), ε_{663} = 147 M^{-1} cm^{-1}) sont également observées. Cette étude spectrophotométrique nous a permis de sélectionner la longueur d'onde d'étude qui correspond à

la différence maximale entre l'absorption des réactifs (**L**^{1}+ Cu) et du produit [Cu**L**$^{1'}$]. Le ligand **L**^{1} et le Cu^{2+} absorbent peu à cette longueur d'onde d'étude (312 nm) (Figure 3.28).

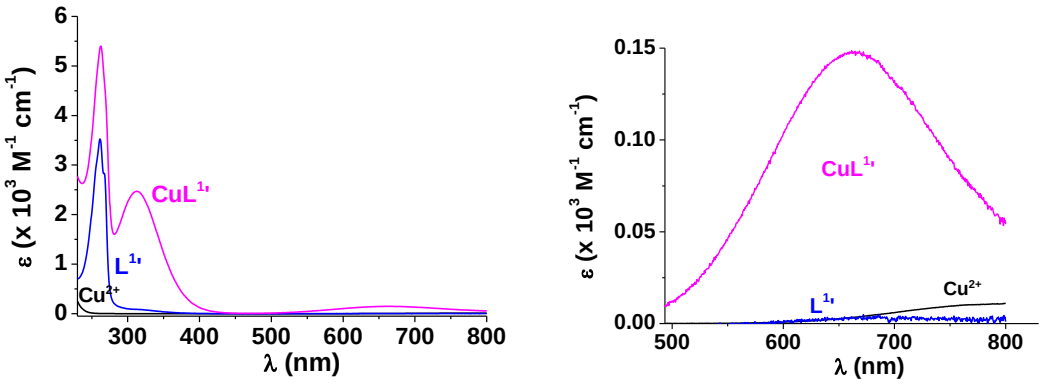


Figure 3.28. *Spectres électroniques apparents à pH 2,0 du complexe cuivrique formé avec le ligand* ***L***^{1}*. Solvant : H_2O ; pH= 2 ; I = 0,1 M ($NaClO_4$) ; T= 25,0(2) °C.*

Afin d'évaluer la vitesse de complexation de Cu^{2+} par le ligand **L**^{1}, nous nous sommes placés dans des conditions de pseudo-premier ordre par rapport au ligand ($[Cu^{2+}]_{tot} \geq 10 \times [\mathbf{L}^{1}]_{tot}$). La concentration en ligand **L**^{1} a été maintenue constante à 3,04 x 10^{-3} M. La cinétique de formation a été étudiée dans une gamme de $[Cu^{2+}]_{tot}$ comprise entre 3,8 x 10^{-3} M et 3,8 x 10^{-2} M. Un excès minimum de 10 équivalents de Cu^{2+} par rapport au ligand est en effet nécessaire pour dégénérer l'ordre de la réaction.

La Figure 3.29 montre que la variation de l'absorbance à 312 nm en fonction du temps suit une croissance exponentielle selon l'équation (5) et que la complexation du Cu(II) par le ligand **L**^{1} est très rapide avec une forte perte d'amplitude (~ 90%) durant le temps de mélange (~ 3 ms) du spectrophotomètre à flux stoppé. L'absorbance à la fin de l'étape limitante (~ 200 ms) correspond d'une manière satisfaisante à la valeur d'absorbance attendue pour le complexe thermodynamique [Cu**L**$^{1'}$] à pH ~ 2, ce qui signifie l'absence d'étapes plus lentes. La vitesse de formation est alors donnée par l'équation (5) :

$$\upsilon = \mathrm{d}[\mathbf{L}^{1\prime}]/\mathrm{d}t = k_{obs}\,[\mathbf{L}^{1\prime}] \qquad (5)$$

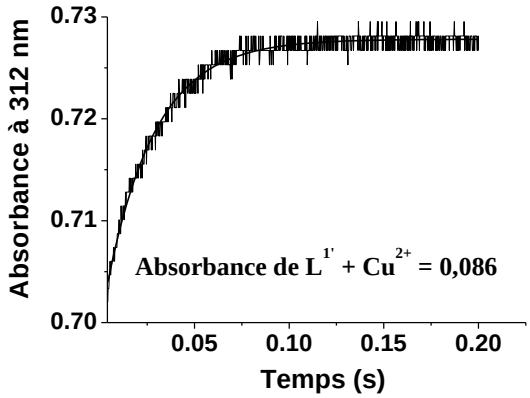


Figure 3.29. *Variation de l'absorbance à 312 nm en fonction du temps pour la formation du complexe Cu**L**^{1} à pH 2. Solvant: H_2O ; T = 25,0(2) °C ; l = 1 cm ; I = 0,1 M ($NaClO_4$) ; $[\mathbf{L}^1]_{tot}$ = 3,04 ✕ 10^{-4}M ; $[Cu^{2+}]_{tot}$ = 1,14 ✕ 10^{-2}M.*

Les valeurs des constantes de vitesse apparentes k_{obs} relatives à la formation du complexe Cu**L**$^{1'}$ calculées pour différentes concentrations de Cu^{2+} ont été déterminées au moyen du logiciel BIOKINE.[76] Pour chacune des $[Cu^{2+}]_{tot}$, une moyenne a été calculée et représente le résultat d'au moins trois traces cinétiques expérimentales répétables obtenus au moyen du spectrophotomètre à flux stoppé. La Figure 3.30 présente la variation des constantes de vitesse apparentes k_{obs} en fonction de la concentration totale en Cu^{2+}.

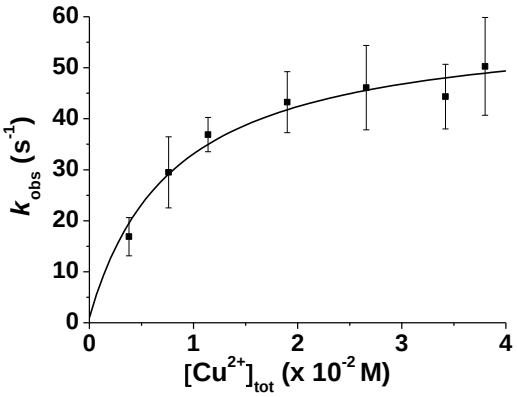


Figure 3.30. *Variation des constantes de vitesse de pseudo-premier ordre k_{obs} (s^{-1}) mesurées lors de la formation du complexe Cu**L**$^{1'}$ à pH 2. Solvant : H_2O ; T = 25,0(2) °C ; l = 1cm ; I = 0,1 M ($NaClO_4$) ; $[\mathbf{L}^1]_{tot}$ = 3,04 ✕ 10^{-4}M.*

Les constantes de vitesse apparentes k_{obs} (s^{-1}) varient en fonction de la concentration totale en Cu^{2+} selon la relation mathématique (6) présentée ci-dessous:

$$k_{\text{obs}} = \frac{a[\text{Cu}^{2+}]_{\text{tot}}}{1+b[\text{Cu}^{2+}]_{tot}} + c \qquad (6)$$

L'ensemble de nos données expérimentales semblent indiquer que la cinétique de formation du complexe [Cu$\mathbf{L^{1'}}$] suit un processus à deux étapes. La première étape est très rapide et correspond à un pré-équilibre qui conduit à la formation d'un complexe intermédiaire [Cu$\mathbf{L^{1'}}$]*. Cette étape correspond en fait à la complexation très rapide du Cu^{2+} par le ligand $\mathbf{L^{1'}}$. Nous avions démontré au début de ce chapitre que cette première étape suivait un mécanisme dissociatif de type Eigen et Wilkins et que la constante de formation était de l'ordre de $2{,}3 \times 10^8$ $M^{-1}s^{-1}$. En outre, la forte perte d'amplitude pendant le temps de mélange (3 ms) semble correspondre à la formation de cet intermédiaire au sein duquel un transfert de charge N → Cu^{2+} est déjà en place. La seconde étape, qui correspond à notre étape limitante conduit à la formation du complexe thermodynamique [Cu$\mathbf{L^{1'}}$]. Cette seconde étape pourrait correspondre à une étape de réarrangement du complexe cinétique intermédiaire [Cu$\mathbf{L^{1'}}$]* en complexe finale [Cu$\mathbf{L^{1'}}$]. Ces deux étapes cinétiques sont décrites par les équations (7) et (8) :

$$\mathbf{L^{1\prime}} + \mathrm{Cu}^{2+} \underset{K'_{[\mathrm{Cu}\mathbf{L^{1\prime}}]^*}}{\rightleftharpoons} [\mathrm{Cu}\mathbf{L^{1\prime}}]^* \qquad (7)$$

$$[\mathrm{Cu}\mathbf{L^{1\prime}}]^* \underset{k^{-1}_{[\mathrm{Cu}\mathbf{L^{1\prime}}]}}{\overset{k_{[\mathrm{Cu}\mathbf{L^{1\prime}}]}}{\rightleftharpoons}} [\mathrm{Cu}\mathbf{L^{1\prime}}] \qquad (8)$$

Nous en déduisons l'expression de k_{obs} par identification de a, b et c de l'équation (6) :

$$k_{\mathrm{obs}} = \frac{k_{[\mathrm{Cu}\mathbf{L^{1\prime}}]} K'_{[\mathrm{Cu}\mathbf{L^{1\prime}}]^*}[\mathrm{Cu}^{2+}]}{1 + K'_{[\mathrm{Cu}\mathbf{L^{1\prime}}]^*}[\mathrm{Cu}^{2+}]} + k^{-1}_{[\mathrm{Cu}\mathbf{L^{1\prime}}]} \qquad \text{avec } \mathbf{L^{1\prime}} = \mathbf{L^1}H_4^{2-} \qquad (9)$$

En analysant nos données avec le logiciel Origin 8.0, nous obtenons la valeur de la constante de vitesse monomoléculaire $k_{[\mathrm{Cu}\mathbf{L1'}]}$ (s^{-1}) ainsi que celle de la constante de stabilité de l'intermédiaire cinétique $K'_{[\mathrm{Cu}\mathbf{L1'}]^*}$ avec une erreur de 3σ (σ : déviation standard calculée).

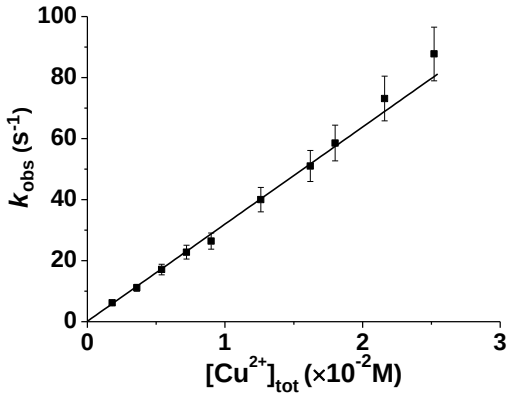
$$\boldsymbol{k_{[\mathrm{Cu}\mathbf{L1'}]} = 59 \pm 9\ s^{-1}}$$

$$\boldsymbol{\log K_{[\mathrm{Cu}\mathbf{L1'}]^*} = 2{,}1 \pm 0{,}2}$$

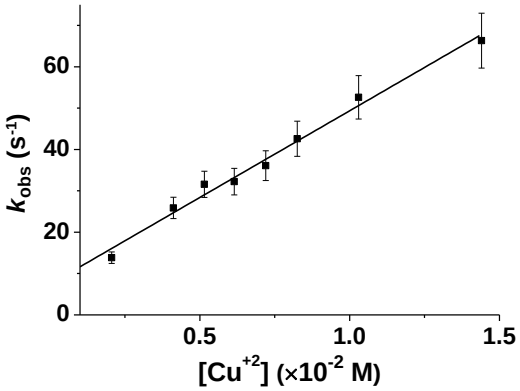
La valeur de $k_{[\mathrm{Cu}\mathbf{L1'}]}$ révèle un temps de demi réaction (réarrangement) d'environ 11,7 ms, ce qui confirme une cinétique de complexation rapide à température ambiante. La constante de stabilité de l'intermédiaire [Cu$\mathbf{L^{1'}}$]* se caractérise par une faible stabilité à pH 2 comparée à celle du complexe finale [Cu$\mathbf{L^{1'}}$] dans les mêmes conditions d'acidité (log $K_{[\mathrm{Cu}\mathbf{L1'}]^*}$= 2,1(2) et log $K'_{[\mathrm{Cu}\mathbf{L1'}]}$ = 6,04 à pH 2). Le processus de réarrangement semble donc impliquer la coordination d'unités phosphonates. Nous avons montré qu'à 312 nm, qui correspond à la bande de transfert de charge N→Cu(II), une forte amplitude était perdue pendant le temps de mélange (~ 3 ms).

Ce processus semble en accord avec la coordination très rapide du Cu(II), selon un mécanisme dissociatif de type Eigen-Wilkins, par les unités azotés du ligand $\mathbf{L^1}$. L'étape limitante se caractérise donc par une variation d'amplitude plus modeste en accord avec la coordination d'unités phosphonates de $\mathbf{L^1}$ qui stabilise très fortement l'intermédiaire cinétique [Cu$\mathbf{L^{1'}}$]* (log $K_{[\mathrm{Cu}\mathbf{L1'}]*}$ = 2,1(2)) en un complexe thermodynamique [Cu$\mathbf{L^{1'}}$] dont nous avons préalablement évalué sa stabilité thermodynamique à pH 2 par une voie spectrophotométrique (log $K'_{[\mathrm{Cu}\mathbf{L1'}]}$ = 6,04).

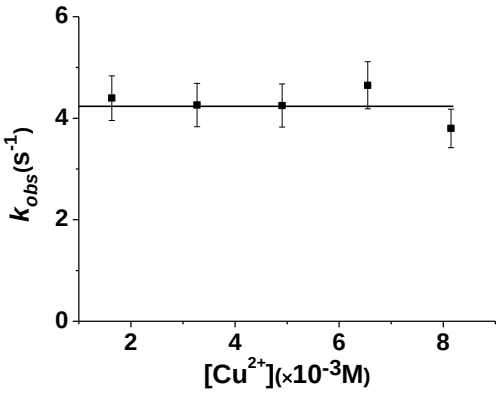
La valeur de la constante de vitesse de dissociation monomoléculaire $k^{-1}_{[\mathrm{Cu}\mathbf{L1'}]}$ n'a pas pu être déterminée dans nos conditions expérimentales et a été estimée à environ 6,94 × 10^{-3} s^{-1} en se basant sur nos données cinétiques et thermodynamiques disponible ($K'_{[\mathrm{Cu}\mathbf{L1'}]}$= $k_{[\mathrm{Cu}\mathbf{L1'}]}$ / $k^{-1}_{[\mathrm{Cu}\mathbf{L1'}]}$). La faible valeur de cette constante de vitesse $k^{-1}_{[\mathrm{Cu}\mathbf{L1'}]}$ indique que l'espèce [Cu$\mathbf{L^{1'}}$] peut être caractérisée comme étant une espèce très inerte ($t_{1/2}$ dissociation ~ 100 s). La Figure 3.31 présente les variations des constantes de vitesse apparentes (k_{obs}, s^{-1}) en fonction de la concentration en Cu^{2+} à pH 2 lors de l'étude cinétique de formation des complexes de cuivre(II) avec les ligands $\mathbf{L^2}$, $\mathbf{L^3}$ et $\mathbf{L^4}$. Les espèces protonées [Cu$\mathbf{L^2}H_2$], [Cu$\mathbf{L^3}H_3$]$^{2-}$ et [Cu$\mathbf{L^4}H_2$]$^{2-}$ sont les espèces majoritaires dans nos conditions expérimentales (pH 2).



a)



b)



c)

Figure 3.31. *Variation des constantes de vitesse de pseudo-premier ordre obtenues lors de la formation des complexes : (a) Cu**L**^{2} (b) Cu**L**^{3} et (c) Cu**L**^{4} à pH 2. Solvant: H_2O ; T = 25,0(2) °C ; l = 1cm ; I = 0,1 M ($NaClO_4$) ; [**L**^{2}]$_{tot}$ = 1,8 ✕ 10^{-4}M, [**L**^{3}]$_{tot}$= 2,06 ✕ 10^{-4} M et [**L**^{4}] $_{tot}$= 1,63 ✕ 10^{-4} M.*

De manière surprenante, les valeurs de k_{obs} varient linéairement avec $[Cu^{2+}]_{tot}$ pour les ligands **L**^{2} et **L**^{3} et sont invariables pour le ligand **L**^{4}. Si nous examinons l'équation (9), nous pouvons remarquer que la valeur de l'expression $(1 + K'_{[Cu\mathbf{L}']*}\,[Cu^{2+}]_{tot})$ et par conséquent la valeur de la constante de stabilité du complexe intermédiaire ($K'_{[Cu\mathbf{L}']*}$) peuvent conduire à deux situations limites pour lesquelles :

$$K'_{[Cu\mathbf{L}']*}\,[Cu^{2+}]_{tot} >> 1 \quad \rightarrow \quad k_{obs} = k_{[Cu\mathbf{L}']} + k^{-1}_{[Cu\mathbf{L}']} \qquad (10)$$

$$\text{et } K'_{[Cu\mathbf{L}']*}\,[Cu^{2+}]_{tot} << 1 \quad \rightarrow \quad k_{obs} = k_{[Cu\mathbf{L}']}\,K_{[Cu\mathbf{L}']*}\,[Cu^{2+}]_{tot} + k^{-1}_{[Cu\mathbf{L}']} \qquad (11)$$

Dans le cas d'un complexe intermédiaire [Cu**L'**]* de forte stabilité, nous pouvons donc nous retrouver dans une situation où les constantes de vitesse de pseudo-premier ordre sont indépendantes de la concentration en Cu^{2+}, ce qui semble être le cas pour le ligand **L**^{4}. Rappelons que le ligand **L**^{4} ne comporte que trois unités phosphonates et une amine tertiaire. La forte implication d'une unité phosphonate au sein du complexe cinétique intermédiaire [Cu**L**$^{4'}$] pourrait permettre d'expliquer cette différence de stabilité. Notons également que pour chacun des systèmes considérés, l'étape limitante correspond à un réarrangement d'un complexe intermédiaire formé très rapidement et pour lequel la cinétique de formation (k_f) été estimée être comprise entre 3✕ 10^7 et 3✕ 10^8 M^{-1} s^{-1} (Tableau 3.13).

Dans le cas des systèmes **L**^{2} et **L**^{3}, qui comportent respectivement 2 et 3 unités phosphonates, la plus faible stabilité du complexe intermédiaire par rapport à **L**^{1} permettrait de

rationaliser la variation linéaire des constantes de vitesse de pseudo-premier ordre en fonction de $[Cu^{2+}]_{tot}$. Grace au logiciel ORIGIN 8.0, nous avons déterminé les valeurs des constantes cinétiques $k_{[CuL']}$ et $k^{-1}_{[CuL']}$ et de la constante thermodynamique $K'_{[CuL']*}$ pour nos quatre systèmes. Les constantes de stabilité des complexes intermédiaires de Cu(II) formés avec les ligands $\mathbf{L^2}$ et $\mathbf{L^3}$ n'ont pu être déterminées et ont été estimées inférieures à 2. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le Tableau 3.14.

Complexes	**log$K_{[CuL']}$ *à pH 2***	**log$K_{[CuL']*}$ *à pH 2***	**$K_{[CuL']}$ (±σ) (M^{-1} s^{-1})**	**$k^{-1}_{[CuL']}$ (± σ) (s^{-1})**	**$k_{[CuL']} \times K_{[CuL']*}$ (± σ) (× 10^3 M^{-1} s^{-1})**
CuL^1	6,04[a]	2,1[a]	59 ± 9[a]	6,94× 10^{-3}[b]	7,43[b]
CuL^2	2,29[a]	<< 2[b]	/	~ 17[b]	3,32 ± 0,05[a]
CuL^3	2,46[a]	<< 2[b]	/	7,5 ± 1,5[a]	4,2 ± 0,2[a]
CuL^4	2,6[a]	~ 2[b]	4,23 ± 0,2[a,c]		/

Tableau 3.14. *Valeurs des constantes de vitesse de pseudo-premier ordre calculées pour la formation des complexes de cuivre(II) avec les ligands : L^1, L^2, L^3 et L^4 à pH 2. Solvant : H_2O ; T = 25,0(2) °C ; l = 1cm ; I = 0,1 M ($NaClO_4$). a) valeurs déterminées, b) valeurs estimées ou calculées, c) pour L^4: $k_{obs} = k_{[CuL']} + k^{-1}_{[CuL']}$.*

Dans le cas de $[CuL^{3'}]$, la constante de stabilité du complexe final peut être calculée selon l'expression (12) :

$$K'_{[CuL^{3\prime}]} = \frac{k_{[CuL^{3\prime}]} \times K^{*}_{[CuL^{3\prime}]}}{k^{-1}_{[CuL^{3\prime}]}} \qquad (12)$$

La valeur de log $K'_{[CuL3']}$ calculée à partir des donnés cinétiques (log $K'_{[CuL3']}$ = 2,75(9)) est en très bon accord avec la valeur estimée à partir des coefficients de Schwarzenbach (log $K'_{[CuL'3]}$ ~ 2,46 ; voir chapitre précédent). Ces résultats confirment donc le mécanisme que nous proposons pour la formation des complexes de cuivre(II) avec notre série de ligands ($\mathbf{L^1}$- $\mathbf{L^4}$).

Les résultats cinétiques obtenus montrent clairement la formation de complexes intermédiaires du cuivre(II) formés avec les ligands $\mathbf{L^1}$, $\mathbf{L^2}$, $\mathbf{L^3}$ et $\mathbf{L^4}$ qui se caractérisent par une plus faible stabilité. La formation des complexes cuivriques est très rapide en accord avec un mécanisme de type Eigen-Wilkins. Les produits $k_{[CuL']}$ $K'_{[CuL']*}$ sont comparables d'un ligand à l'autre, ce qui semble témoigner de processus de réarrangement comparables au sein des

systèmes $\mathbf{L^1}$- $\mathbf{L^4}$. Par contre, les valeurs des constantes de vitesse de dissociation du complexe cinétique intermédiaire, $k^{-1}_{[\mathrm{Cu}\mathbf{L}']*}$, sont très différentes et sont intimement liées au nombre d'unités phosphonates contenues dans ces systèmes. Le ligand $\mathbf{L^1}$ est celui pour lequel la plus forte inertie a été mesurée ($k^{-1}_{[\mathrm{Cu}\mathbf{L}']*}$ = 6,94 × 10^{-3} s^{-1}). Le ligand $\mathbf{L^2}$, qui ne possède que deux unités phosphonates, est celui pour lequel une plus faible inertie cinétique a été calculée. Le complexe Cu$\mathbf{L^1}$ peut être considéré comme étant le complexe de cuivre (II) le plus inerte par rapport aux autres complexes formés avec les ligands $\mathbf{L^2}$, $\mathbf{L^3}$ et $\mathbf{L^4}$, ce qui constitue un avantage pour sa possible utilisation en imagerie médicale.

2. Cinétique de dissociation des complexes du Cuivre(II)

Les chélateurs de ^{64}Cu doivent non seulement être très stables mais également être cinétiquement inertes vis-à-vis de la démétallation dans des compartiments *in vivo* (par exemple, le plasma sanguin à pH 7,35 – 7,45, la bile à pH 7,4 – 7,7….). Cette démétallation peut être induite par des milieux plus acides (sucs gastriques pH 1,2 – 3) ou par échange avec d'autres chélateurs endogènes spécifiques du Cu^{II} (exemple de transporteurs du cuivre dans le plasma sanguin et le foie : métallothionéine, céruloplasmine, transcupréine et albumine…).[77] C'est la raison pour laquelle une vitesse de dissociation ou d'échange très lente est une propriété indispensable afin d'éviter tout effet néfaste au sein de l'organisme mais aussi une détérioration de la qualité des images.

Afin d'obtenir des informations quant à cette propriété de nos systèmes, nous avons étudié la vitesse de dissociation des complexes de Cu(II) formés avec les ligands $\mathbf{L^1}$, $\mathbf{L^2}$, $\mathbf{L^3}$ et $\mathbf{L^4}$ par attaque du proton. La réaction de dissociation a été étudiée à une longueur d'onde pour laquelle l'amplitude de la bande de transfert de charge est maximale (l'absorbance de type N→Cu(II) CT constitue une sonde spectroscopique de choix dans nos études cinétiques). L'étude de la cinétique de dissociation du complexe de cuivre(II) formé avec le ligand $\mathbf{L^1}$ sera détaillée dans cette partie puis sera comparée aux résultats obtenus pour les autres systèmes.

Nous avons donc étudié le mécanisme de libération du cuivre(II) par attaque du proton sur le complexe Cu$\mathbf{L^1}$. Compte tenu des données thermodynamiques disponibles (Figure 3.32) et de nos conditions expérimentales, la réaction globale que nous avons suivie peut s'écrire selon l'équation suivante :

$$[Cu\mathbf{L^1}]^{6-} + 6H^+ \longrightarrow [\mathbf{L^1}H_6]^{2-} + Cu^{2+}$$

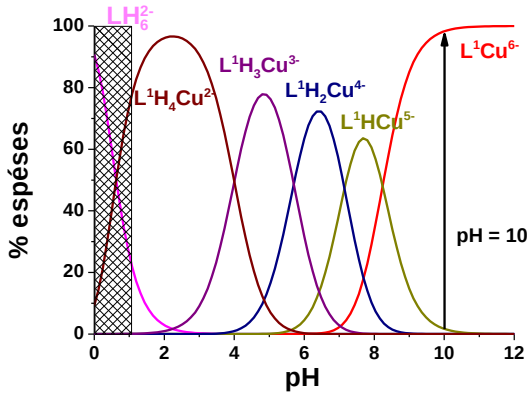


Figure 3.32. *Courbes de distribution des espèces protonées des complexes de Cu(II) formés avec le ligand* $\boldsymbol{L^1}$*. Solvant :* H_2O *; T = 25,0 °C ; I = 0,1 M (*$NaClO_4$*) ;* $[\boldsymbol{L^1}]_{tot} = [Cu^{2+}]_{tot} = 2 \times 10^{-3}$ *M.*

Nous avons tout d'abord effectué un contrôle spectroscopique et thermodynamique pour la réaction de dissociation du complexe Cu$\mathbf{L^1}$ en milieu acide. Pour cela, nous avons mesuré des spectres d'absorption du complexe Cu$\mathbf{L^1}$ à p[H] 10 (l'espèce $[Cu\mathbf{L^1}]^{6-}$ est l'espèce prédominante, Figure 3.32) et des spectres d'absorption après ajouts de concentrations croissantes d'acide perchlorique (Figure 3.33).

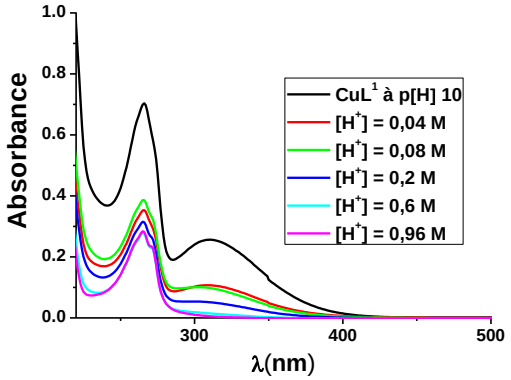


Figure 3.33. *Contrôle thermodynamique et spectroscopique pour la réaction de dissociation du complexe Cu*$\boldsymbol{L^1}$ *par* $HClO_4$*. Solvant :* H_2O *; T = 25,0(2) °C ; I = 0,1 M (*$NaClO_4$*) ; l = 1 cm*

Ces spectres d'absorption montrent que l'intensité de la bande de transfert de charge N→Cu(II) diminue lorsque le pH diminue. Nous avons pu montrer lors de l'étude de la spéciation du Cu(II) par nos ligands que les variations spectrales enregistrées pour chacune des espèces cuivriques protonées (Figure 3.16) témoignaient de modifications géométriques et structurales importantes des complexes de Cu(II) lorsque les unités méthanephosphonates se déprotonaient.

Dans nos conditions d'acidité utilisées pour dissocier les complexes Cu**L**, les ligands libres diversement protonés et le Cu^{2+} prédominent (Figure 3.32) en solution.

Au cours de la cinétique de dissociation du complexe Cu$\mathbf{L^1}$, nous avons tout d'abord observé une forte perte d'amplitude de l'absorbance de la bande de transfert de charge LMCT à 312 nm durant le temps de mélange (~ 3 ms). Ceci suggère l'existence d'étapes rapides qui ne seront pas accessibles dans nos conditions expérimentales avec notre technique instrumentale. La Figure 3.34 présente l'évolution temporelle de l'absorbance à 312 nm en présence d'un excès de proton $[H^+]_{tot}$ par rapport aux concentrations en complexes Cu$\mathbf{L^1}$.

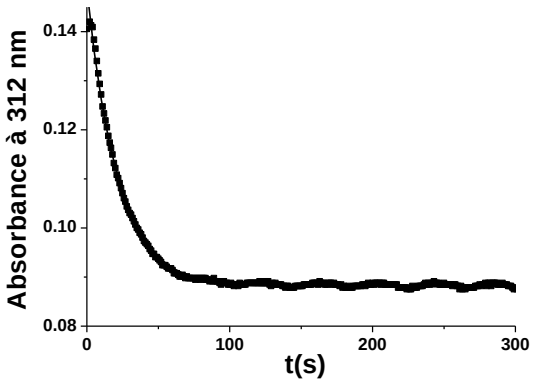


Figure 3.34. *Variation de l'absorbance à 312 nm en fonction du temps pour la dissociation du complexe Cu$\mathbf{L^1}$. Solvant : H_2O ; T = 25,0(2) °C ; l = 1cm ; I = 0,1 M ($NaClO_4$) ; $[Cu\mathbf{L^1}]_{tot} = 7\times10^{-5}$ M ; $[H^+]_{tot} = 5\times10^{-3}$ M. pH initiale du complexe = 10.*

Une seule étape limitante est observée. En outre, l'absorption à 312 nm suit une variation exponentielle en fonction du temps, ce qui implique que la réaction limitante de dissociation est d'ordre un par rapport au complexe Cu$\mathbf{L^1}$. Les traces cinétiques expérimentales ont été traitées au moyen du logiciel BIOKINE et nous ont permis de calculer les constantes de vitesse de pseudo-premier ordre relatives à la dissociation des complexes Cu**L**. La Figure 3.35 illustre les variations des constantes de vitesse de dissociation apparentes des complexes Cu$\mathbf{L^1}$, Cu$\mathbf{L^2}$ et Cu$\mathbf{L^3}$ en fonction des concentrations d'acide prises en excès dans une gamme de concentrations qui varient de 10^{-3} M à 0,5 M. La cinétique de dissociation du complexe Cu$\mathbf{L^4}$ en milieu acide n'a pas pu être étudiée par notre technique de mélange rapide du fait de la rapidité de ce système à se dissocier dans nos conditions expérimentales. Rappelons que $\mathbf{L^4}$ comporte un seul bras éthylaminodiméthanephosphonate et un bras éthylphosphonate.

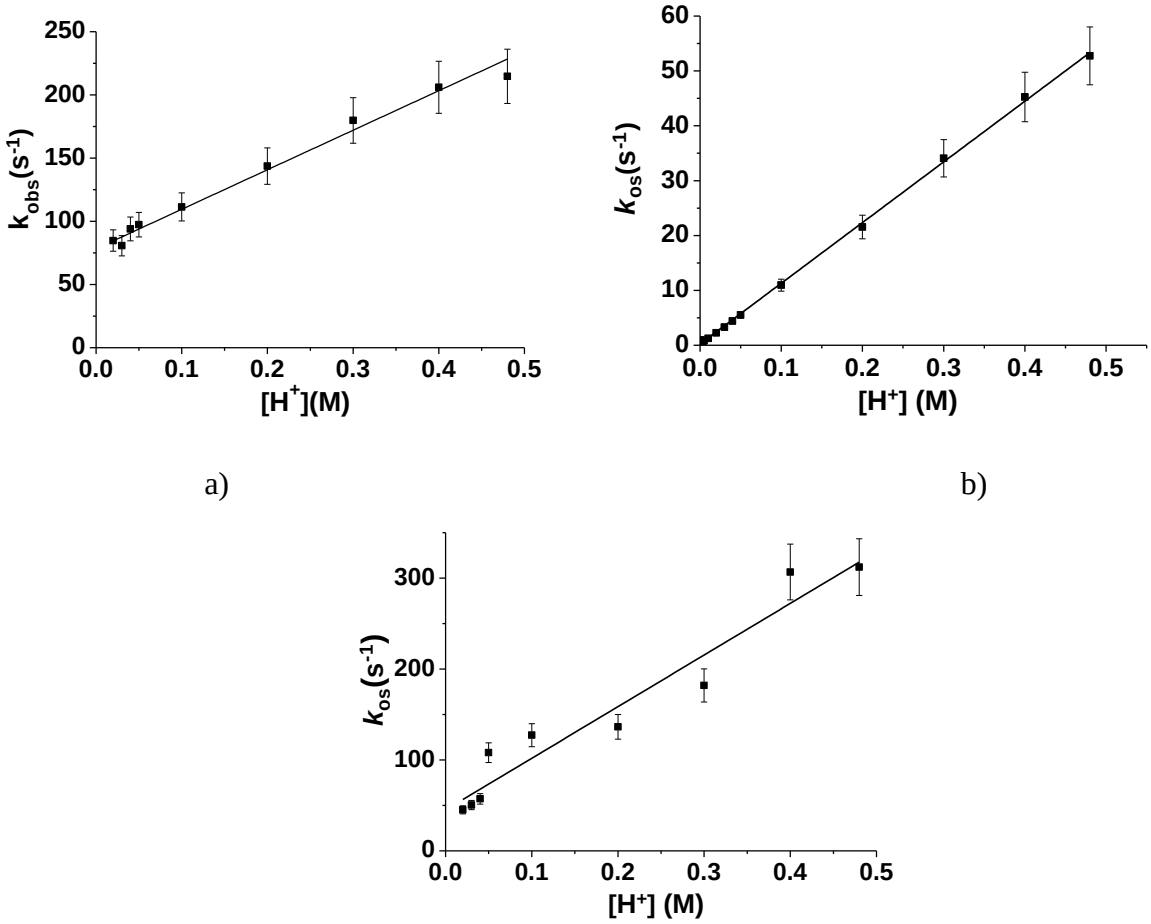


Figure 3.35. *Variations des constantes de vitesse de pseudo-premier ordre mesurées pour la dissociation des complexes. (a) Cu**L**^{1}, (b) Cu**L**^{2} et (c) Cu**L**^{3} en milieu acide. Solvant : H_2O ; T = 25,0(2) °C ; l = 1 cm ; I = 0,1 M ($NaClO_4$) ; [Cu**L**^{1}]$_{tot}$ = 7 × 10^{-5}M, [Cu**L**^{2}]$_{tot}$ = 5,67 × 10^{-5}et [Cu**L**^{3}]$_{tot}$ = 6,84 × 10^{-5}M. Les complexes de départ ont été préparés à pH 10.*

Les constantes de vitesse de dissociation de pseudo-premier ordre des complexes de Cu(II) varient linéairement avec les concentrations en proton, avec pour chacun des systémes considérés une ordonnée à l'origine non nulle. Ces données cinétiques peuvent être décrites simplement selon la relation suivante :

$$k_{\mathrm{obs}} = \mathrm{a} \times [\mathrm{H}^+]_{\mathrm{tot}} + b \qquad (13)$$

avec a, la constante de vitesse bimoléculaire d'acidolyse (k_H, M^{-1} s^{-1}) et b la constante de vitesse monomoléculaire de solvolyse (k_d, s^{-1}) des complexes de Cu(II). L'équation (13) peut donc s'écrire :

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{H}} \times [\text{H}^+]_{\text{tot}} + k_d \quad (14)$$

Les valeurs des constantes de vitesse k_H et k_d ont été obtenus par régression linéaire au moyen du logiciel Origin 8.0 et sont données dans le Tableau 3.15.

Ligands	k_H (× 10^2 M^{-1} s^{-1}) ± (σ)	k_d (s^{-1}) ± (σ)
L¹	3,0 ± 0,2	81 ± 4
L²	1,11 ± 0,01	0,3 ± 0,2
L³	2,8 ± 0,3	45 ± 14

Tableau 3.15. *Valeurs des constantes de vitesse d'acidolyse (k_H) et de solvolyse (k_d) mesurées lors de la dissociation des complexes de cuivre(II) avec les ligands **L¹**, **L²** et **L³**. Solvant: H_2O ; T = 25,0(2) °C ; l = 1cm ; I = 0,1 M ($NaClO_4$).*

Comme nous l'avons déjà mentionné, nos résultats expérimentaux montrent une diminution importante de l'absorbance à la longueur d'onde d'étude (bande de transfert de charge N→Cu(II)), ce qui suggère une étape limitante faisant intervenir des dissociations de liaisons de type N–Cu. En outre, la forte perte d'amplitude du signal spectrophotométrique pendant le temps de mélange (~ 3 ms) suggère plusieurs équilibres rapides successifs de protonation qui précèdent l'étape limitante. Les quatre équilibres de protonation du complexe Cu**L¹** sont rappelés ci -dessous:

$$[\text{Cu}\mathbf{L^1}]^{6-} + \text{H}^+ \Leftrightarrow [\text{Cu}\mathbf{L^1}\text{H}]^{5-} \qquad K_{\text{Cu}\mathbf{L1}\text{H}} = 10^{8,24} \quad (15)$$

$$[\text{Cu}\mathbf{L^1}\text{H}]^{5-} + \text{H}^+ \Leftrightarrow [\text{Cu}\mathbf{L^1}\text{H}_2]^{4-} \qquad K_{\text{Cu}\mathbf{L1}\text{H2}} = 10^{7,15} \quad (16)$$

$$[\text{Cu}\mathbf{L^1}\text{H}_2]^{4-} + \text{H}^+ \Leftrightarrow [\text{Cu}\mathbf{L^1}\text{H}_3]^{3-} \qquad K_{\text{Cu}\mathbf{L1}\text{H3}} = 10^{5,7} \quad (17)$$

$$[\text{Cu}\mathbf{L^1}\text{H}_3]^{3-} + \text{H}^+ \Leftrightarrow [\text{Cu}\mathbf{L^1}\text{H}_4]^{2-} \qquad K_{\text{Cu}\mathbf{L1}\text{H4}} = 10^{4} \quad (18)$$

Pour le système **L¹**, l'espèce protonée $[\text{Cu}\mathbf{L^1}\text{H}_4]^{2-}$ (les 4 unités phosphonates sont protonées) pourrait correspondre à cet intermédiaire cinétique, issu d'étapes de protonation très rapides (Figure 3.32 et Figure 3.36). Les spectres électroniques des espèces $[\text{Cu}\mathbf{L^1}\text{H}_2]^{4-}$, $[\text{Cu}\mathbf{L^1}\text{H}_3]^{3-}$ et $[\text{Cu}\mathbf{L^1}\text{H}_4]^{2-}$ sont très proches et indiquent que les deux constantes de protonation qui relient ces trois espèces (équilibres 17 et 18) impliquent des sites de protonation qui ne perturbent pas le chromophore (i.e. : LMCT).

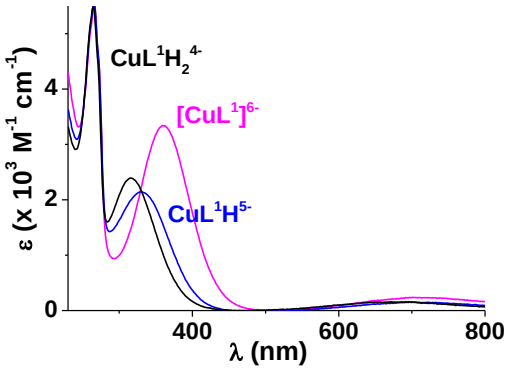


Figure 3.36. *Spectres électroniques des espèces monocuivriques protonées formées avec* ***L¹****. Solvant : H_2O ; T = 25,0(2) °C ; I = 0,1 M ($NaClO_4$).*

L'étape limitante observée pourrait donc être associée à la série de réactions suivantes :

$$\mathrm{Cu^{2+}} + [\mathbf{L^1}\mathrm{H_4}]^{4-} \xleftarrow{k_d} [\mathrm{Cu}\mathbf{L^1}\mathrm{H_4}]^{2-} + \mathrm{H^+} \xrightarrow{k_H} [\mathrm{Cu}\mathbf{L^1}\mathrm{H_5}]^{1-} \xrightarrow[+\mathrm{H^+}]{\text{rapide}} [\mathbf{L^1}\mathrm{H_6}]^{2-} + \mathrm{Cu^{2+}}$$

$$\mathrm{Cu^{2+}} + [\mathbf{L^1}\mathrm{H_4}]^{4-} \xrightarrow[+\,2\mathrm{H^+}]{\text{rapide}} [\mathbf{L^1}\mathrm{H_6}]^{2-}$$

Les mécanismes proposés sont schématisé à la Figure 3.37. L'étape limitante pourrait donc correspondre à la protonation d'une fonction amine et à la dissociation concomitante de la liaison N–Cu correspondante pour conduire à un intérimaire $\mathbf{I_1}$ très peu stable qui se dissocierait ensuite très rapidement par attaque d'un autre proton. Notons que cet intermédiaire $\mathbf{I_1}$ possède une structure très proche de celle que nous pourrions anticiper pour le système $\mathbf{L^4}$, ce qui permet d'expliquer la dissociation extrêmement rapide de celui-ci en milieu acide.

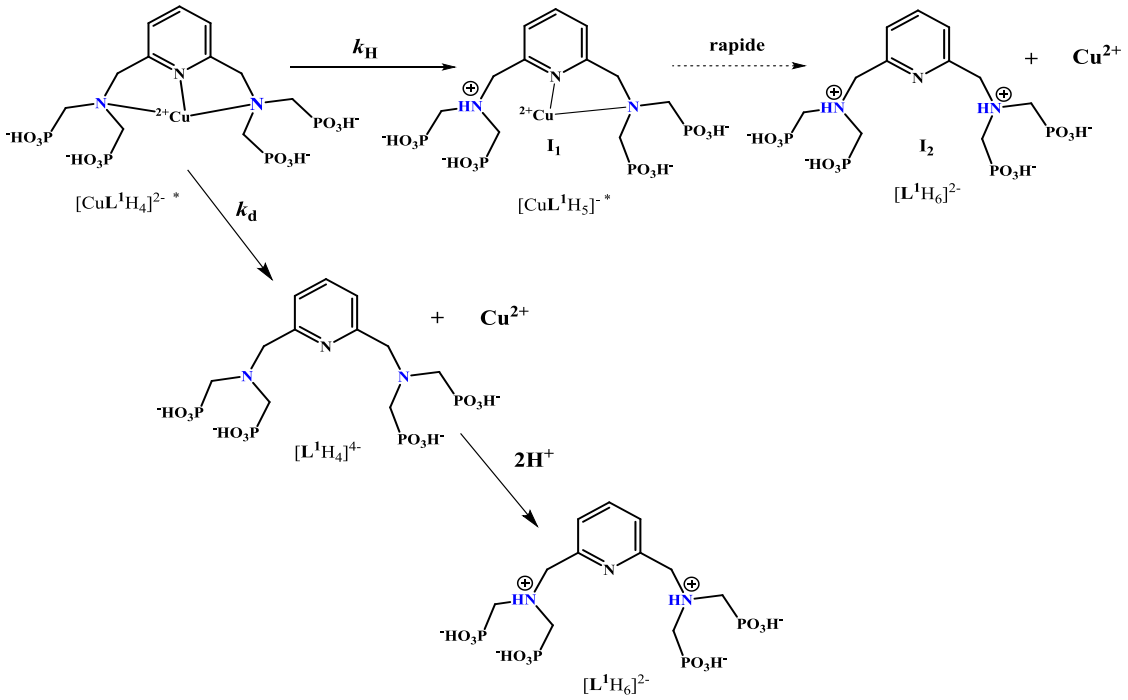


Figure 3.37. *Mécanisme proposé pour la dissociation du complexe Cu**L**^{1}.*

L'examen du Tableau 3.15 apporte des informations très intéressantes. Que ce soit en termes d'acidolyse ou de solvolyse, le système le plus inerte correspond de manière "inattendue" à celui qui comporte le moins d'unités phosphonates (Figure 3.38).

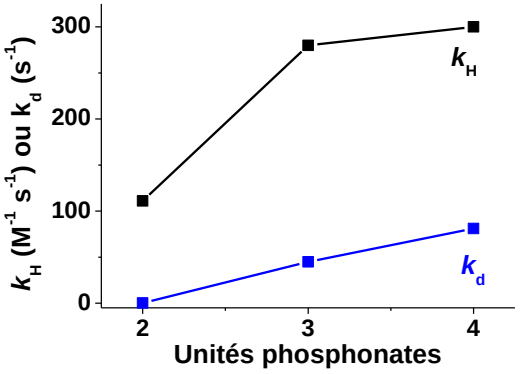


Figure 3.38. *Variation des constantes de vitesse d'acidolyse (k_H) et de solvolyse (k_d) mesurées pour les complexes Cu**L**^{1}, Cu**L**^{2} et Cu**L**^{3} en fonction d'un nombre d'unités phosphonates.*

Ces données suggèrent donc que le nombre d'unités phosphonates influence très fortement l'inertie cinétique du complexe cinétique intermédiaire sujet à une étape limitante de dissociation. Des effets importants de répulsion de charge des unités phosphonates dissociées et négativement chargées (Figure 3.37) ainsi que des contraintes structurales exercées sur les complexes cuivriques intermédiaires, peuvent permettre d'expliquer nos données cinétiques.

Conclusion

Dans cette partie du chapitre IV, nous nous sommes intéressés à la cinétique de complexation et de dissociation des complexes de Cu(II) formés avec notre série de ligands $\mathbf{L^1}$, $\mathbf{L^2}$, $\mathbf{L^3}$ et $\mathbf{L^4}$. Ces études ont été réalisées grâce à une technique de mélange rapide, un spectrophotomètre à flux stoppé.

La cinétique de formation des complexe de Cu(II) à pH 2 suit un processus à deux étapes : la première étape est très rapide et suit un mécanisme de type Eigen-Wilkins. Elle conduit à la formation d'un intermédiaire cinétique [Cu**L'**]* qui se caractérise par une faible stabilité. La stabilité des complexes cinétiques intermédiaires est liée au nombre de phosphonates (et donc à la charge globale du ligand) et c'est le ligand $\mathbf{L^1}$ tétraphosphonaté qui forme le complexe intermédiaire le plus stable par rapport aux systèmes $\mathbf{L^2}$-$\mathbf{L^4}$. La seconde étape est une étape limitante qui correspond à un réarrangement du complexe cinétique intermédiaire et qui implique la coordination des unités phosphonates pour conduire à la formation de complexe thermodynamique [Cu**L'**].

La vitesse de dissociation des complexes de Cu(II) formés avec les ligands $\mathbf{L^1}$, $\mathbf{L^2}$, $\mathbf{L^3}$ et $\mathbf{L^4}$ a été étudiée par attaque du proton. Cette étude a montré l'existence de plusieurs étapes rapides qui ne sont pas accessibles avec notre technique instrumentale. Une seule étape limitante est observée et pourrait correspondre à la protonation de la liaison N–Cu(II), puis à sa dissociation pour conduire à un intermédiaire qui se dissocie ensuite très rapidement par attaque d'un second proton. De manière surprenante, le ligand bisphosphonaté $\mathbf{L^2}$ forme les complexes de Cu(II) les plus inertes par rapport à $\mathbf{L^1}$ ou $\mathbf{L^3}$, ce qui indique que l'inertie cinétique des complexes de Cu(II) est gouvernée par le nombre de groupements phosphonates.

La cinétique de dissociation du complexe [Cu$\mathbf{L^4}$] en milieu acide n'a pas pu être étudiée du fait de la rapidité de ce système à se dissocier dans nos conditions expérimentales.

Les propriétés cinétiques de ces systèmes ont un intérêt particulier dans le domaine de l'imagerie TEP. Cette famille de composés se caractérise par des cinétiques de complexation rapides pour le métal et une certaine inertie cinétique. D'autre part, la forte stabilité et sélectivité des complexes de Cu(II) avec ces systèmes limite le risque de transmétallation ou d'échange avec des compétiteurs métalliques, enzymatiques ou biorganique.

IV- Propriétés électrochimiques des complexes de cuivre(II)

Les propriétés électrochimiques des complexes cuivriques sont parmi les paramètres physico-chimiques les plus importants à considérer avant toute utilisation d'un complexe de ^{64}Cu en imagerie médicale. La réduction in *vivo* de ces complexes par des réducteurs biologiques (Tableau 3.16) conduit généralement à des complexes de cuivre(I) peu stables et extrêmement labiles. Ces derniers peuvent alors se dissocier, soit sous l'effet de processus de solvolyse (faible stabilité des espèces de Cu(I)), d'acidolyse ou par échange avec des ligands biologiques. Le cuivre radioactif pourrait alors se distribuer dans l'organisme et provoquer des effets néfastes pour la santé ainsi qu'une perte de sélectivité vis-à-vis de la cible à imager.

Couple redox (réduction à 2 électrons)	E°'/mV à 25°C / ENH
Xantine / hypoxanthine, H^+	-371
Acide urique / xanthine, H^+	-360
NAD^+, H^+/ NADH	-316
$NADP^+$, H^+/ NADPH	-315
GSSG, $2H^+$ / 2GSH (Glutathion)	-240
FMN, $2H^+$ / $FMNH_2$	-219
FAD, $2H^+$ / $FADH_2$	-219
Riboflavine, $2H^+$ / Leuco-riboflavine	-200
Pyruvate, $2H^+$ / lactate	-183
Oxaloacetate, $2H^+$ / malate	-166
Dehydroascorbate, H^+ / ascorbate	+54
Ubiquinone (CoQ), $2H^+$/ ubihydroquinone ($CoQH_2$)	+84
O_2, $2H^+$ / H_2O_2	+300
H_2O_2, $2H^+$ / $2H_2O$	+1320

Tableau 3.16. *Potentiel d'oxydo-reduction de plusieurs systèmes biologiques. Les potentiels redox à mi-vague (E°') ont été déterminés à pH 7,0 et à 25 °C.*[78,79,80]

C'est pour l'ensemble de ces raisons qu'il est absolument nécessaire de déterminer que le potentiel de réduction des complexes de Cu(II) est hors d'atteinte des réducteurs biologiques ($E_{1/2} \geq$ - 0,4V/ENH) afin d'éviter des processus de réduction, de démétallation ou de dismutation.

Dans notre étude, des mesures électrochimiques par voltampérométrie cyclique et linéaire ont été réalisées afin d'évaluer les potentiels d'oxydo-réduction, ainsi que la réversibilité des systèmes étudiés.

1. Principe de la voltampérométrie

La voltampérométrie est une méthode d'analyse électrochimique qui consiste à perturber l'état d'équilibre d'une solution en contrôlant la différence de potentiel entre deux électrodes spécifiques. La mesure du flux de courant résultant de la réduction ou de l'oxydation des composés présents en solution permet d'obtenir le profil (courbe transitoire i = f(E)) du potentiel en oxydation et en réduction). L'analyse du voltampérogramme obtenu nous renseigne sur les caractéristiques des réactions électrochimiques mise en jeu, tels que le nombre d'électrons échangés, la réversibilité de la réaction redox considéré ainsi que le potentiel $E_{1/2}$ à mi-vague.

L'intensité du courant mesuré résulte principalement de la compétition entre deux phénomènes :

- La vitesse de transfert électronique au sein de la réaction électrochimique qui a lieu à la surface de l'électrode.
- La vitesse de diffusion de l'espèce électrochimique réactive vers l'électrode. A température constante, les courants de convection sont inexistants. La présence d'un électrolyte support (I = 0,1 M $NaClO_4$) annule l'influence du courant de migration. Comme la solution n'est pas agitée, la diffusion demeurera le seul mode de transfert de matière dans le milieu réactionnel (régime de diffusion pure).

Pour étudier nos complexes de cuivre(II) formés avec les ligands $\mathbf{L^1}$, $\mathbf{L^2}$, $\mathbf{L^3}$ et $\mathbf{L^4}$, nous avons utilisé deux méthodes électrochimiques : la voltampérométrie cyclique et la voltampérométrie à ondes carrées dont nous allons détailler les principes ci-dessous.

1.1. Principe de la Voltampérométrie Cyclique (CV)

C'est une technique qui consiste à faire varier le potentiel linéairement en fonction du temps et à mesurer le courant qui en résulte (Figure 3.39).

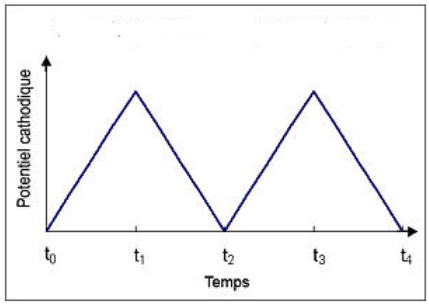


Figure 3.39. *Forme du potentiel en voltampérométrie cyclique.*

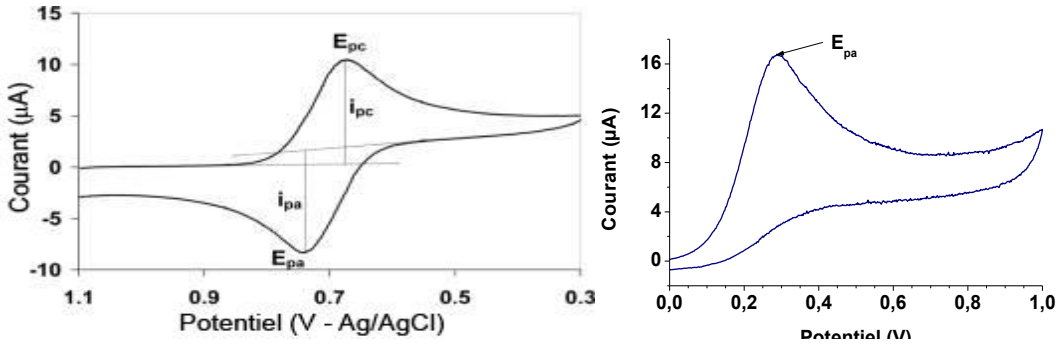
Le voltampérogramme cyclique est la courbe transitoire i = f(E) pour l'oxydation et la réduction d'un composé. Dans le cas d'une réaction d'oxydation et d'une réaction de réduction, le potentiel E(t) varie respectivement de $E(t) = E_i + \nu t$ et $E(t) = E_i - \nu t$ avec E_i = le potentiel initial (V), ν = la vitesse de balayage (V/s) et t = le temps (s). Cette technique électrochimique permet, en particulier, d'étudier la rapidité de la réaction rédox en fonction du temps de mesure. C'est une technique plus qualitative que quantitative car beaucoup de paramètres dépendent du temps. Elle permet notamment de repérer rapidement des potentiels approximatifs de réaction et renseigne sur la nature des réactions (chimique ou électrochimique, état physiques des espèces, degré de réversibilité…).

Rappelons qu'un système électrochimique peut être représenté par la réaction suivante:

$$\text{Red} \underset{\text{rèduction}}{\overset{\text{oxydation}}{\rightleftharpoons}} \text{Ox} + n\,e^-$$

(Ox = oxydant ; e = électron ; Red = réducteur et n = le nombre d'électrons échangés)

Lorsque le balayage en tension débute vers les potentiels anodiques E_{pa}, l'espéce Red s'oxyde lorsque le potentiel devient suffisamment positif (Figure 3.40). Ceci nous permet de mesurer un courant anodique (i_{pa}) causé par les électrons échangés. Si le système est réversible (Figure 3.40a), le produit d'oxydation pourra être réduit et produire un courant cathodique (i_{pc}). Dans le cas contraire, le système est irréversible (Figure 3.40b) et l'oxydant subit une réaction ultérieure et ne pourra pas être réduit.



a) b)

Figure 3.40. *Exemples de voltampérogrammes de systèmes réversible (a) et irréversible (b).*

Dans le cas d'une réaction réversible, le rapport [Ox] / [Red] obéit à tout moment à la loi de Nernst :

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[Ox]}{[Red]}$$

Avec R = 8,314 J. mol^{-1}. K^{-1} constante des gaz parfait, F = constante de Faraday (96485 C), T = température de mesure (K) et E_0 = le potentiel standard.

Ce profil nous permet de connaitre le nombre d'électrons échangés, la réversibilité de la réaction rédox considérée, mais aussi le potentiel $E_{1/2}$ à mi-vague. L'intensité du courant résulte également de la compétition entre deux phénomènes : la vitesse de transfert électronique au sein de la réaction électrochimique qui a lieu à l'électrode et la vitesse de diffusion de l'espèce électrochimique réactive vers l'électrode. Dans notre cas, nous avons utilisé comme dispositif une électrode de travail tournante (axe constitué de carbone vitreux, s = 0,07 cm^2, rotation ajustable jusqu'à 1000 rpm). Cette électrode tournante fait intervenir trois modes de transports : la diffusion, la convection et la migration. L'électrode tournante est l'une des premières méthodes capable de générer des courants stationnaires de diffusion. Le principe est basé sur le fait que la rotation d'un cylindre autour de son axe de symétrie entraîne sur son électrode disque un pompage du liquide dans lequel il est immergé. Ce mouvement hydrodynamique permet de contrôler l'épaisseur de la couche de diffusion en fonction de la vitesse angulaire ω (rad s^{-1} ; $\gamma = 1{,}61\ D^{1/3}\nu^{1/6}\ \omega^{-1/2}$, D = coefficient de diffusion, ν = viscosité cinématique, ω = 2f avec f = rpm).

1.2. Voltampérométrie à ondes carrées

La voltampérométrie à tension pulsée recouvre un ensemble de méthodes électrochimiques d'analyse à courant échantillonné. Elles permettent d'augmenter le rapport courant faradique (courant associé au transfert de charge à une interface métal/solution) sur courant capacitif (courant électrique associé à la charge ou à la décharge de la double couche électrochimique; ce courant capacitif entraine une modification de la répartition des charges électriques) et d'améliorer ainsi la sensibilité de la mesure quand une tension est appliquée. Le courant capacitif relatif à la double couche électrochimique décroît en effet d'une manière exponentielle avec le temps et plus rapidement que la décroissance du courant faradique.

Le principe de la voltampérométrie à ondes carrées (SWV) est d'appliquer une combinaison d'une modulation d'onde carrée d'amplitude avec une rampe en escalier de hauteur |ΔEs| (de l'ordre de 5 mV) à intervalles réguliers au niveau de l'électrode de travail et de mesurer le courant à deux instants précis : avant le début de l'impulsion et avant la fin de chaque impulsion de l'onde carrée. Une impulsion de potentiel d'une durée de temps Δt (de l'ordre de 20 ms) d'amplitude constante, |ΔE| (de l'ordre de 50 mV) (Figure 3.41) est appliquée au début de chaque marche de durée 2Δt (de l'ordre de 40 ms).

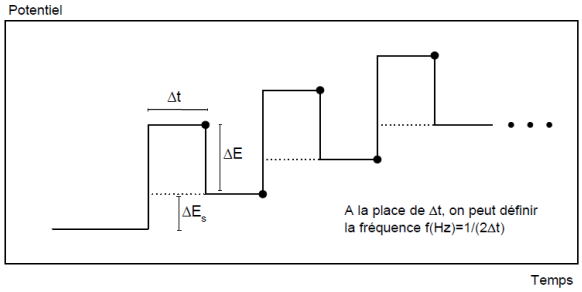


Figure 3.41. *Forme du potentiel en voltampérométrie à ondes carrées*

Le signal mesuré est donc la différence entre les courants mesurés à la fin de chaque impulsion montante et descendante de l'onde carrée. Dans cette méthode, la vitesse de balayage peut varier dans de larges gammes et peut donc être très rapide, ce qui permet de réduire de façon importante la durée d'analyse et d'obtenir une moyenne de plusieurs cycles pour accroître le rapport signal/bruit. La réponse en courant est de type gaussien et le maximum du pic correspond au potentiel standard du couple redox considéré dans le cas d'une réaction réversible (Figure 3.42). Dans le cas d'une réaction irréversible le maximum de pic correspond à E_{pa} ou à E_{pc} selon la nature du processus.

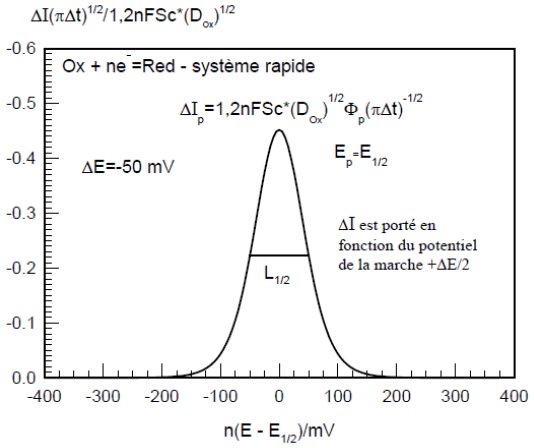


Figure 3.42. *Spectre SWV d'une réaction réversible.*

L'intensité du pic est proportionnelle à la concentration de l'espèce électroactive et des limites de détection aussi basses que 10^{-8} M peuvent être atteintes. Cette méthode peut également permettre de déterminer le nombre d'électrons échangés au cours de la réaction (largeur à mi-hauteur $L^{1/2} = 3.52RT/nF$).

La caractérisation électrochimique des complexes de cuivre(II) formés avec les ligands $\mathbf{L^1}$, $\mathbf{L^2}$, $\mathbf{L^3}$ et $\mathbf{L^4}$ a été réalisée dans l'eau en présence de perchlorate de sodium 0,1 M comme électrolyte support. En premier lieu, nous nous somme intéressés à l'influence du pH puis à celle de la vitesse du balayage en potentiel sur la valeur des potentiels d'oxydo-réduction des complexes de Cu(II). Dans un second temps, nous avons testé la stabilité de nos complexes de cuivre(II) en présence de divers réducteurs biologiques comme la nicotinamide Adénine dinucléotide phosphate (NADPH), la Glutathione (GSH) ou l'acide ascorbique.

2. Etudes des complexes monocuivriques à différentes valeurs de pH

Le pH du milieu d'étude constitue un paramètre déterminant dans les propriétés électrochimiques des complexes de cuivre(II). La caractérisation électrochimique des complexes de cuivre(II) formés avec les ligands $\mathbf{L^1}$, $\mathbf{L^2}$, $\mathbf{L^3}$ et $\mathbf{L^4}$ a donc été réalisée dans l'eau en présence de perchlorate de sodium à 0,1 M (électrolyte support) à différentes valeurs de pH ($3,7 \leq pH \leq 11$).

A titre d'exemple, la Figure 3.43 illustre les variations des voltampérogrammes en fonction du pH pour le complexe Cu$\mathbf{L^1}$. Les variations en fonction du pH observées pour les complexes Cu$\mathbf{L^2}$, Cu$\mathbf{L^3}$ et Cu$\mathbf{L^4}$ sont très similaires.

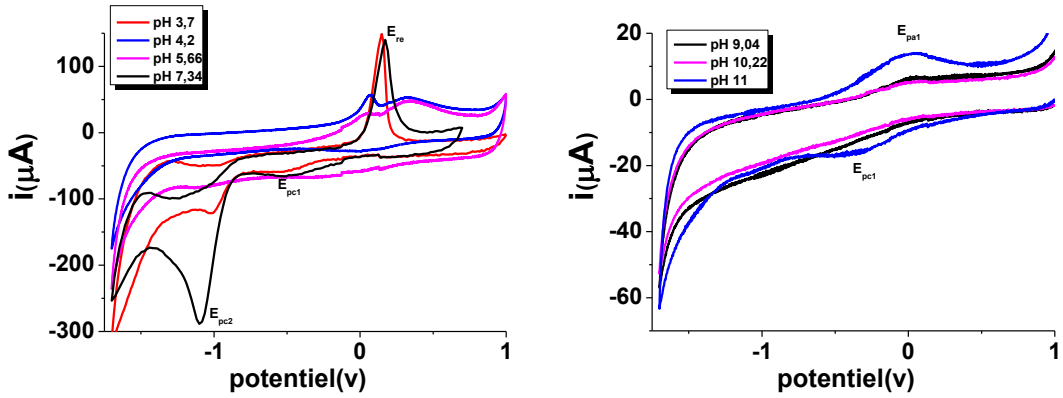


Figure 3.43. *Voltampérogrammes cycliques de solutions de Cu$\mathbf{L^1}$ à différentes valeurs de pH (v = 200mV/s). Solvant : H_2O, I = 0,1 M ($NaClO_4$), [Cu$\mathbf{L^1}$]= 9,94 × 10^{-4}M. Les potentiels sont exprimés par rapport à l'électrode de référence Ag/AgCl.*

En milieu acide (pH 3,7 et 4,2), nous observons la présence de systèmes irréversibles à avec deux pics de réductions quelle que soit la nature du complexe considéré (Cu**L**^{1}, Cu**L**^{2}, Cu**L**^{3} et Cu**L**^{4}) (Figure 3.44).

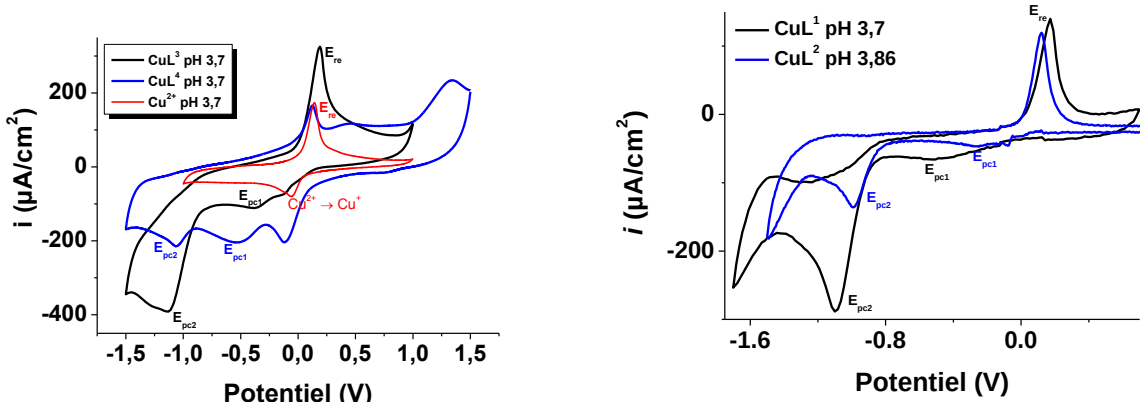


Figure 3.44. *Voltampérogrammes cycliques de Cu**L**^{1}, Cu**L**^{2}, Cu**L**^{3} et Cu**L**^{4} mesurés à 200 mV/s et à pH ~ 3,7. Solvant : H_2O ; I = 0,1 M ($NaClO_4$) ; [Cu**L**] ~ 10^{-3} M. La courbe en rouge correspond au voltampérogramme enregistré pour une solution de Cu^{2+} libre seul.Les potentiels sont exprimés par rapport à l'électrode de référence Ag/AgCl.*

La présence d'un premier pic cathodique pour **L**^{3} et **L**^{4} peut être reliée à la présence de Cu^{2+} libre dans nos conditions expérimentales. Rappelons que **L**^{3} et **L**^{4} forment les espèces cuivriques les moins stables en milieu acide. Le potentiel et l'intensité des deux pics de réduction varient fortement avec la vitesse du balayage. Ces pics cathodiques correspondent à la réduction irréversible de différentes espèces cuivriques protonées qui coexistent dans ces conditions de pH selon les diagrammes de distribution présentés précédemment dans ce manuscrit (Figure 3.14). En plus de ces pics de réduction, nous observons dans tous les cas un pic de redissolution anodique du cuivre(0) déposé sur l'électrode. Ces données mesurées en milieu acide pour nos complexes de Cu (II) montrent qu'il est possible de discriminer chacune des espèces cuivriques par son pic de réduction. Les complexes de Cu(I) formés sont suffisamment instables pour se dissocier très rapidement et générer en solution du Cu(0) à l'origine d'un pic anodique de redissolution (noté E_{re}). Ce comportement suggère donc un mécanisme de type EC correspondant à un transfert d'électron (E, réduction des complexes de Cu(II)) suivie d'une réaction chimique (C) attribuée à la décoordination des fonctions phosphonates du Cu(I).

Lorsque le pH augmente (pH > 5 – 6), les voltampérogrammes cycliques se simplifient pour l'ensemble des systèmes considérés avec la formation d'une vague redox quasi-réversible à

des potentiels plus positifs. La quasi-réversibilité des systèmes est confirmée par le rapport des intensités des pics cathodiques et anodiques (i_{pc}/ i_{pa} > 1), ainsi que par la différence de potentiel entre les pics cathodiques et anodique. La quasi-réversibilité de ces complexes redox persiste après plusieurs balayages et ce, quelle que soit la vitesse de balayage en potentiel. Ceci signifie que le complexe de Cu(I) généré par la réduction de l'espèce cuivrique correspondante est stable puisqu'il n'évolue pas à l'échelle de temps de la voltampérométrie cyclique.

Expérimentalement, un film orange recouvrant le disque de l'électrode de carbone vitreux a pu être observé, correspondant à un dépôt métallique à la surface de l'électrode. La présence du pic de redissolution à ~ 0,1 V suggère donc que les complexes de cuivre(I) dérivés des ligands $\mathbf{L^1}$, $\mathbf{L^2}$, $\mathbf{L^3}$ et $\mathbf{L^4}$ formés sont instable en milieu acide et se dissocient en libérant le Cu(I) en solution. En milieu basique, ce pic de redissolution du Cu^0 disparait en accord avec la plus forte stabilité des complexes de Cu^{II}/Cu^{I} avec $\mathbf{L^1}$, $\mathbf{L^2}$, $\mathbf{L^3}$ et $\mathbf{L^4}$. Les préférences géométriques spécifiques du cuivre(I) au sens de la théorie HSAB (*Hard and Soft Acids and Bases)* de Pearson[81] expliquent la plus faible affinité des ligands polyaminophosphonatés porteurs essentiellement de groupements oxygénés durs vis-à-vis de l'ion mou Cu^{I}. A des valeurs aussi négatives en potentiel (E ~ -1 V), le cuivre(I) instable se réduit instantanément et se dépose à la surface de l'électrode sous la forme de cuivre(0).[82] Lors du balayage retour, ce film métallique se redissout à des potentiel E_{pa} > 0 V.

L'ensemble de ces données démontrent l'importance des processus de protonation, et donc de géométrie de coordination sur les propriétés électrochimiques des complexes de Cu(II). En milieu acide, les diverses protonations semblent affecter des sites de coordination du Cu(II) et influencent fortement la stabilité et le comportement électrochimique de ces espèces. En milieu plus basique, les réactions protolytiques concernent des unités ionisables non impliquées dans la coordination et influence donc très peu le comportement électrochimique des complexes de Cu(II). La plus forte stabilité des complexes de Cu(II) et de Cu(I) conduit à la présence d'une vague redox quasi-réversible quelque soit la nature du ligand considéré.

Le Tableau 3.17 présente un récapitulatif des différents résultats obtenus lors de l'étude électrochimique du complexe Cu$\mathbf{L^1}$ à différentes valeurs de pH. Les notions E_{pc}, E_{pa}, i_{pc} et i_{pa} représentent respectivement les valeurs des potentiels des pics cathodique et anodique, ainsi que l'intensité du courant cathodique et anodique.

	Premier pic de Réduction (p_{c1})		Pic d'oxydation (p_{a1})			Second pic de réduction (p_{c2})		Pic de redissolution	
pH	E_{pc1} (V)	i_{pc1} (µA)	E_{pa1} (V)	i_{pa1} (µA)	i_{pc1}/i_{pa2}	E_{pc2} (V)	i_{pc2} (µA)	E_{pa} (V)	i_{pa} (uA)
3,7	- 0,51	- 66	-	-	-	- 1,1	- 289	0,17	141
4,2	- 0,51	- 58	-	-	-	-1,03	- 120	0,15	149,3
5,66	- 0,02	- 28	0,33	53	1,65	- 0,95	- 32,3	0,01	57,5
7,33	- 0,32	- 68	0,34	48	1,41	-1,1	- 82,9	0,04	28,7
9,04	- 0,21	- 10,5	0,03	7	2,01	-	-	0,03	6,47
10,22	- 0,49	- 12,5	0,03	5	3,35	-	-	0,004	5,09
11	- 0,5	- 17	0,01	14	1,55	-	-	0,024	13,9

Tableau 3.17. *Valeurs des potentiels de réduction (E_{pc}) et d'oxydation (E_{pa}) associés à l'intensité de leurs courants cathodique i_{pc} et anodique i_{pa} mesurées à partir des voltampérogrammes des complexes Cu**L**^{1}, Cu**L**^{2}, Cu**L**^{3} et Cu**L**^{4} entre pH 3,7 et pH 11.*

Les intensités des courants cathodiques augmentent dans la zone de pH comprise entre 3,7 et 6. Pour des valeurs supérieures à 6, on observe des variations quasi constantes. A titre d'exemple, la Figure 3.45 représente la variation des intensités des deux pics cathodiques pour le complexe Cu**L**^{1} en fonction du pH. Les mêmes observations peuvent être faites pour les complexes Cu**L**^{2}, Cu**L**^{3} et Cu**L**^{4}.

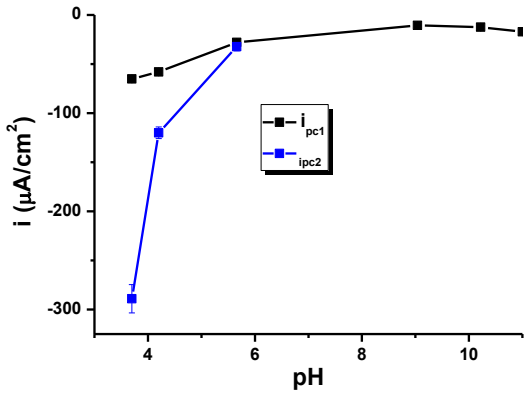


Figure 3.45. *Effet du pH sur les intensités de courant cathodique d'une solution de complexe de Cu(II) formé avec le ligand **L**^{1} (v = 200mV/s). Solvant : H_2O, I = 0,1 M ($NaClO_4$); [Cu**L**^{1}]=9,94 × 10^{-4}M.*

L'augmentation de l'intensité du courant cathodique en milieu acide et le caractère d'irréversibilité peuvent être expliquées par l'effet de la protonation qui conduit à la dissociation d'unités de coordination (phosphonates). Ceci se traduit par une déstabilisation et probablement

un changement de sphère de coordination des complexes de Cu(II) et de Cu(I) et confère au système un caractère d'irréversibilité.[83,84] A pH basique, l'espèce [Cu**L**^{1}]$^{6-}$ est majoritaire, la réduction du Cu(II) en Cu(I) permet de former des complexes de Cu(I) de nombre de coordination 4 plus stables et éviter la dissociation et l'oxydation du Cu(I) en Cu(0), ce qui conduit à des systèmes quasi-réversibles. Les Tableau 3.18 et Tableau 3.19 rassemblent les données électrochimiques enregistrées pour les complexes cuivriques formées avec les ligands **L**^{1}, **L**^{2}, **L**^{3} et **L**^{4} à, respectivement, pH 3,7 et pH 11.

	Premier pic de réduction (Pc1)		**Deuxième pic de réduction (Pc2)**		**Pic de redissolution**	
	E_{pc1}(V)	i_{pc1}(µA)	E_{pc2}(V)	i_{pc2}(µA)	i_{pa}(µA)	*E(V)*
CuL^{1}	- 0,51	- 66	-1,1	- 286	144	0,17
CuL^{2}	- 0,26	- 45	-1	- 136	121	0,12
CuL^{3}	- 0,39	- 112	-1,13	- 389	326	0,19
CuL^{4}	- 0,55	- 206	- 1,06	- 213	165	0,12

Tableau 3.18. *Propriétés électrochimiques des complexes de cuivre(II) mesurées à pH 3,7. Solvant : H_2O; I = 0,1M ($NaClO_4$); v = 200mV/s.*

Complexe	**Pic de réduction (Pc1)**		**Pic d'oxydation (Pa1)**		**ΔE (mV)**
	E_{pc1}(V)	i_{pc1}(µA)	E_{pa1}(V)	i_{pa1}(µA)	
CuL^{1}	- 0,5	-17	0,01	14	490
CuL^{2}	- 0,5	-26,9	-0,26	14,4	240
CuL^{3}	- 0,16	-197	0,25	245	410
CuL^{4}	- 0,07	-47	0,29	44,7	36

Tableau 3.19. *Propriétés électrochimiques des complexes de Cu(II) mesurées à pH 11. Solvant : H_2O ; I = 0,1M ($NaClO_4$); v = 200mV/s.*

Les résultats du Tableau 4 montrent clairement l'influence du nombre des groupements phosphonates sur les potentiels de réduction des complexes de cuivre formés. La comparaison des potentiels de réduction (1^{ére} réduction) montre un déplacement de, respectivement, 250 mV et 120 mV entre Cu**L**^{1} (4 phosphonates) et les complexes Cu**L**^{2} (2 phosphonates) et Cu**L**^{3} (3 phosphonates). De manière intéressante, un écart de prés de 150 mV peut être observé entre Cu**L**^{3} et Cu**L**^{4}, les deux étant basés sur trois unités phosphonates, mais sur des plateformes différentes. Ces différences de potentiel de réduction peuvent donc être en partie liées à la stabilité

thermodynamique des complexes protonés dans ces conditions d'acidité mais également à des géométries de coordination différentes.

Le second pic de réduction, qui correspondant très probablement à une autre espèce protonée majoritaire dans ces conditions d'acidité, est peu sujet à variation lorsque le nombre de phosphonates varie. Ceci indique qu'il s'agit très probablement d'une espèce protonée dont la sphère de coordination est commune à la majeure partie des ligands considérés ($N_{pyridine}$ et $N_{tertiare}$ impliqué dans la coordination).

Le Tableau 3.20 rassemble les données électrochimiques obtenues à pH 11 pour l'ensemble des complexes de Cu(II). Dans ces conditions d'acidité, les complexes entièrement déprotonés prédominent. A l'exception du complexe Cu**L**^{2}, les potentiels cathodique et anodique suivent la séquence de stabilité. Notons également que l'écart entre les pics anodiques (Pa1) et cathodique (Pc1) est compris entre ~ 230 et 500 mV, ce qui traduit bien le caractère quasi-réversible de ce processus et montrent que si les complexes de Cu(I) généré par électroréduction sont un peu plus stables qu'en milieu acide (dissociation du Cu(I)), leurs stabilité reste toutefois faibles.

Nous présenterons au Tableau 3.20 les résultats issus des mesures réalisées par voltampérométrie à onde carrées (SWV) menées sur l'ensemble des complexes de cuivre(II) formés avec les ligands polyaminophosphonatés (**L**^{1}, **L**^{2}, **L**^{3} et **L**^{4}).

Complexe de Cu(II)	1er pic		2^{éme} pic		3^{éme} pic	
	E^1(V)	i (µA cm^{-2})	E^2(V)	i (µA cm^{-2})	E^3(V)	i (µA cm^{-2})
CuL^1	0	- 245	-0,47	-59	-0,93	-321
CuL^2	0,03	- 78	-0,21	-47	-0,85	-100
CuL^3	0,02	- 92	-0,25	-50	-0,84	-129
CuL^4	0,02	- 85	-0,33	-53	-0,85	-178

Tableau 3.20. *Données électrochimiques mesurées à pH 3,7 par voltampérométrie à ondes carrées pour l'ensemble des complexes Cu**L**^{1}, Cu**L**^{2}, Cu**L**^{3} et Cu**L**^{4}.Solvant : H_2O ; I = 0.1M ($NaClO_4$).*

Nous avons comparé à la Figure 3.46 les voltampérogrammes SWV des complexes Cu**L**^{1}, Cu**L**^{2}, Cu**L**^{3} et Cu**L**^{4}.

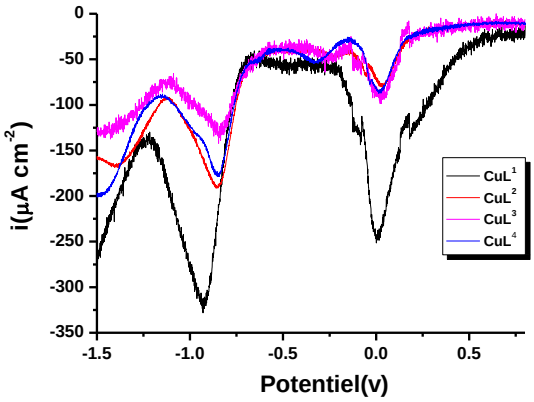


Figure 3.46. *Voltampérogrammes à onde carrées des solutions des complexes de Cu(II) formés avec les ligands* ***L***^{1}, ***L***^{2}, ***L***^{3} *et* ***L***^{4} *à pH 3,7(vitesse de balayage v=200mV/s). Solvant :* H_2O, *I = 0,1 M* ($NaClO_4$),[Cu***L***^{1}]= 9,94 ✕ 10^{-4}M, [Cu***L***^{2}] =1,09 ✕ 10^{-3}M, [Cu***L***^{3}]= 1,1 ✕ 10^{-3}M, [Cu***L***^{4}] = 1,06 ✕ 10^{-3}M.

Quel que soit le système considéré, nous obtenons 3 pics qui correspondent à des processus centrés sur le cuivre (II) libre et complexé. Le premier pic à ~ 0 V correspond à la réduction du Cu(II) libre et à sa redissolution. Les deux pics à des potentiels plus négatifs correspondent aux pics de réduction des complexes cuivriques qui prédominent à pH acide.

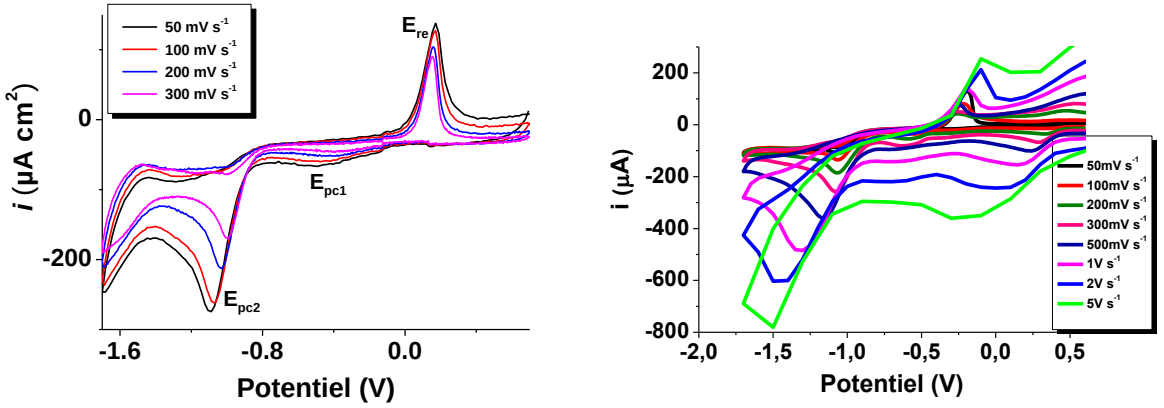
Notons que si la séquence de potentiel redox est maintenue, les valeurs peuvent légèrement différer de celles obtenues par voltampérométrie cyclique du fait d'un courant capacitif plus important (les méthodes à impulsion minimisent la contribution des courants capacitif lors des mesures).

3. Etudes des complexes monocuivriques en fonction de la vitesse de balayage

Après avoir étudié l'influence du pH sur les voltampérogrammes des complexes de cuivre(II) formés avec les ligands **L**^{1}, **L**^{2}, **L**^{3} et **L**^{4}, nous nous sommes intéressés à l'effet des variations des vitesses de balayage en potentiel (50 mV s^{-1} < v < 20 V s^{-1}) sur les mesures électrochimiques, notamment afin de caractériser le phénomène de transfert de ces espèces électroactives.

A titre d'exemple, la Figure 3.47 représente les voltampérogrammes cycliques enregistrés à différentes vitesses de balayage (50 mV ≤ ν ≤ 5000 mV) pour le complexe Cu**L**^{1}. L'intensité des pics de réductions diminue avec l'augmentation de la vitesse de balayage contrairement au pic

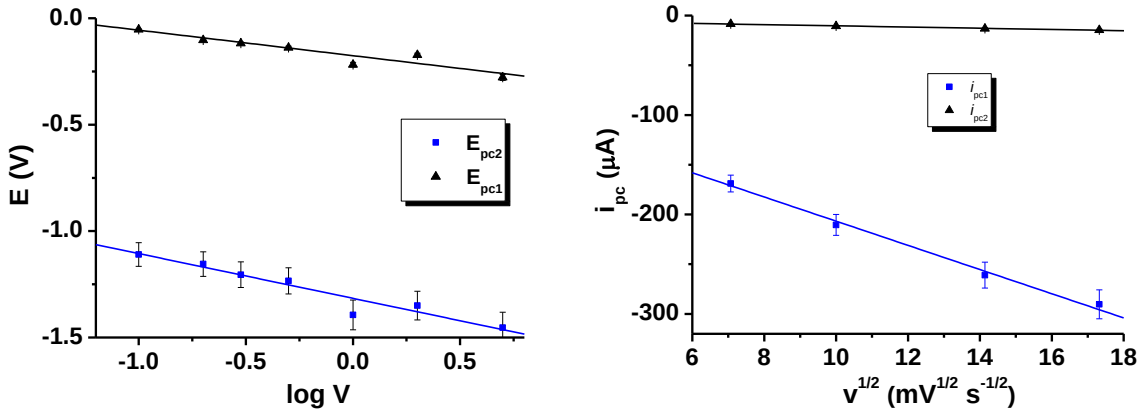
d'oxydation (redissolution) dont l'intensité augmente avec la vitesse. En outre, la vitesse de balayage a une forte influence sur les valeurs de potentiels de réduction (E_{pc1} et E_{pc2}), tandis que le potentiel anodique de redissolution du Cu^0 n'est que peu influencé.



a) b)

Figure 3.47. *Voltampérogrammes enregistrées pour le complexe de Cu(II) formé avec le ligand* ***L¹*** *à pH 3,7. a) en mode interactive (v = 50, 100, 200, 300 mV s^{-1}), b) en mode cyclique (v=50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000, 10000, 20000 mV s^{-1}). Solvant : H_2O, I = 0,1 M ($NaClO_4$), [Cu**L¹**] = 9,94 × 10^{-4}M.*

Ce comportement électrochimique en milieu acide a été observé pour les autres complexes étudiés et suggère un mécanisme de type EC correspondant à un transfert d'électron (E) suivi d'une réaction chimique (C) attribuée à la décoordination des fonctions phosphonates sur le cuivre au degré d'oxydation +I.[85] La Figure 3.48 montre l'influence de la vitesse de balayage sur les paramètres électrochimiques (E_{pc} et i_{pc}) du complexe Cu**L¹**. Les observations peuvent être faites pour les autres complexes de Cu(II).



a) b)

Figure 3.48. *Influence de la vitesse de balayage sur E_{pc} (a) et sur i_{pc} (b). Solvant : H_2O, I = 0,1 M ($NaClO_4$), [Cu**L¹**] = 9,94 × 10^{-4}M, pH= 3,7.*

Le Tableau 3.21 rassemble l'ensemble des données (E_{pc} = f (log(ν)), i_{pc} = f (log($\nu^{1/2}$) et log│ipc│= f(log(ν)) pour les quatre complexes de Cu(II) considérés dans ce travail. Indépendamment de la nature du pic de réduction considérée, les intensités et les potentiels cathodiques varient linéairement lorsque la vitesse de balayage augmente.

	Y = a + b ✕ *x*		Cu**L**^{1}	Cu**L**^{2}	Cu**L**^{3}	Cu**L**^{4}
1er pic de réduction	$E_{pc} = f(\log(\nu))$	a	-0,733	-0,40	-0,447	-0,933
		b	0,135	0,063	0,08	-0,229
	$i_{pc} = f(\log(\sqrt{\nu}))$	a	-0,79	-82,2	-113,8	-490
		b	1,9	2,5	3,2	23,2
	$\log\lvert i_{pc}\rvert = f(\log(\nu))$	a	-3,83	-3,70	-3,17	-2,29
		b	-0,20	-0,28	-0,24	-0,68
2ème pic de réduction	$E_{pc} = f(\log(\nu))$	a	-1,32	-1,19	-1,22	-1,254
		b	0,127	0,087	0,112	0,102
	$i_{pc} = f(\log(\sqrt{\nu}))$	a	-371	-402	-229	-446
		b	11,5	13,0	6,8	19,7
	$\log\lvert i_{pc}\rvert = f(\log(\nu))$	a	-3,04	-3,27	-2,97	-2,52
		b	-0,29	-0,27	-0,31	-0,56

Tableau 3.21. *Résultats de la linéarisation par une méthode des moindres carrés des variations du potentiels de réduction (E_{pc}, V vs ECS) et du courant cathodique (i_{pc}, µA) de solution de complexes de Cu(II) avec* ***L***^{1}, ***L***^{2}, ***L***^{3} *et* ***L***^{4} *en fonction de la vitesse de balayage (x = log(ν) ou* $\sqrt{\nu}$ *, mV/s). Solvant : eau; T = 25 °C ; I = 0,1 M ($NaClO_4$), Y = a + b✕ x.*

Dans le cas d'une réaction réversible ou irréversible, le courant de réduction i_{pc} est proportionnel à la concentration de l'espèce électroactive à la surface de l'électrode mais aussi à la racine carrée de la vitesse de balayage ν. C'est ce qui est observé pour les quatre complexes de Cu(II) à pH 3,7 quel que soit la nature du signal de réduction (Tableau 7). Seul dans le cas d'une réaction irréversible, E_{pc} se déplace vers les potentiels anodiques de la quantité 1,15 RT/αn soit 30/αn à 25 °C lorsque la vitesse de balayage est multipliée par 10 (α : coefficient de transfert de charge, n : nombre d'électron échangé).[86] En postulant que le nombre d'électron échangé est de 1 pour chacune des espèces protonées et chacun des complexes de Cu(II), les données du Tableau 3.21 montrent alors que les coefficients du transfert de charge sont comparables pour les deux pics de réduction pour un même système excepté le complexe Cu**L**^{4} pour lequel le coefficient de transfert de charge est deux fois plus élève pour le premier courant cathodique que pour le second. D'autre part, des différences existent selon la nature du système considéré (**L**^{1}, **L**^{2}, **L**^{3} ou **L**^{4}).

Enfin, notons qu'un processus électrochimique est purement contrôlé par la diffusion si log(i_{pc}) suit une variation linéaire en fonction de log (ν) avec une pente égale à 0,5. L'examen du Tableau 3.21 montre que les valeurs des pentes sont très largement inférieures à 0,5 pour Cu**L**^{1}, Cu**L**^{2} et Cu**L**^{3}, ce qui semble indiquer que ce processus électrochimique n'est pas purement contrôlé par la diffusion. Seul dans le cas du système Cu**L**^{4}, les valeurs mesurées se rapprochent des valeurs attendues pour un tel processus. Notons que Cu**L**^{4} est basé sur une plateforme légèrement différente de celle des systèmes Cu**L**^{1}, Cu**L**^{2} et Cu**L**^{3}. Le Tableau 3.22 rassemble les potentiels de réduction mesurés pour les complexes Cu**L**^{1}, Cu**L**^{2}, Cu**L**^{3} et Cu**L**^{4} ainsi que les valeurs obtenus pour d'autres complexes décrits dans la littérature.

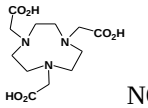
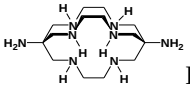
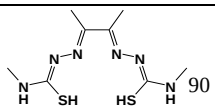
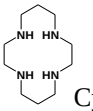
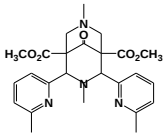
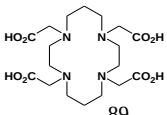
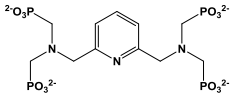
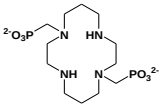
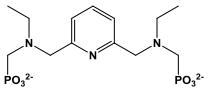
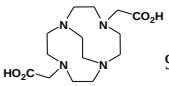
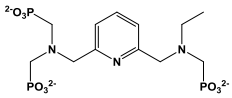
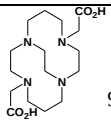
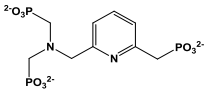
Chélatants	log K_{ML}	E_{red}	Chélatants	log K_{ML}	E_{red}
 NOTA[87]	19,8 21,6	-0,70 (irrev)	 Diamsar[88]	-	-0,90 (irrev)
DOTA[89]	22,2 22,7	-0,74 (irrev)	 90	-	0,40 (q-rev)
 Cyclam[91]	22,7	-0,48 (irrev)	 92	16,3	0.08 (q-rev)
 TETA[89]	21,1 21,9	-0,98 (irrev)		22,7	-0,5 (q-rev)
 TE2P[93]	26,5	-0,45 (irrev)		19,5	-0,5 (q-rev)
 94	-	-0,72 (irrev)		19,11	-0,16 (q-rev)
 95, 96		-0,88 (q-rev)		19,27	-0,07 (q-rev)

Tableau 3.22. *Constantes de stabilité thermodynamique et potentiels redox de quelques complexes de cuivre(II) décrits dans la littérature comparés à nos systèmes Cu**L**^{1}, Cu**L**^{2}, Cu**L**^{3} et Cu**L**^{4} (calculés à pH 11).(E_{red} = potentiel de réduction, q-rev (quasi-réversible); irrev (irréversible).*

Nos complexes acycliques de cuivre (II) se réduisent de manière quasi-réversible avec un potentiel de pic compris entre - 0,5 et - 0,07 V. Ces valeurs, en particulier celles mesurées pour $\mathbf{L^1}$ et $\mathbf{L^2}$, sont comparables à celles de la littérature pour des systèmes tels que le cyclam ou le **TE2P**.

4. Réduction des complexes de Cu(II) avec des réducteurs biologiques

Il est communément admis que la valeur du potentiel de demi vague $E_{1/2}$ doit être inferieure à -0,6 V/(Ag/AgCl) soit environ -0,4 V/ENH à pH = 7,4 pour éviter toute libération *in vivo* du cuivre 64 par réduction avec des réducteurs physiologiques présents dans l'organisme.[4,5] De nombreuses coenzymes d'oxydoréduction jouent le rôle de transporteurs d'électrons et de protons (NAD^+, FAD,…) ou uniquement d'électrons (cytochrome,…). On les rencontre dans toutes les réactions d'oxydoréduction cellulaires et dans les séquences de transports d'électrons organisés comme la respiration ou la photosynthèse. Les enzymes qui catalysent les réactions dans lesquelles sont impliquées ces coenzymes sont des déshydrogénases ou des réductases. On distingue ainsi les coenzymes nicotiniques ou pyridiniques ($NAD^+/NADH,H^+$; $NADP^+/NADPH,H^+$), les coenzymes flaviniques ($FMN/FMNH_2$; $FAD/FADH_2$), les coenzymes quinoniques ($CoQ/CoQH_2$), les métalloporphyrines et les protéines fer-soufre.

Les coenzymes nicotiniques et pyridiniques ont une répartition universelle puisque toutes les cellules en contiennent. Ils dérivent du nicotinamide ou de la vitamine PP. Les deux types les plus représentés sont le NAD^+ (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) et le $NADP^+$ (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate). Les potentiels redox $E°$ à pH 7,4 des couples $NAD^+/NADH,H^+$ et $NADP^+/NADPH,H^+$ sont de – 0,32 V/ENH soit -0,52 V/Ag/AgCl (Tableau 3.16).[1] Ce sont les coenzymes qui possèdent les potentiels les plus négatifs. Les systèmes qui ont des potentiels, $E°$ plus élevés ou très proches auront donc tendance à accepter les électrons des formes réduites $NADH,H^+$ ou $NADPH,H^+$. En comparaison avec les coenzymes nicotiniques et pyridiniques, les coenzymes flaviniques ($FAD/FADH_2$; $FMN/FMNH_2$) présentent un potentiel redox moins négatif ($E°$ = –0,29 V/ENH soit -0,5 V/Ag/AgCl). Les coenzymes flaviniques et les coenzymes quinoniques (Tableau 3.16) encore appelées coenzymes *Q*, jouent donc le rôle de transporteurs d'électrons de par leurs potentiels redox moins négatifs (+ 0,084 V pour Co*Q*).

Il existe d'autres réducteurs biologiques tels que le glutathion et l'acide ascorbique. Le glutathion SH (forme réduite) et le glutathion sous sa forme disulfure S-S (forme oxydée)

constituent les substrats de la glutathion réductase et forment un couple d'oxydoréduction très important car il permet les échanges d'électrons à l'intérieur de la cellule. Le glutathion intervient par exemple dans le maintien du potentiel redox du cytoplasme de la cellule. Il intervient aussi dans un certain nombre de réaction de détoxification et d'élimination d'espèces réactives de l'oxygène. Le couple GSSG/GSH se caractérise par un potentiel redox allant de -0,205 à -0,262 V (0,24 à pH 7).[97]

La vitamine C ou acide L-ascorbique sont des éléments nutritifs essentiels pour les êtres humains, dans lesquels ils fonctionnent comme vitamines. Pour les organismes vivants, l'ascorbate est un antioxydant et un cofacteur indispensable dans plusieurs réactions enzymatiques. Le potentiel redox du couple dehydroascorbate/ascorbate est ~ +0,054 V. [98]

Afin d'évaluer la résistance de nos complexes de cuivre(II) par rapport à la réduction du Cu(II) en Cu(I) in vitro, nous avons réalisé des titrage des complexes de cuivre(II) formé avec les ligands **L^1**, **L^2**, **L^3** et **L^4** à pH 7,4 dans du Tris-HCl avec l'acide ascorbique, le NADPH ou le glutathion qui sont des réducteurs biologiques disponibles commercialement. Nous disposons avec les complexes de Cu(II) de sondes spectroscopiques intéressantes (transfert de charge L→ Cu(II)) qui nous ont permis de suivre la stabilité de nos complexes en présence de réducteurs. Nous avons mené des titrages spectrophotométriques des complexes de Cu(II) avec les systèmes **L^1**, **L^2**, **L^3** et **L^4** par les réducteurs biologiques tels que l'acide ascorbique et le NADPH à pH 7,4.

Couple redox	Potentiel redox (V)	Concentration (µM)
O_2 / H_2O	+0,82	200-300 (O_2)
O_2 / O_2^-	-0,30	< 0,001 (O_2^-)
O_2^- / H_2O_2	+0,94	1-100 (H_2O_2)
H_2O_2 / OH^-	+0,54	Négligeable $(OH)^-$
OH^- / H_2O	+2,20	-
DHA / ASC	-0,10	10000 - 20000
GSSG / GSH	-0,24	2000 - 5000
NAD(P) / NAD(P)H	-0,32	200 - 500

Tableau 3.23. *Potentiels redox et concentrations intracellulaire de quelques couples redox.*[99,100]

Les titrages des complexes de Cu(II) avec l'acide ascorbique et le NADPH à pH 7.4 ont montré que ces complexes sont capables d'être réduits par les réducteurs biologiques qui se trouvent souvent en fortes concentrations dans l'organisme (Tableau 3.23). Le titrage de ces complexes de Cu(II) avec le glutathion na pas donné de résultats satisfaisants à cause de la formation d'un précipité au cours de la réaction. Cela peut s'expliquer par la formation de la

GSSG (forme oxydée de la GSH) qui précipite dans nos conditions expérimentales. Les divers résultats obtenus sont présentées à la Figure 3.49.

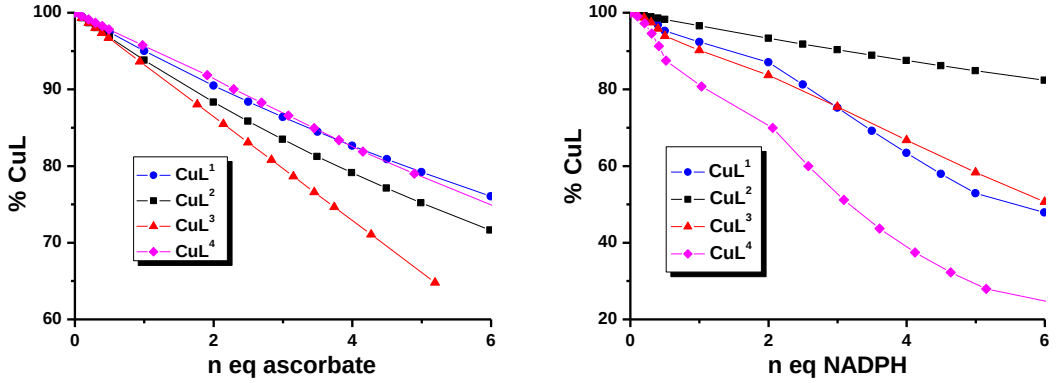


Figure 3.49. *Titrages spectrophotométriques des complexes Cu**L**^{1}, Cu**L**^{2}, Cu**L**^{3} et Cu**L**^{4} avec a) l'acide ascorbique et b) le NADPH. Solvant : Tris-HCl (5 ✕ 10^{-2}M) à pH 7,4, [Ascorbate] = [NADPH] = 5 ✕ 10^{-3}M, [Cu**L**^{1}] = [Cu**L**^{2}] = [Cu**L**^{3}] = 3 x 10^{4}M et [Cu**L**^{4}] = 3 ✕ 10^{-4}M, [Ascorbate] = [NADPH] = 5 ✕ 10^{-2}M.*

La réduction des complexes de Cu(II) avec le NADPH (E_0 = - 0,315 V/ENH à pH 7,0) est beaucoup plus facile que la réduction avec l'acide ascorbique (E_0 = + 0,054 V/ENH à pH 7,0). Le complexe Cu**L**^{4} qui est le moins stable dans notre série de complexes cuivriques se réduit le plus facilement avec le NADPH, contrairement à Cu**L**^{2} qui se réduit beaucoup plus difficilement. La séquence de stabilité vis-à-vis de la réduction par le NADPH ou l'acide ascorbique peut être établie en mesurant la concentration efficace à 80% (Tableau 3.24). Si avec le NADPH, ce sont les complexes Cu**L**^{1} ou Cu**L**^{4} qui résistent le mieux à la réduction par NADPH, l'utilisation d'acide ascorbique varie la séquence de stabilité comme suit : Cu**L**^{2} > Cu**L**^{1} > Cu**L**^{3} > Cu**L**^{4}. Les complexes Cu**L**^{1} et Cu**L**^{3} ont le même comportement avec le NADPH et on observe environ 50% de réduction pour un rapport [NADPH] / [Cu**L**] ~ 6. Le Tableau 3.24 rassemble les potentiels de réduction, E_{pc} des complexes de cuivre(II) mesurée à pH 11(systèmes quasi – réversibles) et les valeurs de IC_{80}.

Complexe de Cu(II) pH 7,4	Potentiel vs NHE	IC_{80} (NADPH)	IC_{80} (Acide ascorbique)
	$E_{1/2}$ (V)		
CuL^1	-0,5	2,62	4,70
CuL^2	-0,5	> 6	3,80
CuL^3	-0,16	2,43	2,96
CuL^4	-0,071	1,12	4,68

Tableau 3.24. *Potentiels $E_{1/2}$ des complexes de cuivre(II) mesurées à pH 7,4. Solvant : H_2O, I = 0,1M ($NaClO_4$).* IC_{80} *exprimé en équivalent de NADPH ou acide ascorbique à une concentration de Cu**L** (**L** = **L**^{1}, **L**^{2}, **L**^{3} et **L**^{4}) de 3 x 10^{-3}M.*

Une corrélation peut être observée entre le potentiel de réduction et la valeur de IC_{80}, excepté dans le cas de **L**^{4} en présence de NADPH. D'autre part, les séquences de stabilité en présence de réducteurs biologiques ne sont pas conservées d'un réducteur à l'autre, ce qui démontre la complexité des systèmes mis en jeu. Ce phénomène a déjà été observé dans le cas des complexes macrocyclique de cuivre(II).[101] Il est en effet connu qu'en présence d'oxygène, les complexes de cuivre(II) peuvent catalyser l'oxydation d'espèces tel que l'acide ascorbique et le glutathion, processus qui consomme le réducteur et affecte le profil de la réaction.[102,103]

Conclusion

Les études électrochimiques des complexes de cuivre (II) formés avec les ligands acycliques polyaminophosphonatés $\mathbf{L^1}$, $\mathbf{L^2}$, $\mathbf{L^3}$ et $\mathbf{L^4}$ nous ont permis d'obtenir des informations intéressantes. En milieu acide (pH ~ 4), nous avons pu mettre en évidence des pics de réduction qui semblent témoigner de la présence de plusieurs espèces protonées. Si le potentiel de l'un des pics de réduction varie selon le chélateur utilisé, le pic de réduction à des potentiels plus négatifs est peu sensible à la nature du ligand, ce qui témoigne très probablement de l'espèce entièrement protonée pour laquelle la sphère de coordination est commune. Pour tous les systèmes, nous observons la présence d'un pic de redissolution anodique caractéristique de la formation de Cu^0. Ces données montrent que les complexes cuivreux générés par électroréduction ne sont pas stables et se dissocie très rapidement par rapport à l'échelle de temps de nos expériences électrochimiques. D'autre part, la variation des vitesses de balayage nous indiquent, qu'excepté $Cu\mathbf{L^4}$, les processus électrochimiques ne sont pas gouvernés par la diffusion. L'ensemble de ces données confirment un mécanisme de type EC. En milieu basique, les profils électrochimiques se simplifient avec la présence d'un signal quasi-réversible. En présence des réducteurs biologiques la séquence de stabilité des complexes de Cu(II) formés avec les ligands $\mathbf{L^1}$-$\mathbf{L^4}$ n'est pas conservée et varie d'un réducteur à l'autre.

Les propriétés électrochimiques des complexes de Cu(II) formés avec cette série de ligand acyclique polyaminophosphonatés sont satisfaisantes pour des applications en imagerie médicale.

La série de ligands synthétisés $\mathbf{L^1}$, $\mathbf{L^2}$, $\mathbf{L^3}$ et $\mathbf{L^4}$ forment des monochélates monocuivriques de forte stabilité. La complexation du Cu(II) est rapide et très sélective par rapport à celles du Zn(II), du Ni(II), du Co(II) et du Ga(III). Les complexes de Cu(II) formés se caractérisent par une bonne inertie vis-à-vis de la démétalation et leurs propriétés électrochimiques sont très satisfaisantes. Touts ces résultats montrent que nos systèmes satisfont l'ensemble des pré-requis indispensables à la chélation du ^{64}Cu dans des applications en imagerie médicale et/ou en radiothérapie.

Partie expérimentale

1- Etudes des propriétés de coordination

Préparation des solutions

Toutes les solutions ont été préparées avec de l'eau permutée. Cette dernière a été préparée à partir d'eau osmosée qui a été filtrée puis purifiée grâce à un système de colonnes échangeuses d'ions anioniques et cationiques (Fisher Bioblock Scientific type R3-83002 et M3-83006) et de colonnes à base de charbon actif (Fisher Bioblock Scientific type ORC-83005). L'eau a ensuite été bouillie, puis dégazée par un flux d'argon qui passe préalablement par une cartouche (Sigma, Oxiclear) afin d'éliminer toute trace d'oxygène. Les solutions ont été préparées par pesée des échantillons au moyen d'une balance analytique (Mettler Toledo AG-245). La force ionique a été fixée à 0,1 M au moyen de perchlorate de sodium (Merck, p.a., $NaClO_4.H_2O$) et toutes les mesures ont été réalisées dans des conditions standards de température (25,0 °C). Les perchlorates de cuivre(II) ($Cu(ClO_4)_2{\cdot}6H_2O$, Fluka, purum p.a.), de zinc(II) ($Zn(ClO_4)_2{\cdot}6H_2O$, Ventron Alfa Produkte, 98,9%), de nickel(II) ($Ni(ClO_4)_2{\cdot}6H_2O$, Fluka, purum p.a.) et de cobalt(II) ($Co(ClO_4)_2{\cdot}6H_2O$, Fluka, purum p.a.) ainsi que le nitrate de gallium(III) ($Ga(NO_3)_3.xH_2O$, Alfa Aesar, Puratronic®) sont des produits commerciaux qui ont été utilisés sans autre purification supplémentaire. Le titre de solutions de métaux (~3 - 5,4 × 10^{-2} M), fraîchement préparées par dissolution dans l'eau de sels métalliques, a été déterminé au moyen de titrages colorimétriques.[104]

Titrages potentiométriques

Les titrages potentiométriques du ligand $\mathbf{L^1}$ (2,2-2,5 × 10^{-3} M), $\mathbf{L^2}$ (2,3-2,5 × 10^{-3} M), $\mathbf{L^3}$ (1,6-2,5 × 10^{-3} M), $\mathbf{L^4}$ (0,97-1,685 × 10^{-4} M) et de leurs complexes métalliques ($[M]_{tot}/[\mathbf{L}]_{tot}$ ~ 1) ont été réalisés au moyen d'un titrateur automatique Metrohm Basic Titrino 794 (Metrohm 2.794.0010) équipé d'une microélectrode de verre combinée (Metrohm 6.0234.100, Long Life) et d'une unité interchangeable à 1 mL (Metrohm 6.3026.110). L'erreur absolue sur le volume du cylindre est de 3 µL par rapport au volume nominal de 1 mL. Les titrages potentiométriques ont été réalisés grâce à la méthode MET-PH (Monotone, Equivalent Point) disponible dans le logiciel Tiamo light 1.2 (Metrohm AG Ltd, Herisau, Suisse) avec les caractéristiques suivantes : incrément 3 µL, débit maximum de la burette 2 mL/min, dérive maximale du signal 1,5 mV/min et temps d'équilibre minimum. 500 s. Pour procéder à la calibration de l'électrode, un titrage

d'une solution d'acide perchlorique (0,98-1,34 × 10^{-1} M, Fluka, 70%, $HClO_4$) par une solution d'hydroxyde de sodium (0,99 -1,27 × 10^{-1} M, BdH, AnalaR, NaOH) a été réalisé dans une cellule de titrage thermostatée à 25,0(2) °C (Lauda E200) sous un flux d'argon constant, préalablement saturé avec des vapeurs d'eau.

Le titre des solutions d'acide perchlorique a été déterminé préalablement par titrage colorimétrique avec une solution de tétraborate de sodium (Fluka, puriss p.a. > 99,5%, $B_4Na_2O_7.10H_2O$) en présence de rouge de méthyle (réactifs RAL). Les solutions d'hydroxyde de sodium (BdH, AnalaR, NaOH) ont été titrées par de l'hydrogenophthalate de potassium (Fluka, puriss, p.a., $C_8H_5KO_4$) en présence de phénolphtaléine. Le programme GLEE[20] a ensuite permis d'obtenir les paramètres de calibration d'électrode (potentiel d'électrode standard E_0/mV et pente de l'électrode mV.pH^{-1}) et de vérifier les niveaux de carbonate des solutions de soude utilisées (toujours < 5%). Les titrages potentiométriques (~ 300 points collectés sur une gamme de pH comprise entre 2,5 et 11,5) des ligands libres $\mathbf{L^1}$, $\mathbf{L^2}$, $\mathbf{L^3}$, $\mathbf{L^4}$ (V_{tot} = 4 mL, atmosphère inerte d'argon, T = 25 °C) et de leurs complexes métalliques (rapport $[M]_{tot}/[\mathbf{L}]_{tot}$ ~ 1), préparés par ajouts de volumes connus de solutions concentrées de sels métalliques ($[Cu(II)]_{tot}$ = 4,98-5,1 × 10^{-2} M, $[Zn(II)]_{tot}$ = 3,3-5,5 × 10^{-2} M, $[Ni(II)]_{tot}$ = 4,9-5,4 × 10^{-2} M, $[Co(II)]_{tot}$ = 4,6 × 10^{-2} M et $[Ga(III)]_{tot}$ = 5,37 × 10^{-2} M), ont été traités par le programme Hyperquad 2000.[20, 21]Ce programme est basé sur des méthodes d'ajustement non linéaires des moindres carrés.[105] Pour les ligands $\mathbf{L^1}$, $\mathbf{L^2}$, $\mathbf{L^3}$, et $\mathbf{L^4}$ au moins trois titrages potentiométriques ont été traités, soit séparément, soit communément, sans aucune variation significative des valeurs déterminées. Les courbes de distribution des espèces protonées et des complexes métalliques ont été calculées au moyen du programme Hyss2009.

Titrages spectrophotométriques (absorption UV-visible) en fonction du pH

Nous avons également réalisé des titrages spectrophotométriques en fonction du pH afin de caractériser les espèces protonées des ligands libres $\mathbf{L^1}$, $\mathbf{L^2}$, $\mathbf{L^3}$, $\mathbf{L^4}$ et leurs complexes cuivriques. Un volume de 40 mL d'une solution du ligand libre $\mathbf{L^1}$ (1,51 × 10^{-4} M), $\mathbf{L^2}$ (1,34 × 10^{-4} M), $\mathbf{L^3}$ (2,29 × 10^{-4} M) ou $\mathbf{L^4}$ (1,76 × 10^{-4} M), dont la concentration avait été préalablement déterminée par un titrage potentiométrique, a été placé dans un vase de titrage (Metrohm, 6.1414.150) maintenu à 25,0(2) °C au moyen d'un thermostat (Lauda E200) sous un flux d'argon constant, préalablement saturé avec des vapeurs d'eau. Après avoir fixé la valeur initiale du pH à ~ 2,5 par ajout d'acide perchlorique, le titrage (2,5 < pH < 11,81) a été réalisé par addition de volumes

connus d'hydroxyde de soude (0,1 M, NaOH, BdH, AnalaR) au moyen d'une micropipette à piston (Eppendorf). Après chaque ajout de base, un spectre d'absorption (200 nm – 800 nm) a été enregistré au moyen d'un spectrophotomètre Cary 50 (Varian) équipé d'une lampe Xénon à arc pulsé. Un système de fibres optiques (Hellma, 041.002-UV) reliées à une sonde à immersion en quartz Suprasil avec un trajet optique de 10 mm (Hellma, 661.500-QX) a permis les mesures *in situ*.

Les titrages spectrophotométriques et potentiométriques des complexes de Cu(II) formé avec $\mathbf{L^1}$, $\mathbf{L^2}$, $\mathbf{L^3}$ et $\mathbf{L^4}$ ont été réalisés dans les mêmes conditions expérimentales (2,5 < pH < 11,9) que les ligands libres mais, cette fois-ci, en présence d'environ un équivalent de Cu(II) ($[\mathbf{L^1}]_{tot}$ = 1,41 × 10^{-4} M ; $[Cu]_{tot}$ = 1,40 × 10^{-4} M ; pH = (1) 2,59 ; (2) 11,17), ($[\mathbf{L^2}]_{tot}$ = 1,39 × 10^{-4} M ; $[Cu]_{tot}$ = 1,30 × 10^{-4} M ; pH = (1) 4 ; (2) 9,5), ($[\mathbf{L^3}]_{tot}$ = $[Cu]_{tot}$ = 1,78 × 10^{-4} M ; pH = (1) 2,49 ; (2) 11,19), ($[\mathbf{L^4}]_{tot}$ = $[Cu]_{tot}$ = 1,3 × 10^{-4} M ; pH = (1) 2,67 ; (2) 9,72). Les données spectrophotométriques ont été traitées au moyen du programme Specfit.[36, 37, 38] Les constantes d'hydrolyse du Cu(II) ont été prises en compte lors du calcul des constantes de protonation des complexes de Cu(II) (log $K_{Cu(OH)+}$ = - 6,29 et log $K_{Cu(OH)2}$ = - 13,31).[73]

Nous avons également réalisé des titrages spectrophotométriques (absorption UV-visible) du ligand $\mathbf{L^1}$ (~ 1,9 × 10^{-4} M) par le Cu(II) dans des conditions fixées d'acidité (pH ~ 1 et pH ~ 2). Afin de se placer à ces valeurs de pH, les solutions de $\mathbf{L^1}$ et de Cu(II) ont été préparées dans des solutions d'acide perchlorique à 10^{-1} M et à 10^{-2} M, dont la force ionique a été ajustée à 0,1 M par du perchlorate de sodium (Merck, p.a., $NaClO_4.H_2O$). Les titrages spectrophotométriques ont été réalisés dans une cellule en quartz Suprasil (Hellma 110-QS) d'un trajet optique de 1 cm et thermostatée à 25,0(2) °C au moyen d'un thermostat (Lauda E200). Après chaque ajout de métal ($[Cu(II)]_{tot}$ = 4,4 × 10^{-3} M) au moyen d'une micropipette à piston (Multipette plus, Eppendorf), nous avons laissé le mélange s'équilibrer, puis un spectre d'absorption UV-visible a été enregistré au moyen d'un spectrophotomètre UV-visible Cary 300 (Varian) ou Cary 5000 (Agilent).

Spectrométrie de masse en mode electrospray

Une étude par spectrométrie de masse en mode electrospray a été mise en œuvre afin de caractériser les différents complexes métalliques formés avec nos ligands. Cette étude a été réalisée à l'aide d'un analyseur à trappe d'ions (Agilent Technologie 6120 quadripole LC/MS) équipé d'une source d'ions electrospray ESI. Différents volumes d'une solution de complexe ML

(M= Cu(II), Ni(II) et Zn(II), L = $\mathbf{L^1}$-$\mathbf{L^4}$) de concentrations connues de 1,8 à 5 × 10^{-4}M ont été préparées. Chacune de ces solutions a été introduite dans la source du spectromètre de masse avec un pousse-seringue (Kd Scientific) à un débit de 300µL h^{-1}. Pour aider à la nébulisation, une assistance pneumatique, du gaz N_2 chauffé à 250 °C avec un débit de 6 L/min a été utilisé. Les tensions du skimmer (V_s) et de sortie de capillaire ($V_{cap\ exit}$) ont été portées respectivement à 140 V et 170 V. Les spectres sont enregistrés en mode positif pour des rapport m/z compris entre 100 et 1000.

Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)

Les spectres RPE ont été enregistrés grâce à un spectromètre Bruker ESP300e (X-band) équipé d'un gaussmètre Bruker E035M. Toutes les mesures ont été faite à 150 K sur des solutions gelées de complexes de Cu$\mathbf{L^1}$ préparées dans un mélange EtOH/ H_2O (50/50) à une concentration de 5 × 10^{-3}M. La température est contrôlée par un module ER 4111VT. Une meilleure résolution a été obtenue à 150 K, une modulation de fréquence 8,414 G et un temps de conversion de 81,92 ms. La simulation des spectres RPE à été faite grâce au logiciel X- sophe version 1.1.4.[106]

2- Cinétique de formation et de dissociation des complexes de Cu(II)

Nous allons détailler dans le paragraphe suivant les conditions expérimentales et les méthodes de mesure appliquées à l'élucidation des mécanismes de coordination et de dissociation du cuivre(II) par les ligands $\mathbf{L^1}$, $\mathbf{L^2}$, $\mathbf{L^3}$ et $\mathbf{L^4}$ pour lesquels différentes études cinétiques ont été réalisées.

Les cinétiques de formation et de dissociation des complexes de Cu(II) sont très rapides ont par conséquent nécessité l'utilisation d'une technique de mélange rapide : La spectrophotométrie à flux stoppé (APPLIED PHOTOPHYSICS SX.18MV) dont le montage est détaillé dans la Figure 3.50. Cet appareil est adapté à l'étude de cinétiques rapides avec des temps de demi-réaction qui varient d'une dizaine de ms à quelques dizaines de minutes sous l'action de pistons pneumatiques (7-8 bars).

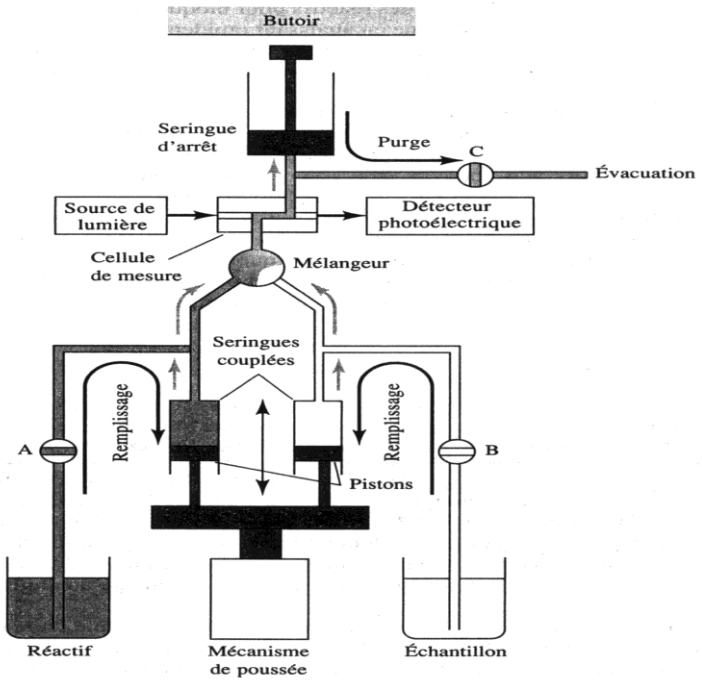


Figure 3.50. *Schéma de fonctionnement d'un spectrophotomètre à flux stoppé (APPLIED PHOTOPHYSICS SX.18MV).*

Le principe de cette technique est de mélanger très rapidement les réactifs contenus dans deux seringues d'injection (18196, M31L, 2,5mL, Kloehn, Las Vegas, USA) dans une chambre de mélange, puis le mélange est poussée à travers une cellule photométrique. La solution précédemment analysée est poussée dans une seringue d'arrêt (Gastight® 1002, HAMILTON, Bonaduz, Suisse). Le piston de cette seringue recule et se bloque contre une butée, ce qui déclenche l'acquisition. La variation de l'absorbance est ensuite suivie en fonction du temps.

L'acquisition consiste alors à mesurer la variation du signal lumineux en fonction du temps et à suivre ainsi l'évolution du mélange. Pour mesurer l'absorbance, nous utilisons un rayonnement monochromatique. Pour cela une lampe xénon (puissance de 150 Watts) émet un faisceau lumineux polychromatique comprenant des longueurs d'ondes comprises entre 250 nm et 800 nm. La lumière émise passe ensuite dans un monochromateur qui permet de sélectionner une seule longueur d'onde (précision ± 1 nm, bande passante 1 nm). Le rayonnement est transmis par une fibre optique en quartz, celui-ci traverse la cellule de mesure en quartz de trajet optique de 1 cm. Le signal lumineux résultant est ensuite converti et amplifié par un photomultiplicateur d'absorption en un signal électrique. Le signal électrique transmis par une interface à l'ordinateur

nous permet de visualiser l'évolution de l'absorbance en fonction du temps. Le temps mort de cet appareil est de l'ordre de 3 ms.[107] La régulation de la température (25°C) est réalisée au moyen d'un thermostat-cryostat (Lauda E200 / RE 220) qui assure une température constante à un bain dans lequel plongent les deux seringues d'injection. Afin de dégénérer l'ordre de la réaction par rapport aux systèmes d'études, les concentrations en Cu(II) (formation) ou en H^+ (dissociation) sont prises respectivement au minimum en excès d'un rapport de 10 par rapport à celles du ligand ou des complexes de Cu(II).

Cinétique de complexation

La cinétique de complexation du Cu(II) par les ligand $\mathbf{L^1}$, $\mathbf{L^2}$, $\mathbf{L^3}$ et $\mathbf{L^4}$ a été étudiée à ~ p[H] 2 (~10^{-2} $HClO_4$, Fluka, 70%) à une force ionique de 0,1 M ($NaClO_4.H_2O$, Merck) au moyen d'un spectrophotomètre à flux stoppé (Applied Photophysics SX.18 MV). Nous avons sélectionné les longueurs d'onde d'étude de 312 nm ($\mathbf{L^1}$), 310 nm ($\mathbf{L^2}$), 303 nm ($\mathbf{L^3}$) et 312 nm ($\mathbf{L^4}$) pour lesquelles les ligands et le Cu(II) n'absorbent pas et pour lesquelles nous mesurons un maximum d'amplitude lors de la formation des complexes Cu**L** (Figure 3.51).

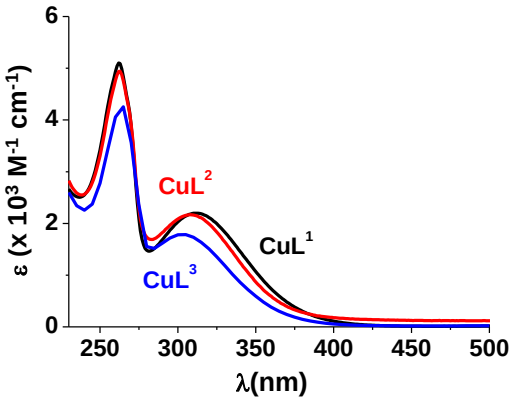


Figure 3.51. *Spectres électroniques des complexes cuivriques formés avec les ligands* $\boldsymbol{L^1}$, $\boldsymbol{L^2}$, $\boldsymbol{L^3}$ *et* $\boldsymbol{L^4}$ *à p[H] 2. Solvant :* H_2O *; I = 0,1 M (*$NaClO_4$*) ; T = (25,0 ± 0,2) °C.*

Afin de dégénérer l'ordre de la réaction par rapport au Cu(II), les concentrations en métal sont prises au minimum en excès de 10 par rapport à celles des ligands $\mathbf{L^1}$, $\mathbf{L^2}$, $\mathbf{L^3}$ et $\mathbf{L^4}$. La concentration des ligands $\mathbf{L^1}$, $\mathbf{L^2}$, $\mathbf{L^3}$ ou $\mathbf{L^4}$ a été maintenue constante ([$\mathbf{L^1}$] = 3,04 × 10^{-4} M, [$\mathbf{L^2}$] = 3,6 × 10^{-4} M, [$\mathbf{L^3}$] = 4,12 × 10^{-4} M et [$\mathbf{L^4}$] = 3,27 × 10^{-4} M). Nous avons fait varier les concentrations en Cu(II) de 3,83 × 10^{-4} M à 8 × 10^{-2} M pour $\mathbf{L^1}$, de 3,6 × 10^{-4} M à 5,04 × 10^{-2} M pour $\mathbf{L^2}$, de 4,12 × 10^{-3} M à 2,88 × 10^{-2} M pour $\mathbf{L^3}$ et de 3,27 × 10^{-3} M à 1,63 × 10^{-2} M pour $\mathbf{L^4}$.

Pour chacune des espèces, des spectres de contrôle d'absorption UV-Visible ont été enregistrés au moyen d'un spectrophotomètre Agilent Cary 5000 afin de vérifier si des informations étaient perdues au début ou en fin de réaction. Les données cinétiques ont été analysées au moyen du logiciel Biokine (le principe de fonctionnement de ce programme est fourni dans la partie Annexe) et les constantes de vitesse du pseudo-premier ordre sont le résultat d'une moyenne de trois expériences indépendantes et répétables. Ces résultats cinétiques ont, en outre, été analysés avec le logiciel ORIGIN 8.0.

Cinétique de dissociation

Les cinétiques de dissociation des complexes cuivriques Cu$\mathbf{L^1}$, Cu$\mathbf{L^2}$ et Cu$\mathbf{L^3}$ ont été étudiées par attaque du proton au moyen de solutions d'acide perchlorique. Les solutions des complexes ont tout d'abord été préparées à p[H] 10 ([NaOH] ~ 10^{-4} M) et leurs concentrations ont été maintenues constantes ([Cu$\mathbf{L^1}$]= 1,4 × 10^{-4} M, [Cu$\mathbf{L^2}$]= 1,13 × 10^{-4} M, [Cu$\mathbf{L^3}$]= 1,37 × 10^{-4} M et [Cu$\mathbf{L^4}$]= 5,08× 10^{-4} M) au cours des expériences cinétiques. Dans ces conditions d'acidité (p[H] ~ 10, les complexes cuivriques entièrement déprotonés ([Cu$\mathbf{L^1}$]$^{6-}$, [Cu$\mathbf{L^2}$]$^{2-}$ et [Cu$\mathbf{L^3}$]$^{4-}$) prédominent. La force ionique des solutions à été fixée à 0,1 M avec du perchlorate de sodium ($NaClO_4$, MERCK, p.a).

Plusieurs solutions d'acide perchlorique ($HClO_4$, FLUKA, 70%) de concentrations comprises entre 2 × 10^{-3} M et 0,96 M ont été préparées à partir d'une solution mère de concentration 0,96 M et d'une solution de sel de fond $NaClO_4$ à 0,1 M. Les cinétiques de dissociation des complexes cuivriques ont été suivies à la longueur d'onde pour laquelle l'amplitude de la bande de transfert de charge N → Cu(II) est au maximum. Comme mentionné précédemment, les constantes de vitesse de pseudo-premier ordre, calculées au moyen du logiciel Biokine, sont le résultat d'au moins trois expériences indépendantes et répétables. Les donnés cinétiques ont ensuite été analysées au moyen du logiciel ORIGIN 8.0.

3- Etudes électrochimiques

Les solutions des complexes monocuiviques formés avec les ligands $\mathbf{L^1}$, $\mathbf{L^2}$, $\mathbf{L^3}$ et $\mathbf{L^4}$ **(**[Cu$\mathbf{L^1}$]=9,94 × 10^{-4}M, [Cu$\mathbf{L^2}$]=1,091 × 10^{-3}M, [Cu$\mathbf{L^3}$]=1,096 × 10^{-3}M, [Cu$\mathbf{L^4}$]=1,063 × 10^{-3}M) ont été introduites dans un vase de titrage (10 ml). La voltamétrie à balayage cyclique (CV) et à ondes carrées de potentiel (SWV) de ces complexes de cuivre(II) a été réalisée en milieu aqueux ($NaClO_4$ 0,1M) à l'aide d'un potentiostat/galvanostat (Radiometer Analytical

MDE150/PST50). Le dispositif de mesure utilisé comprenait un système à trois électrodes: une électrode de travail tournante en carbone vitreux de 0,07 cm^2 de surface (rotation ajustable jusqu'à 1000 rpm) contrôlée par le logiciel Voltmaster 4, une contre électrode en platine et une électrode de référence (ECS) au calomel saturée Ag/AgCl (+ 205 mV/ENH)[108].

Afin de prévenir toute oxydation par l'oxygène dissous, les solutions ont été longuement dégazées à l'argon (phase de dégazage) et un flux de ce gaz a été maintenu à la surface du liquide durant les mesures (phase de léchage).

Entre chaque enregistrement d'un voltamogramme, l'électrode de travail à été poli sur des disques abrasifs de carbure de silicium (800 / 2400 meshs) en présence d'une suspension d'alumine de 0,3 µM. Les mesures ont été réalisées à température ambiante (25 ± 1°C) et à différentes vitesses de balayage. Les mesures par la méthode SWV est basé sur le même principe de voltampérométrie cyclique. Les potentiels ont été enregistrés par rapport au couple Ag/AgCl.

Bibliographie

1 Pellegatti, L.; Zhang, J.; Drahos, B.; Villette, S.; Suzenet, F.; Guillaumet, G.; Petoud, S.; Tóth, E. *Chem. Commun*, **2008**, 6591.

2 Lukes, I.; Kotek, J.; Vojtisek, P.; Hermann, P. *Coord. Chem. Rev.* **2001**, *287*,216.

3 Popov, K.; Ronkkomaki, H.; Lajunen, L. H. J. *Pure Appl. Chem*. **2001**, *73*, 1641.

4 Ichikawa, T.; Sawada, *K. Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1997**, *70*, 829.

5 Ichikawa, T.; Sawada, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1997**, *70*, 2111.

6 Zakrzewski, A.; Geisler, *J. Chem. Anal*. **1987**, *32*, 151.

7 Zakrzewski, A.; Geisler, J. Chem. Anal. **1984**, *29*, 631.

8 Burai, L.; Ren, J.; Kovacs, Z.; Bru1cher, E.; Sherry, A. D. *Inorg. Chem*. **1998**, *37*, 69.

9 Sun, X.; Wuest, M.; Kovacs, Z.; Sherry, A. D.; Motekaitis, R.; Wang, Z.; Martell, A. E.; Welch, M. J.; Anderson, C. J. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2003**, *8*, 217.

10 Perlmutter-Hayman, B. *Acc. Chem. Res.* **1986**, *19*, 90.

11 Polyanchuk, G. V.; Shkolnikova, L. M.; Rudomino,M. V.; Dyatlova, N. M.; Makarevich, S. S. *J. Struct. Chem*. **1985**, *26*, 586.

12 Guerra, K. P.; Delgado, R.; Lima, L. M. P.; Drew, M. G. B.; Félix, V. *Dalton Trans*. **2004**, 1812.

13 Kiss, T.; Farkas, E.; Kozlowski, H. *Inorg. Chim. Acta.* **1989**, *155*, 281.

14 Wozniak, M.; Nowogrocki, G. *Talanta*. **1979**, *26*, 1135.

15 Alderighi, L.; Gans, P.; Ienco, A.; Peters, D.; Sabatini, A.; Vacca, A. *Coord. Chem. Rev*. **1999**, *184*, 311.

16 Specfit, Version 1-2, Spectrum Software Associates, Chapel Hill, NC-USA, **1996**.

17 Gampp, H.; Maeder, M.; Meyer, C.J.; Zuberbühler, A.D. *Talanta*. **1985**, *32*, 1133.

18 Jardine, F.H. *Inorg. Chem. Radiochem*. **1975**, *17*, 115.

19 Hathaway, B. J. *Struct. Bonding*. **1973**, *14*, 49.

20 Cotton, F. A.; Wilkinson, G. Advanced Inorganic Chemistry, 5th ed, Wiley Interscience, John Wiley & Sons, Chicherster, **1988.**

21 Pearson, Ralph G. *J. Chem. Edu* .**1968**, *45*, 643.

22 Saravanabharathi, D.; Nethaji, M.; Samuelson, A. G. *Pro. Ind. Acad. Sci, (Chem. Sci).* **2002**, *114*, 347.

23 Karlin, K. D.; Zubieta, J. *Copper Coordination Chemistry: Biological and Inorganic Perspectives*, Adenine Press, New York, **1983**.

24 Wells, A. F. *Structural Inorganic Chemistry*, 5th Ed., Clarendon, Oxford, **1984**.

25 Hatfield, W. E.; Whyman, R. *Transition Met. Chem.* **1969**, *5*, 47-171.

26 Brill, A. S. *Transition Metals in Biochemistry*, Springer-Verlag, Berlin, **1977**.

27 Hathaway, B. J.; Billing, D. E. *Coord. Chem. Rev.* **1970**, *5*, 143.

28 Hathaway, B. J. *Essays Chem*. **1971**, *2*, 61.

29 Musinu, A.; Paschina, G.; Piccaluga, G.; Magini, M**.** *Inorg. Chem.* **1983,** *22*, 1184.

30 Hathaway, B. J.; Duggan, M.; Murphy, A.; Mullane, J.; Power C.; Walsh, A.; Walsh, B. *Coord. Chem. Rev.* **1981,** *36*, 267.

31 Hathaway, B. J. *Struct. Bonding (Berlin)*. **1984,** *57*, 55.

32 Patterson, G. S., Holm, R. H. *Bioinorg. Chem.* **1975**, *4*, 257.

33 Ferguson, J. *Prog. Inorg. Chem.***1970**, *12*, 159.

34 Bertini, I.; Gatteschi, D.;Scozzafava, A. *Coord. Chem. Rev.* **1979,** *29***,** 67.

35 Solomon, E. I.; Penfield, K. W.; Wilcox, D. E. *Struct. Bonding (Berlin).* **1983**, *53*, 1.

36 Hathaway**,** B. J. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1972**, 1196.

37 Gans, P.; Sabatini,A.; Vacca, A.: HYPERQUAD2000. Leeds, UK, and Florence, Italy (**2000**).

38 Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. *Talanta.* **1996**, *43*, 1739.

39 Connors, K. A. *J. Wiley and Sons*, New York, **1987**, *78.*

40 Duan,W.; Satoh, K.; Sawada, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn*. **2001**, *74*, 487.

41 Motekaitis, R. J.; Murase, I.; Martell, A. E. *Inorg. Nucl. Chem. Lett*. **1971**, *7*, 1103.

42 Sawada, K.; Kanda, T.; Naganuma, Y.; Suzuki, T. J. Chem. Soc. *Dalton Trans*. **1993**, 2557.

43 Kurzak, B.; Kamecka, A.; Kurzak, K.; Jezierska, J.; Kafarski, P. *Polyhedron*,**1998**, *17*,4403.

44 Pellegatti, L.; Zhang, J.;Drahos, B.; Villette, S.; Suzenet, F.; Guillaumet, G.; Petoud, S.; Toth, E. *Chem. Commun*. **2008**, 6591.

45 Polikarpov, Y. M.; Belskii, F. I.;Matveev, S. V.; Medved, T. Y.;Kabachnik, M. I. *Izv. Akad. Nauk. SSSR.* **1982**, *3*, 710.

46 Guerra, K. P.; Delgado, R.; Lima, L. M. P.; Drew, M. G. B.; Félix, V. *Dalton Trans*. **2004**, 1812.

47 Cao, D. K.; Xiao, J.; Li, Y. Z.; Clemente-Juan, J.M.; Coronado, E.; Zheng, L. M. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, 1830.

48 Alderighi, L.; Gans, P.; Ienco, A.; Peters, D., Sabatini, A.; Vacca, A. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *184*, 311.

49 Kurzak, B.; Kamecka, A.; Kurzak, K.; Jezierska J.; Kafarski, P. *Polyhedron*, **1998**,*17*, 4403.

50 (*a*) Boduszek, B.; Dyba, M.; Jezowska-Bojczuk, M.; Kiss T., Kozlowski, H.; *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1997**, *973*; (*b*) Sornosa Ten, A.; Humbert, N.; Verdejo, B.; Llinares, J.M.; Elhabiri, M.; Jezierska, J.; Soriano, C.; Kozlowski, H.; Albrecht-Gary A.M.; Garcia-Espana, E. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 8985.

51 Gajda, T.; Jansco, A.; Mikkola, S.; Lonnberg. H.; Sirges, H. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **2002**, 1757.

52 Lever, A. B. P. *Inorganic Electronic Spectroscopy*, 2nd Ed., Elsevier, Amsterdam, **1984**, 553.

53 Gampp, H.; Maeder,M.; Meyer, C. J.; Zuberbühler, A. D. *Talanta*. **1985**, *32*, 95.

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

55 Gampp, H.; Maeder, M.; Meyer, C. J.; Zuberbühler, A. D. *Talanta* . **1985**, *32*, 1133.

56 Guerra, K. P.; Delgado, R.; Lima, L. M. P.; Drew, M. G. B.; Félix, V. *Dalton Trans*. **2004**, 1812.

57 Ringbom, A.: *Les Complexes en Chimie Analytique*. Ed. Dunod, France (**1967**), 369.

58 (*a*) Lukes, I.; Kotek, J.; Vojtisek, P.; Hermann, P. *Coord. Chem. Rev*. **2001**, *287*, 216 (*b*) Geraldes, C. F. G. C.; Sherry A.D; Cacheris, W.P. *Inorg. Chem.* **1989**, *28*, 3336.

59 Abada, S.; Lecointre, A. ; Elhabiri, M. ; Charbonnière, L.J. *Dalton Trans*. **2010**, 39, 9055.

60 K.N. Raymond. Tragic consequence of acetonitrile adduct, *Chem. Eng. News*, **1983**, *61*,4

61 Alger, R. S. *Electron Paramagnetic Resonance Techniques and Applications* Intersciences, New York, **1968**.

62 Kotek, J.; Lebduskova, P.; Hermann, P.; Vander Elst, L.; Muller, R. N.; Geraldes, C. F. G. C.; Maschmeyer, T.; Luker, I.; Peters, J. A. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 5899.

63 Mato-Iglesias,M.; Valgo, E.; Platas-Iglesias, C.; Coth, E.; de Blas, A.; Rodriguez- Blas, T. *Dalton Trans*. **2006**, 5404.

64 Song, J.L.; Mao, J.G. *J. Solid State Chem.* **2005**, 178, 3514.

65 Kaden, T.; *Helv., Chim. Acta.* **1970**, *53*, 617.

66 Sornosa Ten, A.; Humbert, N.; Verdejo, B.; Linares, J. M.; Elhabiri, M.; Jezierska, J.,Soriano, C.; Kozlowski, H.; Albrecht- Gary, A. M.; Garcia-España, E. *Inorg. Chem*. **2009**, *48*, 8985.

67 Roche, T. S.; Wilkins, R. G. *J. Am. Chem. Soc*. **1974**, *96*, 5082.

68 Elias. H. *Coord. Chem. Rev*. **1999**, *187*, 37.

69 Wilkins, R.G. *Inorg. Chem*. **1964**, *3*, 520.

70 Eigen, M.; Wilkins, R. G. *Adv. Chem. Ser*.**1965**, *49*, 55.

71 Eigen, M. *Pure Appl.Chem*. **1963**, *6*, 97.

72 Fuoss, R. M., *J. Am. Chem. Soc*. **1958**, *80*, 5059.

73 Patel, R. N.; Shrivastava, R. P.; Singh, Nripendra; Kumar, Subodh; Pandeya, Krishna B. *Ind. J. Chem*. **2001**, *40A*, 361.

74 Diebler, H., Eigen, M., Ilgenfritz, G., Maab, G., Winkler, R., *Pure Appl. Chem*. **1969**, *20*, 93.

75 Swift, T. J.; Connick, R. E., *J. Chem. Phys*. **1962**, *37*, 307.

76 Bio-Logic Company: *Biokine V3.0 User's Manuel*, Ed., Bio-Logic Company, Echirolles, France (**1991**).

77 Bartnikas, T.B.; Gitlin, J.D. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*. 33602.

78 Clark, W.M. Ed. *Baltimore, MD*.**1960.**

79 Lardy, H.A. Ed. *Respiratory Enzymes,* Burgess, Minneapolis, MN.**1949**.

80 Burton, K. *Ergeb. Physiol. Biol.Chem. Exptl. Pharmakol.* **1957**, *49*, 275.

81 Pearson, R. G. *Inorg. Chim. Acta,* **1995**, *240*, 93.

82 Grujicic, D.; Pesic, B. *Electrochim. Acta*. **2002**, *47*, 2901.

83 Bucher, C.; Duval, E.; Barbe, J.M.; Verpeaux, J.N.; Amatore, C.; Guilard, R. *Acad. Sci. Paris Ser. II c*. **2000**, *3*, 211.

84 Amatore, C.; Barbe, J.M.; Bucher, C.; Duval, E.; Amatore, C.; Guilard, R. Verpeaux, J.N. *Inorg. Chim. Acta*. **2003**, *356*, 267.

85 (a) Nicholson, R.S.; Shain, I. *Anal. Chem.* **1964,** *36*, 706. (b) Bard, A.J.; Faulkner, L.R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications, 2ème édition*, Wiley & Sons, New-York, **2001**.

86 Bard A.J.; Faulkner, L.R. *Électrochimie : Principes, Méthodes, Applications*, Ed – Masson. **1983**, 791.

87 (a) Martell, A.E.; Hancock, R.D. *Metal Complexes in Aqueous Solutions*; Plenum Press: New York, **1996**. (b) Bevilacqua, A.; Gelb, R.I.; Hebard, W.B.; Zompa, L.J. *Inorg. Chem.* **1987**, *26*, 2699.

88 Bernhardt, P.V.; Bramley, R.; Engelhardt, L.M.; Harrowfield, J.M.; Hockless, D.C.R.; Korybut-Daszkiewicz, B.R.; Krausz, E.R.; Morgan, T.; Sargeson, A.M. *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 3589.

89 (a) Delgado, R.; Frausto da Silva, J.J.R. *Talanta* **1982**, *29*, 815. (b) Chaves, S.; Delgado, R.; Da silva, J.J.R.F. *Talanta* **1992**, *39*, 249. (c) Martell, A.E.; Motekaitis, R.J.; Clarke, E.T.; Delgado, R.; Sun, Y.; Ma, R. *Supramol. Chem.* **1996**, *6*, 353.

90 (a) Holland, J.P.; Barnard, P.J.; Collison, D.; Dilworth, J.R.; Edge, R.; Green, J.C.; Heslop, J.M.; McInnes, E.J.L.; Salzmann, C.G.; Thompson, A.L. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2008**, *22*, 3549. (b) Bu, X.H.; Zhang, Z.H.; An, D.L.; Chen, Y.T.; Shionoya, M.; Kimura, E. *Inorg. Chim. Acta.* **1996**, *249*, 125.

91 Smith, R.M.; Martell, A.E. *Critical Stability Contants*; Plenum Press: New York, **1989**.

92 Bleiholder, C.; Boerzel, H.; Comba, P.; Ferrari, R.; Heydt, M.; Kerscher, M.; Kuwata, S.; Laurenczy, G.; Lawrance, G.A.; Lienke, A.; Martin, B.; Merz, M.; Nuber, B.; Pritzkow, H. *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 8145.

93 Kotek, J.; Lubal, P.; Hermann, P.; Cisarova, I.; Lukes, I.; Godula, T.; Svobodova, I.; Taborsky, P.; Havel, J. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 233.

94 (a) Boswell, C.A.; Sun, X.; Niu, W.; Weisman, G.R.; Wong, E.H.; Rheingold, A.L.; Anderson, C.J. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1465. (b) Woodin, K.S.; Heroux, K.J.; Boswell, C.A.; Wong, E.H.; Weisman, G.R.; Niu, W.; Tomellini, S.A.; Anderson, C.J.; Zakharov, L.N.; Rheingold, A.L. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, *23*, 4829.

95 Woodin, K.S.; Heroux, K.J.; Boswell, C.A.; Wong, E.H.; Weisman, G.R.; Niu, W.; Tomellini, S.A.; Anderson, C.J.; Zakharov, L.N.; Rheingold, A.L. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, *23*, 4829.

96 Wong, E.H.; Weisman, G.R.; Hill, D.C.; Reed, D.P.; Rogers, M.E.; Condon, J.P.; Fagan, M.A.; Calabrese, J.C.; Lam, K.C.; Guzei, I.A.; Rheingold, A.L. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10561.

97 Aslund, F.; Berndt, K.D.; Holmgren, A. *J Biol. Chem*. **1997**, *272*, 30780.

98 Borsook, H.; Keighley. G. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1933**, *19*, 875.

99 Asada, K.; Takahashi, M. In Kyle, D.J.; Osmond, C.B.; Arntzen, C.J. *eds, Photoinhibition.* Elsevier, Amsterdam, **1987**, 227.

100 Mou, Z.; Fan, W.; Dong, X. *Cell* **2003**, *113*, 935.

101 Sowden, R.J.; Trotter, K.D.; Dunbar, L.; Craig, G.; Erdemli, O.; Spickett, C.M.; Reglinski, J. *BioMetals*. **2013**, *26*, 85.

102 Cavallini, D.; De Marco, C.; Dupre, S.; Rotilio, G. *Biochemistry and Biophysics.* **1969**, *130*, 354.

103 Jameson, R.F.; Blackburn, N. J. *J. Chem. Soc, Dalton Trans.* **1982**, *1*, 9.

104 Méthodes d'analyses complexométriques avec les titriplex®, Ed. Merck, Darmastadt.

105 Gans, P.: *Data Fitting in the Chemical Sciences*. *John Wiley & Sons*, Chichester .**1992**.

106 Griffin, M.; Muys, A.; Noble, C.; Wang, D.; Eldershaw, C.; Gates, K. E.; Burrage, K.; Hanson, G. R. *Mol. Phys. Rep.* **1999**, *26*, 60.

107 Peintler, G.; Nagy, A.; Horváth, A. K.; Körtvélyesi, T.; Nagypál, I. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, *2*, 2575.

108 Sawyer, D.T.; Sobkowiak, A.; Jr-Roberts, J.L. *Electrochemistry for Chemists*, 2nd Ed., Wiley: New York, **1995**, *192*.

Chapitre IV

Propriétés de coordination des lanthanides

La synthèse de complexes à base d'ions lanthanides demande un choix très strict des ligands qui doivent former des complexes très stables et fonctionnels en milieu aqueux afin de disposer d'outils d'analyse efficaces pour des applications en imagerie médicale : sondes fluorescentes (europium, terbium) ou des agents de contraste en l'imagerie par résonance magnétique (gadolinium).

Dans ce chapitre, nous allons étudier la complexation de quelques ions lanthanides par notre série de ligands polyaminophosphonatés **L^1 - L^4** synthétisés au cours de mon travail thèse (Figure 4.1). Pour cela, des approches potentiométriques et spectroscopiques (UV-Visible et émission) ont été utilisées pour déterminer les constantes de stabilité caractériser les complexes de lanthanides formés. Des calculs de DFT et des mesures de RMN ont été utilisés afin de déterminer la structure de ces complexes en solution. Avant de présenter les différents résultats obtenus, un rappel des propriétés des lanthanides est présenté en premier.

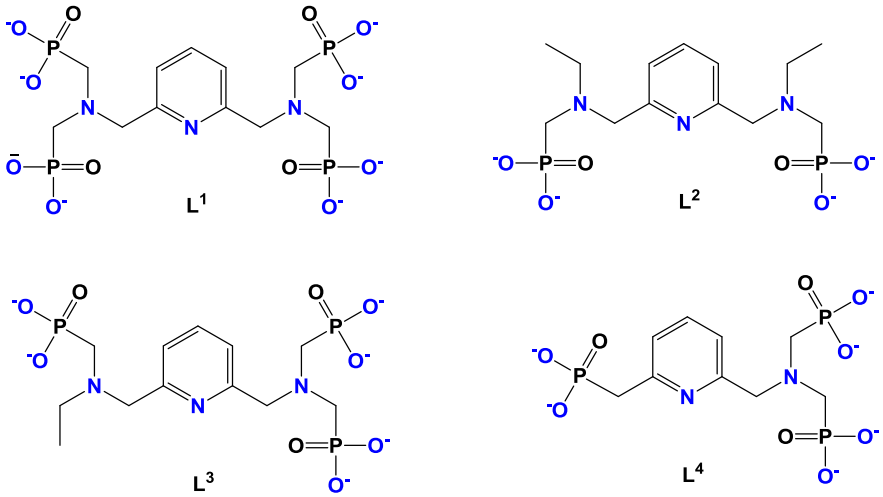


Figure 4.1. *Structures chimiques des ligands étudiés **L^1-L^4** sous leurs formes entièrement déprotonées.*

1. Généralités sur les lanthanides

La série des ions lanthanides est constituée de quinze éléments qui occupent le bloc *f* au sein de la classification périodique de Mendeleïev. Ils ont été principalement découverts au 19ème siècle.[1] Les lanthanides ainsi que les deux éléments yttrium (Z = 39) et scandium (Z = 21) sont communément appelés « terre rares » (Figure 4.2) même si certains éléments tels que le lanthane (34 ppm), le cérium (60 ppm) ou le néodyme (33 ppm) se trouvent en quantité plus abondante que le plomb (0,0063 ppm) dans la croûte terrestre principalement sous forme d'oxyde.[2]

Sc 21													
Y 39	**4f : Terres rares**												
La 57	**Ce 58**	**Pr 59**	**Nd 60**	**Pm 61**	**Sm 62**	**Eu 63**	**Gd 64**	**Tb 65**	**Dy 66**	**Ho 67**	**Er 68**	**Yb 70**	**Lu 71**

Figure 4.2: *Famille des terres rares.*

Les lanthanides sont présents sous forme de traces dans les organismes vivants et ils n'ont aucun rôle biologique. Chez l'humain, leurs concentrations moyennes varie entre 0,5 (tissus osseux) et 10,3 µg /g (foie). Dans la partie qui suit, nous allons décrire quelques propriétés des lanthanides.

1.1. Configuration électronique

La connaissance de la structure électronique d'un élément et de ses formes ioniques permet de mieux comprendre ses propriétés chimiques et physiques. La série des lanthanides aussi appelés « éléments *f* » est construite par remplissage progressif des orbitales ^{4}f. [3] Le premier élément est le lanthane (La) de configuration électronique [Xe] $6s^2 5d^1 4f^0$, le dernier est le lutécium (Lu) avec une configuration électronique [Xe] $6s^2 5d^1 4f^{14}$. Le Tableau 4.1 présente la configuration électronique de la série des lanthanides et de leurs ions trivalents.

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

Tableau 4.1 : *Configurations électroniques des lanthanides et de leurs ions trivalents.*

Dans la série des lanthanides, lorsque le numéro atomique augmente, le rayon atomique et ionique diminue. Ce phénomène est connu sous le terme de « contraction lanthanidique ». Il provient de l'augmentation de la charge nucléaire. Cette contraction n'affecte que faiblement les propriétés physico-chimiques des lanthanides le long de la série. En effet, les électrons 4*f* des lanthanides étant des électrons de cœur, l'état d'oxydation le plus stable est +III pour l'ensemble de la série et résulte de la perte d'électrons 6s et 5d. Certains lanthanides comme le cérium,[4] l'europium,[5] le terbium[6] ou le samarium,[7] présentent des états d'oxydation autre que +III à savoir +II (Eu, Sm) et +IV (Ce et Tb).

1.2. Propriétés magnétiques

Les ions lanthanides possèdent des propriétés magnétiques intéressantes qui sont dues à leurs structures électroniques. À l'exception du lanthane et du lutécium, les lanthanides dont les électrons 4*f* sont célibataires ou partiellement appariés sont fortement paramagnétiques. Avec un nombre important d'électrons non appariés (S = 7/2), le gadolinium (Gd(III)) présente le spin le plus fort dans la classification périodique. Le Gd(III) paramagnétique s'est

révélé très utile pour améliorer les contrastes en imagerie par résonance magnétique ou IRM. Le gadolinium ne peut pas être utilisé sous sa forme ionique libre Gd^{3+} à cause de sa haute toxicité. Il possède le même rayon ionique que l'ion calcium Ca^{2+}, l'élément le plus important dans l'équilibre de l'organisme, lequel serait perturbé par injection de Gd^{3+}. Pour masquer la toxicité de cet élément, il est nécessaire de l'incorporer dans des ligands appartenant généralement à deux grandes familles : les polyaminocarboxylates linéaires et macrocycliques. On obtient ainsi des chélates de gadolinium, appelés agent de contraste (Figure 4. 3).[8]

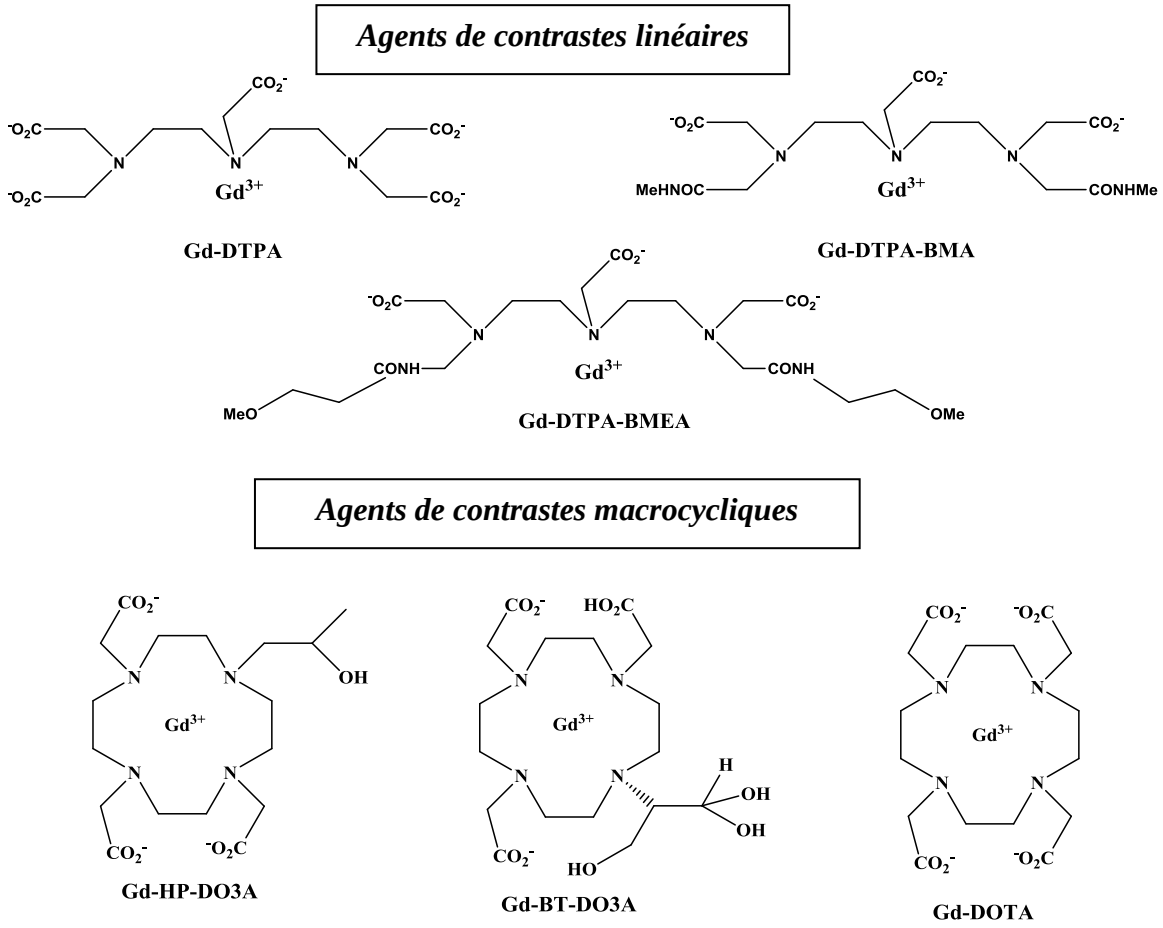


Figure 4. 3. *Différents types de chélates de gadolinium utilisés comme agents de contraste commercialisés depuis les années 1980.*[8]

1.3. Propriétés spectroscopiques

La luminescence est une autre propriété principale de ces ions lanthanides à l'exception du lanthane et du lutécium (de configurations respectives $4f^{0}$ et $4f^{14}$). Le prométhium est fluorescent mais il ne possède pas d'isotope stable, ce qui rend sa caractérisation spectroscopique difficile. La luminescence des lanthanides résulte de transitions électroniques internes *f* - *f* qui sont théoriquement interdite par la règle de sélection de Laporte (ou règle de

parité).[9] Cette règle interdit les transitions conduisant à la redistribution d'électrons entre des orbitales ayant les mêmes propriétés de symétrie par rapport à un centre d'inversion. En outre, l'intensité d'émission est inversement proportionnelle à la différence d'énergie entre le niveau excité le plus bas de l'ion Ln(III) et son état fondamental (Figure 4.4). Plus la différence entre ces deux niveaux est faible, plus l'état excité subit des désactivations non radiatives.

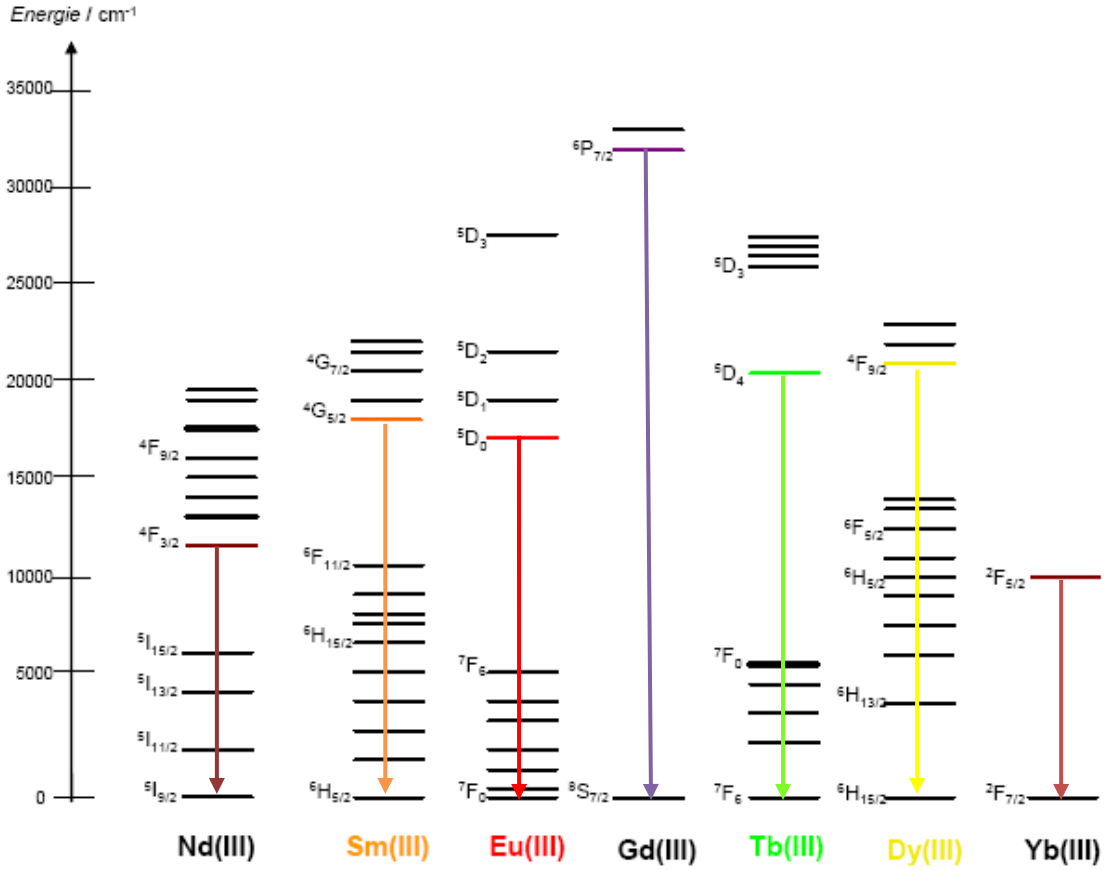


Figure 4.4 : *Diagramme partiel d'énergie pour les ions Ln(III) en solution aqueuse : principaux niveaux luminescents (en couleur) et leurs niveaux fondamentaux.*[10]

Le Tb(III) et l'Eu(III) sont les deux ions les plus intéressants dans cette série du fait de leurs temps de vie longs (de quelques microsecondes à quelques millisecondes) et leurs rendements quantiques de luminescence qui peuvent être exceptionnellement élevés. Ils sont les plus utilisés pour leurs applications comme sondes luminescentes pour l'analyse et le diagnostic biomédical.

L'émission des cations lanthanides luminescents apparait sous la forme de bandes d'émission étroites (Figure 4.5) à des énergies spécifiques qui ne sont pas influencées par les conditions expérimentales, ce qui permet la discrimination spectrale entre le signal du

composé de lanthanide des autres signaux de fluorescence non-désirés comme la fluorescence intrinsèque des milieux biologiques.

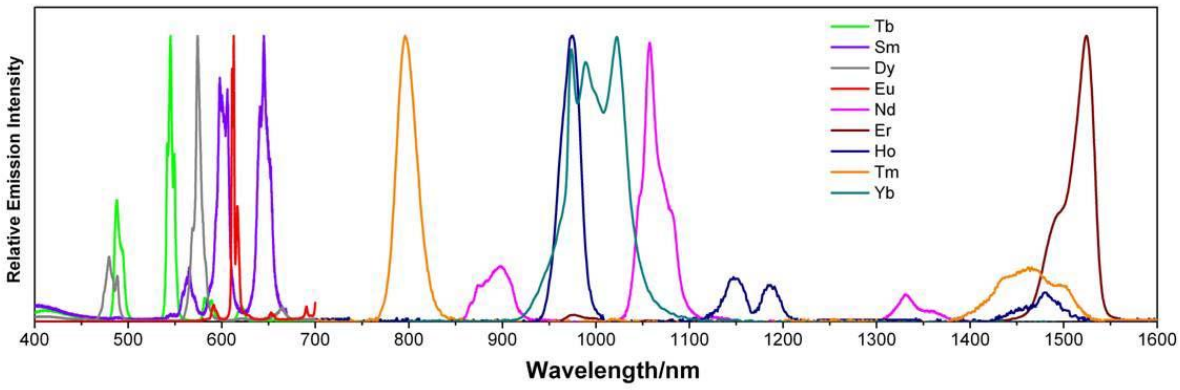
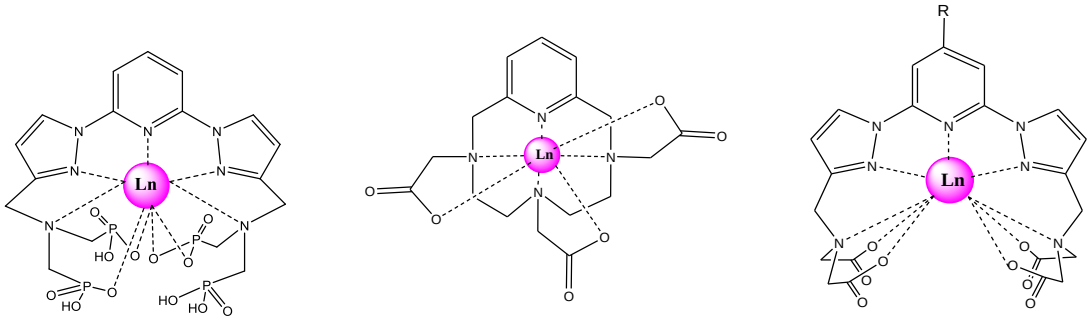


Figure 4.5. *Spectres d'émission des principaux ions lanthanide en solution émettant dans le visible et dans l'infrarouge proche.* [11, 12]

2. Chimie de coordination des lanthanides

Les électrons de valence 4*f* sont peu sensibles à leur environnement chimique. L'interaction métal-ligand dans les complexes de Ln(III) est donc décrite par un modèle purement ionique et les niveaux d'énergie dans les complexes de lanthanides (III) sont très proches de ceux de l'ion libre. De ce fait, les propriétés spectroscopiques et magnétiques sont très peu influencées par le ligand organique coordiné au Ln(III).

Selon la classification de Pearson, les ions lanthanides sont des acides durs.[13,14] Ils ont une grande affinité pour les ligands à atomes donneurs durs (O, halogène). Pour pouvoir former un complexe stable, il faut choisir un ligand qui sera capable de déplacer les molécules d'eau fortement liées à l'ion Ln (III). Les ligands de type carboxylate ou phosphonate ont montré une forte affinité avec ces ions trivalents (Figure 4.6).[15,16,17] La forte acidité au sens de Lewis des ions Ln(III) conduit également à l'activation des molécules d'eau coordinées au centre métallique, donnant lieu à la formation, à pH basique, d'hydroxocomplexes insolubles $Ln(OH)_3$.



R = H, OMe, pH, $CONH_2$, CN

Figure 4.6. *Exemples de complexes de lanthanides luminescents avec des ligands de type polyaminocarboxylate et polyaminophosphonate.*[15-17]

Les complexes de lanthanides présentent des nombres de coordination compris entre 6 et 12 à l'état solide et entre 8 ou 10 en solution. La formation des complexes de lanthanides, leurs géométries de coordination ainsi que leurs réactivités sont influencées par la variation du rayon ionique qui est lui-même gouverné par le phénomène de contraction lanthanidique.[18] Très souvent, on observe une décroissance du nombre de coordination avec le rayon ionique. En solution, le nombre de coordination de l'ion *aqua* $[Ln(H_2O)_n]^{3+}$ varie de 9 en début de série (Ln = La – Nd) à 8 en fin de série (Ln = Tb – Lu) et un équilibre entre des nombres de coordinations de 8 et 9 est observé pour Ln = Nd – Tb.[19]

Par ailleurs, le rayon ionique dépend aussi du nombre de coordination et augmente de 0,3 Å lorsque l'on passe d'une coordination de 6 à 12 (Tableau 4.2).[20]

Lanthanides	CN=6	CN=7	CN=8	CN=9	CN=10	CN=12
La	1,032	1,100	1,160	1,216	1,27	1,360
Ce	1,010	1,070	1,143	1,196	1,25	1,340
Pr	0,990		1,126	1,179		
Nd	0,983		1,109	1,163		1,270
Sm	0,958	1,202	1,079	1,132		1,240
Eu	0,947	1,010	1,066	1,120		
Gd	0,938	1,000	1,053	1,107		
Tb	0,923	0,980	1,040	1,095		
Dy	0,912	0,970	1,027	1,083		
Ho	0,901		1,015	1,072	1,120	
Er	0,890	0,945	1,004	1,062		
Tm	0,880		0,994	1,052		
Yb	0,868	0,925	0,985	1,042		
Lu	0,861		0,977	1,032		

Tableau 4.2. *Rayons ioniques des ions lanthanides(III) en fonction du nombre de coordination.*[18]

3. Luminescence des lanthanides

Comme les transitions *f-f* sont interdites par les règles de Laporte, les cations lanthanides (III) ont des coefficients d'extinction molaire extrêmement faibles (inférieurs à 3 M^{-1}.cm-1).[21] Il est donc crucial de passer outre cette limitation en sensibilisant les cations lanthanides au moyen de ligands possédant un système π et des coefficients d'extinction molaire élevés : c'est l'effet d'antenne (Figure 4.7).[22, 23]

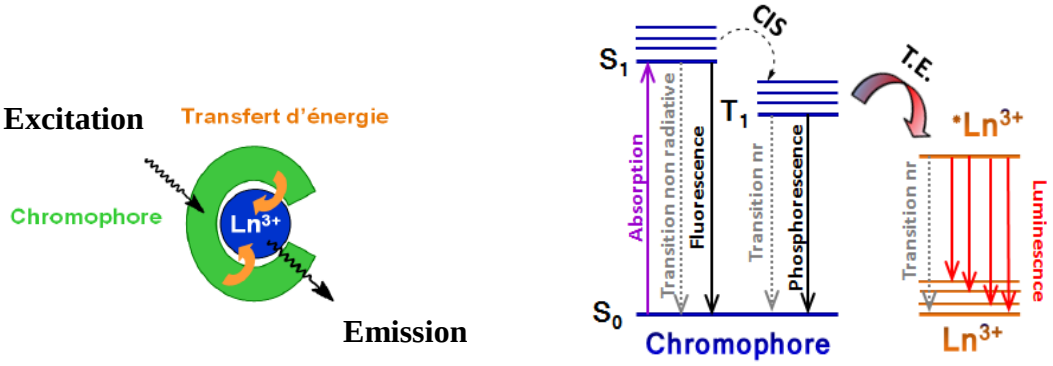


Figure 4.7. *Principe de l'effet d'antenne et diagramme de Jablonski.*[22, 23]
CIS : croisement intersystèmes, T.E. transfert d'énergie.

L'effet d'antenne met généralement en jeu l'état triplet du ligand; il se déroule en plusieurs étapes illustrées sur la Figure 7 par le diagramme de Jablonski. Dans un premier temps, le chromophore organique absorbe les photons et passe de son état fondamental singulet S_0 à son état excité singulet S_1. Par un processus de croisement inter-système favorisé par l'effet d'atome lourd dû au lanthanide, le ligand passe de l'état singulet S_1 à l'état triplet T_1 puis transfert de l'énergie au lanthanide. Les états excités du lanthanide sont ensuite relaxés en partie par un processus radiatif, conduisant à l'émission d'une lumière caractéristique.

Dans le cas d'une différence d'énergie entre les niveaux des états triplet du ligand et du premier niveau excité de l'ion lanthanide(III) trop faible (< 1850 cm^{-1})[24], un transfert en retour (back transfert) vers l'état triplet peut être observé. Dans le cas contraire ou la différence d'énergie serait trop grande (< 5000 cm^{-1})[25], un phénomène de phosphorescence peut avoir lieu qui défavorise le transfert d'énergie par rapport à la luminescence du ligand.

3.1. Paramètres de luminescence

Le processus de luminescence est caractérisé par des paramètres importants tels que le temps de vie de l'état excité et le rendement quantique de luminescence.

3.1.1. Temps de vie de l'état excité τ et nombre d'hydratation q

Le temps de vie de l'état excité est le temps nécessaire pour que l'intensité lumineuse décroisse de 1/e fois sa valeur initiale. Le retour à l'état fondamental se traduit par émission de lumière. L'intensité de luminescence au cours du temps suit une décroissance exponentielle selon l'équation (1).

$$I_{em}(t) = I_0\ e^{-\frac{t}{\tau}} \qquad \text{au temps } \tau \text{ avec } I(\tau) = \frac{I_0}{e} \qquad (1)$$

ou τ : temps de vie de l'état excité

I(t) : intensité de luminescence au temps t

En solution aqueuse, une désactivation de la luminescence des ions lanthanides peut être observée. Cette désactivation est générée par une interaction avec les oscillateurs de type X–H (X = C, N, O …), comme les oscillateurs O–H des molécules d'eau qui peuvent coordiner directement à l'ion lanthanide. La détermination du nombre de molécules d'eau en première sphère de coordination est très importante pour déterminer la capacité du ligand à protéger le lanthanide de son environnement. Les oscillateurs O–H présents dans les molécules d'eau

conduisent à une désexcitation non radiative et provoque un dépeuplement de l'état excité des lanthanides.[19]

La désactivation vibrationnelle est beaucoup moins efficace lorsque les oxillateurs O–H sont remplacés par des oscillateurs O–D.[26] Le nombre d'hydratation q correspond au nombre de molécule d'eau dans la première sphère de coordination et peut être calculé grâce à la formule (2) développée par Horrocks et Sundnick.[27]

$$q = A\left(\frac{1}{\tau_{H_2O}} - \frac{1}{\tau_{D_2O}}\right) \quad (2)$$

La valeur de A dans cette équation correspond à la sensibilité des lanthanides à être désactivé par des oscillateurs O–H en tenant compte de l'ensemble de molécules d'eau coordinées soit en première soit en seconde sphère de coordination.

L'étude menée par Parker et ses collaborateurs a permis de faire une distinction entre la contribution des oscillateurs en première sphère de coordination (A) et celle des oscillateurs en seconde sphère de coordination (B). L'équation (2) est améliorée pour donner l'équation (3).[28]

$$q = A\left(\frac{1}{\tau_{H_2O}} - \frac{1}{\tau_{D_2O}} - B\right) \quad (3)$$

Le Tableau 4.3 donne les valeurs de A et B données dans la littérature pour les complexes d'europium et de terbium.

Auteurs	**Eu**		**Tb**	
	A	***B***	***A***	***B***
Horrocks et Sundnick[25]	0,105	-	4,2	-
Parker et al[26]	1,2	0,25	5	0,06
Horrocks et Supkowski[29]	1,11	0,31	-	-

Tableau 4.3. *Valeurs de A et B dans le cas des complexes d'europium et de terbium*

Les valeurs de A et B que nous utiliserons dans le calcul de nombre d'hydratation q pour les complexes d'europium et de terbium formés avec nos ligands $\mathbf{L^1}$ - $\mathbf{L^4}$ seront celles déterminées par Parker et ses collaborateurs.

3.1.2. Rendement quantique de luminescence Φ

L'efficacité d'un processus luminescent est donnée par son rendement quantique Φ. Il est défini comme le rapport du nombre de photons émis au nombre de photons

absorbés. Il est fortement influencé par la position énergétique des niveaux excités et est d'autant plus important que les désexcitations non radiatives sont minimisées. La technique généralement utilisée pour calculer le rendement quantique est basée sur une méthode comparative. Elle consiste à comparer les spectres d'émission des composés étudiés (x) aux spectres d'émission de composés de référence (r), dont les rendements quantiques Φ_r sont connus.[30] Dans la mesure du possible, les spectres d'émission des composés de référence doivent couvrir le même domaine spectral que les composés étudiés.

Pour le calcul des rendements quantiques de luminescence des complexes d'europium, la référence généralement utilisée est le complexe ruthénium trisbipyridine chlorure (Φ = 4 % dans H_2O pour λ_{ex} = 450 nm),[31] tandis que celle utilisée pour les complexes de terbium est la Rhodamine 6G (Φ = 76 % dans H_2O pour λ_{ex} = 488 nm).[32]

Les rendements quantiques des composés de référence et des échantillions sont reliés par la formule suivante :

$$\frac{\Phi_x}{\Phi_r} = \frac{n_x^2}{n_r^2} \times \frac{s_x}{s_r} \times \frac{1-10^{A_r}}{1-10^{A_x}} \times \frac{I_{\lambda_x}^0}{I_{\lambda_r}^0} \quad (4)$$

Avec n : Indice de réfraction du solvant utilisé
s : Intégrale des spectres d'émission
A : Absorbance des composés étudiés
I_λ : Intensité du faisceau incident à la longueur d'excitation

Quand la référence et l'échantillon sont en solution dans le même solvant, le rapport n_x^2/n_r^2 peut être supprimé. Les mesures sont faites avec des solutions suffisamment diluées (A ≤ 0,05) et les spectres sont mesurés dans les mêmes conditions d'excitation et d'émission et de solvant. L'équation (4) peut être simplifiée comme suit :

$$\frac{\Phi_x}{\Phi_r} = \frac{s_x}{s_r} \times \frac{A_r}{A_x} \quad (5)$$

L'erreur absolue de cette méthode est estimée à ± 15%.[33]

4. Propriétés physicochimiques des complexes d'europium et de terbium

Notre série de ligands **L^1- L^4** basée sur un chromophore pyridinique substitué par des bras méthylaminophosphonates a prouvé son efficacité pour la complexation du cuivre(II) indiquant ainsi un intérêt potentiel pour la coordination de cations lanthanides.

Afin de déterminer les constantes de stabilité des complexes de lanthanides formés avec nos ligands **L^1-L^4**, nous avons réalisé des titrages potentiometriques, spectrophotométriques et

fluorométriques des complexes de lanthanides ainsi que des calculs DFT et des mesures de spectres RMN pour déterminer la géométrie de coordination des complexes formés.

4.1. Titrages potentiométriques

Les constantes de stabilité thermodynamique des complexes de quelques cations lanthanides (La, Nd, Eu, Tb, Er et Lu) représentatifs de la série des terres rares ont été déterminées par potentiométrie. Nous avons procédé de la même façon que pour celle utilisé pour la détermination des constantes de stabilité des complexes de cuivre(II). Des solutions aqueuses équimolaires de ligand et de métal ($Ln(ClO_4)_3$) de concentrations connues et de force ionique constante (I = 0,1 M ($NaClO_4$)) ont été titrées. La Figure 4.8 représente un titrage potentiométrique du complexe de lanthane(III) formé avec le ligand $\mathbf{L^1}$ tetraphosphonaté.

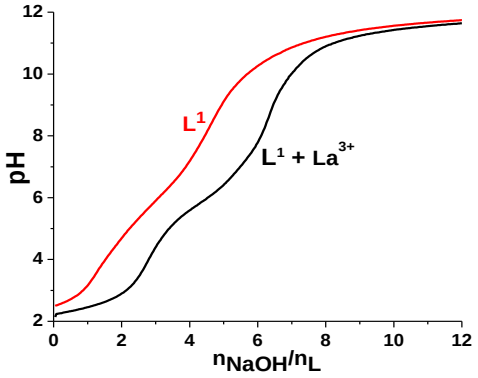


Figure 4.8. *Titrage potentiométrique du complexe* $\boldsymbol{L^1}$*La. Solvant :* H_2O*; T = (25,0 ± 0,2) °C ; I = 0,1 M (*$NaClO_4$*);* $[\boldsymbol{L^1}] = 2{,}5 \times 10^{-3}$ $[La^{3+}] = 4{,}84 \times 10^{-2}$ *M.*

Malgré la précipitation de certains des complexes des lanthanides les plus lourds à pH acide (pH < 6 - 6,5), nous avons réussi à déterminer les constantes de stabilité des complexes formés grâce au logiciel Hyperquad 2000[34] en utilisant les constantes de protonation des ligands libres présentées précédemment (Tableau 2.1). Les constantes de stabilité des complexes de lanthanides formés avec le ligand $\mathbf{L^4}$ n'ont pas pu être déterminées à cause de la formation de précipités dans une large gamme de pH. Les constantes de stabilité calculées sont regroupées dans le Tableau 4.4.

	La	Nd	Eu	Gd	Tb	Er	Lu
$\log K_{\mathbf{ML1}}$	25,5(4)	27,1(3)	25,7(3)	*d*	29,7(6)	29,7(1)	29,3(4)
$\log K_{\mathbf{ML1}\mathrm{H}}$	9,4(4)	8,8(3)	9,4(3)	*d*	7,6(7)	7,8(1)	7,4(6)
$\log K_{\mathbf{ML1}\mathrm{H2}}$	7,3(6)	6,6(4)	7,5(4)	*d*	*d*	*d*	*e*
$\log K_{\mathbf{ML2}}$	9,33(3)	9,16(3)	*d*	10,17(2)	*d*	9,89(4)	*e*
$\log K_{\mathbf{ML2}\mathrm{H}}$	9,66(3)	9,46(4)	*d*	9,21(3)	*d*	9,14(5)	*e*
$\log K_{\mathbf{ML2}\mathrm{H2}}$	7,91(4)	7,97(5)	*d*	7,53(3)	*d*	7,9(6)	*e*
$\log K_{\mathbf{ML2}\mathrm{H3}}$	4,65(5)	*d*	*d*	*d*	*d*	3,85(6)	*e*
$\log K_{\mathbf{ML3}}$	15,76(1)	10,67(3)	*d*	13,90(3)	*d*	12,14(2)	*e*
$\log K_{\mathbf{ML3}\mathrm{H}}$	7,98(2)	8,15(4)	*d*	7,31(4)	*d*	6,92(4)	*e*
$\log K_{\mathbf{ML3}\mathrm{H2}}$	7,67(2)	7,56(4)	*d*	7,39(5)	*d*	7,95(5)	*e*
$\log K_{\mathbf{M3}\mathrm{H2}}$	4,98(3)	6,76(5)	*d*	6,07(5)	*d*	6,25(5)	*e*
$\log K_{\mathrm{M(OH)}}$	-8,83	-8,20	-7,78	-7,85	-7,66	-7,54	-7,29
$\mathrm{pLn}_{\mathbf{L1}}$	21.2	22,1	21,5	*d*	23,6	23,7	23,1
$\mathrm{pLn}_{\mathbf{L2}}$	7,77	7,10	*d*	7,89	*d*	7,45	*e*
$\mathrm{pLn}_{\mathbf{L3}}$	11,07	6,56	*d*	8,56	*d*	6,92	*e*
$\mathrm{pLn}_{\mathbf{DOTA}}$[35]	17,8	17,8	18,4	19,6	19,6	19,6	20,3
$\mathrm{pLn}_{\mathbf{DOTP}}$[36]	21,5	21,2	21,5	22,5	22,6	24,3	24,3

Tableau 4.4 : *Constantes de formation et de protonation des complexes de lanthanides formés avec les ligands* ***L*^{1}**, ***L*^{2}**, ***L*^{3}** *et valeurs de pLn comparées à celles du* ***DOTA*** *et* ***DOTP*** *déjà décrits dans la littérature.* ^{d}*non déterminé.* ^{e}*précipitation.*

Plusieurs informations peuvent être déduites de ce tableau de valeurs. Les complexes formés avec le ligand $\mathbf{L^1}$ qui contient quatre groupements phosphonates se caractérisent par de fortes stabilités comparées à celles des autres ligands $\mathbf{L^2}$- $\mathbf{L^3}$ qui posséde une ou deux unités phosphonates de moins, ce qui peut expliquer ces faibles valeurs de pM (pM = -log$[\mathrm{M}]_{\mathrm{libre}}$ avec $[\mathrm{L}]_{\mathrm{tot}} = 10^{-5}$ et $[\mathrm{M}]_{\mathrm{tot}} = 10^{-6}$M à pH 7) mesurées pour les ligands $\mathbf{L^2}$ et $\mathbf{L^3}$.[37] La série présente, en outre, très peu d'évolution au niveau des valeurs des constantes de stabilité des complexes. Les phosphonates étant des anions durs, dans la théorie HSAB (Hard Soft Acid Base), ils présentent une affinité maximale pour les cations les plus durs de la série, à savoir le lutécium(III).

Le remplacement des groupements carboxylates par des groupements phosphonates a conduit à une forte stabilisation des complexes de lanthanides(III). En effet, les valeurs de log *K* déterminées pour les complexes Eu$\mathbf{L^1}$ et Tb$\mathbf{L^1}$ sont plus élevées (différence de 7 et 11 ordres de grandeur; respectivement) comparées à la constante de stabilité du complexe de

Gd(II) formé avec le ligand $\mathbf{L^G}$ (analogue de $\mathbf{L^1}$) qui ne contient que des groupements carboxylates à la place des groupements phosphonates ($\log K_{\mathrm{Gd}\mathbf{LG}}$ = 18,6, pM= 17,5).[38]

Nos données potentiométriques ont montré la formation d'espèces mono et diprotonées des complexes de Ln(III) formés avec le ligand $\mathbf{L^1}$ (Tableau 4.4). A pH 7,4, l'abondance des espèces non protonée, mono- et diprotonées est respectivement de 0,4, 44,1 et 55,5% avec $[\mathbf{L^1}] = [Eu^{3+}] = 10^{-3}$ M (Figure 4.9).

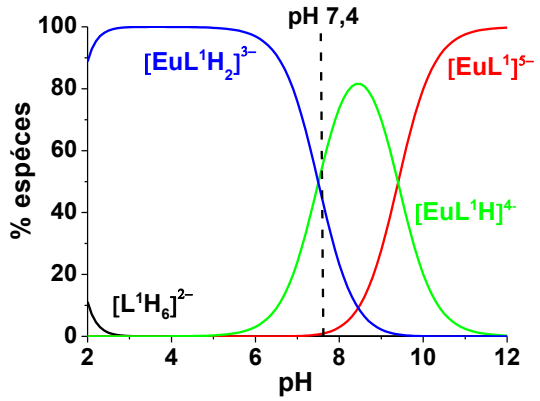


Figure 4.9. *Courbes de distribution des espèces protonées des complexes d'Eu(III) formés avec le ligand* $\boldsymbol{L^1}$*. Solvant :* H_2O*; T = 25,0 °C ; I = 0,1 M (*$NaClO_4$*),* $[\boldsymbol{L^1}] = [Eu^{3+}] = 10^{-3}$*M.*

La précipitation systématique des complexes à pH faiblement acide < (6 - 6,5), ne nous a pas permis de mener à bien cette étude potentiométrique, et les constantes de stabilité n'ont souvent pas été déterminées avec des erreurs satisfaisantes. Ce phénomène est caractéristique de plusieurs complexes de Ln(III) de type linéaire polyaminophosphonaté et indique que certains complexes de Ln(III) protonés ont une faible solubilité dans l'eau à des concentrations proche de 10^{-3} M.[39] Du fait de ce problème de solubilité, nous nous sommes donc intéressés à une méthode alternative qui est la compétition d'échange avec le Cu(II) à pH 2 sondée par spectrophotométrie d'absorption UV-visible.

L'ajout d'un métal (Ln(III)) compétiteur à une solution du complexe de Cu$\mathbf{L^1}$ va conduire à un nouvel équilibre qui correspond à la formation d'un complexe de Ln$\mathbf{L^1}$:

$$\mathrm{Cu}\mathbf{L^1} + \mathrm{Ln} \leftrightarrow \mathrm{Ln}\mathbf{L^1} + \mathrm{Cu}$$

Les constantes de stabilité conditionnelles $K^*_{\mathrm{Ln}\mathbf{L1}}$ mesurées à pH 2 par cette méthode (($\log K^*_{\mathrm{M}\mathbf{L1}}$ = 3,8(1) (La); 4,0(1) (Nd); 4,1(5) (Eu); 4,4(1) (Tb) and 4,42(7) (Er)) le long de la série des lanthanides sont caractéristiques de chélates qui forment des complexes de stabilité croissante lorsque l'ion ionique de l'ion lanthanide diminue. En effet, des interactions électrostatiques entre un même ligand et des ions de densité électronique croissante stabilisent les complexes correspondants.

D'autre part, notons que la substitution de groupements acétates (ligand $\mathbf{L^G}$) par des groupements phosphonates conduit a des complexes de Ln(III) plus stables du fait de la basicité plus élevée des chélateurs phosphonatés ($\log\beta_{L1H4}$ = 36,03 pour $\mathbf{L^1}$ et $\log\beta_{LGH4}$ = 22,66 pour $\mathbf{L^G}$, analogue de $\mathbf{L^1}$). Les complexes de lanthanides formés avec le ligand $\mathbf{L^1}$ ont une stabilité supérieure à ceux formés avec le **DOTA** (ligand aminocarboxylate) et comparables à ceux formés avec l'analogue du **DOTA**, le **DOTP** (ligand aminophosphonate).

4.2. Propriétés spectroscopiques des complexes d'Eu(III) et de Tb(III)

Les propriétés spectroscopiques des complexes d'europium(III) et de terbium(III) ont été déterminées en solution aqueuse tamponnée (tampon Tris/HCl à 0,01 M à pH = 7,0). La formation de ces complexes a été suivie par des titrages spectrophotométrique des ligands $\mathbf{L^1}$-$\mathbf{L^4}$ en mesurant les variations de leurs spectres d'absorption UV-visible et d'émission lors de l'addition de quantités croissantes de chlorure d'europium(III) $EuCl_3 \cdot 6H_2O$ ou de chlorure de terbium(III) $TbCl_3.6H_2O$.

4.2.1. Titrage en absorption UV- visible du ligand L^1par l'Eu^{3+} et le Tb^{3+}

Deux titrages spectrophotometriques ont été réalisés dans une gamme spectrale comprise entre 200 et 400 nm. Un titrage du ligand $\mathbf{L^1}$ par Eu(III), puis un titrage du $\mathbf{L^1}$ avec par le Tb(III) ont été successivement réalisés avec un nombre d'équivalent qui varient de 0 à 6 pour le métal. La Figure 4.10 présente les variations spectrales obtenues lors du titrage du ligand $\mathbf{L^1}$ par Eu(III).

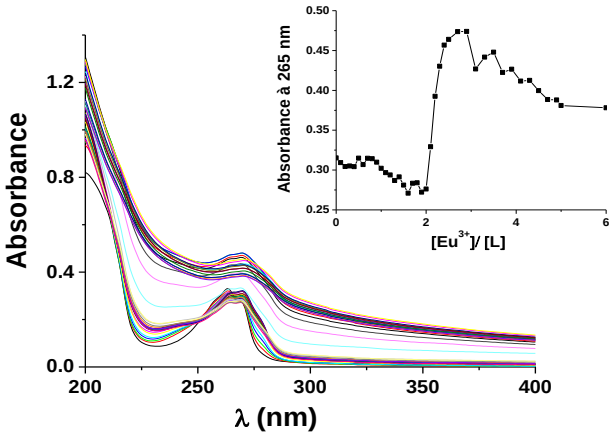


Figure 4.10. *Titrage spectrophotométrique du ligand L^1 par l'europium(III). Solvant : Tris/HCl à 0,01 M à pH = 7,0. [L^1] = 8,54×10^{-5} M, [Eu^{3+}] = 8.19×10^{-4} M.*

La pyridine, qui constitue le principal chromophore de ce système, possède une bande d'absorption centrée vers 265 nm correspondant aux transitions π-π^*. Un tracé de la variation de la densité optique à 265 nm en fonction du rapport métal/ligand (Figure 4.10) montre plusieurs variations spectrales qui suggèrent l'existence de plusieurs espèces métalliques. De 0 à 2 équivalents d'europium(III) une diminution de l'absorbance est d'abord observée, ensuite, entre 2 et 3 équivalents, une forte augmentation de l'absorbance à lieu, ce qui témoigne de la formation d'une nouvelle espèce. Cette variation brusque au delà de 2 équivalents peut être reliée à une dérive continue de la ligne de base qui peut être attribué à la formation d'espèces polynucléaires ou d'agrégats qui diffuse la lumière au sein de l'échantillon. Au delà de 3 équivalents, on observe une diminution de l'absorbance qui pourrait provenir d'une sédimentation des agrégats. Des similitudes sont observées entre les titrages du ligand $\mathbf{L^1}$ par l'europium(III) et par le terbium(III) qui confirment la formation de plusieurs espèces supramoléculaires.

4.2.2. Titrage en émission du ligand L^1 par l'Eu^{3+} et le Tb^{3+}

Les mêmes titrages UV-visible du ligand $\mathbf{L^1}$ par une solution d'Eu(III) ou de Tb(III) ont été réalisés par spectroscopie de fluorescence. Les échantillons ont tous été excités à 275 nm, longueur d'onde maximale d'absorption des complexes d'Eu(III) et de Tb(III). La Figure 4.11 présente les variations de l'intensité d'émission à 620 nm lors du titrage du ligand $\mathbf{L^1}$ par Eu(III). Les spectres d'émission des complexes d'Eu(III) ont été mesurés entre 550 et 750 nm.

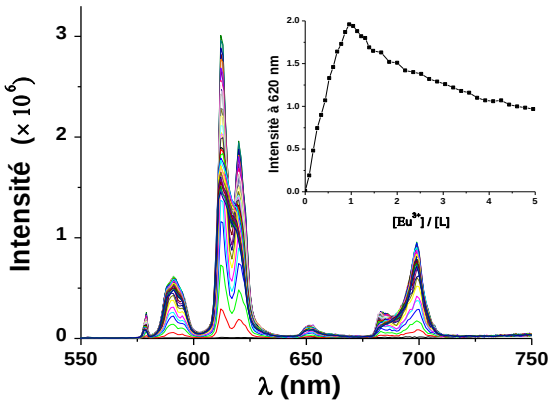


Figure 4.11. *Titrage par emission de fluorescence du ligand $\mathbf{L^1}$ par l'europium. Solvant :* Tris/HCl à 0,01 M à pH = 7,0. *$[\mathbf{L^1}] = 8{,}54 \times 10^{-5}$ M, $[Eu^{3+}] = 8{,}19 \times 10^{-4}$ M. $\lambda_{excitation} = 275$ nm.*

Le tracé de l'intensité d'émission à 620 nm en fonction du nombre d'équivalents d'europium(III) ajoutés, nous a permis d'observer tout d'abord une augmentation de

l'intensité d'émission jusqu'à un rapport [Eu(III)]/[$\mathbf{L^1}$] ~ 1 qui pouvait être en accord avec le la formation d'un complexe de stœchiométrie 1:1 (ML ou M= Eu). Au-delà de ce rapport 1, l'ajout supplémentaire du métal entraine une diminution de l'intensité d'émission, ce qui peut se traduire par la formation d'espèces polynucléaires. Le titrage en émission du ligand $\mathbf{L^1}$ par le Tb(III) donne les mêmes résultats. Le traitement des donnés expérimentales par le logiciel SPECFIT pour l'accès aux constantes de stabilité n'a pas été possible à cause de la formation d'espèces polynucléaires avec une spéciation assez complexe.

5. *Titrage par spectrométrie de masse du ligand L^1 par Eu(III)*

Afin de mettre en évidence la formation d'espèces supramoléculaires polynucléaires, nous avons réalisé un titrage du ligand $\mathbf{L^1}$ avec l'europium(III) par spectrométrie de masse en mode électrospray (ESMS) en mode négatif. Plusieurs solutions du complexe Eu$\mathbf{L^1}$ ont été préparées pour des rapports [Eu^{3+}] / [$\mathbf{L^1}$] qui varient de 0 à 2,5. La Figure 4.12 présente quelques uns des spectres de masse mesurés :

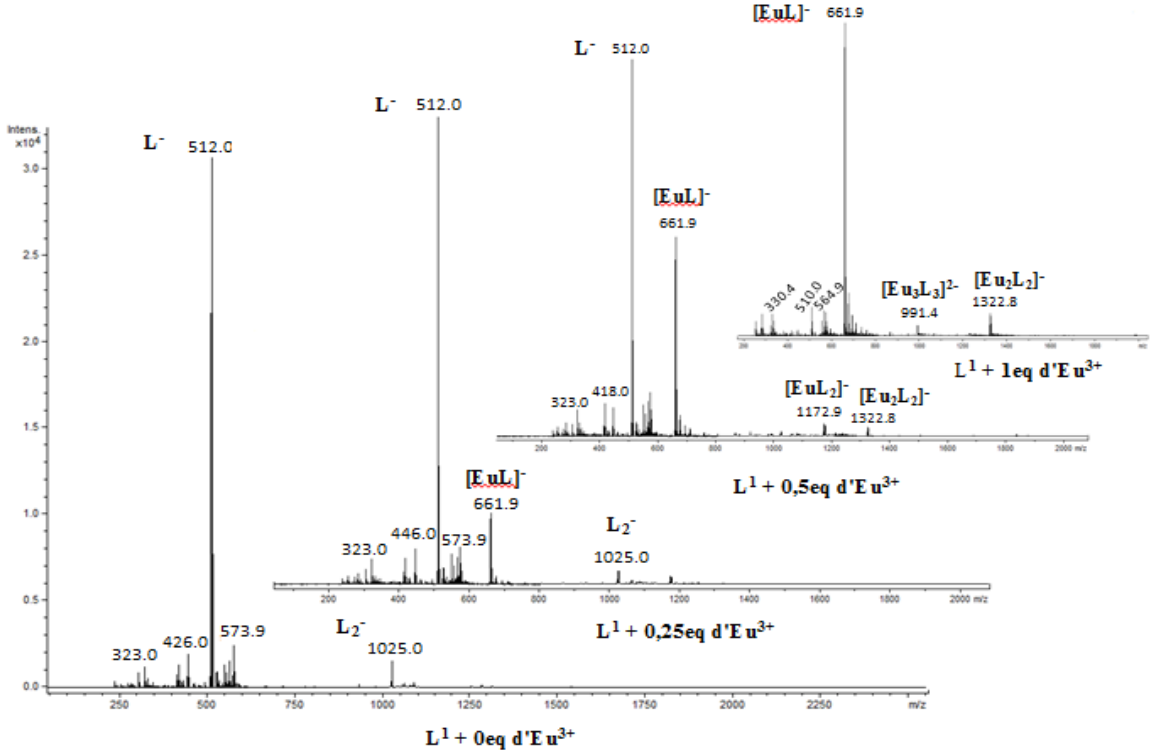


Figure 4.12. *Titrage par spectrométrie de masse en mode électrospray du ligand $\mathbf{L^1}$ par l'europium(III). Solvant : acétate d'ammonium (13,5 mM à pH 6,7), [L^1]= 8,75× 10^{-4} M. [Eu^{3+}]= 8× 10^{-4} M. L = [$\mathbf{L^1}H_7$]$^-$.*

Ce titrage par spectrométrie de masse confirme nos résultats spectrophotométriques (absorption et émission) et confirme la spéciation compliquée des complexes d'Eu(III) formés

avec le ligand $\mathbf{L^1}$. À moins d'un équivalent Eu(III), on observe la formation d'au moins trois espèces. Plus le nombre d'équivalent du métal augmente, plus d'autres espèces polynucléaires se forment. Les différentes espèces identifiées lors de ce titrage sont présentées au Tableau 4.5.

Nombre d'équivalent d'europium	Espèces identifiées $(m/z)_{max}$	
$\mathbf{L^1}$ + 0 eq Eu^{3+}	512	$[\mathbf{L'}]^-$
	1025	$[\mathbf{L'}_2 + H]^-$
	1281,5	$[\mathbf{L'}_5 + 3H]^{2-}$
	1538	$[\mathbf{L'}_3 + 2H]^-$
$\mathbf{L^1}$ + 0,25 eq Eu^{3+}	661,9	$[Eu\mathbf{L'} + 3H]^-$
	1172,9	$[Eu\mathbf{L'}_2 + 2H]^-$
$\mathbf{L^1}$ + 0,5 eq Eu^{3+}	917,5	$[Eu_2\mathbf{L'}_3 + 5H]^{2-}$
	991,5	$[Eu_3\mathbf{L'}_3 + 8H]^{2-}$
	1322,8	$[Eu_2\mathbf{L'}_2 + 5H]^-$
	1835	$[Eu_2\mathbf{L'}_3 + 4H]^-$
	1985	$[Eu_3\mathbf{L'}_3 + 7H]^-$
$\mathbf{L^1}$ + 1,2 eq Eu^{3+}	735,8	$[Eu_3\mathbf{L'}_2 + 9H]^{2-}$
	1066,3	$[Eu\mathbf{L'}_3 + 2H]^{2-}$

Tableau 4.5. *Différents complexes d'europium formés avec le ligand* $\boldsymbol{L^1}$ *identifiés par spectrométrie de masse en mode électrospray. Solvant : acétate d'ammonium (13,5 mM à pH 6,7).* $\boldsymbol{L'} = [\boldsymbol{L^1}H_7]^-$.

6. Caractérisation des complexes de lanthanide

Les complexes de lanthanides(III) formés avec les ligands $\mathbf{L^1 – L^3}$ ont été préparés dans une solution aqueuse en mélangeant 1 équivalent du ligand avec 1 équivalent du métal ($LnCl_3$: Ln = Eu, Gd et Tb). La solution est ensuite laissée sous agitation à 70 °C pendant 2 heures. Après refroidissement, le pH de la solution est ajusté à 7 par ajout d'une solution de NaOH (0,1 M). Le complexe est ensuite obtenu par précipitation au THF (ou au diéthyléther) et au MeOH avec des rendements quantitatifs.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé les complexes d'Eu(III) et de Tb(III) formés avec notre série de ligand $\mathbf{L^1}$- $\mathbf{L^3}$ en mesurant leurs spectres d'absorption et d'émission ainsi que leurs temps de vie de luminescence et leurs rendements quantiques. Les complexes d'Eu(III) et de Tb(III) formés avec le ligand $\mathbf{L^4}$ n'ont pas pu être caractérisés à cause de

problèmes de solubilité. La Figure 4.13 présente les spectres d'absorption et d'émission des complexes Eu**L**^{1} et Tb**L**^{1} normalisés.

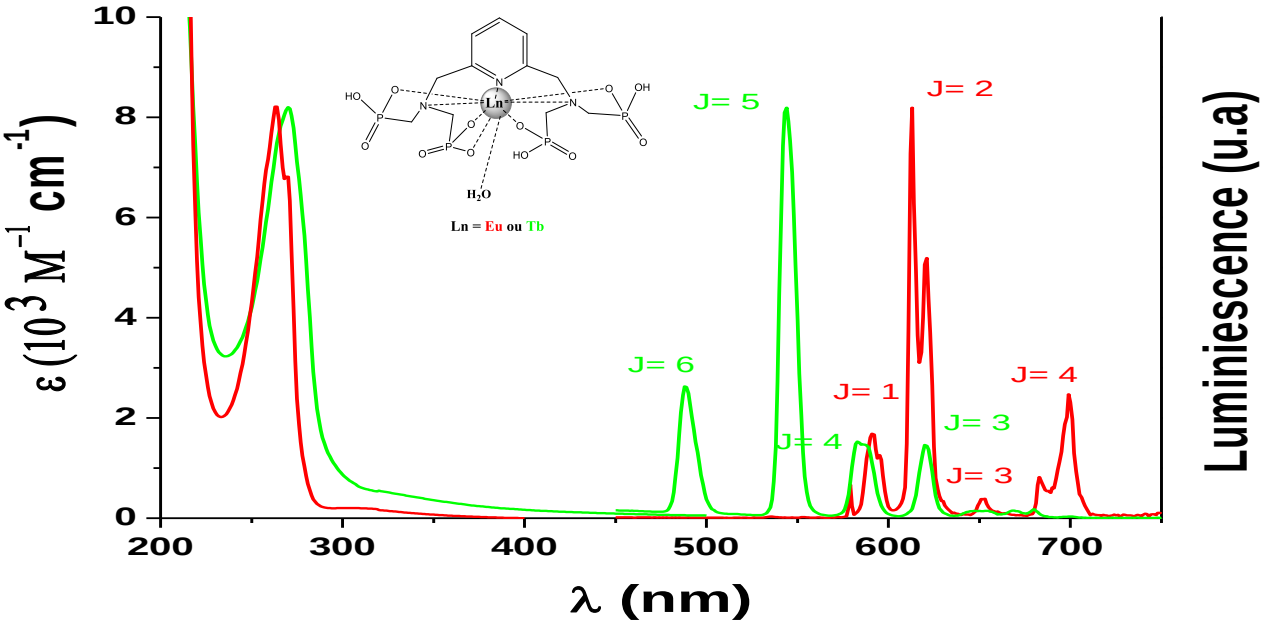


Figure 4.13. *Spectres d'absorption et d'émission des complexes d'europium(III) (—) et de terbium(III) (—) normalisés.*

Le spectre d'émission du complexe d'Eu(III) est caractérisé par la présence de raies qui sont associées aux transitions $^5D_0 \rightarrow {}^7F_J$ (J = 0-4). La raie la plus intense correspond à la transition $^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ vers 620 nm et les raies associées aux transitions $^5D_0 \rightarrow {}^7F_3$, $^5D_0 \rightarrow {}^7F_5$, $^5D_0 \rightarrow {}^7F_6$ sont faibles intensités.

Les raies d'émission du complexe de terbium(III) proviennent du niveau $^5D_4$ et sont associées aux transitions $^5D_4 \rightarrow {}^7F_J$ (J = 6 - 1) La bande de luminescence la plus intense à 543 nm correspond à la transition $^5D_4 \rightarrow {}^7F_5$.

Les complexes d'Eu(III) et de Tb(III) présentent une forte luminescence en solution aqueuse après excitation des tansitions π-π* centrées sur la pyridine. L'intensité d'émission de ces complexes ce traduit par un transfert d'énergie du ligand vers le métal. Ces résultats ont été complétés par la détermination des temps de vie et des rendements quantiques de luminescence. L'ensemble de ces données est présenté dans le Tableau 4.6.

Complexe	Q_{H2O} (%)	Q_{D2O} (%)	τ_{H2O} (ms)	τ_{D2O} (ms)	q_{H2O}
EuL^1	0,12	1,17	0,57	2,21	1,49
TbL^1	10,64	10,64	1,52	2,9	1,26
EuL^2	0,024	0,2	0,364	1,43	2,16
TbL^2	0,365	3,81	1,17	2,4	1,9
EuL^3	0,036	0,3	0,347	1,07	2
TbL^3	0,32	2,83	0,932	1,34	1,33

Tableau 4.6. *Temps de vie de luminescence, rendements quantiques et nombre de molécule d'eau dans la première sphère de coordination des complexes d'europium(III) et de terbium(III) formés avec les ligands* ***L^1***, ***L^2*** *et* ***L^3***.

Les rendements quantiques des complexes d'europium(III) formés avec les ligands **L^1**, **L^2** et **L^3** sont relativement faibles dans l'eau (Φ < 1%) ainsi que dans le D_2O, ces valeurs représentant l'efficacité du transfert d'énergie du ligand vers le métal. Les complexes de terbium(III) présentent des rendements quantiques environ 10 fois supérieurs à ceux des complexes d'europium(III).

Ces faibles rendements quantiques peuvent être expliqués par le fait que l'énergie de l'état excité S1 du ligand vers le métal n'est pas totalement transférée puisqu'il peut y avoir des désactivations non radiatives au niveau du ligand. On sait également que les lanthanides(III) ont un nombre de coordination compris entre 8 et 9. Cependant, nos ligands possèdent un nombre d'atomes coordinants qui varie de 4 à 7. Le métal va donc se coordiner à des molécules d'eau pour compléter sa sphère de coordination. Il est connu que la présence de molécules d'eau dans la première sphère de coordination des complexes de lanthanide(III) conduit très souvent à une extinction de la luminescence via des vibrations des liaisons O–H en particulier pour l'Eu(III).

Les temps de vie des états excités des complexes d'Eu(III) et de Tb(III) sont de l'ordre de la milliseconde et ils sont plus longs dans le l'eau deutérée que dans l'eau. Les complexes de Tb(III) se caractérisent par des temps de vie plus longs que ceux des complexes d'Eu(III).

Pour essayer de mieux comprendre la coordination du ligand **L^1** avec les ions lanthanides(III), des calculs de modélisations (collaboration avec le Dr. Carlos Platas-Iglesias) ont été effectués sur le complexe Gd**L^1**. La Figure 15 représente la conformation d'énergie minimale obtenue pour le complexe $[Gd(H_2\mathbf{L^1})(H_2O)]^{3-}$ qui est la forme majoritaire du complexe de gadolinium(III) à pH physiologique.

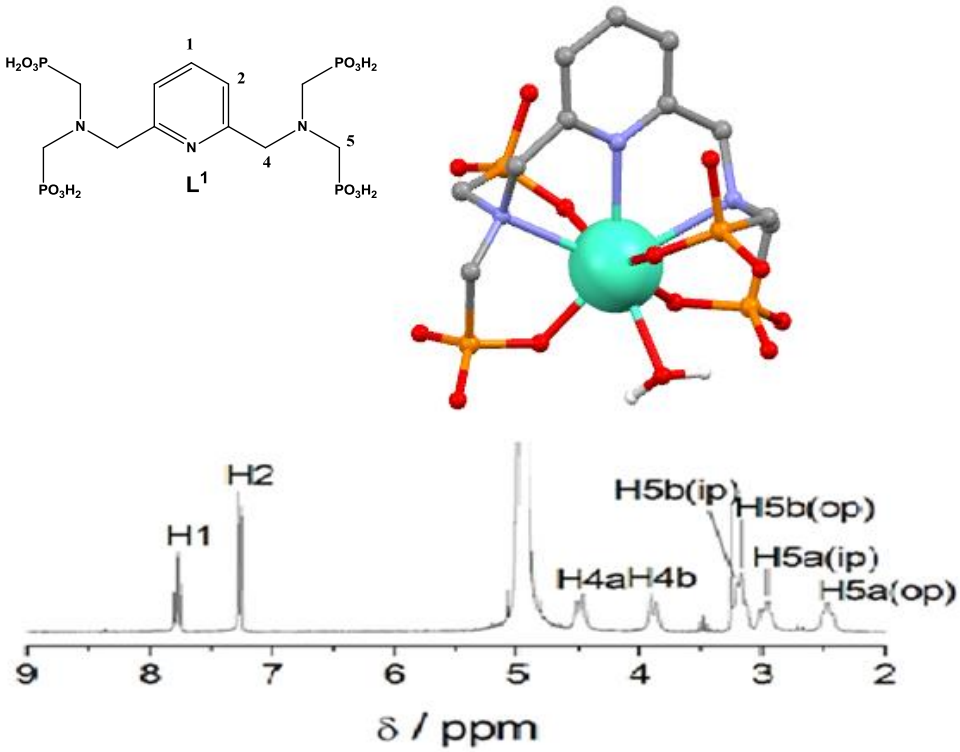


Figure 4.14. *Structure DFT modélisée pour le complexe de gadolinium(III) formé avec le ligand* ***L*** ^{1} *et spectre* ^{1}*H RMN du complexe Lu****L*** ^{1} *dans* D_2O *(pD = 10,5) à 278K.*

Selon les calculs DFT, le ligand $\mathbf{L^1}$ montre une coordination asymétrique de l'ion métallique en raison de la présence d'une molécule d'eau dans la première sphère de coordination.Les modèles suggèrent la coordination des trois atomes d'azote et de quatre atomes d'oxygène des groupements phosphonates. Deux des quatre groupements méthylènephosphonates sont placés légèrement au-dessus et en- dessous du plan de la pyridine, tandis que les deux autres groupements phosphonates restants pointent vers le haut et le bas et se replient vers l'ion Gd^{3+}. Les distances entre le centre métallique et les atomes qui participent à la coordination du Gd(III) ont été calculées. Elles sont regroupées au Tableau 4.7.

	Distance (Å)
$Gd\text{-}N_{pyr}$	2,714
$Gd\text{-}N_{alk}$	2,771 et 2,824
$Gd\text{-}N_{O}$	2,29-2,42
Gd- H_2O	2,609

Tableau 4.7. *Longueurs des liaisons (Å) entre le centre métallique et les atomes coordinants calculées par DFT selon le modèle B3LYP pour le complexe* $[Gd(H_2\mathbf{L^1})(H_2O)]^{3-}$.

La distance entre l'ion Gd^{3+} et la molécule d'H_2O dans la sphère de coordination est de 2,609 Å. Cette distance est plus longue que celle observée dans le cas des complexes de gadolinium(III) formés avec des ligands analogues de type polyaminocarboxylate (2,49 Å pour $Na_2[Gd(DTPA)(H_2O)]$),[40] cela peu s'expliquer par le fait que le modèle utilisé pour nos calculs (PCM : Polarizable continuum model) ne prend pas en compte les interactions entre les molécules d'eau de la sphère interne et de la seconde sphère d'hydratation du complexe.

Les résultats obtenus par DFT ont été confirmés par mesure du spectre RMN du proton du complexe diamagnétique de lutécium(III) formé avec le ligand $\mathbf{L^1}$ (Figure 4.14). Le spectre ^{1}H RMN montre un système de spin AB pour les protons H4 à 4,21 et 3,61 ppm avec une constante de couplage ^2J = 15,0 Hz et quatre signaux bien distincts pour les protons des unités méthylènes adjacentes aux fonctions phosphonates. Toutes ces informations suggèrent une symétrie C_2 du complexe Lu$\mathbf{L^1}$ en solution avec différents signaux pour les groupements méthylènephosphonates qui sont dans le plan (ip) ou en dehors du plan (op). Ceci a été de nouveau confirmé par la présence de deux signaux de même intensité dans le spectre de RMN du ^{31}P du complexe Lu$\mathbf{L^1}$ à 18,9 et 21,6 ppm.

7. Etude de l'interaction avec Mg(II) et Ca(II)

La stabilité du complexe d'europium(III) formé avec le ligand $\mathbf{L^1}$ a été évaluée en présence d'autres cations interférents comme le magnésium(II) et le calcium(II) qui sont abondamment présents donc l'organisme. Pour cela, nous avons réalisé des titrages spectroscopiques (absorption et émission) du complexe Eu$\mathbf{L^1}$ par addition successive et respective de sels de chlorure de magnésium et de calcium ($MgCl_2.6H_2O$ et $CaCl_2.2H_2O$). Au cours du titrage, nous n'avons observé aucune variation spectrale, ni aucune influence sur le temps de vie du complexe Eu$\mathbf{L^1}$ de la présence de fortes concentrations de Ca(II) ou Mg(II). Les résultats obtenus ont montré que la stabilité du complexe Eu$\mathbf{L^1}$ n'est pas influencée par la présence d'autres cations tels que le Mg(II) et le Ca(II).

8. Mécanisme de relaxivité des complexes de gadolinium

Avant de présenter nos résultats, nous allons brièvement faire un rappel sur le principe des mesures de relaxivité.

La contribution principale de la relaxation des protons de l'eau provient des interactions entre le spin nucléaire I des protons et le spin électronique S du cation métallique (Figure 4.15)

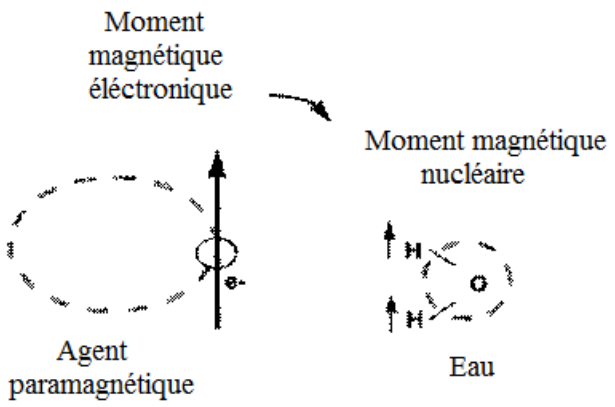


Figure 4.15. *Interaction dipolaire entre les moments magnétiques électronique et nucléaire*.

Dans le cas des complexes de Gd(III), cette interaction spécifique correspond à l'interaction de molécules d'eau avec le spin électronique du cation Gd(III). Cette interaction induit une augmentation des vitesses de relaxation longitudinale et transversale, respectivement $1/T_1$ et $1/T_2$.

En présence de l'agent paramagnétique, la vitesse de relaxation mesurée $1/T_{i\ mes}$ pourra se décomposer en deux termes : $1/T_{i\ dia}$ et $1/T_{i\ para}$ représentant la contribution diamagnétique $1/T_{i\ dia}$ (souvent mesurée en remplaçant le Gd(III) par un ion Ln diamagnétique tel que Lu(III) ou La(III)) et la contribution paramagnétique, $1/T_{i\ para}$.

$$\frac{1}{T_{i\ mes}} = \frac{1}{T_{i\ dia}} + \frac{1}{T_{i\ para}}$$

Le terme paramagnétique est directement proportionnel à [Gd], la concentration en ion Gd et peut s'écrire :

$$\frac{1}{T_{i\ para}} = r_i \times [Gd]$$

ou r_i représente la relaxivité du complexe de l'ion Gd(III).

On distingue trois types de relaxation selon le type de molécule d'eau liée au complexe (Figure 4.16) : le mécanisme de sphère interne (ou inner-sphere, IS), le mécanisme de seconde sphère (ou second-sphere, SS) et le mécanisme à sphère externe (ou outer-sphere, OS).[41]

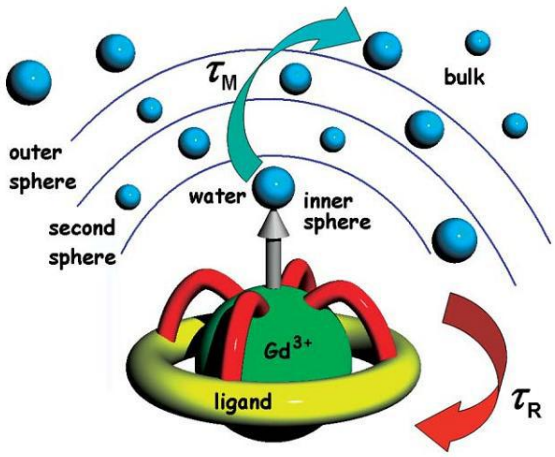


Figure 4.16. *Représentation schématique d'un complexe de Gd(III).*[41]

La relaxivité est donnée par la relation (5).

$$r_i = r_i^{IS} + r_i^{OS} + r_i^{SS} \qquad i = 1, 2 \tag{5}$$

Les agents de contraste à base de Gd(III) étant principalement des agents de type T_1, nous nous limiterons aux équations de relaxivité longitudinale (i = 1) dans la description des trois mécanismes de relaxivité.

<u>Relaxivité de sphère interne (IS)</u> : C'est le mécanisme principal, il est obtenu par la coordination directe d'une ou de plusieurs molécules d'eau au centre métallique. D'après la théorie de Solomon-Bloembergen-Morgan,[42] la relaxivité dépend de plusieurs temps caractéristiques :

- T_1 et T_2, les temps de relaxation électronique longitudinale et transversale.
- Le temps de résidence d'une molécule d'eau en première sphère de coordination du cation τ_m
- Le temps de corrélation rotationnel τ_R
- Le nombre q d'hydratation du complexe

Plus il y aura de molécules d'eau coordinées au métal et plus le temps de relaxation diminuera, ce qui aura pour conséquence l'augmentation du signal.

<u>Relaxivité de seconde sphère (SS)</u> : Les molécules d'eau de la seconde sphère ne sont pas liées directement au centre métallique mais associées via de faibles liaisons hydrogènes avec le ligand et s'échangent avec les molécules d'eau libre.

Relaxivité à sphère externe (OS) : Les molécules d'eau coordinées directement au métal s'échangent avec les molécules d'eau libres de la solution, permettant de propager l'augmentation de la vitesse de relaxation au sein de la solution.

8.1. Paramètres influençant la relaxivité des complexes de Gd(III)

De nombreux paramètres influencent la relaxivité, en particulier les paramètres régissant le mécanisme de sphère interne. L'optimisation de ces paramètres est nécessaire afin d'obtenir, pour un complexe donné, la relaxivité la plus élevée possible.

8.1.1. Nombre de molécules d'eau q coordinées en sphère interne

Le nombre de molécule d'eau en sphère interne (q) est proportionnel à la relaxivité, son augmentation s'accompagne d'une amélioration de la relaxivité quel que soit le champ magnétique. Cependant, l'augmentation de q est associée à une diminution du nombre de coordination du complexe et s'accompagne généralement d'une diminution de stabilité thermodynamique et/ou cinétique. La méthode la plus fréquemment utilisée pour la détermination de q est la mesure des temps de vie de luminescence des complexes de Tb(III) et d'Eu(III) dans l'eau et dans D_2O. Cette méthode est décrite dans le paragraphe 3.1.1 de ce chapitre.

8.1.2. Distance Gd(III)-proton $r_{Gd\text{-}H}$

La distance entre le spin nucléaire I (du proton) et le spin électronique S est r_{GdH}. La relaxivité de sphère interne (IS) est une fonction de la distance entre le proton et l'ion Gd(III) à la puissance (-6) $(r_{GdH})^{-6}$ donnée par l'équation de Solomon-Bloembergen : [43, 44]

$$\frac{1}{T_{1m}} = \frac{2}{15}\,\frac{\gamma_I^2\, g^2\, \mu_B^2\; S(S+1)}{(r_{GdH})^6}\left[\frac{3\,\tau_{C1}}{(1+\ \omega_I{}^{\,2}\ \tau_{C2}{}^2)} + \frac{7\,\tau_{C2}^2}{(1+\ \omega_s{}^{\,2}\ \tau_{C2}{}^2)}\right]$$

Avec :

S	le nombre quantique de spin électronique
γ_I	le rapport gyromagnétique nucléaire du proton
μ_B	le magnéton de Bohr
g	le facteur de Landé pour l'électron libre
ω_I et ω_S	les fréquences de Larmor pour le proton et l'électron (ω_S = 658 ω_I)
τ_{ci}	(i = 1,2) le temps de corrélation relatif à la dynamique du couplage S-I.

Ce paramètre r_{GdH} a une influence importante sur la relaxivité. Une diminution de la distance de 0,1 Å correspond à une augmentation de 20% de la relaxivité. En pratique, cette distance est souvent calculée à partir de la distance Gd(III)-O qui est elle-même déterminée au moyen d'études cristallographiques ou par spectroscopie ENDOR (Electron Nuclear Double Resonance). Cette dernière technique a été utilisée dans le cas du complexe [Gd(HPDO3A)(H_2O)] pour determiner la distance r_{GdH} qui est égale à 3,1Å.[45] Cette valeur est en très bon accord avec les données cristallographique obtenues pour ce complexe.[46]

8.1.3. Temps de corrélation rotationnelle τ_R

Aux champs de l'IRM utilisés actuellement (0,5 -1,5 T), la relaxivité des petits complexes de gadolinium est limitée par leurs vitesses de rotation. Cette dernière est influencée par le poids moléculaire des molécules utilisées. Il a été montré que, pour atteindre des relaxivités très élevées, il est nécessaire d'avoir des temps de corrélation rotationnelle de l'ordre de la ns. En revanche, aux champs élevés (7 – 9,5 T), la relaxivité la plus élevée est obtenue pour des complexes de tailles intermédiaires. Dans le cas d'une cinétique de rotation plus lente, une diminution de la relaxivité est observée.

8.1.4. Vitesse d'échange des molécules d'eau k_{ex}

La vitesse d'échange des molécules d'eau k_{ex} est définie comme l'inverse de leur temps de résidence dans la première sphère de coordination τ_m. $k_{ex} = 1/\tau_m$

Ce temps τ_m module l'efficacité de l'échange chimique entre la molécule d'eau en sphère interne et le solvant environnant. Cet échange peut se faire selon deux mécanismes :

- Un mécanisme dissociatif pour lequel une molécule d'eau en première sphère quitte le cation avant qu'une autre ne le remplace.
- Un mécanisme associatif pour lequel la molécule d'eau arrive sur le cation métallique avant qu'une autre ne le quitte.

Il a été montré que pour les complexes polyaminocarboxylates, le temps τ_m varie entre 10 ns et 2000 ns et que le mécanisme d'échange effectif se situe souvent entre les deux mécanismes d'échange dissociatif et associatif.[8]

8.1.5. Temps de relaxation électronique

Le temps de relaxation électronique T_{ie} (i = 1, 2) intervient lorsque le champ est faible inferieur à 0,5 T. Ces valeurs de T_{ie} dépendent du champ magnétique. Pour que la relaxivité

soit la plus haute possible, il faut que les temps de relaxation électronique soient les plus longs possibles. Il est cependant très difficile de contrôler ce paramètre. Heureusement la théorie montre que la relaxation électronique a un impact mineur sur la relaxivité au dessus de 1/T environ.

8.2. Mesure de la relaxivité des complexes GdL^1, GdL^2 et GdL^3

La mesure des temps de relaxation en fonction du champ magnétique appliqué est appelée relaxométrie. Un profil relaxométrique est un tracé de la vitesse de relaxation du spin du noyau observé en fonction du champ magnétique. Ce tracé est également appelé profil de dispersion de relaxation magnétique nucléaire ou profil NMRD (Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion). Les mesures de relaxivité pour nos systèmes Gd**L**^{1}, Gd**L**^{2} et Gd**L**^{3} ont été réalisées par l'équipe du Dr. Marinella Mazzanti au Laboratoire de Reconnaissance Ionique et Chimie de Coordination au CEA Grenoble et par l'équipe du professeur Mauro Botta de l'université de Alessandria en Italie.

8.2.1. Relaxivité du complexe GdL^1

La relaxivité du complexe Gd**L**^{1} a été mesurée dans H_2O (pH ajusté à pH 7,4 avec du NaOH) à une température de 25°C. La Figure 4. 17 présente le profil NMRD obtenu pour ce complexe.

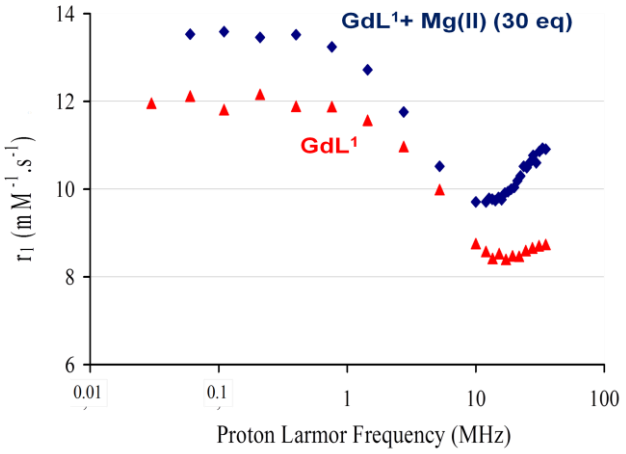


Figure 4. 17. Profil NMRD du complexe [Gd**L**^{1}(H_2O)] dans H_2O à pH 7,4 et à 25°C (▲) complexe seul, (♦) en présence de 30 équivalents de $MgCl_2$.

Le profil NMRD obtenu pour le complexe [Gd**L**^{1}(H_2O)] indique un comportement typique d'une petite molécule [8,47] et montre une relaxivité à 20 MHz très élevée (r_1 = 8,5 mM^{-1} s^{-1} à 25 °C) comparée à celles d'autres agents de contraste monohydratés déjà décrits dans la littérature tels que [Gd(DOTA)]$^-$ (r_1 = 4,2 mM^{-1} s^{-1}) ou [Gd(DTPA)]$^{2-}$ (r_1 = 4,3 mM^{-1}s^{-1}).[48] La

relaxivité déterminée pour le complexe Gd**L**^{1} est très similaire à celles mesurées pour les complexes de Gd(III) formés avec des ligands qui portent des groupements phosphonates et une seule molécule d'eau dans la première sphère de coordination (sphère interne IS).[49] Ces ligands phosphonatés se caractérisent par des relaxivités relativement élevées du fait de la contribution de la seconde sphère par formation de liaisons hydrogène entre les groupements phosphonates et les molécules d'eau du solvant.

Du fait de la charge négative du complexe Gd**L**^{1} à pH neutre, des interactions avec des cations tels que Ca(II) et Mg(II) sont possibles. Pour mettre en évidence ces interactions, nous avons suivi la variation de la relaxivité en présence d'un nombre croissant d'équivalent de Ca(II) et Mg(II). En présence de 200 équivalents de $CaCl_2$, aucune variation significative n'a pas été observée pour la relaxivité du complexe Gd**L**^{1} qui varie respectivement de 8,78 à 8,48 mM^{-1} s^{-1} (pH = 7,4, 25°C, 200MHz) en absence et en présence de Ca(II). En revanche, l'addition de 30 équivalents de $MgCl_2$ conduit à une augmentation d'environ 40% de la relaxivité du complexe Gd**L**^{1} (r_1 = 12 mM^{-1} s^{-1}) (Figure 4. 17). Le profil NMRD du complexe Gd**L**^{1} en présence de 30 équivalents de Mg^{2+} montre une augmentation de la relaxivité à toutes les fréquences, en particulier dans les fréquences les plus élevées, associées à l'augmentation du temps de rotation du complexe.[45, 46] Ce comportement est souvent observé pour les ligands polyaminophosphonatés et peut être relié à la formation d'espèces polynucléaires.[50] La présence du Gd(III) libre à été vérifiée par le test de l'indicateur coloré orangé de xylénol afin d'exclure la possibilité de relargage du Gd(III) en présence de Mg(III).

8.2.2. Relaxivité des complexes GdL^{2} et GdL^{3}

Les relaxivités des complexes Gd**L**^{2} et Gd**L**^{3} ont été mesurées dans H_2O à différents champs magnétiques et à différentes températures. Les profils NMRD sont représentés sur la Figure 4.18.

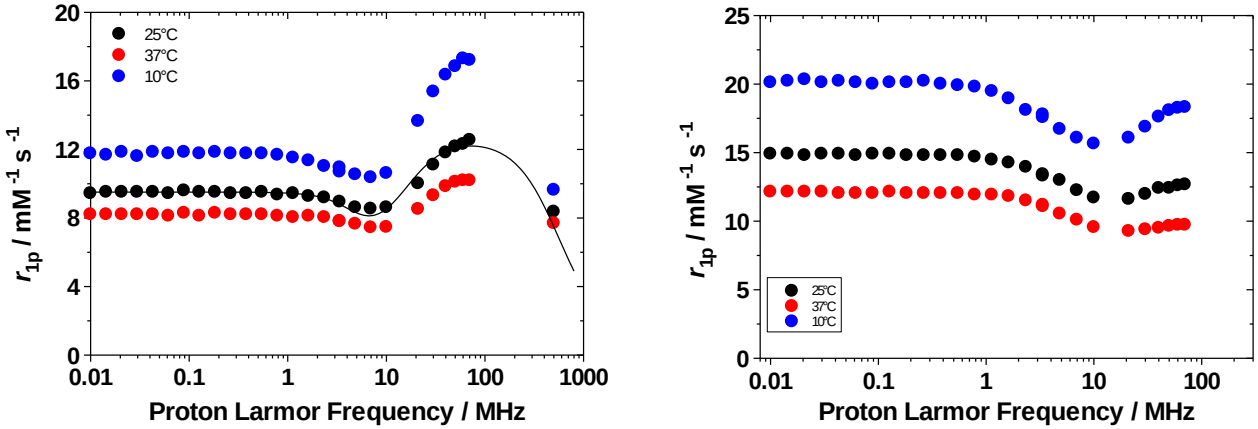


Figure 4.18. *Profils NMRD des complexes Gd**L**^{2} (à gauche, pH 7,3) et Gd**L**^{3} (à droite, pH 8,1) dans H_2O à différentes température.* (●) *10°C ,*(●) *25°C et* (●) *37°C et .*

Les profils NMRD des complexes Gd**L**^{2} et Gd**L**^{3} montrent que la relaxivité de ces deux complexes augmente lorsque la température diminue. La température a un effet sur le temps de rotation de la molécule τ_r.[51] Lorsque la température augmente, le τ_r augmente et la vitesse d'échange de molécules d'eau k_{ex} diminue et par conséquent la relaxivité diminue.

Les complexes Gd**L**^{2} et Gd**L**^{3} présentent des relaxivités très élevées à 20MHz (r_1 ~ 10 mM^{-1} s^{-1} et r_1 ~12,5 mM^{-1} s^{-1} à 25 °C respectivement). Ces relaxivités élevées peuvent être expliquées par le fait que chacun de ces complexes contient au moins deux molécules d'eau dans la première sphère de coordination (q = 1 pour Gd**L**^{1}).

La relaxivité de ces deux complexes a été également mesurée en fonction du pH et les profils obtenus sont représentés sur la Figure 4.19.

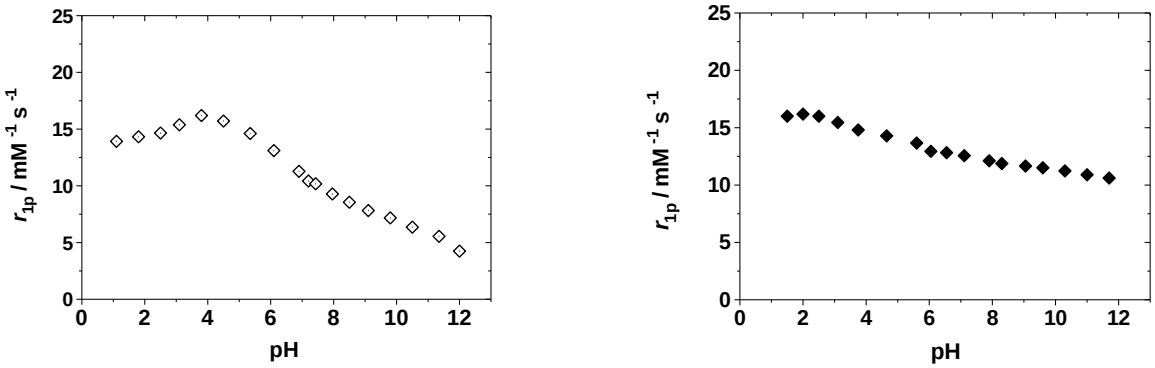


Figure 4.19. *Evolution de la relaxivité des complexes Gd**L** ^{2}(à gauche) et Gd**L**^{3} (à droite) en fonction du pH.*

L'évolution de la relaxivité du complexe Gd**L**^{3} mesurée en fonction du pH présente une légére variation de la relaxivité, qui fait passer sa valeur d'environ 16 mM^{-1} s^{-1} à pH ~ 1,5, à 10 à pH = 12. Contrairement à Gd**L**^{3}, la relaxivité du complexe Gd**L**^{2} varie très fortement en fonction du pH, cela peut être expliqué par la variation du nombre de molécules d'eau dans la première sphère de coordination. Afin de confirmer notre hypothèse, nous avons mesuré le nombre de molécules d'eau présentes dans la sphère de coordination du complexe Gd**L**^{2} en fonction du pH. Le nombre de molécules d'eau dans la première sphère de coordination des complexes Gd**L**^{1}, Gd**L**^{2} et Gd**L**^{3} a été calculé avec la formule de Horrocks et Sundnick par les mesures de temps de vie des complexes d'Eu correspondants dans l'H_2O et dans le D_2O (paragraphe 3.1.1). [27] Les résultats obtenus sont représentés à la Figure 4.20.

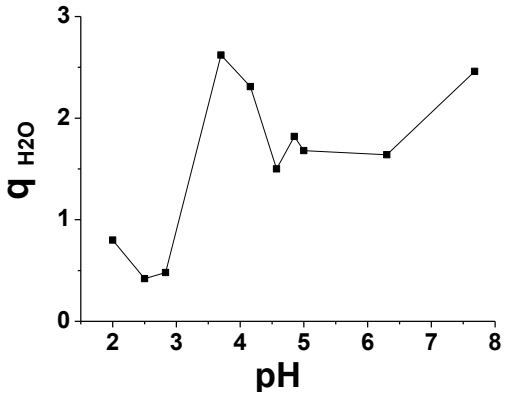


Figure 4.20. *Variation du nombre de molécules d'eau dans la sphère de coordination du complexe Gd**L**^{2} en fonction du pH.*

Il est à noter que les déclins de luminescence mesurés en solution dans H_2O et D_2O sont rarement monoexponentielle, mettant en évidence la coexistence de plusieurs espèces en solution en échange lent à l'échelle de temps de processus de luminescence (ms). Pour des raisons pratiques les temps de vie mesurés correspondent donc aux meilleurs ajustements obtenus avec une décroissance monoexponentielle, ce qui explique que les nombres d'hydratation moyens ne sont pas des valeurs entières.

Les résultats obtenus montrent un comportement similaire à celui de la relaxivité en fonction du pH, le nombre de molécule d'eau dans la sphère de coordination augmente d'environ 0,8 à 2,5 molécules d'eau entre pH 3 et pH 3,7 puis chute à environ 1,5 molécules d'eau pour des pH supérieurs à 4,5.

Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons étudié la complexation d'ions lanthanides par nos ligands polyaminophosphonatés **L^1 - L^3**. Nous avons montré que le ligand **L^1** qui porte quatre unités phosphonates est particulièrement efficace pour la coordination des lanthanides(III) à travers la détermination des constantes de stabilités élevées avec les cations Ln(III) étudiés. Les complexes de Ln(III) formés avec les ligands **L^2** et **L^3** se caractérisent par des constantes de stabilité beaucoup plus faibles que ceux formés avec le ligand **L^1**. Cela se traduit par l'absence d'une ou de deux unités phosphonates pour **L^3** et **L^2** respectivement par rapport au **L^1**. L'étude des complexes de lanthanides(III) formés avec le ligand **L^4** n'a pas pu être réalisée à cause de problèmes de solubilité.

Les propriétés photophysiques en milieu aqueux des complexes d'Eu(III) et de Tb(III) dérivés des ligands **L^1- L^3** ont été également étudiées. Ces complexes se caractérisent par des temps de vie longs mais des rendements quantiques faibles. Les temps de vie les plus longs ainsi que les rendements quantiques les plus élevés ont été observés dans le cas des complexes de Tb(III) formés avec le ligand **L^1**.

La géométrie de coordination des complexes de Ln^{3+} formés avec le ligand **L^1** a été également évaluée grâce à des calculs DFT sur le complexe Gd**L^1** et des mesures en RMN du proton pour le complexe diamagnétique Lu**L^1**. D'autre part, le complexe Gd**L^1** présente une relaxivité très élevé qui augmente en présence du Mg(II) contrairement au Ca(II) qui ne provoque aucun effet sur la relaxivité du complexe Gd**L^1**. Les complexes Gd**L^2** et Gd**L^3** se caractérisent par des relaxivité très élevés fortement influencées par le pH du milieu qui résulte de la variation du nombre de molécule d'eau dans la première sphère de coordination.

Cette série de ligands non macrocycliques **L^1-L^3** peut donc avoir un intérêt en imagerie médicale et plus particulièrement en imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM)[52] à travers la formation de nouveaux agents de contraste. Afin d'exploiter toutes l'ensemble de ces propriétés très intéressantes, il était nécessaire de rendre ces complexes réactifs à l'égard des biomolécules à travers l'insertion d'une fonction de greffage pour des applications en imagerie médicale.

Partie expérimentale

Dans cette partie, nous exposerons les conditions expérimentales et les techniques mises en œuvre pour la caractérisation des complexes métalliques.

Préparation des solutions

La préparation des solutions de ligands et l'étalonnage des électrodes ont été réalisés de la même manière que celle décrite dans le troisième chapitre. Des solutions mères de perchlorates de terbium ($Tb(ClO_4)_3$, STREM CHEMICAL, 99,9%) de perchlorates d'europium ($Eu(ClO_4)_3$, SIGMA ALDRICH, 99,9%) de perchlorates de lanthane ($La(ClO_4)_3$, SIGMA ALDRICH, 99,9%), de perchlorates de lutécium ($Lu(ClO_4)_3$, ABCR, 99,9%), de perchlorate d'erbium ($Er(ClO_4)_3$, SIGMA ALDRICH, 99,9%) et de perchlorate de néodyme ($Lu(ClO_4)_3$), STREM CHEMICAL) ont été préparées dans de l'eau dégazée. *Attention! Les sels de perchlorate combinés avec des solvants organiques sont potentiellement explosifs et doivent être manipulés en petites quantités avec les précautions les plus soigneuses et adéquates*.[53]

La concentration de ces solutions a été déterminée au moyen de titrages colorimétriques en présence d'un indicateur coloré (orange de xylénol) avec une solution standardisée d'acide éthylènediaminetétraacétique sous forme disodique (Na_2H_2EDTA, TITRIPLEX® III, MERCK).

Titrage potentiométrique

Des titrages potentiométriques ont été réalisés afin de déterminer les constantes de stabilité des complexes de Ln(III) formés avec notre série de ligand $\mathbf{L^1}$- $\mathbf{L^3}$. Des volumes adéquats des solutions de Ln(III) sont ajoutés à 4 mL d'une solution de ligands (**L** (~ 3×10^{-3} M) afin d'obtenir une stœchiométrie 1:1. Les mélanges ont été réalisés dans un vase de titrage thermostaté à 25 °C (METROHM 6.0234.500). La force ionique a été maintenue constante à 0,1 M par ajout de perchlorate de sodium ($NaClO_4$, MERCK, p.a.). Les données potentiometriques ont été analysées par le logiciel Hyperquad dont le principe sera détaillé dans la partie Annexe.

Spectrophotométrie d'absorption et d'émission

Les titrages spectrophotométriques ont été réalisés par ajouts successifs de microvolumes d'une solution concentrée de Ln(III) à des solutions de ligands. Les spectres d'absorption et d'émission ont été mesurés à pH = 7,4. Pour cela, les solutions ont été préparées dans du Tris-HCl à pH 7,4. Les spectres d'absorption UV-visible ont été mesurés grâce à un spectrophotomètre Specord 205 dans une cuve en quartz de 1 cm. Les spectres

d'émission et les temps de vie de luminescence ont été mesurés grâce à un spectrophotomètre Horiba Jobin Yvon Fluoromax ou un spectrophotomètre Edinburg Instrument FL5920.

Titrage spectrophotométrique

Pour les titrages par compétition, la solution initiale contient un complexe 1:1 du Cu(II) formé avec le ligand $\mathbf{L^1}$ à pH 2. Des ajouts successifs d'une solution d'une solution de perchlorate de lanthanide(III) sont ajoutés jusqu'à l'observation de la disparition totale ou de la disparition de 50% de la bande d'absorption de transfert de charge du complexe Cu$\mathbf{L^1}$ à 312 nm. Les variations de l'absorbance ont été suivies par spectrophotométrie UV-Visible en utilisant un spectrophotomètre Cary 50.

Titrage par spectrométrie de masse en mode electrospray

Les titrages par spectrométrie de masse ont été réalisés par le groupe du professeur Laurence Sabatier sur un spectromètre Bruker Daltonics micro-TOF. Plusieurs mélanges de ligand et de métal à différents rapports [L]/[M], qui varient de 0 à 2,5, ont été préparés dans l'acétate d'ammonium 13,5 mM à pH 6,7.

Synthèse des complexes de Ln(III)

À une solution aqueuse du ligand, on rajoute une solution contenant 1 équivalent du chlorure de lanthanide ($LnCl_3$, Ln = Eu, Tb) en solution dans l'eau. Le mélange est ensuite chauffé à 70°C pendant deux heures. Après refroidissement du milieu, le pH est ajusté à 7 par ajout d'une solution de NaOH (1 M), l'ajout d'un non-solvant (THF, diéthyléther, méthanol) permet de précipiter les complexes. Le mélange des deux phases est enfin centrifugé afin d'isoler les complexes sous forme de poudre après séchage avec des rendements quantitatifs.
Les complexes d'Eu(III) et de Tb(III) ont été caractérisés par spectrométrie de masse selon la méthode d'ionisation électronique. A titre d'exemple, les spectres de masse obtenus pour le complexe d'Eu(III) formé avec le ligand $\mathbf{L^1}$ sont représentés à la Figure 4.21. Le complexe d'europium(III) présente un pic majoritaire à m/z = 705,858 qui correspond au complexe $[Eu\mathbf{L^1}H_2Na_2]^-$ et le profil isotopique de ce complexe est en très bon accord avec les calculs théoriques.

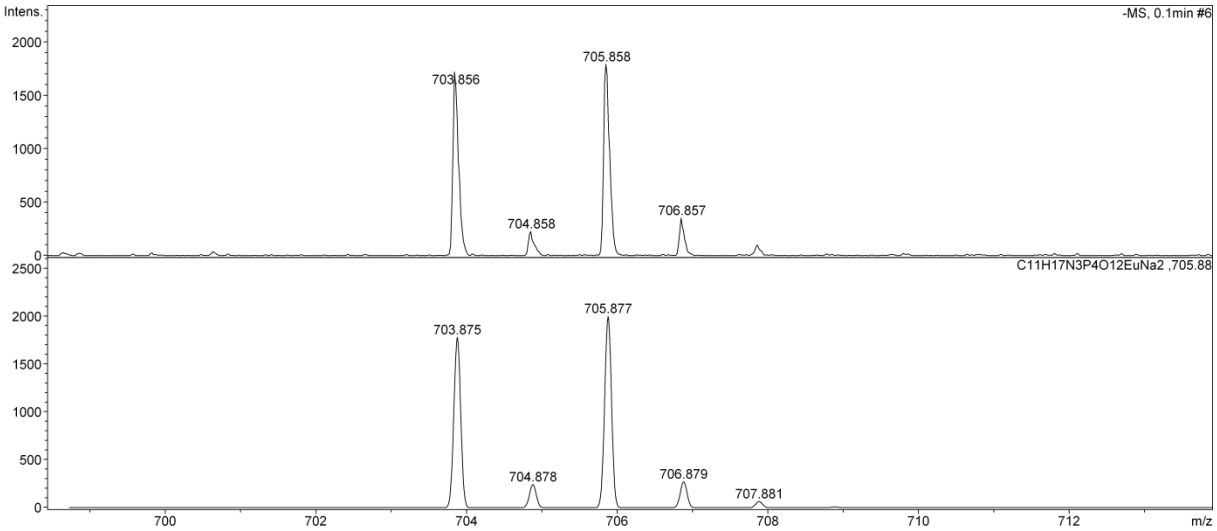


Figure 4.21. *Spectre de masse (ESI-) du complexe Eu**L**^{1} représentant la distribution isotopique mesurée (en haut) et calculée (en bas) pour le pic de l'ion [Eu**L**^{1}H$_2$Na$_2$]$^-$ centré à m/z = 705,858.*

Mesure de la relaxivité des complexes GdL^{1}, GdL^{2} et GdL^{3}

Les échantillons ont été préparés *in situ* en mélangeant des quantités appropriées de ligand et de métal ($GdCl_3.6H_2O$, 99,99%; Aldrich) à des pH ajustés avec une solution de NaOH (1 M et 0,1 M). Une solution stock de Gd(III) a été préparée dans l'eau et la concentration exacte de cette solution à été déterminée grâce un titrage colorimétrique dans un tampon acétate avec une solution de H_2Na_2EDTA à pH 4,5 et en présence d'orangé de xylénol comme indicateur coloré.

La concentration des complexes utilisés varient de 2 à 5 mM. Une solution de $MgCl_2$ à été préparée par pesée dans H_2O. Le pH de la solution a été ajusté à pH 7,4 avec une solution de KOH ou HCl. La relaxivité des complexes de Gd(III) en présence de Mg(II) à été mesurée en préparant des mélanges du complexe de Gd(III) avec des volumes croissant de Mg(II). La relaxivité à 200 MHz à été mesurée à 25°C entre 0,01 et 35 MHz grâce à un relaxomètre RMN Spinmaster FFC Fast Field Cycling).

Bibliographie

1 Jørgensen, C. K. *Inorg. Chim. Acta.* **1987**, *139*, 1.

2 Cotton, F. A.; Wilkinson, G. In *Advanced Inorganic Chemistry*; 5th ed.; John Wiley and Sons: New York, **1988**.

3 Binnemans, K. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4283.

4 Buchler, J. W.; De Cian, A.; Fischer, J.; Kihn-Botulinski, M.; Paulus, H.; Weiss, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 3652.

5 Garcia, J.; Allen, M. J. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, 4550.

6 Josse, M.; Dubois, M.; El-Ghozzi, M.; Avignant, D. *J. Alloys & Compo.* **2004**, *374*, 213.

7 Du, Z.; Zhang, Y.; Yao, Y.; Shen, Q. *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 7639.

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

9 Schriver, D. F.; Atkins, P. W. In *Inorganic Chemistry*; 3th ed.; Oxford University Press: New York. **1999**.

10 Bunzli, J. C. G.; Piguet, C. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 1048.

11 Zhang, J.; Badger, P. D.; Geib, S. J.; Petoud, S. *Ang. Chem, Int. Ed*. **2005**, *44*, 2508.

12 Petoud, S.; Cohen, S. M.; Bünzli, J.-C. G.; Raymond, K. N. *J. Am. Chem.Soc*. **2003**, *125*, 13324.

13 Pearson, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3533.

14 Lehn, J.-M. *Supramolecular Chemistry : Concepts and Perspectives*; VCH: Weinheim. **1995**.

15 Nchimi Nono, K.; Lecointre, A.; Regueiro-Figueroa, M.; Platas-Iglesias, C.; Charbonnière L.J. *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 1689.

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

17 Pellegatti, L.; Zhang, J.; Drahos, B.; Villette, S.; Suzenet, F.; Guillaumet, G.; Petoud, S. ; Toth, E. *Chem. Commun.* **2008**, 6591.

18 Kobayashi, S.; Nagayama, S.; Busujima, T. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 9221.

19 Rizkalla, E. N.; Choppin, G. R. *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths. Elsevier Science Publ. B.V. : Amsterdam*. **1991**, *15.*

20 Shannon, R. D.; Prewitt, C. T. *Acta Cryst*. **1969**, *B25*, 925.

21 Bünzli, J.-C. G.; Piguet, C. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*,1048.

22 Sabbatini, N.; Guardigli, M.; Lehn, J. M. *Coord. Chem. Rev.* **1993**, *123*,201.

[23] Parker, D.; Dickins, R. S.; Puschmann, H.; Crossland, C.; Howard, J. A. K. *Chem. Rev.* **2002**, *102*,1977.

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

[25] Comby, S.; Bünzli, J.-C. G. *In Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths; Elsevier.* **2007**,*37*.

[26] Stein, G.; Wurzberg, E. *J. Chem.phys*. **1975**, *62*, 208.

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

[28] Beeby, A.; M. Clarkson, I.; S. Dickins, R.; Faulkner, S.; Parker, D.; Royle, L.; S. de Sousa, A.; A. Gareth Williams, J.; Woods, M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2.* **1999**, 493.

[29] Supkowski, R.M.; Horrocks, WD. *Inorg. Chim. Acta*. **2002**, *340*, 44.

[30] Haas, Y.; Stein, G. *J. Phys. Chem.* **1971**, *75*, 3668.

[31] Ishida, H.; Tobita, S.; Hasegawa, Y.; Katoh, R.; Nozaki, K. *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254*, 2449.

[32] Olmsted, J. *J. Phys. Chem.* **1979**, *83*, 2581.

[33] Valeur, B. In *Molecular Fluorescence*; Wiley: Weinheim. **2002**.

[34] Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. *Talanta*. **1996**, *43*, 1739.

[35] Cacheris, W. P.; Nickle, S. K.; Sherry, A. D. *Inorg. Chem*. **1987**,*26*, 958.

[36] Sherry, A. D.; Ren, J.; Huskens, J.; Brucher, E.; Toth, E.; Geraldes, C. F. C. G.; Castro, M. M. C. A.; Cacheris, W. P. *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 4604.

[37] Harris, W. R.; Carrano, C. J.; Raymond, K. N. *J. Am. Chem. Soc*. **1979**, *101*, 2213.

[38] Pellegatti, L.; Zhang, J.; Drahos, B.; Villette, S.; Suzenet, F.; Guillaumet, G.; Petoud, S. ; Toth, E.; *Chem. Commun.* **2008**, 6591.

[39] Sawada, K. ; Kuribayashi, M.; Suzuki, T.; Miyamoto, H. *J. Sol. Chem.* **1991**, *20*, 829.

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

[41] Hermann, P.; Kotek, J.; Kubicek, V.; Lukes, I. *Dalton Trans.* **2008,** 3027.

[42] Dwek, R. A. *NMR in Biochemistry*. Clarendon Press Ed., Oxford. **1973**.

[43] Bloembergen, N.; Morgan, L. O. *J. Chem. Phys.* **1961**, *34*, 842.

[44] Solomon, I.; Bloembergen, N. *J. Chem. Phys.* **1956**, *25*, 261.

[45] Astashkin, A. V.; Raitsimring, A. M.; Caravan, P.; *J. Phys. Chem. A.* **2004**, *108*, 1990.

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

[47] Merbach, A. E.; Toth, E. *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, Wiley, London. **2001**.

[48] Aime, S.; Botta, M.; Panero, M.; Grandi, M.; Uggeri, F. *Magn. Reson. Chem.* **1991**, 29, 923.

[49] a) Kotek, J.; Lebduskova, P.; Hermann, P.; Vander Elst, L.; Muller, R. N.; Geraldes, C. F. G. C.; Maschmeyer, T.; Lukes, I.; Peters, J. A. *Chem.–Eur. J.* **2003**, *9*, 5899.; b) Aime, S.; Gianolio, E.; Corpillo, D.; Cavalloti, M.; Palmesano, M.; Sist, M.; Giovenzana, G. B.; Pagliarin, R. *Helv. Chim. Acta*. **2003**, *86*, 615.

[50] Comby, S.; Scopelitti, R.; Imbert, D.; Charbonnière, L.; Ziessel, R.; Bunzli, J.-C. G. *Inorg. Chem*. **2006**, *45*, 3158.

[51] Edina Balogh, E.; Mato-Iglesias,M.; Platas-Iglesias, C.; Toth, E.; Djanashvili, K.; Peters, J.A.; Andres de Blas, A.;Teresa Rodrı´guez-Blas, T.R. *Inorg. Chem*. **2006**, *45*, 8719.

[52] Abada, S.; Lecointre, A.; Elhabiri, M.; Platas-Iglesias, C.; Tallec, G.; Mazzanti, M.; Charbonnière L.J. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 4085.

[53] Raymond, K. N. *Chem. Eng. News*. **1983**, *61*, 4.

Chapitre V

Marquage de biomolécules pour des applications en imagerie

L'utilisation du ^{64}Cu comme radiotraceur nécessite le développement d'un chélateur bifonctionnel qui sera capable de complexer le métal d'une façon sélective, avec une très forte stabilité et une cinétique de formation rapide ainsi qu'une inertie cinétique vis à vis de la transmétallation. Les études thermodynamique, cinétique et électrochimique de nos systèmes **L^1**, **L^2**, **L^3** et **L^4** ont montré que le ligand **L^1** peut avoir un grand potentiel dans des applications en imagerie médicale. Afin de finaliser ces premiéres études, le ligand **L^1** a été fonctionnalisé au sein de notre équipe par le Dr. Câline Christine et Mika Koubemba avec un groupement carbamate de N-hydroxysuccinimidyl (NHS) (Figure 5.1). [1] Ce groupement le rend extrêmement réactif vis-à-vis de protéines portant des groupements nucléophiles libres. Les réactions de couplage étudiées ont été réalisées en collaboration avec le professeur Laurence Sabatier (DSA/IPHC Strasbourg). Ces résultats ont été publiés récemment.[1]Afin d'introduire les résultats obtenus sur le marquage, les résultats précédemment publiés sont résumés dans les sections §1 à §3.1.

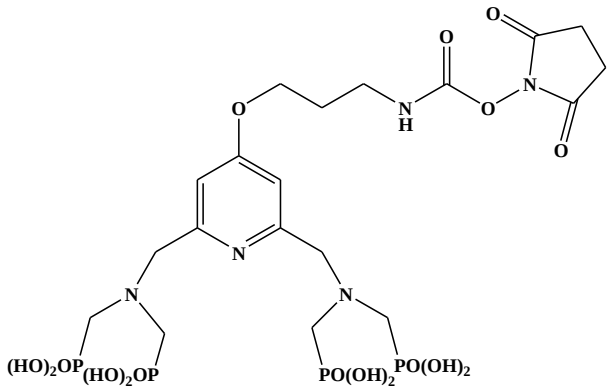


Figure 5.1 . *Structure chimique du ligand **L^1** fonctionnalisé (noté **L^A**) jouant le rôle de chélateur bifonctionnel (CBF).*

1. Etude de la cinétique d'hydrolyse de la fonction activée

Il a été observé que le groupement carbamate de N-hydroxysuccinimide (NHS), qui permet le couplage avec la biomolécule, s'hydrolyse en solution de la même façon que les esters NHS.[2, 3] Le suivie de l'hydrolyse par spectrométrie de masse ESI-MS en mode positif a montré que le chélatant activé est relativement stable à pH acide (90 min à pH 4 et 14 min à pH 6,8), sa demi-vie à pH basique est en revanche extrêmement courte (< 1 min à pH 8,6). Le mécanisme d'hydrolyse de la fonction carbamate NHS est dépendant du pH, puisqu'à pH

acide, c'est l'amine primaire (m/z = 587, $\mathbf{P_1}$) qui est formée tandis qu'à pH basique c'est la fonction carbamate qui est obtenue très majoritairement (m/z = 630, $\mathbf{P_2}$) (Figure 5.2).

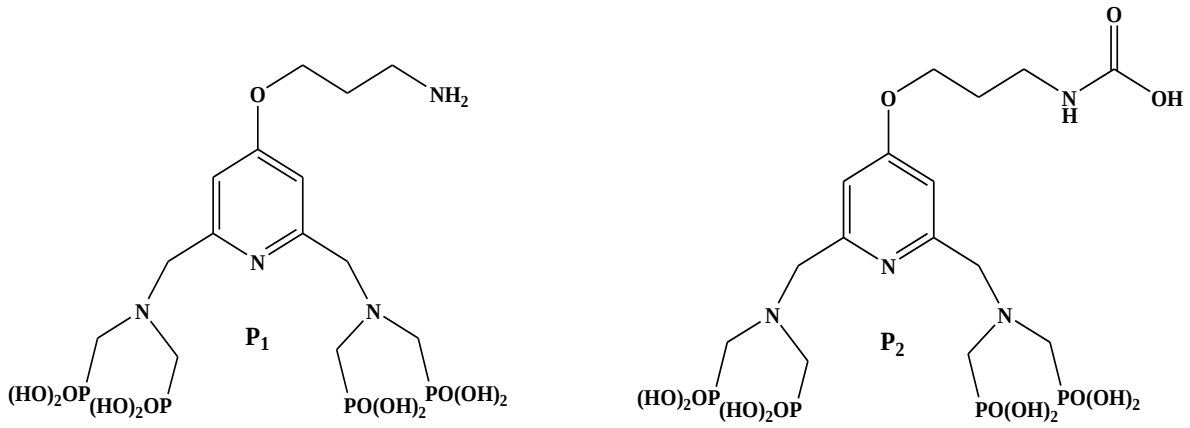


Figure 5.2. *Structures chimiques des deux produits d'hydrolyse.*

2. Mise au point de la réaction de couplage

2.1. Couplage avec une amine primaire

Afin de mettre au point les conditions expérimentales de la réaction de couplage, une étude préliminaire à été réalisée afin d'étudier la compétition entre l'hydrolyse de la fonction activée et la réaction de couplage aux biomolécules. Pour cela l'éthylamine a été utilisée système modèle.

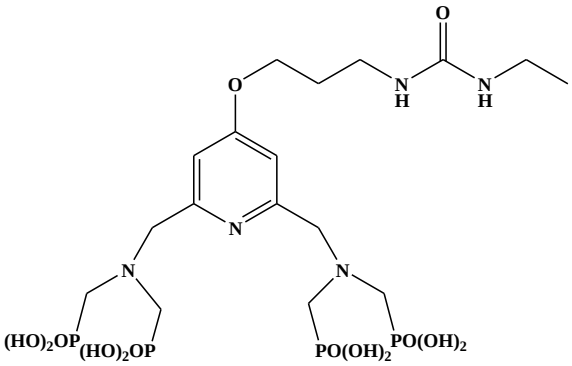


Figure 5.3. *Produit de couplage entre l'éthylamine et le CBF (**L**^{A}).*

Les résultats obtenus lors de cette étude préliminaire montrent qu'un ratio R = 0,8- 0,88 est obtenue au pH le plus élevé (pH = 9,9) ou l'amine primaire est sous sa forme déprotonée (pKa_{EtNH2} = 10,7) et qu'un large excès d'amine par rapport au CBF n'améliore pas le taux de couplage.

2.2. Réaction de couplage avec un peptide modèle A (SIINFEKL)

En tenant compte des résultats de l'étude d'hydrolyse du chélatant $\mathbf{L^A}$ ainsi que les données apportées par la littérature,[2,3,4,5] des essais de couplage ont été réalisés dans différents tampons et en excès de CBF. Le couplage a été réalisé en milieu tampon NH_4HCO_3 (100 mM) à pH = 8,2. La Figure 5.4 représente la réaction de couplage du peptide A avec le CBF.

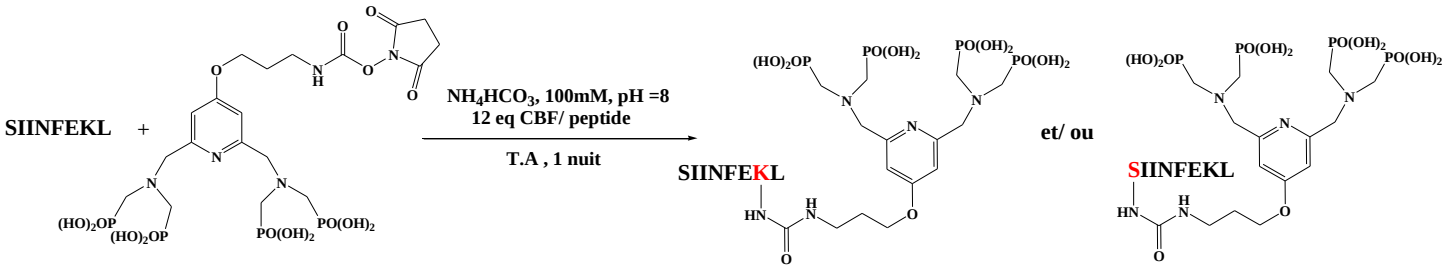


Figure 5.4. *Schéma du couplage du peptide A avec le CBF.*

Le produit de couplage a été analysé par spectrométrie de masse MALDI-MS. Le spectre de masse obtenu présente un pic à *m/z* = 1575,5 qui correspond à la forme $[M+H]^+$ en accord avec la masse calculée pour le peptide A couplé avec un seul CBF (m/z = 1575,6). Le peptide A marqué et purifié à été soumis à une digestion par l'endoprotéinase Glu-C (*Staphylococcus aureus* Protéase V8) qui est capable de couper sélectivement la liaison peptidique située après les acides glutamiques (Glu, E) (Figure 5.5).

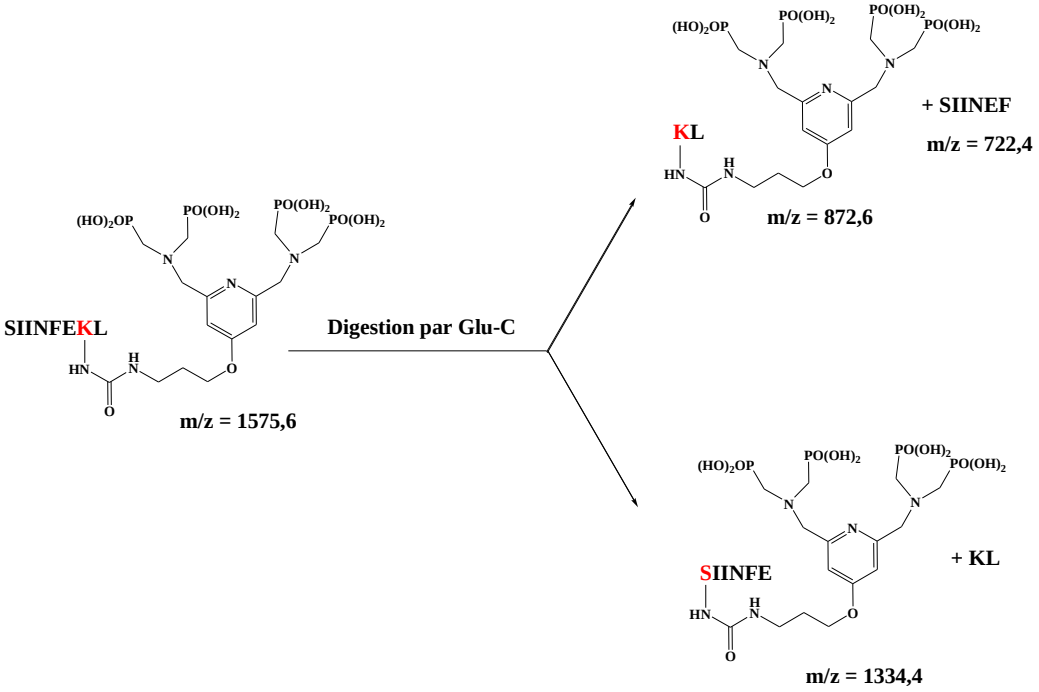


Figure 5.5. *Schéma des produits susceptibles d'être générés par l'enzyme Glu-C à partir du peptide A marqué.*

L'analyse par spectrométrie de masse du peptide A après digestion par l'enzyme Glu-C présente un pic à *m/z* = 1334,4 qui correspond à un produit de couplage effectué au niveau de l'amine N-terminale *SIINFE. Aucun pic n'est observé pour le couplage au niveau de la lysine, ce qui est en bon accord avec le p*K*a élevé de la Lys ε-NH_2 (p*K*a = 10,8) tandis que l'amine N-terminale a un p*K*a de 9,2. Dans le milieu réactionnel (pH = 8,2), il y a donc plus d'amines libres en position N-terminale que sur la chaîne latérale de la lysine.

La complexation du Cu(II) par le peptide A marqué a été suivie par spectrofluorimétrie en réalisant des ajouts successifs de Cu(II). Pour chaque ajout, un spectre d'émission est mesuré en excitant à 270 nm. (Figure 5.6).

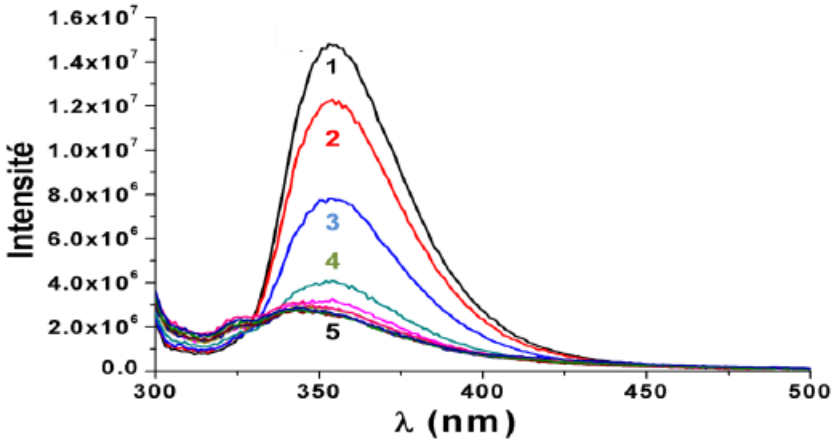


Figure 5.6. *Titrage fluorimétrique du peptide A marqué par le Cu(II).* ***1*** *: en absence de Cu(II);* ***2*** *: 0,25 eq de Cu(II);* ***3*** *: 0,5 eq;* ***4*** *: 0,75 eq et* ***5*** *: 1 eq ou plus de Cu(II) ($CuCl_2$) par rapport au peptide A marqué. λ_{ex} = 270 nm.*

En absence du Cu(II), le peptide A marqué présente une bande d'émission centrée à 355 nm après excitation de la bande d'absorption à 270 nm (transition π- π*) centrée sur la pyridine. La disparition progressive de la fluorescence lors de l'ajout progressif de Cu(II) s'explique par un transfert d'électron entre le centre métallique et l'état excité du cycle aromatique de la pyridine.[6,7] La complexation du cuivre(II) par le peptide A marqué a été confirmée par spectrométrie de masse (Figure 5.7).

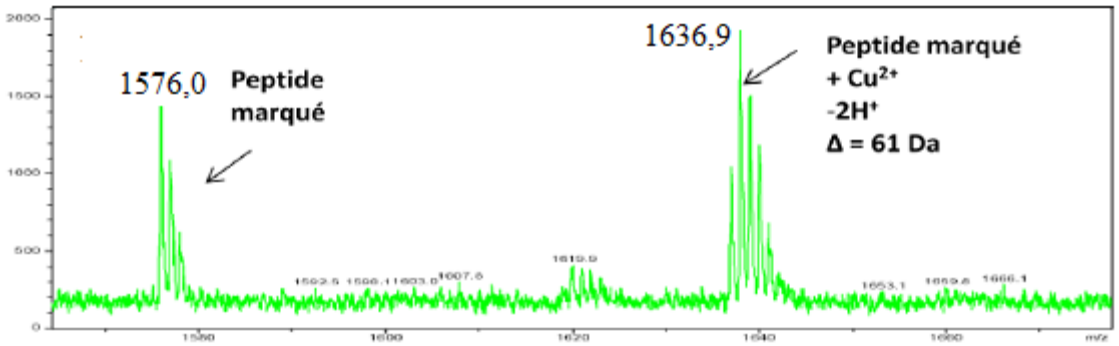


Figure 5.7 . *Spectre de masse MALDI du peptide A marqué après ajout du Cu(II).*

Le spectre de masse du peptide A marqué après complexation du Cu(II) présente un premier pic à m/z = 1636,9 qui correspond au complexe 1:1 et un deuxième pic à m/z = 1576,0 correspondant au peptide marqué non complexé par le Cu(II) due probablement à la dissociation partielle du complexe de Cu(II) dans le spectromètre.

2.3. Réaction de couplage avec le peptide modèle B (KLTPLCVSL)

Le groupement NHS est décrit comme sélectif vis-à-vis des amines primaires.[4] Pour cela, un second peptide modèle B a été utilisé afin de mettre en évidence cette sélectivité. Ce peptide modèle contient différents sites de couplage potentiel sur les amines primaires, en position N-terminale sur la chaîne latérale de la lysine et sur le groupement thiol de la cystéine. La réaction de couplage a été réalisée selon le schéma suivant :

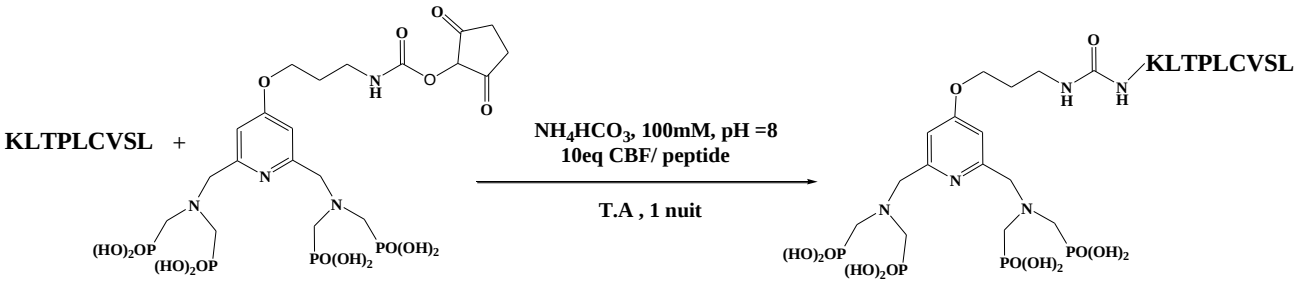


Figure 5.8 . *Schéma de couplage du peptide B avec* L^A.

Le milieu réactionnel du couplage a été ensuite soumis à une alkylation avec l'iodoacétamide puis analysé par spectrométrie de masse afin de savoir si les cystéines sont impliquées dans la réaction de couplage. La réaction d'alkylation des cystéines est représentée comme suit :

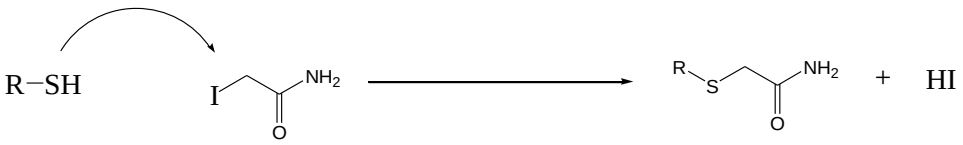


Figure 5.9. *Mécanisme d'alkylation des cystéines par l'iodoacétamide*

Un décalage de 57 Da après l'ajout de l'iodoacétamide est observé pour les pics à m/z = 973,6 (peptide B) et m/z = 1585,6 (peptide B marqué). Cela signifie que toutes les cystéines étaient disponibles à la fin de la réaction de couplage, ce qui confirme que cette dernière est réalisée sur la lysine. Il n'a pas été possible de déterminer sur laquelle des amines primaires de la lysine terminale (Figure 5.10) le couplage a eu lieu.

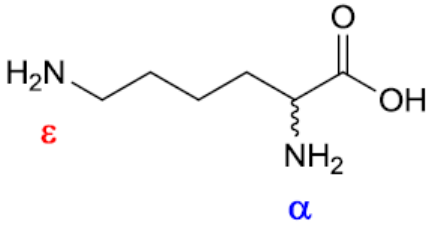


Figure 5.10. *Structure de la lysine*

3. Marquage des anticorps

Le marquage de l'anticorps B28-13 par Séverine Clavier et les détails expérimentaux sont décrits ci-dessous. J'ai appliqué les mêmes protocoles pour le marquage de l'anticorps RAM1 (§ 3.2).

3.1. Marquage de l'anticorps B28-13

La ténascine-C (TNC) est une glycoprotéine de la matrice extracellulaire, de haut poids moléculaire, jouant un rôle dans l'embryogenèse, la cicatrisation et les processus néoplasiques. Chez l'homme, elle s'exprime normalement dans la tunique musculaire lisse des vaisseaux, ainsi que dans le tissu osseux. [8,9] La TNC est exprimée également lors de plusieurs situations pathologiques et elle est augmentée dans diverses tumeurs chez l'homme (tumeur du sein, lymphomes B, tumeurs astrocytaires).[10] Beaucoup d'anticorps ont été développés et certains d'entre eux sont en essai préclinique ou clinique.[11] Le B28-13 est un anticorps monoclonal de souris anti-ténascine humaine qui reconnait spécifiquement les répétitions 13-15 du domaine FN de type III de la TNC humaine,[12] un motif qui est présent dans tous les TNCs. Le B28-13 a été choisi comme un anticorps à marquer avec le chélateur bifonctionnel du ^{64}Cu (ligand $\mathbf{L^A}$) pour des applications en imagerie TEP du cancer.

3.1.1. Détermination de la concentration de B28-13

Avant de réaliser la réaction de couplage du B28-13 avec le ligand $\mathbf{L^A}$ fonctionnalisé, la concentration de l'anticorps à été déterminée par la méthode de Bradford.[13] Le principe de cette méthode est basé sur la mesure de l'absorbance du colorant bleu de Coomassie (maximum à 465 et 470 nm). Ce dernier s'adsorbe sur les protéines et cette complexation provoque un transfert de son pic d'absorption du rouge au bleu (maximum à 595 nm). Cette adsorption se fait principalement par des liens ioniques avec des acides aminés basiques (arginine, histidine, et lysine) et des interactions hydrophobes (acides aminés hydrophobes). Cette méthode nécessite la réalisation de courbe d'étalonnage par spectrophotométrie UV-visible à l'aide d'une solution de protéine à une concentration connue, dans notre cas c'est l'BgG (Bovine Gammaglobuline). La mesure de l'absorbance à 595 nm permet de déterminer la concentration de la protéine dans le milieu. La concentration de l'anticorps était de 0,7 mg ml^{-1}.

3.1.2. Analyse par spectrométrie de masse de B28-13

L'analyse par spectrométrie de masse MALDI/MS de l'anticorps B28-13 nous a permis de déterminer sa masse moléculaire. Le spectre de masse obtenu (Figure 5.11) montre la présence de deux pics à 148000 Da et à 74000 Da qui correspondent aux espèces mono et di chargé respectivement. La masse de l'anticorps est donc estimée à 148000 Da.

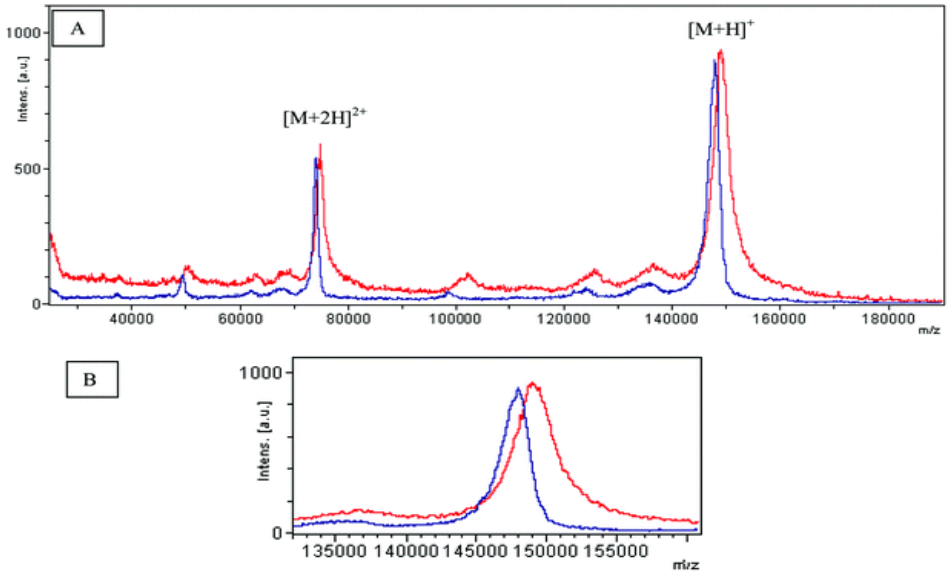


Figure 5.11 . *(A) Spectre de masse de l'anticorps B28-13 avant marquage (en bleu) et après marquage (en rouge).(B) Zoom de la région 135000- 160000 qui montre un déplacement de 800 unités de la masse de l'anticorps B28-13 du au marquage avec le CBF.*

3.1.3. Réaction de couplage

A une solution d'anticorps, un large excès de CBF est ajouté (200 équivalents) afin de tenir compte de l'hydrolyse du CBF et pour avoir un taux de marquage le plus élevé possible. Le pH de la solution est ajusté à 7,4 avec une solution de tampon phosphate salin (PBS) et le milieu réactionnel a été agité à température ambiante pendant une heure. Des microfiltrations (20 cycles) sur Vivaspin 500 (30 kDa cut-off) et Tris-HCl (10 mM à pH 7,4) ont été effectué afin d'éliminer l'excès de ligand $\mathbf{L^A}$. Le produit de couplage est caractérisé par spectrométrie de masse MALDI/MS (Figure 15). Le spectre de masse de l'anticorps marqué montre un déplacement d'environ 800 unités, ce qui correspond à un taux de marquage d'un chélatant par anticorps.

3.1.4. Immunofluorescence de l'anticorps B28-13 marqué

Afin de vérifier que le marquage de l'anticorps B28-13 par le chélatant bifonctionnel n'a pas perturbé son affinité pour son antigène, des tests d'immunofluorescence ont été réalisés sur des sections tissulaires (biopsie) d'un patient atteint d'un cancer colorectal en collaboration avec Gertraud Orend et Falk Saupe (INSERM) (Figure 5.12).

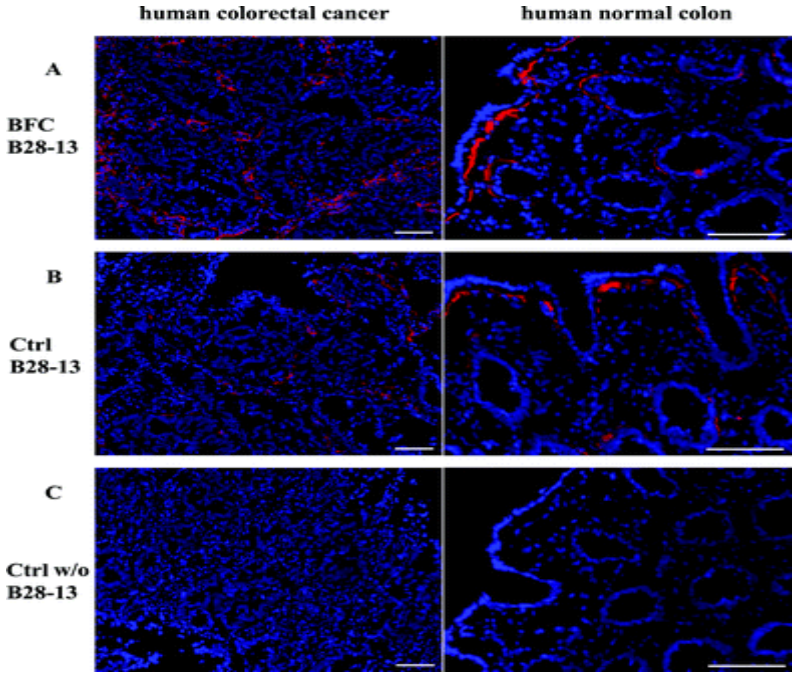


Figure 5.12. *Tests d'immunofluorescence de l'anticorps B28-13 sur des biopsies d'un patient atteint d'un cancer colorectal. A droite patient sain, à gauche patient atteint du cancer colorectal. A) B28-13 marqué, B) B28-13 non modifié et C) absence de l'anticorps secondaire.*

L'activité de l'anticorps B28-13 marqué a été testée après marquage sur une coupe de cancer de côlon humain, puis révélée par un anticorps secondaire contenant un colorant. Ce test a révélé que l'anticorps a toujours une bonne affinité pour sa cible.

3.2. Marquage de l'anticorps RAM1

Nous avons tenté de marquer un second anticorps spécifique des plaquettes sanguines, RAM1, avec notre chélateur bifonctionnel $\mathbf{L^A}$. Nous avons suivi les mêmes étapes que pour le marquage de B28-13. L'anticorps RAM1 a été fourni par nos collaborateurs de l'INSERM à Strasbourg (Dr. Pierre Mangin, établissement Français du sang, INSERM U949).

Dans un premier temps, nous avons déterminé la concentration de l'anticorps fourni grâce à un dosage Bradford en utilisant la BgG pour la gamme d'étalonnage (Figure 5.13). La concentration de l'anticorps RAM1 était de 3,6 ± 0,1 mg ml^{-1}.

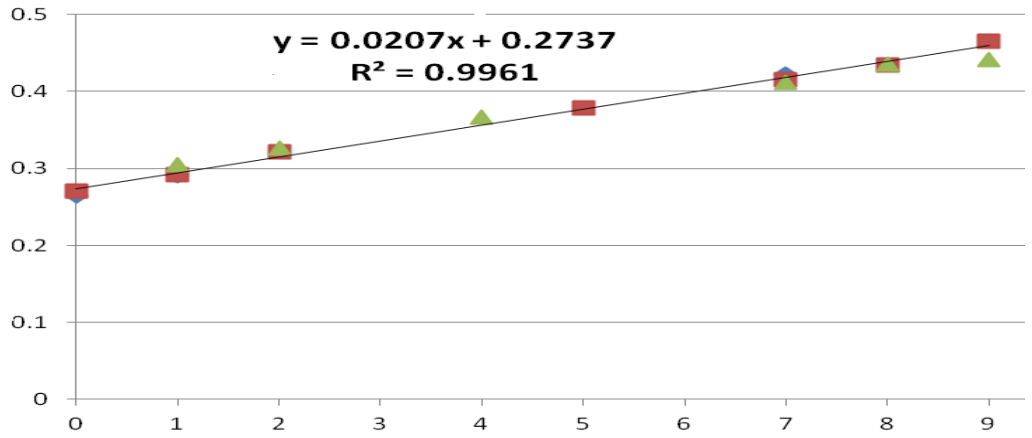


Figure 5.13. *Courbe de calibration obtenue avec la BgG comme standard du test de Bradford.*

La masse moléculaire du RAM1 a été déterminée par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Figure 5.14). Le spectre de masse montre un signal très faible vers 146 kDa qui correspond à la masse de notre anticorps, un deuxième signal vers 74 kDa est attribué à l'espèce dichargée. Un troisième signal est observé vers 100 kDa et pourrait correspondre à un fragment de l'anticorps ou à une autre protéine.

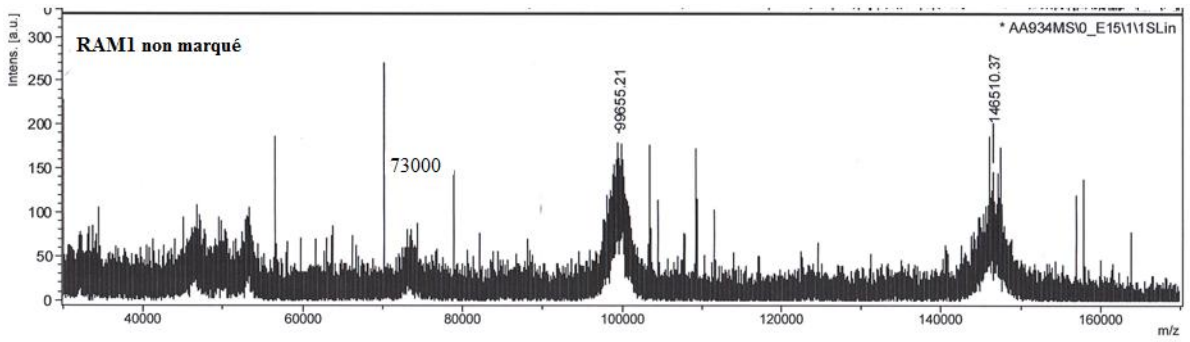


Figure 5.14. *Spectre de masse MALDI -TOF de l'anticorps RAM1*

Le marquage du RAM1 avec le CBF $\mathbf{L^A}$ a été réalisé avec 250 équivalents de CBF à pH 7,4 dans un tampon PBS. L'excès du CBF a été éliminé par microfiltration (20 cycles) sur Vivaspin 500 (30 kDa cut-off) avec du Tris-HCl (10 mM à pH 7,4). Le produit de couplage est caractérisé par spectrométrie de masse MALDI-TOF et sa concentration a été déterminée par un dosage Bradford : C = 1,95 ± 0.03 mg ml^{-1}. Le spectre de masse du RAM1 couplé au CBF montre un décalage de 1178 Da ce qui signifie que l'anticorps est marqué par 1,5 CBF en moyenne.

L'anticorps RAM1 marqué a été ensuite envoyé à l'équipe du Dr. Pierre Mangin pour tester l'affinité de l'anticorps marqué pour sa cible. Les tests d'affinité ont été réalisés par cytométrie de flux en mesurant l'affinité de RAM1 marqué avec les plaquettes sanguines après incubation avec un anticorps secondaire fluorescent reconnaissant RAM1. Malheureusement, les résultats montrent une perte d'affinité après marquage (Figure 5.15) qui correspond soit à la perte d'affinité de RAM1 marqué pour les plaquettes, soit à la perte d'affinité de l'anticorps secondaire vis-à-vis de RAM1. Des études complémentaires sont actuellement en cours pour élucider les raisons de cette perte d'affinité.

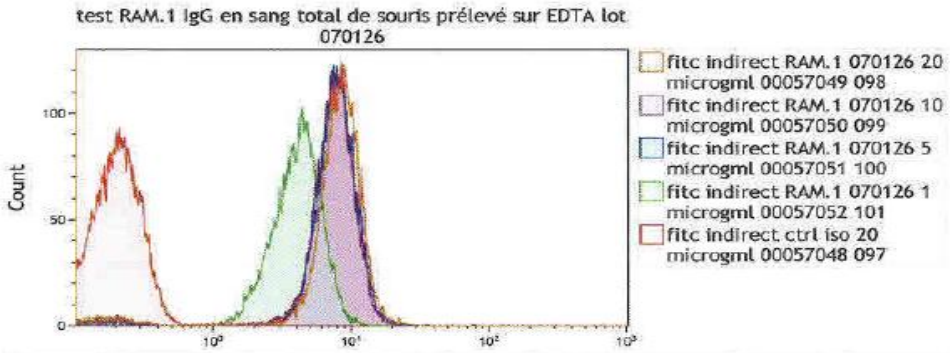


Figure 5.15. *Diagramme de cytométrie de flux pour RAM1 non marqué (gauche) et RAM1 marqué avec* $\boldsymbol{L^A}$ *(droite), montrant la perte d'affinité de l'anticorps vis-à-vis des plaquettes.*

4. Applications en Imagerie

4.1. Imagerie TEMP

Des images TEMP du petit animal ont été obtenues avec les complexes de ^{99m}Tc formé avec les ligands $\mathbf{L^1}$ et $\mathbf{L^2}$ non fonctionnalisés. Ces images ont été obtenues grâce à une collaboration avec le Dr. Ali Ouadi et le Dr. David Brasse (IPHC) (Figure 5.16).

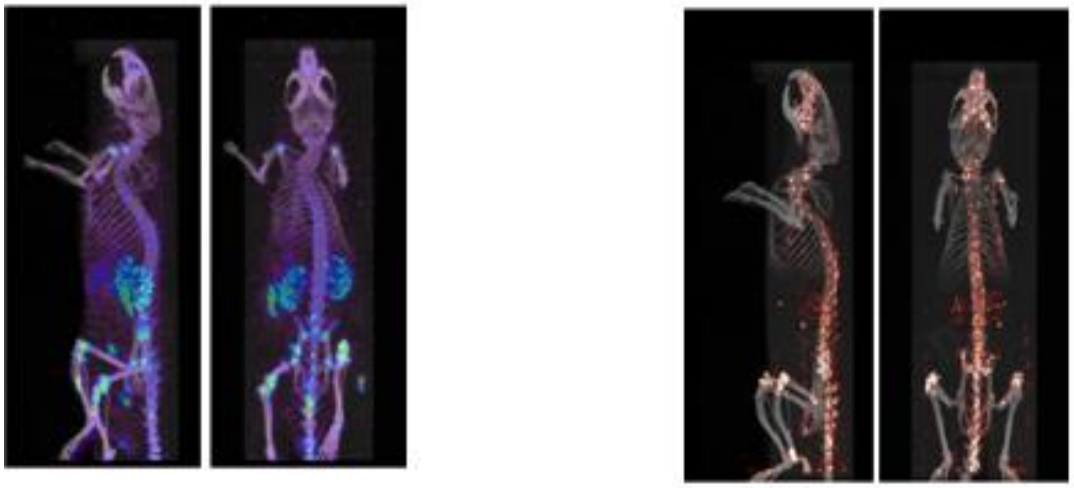


Figure 5. 16. *Images TEMP obtenues 4 heures après injection d'un complexe de ^{99m}Tc$\mathbf{L^1}$ (droite) et d'un complexe de ^{99m}Tc$\mathbf{L^2}$ (gauche) à une souris.*

Les images TEMP montrent que le complexe avec $\mathbf{L^1}$ se fixe préférentiellement sur les parties cartilagineuses du squelette de la sourie (genoux, épaules, colonne vertébrale, cloison nasale). L'élimination se fait par voie rénale et de faibles traces sont visibles au niveau des reins.

En remplaçant deux fonctions phosphonates par des groupements éthyls ($\mathbf{L^1} \rightarrow \mathbf{L^2}$), la biodistribution est totalement différente. Le complexe est beaucoup plus rapidement éliminé par voie rénale et la fixation sur les parties cartilagineuses est beaucoup plus faible. Le remplacement des phosphonates par des groupements éthyls conduit probablement à une lipophilisation du complexe, qui est plus facilement éliminé.

4.2. Imagerie IRM

Le Dr Philipe Choquet (UF6237 Imagerie Préclinique Biophysique et Médecine Nucléaire, Hôpital de Hautepierre) a réalisé des images IRM avec le complexe de Gd(III) formé avec le ligand $\mathbf{L^1}$ (Figure 5.17).

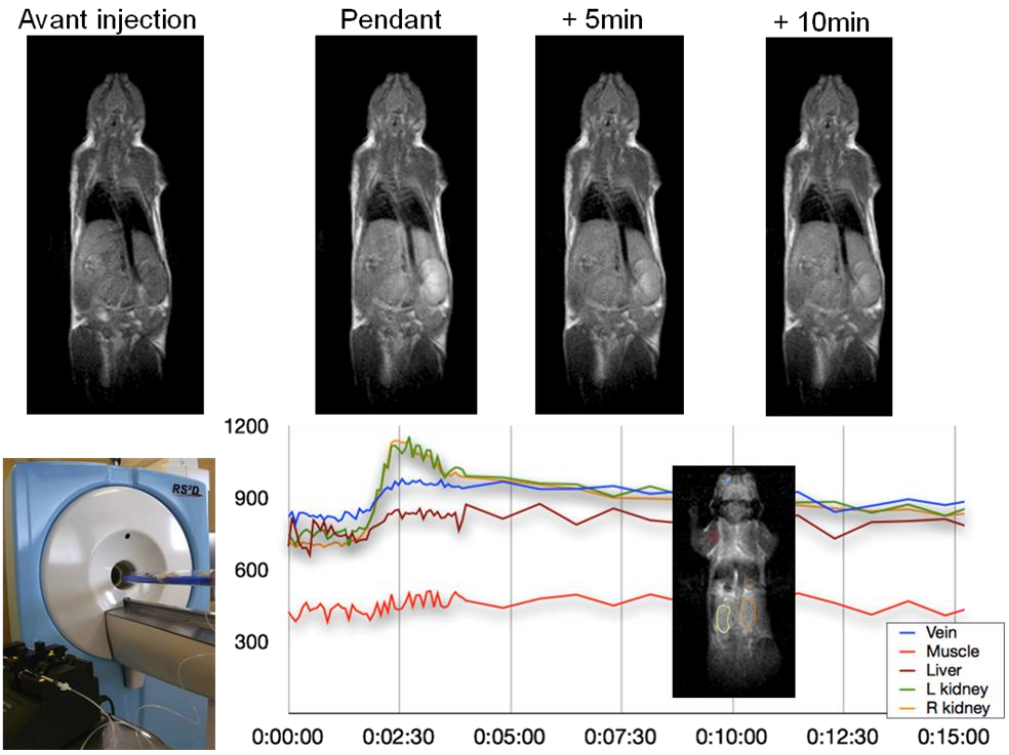


Figure 5. 17. *Suivie cinétique de la biodistribution du complexe Gd**L**[1]dans la souris.*

Après injection par voie intraveineuse de 100 µl d'une solution aqueuse à 10^{-2} M du complexe, la biodistribution a été suivie dans le temps avec un imageur pour petit animal (modèle RS2D optimouse, 1,5 T). Des régions d'intérêt ont été sélectionnées (Figure 5.17), montrant que le complexe est rapidement distribué dans tout le corps par la circulation sanguine. Cependant, il est très rapidement accumulé dans les reins par lesquels il sera éliminé. Aucune trace n'a été mise en évidences dans les muscles ou le foie.

Si le réhaussement de la relaxivité du au complexe de Gd est très prometteur, son élimination est trop rapide pour pouvoir envisager son application pour l'angiographie par exemple. L'ajout de chaine hydrophiles de type polyéthylène glycol pourrait permettre d'augmenter le temps de rétention avant son élimination.

Conclusion

Les études menées au laboratoire ont permis de synthétiser un ligand $\mathbf{L^A}$ tétraphosphonaté activé avec un groupement carbamate de N-hydroxysuccinimidyl (NHS) pour réaliser des couplages avec des biomolécules modèles ou d'intérêt (peptide, anticorps, protéine) dans le but de faire de l'imagerie.

Des méthodes d'analyse par spectrométrie de masse et de purification par HPLC ont été développées afin de caractériser les différents produits de couplage. Tout d'abord, la stabilité du chélatant bifonctionnel a été étudiée à différentes valeurs de pH. Cette étude a montré que le CBF est stable à pH acide et s'hydrolyse rapidement à pH basique. Dans un deuxième temps, les conditions de couplage ont été optimisées, ce qui a permis de marquer deux peptides modèles A et B. L'étude du premier peptide marqué a permis de déterminer que le couplage s'effectuait sur l'amine située en position N-terminale et non sur la chaîne latérale de la lysine. Le marquage du peptide B a confirmé la sélectivité de la fonction réactive carbamate NHS vis-à-vis des amines primaires.

Nous avons également réussi à marquer deux anticorps B28-13 et RAM1 avec un taux de marquage de 1 à 1,5 CBF par anticorps. Les tests d'immunofluorescence du B28-13 pour sa cible nous ont permis de confirmer que le marquage de cet anticorps n'a aucun effet sur son affinité pour sa cible. Dans le cas de RAM1, l'affinité pour les plaquettes a disparu après marquage, sans que les causes ne soient encore clairement identifiées.

Des images par Tomographie par Emission Monophotonique (TEMP) de la souris ont été réalisées avec les complexes de ^{99m}Tc formés avec les ligands $\mathbf{L^1}$ et $\mathbf{L^2}$. Les expériences ont clairement montré que les radiotraceurs de $\mathbf{L^1}$ se fixent sur le cartilage et s'éliminent rapidement par les reins. Les radiotraceurs de $\mathbf{L^2}$, quant à eux, ont une biodistribution différente de celle de $\mathbf{L^1}$ et ils s'éliminent rapidement par voie rénale à cause de la lipophilie du complexe. Les images IRM obtenues, avec le complexe de gadolinium(III) formé avec $\mathbf{L^1}$, ont fourni des résultats encourageants qui montre que le complexe Gd$\mathbf{L^1}$ se distribue dans tous le corps mais son temps d'élimination est trop rapide, ce qui constitue un inconvénient pour des applications en IRM.

Partie expérimentale

Stabilité du ligand L^A en solution

Des solutions de ligand ont été préparées à différentes valeurs de pH : pH = 4,0 (ajustement avec de l'acide formique), pH = 6,8 (CH_3COONH_4, 50mM), pH = 8,6 ($(NH_4)_2CO_3$, 50mM) puis ont été infusées dans le spectromètre de masse (MicroTOF-Q, Bruker Daltonics). Le flux d'infusion était de 180 µl h^{-1} et les spectres ont été mesurés dans une gamme de *m/z* de 50-1500. L'intensité des pics à *m/z* = 587, 630 et 728 a été relevée à différents temps.

Réaction de couplage des peptides modèles A et B

La pureté du chélateur à été déterminée par RMN (chélateur activé/chélateur hydrolysé) et a été estimée à environ 25% lors du couplage des peptides modèle A, B et de l'anticorps B28-13. La pureté du $\mathbf{L^A}$ était d'environ 14% lors du couplage avec l'anticorps RAM1.

Couplage des peptides A et B

Les réactions de couplage ont été réalisées dans une solution de NH_4HCO_3 100mM à laquelle sont ajoutés le peptide (A ou B), sous forme de solution, et $\mathbf{L^A}$ sous forme de solide. Le pH du milieu réactionnel a été ajusté à pH = 8 par ajout de NH_4HCO_3 100mM. Le mélange réactionnel est ensuite laissé une nuit à température ambiante.

Analyse MALDI/MS du peptide A marqué

Les spectres MALDI-TOF ont été obtenus avec un spectromètre Ultraflex (Bruker Daltonics) piloté par le logiciel Flexcontrol. Selon les cas, les matrices HCCA, THAP et DHB ont été utilisées. Dans le cas du peptide A, la matrice HCCA est utilisée. Elle est préparée à partir d'une solution saturée d'HCCA dans une solution 50% ACN et diluée 2 fois dans une solution 50% ACN + 0,1% TFA. La matrice THAP est préparée en mélangeant dans un ratio 9:1 une solution de THAP (10 mg/mL) dans 50% ACN et une solution aqueuse de citrate d'ammonium (50 mg/mL). Cette dernière a été utilisée pour mesurer le spectre de masse du peptide B.

Analyse HPLC

Le milieu réactionnel de couplage a été purifié par RP-HPLC (12 injections de 50 µL) sur un système Agilent en utilisant une colonne Poroshell 120 EC-C18 - 2,7 µm - 2,1×100

mm. Le produit de couplage A est élué à TR = 14,5 minutes avec un gradient de 10 à 45% de B en 30 min (A : H_2O + 0,1%TFA ; B : MeOH + 0,1%TFA) et à un débit de 0,8 mL min^{-1}.

Digestion par l'enzyme Glu-C

Dans un eppendorf de 500 µL sont introduits environ 5 µg de peptide A marqué, du tampon NH_4HCO_3 100 mM et l'endoprotéinase Glu-C (*Staphylococcus aureus* Protease V8) en solution dans de l'eau mQ (0,5 µg, soit un ratio enzyme/peptide de 1:10). Après 3 heures de digestion à température ambiante, le milieu réactionnel est acidifié par une solution de TFA à 10% (1 µL) puis analysé par MALDI-MS avec une matrice THAP (2,4,6-Trihydroxyacetophenone).

Analyse spectrofluorimétrique

Le dosage fluorimétrique a été réalisé sur l'échantillon de peptide A marqué, purifié par HPLC (400 µL de solution dont la concentration est estimée à 5×10^{-5} M soit 2×10^{-8} mole). L'émission est mesurée au niveau de son maximum à λ=355nm après une excitation réalisée à 270 nm. La valeur de l'émission est mesurée sur le produit de couplage A seul puis après chaque ajout de Cu(II) (1 ajout = 3 µL de solution de Cu(II) à $2,5 \times 10^{-4}$ M, 0,25 équivalent).

Alkylation des cystéines

Dans un eppendorf de 500 µL sont introduits successivement 5 µL du milieu réactionnel (correspondant à 3 µg de peptide B, 3 nmoles, 1équivalent), du tampon CH_3COONH_4 50 mM (5 µL, pH=8,6), de l'iodoacétamide sous forme d'une solution à 1 µg/µL (8 µL, 40 nmoles, 13 éq). Le milieu réactionnel est laissé 1 heure à température ambiante, à l'abri de la lumière puis est acidifié et analysé en MALDI-MS avec une matrice THAP.

Marquage des anticorps B28-13 et RAM1

La caractérisation des anticorps a été réalisée par spectrométrie de masse MALDI-TOF afin de déterminer leurs masses moléculaires et un dosage Bradford a été utilisé afin de déterminer les concentrations des anticorps avant et après marquage.

La réaction de couplage a été effectuée en utilisant un excès de CBF, le pH du milieu est ajusté à 7 avec un tampon PBS et le milieu a été maintenu sous agitation à température ambiante pendant une heure. L'excès de CBF a ensuite été éliminé par ultrafiltration sur des modules vivaspin 500 (Sartorius) avec un cut-off de 30 kDa et lavé plusieurs fois (20 cycles)

avec un tampon Tris-HCl 0,01 M à pH 7. Le spectre de masse du produit de marquage a été obtenu après dessalage sur ZipTip C18 sur une plaque MALDI.

Immunofluorescence du B28-13 après marquage

L'activité de l'anticorps B28-13 marqué a été testée suite au marquage sur une coupe de cancer de côlon humain, puis révélée par un anticorps secondaire contenant un colorant. Ce test a révélé que l'anticorps a toujours une bonne affinité pour sa cible.

Bibliographie

[1] Christine, C. ; Koubemba, M. ; Shakir, S. ; Clavier, S. ; Sabatier, L. ; Saupe, F. ; Orend, G. ; Charbonnière L.J. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 9183.

[2] Morpurgo M., ;Bayer E.A.;Wilchek M. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **1999**, *38*, 17.

[3] Tournier E.J.M.; Wallach J.; Blond, P. *Anal. Chim. Acta.* **1998**, *361*, 33.

[4] Brinkley, M. *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 2.

[5] Protocol NHS ester labeling of amino-biomolécules. *Lumiprobe.* *http://www.lumiprobe.com*.

[6] Jiang L.; Luo Q-H.; Li, Q-X.; Shen, M-C.; Hu, H-W. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2002**, 664.

[7] de Silva, A. P.; Gunaratne, H. Q. N.; Gnnlaugsson, T.; Huxley, A. J. M.; McCoy, C. P.; Rademacher, J. T.; Rice, T. E. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1515.

[8] Chiquet-Ehrismann, R.; Tucker, R. P. *Persp. Biol*. **2011**, *3*, a004960.

[9] Sevastre, B.; van Ederen, A.M.; Terlou, M.; Gruys, E.; Nederbragt, H. *J. compar. Pathol*. **2007**, *136*, 49.

[10] Orend, G.; Chiquet-Ehrismann, R. *Cancer Lett*. **2006**, *244*, 143.

[11] Midwood, K. S.; Hussenet, T.; Langlois B.; Orend, G. *Cell. Mol. Life Sci*. **2011**, *68*, 3175.

[12] Schenk, S.; Muser, J.; Vollmer, G.; Chiquet-Ehrismann, R. *Int. J. Cancer*, **1995**, *61*, 443

[13] MRI. In *Protein Analysis and Purification*; Second Ed.; Birkhaüser: Boston, **2005**.

Conclusion générale

Ce travail de thèse a été consacré au développement et à l'étude d'une nouvelle famille de chélateurs bifonctionnels (CBF) pour le marquage de biomolécules en vue de leurs utilisations en imagerie médicale. Dans cet objectif, nous avons réalisé la synthèse de quatre ligands acycliques polyaminophosphonatés (**L^1-L^4**) intégrant dans leurs structures un chromophore pyridinique et des bras phosphonates qui permettent la complexation de cations métalliques divalents et trivalents (Cu(II), Zn(II), Ni(II), Ln(III) et Ga(III)) et la photosensibilisation d'ions lanthanides(III). Cette série de ligands est homogène a été développée et étudiée dans l'objectif d'évaluer l'influence du nombre d'unités phosphonates (denticité, charge…) sur les propriétés physico-chimiques (stabilité thermodynamique, cinétique de formation, balance inertie/labilité, propriétés et stabilité électrochimiques…) des ligands libres et de leurs complexes métalliques.

Grâce à une combinaison fructueuse de méthodes potentiométriques et spectrophotométriques en solution aqueuse, il a tout d'abord été possible de déterminer les propriétés acido-basiques des ligands **L^1- L^4**. Cette étude nous a permis de calculer et d'attribuer plusieurs valeurs de constantes de protonation. Les constantes les plus basiques ont été attribuées aux amines tertiaires. La pyridine, qui constitue le principal chromophore de cette série de ligand, est l'un des sites les plus acides et sa constante de protonation n'a pas pu peut être déterminée dans nos conditions expérimentales. Cette acidité très élevée de cette unité pyridine peut être expliquée par la formation de ponts hydrogène entre l'azote pyridinique et les amines tertiaires protonées. Les secondes constantes de protonation des groupements phosphonates n'ont pas pu également être déterminées dans nos conditions expérimentales (log K << 2). Des études par spectrophotométrie d'absorption en fonction du pH ont permis de confirmer les attributions ainsi que les valeurs des constantes de protonation déterminées par potentiométrie.

Toujours grâce à la même panoplie de méthodes analytiques, les propriétés de coordination du cuivre(II) par ces CBFs ont été étudiées afin d'évaluer la stabilité et la sélectivité de la complexation du Cu(II) par rapport à d'autres métaux divalents et trivalents (Ni(II), Zn(II), Co(II) et Ga(III)). Les résultats obtenus ont montré que nos chélateurs forment des complexes monocuivriques très stables (log $K_{\mathrm{Cu}\mathbf{L1}}$= 22,71(7), log $K_{\mathrm{Cu}\mathbf{L2}}$ = 19,50(9), log $K_{\mathrm{Cu}\mathbf{L3}}$ = 19,10(3) et log $K_{\mathrm{Cu}\mathbf{L4}}$ = 19,30(6)). Le ligand **L^1**, qui possède respectivement une et deux unités méthanephosphonates additionnelles par rapport à ses analogues **L^2** et **L^3/L^4** forme les complexes monocuivriques les plus stables.

Une étude spectrophotométrique (absorption) nous a permis de montrer que les amines tertiaires étaient, quel que soit le pH considéré (2,5 < pH < 11,5), fortement impliquées dans la coordination du Cu(II) et que les sites phosphonates complétaient la sphère de coordination du cation cuivrique. La complexation du Cu(II) par les ligands **L^1- L^4** est, en outre, très sélective comparée à celles du Zn(II), du Ni(II), du Co(II) ou du Ga(III). Le calcul des valeurs de pCu dans des conditions arbitraires de pH et de concentrations en ligand et en métal (pCu^{2+}= - log $[Cu^{2+}]_{libre}$ pour $[L]_{tot} = 10^{-5}$ M et $[Cu^{2+}]_{tot} = 10^{-6}$ M) nous a permis de comparer la stabilité des complexes de Cu(II) formés avec les ligands **L^1- L^4** avec d'autres chélateurs décrits dans la littérature. Par exemple, le ligand tétraphosphonaté **L^1** conduit à des complexes cuivriques de très forte stabilité après le **DO2P**, l'un des ligands phosphonatés les plus efficaces décrit à ce jour pour la complexation du Cu(II)).

La spectroscopie RPE et les calculs DFT réalisés sur le complexe Cu**L^1** ont par ailleurs montré que le Cu(II) est pentacoordiné et présente une géométrie de coordination pyramidale à base carrée déformée. La base carrée de la pyramide semble être constituée d'un atome d'azote appartenant à l'une des deux amines tertiaires et de trois atomes d'oxygène des groupements méthanephosphonates coordinés au Cu(II). La position apicale de la pyramide est occupée par l'atome d'azote de la pyridine.

La cinétique de formation et de dissociation des complexes de Cu(II) formés avec les ligands **L^1- L^4** a été étudiée au moyen de techniques de mélange rapide. Cette étude a montré que la complexation du Cu^{2+} en milieu acide est très rapide et suit un mécanisme d'Eigen-Wilkins à caractère dissociatif. La première étape, très rapide, conduit à la formation d'un complexe intermédiaire [Cu**L'**]* qui se caractérise par une faible stabilité. La seconde étape, qui est une étape limitante, correspond à un réarrangement du complexe cinétique intermédiaire et implique la coordination des unités phosphonates pour conduire à la formation des complexe thermodynamiques [Cu**L'**].

La cinétique de dissociation des complexes de Cu(II) formés avec les ligands **L^1-L^4** a été également étudiée par attaque du proton. Cette étude a montré l'existence de plusieurs étapes rapide qui ne sont pas accessibles avec notre technique spectroscopique. Une seule étape limitante est observée et semble correspondre à la protonation de l'une des liaisons N_{tert}–Cu(II) puis à sa dissociation pour conduire à un intermédiaire qui se dissocie ensuite très rapidement par attaque d'un second proton. C'est le ligand **L^2** qui se caractérise par la plus

forte inertie cinétique par rapport à $\mathbf{L^1}$ ou $\mathbf{L^3}$. La cinétique de dissociation du complexe Cu$\mathbf{L^4}$ n'a pas pu être étudiée à cause de sa dissociation très rapide en milieu acide.

Après ces études thermodynamiques et cinétiques, nous avons mené une étude électrochimique de l'ensemble des systèmes en solution aqueuse en fonction du pH. Ces études électrochimiques, menées sur les complexes de cuivre (II) formés avec les ligands $\mathbf{L^1}$-$\mathbf{L^4}$, ont montré, qu'à pH acide, les systèmes semblent irréversibles et présentent deux pics de réduction qui pourraient témoigner de la coexistence de plusieurs espèces protonées. La présence d'un pic de redissolution anodique indique que les complexes cuivreux générés par électroréduction ne sont pas stables et se dissocie très rapidement par rapport à l'échelle de temps de nos expériences électrochimiques. En milieu basique, les profils électrochimiques se simplifient avec la présence d'un signal quasi-réversible. D'autre part, la variation des vitesses de balayage nous indiquent, qu'excepté le Cu$\mathbf{L^4}$, les processus électrochimiques ne sont pas gouvernés par la diffusion.

Nous avons ensuite évalué les propriétés de coordination de plusieurs cations lanthanides(III) (Nd, Eu, Gd, Tb, Er et Lu), représentatifs de la série des terres rares. Le ligand $\mathbf{L^1}$ s'est révélé comme étant un ligand très efficace pour la coordination des Ln(II) contrairement aux systèmes $\mathbf{L^2}$ et $\mathbf{L^3}$ qui forment des complexes de Ln(III) de plus faibles stabilités. Ceci peut s'expliquer par l'absence respectivement d'une ou de deux unités phosphonates pour $\mathbf{L^3}$ et $\mathbf{L^2}$ par rapport à $\mathbf{L^1}$. L'étude des complexes de lanthanides(III) formés avec le ligand $\mathbf{L^4}$ n'a pas pu être réalisée du fait de problème de solubilité des complexes correspondants. Les calculs DFT menés sur le complexe Gd$\mathbf{L^1}$ et des mesures en RMN du proton effectuées pour le complexe diamagnétique Lu$\mathbf{L^1}$ suggèrent que les complexes de Ln(III) formés avec le ligand $\mathbf{L^1}$ présentent une géométrie de coordination qui implique la coordination de l'azote pyridinique, les deux amines tertiaires et quatre atomes d'oxygène des groupements phosphonates. Une molécule d'eau complète la sphère de coordination de l'ion lanthanide.

La mesure de la relaxivité des complexes de Gd(III) formés avec les ligands $\mathbf{L^1}$-$\mathbf{L^3}$ s'est révélée très intéressante (r1= 8.5 $mM^{-1}s^{-1}$, r_1 ~ 10 mM^{-1} s^{-1} et r_1 ~12,5 mM^{-1} s^{-1} à 20 MHz, 25 °C respectivement). Les complexes Gd$\mathbf{L^2}$ et Gd$\mathbf{L^3}$ se caractérisent par des relaxivités très élevées comparé à celle de Gd$\mathbf{L^1}$ du fait de la présence de deux molécules d'eau dans leurs sphères de coordination. Nous avons, en outre, montré que la relaxivité Gd$\mathbf{L^1}$ augmentait en particulier en présence de Mg^{2+}.

La synthèse de cette série de ligands non macrocycliques **L^1-L^4** avait été motivée par le souhait de disposer de nouveaux outils moléculaires pour des applications en imagerie médicale et, plus particulièrement, en imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM) à travers la formation de nouveaux agents de contraste. Afin d'exploiter l'ensemble des propriétés très encourageantes, il était cependant nécessaire de rendre ces complexes réactifs vis-à-vis de biomolécules à travers l'insertion d'une fonction de greffage pour des applications en imagerie médicales. Les études menées au laboratoire ont permis de synthétiser un analogue de **L^1**, le ligand **L^A** tétraphosphonaté activé en position 4 de la pyridine par un groupement carbamate de N-hydroxysuccinimidyl (NHS), afin de réaliser des études de couplage avec des biomolécules d'intérêt (peptide, anticorps, protéine) et dans le but de faire de l'imagerie. Malgré la forte sensibilité de la fonction de greffage qui s'hydrolyse au milieu basique, nous avons réussi à marquer plusieurs peptides modèles qui nous ont permis de mettre au point les conditions de couplage et de confirmer la sélectivité de la fonction réactive carbamate NHS vis-à-vis d'amines primaires. Deux anticorps B28-13 et RAM1 ont été marqués avec le CBF **L^A** avec un taux de marquage de 1 à 1,5 CBF par anticorps. L'affinité de l'anticorps B28-13 pour sa cible n'a pas été influencée après le marquage au CBF, ce qui n'était malheureusement pas le cas pour le RAM1.

Des images par Tomographie par Emission Monophotonique (TEMP) du petit animal ont été obtenues avec les complexes de ^{99m}Tc formés avec les ligands **L^1** et **L^2**. Les expériences ont clairement montré que les radiotraceurs basés sur la plateforme **L^1** se fixaient sur le cartilage des os tandis que ceux obtenus à partir de **L^2** étaient rapidement éliminés par les reins. Les premières images IRM obtenues avec le complexe de Gd(III) formé avec **L^1** ont montré une large distribution du complexe dans l'organisme mais son élimination était trop rapide, ce qui constitue un obstacle pour de futures applications en imagerie.

En perspective à ces travaux, nous évaluerons tout d'abord le marquage d'autres biomolécules d'intérêt avec les complexes de Cu(II) pour l'imagerie TEP et avec les complexes de lanthanide(III), notamment les complexes de Gd(III), pour l'IRM. Nous nous intéresserons également à la fonctionnalisation des ligands **L^2-L^4** à travers l'insertion de fonctions de greffage. Enfin, nous examinerons les propriétés de coordination du Zr(IV) par cette famille homogène de ligands polyaminophosphonatés pour une possible utilisation en imagerie médicale et/ou en radiothérapie.

Annexe

1- Hyperquad

HYPERQUAD[1] est un logiciel permettant de déterminer les constantes d'équilibre à partir de données obtenues lors d'un titrage potentiométrique par une approche des moindres carrées.[2-4] Chaque point de la courbe de titrage représente un état d'équilibre entre n espèces différentes de formule générale $H_pM_qL_r$. La concentration de chaque espèce $H_pM_qL_r$ au $k^{ème}$ point est donnée par :

$$[H_pM_qL_r]_k = \beta_{pqr}[H]_k^p [M]_k^q [L]_k^r \tag{1}$$

où β_{pqr} est la constante de formation des espèces prises en considération et $[H]_k$, $[M]_k$, $[L]_k$ sont respectivement les concentrations libres en proton, métal et en ligand.

Les équations de bilan de masse pour le $k^{ème}$ point s'écrivent :

$$T_{k,1} = [H]_k + \sum_{i=1}^{n} p\, \beta_{pqr} [H]_k^p [M]_k^q [L]_k^r \tag{2}$$

$$T_{k,2} = [M]_k + \sum_{i=1}^{n} q\, \beta_{pqr} [H]_k^p [M]_k^q [L]_k^r \tag{3}$$

$$T_{k,3} = [L]_k + \sum_{i=1}^{n} r\, \beta_{pqr} [H]_k^p [M]_k^q [L]_k^r \tag{4}$$

où $T_{k,1}$, $T_{k,2}$ et $T_{k,3}$ sont respectivement les concentrations analytiques en proton, en ion métallique et en ligand. Ces équations sont non linéaires avec les inconnues $[M]_k$, $[L]_k$ et β_{pqr}. Les valeurs de $[H]_k$ sont obtenues à partir de mesures potentiométriques.

Les constantes de formation et de protonation et ainsi les paramètres $[M]_k$, $[L]_k$ et β_{pqr} sont ajustés en minimisant la somme des carrées des erreurs U :

$$U = \sum_{k=1}^{n} \sum_{j=1}^{3} (T_{k,j}^{calc} - T_{k,j}^{obs})^2 \tag{5}$$

Ceci correspond à minimiser la somme des carrées des erreurs U des pH :

$$U = \sum_i W_i (pH_{obs} - pH_{calc})^2 \qquad (6)$$

où pH_{obs} et pH_{calc} réfèrent aux pH mesuré et calculé et où les indices calc et obs désignent respectivement les valeurs calculées et les valeurs observées. Le facteur poids W_i est défini comme la réciproque de la variance estimée de la mesure :

$$N_i = 1/\sigma^2 = \frac{1}{\sigma^2 + \left(\frac{\delta pH}{\delta v}\right)\sigma^2} \qquad (7)$$

où σ_{pH} et σ_v sont respectivement les variances estimées sur la lecture du pH et le volume.

La qualité du modèle est jugée par les valeurs de la déviation standard de l'échantillon, S, et la justesse du modèle χ^2. Avec σ_{pH} = 0,0023 et σ_v = 0,003 mL, les valeurs de S dans les titrages étaient situées entre 1,0 et 1,8 ; χ^2 était compris entre 12,0 et 30.

2- Specfit

Le programme SPECFIT,[5,6,7,8] utilise l'analyse factorielle pour réduire le nombre de données expérimentales et extraire les valeurs propres principales avant d'ajuster les valeurs des spectres électroniques et des constantes de stabilité des espèces correspondantes à l'aide de l'algorithme de MARQUARDT.[9,10] Les données expérimentales consistent en un ensemble de i spectres mesurés à j longueurs d'onde qui peuvent être arrangés dans une matrice Y à i rangées et j colonnes. Selon la loi de BEER-LAMBERT, pour un système à n espèces absorbantes, Y peut se décomposer en un produit d'une matrice de concentrations C de dimension notée (i × n) et d'une matrice de coefficients d'extinction molaire A (n × j). Cependant, en raison du bruit et des erreurs expérimentales, cette décomposition ne représente pas exactement Y. La matrice des résidus R est définie par l'équation (8)

$$R = C \times A - Y \qquad (8)$$

Elle doit être minimisée par des procédures d'ajustement afin de déterminer de façon optimale les matrices C et A. Pour cela, un modèle est utilisé, il est une fonction (loi d'action de masse pour l'étude d'équilibre) qui décrit les concentrations de tous les composants du système dans la matrice C. Le nombre des données et donc la dimension de la matrice Y est élevé. Une analyse

factorielle est utilisée pour réduire le nombre de données à ajuster. Par une décomposition en valeur singulière, la matrice Y est décomposée en un produit de trois matrices U, S et V :

$$Y = U \times S \times V. \qquad (9)$$

La matrice U (i × n) est formée des vecteurs propres de la matrice YY^t et V (n × j) par ceux de la matrice Y^tY. Les colonnes de la matrice U et les lignes de la matrice V sont orthonormales : $U^tU = VV^t = I$ (matrice identité). S (n × n) est une matrice diagonale dont les valeurs singulières sont les racines carrées des valeurs propres de la matrice Y^tY ou YY^t.

Le but premier de l'analyse factorielle est la détermination du nombre n de constituants ou de facteurs dans le système considéré. La réduction du bruit est un autre aspect important de l'analyse factorielle ; en représentant Y par USV, le contenu d'informations est conservé, alors que la plupart des composantes du bruit sont rejetées. Ainsi la relation (9) devient :

$$R = CA - USV \qquad (10)$$

En multipliant cette équation membre à membre par V^t :

$$RV^t = CAV^t - US \qquad (11)$$

L'équation (11 est la projection de R, Y et A dans le sous-espace défini par V. Les projections RV^t et AV^t sont renommées R' et A'. US correspond à YV^t et est renommée Y'. Ainsi l'équation (11) peut s'écrire :

$$R' = CA' - Y' \qquad (12)$$

La comparaison de (10) et (12) montre que la réduction des tailles de Y, A et R en Y', A' et R' est considérable, le nombre de colonnes de ces trois matrices est réduit de j à n. Il a été prouvé que la minimisation de R' au lieu de R conduit au même minimum beaucoup plus rapidement.[9] La matrice R' des résidus est une fonction de deux ensembles indépendants de paramètres, les paramètres non linéaires qui forment un vecteur paramètre k et les paramètres linéaires qui sont les projections des coefficients d'extinction molaire, formant la matrice A'.

$$R' = f(k,A') \qquad (13)$$

La matrice C des concentrations est uniquement une fonction des paramètres non linéaires k. Dans des systèmes d'équilibres, ces paramètres sont des constantes de stabilité. Les coefficients d'extinction molaire A ou leurs projections A' sont tous des paramètres linéaires qui peuvent être

déterminés durant l'ajustement des paramètres non linéaires : A' peut être remplacée par son estimation par moindres carrés linéaires Â'.

$$\hat{A}' = C^{+}\ Y' \tag{14}$$

où C^{+} est la matrice pseudo inverse de C.

$$C^{+} = (C^{t}C)^{-1}\ C^{t} \tag{15}$$

Ainsi, R' peut s'écrire uniquement comme une fonction des paramètres non linéaires k.

$$R' = C\ \hat{A}' - Y' = (CC^{+} - 1)Y' = f(k) \tag{16}$$

Les résidus R' et la somme des carrés de ses éléments sont calculés, puis minimisés en ajustant les valeurs des paramètres de k grâce à l'algorithme de MARQUARDT.[10]

3- Biokine

BIOKINE[11] est un logiciel qui permet d'analyser les données expérimentales, enregistrées dans des conditions de pseudo-premier ordre en fonction du temps et les ajustées par une somme d'exponentielles selon la fonction (17) en utilisant l'algorithme Simplex.

$$A(t) = pt + A_{\infty} + \sum_{i} A_i \exp(-k_{obs,i}t) \tag{17}$$

avec A_i : amplitude de la fonction exponentielle i

$k_{obs,i}$: constante de vitesse du pseudo-premier ordre

p : dérive du signal

A_{∞} : absorbance finale

Le choix de modèle et l'initialisation des paramètres à ajuster se fait par une méthode d'analyse de Padé-Laplace [12]. La fonction f(t)

(18) qui représente le signal multi-exponentiel à étudier, subit une transformée de Laplace (19**)** qui conduit à la relation (20**)** .

$$f(t) = \sum_{j=1}^{n} A_j e^{k_j t} \tag{18}$$

$$L\,[f](p) = \int_0^{\infty} e^{-pt}\, f(t)dt \tag{19}$$

$$L\,[f](p) = \sum_{j=1}^{n} \frac{A_j}{p - k_j} \tag{20}$$

La méthode des approximants de Padé est alors appliquée à la relation (20) afin de déterminer les valeurs de p correspondant à des discontinuités de la fonction homographique *L* [F](p). Ces valeurs particulières de p donnent les valeurs k_j et A_j des n exponentielles.

Bibliographie

[1] Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. *Talanta.* **1996**, *43*, 1739.

[2] Sabatini, A.; Vacca, A.; Gans, P. *Coord. Chem. Rev.* **1992**, *120*, 389.

[3] Vacca, A.; Sabatini, A.; Gristina, M.A. *Coord. Chem. Rev.* **1972**, *8*, 45.

[4] Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. *Inorg. Chim. Acta*. **1976**, *18*, 237.

[5] Gampp, H.; Maeder, M. ; Meyer, C. J.; Zuberbühler, A. D. *Talanta*, **1985**, *32*, 95.

[6] Gampp, H. ; Maeder, M. ; Meyer, C. J. ; Zuberbühler, A. D. *Talanta*, **1985**, *32*, 257.

[7] Gampp, H. ; Maeder, M. ; Meyer, C. J. ; Zuberbühler, A. D. *Talanta*, **1986**, *33*, 943.

[8] Specfit, a Program for Global Least Squares Fitting of Equilibrium and Kinetics Systems Using Factor Analysis and Marquardt Minimisation, Version 2-11, Revision C, Spectrum Software Associates, Chapel Hill, USA, **1997**.

[9] Maeder, M.; Zuberbühler, A.D. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 2220.

[10] Marquardt, D.W. *J. Soc. Ind. Appl. Math*. **1963**, *11*, 431.

Abréviations

CYRCE	Cyclotron de Recherche et d'Enseignement
DFT	Density Functional Theory
DMF	Diméthylformamide
DOTA	2,2',2",2'''-(1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetrayl)tetraacetic acid
DTPA	Diethylenetriaminepentaacetic acid
DHB	2,5-dihydroxybenzoic acid
ESI	Electron Spray Ionization
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ESI	Electrospray Ionization
FDG	Fluorodéoxyglucose
Glu	Acide glutamique
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HCCA	α-cyano-4-hydroxycinnamic acid
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
Lys	Lysine
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight
NHS	N-hydroxysuccinimidyl
NOTA	2,2',2"-(1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triyl)triacetic acid
PBS	Phosphate Buffered Saline
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
TEP	Tomographie par Emission de positrons
TFA	Trifluoro Acetic Acid
TMSBr	Triméthylbromosilane
TDM	Tomodensitométrie
TEMP	Tomographie d'Émission MonoPhotonique
TEP	Tomographie par Émission de Positons
TETA	2,2',2",2'''-(1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane-1,4,8,11-tetrayl)tetraacetic acid
TRITA	2,2',2",2'''-(1,4,7,10-tetraazacyclotridecane-1,4,7,10-tetrayl)tetraacetic acid
Tyr	Tyrosine
THAP	2',4',6'-trihydroxyacetophenone
UV	Ultraviolet

Publications et communications

Publications **:**

1- Pouessel, J. ; **Abada, S**. ; Le Bris, N. ; Elhabiri, M. ; Charbonnière, L.J. ; Tripier, R. "New bistetraamine ligand with a chromophoric 4-(anthracen-10-yl)-2,6-dimethylpyridinyl linker for Glyphosate and ATP sensing" *Dalton Trans*. 2013, 42, 4859-4872.

2- **Abada, S**. ; Lecointre, A. ; Elhabiri, M. ; Platas-Iglesias, C. ; Tallec, G. ; Mazzanti, M. ; Charbonnière L.J. "Highly relaxing phosphonated Gadolinium complex with selectivity for Mg2+ sensing" *Chem. Commun*. 2012, 48, 4085-4087.

3- **Abada S**. ; Lecointre A.; Déchamps, I. ; Platas-Iglesias, C. ; Christine, C. ; Elhabiri M. ; Charbonnière, L. "Highly stable acyclic bifunctional chelator for 64Cu PET imaging" *Radiochimica Acta*, 2011, 99, 663-678.

4- **Abada, S**. ; Lecointre, A. ; Elhabiri, M. ; Charbonnière, L.J. "Formation of very stable and selective Cu(II) complexes with a non-macrocyclic ligand : can basicity rivals with pre-organization ?" *Dalton Trans*, 2010, 39, 9055.

Communication par affiche :

Sabah Abada*, Alexandre Lecointre, Mourad Elhabiri et Loïc J. Charbonnière.*

Complexation du Cuivre(II), Nickel(II), Zinc(II) et Gallium(III) par des ligands acycliques de type polyaminophosphonate.

Troisième journée de rencontre du GPOL (Groupe d'études en chimie des polyamines cycliques et linéaires) du 14 au 16 Juin 2010 à Orléans, France.

Flash Communication **:**

Sabah Abada*, Alexandre Lecointre, Mourad Elhabiri et Loïc J. Charbonnière*

Etude des propriétés de coordination du Cu(II) par de nouveaux chélateurs acycliques de type polyaminophosphonate à fort potentiel en imagerie médicale

GECOM-CONCOORD (Congrès de Chimie de Coordination, de Chimie Organométallique et de Catalyse) se déroulera du 03 au 08 juin 2012 sur la commune de Métabief, Besançon, France.

Résumé :

Le travail de recherche présenté dans ce mémoire, concerne la synthèse et l'étude des propriétés de coordination du ^{64}Cu par une nouvelle famille de ligands acycliques de type polyaminophosphonatés à fort potentiel en imagerie médicale, en particulier pour la tomographie par émission de positron TEP. Ce sujet a nécessité l'utilisation de méthodes analytiques telles que la potentiométrie, la spectrophotométrie et la spectrométrie de masse en mode electrospray pour les études thermodynamiques et des techniques de cinétique rapide a écoulement bloqué pour la détermination des vitesses de formation et de dissociation des complexes de Cu(II).

Nous avons synthétisé quatre ligands (**L^1-L^4)** qui forment des complexes de formule Cu**L** de forte stabilité et avec une bonne sélectivité pour le Cu(II) par rapport à d'autres métaux tels que Ni(II), Zn(II), Co(II) et Ga(III). La cinétique de complexation de Cu(II) s'est avérée rapide et elle suit un mécanisme à caractère dissociatif de type Eigen-Wilkins. Les complexes Cu**L** formés avec cette série de ligand se caractérisent par une bonne inertie cinétique vis-à-vis de la démétallation et ils sont capables d'être réduit en présence de réducteurs biologiques tout en restant stables.

Les complexes de lanthanides formés avec cette série de ligands sont très stables en milieu physiologique, en particulier ceux formés avec le ligand **L^1**. Les complexes **GdL^1**, **GdL^2** et **GdL^3** révèlent des relaxivités très intéressantes qui les désignent comme de futurs agents de contraste à fort potentiel en IRM.

Le ligand **L^1** tetraphosphonaté a été fonctionnalisé par la présence de groupement réactif ce qui a permit le marquage de biomolécules, dont l'anticorps B28-13 anticorps anti-tenascineC pour la détection de tumeurs cancéreuses.

Mots clés : Cuivre 64, imagerie médicale, TEP, complexes métalliques, cinétique, IRM.

Abstract

The research work presented in this report, concerns the synthesis and the study of the coordination properties of the ^{64}Cu by new acyclic chelators for PET imaging.

We have synthesized four ligands (**L^1-L^4)** based on a pyridine scaffold, functionnalized by a varying number of methanephosphonate functions. A combination of potentiometry, spectrophotometry and electrospay mass spectrometry was used to study the coordination properties of Cu(II) with this ligands. The kinetic studies of the formation and dissociation of Cu(II) complexes have been carried out with stopped-flow techniques.

L^1 was shown to display a very high affinity towards Cu(II) and selectivity over Ni(II), Zn(II), Co(II) and Ga(III). The chelation of the Cu(II) by the four ligands is fast and efficient and it follows a dissociative Eigen-Wilkins mechanism.

The complexes of lanthanides formed with this series of ligands are very stable in physiological conditions in particular those formed with **L^1**. The complexes Gd**L^1**, Gd**L^2** and Gd**L^3** show a very high relaxivity which pointed them as potential contrast agents for MRI.

The ligand **L^1** was activated by a side chain containing a reactive NHS carbamate function in the para position of the pyridine. The labeling was further performed on B28-13, a mouse monoclonal antibody specifically recognizing tenascin-C protein in human cancer.

Key words: Copper 64, medical imaging, PET, metallic complexes, kinetics, MRI.