



HAL
open science

Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes : applications au marquage covalent et à la détection de biomolécules.

Nicolas Maindron

► **To cite this version:**

Nicolas Maindron. Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes : applications au marquage covalent et à la détection de biomolécules.. Chimie organique. Université de Rouen, 2012. Français. NNT: . tel-01066476

HAL Id: tel-01066476

<https://theses.hal.science/tel-01066476v1>

Submitted on 20 Sep 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.



**THESE DE
DOCTORAT**



Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE ROUEN

Spécialité : Chimie Organique

Soutenue le 19 octobre 2012

Par

Nicolas MAINDRON

**Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes :
applications au marquage covalent et à la détection de
biomolécules.**

Devant le jury composé de :

Pr. Jean-Claude BÜNZLI	Professeur, EPFL	Rapporteur
Pr. Franck DENAT	Professeur, Université de Bourgogne	Rapporteur
Dr. Yann BRETONNIERE	Chargé de Recherche CNRS, ENS Lyon	Examineur
Pr. Pierre-Yves RENARD	Professeur, Université de Rouen	
Dr. Anthony ROMIEU	Maître de conférences, Université de Rouen	



**THESE DE
DOCTORAT**



Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE ROUEN

Spécialité : Chimie Organique

Soutenu le 19 octobre 2012

Par

Nicolas MAINDRON

**Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes :
applications au marquage covalent et à la détection de
biomolécules.**

Devant le jury composé de :

Pr. Jean-Claude BÜNZLI	Professeur, EPFL	Rapporteur
Pr. Franck DENAT	Professeur, Université de Bourgogne	Rapporteur
Dr. Yann BRETONNIERE	Chargé de Recherche CNRS, ENS Lyon	Examineur
Pr. Pierre-Yves RENARD	Professeur, Université de Rouen	
Dr. Anthony ROMIEU	Maître de conférences, Université de Rouen	

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'IRCOF (COBRA – UMR CNRS 6014) dans l'équipe du Professeur Pierre-Yves Renard. Je tiens à remercier le CNRS, la région Haute-Normandie et l'union européenne (fonds FEDER, TRIPODE n°33883) pour le financement de ces travaux.

Je tiens à remercier très sincèrement les Prs. Jean-Claude Bünzli et Franck Denat ainsi que le Dr. Yann Bretonnière pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie tout particulièrement mon directeur de thèse, le professeur Pierre-Yves Renard pour m'avoir intégré dans son équipe ainsi que mon co-directeur de thèse, le docteur Anthony Romieu pour son dévouement sans limite.

Je voudrais aussi adresser un merci amical aux autres étudiants qui m'ont accompagné pendant une partie de ces trois années de thèse : les anciens (Yves, Virgile, Tristan, le roots et sa maison qui roule, le Peix, Agathe, Rudyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyy, j'espère que toutes les lettres y sont, et dans le bon ordre aussi, Guillaume, Sébastien, Thomas, le Roux (bon lui je l'ai mis mais c'est plus pour les quotas), Lucie) et les autres (le bleu qui chausse du 38, la burne, l'autre Guillaume, Julien, Emiloche, Catoche, Sioux, Marine, LAJ, Emilia, Caroline, JCVD, Alex, RRRRRRRRRRRomain et Julien le grand).

Une pensée particulière pour ceux qui ont débuté en même temps : le coach, mimile, mathiaaaa et le taxi massif avec qui j'ai partagé presque la même paillasse pendant ces trois années ainsi que son goût musical (mais sous la contrainte...) on ne peut plus éclectique.

Je garde le meilleur pour la fin et souhaite adresser mes remerciements les plus tendres et chaleureux à toute ma famille, et comme ne le dit pas le dicton, loin des yeux (souvent) mais jamais du cœur (petite pensée pour ma sœur, égarée sur un caillou de l'océan indien à compter les gorfous, j'espère te revoir dans quelques mois en meilleure forme que la dernière fois....).

Per Horus et per Rha et per solem
invictus duceres.

Liste des abréviations et notations

Abs	Absorbance
Ac	Acétyle
AC	Agent de contraste
ADN	Acide désoxyribonucléique
anh.	Anhydre ou <i>anhydrous</i>
AP ₃	3-Aminopropargyle
APC	Allophycocyanine
aq.	Aqueux ou <i>aqueous</i>
ARN	Acide ribonucléique
Asn	Asparagine
Asp	Acide aspartique
b	Biotine
Bn	Benzyle
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyle
BODIPY	4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène
BP	Benzophénone
Bpy ou bipy	Bipyridine
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
Bu	Butyle
Bz	Benzoyle
c	Concentration
CCM	Chromatographie sur couche mince
CIS	Croisement intersystème
Cs124	Carbostyrile 124
Cy	Cyanine
Cys	Cystéine

DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichlorométhane
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimide
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropyléthylamine
DMAc	Diméthylacétamide
DMAP	4-Diméthylaminopyridine
DME	Diméthoxyéthane
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO2A	Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,7-diyl acétique
DO3A	Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane- <i>N,N',N''</i> -triacétique
DO3AM	1,4,7,10-tétraazacyclododécane- <i>N,N',N''</i> -triacétamide
DOTA	Acide tétraazacyclododécane tétraacétique
DOTMP	Acide tétraazacyclododécane tétraméthyle phosphonique
Dpa	Di-2-picolylamine
DSC	Carbonate de disuccinimidyle
DSSEB	Sébaçate de disuccinimidyle
DTPA	Acide diéthylène triamine pentaacétique
ε	Coefficient d'absorption molaire
E	Energie
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EDTMP	Acide éthylène diamine tétraméthyle phosphonique
em	Emission
eq	Equivalent
ESI	<i>Electrospray ionisation</i>
Et	Ethyle
exc	Excitation
Φ	Rendement quantique

Fmoc	9H-fluoren-9-ylméthoxycarbone
FRET	<i>Förster resonance energy transfer</i>
nFRET	<i>Non-overlapping FRET</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
Glu	Acide glutamique
Gly	Glycine
GM	Göppert-Mayer
η	Efficacité de transfert d'énergie
HBTU	Hexafluorophosphate de 2-(benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
His	Histidine
HOBt	<i>N</i> -Hydroxybenzotriazole
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
Ig	Immunoglobuline
ILCT	<i>Intraligand charge transfer</i>
IR	Infrarouge
IRM	Imagerie par résonance magnétique
λ	Longueur d'onde
LBT	<i>Lanthanide binding tag</i>
LMCT	<i>Ligand to metal charge transfer</i>
Ln	Lanthanide
Lys	Lysine
mAb	Anticorps monoclonal
Me	Méthyle
MES	Acide-2-(<i>N</i> -morpholino)-éthanesulfonique
MLCT	<i>Metal to ligand charge transfer</i>
MOPS	Acide 3-(<i>N</i> -morpholino)-propanesulfonique
ν	Nombre d'onde

NC	Nombre de coordination
ND	Non déterminé
NHS	<i>N</i> -Hydroxy succinimide
NMP	<i>N</i> -Méthyl-2-pyrrolidone
NTA	Acide nitrilotriacétique
OTR	Oxyde de terre rare
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
Pd/C	Palladium sur charbon
PeT	<i>Photoinduced electron transfer</i>
PET	<i>Positron emission tomography</i>
Phe	Phénylalanine
PIPES	Acide 1,4-pipérazinediéthanesulfonique
ppm	Partie par million
ppy	Phénylpyridine
Pro	Proline
PyBrOP	Hexafluorophosphate de Bromo-tris-pyrrolidino phosphonium
q	Nombre de molécules d'eau présentes en première sphère de coordination du lanthanide
quant.	Quantitatif
R6G	Rhodamine 6G
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RP	<i>Reversed phase</i>
RT	<i>Room temperature</i>
σ	Section efficace d'absorption
SA	Streptavidine
sat.	Saturé ou <i>saturated</i>
Ser	Sérine
SPECT	<i>Single photon emission computed tomography</i>

SPPS	<i>Solide phase peptide synthesis</i>
τ	Temps d'émission ou de corrélation
TA	Température ambiante
TBAF	Fluorure de tétrabutylammonium
TBS	<i>tert</i> -Butyldiméthylsilyle ou <i>Tris buffered saline</i>
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -Butyle
TE	Transfert d'énergie
TEAA	Acétate de triéthylammonium
TEAB	Bicarbonate de triéthylammonium
terpy	Terpyridine
Tf	Triflyle
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TLC	<i>Thin layer chromatography</i>
TMP	2,2,6,6-Tétraméthylpipéridine ou Triméthoprim
TMT	Acide terpyridine-bis(méthylèneamine) tétraacétique
TOPO	Oxyde de trioctyle phosphine
TR-FRET	<i>Time-resolved FRET</i>
Tris	2-Amino-2-(hydroxyméthyl)-propane-1,3-diol
Trp	Tryptophane
Ts	Tosyle
TSTU	Tétrafluoroborate de <i>N,N,N',N'</i> -tétraméthyl- <i>O</i> -(<i>N</i> -succinimidyl) uronium
TTHA	Acide triéthylène tétraamine hexaacétique
Tyr	Tyrosine
u.a.	Unité arbitraire
UICPA	Union internationale de chimie pure et appliquée
UV	Ultraviolet
Z (Cbz)	Benzyloxycarbone

Sommaire

Préambule

CHAPITRE 1 : Les lanthanides.

I. Généralités.....	3
1 Définition.....	3
2 Découverte.....	4
3 Une ressource stratégique.....	5
4 Applications industrielles.....	8
II. Des propriétés singulières.....	10
1 Configuration électronique.....	10
2 Degrés d'oxydation.....	11
3 Acidité de Lewis.....	12
4 Nombre de coordination.....	13
5 Propriétés magnétiques.....	13
6 Propriétés spectroscopiques.....	14
6.1. Diagramme énergétique.....	14
6.2. Transitions électroniques.....	15
6.3. Caractéristiques des transitions 4f-4f.....	16
6.4. Sensibilisation de luminescence ou effet d'antenne.....	17
7 Transfert d'énergie du chromophore au lanthanide.....	18
7.1. Mécanisme.....	18
7.2. Optimisation du rendement de sensibilisation.....	20
7.3. Sensibilisation par un état ILCT.....	26
7.4. Désactivation vibrationnelle non-radiative.....	28
III. Sondes fluorescentes et luminescentes.....	33
1 Fluorophores organiques.....	33
2 Complexes de lanthanides.....	35

3 Autres sondes lumineuses.....	37
4 Fluorophores organiques contre complexes de lanthanides	37
5 Conception d'un marqueur lanthanidique luminescent	40
5.1. Remarques générales	40
5.2. Structure complexante	40
5.3. Fonctions bioconjuguables	41
6 Aperçu de quelques structures de chélates luminescents.....	41
6.1. Les ligands polyaminocarboxylates	41
6.2. Les ligands macrocycliques	47
6.3. Les ligands phosphonatés	49
6.4. Les β -dicétones	50
6.5. Les cryptants	51
IV. Applications biomédicales	53
1 En thérapie	54
2 En radiothérapie	55
3 En imagerie par résonance magnétique	56
3.1. Principe	56
3.2. Facteurs contrôlant la relaxivité	57
3.3. Optimisation des agents de contraste	58
3.4. Sondes IRM intelligentes	60
3.5. Toxicité.....	61
4 En analyse biologique.....	61
V. Dosages immunologiques en temps résolu	62
1 Immuno-marquage.....	62
2 Dosages hétérogènes	64
2.1. La technologie DELFIA®	64
2.2. La technologie FIAgen.....	66
2.3. Autres exemples de dosages hétérogènes	68
3 Dosages homogènes.....	69
3.1. Principe du FRET	69
3.2. Principe du nFRET	71
3.3. Couples donneur/accepteur appliqués au TR-FRET.....	72
3.4. Détection à double longueur d'onde.....	74
3.5. Technologies appliquées aux dosages homogènes	74

3.6. Dosages homogènes : applications.....	75
4 Vers du diagnostique et de l'imagerie <i>in vivo</i> ?.....	77
VI. Objectif du premier projet.....	80

CHAPITRE 2 : Conception d'un ligand original pyrazinique - Application du chélate d'euporium au marquage covalent de biomolécules.

I. Complexes de lanthanides à structure diazinique 83

II. Synthèse du ligand bis-pyridinylpyrazine 85

1 Première voie de synthèse	85
2 Deuxième voie de synthèse.....	88
2.1. Synthèse des ligands.....	88
2.2. Synthèse des chélates.....	91
2.3. Brève étude de stabilité.....	93
3 Propriétés photophysiques	94
3.1. Rendements quantiques.....	94
3.2. Temps d'émission et évaluation du nombre de molécules d'eau présentes dans la sphère interne de coordination	98
3.3. Ajouts dosés et détermination des coefficients d'absorption molaire	99

III. Bioconjugaison 101

1 Activation du chélate Eu-106	102
1.1. Activation au DSC.....	103
1.2. Activation au chlorure de triazine.....	103
1.3. Activation au DSSEB	104
2 Marquage du peptide modèle et propriétés de luminescence.....	105
2.1. Synthèse du peptide	105
2.2. Bioconjugaison.....	106
2.3. Rendements de bioconjugaison.....	108
2.4. Propriétés photophysiques.....	110
3 Marquage des anticorps et propriétés de luminescence.....	110
3.1. Bioconjugaison.....	110
3.2. Rendements quantiques.....	115

IV. Conclusion.....	116
V. Discussions et perspectives	117
VI. Objectifs du deuxième projet	121

CHAPITRE 3 : Stratégies de marquage fluorescent de protéines utilisant des protéines de fusion - Applications des chélates de lanthanides à l'imagerie cellulaire.

I. Utilisation de protéines de fusion pour le marquage et la visualisation de protéines..... 125

1 Marquage non-covalent	126
1.1. Affinité naturelle	126
1.2. Reconnaissance de tags peptidiques	128
1.3. Marquage par des lanthanides	133
2 Marquage covalent.....	137
2.1. Les protéines fluorescentes	137
2.2. Motifs de reconnaissance enzymatiques.....	138
2.3. Motifs de reconnaissance peptidiques	143
2.4. Marquage catalysé par des enzymes auxiliaires.....	144
2.5. Réactions bioorthogonales	146
2.6. Photomarquage d'affinité.....	148
2.7. Sondes bi-fonctionnelles.....	150
3. Bilan	152

II. Complexes de lanthanides : des sondes luminescentes à intensité modulable 153

1 Principe	153
2 Exemples d'applications	154
2.1. Interaction analyte-chromophore	154
2.2. Interaction analyte-lanthanide	161

CHAPITRE 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

I. Présentation du projet	167
II. Voies de synthèse du cyclène et de ses dérivés.....	169
1 Obtention du cyclène	169
2 Substitution sélective des azotes du cyclène	170
2.1. <i>N</i> -monoalkylation	170
2.2. <i>N</i> -Dialkylation.....	171
2.3. <i>N</i> -Trialkylation.....	172
III. Conception de chélates fondés sur une antenne photoactivable de type benzophénone	173
1 Synthèse des benzophénones	175
2 Synthèse des ligands	175
2.1. Structures chélatantes composées d'acides carboxyliques.....	175
2.2. Structures chélatantes composées d'acétamides	181
3 Complexation des ligands avec le terbium et l'euporium.....	182
IV. Synthèse des chélates comportant une antenne photoactivable de type azidocoumarine ou azidoquinolinone	184
1 Synthèse des antennes.....	189
1.1. 7-amino-6-chloro-4-acide acétique-coumarine.....	189
1.2. Dérivés de la 3-aminocoumarine	192
2 Synthèse du cs124-acide carboxylique.....	194
3 Synthèse des ligands	195
3.1. Introduction de l'antenne sur le cyclène	195
3.2. Introduction de l'antenne sur le DO3At-Bu	199
3.3. Introduction de l'antenne sur le DO3At-Bu aminoéthyle.....	202
4 Complexation des ligands avec le terbium et l'euporium.....	204
V. Propriétés photophysiques.....	206
1 Des chélates sensibilisés par une antenne benzophénone.....	206
1.1. Spectres d'émission	206
1.2. Calcul du nombre de molécules d'eau coordonnées au métal.....	208

1.3. Etude des effets de tampon sur la luminescence	209
1.4. Influence de l'étiquette peptidique sur la luminescence	214
2 Des chélates sensibilisés par les antennes azidocoumarine et azidocarbostyrile	220
2.1. Avant photoactivation	220
2.2. Après photoactivation	225
VI. Conclusion et perspectives	228

CHAPITRE 5 : Partie expérimentale.

I. General procedures	237
II. RP-HPLC methods	238
1 Systems used for molecules synthesised in chapter 2	238
2 Systems used for molecules synthesised in chapter 4	239
III. Molecules from chapter 2	242
1 Synthesis of bis-pyridinylpyrazine ligand 104	242
2 Synthesis of non-symmetrical bis-pyridinylpyrazine ligand 106	246
3 Synthesis of Ln(III) chelates	249
4 Activation of Eu(III) non-symmetrical chelate Eu-106	250
5 Peptide synthesis	251
6 Bioconjugation experiments	251
6.1. Peptide labelling	251
6.2. mAb labelling	252
IV. Molecules from chapter 4	252
1 Antennae	252
1.1. Benzophenone derivatives	252
1.2. Coumarins and quinolinones	253
2 Chelating part scaffolds based on cyclen	262
2.1. Disubstituted cyclen	262
2.2. Trisubstituted cyclen	262
2.3. Tetrasubstituted cyclen	262
3 Ligands and chelates containing a benzophenone	263
3.1. Monoalkylated cyclens	263

3.2. Protected cyclen ligands	264
3.3. Cyclen ligands.....	268
3.4. Linear ligand.....	274
3.5. Europium and terbium chelates	277
4 Ligands and chelates containing a coumarin or quinolinone.....	281
4.1. Mono- and tetrasubstituted cyclen	281
4.2. Europium and terbium chelates	289
V. Absorption and luminescent measurements	293

Préambule

Maintenant que l'ensemble du génome humain est déchiffré, il s'agit de répondre à un nouveau défi : attribuer une fonction à chacun de ces gènes, et donc trouver la structure et la fonction de la protéine correspondante. L'étude de ces protéines, la protéomique, constitue à la fois une solution de rechange et une démarche complémentaire à la génomique, car la plupart des processus pathologiques et des traitements exercent leurs effets au niveau de la protéine plutôt que du gène. L'identification de la structure, de la fonction et de la répartition des protéines dans une cellule est un problème délicat, car il s'agit de différencier efficacement une protéine ciblée du milieu cellulaire complexe, sans perturber sa ou ses fonctions.

L'objectif de ce projet est de répondre aux demandes de la protéomique structurale et fonctionnelle en concevant et en synthétisant une nouvelle famille de sondes chimiques fluorescentes polyvalentes, susceptibles de se fixer sélectivement sur les étiquettes (tags) polypeptidiques des protéines produites par biologie moléculaire à partir des gènes identifiés, et dont le signal s'allume spécifiquement en présence de l'étiquette.

Les complexes de lanthanides(III) (europium et terbium) ont été choisis comme cœur pro-fluorescent de nos sondes afin de tirer partie de deux propriétés essentielles liées à la luminescence de ces terres rares : le temps d'émission long (de l'ordre de la milliseconde dans l'eau) qui va permettre de s'affranchir des problèmes d'auto-fluorescence des milieux biologiques *via* des mesures résolues dans le temps, et l'extinction de cette luminescence dans le cas où la sphère de coordination du métal est incomplète (*i.e.*, complétée par des molécules d'eau). Ces complexes de lanthanides(III) comporteront une sphère de coordination incomplète, choisie de telle sorte que la complexation de l'étiquette peptidique conduira d'une part à l'accrochage spécifique non-covalent du bio-senseur sur la protéine, et d'autre part à une augmentation de ses propriétés de luminescence. Un motif photoréactif sera aussi greffé à la sonde luminescente qui permettra l'établissement d'une liaison covalente avec le tag.

Un projet annexe concerne aussi le développement d'une structure originale de sonde lanthanidique possédant un maximum d'absorption déplacé vers l'UV-A, au-delà de 350 nm puisqu'à ces longueurs d'onde le matériel biologique se dégrade moins.

Ainsi, après une courte introduction générale sur les lanthanides, nous nous focaliserons sur leurs propriétés particulières de luminescence et sur l'application de leurs chélates en bioanalyse. Dans une deuxième partie nous décrirons la mise au point d'une nouvelle sonde lanthanidique pouvant absorber efficacement au-delà de 345 nm, ce que peu de chélates commerciaux sont actuellement capables de faire. Nous nous intéresserons enfin au marquage de protéines de fusion et au développement de chélates de lanthanides photoréactifs pouvant moduler leur luminescence suite à la reconnaissance et l'accrochage covalent avec la protéine d'intérêt étiquetée.

CHAPITRE 1

LES LANTHANIDES

I. GENERALITES

1 DEFINITION

Par définition, les lanthanides, littéralement « de la famille du lanthane », regroupent les quinze éléments chimiques dont le numéro atomique est compris entre 57 (lanthane : La) et 71 (lutécium : Lu) ;¹ les terres rares englobent les lanthanides, le scandium (Sc) et l'yttrium (Y).

Figure 1 : Tableau périodique des éléments. Le tableau présente les éléments chimiques classés par numéro atomique croissant. Les lanthanides (éléments 57 à 71) et les actinides (éléments 89 à 103) sont mis en évidence par une surbrillance bleue. Une légende indique que le 'Symbol' est le nom de l'élément et le 'atomic number' est son poids atomique standard.

1 H hydrogen (1.007; 1.008)																	2 He helium 4.003																										
3 Li lithium (6.938; 6.997)	4 Be beryllium 9.012	Key: atomic number Symbol name standard atomic weight										5 B boron (10.80; 10.83)	6 C carbon (12.00; 12.02)	7 N nitrogen (14.00; 14.01)	8 O oxygen (15.99; 16.00)	9 F fluorine 19.00	10 Ne neon 20.18																										
11 Na sodium 22.99	12 Mg magnesium 24.31	13 Al aluminium 26.98	14 Si silicon (28.08; 28.09)	15 P phosphorus 30.97	16 S sulfur (32.05; 32.08)	17 Cl chlorine (35.44; 35.46)	18 Ar argon 39.95	19 K potassium 39.10	20 Ca calcium 40.08	21 Sc scandium 44.96	22 Ti titanium 47.87	23 V vanadium 50.94	24 Cr chromium 52.00	25 Mn manganese 54.94	26 Fe iron 55.85	27 Co cobalt 58.93	28 Ni nickel 58.69	29 Cu copper 63.55	30 Zn zinc (65.382)	31 Ga gallium 69.72	32 Ge germanium 72.63	33 As arsenic 74.92	34 Se selenium (78.963)	35 Br bromine 79.90	36 Kr krypton 83.80																		
37 Rb rubidium 85.47	38 Sr strontium 87.62	39 Y yttrium 88.91	40 Zr zirconium 91.22	41 Nb niobium 92.91	42 Mo molybdenum 95.94(2)	43 Tc technetium	44 Ru ruthenium 101.1	45 Rh rhodium 102.9	46 Pd palladium 106.4	47 Ag silver 107.9	48 Cd cadmium 112.4	49 In indium 114.8	50 Sn tin 118.7	51 Sb antimony 121.8	52 Te tellurium 127.6	53 I iodine 126.9	54 Xe xenon 131.3	55 Cs caesium 132.9	56 Ba barium 137.3	57-71 lanthanoids	72 Hf hafnium 178.5	73 Ta tantalum 180.9	74 W tungsten 183.8	75 Re rhenium 186.2	76 Os osmium 190.2	77 Ir iridium 192.2	78 Pt platinum 195.1	79 Au gold 197.0	80 Hg mercury 200.6	81 Tl thallium (204.3; 204.4)	82 Pb lead 207.2	83 Bi bismuth 209.0	84 Po polonium	85 At astatine	86 Rn radon								
87 Fr francium	88 Ra radium	89-103 actinoids	104 Rf rutherfordium	105 Db dubnium	106 Sg seaborgium	107 Bh bohrium	108 Hs hassium	109 Mt meitnerium	110 Ds darmstadtium	111 Rg roentgenium	112 Cn copernicium																																
																		57 La lanthanum 138.9	58 Ce cerium 140.1	59 Pr praseodymium 140.9	60 Nd neodymium 144.2	61 Pm promethium	62 Sm samarium 150.4	63 Eu europium 152.0	64 Gd gadolinium 157.3	65 Tb terbium 158.9	66 Dy dysprosium 162.5	67 Ho holmium 164.9	68 Er erbium 167.3	69 Tm thulium 168.9	70 Yb ytterbium 173.1	71 Lu lutetium 175.0											
89 Ac actinium	90 Th thorium 232.0	91 Pa protactinium 231.0	92 U uranium 238.0	93 Np neptunium	94 Pu plutonium	95 Am americium	96 Cm curium	97 Bk berkelium	98 Cf californium	99 Es einsteinium	100 Fm fermium	101 Md mendelevium	102 No nobelium	103 Lr lawrencium																													

Figure 1 : Tableau périodique des éléments.²

Il faut noter que l'adjectif « rares » qui les qualifie est plutôt inapproprié. Même s'ils ne comptent pas parmi les éléments les plus abondants, leur concentration globale dans la croûte terrestre, estimée à 150-220 ppm, n'est pas plus faible que celle de nombreux autres métaux (Figure 2).³ A titre de comparaison, le cérium, un des composés le plus commun de cette famille est aussi répandu que le cuivre, alors que le plus rare à l'état naturel, le thulium, est quatre fois plus abondant que l'argent.

En revanche, l'étymologie grecque du mot lanthane, *lanthano*, littéralement « je suis caché », traduit plus justement la réalité.⁴ En effet, sur environ deux cents minerais connus contenant des terres rares, la teneur obtenue en oxydes après enrichissement, par divers

¹Le terme lanthanide peut aussi désigner les atomes dont la sous-couche électronique 4f est partiellement ou totalement remplie (Ce-Lu) ; dans ce cas l'appellation lanthanoïde englobe l'élément La avec les quatorze lanthanides. En anglais, l'IUPAC préconise le terme *lanthanoid* (bien que rarement rencontré) pour désigner ces quinze éléments car le suffixe *ide* se réfère déjà aux anions minéraux.

² http://www.iupac.org/fileadmin/user_upload/news/IUPAC_Periodic_Table-2011-01-21.pdf.

³ <http://pubs.usgs.gov/fs/2002/fs087-02/>.

⁴ Historiquement cette appellation fut attribuée à cet élément car il a été découvert dans un échantillon d'oxyde de cérium dont on pensait qu'il ne contenait plus aucun autre composé.

éléments. En effet, entre 1859 et 1889, neuf terres rares furent découvertes contre cinq auparavant. Le dernier lanthanide présent à l'état naturel à être caractérisé fut le lutécium, en 1907, indépendamment par Georges Urbain en France, Carl Auer von Welsbach en Autriche et Charles James aux Etats-Unis. Quant au prométhium, qui est le seul élément de la série ne présentant aucun isotope stable (le temps de demi-vie du plus persistant étant de l'ordre de dix-huit années), il fut initialement détecté dans les sous-produits de la fission de l'uranium dès 1942 lors du projet Manhattan mais ne sera dévoilé que cinq ans plus tard.

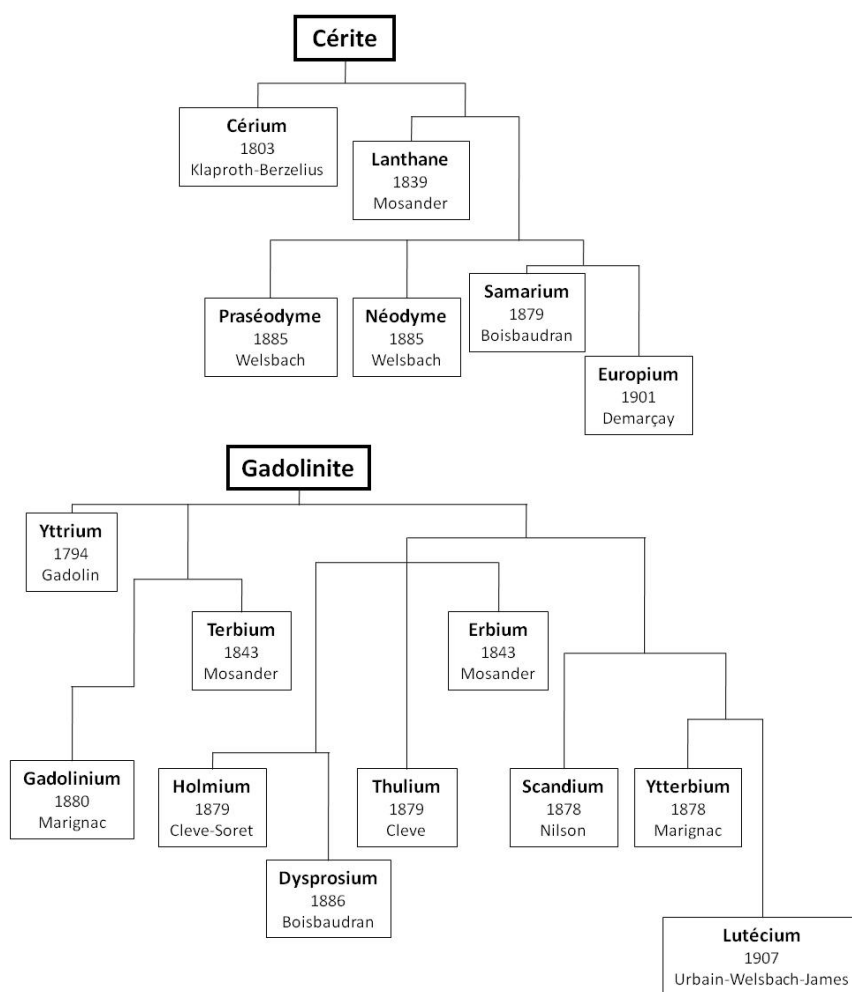


Figure 3 : Schéma résumant la chronologie de la découverte des terres rares à partir de gadolinite et de cériite.

3 UNE RESSOURCE STRATEGIQUE

Le problème que soulève la production de terres rares est moins lié à leur distribution dans la croûte terrestre qu'à leur disponibilité puisqu'en effet cette ressource est répartie de façon relativement homogène à travers le monde (trente-quatre pays sont connus pour disposer de dépôts en terres rares : Figure 4) mais à des concentrations variables. Ajouter à cela une extraction et un raffinage complexes, sources inévitables de pollution, il s'avère finalement que la production de ces composés est rarement viable économiquement.

Depuis le milieu des années 1990, la Chine s’est octroyée un monopole presque exclusif dans ce domaine grâce à une politique agressive de développement de cette filière ; main-d’œuvre peu rémunérée et normes environnementales plus ou moins inexistantes lui a permis de casser les prix afin d’éliminer ses concurrents. Ainsi, en 2011, la Chine détenait près de 97% du marché (Figure 5) alors qu’elle n’était créditée que de 48% des réserves estimées en oxydes de terres rares (OTR).

Pays	Production	Réserves estimées
Chine	130 000 ; 97.32%	55 000 000 ; 48.34%
Autres	ND	22 000 000 ; 19.34%
CEI	ND	19 000 000 ; 16.70%
Etats-Unis	0	13 000 000 ; 11.43%
Inde	3 000 ; 2.25%	3 100 000 ; 2.72%
Australie	0	1 600 000 ; 1.41%
Brésil	550 ; 0.41%	48 000 ; 0.04%
Malaisie	30 ; 0.02%	30 000 ; 0.03%

Tableau 2 : Production et réserves estimées en 2011 (exprimées en tonnes d’OTR ; CEI : Communauté des Etats Indépendants).⁸



Figure 4 : Distribution mondiale des ressources de terres rares.⁹

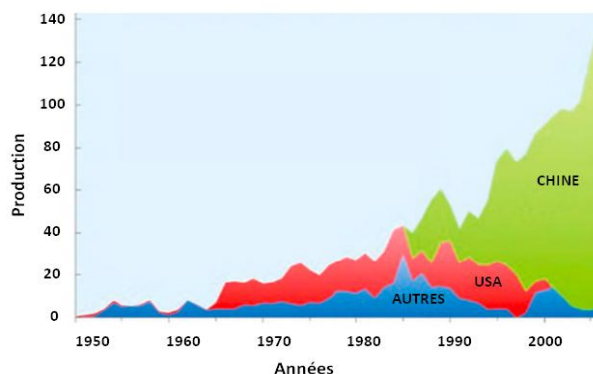


Figure 5 : Evolution de la production mondiale en OTR (10³ tonnes) entre 1950 et 2007.¹⁰

Les propriétés uniques que confèrent les lanthanides aux matériaux les incluant et utilisés dans les domaines des hautes technologies, qui elles-mêmes connaissent un développement soutenu et pour lesquelles nous devenons de plus en plus dépendants, font de ces composés une ressource éminemment stratégique. La mainmise sur ce marché par la Chine, conjuguée à une forte croissance de leur utilisation ne permet pas d’assurer un équilibre stable de l’offre et de la demande. De plus, la décision prise par le gouvernement chinois de réduire de 35% les quotas à l’exportation entre 2009 et 2010 a entraîné une envolée spectaculaire du

⁸ <http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/mcs/2012/mcs2012.pdf>. Chiffres à considérer avec prudence : aucune statistique réputée fiable n’existe en raison de la confidentialité de certaines données, notamment chinoises.

⁹ Z. Chen, *J. Rare Earths*, 2011, 29, 1-6.

¹⁰ <http://www.franceculture.fr/blog-globe-2012-02-01-les-terres-rares-en-cartes-et-dans-la-presse-un-marche-strategique>.

prix des terres rares en 2011 (Tableau 3 et Figure 6). Suite à ces restrictions commerciales, les Etats-Unis, le Japon et l'Union Européenne ont déposé plainte contre la Chine auprès de l'OMC (Organisation Mondiale du Commerce) en mars 2012.

Ces pays cherchent cependant aussi à sécuriser et diversifier leur approvisionnement en relançant cette filière qui n'était plus rentable après que les chinois ont baissé drastiquement les coûts de production. Ainsi, pas moins de deux cents projets d'exploration et d'exploitation de ces minerais seraient en préparation dont les plus avancés auraient déjà permis l'extraction d'environ 10 000 tonnes en 2011.⁹ Par conséquent, il est estimé que d'ici à 2015 la part de la Chine dans la production de terres rares devrait passer de 97 à 70%.¹¹

	2009	10/2011	01/2012	05/2012
La	6	60	62	25
Ce	4	55	100	25
Pr	16	60	250	120
Nd	16	235	295	110
Sm	5	87	150	90
Dy	107	2 000	2 600	1 000
Eu	473	4 000	3 850	2 500

Tableau 3 : Evolution du prix de certains OTR (\$/kg).¹¹

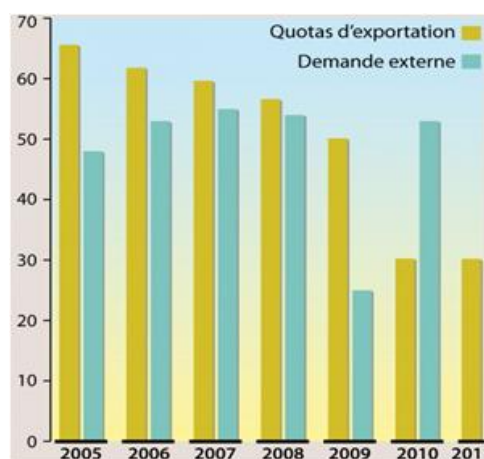


Figure 6 : Quotas chinois pour les exportations d'OTR (10³ tonnes).¹⁰

En revanche, la menace de pénurie pour certains de ces métaux à court terme (2015) est bien réelle, notamment pour le dysprosium, le néodyme, le terbium, l'euprium et l'yttrium et dépendra fortement de la réussite des projets actuels de prospection.

Par exemple, en décembre 2011 une compagnie minière allemande a annoncé la découverte à Madagascar d'un gisement de plus de 10 millions de tonnes d'OTR dont 20% de terres rares lourdes (du samarium au lutécium) qui sont les moins répandues et extraites exclusivement en Chine.¹² Un accord avec Rhodia prévoit une production de 15 000 tonnes par an à partir de 2014.^{13a}

De nombreux autres gisements ont aussi été identifiés sous l'océan Pacifique par une équipe japonaise en 2010 et dont les réserves pourraient être cent à mille fois supérieures que celles déjà connues. Leur exploitation reste cependant utopique tant d'un point de vue économique, technique (ils se situent entre 3 500 et 6 000 mètres de profondeur) qu'écologique.

Enfin le recyclage pourrait aussi être envisagé, d'autant qu'il commence à devenir rentable compte tenu de l'augmentation substantielle du prix de ces composés. Ainsi les batteries de

¹¹ http://www.iamgold.com/Theme/IAMGold/files/presentations/REE101_April%202012-FR.pdf.

¹² http://tre-ag.com/media/regulatory-news.aspx?sc_lang=en.

¹³ **a)** http://www.rhodia.com/fr/news_center/news_releases/Tantalus_LOI_230412.tcm ; **b)** *Les enjeux des métaux stratégiques : le cas des terres rares*, rapport des députés C. Birraux et C. Kert, 2011.

voitures hybrides contenant du néodyme et du lanthane sont recyclées afin de récupérer ces matériaux. En France, Rhodia a même réussi à mettre au point un procédé de recyclage de certains de ces éléments entrant pourtant en faible proportion dans les lampes à économie d'énergie par exemple (sites de Saint-Fons et La Rochelle).^{13b}

4 APPLICATIONS INDUSTRIELLES¹⁴

Les lanthanides sont indispensables aux nombreuses innovations technologiques dans des domaines aussi variés que la santé, l'écologie et les télécommunications par exemple (Tableau 4). De plus, aucune autre série d'éléments chimiques n'est actuellement capable d'égaliser les performances apportées par les terres rares, d'où une croissance importante globale de 6 à 8% par an qui est stimulée par le secteur des énergies « vertes ». Ainsi pour égaler la puissance d'une centrale nucléaire de 1 000 MW par des éoliennes il faudrait respectivement de l'ordre de 155 et 27.5 tonnes de néodyme et de praséodyme ce qui pourrait constituer un frein au développement massif de cette filière. D'autant plus que l'extraction et la purification des lanthanides est bien loin d'être écologique : production de déchets faiblement radioactifs (thorium et uranium), métaux lourds, fluorures, eaux usées acides, émission dans l'air de gaz acides et toxiques : HF, HCl, SO₂ entre autres.

¹⁴ a) S. V. Eliseeva and J.-C. G. Bünzli, *New J. Chem.*, **2011**, 35, 1165-1176 ; b) V. S. Sastri, J.-C. Bünzli, V. R. Rao, G. V. S. Rayudu and J. R. Perumareddi, *Modern Aspects of Rare Earth and Their complexes*, Elsevier, Amsterdam, **2003**, pp. 893-981.

Exemples d'applications des terres rares	Taux de croissance 2010-2015	Total de la demande 2015
<p>Aimants permanents : les aimants Nd-Fe-B ($\text{Nd}_2\text{Fe}_{14}\text{B}$) dopés au Dy sont les plus puissants actuellement produits à l'échelle industrielle. Ils contiennent, en moyenne, 31% en poids de Nd et 5.5% de Dy. Du Pr peut également entrer dans leur formulation afin de maintenir l'aimantation à des températures plus élevées. Utilisations principales : moteur des voitures électriques et turbines d'éoliennes. Les aimants Sm-Co gardent leurs propriétés à des températures encore plus hautes, 700-800 °C (rotors de TGV par exemple).</p>	10 à 15% par an	48 000 26.0%
<p>Alliages métalliques : les accumulateurs alcalins fabriqués à l'aide de La, Ce, Nd et Pr (combinés avec du nickel, du cobalt, du manganèse et/ou de l'aluminium) sont utilisés dans les batteries de voitures électriques, dans les appareils électroniques et dans les outils électriques. Ils sont actuellement moins coûteux et plus robustes que les batteries Ni-ion ; l'alliage Y-acier (résistance accrue aux chocs thermiques) est utilisé dans les pipelines ; l'ajout de Ce augmente l'élasticité de l'acier.</p>	8 à 12% par an	35 000 18.9%
<p>Polissage : CeO_2 est un excellent agent de polissage lié à sa dureté naturelle et au fait qu'une réaction chimique se produit à l'interface silice-oxyde de cérium. Elle conduit à la formation d'une couche de silicate de cérium qui fragilise la surface du verre et la rend plus sensible à l'érosion mécanique lors du polissage (verres, lentilles, écrans de téléviseurs, puces de silicium).</p>	8 à 10% par an	30 500 16.5%
<p>Catalyse : pots catalytiques (Ce^{3+} réduit les NOx en N_2, Ce^{4+} oxyde le CO en CO_2 et les hydrocarbures en CO_2 et H_2O), raffinage pétrolier (Ce et La).</p>	3 à 5% par an	28 500 15.4%
<p>Luminophores : poudres luminophores comme $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{III}$ ou $\text{Y}_2\text{GdBO}_3:\text{Eu}^{III}$ (rouge), $\text{CeMgAl}_{11}\text{O}_{19}:\text{Tb}^{III}$, $(\text{La}:\text{Ce},\text{Tb})\text{PO}_4$ ou $\text{YGdBO}_3:\text{Tb}^{III}$ (vert) et $\text{BaMgAl}_{10}\text{O}_{17}:\text{Eu}^{II}$ (bleu) entre autres et destinées aux écrans et aux lampes basse consommation.</p>	6 à 10% par an	13 000 7.0%
<p>Industrie du verre : coloration du verre (oxydes de Nd, Pr, Er, Ce, Eu). L'oxyde de La accroît l'indice de réfraction et diminue la dispersion de la lumière (optique de précision : lentilles de microscopes, télescopes, objectifs photographiques). Décoloration du verre par différents oxydes (Ce, Nd, Er). Absorption des UV par ajout de CeO_2.</p>	négligeable	11 000 6.0%
<p>Céramiques : utilisation de matériaux composites comme $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-GdAlO}_3$ qui permettent de conserver des propriétés mécaniques particulières même à haute température (> 1 600 °C) (industrie nucléaire : aubes de turbines de réacteurs). Le gadolinium, le lanthane et l'yttrium entrent dans la composition de céramiques spéciales pour la production de circuits électroniques (condensateurs).</p>	6 à 8% par an	9 500 5.1%
Autres	6 à 8% par an	9 500 5.1%
TOTAL	6 à 10% par an	185 000

Tableau 4 : Principales applications des terres rares, taux de croissance et demande estimée en 2015 (tonnes d'OTR).^{5,11,14}

II. DES PROPRIETES SINGULIERES

1 CONFIGURATION ELECTRONIQUE

Le scandium, l'yttrium et le lanthane sont les éléments qui initient respectivement la série des composés 3d, 4d et 5d. En revanche, si les orbitales f sont trop hautes en énergie pour les deux premières séries, elles deviennent plus accessibles à partir du lanthane. Les éléments constitués par le remplissage des orbitales 4f, alors plus favorable énergétiquement que celui des 5d, forment la famille des lanthanides, de configuration électronique $[\text{Xe}]4f^n6s^2$ ou, pour le La, Ce et Gd de configuration $[\text{Xe}]4f^{n-1}5d^16s^2$.

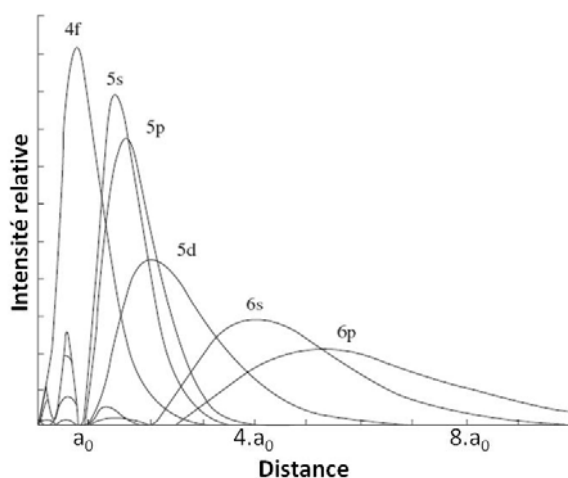


Figure 7 : Fonctions de distribution radiale des orbitales 4f, 5s, 5p, 5d, 6s et 6p du cérium (a_0 : rayon de Bohr).¹⁵

Ce gain énergétique implique une contraction des orbitales 4f qui se retrouvent alors protégées par les sous-couches plus étendues $5s^2$ et $5p^6$ (Figure 7). Ainsi, la réactivité des lanthanides, à l'inverse de celle des métaux d est très peu influencée par la configuration électronique et les interactions qu'ils entretiennent avec leur environnement extérieur. Elles s'avèrent donc principalement sous contrôle de charge et sous contrôle stérique (le degré de covalence des liaisons Ln(III)-ligand n'excède pas 5 à 7%).¹⁶ C'est pourquoi les lanthanides possèdent des propriétés remarquablement homogènes.

Le seul paramètre variant régulièrement le long de cette période est le rayon atomique qui diminue (Tableau 5) bien que cela ne soit pas propre aux lanthanides (la seule différence est que cette contraction est faible) : suite à la répulsion interélectronique la valeur de la constante d'écran apportée par le nouvel électron n'est pas suffisante pour égaler l'augmentation de charge du noyau ressentie par le nuage électronique. Il s'agit du seul critère qui puisse être mis à profit pour séparer tous ces éléments en plus des propriétés rédox particulières de l'Eu et du Ce.

¹⁵ C. Huang and Z. Bian, *Rare Earth Coordination Chemistry : Fundamentals and Applications*, C. Huang (ed.), John Wiley & Sons, Ltd, **2010**, pp. 1-39.

¹⁶ J.-C. G. Bünzli and S. V. Eliseeva, *Springer Series on Fluorescence*, P. Hänninen and H. Härnä (eds.), Springer-Verlag : Berlin Heidelberg, **2011**, vol. 7, pp. 1-45.

Lanthanide	Configuration électronique	Rayon atomique (Å) ¹⁷	Rayon ionique des cations trivalents (Å) ¹⁸	
			NC = 6	NC = 9
La	[Xe]5d ¹ 6s ²	1.877	1.032	1.216
Ce	[Xe]4f ¹ 5d ¹ 6s ²	1.824	1.010	1.196
Pr	[Xe]4f ³ 6s ²	1.828	0.990	1.179
Nd	[Xe]4f ⁴ 6s ²	1.821	0.983	1.163
Pm	[Xe]4f ⁵ 6s ²	1.810	0.970	1.144
Sm	[Xe]4f ⁶ 6s ²	1.802	0.958	1.132
Eu	[Xe]4f ⁷ 6s ²	2.042	0.947	1.120
Gd	[Xe]4f ⁷ 5d ¹ 6s ²	1.802	0.938	1.107
Tb	[Xe]4f ⁹ 6s ²	1.782	0.923	1.095
Dy	[Xe]4f ¹⁰ 6s ²	1.773	0.912	1.083
Ho	[Xe]4f ¹¹ 6s ²	1.766	0.901	1.072
Er	[Xe]4f ¹² 6s ²	1.757	0.890	1.062
Tm	[Xe]4f ¹³ 6s ²	1.746	0.880	1.052
Yb	[Xe]4f ¹⁴ 6s ²	1.940	0.868	1.042
Lu	[Xe]4f ¹⁴ 5d ¹ 6s ²	1.734	0.861	1.032

Tableau 5 : Configurations électroniques, rayons atomiques et ioniques des lanthanides.

2 DEGRES D'OXYDATION

Les lanthanides sont des métaux très réducteurs qui possèdent une électropositivité du même ordre de grandeur que celle de la famille des alcalins et des alcalino-terreux. Ils présentent le plus fréquemment un état d'oxydation +3 de configuration [Xe]4fⁿ. En solution, la stabilisation apportée par la solvatation compense la somme des trois premières énergies d'ionisation. La quatrième, correspondant à l'extraction d'un deuxième électron de l'orbital 4f n'est favorable en phase aqueuse que pour le cérium qui atteint alors la configuration du xénon. En revanche le Pr⁴⁺ et le Tb⁴⁺ existent aussi à l'état solide.

A noter que le noyau produit une attraction d'autant plus forte sur les orbitales 4f qu'elles sont enfouies dans le nuage électronique alors que cette interaction dans le cas des métaux d qui disposent d'orbitales de valence beaucoup plus diffuses, est plus faible, conduisant à un nombre plus important d'états d'oxydation.

Le degré d'oxydation +2 semble plus accessible que le +4. En effet, tous les lanthanides à l'état solide ont pu être obtenus sous cette forme, en solution aussi mais plus difficilement.¹⁹

¹⁷ V. S. Sastri, J.-C. Bünzli, V. R. Rao, G. V. S. Rayudu and J. R. Perumareddi, *Modern Aspects of Rare Earth and Their complexes*, Elsevier, Amsterdam, **2003**, pp. 73-125.

¹⁸ R. D. Shannon, *Acta Crystallogr. Sect. A*, **1976**, 32, 751-767.

¹⁹ a) W. J. Evans, *Coord. Chem. Rev.*, **2000**, 206-207, 263-283 ; b) W. J. Evans, *Inorg. Chem.*, **2007**, 46, 3435-3449.

En phase aqueuse, seul le cation Eu^{2+} qui dispose alors d'une couche de valence à moitié remplie est stable.

En synthèse organique, les propriétés rédox du Ce(IV) et du Sm(II) sont largement exploitées.²⁰ Enfin, la purification de l'euporium et du cérium est plus facile à mettre en œuvre car ce sont les seuls lanthanides qui possèdent des états d'oxydations stables en phase aqueuse autres que l'état trivalent.⁵

3 ACIDITE DE LEWIS

La forte charge du cation lanthanidique associé au caractère ionique de ses interactions avec son environnement font de ces éléments des acides durs selon l'échelle de Klopman.²¹ Ils sont donc très oxophiles et possèdent une forte affinité pour les groupements ionisables ou naturellement chargés négativement comme les carboxylates, alcoxydes, phosphates, hydroxydes (bases dures) et plus généralement l'ordre croissant d'affinité est le suivant : $\text{O} > \text{N} > \text{S}$. En revanche leur dureté est « adoucie » par leur volume important.

Cette dualité confère à ces cations des propriétés particulières par rapport aux acides de Lewis classiques (TiCl_4 , AlCl_3 , SnCl_4 , etc.) pour l'activation d'électrophiles (réactions d'aldolisation et de Mannich par exemple). Ainsi, ils sont labiles (les ligands sont facilement échangeables ce qui permet, généralement, une introduction du sel de lanthanide en quantité catalytique) et surtout beaucoup plus tolérants à l'humidité, à l'utilisation de solvants protiques et ne perdent pas de leur activité en présence de base de Lewis faible. L'optimisation des conditions (rendement, stéréosélectivité) reste cependant très empirique mais les catalyseurs qui donnent généralement les meilleurs résultats sont les triflates des cations Sc^{3+} et Yb^{3+} .²² L'utilisation de ligands chiraux permet d'obtenir des versions asymétriques des réactions catalysées.²³

Néanmoins, les terres rares libres en milieu aqueux ont tendance à précipiter sous forme d'hydroxydes, $\text{Ln}(\text{OH})_3$, à partir d'un pH voisin de 6.5 (activation de l'acidité des protons des molécules d'eau présentes dans la sphère de coordination).

Enfin, leur acidité et leur capacité à échanger facilement leur ligand (nombre de cycles catalytiques important) sont aussi exploitées en polymérisation et en oligomérisation d'oléfines.²⁴

²⁰ a) V. Nair, L. Balagopal, R. Rajan and J. Mathew, *Acc. Chem. Res.*, **2004**, *37*, 21-30 ; b) K. C. Nicolaou, S. P. Ellery and J. S. Chen, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 7140-7165 ; c) M. Szostak and D. J. Procter, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 9238-9256.

²¹ G. Ionova, S. Ionov, C. Rabbe, C. Hill, C. Madic, R. Guillaumont, G. Modolo and J. C. Krupa, *New J. Chem.*, **2001**, *25*, 491-501.

²² S. Kobayashi, M. Sugiura, H. Kitagawa and W. W. L. Lam, *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 2227-2302.

²³ a) J. Inanaga, H. Furuno and T. Hayano, *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 2211-2226 ; b) M. Shibasaki and N. Yoshikawa, *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 2187-2210 ; c) T. Hamada, K. Manabe, S. Ishikawa, S. Nagayama, M. Shiro and S. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 2989-2996 ; d) Y. Mei, P. Dissanayake and M. J. Allen, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 12871-12873.

²⁴ a) R. Anwender, *Topics in Organometallic Chemistry*, S. Kobayashi (Ed.), vol. 2, Springer: Berlin Heidelberg, **1999**, pp. 1-61 ; b) F. T. Edelmann, *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, *38*, 2253-2268 ; c) F. T. Edelmann, *Coord. Chem. Rev.*, **2012**, *256*, 1151-1228 ; d) F. T. Edelmann, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 7657-7672.

4 NOMBRE DE COORDINATION

La géométrie des complexes de lanthanides s'avère très flexible car elle ne peut pas être gouvernée par la direction des orbitales de valence 4f qui sont blindées par les sous-couches externes complètes 5s² et 5p⁶. Ainsi, l'effet de champ des ligands résultant du recouvrement orbitalaire est faible, jusqu'à cent fois moins que ce qui est généralement observé avec les métaux d, qui eux, possèdent principalement soit quatre, soit six sites de coordination.¹⁸ Cette propriété contraint le métal f à se coordiner à un maximum de ligands afin de minimiser l'énergie électrostatique.

La valeur du nombre de coordination et la géométrie adoptée sont donc la résultante de plusieurs facteurs dont : la taille du lanthanide, la gêne stérique et la dureté des bases de Lewis assurant le rôle de ligands. Ces cations métalliques peuvent s'accommoder de trois à douze sites de coordination. En phase aqueuse ce nombre varie généralement de huit, pour les lanthanides plus petits (Dy-Yb), à neuf pour les plus volumineux (La-Pr) ; entre le néodyme et le terbium cette valeur est moins univoque et oscille entre huit et neuf.²⁵

5 PROPRIETES MAGNETIQUES

Les éléments disposant d'électrons non appariés sont dits paramagnétiques et sont dotés d'un moment magnétique non-nul ainsi que d'une susceptibilité magnétique positive (qui traduit la faculté d'aimantation d'un matériau sous l'action d'un champ magnétique) ; ils sont attirés par un champ magnétique. Un composé est diamagnétique si tous ses électrons sont appariés et l'effet subi par un champ magnétique demeure faible.

Les lanthanides, à l'exception du lanthane et du lutécium sont paramagnétiques, car leurs orbitales de valence 4f ne sont que partiellement remplies. De plus, ils possèdent un fort effet paramagnétique, d'environ 1.5 pour le samarium, à 10.5 magnétons de Bohr (moment magnétique associé à une mole d'électrons) pour le dysprosium et l'holmium.²⁶ A titre de comparaison, le métal de transition d ayant le plus fort moment magnétique est le Fe³⁺ avec une valeur de 6.0 magnétons de Bohr. Néanmoins, après complexation leur magnétisation est plus faible car l'effet du champ cristallin est beaucoup plus prononcé dans les chélates métalliques d. Pour les métaux 4f, toujours grâce à l'enfouissement des orbitales de valence dans le nuage électronique, l'effet du champ des ligands est minimal et la contribution orbitalaire au moment magnétique est conséquente. C'est une des raisons pour lesquelles ils rentrent dans la composition d'aimants puissants.²⁷

Une application très importante dans le domaine médical et qui sera brièvement commentée par la suite est liée au caractère paramagnétique du gadolinium. Ce cation métallique permet, en imagerie par résonance magnétique (IRM), d'améliorer la sensibilité en relaxant plus rapidement les protons de l'eau situés dans son environnement proche *via*

²⁵ J.-C. G. Bünzli and C. Piguet, *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 1897-1928.

²⁶ P. Harvey, I. Kuprov and D. Parker, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2012**, 2015-2022.

²⁷ C. Benelli and D. Gatteschi, *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 2369-2388.

La structure électronique des cations Ln(III), [Xe]4fⁿ (n = 0 - 14), conduit à un très grand nombre de niveaux énergétiques (jusqu'à 3 432 pour le Gd³⁺) correspondant aux différentes configurations électroniques possibles (Figure 8). Cette valeur est donnée par la formule suivante qui dénombre les possibilités d'associer n électrons dans les sept orbitales f en prenant en compte le spin :

$$\frac{14!}{n!(14-n)!}$$

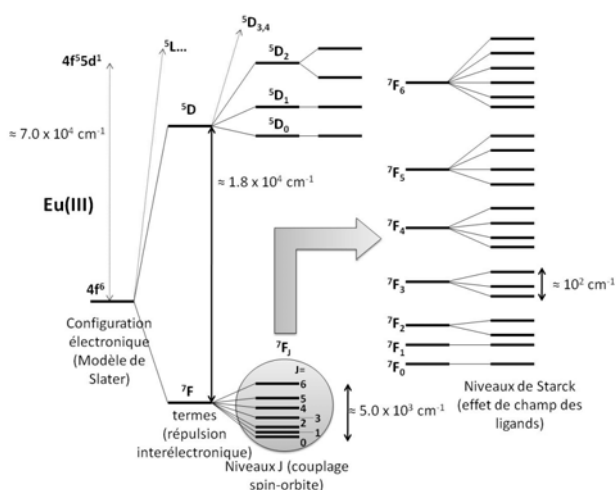


Figure 9 : Eclatement des niveaux d'énergie du cation Eu³⁺ inséré dans un site de géométrie cubique.¹⁶

L'énergie des configurations électroniques est obtenue en première approximation en considérant que chaque électron f subit la même interaction avec le noyau (modèle de Slater), par conséquent, chaque configuration possède la même énergie. Une première levée de dégénérescence survient en introduisant la répulsion interélectronique qui éclate alors le niveau fondamental en plusieurs termes, espacés en moyenne par des énergies de l'ordre de 10⁴ cm⁻¹. Une seconde interaction faisant intervenir le

couplage entre les deux mouvements des électrons (sur eux-mêmes et autour du noyau : couplage spin-orbite ou couplage de Russel-Saunders) éclate les termes en niveaux spectroscopiques avec une amplitude plus faible que précédemment, de l'ordre de 10³ cm⁻¹. La dernière levée de dégénérescence provient du champ des ligands dont l'éclatement, qui dépend de la géométrie du site métallique, est de l'ordre de 10² cm⁻¹ (sous-niveaux de Starck) alors que pour les métaux d elle est cent fois plus élevée (Figure 9).

6.2. TRANSITIONS ELECTRONIQUES

Les transitions électroniques que peuvent subir les lanthanides sont de nature différente : transitions de transfert de charge du ligand vers le métal (LMCT (*Ligand to Metal Charge Transfer*) : Sm³⁺, Eu³⁺ ou Yb³⁺ y sont les plus aptes) ou inversement (MLCT (*Metal to Ligand Charge Transfer*) : Ce³⁺ et Tb³⁺ principalement), promotion d'un électron 4f vers une orbitale 5d ou, dernière possibilité, vers une autre orbitale 4f. Les deux premiers types de transitions ont une

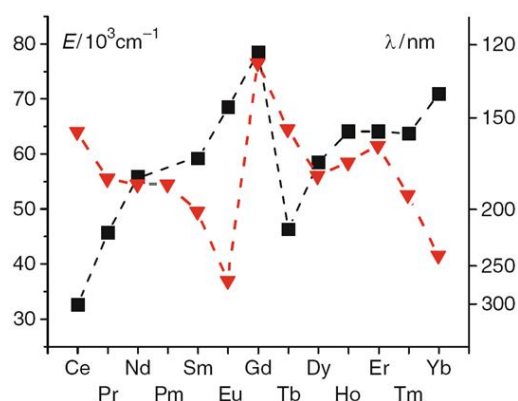


Figure 10 : Energies des transitions 4f-5d des Ln³⁺ dans CaF₂ (carrés noirs) et de transfert de charge d'une orbitale 2p(O) vers une 4f (triangles rouges).¹⁶

probabilité non négligeable de se produire (ϵ est compris entre 200 et 1 000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ pour la transition $4f-5d$)³⁰ mais ont besoin d'une énergie importante ($\lambda < 300 \text{ nm}$) par rapport aux applications biologiques souhaitées (Figure 10). A noter que celle de la transition $4f-5d$ est largement dépendante du ligand puisque l'expansion radiale de la $5d$ implique un effet de champ des ligands plus fort.

Les propriétés de luminescence des lanthanides qui sont exploitées à des fins biomédicales et d'imagerie cellulaire proviennent des transitions $4f-4f$. Leurs propriétés vont donc être traitées plus en détails au cours de ce chapitre.

6.3. CARACTERISTIQUES DES TRANSITIONS 4f-4f

A l'exception du La(III) et du Lu(III) dont le premier dispose d'une couche $4f$ vide et le second pleine, les lanthanides trivalents possèdent des propriétés singulières de luminescence qui recouvrent une large gamme spectrale : de l'UV-B pour le Gd^{3+} (315 nm) au proche IR pour l' Yb^{3+} (980 nm) ou l' Er^{3+} (1 540 nm) par exemple (Figure 11).

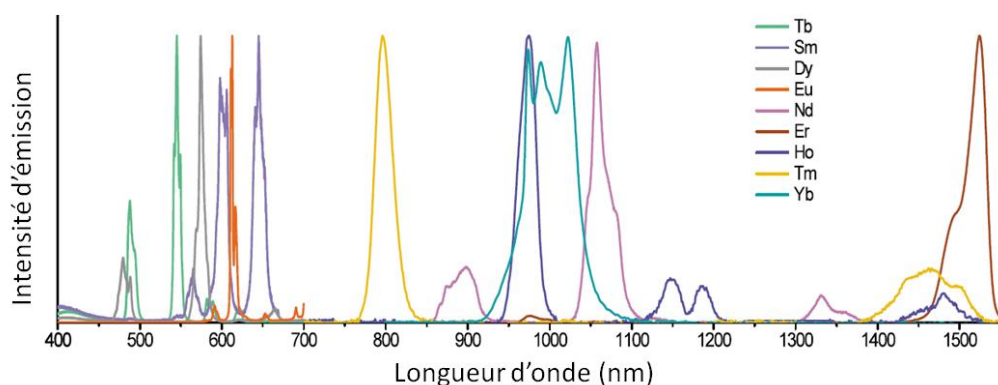


Figure 11 : Intensités normalisées d'émission en fonction de la longueur d'onde de différents complexes de Ln(III).³¹

Le caractère très faiblement covalent des orbitales $4f$ assure une perturbation minimale de l'architecture moléculaire suite à l'absorption d'énergie. C'est pourquoi le nombre de sous-niveaux électroniques dans le cas des lanthanides est nettement plus faible que pour des chromophores organiques (multitude de niveaux vibrationnels ($\Delta E_{\text{vib}} \approx 1\,000 \text{ cm}^{-1}$) et rotationnels ($\Delta E_{\text{rot}} \approx 30 \text{ cm}^{-1}$)). Ainsi, le réarrangement électronique de la transition f-f qui s'ensuit libère une énergie lumineuse

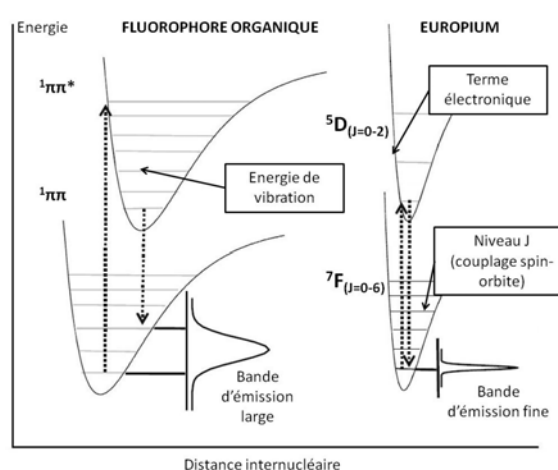


Figure 12: Schématisation par des diagrammes d'énergie potentielle de l'émission radiative d'un fluorophore organique et de l'europium.¹⁶

³⁰ S. V. Eliseeva and J.-C. G. Bünzli, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 189-227.

³¹ H. Uh and S. Petoud, *C. R. Chim.*, **2010**, 13, 668-680.

très similaire à celle de l'absorption, car de fait elle ne peut quasiment pas se dissiper par vibration et rotation des liaisons centrées sur le cation métallique (Figure 12). Par conséquent, cela conduit d'une part, à des bandes d'émission souvent très fines (la largeur de bande à mi-hauteur est de l'ordre de 10 à 20 nm),³² et d'autre part à un déplacement de Stokes (différence entre la longueur d'onde d'émission et d'absorption) négligeable.

Aussi, il est très peu probable qu'un électron de valence soit promu dans une orbitale appartenant à la même sous-couche, c'est pourquoi le coefficient d'absorption molaire des transitions 4f-4f est de l'ordre de l'unité (avec un maximum d'environ $12 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ pour le Nd^{3+})³³ alors que les chromophores organiques possèdent communément des coefficients de l'ordre de 10^4 à $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. L'excitation directe sur l'ion métallique se révèle donc peu efficace et nécessite l'emploi de lasers puissants et émettant dans une fine gamme spectrale (les bandes d'absorption des lanthanides sont étroites : $\Delta\lambda < 2 \text{ nm}$)³⁴. Le corollaire de ce phénomène est que la désexcitation radiative de ces transitions s'avère extrêmement longue, jusqu'à 10 ms pour certains et suivant la raie d'émission, entre autre.¹⁶ Cette caractéristique est la raison principale de l'utilisation des complexes de lanthanides pour des applications bioanalytiques (cf. § V),³⁵ car la mesure de luminescence en temps résolu permet de s'affranchir du bruit de fond lié à la fluorescence intrinsèque des milieux biologiques dont le temps de désexcitation radiative n'excède pas généralement quelques dizaines de ns.

6.4. SENSIBILISATION DE LUMINESCENCE OU EFFET D'ANTENNE

La capacité du cation métallique à promouvoir une transition intraconfigurationnelle suite à une absorption d'énergie, peut être exaltée en l'incorporant à proximité d'un chromophore adéquat, dont le rôle est, grâce à sa structure polyaromatique, d'absorber l'énergie lumineuse (transitions $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \pi^*$) puis de la transférer au lanthanide. Ce phénomène, désigné sous le terme de sensibilisation ou effet d'antenne, a été découvert en 1942.³⁶ Le coefficient d'absorption molaire est maintenant dépendant du chromophore (des valeurs de $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ sont courantes) mais l'intensité d'émission du complexe sera gouvernée, en plus, par l'efficacité du transfert d'énergie entre l'antenne et le métal.

Des antennes constituées d'un métal de transition et d'un ligand adéquat, par l'intermédiaire de l'état triplet de cette entité (³MLCT) sont aussi capables de sensibiliser les lanthanides émettant dans le proche IR.³⁷ Ce type de transfert ne sera pas détaillé ici.

³² A. de Bettencourt-Dias, *Curr. Org. Chem.*, **2007**, *11*, 1460-1480.

³³ J.-C. G. Bünzli and S. V. Eliseeva, *J. Rare Earths*, **2010**, *28*, 824-842.

³⁴ M. H. V. Werts, N. Nerambourg, D. Pelegry, Y. L. Grand and M. Blanchard-Desce, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2005**, *4*, 531-538.

³⁵ I. Hemmilä and V. Laitala, *J. Fluoresc.*, **2005**, *15*, 529-542.

³⁶ S. I. Weissman, *J. Chem. Phys.*, **1942**, *10*, 214-217.

³⁷ a) M. D. Ward, *Coord. Chem. Rev.*, **2007**, *251*, 1663-1677 ; b) F.-F. Chen, Z.-Q. Chen, Z.-Q. Bian and C.-H. Huang, *Coord. Chem. Rev.*, **2010**, *254*, 991-1010.

7 TRANSFERT D'ÉNERGIE DU CHROMOPHORE AU LANTHANIDE

7.1. MECANISME

L'échange d'énergie entre l'antenne et le cation métallique est un mécanisme complexe, partiellement élucidé, qui peut faire intervenir de nombreux phénomènes de transfert.³⁸ Le diagramme de Jablonski peut néanmoins permettre de décrire sommairement ce processus (Figure 13) : le chromophore, suite à l'absorption de lumière, atteint un état excité singulet puis triplet par croisement intersystème. Dans le cas de chromophores classiques, cette étape d'inversion de spin de l'électron promu n'est pas favorable mais la proximité d'un atome lourd paramagnétique rend cette conversion compétitive.³⁹ Le lanthanide reçoit l'énergie principalement *via* ce niveau⁴⁰ dont la durée de vie, plus longue que celle de l'état singulet, est plus compatible à un transfert vers le cation métallique. L'efficacité de ce transfert dépend de la facilité avec lequel cet état triplet peut se peupler et à sa position par rapport au niveau d'émission du lanthanide.

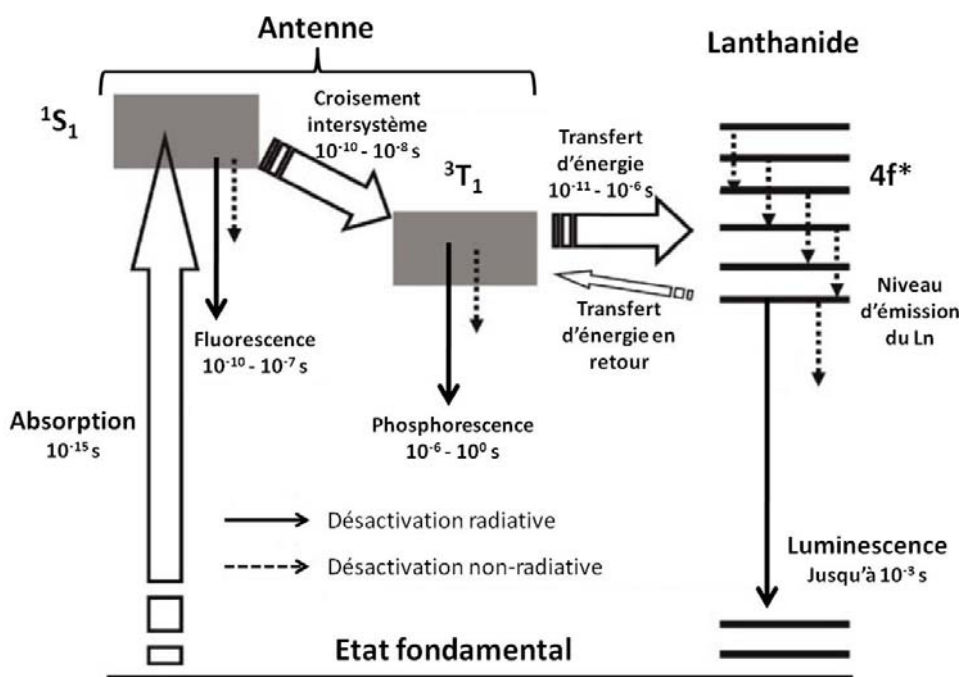


Figure 13 : Diagramme simplifié résumant les principaux transferts d'énergie avec leurs durées de vie respectives impliqués dans la sensibilisation du Ln.⁴¹

Le rendement quantique d'un chélate (Φ), qui formellement représente le rapport entre le nombre de photons émis par le lanthanide sur ceux absorbés par le ligand, est lié à l'efficacité du croisement intersystème (CIS), du transfert d'énergie (TE) entre cet état et les

³⁸ G. F. de Sá, O. L. Malta, C. de Mello Donegá, A. M. Simas, R. L. Longo, P. A. Santa-Cruz and E. F. da Silva Jr, *Coord. Chem. Rev.*, **2000**, *196*, 165-195.

³⁹ S. Tobita, M. Arakawa and I. Tanaka, *J. Phys. Chem.*, **1985**, *89*, 5649-5654.

⁴⁰ C. Yang, L.-M. Fu, Y. Wang, J.-P. Zhang, W.-T. Wong, X.-C. Ai, Y.-F. Qiao, B.-S. Zou and L.-L. Gui, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 5010-5013.

⁴¹ J.-C. G. Bünzli and C. Piguet, *Chem. Soc. Rev.*, **2005**, *34*, 1048-1077.

niveaux du lanthanide susceptibles de collecter l'énergie, et enfin, est directement dépendant du rendement quantique intrinsèque de l'ion métallique (Φ_{Ln}^{Ln}) :

$$\Phi = \eta_{CIS} \times \eta_{TE} \times \Phi_{Ln}^{Ln} = \eta_{sens} \times \Phi_{Ln}^{Ln} \quad ; \quad \Phi_{Ln}^{Ln} = \frac{\tau_{obs}}{\tau_{rad}} = \frac{k_{rad}}{k_{obs}} = \frac{k_{rad}}{k_{rad} + k_{nrad}} .$$

Avec τ_{rad} et τ_{obs} correspondant aux durées de vie, respectivement, de luminescence et de l'état excité ; k_{rad} et k_{nrad} sont les constantes de vitesse des processus radiatif et non-radiatif. Le rendement intrinsèque reflète l'intensité avec laquelle se produisent les processus de désactivation non-radiative. La mesure directe de ce paramètre est délicate du fait de la très faible absorbance des transitions f-f. En revanche des formules, complexes pour un chimiste organicien, permettent à partir du spectre d'absorbance de calculer τ_{rad} (dépend évidemment du lanthanide (et du niveau d'émission), mais aussi de son environnement chimique ainsi que de l'indice de réfraction du milieu).⁴² Quant à τ_{obs} , qui s'obtient expérimentalement par la mesure de la décroissance de l'intensité de luminescence, sa valeur englobe tous les processus de désactivation.

Il peut être intéressant de remarquer que le rendement intrinsèque du lanthanide, et par suite le rendement quantique global Φ , est d'autant plus élevé que la vitesse de désactivation radiative τ_{rad} est rapide. En effet, une désactivation radiative rapide signifie que le processus de luminescence est probable et que l'excès d'énergie accumulée par l'effet d'antenne se dissipera plus facilement selon cette voie radiative (d'où une valeur élevée de Φ). Pour simplifier, un rendement quantique global élevé n'est pas nécessairement synonyme d'un temps de luminescence (τ_{obs}) plus long. Ainsi les chélates **Eu-28** (Figure 27) et **Eu-74** (Figure 39) possèdent des rendements quantiques relativement élevés en phase aqueuse pour des complexes d'euprimum et des temps d'émission assez court (respectivement 70%/0.50-0.73 ms et 40%/0.52 ms). Il en est de même pour le terbium dont certains exemples sont présentés à la Figure 14.

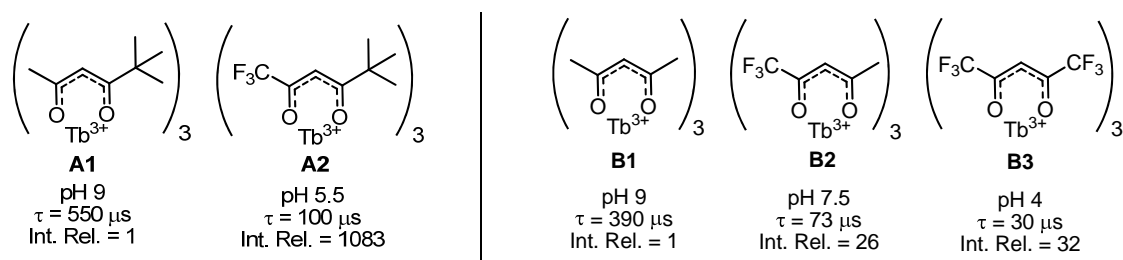


Figure 14 : Chélates de terbium montrant une variation opposée ente le rendement quantique (Int. Rel. : intensité relative de luminescence) et la durée d'émission τ_{obs} (phase aqueuse contenant aussi du TOPO, TriOctylPhosphine Oxide, et du Triton X100).⁴³

Au moins deux mécanismes peuvent être proposés pour expliquer le transfert d'énergie permettant la transition f-f (Figure 15) : un mécanisme d'échange d'électrons (type Dexter)

⁴² J.-C. G. Bünzli, A.-S. Chauvin, H. K. Kim, E. Deiters and S. V. Eliseeva, *Coord. Chem. Rev.*, **2010**, 254, 2623-2633.

⁴³ I. Hemmilä, *Anal. Chem.*, **1985**, 57, 1676-1681.

dont l'efficacité dépend de la distance R entre le ligand et le lanthanide (proportionnelle à $e^{-R_{L-Ln}}$) et de leur recouvrement orbitalaire ; le deuxième est un transfert d'énergie par interaction dipôle-dipôle (Förster) opérant à plus grande distance, car proportionnel à R_{L-Ln}^{-6} , et dépendant à la fois de l'orientation de l'antenne vis-à-vis du lanthanide et du recouvrement entre le spectre d'émission du ligand et le spectre d'absorption du métal. Le mécanisme d'échange semble être le moins probable car, encore une fois, les orbitales 4f étant peu étendues, elles ne permettent pas un bon recouvrement orbitalaire avec celles du chromophore.

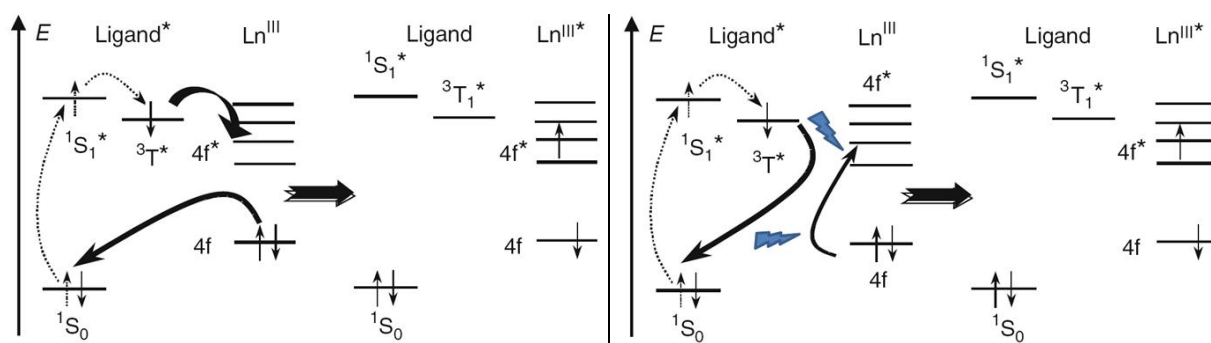


Figure 15 : Mécanismes possibles de transfert d'énergie du ligand au lanthanide (à gauche : Dexter ; à droite Förster).¹⁶

Alors que l'excitation directe du lanthanide induit un déplacement de Stokes négligeable, celle indirecte, *via* des molécules polyaromatiques possédant des états électroniques excités plus haut en énergie, conduit à des déplacements de l'ordre de 200 à 300 nm. Ceci constitue un autre intérêt des lanthanides pour des applications biologiques, car la plupart des chromophores organiques fluorescents ont des déplacements de Stokes, généralement, largement inférieurs à 100 nm. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission seront alors bien mieux différenciées, et les longueurs d'onde d'émission spécifiques des lanthanides plus faciles à distinguer (pour une longueur d'onde d'excitation donnée).

7.2. OPTIMISATION DU RENDEMENT DE SENSIBILISATION

D'après l'équation précédente, le rendement quantique peut être maximisé en optimisant d'une part, le processus de sensibilisation (η_{sens}) et d'autre part, le rendement quantique intrinsèque (Φ_{Ln}^{Ln}). Cette dernière variable est par définition liée au lanthanide. Elle dépend de l'écart énergétique entre le niveau d'émission et de réception du métal et de l'efficacité avec laquelle le ligand le protège des interactions extérieures (*cf.* § II-7-4). Enfin, tout phénomène minimisant « l'interdiction » de la transition f-f contribuera à faire augmenter ce rendement mais cette notion demeure relativement vague et non prévisible.

A l'inverse, certaines règles établies expérimentalement prévoient grossièrement les conditions à respecter afin de maximiser le transfert d'énergie dont en particulier :

- 1) l'écart entre le niveau singulet et triplet du ligand doit être d'au moins $5\,000\text{ cm}^{-1}$;

2) l'état triplet du ligand doit être plus énergétique d'au moins $2\,500$ à $3\,000\text{ cm}^{-1}$ par rapport aux niveaux d'émission de l'Eu(III) et du Tb(III) (ceci est probablement vrai aussi pour les autres lanthanides).^{26,44}

Par conséquent, il est possible d'estimer l'énergie du premier état excité singulet du chromophore à partir duquel chaque ion métallique pourra être sensibilisé. Par exemple, le niveau principal d'émission de l'euporium est le 5D_0 . En revanche, il semblerait que le niveau 5D_1 soit le plus efficace à réceptionner l'énergie venant du chromophore : la durée de vie de l'état 5D_0 serait suffisamment longue pour que le transfert d'énergie en retour soit compétitif (Figure 16).^{44b,45} A l'inverse, il semblerait probable que suite au peuplement du niveau 5D_1 , l'énergie soit plus efficacement transférée sur le 5D_0 minimisant ainsi le transfert d'énergie en retour.⁴⁶ Pour le terbium le niveau 5D_4 permet à la fois de collecter l'énergie de l'antenne et de la réémettre sous forme de luminescence.

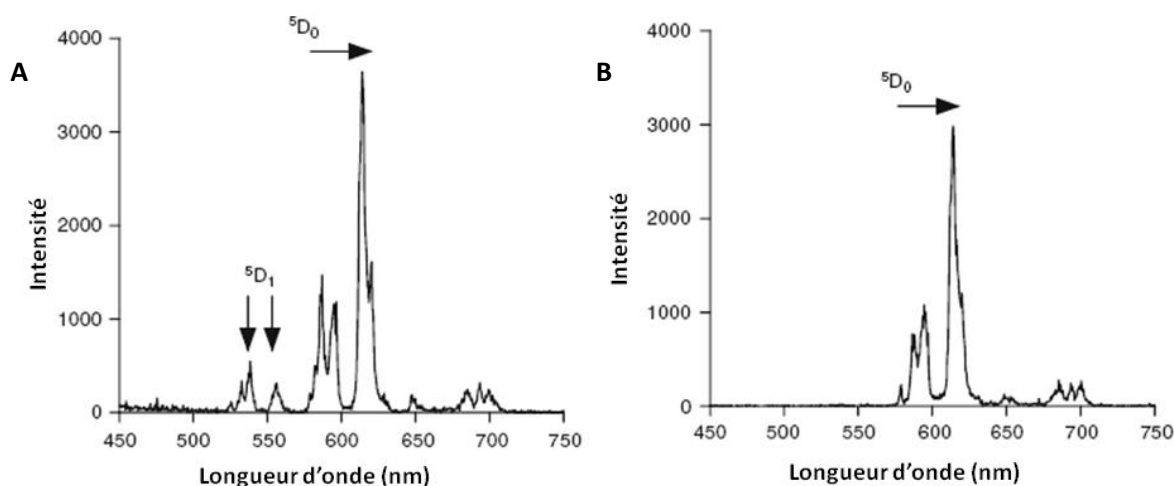


Figure 16 : Spectres d'émission d'un chélate d'euporium enregistré $2\ \mu\text{s}$ (A) ou $7\ \mu\text{s}$ (B) après l'excitation.⁴⁷

Ainsi, l'euporium aura besoin d'une antenne possédant son premier état excité singulet à une énergie minimale aux alentours de $25\,600\text{ cm}^{-1}$ (soit environ 385 nm , en considérant le 5D_0) et pour le terbium elle est de $28\,500\text{ cm}^{-1}$ (346 nm).^{44a}

Seules quelques antennes permettent d'atteindre ou même de dépasser parfois ces limites. Quelques exemples sont présentés à la Figure 18. Ce qui pourrait expliquer partiellement cet écart est que soit ces antennes sont capables de sensibiliser correctement le lanthanide avec un écart S_1-T_1 réduit, soit l'énergie de l'état T_1 est plus proche du niveau d'émission du métal, mais dans ce cas le rendement est faible (Eu-3).

⁴⁴ a) F. J. Steemers, W. Verboom, D. N. Reinhoudt, E. B. van der Tol and J. W. Verhoeven, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 9408-9414 ; b) M. Latva, H. Takalo, V.-M. Mukkala, C. Matachescu, J. C. Rodriguez-Ubis and J. Kankare, *J. Lumin.*, **1997**, *75*, 149-169.

⁴⁵ A. D'Aléo, A. Picot, P. L. Baldeck, C. Andraud and O. Maury, *Inorg. Chem.*, **2008**, *47*, 10269-10279.

⁴⁶ A. Beeby, S. Faulkner, D. Parker and J. A. G. Williams, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2001**, 1268-1273.

⁴⁷ I. Hemmilä and V. Laitala, *Springer Series on Fluorescence*, P. Hänninen and H. Hännä (eds.), Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, **2011**, vol. 7, pp. 361-380.

D'autres paramètres comme les cinétiques de transferts d'énergie ainsi que la géométrie du complexe jouent aussi un rôle déterminant dans l'efficacité du processus de sensibilisation (et du rendement intrinsèque du lanthanide probablement).

Concernant la règle 2, si l'écart est trop faible, un transfert d'énergie en retour sur l'état triplet peut se produire et sa désactivation non-radiative devient compétitive ce qui conduit donc à une inhibition de luminescence. Une large différence peut néanmoins permettre un transfert efficace sur le métal *via* ses niveaux de haute énergie mais l'accès au niveau d'émission impliquera de nombreuses conversions internes, ce qui diminuera aussi la luminescence.⁴⁸ Pour l'ytterbium, qui ne contient qu'un seul état d'émission localisé à $10\,250\text{ cm}^{-1}$ et aucun autre niveau plus énergétique, l'échange d'énergie ne pourra pas, *a priori*, s'effectuer *via* un transfert de type Förster (qui nécessite un recouvrement spectral) avec des chromophores possédant des états triplets au-delà de $20\,000\text{ cm}^{-1}$ par exemple. La sensibilisation de ce lanthanide peut très probablement aussi se dérouler selon un mécanisme d'échange d'électron avec l'antenne (état LMCT).⁴⁹ En effet, l'ytterbium est un lanthanide facilement réductible (*cf.* Figure 10). Ainsi le tryptophane, à partir de son état 1S situé à 3.9 eV (soit $31\,400\text{ cm}^{-1}$) le réduit en Yb(II). A partir du niveau intermédiaire [Trp $^{\bullet+}$, Yb $^{2+}$], l'oxydation du métal par le radical Trp $^{\bullet+}$ le conduit soit à son niveau fondamental, soit à son état excité $^2F_{5/2}$ à partir duquel il émettra de la luminescence en se désactivant (Figure 17).

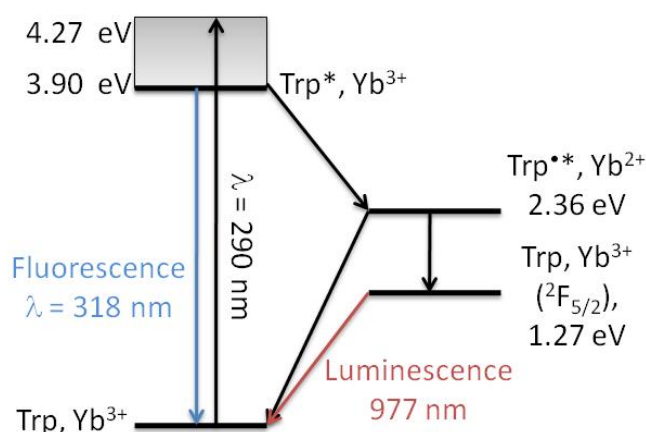


Figure 17 : Représentation schématique de la sensibilisation de l'ytterbium par une antenne indolique.⁴⁹

⁴⁸ a) G. A. Crosby and M. Kasha, *Spectrochim. Acta*, **1958**, *10*, 377-382 ; b) M. H. V. Werts, J. W. Hofstraat, F. A. J. Geurts and J. W. Verhoeven, *Chem. Phys. Lett.*, **1997**, *276*, 196-201.

⁴⁹ W. D. Horrocks, J. P. Bolender, W. D. Smith and R. M. Supkowski, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 5972-5973.

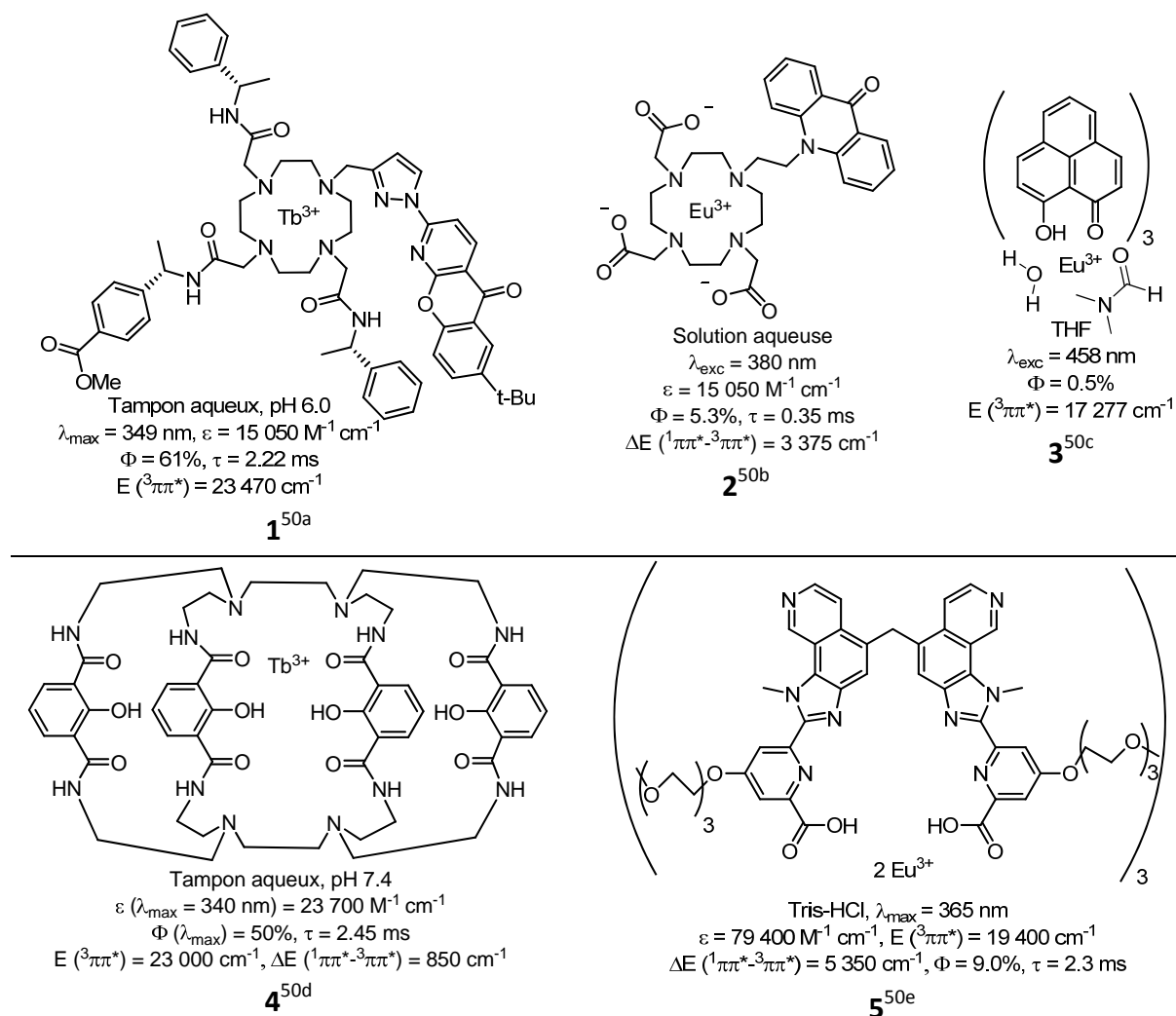


Figure 18 : Quelques exemples d'antennes capables de sensibiliser le terbium ou l'euprium, vers, ou au-delà de 350 nm.

Enfin, il faut noter que les antennes capables de sensibiliser efficacement plusieurs lanthanides sont rares (Figure 19) car chacun de ces cations trivalents possède des bandes d'absorption, évidemment qui leur sont propres, mais qui sont étroites.^{34,51} Ainsi, d'infimes variations énergétiques sur les états singulet et triplet des chromophores peuvent induire un mauvais recouvrement avec les spectres d'absorption des lanthanides.

⁵⁰ a) C. P. Montgomery, E. J. New, L. O. Palsson, D. Parker, A. S. Batsanov and L. Lamarque, *Helv. Chim. Acta*, **2009**, 92, 2186-2213 ; b) A. Dadabhoy, S. Faulkner and P. G. Sammes, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2002**, 348-357 ; c) R. V. Deun, P. Nockemann, P. Fias, K. V. Hecke, L. V. Meervelt and K. Binnemans, *Chem. Commun.*, **2005**, 590-592 ; d) A. P. S. Samuel, E. G. Moore, M. Melchior, J. Xu and K. N. Raymond, *Inorg. Chem.*, **2008**, 47, 7535-7544 ; e) E. Deiters, B. Song, A.-S. Chauvin, C. D. B. Vandevyver, F. Gumy and J.-C. G. Bünzli, *Chem. Eur. J.*, **2009**, 15, 885-900.

⁵¹ V. S. Sastri, J.-C. Bünzli, V. R. Rao, G. V. S. Rayudu and J. R. Perumareddi, *Modern Aspects of Rare Earth and Their complexes*, Elsevier, Amsterdam, **2003**, pp. 569-731.

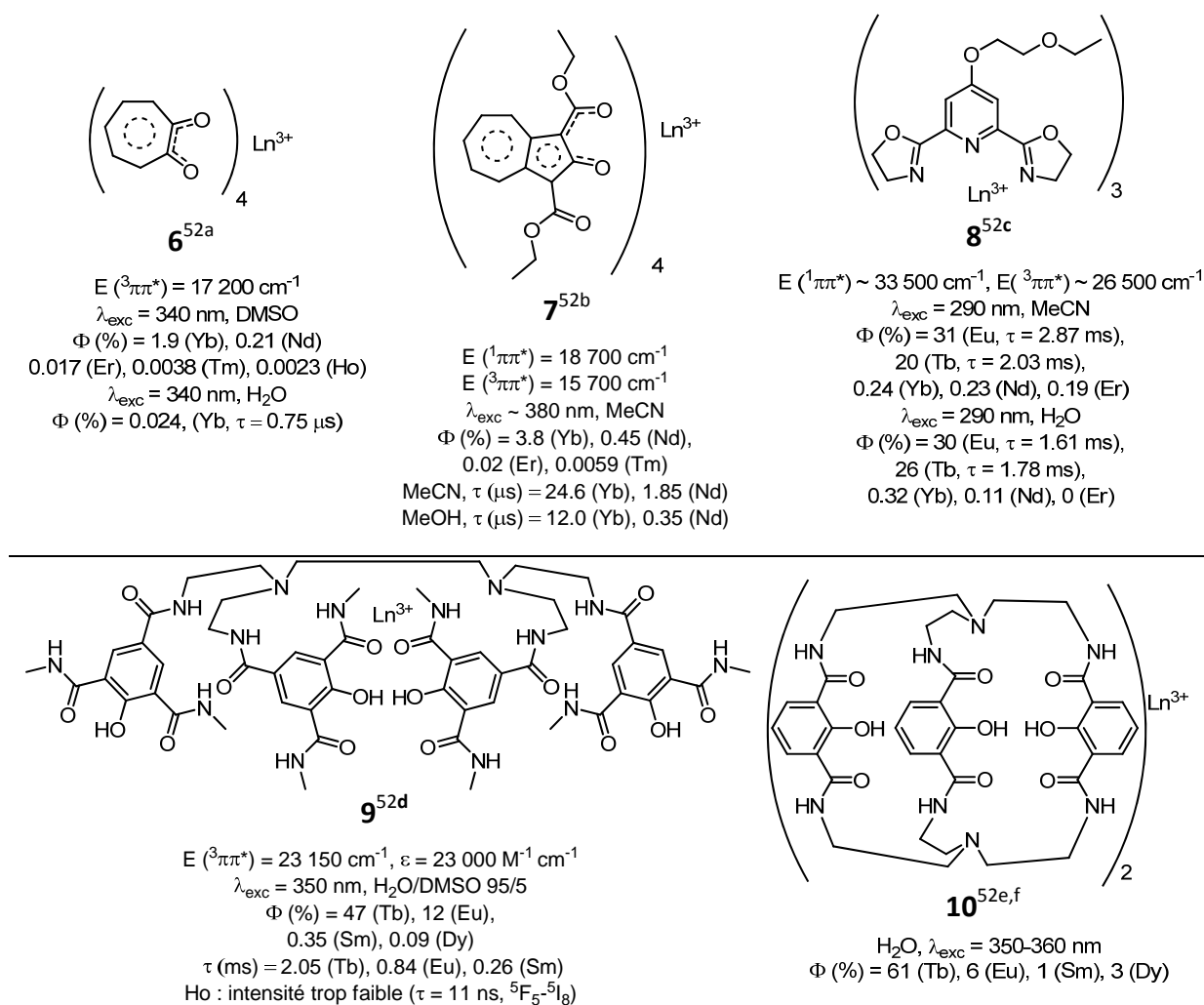


Figure 19 : Quelques exemples de ligands pouvant sensibiliser plusieurs lanthanides.

Quant aux lanthanides émettant dans le proche IR comme le Nd^{3+} , l' Er^{3+} et l' Yb^{3+} dont les niveaux d'émission sont localisés aux alentours de $10\,000\text{ cm}^{-1}$, ils peuvent être sensibilisés par des antennes disposant de bandes d'absorption moins énergétiques situées vers 550 nm. Ainsi de nombreux complexes possédant des antennes de type fluorescéine,⁵³ rhodamine,⁵⁴ BODIPY,⁵⁵ porphyrine,⁵⁶ 8-hydroxyquinoline,⁵⁷ t trathiafulval ne⁵⁸ ou un

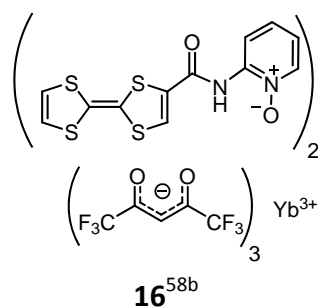
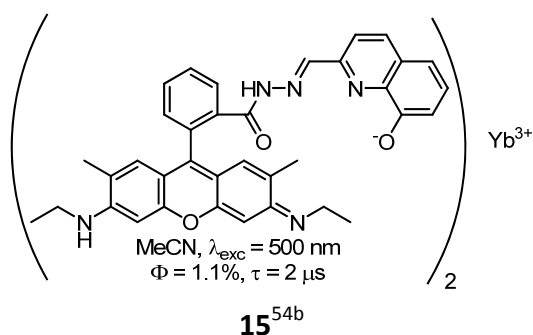
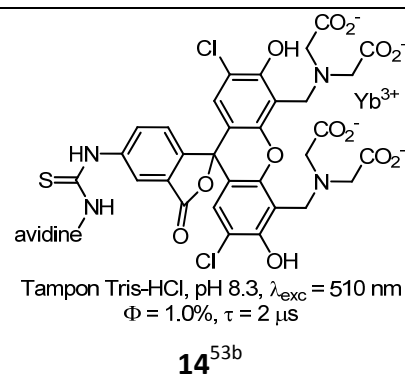
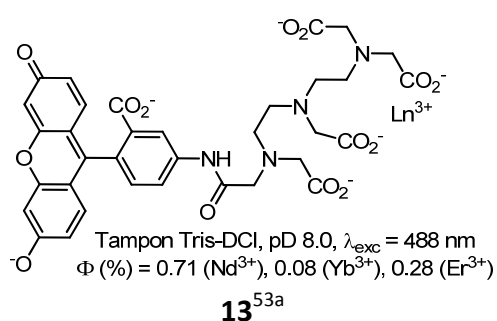
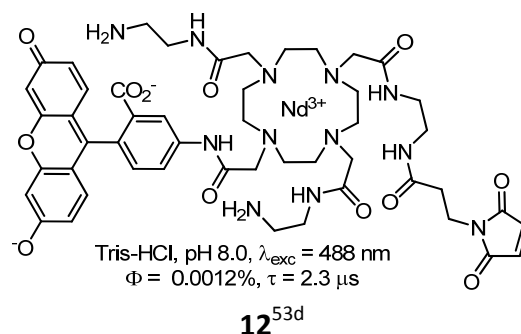
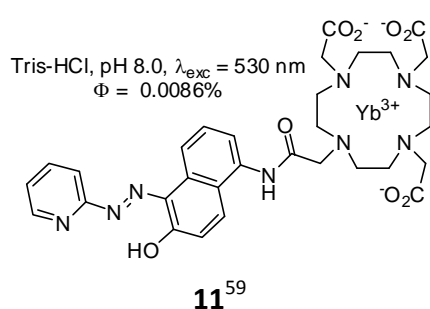
⁵² a) J. Zhang, P. D. Badger, S. J. Geib and S. Petoud, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 2508-2512 ; b) J. Zhang and S. Petoud, *Chem. Eur. J.*, **2008**, *14*, 1264-1272 ; c) A. de Bettencourt-Dias, P. S. Barber and S. Bauer, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 6987-6994 ; d) G.-L. Law, T. A. Pham, J. Xu and K. N. Raymond, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 2371-2374 ; e) S. Petoud, S. M. Cohen, J.-C. G. Bünzli and K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 13324-13325 ; f) J. Xu, T. M. Corneillie, E. G. Moore, G.-L. Law, N. G. Butlin and K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 19900-19910.

⁵³ a) M. H. V. Werts, J. W. Hofstraat, F. A. J. Geurts and J. W. Verhoeven *Chem. Phys. Lett.*, **1997**, *276*, 196-201 ; b) M. H. V. Werts, R. H. Woudenberg, P. G. Emmerink, R. van Gassel, J. W. Hofstraat and J. W. Verhoeven, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, *39*, 4542-4544 ; c) K. Aita, T. Temma, Y. Kuge and H. Saji, *Luminescence*, **2007**, *22*, 455-461 ; d) K. Aita, T. Temma, Y. Shimizu, Y. Kuge, K.-i. Seki and H. Saji, *J. Fluoresc.*, **2010**, *20*, 225-234.

⁵⁴ a) A. Bodi, K. E. Borbas and J. I. Bruce, *Dalton Trans.*, **2007**, 4352-4358 ; b) W. Huang, D. Wu, D. Guo, X. Zhu, C. He, Q. Meng and C. Duan, *Dalton Trans.*, **2009**, 2081-2084.

⁵⁵ a) R. F. Ziessel, G. Ulrich, L. Charbonnière, D. Imbert, R. Scopelliti and J.-C. G. Bünzli, *Chem. Eur. J.*, **2006**, *12*, 5060-5067 ; b) Y. Zhong, L. Si, H. He and A. G. Sykes, *Dalton Trans.*, **2011**, *40*, 11389-11395 ; c) H. He, L.

dérivé de naphthalène non-fluorescent (PAN)⁵⁹ par exemple, sont aptes à sensibiliser ces éléments (Figure 20).



Si, Y. Zhong and M. Dubey, *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 1886-1888 ; **d**) J. H. Ryu, Y. K. Eom, J.-C. G. Bünzli and H. K. Kim, *New J. Chem.*, **2012**, 36, 723-731.

⁵⁶ **a**) X. Zhu, W.-K. Wong, W.-Y. Wong and X. Yang, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2011**, 2011, 4651-4674 ; **b**) V. Bulach, F. Sguerra and M. W. Hosseini, *Coord. Chem. Rev.*, **2012**, 256, 1468-1478.

⁵⁷ F. Artizzu, M. L. Mercuri, A. Serpe and P. Deplano, *Coord. Chem. Rev.*, **2011**, 255, 2514-2529.

⁵⁸ **a**) S. Faulkner, B. P. Burton-Pye, T. Khan, L. R. Martin, S. D. Wray and P. J. Skabara, *Chem. Commun.*, **2002**, 1668-1669 ; **b**) F. Pointillart, T. Cauchy, O. Maury, Y. Le Gal, S. Golhen, O. Cadour and L. Ouahab, *Chem. Eur. J.*, **2010**, 16, 11926-11941.

⁵⁹ K. Aita, T. Temma, Y. Kuge, K.-i. Seki and H. Saji, *Luminescence*, **2010**, 25, 19-24.

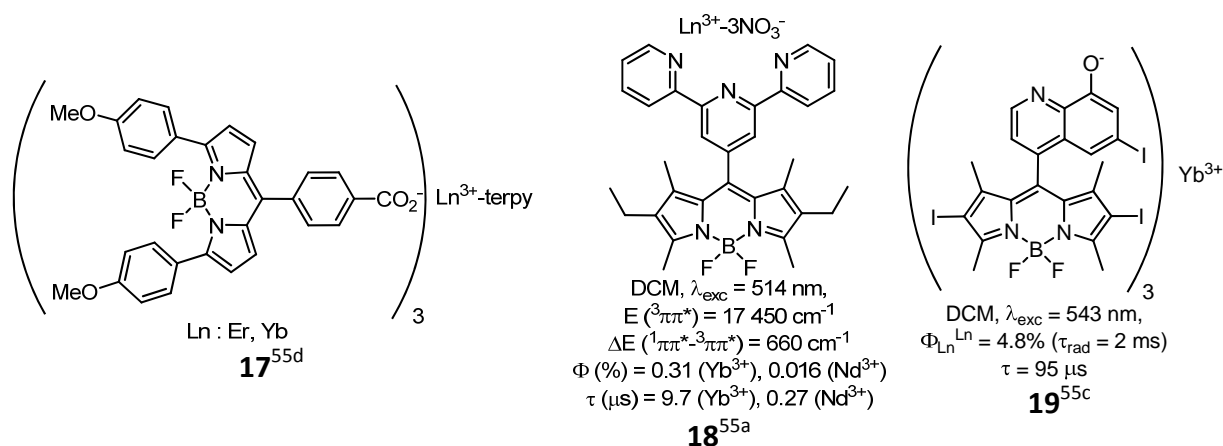


Figure 20 : Quelques exemples de chélates de lanthanides émettant dans le proche IR.

7.3. SENSIBILISATION PAR UN ETAT ILCT

Les chromophores comportant un groupement électro-donneur relié à un groupement électro-attracteur par un système π (structure dite *push-pull*) sont capables d'absorber un rayonnement lumineux moins énergétique (effet bathochrome). Cette caractéristique provient du caractère dipolaire prononcé de l'état excité qui présente une séparation de charge entre ces deux fonctions antagonistes : ce niveau d'énergie est appelé état de transfert de charge intraligand (ILCT : *IntraLigand Charge Transfer*) et s'avère moins énergétique que les niveaux excités singulets voire même triplets liés aux transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ ou $n \rightarrow \pi^*$.

Un état de transfert de charge conduit à un large déplacement de Stokes qui augmente encore avec la polarité du solvant car ce dernier sera alors plus apte à stabiliser cet état intermédiaire hautement polarisé (état ILCT relaxé). Une autre caractéristique est sa dépendance à la température (et par suite à la viscosité du milieu) : plus la température diminue et moins la relaxation par le solvant est efficace (effet hypsochrome).

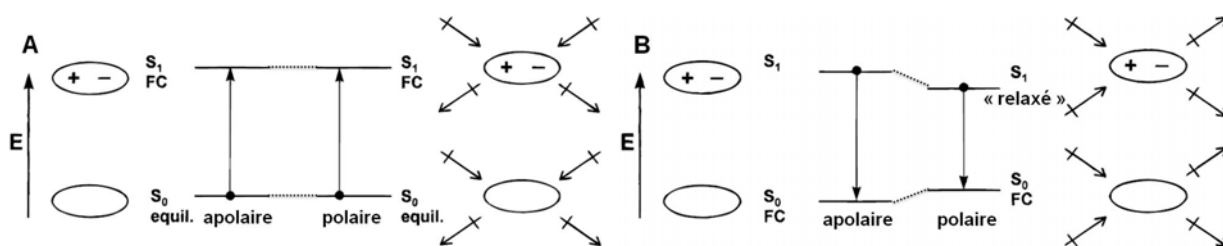


Figure 21 : Représentation schématique de l'absorption (A) et de l'émission (B) d'un chromophore présentant un ILCT. Le solvant n'a aucune influence sur l'absorption (la cinétique de l'absorption est trop rapide pour permettre au solvant de stabiliser la séparation de charge du chromophore liée à l'excitation : état Franck-Condon (FC)).⁶⁰

⁶⁰ A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher and T. E. Rice, *Chem. Rev.*, **1997**, 97, 1515-1566.

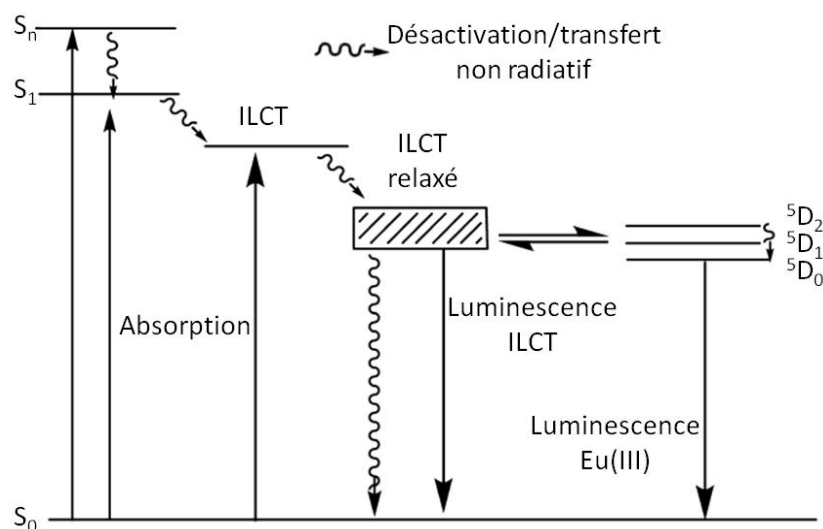


Figure 22 : Représentation schématique du transfert d'énergie *via* un état ILCT.⁴⁵

Bien qu'initialement le seul mécanisme de transfert d'énergie pris en compte dans la conception des chélates de lanthanides luminescents ait été celui faisant intervenir l'état triplet du ligand, depuis moins de dix ans, le développement de ligands capables de sensibiliser les lanthanides *via* le processus ILCT connaît un essor (Figure 22).^{45,61} En effet, le grand avantage de ce dernier est qu'il permet un transfert vers l'europlum à partir d'une excitation dans le visible. Cependant, aucun exemple avec le terbium n'a été décrit, probablement à cause de son niveau 5D_4 , trop énergétique pour être activé par ce mécanisme. En effet, il semblerait que l'efficacité de ce transfert respecte la même règle empirique que celle stipulant que le niveau triplet doit être supérieur d'environ $2\,500\text{ cm}^{-1}$ de l'état de réception du métal.⁴⁵ Ces types de structure sont aussi capables de sensibiliser plus ou moins efficacement les lanthanides émettant dans le proche IR.

Le premier complexe à transfert de charge décrit dans la littérature a été le chélate **Eu-23** mais à l'époque (en 1999) il a été supposé que soit l'écart singulet-triplet était faible (l'énergie de l'état triplet a été mesuré et est situé à $19\,600\text{ cm}^{-1}$) ou qu'un second mécanisme non-élucidé lors de la parution de l'article était impliqué. Le processus classique faisant intervenir l'état triplet de l'antenne doit aussi en partie être impliqué puisqu'en milieu désoxygéné le rendement quantique est légèrement amélioré (20% contre 17%).

⁶¹ a) P. Kadjane, L. Charbonnière, F. Camerel, P. Lainé and R. Ziessel, *J. Fluoresc.*, **2008**, *18*, 119-129 ; b) N. M. Shavaleev, R. Scopelliti, F. Gumy and J.-C. G. Bünzli, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2008**, *2008*, 1523-1529 ; c) M. Shi, C. Ding, J. Dong, H. Wang, Y. Tian and Z. Hu, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2009**, *11*, 5119-5123 ; d) A. D'Aléo, F. Pointillart, L. Ouahab, C. Andraud and O. Maury, *Coord. Chem. Rev.*, **2012**, *256*, 1604-1620.

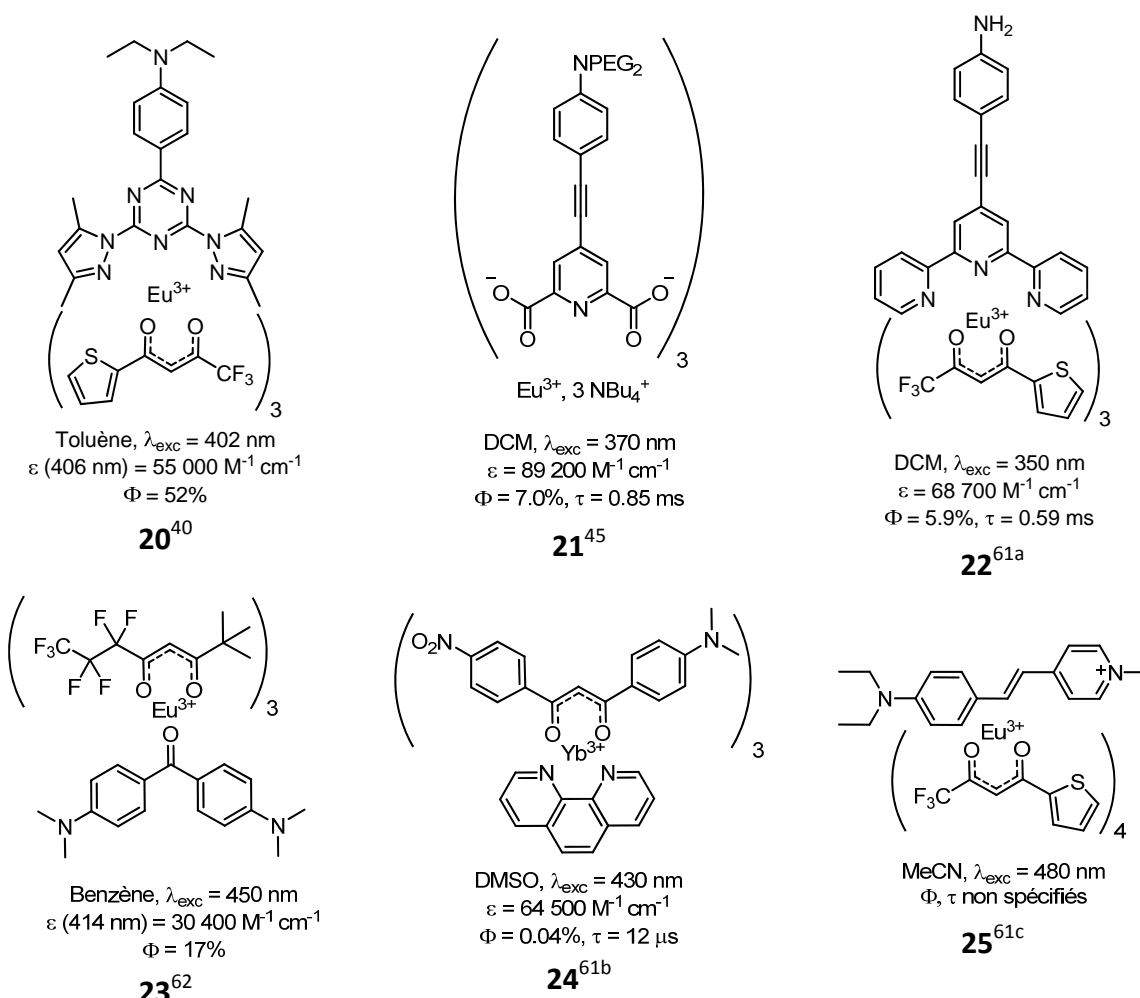


Figure 23 : Chélates présentant un état de transfert de charge intraligand (ILCT).

Après avoir sommairement présenté le processus de sensibilisation permettant d'exalter la faible luminescence intrinsèque des lanthanides, nous allons nous focaliser sur la principale source de désactivation non-radiative faisant suite à ce transfert d'énergie.

7.4. DESACTIVATION VIBRATIONNELLE NON-RADIATIVE

L'excès d'énergie d'un édifice moléculaire à l'état excité peut se dissiper rapidement (10^{-12} à 10^{-10} s) par vibration et rotation de ses propres liaisons chimiques ou celles qui lui sont proches. En effet, elles se comportent comme des oscillateurs (ou vibrateurs) et rotateurs capables d'absorber des quanta d'énergie, appelés phonons (équivalent mécanique du photon), dont la valeur dépend de la nature de la liaison. Dans le cas des lanthanides, ce processus ne peut s'effectuer que par interactions dipolaires (type Förster) avec des liaisons appartenant au ligand et/ou à des molécules coordonnées ou situées dans l'environnement proche du cation métallique. L'intensité de cette désactivation non-radiative est dépendante de la température, de la distance entre le lanthanide et l'oscillateur et du nombre de quanta nécessaires pour combler la différence d'énergie entre le niveau d'émission et le plus proche

⁶² M. H. V. Werts, M. A. Duin, J. W. Hofstraat and J. W. Verhoeven, *Chem. Commun.*, **1999**, 799-800.

d'énergie inférieure. Plus ce nombre de quanta est faible et plus cette désactivation est efficace. C'est pourquoi les oscillateurs vibrationnels de haute énergie sont les plus aptes à inhiber la luminescence et à diminuer le temps d'émission. Par ordre croissant on trouve les liaisons suivantes : C-F ($\nu = 1\,200\text{ cm}^{-1}$) < C-C, C-O ($\nu \approx 1\,600\text{ cm}^{-1}$) < O-D, C-D, CN ($\nu \approx 2\,200\text{ cm}^{-1}$) < C-H ($\nu = 3\,000\text{ cm}^{-1}$) < N-H ($\nu = 3\,300\text{ cm}^{-1}$) < O-H ($\nu = 3\,600\text{ cm}^{-1}$).⁶³

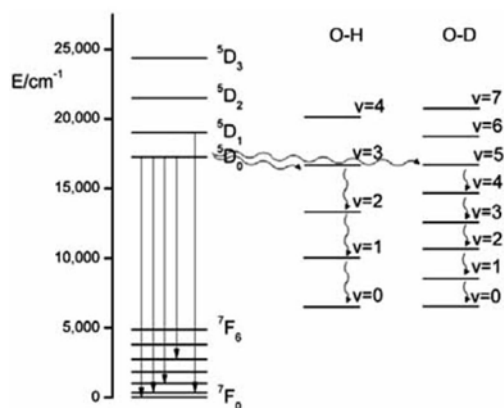


Figure 24 : Représentation de la désactivation vibrationnelle de luminescence au-travers de liaisons O-H et O-D coordonnées à l'Eu(III).³²

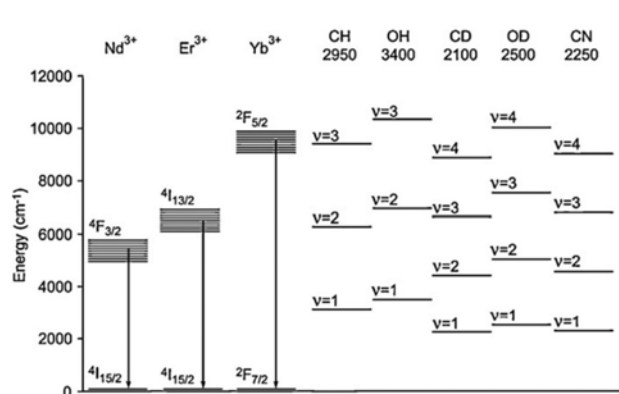


Figure 25 : Comparaison entre les niveaux d'émission de lanthanides émettant dans l'IR et le nombre de phonons de différents oscillateurs nécessaires pour les inhiber.^{63c}

lanthanide	$\Delta(E) (\text{cm}^{-1})$	Nombre de phonons		Durée de vie (μs)	
		OH	OD	H ₂ O	D ₂ O
Gd	32 100 (⁶ P _{7/2} - ⁸ S _{7/2})	9	15	2 300	-
Tb	14 800 (⁵ D ₄ - ⁷ F ₀)	4	7	467	3 800
Eu	12 300 (⁵ D ₀ - ⁷ F ₆)	3 - 4	5 - 6	108	4 100
Yb	10 250 (² F _{5/2} - ² F _{7/2})	3	4	0.17	3.95
Dy	7 850 (⁴ F _{9/2} - ⁶ F _{3/2})	2 - 3	3 - 4	2.6	42
Sm	7 400 (⁴ G _{5/2} - ⁶ F _{11/2})	2	3	2.7	60
Pr	6 940 (¹ D ₂ - ¹ G ₄)	-	-	-	-
Er	6 500 (⁴ I _{13/2} - ⁴ I _{15/2})	2	3	-	0.37
Tm	6 250 (¹ G ₄ - ³ F ₂)	-	-	-	-
Nd	5 400 (⁴ F _{3/2} - ⁴ I _{15/2})	1 - 2	2 - 3	0.031	0.14
Ho	3 000 (⁵ S ₂ - ⁵ F ₅)	< 1	1	ND	ND

Tableau 6 : Ecarts d'énergie entre le niveau principal d'émission et son plus proche voisin d'énergie inférieure, nombres de phonons O-H et O-D comblant cet écart et durées de vie d'émission (sels de perchlorates ou de triflates de lanthanide dilués en phase aqueuse).¹⁶

L'eau est par conséquent un très bon vecteur d'extinction de luminescence des lanthanides. Ainsi, pour les applications requérant l'utilisation de complexes en phase aqueuse, il faudra

⁶³ a) J.-C. G. Bünzli, *Springer Series in Materials Science*, P. Liu and B. Jacquier (eds.), Springer: Berlin Heidelberg, **2005**, vol. 83, pp. 462-499 ; b) C. Doffek, N. Alzakhem, M. Molon and M. Seitz, *Inorg. Chem.*, **2012**, *51*, 4539-4545 ; c) F. Artizzu, M. L. Mercuri, A. Serpe and P. Deplano, *Coord. Chem. Rev.*, **2011**, *255*, 2514-2529.

La différence entre le niveau d'émission et son plus proche voisin d'énergie inférieure est très variable suivant les lanthanides (Tableau 6 et Figure 26), c'est pourquoi chacun de ces éléments n'aura pas la même propension à se désactiver *via* ce processus vibrationnel. Ainsi l'élément ayant le rendement quantique le moins sensible à ce type de désactivation est le gadolinium. Il présente cependant un inconvénient majeur pour des applications biologiques puisqu'une antenne absorbant dans l'UV-C, ce qui est beaucoup trop énergétique car délétère pour certaines biomolécules (ADN/ARN particulièrement) et les tissus, se révèle nécessaire pour obtenir une sensibilisation correcte. Son émission dans l'UV-B (≈ 315 nm) n'est pas compatible non plus pour de telles applications. Cet écart important est néanmoins mis à profit pour mesurer le niveau d'énergie de l'état triplet des antennes qui généralement sont incapables de transférer l'énergie au Gd. Cet ion métallique permet d'une part de mimer la structure électronique d'un complexe lanthanidique quelconque, et d'autre part de favoriser le croisement intersystème³³ et ainsi la phosphorescence du chromophore dont la mesure permettra de remonter à l'énergie de son niveau triplet.

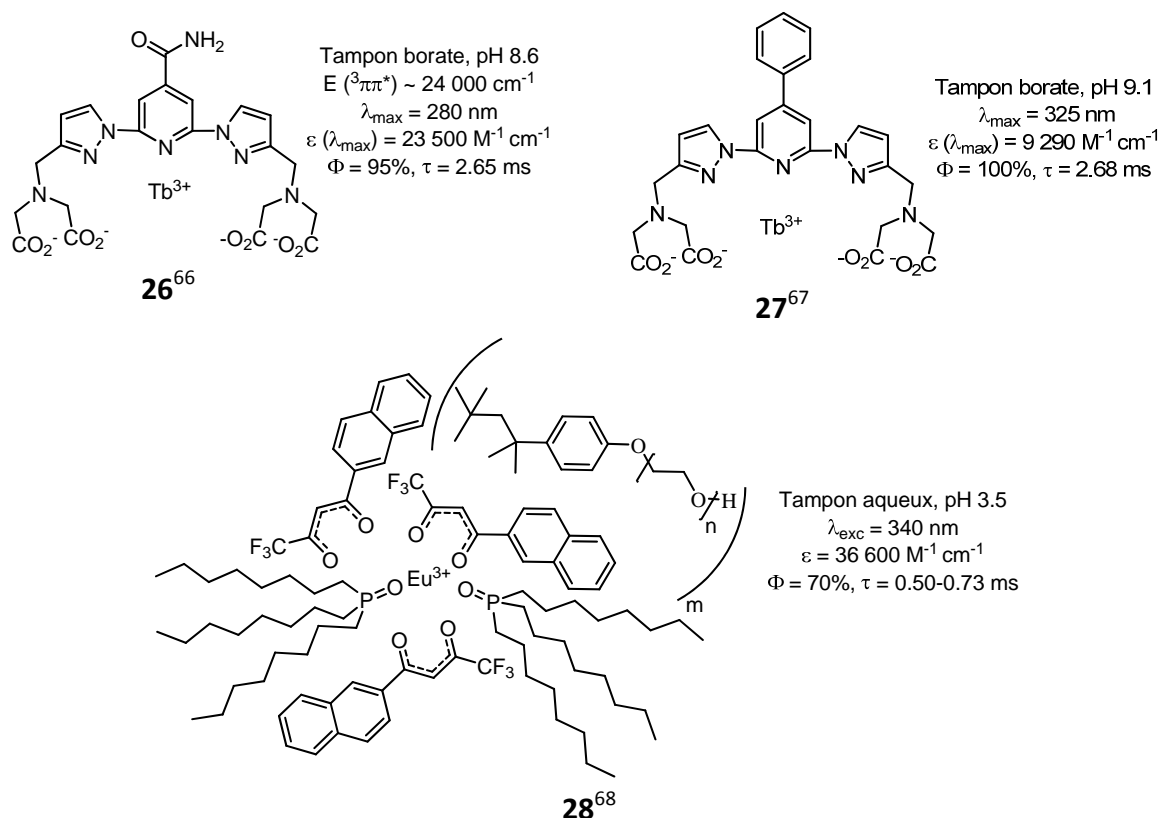


Figure 27 : Chélates de terbium et d'europlum présentant les rendements quantiques les plus élevés en phase aqueuse.

Les complexes de terres rares présentant en phase aqueuse le meilleur compromis entre longueur d'onde d'excitation de l'antenne compatible avec une sensibilisation efficace, et

⁶⁶ E. Brunet, O. Juanes, R. Sedano and J.-C. Rodriguez-Ubis, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2002**, *1*, 613-618.

⁶⁷ J. Yuan, G. Wang, K. Majima and K. Matsumoto, *Anal. Chem.*, **2001**, *73*, 1869-1876.

⁶⁸ a) I. Hemmilä and V.-M. Mukkala, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, **2001**, *38*, 441-519 ; b) www.jnhitech.com.tw/comm/upfile/p_041104_09340.pdf, Multiplexing DELFIA[®] assay using lanthanide-labeled probes.

faible désactivation vibrationnelle de luminescence sont ceux de terbium (Figure 27), d'euprium et dans une moindre mesure ceux de samarium et de dysprosium. Pour les deux premiers la désactivation est presque exclusivement liée aux vibreurs O-H.

Par exemple, une étude sur la sensibilité de l'émission du terbium et celle de l'euprium vis-à-vis de la désactivation par liaisons C-H en phase aqueuse a montré (en comparant les ligands deutérés et non deutérés) que dans le cas du complexe **Eu-29** hepta-coordiné (Figure 28) la désactivation par les liaisons O-H de l'eau rend négligeable celle des liaisons C-H. Quant à celui au terbium, qu'il soit ou non deutéré, la seule désactivation observée est celle liée aux molécules d'eau. La désactivation par les liaisons C-H de la luminescence de ce lanthanide n'est *a priori* pas perceptible dans le cas de complexe aqueux. Enfin, la deutération présente un effet positif seulement sur le chélate nona-coordiné **Eu-30** dont la sphère de coordination du cation métallique est saturée par le ligand (Figure 28).⁶⁹

Les terres rares émettant dans le proche IR sont encore plus sensibles aux oscillateurs O-H et même les liaisons C-H du ligand ont un effet délétère très prononcé sur la luminescence. Quelques ligands perfluorés ou perdeutérés permettant de sensibiliser plus efficacement ces lanthanides ont été décrits dont les ligands **31** à **33** (Figure 28).

⁶⁹ I. Hemmilä, V. M. Mikkala and H. Takalo, *J. Fluoresc.*, **1995**, 5, 159-163.

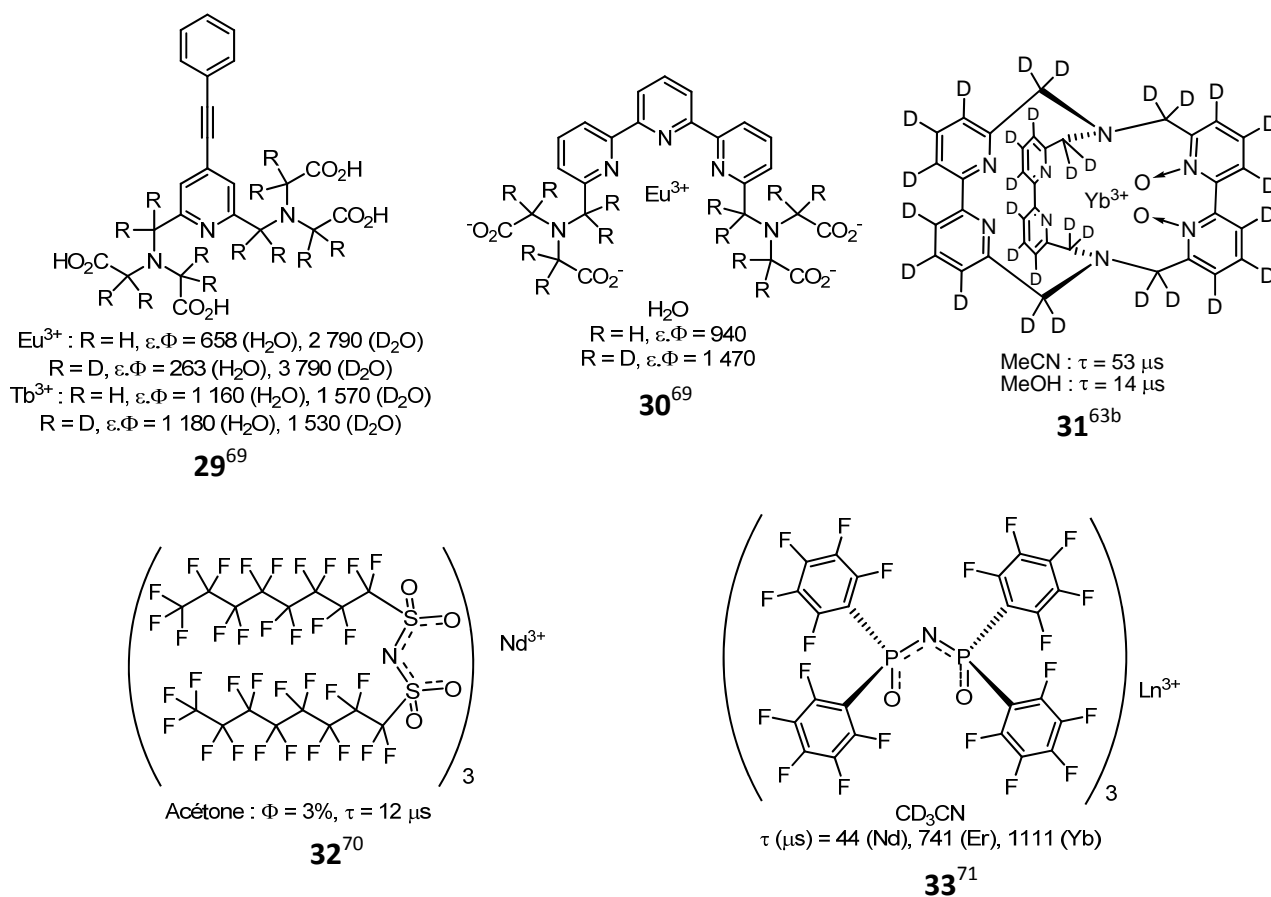


Figure 28 : Exemples de chélates perfluorés et deutérés ($\epsilon \cdot \Phi$, brillance, en $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

III. SONDÉS FLUORESCENTES ET LUMINESCENTES

1 FLUOROPHORES ORGANIQUES

En règle générale, les fluorophores organiques possèdent un rendement quantique élevé, très souvent supérieur à 60%, parfois proche de 100%, et un fort coefficient d'absorption molaire ($\epsilon \geq 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La brillance ($\Phi \times \epsilon$), qui traduit la capacité d'absorption, mais aussi d'émission radiative, et représente donc l'efficacité globale d'un composé fluorescent, est souvent élevée pour ces molécules organiques. De plus elles couvrent une large gamme spectrale, allant de 400 à près de 900 nm, mais celles émettant dans le rouge lointain ou le proche IR sont généralement moins fluorescentes ($\Phi < 25\%$) et l'émission plus rapide ($\tau < 1.5 \text{ ns}$).⁷²

⁷⁰ Y. Hasegawa, T. Ohkubo, K. Sogabe, Y. Kawamura, Y. Wada, N. Nakashima and S. Yanagida, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, *39*, 357-360.

⁷¹ a) G. Mancino, A. J. Ferguson, A. Beeby, N. J. Long and T. S. Jones, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *127*, 524-525 ; b) P. B. Glover, A. P. Bassett, P. Nockemann, B. M. Kariuki, R. Van Deun and Z. Pikramenou, *Chem. Eur. J.*, **2007**, *13*, 6286-6286.

⁷² a) M. Y. Berezin and S. Achilefu, *Chem. Rev.*, **2010**, *110*, 2641-2684 ; b) J. O. Escobedo, O. Rusin, S. Lim and R. M. Strongin, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2010**, *14*, 64-70.

La majorité de ces composés est conçue pour des applications en imagerie *in vitro* et *in cellulo*. Le cahier des charges que doit remplir une sonde fluorescente développée pour des expériences *in vivo* est plus contraignant : elle doit être non (ou peu) toxique, suffisamment stable dans un milieu biologique complexe et capable d'absorber et de ré-émettre entre 650 et 900 nm (fenêtre thérapeutique, Figure 29) afin de ne pas subir l'absorbance et l'auto-fluorescence (fluorescence des fluorophores endogènes) de l'organisme. Actuellement, seuls deux fluorophores organiques sont autorisés à des fins de diagnostic médical : le vert d'indocyanine (ICG : *IndoCyanine Green*) et la fluorescéine. En recherche, les colorants fluorescents les plus couramment employés font partie de la famille des cyanines, fluorescéines, rhodamines ou BODIPYs.

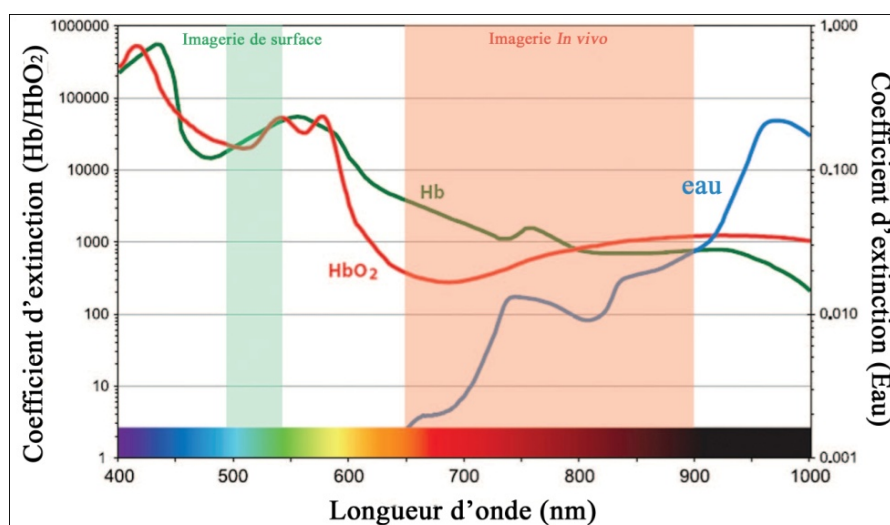
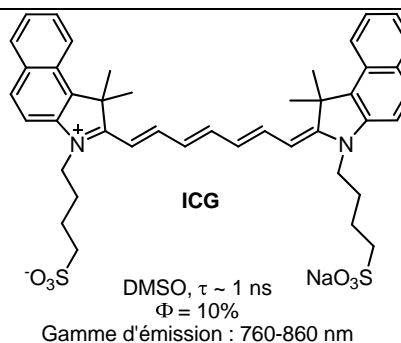
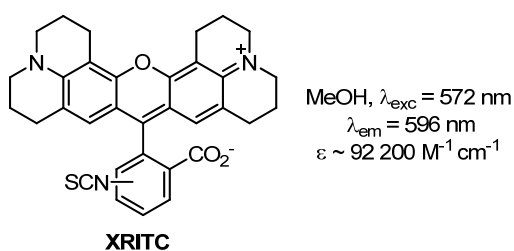
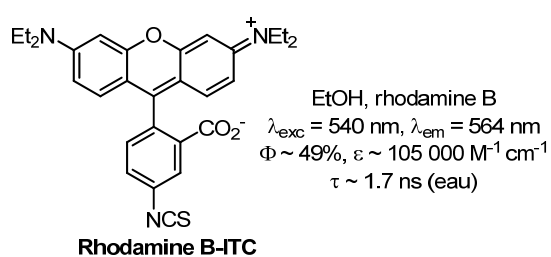
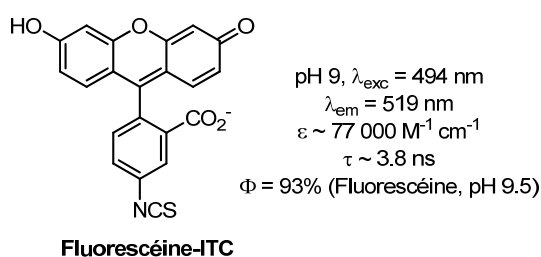
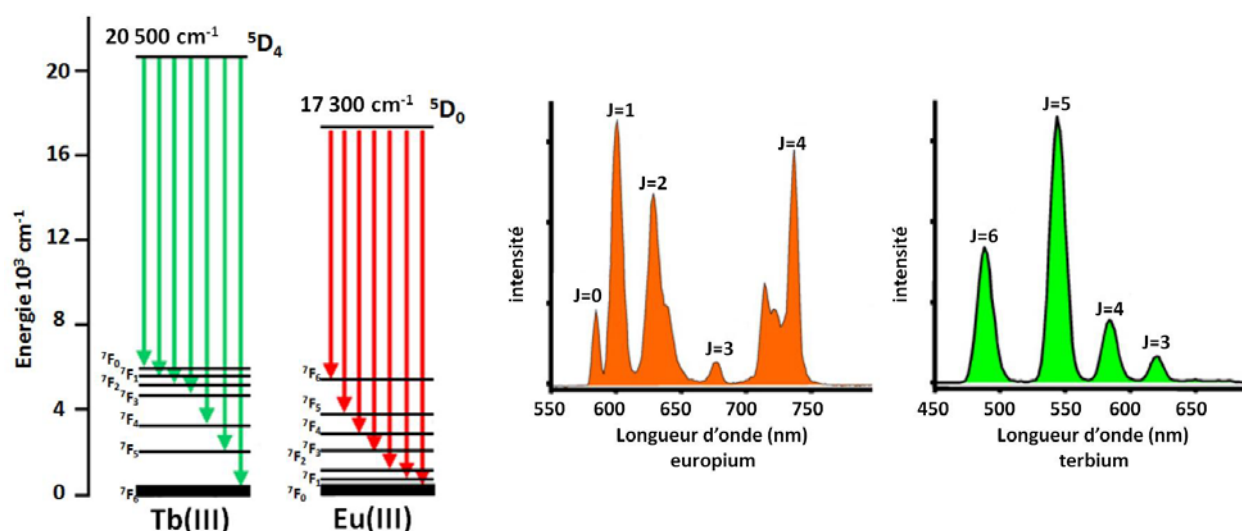


Figure 29 : Graphique d'absorption de l'hémoglobine et de l'eau en fonction de la longueur d'onde.⁷³



⁷³ H. Kobayashi, M. Ogawa, R. Alford, P. L. Choyke and Y. Urano, *Chem. Rev.*, **2010**, *110*, 2620-2640.


 Figure 31 : Emission de luminescence de l'euprimum et du terbium.⁷⁴

Transition	Emission (nm)	Intensité relative	Sensibilité à l'environnement
Terbium (III)			
$^5D_4 \rightarrow ^7F_6$	480-500	moyenne-forte	modérément sensible
$\rightarrow ^7F_5$	540-555	la plus forte	sensible
$\rightarrow ^7F_4$	580-595	moyenne-forte	modérément sensible
$\rightarrow ^7F_3$	615-625	faible-moyenne	faible
$\rightarrow ^7F_2$	645-655	faible	modérément sensible
$\rightarrow ^7F_1$	660-670	très faible	rarement observée
$\rightarrow ^7F_0$	675-680	très faible	rarement observée
Euprimum (III)			
$^5D_0 \rightarrow ^7F_0$	578-580	faible	bande étroite, transition non dégénérée
$\rightarrow ^7F_1$	585-600	très forte	peu sensible
$\rightarrow ^7F_2$	610-630	très forte	hypersensible
$\rightarrow ^7F_3$	645-660	faible	faible
$\rightarrow ^7F_4$	680-705	moyenne	très sensible
$\rightarrow ^7F_5$	740-770	très faible	rarement observée
$\rightarrow ^7F_6$	810-840	très faible	rarement observée

 Tableau 7 : Caractéristiques des spectres d'émission des complexes du Tb(III) et Eu(III) en solution aqueuse.⁷⁵

Les intensités relatives des émissions $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ et $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ de l'euprimum sont très sensibles à l'environnement du ligand. En effet, la transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ est hypersensible à cet environnement alors que la transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ n'y est que peu sensible.⁷⁵ Le rapport de ces intensités va donc être un indicateur de la symétrie adoptée autour de ce cation.

Dans le cas du terbium(III), aucune transition n'est hypersensible à l'environnement du ligand. Contrairement au cas de l'euprimum(III), il n'est donc pas possible d'obtenir des informations précises quant à la symétrie du site de coordination.

⁷⁴ J. P. Leonard and T. Gunnlaugsson, *J. Fluoresc.*, **2005**, *15*, 585-595.

⁷⁵ F. S. Richardson, *Chem. Rev.*, **1982**, *82*, 541-552.

3 AUTRES SONDES LUMINEUSES

Ils existent évidemment d'autres modalités permettant de visualiser un processus biologique ou de quantifier par exemple un bioanalyte d'intérêt. L'utilisation de radioéléments, de quantum dots⁷⁶ ou de complexes de métaux de transition⁷⁷ peut parfois constituer une alternative à ne pas négliger mais ces techniques ne seront pas traitées ni comparées avec les chélates de lanthanides dans ce manuscrit.

Mentionnons cependant que les radioéléments constituent un groupe de marqueurs aussi sensibles⁷⁸ que les complexes de lanthanides mais leurs manipulations et stockage sont loin d'être aussi aisés et sûrs. Ainsi, en routine, les dosages immunologiques en temps résolu ont supplanté les tests utilisant des isotopes radioactifs (¹²⁵I, ³H et ¹⁴C principalement).

4 FLUOROPHORES ORGANIQUES CONTRE COMPLEXES DE LANTHANIDES

Selon l'application visée, certaines caractéristiques des fluorophores organiques, comme ceux présentés brièvement à la section III-1 peuvent présenter quelques inconvénients :

- déplacement de Stokes faible (inférieur à 50 nm ; parfois proche de 100 nm pour des fluorophores comme les hydroxy- ou aminocoumarines, dont l'état excité peut être relaxé grâce à un transfert de charge intramoléculaire (l'émission reste cependant cantonnée dans le bleu) ; très rarement supérieur à 100 nm : quelques exemples récents visent à pallier cet inconvénient, comme les MegaStoke Dyes, développés par la société Dyomics⁷⁹ et qui sont des hybrides hémicyanine-coumarines, des benzocoumarines⁸⁰ et des dérivés de xanthène,⁸¹ récemment publiés et qui présentent des déplacements proches de 200 nm) ;

- bande d'émission large qui recouvre aisément une centaine de nanomètres ce qui limite l'utilisation simultanée de différentes sondes ;

- temps d'émission court (jusqu'à une centaine de nanosecondes pour le pyrène mais généralement quelques nanosecondes ; cependant le suivi du processus biologique nécessite parfois un temps d'acquisition court compatible avec l'emploi de sondes fluorescentes organiques) ;

- sensibilité importante au photo-blanchiment, *i.e.* extinction de fluorescence suite à une irradiation intense ou prolongée (en revanche cette caractéristique plus ou moins prononcée selon le fluorophore est mise à profit pour certaines applications étudiant la

⁷⁶ a) M. Bottrill and M. Green, *Chem. Commun.*, **2011**, 47, 7039-7050 ; b) K. M. Tsoi, Q. Dai, B. A. Alman and W. C. W. Chan, *Acc. Chem. Res.*, **2012**, DOI : 10.1021/ar300040z.

⁷⁷ E. Baggaley, J. A. Weinstein and J. A. G. Williams, *Coord. Chem. Rev.*, **2012**, 256, 1762-1785.

⁷⁸ U.-H. Stenman, *Springer Series on Fluorescence*, P. Hänninen and H. Hännä (eds.), Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, **2011**, vol. 7, pp. 329-341.

⁷⁹ <http://www.dyomics.com/megastokes-dyes.html>.

⁸⁰ C. Murata, T. Masuda, Y. Kamochi, K. Todoroki, H. Yoshida, H. Nohta, M. Yamaguchi and A. Takadate, *Chem. Pharm. Bull.*, **2005**, 53, 750-758.

⁸¹ a) Y. Yang, M. Lowry, X. Xu, J. O. Escobedo, M. Sibrian-Vazquez, L. Wong, C. M. Schowalter, T. J. Jensen, F. R. Fronczek, I. M. Warner, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2008**, 105, 8829-8834 ; b) M. Sibrian-Vazquez, J. O. Escobedo, M. Lowry, F. R. Fronczek and R. M. Strongin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 10502-10508.

dynamique cellulaire des protéines ; il s'agit des techniques FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*), iFRAP (*Inverse FRAP*), FLAP (*Fluorescence Localization After Photobleaching*) et FLIP (*Fluorescence Loss In Photobleaching*)).

En conséquence, le faible déplacement de Stokes couplé à des bandes d'absorption et d'émission larges (Figure 32) est propice au phénomène d'extinction mutuelle, plus communément désigné sous le terme de *self-quenching*. Celui-ci survient, *via*, entre autre, un transfert résonnant de type Förster, lorsque plusieurs fluorophores sont proches.⁸² C'est pourquoi la sensibilité de l'analyse n'est pas meilleure, voire nettement moins bonne, si plusieurs de ces sondes fluorescentes sont conjuguées au même vecteur biologique.

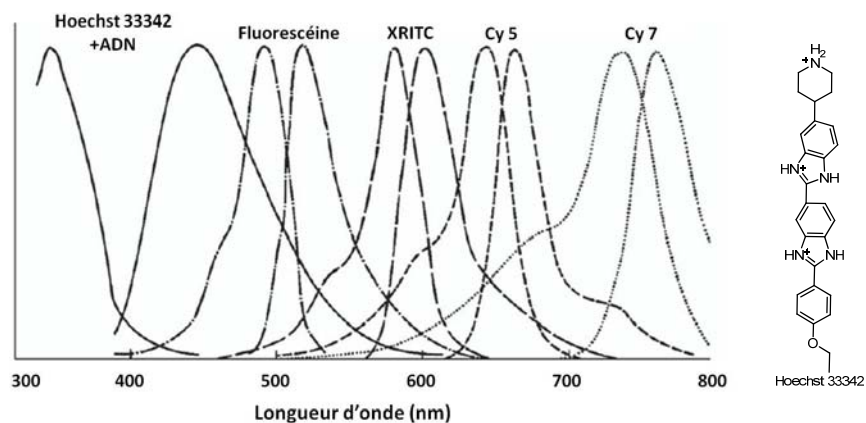


Figure 32 : Spectres d'émission et d'absorption de certains fluorophores organiques.⁸³

Enfin, les sondes fluorescentes organiques sont peu adaptées à la détection de bioanalytes au sein de milieux biologiques riches en fluorophores endogènes (échantillons sanguin, salivaire ou sérologique par exemple), présentant de fait une auto-fluorescence élevée, car ces deux types de composés possèdent des temps de vie d'émission du même ordre de grandeur.^{72a} Bien que ces milieux biologiques soient relativement transparents au-delà de 500 nm, les interférences liées à la diffusion du faisceau lumineux au contact avec l'échantillon (diffusion Rayleigh : émission à la même longueur d'onde que le faisceau d'excitation ; Raman : émission à une longueur d'onde différente d'environ 50 nm) demeurent problématiques pour des sondes à faible déplacement de Stokes.

Au final, la limite de détection des analyses utilisant des fluorophores organiques peut différer d'un facteur 50 à 1 000 entre un tampon aqueux et une matrice biologique.⁸⁴

En règle générale, la limite de détection des dosages immunologiques utilisant la fluorescéine ou la rhodamine oscillent entre 10^{-9} et 10^{-10} M.⁸⁵ Quant aux chélates de lanthanides, même si les fluorophores endogènes absorbent fortement à la longueur d'onde

⁸² a) J. B. Randolph and A. S. Waggoner, *Nucleic Acids Res.*, **1997**, *25*, 2923-2929 ; b) M. K. Johansson and R. M. Cook, *Chem. Eur. J.*, **2003**, *9*, 3466-3471 ; c) M. Ogawa, N. Kosaka, P. L. Choyke and H. Kobayashi, *ACS Chem. Biol.*, **2009**, *4*, 535-546.

⁸³ A. Waggoner, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2006**, *10*, 62-66.

⁸⁴ a) E. Soini and I. Hemmilä, *Clin. Chem.*, **1979**, *25*, 353-361 ; b) I. Hemmilä, *Clin. Chem.*, **1985**, *31*, 359-370.

⁸⁵ P. G. Sammes and G. Yahioğlu, *Nat. Prod. Rep.*, **1996**, *13*, 1-28.

d'excitation employée (généralement 337 nm à l'aide d'un laser à azote), ils permettent d'une part d'abaisser le seuil de détection aux environs de $5 \cdot 10^{-16} \text{ M}^{86}$ et d'autre part d'obtenir une gamme dynamique (intervalle entre la concentration la plus haute et la plus basse pour lequel l'analyse présente une précision et une linéarité suffisantes) de plusieurs ordres de grandeur (jusqu'à cinq).⁷⁸

Cette meilleure sensibilité provient de la possibilité d'effectuer une mesure de luminescence en temps résolu (Figure 33)⁸⁷ car l'émission de ces chélates persiste dans le temps. Ainsi, pour les analyses utilisant des complexes de lanthanides, l'acquisition ne débute qu'après un délai de 50 à 400 μs , qui dépend du lanthanide utilisé et du type d'analyse. Ceci permet d'éliminer virtuellement la fluorescence intrinsèque des fluorophores endogènes. En outre,

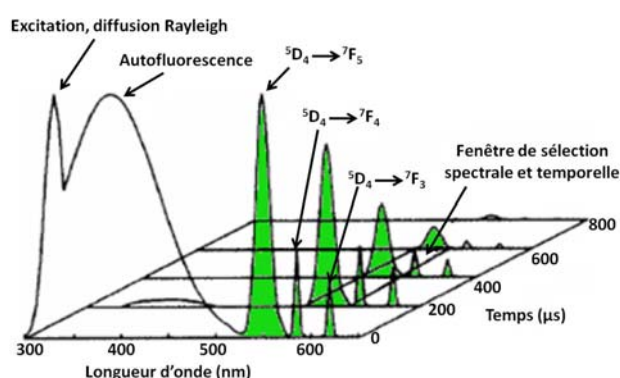


Figure 33 : Schéma de principe de la mesure de luminescence en temps résolu (émission d'un chélate de Tb^{3+}).⁸⁷

les interférences liées à la diffusion de la source d'excitation d'une part (ce phénomène ne devient imperceptible qu'à partir de 50 à 100 μs ; il peut être atténué mais cela requiert un spectrofluorimètre plus complexe et donc plus coûteux)⁸⁸ et de la diffusion du milieu biologique d'autre part (Rayleigh et Raman) sont minimisées.

Le large déplacement de Stokes permet une discrimination spectrale aisée entre l'absorption et l'émission et limite le *self-quenching* lorsque plusieurs chélates sont accrochés au même vecteur biologique (anticorps), ce qui augmente d'autant le rapport signal-sur-bruit.⁸⁹

Enfin, la mesure de quatre analytes différents présents dans le même échantillon selon une stratégie de multiplexage est possible grâce aux bandes d'émission étroites de l'euporium, du terbium, du samarium et du dysprosium.

Bien que le faible rendement quantique des chélates de lanthanides par rapport aux fluorophores soit parfois avancé dans la littérature comme contrainte majeure, leur longue durée de vie rend compatible leur utilisation pour des dosages biologiques à partir d'une brillance de seulement $300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.^{88a}

Ainsi, la luminescence en temps résolu fondée sur l'utilisation de chélates de lanthanides, pour des applications de dosages biologiques *in vitro* d'échantillons présentant un bruit de fond important (sérum, urine, sang) est plus adaptée que les sondes optiques fluorescentes. Cette application sera présentée plus en détails dans le paragraphe V.

⁸⁶ J. Hovinen and V.-M. Mikkala, **2009**, WO 09/115644.

⁸⁷ E. F. Gudgin Dickson, A. Pollak and E. P. Diamandis, *J. Photochem. Photobiol., B*, **1995**, 27, 3-19.

⁸⁸ a) G. Mathis and H. Bazin, *Springer Series on Fluorescence*, P. Hänninen and H. Härnä (eds.), Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, **2011**, vol. 7, pp. 47-88 ; b) A. Kuusisto and P. Hänninen, *Springer Series on Fluorescence*, P. Hänninen and H. Härnä (eds.), Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, **2011**, vol. 7, pp. 263-277.

⁸⁹ H. Takalo, V.-M. Mikkala, H. Mikola, P. Liitti and I. Hemmilä, *Bioconjugate Chem.*, **1994**, 5, 278-282.

5 CONCEPTION D'UN MARQUEUR LANTHANIDIQUE LUMINESCENT

5.1. REMARQUES GENERALES

Ces marqueurs luminescents doivent, pour des applications en analyse biologique, satisfaire à plusieurs exigences tant du point de vue chimique, photophysique que biochimique.⁶⁵ Solubilité dans l'eau, stabilité en milieu physiologique, bon coefficient d'absorption au-delà de 330 nm mais l'idéal serait d'atteindre 350 nm afin de limiter la photo-dégradation du matériel biologique (d'un point de vue instrumentation il est aussi moins onéreux de pouvoir exciter une sonde dans l'UV-A et le visible), transfert efficace d'énergie entre l'antenne et l'ion lanthanide, limitation des processus de désactivation non-radiatifs, longue durée de vie des états excités, photo-stabilité (bien que par rapport aux fluorophores organiques les complexes lanthanidiques y sont très peu sensibles) et enfin la biomolécule marquée doit conserver sa capacité d'interaction spécifique et son affinité pour le bioanalyte d'intérêt.

5.2. STRUCTURE COMPLEXANTE

Comme mentionné précédemment, les lanthanides en milieu aqueux possèdent d'une part neuf sites de coordination. D'autre part, l'intensité, ainsi que la durée de luminescence de ces cations métalliques appliqués aux immuno-dosages (Eu, Tb, Sm et Dy) sont partiellement inhibées par la présence d'eau dans leur première sphère de coordination. Par suite, la partie chélatante des ligands comporte généralement neuf sites de coordination. Aussi, afin de réduire la distance séparant l'antenne du cation métallique et optimiser le transfert d'énergie, le chromophore est très souvent composé d'atomes intervenant dans la complexation du lanthanide.

La chélation entre le lanthanide aqueux et le ligand implique une étape de désolvatation du métal qui n'est pas favorable car l'énergie nécessaire pour déshydrater le lanthanide n'est pas suffisamment compensée par la formation des liaisons électrostatiques ligand-Ln. La complexation est alors sous contrôle entropique et ne deviendra compétitive que par l'action d'un ligand polydenté.⁹⁰ En phase aqueuse, les fonctions comportant des atomes d'oxygène ou d'azote neutres sont complexées au métal que s'ils appartiennent à une structure polydentée contenant déjà un ou deux autres atomes donneurs chargés négativement.⁷⁵

L'intégrité du chélate, qui est d'autant plus délicate à maintenir qu'il est dilué dans des milieux biologiques complexes est un paramètre crucial à respecter pour le développement de sondes luminescentes efficaces. En effet, de nombreuses espèces endogènes ou exogènes sont susceptibles soit de décomplexer le lanthanide (Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , EDTA) soit de désactiver de façon non-radiative l'état excité du métal (iodure, bromure, urate, ascorbate).^{88a} La stabilité de l'édifice est d'autant plus forte (à pH neutre et basique) que le

⁹⁰ L. Armelao, S. Quici, F. Barigelletti, G. Accorsi, G. Bottaro, M. Cavazzini and E. Tondello, *Coord. Chem. Rev.*, **2010**, 254, 487-505.

nombre de sites anioniques du ligand est important ; ainsi les motifs polyaminocarboxylates sont largement répandus. D'autres structures complexantes conduisant à des chélates plus stables en milieu acide existent aussi : β -dicétones fluorées et cryptants notamment.

5.3. FONCTIONS BIOCONJUGABLES

Enfin, les complexes doivent disposer d'une fonction réactive vis-à-vis, généralement, d'amines primaires ou de thiols conduisant à un marquage covalent avec la biomolécule. Les groupements chimiques autorisant cette réaction sont variés. En voici une brève liste : isothiocyanates, isocyanates, esters de NHS (*N*-hydroxy succinimide), chlorures de sulfonyle, aldéhydes, anhydrides, chlorures de triazine réagissent sur les amines ; iodoacétamides, maléimides pour les thiols.⁹¹

La fonction réactive de choix pour la bioconjugaison est l'ester de NHS car il offre le meilleur compromis entre stabilité et réactivité à pH neutre. Le pH conférant une réactivité optimale des fonctions iodoacétyle et isothiocyanate d'aryle se situe entre 9.0 et 9.5 ce qui selon l'application peut s'avérer un milieu trop basique ; quant aux chlorures de sulfonyle, s'ils sont beaucoup plus réactifs, ils s'hydrolysent plus facilement et conduisent donc généralement à des rendements de bioconjugaison pouvant être médiocres.

6 APERÇU DE QUELQUES STRUCTURES DE CHELATES LUMINESCENTS

La recherche de complexes pouvant satisfaire à tous les critères énumérés précédemment a mené à la synthèse d'un très large éventail de structures dont la très grande majorité est fondée sur une antenne composée d'aromatiques azotés.⁹² Les paragraphes suivants seront consacrés à leur classification selon la nature de leur architecture complexante : polyaminocarboxylates, macrocycles, phosphonates, β -dicétones ou cryptants.

6.1. LES LIGANDS POLYAMINOCARBOXYLATES

Grâce à la structure polydentée anionique, ces ligands sont capables de former des chélates globalement stables, dont la stabilité augmente avec les ligands cycliques (à conditions que la taille du cation soit semblable à celle de la cavité formée par le cycle). Les constantes de stabilité ($\log K$) peuvent s'échelonner de 15 à 26 environ (EDTA < DTPA < DOTA).⁹³

6.1.1 ANALOGUES EDTA

Les chélates comportant cette structure et qui se sont révélés les plus aptes en tant que sondes luminescentes pour des dosages biologiques sont constitués en grande majorité par

⁹¹ a) G. E. Means and R. E. Feeney, *Bioconjugate Chem.*, **1990**, *1*, 2-12 ; b) G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, **1996**, Academic Press, San Diego, pp 137-166.

⁹² a) E. Brunet, O. Juanes and J. C. Rodriguez-Ubis, *Curr. Chem. Biol.*, **2007**, *1*, 11-39 ; b) J. Hovinen and P. M. Guy, *Bioconjugate Chem.*, **2009**, *20*, 404-421.

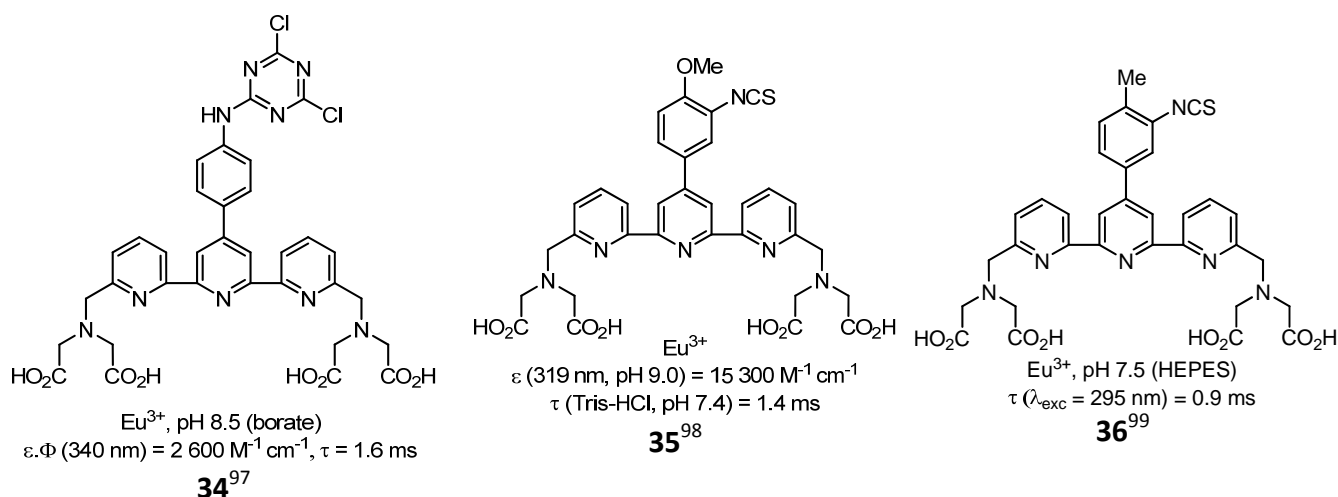
⁹³ W. P. Cacheris, S. K. Nickle and A. D. Sherry, *Inorg. Chem.*, **1987**, *26*, 958-960.

une antenne terpyridine, pyridine éventuellement substituée par d'autres cycles aromatiques azotés. De nombreux autres chélates présentant la même structure complexante mais des antennes différentes ont aussi été synthétisés mais se sont montrés moins intéressants (mauvais compromis entre rendement quantique, longueur d'onde d'excitation et stabilité).⁹⁴

La structure terpyridine est une bonne antenne pour l'euprium, en revanche, l'énergie de son niveau triplet ($22\,300\text{ cm}^{-1}$)^{44b} est relativement proche de celle du niveau 5D_4 du terbium ($20\,500\text{ cm}^{-1}$) si bien que la simple modification du chromophore permettant l'introduction d'une fonction bioconjuguable peut avoir un effet délétère sur l'intensité de luminescence de ce lanthanide, qui pourra encore être accentué après accrochage sur la biomolécule.^{94c}

A l'inverse, il s'est avéré que le motif bis-pyrazolylpyridine⁹⁵ est un bon sensibilisateur du terbium avec un niveau triplet à $25\,150\text{ cm}^{-1}$.^{44b} De plus, l'insertion d'un groupement phényle en position 4 de la pyridine centrale a permis l'obtention du chélate de terbium possédant le rendement quantique le plus élevé possible, 100%, en phase aqueuse (**Tb-27**, Figure 27).⁶⁷

Le chélate **Eu-43** (Figure 34), en dépit de sa structure hepta-coordinante est souvent employé lors d'immuno-dosages homogènes.⁹⁶ Des chélates plus robustes et plus intenses disposant de la même antenne, deux par chélate, ont aussi été décrits dont un exemple, **Eu-42**, est présenté à la Figure 34. Les groupements α -galactopyranose permettent une meilleure solubilité en milieu aqueux et de limiter les interactions non-spécifiques avec les biomolécules.



⁹⁴ a) V.-M. Mukkala, C. Sund, M. Kwiatkowski, P. Pasanen, M. Högberg, J. Kankare and H. Takalo, *Helv. Chim. Acta*, **1992**, 75, 1621-1632 ; b) V.-M. Mukkala and J. J. Kankare, *Helv. Chim. Acta*, **1992**, 75, 1578-1592; c) H. Takalo, V.-M. Mukkala, L. Meriö, J. C. Rodríguez-Ubis, R. Sedano, O. Juanes and E. Brunet, *Helv. Chim. Acta*, **1997**, 80, 372-387.

⁹⁵ M. J. Remuinan, H. Roman, M. T. Alonso and J. C. Rodríguez-Ubis, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1993**, 1099-1102.

⁹⁶ I. Hemmilä, *J. Biomol. Screening*, **1999**, 4, 303-307.

⁹⁷ V. M. Mukkala, M. Helenius, I. Hemmilä, J. Kankare and H. Takalo, *Helv. Chim. Acta*, **1993**, 76, 1361-1378.

⁹⁸ A. K. Saha, K. Kross, E. D. Kloszewski, D. A. Upson, J. L. Toner, R. A. Snow, C. D. V. Black and V. C. Desai, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 11032-11033.

⁹⁹ M. E. Cooper and P. G. Sammes, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2000**, 1695-1700.

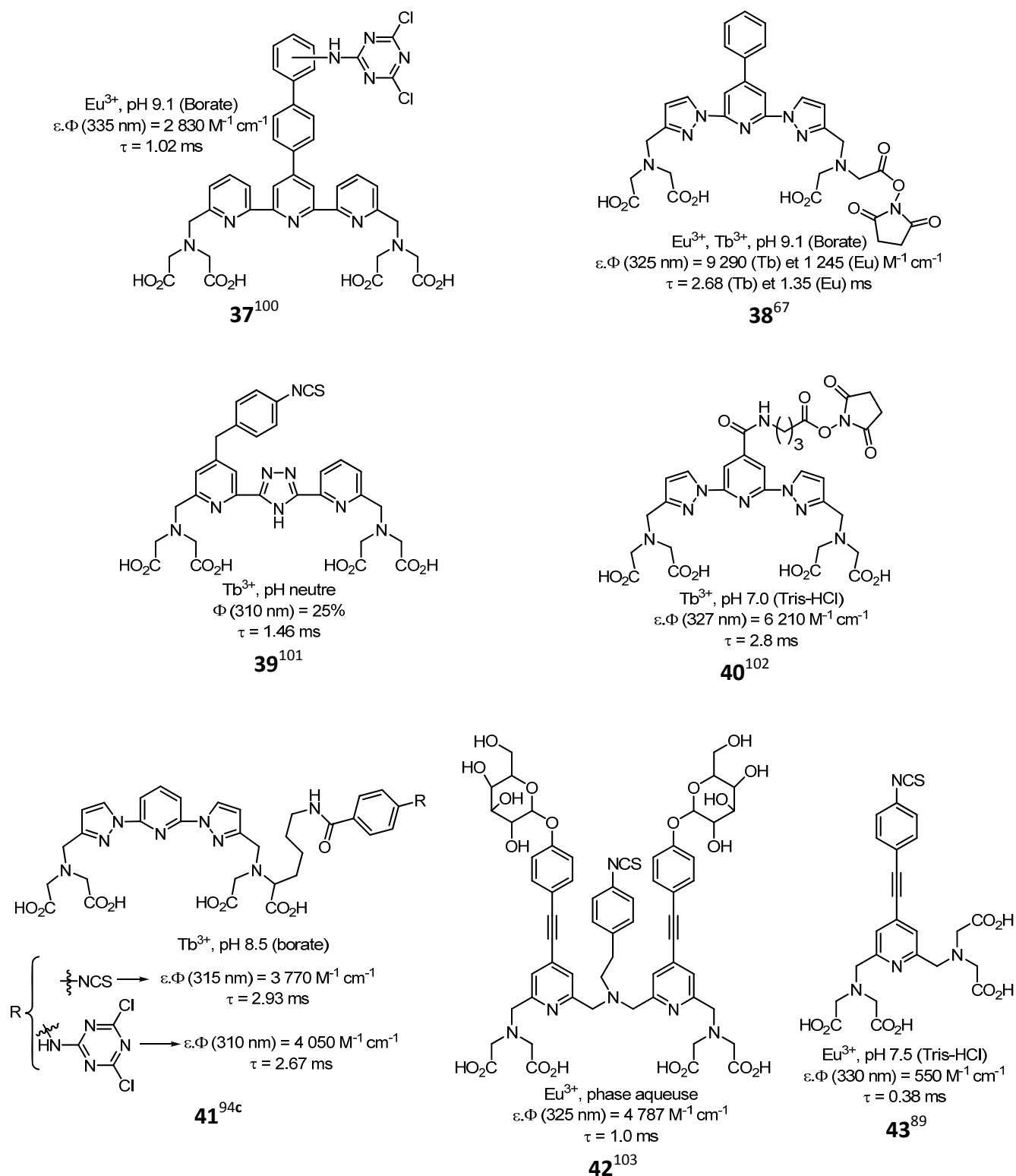


Figure 34 : Exemples de chélates de lanthanides dont la structure complexante est de type EDTA.

¹⁰⁰ T. Nishioka, J. Yuan, Y. Yamamoto, K. Sumitomo, Z. Wang, K. Hashino, C. Hosoya, K. Ikawa, G. Wang and K. Matsumoto, *Inorg. Chem.*, **2006**, 45, 4088-4096.

¹⁰¹ H. Takkalo and V.-M. Mikkala, **1993**, WO 93/011433.

¹⁰² M. Starck, P. Kadjane, E. Bois, B. Darbouret, A. Incamps, R. Ziessel and L. J. Charbonnière, *Chem. Eur. J.*, **2011**, 17, 9164-9179.

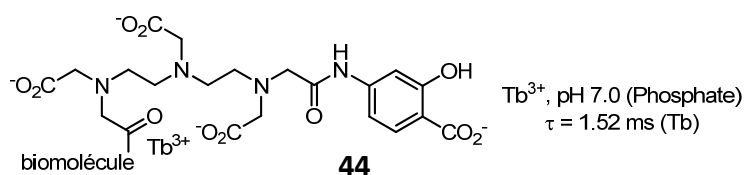
¹⁰³ P. von Lode, J. Rosenberg, K. Pettersson and H. Takalo, *Anal. Chem.*, **2003**, 75, 3193-3201.

6.1.2 ANALOGUES DTPA-TTHA

Bien que le premier chélate comportant une structure DTPA disposait d'une antenne *p*-aminosalicylate capable de sensibiliser le terbium et était appliqué, entre autre, au marquage de la protéine albumine de sérum humain (HSA) (chélate **44**),¹⁰⁴ la grande majorité de ces complexes sont constitués d'un chromophore de type 7-amino-4-méthyl-2-(1H)-quinolinone (carbostyrile 124 ou cs124) sensibilisant aussi bien l'euporium que le terbium. En revanche, les rendements quantiques sont généralement inférieurs à 10%.¹⁰⁵ Le remplacement du groupement méthyle en position 4 par un groupement trifluorométhylène (ligand **46**) améliore la brillance du chélate d'euporium (celui au terbium devient non-luminescent) et son spectre d'absorption subit un effet bathochrome d'environ 15 nm.¹⁰⁶

Dans le cas du DTPA l'oxygène du lien amide intervient dans la chélation du métal contrairement à celui de l'antenne. Quant au ligand TTHA, il assure une saturation de la sphère de coordination du métal expulsant ainsi efficacement les molécules d'eau. Par suite, l'émission du cation métallique est plus intense et sa durée est allongée.¹⁰⁷ Cependant, la stabilité du complexe vis-à-vis de l'EDTA ne semble pas meilleure (Figure 36-A).¹⁰⁸

L'avantage de ces structures chélatantes est que le ligand est obtenu relativement simplement à partir du bis-anhydride correspondant et du cs124 : la deuxième fonction anhydride permet l'insertion d'une fonction bioconjugable. Néanmoins, dans le cas du DTPA, cette stratégie conduit à un complexe d'une part neutre qui sera moins soluble en phase aqueuse (et donc plus propice aux interactions non-spécifiques avec des biomolécules) et d'autre part moins stable car une fonction carboxylate est «réquisitionnée» pour introduire le bras d'accroche à la biomolécule. Enfin, le temps de demi-vie du chélate **Tb-46** en présence d'EDTA est environ dix fois plus long que son analogue ne disposant que de trois fonctions carboxylate (Figure 36-B).¹⁰⁹



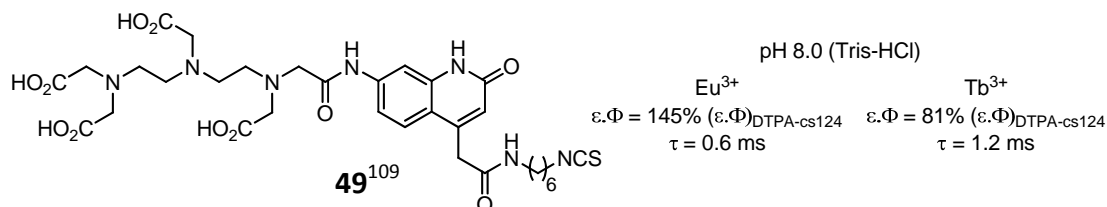
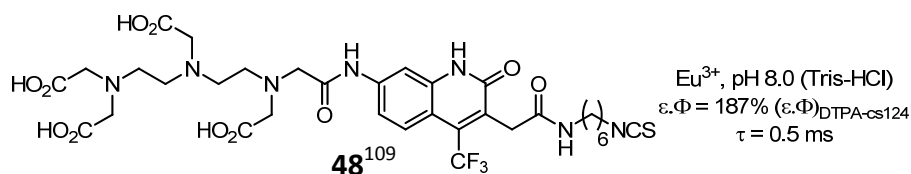
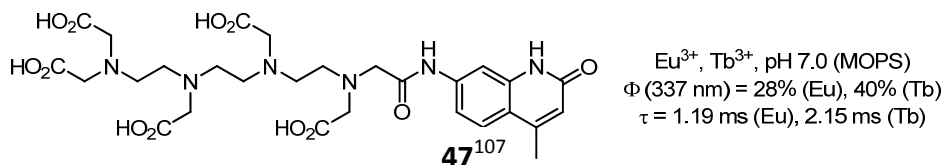
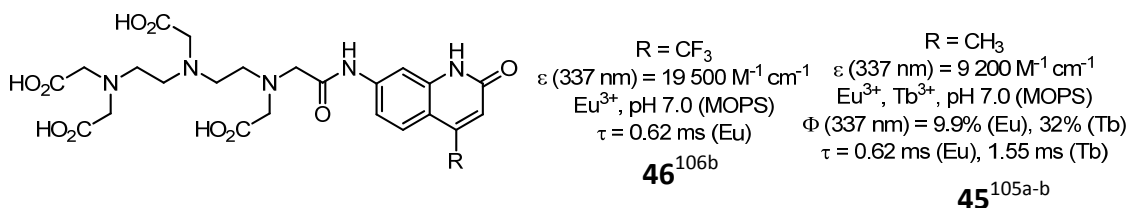
¹⁰⁴ **a)** M. P. Bailey, B. F. Rocks and C. Riley, *Analyst*, **1984**, *109*, 1449-1450 ; **b)** A. Canfi, M. P. Bailey and B. F. Rocks, *Analyst*, **1989**, *114*, 1407-1411.

¹⁰⁵ **a)** P. R. Selvin, T. M. Rana and J. E. Hearst, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 6029-6030 ; **b)** M. Xiao and P. R. Selvin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 7067-7073. **c)** J. G. Reifernberger, P. Ge and P. R. Selvin, *Reviews in Fluorescence 2005*, C. D. Geddes and J. R. Lakowicz (eds.), Springer US, **2005**, pp. 399-431 ; **d)** D. Parker and J. A. G. Williams, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.2*, **1996**, 1581-1586.

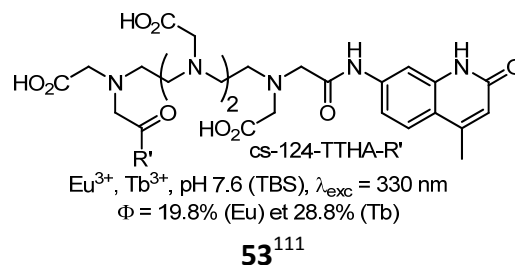
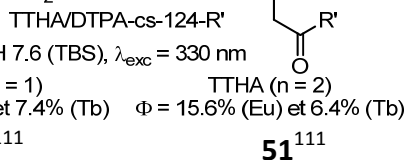
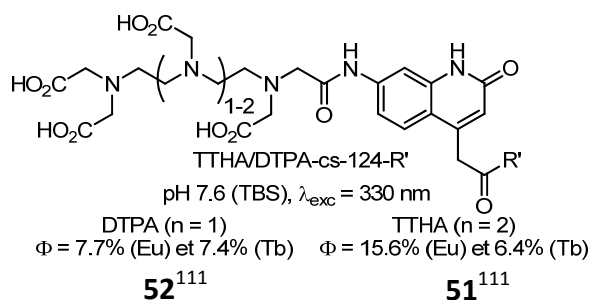
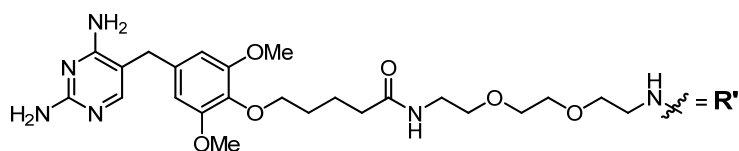
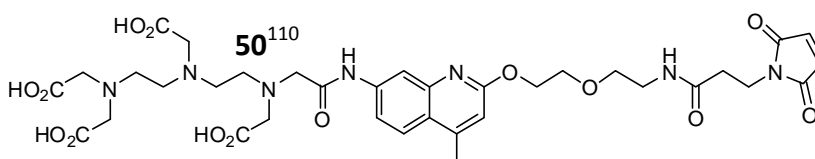
¹⁰⁶ **a)** G. Uray, K. S. Niederreiter, F. Belaj and W. M. F. Fabian, *Helv. Chim. Acta*, **1999**, *82*, 1408-1417 ; **b)** J. Chen and P. R. Selvin, *J. Photochem. Photobiol., A*, **2000**, *135*, 27-32.

¹⁰⁷ M. Li and P. R. Selvin, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 8132-8138.

¹⁰⁸ P. Ge and P. R. Selvin, *Bioconjugate Chem.*, **2008**, *19*, 1105-1111.



Eu^{3+} , Tb^{3+} , phase aqueuse, $\lambda_{max} = 330$ nm
 $\Phi = 60\%$ Φ _{DTPA-cs124}
 $\tau = 0.61$ ms (Eu), 1.24 ms (Tb)



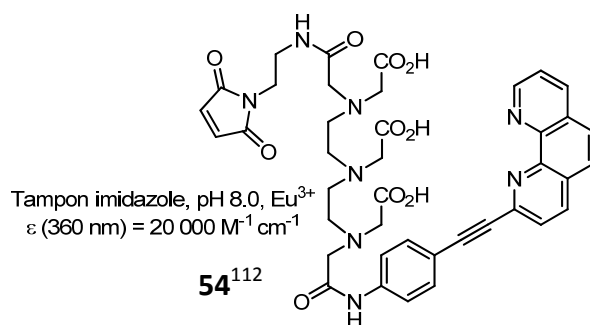
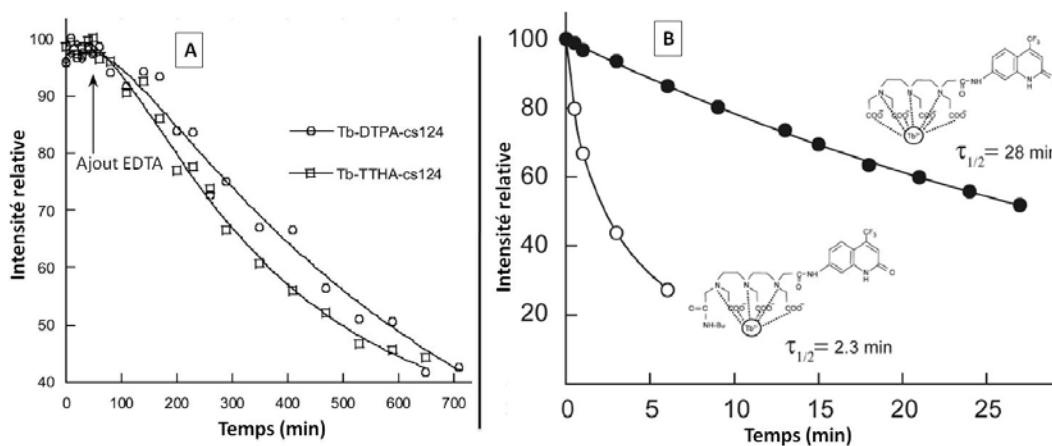


Figure 35 : Quelques exemples de chélates de lanthanides fondés sur une structure DTPA ou TTHA.

Afin d'améliorer la stabilité de ces chélates, la fonction bioconjugable ou le motif de reconnaissance (R' , dont la partie aromatique, la triméthoprim, possède une forte affinité pour une protéine nommée DHFR) ont pu être directement greffés sur l'antenne (complexes **48-49**,¹⁰⁹ **50**¹¹⁰). En outre, dans le cas du TTHA, que le motif R' soit relié *via* l'antenne (ligand **51** : TTHA-cs124- R' , Figure 36-C) n'est pas avantageux et aussi paradoxal que cela puisse paraître le complexe est même légèrement moins stable face à l'EDTA (Figure 36 C).¹¹¹

A noter que **Tb-51** est plus stable que **Tb-52** en milieu EDTA, ce qui semble *a priori* logique compte tenu de la dendricité du ligand TTHA. En revanche cela apparaît contradictoire (bien que la substitution de l'antenne soit différente) avec la Figure 36-A qui montre au contraire que l'intensité de luminescence est affectée légèrement moins vite dans le cas du DTPA que du TTHA.



¹⁰⁹ L. N. Krasnoperov, S. A. E. Marras, M. Kozlov, L. Wirpsza and A. Mustaev, *Bioconjugate Chem.*, **2010**, 21, 319-327.

¹¹⁰ S. H. Kim, P. Ge and J. A. Katzenellenbogen, *Chem. Commun.*, **2009**, 183-185.

¹¹¹ D. R. Reddy, L. E. Pedro Rosa and L. W. Miller, *Bioconjugate Chem.*, **2011**, 22, 1402-1409.

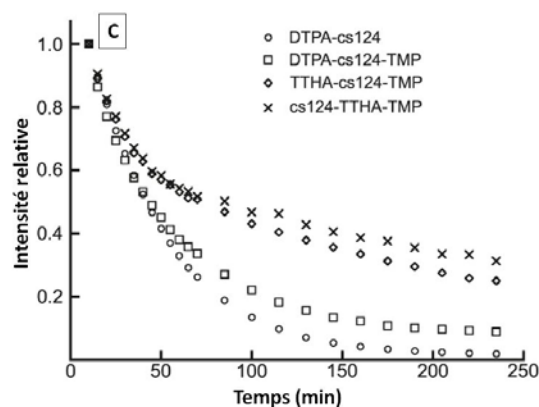


Figure 36 : Influence de l'EDTA sur l'intensité d'émission des chélates de Tb^{3+} (A : Tb-45 et Tb-47 (concentrations non précisées), 5 mM EDTA, tampon MOPS;¹⁰⁸ B : Tb-46 et analogue monoacylé (concentrations non spécifiées), EDTA (concentration non précisée);¹⁰⁹ C : Tb-45, Tb-52, Tb-51 et Tb-53 (c = 50 nM), 10 mM EDTA, tampon TBS¹¹¹).

Le chélate **Eu-54** formé d'un analogue de phénantroline permet de sensibiliser l'euporium à une longueur d'onde supérieure à 350 nm et son application à la détection de protéines sur gel d'électrophorèse a permis d'atteindre des limites de détections plus faibles qu'avec d'autres techniques mises en œuvre dans ce domaine.¹¹²

6.2. LES LIGANDS MACROCYCLIQUES

La très grande majorité de ces ligands sont composés de macrocycles azotés (triaazacyclononane, cyclène ou cyclame par exemple)¹¹³ et sont largement employés, grâce à leur propriété de complexation qui offre une stabilité accrue, pour la synthèse de radiopharmaceutiques métalliques¹¹⁴ ou de sondes au gadolinium pour l'IRM.¹¹⁵ Il existe aussi de nombreux complexes luminescents dont les structures chélatantes sont des analogues de cyclène substitué par un chromophore mais ceux-ci seront détaillés au chapitre 3 car, le plus souvent, ils sont utilisés comme senseurs (*i.e.* l'intensité d'émission est modulée par interaction d'un analyte avec le métal ou l'antenne).¹¹⁶

D'autres architectures macrocycliques incorporant directement l'antenne ont été décrites dont quelques molécules sont représentées dans la Figure 37. En revanche, bien que ces chélates soient généralement plus stables que leurs analogues linéaires, le nombre de ces structures reste plutôt limité, peut-être en raison d'une synthèse plus délicate qui nécessite une étape clé de macrocyclisation. En outre, les propriétés photophysiques ne se révèlent pas nécessairement supérieures à celles des chélates linéaires. Par exemple, le temps d'émission du complexe **Eu-56** est plus long que son dérivé cyclique **Eu-55**. De même, le

¹¹² T. Zuchner, F. Schumer, R. Berger-Hoffmann, K. Müller, M. Lukas, K. Zeckert, J. Marx, H. Hennig and R. Hoffmann, *Anal. Chem.*, **2009**, *81*, 9449-9453.

¹¹³ a) R. E. Mewis and S. J. Archibald, *Coord. Chem. Rev.*, **2010**, *254*, 1686-1712 ; b) L. Lattuada, A. Barge, G. Cravotto, G. B. Giovenzana and L. Tei, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, *40*, 3019-3049.

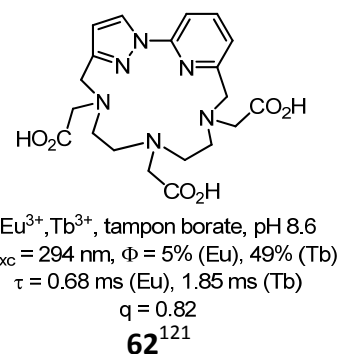
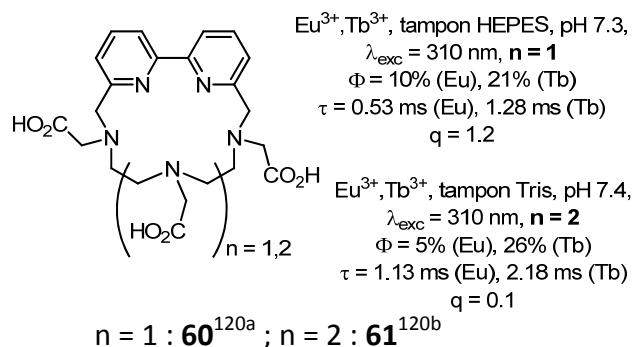
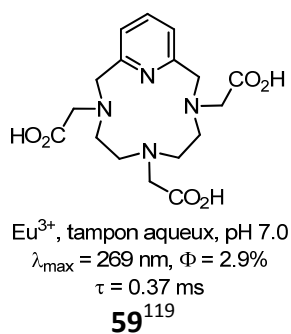
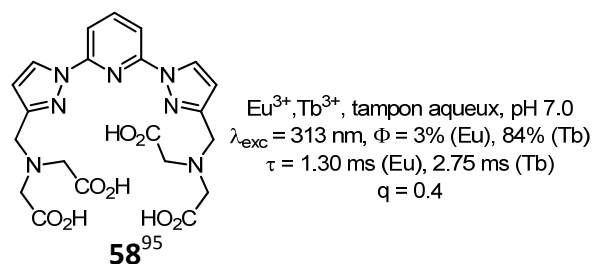
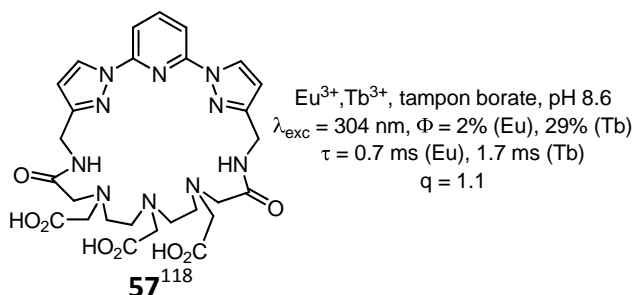
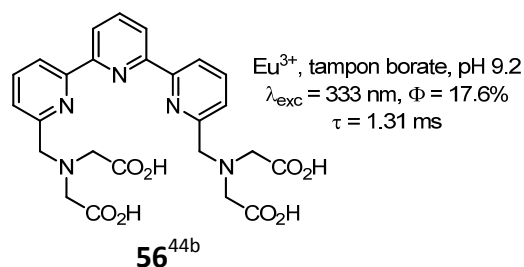
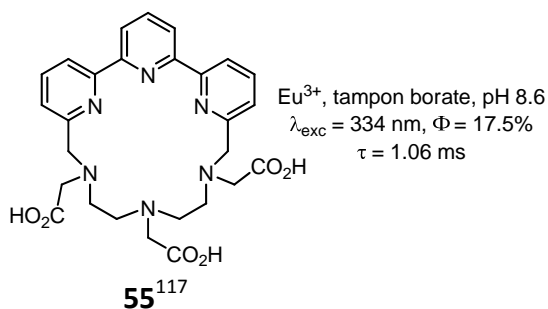
¹¹⁴ a) S. Liu, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2008**, *60*, 1347-1370; b) M. Shokeen and C. J. Anderson, *Acc. Chem. Res.*, **2009**, *42*, 832-841.

¹¹⁵ a) C. F. G. C. Geraldès and S. Laurent, *Contrast Media Mol. Imaging*, **2009**, *4*, 1-23 ; b) L. Frullano and P. Caravan, *Curr. Org. Synth.*, **2011**, *8*, 535-565.

¹¹⁶ A. Thibon and V. C. Pierre, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2009**, *394*, 107-120.

motif DTPA cyclique du ligand **57** ne semble pas adapté pour protéger efficacement le métal de l'environnement aqueux puisque le nombre de molécules d'eau dans la sphère de coordination du lanthanide est de 1.1 contre 0.4 pour le dérivé non cyclique **58**.

Notons aussi que la structure **61** complexe plus efficacement le métal que le composé **60** grâce à sa fonction carboxylate supplémentaire, alors que le rendement quantique de l'euporium diminue. Cela peut s'interpréter par un état LMCT plus favorable conduisant à une réduction du métal et à une baisse de luminescence.



¹¹⁷ C. Galaup, J.-M. Couchet, S. Bedel, P. Tisnès and C. Picard, *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 2274-2284.

¹¹⁸ E. Brunet, O. Juanes, R. Sedano and J.-C. Rodriguez-Ubis, *Org. Lett.*, **2001**, *4*, 213-216.

¹¹⁹ J.-M. Siaugue, F. Segat-Dioury, A. Favre-Réguillon, C. Madic, J. Foos and A. Guy, *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 7443-7446.

¹²⁰ a) I. Nasso, C. Galaup, F. Havas, P. Tisnès, C. Picard, S. Laurent, L. Vander Elst and R. N. Muller, *Inorg. Chem.*, **2005**, *44*, 8293-8305 ; b) G. Bechara, N. Leygue, C. Galaup, B. Mestre-Voegtli and C. Picard, *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 8594-8604.

¹²¹ I. Nasso, S. Bedel, C. Galaup and C. Picard, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2008**, 2064-2074.

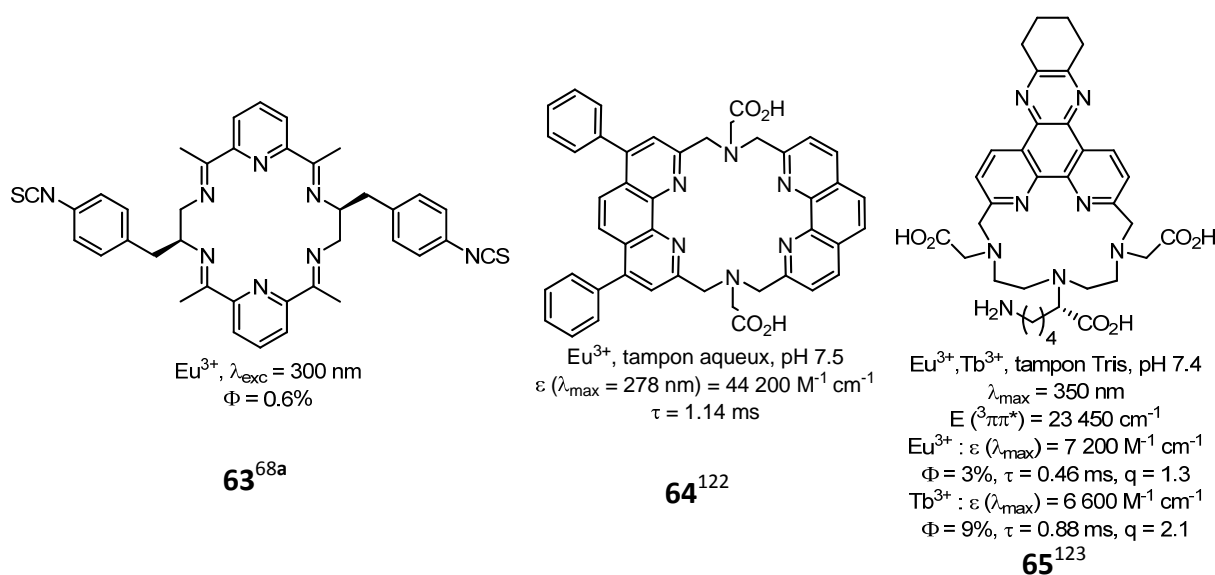


Figure 37 : Chélates à architecture macrocyclique.

Le ligand macrocyclique **65**, récemment décrit, comportant une antenne dipyridotetrahydrophenazine permet de sensibiliser aussi bien l'euprium que le terbium à une longueur d'onde de 350 nm.¹²³ De plus, ce composé dispose d'une fonction amine primaire dérivatisable. Les chélates d'euprium et de terbium activés sur ce résidu par un maléimide ont ainsi pu être greffés sur un anticorps modèle. Enfin ces complexes se montrent stables dans différents tampons aqueux usuels ainsi qu'en milieu EDTA (1 mM pour une concentration en complexe de l'ordre de 1 μM).

6.3. LES LIGANDS PHOSPHONATES

Les phosphonates sont des bases plus dures que les carboxylates et forment ainsi des complexes lanthanidique plus stables. En revanche, peu de chélates organiques luminescents incorporent cette structure ce qui peut être imputé à des synthèses plus délicates ou au fait que la charge nette négative élevée à pH physiologique peut modifier les propriétés de la biomolécule marquée.^{92b}

Cette plus forte affinité des phosphonates, qui permet d'expulser plus efficacement les molécules d'eau de la sphère de coordination du métal, se traduit donc par un temps d'émission de luminescence plus long (cf. τ (**Tb-68**) vs. τ (**Tb-67**) par exemple).¹²⁴ Cependant, il a été montré que pour les chélates Ln-**66** le rendement quantique est plus faible que pour leurs analogues carboxylates (Ln-**38** : Figure 34)¹²⁵ ce qui peut s'expliquer par un plus grand éloignement du chromophore vis-à-vis du métal résultant de la forte interaction entre ce

¹²² a) D. Horiguchi, Y. Katayama, K. Sasamoto, H. Terasawa, N. Sato, H. Mochizuki and Y. Ohkura, *Chem. Pharm. Bull.*, **1992**, *40*, 3334-3337 ; b) D. Horiguchi, K. Sasamoto, H. Terasawa, H. Mochizuki and Y. Ohkura, *Chem. Pharm. Bull.*, **1994**, *42*, 972-975.

¹²³ S. Deslandes, C. Galaup, R. Poole, B. Mestre-Voegtle, S. Soldevila, N. Leygue, H. Bazin, L. Lamarque and C. Picard, *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, *10*, 8509-8523.

¹²⁴ R. Ziesel, A. Sutter and M. Starck, *Tetrahedron Lett.*, **2012**, *53*, 3717-3721.

¹²⁵ N. N. Katia, A. Lecointre, M. Regueiro-Figueroa, C. Platas-Iglesias and L. J. Charbonnière, *Inorg. Chem.*, **2011**, *50*, 1689-1697.

dernier et les fonctions phosphonates. Le chélate **Gd/Eu-69** a été utilisé comme sonde bimodale (aucune donnée n'est spécifiée quant aux propriétés photophysiques du chélate **Eu-69**) pour imager des cellules cancéreuses du cerveau.¹²⁶

Le motif phosphinate est aussi parfois rencontré,⁴¹ ce qui permet de moduler l'acidité des fonctions acide phosphonique/phosphinique et le pouvoir complexant.

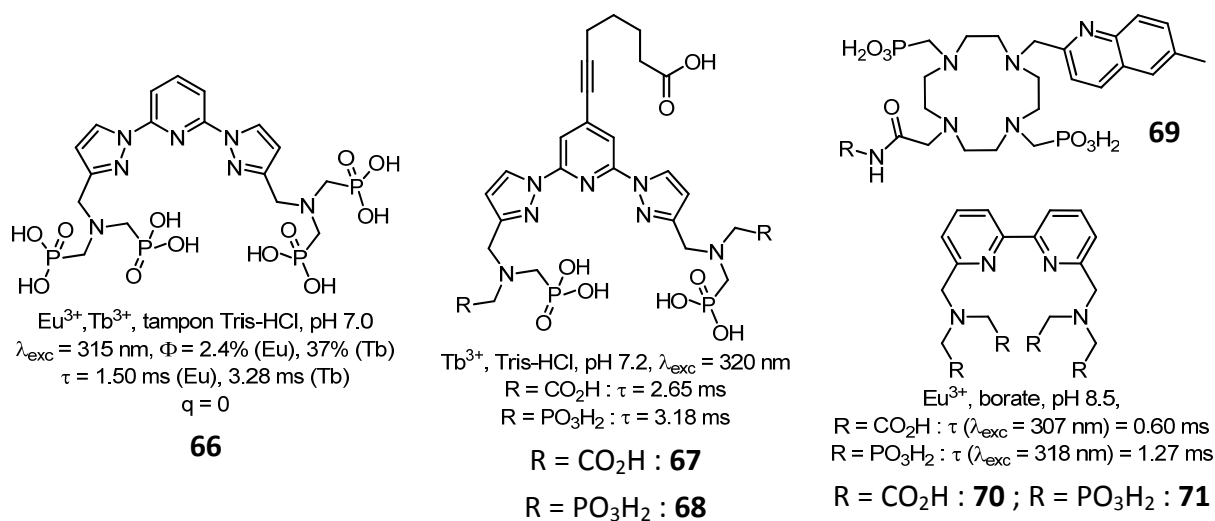


Figure 38 : Ligands phosphonates.

6.4. LES β -DICÉTONES

De par la structure bidentée des β -dicétones, les chélates de lanthanides correspondants sont composés soit de trois β -dicétonates, et dans ce cas une base de Lewis ajoutée au milieu complète la sphère de coordination du métal (2,2'-bipyridine, 1,10-phénantroline, TOPO ou l'eau par-exemple) ou soit de quatre. Les β -dicétones aromatiques sensibilisent l'euporium et le samarium mais pas le terbium ni le dysprosium.¹²⁷

Plusieurs chélates à base de ligands tétradentés incorporant deux motifs β -dicétones, plus stables en proportion métal : ligand 1 : 1, et capables de marquer une biomolécule, sont rapportés dans la littérature. Les groupements fluorés en position α des β -dicétones favorisent la formation de l'énolate en présence du lanthanide augmentant ainsi la stabilité du complexe.

L'inconvénient du ligand **72**¹²⁸ est qu'il convient de neutraliser de façon contrôlée un des deux chlorosulfonyle avant l'étape de bioconjugaison. Le ligand **73**,¹²⁹ bien que moins soluble en phase aqueuse, conduit à un chélate plus luminescent mais aussi moins stable du fait de sa structure plus rigide : pour pallier cet inconvénient un excès d'euporium doit être

¹²⁶ a) H. C. Manning, T. Goebel, R. C. Thompson, R. R. Price, H. Lee and D. J. Bornhop, *Bioconjugate Chem.*, **2004**, 15, 1488-1495 ; b) H. C. Manning, M. Bai, B. M. Anderson, R. Lisiak, L. E. Samuelson and D. J. Bornhop, *Tetrahedron Lett.*, **2005**, 46, 4707-4710.

¹²⁷ K. Binnemans, *Chem. Rev.*, **2009**, 109, 4283-4374.

¹²⁸ J. Yuan and K. Matsumoto, *Anal. Sci.*, **1996**, 12, 695-699.

¹²⁹ J. Yuan, K. Matsumoto and H. Kimura, *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 596-601.

ajouté. Récemment, une nouvelle structure (ligand **74**) plus flexible a été décrite.¹³⁰ Le chélate d'europium correspondant est alors plus stable et plus luminescent que son analogue **Eu-73**.

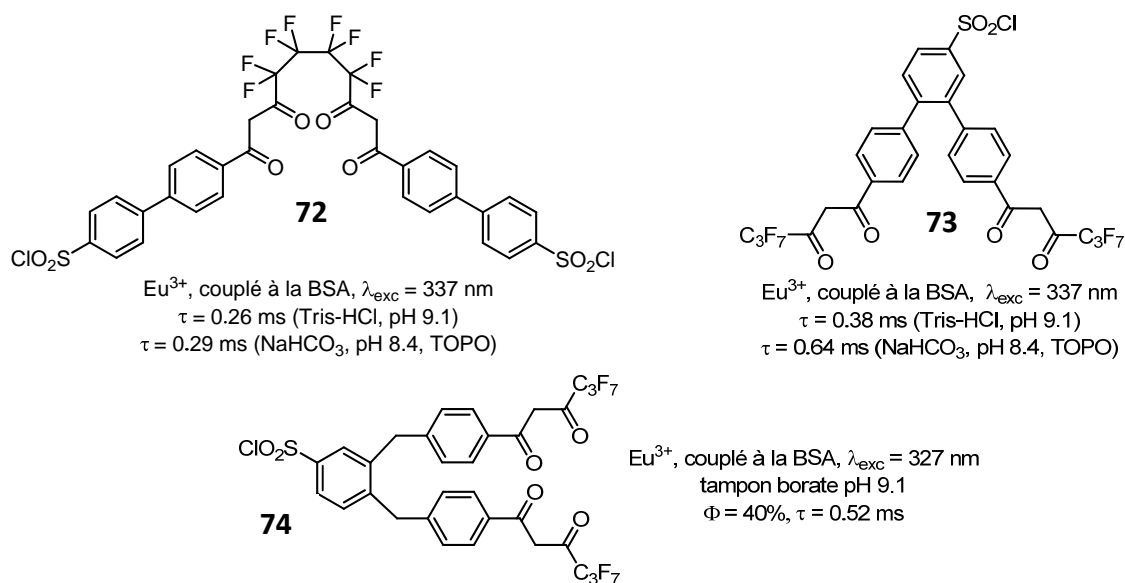


Figure 39 : Exemples de chélates d'europium tétradentés β -dicétoniques.

6.5. LES CRYPTANTS

Le terme cryptate désigne des complexes d'inclusion dont le ligand (cryptant) est composé d'un assemblage polycyclique formant une cavité ; selon sa taille cette dernière peut encapsuler différentes entités. Ce type d'architecture complexant les lanthanides a été tout particulièrement étudié dans les années 1980 et 1990 par l'équipe de J.-M. Lehn.

La bipyridine est le motif le plus largement répandu dans la série des cryptates photoactifs qui ont mené au développement de complexes de lanthanides plus robustes que les chélates décrits précédemment.^{131,92a} Comme ces structures intègrent plusieurs antennes le coefficient d'absorption est généralement élevé (environ $30\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, cf. Figure 41, contre $9\,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ pour les chélates **Eu-** et **Tb-70** contenant un seul motif bipyridine).

Dans le cas des cryptates, le processus de dissociation est lent puisque l'énergie d'activation nécessaire pour expulser le cation métallique est importante ($\Delta G^* \approx 100\text{-}120 \text{ kJ mol}^{-1}$). En effet, l'état de transition de la réaction de décomplexation impose que l'un des azotes tête-de-pont change sa conformation. Quant aux chélates composés de motifs polyaminocarboxylate, l'énergie d'activation est plus basse ($0\text{-}40 \text{ kJ mol}^{-1}$) et ils sont peu stables en milieu acide contrairement aux cryptates.

¹³⁰ L. Zhang, Y. Wang, Z. Ye, D. Jin and J. Yuan, *Bioconjugate Chem.*, **2012**, 23, 1244-1251.

¹³¹ N. Sabbatini, M. Guardigli and J.-M. Lehn, *Coord. Chem. Rev.*, **1993**, 123, 201-228.

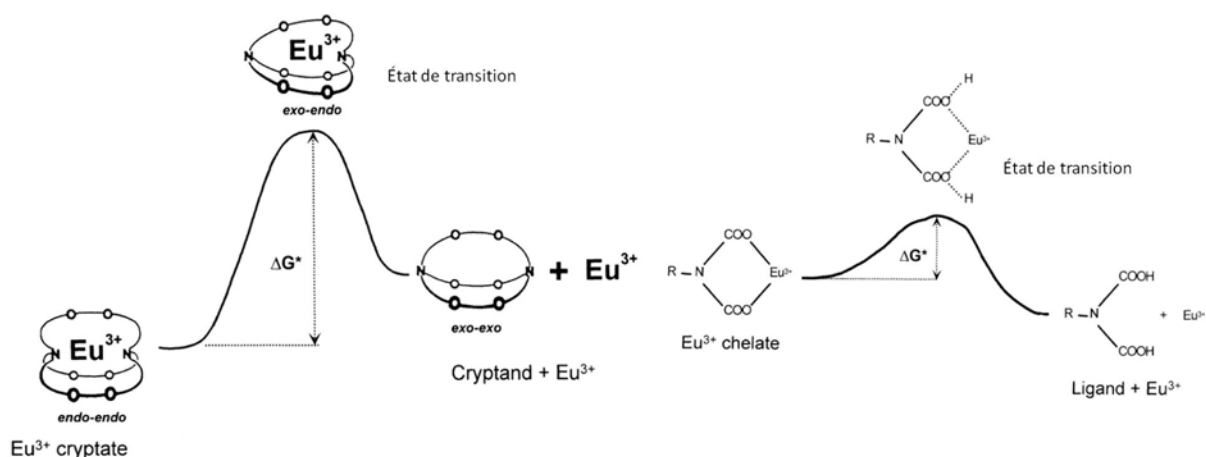
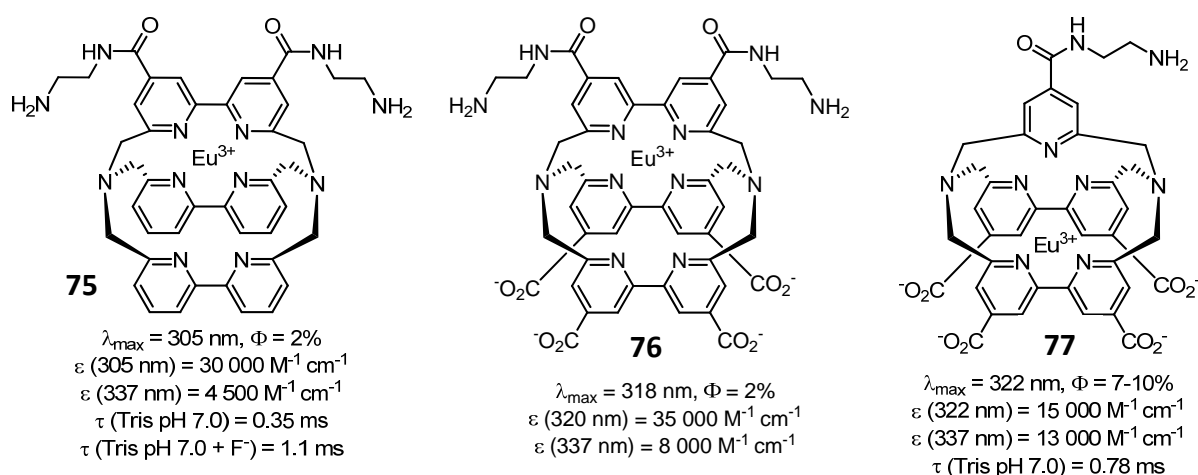


Figure 40 : Diagrammes d'énergie potentielle de la décomplexation d'un cryptate et d'un chélate d'euprium.¹³²

L'énergie de l'état triplet des cryptates bipyridiniques est trop proche du niveau d'émission 5D_4 du terbium pour permettre un transfert efficace sur le lanthanide ($21\,600\text{ cm}^{-1}$ soit $1\,200\text{ cm}^{-1}$ au-dessus,¹³¹ alors que celui de la bipyridine **70** (Figure 38) est localisé à $22\,400\text{ cm}^{-1}$ et sensibilise correctement le terbium : $\Phi = 14\%$ ^{44b}). Quant au faible rendement quantique des cryptates d'euprium tris-bipyridine (cryptates **75** et **76**), il s'explique par un transfert de charge entre le ligand et le métal conduisant à sa réduction en Eu^{2+} et à une désexcitation non-radiative du complexe. De plus, le volume de la cavité est suffisamment grand pour permettre à deux molécules d'eau de s'insérer dans la sphère de coordination du lanthanide. La taille de cette « poche » est diminuée en remplaçant une bipyridine par une pyridine (cryptate **77**) et la luminescence est alors moins inhibée par l'eau ; la réduction du métal est aussi atténuée puisque le cation Eu(II) est plus large que le cation Eu(III) (1.30 contre 1.12 \AA).⁶⁵ Cette modification permet d'éviter l'emploi d'ions fluorures cytotoxiques utilisés avec les cryptates **75** et **76** pour saturer le cation métallique.

Enfin, l'ajout des fonctions carboxylates se conjuguant à la structure aromatique provoque un effet bathochrome de l'antenne, rendant ces molécules plus brillantes à la longueur d'onde d'excitation du laser à azote (337 nm) communément employé.



¹³² G. Mathis, *J. Biomol. Screening*, **1999**, *4*, 309-313.

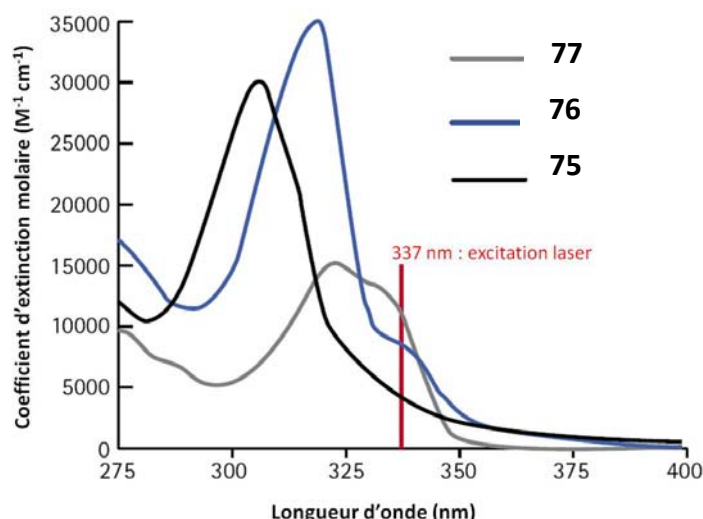


Figure 41 : Exemples de cryptates d'europium(III) et de leur spectre d'absorption enregistrés dans le tampon Tris (pH 7.0).^{65,88a,133}

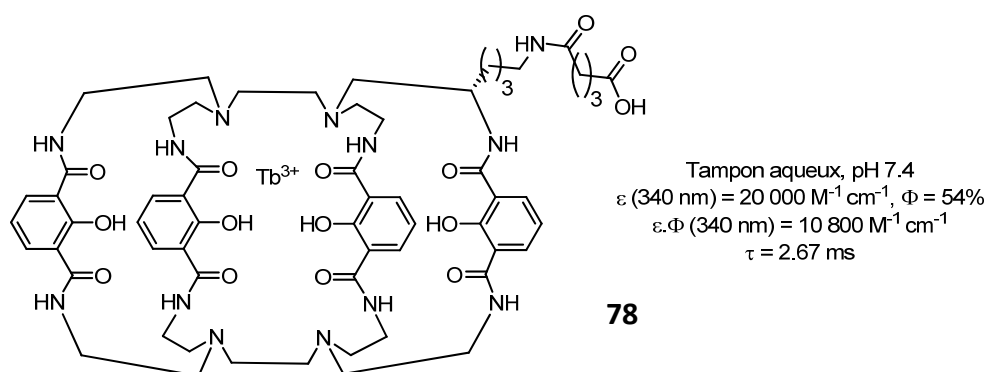


Figure 42 : Cryptate de terbium (Lumi4®-Tb).^{52f}

Le cryptant tricyclique constitué du motif 2-hydroxyisophtalamide décrit récemment (Figure 42) s'avère être un complexe prometteur car il sensibilise parfaitement le terbium et sa brillance à 340 nm est conséquente.

IV. APPLICATIONS BIOMÉDICALES

Les propriétés biologiques des lanthanides proviennent de la similitude de leur rayon ionique avec ceux du zinc mais surtout du calcium, qui est un cation métallique abondant dans les systèmes vivants. En outre, les lanthanides disposent d'une densité de charge plus élevée ce qui leur confère une affinité plus grande vis-à-vis des sites calcium et manganèse des biomolécules. Par exemple, la géométrie de ces sites peut être déterminée en y incorporant le cation Eu^{3+} puis en analysant son spectre d'émission. En effet, l'éclatement des niveaux J (Figure 9) associé au champ des ligands dépend de la symétrie adoptée mais reste prédictible. Enfin, ce qui facilite l'interprétation des spectres est que l'europium, en

¹³³ a) F. Degorce, A. Card, S. Soh, E. Trinquet, G. P. Knapik and B. Xie, *Curr. Chem. Genomics*, **2009**, 3, 22-32 ; b) Application Note 7 : *New europium cryptate to probe molecular interactions using HTRF®*.

plus d'être l'unique lanthanide présentant un niveau d'émission (5D_0) non-dégénéré, possède une transition hypersensible (cf. section III-2).

Leur acidité de Lewis est aussi mise à profit pour catalyser l'hydrolyse de liens phosphodiester de l'ADN ou de l'ARN par exemple, et se sont révélés beaucoup plus efficaces que d'autres cations métalliques (Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) grâce notamment à leur stabilité relative en milieu aqueux et leur caractère labile.¹³⁴

Quant à l'utilisation des lanthanides en thérapie, elle reste relativement marginale car le calcium étant impliqué dans de très nombreux processus biochimiques il est délicat de développer une molécule à base de lanthanide présentant peu d'effets secondaires ; quelques contre-exemples existent néanmoins. Dans le domaine du diagnostique en revanche, ces cations métalliques sont largement exploités.

1 EN THERAPIE¹³⁵

Ils n'existent actuellement que deux médicaments dont les principes actifs incorporent un cation lanthanide. Le premier (Flammacérium), à base de nitrate de cérium est préconisé pour améliorer la cicatrisation et ainsi prévenir le risque d'infection bactérienne consécutif à des brûlures ayant occasionnées de graves lésions. Le second (Fosrenol) est exclusivement composé de carbonate de lanthane tétrahydraté et est utilisé dans le traitement de l'hyperphosphorémie grâce à sa capacité à se coordiner aux phosphates dans une large gamme de pH allant de 1 à 7. De plus, après complexation, le chélate devient insoluble ce qui empêche l'accumulation de lanthane dans les tissus.

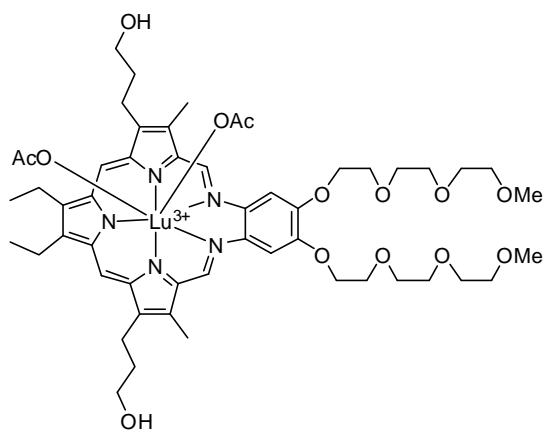


Figure 43 : Analogue de texaphyrine chélatant du Lu pour une application potentielle en thérapie photodynamique.

Des chélates de gadolinium et de lutécium à base de texaphyrine (analogue de porphyrine comportant une cavité plus volumineuse : Figure 43) présentant des propriétés intéressantes sont à l'étude. En effet, ces complexes possèdent une importante activité rédox en milieu biologique : ils se réduisent facilement, puis, en s'oxydant à nouveau favorisent la formation d'espèces oxygénées réactives cytotoxiques. Ils pourraient donc être utilisés comme agents anticancéreux. D'autre part ces chélates sont aussi envisagés pour de la thérapie photodynamique (TPD)¹³⁶

puisque la texaphyrine est capable d'absorber dans le proche IR à 730 nm (à cette longueur

¹³⁴ a) S. J. Franklin, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2001**, 5, 201-208 ; b) V. Dokukin and S. K. Silverman, *Chem. Sci.*, **2012**, 3, 1707-1714.

¹³⁵ S. P. Fricker, *Chem. Soc. Rev.*, **2006**, 35, 524-533.

¹³⁶ a) H. Ali and J. E. van Lier, *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2379-2450 ; b) V. S. Sastri, J.-C. Bünzli, V. R. Rao, G. V. S. Rayudu and J. R. Perumareddi, *Modern Aspects of Rare Earth and Their complexes*, Elsevier, Amsterdam, **2003**, pp. 259-374.

d'onde les tissus et l'hémoglobine sont transparents). Enfin, le peuplement de l'état triplet est favorisé par la proximité du lanthanide et par le fait que le transfert d'énergie sur le gadolinium ou le lutétium est impossible. Une conséquence, mise à profit en TPD, est que l'état triplet peut se désactiver par interaction avec l'oxygène, pour donner de l'oxygène singlet, qui va conduire à la destruction des cellules cancéreuses.

2 EN RADIOTHERAPIE^{114,137}

Certains radiopharmaceutiques à visée thérapeutique sont constitués d'isotopes radioactifs de lanthanides (et d'yttrium) qui sont le plus souvent utilisés pour détruire des tumeurs cancéreuses grâce au rayonnement ionisant cytotoxique qu'ils délivrent suite à une désintégration β^- . Ce processus conduisant à l'émission d'un électron résulte de la transformation d'un neutron en proton au sein de noyaux dont l'instabilité est due à un excès de neutrons. Il est parfois accompagné de rayons γ qui n'ont qu'un effet thérapeutique très limité mais peuvent s'avérer dangereux suivant leur puissance et leur durée de vie car ce sont des rayonnements très pénétrants (émission de photons très énergétiques). En contrepartie, certains éléments (^{99m}Tc, ¹¹¹In, ⁶⁷Ga par exemple) émettant ce type de rayonnement sont très utilisés en imagerie médicale à des fins de diagnostic (scintigraphie gamma).

Pour être efficace et le moins nocif possible pour l'organisme, le complexe doit être préférentiellement capté par les cellules tumorales et la fraction qui ne l'est pas doit pouvoir être facilement excrétée. Aussi, le ligand doit former un chélate stable dans des conditions de haute dilution et dans des milieux biologiques naturellement riches en ions.

Le choix du radionucléide est le résultat d'un compromis entre la taille de la tumeur, le profil de bio-distribution du chélate, son activité spécifique (énergie de la particule émise), son temps de demi-vie, sa pureté et le coût de production. Les isotopes de terres rares les plus employés en radiothérapie sont les suivants : ⁹⁰Y, ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁶⁶Ho et ¹⁴⁹Pm.

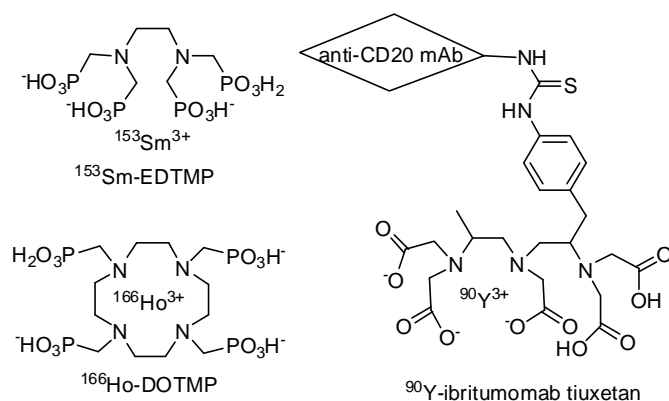


Figure 44 : Exemples de radiopharmaceutiques commercialisés ou à l'étude à base de terres rares.

Actuellement, deux chélates de radiolanthanides (Figure 44) ont reçu l'autorisation de mise sur le marché. ¹⁵³Sm-EDTMP est prescrit dans le traitement du cancer des os dont l'absorption préférentielle proviendrait de l'interaction entre les atomes d'oxygène des fonctions phosphonates du complexe avec la matrice minérale des os. Son dérivé, ¹⁶⁶Ho-DOTMP, émettant un rayonnement plus intense,

¹³⁷ a) W. A. Volkert and T. J. Hoffman, *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2269-2292 ; b) S. Liu and D. S. Edwards, *Bioconjugate Chem.*, **2001**, 12, 7-34.

est aussi envisagé pour traiter des patients atteints de myélome multiple (cancer hématologique lié à un dysfonctionnement de la moelle osseuse). L'objectif est la destruction de la moelle osseuse défaillante avant une greffe de moelle saine. Le deuxième complexe commercialisé est composé d'yttrium et permet de traiter un cancer du système lymphatique (lymphome non-Hodgkinien). L'anticorps monoclonal conjugué au chélate permet une reconnaissance spécifique de l'antigène CD-20 exprimé à la surface des lymphocytes B. Grâce au rayonnement puissant de l'yttrium 90, les cellules tumorales dans l'environnement proche de ces lymphocytes seront détruites. A noter que le méthyle du motif DTPA augmente la stabilité cinétique du chélate et limite ainsi la décomplexation de l'yttrium qui est l'un des radionucléides les plus puissants utilisés en radiothérapie.

3 EN IMAGERIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE

Il s'agit d'une technique d'imagerie utilisée en routine dans le diagnostic clinique et dans la recherche biomédicale qui repose sur la résonance magnétique nucléaire des hydrogènes des molécules d'eau, principal constituant des tissus biologiques. Dans les paragraphes suivants nous nous attacherons à la description des agents de contraste (AC) au gadolinium mais d'autres complexes, au fer, au manganèse et avec d'autres lanthanides plus ou moins paramagnétiques, existent et reposent aussi sur la relaxivité du proton. Enfin, l'IRM nucléaire n'est plus cantonnée au proton mais de nouvelles méthodes permettent d'obtenir de très bons contrastes avec d'autres noyaux présentant aussi un spin nucléaire non-nul (^3He , ^{129}Xe , ^{13}C , ^{15}N , ^6Li).^{115a}

3.1. PRINCIPE

Les atomes possédant un nombre quantique de spin nucléaire non-nul, comme l'hydrogène, interagissent avec un champ magnétique extérieur. Lors d'une expérience IRM, un champ magnétique statique mais variant linéairement le long d'une direction de l'espace va permettre d'orienter les moments magnétiques des spins nucléaires qui décriront alors un mouvement de précession de façon parallèle ou bien antiparallèle à ce champ externe. La vitesse angulaire de rotation dépendra de l'intensité du champ. Une courte impulsion de radiofréquence spécifique aux noyaux d'hydrogène situés dans un plan de l'espace (où le champ magnétique est identique ainsi que la vitesse angulaire) est alors appliquée afin qu'ils puissent en capter l'énergie. Le retour à l'équilibre (relaxation) s'accompagne de la restitution de l'énergie par une onde de résonance qui est recueillie par une antenne. Ce signal, dont la localisation de la source est obtenue après traitement mathématique, est influencé par la concentration en eau et la vitesse de relaxation des protons qui varient suivant l'environnement et l'état des tissus (sains ou malades).

Ce procédé d'imagerie présente l'avantage d'être non invasif, de posséder une résolution spatiale submillimétrique, de n'émettre aucun rayonnement ionisant, de délivrer des informations anatomiques en trois dimensions et de pouvoir sonder les tissus en profondeur

sans que la qualité en pâtisse. En revanche, cette méthode est peu sensible et ne permet la visualisation des tissus que si la concentration en protons aqueux y est de l'ordre de 90 M. La sensibilité peut être exaltée en introduisant un agent dit de contraste dont le but est, en diminuant le temps de relaxation des protons de l'eau situés dans son environnement proche, d'améliorer le contraste des images.¹³⁸

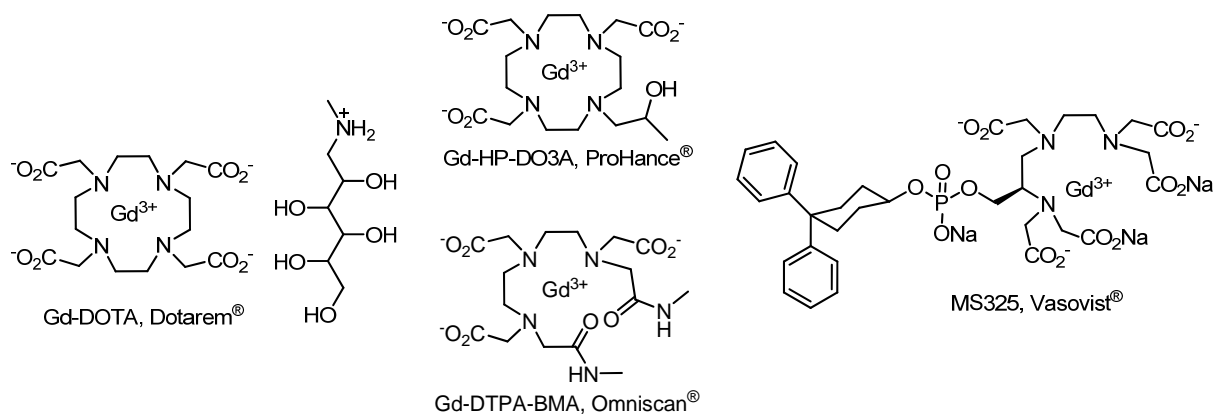


Figure 45 : Quelques exemples de chélateurs de Gd(III) commerciaux.

3.2. FACTEURS CONTROLANT LA RELAXIVITE

La vitesse de relaxation du moment magnétique des protons dépend évidemment de leur vitesse de relaxation intrinsèque (vitesse de relaxation diamagnétique) mais aussi de la vitesse de relaxation paramagnétique qui leur est communiquée par l'agent de contraste. Ce terme dépend de la relaxivité de ce dernier qui traduit l'efficacité avec laquelle la vitesse de relaxation est augmentée, ainsi que de sa concentration.

L'augmentation de la vitesse de relaxation des molécules d'eau par un agent de contraste

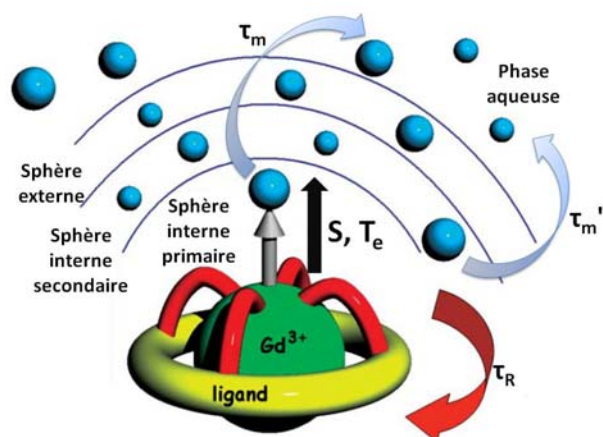


Figure 46 : Schématisation de l'interaction entre l'eau et un agent de contraste au Gd(III) (S : spin électronique ; T_e : temps de relaxation électronique du cation).¹³⁹

est un phénomène multifactoriel complexe (Figure 46).¹³⁹ Le chélate, introduit en quantité catalytique par rapport à l'eau, doit transmettre son paramagnétisme au plus grand nombre de molécules d'eau lors du processus de relaxation. Autrement dit, la vitesse d'échange entre les molécules relaxées dans l'entourage proche du complexe et celles de la phase aqueuse doit être optimale car l'interaction $Gd^{III} \cdots H$ diminue rapidement avec la distance. La répartition spatiale de l'eau autour du

¹³⁸ P. Caravan, *Chem. Soc. Rev.*, **2006**, 35, 512-523.

¹³⁹ P. Hermann, J. Kotek, V. Kubicek and I. Lukes, *Dalton Trans.*, **2008**, 3027-3047.

secondaire et sphère externe qui représentent respectivement les molécules d'eau coordonnées au métal, celles interagissant par liaisons hydrogène avec le chélate et celles dont l'interaction est gouvernée par la seule diffusion et caractérisées par une distance de plus courte approche. La contribution de cette dernière sphère à la relaxivité n'est pas bien comprise et est négligée lors de la conception des agents de contraste.

La relaxation des protons de l'eau par le Gd^{3+} s'effectue *via* un mécanisme dipolaire entre le spin nucléaire de ces protons et le spin électronique du métal. Ce transfert d'énergie entre protons et spins est possible car les électrons non-appariés du gadolinium relaxent à une vitesse exceptionnellement lente (*cf.* §-II-5). L'intensité de cette désactivation est proportionnelle à r^{-6} (r : distance chélate-noyau), au nombre de molécules d'eau en sphères primaire (q) et secondaire et à la durée de plusieurs processus dont l'échange entre les molécules d'eau coordonnées au métal ou au complexe par liaisons hydrogène avec celles du milieu extérieur (respectivement τ_m et τ_m'), la rotation du complexe autour de l'axe Gd-OH₂ (τ_R) et la relaxation électronique du cation métallique ($1/T_e$) qui lui-même dépend de l'intensité du champ magnétique.

La relaxivité provient majoritairement de la sphère interne primaire dont sa contribution est la moins délicate à prévoir et à moduler par modification chimique du ligand. En revanche, le rôle des deux autres sphères n'est pas négligeable car même des chélates saturés peuvent induire une relaxivité correcte.

3.3. OPTIMISATION DES AGENTS DE CONTRASTE

En théorie, trois variables peuvent être ajustées pour diminuer le temps de relaxation : augmenter q , allonger τ_R (seulement si le champ magnétique appliqué correspond à une fréquence inférieure à 60 MHz) et diminuer τ_m (la durée de l'échange ne doit pas non plus être trop rapide afin que l'effet du gadolinium soit perçu par le proton aqueux).

Le plus simple, *a priori*, est de réduire la dendricité du ligand afin d'augmenter le nombre de molécules d'eau pouvant se lier simultanément au gadolinium. Cela peut engendrer un encombrement plus faible autour du métal, favorisant l'expulsion d'eau par des ligands endogènes plus affins pour le lanthanide (anions phosphates ou bicarbonates par exemple) ou la dissociation de l'agent de contraste ce qui, dans chaque cas, atténue la relaxivité. Néanmoins, des chélates suffisamment stables offrant deux à trois sites vacants dans la première sphère de coordination du cation métallique et dotés d'une relaxivité améliorée ont été décrits (Figure 47).¹⁴⁰

¹⁴⁰ a) S. Aime, M. Botta, L. Frullano, S. Geninatti Crich, G. Giovenzana, R. Pagliarin, G. Palmisano, F. R. Sirtori and M. Sisti, *J. Med. Chem.*, **2000**, *43*, 4017-4024 ; b) J. B. Livramento, A. Sour, A. Borel, A. E. Merbach and É. Tóth, *Chem. Eur. J.*, **2006**, *12*, 989-1003 ; c) Z. Baranyai, F. Uggeri, G. B. Giovenzana, A. Bényei, E. Brücher and S. Aime, *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 1696-1705 ; d) A. Datta and K. N. Raymond, *Acc. Chem. Res.*, **2009**, *42*, 938-947.

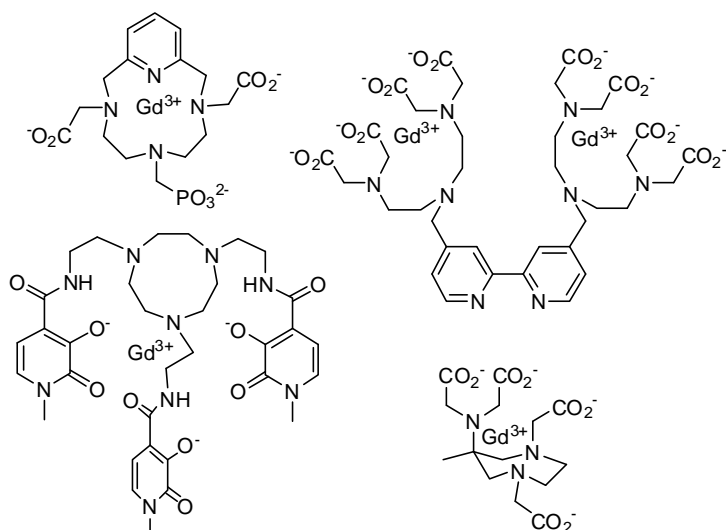


Figure 47 : Agents de contrastes au Gd(III) stables disposant d'au moins deux molécules d'eau dans la première sphère de coordination.

Les deux dernières variables (τ_R et τ_m) sont interdépendantes dans l'optimisation de la relaxivité : ainsi plus la vitesse de rotation de l'agent de contraste est faible et plus τ_m aura un impact sur l'efficacité du transfert de paramagnétisme.

En règle générale, l'insertion du gadolinium dans des structures hydrophiles macromoléculaires de type dendritiques¹⁴¹ ou supramoléculaires^{140b,142} peut conduire à une augmentation de

τ_R et de la relaxivité. Une autre stratégie consiste à augmenter virtuellement la masse du chélate en lui incorporant une fonction affine pour certaines protéines (MS325, Vasovist®, Figure 45).¹⁴³

La valeur de τ_m dépend de la géométrie de coordination du chélate¹⁴⁴ mais plus globalement de sa capacité à stabiliser son état de transition lors du transfert des molécules d'eau. Pour un complexe nona-coordiné monohydraté (NC = 9 dont une molécule d'eau) le processus d'échange conduira à un intermédiaire soit octa-coordiné (mécanisme dissociatif) soit deca-coordiné (mécanisme associatif). Les lanthanides ayant en solution des NC de huit ou neuf, le mécanisme dissociatif est favorisé. De façon plus générale,

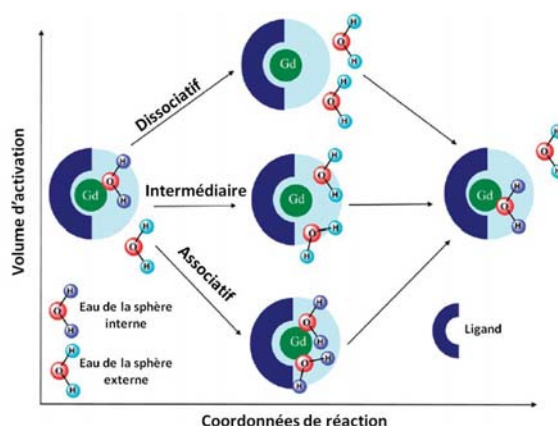


Figure 48 : Représentation des états de transition possibles lors du processus d'échange de molécules d'eau.^{140d}

¹⁴¹ a) Z. Jászberényi, L. Moriggi, P. Schmidt, C. Weidensteiner, R. Kneuer, A. Merbach, L. Helm and É. Tóth, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2007**, *12*, 406-420 ; b) Z. Cheng, D. L. J. Thorek and A. Tsourkas, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 346-350 ; c) P. J. Klemm, W. C. Floyd, D. E. Smiles, J. M. J. Fréchet and K. N. Raymond, *Contrast Media Mol. Imaging*, **2012**, *7*, 95-99.

¹⁴² a) J. B. Livramento, É. Tóth, A. Sour, A. Borel, A. E. Merbach and R. Ruloff, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 1480-1484 ; b) P. Verwilt, S. V. Eliseeva, L. Vander Elst, C. Burtea, S. Laurent, S. Petoud, R. N. Muller, T. N. Parac-Vogt and W. M. De Borggraeve, *Inorg. Chem.*, **2012**, *51*, 6405-6411 ; c) G. Dehaen, S. V. Eliseeva, P. Verwilt, S. Laurent, L. Vander Elst, R. N. Muller, W. De Borggraeve, K. Binnemans and T. N. Parac-Vogt, *Inorg. Chem.*, **2012**, *51*, 8775-8783.

¹⁴³ a) P. Caravan, N. J. Cloutier, M. T. Greenfield, S. A. McDermid, S. U. Dunham, J. W. M. Bulte, J. C. Amedio, R. J. Looby, R. M. Supkowski, W. D. Horrocks, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 3152-3162 ; b) Z. Zhang, M. T. Greenfield, M. Spiller, T. J. McMurry, R. B. Lauffer and P. Caravan, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 6766-6769 ; c) J. Zheng, J. Carr, K. Harris, M. B. Saker, F. M. Cavagna, F. Maggioni, G. Laub, D. Li and J. P. Finn, *J. Magn. Reson. Imaging*, **2001**, *14*, 425-432.

¹⁴⁴ M. Woods, Z. Kovacs, S. Zhang and A. D. Sherry, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, *42*, 5889-5892.

une structure complexante pouvant s'accommoder aisément de géométries ayant des NC qui diffèrent d'une unité conduira à une vitesse de transfert plus rapide (Figure 48).^{140d}

Il a été observé que le remplacement de bras acétates par des bras chélatants amides est dans ce type de mécanisme défavorable à un transfert rapide.^{145a} A l'inverse, une sphère de coordination encombrée conduira à un échange plus rapide ainsi que l'insertion d'un bras acide phosphinique^{145b} ou 2-méthylpyridine *N*-oxyde à la place d'un carboxylate.^{145c}

Un autre moyen d'accroître la relaxivité est l'utilisation de complexes hautement hydrophiles ce qui peut engendrer une contribution favorable de la sphère interne secondaire. En revanche cette stratégie demeure moins prédictible.¹⁴⁶

3.4. SONDES IRM INTELLIGENTES

A la différence des techniques d'imagerie PET ou SPECT, qui, bien que beaucoup plus sensibles, émettent un signal lié à la décroissance radioactive qui n'est pas modulable, il est possible, en IRM, de développer des AC qui ne perturberont la relaxivité des protons de l'eau qu'en présence d'un analyte ou sous l'action d'un phénomène biologique modifiant le plus souvent, soit q , soit τ_R . Pour ce faire, un motif de reconnaissance spécifique doit être incorporé au chélate.¹⁴⁷

Ainsi, de nombreuses sondes IRM au gadolinium, dites « intelligentes » (*smart* ou *responsive*) capables de détecter une modification du pH,¹⁴⁸ une réaction enzymatique,^{71,149} la présence d'une protéine¹⁵⁰ ou un cation métallique¹⁵¹ ont déjà été développées. De plus, une diminution de solubilité du chélate, suite à la coupure d'une chaîne hydrophile par une protéase exprimée chez certaines cellules cancéreuses, permet aussi d'augmenter le contraste de ces zones tumorales.¹⁵²

¹⁴⁵ a) D. H. Powell, O. M. N. Dhubghaill, D. Pubanz, L. Helm, Y. S. Lebedev, W. Schlaepfer and A. E. Merbach, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 9333 ; b) J. Rudovsky, J. Kotek, P. Hermann, I. Lukes, V. Mainero and S. Aime, *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, *3*, 112-117 ; c) M. Polasek, M. Sedinova, J. Kotek, L. Vander Elst, R. N. Müller, P. Hermann and I. Lukes, *Inorg. Chem.*, **2008**, *48*, 455-465.

¹⁴⁶ C. S. Bonnet and E. Toth, *C. R. Chimie*, **2010**, *13*, 700-714.

¹⁴⁷ J. L. Major and T. J. Meade, *Acc. Chem. Res.*, **2009**, *42*, 893-903.

¹⁴⁸ a) S. Zhang, K. Wu and A. D. Sherry, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, *38*, 3192-3194 ; b) S. Aime, S. Geninatti Crich, M. Botta, G. Giovenzana, G. Palmisano and M. Sisti, *Chem. Commun.*, **1999**, 1577-1578 ; c) M. P. Lowe, D. Parker, O. Reany, S. Aime, M. Botta, G. Castellano, E. Gianolio and R. Pagliarin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 7601-7609 ; d) G. B. Giovenzana, R. Negri, G. A. Rolla and L. Tei, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2012**, *2012*, 2035-2039.

¹⁴⁹ a) M. Giardiello, M. P. Lowe and M. Botta, *Chem. Commun.*, **2007**, 4044-4046 ; b) K. Hanaoka, K. Kikuchi, T. Terai, T. Komatsu and T. Nagano, *Chem. Eur. J.*, **2008**, *14*, 987-995.

¹⁵⁰ a) R. C. Strauch, D. J. Mastarone, P. A. Sukerkar, Y. Song, J. J. Ipsaro and T. J. Meade, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 16346-16349 ; b) A. Mishra, S. Gottschalk, J. Engelmann and D. Parker, *Chem. Sci.*, **2012**, *3*, 131-135.

¹⁵¹ E. L. Que and C. J. Chang, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, *39*, 51-60.

¹⁵² B. Jastrzebska, R. Lebel, H. Therriault, J. O. McIntyre, E. Escher, B. Guérin, B. Paquette, W. A. Neugebauer and M. Lepage, *J. Med. Chem.*, **2009**, *52*, 1576-1581.

3.5. TOXICITE

La faible sensibilité de cette technique oblige à injecter une grande quantité d'AC, de l'ordre du gramme. Le chélate doit par conséquent se montrer stable *in vivo* afin de ne pas relarguer d'une part le ligand, qui pourra alors se complexer avec de nombreux autres métaux jouant un rôle physiologique précis et important, et d'autre part le gadolinium qui peut se révéler nocif. En effet, la similarité de taille entre Ca^{2+} , 114 pm, et les lanthanides (Gd^{3+} : 111 pm),¹⁷ alors que ces derniers conduisent à des interactions électrostatiques fortes, fait de ces cations métalliques de puissants substitués au calcium. Ainsi, les sites calciques de protéines peuvent être jusqu'à 1 000 fois plus affins pour le Gd(III) que pour le Ca(II).^{136b} De surcroît, ce dernier possède un rôle physiologique crucial par son interaction sur une multitude de canaux ioniques. Cette interférence peut conduire à de nombreux dysfonctionnements qui seront d'autant plus graves que la quantité d'ions lanthanides libres dans l'organisme sera grande. Le gadolinium fait l'objet de nombreuses études toxicologiques¹⁵³ car c'est le seul lanthanide injecté dans l'organisme à des doses aussi élevées pour des applications médicales. Une pathologie liée à ce métal, la fibrose néphrogénique systémique, a été reconnue en 1997 et une relation de cause à effet a été suggérée en 2006.¹⁵⁴ En revanche, cette maladie hautement invalidante est rare et ne concerne que des patients souffrant déjà de troubles rénaux et pour lesquels un AC linéaire non-ionique (principalement avec l'Omniscan®, Figure 45), moins stable que ceux cycliques (cyclène), a été utilisé. En effet, chez un individu ne présentant aucune altération des fonctions rénales le temps de demi-vie des chélates avant excrétion n'est que de 1h30, dans le cas contraire cette durée peut dépasser 30h.

4 EN ANALYSE BIOLOGIQUE¹⁵⁵

Dans ce domaine, l'objectif est de quantifier un bioanalyte ou biopolymère spécifique contenu en faible quantité ($\leq 10^{-10}$ M)⁸⁷ et dilué dans une matrice biologique complexe à des fins de diagnostics cliniques. Le suivi d'interactions biomoléculaires utilisé en criblage haut-débit pour la découverte par exemple d'inhibiteurs d'enzymes à potentiel thérapeutique requiert aussi l'emploi de techniques sensibles, spécifiques, fiables, rapides, automatisables et facilement miniaturisables. Pour cela, bien que ces critères soient rarement tous réunis, l'utilisation de marqueurs luminescents de lanthanides se révèle être une méthode de choix.

¹⁵³ M. Port, J.-M. Idée, C. Medina, C. Robic, M. Sabatou and C. Corot, *BioMetals*, **2008**, *21*, 469-490.

¹⁵⁴ P. Marckmann, L. Skov, K. Rossen, A. Dupont, M. B. Damholt, J. G. Heaf and H. S. Thomsen, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **2006**, *17*, 2359-2362.

¹⁵⁵ A. Hagan and T. Zuchner, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2011**, *400*, 2847-2864.

V. DOSAGES IMMUNOLOGIQUES EN TEMPS RESOLU

Ces dosages, ainsi que l'étude d'interactions entre biomolécules reposent principalement sur l'emploi d'anticorps marqués avec des sondes lumineuses car ces vecteurs biologiques sont capables de reconnaître et de se lier spécifiquement avec l'antigène d'intérêt, même s'il est dilué dans une matrice biologique complexe. L'utilisation de sondes, typiquement celles aux lanthanides, émettant, après excitation, un signal lumineux de longue durée pouvant être détecté en temps résolu s'avère ici un atout majeur. La très forte fluorescence intrinsèque du milieu biologique étudié ne se superpose plus au signal mesuré. Ainsi, la limite de détection s'en trouve abaissée.

1 IMMUNO-MARQUAGE

Cette technique est fondée sur la reconnaissance d'un anticorps par un antigène. Ce dernier est pourvu d'un ou plusieurs domaine(s), appelé(s) épitope(s), reconnu(s) par l'anticorps. Quant aux anticorps, leur structure quaternaire repose sur quatre chaînes peptidiques (Figure 49) : deux légères et deux lourdes. Chaque chaîne légère est reliée à une chaîne lourde par un pont disulfure. La structure tertiaire de chaque chaîne résulte également de la formation de ponts disulfures au sein de chaque chaîne. De plus, chaque anticorps est divisé en deux régions, une constante et une variable. Une partie de cette dernière (paratope) est organisée de façon à reconnaître spécifiquement un épitope antigénique déterminé. Le lien entre ces deux entités s'effectue de manière non-covalente par liaisons de type hydrogène et Van-der-Waals ainsi que par des interactions électrostatiques et hydrophobes.¹⁵⁶

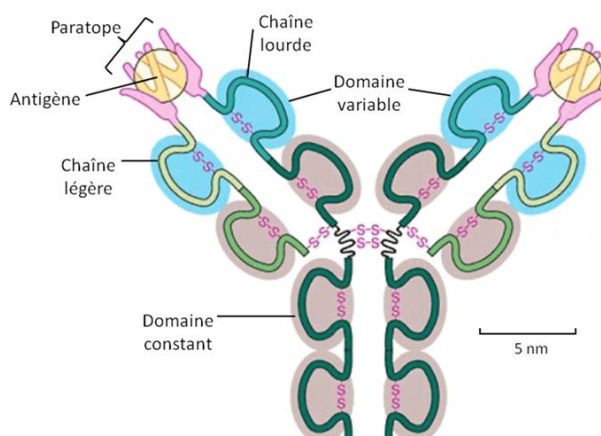


Figure 49 : Structure d'un anticorps.¹⁵⁷

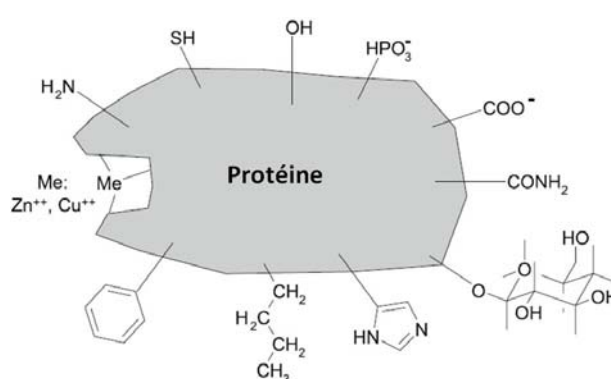


Figure 50 : Groupements chimiques présents sur une protéine et capables d'interagir avec une biomolécule.¹⁵⁶

Dans le cadre d'immuno-dosages (*immunoassays*), les anticorps monoclonaux (anticorps dont les lymphocytes les produisant ont été sélectionnés suivant diverses méthodes de

¹⁵⁶ M. Seydack, *Springer Series on Fluorescence*, U. Resch-Genger (ed.), Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, **2008**, vol. 6, pp 401-428.

¹⁵⁷ Schéma repris du manuscrit de thèse du Dr. L. Louise-Leriche, Université de Rouen, décembre 2007.

cultures cellulaires,¹⁵⁸ permettant d'obtenir des quantités importantes d'anticorps entièrement identiques, qui de fait, ne reconnaissent qu'un seul épitope d'un antigène donné, et productibles à souhait) sont préférés aux anticorps polyclonaux (mélange constitué de différents anticorps reconnaissant plusieurs épitopes du même antigène), car la gamme dynamique est plus étendue, et les résultats plus reproductibles. Cela provient du fait que dans une solution d'un anticorps monoclonal, la proportion d'anticorps qui se lie à l'antigène est nettement plus grande : 80% contre 1 à 3% dans le cas d'une préparation d'anticorps polyclonaux.⁷⁸

La structure quaternaire similaire de tous les anticorps monoclonaux (mise à part son paratope), et la disponibilité de nombreuses fonctions bioconjugables accessibles sur ces anticorps en font une biomolécule qu'il est facile de marquer avec différents traceurs, que ce soient des radionucléides, des fluorophores (dont des chélates et cryptates de lanthanides), voire des protéines ou des enzymes dont la présence et/ou l'activité est facilement détectable. C'est ce marquage, puis celui des analytes à détecter, qui est mis à profit dans le cadre des dosages immunologiques.

Différents formats de dosages immunologiques existent : dosages directs/indirects ; compétitifs/non-compétitifs ; hétérogènes/homogènes.

Le dosage direct ne fait intervenir qu'un seul type d'anticorps contre deux pour le dosage indirect (Figure 51-B et Figure 51-A).

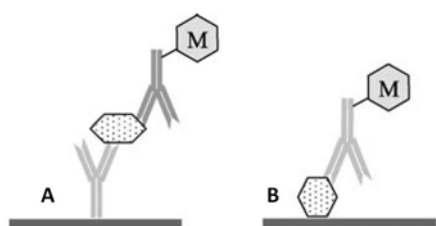


Figure 51 : Représentations d'un immuno-dosage indirect (A) et direct (B).¹⁵⁶

En outre, les immuno-dosages peuvent aussi être définis comme compétitifs ou non-compétitifs. Lors d'un dosage compétitif l'analyte de l'échantillon rentre en compétition avec une quantité déterminée du même analyte marqué pour la reconnaissance avec un anticorps immobilisé (Figure 52-A). Une deuxième option consiste à immobiliser une quantité fixée

d'antigène et l'anticorps marqué se liera avec les analytes immobilisés et ceux de l'échantillon, après lavage seuls les anticorps porteurs du traceur (luminescent dans le cas des lanthanides), accrochés aux antigènes fixes seront détectés (Figure 52-B).

Les immuno-dosages de type *sandwich* font intervenir au moins deux types d'anticorps dont un est marqué. L'analyte devra donc disposer d'au moins deux épitopes distincts.

Enfin, un dosage est dit homogène s'il ne nécessite aucune étape de lavage (plus rapide mais la limite de détection est généralement plus haute).

Les formats *sandwich* non-compétitifs sont ceux permettant une limite de détection la plus basse et sont donc préférés dans les dosages immunologiques en temps résolu.

¹⁵⁸ G. Kohler and C. Milstein, *Nature*, **1975**, 256, 495-497.

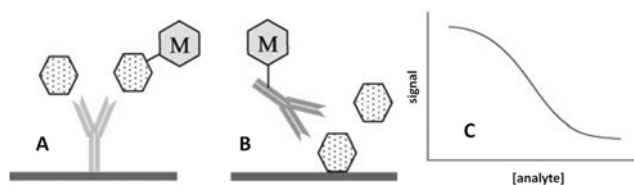


Figure 52 : Immunodosages compétitifs fondés soit sur la compétition entre l'analyte et un antigène marqué pour un anticorps immobilisé (A) ou entre l'antigène et l'analyte pour un anticorps marqué (B). Dans les deux cas la luminescence chute avec l'augmentation de la concentration en analyte (C).¹⁵⁶

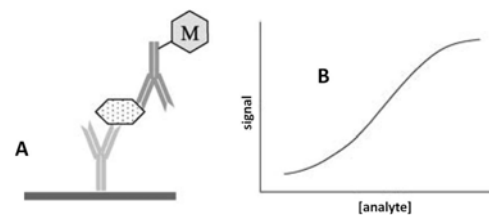


Figure 53 : Un immuno-dosage non-compétitif est typiquement de type *sandwich* (A). La luminescence augmente avec la concentration en analyte (B).¹⁵⁶

2 DOSAGES HETEROGENES

Deux technologies fondées sur les formats hétérogènes ont été développés avec les chélates de lanthanides dont la première, nommée DELFIA® (*Dissociation Enhanced Lanthanide FluoroImmunoAssay*) est toujours actuellement la plus répandue en diagnostic clinique.^{35,78}

2.1. LA TECHNOLOGIE DELFIA®

Ce système est commercialisé par la société PerkinElmer mais a été initialement développé par les équipes de I. Hemmilä et R. Ekins à la fin des années 1970.¹⁵⁹

Généralement le dosage est de type sandwich non-compétitif dans lequel un premier anticorps reconnaissant un épitope de l'antigène à quantifier est préalablement immobilisé sur le support (plaques multi-puits) dans lequel le dosage est effectué. Un deuxième anticorps spécifique de l'antigène à quantifier, marqué avec un chélate de lanthanide pas ou peu luminescent (ligands **79** ou **82** en général, Figure 54), est incubé avec ce dernier dans le puits. Une fois la réaction immunologique terminée, l'excès d'anticorps marqué est éliminé par lavage puis une solution acide (généralement tampon phtalate-HCl à pH 3.2) dite de révélation est ajoutée. Elle contient entre autres du détergent (Triton X-100), du TOPO et une antenne, le plus souvent de type β -cétonique fluorée en excès (la plus utilisée est le NTA (2-naphtoyltrifluoroacétone), ligand **83**, Figure 56) et permettra d'une part de libérer le lanthanide du complexe immunologique puis de former une micelle contenant un chélate ternaire (Figure 55, et structure **28**, Figure 27).

¹⁵⁹ a) I. Hemmilä and S. Dakubu, **1982**, EP 0064484 A2 ; b) R. P. Ekins, *Clin. Chem.*, **1998**, *44*, 2015-2030.

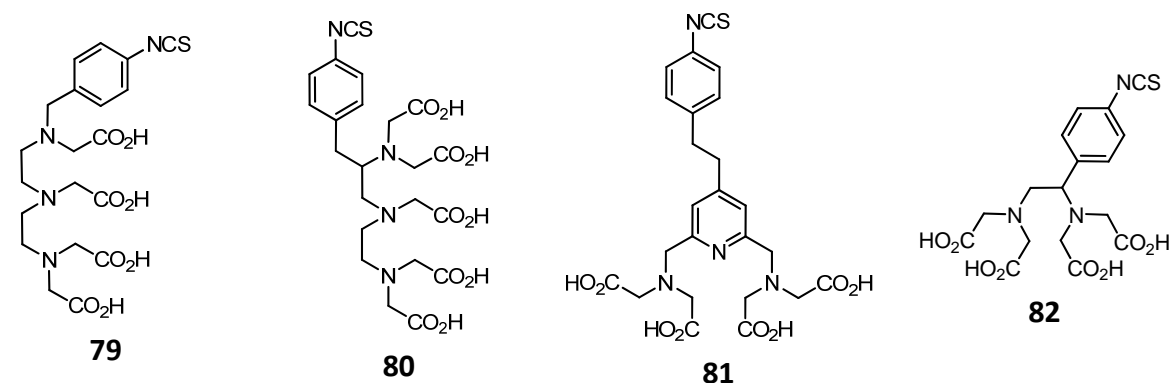


Figure 54 : Structures des ligands utilisés pour préparer la future micelle luminescente. La fonction isothiocyanate permet le marquage des anticorps en réagissant avec les amines libres accessibles à sa surface.¹⁶⁰

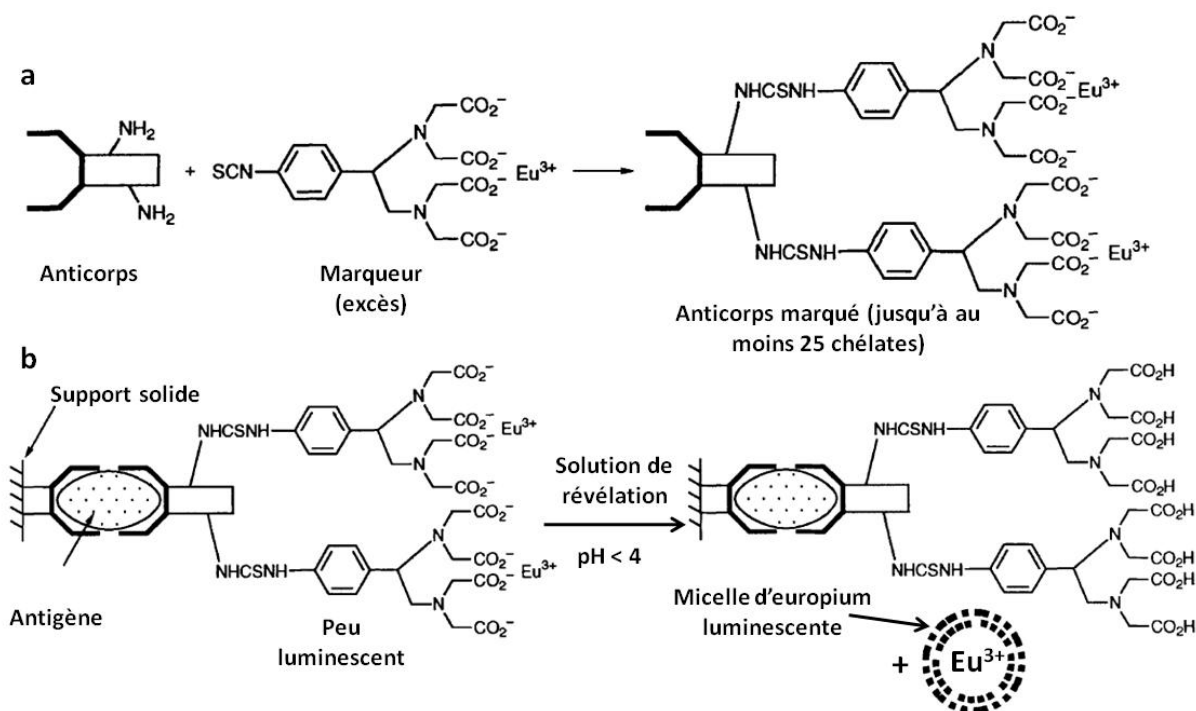


Figure 55 : En a, marquage d'un anticorps avec une étiquette lanthanidique pas ou peu luminescente, l'excès de marqueur est généralement éliminé par colonne d'exclusion stérique et le taux de marquage est déterminé par comparaison avec des standards ; en b, Décomplexation de l'immuno-complexe et formation de la micelle luminescente en milieu acide.⁸⁵

L'avantage de cette méthode est qu'elle conduit à un complexe extrêmement luminescent grâce à la formation d'une micelle protectrice (Figure 55) expulsant l'eau de la sphère de coordination du métal, et exaltant ainsi l'intensité d'émission. De plus, la structure micellaire ainsi que la fluoration de l'antenne, qui favorise la formation de l'énol, mènent à une entité stable en milieu acide.

Le lanthanide de choix est l'europium car il aboutit au seuil de détection le plus bas suivi par le terbium, le samarium et le dysprosium. Dans le cas de dosages faisant intervenir simultanément plusieurs analytes différents, un second ligand de type acide dipicolinique (ligand **86** : TMP-DPA) doit être rajouté pour sensibiliser le terbium et le dysprosium car

¹⁶⁰ a) I. Hemmilä, *J. Alloys Compd.*, **1995**, 225, 480-485 ; b) I. Hemmilä and S. Webb, *Drug Discov. Today*, **1997**, 2, 373-381.

l'énergie de son niveau triplet, à $23\,500\text{ cm}^{-1}$,^{44b} permet de peupler les niveaux 5D_4 du terbium et $^4F_{9/2}$ du dysprosium contrairement aux états triplets des β -dicétones aromatiques. Une étape supplémentaire qui consiste en l'ajout d'une seconde solution de révélation est alors nécessaire car ces deux types de cations ne peuvent pas être détectés précisément en présence des deux antennes. C'est pourquoi, même si le samarium est nettement moins sensible que le terbium, il lui est préféré à condition que la gamme de concentration du deuxième antigène à quantifier ne soit pas trop faible. Afin d'améliorer la limite de détection il est néanmoins possible d'utiliser un anticorps plus densément marqué en samarium sans altérer les propriétés de la glycoprotéine (au moins jusqu'à vingt chélates DTPA).¹⁶¹

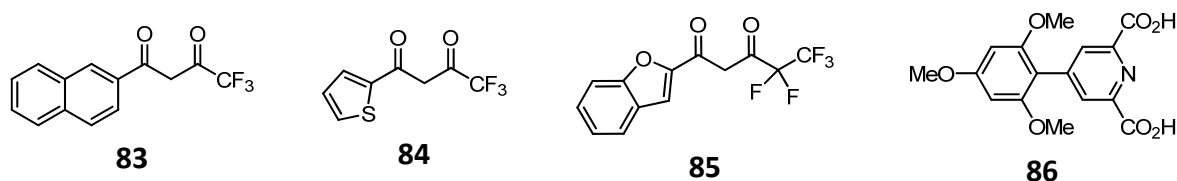


Figure 56 : Structure des différents ligands utilisés dans la technologie DELFIA®.

Chélate	λ_{exc} (nm)	ϵ ($M^{-1}\text{ cm}^{-1}$)	λ_{em} (nm)	τ (μs)	Φ (%)	Limite de détection (pM)
Eu-83	340	36 600	615	730	69	0.05
Sm-83	340	36 600	642	50	2	3.5
Tb-86	320	18 800	545	1 050	48	0.4
Dy-86	320	18 800	572	16	2	20

Tableau 8 : Propriétés photophysiques et limites de détection des chélates mis en œuvre dans la méthode DELFIA®.^{68,160a}

Afin d'obtenir une cinétique raisonnable de décomplexation de l'immuno-complexe dans le cas de dosages nécessitant l'emploi de marqueurs non-luminescents plus robustes en milieu acide, comme la molécule **80**, le pH de la solution de révélation doit rester inférieur à 3. A cette valeur le chélate Eu-NTA n'est pas suffisamment stable alors que la β -dicétone **85** disposant d'une chaîne fluorée plus électronégative peut rester majoritairement sous forme énol et ainsi former un chélate stable à ce niveau requis d'acidité.^{161,162}

2.2. LA TECHNOLOGIE FIAGEN

Cette méthode développée par le groupe de E. P. Diamandis dans les années 1980 et qui fut commercialisée par la société CyberFluor Inc. repose sur l'utilisation d'un anticorps marqué directement par le chélate luminescent Eu-BCPDA (acide 4,7-bis(chlorosulfonylphényl)-1,10-phénanthroline-2,9-dicarboxylique : ligand **87**). Le temps de vie de l'émission du chélate

¹⁶¹ K. Blomberg, V.-M. Mikkala, H. Hakala, P. Mäkinen, M. Suonpää and I. Hemmilä, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2011**, 399, 1677-1682.

¹⁶² I. Hemmilä, K. Blomberg, V.-M. Mikkala and H. Hakala, **2003**, WO 03/076939.

varie en tampon phosphate de 210 μs (stœchiométrie du complexe 1 : 1 en métal : BCPDA qui n'apparaît que si l'euporium est en excès) à 770 μs (stœchiométrie 1 : 2).¹⁶³ Bien que le ligand possède deux fonctions chlorosulfonyl très réactives le couplage sur une protéine modèle (BSA) n'a pas provoqué de « réaction croisée ».^{163a} La limite de détection est approximativement de 10^{-11} M (Figure 57-a).⁸⁷

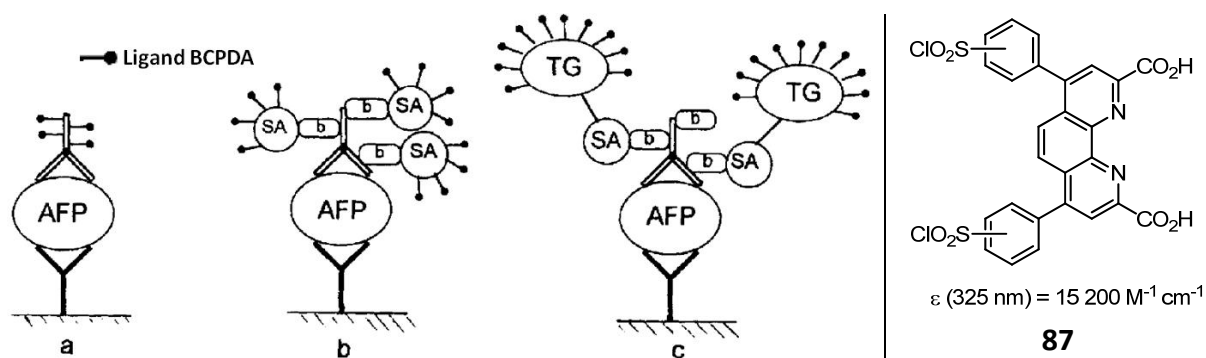


Figure 57 : A gauche, schéma de principe des différents dosages de la α -fetoprotéine (AFP) utilisant le ligand BCPDA (b : biotine ; SA : streptavidine ; TG : thyroglobuline) ;¹⁶⁴ à droite, le ligand BCPDA.^{163a}

Il a été montré dans le cas de la protéine AFP que la sensibilité du dosage par rapport au marquage direct de l'anticorps avec la sonde lumineuse **Eu-87** peut être augmentée d'un facteur cinq grâce à l'utilisation d'un anticorps biotinylé couplé à un conjugué SA-(Eu-BCPDA)₁₅ (10^{-10} - 10^{-11} M : Figure 57-b) ; l'entité SA-TG-(Eu-BCPDA)_{~150} permet à nouveau de diminuer le seuil de détection d'un facteur cinq (10^{-11} - 10^{-12} M : Figure 57-c). Dans les deux derniers cas les complexes SA et SA-TG marqués ne sont introduits qu'une fois l'immuno-réaction terminée et l'excès d'anticorps biotinylés éliminé par lavage.

Le système de reconnaissance biotine/(strept)avidine est très répandu car l'interaction spécifique non-covalente entre ces deux espèces est relativement forte (la constante de formation est 10^3 à 10^6 plus forte que celle entre un antigène et un anticorps).¹⁶⁵ La SA est une protéine très stable et son interaction avec la biotine n'est pas sensiblement affectée par le taux de greffage. Il en est de même pour l'anticorps biotinylé qui conserve son activité biologique. C'est pourquoi l'emploi du couple biotine/(strept)avidine est un moyen fiable d'amplification du signal lumineux qui peut encore être augmenté en introduisant sur la SA une deuxième protéine plus lourde, comme la thyroglobuline (contenant plus d'amines réactives que la SA : 150 contre 20),¹⁶⁶ car elle rend possible un marquage plus dense.

¹⁶³ a) R. A. Evangelista, A. Pollak, B. Allore, A. F. Templeton, R. C. Morton and E. P. Diamandis, *Clin. Biochem.*, **1988**, 21, 173-178 ; b) G. Marriott, M. Heidecker, E. P. Diamandis and Y. Yan-Mariott, *Biophys. J.*, **1994**, 67, 957-965.

¹⁶⁴ a) E. P. Diamandis, R. C. Morton, E. Reichstein and M. J. Khosravi, *Anal. Chem.*, **1989**, 61, 48-53 ; b) E. P. Diamandis, *Clin. Chim. Acta*, **1990**, 194, 19-50.

¹⁶⁵ E. P. Diamandis and T. K. Christopoulos, *Clin. Chem.*, **1991**, 37, 625-636.

¹⁶⁶ E. P. Diamandis and R. C. Morton, *J. Immunol. Methods*, **1988**, 112, 43-52.

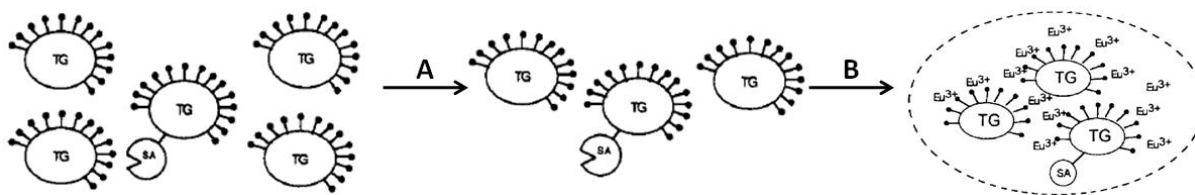


Figure 58 : Formation du complexe macromoléculaire SA-TG_{3.3}-BCPDA₄₈₀ (A : purification par chromatographie d'exclusion stérique ; B : incubation avec l'euporium).¹⁶⁷

Il a été observé que selon la proportion de TG-(BCPDA)_{~150} par rapport au conjugué SA-TG-(BCPDA)_{~150} un complexe macromoléculaire stable, de formule SA-TG_{3.3}-BCPDA₄₈₀, se formait suite à l'ajout d'euporium (Figure 58), améliorant ainsi la sensibilité d'un facteur 8 à 26 par rapport au conjugué non agrégé (limite de détection : 10^{-12} - 10^{-13} M).^{164b,167}

Le chélate Eu-BCPDA n'étant pas suffisamment stable ni luminescent en phase aqueuse, l'émission en temps résolu n'est mesurée qu'après évaporation de l'eau. En revanche, l'avantage sur la technologie DELFIA® est qu'elle est insensible aux contaminations potentielles en europium et que l'information spatiale n'est pas perdue (la localisation d'un analyte purifié sur un support solide est possible). En revanche cette méthode n'est optimisée que pour ce lanthanide.

2.3. AUTRES EXEMPLES DE DOSAGES HETEROGENES

Différents formats hétérogènes utilisant des chélates suffisamment stables et brillants sans avoir recours à la solution de révélation ont été décrits dont un exemple est présenté à la Figure 59.¹⁶⁸ Ce dosage impliquant l'emploi simultané d'un anticorps d'euporium (mAb-3-Eu-43) ne reconnaissant que la forme libre de la PSA (*Prostate Specific Antigen*) et d'un deuxième anticorps marqué au terbium (mAb-2-Tb-39) reconnaissant les deux formes, libre et complexé à l'ACT (*α1-antichymotrypsin*), rend possible la mesure en une étape du ratio $PSA_{\text{libre}}/PSA_{\text{total}}$ dont la valeur permet de diagnostiquer un cancer de la prostate.

Un deuxième exemple de dosage quantifiant deux marqueurs tumoraux, l'AFP et le CEA (*CarcinoEmbryonic Antigen*), à partir d'échantillons sérologiques est aussi schématisé à la Figure 59.⁶⁷ Il met en œuvre le chélate tétradenté β-dicétonate **Eu-73** greffé à l'anticorps anti-AFP et le chélate **Tb-38** couplé à la SA (26 complexes par protéine) qui reconnaîtra la biotine couplée à l'anticorps anti-CEA. Le dosage s'effectue en deux temps car l'émission du terbium recouvre partiellement la bande de l'euporium à 615 nm qui est celle dont l'intensité est mesurée : l'incubation de la SA marquée n'est réalisée qu'après la mesure de luminescence de l'euporium. Selon les auteurs, les seuils de détection, 44 et 76 ng.mL⁻¹ pour l'AFP et le CEA respectivement, sont suffisants pour appliquer ce dosage en diagnostique clinique.

¹⁶⁷ R. C. Morton and E. P. Diamandis, *Anal. Chem.*, **1990**, 62, 1841-1845.

¹⁶⁸ K. Mitrunen, K. Pettersson, T. Piironen, T. Björk, H. Lilja and T. Lövgren, *Clin. Chem.*, **1995**, 41, 1115-1120.

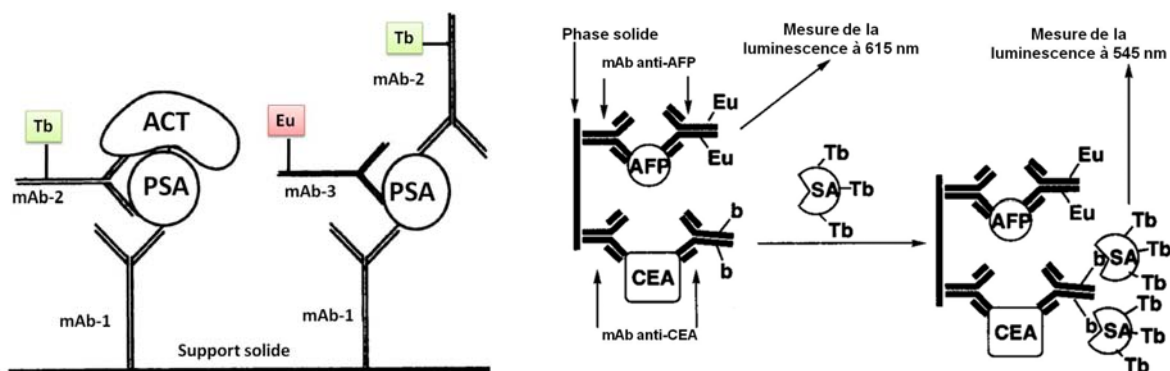


Figure 59 : A gauche, schéma du dosage immunologique hétérogène de la PSA libre et liée, et à droite, celui du CEA et de l'AFP.⁶⁷

3 DOSAGES HOMOGENES

Les dosages immunologiques homogènes sont *a priori* beaucoup plus simples à mettre en œuvre que les formats hétérogènes car, par définition, aucune étape de lavage ou de séchage ne sont nécessaires. De plus, aucun anticorps n'est immobilisé sur la phase solide : tous les composants du dosage sont ajoutés en une fois à la solution à étudier et les interactions entre réactifs et biomolécules sont déterminées en analysant directement la modulation du signal lumineux. Cette modulation provient d'un transfert d'énergie résonant entre un accepteur et un donneur qui repose sur le principe du FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*).¹⁶⁹

Ce système est en revanche plus contraignant pour la sonde lanthanidique qui doit être à la fois brillante et stable alors que dans la technologie DELFIA®, ces deux propriétés sont apportées après lavage par la solution de révélation. Ce format est néanmoins très avantageux car il permet une automatisation et une miniaturisation aisées (la quantité de réactifs requis, notamment celle des enzymes, est considérablement réduite par rapport à d'autres techniques ne reposant pas sur l'emploi des lanthanides).^{88a}

3.1. PRINCIPE DU FRET

Le mécanisme du FRET a été très brièvement introduit au paragraphe II-7-1 car il est en partie à l'origine du transfert d'énergie intrachélate entre l'antenne et le lanthanide.

Il s'agit d'un transfert d'énergie provenant d'une interaction dipolaire entre deux entités, séparées au plus de 100 Å, car la force du champ électrique dipolaire oscillant d'une espèce excitée diminue avec la distance.

Ainsi, si le fluorophore excité (donneur) est suffisamment proche d'un chromophore (accepteur qui est soit un fluorophore soit un *quencher*, *i.e.* un colorant non-fluorescent) capable d'absorber son excès d'énergie, alors l'intensité et la durée de vie d'émission du donneur sera diminuée. Evidemment, l'intensité du transfert dépend du rendement

¹⁶⁹ K. E. Sapsford, L. Berti and I. L. Medintz, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 4562-4589.

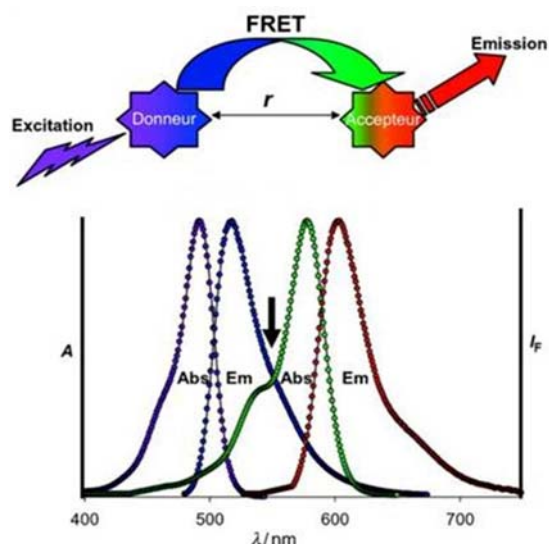


Figure 60 : Recouvrement du spectre d'émission du donneur avec le spectre d'absorption de l'accepteur.¹⁶⁹

quantique du donneur ainsi que de la capacité de l'accepteur à absorber l'énergie du donneur. Ce paramètre est relié à la façon dont coïncident les spectres d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur (Figure 60) : s'il n'y a aucun recouvrement spectral le transfert sera inefficace. Un quatrième facteur moins intuitif intervenant dans le mécanisme est l'orientation qu'adopte le donneur vis-à-vis de l'accepteur : ce terme est le moins évident à déterminer. En revanche, si l'échelle de temps du transfert est longue (typiquement dans le cas où le donneur est un chélate d'euprotium ou de terbium) la valeur estimée est fiable.¹⁷⁰ Le processus de FRET peut donc être visualisé de

deux manières, soit en mesurant la variation du temps d'émission du donneur soit en déterminant l'intensité relative du spectre d'émission du donneur avant et après le processus de FRET.

Les accepteurs couplés aux complexes de lanthanides (*cf.* § V-3-3) sont des fluorophores organiques ou des protéines fluorescentes comme l'allophycocyanine (APC) et son dérivé plus stable issu d'une modification chimique (XL665).¹⁷¹ Les accepteurs non-fluorescents inhibant efficacement la luminescence de l'euprotium sont le dabcyll ou le QSY® 7 qui appartiennent respectivement à la famille des colorants diazoïques et xanthènes (> 99% d'inhibition).¹⁷²

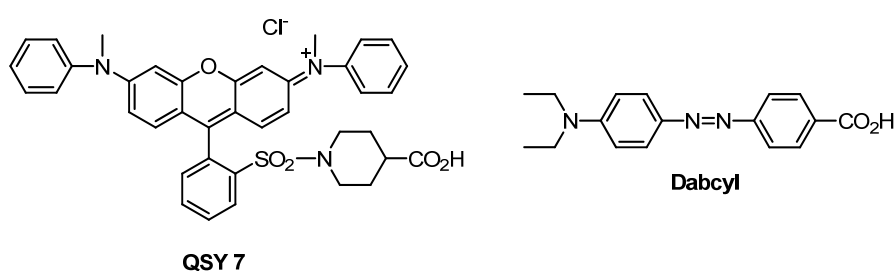


Figure 61 : Structure des *quencher* de luminescence du cation Eu(III).

Cette technique de FRET fut initialement développée pour déterminer des distances entre molécules (le plus souvent des protéines) mais est surtout appliquée à l'étude des

¹⁷⁰ P. R. Selvin, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **2002**, 31, 275-302.

¹⁷¹ H. Bazin, E. Trinquet and G. Mathis, *Rev. Mol. Biotechnol.*, **2002**, 82, 233-250.

¹⁷² J. Karvinen, V. Laitala, M.-L. Mäkinen, O. Mulari, J. Tamminen, J. Hermonen, P. Hurskainen and I. Hemmilä, *Anal. Chem.*, **2004**, 76, 1429-1436.

événements biologiques (interaction protéine-protéine, détection d'activités enzymatiques) *in cellulo*.^{72a,173}

Depuis les années 1990,^{174,105a} les chélates d'euprium et de terbium sont utilisés comme donneurs et le transfert d'énergie avec l'accepteur peut donc être observé en temps résolu : *Time-Resolved FRET* (TR-FRET) ou TR-FQA (*Time-Resolved Fluorescence Quenching Assay*) si l'accepteur est non-fluorescent (généralement appliquée au suivi de réaction de dissociation comme l'hydrolyse enzymatique de peptides^{172,175} et à l'hybridation d'acide nucléiques).¹⁰⁹

3.2. PRINCIPE DU nFRET

Le mécanisme de nFRET (*Non-overlapping FRET*) a été décrit pour la première fois en 2005 avec des chélates d'euprium et de samarium.¹⁷⁶ L'application de ce processus avec des sondes de lanthanides dans la détection d'interactions entre biomolécules reste encore plutôt confidentielle.

Sa particularité provient du fait que le spectre d'émission du lanthanide n'a nul besoin d'être en partie superposé au spectre d'absorption de l'accepteur. En effet, le transfert d'énergie ne s'effectue pas par les niveaux d'émission mais par ceux collectant l'énergie de l'antenne (qui sont peu ou pas luminescent) de l'euprium (5D_1 et 5D_2 , les états supérieurs ne peuvent pas être sensibilisés par les antennes utilisées) et du samarium ($^4G_{7/2}$, il semblerait probable que l'état $^4F_{3/2}$ ne transfère pas vers les Alexa Fluor® 546 et 555 car la décroissance est toujours mono-exponentielle). En revanche ce transfert n'est observé que si le niveau 1S du fluorophore accepteur est localisé au-dessus du niveau d'émission du métal sinon le transfert classique est favorisé. L'étude montre aussi que la durée de vie de l'état 5D_1 est plus longue que celle du 5D_2 : ainsi l'Alexa Fluor® 488, qui est exclusivement sensibilisé par l'état 5D_2 , présente une fluorescence dont la durée de vie est de 0.63 μs alors que l'Alexa Fluor® 555 conduit à une décroissance de fluorescence bi-exponentielle dont les valeurs sont 0.69 (*via* le 5D_2) et 54.0 μs (*via* le 5D_1)).

En conséquence, la sensibilité de détection est améliorée car le fluorophore, suite au nFRET, émet dans une gamme de longueurs d'onde plus courtes que celle de l'émission du cation métallique. Dans le cas du samarium, qui pourtant possède un rendement quantique environ 90 fois moindre que celui de l'euprium, cette méthode conduit à des seuils de détection similaires à ceux obtenus avec l'euprium.^{176b}

¹⁷³ a) E. A. Jares-Erijman and T. M. Jovin, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2006**, *10*, 409-416 ; b) A. Ibraheem and R. E. Campbell, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2010**, *14*, 30-36.

¹⁷⁴ a) G. Mathis, *Clin. Chem.*, **1993**, *39*, 1953-1959 ; b) G. Mathis, *Clin. Chem.*, **1995**, *41*, 1391-1397.

¹⁷⁵ a) J. Karvinen, A. Elomaa, M.-L. Mäkinen, H. Hakala, V.-M. Mikkala, J. Peuralahti, P. Hurskainen, J. Hovinen and I. Hemmilä, *Anal. Biochem.*, **2004**, *325*, 317-325 ; b) A.-K. Marguerre and R. Krämer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, *19*, 5757-5759.

¹⁷⁶ a) V. Laitala and I. Hemmilä, *Anal. Chem.*, **2005**, *77*, 1483-1487 ; b) V. Laitala and I. Hemmilä, *Anal. Chim. Acta*, **2005**, *551*, 73-78 ; c) J. Vuojola, U. Lamminmäki and T. Soukka, *Anal. Chem.*, **2009**, *81*, 5033-5038.

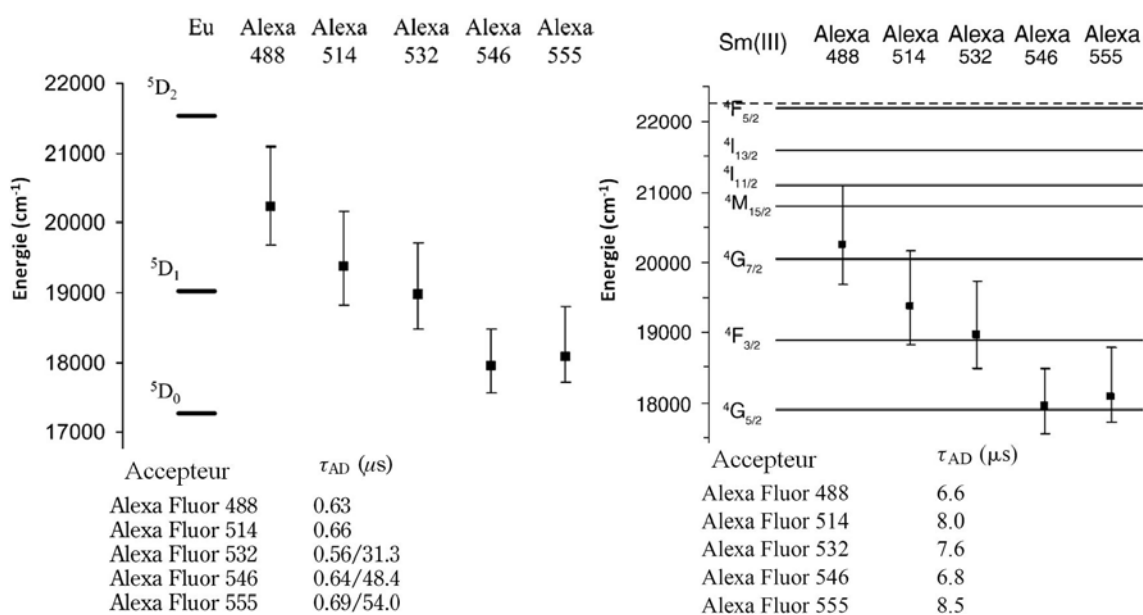


Figure 62 : Niveaux énergétiques des lanthanides et des Alexa Fluor® (largeur du pic d'absorption à mi-hauteur) et durée d'émission de fluorescence suite au transfert nFRET (la ligne pointillée vers 22 250 cm⁻¹ correspond à l'énergie du niveau triplet de la terpyridine utilisée comme antenne avec le chélate de Sm³⁺).^{176a-b}

3.3. COUPLES DONNEUR/ACCEPTEUR APPLIQUES AU TR-FRET

La zone de recouvrement spectral privilégiée dans le cas de l'euprimum se situe vers 615 nm, longueur d'onde correspondant à la transition hypersensible $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ (l'idéal serait de pouvoir utiliser un chélate qui de par sa géométrie concentre l'émission sur cette bande). Une autre transition localisée vers 680-705 nm ($^5D_0 \rightarrow ^7F_4$) peut être mise à profit pour une détection dans le proche IR. Quant au choix du chromophore accepteur couplé au terbium il est guidé par les transitions $^5D_4 \rightarrow ^7F_6$ et $^5D_4 \rightarrow ^7F_4$ (480-500 et 580-595 nm respectivement) du métal.

Néanmoins, la sélection des accepteurs ne dépend pas de la seule superposition spectrale qu'ils entretiennent avec le chélate donneur car il est aussi préférable que leur spectre d'émission ne couvre pas une surface trop importante de celui du complexe lanthanidique. Deux zones sont généralement retenues avec l'euprimum : soit 665 nm, soit 730 nm. Pour le terbium, des fluorophores émettant à 520, 570 ou au-delà de 650 nm sont choisis. L'utilisation de filtres permet de ne sélectionner qu'un étroit segment de la large bande d'émission du chromophore organique (évidemment, plus la sélection est fine et moins le signal sera intense). De plus, afin d'amplifier au maximum le signal du donneur, la brillance du chromophore accepteur doit être la plus élevée possible. Enfin, le couple donneur-accepteur retenu, doit, dans les conditions du dosage préserver ses propriétés photophysiques.⁴⁷

Pour le terbium, les accepteurs fluorescents généralement sélectionnés sont, la fluorescéine ($\lambda_{max} = 490$ nm, $\lambda_{em} = 514$ nm), la tétraméthylrhodamine ($\lambda_{max} = 540$ nm, $\lambda_{em} = 565$ nm) ou l'indocyanine Cy-3.0 ($\lambda_{max} = 554$ nm, $\lambda_{em} = 568$ nm). Pour l'euprimum il s'agit de la cyanine Cy-5.0 ($\lambda_{max} = 652$ nm, $\lambda_{em} = 672$ nm), des Alexa Fluor® 647 ($\lambda_{max} = 650$ nm, $\lambda_{em} = 665$ nm) et

680 ($\lambda_{\max} = 679 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 702 \text{ nm}$). En outre, un accepteur très utilisé avec l'euporium est la protéine APC qui présente un coefficient d'absorption molaire de $700\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à 652 nm et un rendement quantique de 68% et dont le pic d'émission se situe vers 660 nm .^{170,171} En revanche son encombrement stérique ($M = 105 \text{ kDa}$) peut parfois s'avérer problématique. D'autres fluorophores désignés sous l'appellation d2 (commercialisé par la société Cisbio Bioassays)¹⁷⁷ et *ULight*TM (commercialisé par la société PerkinElmer)¹⁷⁸ dont les structures ne sont pas dévoilées mais qui doivent sans doute se rapprocher de celle de la cyanine Cy-5.0 sont aussi appliqués à ce type de dosage avec les chélates d'euporium.

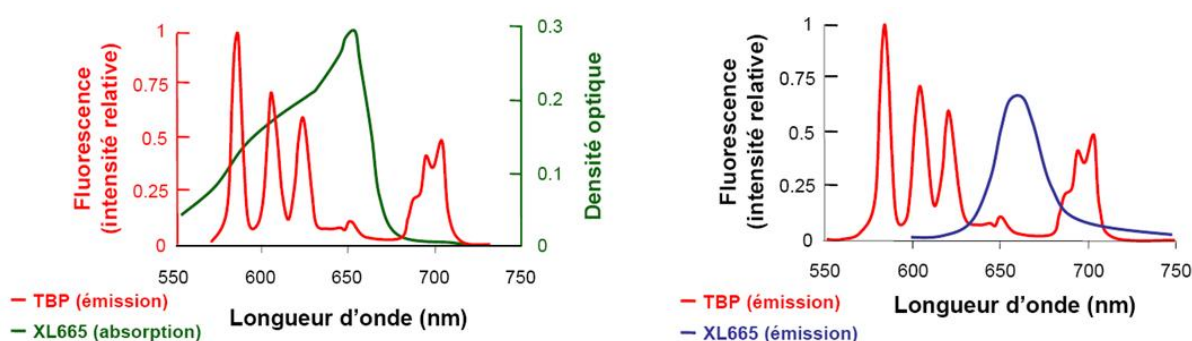


Figure 63 : Recouvrement spectral entre XL665 et TBP (TBP : chélate 75, Figure 41).¹⁷⁹

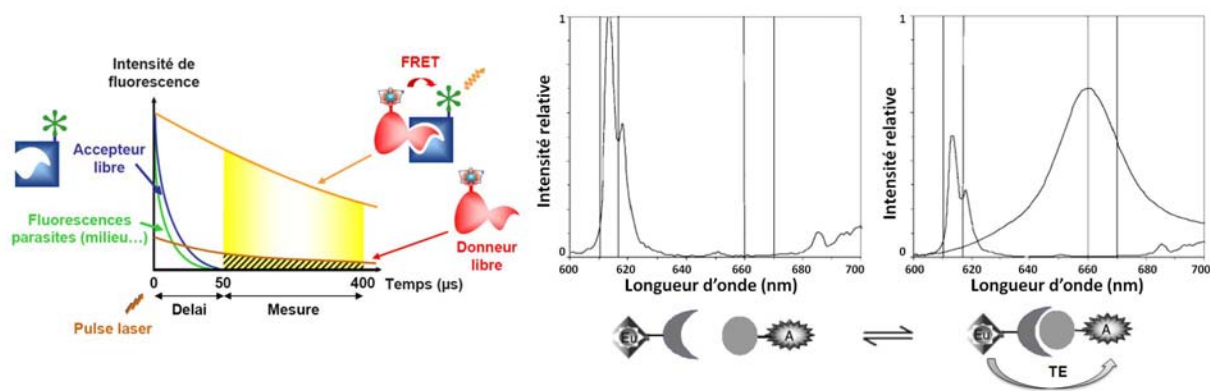


Figure 64 : Représentation de la résolution temporelle et spectrale en TR-FRET (A : APC ; TE : Transfert d'Énergie).^{35,179}

Encore une fois, le principal avantage de l'application d'un chélate de lanthanide est qu'il transfère son énergie au fluorophore organique sur une échelle de temps proche de la ms (la durée moyenne de fluorescence issue du FRET est de l'ordre de $250 \mu\text{s}$ pour le couple **Eu-75/APC**).^{174a} Ainsi le signal fluorescent émis par l'accepteur sera aussi du même ordre de grandeur et une détection 10 à $100 \mu\text{s}$ ^{174a} après l'excitation du donneur est possible. Cette technique permet donc de combiner une amplification du signal, liée à la forte brillance des fluorophores organiques ou des protéines fluorescentes, avec la longue durée d'émission des chélates lanthanidiques (Figure 64). L'amplification ne se produit que si le transfert d'énergie du lanthanide à l'accepteur est aussi plus efficace que sa désactivation radiative.

¹⁷⁷ <http://www.htrf.com/htrf-technology/htrf-chemistry>.

¹⁷⁸ <http://perkinelmerreagents.onconfluence.com/display/ts/LANCE+and+LANCE+Ultra+TR-FRET+assays>.

¹⁷⁹ Schémas repris du manuscrit de thèse du Dr. D. Maurel, Université Montpellier 1, 2006.

3.4. DETECTION A DOUBLE LONGUEUR D'ONDE

L'avantage du format homogène est qu'aucune étape de lavage n'est nécessaire. Or les échantillons étudiés possèdent des absorbances d'une très grande variabilité à la longueur d'onde d'excitation sélectionnée des chélates (entre 320 et 340 nm). De ce fait, l'intensité du signal mesuré à une longueur d'onde ne dépend donc pas exclusivement de la concentration en analyte d'intérêt mais aussi de l'absorbance résiduelle de l'échantillon. Une mesure ratiométrique (rapport entre l'intensité à une longueur d'onde d'émission de l'accepteur et l'intensité à une longueur d'onde d'émission du donneur) permet de s'affranchir de ces fluctuations et de conserver une reproductibilité et une fiabilité des résultats pour des dosages en format homogène (Figure 65).

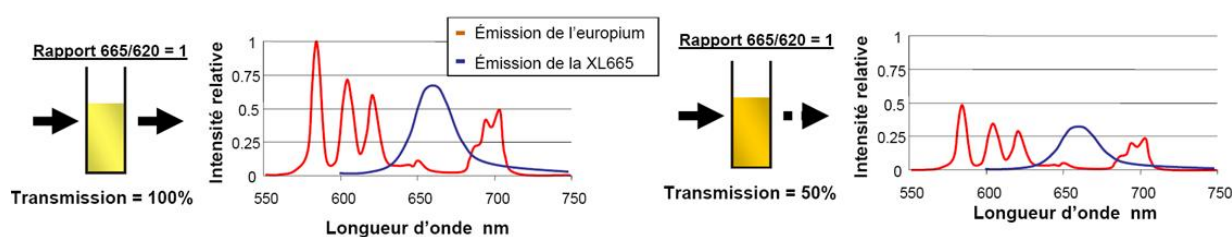


Figure 65 : Effet de filtre interne et mesure ratiométrique.¹⁷⁹

3.5. TECHNOLOGIES APPLIQUEES AUX DOSAGES HOMOGENES

Différentes technologies utilisant différents chélates sont disponibles commercialement :

- la technologie HTRF[®] (*Homogeneous Time-Resolved Fluorescence*) commercialisée par la société Cisbio Bioassays repose sur l'utilisation de couples de fluorophores, les cryptates **Eu-75/76/77** et **Tb-78** (Lumi4[®]-Tb) d'un côté, et un accepteur de FRET adapté. Grâce à la très grande stabilité cinétique de ces sondes (Figure 40), cette technique s'avère actuellement la plus robuste. C'est pourquoi elle est très répandue dans des expériences de criblage haut-débit mimant au mieux les conditions *in vivo*, ce qui permet une évaluation d'autant plus précise de l'efficacité des molécules testées sur la cible biologique étudiée (généralement une enzyme) ;¹⁸⁰
- la seconde technologie, LANCE[®] (*LANthanide Chelate Emission*), commercialisée par la société PerkinElmer utilise comme donneurs deux chélates d'europlum, le composé hepta-coordiné **Eu-43** (nom commercial W1024) et le chélate nona-coordiné, plus stable, **Eu-34** (nom commercial W8044) ; les accepteurs sont soit la protéine APC ou le fluorophore *ULight*[™] ;¹⁸¹
- le système LanthaScreen[®], commercialisé par Life Technologies se fonde sur les chélates d'europlum et de terbium linéaires sensibilisés par le cs124 (ligand **47**) ;

¹⁸⁰ H.Bazin, *Actual. Chim.*, **2009**, 330, 20-27.

¹⁸¹ http://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-73070APP_LANCEEuChelatesStability.pdf.

- enfin, le chélate **Eu-35** (Amersham Eu(TMT) isothiocyanate), vendu par la société General Electric Healthcare est aussi compatible avec les dosages homogènes.

Le chélate **Tb-78** (Lumi4[®]-Tb) récemment appliquée en HTRF[®] apparaît, en termes de brillance à des longueurs d'onde d'absorption supérieures à 320 nm et de stabilité (comparable aux cryptates d'europium), nettement plus avantageux que tous les autres complexes (Figure 66).¹⁸²

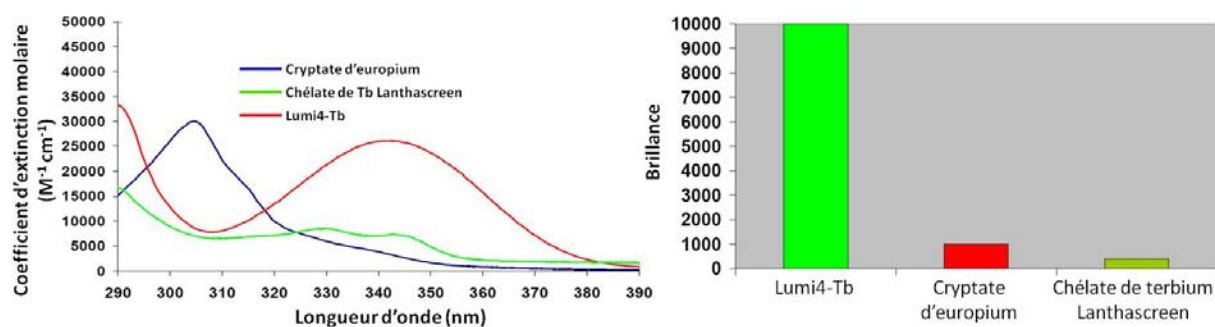


Figure 66 : Spectres d'absorption et brillance des complexes utilisés en TR-FRET.¹⁸²

3.6. DOSAGES HOMOGENES : APPLICATIONS

L'émergence dans les années 1990 des sondes luminescentes lanthanidiques permettant la mise au point d'immuno-dosages homogènes qui soient sensibles et robustes a mené à l'application de cette technique dans un nombre toujours croissant de dosages ou d'études visant à détecter des interactions entre biomolécules (oligomérisation de récepteurs membranaires, interactions récepteur-ligand, expression de protéines ou modification post-traductionnelles par exemple (ce dernier processus concerne la modification chimique d'une biomolécule après sa synthèse, réalisée le plus souvent par une enzyme qui entraîne de ce fait un changement de sa fonction)).^{133a,183}

Dans le domaine pharmaceutique, cet outil de détection est primordial car il rend possible l'analyse à haut débit des effets d'une molécule sur ces processus biologiques. Par exemple, l'activation des récepteurs couplés aux protéines G (récepteurs membranaires) qui après activation induisent une cascade de réactions biochimiques impliquant des messagers secondaires permet *in fine* de réguler le fonctionnement cellulaire. Le dosage d'un de ses messagers, l'adénosine monophosphate cyclique (cAMP), est un moyen servant à contrôler l'activité de ces protéines. Les kinases constituent une autre cible très étudiée par cette méthode car ces enzymes contrôlent de nombreux processus physiologiques et leur bon fonctionnement est altéré dans un grand nombre de maladies.

¹⁸² E. Trinquet, *Introduction to Lumi4TM-Tb. A new TR-FRET terbium cryptate*, 2008, SBS, S^t-Louis.

¹⁸³ J. Yuan and G. Wang, *Trends Anal. Chem.*, 2006, 25, 490-500.

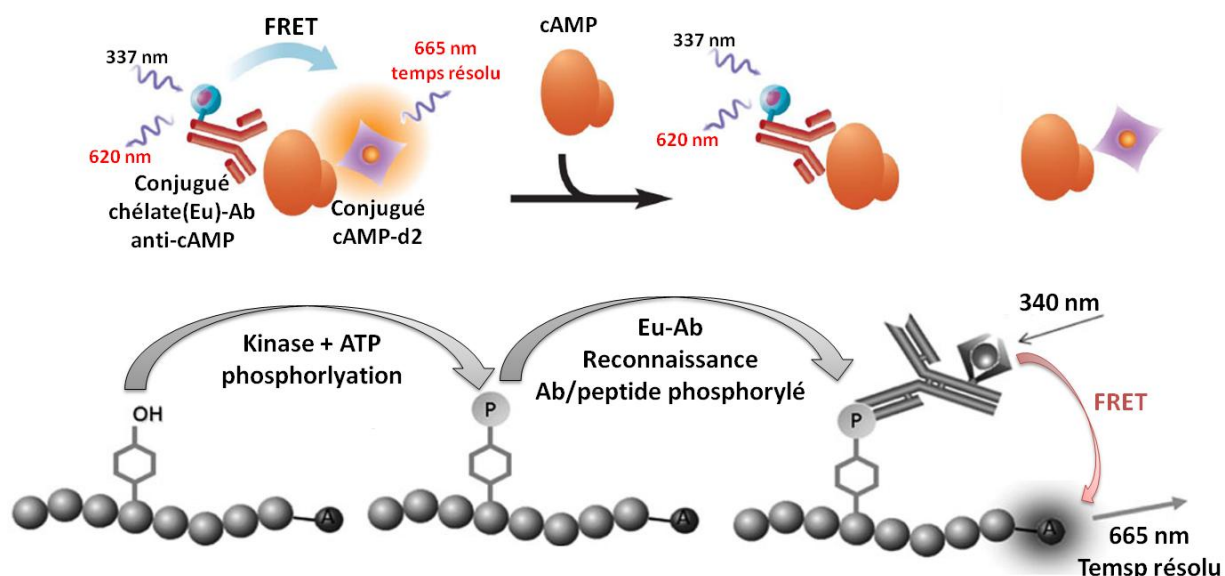


Figure 67 : Schémas d'un dosage immunologique du cAMP (compétitif) et visualisation de l'activité d'une kinase en TR-FRET.^{47,133a}

Cette technique est aussi employée dans les dosages par hybridation des acides nucléiques permettant de détecter une complémentarité entre une ou deux séquences oligonucléotidiques marquées et leur cible (séquence complémentaire), si cette dernière est présente. S'il y a reconnaissance entre les deux ou trois motifs alors une modulation ou l'apparition d'un signal issu du FRET est mesuré. Il s'agit d'un outil servant entre autre à diagnostiquer une maladie génétique ou à détecter la présence d'organismes pathogènes.

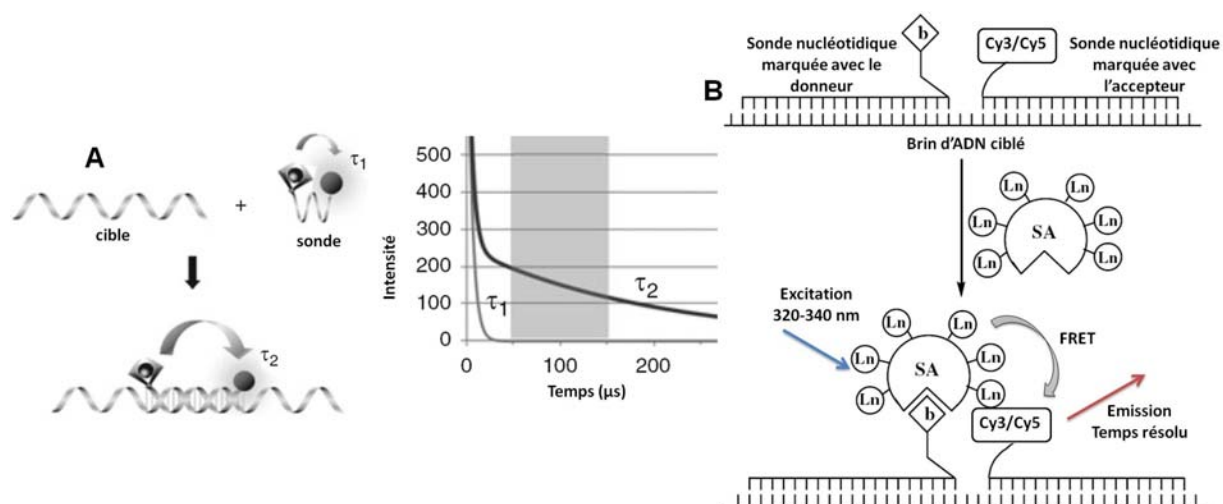


Figure 68 : Détection en TR-FRET d'hybridation d'ADN. A : le FRET est très intense avant l'hybridation conduisant à une décroissance plus rapide du signal de l'accepteur issu du transfert.¹⁸⁴ B : hybridation avec deux sondes oligonucléotidiques, l'une marquée avec le chélate de lanthanide (Eu ou Tb) via le système d'amplification SA-b et l'autre avec l'accepteur (Cy-3.0 si Tb ou Cy-5.0 si Eu).¹⁸⁵

¹⁸⁴ V. Laitala, A. Ylikoski, H.-M. Raussi, P. Ollikka and I. Hemmilä, *Anal. Biochem.*, **2007**, *361*, 127-131.

¹⁸⁵ a) S. Sueda, J. Yuan and K. Matsumoto, *Bioconjugate Chem.*, **2000**, *11*, 827-831 ; b) S. Sueda, J. Yuan and K. Matsumoto, *Bioconjugate Chem.*, **2002**, *13*, 200-205.

4 VERS DU DIAGNOSTIQUE ET DE L'IMAGERIE *IN VIVO* ?

Le choix initial des lanthanides s'est évidemment tourné sur ceux menant à la plus forte brillance ainsi qu'à une décroissance de luminescence la plus longue possible en phase aqueuse. C'est pourquoi les complexes d'euporium et de terbium, grâce à leur sensibilité sans commune mesure sont très répandus dans des expériences *in vitro* et *in cellulo*.

Malheureusement, leurs longueurs d'onde d'excitation et d'émission (au moins pour le terbium) ne sont pas compatibles pour des applications bioanalytiques dans un contexte *in vivo* (Figure 29). Un nouvel axe de recherche s'est donc tourné vers le développement de complexes de lanthanides émettant dans le proche IR (Yb^{3+} , Nd^{3+} , Er^{3+} ; cf. Figure 20). Cet essor intervient suite aux progrès importants effectués dans la conception de détecteurs sensibles dans cette gamme spectrale. En revanche, les rendements quantiques en milieu aqueux demeurent nettement plus faibles.¹⁸⁶

Une alternative réside dans la mise au point d'antennes capables d'absorber simultanément deux ou plusieurs photons.^{34,187} Tout en conservant les propriétés spectroscopiques avantageuses des lanthanides, la longueur d'onde d'excitation est alors multipliée par deux dans le cas d'une absorption biphotonique. Néanmoins, le défi majeur de cette voie de sensibilisation reste l'amélioration en milieu biologique de la brillance des chélates.¹⁸⁸

Il s'avère expérimentalement que les structures hautement polarisables possédant une symétrie moléculaire adéquate sont favorables à une absorption multiphotonique dont la probabilité d'occurrence, σ , (section efficace d'absorption) est exprimée en GM (« Göppert-Mayer » ; l'analogie de la section efficace d'absorption en optique linéaire n'est autre que le coefficient d'absorption molaire ϵ mais les unités diffèrent car le degré d'atténuation de la lumière incidente dépend désormais d'une absorption quasi-simultanée de deux photons, et de ce fait cette atténuation est proportionnelle au carré de l'intensité lumineuse du faisceau incident).¹⁸⁹

Le complexe **Eu-20** et son analogue diméthylé **Eu-88** possèdent de très bonnes propriétés d'absorption biphotonique mais seulement en milieu organique apolaire (toluène en particulier).^{190a-b} Un deuxième analogue **Eu-89**, préalablement solubilisé dans du DMSO, a néanmoins pu être appliqué à de l'imagerie cellulaire.^{190c}

¹⁸⁶ M. H. V. Werts, *Springer Series on Fluorescence*, P. Hänninen and H. Härnä (eds.), Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, **2011**, vol. 7, pp. 133-160.

¹⁸⁷ G. Piszczek, B. P. Maliwal, I. Gryczynski, J. Dattelbaum and J. R. Lakowicz, *J. Fluoresc.*, **2001**, *11*, 101-107.

¹⁸⁸ C. Andraud and O. Maury, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2009**, *2009*, 4357-4371.

¹⁸⁹ a) G. S. He, L.-S. Tan, Q. Zheng and P. N. Prasad, *Chem. Rev.*, **2008**, *108*, 1245-1330 ; b) M. Pawlicki, H. A. Collins, R. G. Denning and H. L. Anderson, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 3244-3266.

¹⁹⁰ a) L.-M. Fu, X.-F. Wen, X.-C. Ai, Y. Sun, Y.-S. Wu, J.-P. Zhang and Y. Wang, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 747-750 ; b) R. Hao, M. Li, Y. Wang, J. Zhang, Y. Ma, L. Fu, X. Wen, Y. Wu, X. Ai, S. Zhang, *et al.*, *Adv. Funct. Mater.*, **2007**, *17*, 3663-3669 ; c) W.-S. Lo, W.-M. Kwok, G.-L. Law, C.-T. Yeung, C. T.-L. Chan, H.-L. Yeung, H.-K. Kong, C.-H. Chen, M. B. Murphy, K.-L. Wong, *et al.*, *Inorg. Chem.*, **2011**, *50*, 5309-5311.

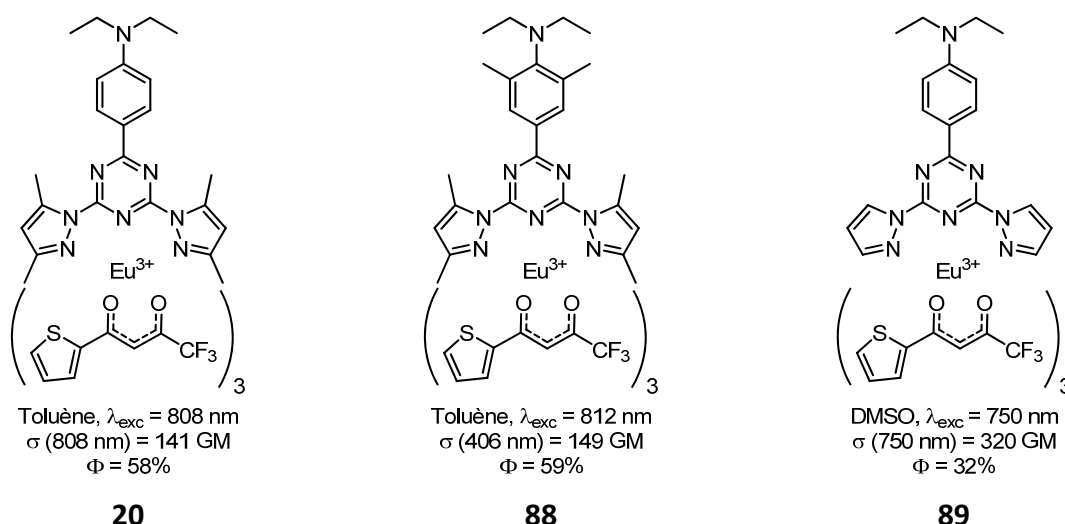


Figure 69 : Complexes ternaires d'euprium(III) présentant des brillances en absorption biphotonique intéressantes seulement en milieu organique.¹⁹⁰

Une autre classe de complexes, solubles en phase aqueuse, et fondés sur des cyclènes substitués par des antennes aza(thio)xanthones ont permis de sensibiliser en absorption biphotonique le terbium et l'euprium. Malheureusement la section efficace d'absorption reste très faible : un maximum de 2 GM est obtenu avec l'euprium.¹⁹¹ En revanche, ces premiers travaux ont prouvés qu'il est possible de sensibiliser les lanthanides par ce mode d'absorption en phase aqueuse.

Désormais, les chélates solubles en phase aqueuse les plus étudiés complexent l'euprium et sont constitués d'une antenne incorporant l'acide dipicolinique substitué en position *para* par divers motifs phénylacétylène qui permettent un transfert de charge à l'état excité.^{30,192}

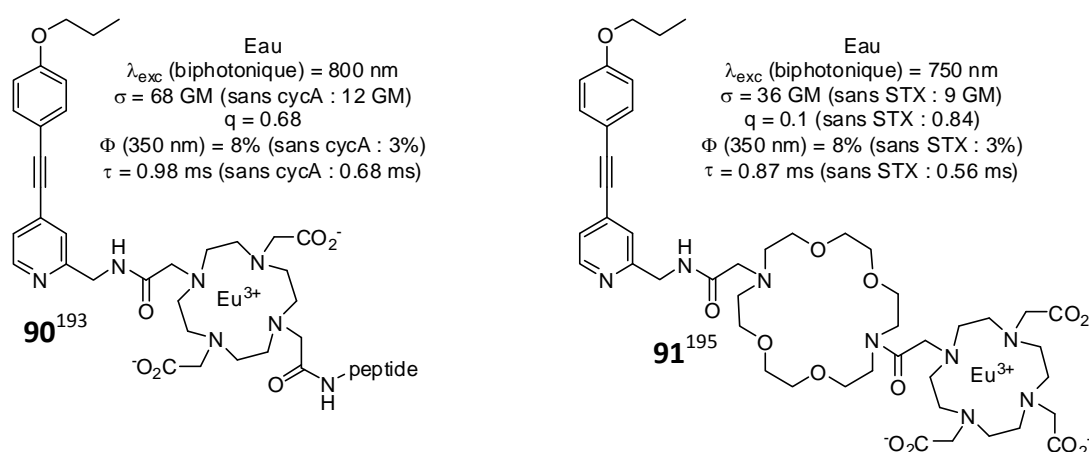


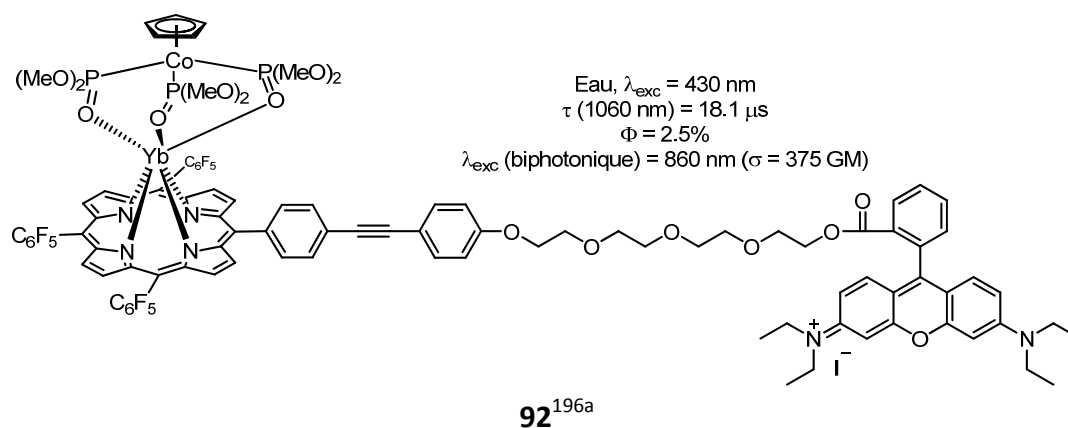
Figure 70 : Complexes d'euprium(III) possédant une forte brillance en absorption biphotonique en phase aqueuse (cycA : cycline A ; STX : saxitoxine).

¹⁹¹ a) L.-O. Palsson, R. Pal, B. S. Murray, D. Parker and A. Beeby, *Dalton Trans.*, **2007**, 5726-5734 ; b) F. Kielar, A. Congreve, G.-I. Law, E. J. New, D. Parker, K.-L. Wong, P. Castreno and J. de Mendoza, *Chem. Commun.*, **2008**, 2435-2437.

¹⁹² Y. Ma and Y. Wang, *Coord. Chem. Rev.*, **2010**, 254, 972-990.

Il y a peu, deux chélates d'euprimum sensibilisés en absorption biphotonique, ont permis de détecter par modulation de la luminescence la cycline A (protéine régulatrice du cycle cellulaire en association avec certaines kinases),¹⁹³ *via* une reconnaissance spécifique de cette dernière avec un motif peptidique (**Eu-90**), et la saxitoxine (neurotoxique (inhibition de la transmission neuromusculaire) plus puissant que le sarin, il est sécrété par des algues et peut s'accumuler dans les fruits de mer¹⁹⁴); l'interaction se produisant grâce à l'éther couronne (**Eu-91**).¹⁹⁵

Enfin, des chélates d'ytterbium sensibilisés en phase aqueuse par une excitation dans la fenêtre thérapeutique grâce à de l'absorption biphotonique ont récemment été décrits.¹⁹⁶ Cependant, bien que le chélate **Yb-92** soit luminescent, il n'a été appliqué que pour de l'imagerie cellulaire aux longueurs d'onde d'émission de la porphyrine seulement (la rhodamine B permet une meilleure solubilisation du complexe ainsi qu'une localisation spécifique du complexe dans les mitochondries). Une explication possible, qui n'est pas explicitée dans l'article, est une limitation « simplement » liée à l'instrumentation qui ne permet pas aisément, en microscopie biphotonique, et dans le domaine du proche IR, de détecter une émission à une longueur d'onde supérieure à celle de l'excitation. Cela a pu être possible avec le chélate **Yb-93** suite à une modification de l'appareillage permettant ainsi d'imager des tissus à 80 μm de profondeur.^{196b} Pour ce dernier, σ n'a pas pu être déterminée avec précision ; les valeurs 500 et 775 GM sont celles des chélates de lutécium et d'euprimum respectivement.



¹⁹³ H.-K. Kong, F. L. Chadbourne, G.-L. Law, H. Li, H.-L. Tam, S. L. Cobb, C.-K. Lau, C.-S. Lee and K.-L. Wong, *Chem. Commun.*, **2011**, 47, 8052-8054.

¹⁹⁴ http://www.labor-spiez.ch/fr/dok/fa/pdf_f/fact_sheet_saxitoxin_fr.pdf.

¹⁹⁵ S. He, H. Li, Y.-W. Yip, C.-T. Yeung, Y. O. Fung, H.-K. Kong, H.-L. Yeung, G.-L. Law, K.-L. Wong, C.-S. Lee, *et al.*, *Org. Lett.*, **2011**, 13, 5036-5039.

¹⁹⁶ a) T. Zhang, X. Zhu, C. C. W. Cheng, W.-M. Kwok, H.-L. Tam, J. Hao, D. W. J. Kwong, W.-K. Wong and K.-L. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 20120-20122 ; b) A. D'Aléo, A. Bourdolle, S. Brustlein, T. Fauquier, A. Grichine, A. Duperray, P. L. Baldeck, C. Andraud, S. Brasselet and O. Maury, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51, 6622-6625.

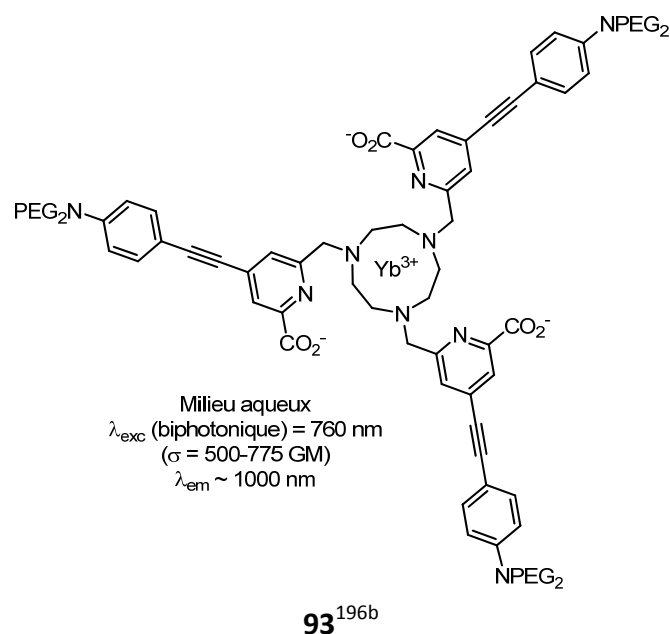


Figure 71 : Chélates d'ytterbium capables d'absorber et d'émettre dans le proche IR.¹⁹⁶

VI. OBJECTIF DU PREMIER PROJET

En dépit du grand nombre de chélates décrit dans la littérature une proportion relativement faible dispose de propriétés de luminescence compatibles avec des dosages immunologiques (cf. § III-5-1). En particulier, les longueurs d'onde d'excitation de l'antenne sont rarement supérieures à 340 nm, ce qui conduit à des détériorations des milieux biologiques, et, potentiellement également à des transferts d'énergie vers le lanthanide d'autres entités biologiques que l'antenne choisie. Afin de répondre à cette limitation, le prochain chapitre aura pour objet la description de la synthèse, de la conjugaison sur biomolécules et des propriétés luminescentes d'un chélate de lanthanide fondée sur une structure originale bis-pyridinylpyrazine permettant une sensibilisation efficace de l'euporium dans l'UV-A (vers 350 nm).

CHAPITRE 2

**CONCEPTION D'UN LIGAND ORIGINAL
PYRAZINIQUE - APPLICATION DU CHELATE
D'EUROPIUM AU MARQUAGE COVALENT DE
BIOMOLECULES**

I. COMPLEXES DE LANTHANIDES A STRUCTURE DIAZINIQUE

Une solution pour décaler les longueurs d'onde d'absorption des chélates de lanthanides est de modifier la structure de l'antenne, en particulier en remplaçant les pyridines par d'autres hétérocycles azotés comme par exemple certaines diazines.

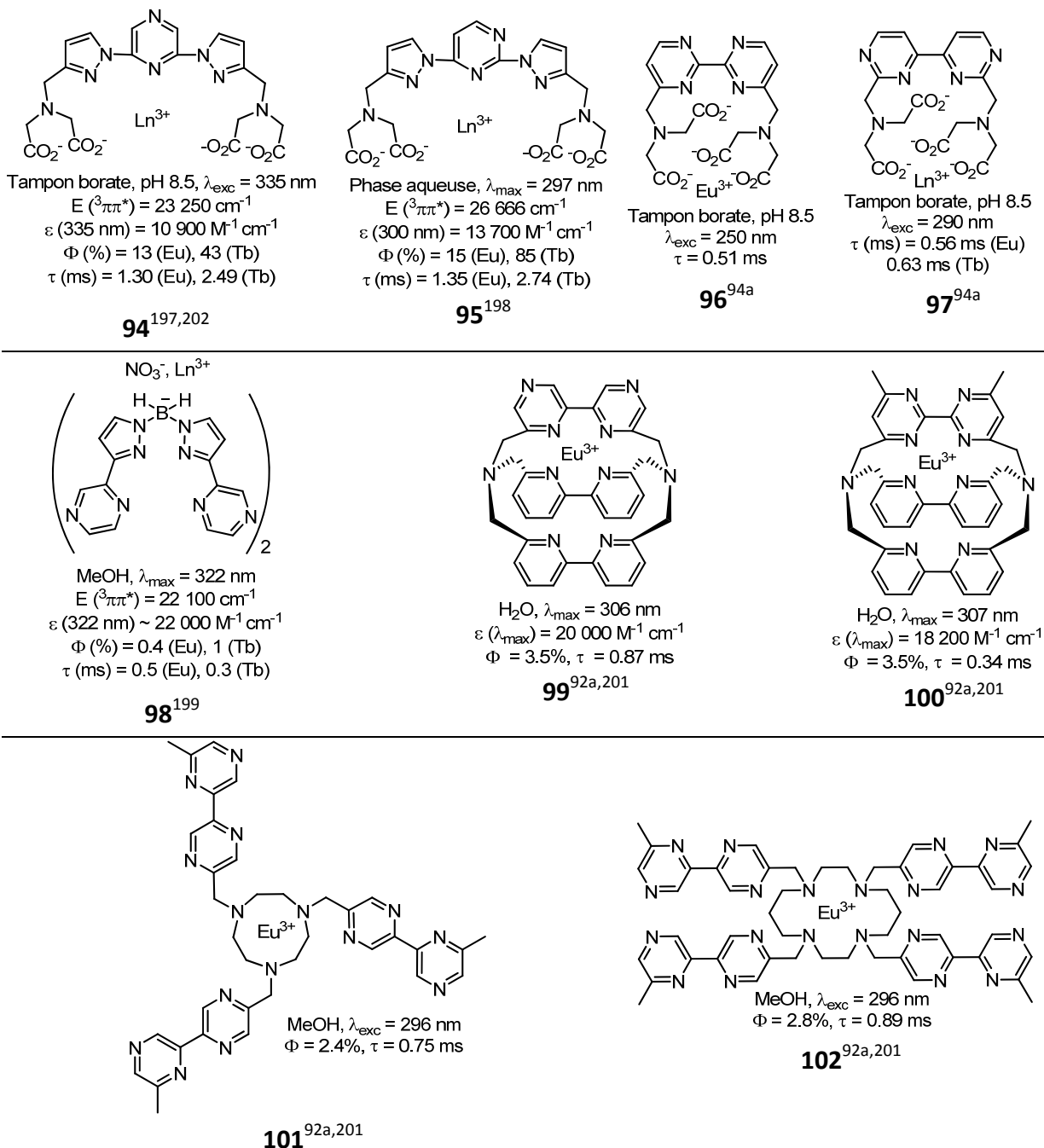


Figure 72 : Chélates de lanthanides comportant une antenne diazinique.

¹⁹⁷ J. C. Rodriguez-Ubis, R. Sedano, G. Barroso, O. Juanes and E. Brunet, *Helv. Chim. Acta*, **1997**, 80, 86-96.

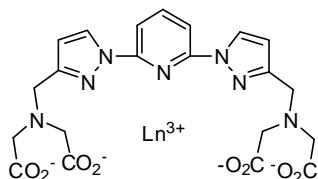
¹⁹⁸ E. Brunet, O. Juanes, R. Sedano and J. C. Rodriguez-Ubis, *Tetrahedron Lett.*, **2007**, 48, 1091-1094.

¹⁹⁹ N. Armaroli, G. Accorsi, F. Barigelletti, S. M. Couchman, J. S. Fleming, N. C. Harden, J. C. Jeffery, K. L. V. Mann, J. A. McCleverty, L. H. Rees, *et al.*, *Inorg. Chem.*, **1999**, 38, 5769-5776.

Chapitre 2 : Conception d'un ligand original pyrazinique - Application du chélate d'euprium au marquage covalent de biomolécules.

A notre connaissance, tous les complexes de lanthanides rapportés dans la littérature et disposant d'un chromophore diazinique sont décrits à la Figure 72. En outre, la molécule 2,2'-bipyrimidine devient de plus en plus étudiée comme ligand de lanthanides pour l'élaboration, à l'état de solide, de matériaux mettant à profit les propriétés magnétiques ou luminescentes particulières de ces éléments.²⁰⁰

Parmi les complexes diaziniques décrits, certains ne sont pas suffisamment stables (**Eu-101** et **Eu-102**)²⁰¹ ou luminescent (**Tb-96**) en solution aqueuse ; les autres, en particuliers **Ln-94** et **Ln-95**, possèdent de fortes brillances. En revanche, l'absorbance maximale de ces



Tampon borate, $\lambda_{exc} = 320$ nm
E ($3\pi\pi^*$) = 25 150 cm^{-1}
 ϵ (313 nm) = 8 100 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$
 Φ (%) = 3 (Eu), 58 (Tb)
 τ (ms) = 1.30 (Eu), 2.75 (Tb)

103

complexes est localisée à des longueurs d'onde relativement énergétiques, notamment pour le complexe bis-pyrazolylpyridine **Ln-95** dont le λ_{max} est égal à 297 nm. Le point intéressant à relever est que le changement de la pyridine du ligand **103** par la pyrazine conduit à un déplacement bathochrome significatif de 22 nm pour le chélate **Eu-94**. Ainsi, la pyrazine, en plus de diminuer l'énergie de l'état triplet (celui de l'analogue pyridinique non représenté du ligand **98** est aussi plus élevé : 23 900 contre 22 100 cm^{-1})¹⁹⁹ semble aussi abaisser l'énergie du premier état excité singulet. Cette diminution s'avère par exemple plus adaptée au transfert vers l'euprium pour le ligand bis-pyrazolylpyrazine **94** (le rendement quantique passe de 3% pour **Eu-103** à 13% pour **Eu-94**)²⁰² alors que le Tb devient probablement plus sensible au transfert d'énergie en retour ($\Delta E (^1\pi\pi^* - ^3\pi\pi^*) < 3\ 000 \text{ cm}^{-1}$) car le rendement chute de 60 à 43%.

Suites à ces observations et afin, d'une part, d'obtenir des complexes absorbant à des longueurs d'onde supérieures à la majorité des chélates commerciaux pour lesquels λ_{max} est généralement inférieure à 340 nm et, d'autre part, de tirer partie de l'expérience d'autres équipes de l'UMR 6014 sur la chimie de ces hétérocycles azotés aromatiques, il nous a paru judicieux de rassembler au sein d'une même antenne la pyrazine et la pyridine.

Pour conforter notre choix, les antennes bis-pyrazinylpyridine et bis-pyridinylpyrazine ont été synthétisées et leur propriété d'absorption comparée à celle de la terpyridine.²⁰³ La

²⁰⁰ a) G. Zucchi, O. Maury, P. Thuéry, F. Gumy, J.-C. G. Bünzli and M. Ephritikhine, *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 9686-9696 ; b) M. H. Baker, J. D. Dorweiler, A. N. Ley, R. D. Pike and S. M. Berry, *Polyhedron*, **2009**, *28*, 188-194 ; c) G. Zucchi, *Inter. J. Inorg. Chem.*, **2011**, Article ID 918435 ; d) J. Cepeda, R. Balda, G. Beobide, O. Castillo, J. Fernandez, A. Luque, S. Perez-Yanez and P. Roman, *Inorg. Chem.*, **2012**, *51*, 7875-7888.

²⁰¹ F. Bodar-Houillon and A. Marsura, *New J. Chem.*, **1996**, *20*, 1041-1045.

²⁰² Dans la publication initiale (référence 95) le rendement quantique de **Tb-103** est annoncé à 84% dans du tampon borate à pH 8.5. De plus, dans le premier article décrivant le ligand pyrazine **94** (référence 197) il semblerait qu'une inversion ait été commise entre le ligand **94** et son analogue pyridine **103** concernant le rendement quantique ainsi que l'énergie du niveau triplet. Les valeurs indiquées pour ces deux chélates sont celles issues de la référence 44b.

²⁰³ Travail effectué par J. B. Langlois en 2005 lors de son stage de Licence 3 en collaboration avec l'équipe du Pr. N. Plé selon une méthodologie de fonctionnalisation de diazines *via* des réactions de stannylation régiosélectives suivies de couplages de Stille : a) F. Toudic, A. Haynderickx, N. Plé, A. Turck and G. Quéguiner, *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 6375-6384 ; b) F. Buron, N. Plé, A. Turck and G. Quéguiner, *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 2616-2621 ; c) M. Darabantu, L. Bouilly, A. Turck and N. Plé, *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 2897-2905.

Chapitre 2 : Conception d'un ligand original pyrazinique - Application du chélate d'euprium au marquage covalent de biomolécules.

structure induisant l'effet bathochrome le plus prononcé est le chromophore bis-pyridinylpyrazine ; en revanche son coefficient d'absorption molaire est moins élevé (Figure 73). C'est pourquoi la synthèse du ligand **104**, comportant cette antenne substituée par deux fonctions acide iminodiacétique permettant de complexer le cation lanthanide, a été envisagée (Figure 74).

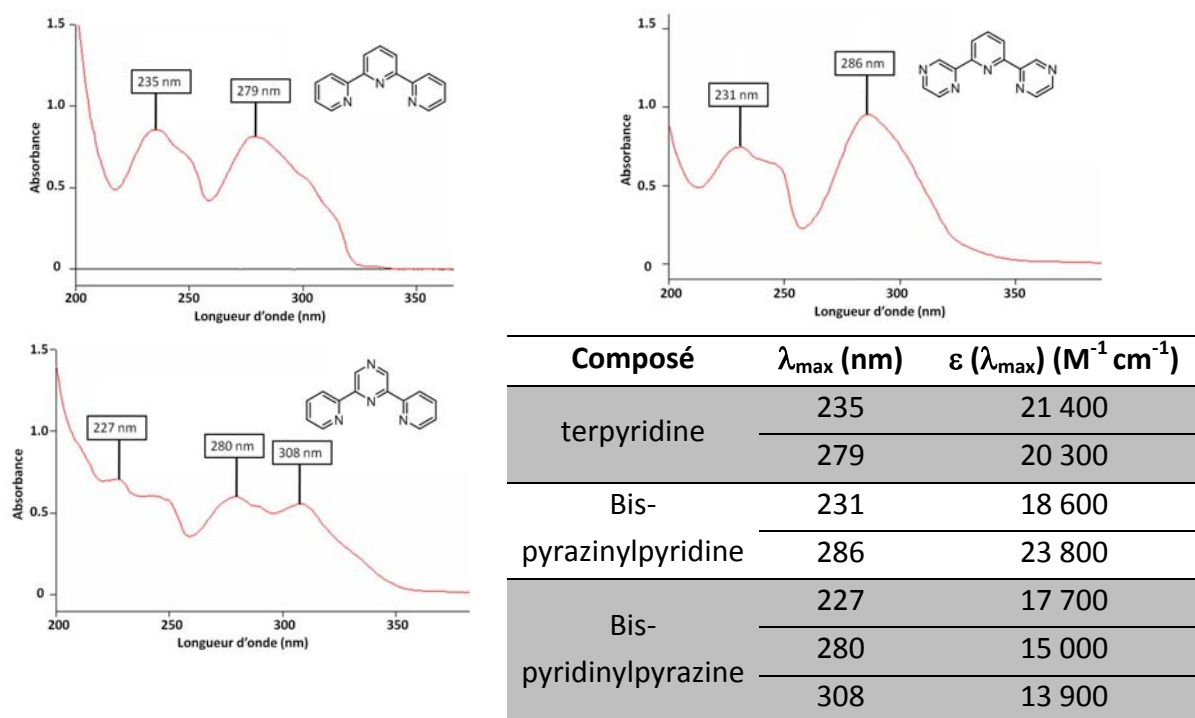


Figure 73 : Spectre d'absorption de la terpyridine, du bis-pyrazinylpyridine et du bis-pyridinylpyrazine dans MeCN (25 °C, c = 40 μM).

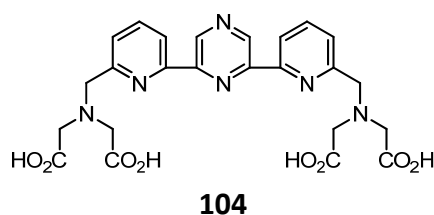


Figure 74 : Structure du ligand pyrazine ciblé.

II. SYNTHÈSE DU LIGAND BIS-PYRIDINYLPIRAZINE

1 PREMIÈRE VOIE DE SYNTHÈSE²⁰⁴

La stratégie initiale s'appuie sur les méthodes classiques de synthèse de terpyridines substituées.^{92b,205} Elle s'articule autour de l'intermédiaire nitrilé **F-1** (molécule **F**, Schéma 1)²⁰⁶

²⁰⁴ Ce travail a fait l'objet d'une partie de la thèse du Dr. Séverine Poupart, soutenue en octobre 2008.

²⁰⁵ R.-A. Fallahpour, *Synthesis*, **2003**, 155-184.

²⁰⁶ La numérotation des molécules intermédiaires sera indiquée de cette façon dans le manuscrit : « lettre » suivi du numéro de schéma dans laquelle la molécule est décrite.

Chapitre 2 : Conception d'un ligand original pyrazinique - Application du chélate d'euprium au marquage covalent de biomolécules.

de la bis-pyridinylpyrazine. Elle s'est cependant révélée extrêmement délicate et fastidieuse à mettre en œuvre alors qu'elle s'avère relativement aisée et efficace dans le cas des terpyridines. En effet, sur ces structures, la séquence réactionnelle classique de cyanation de terpyridines *N*-oxydées²⁰⁷ dans les conditions de Reissert-Henze modifiées (utilisation du cyanotriméthylsilane à la place du cyanure de potassium : un meilleur *ratio ortho/para* est obtenu)²⁰⁸ conduit à de bons rendements, généralement supérieurs à 70%.^{92b,94a,97} En revanche, cette méthodologie s'est montrée infructueuse dans le cas du bis-pyridinylpyrazine **C-1**.

Le composé **F-1** a finalement pu être obtenu par couplage de Stille²⁰⁹ avec la pyridine **D-1** (synthétisée à partir de la 2,6-dibromopyridine)²⁰⁴ directement fonctionnalisée par le groupement nitrile. La réduction de cette fonction à partir de borane n'a pas été concluante et la séquence hydrolyse, estérification, réduction, bromation s'est montrée extrêmement inefficace (4.7% sur ces quatre étapes). Plus particulièrement, l'étape de réduction au DIBAL-H a très probablement engendré la formation d'un complexe entre la structure hétérocyclique azotée et des sels d'aluminium, rendant les étapes de lavage et de purification sur colonne chromatographique extrêmement délicates. Le produit a finalement pu être récupéré mais en mélange avec de nombreuses impuretés. C'est pourquoi le brut a finalement été engagé directement dans la réaction de bromation, conduisant au produit désiré avec un rendement de 9% sur ces deux étapes. Après la substitution des atomes de brome par l'amine secondaire **H-1**, la déprotection des esters *tert*-butyliques par le TFA a été effectuée sur le brut réactionnel. Suite à une purification en phase inverse par HPLC semi-préparative, le ligand **104** a alors pu être obtenu mais seulement à l'échelle du mg avec un rendement global dérisoire de 0.2% (Schéma 1).²⁰⁴

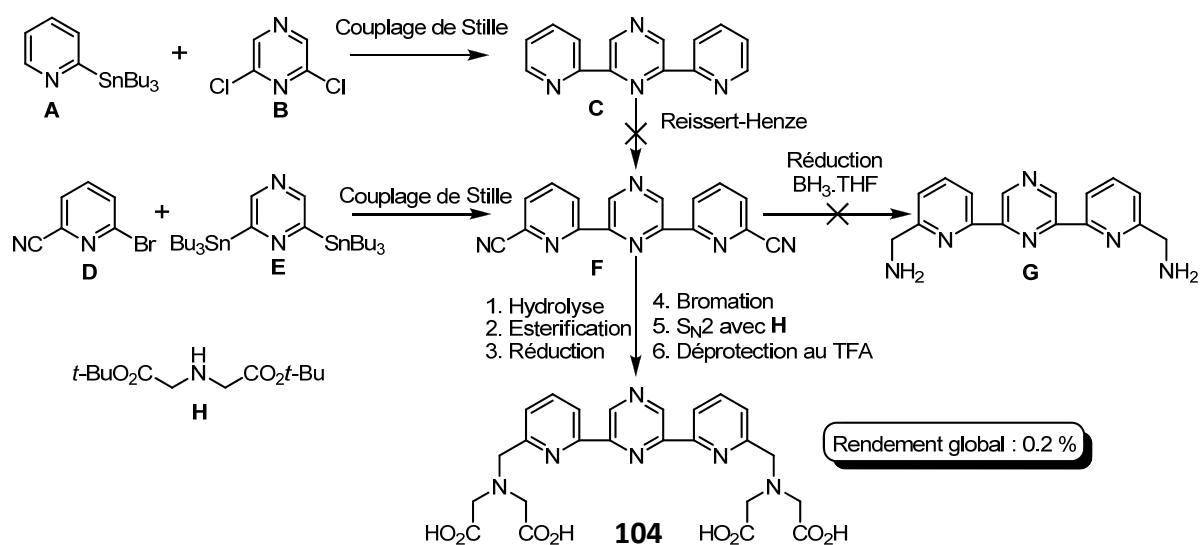


Schéma 1 : Première voie de synthèse explorée pour l'obtention du ligand 104.

²⁰⁷ R. P. Thummel and Y. Jahng, *J. Org. Chem.*, **1985**, *50*, 3635-3636.

²⁰⁸ W. K. Fife, *J. Org. Chem.*, **1983**, *48*, 1375-1377.

²⁰⁹ P. Espinet and A. M. Echavarren, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 4704-4734.

Chapitre 2 : Conception d'un ligand original pyrazinique - Application du chélate d'euprium au marquage covalent de biomolécules.

La formation du complexe **Eu-104** a néanmoins pu être réalisée directement dans la cuve du spectrophotomètre UV-visible et la mesure de son spectre d'absorption dans l'eau ultrapure confirme l'effet bathochrome par rapport au chélate d'euprium dérivé du ligand terpyridine (Figure 75). Ainsi, à 354 nm, **Eu-104** possède une absorbance encore proche de celle à 344 nm (λ_{\max}), alors qu'à cette première longueur d'onde, l'absorbance de son analogue terpyridine est presque nulle.

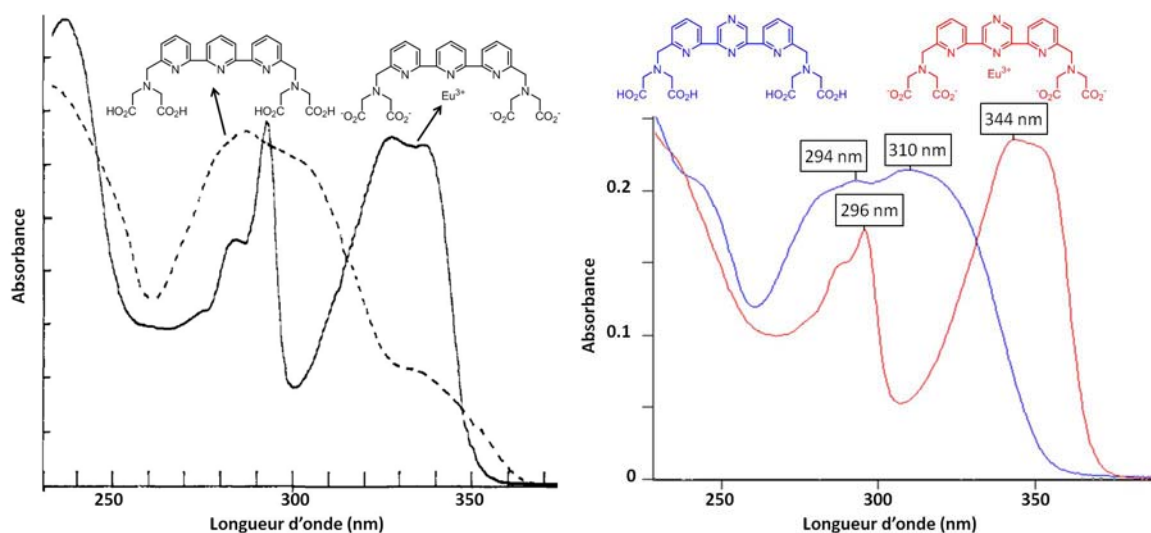
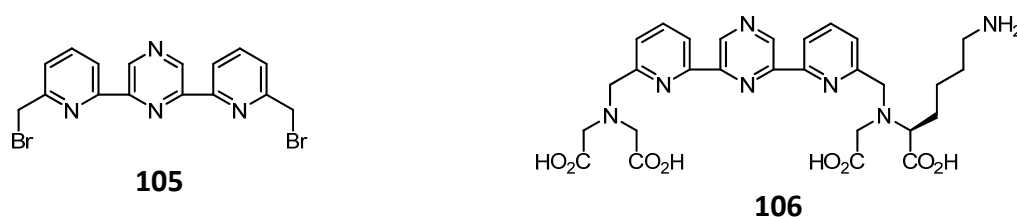


Figure 75 : Comparaison des spectres d'absorption des ligands et chélates d'euprium terpyridine^{94a} et bis-pyridinylpyrazine en phase aqueuse.

Il apparaît opportun, au vu de ce résultat encourageant, d'optimiser la synthèse du ligand afin d'avoir accès au composé bromé **105** en quantité suffisante. En effet, cet intermédiaire permettra de synthétiser le ligand non-symétrique **106** contenant une amine primaire qui sera ultérieurement convertie en fonction bioconjugable.



Les propriétés photophysiques des complexes issus des ligands **104** et **106** seront exposées plus en détails après la description de la deuxième voie de synthèse menant au ligand **104** avec un rendement amélioré puis au composé **106**.

2 DEUXIEME VOIE DE SYNTHESE

2.1. SYNTHESE DES LIGANDS

Cette stratégie repose sur l'introduction, par un couplage de Stille, de la pyridine **D-2**, fonctionnalisée par un alcool protégé, en l'occurrence silylé, sur la pyrazine centrale. Ce chemin réactionnel permet alors de s'affranchir de l'étape problématique de réduction des esters en alcools, imposée par l'insertion préalable de la 2-cyano-6-bromopyridine **D-1** dans la première stratégie de synthèse. Ainsi, l'intermédiaire dibromé **105** a été obtenu, à partir de la 2,6-dibromopyridine, avec 27% de rendement (Schéma 2) contre 1.4% précédemment. La synthèse débute par la mono-formylation de la 2,6-dibromopyridine puis réduction de l'aldéhyde en alcool **B-2**. Il a été montré que l'addition inverse, *i.e.* ajout de la pyridine **A-2** sur la solution de *n*BuLi dans le THF anhydre, en gardant la température inférieure à -70 °C permet de générer exclusivement l'intermédiaire 2-bromo-6-lithiopyridine *via* l'échange halogène-métal entre la 2,6-dibromo- et 2,6-dilithiopyridine. Dans le cas contraire, les produits issus de la déprotonation en position 3 et 4 ainsi que l'analogue **B-2** ayant subi une réduction de la liaison C-Br peuvent être obtenus.²¹⁰

A noter que l'analogue tributyle du composé triméthylstannylé **D-2** a initialement été engagé dans le couplage avec la 2,6-dichloropyrazine mais s'est avéré peu réactif par rapport à son analogue triméthyle **D-2**. Enfin, le composé stannylé **D-2** semble subir une réduction de la liaison C-Sn dans les conditions du couplage. C'est pourquoi son ajout est effectué en plusieurs fois au cours de la réaction.

Aussi, malgré une déprotection quantitative (d'après l'analyse du brut réactionnel) des éthers silylés avec le TBAF dans le THF, la purification du diol **F-2** s'est révélée délicate. Une première tentative de purification du produit sur colonne chromatographique en phase inverse élué avec de l'eau ultrapure et du méthanol s'est montrée infructueuse : étrangement, seule une fraction infime a pu être récupérée (\approx 2.5%). Sur phase normale, en utilisant un mélange ternaire DCM/MeOH/Et₃N, le produit a pu être récupéré à hauteur de 60% environ mais contaminé en partie avec des sels de tétrabutylammonium. Finalement, et aussi paradoxal que celui puisse paraître pour des pyridines (bien que le pKa de la pyrazine soit extrêmement bas : 0.37), **F-2** a précipité dans un mélange acide TFA 0.1%/MeOH (v/v 1/1). Ce mélange était initialement prévu pour dissoudre **F-2** et analyser l'échantillon en HPLC analytique. Le solide obtenu avec un rendement de 79% et s'avérant pur, il était inutile de tester d'autres solvants de précipitation. Enfin la molécule dibromée **105** a été obtenue en utilisant un réactif de bromation classique, PBr₃, sans difficulté particulière et sans purification sur gel de silice ou recristallisation (les spectres RMN ont révélés une pureté similaire du produit purifié par simple extraction liquide-liquide que celui purifié en plus par colonne ou recristallisation).

²¹⁰ D. Cai, D. L. Hughes and T. R. Verhoeven, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 2537-2540.

Chapitre 2 : Conception d'un ligand original pyrazinique - Application du chélate d'euprium au marquage covalent de biomolécules.

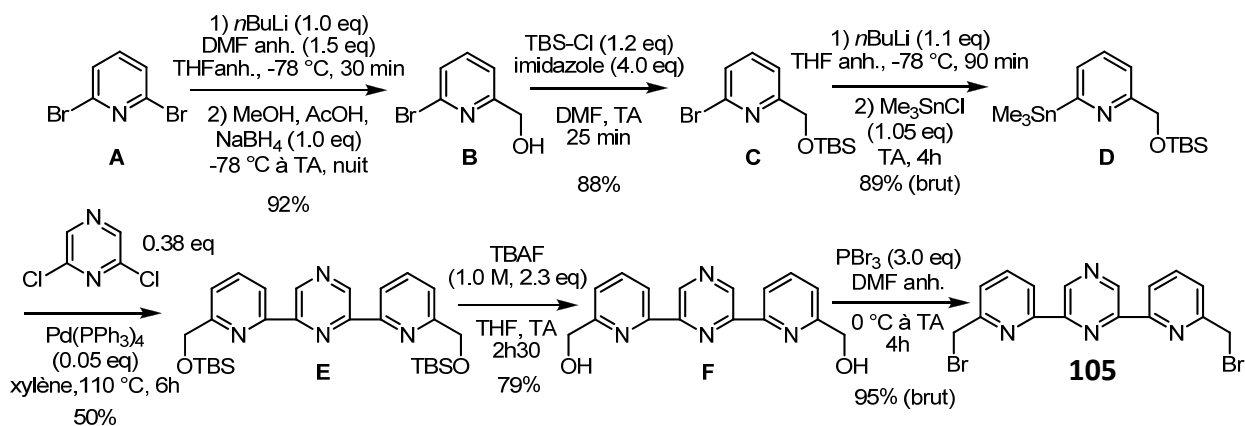


Schéma 2 : Séquence réactionnelle optimisée menant à l'intermédiaire dibromé 105.

Compte tenu initialement de la difficulté à obtenir en quantité suffisante le diol **F-2** après purification sur colonne chromatographique, un essai de désilylation-bromation « one-pot » du diol protégé **E-2** en présence de CBr_4 et PPh_3 a été tenté mais sans succès.²¹¹

En parallèle de la bromation avec le tribromure de phosphore, un essai de méthylation a été effectué avec le chlorure de méthyle mais la conversion dans le brut réactionnel ne semblait pas bonne. L'emploi de l'anhydride de méthyle, employé dans la synthèse du ligand **35** (Figure 34)²¹² n'a pas été essayé puisque le PBr_3 a donné un résultat satisfaisant.

Les ligands symétrique **104** et non-symétrique **106** sont obtenus par substitution du brome avec les amines **H-1** et **E-3** dont les synthèses sont présentées Schéma 3. **H-1** est synthétisé sans difficulté en deux étapes à partir de la benzylamine.²¹³ Quant à **E-3**, il se prépare en trois étapes *via* une estérification de la lysine commerciale **C-3** par du Boc_2O dans le *tert*-butanol en présence de DMAP,²¹⁴ suivie de la déprotection du groupement Fmoc puis de la monosubstitution de l'amine primaire.

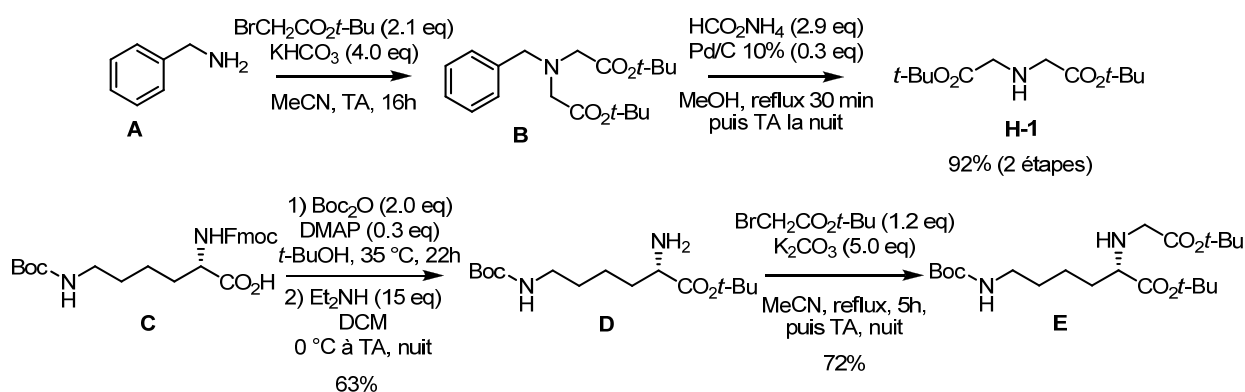


Schéma 3 : Synthèse des futurs bras chélatants.

²¹¹ H. Mattes and C. Benezra, *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28, 1697-1698.

²¹² J. L. Toner, D. A. Hilborn, B. J. Murray, T. Z. Houssain, R. A. Snow, A. K. Saha, R. Phillion, C. Shearman and C. Shah, **1993**, WO 93/021957.

²¹³ S. I. Achilefu and A. Srinivasan, **2001**, WO 01/052898.

²¹⁴ a) K. Takeda, A. Akiyama, H. Nakamura, S.-i. Takizawa, Y. Mizuno, H. Takayanagi and Y. Harigaya, *Synthesis*, **1994**, 1063-1066 ; b) Pour une courte revue sur la synthèse d'esters *tert*-butyliques, voir : J. A. Morales-Serna, A. Vera, E. Paleo, E. Garcia-Rios, R. Gavino, G. Garcia de la Mora and J. Cardenas, *Synthesis*, **2010**, 4261-4267.

Chapitre 2 : Conception d'un ligand original pyrazinique - Application du chélate d'euporium au marquage covalent de biomolécules.

Le ligand **104** est facilement synthétisé à partir de **105** et **H-1** en deux étapes (Schéma 4). L'intermédiaire protégé **A-4** est obtenu à hauteur de 64% après une purification sur silice. L'étape de déprotection des esters *tert*-butyliques en milieu acide (TFA) dans le dichlorométhane en présence d'un excès d'eau (50 eq.), permet de piéger le carbocation *tert*-butyle. Le ligand est ensuite purifié sur colonne chromatographique de silice C18 en phase inverse (TFA 0.1%/MeOH comme éluants) avec un rendement de 44%. Le rendement global de ce ligand symétrique s'élève alors à 7.6%.

En revanche la synthèse du dérivé lysine **106** est beaucoup moins efficace car les deux amines **H-1** et **E-3** doivent chacune substituer un seul atome de brome du même composé **105**. En outre, *a priori* pour des raisons stériques, ces deux nucléophiles ne possèdent pas la même réactivité vis-à-vis du site électrophile, c'est pourquoi la lysine substituée **E-3** est introduite la première et est laissée seule en solution avec le composé dibromé pendant 9h à TA dans le DMF (la réaction a aussi été effectuée dans le MeCN à reflux mais **105** y est moins soluble et surtout semble en partie se dégrader). Un suivi de la réaction par RMN semble montrer la formation d'un composé constitué d'une pyrazine non-symétrique. Ensuite **H-1** est donc rajouté en plusieurs portions sur environ 60h. Après une purification rapide sur colonne chromatographique en phase normale le résidu est purifié à nouveau par HPLC semi-préparative en phase inverse (TFA 0.1%/MeCN comme éluants). En supposant que les produits récupérés ne soient pas sous forme de sel de TFA, le rendement ne s'élève qu'à 18% pour **B-4**, alors que, en dépit d'un ajout très progressif en **H-1**, la quantité en molécule symétrique **A-4** non désirée est de 11%. La deuxième molécule symétrique issue de la double substitution par **E-3** s'est formée à hauteur de 6%. Le ligand **106** s'obtient ensuite par simple déprotection en milieu acide des esters de *t*Bu et du groupement Boc (Schéma 4). Le rendement global de sa formation est plus faible : 2.6%.

Chapitre 2 : Conception d'un ligand original pyrazinique - Application du chélate d'euprium au marquage covalent de biomolécules.

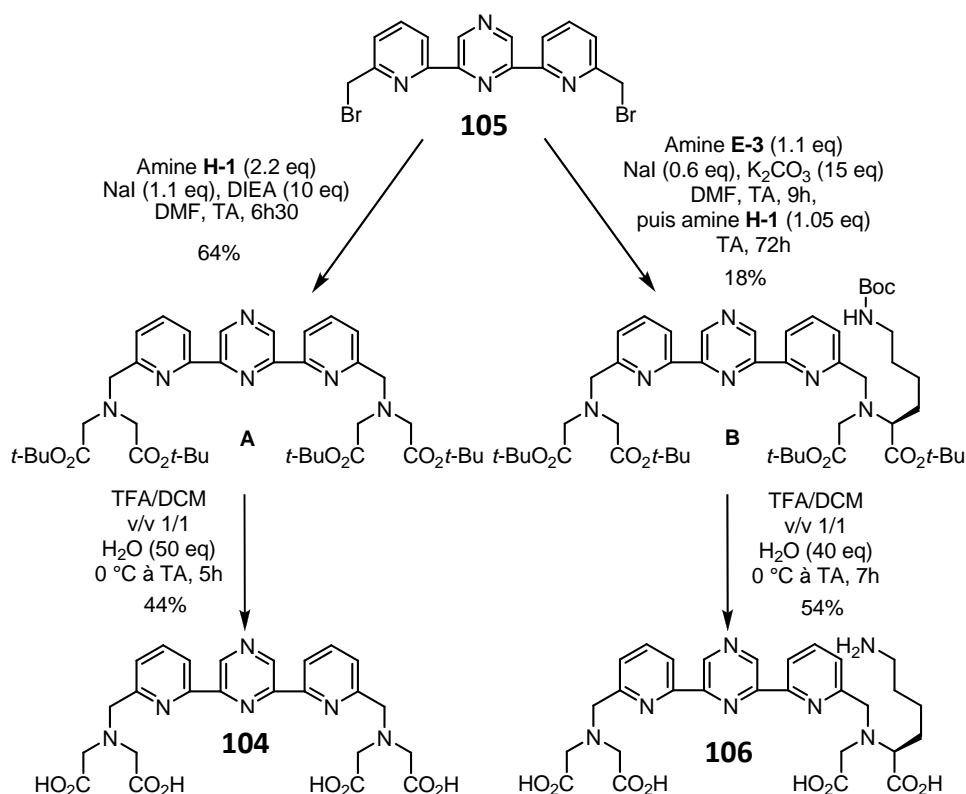


Schéma 4 : Etapes de synthèse menant aux ligands 104 et 106 à partir du composé dibromé 105.

2.2. SYNTHÈSE DES CHÉLATES

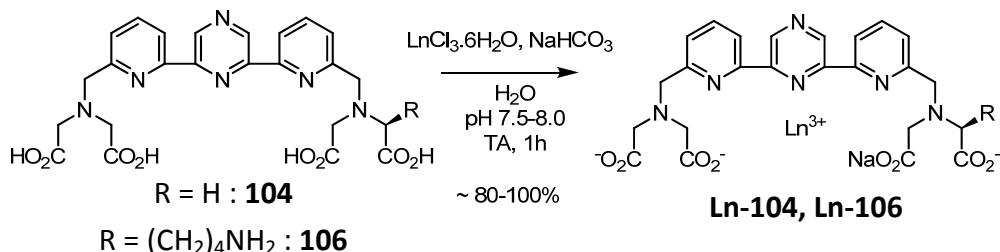


Schéma 5 : Réaction de complexation.

Les chélates **Eu-104/106**, **Sm-104** et **Tb-104/106** ont été synthétisés mais seuls les complexes d'euprium et de samarium sont luminescents. Ne disposant pas d'un spectrophotomètre permettant des mesures de phosphorescence à 77 K du chélate de gadolinium (cf. § II-7-4, chapitre 1) nous ne pouvons que supposer que le niveau triplet du chromophore bis-pyridinylpyrazine est inférieur au niveau 5D_4 du terbium d'énergie 20 500 cm^{-1} et supérieur au $^4G_{5/2}$ du samarium localisé à environ 17 900 cm^{-1} .

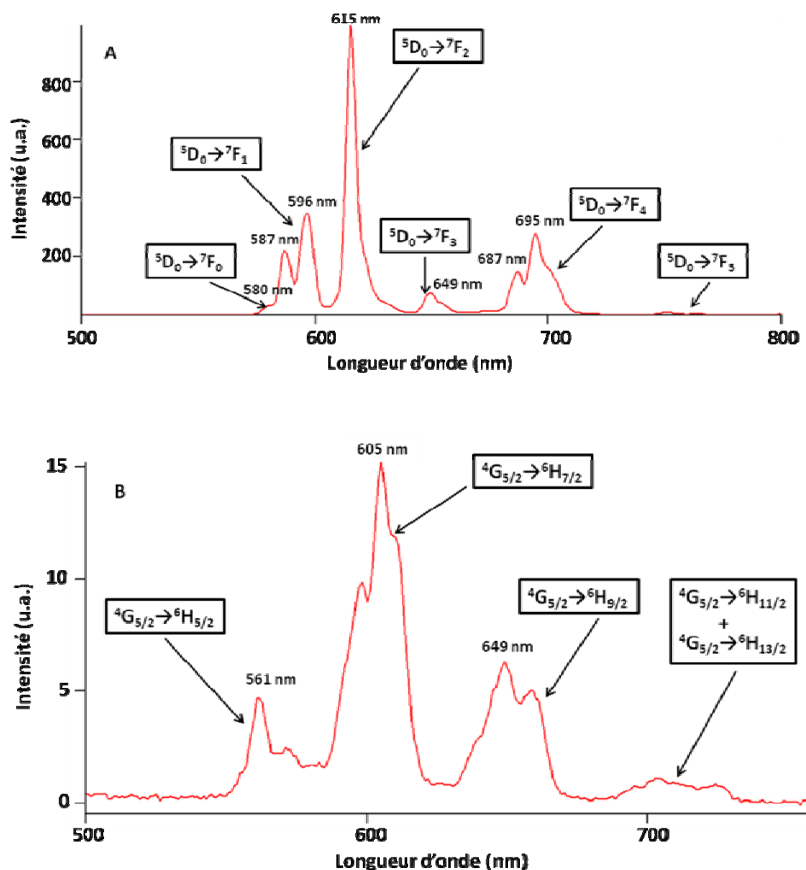


Figure 76 : Spectres d'émission des chélates Eu-104 (A : $c = 12 \mu\text{M}$) et Sm-104 (B : concentration non déterminée) dans l'eau ultrapure à 25 °C ($\lambda_{\text{exc}} = 344 \text{ nm}$).

Le chélate de samarium est évidemment beaucoup moins brillant que son homologue à l'euporium (écart énergétique entre le niveau d'émission et le plus proche d'énergie inférieure est plus faible que celui de l'euporium : $7\,400$ contre $12\,300 \text{ cm}^{-1}$ (cf. Tableau 6)). Pour obtenir un spectre d'émission correct dans le visible, représenté à la Figure 76, nous avons dû l'enregistrer à partir d'une fraction non diluée (le spectre d'absorption est saturé) issue de la purification sur colonne chromatographique en phase inverse.

Quant au spectre d'émission de l'euporium(III) inséré dans la structure bis-pyridinylpyrazine, il présente la même forme que ceux dont le signal est issu d'une structure terpyridine.^{98,99} La forte intensité d'émission de la bande correspondant à la transition hypersensible ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ par rapport à celle de la transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$, très peu sensible à l'environnement, traduit le fait que le site métallique adopte une géométrie possédant un faible degré de symétrie.

2.3. BREVE ETUDE DE STABILITE

Les échantillons analysés lors de dosages biologiques, par définition, ne sont pas constitués du seul analyte à quantifier et/ou à visualiser mais aussi de nombreuses espèces endogènes ou exogènes selon les besoins de l'expérience qui peuvent interférer avec le ligand et ainsi porter atteinte à l'intégrité de la sonde lanthanidique luminescente.^{88a} Le chélate doit par conséquent s'avérer suffisamment stable sur la durée de l'analyse.

De très loin, il ne s'agit pas ici d'une étude exhaustive sur la stabilité de notre chélate vis-à-vis des différentes espèces connues pour décomplexer ou inhiber la luminescence des lanthanides. Nous avons brièvement étudié l'influence du tampon PBS (contenant des phosphates, connus pour avoir une forte affinité pour les cations lanthanidiques) et de l'EDTA.

Ainsi, sur une période d'un mois et à 4 °C, **Eu-104** dilué à hauteur de 3 µM dans un tampon PBS (100 mM, 150 mM NaCl, pH 7.4) a perdu 12% de son intensité initiale.

L'évolution des spectres d'absorption et d'émission du chélate **Eu-104** (concentration de l'ordre de 5 µM) a aussi été enregistrée en milieu aqueux tamponné (tampon PIPES 20 mM, pH 7.1) en présence d'EDTA (20 mM) sur une période de quinze heures à 25 °C. Après seulement 35 minutes d'agitation avec l'EDTA, l'absorbance est peu modifiée mais l'émission de l'euprium demeure inchangée. En revanche, l'intensité du spectre d'émission après quinze heures d'agitation ne s'élève plus qu'à 47% de l'intensité initiale (Figure 77). A noter que pour une même concentration en chélate, l'intensité initiale de luminescence dans l'eau ultrapure est légèrement plus élevée (107%) que dans le tampon PIPES.

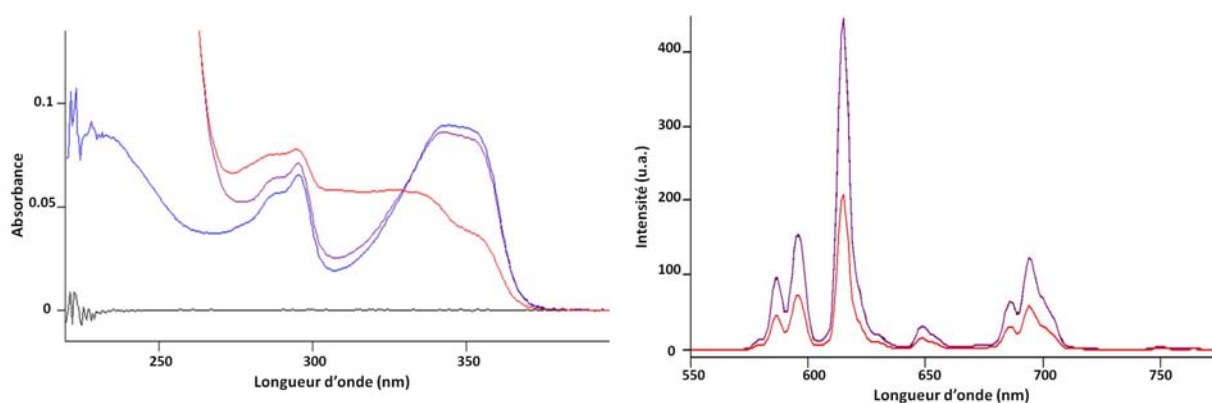


Figure 77 : Spectres d'absorption (gauche) et d'émission (droite) du chélate Eu-104 dilué à 5 µM dans une solution aqueuse tamponnée (PIPES 20 mM, NaCl 100 mM, pH 7.1, 25 °C) en présence de 20 mM d'EDTA (bleu : sans EDTA ; violet : 35 minutes après l'ajout d'EDTA (le spectre d'émission se superpose parfaitement au premier) ; rouge : après quinze heures).

Si nous nous référons aux conditions minimales de stabilité que doit satisfaire un complexe de lanthanides en bioanalyse énoncées par Mathis^{88a} et concernant seulement l'EDTA, il est vrai que le complexe **Eu-104** ne semble pas le candidat idéal. En effet, à 20 °C et pour une concentration en chélate de l'ordre du nM, l'intensité d'émission après une nuit en présence

Chapitre 2 : Conception d'un ligand original pyrazinique - Application du chélate d'euporium au marquage covalent de biomolécules.

de 20 mM d'EDTA ne devrait pas diminuer de plus de 20%. Evidemment, le degré de stabilité recherché pour un chélate dépendra aussi de l'application visée.

Afin de disposer d'une référence dont l'architecture est proche de celle de certains chélates

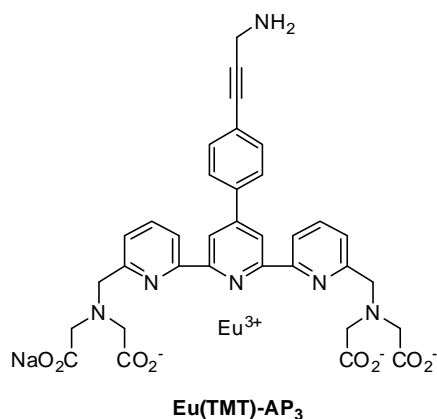


Figure 78 : Structure du chélate d'euporium(III) Eu(TMT)-AP₃ développé au laboratoire.²¹⁵

commerciaux, à savoir une structure aromatique de type terpyridine, nous avons soumis le complexe Eu(TMT)-AP₃ à ce même test vis-à-vis de l'EDTA. Il s'agit d'un complexe d'euporium(III) (Figure 78) développé au laboratoire dans le cadre d'une étude visant à suivre par l'intermédiaire d'un processus de FRET (l'accepteur étant une Cy-5.0) l'activité de la caspase-3.²¹⁵

La même étude de stabilité a finalement montré (spectre non présenté) que la luminescence de ce complexe, dans les mêmes conditions de dilution appliquées à **Eu-104**, et en présence de la même

quantité d'EDTA, est intacte après quinze heures à 25 °C.

Une raison pouvant expliquer que notre chélate **Eu-104** soit moins stable que ses dérivés possédant un chromophore terpyridine est que le pKa de la pyrazine est extrêmement faible (0.37) diminuant de fait la capacité du doublet non-liant de l'azote pyrazinique à interagir avec le cation métallique. Ainsi, il a par exemple été montré (pour des ligands de type podand) que d'une part, le dérivé pyridinique du chélate **Eu-98** possède un rendement quantique dix fois moindre que ce dernier, ce qui peut être justifié par une capacité réductrice de l'azote de la pyridine plus forte que celui de la pyrazine (réduction de Eu(III) en Eu(II) non-luminescent) et d'autre part, que la distance métal-N_{pyrazine} est plus longue que celle métal-N_{pyridine}.¹⁹⁹ Cela signifie que la capacité de la pyrazine à chélater des acides de Lewis est moins forte qu'avec la pyridine, engendrant une plus faible stabilité du complexe.

3 PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES

3.1. RENDEMENTS QUANTIQUES

Les rendements quantiques relatifs des différents chélates ont été mesurés par la méthode comparative^{16,216} qui est fondée sur la comparaison avec un standard fluorescent dont le rendement quantique est précisément connu. Ce dernier est calculé par des méthodes dites absolues : sphère d'intégration¹⁶ ou mesures calorimétriques.^{217a}

²¹⁵ S. Poupart, C. Boudou, P. Peixoto, M. Massonneau, P.-Y. Renard and A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, *4*, 4165-4177 ; corrigendum, *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, *6*, 4669.

²¹⁶ a) <http://www.chem.ufl.edu/~kschanze/manuals/quantumyieldguide.pdf> ; b) A. T. R. Williams, S. A. Winfield and J. N. Miller, *Analyst*, **1983**, *108*, 1067-1071.

²¹⁷ a) J. Olmsted, III, *J. Phys. Chem.*, **1979**, *83*, 2581-2584 ; b) K. Nakamaru, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1982**, *55*, 2697-2705.

Chapitre 2 : Conception d'un ligand original pyrazinique - Application du chélate d'euprium au marquage covalent de biomolécules.

La détermination du rendement s'effectue donc en reportant l'intensité de l'émission du lanthanide (aire sous la courbe d'émission)²¹⁸ en fonction de l'absorbance de l'antenne à la longueur d'onde d'excitation choisie. Cette opération est réalisée à différentes concentrations afin de tracer une droite de tendance. Le rapport entre son coefficient directeur ($Grad_x$) et celui de la droite obtenue de la même façon pour le standard ($Grad_{st}$) est relié au rendement quantique du fluorophore par la relation suivante :

$$\Phi_x = \Phi_{st} \times \frac{Grad_x}{Grad_{st}} \times \frac{\eta_x^2}{\eta_{st}^2}.$$

Avec :

- Φ_x : rendement quantique du complexe à déterminer ;
- Φ_{st} : rendement quantique connu du standard ;
- η_x : indice de réfraction du solvant dans lequel le fluorophore est dilué ;
- η_{st} : indice de réfraction du solvant dans lequel le standard est dilué.

Par rapport aux méthodes absolues celle-ci est beaucoup plus simple à mettre en œuvre mais reste approximative : les incertitudes s'élèvent généralement à 15-20%.

En outre, quelques règles doivent être, si possible, respectées afin d'obtenir une valeur de Φ_x la plus proche de la réalité :

- les longueurs d'onde d'excitation du complexe et du standard doivent être identiques ;
- l'absorbance à la longueur d'onde d'excitation et aux longueurs d'onde moins énergétiques doit être inférieure à 0.1 unité d'absorbance ;
- le standard choisi doit émettre dans le même domaine spectral que le complexe.

Les mesures ont été effectuées à l'aide de trois standards, le complexe de ruthénium $[Ru(bipy)_3]Cl_2$ commercial (2.8% dans l'eau ultrapure),^{217b} le chélate d'euprium $Eu(TMT)-AP_3$ (16.9% dans l'eau ultrapure) ;²¹⁵ une deuxième mesure indiquerait un rendement quantique de 22.0% ce qui équivaut à une différence de 23% par rapport au deuxième rendement en utilisant dans les deux cas le complexe de ruthénium comme standard) et la rhodamine 6G commercial (R6G, 88% dans l'éthanol).^{217a,219}

²¹⁸ La courbe d'émission des chélates est enregistrée en mode phosphorescence avec les paramètres suivants : *delay time* 0.1 ms, *gate time* 3 ms et *total decay time* 10 ms.

²¹⁹ La rhodamine 6G n'est peut-être pas le standard le plus adapté car, bien qu'il possède une bande d'absorption vers 345-350 nm, sa bande principale (coefficient d'absorption dix fois plus élevé) est localisée à 530 nm dans l'éthanol. De plus son rendement quantique est déterminé à partir de cette bande intense d'où la fluorescence est émise. En excitant à 345 nm, une perte d'énergie doit se produire par conversion interne pour atteindre le niveau principal (correspondant à la bande à 530 nm) menant ensuite à la fluorescence.

Chapitre 2 : Conception d'un ligand original pyrazinique - Application du chélate d'euprium au marquage covalent de biomolécules.

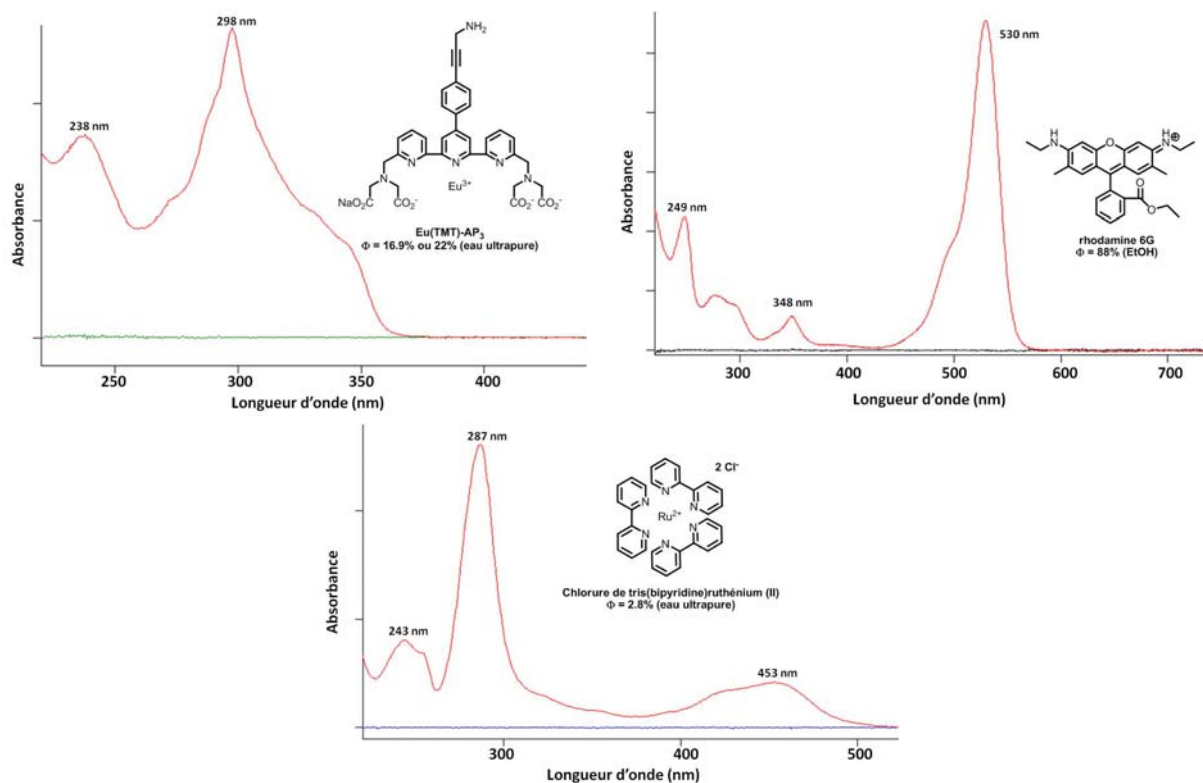


Figure 79 : Spectres d'absorption et structures des standards choisis.

standard	Φ (%)			
	Eu(TMT)-AP ₃		[Ru(bipy) ₃]Cl ₂	R6G
λ_{exc} (nm)	295	344	295	344
Eu-104	11.8 (15.3)	15.7 (20.4)	16.2	14.2
Sm-104	-	0.5 (0.6 - 0.7)	-	0.4
Eu-106	10.5 (13.7)	14.5 (18.9)	-	13.2

Tableau 9 : Rendements quantiques des différents chélates dans l'eau ultrapure. Entre parenthèses est indiqué la valeur obtenue en appliquant un rendement de 22.0% et non de 16.9% pour le standard Eu(TMT)-AP₃.

Etrangement, le rendement quantique du chélate **Eu-104** à 295 nm en utilisant le complexe au ruthénium ([Ru(bipy)₃]Cl₂) est sensiblement supérieur (16.2%) à celui trouvé en utilisant notre composé Eu(TMT)-AP₃ comme standard (11.8%), dont le rendement quantique (16.9% dans l'eau ultrapure) a été préalablement calculé à partir de ce même complexe au ruthénium.

Compte tenu de l'écart important (11.8 et 16.2%), le rendement quantique de Eu(TMT)-AP₃ a donc été à nouveau mesuré à partir du complexe de ruthénium le jour même où a été déterminé le rendement quantique de **Eu-104** à 295 nm par le standard [Ru(bipy)₃]Cl₂. Une valeur nettement supérieure à celle initiale de 16.9% est alors calculée, à savoir 22.0%. Par suite, **Eu-104** posséderait un rendement de 20.4% à 344 nm.

Les rendements quantiques des chélates d'euprium(III) excités à 295 nm sont moins élevés que ceux excités à 344 nm. Au moins deux raisons peuvent être invoquées : le chélate

Chapitre 2 : Conception d'un ligand original pyrazinique - Application du chélate d'euprium au marquage covalent de biomolécules.

standard Eu(TMT)-AP₃ ne possède pas le même rendement quantique à 295 et 344 nm, autrement dit le transfert d'énergie de la terpyridine au cation Eu³⁺ ne s'effectue pas avec la même efficacité si l'antenne est excitée à 295 et 344 nm ; la deuxième raison est identique à la première mais concernerait les rendements quantiques des chélates **Eu-104** et **Eu-106**. Finalement, il apparaît d'une part que le transfert d'énergie est moins efficace *via* la bande centrée à 295 nm que celle à 344 nm pour le chélate **Eu-104** (cf. Figure 80 et Figure 75) : le rapport entre l'absorbance à 344 et 295 nm n'est que de 1.4 alors que pour le spectre d'excitation²²⁰ à 615 nm ce *ratio* est de 1.8.

A l'inverse, concernant notre standard à l'euprium, la différence de ce rapport s'avère plus constant entre les deux spectres : 2.4 et 2.3 respectivement pour les spectres d'absorption et d'excitation (Figure 79 et Figure 81). Eu(TMT)-AP₃ peut par conséquent servir de standard en appliquant le même rendement quantique à ces deux longueurs d'onde.

Il est vrai que les spectres d'excitation, s'ils ne sont pas corrigés,²²¹ ce qui est notre cas, peuvent présenter des valeurs différentes de celles du spectre d'absorption (cependant, même si les intensités relatives des maxima peuvent varier, l'allure du spectre d'excitation est identique à celle du spectre d'absorption si une seule espèce absorbante est présente). Néanmoins, la variation entre les rapports cités précédemment peut être comparée puisque ces derniers ont été calculés à partir des mêmes longueurs d'onde.

Nous pouvons aussi remarquer que le spectre d'excitation du chélate **Eu-104** (Figure 80) possède, comme son spectre d'absorption (Figure 75), les deux bandes centrées à 295 et 344 nm. Cette similitude confirme que le transfert d'énergie sur le lanthanide(III) conduisant à sa luminescence provient de la désexcitation du chromophore bis-pyridinylpyrazine.

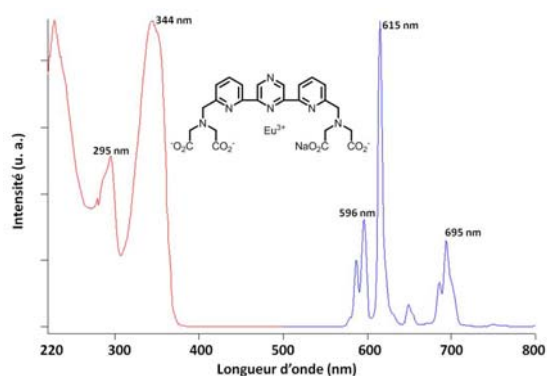


Figure 80 : Spectres d'émission ($\lambda_{\text{exc}} = 344$ nm, en bleu) et d'excitation ($\lambda_{\text{em}} = 615$ nm, en rouge) du chélate **Eu-104** (eau ultra pure, $c = 6 \mu\text{M}$).

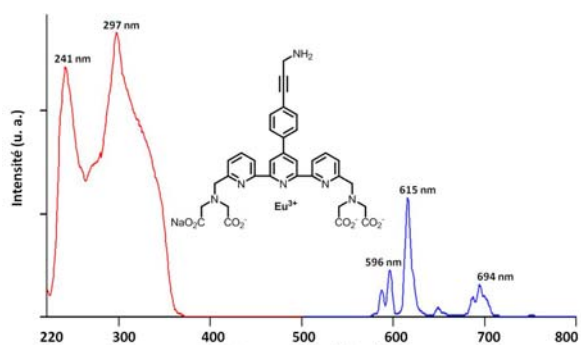


Figure 81 : Spectres d'émission ($\lambda_{\text{exc}} = 344$ nm, bleu) et d'excitation ($\lambda_{\text{em}} = 615$ nm, en rouge) du standard **Eu(TMT)-AP₃** (eau ultra pure, $c = 6 \mu\text{M}$).

²²⁰ Les spectres d'excitation reflètent la variation de l'intensité de luminescence fixée à une longueur d'onde d'émission en fonction de la longueur d'onde d'excitation. Cela traduit finalement l'évolution de l'absorbance des espèces émettant à la longueur d'onde fixée, à condition que l'intensité du faisceau incident soit indépendante de la longueur d'onde.

²²¹ B. Valeur, *Molecular Fluorescence : Principles and Applications*, Wiley-VCH : Weinheim, 2001.

Enfin, au vu des rendements quantiques calculés (Tableau 9), il apparaît que le chélate non-symétrique **Eu-106**, comportant une amine primaire, désactive la luminescence de l'euporium, mais cet effet reste assez limité par rapport à d'autres complexes terpyridines. Ceux-ci sont cependant dotés d'une aniline comme groupement dérivatisable en fonction bioconjugable, plus favorable à désactiver par PeT (*PhotoInduced electron Transfer*), soit l'état excité du chromophore, soit directement l'euporium(III) en le réduisant en euporium(II) ; une chute de l'intensité de luminescence allant jusqu'à 50% par rapport au chélate symétrique correspondant peut alors être observée.^{44b,222}

3.2. TEMPS D'EMISSION ET EVALUATION DU NOMBRE DE MOLECULES D'EAU PRESENTES DANS LA SPHERE INTERNE DE COORDINATION

Les durées d'émission de la bande à 615 nm des chélates **Eu-104** et **Eu-106** ont été déterminées dans des solutions d'eau ultrapure et d'eau lourde à la concentration de 10 μM à 25 °C. Ces mesures permettent de calculer le nombre de molécules d'eau, q , présentes dans la première sphère de coordination du métal. Ces valeurs, ainsi que celle du chélate **Eu(TMT)-AP₃** sont rassemblées dans le tableau suivant, et s'avèrent similaires à celles d'autres chélates nona-coordinés s'apparentant à une structure terpyridine (*cf.* Figure 34, chapitre 1).

Il semblerait que le bras lysine du complexe **Eu-106** diminue le temps d'émission du lanthanide mais cette variation reste limitée. Enfin, l'architecture complexante nona-coordinée permet d'expulser efficacement les molécules d'eau de la sphère de coordination de l'euporium puisqu'une valeur comprise entre 0 et 0.3(5) molécule d'eau est trouvée.

Chélate	τ (H ₂ O) (ms)	τ (D ₂ O) (ms)	q
Eu-104	1.35	2.35	0.3 (0)
Eu-106	1.30	2.30	0.35 (0)
Eu(TMT)-AP₃	1.41	2.28	0.3 (0)

Tableau 10 : Valeurs des temps de luminescence mesurés à 615 nm ainsi que du nombre q des chélates d'euporium.

Le calcul de q a été effectué en utilisant soit la première^{223a}, soit la deuxième expression (valeurs entre parenthèses dans le Tableau 10)^{223b} :

$$q_{\text{H}_2\text{O}} = 1.05 \times \left(\frac{1}{\tau_{\text{H}_2\text{O}}} - \frac{1}{\tau_{\text{D}_2\text{O}}} \right) \text{ ou } q_{\text{H}_2\text{O}} = 1.11 \times \left(\frac{1}{\tau_{\text{H}_2\text{O}}} - \frac{1}{\tau_{\text{D}_2\text{O}}} - 0.31 \right).$$

Ces formules, déterminées expérimentalement pour une catégorie de ligands (même structure chélatante généralement) et pour un lanthanide précis supposent que la

²²² V. M. Mukkala, H. Takalo, P. Liitti and I. Hemmilä, *J. Alloys Compd.*, **1995**, 225, 507-510.

²²³ a) W. D. Horrocks, Jr. and D. R. Sudnick, *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, 101, 334-340 ; b) R. M. Supkowski and W. D. Horrocks, Jr., *Inorg. Chim. Acta*, **2002**, 340, 44-48.

désactivation dans l'eau lourde par les vibreurs OD est négligeable face à la désactivation radiative (constante de vitesse k_r) et non-radiative naturelle (constante de vitesse k_{nr}).

$$k_{H_2O} = k_r + k_{nr} + k_{vibr}^{OH} + k_{vibr}^{XH} \quad k_{D_2O} = k_r + k_{nr} .$$
$$\Delta k = \frac{1}{\tau_{H_2O}} - \frac{1}{\tau_{D_2O}} = k_{vibr}^{OH} + k_{vibr}^{XH} .$$

Ainsi, la différence des constantes de vitesses de tous les processus conduisant à la désactivation du Ln(III) entre l'eau et l'eau lourde ne se résume « plus » qu'à la somme de celles liées aux vibreurs de haute énergie OH et XH. Le terme XH englobe toute liaison suffisamment proche du centre métallique capable d'inhiber sa luminescence (typiquement des amines primaires, secondaires et des amides).

La première formule appliquée ne prend pas en compte les molécules d'eau diffusant dans la sphère externe du lanthanide mais, bien qu'elles ne soient pas coordonnées au métal, participent néanmoins à sa désactivation. Quant à la deuxième, elle incorpore un facteur correctif (-0.31) intégrant ce processus : elle doit donc traduire plus justement la valeur exacte de q .

Quant au premier terme (ici 1.05 ou 1.11), il dépend du lanthanide et traduit sa capacité à être plus ou moins affecté par ces oscillateurs.

3.3. AJOUTS DOSES ET DETERMINATION DES COEFFICIENTS D'ABSORPTION MOLAIRE

La finalité de cette méthode est de pouvoir déterminer le plus justement possible la quantité de matière en ligand introduit dans la cuve UV et ainsi, grâce à la mesure de l'absorbance, de déduire, en utilisant la relation de Beer-Lambert, le coefficient d'absorption molaire à la longueur d'onde désirée du ligand et du chélate, ce dernier étant formé *in situ* lors des ajouts dosés en Eu(III).

La précision de cette technique dans le calcul des valeurs du coefficient d'absorption molaire ε provient du fait que la concentration en ions Eu(III) est connue avec une plus faible incertitude (30 à 40 mg de sel $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sont pesés pour préparer la solution mère) que la concentration en ligand ou en chélate (dans le cas où une mesure directe du coefficient d'absorption molaire est effectuée). En effet, ne disposant pas, d'une part de quantités en ligands et en chélates suffisantes pour préparer des solutions mères concentrées permettant de minimiser l'incertitude liée à la pesée, ni d'autre part à une analyse élémentaire fiable,²²⁴ il s'avère beaucoup plus simple de recourir aux ajouts dosés.

²²⁴ Après purification sur phase inverse en eau mQ/MeOH, les spectres RMN des ligands **104** et **106** en ^{19}F révèlent la présence de TFA résiduel utilisé pour déprotéger les groupements Boc et esters *tert*-butyliques. L'analyse élémentaire de **104** indiquerait environ 0.5 molécule de TFA par ligand mais les écarts avec la théorie s'élèvent respectivement à 1%, 5% et 5% pour le carbone, l'hydrogène et l'azote. Le ligand **106** n'a pas été analysé faute d'une quantité de matière suffisante.

Le dosage du TFA aurait aussi pu être entrepris par RMN du fluor mais demande un temps de mise en œuvre plus long.

Chapitre 2 : Conception d'un ligand original pyrazinique - Application du chélate d'euporium au marquage covalent de biomolécules.

Cette méthode est particulièrement adaptée aux ligands capables de complexer rapidement l'ion métallique à une stœchiométrie fixée (dans notre cas l'expérience montre, *vide infra*, qu'elle est de 1/1 en métal/ligand) et dont la partie chromophorique intervient aussi dans la complexation du lanthanide. Ainsi, la formation du chélate est visualisée par la modification du spectre d'absorption (Figure 82) : lorsqu'il n'évolue plus l'équivalence est atteinte et la quantité en europium ajoutée pour l'atteindre égale (dans le cas d'un complexe 1/1) celle en ligand initialement introduite.

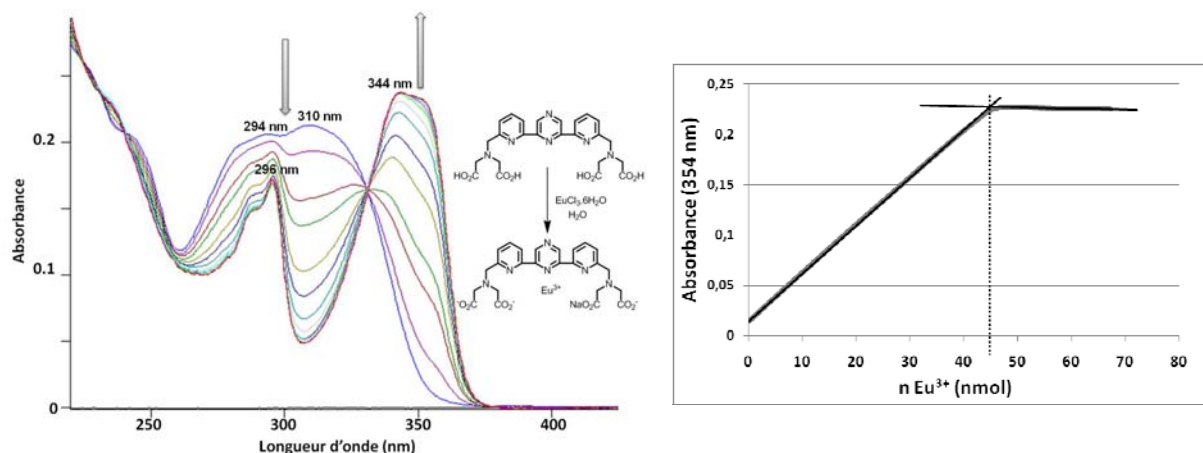


Figure 82 : Superposition des spectres d'absorption à différentes concentrations en Eu(III) et variation de l'absorbance, à 354 nm, du ligand 104 en fonction de la quantité en europium ajoutée (à partir d'une solution de concentration 0.48 mM, elle-même obtenue à partir d'une solution mère de concentration 10 mM, eau ultrapure, 25 °C).

La détection de l'équivalence s'est révélée plus précise en reportant, en fonction de la quantité d'euporium, les valeurs de l'absorbance à 354 nm et non à 344 nm car à l'approche du point équivalent son évolution n'est plus significative. L'intersection des « droites de tendance » avant et après équivalence permet de repérer la quantité stœchiométrique de lanthanide nécessaire pour former le chélate.

Les valeurs des coefficients d'absorption rapportées au Tableau 11 ont été déterminées en moyennant les résultats obtenus sur deux à trois dosages.

	Coefficient d'absorption molaire ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$), à λ (nm)				
	294	310	296	344	354
104	14 100	14 600	-	-	-
106	14 700	14 700	-	-	-
Eu-104	-	-	11 900	16 300	15 600
Eu-106	-	-	12 400	16 600	15 900

Tableau 11 : Coefficients d'absorption molaire des ligands et chélates à différentes longueurs d'onde déterminés par la méthode des ajouts dosés (eau ultrapure, 25 °C).

Cette méthode permet très grossièrement (puisque, pour chaque ligand, seulement 1 mg environ, avec une incertitude de 0.05 mg, a été pesé pour préparer les échantillons)

Chapitre 2 : Conception d'un ligand original pyrazinique - Application du chélate d'euprium au marquage covalent de biomolécules.

d'évaluer la quantité de TFA contenue dans les ligands avant complexation : environ 0.5 et 1.3 molécules d'acide pour, respectivement, les ligands **104** et **106** ont été calculées.

L'éclatement de la large bande d'absorption (260 – 350 nm) du ligand en deux bandes centrées à 296 et 344 nm, suite à la complexation est un phénomène classique dans le cas des terpyridines.²²⁵ Il est lié à la géométrie de la structure aromatique qui évolue d'une géométrie, probablement trans-trans, dans le cas de notre ligand, à cis-cis pour le chélate.

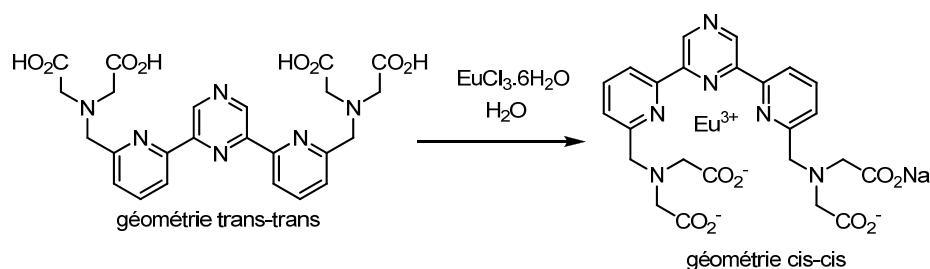


Schéma 6 : Variation de la géométrie du composé **104** suite à la complexation.

La bande d'absorption principale du ligand **104**, qui peut être considérée comme la résultante de l'absorption de deux motifs 2-pyridinylepyrazine distincts,²²⁶ est peu résolue car l'amplitude de la rotation des pyridines autour de la liaison $C_{\text{pyrazine}}-C_{\text{pyridine}}$ est nettement plus grande que dans le cas du chélate. Ce dernier, dont l'architecture aromatique dispose d'un degré de liberté plus faible suite à la complexation des doublets non-liants des azotes pyridiniques sur le cation métallique, possède un spectre d'absorption beaucoup mieux défini et présente un effet bathochrome significatif. En effet, l'euprium contraint le chromophore à adopter une géométrie plane exaltant la résonance des électrons n et π . Enfin, par analogie avec les structures terpyridine²²⁷ ou bis-pyrazolylepyridine^{102,124} la bande centrée à 296 nm correspondrait à l'absorption des pyridines et la bande à 344 nm à celle de la pyrazine.

III. BIOCONJUGAISON

Afin de connaître les propriétés de luminescence du chélate **Eu-106** après marquage sur un anticorps monoclonal modèle et de démontrer l'utilité potentielle de notre complexe comme sonde luminescente, il a été nécessaire d'activer au préalable l'amine primaire de son bras lysine. Cette dérivatisation permet d'introduire une fonction bioconjuguée essentiellement réactive vis-à-vis des amines primaires (extrémité *N*-terminale ou chaîne

²²⁵ K. Nakamoto, *J. Phys. Chem.*, **1960**, *64*, 1420-1425.

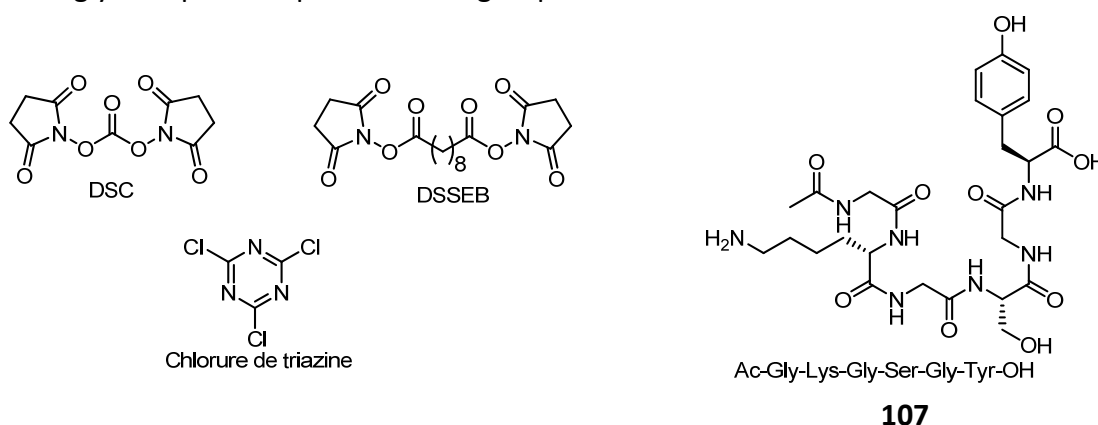
²²⁶ Par analogie avec les molécules bipyridine et terpyridine pour lesquelles un maximum d'absorption similaire a été observé. Par conséquent, au sein de la structure terpyridine, la pyridine en position *meta* de la bipyridine n'intervient que très peu dans le recouvrement orbitalaire. Sinon un déplacement plus prononcé vers le rouge aurait été observé (*cf.* référence précédente).

²²⁷ a) L. Prodi, M. Montalti, N. Zaccheroni, G. Pickaert, L. Charbonniere and R. Ziessel, *New J. Chem.*, **2003**, *27*, 134-139 ; b) L. Charbonnière, S. Mameri, P. Kadjane, C. Platas-Iglesias and R. Ziessel, *Inorg. Chem.*, **2008**, *47*, 3748-3762.

Chapitre 2 : Conception d'un ligand original pyrazinique - Application du chélate d'euprium au marquage covalent de biomolécules.

latérale des lysines accessibles de la biomolécule). Deux réactifs homobifonctionnels, le DSC (*disuccinimidyl carbonate*) et le DSSEB (*disuccinimidyl sebacate*) ainsi que le 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine (nommé chlorure de triazine par la suite)²²⁸ ont été testés.

En outre, dans l'objectif de déterminer la méthode d'activation optimale, une étape préliminaire d'un marquage du peptide modèle **107** a été entreprise. Ce dernier a été choisi car il contient trois acides aminés dont chacune des chaînes latérales comporte une fonction susceptible de réagir sur le chélate activé, à savoir une fonction alcool pour la sérine, phénol pour la tyrosine et amine primaire pour la lysine. En outre, ces acides aminés sont séparés par la glycine qui ne dispose d'aucun groupement réactif.



1 ACTIVATION DU CHELATE Eu-106

Les conditions de réaction utilisées avec les deux réactifs de couplage homobifonctionnels et le chlorure de triazine sont résumées dans le schéma suivant.

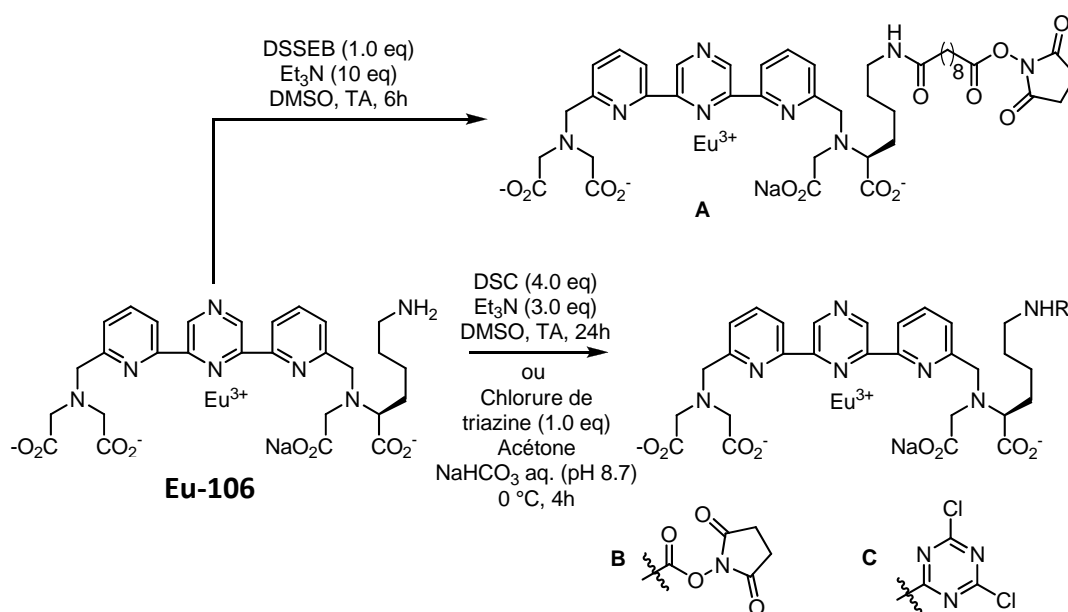


Schéma 7 : Réactions d'activation du chélate Eu-106.

²²⁸ Pour une revue sur les applications en synthèse de la triazine : G. Blotny, *Tetrahedron*, **2006**, 62, 9507-9522.

1.1. ACTIVATION AU DSC

L'utilisation du DSC n'a pas donné satisfaction, car la formation quantitative du carbamate activé **B-7**²²⁹ correspondant a requis l'emploi d'un large excès de ce réactif (4.0 eq). Or, afin d'éviter d'une part, toute compétition entre le DSC en excès et le chélate activé **B-7** et d'autre part afin de limiter les possibles réactions croisées dans le cas où des carbamates activés se formeraient sur des fonctions réactives de la biomolécule à marquer il a été nécessaire d'éliminer l'excès de DSC. Une purification par HPLC semi-préparative en eau ultrapure/MeCN a donc été effectuée mais le carbamate activé s'est hydrolysé, même au pH non basique de la phase mobile.²³⁰

En revanche, l'emploi d'un seul équivalent de chlorure de triazine ou de DSSEB a conduit à leur chélate activé respectif **C-7** et **A-7**.

1.2. ACTIVATION AU CHLORURE DE TRIAZINE

Cette réaction est effectuée à 0 °C par l'ajout, en une fois, de la solution de chlorure de triazine dissout dans l'acétone à la solution aqueuse basique (pH 8.7) contenant le chélate.

Cette activation présente quelques inconvénients : la forte réactivité de ce réactif de couplage conduit à la formation partielle du dimère **108** ce qui semble contradictoire avec les données concernant la réactivité de la triazine.²³¹ Si le premier atome de chlore est facilement substitué à 4 °C et à pH 9 par les alcools ainsi que par les amines primaires et secondaires, la substitution du second devient possible au même pH mais à TA. Après substitution des deux premiers atomes de chlore le troisième n'est réactif que vers 80 °C.

Quatre heures après l'ajout du chlorure de triazine, les proportions, déterminées en HPLC analytique²³² grâce au chromatogramme obtenu à 344 nm, en chélate **Eu-106**, dimère **108** et chélate activé désiré **C-7** sont respectivement de 33, 4 et 63%. La totalité du complexe d'euprium peut réagir mais dans ce cas la proportion en dimère augmente. Par exemple, après trois semaines à -22 °C le mélange réactionnel contient majoritairement le dimère (63 contre 37% en **C-7** ; ce pourcentage est approximatif car, *a priori*, le coefficient d'absorption molaire du dimère doit être plus élevé). Le meilleur compromis est d'engager le brut réactionnel avant que la conversion en complexe activé ne soit complète ou d'abaisser son pH (sans décomplexer le lanthanide) et de le stocker à -22 °C. Une deuxième limitation de cette voie d'activation semble être sa faible reproductibilité : un deuxième essai d'activation

²²⁹ a) K. Takeda, Y. Akagi, A. Saiki, T. Tsukahara and H. Ogura, *Tetrahedron Lett.*, **1983**, *24*, 4569-4572 ; b) M. Morpurgo, E. A. Bayer and M. Wilchek, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **1999**, *38*, 17-28 ; c) G. Clavé, H. Boutal, A. Hoang, F. Perraut, H. Volland, P.-Y. Renard and A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, *6*, 3065-3078 ; d) R. Mhidia, A. I. Vallin, N. Ollivier, A. Blanpain, G. Shi, R. Christiano, L. Johannes and O. Melnyk, *Bioconjugate Chem.*, **2010**, *21*, 219-228.

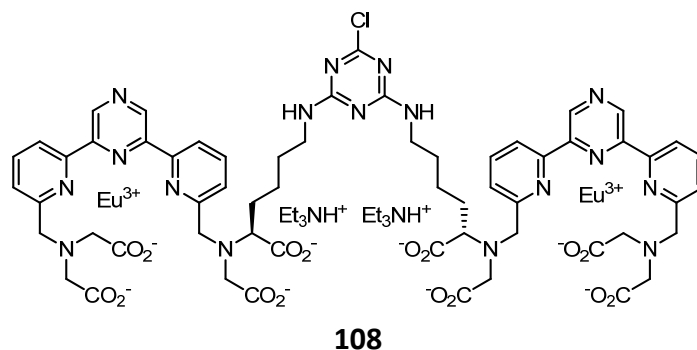
²³⁰ Aucune tentative de purification en acide acétique ou formique (plus doux que le TFA) n'a été envisagée.

²³¹ G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, **1996**, Academic Press, San Diego, pp 605-629.

²³² Elution en TEAA (*TriEthylAmmonium Acetate*) et MeCN.

Chapitre 2 : Conception d'un ligand original pyrazinique - Application du chélate d'europium au marquage covalent de biomolécules.

dans les mêmes conditions a conduit, toujours après 4h de réaction au profil suivant : 41, 19 et 40% en chélate **Eu-106**, dimère **108** et complexe **C-7** (cf. Figure 83).



L'emploi de ce réactif ne s'avère donc pas optimal pour activer des amines primaires (cependant aucun essai à pH moins basique n'a été réalisé). Il est vrai que ce composé est utilisé, au moins dans le cas des chélates de lanthanides bioconjuguables, exclusivement pour activer une aniline (**Eu-32/35** et **Tb-39**, Figure 34) réactive à pH moins basique. La réaction s'effectue à TA dans un mélange d'acétone et de tampon acétate à pH 4.9.^{89,97,100} De plus, la forte réactivité du chlorure de triazine peut être modulée en lui pré-substituant un des atomes de chlore avant l'étape d'activation du chélate.²³³

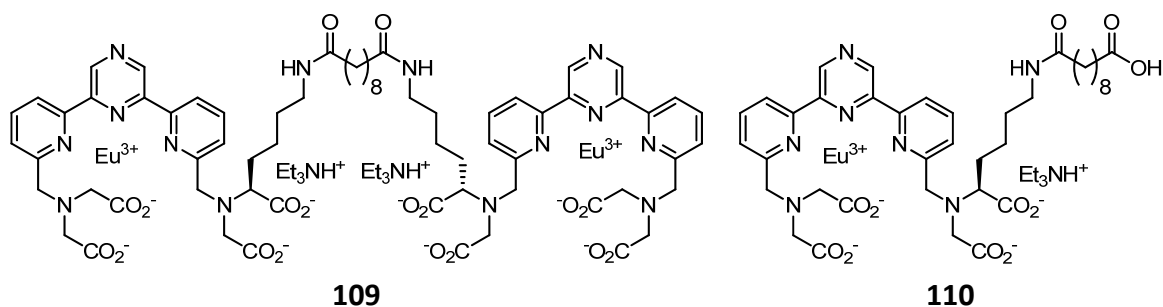
Le chélate activé selon cette voie a néanmoins été testé dans l'étape de marquage du peptide **107** et des anticorps (*vide infra*).

1.3. ACTIVATION AU DSSEB

L'activation au DSSEB a été effectuée de façon plus progressive afin de limiter la formation du composé dimérique **109** : le chélate **Eu-106**, dissout dans le DMSO et la Et₃N (v/v 98/2), est ajouté en plusieurs portions à la solution de DMSO contenant le réactif homobifonctionnel.

Finalement, ce mode d'activation apparaît plus avantageux que le précédent car après consommation totale du chélate **Eu-106** la proportion d'ester activé **A-7** s'élève à 70% (26% pour le dimère **109** et 3% pour le chélate activé hydrolysé **110** ; les proportions ont été mesurées comme précédemment, à partir du chromatogramme à 344 nm obtenu en HPLC analytique).

²³³ H. Karsilayan, I. Hemmilä, H. Takalo, A. Toivonen, K. Pettersson, T. Lövgren and V. M. Mukkala, *Bioconjugate Chem.*, **1997**, 8, 71-75.



2 MARQUAGE DU PEPTIDE MODELE ET PROPRIETES DE LUMINESCENCE

2.1. SYNTHÈSE DU PEPTIDE

Le peptide **107** a été synthétisé sur phase solide en utilisant un automate de synthèse peptidique en utilisant la stratégie « Fmoc/*t*-Bu ». ²³⁴ La phase solide est un copolymère constitué de polystyrène et de 1% de divinylbenzène sur lequel est greffé l'alcool *para*-benzyloxybenzylique (résine de Wang).

Le premier acide aminé est greffé « manuellement » à la résine par estérification à l'aide de DIC/DMAP dans un mélange DCM/NMP. L'extrémité *N*-terminale de chaque acide aminé utilisé est protégée par un groupement Fmoc. Après accrochage sur le peptide greffé à la résine cette fonction est clivée par la pipéridine afin de libérer l'amine. Celle-ci peut alors réagir avec l'acide aminé suivant, dont la fonction acide *C*-terminal a été préalablement activé par HBTU et HOBt en milieu basique (DIEA) dans un mélange DMF/NMP. Cette séquence est répétée pour chaque acide aminé à coupler (Schéma 8).

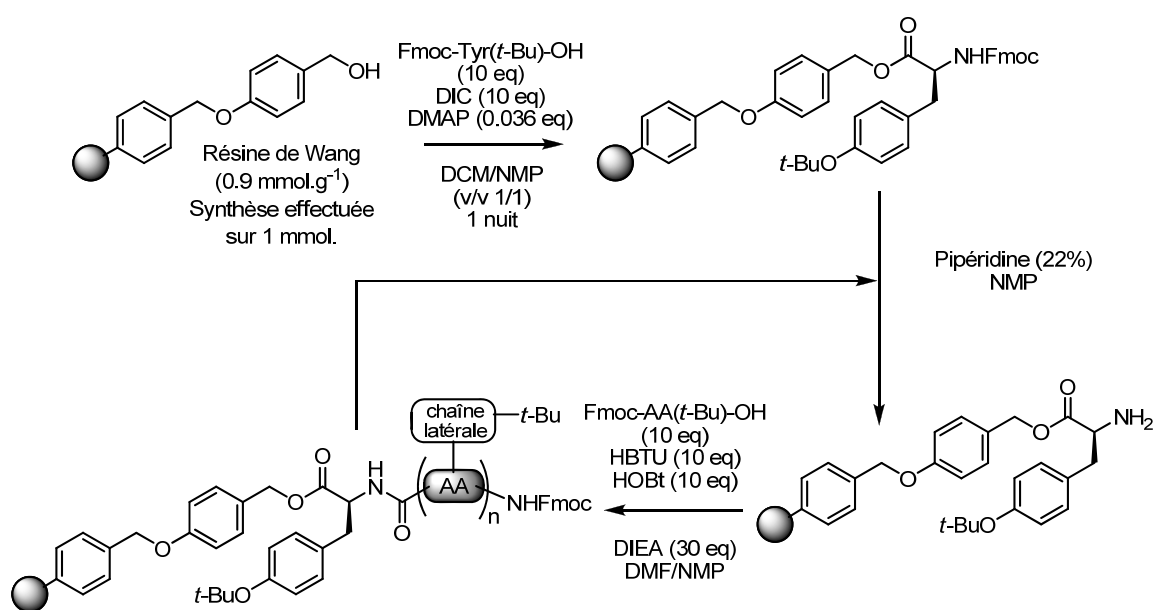


Schéma 8 : Séquence réactionnelle de la formation du peptide **107** en phase solide (AA : acide aminé).

²³⁴ N. Sewald and H.-D. Jakubke, *Peptides : chemistry and biology*, **2002**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp 135-267.

Chapitre 2 : Conception d'un ligand original pyrazinique - Application du chélate d'euprium au marquage covalent de biomolécules.

Les fonctions alcool et phénol des chaînes latérales de la sérine et de la thyrosine sont protégées sous forme d'éther *tert*-butylique. Quant à l'amine primaire de la lysine, elle est protégée par un groupement Boc. Ces groupes protecteurs, inertes lors de la déprotection du Fmoc en milieu basique, sont labiles en milieu TFA tout comme le lien ester entre la résine de Wang et la thyrosine.

Ainsi, après déprotection du Fmoc du dernier acide aminé couplé, l'extrémité *N*-terminale est acétylée (sinon elle serait susceptible de réagir aussi sur le chélate activé), puis le traitement au TFA permet d'une part de libérer les fonctions phénol, alcool et amine des chaînes latérales et d'autre part de cliver le peptide de la résine (Schéma 9).

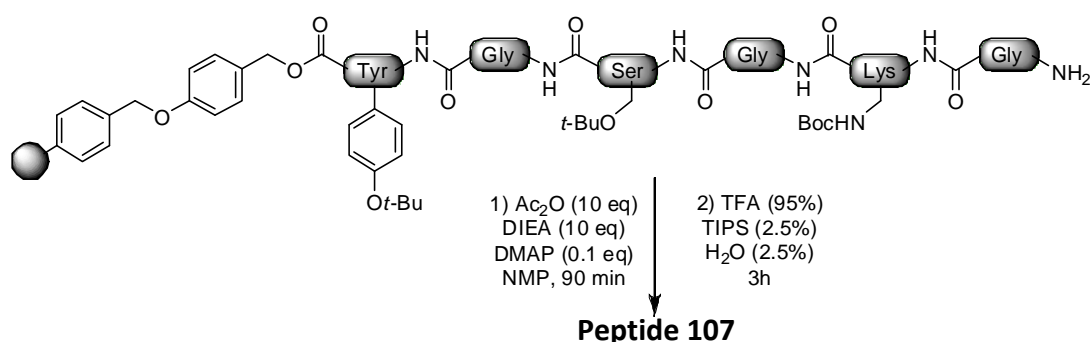


Schéma 9 : Clivage acide permettant de libérer le peptide modèle.

2.2. BIOCONJUGAISON

Les chélates d'euprium activés au chlorure de triazine (**C-7**) et au DSSEB (**A-7**) ont été couplés à l'hexa-peptide **107**. Dans les deux cas, trois équivalents de chélate (en supposant, pour simplifier, que l'étape d'activation soit quantitative) sont introduits à une solution aqueuse de NaHCO₃ 0.1 M (pH 8.5) contenant le peptide (Schéma 10).

L'évolution de la réaction de marquage est suivie par analyse HPLC et LC-MS. Comme prévu le peptide marqué par un seul chélate (*a priori* via l'amine primaire de la lysine) est détecté dans les deux cas (**A-10** et **B-10**).

Chapitre 2 : Conception d'un ligand original pyrazinique - Application du chélate d'euprium au marquage covalent de biomolécules.

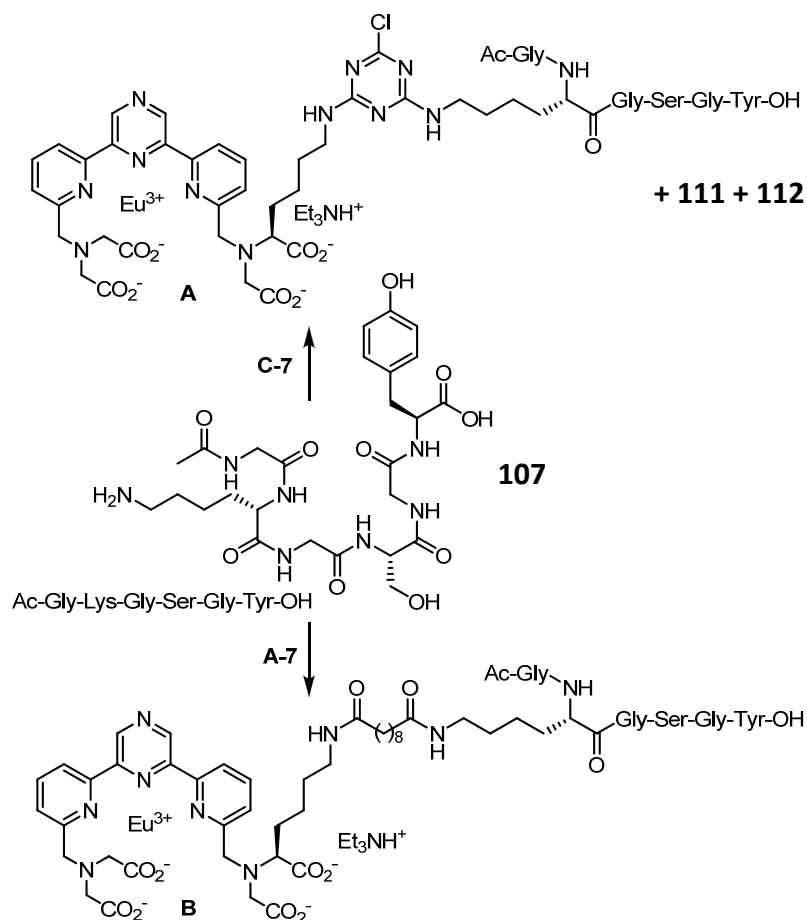


Schéma 10 : Marquage de l'hexa-peptide modèle.

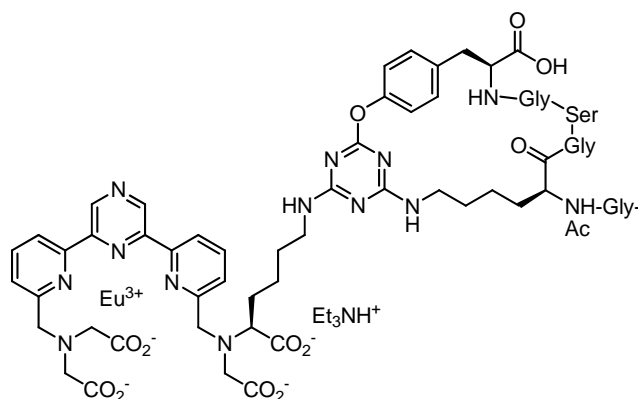
En revanche, deux produits supplémentaires contenant de l'euprium (isotopie singulière, facilement détectable par spectrométrie de masse) sont repérés, mais seulement avec le chélate activé à la triazine (C-7). L'analyse par spectrométrie de masse semble confirmer que l'un des produits est issu de la substitution intramoléculaire du troisième atome de chlore de la triazine par le phénol de la tyrosine (111) alors que l'autre produit contiendrait deux chélates, le deuxième étant lié par la tyrosine (112). Il apparaît donc clairement que dans ces conditions de marquage (TA, pH 8.5) la triazine est suffisamment réactive vis-à-vis des phénols²³⁵ et que, le dernier atome de chlore, pourtant moins réactif²³¹ peut être substitué en réaction intramoléculaire par un phénol.

Le mélange réactionnel est ensuite purifié par HPLC semi-préparative en utilisant une phase mobile aqueuse légèrement basique (solution de TEAB : *TriEthylAmmonium Bicarbonate*, 50 mM, pH 7.5) en présence de MeCN. Seuls les peptides marqués A-10 et 112 sont récupérés ; le peptide marqué cyclisé 111 possède malheureusement un temps de rétention trop proche du chélate dimérique 108 (cf. Figure 83) qui ne permet pas de les séparer.

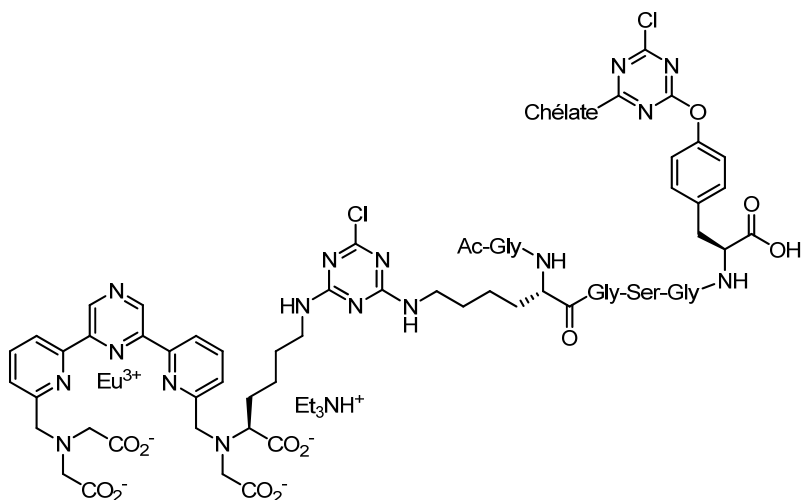
De façon beaucoup plus satisfaisante, pour le marquage par le chélate activé au DSSEB, seul le peptide « monomarqué » désiré B-10 est obtenu.

²³⁵ Y. Gotoh, M. Tsukada and N. Minoura, *Bioconjugate Chem.*, **1993**, 4, 554-559.

Chapitre 2 : Conception d'un ligand original pyrazinique - Application du chélate d'euprium au marquage covalent de biomolécules.



111



112

2.3. RENDEMENTS DE BIOCONJUGAISON

Les quantités de matières engagés étant faibles (217 nmol de peptide pour chaque réaction), le moyen permettant de déterminer avec le moins d'incertitude possible le rendement du marquage se fonde sur la mesure de l'absorbance car elle est reliée à la concentration par la relation de Beer-Lambert. Il faut aussi supposer que le coefficient d'absorption molaire du chélate **Eu-106** est identique à celui des chélates greffés au peptide. Aussi, la longueur d'onde d'absorption choisie doit être spécifique du chélate. Celle à 344 nm (ϵ étant de $16\,600\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) est donc parfaitement adaptée puisque le peptide est totalement transparent dans cette zone spectrale.

Après purification en phase inverse par HPLC semi-préparative, les différents peptides marqués sont dilués dans un volume précis d'eau ultrapure. Une fraction connue de ce volume est diluée dans la cuve permettant de mesurer l'absorbance à 344 nm. Les valeurs obtenues permettent de déduire la quantité de peptide contenue dans la solution mère grâce à l'équation de Beer-Lambert. Les rendements de marquage pour les différents peptides purifiés sont rassemblés dans le Tableau 12.

Chapitre 2 : Conception d'un ligand original pyrazinique - Application du chélate d'euprium au marquage covalent de biomolécules.

Mode d'activation	Composé	Quantité de matière	rendement
Chlorure de triazine	A-10	11.1 nmol	5.1%
	112	3 nmol	1.4%
DSSEB	B-10	35 nmol	16.1%

Tableau 12 : Rendements des différents peptides marqués puis isolés par HPLC.²³⁶

En ne considérant que les peptides **A-10** et **112**, il apparaît que le complexe activé au DSSEB conduit à un marquage plus efficace, ce qui peut être attribué à l'étape d'activation qui se montre plus univoque. Cependant le peptide cyclisé **111** marqué par le chélate activé à la triazine n'a pu être récupéré pur car son temps de rétention avoisine celui du chélate dimérique **108**. Or, parmi les différents peptides marqués, celui nettement majoritaire s'avère justement être le peptide **111** (pic 4, Figure 83). Cependant le mélange de ces deux produits, même si le *ratio* semble nettement en faveur du composé **111** (d'autant que le dimère doit absorber plus) n'a pas été récupéré puisque l'objectif dans un premier était plus de déterminer les rendements quantiques que ceux de l'étape de marquage. En outre, l'activation au DSSEB se montrait aussi beaucoup plus fiable.

Pour conclure, le marquage par une activation préalable au chlorure de triazine est probablement plus efficace qu'avec un ester de NHS. Néanmoins, après accrochage de la sonde lumineuse sur une biomolécule le chlore restant de la triazine pourrait, d'après l'observation précédente, encore être réactif et par suite induire des modifications de réactivité du vecteur biologique.

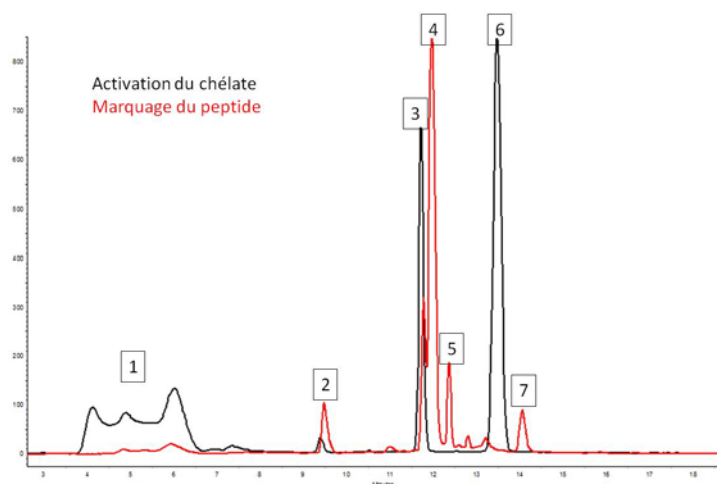


Figure 83 : Superposition des profils d'éluion HPLC analytique, enregistrés à 344 nm, de l'activation à la triazine du chélate Eu-106 (noir) et du marquage du peptide modèle 107 (rouge) par ce même chélate activé (1 : chélate Eu-106 ; 2 : produit non déterminé dont le spectre d'absorption est similaire au chélate Eu-106 ; 3 : chélate dimérique 108 ; 4 : peptide cyclique 111 ; 5 : peptide marqué attendu A-10 ; 6 : chélate activé C-7 ; 7 : peptide doublement marqué 112).

²³⁶ Les faibles rendements d'accrochage peuvent aussi s'expliquer par des pertes lors de la purification et de la lyophilisation des peptides, l'échelle de travail étant petite.

2.4. PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES

Mode d'activation	Composé	Φ ($\lambda_{exc} = 344$ nm, en %)		τ (en ms)
		Eu(TMT)-AP ₃ *	R6G	
Chlorure de triazine	A-10	11.5 (15.0)	9.8	1.31
	112	12.4 (16.1)	10.5	-
DSSEB	B-10	13.3 (17.3)	11.3	1.31

Tableau 13 : Rendements quantiques et temps d'émission (à 615 nm) des peptides marqués (mesures effectuées dans l'eau ultrapure ; les valeurs de τ ont été déterminées à une concentration de 10 μ M ;* les valeurs entre parenthèses sont obtenues en appliquant comme rendement quantique 22.0%).

Les rendements quantiques relatifs, toujours calculés par la méthode des standards, révèlent, quelque soit le mode d'activation, que les complexes accrochés sur le peptide émettent légèrement moins intensément que le chélate libre **Eu-106** dont la valeur est de l'ordre de 14% à 344 nm (*cf.* Tableau 9). Aussi, le rendement quantique du peptide **B-10** marqué par le chélate activé au DSSEB (**A-7**) est légèrement supérieur. Ces observations semblent indiquer, bien que l'effet reste modeste, que plus le peptide est proche de la sonde lanthanidique luminescente et plus l'intensité de cette dernière diminue. En outre, le conjugué **112** contenant deux chélates possède un rendement quantique similaire au composé « monomarké » **A-10** ce qui est bien en accord avec le fait que ces complexes sont peu sensibles au *self-quenching*. Enfin, la durée de vie d'émission n'est pas modifiée par rapport à **Eu-106**.

3 MARQUAGE DES ANTICORPS ET PROPRIETES DE LUMINESCENCE

Même si l'activation au chlorure de triazine conduit à un chélate activé potentiellement « trop » réactif, ce dernier, ainsi que son homologue activé au DSSEB, ont été couplés à deux anticorps monoclonaux dirigés contre des étiquettes polypeptidiques classiques : 9E10 anti c-myc et 12CA5 anti HA (par la suite désignés 9E10 et 12CA5). L'objectif serait de pouvoir, grâce aux anticorps marqués avec le chélate d'euprium(III), de pouvoir suivre une protéine d'intérêt marquée avec une des deux étiquettes polypeptidiques par ingénierie génétique, en particuliers dans des expériences d'immunohistochimie. Une alternative serait d'utiliser des anticorps monoclonaux marqués avec ces chélates de lanthanide dans des immunodosages, les deux anticorps choisis servent donc de modèles d'immunoglobulines.

3.1. BIOCONJUGAISON

3.1.1 REACTION DE MARQUAGE

Les réactions de bioconjugaison ont été effectuées sans modification du milieu dans lequel les anticorps sont stockés, *i.e.* 500 μ L de tampon PBS 0.1 M (pH 6.5) contenant 0.01% d'azoture de sodium. De plus les solutions d'anticorps 12CA5 sont plus concentrées que

Chapitre 2 : Conception d'un ligand original pyrazinique - Application du chélate d'euporium au marquage covalent de biomolécules.

celles contenant 9E10 (1.8 mg.mL⁻¹ contre 0.7 mg.mL⁻¹ soit, respectivement, pour une solution de 500 µL, 6.0 nmol et 2.3 nmol (les anticorps possèdent chacun une masse de 150 kDa)).

Enfin, le brut réactionnel de l'étape d'activation du chélate est ajouté à la solution d'anticorps afin d'atteindre un excès de 24 ou 72 équivalents (en considérant toujours, même si ce n'est pas le cas, que la formation des chélates activés **A-7** et **C-7** est quantitative), puis le milieu réactionnel est laissé à TA pendant une nuit sans agitation.

3.1.2 PURIFICATION

Initialement le mélange réactionnel a été purifié sur gel d'exclusion stérique en éluant avec du tampon PBS 0.01 M. Le principe de cette méthode est de séparer les composés selon leur taille : les plus volumineux seront élués plus rapidement. Ainsi les anticorps marqués et non marqués, de poids moléculaire importants seront élués plus rapidement que les chélates activés (et hydrolysés) de masse beaucoup plus faible. En revanche, le gel commercial utilisé (SephadexTM G25 ou SepharoseTM 6B qui sont constitués de billes de polysaccharide) ne permet pas de séparer efficacement les biomolécules de composés ayant un poids moléculaire compris entre 1 000 et 5 000 g.mol⁻¹.

Cette méthode de purification a été mise en œuvre après le marquage des anticorps 9E10 et 12CA5 seulement avec le chélate activé à la triazine. Un volume en gel de 8 mL est utilisé et chaque fraction collectée contient environ 1 mL d'éluant. Cependant, il semblerait que la résolution soit assez mauvaise car les fractions luminescentes ne sont pas séparées ne serait-ce que par une seule fraction pas ou peu luminescente. En outre, pour les fractions présentant un profil d'absorbance correct (bande d'absorption à 280 nm bien définie, correspondant à l'absorbance des résidus tyrosine des anticorps), le rapport des intensités à 280 et 344 nm n'est pas toujours similaire (Fr 3-4 Figure 84C et Fr 3-4 Figure 84D). Il apparaît évident que les chélates en excès ne sont pas retenus suffisamment longtemps dans les pores de la phase stationnaire. De plus, il se peut que le gel d'exclusion stérique utilisé ne permette pas une séparation franche compte tenu de la masse relativement importante du dimère **108**, à savoir 1 598 g.mol⁻¹.

Chapitre 2 : Conception d'un ligand original pyrazinique - Application du chélate d'euprium au marquage covalent de biomolécules.

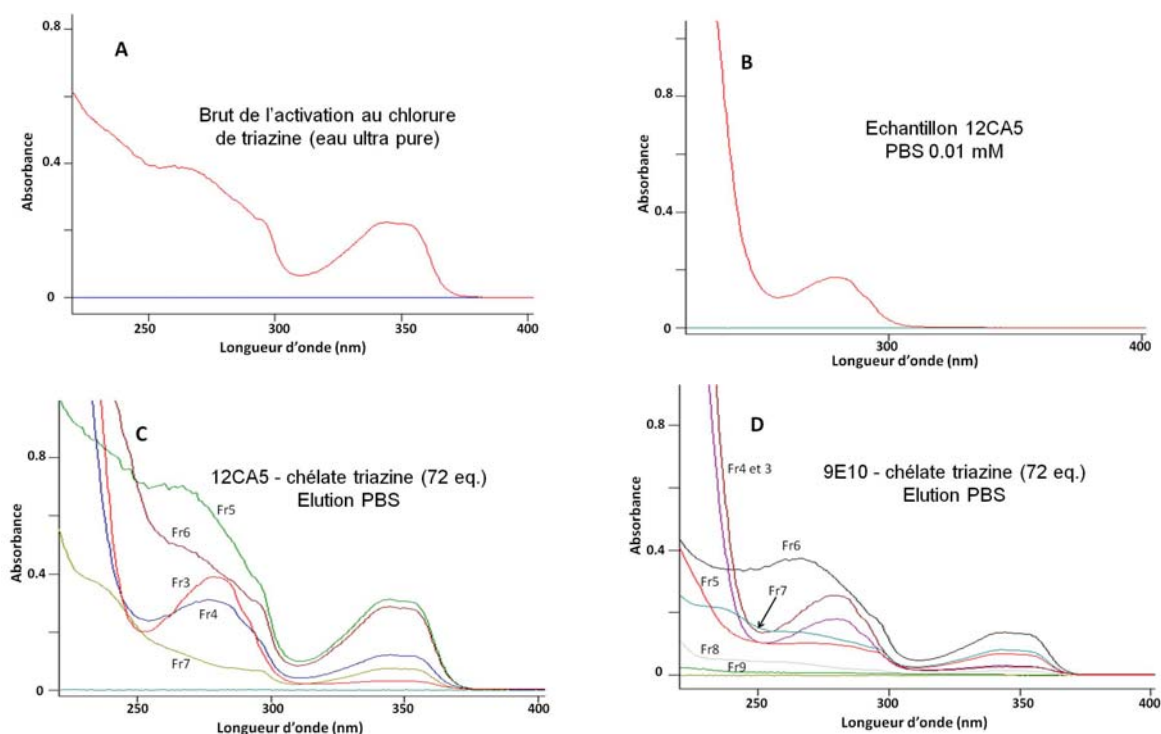


Figure 84 : Spectres d'absorption du chélate activé à la triazine (A ; l'absorbance vers 260 nm est principalement due à l'acétone résiduelle), de l'anticorps 12CA5 anti HA (B) et des différentes fractions obtenues après purification par exclusion stérique (C et D).

Ces premières tentatives de purification peu concluantes nous ont amenés à employer une deuxième technique : la chromatographie d'affinité avec la protéine A. Il s'agit d'une protéine de source bactérienne ayant la capacité de se fixer sur le domaine constant des chaînes lourdes (Figure 49) de certains anticorps (principalement les immunoglobulines de type G) ; elle est fixée de façon covalente, par l'intermédiaire d'un bras de fixation, à la phase stationnaire qui peut être constituée de billes de polysaccharides comme la SephadexTM ou la SepharoseTM mais d'autres matrices sont aussi utilisées. La reconnaissance entre les protéines A et l'anticorps est de nature électrostatique et s'effectue en milieu basique (tampon borate pH 8.5). Dès que les fractions ne contiennent plus d'espèces luminescentes les anticorps marqués sont décrochés en éluant avec un tampon glycine acide (pH 3.5). Les fractions sont ensuite neutralisées par ajout d'un tampon Tris-HCl pH 8.5 (*cf.* Partie Expérimentale). Les profils d'absorbance des fractions luminescentes après élution sont désormais plus cohérents. (Figure 85).

Chapitre 2 : Conception d'un ligand original pyrazinique - Application du chélate d'euprium au marquage covalent de biomolécules.

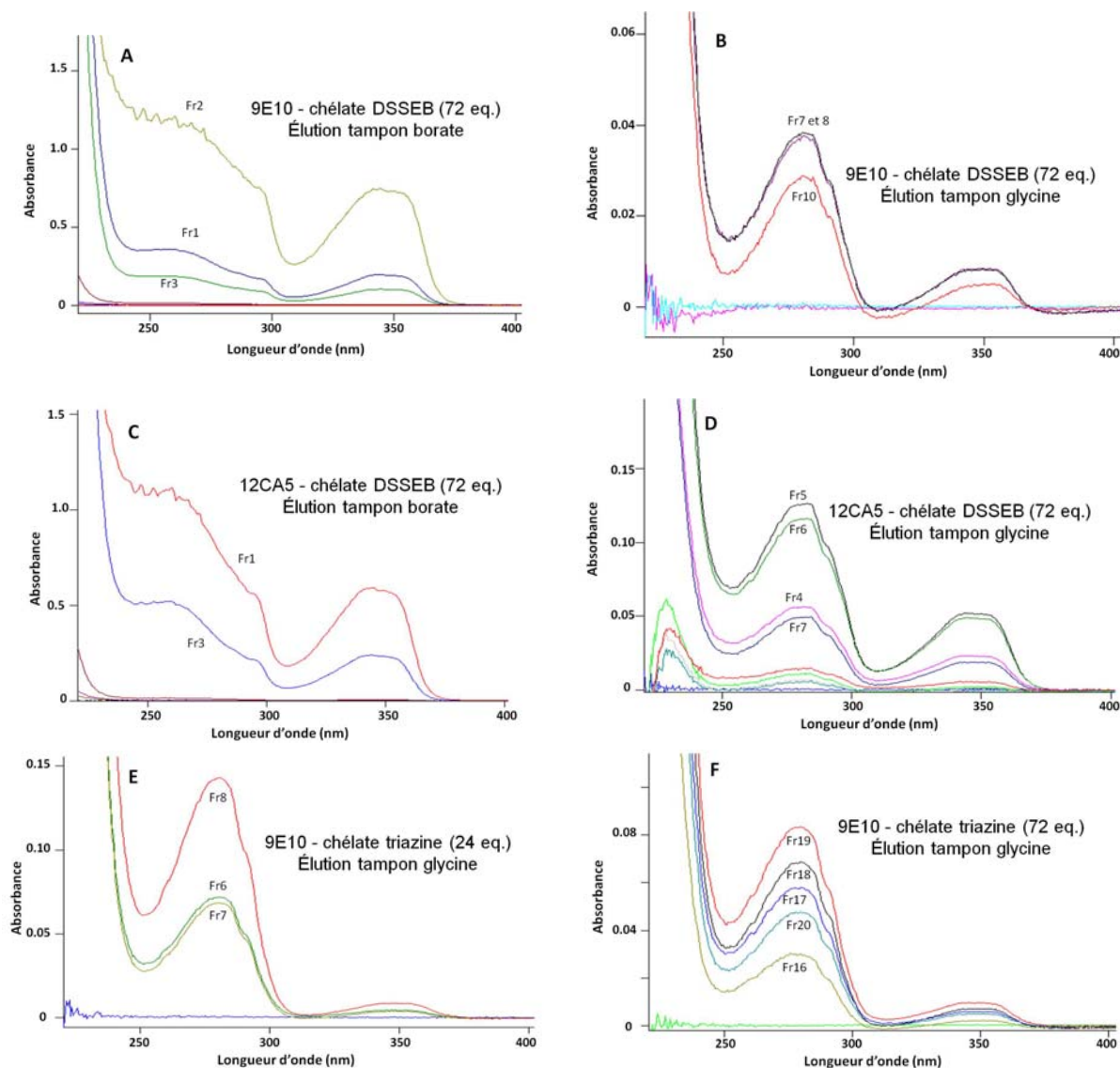


Figure 85 : Spectres d'absorption des fractions luminescentes issus des purifications sur gel de protéines A (A et B : avant et après décrochage des anticorps 9E10 marqués par le chélate activé au DSSEB ; C et D : avant et après décrochage des anticorps 12CA5 marqués par le chélate activé au DSSEB ; E et F : après décrochage des anticorps 9E10 marqués par le chélate activé à la triazine en excès respectivement de 24 et 72 eq.).

3.1.3 TAUX DE GREFFAGE

Pour déterminer le nombre de complexes luminescents par anticorps (Tableau 14) il faut évidemment connaître le rapport entre la concentration en anticorps et celle en chélates ; elles se calculent aisément par spectroscopie d'absorption UV-visible. La concentration d'anticorps en μM est obtenue avec la relation suivante, issue de la loi de Beer-Lambert, déterminée de façon empirique pour l'ensemble des anticorps monoclonaux IgG, qui ont une composition en acides aminés similaire, aux quelques acides aminés des boucles hypervariables près :

$$[mAb] = \frac{Abs_{280nm} - 0.5 \times Abs_{344nm}}{1.48 \times 0.15}$$

Chapitre 2 : Conception d'un ligand original pyrazinique - Application du chélate d'euporium au marquage covalent de biomolécules.

Les coefficients d'absorption molaire des anticorps sont généralement données en $\epsilon_{\text{percent}}$ à 280 nm ce qui correspond à la valeur de ϵ à 280 nm pour une solution contenant 1% (soit 1 g pour 100 mL) de l'espèce absorbante dans une cuve d'un centimètre d'épaisseur (pour les deux anticorps utilisées $\epsilon_{\text{percent}}$ est de 14.8) ; l'unité de la concentration calculée sera alors en 10 mg.mL^{-1} . Le dénominateur de l'équation peut être modifié afin d'obtenir directement la concentration en μM (sans l'introduction de la masse molaire des anticorps au dénominateur (150 kDa chacun soit $0.15 \text{ g.}\mu\text{L}^{-1}$) la concentration serait en mg.mL^{-1} ou g.L^{-1}). Le coefficient d'absorption à 280 nm des anticorps étant connue, il suffit désormais de déterminer à cette même longueur d'onde la proportion de l'absorbance provenant exclusivement des biomolécules et par suite de connaître celle issue des chélates. Cette dernière se déduit simplement par la mesure du *ratio* $\text{Abs}_{280\text{nm}}/\text{Abs}_{344\text{nm}}$ du chélate **Eu-106** (une valeur de 0.5 dans l'eau ultrapure a été mesurée ; les spectres d'absorption des chélates activés **A-7** et **C-7** obtenus lors des analyses des mélanges réactionnels par HPLC analytique montrent que ce rapport n'est pas sensiblement modifié). La valeur de « référence » est choisie à 344 nm car à cette longueur d'onde les anticorps n'absorbent pas ; d'où la formule du numérateur qui traduit alors l'absorbance exclusive de l'anticorps. La concentration en chélate est mesurée à partir de l'absorbance à 344 nm et du coefficient d'absorption molaire du chélate libre **Eu-106** à cette même longueur d'onde ($16\,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Anticorps marqué	Mode d'activation du chélate	Taux de marquage
9E10 anti c-myc	Chlorure de triazine	1.7 (0.8)
	DSSEB	3.4
12CA5 anti HA	DSSEB	7.4

Tableau 14 : Nombre de chélates d'euporium greffés par anticorps. Entre parenthèses, valeurs obtenues avec 24 eq. de chélate, 72 eq. ont été engagés pour les autres réactions de marquage.

Même si ce résultat paraît évident, un excès plus important en complexe conduit à un nombre de sondes luminescentes par biomolécule plus grand.

Aussi, l'activation par le DSSEB permet une accroche plus efficace alors que le chlorure de triazine est plus réactif que l'ester de NHS. Néanmoins l'étape d'activation à la triazine s'est avérée moins fiable, ainsi l'explication la plus probable est que l'excès en chélate activé est plus faible dans le cas du chlorure de triazine. En outre, le bras de liaison sébaçate séparant le chélate du site réactif est plus long, ce qui facilite l'approche entre la sonde et une lysine de la biomolécule.

De plus, dans des conditions de réaction identiques (mêmes quantités de chélates issus du même mode d'activation et du même mélange réactionnel), le taux de marquage de 12CA5 est plus élevé. Il semblerait donc que le nombre de sites réactifs accessibles présents sur cet anticorps est plus abondant que sur le 9E10. Cependant, le fait que l'échantillon 12CA5 soit

Chapitre 2 : Conception d'un ligand original pyrazinique - Application du chélate d'euprium au marquage covalent de biomolécules.

plus concentré (1.8 mg.mL^{-1} contre 0.7 mg.mL^{-1}) pourrait aussi améliorer l'efficacité de l'accroche par une probabilité de rencontre des deux réactifs plus grande.

Enfin, les taux de marquage obtenus sont satisfaisants : par exemple, pour une protéine de 160 kDa, si le chélate utilisé est **Eu-34**, un taux entre 4 et 10 est idéal.²³⁷ Ce *ratio* aurait aussi pu être probablement amélioré avec une augmentation du pH, mais nous avons préféré travailler à pH 7.4 pour s'assurer de conserver les propriétés de reconnaissance des anticorps.

3.2. RENDEMENTS QUANTIQUES

Les rendements quantiques relatifs des anticorps marqués et purifiés par chromatographie d'affinité ont été mesurés directement dans le mélange de tampon glycine (0.1 M, pH 3.5) et Tris-HCl (0.5 M, pH 8.5), dont chaque fraction en contient respectivement 750 μL et 50 μL approximativement.

Anticorps	Mode d'activation	Fraction	Φ ($\lambda_{\text{exc}} = 344 \text{ nm}$, en %)		Taux de marquage
			Eu(TMT)-AP ₃ **	R6G	
9E10 anti c-myc	Chlorure de triazine	Fr 8*	5.5 (7.2)	4.7	0.8
		Fr 19	5.3 (6.9)	4.5	1.7
	DSSEB	Fr 7	10.9 (14.2)	9.3	3.5
		Fr 8	10.4 (13.5)	8.9	3.3
12CA5 anti HA	DSSEB	Fr 4	10.0 (13.0)	8.5	7.3
		Fr 5	10.0 (13.0)	8.5	7.6
		Fr 6	10.2 (13.3)	8.7	7.3

Tableau 15 : Rendements quantiques de certaines fractions contenant les anticorps marqués et leur taux de marquage (* : marquage effectué avec 24 eq. du chélate activé à la triazine C-7 ; pour toutes les autres réactions 72 eq. ont été engagés ; ** les valeurs entre parenthèses sont obtenues en appliquant comme rendement quantique 22.0%).

Comme pour les chélates liés au peptide, les rendements quantiques sont plus faibles, néanmoins l'effet s'avère plus prononcé. Il doit très certainement s'agir d'interactions provenant de l'anticorps et non du milieu dans lequel sont effectuées les mesures (eau ultrapure pour le peptide contre un mélange de tampons glycine et Tris-HCl pour les anticorps). En effet la diminution est nettement moins forte dans le cas d'une activation au DSSEB alors que le milieu aqueux utilisé avec la triazine est identique. Ainsi, le rendement quantique est deux fois plus grand si le chélate est activé au DSSEB : la longueur du bras d'accrochage pourrait donc limiter des interactions protéine/chélate inhibant la luminescence sachant que l'intensité de ces interactions est semblable quelque soit l'anticorps (les rendements quantiques sont sensiblement les mêmes pour les chélates **A-7** fixés sur 9E10 ou 12CA5).

²³⁷ Selon Perkin Elmer, une valeur de 4 à 10 chélates **Eu-34** (Figure 34) par protéine (de poids moléculaire supérieur à 100 kDa) est un bon ratio (cf. http://las.perkinelmer.com/Content/manuals/man_ad0020.pdf).

Chapitre 2 : Conception d'un ligand original pyrazinique - Application du chélate d'euporium au marquage covalent de biomolécules.

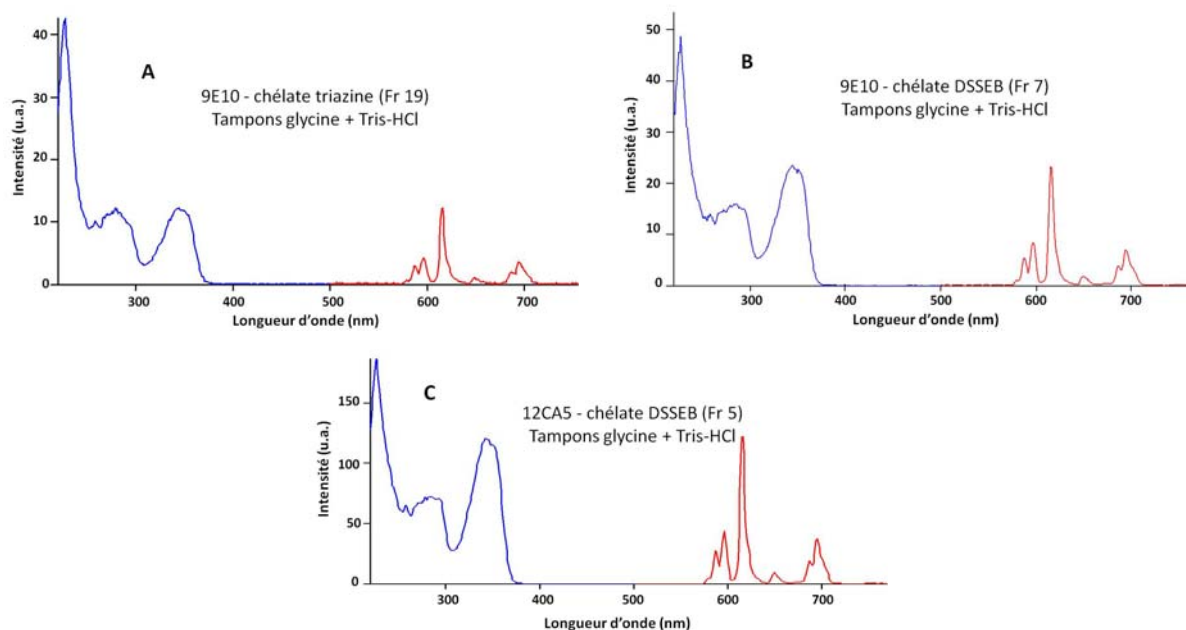


Figure 86 : Spectres d'excitation ($\lambda_{em} = 615$ nm, bleu) et d'émission ($\lambda_{exc} = 344$ nm, rouge) des anticorps marqués.

Les spectres d'émission et d'excitation présentés à la figure précédente confirment que la luminescence (à 615 nm) de l'euporium provient de l'excitation de l'antenne bis-pyridinylpyrazine. A noter que les chélates fixés aux biopolymères et qui ont préalablement été activés au chlorure de triazine disposent d'un spectre d'excitation légèrement différent que celui des sondes luminescentes accrochées aux anticorps *via* le DSSEB, dont le spectre diffère aussi de celui du complexe symétrique **Eu-104**. Pour les premiers, la bande à 260-290 nm est en effet de même intensité que celle centrée vers 345 nm. Il se pourrait donc que certaines chaînes indoliques, benzéniques et phénoliques des acides aminés tryptophane, phénylalanine et tyrosine soient localisées près du cation métallique et jouent donc le rôle d'antenne. Dans le cas du chélate activé au DSSEB cette voie de sensibilisation serait moins efficace car la chaîne carbonée du sébaçate éloigne suffisamment le complexe de la chaîne peptidique de l'anticorps. Une autre explication serait un transfert d'énergie sur l'euporium(III) *via* la triazine. En revanche, il reste le pic très intense à 225 nm (dans le spectre d'excitation du composé **Eu-104** la hauteur de ce pic est comparable à celle de la bande centrée vers 345 nm) qui apparaît quelque soit le mode d'activation.

IV. CONCLUSION

Une structure chromophorique originale reposant sur le motif bis-pyridinylpyrazine a été synthétisée et convertie en sonde luminescente à l'euporium, le terbium n'étant pas sensibilisé par cette antenne, puis appliquée au marquage d'anticorps. Sa particularité par rapport à ses analogues commerciaux fondés sur des architectures terpyridines est son déplacement bathochrome : son maximum d'absorption situé à 344 nm reste peu altéré jusqu'à 354 nm (*cf.* Figure 75 et Tableau 11). De plus, sa brillance, supérieure à $2\ 500\ M^{-1}$

cm^{-1} , ainsi que sa durée de vie de luminescence, 1.30 ms, sont largement compatibles avec des dosages immunologiques. Cependant, bien que la stabilité du chélate **Eu-104** ne soit pas affectée en tampon PBS, la présence d'un large excès en EDTA, ligand poly-dentate compétitif, induit, après plusieurs heures d'incubation, un relargage partiel du cation.

Le chélate **Eu-106** disposant d'une amine primaire dérivatisable en fonction bioconjugable a aussi été synthétisé. Trois réactifs de couplage activant l'amine ont été testés : le DSC, le chlorure de triazine et le DSSEB. Une étude préliminaire sur un peptide modèle contenant trois fonctions (alcool, amine primaire et phénol) potentiellement réactives sur le chélate activé à la triazine et au DSSEB a été menée. Celle-ci a confirmé la plus forte réactivité de la triazine qui contrairement à l'ester de NHS est réactive vis-à-vis du phénol. Enfin, les deux types de chélates activés ont été engagés dans une réaction de marquage sur deux anticorps puis, après purification par chromatographie d'affinité les rendements quantiques des biopolymères marqués ainsi que le nombre de chélates par anticorps ont été déterminés. Bien que le rendement quantique des chélates une fois accrochés sur la biomolécule chute (surtout avec le complexe activé à la triazine) la brillance demeure tout à fait acceptable ; cela démontre la potentielle utilité des complexes bis-pyridinylpyrazine pour des dosages immunologiques. Ce travail a pu faire l'objet d'une publication parue en 2011 dans le journal *Organic and Biomolecular Chemistry* de la *Royal Society of Chemistry* et insérée à la fin du manuscrit.²³⁸

Enfin le chélate **Eu-106** a été récemment converti en dérivé réactif vis-à-vis des thiols (*i.e.*, dérivé iodoacétylé) et a pu être introduit dans une structure hétérotrifonctionnelle (*tripode*)^{229c,239} permettant un accès aisé à des conjugués oligonucléotides-peptides luminescents. Ce travail a été réalisé par un stagiaire post-doctoral du laboratoire dont une partie, incluant l'utilisation du chélate d'euporium iodoacétylé, a fait l'objet d'un article actuellement soumis à *Organic and Biomolecular Chemistry*.

V. DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES

Différentes stratégies de synthèse auraient aussi pu être tentées afin d'améliorer le rendement de la formation du chélate **Eu-106**. Soit en raccourcissant le nombre d'étapes permettant d'accéder à la molécule dibromée **105** sans avoir recours si possible à la séquence protection/déprotection de l'alcool **B-2**. La deuxième voie consiste en l'introduction séquentielle des pyridines déjà substituées par les groupements amino (Schéma 11).

²³⁸ N. Maindron, S. Poupart, M. Hamon, J.-B. Langlois, N. Plé, L. Jean, A. Romieu and P.-Y. Renard, *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, 9, 2357-2370.

²³⁹ G. Clavé, H. Volland, M. Flaender, D. Gasparutto, A. Romieu and P.-Y. Renard, *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, 8, 4329-4345.

Chapitre 2 : Conception d'un ligand original pyrazinique - Application du chélate d'euprium au marquage covalent de biomolécules.

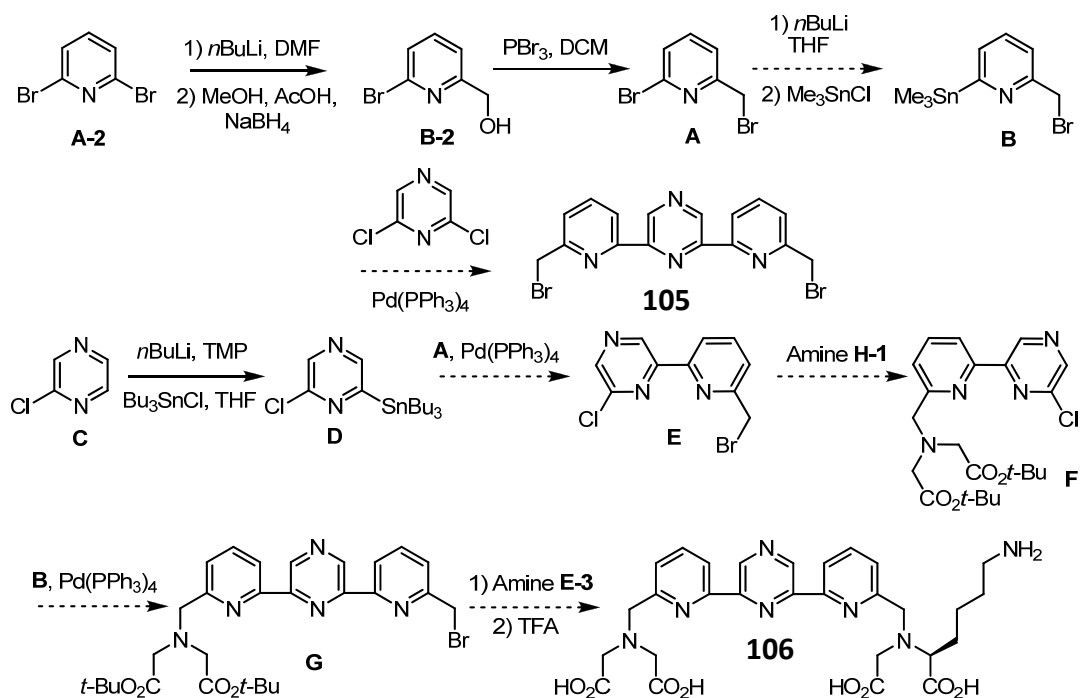


Schéma 11 : Autres stratégies de synthèse envisagées pour accéder au composé dibromé 105 et au ligand 106.

Il est vrai qu'il est généralement préférable de greffer le bras de bioconjugaison sur la partie chélatante car, s'il est fixé sur le chromophore, il peut perturber ses niveaux d'énergie et, *in fine*, la luminescence du lanthanide, surtout dans le cas du terbium.^{92b,222} Néanmoins cette approche implique souvent une synthèse plus délicate. Pour la simplifier, l'insertion du bras d'accroche sur la pyrazine serait une troisième voie à étudier.

Cette stratégie n'a été que très partiellement explorée en effectuant quelques réactions à partir de la 2-amino-3,5-dibromopyrazine commerciale ou facilement obtenue à partir de la 2-aminopyrazine²⁴⁰ (Schéma 12). L'emploi d'électrophiles puissants comme les halogénures d'acyles sont nécessaires car la nucléophilie de l'amine aromatique est faible à cause de sa conjugaison avec le cycle diazinique pauvre en électrons.

²⁴⁰ N.Sato and R. Takeuchi, *Synthesis*, **1990**, 659-660.

Chapitre 2 : Conception d'un ligand original pyrazinique - Application du chélate d'euprium au marquage covalent de biomolécules.

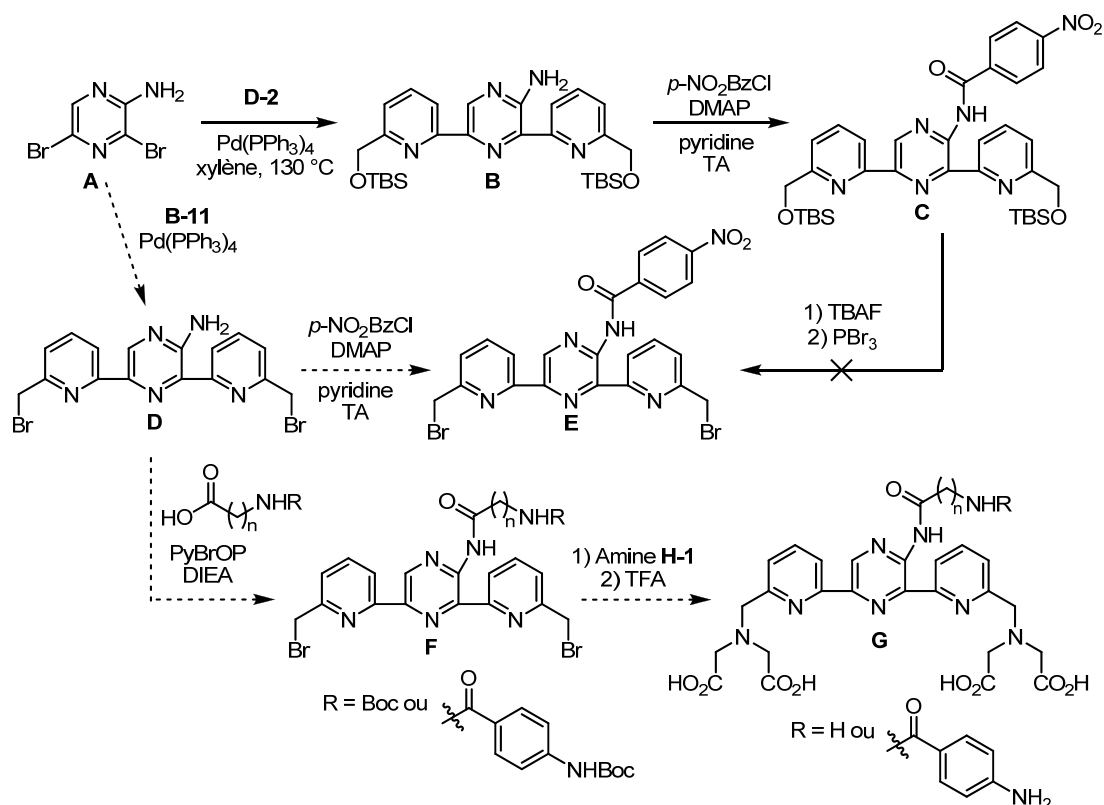


Schéma 12 : Voie de synthèse éventuelle à partir de la 2,6-dibromoaminopyrazine d'un ligand comportant la fonction bioconjugable sur la pyrazine.

Une deuxième possibilité serait d'engager la 2-iodo-3,5-dichloropyrazine²⁴¹ dans un couplage de Sonogashira²⁴² avec l'amine propargylique protégée, puis de substituer les atomes de chlore par les pyridines bromées **B-11**, ou silylées **C-2**, via le couplage de Stille (Schéma 13).

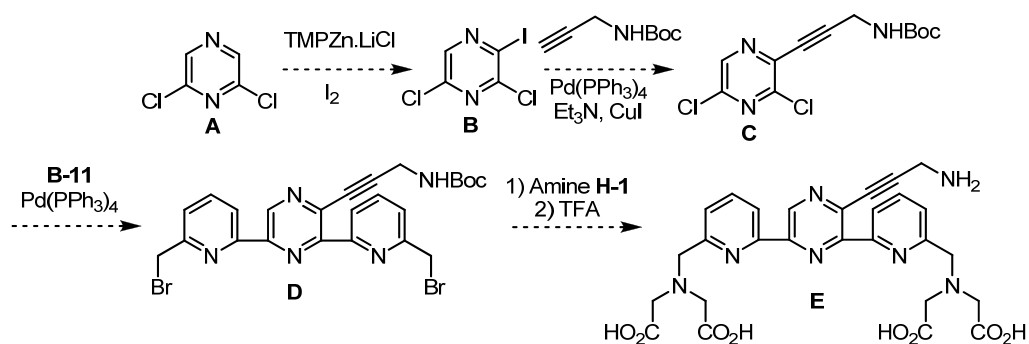


Schéma 13 : Schéma réactionnel hypothétique permettant d'insérer le bras aminopropargylique sur la pyrazine.

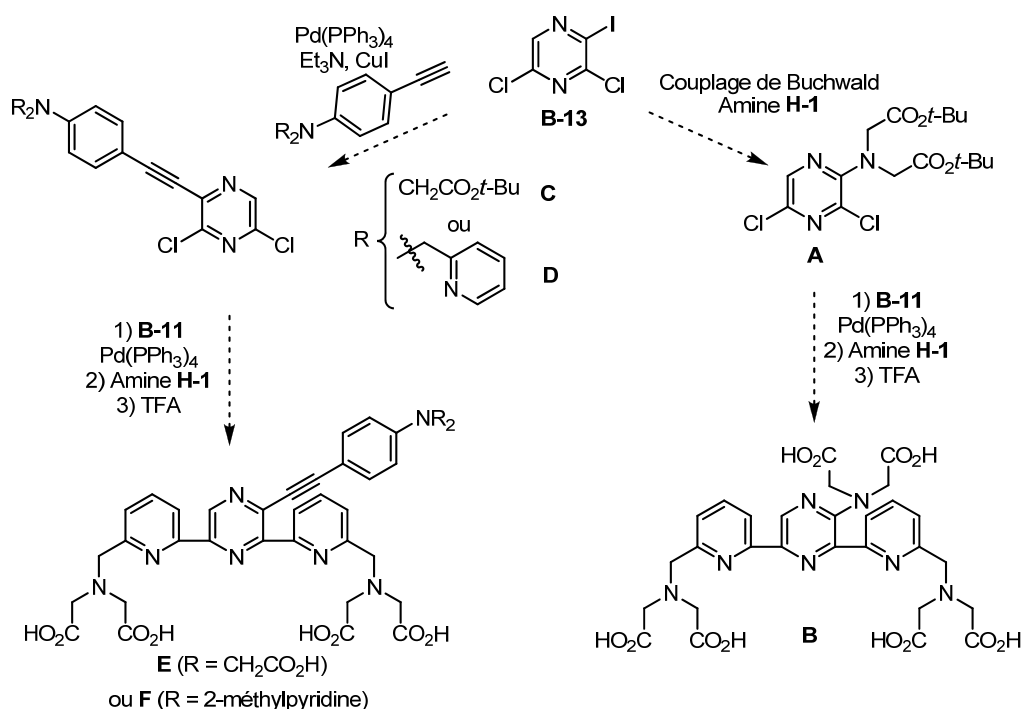
Ce même intermédiaire iodé **B-13** pourrait potentiellement permettre l'introduction de différents motifs capables de reconnaître certains cations métalliques dans le but de

²⁴¹ a) A. Turck, D. Trohay, L. Mojovic, N. Plé and G. Quéguiner, *J. Organomet. Chem.*, **1991**, 412, 301-310 ; b) M. Mosrin and P. Knochel, *Org. Lett.*, **2009**, 11, 1837-1840.

²⁴² R. Chinchilla and C. Najera, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40, 5084-5121.

Chapitre 2 : Conception d'un ligand original pyrazinique - Application du chélate d'euprium au marquage covalent de biomolécules.

synthétiser des sondes ratiométriques fluorescentes pour ces métaux.²⁴³ Pour cela, il faut que la complexation du cation métallique à doser modifie les propriétés chromogéniques du complexe. Il est par exemple bien connu que la structure Dpa (dipicolylamine) complexe préférentiellement le cation Zn(II) (**F-14**).²⁴⁴ Il a aussi été montré que le motif iminodiacétate est capable de chélater le cation Hg(II) (**E-14** ou **B-14**).²⁴⁵ Ces fonctions, une fois conjuguées au chromophore, devraient moduler sa luminescence suite à la complexation de ces cations métalliques. Toujours concernant le mercure, la fonction amido thiourée du chélate **I-14** pourrait subir en sa présence une réaction de désulfuration²⁴⁶ créant ainsi le motif 1,2,3,4-oxaphényldiazole (**J-14**) pouvant modifier la luminescence du lanthanide.



²⁴³ Pour des revues sur les senseurs fluorescents des cations Zn(II) et Hg(II) : **a**) Z. Xu, J. Yoon and D. R. Spring, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, *39*, 1996-2006 ; **b**) J. Du, M. Hu, J. Fan and X. Peng, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 4511-4535. Et pour une dernière revue plus générale : **c**) Y. Yang, Q. Zhao, W. Feng and F. Li, *Chem. Rev.*, **2012**, DOI : 10.1021/cr2004103.

²⁴⁴ H. T. Ngo, X. Liu and K. A. Jolliffe, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 4928-4965.

²⁴⁵ B. K. McMahon and T. Gunnlaugsson, *Tetrahedron Lett.*, **2010**, *51*, 5406-5410.

²⁴⁶ Z. Xing, H.-C. Wang, Y. Cheng, T. D. James and C. Zhu, *Chem. Asian J.*, **2011**, *6*, 3054-3058.

Chapitre 2 : Conception d'un ligand original pyrazinique - Application du chélate d'euprium au marquage covalent de biomolécules.

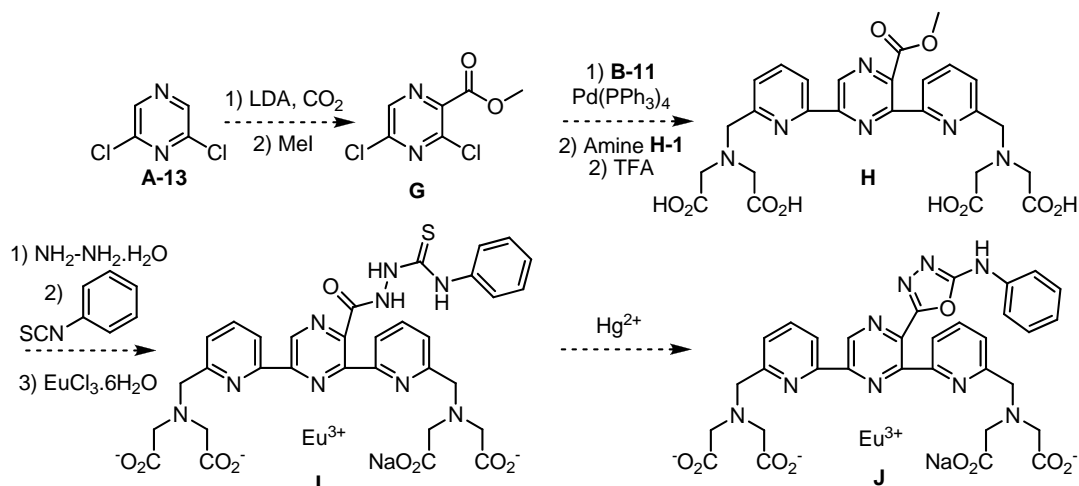


Schéma 14 : Chemins réactionnels hypothétiques conduisant à de possibles senseurs métalliques luminescents fondés sur le chromophore bis-pyridinylpyrazine.

Nous pouvons aussi envisager de fixer sur la pyrazine centrale deux motifs *para*-aminophényléthylène capable d'induire un transfert de charge diminuant ainsi la longueur d'onde d'excitation ; idéalement, le ligand D-15 sensibiliserait l'ytterbium (III).

Enfin, les structures favorables à un état de transfert de charge intramoléculaire étant aussi susceptibles d'absorber simultanément deux ou plusieurs photons, il pourrait s'avérer intéressant d'étudier en absorption biphotonique le chélate de lanthanide issu du ligand D-15. Cependant, les structures de symétrie D₃, ce qui n'est pas le cas de ce ligand, se révèlent plus réceptives à une absorption multiphotonique.³⁰

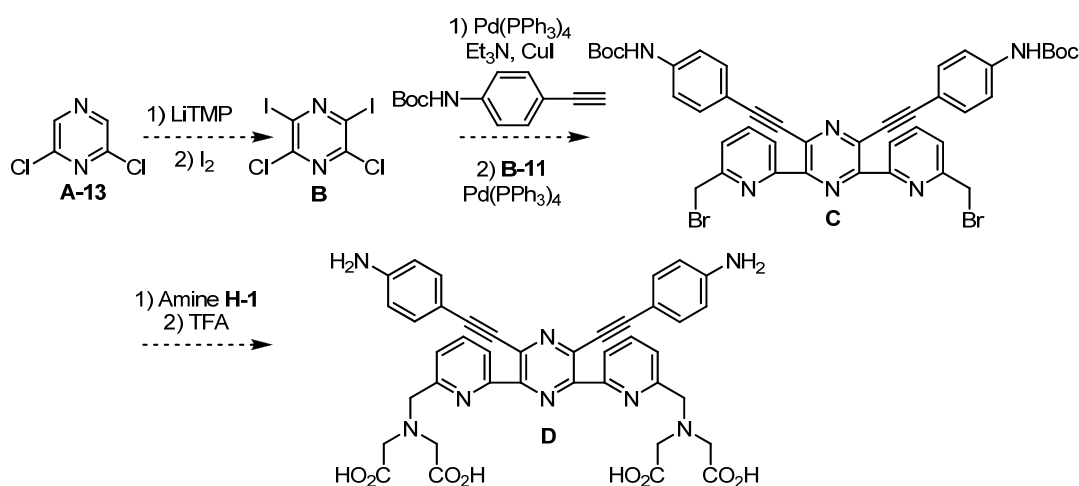


Schéma 15 : Synthèse éventuelle d'un ligand possédant une structure pouvant mener à un état de transfert de charge.

VI. OBJECTIFS DU DEUXIEME PROJET

Après avoir exploré les propriétés de luminescence d'un chélate d'euprium original, la finalité de ce second projet est d'obtenir une sonde permettant de suivre la production, la localisation et le devenir d'une protéine *in cellulo*.

Chapitre 2 : Conception d'un ligand original pyrazinique - Application du chélate d'euprium au marquage covalent de biomolécules.

Pour ce faire, deux solutions sont possibles, soit un marquage permanent de la protéine d'intérêt, ce qui peut être fait avec les fluorophores tels que ceux décrits dans ce deuxième chapitre de la thèse, ou tout autre fluorophore, notamment un colorant organique. En revanche, cette stratégie nécessite d'isoler et de purifier la protéine d'intérêt.

Une seconde solution consiste à utiliser un ligand spécifique de la protéine, et de le marquer avec le fluorophore. Cependant, la quantité de ligand fluorescent circulant non-lié à la protéine d'intérêt conduit à un bruit de fond important. Le capteur biochimique devrait donc être sélectif de la protéine d'intérêt et n'émettre un signal qu'en sa présence (sonde dite *on/off*).

Cette deuxième stratégie est couramment utilisée pour détecter des enzymes, en utilisant des pseudo-substrats pro-fluorescents. Mais elle est plus difficilement applicable aux récepteurs, car utiliser un ligand endogène du récepteur d'intérêt va modifier ses propriétés biologiques et nécessite la conception d'une sonde spécifique pour chaque protéine.

Afin d'obtenir une sonde « universelle », la stratégie adoptée est de tirer partie des étiquettes polypeptidiques couramment introduites dans les protéines recombinantes, à fin de purification ou de détection par des anticorps spécifiques de ces étiquettes, comme les anticorps anti c-myc ou anti HA utilisés dans ce chapitre 2.

Le défi étant alors d'avoir cette fois une sonde *on/off* sélective de ces étiquettes. Dans notre cas, nous souhaitons mettre au point un chélate de lanthanide, à sphère de coordination incomplète, qui soit capable de reconnaître spécifiquement une protéine d'intérêt fusionnée avec une étiquette peptidique (poly(His) ou poly(Asp)), et ce directement *via* l'ion métallique insaturé (si possible, sinon un motif de reconnaissance devra en plus être incorporé à la sonde). L'interaction entre le lanthanide et l'étiquette peptidique devra permettre de saturer la sphère de coordination du métal générant *in fine* une exaltation de luminescence par expulsion des molécules d'eau. Dans un second temps, un accrochage covalent de la sonde sur la protéine taguée est recherché afin d'écartier tout risque de dissociation, ce qui augmentera la sensibilité du système. Un groupement photoactivable constituant l'antenne ou étant greffé sur la partie chélatante permettra cet accroche.

Le prochain chapitre sera donc consacré à la description des différentes modalités de marquage fluorescent, covalent ou non de biomolécules, à des fins de détection ainsi qu'à la mise en œuvre des complexes lanthanidiques en imagerie cellulaire ou à la détection d'analytes biologiques d'intérêt par modulation de luminescence. Le quatrième et dernier chapitre traitera de la synthèse ainsi que des propriétés luminescentes de chélates d'euprium et de terbium initialement envisagés pour cette application.

CHAPITRE 3

**STRATEGIES DE MARQUAGE FLUORESCENT DE
PROTEINES UTILISANT DES PROTEINES DE FUSION -
APPLICATIONS DES CHELATES DE LANTHANIDES A
L'IMAGERIE CELLULAIRE**

I. UTILISATION DE PROTEINES DE FUSION POUR LE MARQUAGE ET LA VISUALISATION DE PROTEINES

Afin de comprendre le rôle des différentes protéines dans un organisme vivant, ou de comprendre l'origine des dysfonctionnements liés à des modifications de ces protéines, il est intéressant de pouvoir suivre, *in cellulo*, voire *in vivo*, la dynamique des protéines et des interactions qu'elles peuvent entretenir avec d'autres biomolécules dans leur milieu naturel. Cela permettrait, entre autres, de mieux appréhender la fonction des gènes codant pour ces protéines.

Pour ce faire, il faut être capable de visualiser spécifiquement la protéine d'intérêt dans son environnement naturel. Une possibilité serait, comme annoncé précédemment d'utiliser un ligand naturel modifié avec un marqueur (fluorescent, radioactif...) de la protéine, mais ses propriétés biologiques seraient alors modifiées, et le signal perturbé par un signal non-spécifique issu du marqueur non-lié avec la cible.

Or, outre la production de protéines sous leurs formes natives et physiologiquement actives (tout en sachant que suivant l'organisme utilisé se pose la question des modifications post-synthétiques), les avancées technologiques en génie génétique permettent maintenant de produire des protéines « à façon » en modifiant la séquence d'ADN codant pour une protéine ciblée. Ainsi, des protéines dites de fusion ou recombinantes peuvent être obtenues. L'adjonction d'une séquence peptidique permet d'étiqueter la protéine ; cette étiquette (ou « tag ») peut prendre différentes formes (protéine entière, enzyme, peptide,...). Initialement utilisée à des fins de purifications (c'est le cas de l'étiquette poly-histidine), cette méthode, grâce au développement de nouveaux tags, est désormais largement répandue pour la détection de protéines de fusion dans leur milieu biologique. En effet, l'enchaînement peptidique de ces tags peut être reconnu par des anticorps (comme les anticorps anti c-myc ou anti HA ; par soucis de concision, ce manuscrit ne s'attachera pas à ce système anticorps marqué/anti tag polypeptidique, en particulier car les anticorps ne pénètrent pas efficacement dans les cellules, et ne peuvent donc pas être utilisés *in cellulo*), ou des réactifs spécifiques comportant un motif de reconnaissance de l'étiquette couplé à un marqueur fluorescent par exemple ; enfin, le tag peut en lui-même être fluorescent (protéines fluorescentes).²⁴⁷

Les techniques de marquage peuvent être répertoriées en deux grandes classes : soit non-covalente et réversible, fondée sur l'affinité entre une étiquette de marquage, exprimée sur la biomolécule d'intérêt et un motif de reconnaissance porté par le marqueur ; soit

²⁴⁷ a) L. W. Miller and V. W. Cornish, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2005**, 9, 56-61 ; b) M. J. Hinner and K. Johnsson, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2010**, 21, 766-776 ; c) C. Jing and V. W. Cornish, *Acc. Chem. Res.*, **2011**, 44, 784-792.

Chapitre 3 : Stratégies de marquage fluorescent de protéines utilisant des protéines de fusion - Applications des chélates de lanthanides à l'imagerie cellulaire.

covalente et irréversible, reposant sur la formation d'une liaison covalente entre la protéine cible et le marqueur.²⁴⁸

Les étiquettes volumineuses (enzymes ou protéines) doivent pouvoir être insérées en position *N*- ou *C*-terminale de la biomolécule d'intérêt afin de perturber le moins possible ses fonctions biologiques.^{247b}

Enfin, le marquage idéal, même s'il n'existe pas, devrait remplir les conditions suivantes : possibilité d'introduire n'importe quel marqueur en une étape rapide, quantitative et spécifique de surcroît ; l'étiquette utilisée doit être de taille minimale, surtout si elle n'est pas incorporée en bout de chaîne, afin de ne pas altérer les fonctions de la protéine ; les réactifs de marquage ne doivent pas induire d'effets secondaires ; le marquage doit finalement pouvoir être efficace à la fois dans le contexte *in vitro* ainsi qu'*in vivo*.

1 MARQUAGE NON-COVALENT

1.1. AFFINITE NATURELLE

Cette approche de marquage consiste à profiter de l'affinité que possèdent naturellement des couples ligand/récepteur dont au moins un des deux partenaires est une biomolécule.

1.1.1 COUPLE AVIDINE/BIOTINE

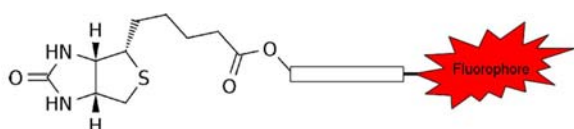


Figure 87 : Sonde biotine fluorescente.

Le système biotine/avidine (ou streptavidine) est souvent rencontré car la constante de dissociation est très faible (avec l'avidine l'affinité est dix à cent fois plus forte qu'avec la streptavidine).

L'utilisation de protéines de fusion étiquetées avec l'avidine et de dérivés biotine portant un pro-fluorophore sensible au pH a permis de le mesurer dans certains organites.²⁴⁹ A notre connaissance il n'existe que peu d'exemples utilisant ce système pour des applications *in cellulo*.

En effet, le caractère basique et fortement chargé de l'avidine conduit d'une part à des interactions non-spécifiques pouvant être gênantes et d'autre part à une toxicité des protéines étiquetées qui de plus peuvent être affectées par la masse importante (63 kDa) de cette protéine tétramérique.^{247a} Des solutions alternatives consistent à remplacer l'avidine par une protéine non-chargée (neutravidine) ou non-glycosylée (streptavidine) ou par ses

²⁴⁸ a) N. Soh, *Sensors*, **2008**, 8, 1004-1024 ; b) K. K. Sadhu, S. Mizukami, Y. Hori and K. Kikuchi, *ChemBioChem*, **2011**, 12, 1299-1308.

²⁴⁹ M. M. Wu, J. Llopis, S. Adams, J. M. McCaffery, M. S. Kulomaa, T. E. Machen, H.-P. H. Moore and R. Y. Tsien, *Chem. Biol.*, **2000**, 7, 197-209.

formes monomériques.²⁵⁰ Enfin, pour des applications *in cellulo* une compétition entre la biotine couplée au marqueur fluorescent et la biotine endogène n'est pas à exclure.

1.1.2 COUPLE METHOTREXATE (TRIMETHOPRIME)/DHFR

La dihydrofolate réductase (DHFR) est une enzyme monomérique (157 acides aminés, 18 kDa) chargée de régénérer l'acide folique (molécule impliquées dans la synthèse des bases nucléiques) sous forme réduite. Le méthotrexate est une molécule analogue de l'acide folique inhibant la DHFR. L'emploi de dérivés de méthotrexate portant un fluorophore et perméables aux membranes cellulaires a donc permis de localiser des protéines fusionnées avec la DHFR des mammifères *in cellulo*.²⁵¹ Deux solutions sont disponibles afin d'éviter un accrochage non-spécifique avec l'enzyme endogène : soit les cellules étudiées sont déficientes en DHFR soit l'enzyme bactérienne eDHFR est fusionnée à la biomolécule souhaitée. Dans ce dernier cas, il a été montré que la triméthoprine (inhibiteur de la DHFR) couplée à un marqueur fluorescent comme la fluorescéine reconnaît préférentiellement la eDHFR en présence de la DHFR endogène.^{247c,252}

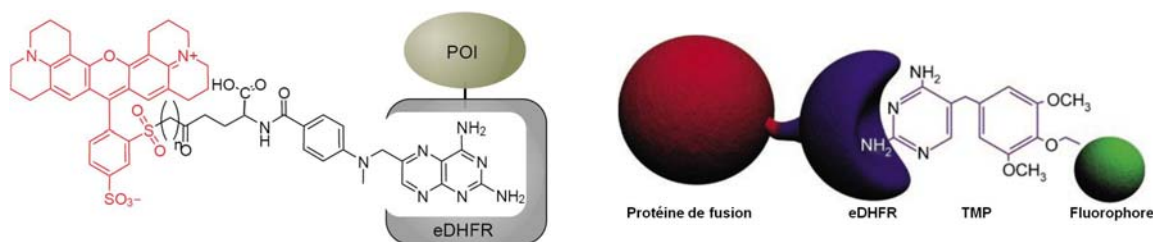


Figure 88 : Reconnaissance entre le méthotrexate marqué par la sulfo-rhodamine 101 (gauche)^{247a} ou la TMP marquée par un fluorophore organique (droite)^{252b} avec une protéine de fusion comportant l'enzyme eDHFR.

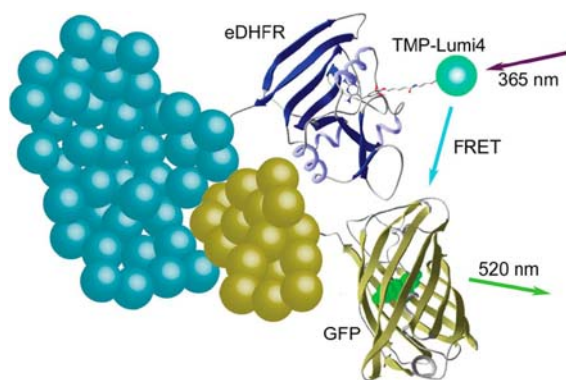


Figure 89 : Représentation du transfert d'énergie suite à une interaction entre deux protéines marquées.²⁵⁴

Plus récemment, ce ligand a aussi été couplé à des chélates de terbium possédant comme antenne soit le cs124 (avec une structure complexante de type DTTA ou TTHA, **Tb-53**) ou le Lumi4® (**Tb-78**, Figure 42), ce dernier étant plus robuste il a permis le marquage de la protéine de fusion sur les parois externes de la cellule.²⁵³

²⁵⁰ S. C. Meyer, T. Gaj and I. Ghosh, *Chem. Biol. Drug Des.*, **2006**, 68, 3-10.

²⁵¹ L. W. Miller, J. Sable, P. Goelet, M. P. Sheetz and V. W. Cornish, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 43, 1672-1675.

²⁵² a) L. W. Miller, Y. Cai, M. P. Sheetz and V. W. Cornish, *Nat. Meth.*, **2005**, 2, 255-257 ; b) N. T. Calloway, M. Choob, A. Sanz, M. P. Sheetz, L. W. Miller and V. W. Cornish, *ChemBioChem*, **2007**, 8, 767-774.

²⁵³ H. E. Rajapakse, D. R. Reddy, S. Mohandessi, N. G. Butlin and L. W. Miller, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48, 4990-4992.

Chapitre 3 : Stratégies de marquage fluorescent de protéines utilisant des protéines de fusion - Applications des chélates de lanthanides à l'imagerie cellulaire.

Afin d'obtenir un système de type *on/off* pour lequel un signal de fluorescence spécifique sera obtenu uniquement si la protéine d'intérêt est présente, un double marquage avec deux protéines de fusion a été utilisé. Le couple TMP-Lumi4®/eDHFR a ainsi pu être appliqué à une expérience de FRET (Figure 89)²⁵⁴ avec une protéine fluorescente (cf. § I-2-1 de ce chapitre sur les GFP) permettant de visualiser une interaction *in cellulo* entre une biomolécule marquée par le donneur (chélate de Tb) et une deuxième marquée par l'accepteur (GFP). En excitant à la longueur d'onde du donneur (Lumi4®), il n'y a émission de l'accepteur (GFP) que si les deux protéines sont en interaction.

1.2. RECONNAISSANCE DE TAGS PEPTIDIQUES

Cette stratégie consiste en l'insertion d'une séquence peptidique non-endogène sur une protéine d'intérêt pour laquelle un ligand qui lui est spécifique est couplé à un marqueur fluorescent. Cette technique peut être destinée aussi bien à du marquage covalent (cf. I-2) que non-covalent.

1.2.1 TAG HISTIDINE

Initialement appliqué à la chromatographie d'affinité pour la purification de protéines recombinantes,²⁵⁵ le système oligo-histidine (généralement hexa-histidine)/acide nitrilotriacétique-Ni²⁺ (NTA-Ni²⁺) est désormais étendu au marquage non-covalent de biopolymères. L'interaction électrostatique sélective de cette paire rend possible la visualisation *in vivo* de protéines étiquetées par ce peptide.²⁵⁶

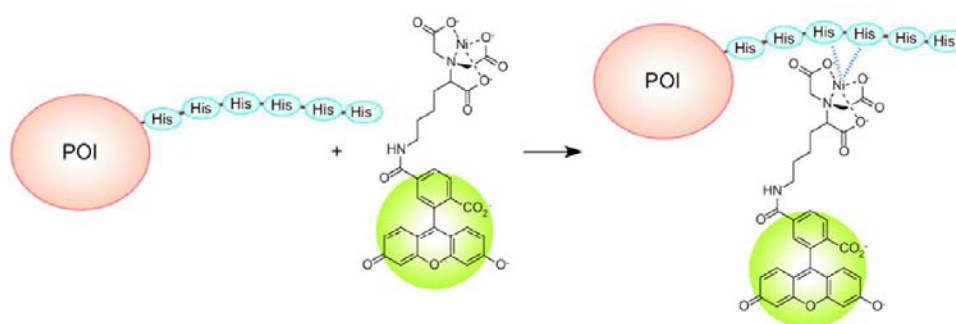


Figure 90 : Reconnaissance sélective entre une étiquette hexa-histidine portée par la protéine cible (POI : Protein Of Interest) et le motif NTA-Ni²⁺ couplé à une fluorescéine.^{248a,256c}

Cependant, l'affinité reste relativement faible, et, dans les premiers exemples décrits, le signal de fluorescence n'est pas modulable. L'affinité peut être augmentée d'un facteur dix

²⁵⁴ H. E. Rajapakse, N. Gahlaut, S. Mohandessi, D. Yu, J. R. Turner and L. W. Miller, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2010**, *107*, 13582-13587.

²⁵⁵ E. Hochuli, H. Döbeli and A. Schacher, *J. Chromatogr. A*, **1987**, *411*, 177-184.

²⁵⁶ a) E. G. Guignet, R. Hovius and H. Vogel, *Nat. Biotechnol.*, **2004**, *22*, 440 ; b) S. Boonyarattanakalin, S. Athavankar, Q. Sun and B. R. Peterson, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 386-387 ; c) C. R. Goldsmith, J. Jaworski, M. Sheng and S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 418-419.

Chapitre 3 : Stratégies de marquage fluorescent de protéines utilisant des protéines de fusion - Applications des chélates de lanthanides à l'imagerie cellulaire.

en utilisant une étiquette formée par un enchaînement de dix résidus histidine,^{256a} ou alors une technique nettement plus efficace consiste en l'insertion sur le marqueur de plusieurs motifs NTA : la stabilité est ainsi améliorée d'un facteur quatre par rapport à une sonde ne contenant qu'un seul groupement NTA.²⁵⁷

Quelques contraintes inhérentes au motif NTA-Ni²⁺ peuvent aussi limiter son emploi : le cation métallique en plus de sa cytotoxicité peut parfois éteindre la fluorescence de la sonde et la pénétration cellulaire est entravée par la charge globale négative de ce système, cependant les protéines extracellulaires sont imagées.^{256c} Cette dernière limitation a pu être contournée par l'utilisation du motif NDA (acide nitrilodiacétique).²⁵⁸

Deux autres structures affines pour des étiquettes poly-histidine ont été décrites, dans lesquelles le cation nickel(II) a été remplacé par le zinc(II), ce qui permet de s'affranchir de la toxicité du premier ainsi que de sa propriété inhibitrice de fluorescence (Figure 91).²⁵⁹

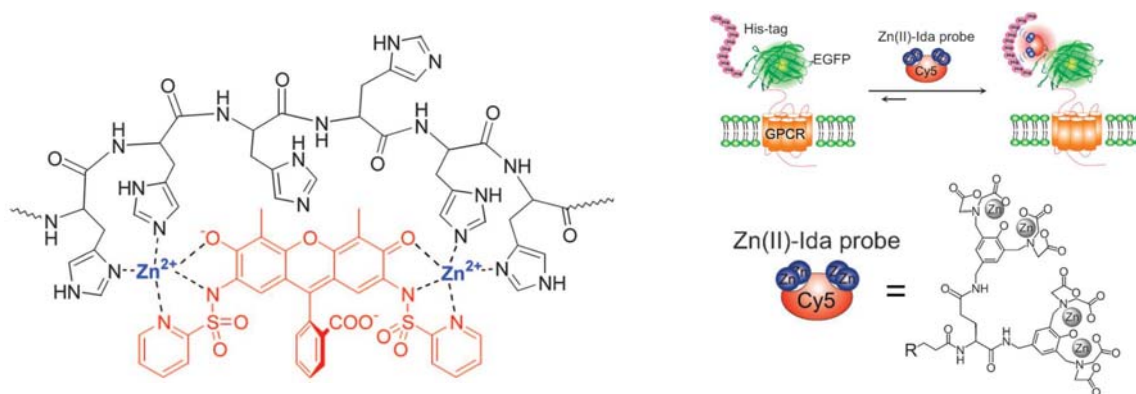


Figure 91 : Sondes fluorescentes contenant des motifs au zinc(II) et reconnaissant un tag histidine (GPCR : *G Protein-Coupled Receptor* ; Ida : *IminoDiacetic Acid* ; EGFP : *Enhanced Green Fluorescent Protein*, cette protéine fluorescente permet de confirmer que l'émission lumineuse de la sonde Cy-5.0 est localisée au même endroit que la protéine de fusion fluorescente).²⁵⁹

Afin d'obtenir une modulation du signal fluorescent lors de l'accrochage sur la cible, l'équipe de T. Higuchi a pu profiter du caractère inhibiteur de fluorescence du Ni²⁺ (ainsi que du Co²⁺) pour mettre au point *in vitro* des sondes fluorogènes. Les marqueurs choisis sont des fluorophores à phénol comme la 7-hydroxycoumarine ou la fluorescéine (Figure 91). Tant que l'étiquette poly-histidine, fusionnée à la protéine d'intérêt, ne se trouve pas suffisamment proche de la sonde marquée par le motif NTA-Ni²⁺ (ou Co²⁺), celui-ci, par l'intermédiaire du cation Ni(II) chélate le groupement hydroxyle du fluorophore éteignant sa fluorescence. En revanche, l'affinité de la fonction NTA-Ni²⁺ étant plus grande pour le tag poly(His), dès que ces deux partenaires sont réunis, la fluorescence de la sonde est exaltée

²⁵⁷ S. Lata, A. Reichel, R. Brock, R. Tampé and J. Piehler, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 10205-10215.

²⁵⁸ C. Orange, A. Specht, D. Puliti, E. Sakr, T. Furuta, B. Winsor and M. Goeldner, *Chem. Commun.*, **2008**, 1217-1219.

²⁵⁹ a) C. T. Hauser and R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2007**, *104*, 3693-3697 ; b) S.-h. Fujishima, H. Nonaka, S.-h. Uchinomiya, Y. A. Kawase, A. Ojida and I. Hamachi, *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 594-596.

Chapitre 3 : Stratégies de marquage fluorescent de protéines utilisant des protéines de fusion - Applications des chélates de lanthanides à l'imagerie cellulaire.

(jusqu'à un facteur 22 pour la 7-hydroxycoumarine) puisque le cation divalent se trouve alors complexé par les résidus imidazole de l'étiquette.²⁶⁰

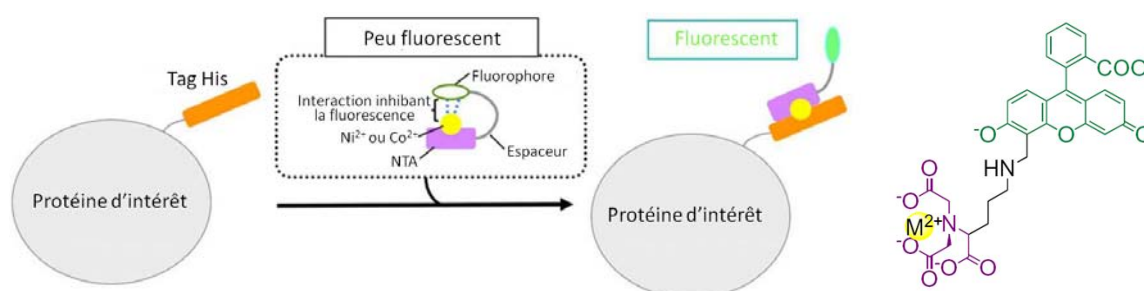


Figure 92 : Illustration du système fluorogène conçu par Higuchi *et al.* suite à la reconnaissance du marqueur par le tag.²⁶⁰

Un autre système fondé sur une étiquette hexa-histidine liée à un « suppresser » de fluorescence, le dabcyI, permet après ajout d'une quantité équimolaire du peptide hexa-histidine une augmentation, certes relativement modeste de 40%, de la fluorescence initiale d'une rhodamine couplée à trois motifs NTA-Ni(II).²⁶¹ Cette hausse de fluorescence provient du fait qu'une fraction du fluorophore interagit désormais avec l'étiquette poly(His) ne contenant aucun *quencher*. L'exaltation reste modérée car le fluorophore/NTA-Ni(II) est aussi affiné pour le tag dabcyI/poly(His) inhibant la fluorescence que le tag poly(His) la restituant.

Enfin, plus récemment, le groupe de T. Nagano a développé une sonde composée d'une fluorescéine couplée à la fois avec le NTA-Ni(II) et avec un inhibiteur de fluorescence, le dinitrobenzyle.²⁶² Le recouvrement de la fluorescence (augmentée d'un facteur 13) s'opère grâce au résidu cystéine intégré à l'étiquette qui, après reconnaissance du marqueur avec cette dernière, est suffisamment proche pour réagir de façon « intramolécule » avec le groupe dinitrobenzyle *via* une réaction de substitution nucléophile aromatique *ipso*, et ainsi libérer le dérivé de fluorescéine (Figure 93). Cette stratégie a pu être appliquée au marquage d'une protéine modèle de fusion *in vitro*. A noter que la présence d'un tag contenant la cystéine sans le motif de reconnaissance n'exalte pas aussi rapidement la fluorescence, ce qui semblerait indiquer que cette approche puisse être viable dans des milieux biologiques contenant naturellement des thiols (glutathion, cystéine...).

²⁶⁰ a) M. Kamoto, N. Umezawa, N. Kato and T. Higuchi, *Chem. Eur. J.*, **2008**, *14*, 8004-8012 ; b) M. Kamoto, N. Umezawa, N. Kato and T. Higuchi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, *19*, 2285-2288.

²⁶¹ A. Murata, S. Arai, S.-I. Yoon, M. Takabayashi, M. Ozaki and S. Takeoka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*, 6905-6908.

²⁶² K. Hirabayashi, K. Hanaoka, M. Shimonishi, T. Terai, T. Komatsu, T. Ueno and T. Nagano, *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 14763-14771.

Chapitre 3 : Stratégies de marquage fluorescent de protéines utilisant des protéines de fusion - Applications des chélates de lanthanides à l'imagerie cellulaire.

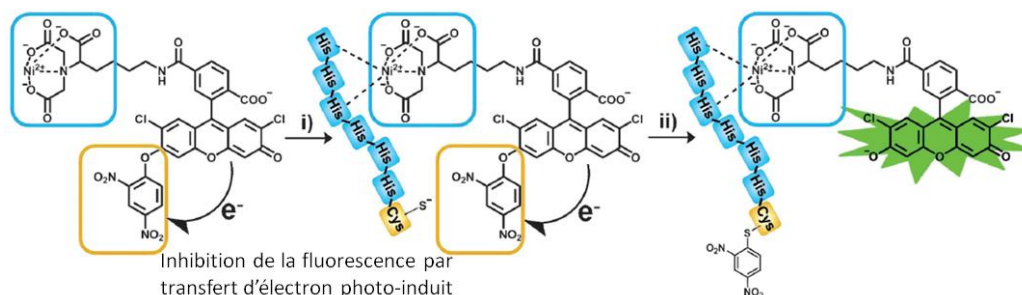


Figure 93 : Représentation schématique de la restitution de fluorescence de la dichlorofluorescéine consécutif à la séquence interaction non-covalente de la sonde avec le tag histidine - élimination du dinitrobenzyle du fluorophore *via* une réaction S_NAr ipso intramoléculaire.²⁶²

Le groupe de K.-Y. Wong a développé un système différent utilisant des complexes d'iridium.²⁶³ En effet, les propriétés de fluorescence de ces complexes sont exaltées lorsque la sphère de coordination est saturée par des ligands et qu'aucune molécule d'eau n'est coordonnée. L'utilisation d'un ligand ne saturant pas la sphère de coordination leur a donc permis de mettre en évidence une augmentation de l'intensité de fluorescence par ajouts d'histidine ou d'une protéine étiquetée poly(His) (Figure 94).

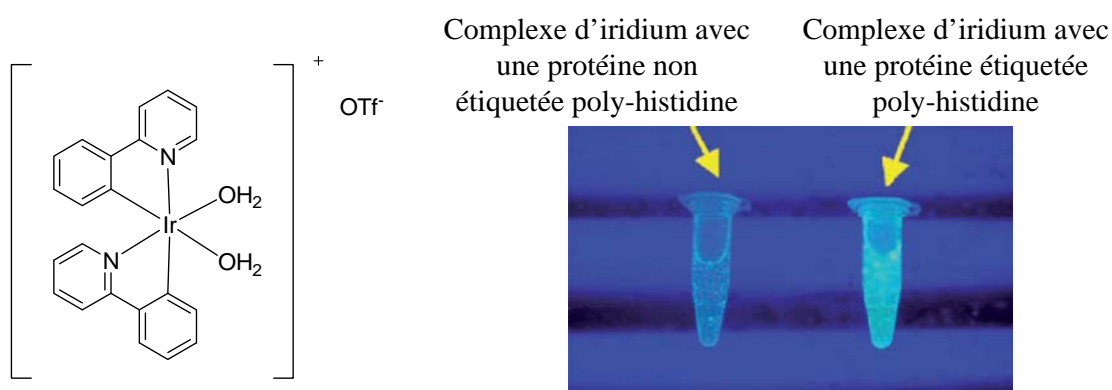


Figure 94 : Complexe d'Iridium développé par l'équipe de K.-Y. Wong et photographie de l'émission de luminescence d'une solution de complexe en présence d'une protéine (β -lactamase) étiquetée ou non par une poly-histidine.²⁶³

²⁶³ D.-L. Ma, W.-L. Wong, W.-H. Chung, F.-Y. Chan, P.-K. So, T.-S. Lai, Z.-Y. Zhou, Y.-C. Leung and K.-Y. Wong, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, 47, 3735-3739.

1.2.2 TAG ASPARTATE

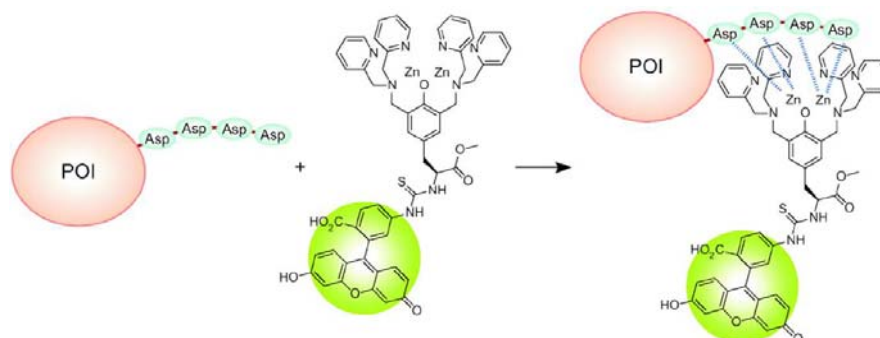


Figure 95 : Reconnaissance sélective entre une étiquette tétra-aspartate portée par la protéine cible et le motif DpaTyr-Zn²⁺ couplé à une fluorescéine.^{248a,264}

Le système bis(dipicolylamino)méthyle tyrosine-Zn²⁺ (DpaTyr-Zn²⁺)/tétra-aspartate, orthogonal à la paire NTA-Ni(II)/poly(His) et élaboré par l'équipe de I. Hamachi en 2006 permet aussi d'accrocher de façon non-covalente une sonde fluorescente sur une protéine spécifique disposant de l'étiquette peptidique adéquate.²⁶⁴ Une étiquette comportant quatre acides aspartiques contigus est suffisante pour lier le système (DpaTyr-Zn²⁺). En effet, l'affinité est augmentée d'un facteur dix à chaque acide supplémentaire et au-delà de quatre résidus Asp consécutifs la stabilité n'est plus sensiblement améliorée. Néanmoins l'affinité demeure modeste mais elle peut être exaltée à nouveau d'un facteur mille par l'insertion simultanée d'un deuxième motif DpaTyr-Zn²⁺ sur le marqueur et de quatre motifs Asp supplémentaires, séparés des premiers par un résidu glycine.

Ce système ne permet pas *a priori* d'obtenir un système *on/off* pour l'apparition de fluorescence, mais il a été également appliqué à des sondes fluorescentes sensibles au pH.²⁶⁵ En effet, la présence de ce peptide « acide » à proximité de la sonde peut modifier ses propriétés de fluorescence si cette dernière est sensible au pH comme c'est le cas par exemple du seminalphthorhodafleur. Ainsi, après coordination du zinc(II) sur les aspartates de l'étiquette le phénolate du fluorophore se protone conduisant à un déplacement hypsochrome de la fluorescence. Cela rend possible une analyse en mode ratiométrique qui s'avère plus sensible car le signal provenant des fluorophores non-liés à l'étiquette est plus facilement discriminé (Figure 96).

²⁶⁴ A. Ojida, K. Honda, D. Shinmi, S. Kiyonaka, Y. Mori and I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 10452-10459.

²⁶⁵ K. Honda, E. Nakata, A. Ojida and I. Hamachi, *Chem. Commun.*, **2006**, 4024-4026.

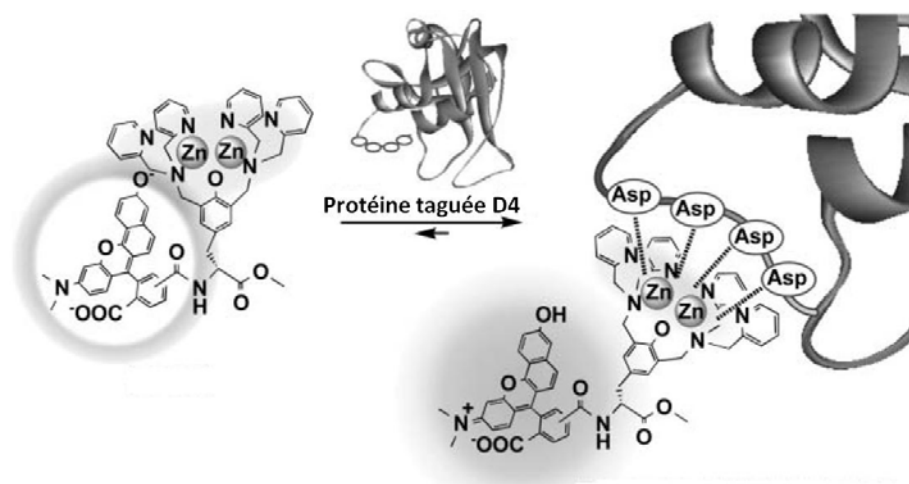


Figure 96 : Détection ratiométrique (586 nm/628 nm) du marquage d'une protéine étiquetée tétra-Asp (D4).²⁶⁵

Suivant ce même principe, un deuxième couple constitué de deux motifs DpaTyr-Ni²⁺ et d'une étiquette peptidique Asp₃-Asn-Gly-Asp₃ dont l'affinité se révèle cent fois plus forte qu'avec la paire (DpaTyr-Zn²⁺)₂/Asp₄-Gly-Asp₄ a aussi été développé par la même équipe.²⁶⁶

1.3. MARQUAGE PAR DES LANTHANIDES

1.3.1 LANTHANIDE BINDING TAG

Cette stratégie consiste en l'insertion d'une étiquette peptidique (LBT : *Lanthanide Binding Tag*) au sein d'une protéine d'intérêt. Celle-ci aura pour rôle de complexer ainsi que de sensibiliser, essentiellement par l'intermédiaire de résidus tryptophane excités à 280 nm le Tb³⁺, cation métallique, comme tous les autres lanthanides, absents des systèmes vivants.²⁶⁷ La tyrosine, en complément, peut aussi améliorer l'intensité de la luminescence. Etant donné l'affinité de ces cations métalliques pour les sites des protéines fixant le calcium, l'optimisation initiale, permettant grâce à un enchaînement court de douze acides aminés de former un complexe stable et luminescent, s'est reposée sur la variation de séquences peptidiques de calmodulines (protéines comportant plusieurs sites de fixation du Ca²⁺).²⁶⁸ En s'inspirant de ces travaux et en développant une méthodologie de criblage efficace, le groupe de B. Imperiali a pu concevoir des tags peptidiques comportant moins de vingt acides aminés et conduisant à des chélates de Tb(III) plus stables, jusqu'à 140 fois plus, quelque soit leur localisation au sein de la protéine recombinante et plus sélectifs pour les lanthanides.²⁶⁹

²⁶⁶ A. Ojida, S.-h. Fujishima, K. Honda, H. Nonaka, S.-h. Uchinomiya and I. Hamachi, *Chem. Asian J.*, **2010**, *5*, 877-886.

²⁶⁷ K. N. Allen and B. Imperiali, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2010**, *14*, 247-254.

²⁶⁸ **a)** J. P. MacManus, C. W. Hogue, B. J. Marsden, M. Sikorska and A. G. Szabo, *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265*, 10358-10366 ; **b)** C. W. Hogue, J. P. MacManus, D. Banville and A. G. Szabo, *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*, 13340-13347.

²⁶⁹ **a)** M. Nitz, K. J. Franz, M. L. Rebecca and B. Imperiali, *ChemBioChem*, **2003**, *4*, 272-276 ; **b)** M. Nitz, M. Sherawat, K. J. Franz, E. Peisach, K. N. Allen and B. Imperiali, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 3682-3685.

Chapitre 3 : Stratégies de marquage fluorescent de protéines utilisant des protéines de fusion - Applications des chélates de lanthanides à l'imagerie cellulaire.

Des LBT incorporant des acides aminés non-naturels sensibilisant le terbium et/ou l'euprium et capables d'absorber à des longueurs d'onde moins énergétiques que le Trp et donc plus favorables pour des expériences *in cellulo* ont été mis au point plus récemment et ce tout en conservant une bonne stabilité de la structure complexante. Le cs124 (340 nm) ou l'acridone (390 nm)²⁷⁰ et le naphthalimide (345 nm)²⁷¹ ont par exemple été insérés dans des LBT (Figure 97-A et B).

Par ailleurs, afin d'augmenter sensiblement la stabilité de ces étiquettes, de nouveaux tags hexa-peptidiques incorporant deux acides aminés non-naturels ont été synthétisés par l'équipe de P. Delangle. Ceux-ci comportent des motifs tridentés (acide aminodiacétique)²⁷² ou pentadentés (acide éthylène diaminotriacétique)²⁷³ complexant plus efficacement les lanthanides que les acides aminés naturels Asp, Glu ou Asn par exemple (la stabilité est jusqu'à 1 000 fois plus grande par rapport aux tags conçus par le groupe de B. Imperiali) et expulsant efficacement les molécules d'eau de la sphère de coordination du cation métallique.²⁷³

Ces dernières étiquettes se composent d'acides aminés non-naturels, les protéines modifiées par ces tags ne peuvent plus être obtenues par ingénierie génétique. Ces systèmes ne sont donc pas compatibles avec des études *in cellulo*.

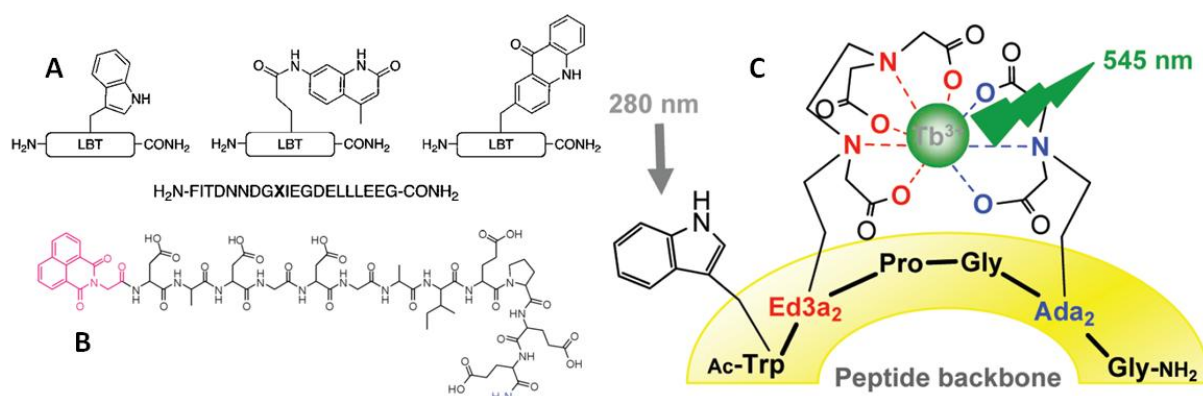


Figure 97 : En A, LBT où X correspond soit au Trp, cs124 ou acridone (A) ;²⁷⁰ en B, LBT incorporant le naphthalimide sensibilisant efficacement l'euprium ;²⁷¹ en C, LBT faisant preuve d'une stabilité renforcée.²⁷³

1.3.2 DIVERS

Différents systèmes de détection dans lesquels le cation lanthanide n'est pas directement inséré dans la biomolécule d'intérêt ont aussi été décrits.

²⁷⁰ A. M. Reynolds, B. R. Sculimbrene and B. Imperiali, *Bioconjugate Chem.*, **2008**, *19*, 588-591.

²⁷¹ a) C. S. Bonnet, M. Devocelle and T. Gunnlaugsson, *Chem. Commun.*, **2008**, 4552-4554 ; b) C. S. Bonnet, M. Devocelle and T. Gunnlaugsson, *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, *10*, 126-133.

²⁷² a) F. Cisnetti, C. Gateau, C. Lebrun and P. Delangle, *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 7456-7469 ; b) F. Cisnetti, C. Lebrun and P. Delangle, *Dalton Trans.*, **2010**, *39*, 3560-3562 ; c) A. Niedzwiecka, F. Cisnetti, C. Lebrun, C. Gateau and P. Delangle, *Dalton Trans.*, **2012**, *41*, 3239-3247.

²⁷³ A. Niedzwiecka, F. Cisnetti, C. Lebrun and P. Delangle, *Inorg. Chem.*, **2012**, *51*, 5458-5464.

Chapitre 3 : Stratégies de marquage fluorescent de protéines utilisant des protéines de fusion - Applications des chélates de lanthanides à l'imagerie cellulaire.

Ainsi, une étiquette oligo-aspartate incorporant le tryptophane et reconnu par le motif Dpa-Zn²⁺ a été développée par le groupe de Y. Yamamoto (Figure 98-A).²⁷⁴ La sonde, un cyclène substitué par deux fonctions Dpa-Zn²⁺ et complexant le terbium reconnaît la protéine d'intérêt fusionnée avec ce tag. Suite à la reconnaissance, le résidu indolique du tryptophane de l'étiquette devient alors suffisamment proche pour sensibiliser le lanthanide. L'affinité de cette sonde lanthanidique pour le tag peptidique est plus grande (constante de dissociation K_d de l'ordre de 0.14-0.30 μM) que celle liant l'étiquette hexa-histidine avec le motif NTA-Ni²⁺ (K_d de 10 μM).

Un système apparenté, qui sort un peu du cadre de notre étude, mais mérite d'être cité car il utilise le même principe de pro-luminescence, mais sans utiliser d'étiquette polypeptidique conventionnelle, a été décrit par l'équipe de M.Vazquez (Figure 98-B).²⁷⁵ Il s'agit de greffer le cyclène sur un polypeptide ne comportant pas d'acide aminé susceptible de sensibiliser le terbium et doit permettre une reconnaissance spécifique de la protéine d'intérêt. Cette dernière doit aussi comporter un résidu tryptophane susceptible de transférer l'énergie au terbium à proximité du site de liaison. La sonde ne devient luminescente qu'une fois liée à la protéine. Ce système est en revanche beaucoup moins général car pour chaque biopolymère étudié un tag peptidique autorisant une reconnaissance spécifique doit être conçu. En outre, la partie de la biomolécule reconnue doit posséder un tryptophane proche du site de reconnaissance.

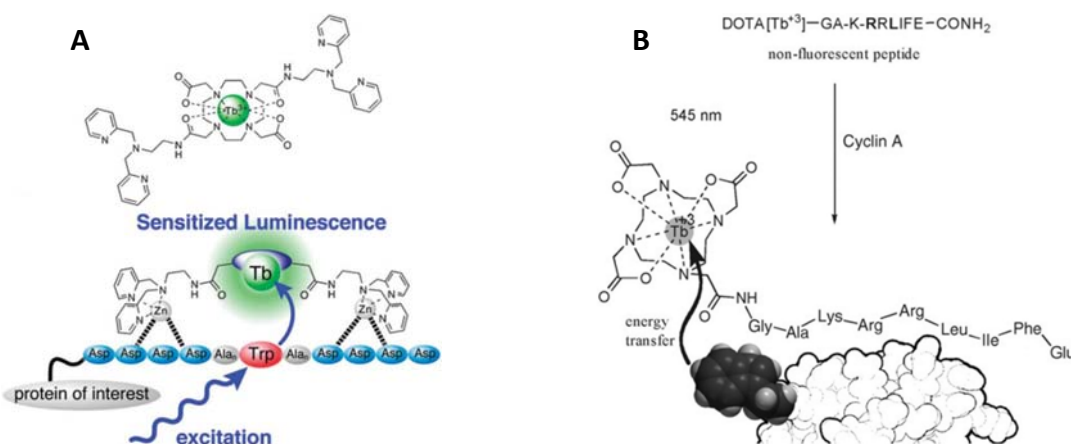


Figure 98 : Reconnaitre *via* une étiquette peptidique incorporée soit sur la protéine (A)²⁷⁴ soit sur la sonde lanthanidique (B)^{275a} pro-luminescente ; la sonde luminesce dès qu'elle s'approche suffisamment du résidu tryptophane, *i.e.* après reconnaissance du polypeptide et de son ligand.

Evidemment, la reconnaissance ne s'effectue pas nécessairement par un motif peptidique. Un chélate de Tb(III) amphiphile, décrit par Davies *et al.* a aussi permis la détection de

²⁷⁴ T. Hirayama, M. Taki, A. Kodan, H. Kato and Y. Yamamoto, *Chem. Commun.*, **2009**, 3196-3198.

²⁷⁵ a) E. Pazos, D. Torrecilla, M. Vazquez Lopez, L. Castedo, J. L. Mascarenas, A. Vidal and M. E. Vazquez, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 9652-9653 ; b) E. Pazos, A. Jimenez-Balsa, J. L. Mascarenas and M. E. Vazquez, *Chem. Sci.*, **2011**, *2*, 1984-1987.

Chapitre 3 : Stratégies de marquage fluorescent de protéines utilisant des protéines de fusion - Applications des chélates de lanthanides à l'imagerie cellulaire.

protéines membranaires via une interaction intermoléculaire entre les résidus indoliques excités à 285 nm et la cation Tb^{3+} (Figure 99-A).²⁷⁶

Il a aussi été montré qu'un chélate de terbium disposant du groupement 2-méthyl-5-nitroimidazole s'avère sélectif pour l'albumine de sérum humain (HSA) et dont la luminescence est exaltée d'un facteur 7.5 en sa présence (Figure 99-B).²⁷⁷ Cette augmentation n'est pas liée à l'expulsion de la molécule d'eau complétant la sphère de coordination du cation métallique puisqu'en solution dans l'eau lourde le conjugué HSA-complexe n'est pas plus luminescent. Selon les auteurs elle proviendrait d'interactions entre les groupements amino des résidus lysine de la protéine et les fonctions nitro du chélate. Sans cette interaction, les fonctions nitro inhibent le transfert d'énergie entre les noyaux imidazole et le terbium ($\lambda_{exc} = 265$ nm).

Un dernier exemple impliquant la reconnaissance entre une séquence d'ADN riche en paires AT et la bis-4-aminobenzamidine a été décrit par l'équipe de M.Vazquez (Figure 99-C).²⁷⁸ Elle a remarqué que l'interaction spécifique entre ces deux espèces exalte la fluorescence de la benzamidine ($\lambda_{exc} = 329$ nm ; $\lambda_{em} = 387$ nm). L'accrochage d'un chélate de Tb(III) ou d'Eu(III) sur ce composé conduit aussi, à la longueur d'onde d'excitation de la molécule, à une augmentation de luminescence du lanthanide (l'intensité de luminescence est améliorée d'un facteur quatre) après ajout d'une séquence d'ADN contenant un enchaînement riche en paires AT.

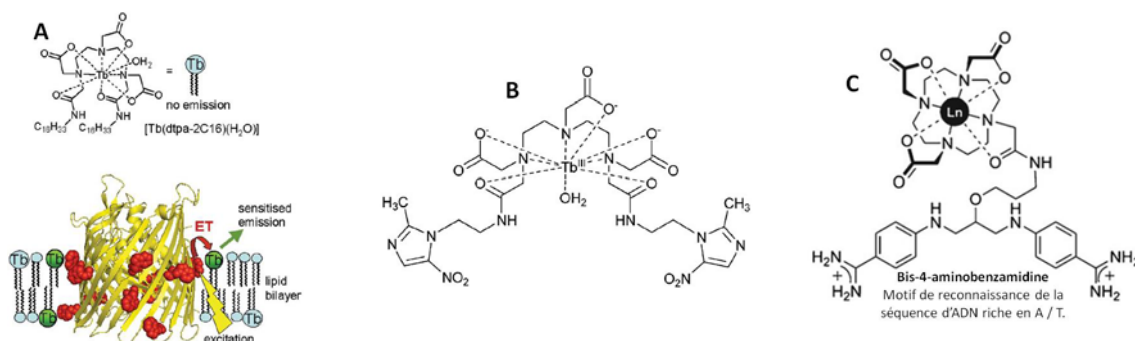


Figure 99 : Interaction entre une sonde lanthanidique pro-luminescente et des protéines membranaires (A),²⁷⁶ la HSA (B)²⁷⁷ ou une séquence de l'ADN riche en paires AT (C).²⁷⁸

Ces quelques exemples de marquage non-covalent de biomolécules impliquant une sonde lanthanidique nécessitent une excitation à des longueurs d'onde énergétiques très souvent inférieures à 300 nm, sauf dans le cas où l'antenne est dérivée de la benzamidine (Figure 99-C). En revanche, cette dernière sonde n'est pas généralisable et demeure spécifique à certaines séquences ADN. Seul le système décrit par Yamamoto *et al.* (Figure 78-A) s'avère plus général puisqu'il repose sur l'utilisation d'un tag peptidique mais la longueur d'onde

²⁷⁶ C. L. Davies, N. G. Housden and A.-K. Duhme-Klair, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 8856-8858.

²⁷⁷ X. Wang, X. Wang, Y. Wang and Z. Guo, *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 8127-8129.

²⁷⁸ O. Vazquez, M. I. Sanchez, J. L. Mascarenas and M. E. Vazquez, *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 5518-5520.

d'excitation reste énergétique puisque l'antenne est toujours constituée d'un résidu tryptophane.

Dans le cas des LBT cités précédemment, une antenne, autre qu'un résidu indolique du tryptophane, peut être incorporée (cs124, acridone...), mais dans ce cas, l'étiquette n'est plus constituée entièrement par des acides aminés naturels, et son application dans un contexte *in cellulo* devient problématique.

2 MARQUAGE COVALENT

2.1. LES PROTEINES FLUORESCENTES

Le premier composé naturel de cette famille, la protéine fluorescente verte (*Green Fluorescent Protein* abrégé en GFP), a été découvert en 1962 par Shimomura et extrait à partir d'une méduse, l'*Aequorea victoria*, présentant une bioluminescence bleue (émission de lumière suite à une réaction chimique et non à une excitation lumineuse).²⁷⁹ Cette luminescence provient de la dégradation de la coelentérazine (substrat provenant du plancton ou des crustacés dont se nourrissent ces méduses) en présence de calcium et d'oxygène par une deuxième protéine, l'aequorine qui est présente en plus grande quantité que la GFP (Schéma 16).²⁸⁰ L'émission résultante vers 470 nm peut alors être captée par le chromophore de la GFP (constitué du produit de cyclisation de trois acides aminés adjacents : une sérine, une tyrosine et une glycine, cf. Figure 100) qui réémet à 508 nm.

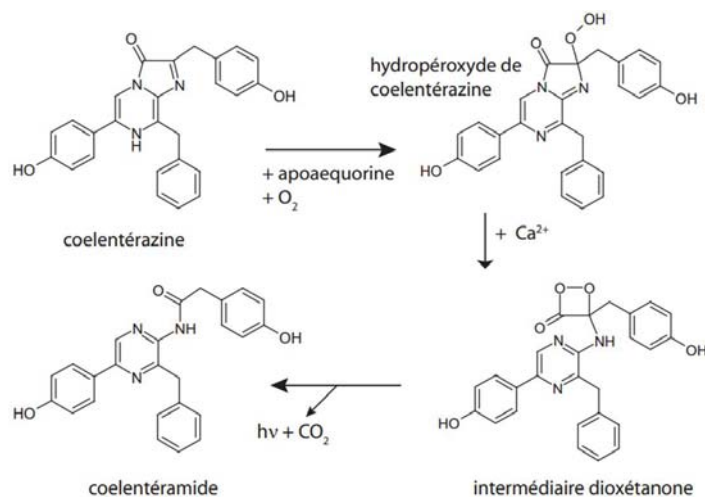


Schéma 16 : Réaction d'oxydation de la coelentérazine par l'aequorine conduisant au coelentéramide et à une émission de lumière bleue.²⁸⁰

La GFP contient 238 acides aminés organisés en feuillets β formant un tonneau autour d'une hélice transversale centrale portant le fluorophore qui le protège ainsi du milieu extérieur.

²⁷⁹ O. Shimomura, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48, 5590-5602. La bioluminescence bleue de la coelentérazine par l'aequorine n'a, pour l'application de la GFP en marquage, aucun lien. Historiquement en revanche elle est intimement liée à sa découverte car la bioluminescence, naturellement visible, cache la fluorescence de la GFP présente dans la méduse en quantité beaucoup plus faible.

²⁸⁰ Thèse du Dr. L. Tricoire, Université Paris VI, **2006**.

Chapitre 3 : Stratégies de marquage fluorescent de protéines utilisant des protéines de fusion - Applications des chélates de lanthanides à l'imagerie cellulaire.

En outre, les nombreuses interactions non-covalentes entre les onze feuillets β , en plus d'assurer la stabilité du fluorophore permettent aussi de catalyser la formation du cœur fluorescent. Par chance, les extrémités C- et N-terminales étant localisées à la surface, la GFP peut être aisément employée comme étiquette fluorescente dans des protéines de fusion tout en conservant ses propriétés de fluorescence. Enfin, de nombreuses autres protéines fluorescentes ont été obtenues par mutations génétiques permettant ainsi de couvrir une large gamme spectrale.²⁸¹

L'utilisation de cette protéine fluorescente verte et son incorporation en tant qu'étiquette fluorescente a été initiée par le groupe de R. Tsien,²⁸² ce qui lui a valu le prix Nobel de chimie avec M. Chalfie et O. Shimomura en 2008.

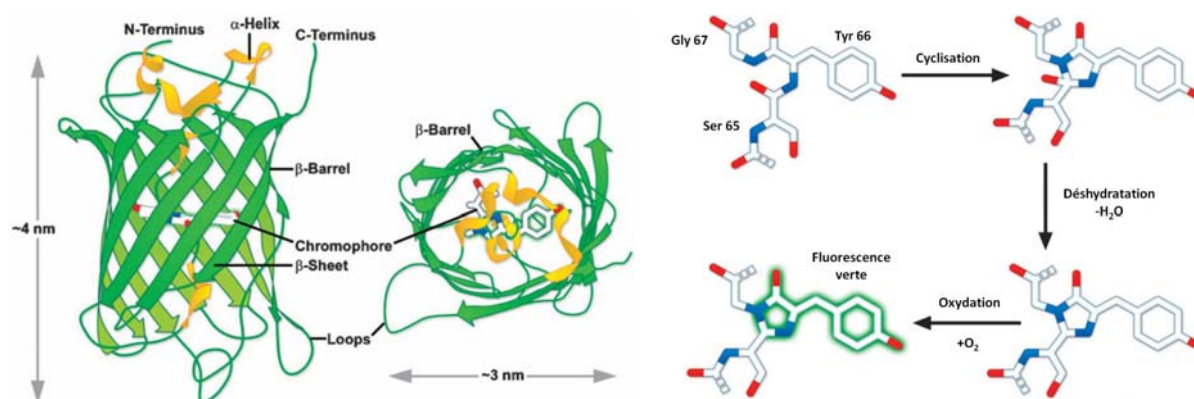


Figure 100 : Structure de la GFP montrant l'hélice centrale comportant le fluorophore entourée d'un tonneau de onze feuillets β (gauche). Maturation du fluorophore de la GFP : l'attaque nucléophile de l'azote du résidu Gly-67 sur le carbonyle de la Ser-65 suivie d'une déshydratation conduit au cycle imidazolinone ; après oxydation de la liaison exocyclique celui-ci devient conjugué au phénol de la Tyr-66 constituant ainsi le fluorophore de la GFP.^{281b}

Ces caractéristiques sont généralement mises à profit dans des expériences de FRET pour étudier la dynamique cellulaire des protéines ainsi que des interactions qu'elles peuvent entretenir avec d'autres analytes.^{173b} Pour plusieurs raisons, l'exploitation de ces protéines peut néanmoins être limitée : leur maturation conduisant à la fluorescence est lente (jusqu'à plusieurs heures) ;^{260a} l'auto-fluorescence et l'absorbance des tissus se superposent à leur domaine spectral ; leur taille conséquente (≈ 27 kDa) par rapport aux couples complexes métalliques/étiquettes peptidiques, peut engendrer des modifications des propriétés biochimiques de la protéine marquée.^{247b}

2.2. MOTIFS DE RECONNAISSANCE ENZYMATIQUES

Cette technique de marquage covalent repose sur la reconnaissance d'une enzyme, introduite en position terminale de la protéine à marquer, avec son substrat contenant un

²⁸¹ a) M. Zimmer, *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, 38, 2823-2832 ; b) R. N. Day and M. W. Davidson, *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, 38, 2887-2921 ; c) D. M. Shcherbakova, O. M. Subach and V. V. Verkhusha, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51, 10724-10738.

²⁸² R. Heim, D. C. Prasher and R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1994**, 91, 12501-12504.

Chapitre 3 : Stratégies de marquage fluorescent de protéines utilisant des protéines de fusion - Applications des chélates de lanthanides à l'imagerie cellulaire.

fluorophore. L'enzyme est sélectionnée de façon à ce que son substrat ne soit réactif que vis-à-vis d'elle, que la réaction soit rapide et quantitative. La spécificité de la reconnaissance doit aussi être modérée afin d'obtenir un marquage efficace quelle que soit la sonde greffée sur le substrat. Cette dernière doit pouvoir traverser les membranes cellulaires et ne pas interagir de façon non-spécifique avec les protéines endogènes. L'objectif est de combiner la sélectivité intrinsèque des enzymes avec la diversité fonctionnelle apportée par la chimie de synthèse.

2.2.1 SNAP-TAG

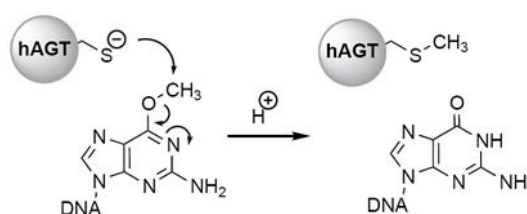


Schéma 17 : Mécanisme de réparation des guanines par la hAGT.

Cette stratégie a été initialement développée par l'équipe de K. Johnsson en 2003,²⁸³ puis commercialisée par la société suisse Covalys, aujourd'hui propriété de New England BioLabs, Inc. L'étiquette est une enzyme mutante (SNAP-Tag) de la AGT humaine (hAGT : *human O⁶-AlkylGuanine-DNA alkylTransferase*) qui est une

protéine de réparation de l'ADN : elle transfère une chaîne alkyle de son substrat (guanine 6-O-alkylée) vers un résidu Cys de son site actif (Schéma 17²⁸³). Quant à son dérivé SNAP-tag il est capable de transférer, à partir d'une guanine benzylée en position 6, la fonction benzylée contenant un marqueur fluorescent. De plus, l'enzyme modifiée est à la fois plus résistante, légèrement plus petite (19 kDa contre 21 kDa pour la hAGT), n'interagit plus avec l'ADN et transfère 50 fois plus rapidement la chaîne benzylée.²⁸⁴

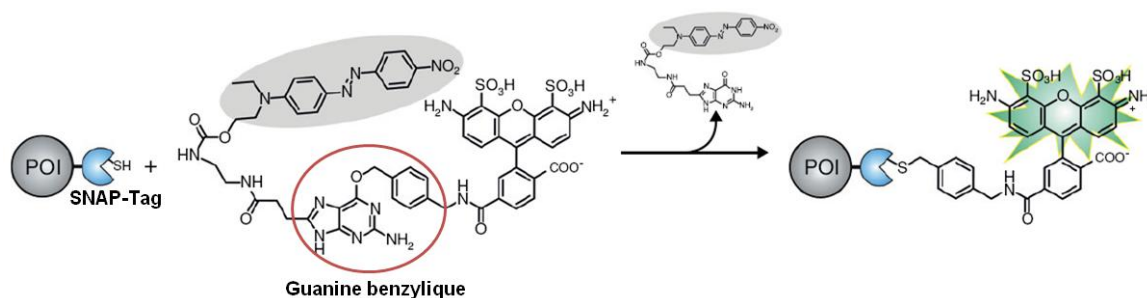


Schéma 18 : Marquage par une sonde fluorogène d'une protéine de fusion SNAP-Tag : la fluorescence de la rhodamine disulfonate AlexaFluor® 488 est inhibée par un *quencher* FRET diazo (*Disperse Red 1*) situé à proximité. Après marquage la fluorescence de la rhodamine est recouvrée.²⁸⁵

En plus des avantages cités précédemment, la structure guanine benzylée reconnue par ce tag est aisément synthétisée et facilement modulable. Enfin, le marquage *in cellulo* non-spécifique avec la hAGT endogène a pu être limité par la mise au point d'un inhibiteur

²⁸³ A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel and K. Johnsson, *Nat. Biotechnol.*, **2003**, *21*, 86-89.

²⁸⁴ H. M. O'Hare, K. Johnsson and A. Gautier, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2007**, *17*, 488-494.

²⁸⁵ G. Lukinavicius and K. Johnsson, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2011**, *15*, 768-774.

Chapitre 3 : Stratégies de marquage fluorescent de protéines utilisant des protéines de fusion - Applications des chélates de lanthanides à l'imagerie cellulaire.

sélectif de l'enzyme humaine qui n'affecte pas l'activité du SNAP-tag.²⁸⁶ Enfin, le bruit de fond issu de la fluorescence intrinsèque du marqueur peut être nettement diminué en introduisant, dans le pseudo-substrat de l'enzyme, un *quencher* spécifique du fluorophore (Schéma 18). Un avantage supplémentaire de cette méthode est la large gamme spectrale qui peut lui être associée, car le fluorophore n'intervient pas directement dans la réaction de marquage. En revanche, la protéine reste suffisamment encombrante ; une modification des propriétés biologiques de la protéine d'intérêt qui lui est attachée n'est pas à exclure.

2.2.2 CLIP-TAG

Plus récemment, le même groupe a développé une nouvelle étiquette enzymatique, toujours à partir de la hAGT, nommée CLIP-tag, dont le substrat reconnu est une cytosine benzylique.²⁸⁷ De manière analogue au SNAP-tag, le benzyle portant un fluorophore est transféré sur la cystéine du site actif. Cette méthode étant orthogonale à la première deux protéines peuvent être visualisées simultanément (Schéma 19).

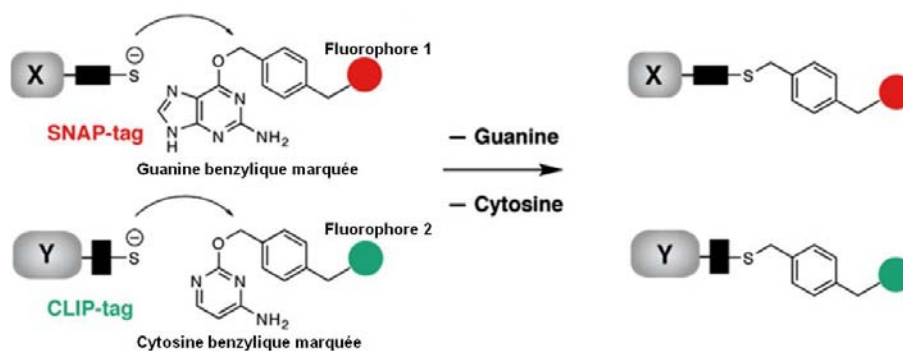


Schéma 19 : Représentation de la complémentarité des méthodes SNAP- et CLIP-tag.²⁸⁷

2.2.3 HALO-TAG

Cette étiquette enzymatique développée et commercialisée par la société Promega est dérivée d'une haloalcane déshalogénase bactérienne de 33 kDa qui catalyse la conversion d'halogènes aliphatiques en alcools primaires correspondants.²⁸⁸ L'enzyme mutée conduit à un accrochage covalent car la saponification de l'ester formé dans le site actif suite à la substitution de l'halogène par le résidu carboxylate de Asp106 est inhibée : l'histidine activant par liaison hydrogène la molécule d'eau présente dans le site actif a été remplacé par une phénylalanine inerte (Schéma 20).

²⁸⁶ A. Juillerat, C. Heinis, I. Sielaff, J. Barnikow, H. Jaccard, B. Kunz, A. Terskikh and K. Johnsson, *ChemBioChem*, **2005**, *6*, 1263-1269.

²⁸⁷ A. Gautier, A. Juillerat, C. Heinis, I. R. Correa Jr, M. Kindermann, F. Beaufils and K. Johnsson, *Chem. Biol.*, **2008**, *15*, 128-136.

²⁸⁸ G. V. Los, L. P. Encell, M. G. McDougall, D. D. Hartzell, N. Karassina, C. Zimprich, M. G. Wood, R. Learish, R. F. Ohana, M. Urh, *et al.*, *ACS Chem. Biol.*, **2008**, *3*, 373-382.

Chapitre 3 : Stratégies de marquage fluorescent de protéines utilisant des protéines de fusion - Applications des chélates de lanthanides à l'imagerie cellulaire.

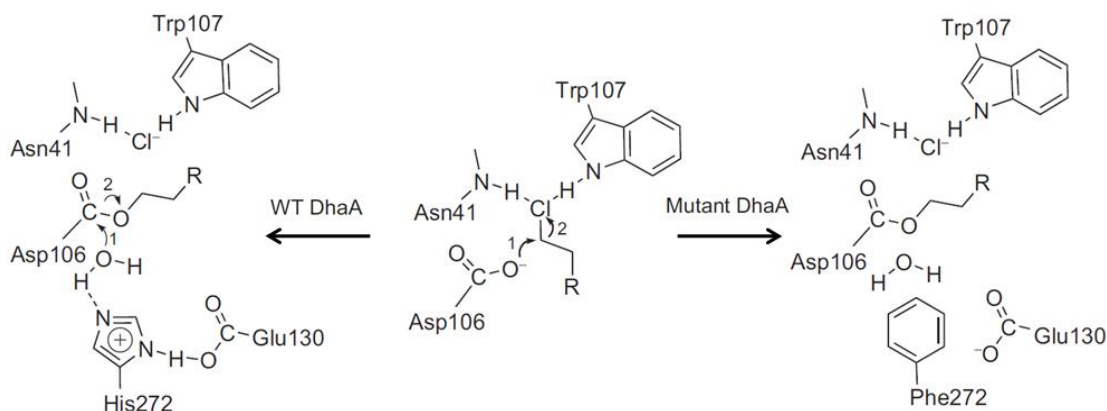


Schéma 20 : Mécanisme de formation de l'alcool primaire par l'enzyme non-mutée (WT : *Wild Type*) libérant son substrat et accrochage covalent du substrat sur l'enzyme mutée.²⁸⁸

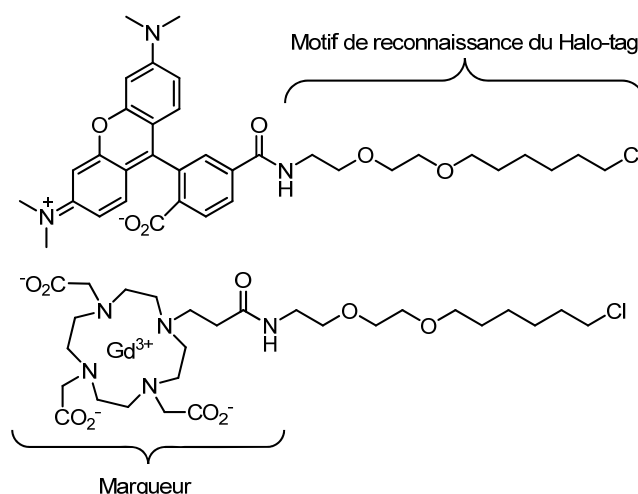


Figure 101 : Motif de reconnaissance du Halo-tag (1-[2-(2-aminoéthoxy)éthoxy]-6-chlorohexane) couplé à une tétraméthylrhodamine ou à un agent de contraste^{150a} (sonde IRM « intelligente » dont la relaxivité est améliorée d'un facteur 6 après accrochage sur la protéine taguée grâce à une augmentation du temps de corrélation rotationnel τ_R).

Ce troisième tag est aussi orthogonal aux deux précédents, mais ne permet pas un marquage par un pro-fluorophore donnant un système *on/off*.

2.2.4 BL-TAG

Les β -lactamases (BL) sont des enzymes bactériennes qui catalysent l'ouverture du cycle β -lactame. En dépit de leur taille relativement importante (29 kDa) elles ne possèdent pas d'analogues chez les eukaryotes. Une enzyme mutante a été développée par l'équipe de K. Kikuchi afin qu'après ouverture du cycle le composé contenant le résidu β -lactame soit lié de manière covalente à la protéine (Schéma 21). Cette technologie peut être utilisée simultanément à celle du SNAP-tag sans interférence, la cinétique de liaison avec le BL-tag est cependant plus faible. Initialement appliquée à du marquage de protéines membranaires

Chapitre 3 : Stratégies de marquage fluorescent de protéines utilisant des protéines de fusion - Applications des chélates de lanthanides à l'imagerie cellulaire.

elle a pu ensuite être étendue à l'imagerie cellulaire.²⁸⁹ Ce système donne également accès à un marquage de type on/off grâce à un substrat éteint par un phénomène de FRET.

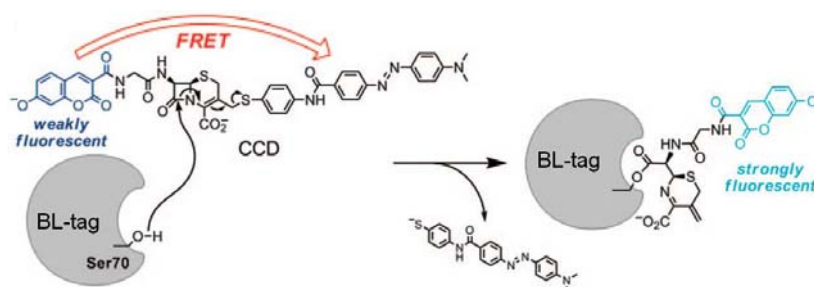
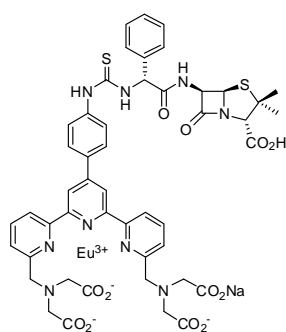


Schéma 21 : Marquage covalent du BL-tag par une sonde fluorogène contenant un motif de reconnaissance β -lactame ainsi que d'une 7-hydroxycoumarine dont la fluorescence est inhibée par le Dabcyl avant accrochage.^{289a}



Plus récemment la même équipe a conçu une sonde fluorogène analogue, autorisant une incubation plus rapide, dont l'inhibition de fluorescence s'effectue par un processus PeT avec un motif dinitrobenzyle.²⁹⁰

Elle a aussi appliqué cette méthode à la sonde lumineuse à l'euporium(III) de type terpyridine représentée ci-contre.²⁹¹

2.2.5 TMP-TAG COVALENT

L'enzyme eDHFR a pu être modifiée, sans perte d'affinité pour la structure TMP, par l'insertion d'une cystéine située de façon optimale (proche du site de reconnaissance) afin de réagir spécifiquement sur une fonction acrylamide (électrophile suffisamment doux pour minimiser des accrochages non-spécifiques) contenu sur un conjugué TMP-fluorophore (Figure 102-A). Contrairement aux modes d'action précédents la liaison est induite par un acide aminé localisé hors du site actif de l'enzyme. La conversion de l'accroche covalente est quantitative mais sa cinétique est du même ordre de grandeur que celle entre le BL-tag et son substrat. Cette stratégie a été appliquée à du marquage intracellulaire.^{292a}

Très récemment, ce même groupe a conçu un deuxième analogue (Figure 102-B) plus stable et réagissant plus rapidement sur la eDHFR modifiée autorisant un marquage intracellulaire beaucoup plus efficace.^{292b}

²⁸⁹ a) S. Mizukami, S. Watanabe, Y. Horii and K. Kikuchi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 5016-5017 ; b) S. Watanabe, S. Mizukami, Y. Horii and K. Kikuchi, *Bioconjugate Chem.*, **2010**, *21*, 2320-2326.

²⁹⁰ K. K. Sadhu, S. Mizukami, C. R. Lanam and K. Kikuchi, *Chem. Asian J.*, **2012**, *7*, 272-276.

²⁹¹ S. Mizukami, T. Yamamoto, A. Yoshimura, S. Watanabe and K. Kikuchi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 8750-8752.

²⁹² a) S. S. Gallagher, J. E. Sable, M. P. Sheetz and V. W. Cornish, *ACS Chem. Biol.*, **2009**, *4*, 547-556 ; b) Z. Chen, C. Jing, S. S. Gallagher, M. P. Sheetz and V. W. Cornish, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 13692-13699.

Chapitre 3 : Stratégies de marquage fluorescent de protéines utilisant des protéines de fusion - Applications des chélates de lanthanides à l'imagerie cellulaire.

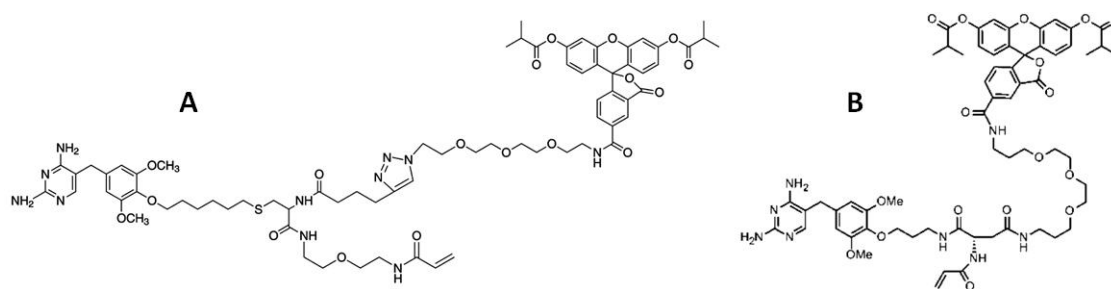


Figure 102 : Conjugués TMP-acrylamide-fluorescéine appliqués au marquage covalent de protéines fusionnées avec l'enzyme mutante de eDHFR (la fluorescéine est *O*-protégée par des motifs isobutyryle afin d'améliorer le passage des membranes cellulaires, après internalisation les estérases naturellement présentes dans la cellule libèrent la fluorescéine).

2.3. MOTIFS DE RECONNAISSANCE PEPTIDIQUES

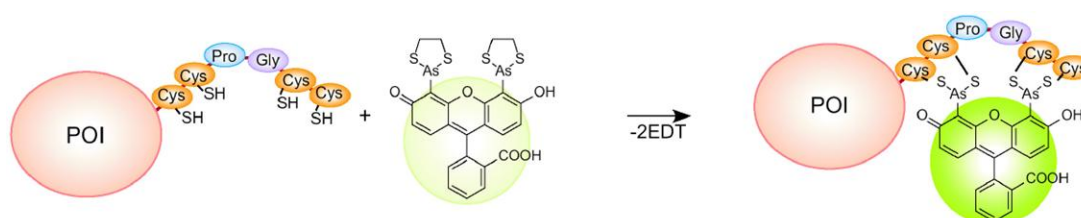


Figure 103 : Reconnaissance sélective entre une étiquette contenant quatre cystéines et une fluorescéine arsénée (FIAsH) conduisant à une exaltation de fluorescence.^{248a,293}

Le système tétra-cystéine/FIAsH (TC/FIAsH) a été le premier substitut aux protéines fluorescentes et permet un greffage covalent entre les résidus thiols des cystéines du tag et les arséniques de la fluorescéine FIAsH.²⁹³ Il a été mis au point par le groupe de R. Tsien, celui là même qui avait popularisé l'utilisation de la GFP. Il présente l'avantage d'être pro-fluorescent (le rendement quantique peut être multiplié par 50 000 ; sa valeur après l'accroche sur le motif TC dans le tampon PBS à pH 7.4 est de 49%),²⁹³ propriété dont l'origine n'est toujours pas clairement établie (désactivation vibrationnelle et/ou transfert d'électron photoinduit).²⁹⁴

L'introduction des deux acides aminés proline et glycine entre les cystéines permet une meilleure affinité, et un positionnement idoine des quatre résidus cystéine par rapport aux deux atomes d'arsenic.²⁹⁵ Une modification apportée plus récemment concernant l'enchaînement des acides aminés entourant le motif TC a conduit à une étiquette encore plus affine.²⁹⁶

De plus, de nombreux fluorophores ont par la suite été conçus afin d'améliorer ou moduler les propriétés photochimiques,²⁴⁸ dont le dérivé résorufine (ReAsH) émettant à de plus

²⁹³ B. A. Griffin, S. R. Adams and R. Y. Tsien, *Science*, **1998**, *281*, 269-272.

²⁹⁴ R. A. Scheck and A. Schepartz, *Acc. Chem. Res.*, **2011**, *44*, 654-665.

²⁹⁵ S. R. Adams, R. E. Campbell, L. A. Gross, B. R. Martin, G. K. Walkup, Y. Yao, J. Llopis and R. Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 6063-6076.

²⁹⁶ B. R. Martin, B. N. G. Giepmans, S. R. Adams and R. Y. Tsien, *Nat. Biotech.*, **2005**, *23*, 1308-1314.

Chapitre 3 : Stratégies de marquage fluorescent de protéines utilisant des protéines de fusion - Applications des chélates de lanthanides à l'imagerie cellulaire.

grandes longueurs d'onde,²⁹⁵ ou la fluorescéine CrAsH moins encline que son analogue FIAsH aux interactions non spécifiques, car moins hydrophobe, et conduisant à un meilleur rapport signal-sur-bruit.²⁹⁷ Le dérivé arsénié de Cy-3.0, AsCy3 se révèle moins sensible au photoblanchiment mais la pro-fluorescence reste modeste (augmentation d'un facteur six). En revanche, il peut être appliqué à des expériences de FRET ou de multimarquage avec les dérivés fluorescéine et résorufine car la séquence peptidique reconnue est orthogonale à celle des fluorescéines et résorufines.²⁹⁸ Aussi, les membranes cellulaires sont perméables à ces fluorogènes et les cinétiques ainsi que les rendements d'accrochage sont bons.

En revanche, la reconnaissance spécifique n'est pas toujours optimale si bien que ces sondes peuvent aussi se lier à d'autres protéines disposant de séquences peptidiques comportant des cystéines favorablement positionnées. Pour limiter cet effet, il s'avère nécessaire d'ajouter une quantité en dithiols de l'ordre du μM . A une concentration trop élevée (mM) la reconnaissance avec le tag est alors inhibée.²⁹³ Il est aussi nécessaire d'introduire des molécules hydrophobes si les fluorophores utilisés produisent trop d'interactions hydrophobes non-spécifiques. Enfin, les composés arséniés peuvent présenter une cytotoxicité.

Plus récemment, une rhodamine boronique (RhoBo) fluorogène, pour laquelle les membranes cellulaires sont perméables, et capable de se lier à une étiquette tétrasérine a été décrite (la fluorescence est augmentée d'un facteur 4 après l'accrochage).^{294,299} Les inconvénients liés aux thiols et à la toxicité de l'arsénique sont alors contournés mais la sélectivité n'est pas encore optimale puisque la sonde peut interagir également avec les polysaccharides.

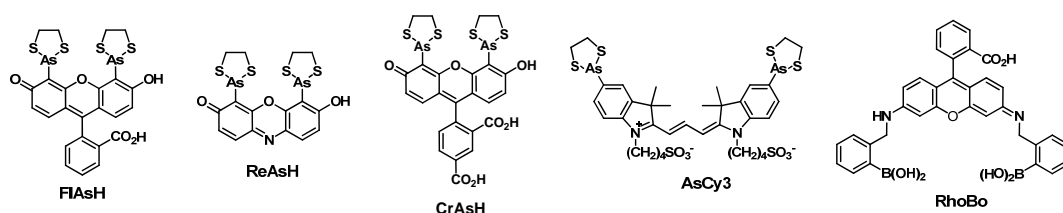


Figure 104 : Fluorophores arséniés et boronique.

2.4. MARQUAGE CATALYSE PAR DES ENZYMES AUXILIAIRES

Cette technique, dont seulement quelques exemples sont présentés ci-dessous, peut être assimilée à celle tirant partie de tags de type enzymatique. Cette fois, c'est le substrat polypeptidique d'une enzyme auxiliaire qui est fixé sur la protéine d'intérêt. Cette enzyme auxiliaire assure l'accrochage d'un fragment de leur substrat comportant un fluorophore, sur

²⁹⁷ H. Cao, B. Chen, T. C. Squier and M. U. Mayer, *Chem. Commun.*, **2006**, 2601-2603.

²⁹⁸ H. Cao, Y. Xiong, T. Wang, B. Chen, T. C. Squier and M. U. Mayer, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 8672-8673.

²⁹⁹ T. L. Halo, J. Appelbaum, E. M. Hobert, D. M. Balkin and A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *131*, 438-439.

Chapitre 3 : Stratégies de marquage fluorescent de protéines utilisant des protéines de fusion - Applications des chélates de lanthanides à l'imagerie cellulaire.

des protéines qu'elles reconnaissent spécifiquement. En revanche, ce sont des techniques ne permettant pas d'obtenir de systèmes pro-fluorescents.

2.4.1 LA PHOSPHOPANTHÉINE TRANSFERASE (PPTase)

La PPTase permet le transfert d'un bras réactif provenant de la coenzyme A sur des protéines dites de transport (CP : *Carrier Protein*) via un résidu sérine. La modification chimique de ce cofacteur par l'insertion d'un fluorophore n'altère que modérément son affinité pour l'enzyme. Ainsi, la présence de protéines fusionnées avec une protéine de transport localisées dans les membranes cellulaires sera révélée par fluorescence (Schéma 22-A).³⁰⁰ Cette étiquette protéinique constituée de 80 à 100 acides aminés a pu être réduite à 12 acides aminés.³⁰¹

2.4.2 LA BIOTINE LIGASE (BirA)

Sur le même principe, la BirA d'*Escherichia coli* est mise à profit pour insérer une biotine modifiée sur le motif de reconnaissance de cette enzyme. Ce processus est orthogonal à la biotinylation des cellules eukaryotes. L'« accepteur peptidique » (AP) formé de 15 acides aminés se lie à la biotine par un résidu lysine. Le premier exemple qui a été décrit par le groupe de A. Ting fait intervenir une biotine dont la fonction urée est remplacée par une cétone, fonction absente des biomolécules localisées à la surface cellulaire. Une fois la protéine de fusion AP marquée par la biotine cétonique un fluorophore contenant une fonction hydrazide réagira sur cette fonction et illuminera la protéine de fusion.^{302a} L'inconvénient est que le choix de la sonde est limité à une biotine cétonique impliquant une deuxième étape pour insérer la sonde fluorescente. De plus, un marquage intracellulaire se révèle impossible car ce milieu contient d'autres entités comportant des fonctions cétone ou aldéhyde. Plus récemment, d'autres biotines ligases ont permis l'insertion sur des protéines de fusion AP membranaires de divers analogues de biotine contenant des fonctions azoture ou alcyne terminale.^{302b} Bien que ces deux fonctions soient absentes des milieux cellulaires les biotines ligases permettant le transfert de ses substrats ne sont plus orthogonales aux composés biotinylés endogènes.^{302c}

2.4.3 L'ACIDE LIPOÏQUE LIGASE (LplA)

L'équipe de A. Ting a aussi développé différents mutants de la LplA d'*Escherichia coli* autorisant le marquage de différents marqueurs sur des protéines (membranaires ou

³⁰⁰ a) N. George, H. Pick, H. Vogel, N. Johnsson and K. Johnsson, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 8896-8897 ; b) J. Yin, F. Liu, X. Li and C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 7754-7755.

³⁰¹ Z. Zhou, A. Koglin, Y. Wang, A. P. McMahon and C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 9925-9930.

³⁰² a) I. Chen, M. Howarth, W. Lin and A. Y. Ting, *Nat. Meth.*, **2005**, *2*, 99-104 ; b) S. A. Slavoff, I. Chen, Y.-A. Choi and A. Y. Ting, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 1160-1162 ; c) R. Wombacher and V. W. Cornish, *J. Biophotonics*, **2011**, *4*, 391-402.

Chapitre 3 : Stratégies de marquage fluorescent de protéines utilisant des protéines de fusion - Applications des chélates de lanthanides à l'imagerie cellulaire.

intracellulaires) étiquetées avec leur motif peptidique de reconnaissance (LAP : *LpIA Acceptor Peptide*, constitué de 13 acides aminés ; le lien s'opère par un résidu lysine).³⁰³ Ceux-ci sont soit directement fluorescents (dérivés de coumarine)³⁰⁴ soit permettent un accrochage spécifique ultérieur *via* des réactions bioorthogonales,³⁰⁵ de photomarquage³⁰⁶ (azoture d'aryle fluoré) ou de reconnaissance avec le Halo-tag³⁰⁷ (Schéma 22-B) par exemple. Actuellement, les seules sondes fluorescentes pouvant être directement greffées sur l'étiquette LAP sont les coumarines puisque les fluorophores plus volumineux de type cyanine, rhodamine ou fluorescéine, présentant l'avantage d'être plus brillants et d'émettre à de plus grandes longueurs d'onde ne sont malheureusement pas encore compatibles avec les ligases développées.

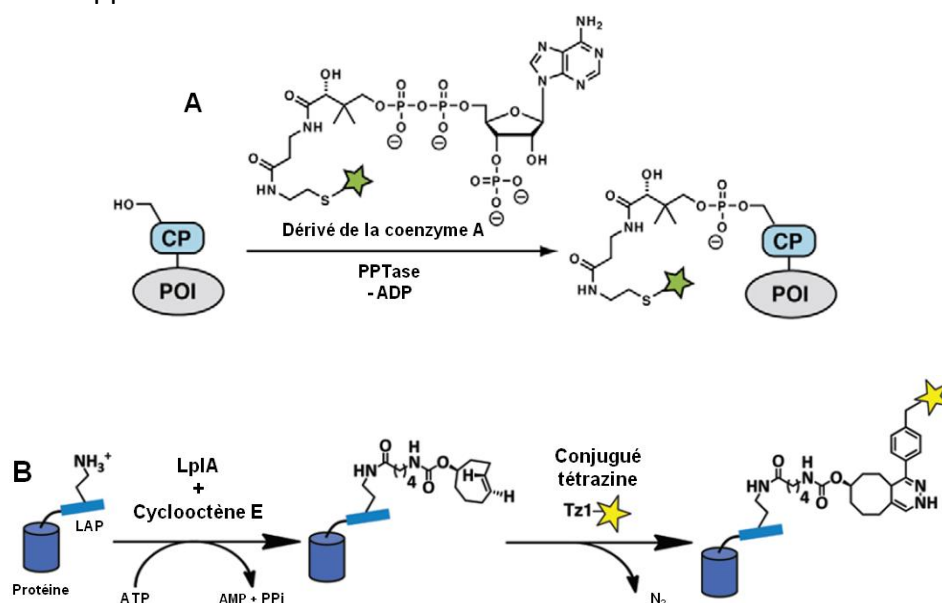


Schéma 22 : Schémas de principe de marquage enzymatique avec la PPTase²⁸⁴ ou une mutante de la LpIA^{305a} (AMP, ADP, ATP : Adénosine Mono(Di ou Tri)Phosphate ; PPI : anion pyrophosphate).

2.5. REACTIONS BIOORTHOGONALES

L'introduction d'une étiquette peptidique ou protéinique ne peut pas être réalisée par ingénierie génétique sur toutes les biomolécules. Pour ces composés (lipides, glycanes, acides nucléiques et autres métabolites) il faut avoir recours à l'incorporation d'un groupement fonctionnel (la biomolécule étudiée est incubée avec un précurseur

³⁰³ M. Fernandez-Suarez, H. Baruah, L. Martinez-Hernandez, K. T. Xie, J. M. Baskin, C. R. Bertozzi, and A. Y. Ting, *Nat. Biotechnol.*, **2007**, 25, 1483-1487.

³⁰⁴ a) C. Uttamapinant, K. A. White, H. Baruah, S. Thompson, M. Fernandez-Suarez, S. Puthenveetil and A. Y. Ting, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2010**, 107, 10914-10919 ; b) C. Uttamapinant, A. Tangpeerachaikul, S. Grecian, S. Clarke, U. Singh, P. Slade, K. R. Gee and A. Y. Ting, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51, 5852-5856.

³⁰⁵ a) D. S. Liu, A. Tangpeerachaikul, R. Selvaraj, M. T. Taylor, J. M. Fox and A. Y. Ting, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 792-795 ; b) J. Z. Yao, C. Uttamapinant, A. Poloukhine, J. M. Baskin, J. A. Codelli, E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, V. V. Popik and A. Y. Ting, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 3720-3728.

³⁰⁶ H. Baruah, S. Puthenveetil, Y.-A. Choi, S. Shah and A. Y. Ting, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, 47, 7018-7021.

³⁰⁷ S. Puthenveetil, D. S. Liu, K. A. White, S. Thompson and A. Y. Ting, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 16430-16438.

métabolique le possédant) réagissant dans un second temps sur la sonde. Cette paire doit être judicieusement sélectionnée afin que les deux partenaires, absents des systèmes vivants, s'associent l'un à l'autre de manière sélective, rapide et à haute dilution dans un milieu biologique complexe contenant de fait de l'eau ainsi que de nombreuses espèces réactives (amines, thiols, hydroxyles) et cela sans le perturber ; évidemment, la liaison qui en résulte doit aussi être stable. Une réaction satisfaisant ces critères est désignée comme bioorthogonale, concept développé initialement par C. Bertozzi à la fin des années 1990.³⁰⁸ Les réactions associées à ce principe sont calquées sur des réactions déjà bien établies en chimie organique. En revanche, le défi majeur est de les rendre compatibles avec le milieu biologique.

Par exemple, la première réaction développée dans ce contexte est dérivée de la réaction de Staudinger entre un azoture (de préférence un azoture d'aryle qui est moins enclin à la réduction à pH physiologique par les thiols) lié à une biomolécule et un dérivé de triphénylphosphine contenant un fluorophore (**A-23**).^{308,309} Malheureusement, la cinétique de la réaction n'est pas suffisamment rapide pour des applications *in vivo*. Cette stratégie se montre néanmoins applicable *in vitro*.³¹⁰ Enfin, il est aussi possible d'exalter la nucléophilie de la phosphine par l'incorporation de groupements électro-donneurs mais son oxydation devient alors plus favorable que l'attaque sur l'azoture.

Le développement d'une variante de la réaction de cycloaddition de Huisgen entre un azoture et un alcyne vrai a conduit au premier marquage efficace *in vivo* de biomolécules localisées à la surface de cellules. L'obtention d'une cinétique acceptable sans ajout de catalyseur cytotoxique comme le cuivre (réaction appartenant au répertoire de la « click chemistry » dont la catalyse efficace par le cuivre (I) a été découverte par l'équipe de M. Meldal en 2001 puis généralisée par cette dernière et celle de B. Sharpless)³¹¹ nécessite l'emploi d'alcynes contraints comme les cyclooctynes qui sont les plus petits alcynes cycliques suffisamment stables (**B-23**).³⁰⁸ Très récemment, il a été montré que les azotures peuvent être substitués par les diazo dont certains sont plus réactifs.³¹²

Une troisième solution repose sur une réaction de Diels-Alder à demande inverse entre une 1,2,4,5-tétrazine contenant le fluorophore et un alcène tendu, norbornène³¹³ ou cyclooctène de configuration E (**C-23**),³¹⁴ accroché à la biomolécule d'intérêt. L'avantage de cette réaction est sa cinétique extrêmement rapide, notamment dans le cas du cyclooctène (environ 10⁵ fois plus rapide que la réaction entre un azoture et un cyclooctyne

³⁰⁸ E. M. Sletten and C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.*, **2011**, *44*, 666-676.

³⁰⁹ E. M. Sletten and C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 6974-6998.

³¹⁰ a) C. I. Schilling, N. Jung, M. Biskup, U. Schepers and S. Bräse, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, *40*, 4840-4871 ; b) S. S. van Berkel, M. B. van Eldijk and J. C. M. van Hest, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 8806-8827.

³¹¹ M. Meldal and C. W. Tornøe, *Chem. Rev.*, **2008**, *108*, 2952-3015.

³¹² N. A. McGrath and R. T. Raines, *Chem. Sci.*, **2012**, *3*, 3237-3240.

³¹³ N. K. Devaraj, R. Weissleder and S. A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chem.*, **2008**, *19*, 2297-2299.

³¹⁴ a) M. L. Blackman, M. Royzen and J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 13518-13519 ; b) M. T. Taylor, M. L. Blackman, O. Dmitrenko and J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 9646-9649 ; c) N. K. Devaraj and R. Weissleder, *Acc. Chem. Res.*, **2011**, *44*, 816-827.

contraint).^{314b} En revanche, la synthèse de cet alcène de configuration E n'est pas triviale et nécessite l'emploi d'un dispositif d'irradiation photochimique en flux continu.^{314a,b}

D'autres réactions bioorthogonales sont aussi en cours de développement. Par exemple, la mise au point du couplage de Suzuki en milieu aqueux à 37 °C grâce à l'utilisation d'une pyrimidine substituée comme ligand du palladium(0) et un autre ligand piégeant ce métal a permis de greffer quantitativement divers acides boroniques sur une protéine contenant une *para*-iodophénylalanine (**E-23**) ;³¹⁵ des réactions de métathèse sont aussi à l'étude³¹⁶ ainsi que des cycloadditions 1,3-dipolaires photoinduites entre des tétrazoles substitués (**D-23**) ou des azirines et des alcènes appauvris en électrons (« photoclick chemistry »).³¹⁷

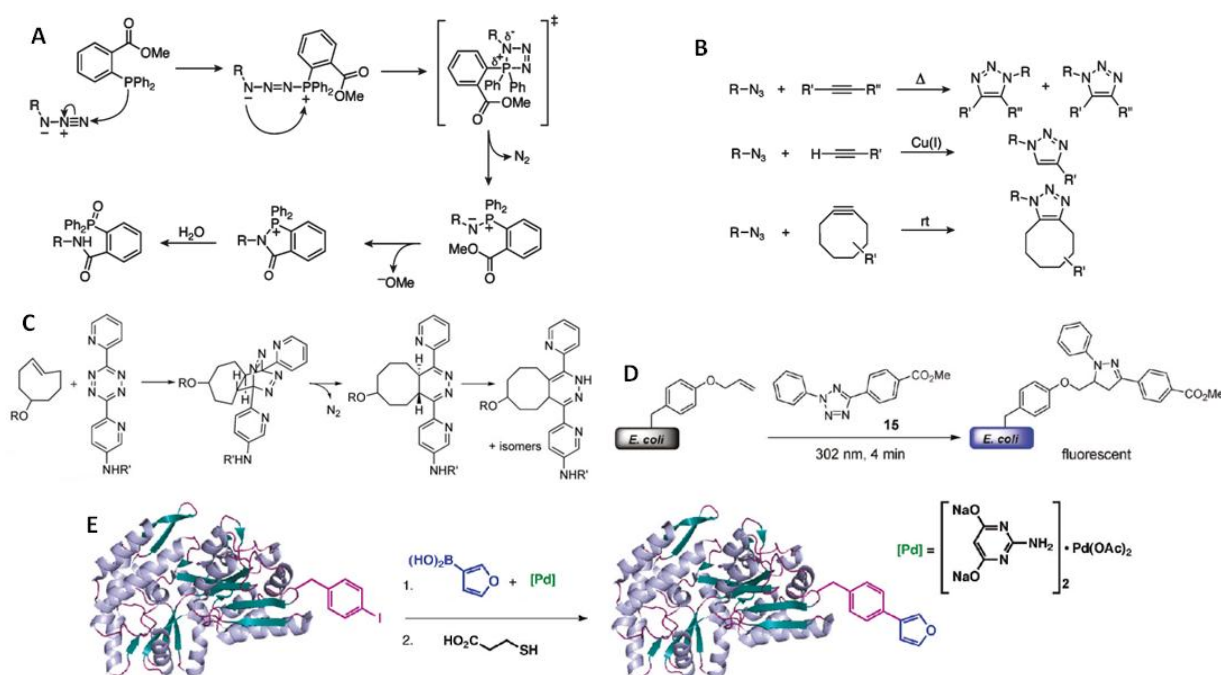


Schéma 23 : Quelques réactions bioorthogonales.^{308,309,316,317}

L'inconvénient principal de cette méthode reste la nécessité de modifier les protéines avec des groupements qui ne sont pas des acides aminés naturels. Elle requiert donc l'isolation, la purification puis la modification des dites protéines ou biomolécules ciblées.

2.6. PHOTOMARQUAGE D’AFFINITE

Certains réactifs conduisent, suite à une photoactivation, à la formation d'une liaison covalente par insertion dans une liaison C-C, C-H, X-H, X étant un hétéroatome (PAL : *PhotoAffinity Labelling*). Le nombre de fonctions autorisant un tel marquage est assez limité car elles doivent remplir plusieurs critères dont être relativement stables à la lumière ambiante, générer par voie photochimique un état excité d'une durée de vie assez longue

³¹⁵ C. D. Spicer and B. G. Davis, *Chem. Commun.*, **2011**, 47, 1698-1700.

³¹⁶ J. M. Chalker, G. a. J. L. Bernardes and B. G. Davis, *Acc. Chem. Res.*, **2011**, 44, 730-741.

³¹⁷ R. K. V. Lim and Q. Lin, *Acc. Chem. Res.*, **2011**, 44, 828-839.

Chapitre 3 : Stratégies de marquage fluorescent de protéines utilisant des protéines de fusion - Applications des chélates de lanthanides à l'imagerie cellulaire.

afin de réagir à proximité du site de reconnaissance, en revanche, ce temps doit aussi être plus court que celui de la dissociation récepteur-ligand et la liaison formée doit se montrer stable.³¹⁸ Un écart à ces conditions pourra engendrer un taux de marquage médiocre et/ou du marquage non-spécifique.

Trois classes de composés se sont imposées dans ce mode de marquage : les benzophénones, les azotures d'aryles et les diazirines. Les premiers présentent l'avantage, une fois activés, de revenir, en présence d'eau, à leur état fondamental s'ils n'ont pas pu réagir avec un acide aminé ou une protéine, et ainsi de pouvoir être à nouveau photoactivés. C'est pourquoi les benzophénones conduisent à des efficacités de marquage globalement plus élevées. De plus, elles s'insèrent préférentiellement dans des liaisons C-H non-réactives même en présence d'eau ou de nucléophiles encombrés.³¹⁹

Les deux autres types de réactifs, une fois photoactivés forment soit un carbène (à partir d'une diazirine)³²⁰ soit un nitrène ou une déhydroazépine (à partir d'un azoture d'aryle halogéné ou non-halogéné respectivement) ; ce dernier intermédiaire ne réagit que sur les fonctions amines. L'ajout d'atomes de fluor d'une part stabilise les carbènes (la proportion en composé diazo menant à du marquage non-spécifique par l'intermédiaire du carbocation formé est ainsi diminuée) et les nitrènes intermédiaires et d'autre part permet une photoactivation des azotures d'aryle à des longueurs d'onde moins énergétiques (cf. Schéma 24). L'activation de ces composés n'est cependant pas réversible.

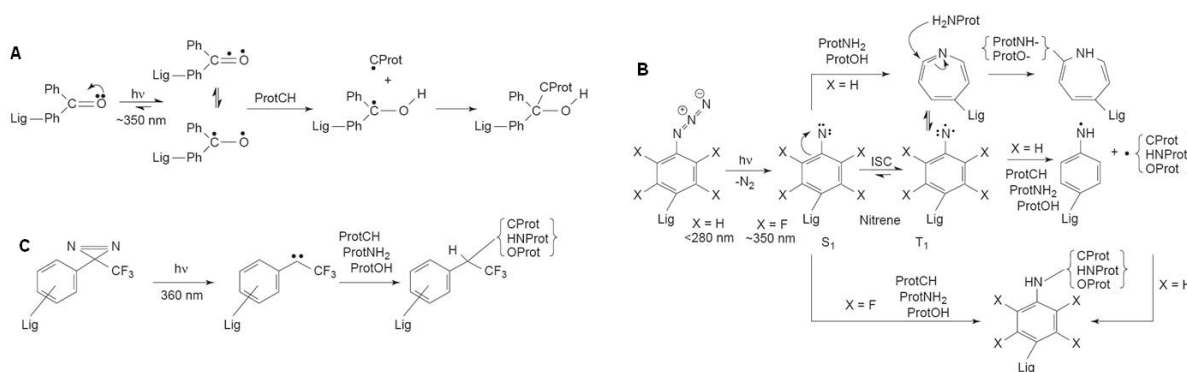


Schéma 24 : Mécanismes réactionnels aboutissant au marquage covalent par photoactivation de la benzophénone (A), d'azoture d'aryle (B), ou de diazirine d'aryle (C) (Lig : ligand ; Prot : protéine).³¹⁸

Ce procédé, utilisé en protéomique, permet de coupler une protéine interagissant avec une deuxième marquée par un groupement photoactivable ou de localiser sur une protéine l'emplacement et la structure d'un site récepteur d'un ligand d'intérêt par exemple.^{318b}

Les diazirines aliphatiques, bien qu'*a priori* moins efficaces que les benzophénones (par exemple la *para*-benzoylphénylalanine), connaissent un intérêt croissant car elles présentent

³¹⁸ a) S. A. Fleming, *Tetrahedron*, **1995**, *51*, 12479-12520 ; b) G. Dorman and G. D. Prestwich, *Trends Biotechnol.*, **2000**, *18*, 64-77.

³¹⁹ G. Dorman and G. D. Prestwich, *Biochemistry*, **1994**, *33*, 5661-5673.

³²⁰ a) J. Das, *Chem. Rev.*, 2011, *111*, 4405-4417 ; b) L. Dubinsky, B. P. Krom and M. M. Meijler, *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, *20*, 554-570.

une contrainte stérique moindre et par conséquent perturbent moins les interactions entre biomolécules. Ainsi, plusieurs acides aminés non-naturels³²¹ ou bases de l'ADN³²² contenant ce motif ont été synthétisés et appliqués à du marquage intracellulaire.

2.7. SONDES BI-FONCTIONNELLES

Les marqueurs de protéines utilisés par cette méthode peuvent être conçus selon deux approches différentes. Dans les deux cas, la sonde contient une fonction réactive autorisant la liaison sur la biomolécule désirée grâce à une reconnaissance mutuelle qui rapproche favorablement ces deux partenaires pour qu'ils réagissent. Cette étape de reconnaissance peut cependant s'effectuer de deux manières : soit la protéine d'intérêt est décorée d'un tag peptidique affin pour le marqueur, soit ce dernier incorpore un ligand spécifique de la protéine à visualiser.

Concernant l'accrochage sur des protéines recombinantes les différents tags peptidiques, à savoir poly-histidine,³²³ poly-aspartate³²⁴ et FLAG (Asp-Tyr-Lys-Asp₄-Lys)³²⁵ ont été utilisés pour la visualisation de protéines membranaires. Différentes fonctions réactives ont été insérées sur les différents marqueurs : un motif *N*- α -chloroacétyle³²⁴ pour un accrochage sur une cystéine ; un thioester subissant une attaque nucléophile d'un résidu lysine ;³²⁵ un ester de tosylo halogéné réagissant directement sur une histidine du tag ;^{323b} un azoture d'aryle photoréactif.^{323a} Ces méthodes permettent de créer une liaison covalente plus stable que les interactions électrostatiques entre le métal et l'étiquette, en revanche leurs cinétique et conversion sont moins bonnes que celles obtenues par les SNAP- CLIP- ou Halo-tag.^{247b}

³²¹ **a)** M. Suchanek, A. Radzikowska and C. Thiele, *Nat Meth*, **2005**, 2, 261-268 ; **b)** C. Chou, R. Uprety, L. Davis, J. W. Chin and A. Deiters, *Chem. Sci.*, **2011**, 2, 480-483.

³²² C.-X. Song and C. He, *Acc. Chem. Res.*, **2011**, 44, 709-717.

³²³ **a)** M. Hintersteiner, T. Weidemann, T. Kimmerlin, N. Filiz, C. Buehler and M. Auer, *ChemBioChem*, **2008**, 9, 1391-1395 ; **b)** S.-h. Uchinomiya, H. Nonaka, S.-h. Fujishima, S. Tsukiji, A. Ojida and I. Hamachi, *Chem. Commun.*, **2009**, 5880-5882.

³²⁴ **a)** H. Nonaka, S. Tsukiji, A. Ojida and I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 15777-15779 ; **b)** H. Nonaka, S.-h. Fujishima, S.-h. Uchinomiya, A. Ojida and I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 9301-9309.

³²⁵ H. Nonaka, S.-h. Fujishima, S.-h. Uchinomiya, A. Ojida and I. Hamachi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, 19, 6696-6699.

Chapitre 3 : Stratégies de marquage fluorescent de protéines utilisant des protéines de fusion - Applications des chélates de lanthanides à l'imagerie cellulaire.

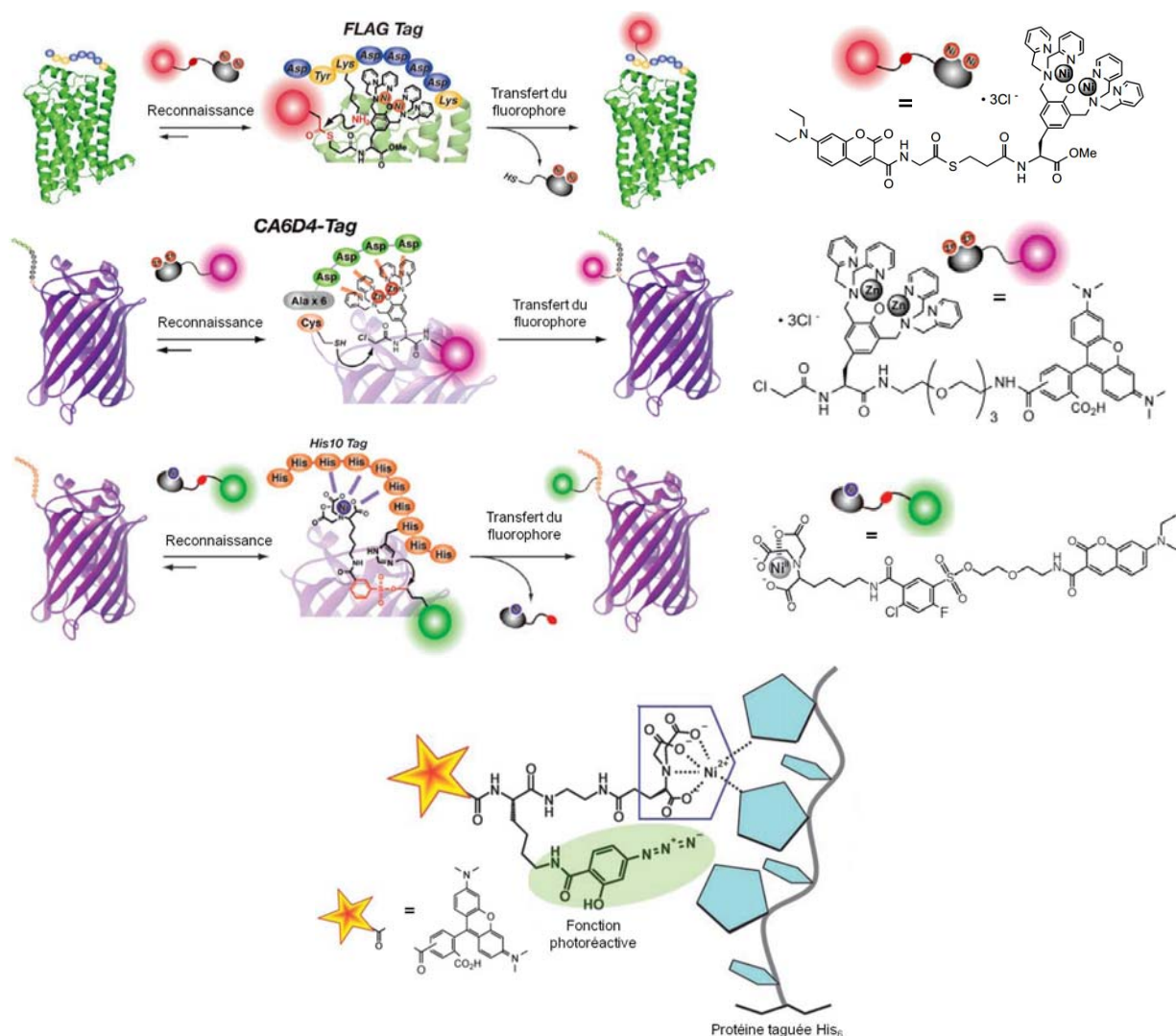


Figure 105 : Illustrations décrivant le mode d'action des différentes sondes bi-fonctionnelles autorisant une accroche covalente sur des protéines recombinantes.^{323,324,325}

Quant à la deuxième approche, développée par l'équipe de I. Hamachi, bien que moins générale, elle présente l'énorme avantage de marquer, *in cellulo*, la protéine sous sa forme native sans adjonction d'aucune séquence peptidique.³²⁶ Selon cette stratégie, deux voies concernant l'introduction du marqueur fluorescent sur la protéine ont été envisagées : soit celle-ci, comme précédemment, est greffée au ligand ; le lien s'effectue grâce à l'attaque d'un acide aminé à chaîne latérale nucléophile de la biomolécule sur la sonde contenant un groupement partant de type tosylo (chimie LDT : *Ligand-Directed Tosyl*)^{327a} ou acyle imidazole (chimie LDAI : *Ligand-Directed Acyl Imidazole*)^{327b}, ce dernier étant plus réactif que le premier et toujours sélectif de la protéine désirée. La deuxième stratégie est fondée sur le principe de l'organocatalyse et a été appliquée à du marquage de surface cellulaire. Le

³²⁶ T. Hayashi and I. Hamachi, *Acc. Chem. Res.*, **2012**, *45*, 1460-1469.

³²⁷ a) T. Tamura, S. Tsukiji and I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 2216-2226 ; b) S.-h. Fujishima, R. Yasui, T. Miki, A. Ojida and I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 3961-3964.

Chapitre 3 : Stratégies de marquage fluorescent de protéines utilisant des protéines de fusion - Applications des chélates de lanthanides à l'imagerie cellulaire.

marqueur est toujours formé d'un ligand de reconnaissance pour la protéine native ciblée, mais en plus, d'une partie constitué de plusieurs DMAP activant la sonde fluorescente libre, conduisant à l'accrochage, encore par attaque nucléophile, d'un acide aminé situé à proximité du site récepteur de la protéine (chimie AGD : *Affinity-Guided DMAP*).³²⁸

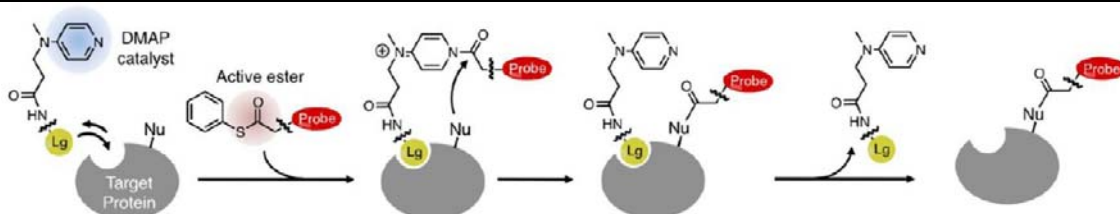
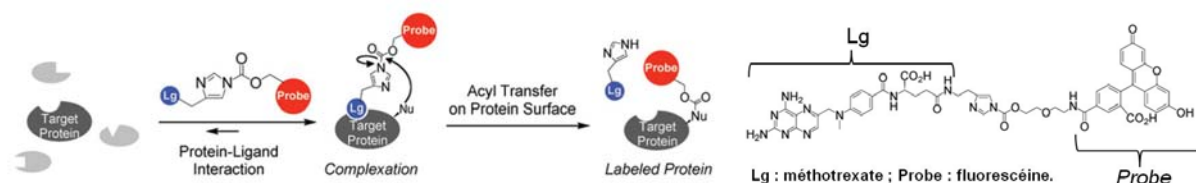


Figure 106 : Représentation schématique de l'accrochage selon le concept LDAI (haut) ou AGD (bas).^{327,328}

Deux bémols peuvent cependant être soulevés : cette approche impose pour chaque protéine étudiée un ligand affiné et de plus, selon Hamachi lui-même,³²⁶ le site de l'accrochage n'est pas prédictible, et présuppose la présence d'un nucléophile à proximité du site de liaison. Enfin, ce système ne permet pas d'obtenir un système où la fluorescence ne serait révélée qu'une fois l'accrochage sur la protéine effectuée.

3 BILAN

Comme l'illustrent les différents exemples cités précédemment, dont certains ont été décrits après le début de cette thèse, la mise au point d'une technique universelle rendant compte de la dynamique et des interactions entre biomolécules dans leur milieu biologique s'avère un défi majeur voire même relève de l'utopie. En effet, les stratégies menant aux marquages les plus efficaces et sélectifs *in cellulo* requièrent l'utilisation de protéines de fusion non-naturelles. Quant aux techniques fondées sur l'ajout d'une étiquette peptidique moins volumineuse, soit elles ne conduisent pas à la formation d'une liaison permanente avec le fluorophore soit, pour les sondes bi-fonctionnelles et les réactions bioorthogonales où une liaison covalente est créée, le rendement et/ou la cinétique ne sont pas aussi favorables. De plus, toutes ces méthodes ne permettent pas nécessairement une incorporation intracellulaire non-invasive de la sonde ou du motif de reconnaissance ainsi qu'une fluorescence du marqueur. Nonobstant ces nombreuses limitations, le panel de plus en plus

³²⁸ H. Wang, Y. Koshi, D. Minato, H. Nonaka, S. Kiyonaka, Y. Mori, S. Tsukiji and I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 12220-12228.

varié des techniques de marquage a rendu possible d'importantes avancées dans la compréhension des mécanismes biologiques à l'échelle microscopique.

L'objectif de cette seconde partie de thèse sera de tirer partie d'une propriété des chélates de lanthanides, à savoir la variation du signal de luminescence en fonction de leur environnement avec comme but ultime un accrochage covalent sur la protéine ciblée.

Avant de décrire la stratégie choisie, nous allons décrire quelques exemples représentatifs de sondes lanthanidiques dont la luminescence est modulée en présence d'un analyte spécifique.

II. COMPLEXES DE LANTHANIDES : DES SONDES LUMINESCENTES A INTENSITE MODULABLE

1 PRINCIPE

Bien que l'optimisation des complexes de lanthanides se montre parfois délicate suite au mécanisme complexe de transfert d'énergie entre le chromophore et le cation métallique, il s'avère néanmoins possible d'en profiter pour développer des sondes lanthanidiques qui selon leur environnement présenteront des propriétés de luminescence différentes.^{116,329}

Plusieurs paramètres influençant le rendement quantique de luminescence peuvent être modifiés par la présence d'un, de préférence, ou de plusieurs bioanalytes :

- l'efficacité avec laquelle le niveau triplet de l'antenne se peuple (par exemple si un analyte inhibe, par PeT, l'état excité singulet du chromophore la luminescence du métal sera éteinte) ;
- la position de l'état triplet de l'antenne par rapport au niveau de réception du lanthanide (s'il se rapproche du niveau de réception du métal sa désactivation non-radiative, par exemple par formation d'oxygène singulet, devient compétitive) ;
- la distance séparant la partie chromophorique du cation métallique ;
- le nombre de molécules d'eau coordonnées au métal.

Quelques chélates ont été conçus pour détecter des analytes faisant varier la distance entre le métal et l'antenne³³⁰ ou catalysant la formation de cette dernière³³¹ mais le mode d'action de la très grande majorité des complexes lanthanidiques « intelligents » repose sur une interaction entre l'analyte et le chromophore ou le lanthanide du chélate.

Les principaux analytes pouvant être détectés selon cette stratégie sont certains cations métalliques (Na^+ , K^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+}), les protons, l'oxygène, le peroxyde d'hydrogène, le radical

³²⁹ a) D. Parker, *Coord. Chem. Rev.*, **2000**, 205, 109-130 ; b) J. Leonard, C. Nolan, F. Stomeo, T. Gunnlaugsson, V. Balzani and S. Campagna, *Topics in Current Chemistry*, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, **2007**, vol. 281, pp. 1-43.

³³⁰ a) K. Lee, V. Dzubeck, L. Latshaw and J. P. Schneider, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 13616-13617 ; b) A. Thibon and V. C. Pierre, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 434-435.

³³¹ a) R. F. H. Viguiet and A. N. Hulme, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 11370-11371 ; b) E. Pershagen, J. Nordholm and K. E. Borbas, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 9832-9835.

Chapitre 3 : Stratégies de marquage fluorescent de protéines utilisant des protéines de fusion - Applications des chélates de lanthanides à l'imagerie cellulaire.

hydroxyle, l'oxyde nitrique, le peroxydite, les halogénures, quelques enzymes et certains anions d'intérêt biologique ((hydrogène)carbonate, phosphate, ascorbate, lactate, urate, citrate et malate). Seuls ces derniers interagissent directement avec le cation métallique³³² qui est inséré dans une structure, le plus souvent, ne permettant pas de saturer sa sphère de coordination alors complétée par une ou deux molécules d'eau (excepté l'ion fluorure qui est aussi capable de remplacer une molécule d'eau).³³³

Il a aussi été montré que des chélates d'euprium et de terbium ne disposant pas de structure complexante définie puisque formés à partir d'analogues de tétracycline ou de fluoroquinolones voient leur intensité d'émission varier significativement en présence de certains analytes (enzymes, phosphates, H₂O₂,...); cette stratégie ne sera pas détaillée dans ce manuscrit.³³⁴

2 EXEMPLES D'APPLICATIONS

2.1. INTERACTION ANALYTE-CHROMOPHORE

En règle générale, mis à part les composés anioniques, tous les analytes cités précédemment induisent une modulation de l'émission du lanthanide par la relation qu'ils peuvent entretenir avec l'antenne ou un motif de reconnaissance proche du chromophore.

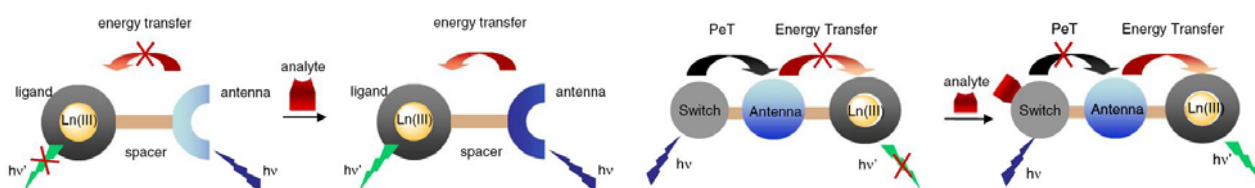


Schéma 25 : Représentation de la modulation de la luminescence par interaction directe de l'analyte avec l'antenne (gauche) modifiant l'énergie de son état triplet ou *via* un motif de reconnaissance située proche de l'antenne (droite).¹¹⁶

2.1.1 SONDÉS METALLIQUES

Différents senseurs sélectifs du cation Zn²⁺ grâce au motif Dpa le plus souvent et reposant sur des chélates de lanthanides sont décrits dans la littérature³³⁵ dont le chélate **A** du Schéma 26 (**A-26**). L'intensité de luminescence de l'euprium après ajout d'un équivalent de ZnCl₂ est augmentée d'un facteur 8.5.^{335a} Selon les auteurs il ne s'agirait pas d'une inhibition liée à un mécanisme de PeT puisque même si l'amine tertiaire, sans ajout de Zn(II), est

³³² a) D. Parker, R. S. Dickins, H. Puschmann, C. Crossland and J. A. K. Howard, *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 1977-2010 ; b) S. J. Butler and D. Parker, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, DOI : 10.1039/C2CS35144G.

³³³ R. Tripier, C. Platas-Iglesias, A. Boos, J.-F. Morfin and L. Charbonnière, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2010**, 2735-2745.

³³⁴ C. Spangler and M. Schäferling, *Springer Series on Fluorescence*, P. Hänninen and H. Härnä (eds.), Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, **2011**, vol. 7, pp. 235-262.

³³⁵ a) K. Hanaoka, K. Kikuchi, H. Kojima, Y. Urano and T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 12470-12476 ; b) S. J. A. Pope and R. H. Laye, *Dalton Trans.*, **2006**, 3108-3113 ; c) K. Hanaoka, K. Kikuchi, S. Kobayashi and T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 13502-13509.

Chapitre 3 : Stratégies de marquage fluorescent de protéines utilisant des protéines de fusion - Applications des chélates de lanthanides à l'imagerie cellulaire.

protonée la luminescence n'est pas exaltée, aussi q reste inchangé. Un mécanisme de transfert de charge des pyridines sur l'euprium pourrait peut-être expliquer la plus forte intensité après complexation avec le Zn(II). Quant au chélate **B-26** l'ajout d'un équivalent du cation Zn(II) entraîne une diminution de la luminescence accompagnée d'une augmentation de la fluorescence de l'antenne car q passe de zéro à deux suite à la complexation des pyridines par ce cation divalent.^{335b}

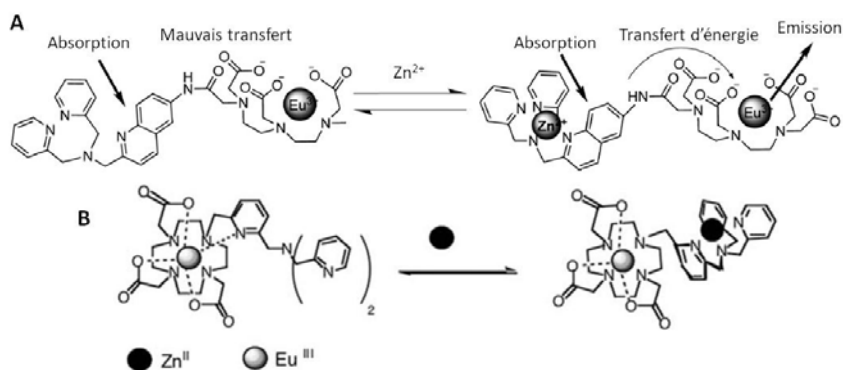


Schéma 26 : Exemples de senseurs à l'euprium(III) du cation Zn²⁺.³³⁵

Le chélate de terbium bis-pyrazolopyridine **A** de la Figure 107, substitué par une structure soufrée coordonnant sélectivement le cation Hg²⁺, possède un rendement quantique cinq fois plus élevé à pH 7.0 s'il est lié au mercure (l'état singulet de l'antenne doit être désactivé par PeT en absence de ce cation).³³⁶

Le chélate d'euprium **B** de la même figure, par l'intermédiaire de l'éther couronne, complexe préférentiellement K⁺ vis-à-vis de Na⁺, Li⁺, Ca²⁺ ou Mg²⁺.³³⁷ Cette molécule permet aussi une mesure ratiométrique de l'intensité après excitation à 265 nm par rapport à celle obtenue suite à une excitation à 400 nm, longueur d'onde à laquelle la luminescence demeure invariable. Enfin, à pH 7.0 et excité à 265 nm le complexe, après chélation du potassium, émet avec une intensité augmentée de 83%.

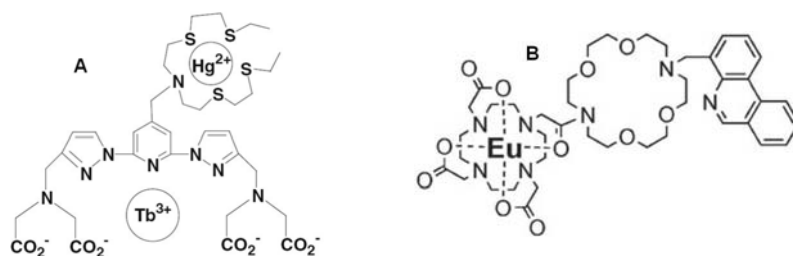


Figure 107 : Senseurs lanthanidiques des cations Hg²⁺ (A)³³⁶ et K⁺ (B).³³⁷

³³⁶ G. Cui, Z. Ye, R. Zhang, G. Wang and J. Yuan, *J. Fluoresc.*, **2012**, 22, 261-267.

³³⁷ E. A. Weitz and V. C. Pierre, *Chem. Commun.*, **2011**, 47, 541-543.

2.1.2 SONDES ENZYMATIQUES

Plusieurs chélates de lanthanides (principalement au terbium) ont été conçus afin de détecter *in vitro* l'activité d'une enzyme spécifique. La modulation du signal est le plus souvent obtenue soit par un mécanisme de PeT qui s'active ou se désactive suite à une modification fonctionnelle d'un motif lié au chromophore, soit par altération directe de l'antenne, ces deux processus étant catalysés par l'enzyme d'intérêt.

L'équipe de T. Nagano a par exemple développé différentes sondes conduisant soit à une inhibition (senseur LAP : *Leucine AminoPeptidase*, l'intensité est diminuée d'un facteur 500),^{338a} soit à une exaltation de luminescence (senseur NAT : N-AcetylTransferase, augmentation d'un facteur 100).^{338b} Ce groupe a aussi montré qu'il est possible de détecter une *alkaline phosphatase* (ALP) en mode ratiométrique.^{338c}

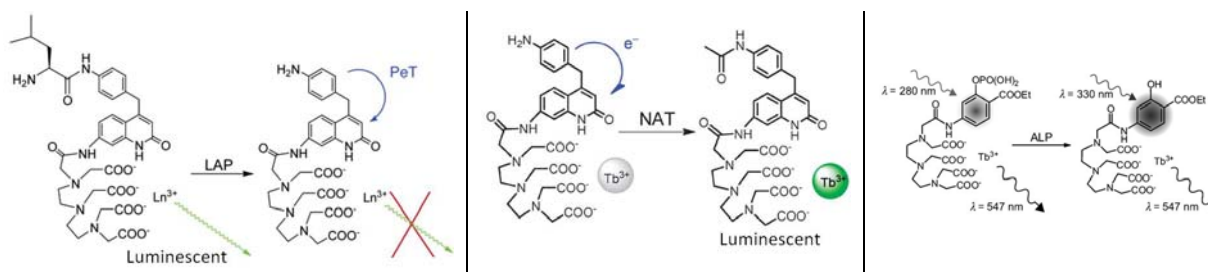
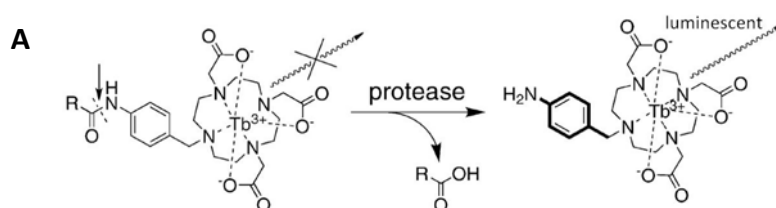


Schéma 27 : Senseurs enzymatiques de lanthanides développés par l'équipe de T. Nagano.³³⁸

L'activité d'autres enzymes comme des peroxydases,³³⁹ estérases,³⁴⁰ kinases³⁴¹ ou phosphatases³⁴² a aussi pu être détectée par différents complexes de terbium(III) ou d'euprimum(III). Enfin, la sonde à protéase développée par le groupe de K. Kikuchi (Schéma 28-A), contrairement à celle mise au point par T. Nagano (sonde LAP, Schéma 27) conduit à une exaltation de luminescence, cependant la longueur d'onde d'excitation est trop énergétique car située dans l'UV-C (250 nm).³⁴³



³³⁸ a) T. Terai, K. Kikuchi, S.-y. Iwasawa, T. Kawabe, Y. Hirata, Y. Urano and T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 6938-6946 ; b) T. Terai, K. Kikuchi, Y. Urano, H. Kojima and T. Nagano, *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 2234-2236 ; c) T. Terai, H. Ito, K. Kikuchi and T. Nagano, *Chem. Eur. J.*, **2012**, *18*, 7377-7381.

³³⁹ Z. Ye, J. Chen, G. Wang and J. Yuan, *Anal. Chem.*, **2011**, *83*, 4163-4169.

³⁴⁰ M. S. Tremblay, M. Halim and D. Sames, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 7570-7577.

³⁴¹ M. S. Tremblay, M. Lee and D. Sames, *Org. Lett.*, **2008**, *10*, 5-8.

³⁴² E. Pazos, M. Golicnik, J. L. Mascarenas and M. Eugenio Vazquez, *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 9534-9536.

³⁴³ S. Mizukami, K. Tonai, M. Kaneko and K. Kikuchi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 14376-14377.

Chapitre 3 : Stratégies de marquage fluorescent de protéines utilisant des protéines de fusion - Applications des chélates de lanthanides à l'imagerie cellulaire.

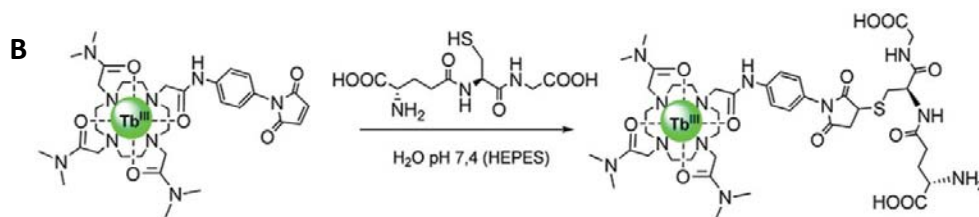
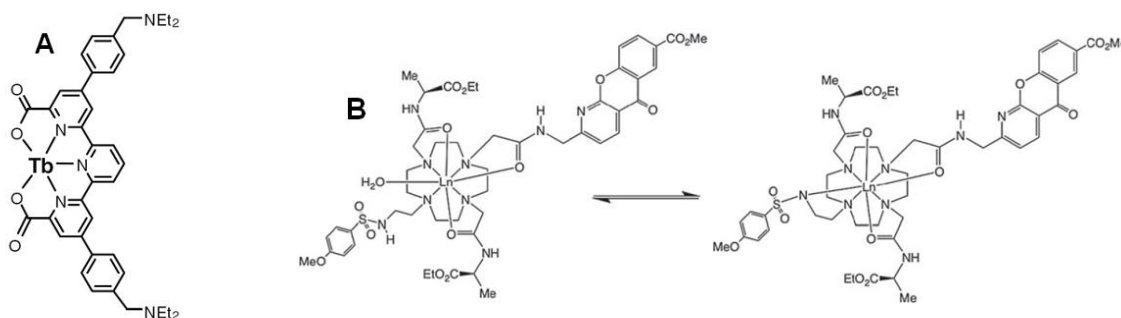


Schéma 28 : Senseurs de protéases³⁴³ et de la glutathione reductase.³⁴⁴

L'équipe de T. Gunnlaugsson a aussi décrit un chélate dont la luminescence est augmentée de 400 à 500% suite à une réaction de thio-alkylation avec le glutathion, uniquement entre un pH de 4 et 10. Elle a ensuite pu appliquer cette sonde à la détection *in vitro* de la glutathione reductase (Schéma 28-B).³⁴⁴

2.1.3 SONDES A pH

Globalement, trois méthodes différentes peuvent conduire les chélates de lanthanides à renseigner sur la valeur du pH d'un milieu. Soit une fonction qui, selon qu'elle soit protonée ou non, rompt, par PeT, le transfert d'énergie entre le chromophore et le lanthanide. Cette fonction, typiquement une amine, est greffée proche de l'aromatique (**A-29**). Soit le chélate peut aussi comporter une fonction qui selon le pH sera ou non capable de complexer le lanthanide et donc de diminuer ou d'augmenter q (**B-29**).^{329a,345} Soit, enfin, la structure chimique de l'antenne dépend du pH, modifiant par conséquent sa configuration électronique (**C-** et **D-29**).



³⁴⁴ B. K. McMahon and T. Gunnlaugsson, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 10725-10728.

³⁴⁵ T. Gunnlaugsson and J. P. Leonard, *Chem. Commun.*, **2005**, 3114-3131.

Chapitre 3 : Stratégies de marquage fluorescent de protéines utilisant des protéines de fusion - Applications des chélates de lanthanides à l'imagerie cellulaire.

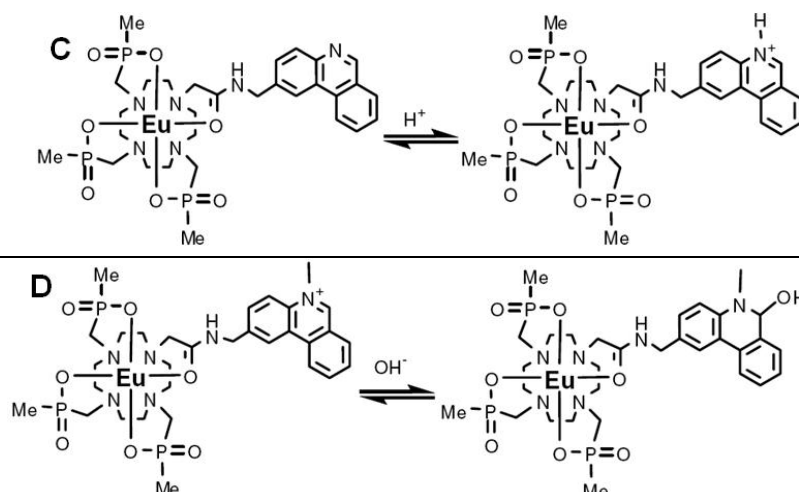


Schéma 29 : Quelques exemples de sondes lanthanidiques à pH.³⁴⁶

Le premier chélate spécialement conçu pour émettre un signal dépendant du pH, **A-29**, est fondé sur un processus de PeT.^{346a} La variation d'intensité s'effectue entre pH 5 et pH 8 avec 100 équivalents de lanthanide ; en milieu acide le terbium est environ 15 fois plus luminescent.

Les nombreux complexes développés par la suite reposent sur une structure chélatante plus stable de type cyclène. Parmi eux, les chromophores phénanthridine ou *N*-méthylphénanthridinium sensibles au pH ont été mis à contribution.^{346b-c} La luminescence de **C-29** diminue d'un facteur 500 entre pH 2 et pH 4. Son analogue au Tb(III) réagit de manière opposé : suite à la protonation, l'énergie du niveau triplet devient trop proche du niveau ⁵D₄.

Quant à la l'intensité de **D-29**, elle n'est altérée (diminution d'un facteur 200) qu'au-delà de pH 12 car l'absorbance à la longueur d'onde d'excitation (380 nm) est nettement amoindrie après insertion réversible de l'hydroxyde. Ce chromophore (avec le *N*-alkyl-quinolinium) est aussi sensible à la présence d'ions Cl⁻, Br⁻ et I⁻ qui désactivent l'état singulet excité par PeT.

Concernant la troisième stratégie, le cyclène est substitué par une antenne peu sensible au pH et distincte du motif sulfonamide qui selon le pH se complexe (pH > 8) ou non (pH < 6) au lanthanide de manière réversible et expulse une molécule d'eau de la sphère de coordination du métal.^{346d-e} Cette stratégie a aussi pu être appliquée pour détecter le pH par IRM.^{148c}

Par conséquent, la géométrie autour du cation est modifiée conduisant à un changement notable des intensités relatives de chaque bande (surtout avec l'euporium). Une mesure en mode ratiométrique est alors possible. Cette dernière classe de composés, dont un exemple est représenté au Schéma 29 (**B-29**), est compatible pour des expériences évaluant le pH *in cellulo*.

³⁴⁶ a) A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne and T. E. Rice, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1996**, 35, 2116-2118 ; b) D. Parker, P. Kanthi Senanayake and J. A. Gareth Williams, *Chem. Commun.*, **1997**, 1777-1778 ; c) D. Parker, P. Kanthi Senanayake and J. A. Gareth Williams, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1998**, 2129-2140 ; d) R. Pal and D. Parker, *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, 6, 1020-1033 ; e) D. G. Smith, B. K. McMahon, R. Pal and D. Parker, *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 8520-8522.

Chapitre 3 : Stratégies de marquage fluorescent de protéines utilisant des protéines de fusion - Applications des chélates de lanthanides à l'imagerie cellulaire.

2.1.4 SONDES A RADICAUX

Deux stratégies ont été envisagées pour la détection de radicaux HO[•]. Dans l'exemple **A** du Schéma 30, l'antenne n'est pas liée par covalence au chélate.³⁴⁷ En revanche, elle réagit sélectivement avec le radical hydroxyle pour former une molécule, d'une part permettant un transfert d'énergie plus efficace sur le terbium et d'autre part plus affine pour le complexe hepta-coordiné (formation d'une structure ternaire où le lanthanide est incorporé dans un cycle à six chaînons avec l'antenne) même en présence de glutamate ; l'intensité est alors améliorée d'un facteur onze. L'exemple **B** fait intervenir un mélange équimolaire du chélate de terbium et d'euporium afin de doser le radical en mode ratiométrique.³⁴⁸ Le groupement *para*-aminophénol éteint la luminescence du lanthanide par désactivation PeT du niveau singulet de la terpyridine. Or cette fonction réagit spécifiquement sur le radical hydroxyle formant ainsi la *para*-quinone imine et libérant le chélate. Le rapport I_{540nm}/I_{610nm} passe de 0.18 à 1.4 à pH 7.2 sous irradiation à 330 nm.

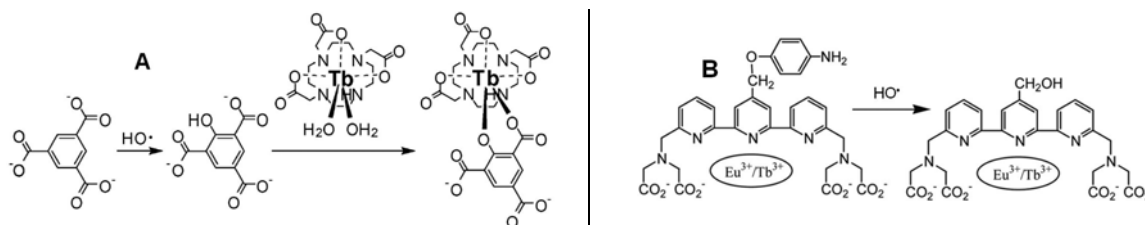


Schéma 30 : Mode d'action du radical HO[•] sur le chromophore.^{347,348}

2.1.5 SONDES A OXYGENE

La sonde à architecture terpyridine substituée par un anthracène (Schéma 31) conduit après réaction avec de l'oxygène singulet à une augmentation du rendement quantique qui passe de 0.9 à 13.8% : l'endoperoxyde formé, contrairement à l'anthracène initial, ne désactive plus l'état singulet du chromophore. Cette réaction rapide et spécifique a permis de visualiser la formation provoquée d'oxygène singulet *in cellulo*.^{349a}

Le deuxième exemple, développé par le groupe de D.Parker, permet de détecter l'oxygène triplet non-réactif.^{349b} Ce système fait intervenir simultanément le chélate de terbium et d'euporium. Le niveau triplet (20 850 cm⁻¹) du naphthyle, très proche du ⁵D₄ du terbium, peut se peupler facilement par transfert d'énergie en retour et se désactiver en formant de l'oxygène singulet. Finalement, la luminescence du chélate de terbium est donc sensible à l'oxygène contrairement à son homologue à l'euporium. La valeur de pO₂ peut ainsi être mesurée en mode ratiométrique.

³⁴⁷ S. E. Page, K. T. Wilke and V. C. Pierre, *Chem. Commun.*, **2010**, 46, 2423-2425.

³⁴⁸ Y. Xiao, Z. Ye, G. Wang and J. Yuan, *Inorg. Chem.*, **2012**, 51, 2940-2946.

³⁴⁹ a) B. Song, G. Wang, M. Tan and J. Yuan, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 13442-13450 ; b) G.-L. Law, R. Pal, L. O. Palsson, D. Parker and K.-L. Wong, *Chem. Commun.*, **2009**, 7321-7323.

Chapitre 3 : Stratégies de marquage fluorescent de protéines utilisant des protéines de fusion - Applications des chélates de lanthanides à l'imagerie cellulaire.

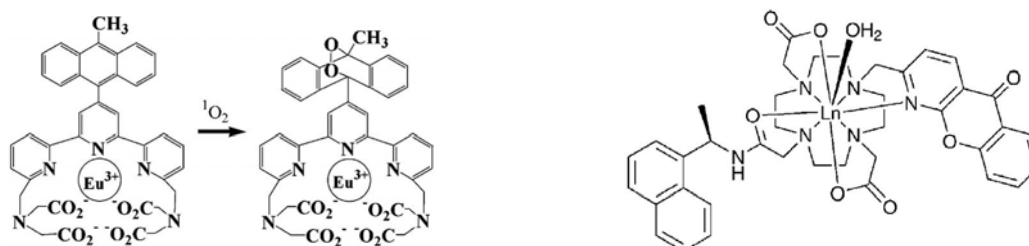


Schéma 31 : Exemples de senseurs à oxygène.³⁴⁹

2.1.6 SONDES AU PEROXYDE D'HYDROGENE

Le mode d'action des ces sondes luminescentes tirent profit de l'oxydation sélective des boronates d'aryle (fonction aussi utilisée pour détecter les sucres et appliquée en IRM)³⁵⁰ par l'eau oxygénée. Deux chélates de terbium ont permis de détecter la présence de cet analyte *in cellulo*.^{351a} L'intensité après oxydation est multipliée par un facteur six dans les deux cas, cependant la réaction est deux fois plus rapide pour le complexe disposant du bras auto-immolable. La longueur d'onde d'excitation est en revanche énergétique : 280 nm. La structure terpyridine permet une excitation moins énergétique à 330 nm, en revanche la cinétique est lente et n'a été appliquée qu'en tampon aqueux à 60 °C.^{351b} Dans ce dernier cas, après oxydation du boronate, et à pH supérieur à 7, le phénolate réduit l'euprium amenant à une extinction de luminescence.

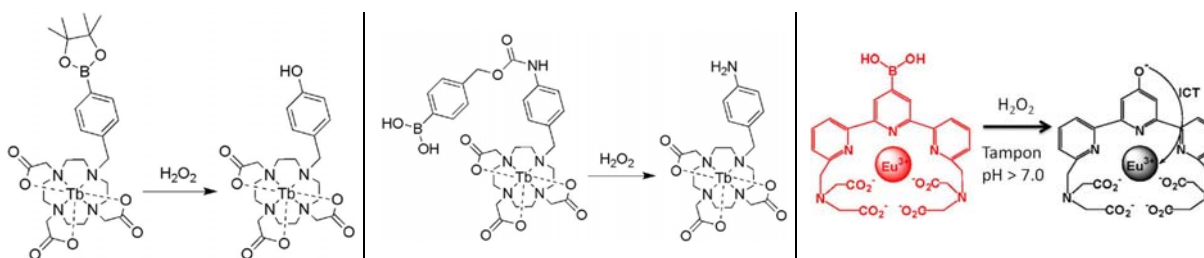


Schéma 32 : Exemples de sondes lanthanidiques sélectives au peroxyde d'hydrogène.³⁵¹

2.1.7 SONDES A OXYDE NITRIQUE

Cette technique de mesure, déjà employée avec des fluorophores organiques,³⁵² a été il y a peu, appliquée à des chélates d'euprium^{353a-b} et d'ytterbium.^{353c} L'oxyde nitrique (NO), en présence d'oxygène, réagit sur une fonction *ortho*-diaminobenzyle riche en électrons

³⁵⁰ M. Regueiro-Figueroa, K. Djanashvili, D. Esteban-Gomez, T. Chauvin, E. Toth, A. de Blas, T. Rodriguez-Blas and C. Platas-Iglesias, *Inorg. Chem.*, **2010**, *49*, 4212-4223.

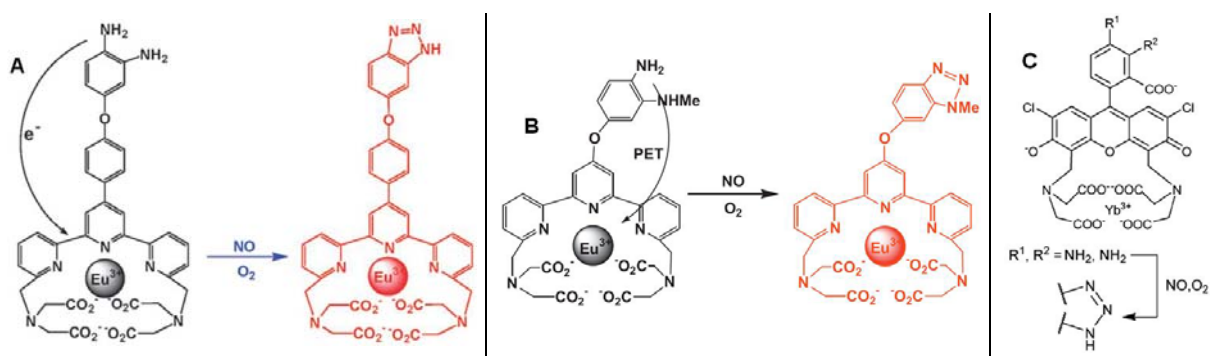
³⁵¹ a) A. R. Lippert, T. Gschneidtnr and C. J. Chang, *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 7510-7512 ; b) M. Liu, Z. Ye, G. Wang and J. Yuan, *Talanta*, **2012**, *91*, 116-121.

³⁵² H. Kojima, N. Nakatsubo, K. Kikuchi, S. Kawahara, Y. Kirino, H. Nagoshi, Y. Hirata and T. Nagano, *Anal. Chem.*, **1998**, *70*, 2446-2453.

³⁵³ a) Y. Chen, W. Guo, Z. Ye, G. Wang and J. Yuan, *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 6266-6268 ; b) M. Liu, Z. Ye, G. Wang and J. Yuan, *Talanta*, **2012**, *99*, 951-958 ; c) T. Terai, Y. Urano, S. Izumi, H. Kojima and T. Nagano, *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 2840-2842.

Chapitre 3 : Stratégies de marquage fluorescent de protéines utilisant des protéines de fusion - Applications des chélates de lanthanides à l'imagerie cellulaire.

capable, par PeT de désactiver le chromophore. Il en résulte la formation d'un benzotriazole inerte vis-à-vis du chromophore. Le rendement quantique du complexe d'euprium **A-33** est 47 fois plus élevé, à pH physiologique et sous irradiation à 326 nm, lorsque le benzotriazole s'est formé.^{353a} L'exaltation de luminescence de son homologue **B-33** est plus faible (rapport de 6.3), en revanche la substitution de l'hydrogène par le méthyle permet un signal stable à pH plus basique.^{353b} Quant à la fluorescéine **C-33** complexé à Yb(III), elle voit son intensité augmenter d'un facteur 50 en tampon aqueux (pH 7.2) sous irradiation à 500 nm.^{353c}



2.2. INTERACTION ANALYTE-LANTHANIDE

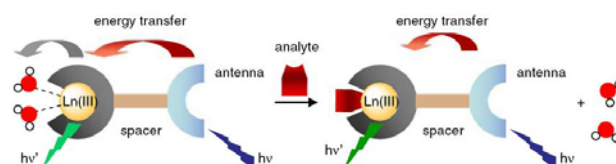


Schéma 34 : Représentation de la modulation de la luminescence par interaction d'un analyte anionique sur le lanthanide(III).¹¹⁶

La substitution des molécules d'eau de la sphère de coordination du lanthanide par un analyte anionique modifie la forme du spectre d'émission : l'augmentation de la luminescence s'accompagne souvent d'un éclatement différent des bandes d'émission ainsi que d'une variation de leur intensité relative.³⁵⁴ Cela permet une mesure en mode ratiométrique, peu dépendante de l'environnement extérieur du chélate, ce qui la rend plus fiable et reproductible. L'euprium est préféré au terbium car ces bandes d'émissions sont plus modulables : l'intensité de celle correspondant à la transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ est peu sensible à la géométrie du site métallique et des ligands alors que ses homologues $^5D_0 \rightarrow ^7F_4$ et particulièrement $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ le sont ; d'autre part le terbium est aussi moins sensible aux désactivations des vibrateurs OH (cf. § II-7-4, chapitre1). En revanche, le chélate de terbium,

³⁵⁴ Il n'est pas toujours nécessaire de concevoir des chélates à sphère de coordination incomplète pour observer l'interaction anion-lanthanide. En effet, si un des sites de coordination du ligand peut être décomplexé par l'analyte, une modification de la forme des bandes d'émission, même si l'augmentation d'intensité n'est pas notable, est suffisante pour évaluer en mode ratiométrique la concentration de cet analyte.

Chapitre 3 : Stratégies de marquage fluorescent de protéines utilisant des protéines de fusion - Applications des chélates de lanthanides à l'imagerie cellulaire.

en mélange avec son analogue à l'euprécium, peut servir de référence pour une mesure ratiométrique.

La principale contribution au développement de sondes lanthanidiques à anions compatibles pour de l'imagerie cellulaire ou de l'analyse *in vitro* d'échantillons biologiques provient du groupe de D. Parker.^{329a,355} Les analytes pouvant être spécifiquement visualisés par ces composés et présentant un intérêt en diagnostique sont le bicarbonate, le lactate, le citrate et l'urate. Le développement de complexes de lanthanides luminescents, dont certains sont décrits dans ce manuscrit (**Eu-2-5₃**,^{50e} **Eu-69**,^{126a} **Tb-78**,^{253,254} **Tb-1**^{50a,356a}) destinés à des applications plus générales d'imagerie cellulaire comme de la détection de protéines *in cellulo* ou de cellules cancéreuses est aussi rapporté dans la littérature.³⁵⁶

Le contrôle de la sélectivité d'un chélate à sphère de coordination incomplète vis-à-vis d'un composé anionique particulier peut s'obtenir en faisant varier la charge globale du complexe et l'encombrement stérique autour du métal car l'interaction lanthanide-anion est gouvernée par les interactions électrostatiques et stériques (*cf.* § II-1 et II-4, chapitre 1). En outre, le mode de coordination des différents anions n'impose pas les mêmes contraintes stériques.

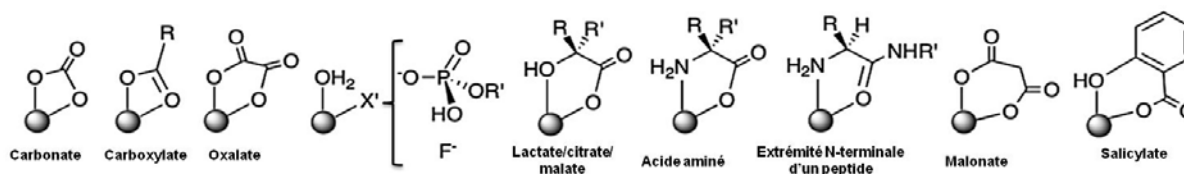


Figure 108 : Modes de coordination de divers analytes anioniques.^{332b}

Les anions HCO_3^- peuvent être quantifiés de façon sélective relativement simplement puisqu'ils présentent l'avantage, par rapport aux anions phosphate par exemple qui se montrent aussi affins pour le lanthanide, d'être, en milieu intra ou extracellulaire, plus concentrés. L'émission de certains complexes (Figure 109) varie spécifiquement en leur présence dans des gammes de concentration « biologique » et à pH physiologique.

³⁵⁵ a) S. Pandya, J. Yu and D. Parker, *Dalton Trans.*, **2006**, 2757-2766 ; b) C. P. Montgomery, B. S. Murray, E. J. New, R. Pal and D. Parker, *Acc. Chem. Res.*, **2009**, 42, 925-937 ; c) E. J. New, D. Parker, D. G. Smith and J. W. Walton, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2010**, 14, 238-246 ; c) E. J. New, A. Congreve and D. Parker, *Chem. Sci.*, **2010**, 1, 111-118.

³⁵⁶ a) C. P. Montgomery, D. Parker and L. Lamarque, *Chem. Commun.*, **2007**, 3841-3843 ; b) T. Ito, M. Inoue, K. Akamatsu, E. Kusaka, K. Tanabe and S.-i. Nishimoto, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2011**, 21, 3515-3518 ; c) S. V. Eliseeva, B. Song, C. D. B. Vandevyver, A.-S. Chauvin, J. B. Wacker and J.-C. G. Bünzli, *New J. Chem.*, **2010**, 34, 2915-2921.

Chapitre 3 : Stratégies de marquage fluorescent de protéines utilisant des protéines de fusion - Applications des chélates de lanthanides à l'imagerie cellulaire.

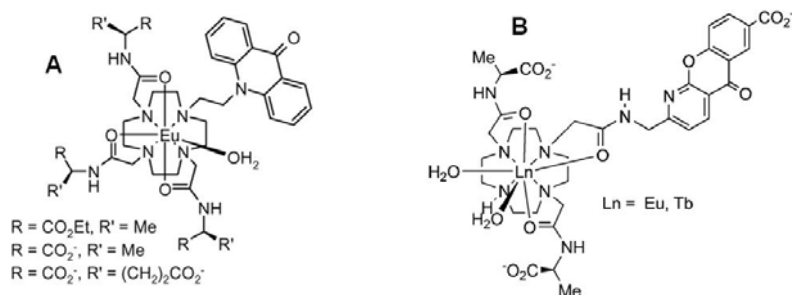


Figure 109 : Sondes lanthanidiques permettant de quantifier les anions hydrogénocarbonate.^{357,358}

Les chélates conçus initialement pour cibler cet analyte (Figure 109-A)³⁵⁷ présentent l'inconvénient de migrer vers des organites acides de la cellule alors que les composés **B** de la Figure 109 se localisent exclusivement dans les mitochondries ce qui a permis d'y mesurer la teneur en anions hydrogénocarbonate.³⁵⁸

L'optimisation de complexes sélectifs pour les anions lactate et citrate a révélé que le complexe hepta-coordiné cationique (Figure 110-A) interagit préférentiellement avec le citrate qui, à pH physiologique, porte trois charges négatives.³⁵⁹ Le chélate anionique, représenté Figure 110-B, qui de plus impose une contrainte stérique plus forte autour du cation métallique, s'avère plus affiné pour le lactate, espèce anionique monochargée et moins volumineuse que le citrate.^{359c}

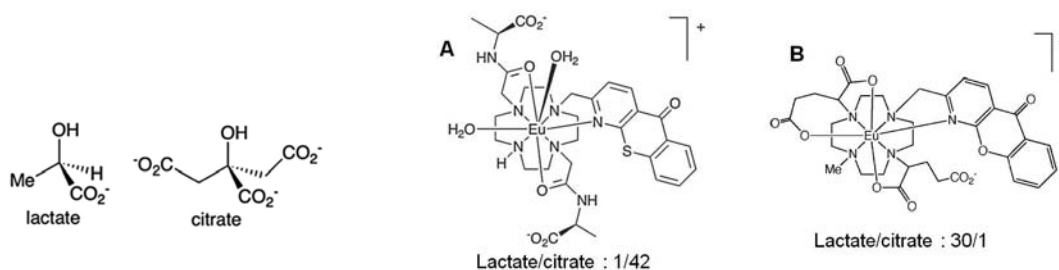


Figure 110 : Chélates sélectifs du citrate (A) et du lactate (B).^{359c}

D'autres sondes lanthanidiques sont aussi susceptibles de quantifier des anions réducteurs, en particuliers l'ascorbate et l'urate.³⁶⁰ Le mode d'action est différent puisque ces ions agissent directement sur le chromophore (d'autant plus que sa densité électronique est faible) et non sur le centre métallique, conduisant à une réduction de l'intensité et de la durée d'émission, plus prononcée pour le terbium que pour l'euporium. L'interaction semble

³⁵⁷ a) Y. Bretonnière, M. J. Cann, D. Parker and R. Slater, *Chem. Commun.*, **2002**, 1930-1931 ; b) Y. Bretonnière, M. J. Cann, D. Parker and R. Slater, *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, 2, 1624-1632.

³⁵⁸ D. G. Smith, R. Pal and D. Parker, *Chem. Eur. J.*, **2012**, 18, 11604-11613.

³⁵⁹ a) D. Parker and J. Yu, *Chem. Commun.*, **2005**, 3141-3143 ; b) B. S. Murray, E. J. New, R. Pal and D. Parker, *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, 6, 2085-2094 ; c) R. Pal, D. Parker and L. C. Costello, *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, 7, 1525-1528 ; d) R. Pal, A. Beeby and D. Parker, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2011**, 56, 352-358.

³⁶⁰ a) R. A. Poole, F. Kielar, S. L. Richardson, P. A. Stenson and D. Parker, *Chem. Commun.*, **2006**, 4084-4086 ; b) F. Kielar, C. P. Montgomery, E. J. New, D. Parker, R. A. Poole, S. L. Richardson and P. A. Stenson, *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, 5, 2975-2982.

Chapitre 3 : Stratégies de marquage fluorescent de protéines utilisant des protéines de fusion - Applications des chélates de lanthanides à l'imagerie cellulaire.

être régie majoritairement par un contrôle stérique puisque même les complexes chargés négativement sont enclins à cette désactivation.

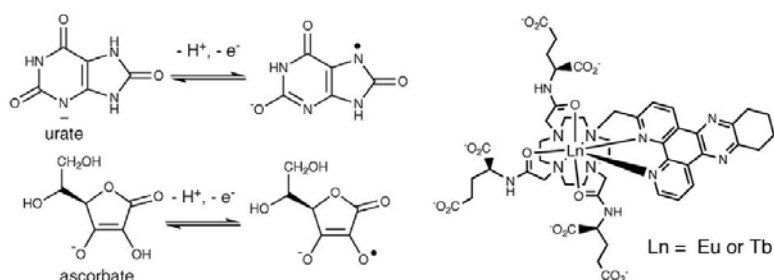


Figure 111 : Radicaux anioniques urate et ascorbate ; complexe de lanthanides sélectif de l'urate (interaction hydrophobe avec l'antenne) appliqué à son dosage ratiométrique (complexes d'euprium et de terbium en mélange).^{360a}

Nous allons maintenant tenter de développer un complexe dont l'analyte modulant la luminescence du lanthanide est une étiquette peptidique. Son rôle sera double : elle devra reconnaître spécifiquement le métal tout en exaltant sa luminescence.

CHAPITRE 4

**SYNTHESE DE SONDAS LANTHANIDIQUES
LUMINESCENTES POUR LE MARQUAGE COVALENT DE
PROTEINES ETIQUETTES**

I. PRESENTATION DU PROJET

Ce dernier chapitre aura pour objet d'étudier la faisabilité de notre concept de sonde lanthanidique photoactivable permettant une accroche covalente sur une protéine d'intérêt fusionnée avec une étiquette peptidique. Idéalement, l'étape de reconnaissance ne devra faire intervenir que le lanthanide disposant d'une, deux voire de trois molécules d'eau dans sa sphère de coordination qui inhiberont sa luminescence. L'étiquette peptidique, en reconnaissant par interactions électrostatiques le cation métallique, devrait chasser les molécules d'eau et ainsi augmenter sa luminescence.

Ce principe est semblable à celui des sondes bi-fonctionnelles présentées au chapitre précédent. La principale différence qui apporte une valeur ajoutée à notre système, s'il s'avère réalisable, est qu'il conduit à une exaltation d'intensité du signal lumineux de la sonde seulement suite à la reconnaissance avec la protéine étiquetée ; le rapport signal-sur-bruit sera donc amélioré. Enfin, cette stratégie n'a jamais été appliquée aux chélates de lanthanides qui pourtant présentent l'avantage majeur d'émettre sur une plus longue durée que les fluorophores organiques.

Le projet a commencé au laboratoire lors de la thèse de Séverine Poupart (2005-2008). Des chélates d'euporium(III) hepta- et octa-coordinés fondés sur des structures terpyridines, sans fonction photoréactive, ont été synthétisés afin d'étudier leur profil d'émission, en absence et en présence de l'hexa-peptide histidine poly(His). L'augmentation de luminescence après ajout de ce polypeptide ne s'est pas révélée probante (de l'ordre de 5%).²⁰⁴ Trois hypothèses peuvent être avancées : soit l'affinité de l'imidazole du résidu histidine pour le cation métallique est trop faible pour déplacer efficacement les molécules d'eau, soit l'ion métallique n'est pas suffisamment accessible, soit les liaisons N-H présentes sur les molécules d'imidazole liées au cation métallique inhibent la luminescence du lanthanide.

Afin de nous affranchir de ces limitations et de pallier cette faible interaction entre le tag peptidique et le cation métallique, nous avons choisi de modifier, d'une part, la structure du tag en travaillant avec une étiquette hexa-aspartate poly(Asp), et d'autre part la structure complexante, en s'orientant vers un macrocyle azoté, le 1,4,7,10-tétraazacyclododécane, plus communément désigné sous le terme cyclène. Ce dernier, déjà mentionné à maintes

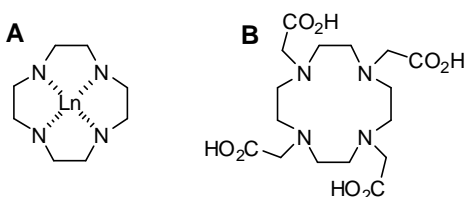


Figure 112 : Contrainte stérique des azotes minimisée par l'insertion du cation métallique (A) ; structure du DOTA (B).

reprises au cours de ce manuscrit, est très largement employé dans la complexation de certains cations métalliques et plus particulièrement des lanthanides. Au moins deux raisons peuvent être invoquées : ce macrocyle confère une stabilité intrinsèque conséquente (bien sûr, si le volume du cation

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

métallique est adapté à la cavité du cyclène) puisque la coordination du cation métallique mène à la formation de quatre cycles virtuels à cinq chaînons centrés sur le cation, ce qui minimise la répulsion entre les atomes d'azote adjacents du macrocycle (Figure 112-A). Cette stabilisation sera renforcée si ces atomes d'azote sont substitués par une fonction acide acétique (structure DOTA : Figure 112-B) générant à pH physiologique des bases dures, de type carboxylate, affines pour le cation lanthanidique, tout comme les carboxylates du tag poly(Asp). La deuxième raison est que la fonctionnalisation de cette molécule peut être assez facilement modulable par différentes substitutions sélectives des atomes d'azote ; d'autant plus que l'attractivité initiale de cette structure pour le développement d'agents de contraste et autres radiopharmaceutiques a fortement contribué à l'optimisation des voies de synthèse, désormais relativement bien établies.

Cette architecture complexante pourra ainsi être diversement substituée afin de faire varier, d'une part, la charge globale du complexe (*a priori* une charge positive devrait améliorer l'affinité pour les bases de Lewis ou les anions carboxylates, fonction présente sur la chaîne latérale de l'acide aspartique), et d'autre part, l'encombrement stérique.

Enfin, différentes antennes photoréactives connues pour sensibiliser, plus ou moins efficacement, le terbium et/ou l'euporium, ont été testées : benzophénones, azidocoumarines et azidoquinolinones. Une brève introduction sur chacune d'elles sera effectuée avant la description de la synthèse des ligands correspondants. Ces antennes ont été choisies dans un double but : d'une part, en raison de leur caractère photoréactif, pour effectuer un greffage covalent sur la protéine étiquetée, et donc de stabiliser le complexe avec le tag. Mais surtout, si la modification du signal suite à la complexation de l'étiquette sur le cation métallique n'est pas suffisante, comme cela s'est avéré avec l'expérience précédente des premiers complexes terpyridiniques, nous comptons profiter de la modulation du signal, que ce soit une simple augmentation/diminution de l'intensité de luminescence à la même longueur d'onde d'excitation, ou, plus intéressant, d'une modification des longueurs d'onde d'excitation.

Après une étude bibliographique succincte sur la synthèse du cyclène³⁶¹ ainsi que certains de ses dérivés dont nous avons eu recours, ce chapitre traitera de la formation des chélates comportant des antennes photoréactives, à savoir d'une part, une benzophénone puis d'autre part une coumarine ou quinolinone. Enfin, un dernier paragraphe aura pour objet la description des propriétés photophysiques des chélates ainsi que de leur comportement luminescent en tampon aqueux et en présence des peptides poly(His) ou poly(Asp). Les premières tentatives de photoactivation y seront aussi présentées.

³⁶¹ Le cyclène utilisé pour les synthèses décrites ultérieurement a été acheté chez Strem.

II. VOIES DE SYNTHÈSE DU CYCLENE ET DE SES DERIVES

Les macrocycles azotés, grâce à leurs propriétés de coordination pouvant être affinées selon leur taille et dendricité, s'avèrent de parfaits candidats pour des applications nécessitant l'emploi de complexes métalliques stables. Le cyclène plus particulièrement, du fait de sa capacité à complexer efficacement, s'il est correctement substitué, certains cations métalliques très largement utilisés dans de nombreux domaines, médicaux notamment, a suscité une recherche intensive visant à optimiser sa synthèse ainsi que celles menant à des analogues diversement substitués.³⁶²

1 OBTENTION DU CYCLENE

Différentes synthèses permettent de conduire à ce composé dont les premières, à l'image de la voie A (Schéma 35) sont peu économes en solvant et surtout en atomes car elles nécessitent une protection des amines sous formes de sulfonamides.³⁶³ D'autres, apparues au milieu des années 1990 suite à une forte demande stimulée par l'utilisation croissante des agents de contraste pour l'IRM,¹¹⁵ a abouti au développement de synthèses plus économiques et transposables à l'échelle industrielle (notamment les voies B et D). Toutes mettent à profit l'effet de matrice entre la tétraamine linéaire et, soit le glyoxal^{364a-c} ou la butanedione (voie B)^{364d}, soit une dithiooxamide (voie C)³⁶⁵ ou soit un acétal de DMF (voie D),³⁶⁶ qui permettent de rapprocher les extrémités de la polyamine et de faciliter la formation du cycle. Une étape finale est nécessaire pour se débarrasser du réactif ayant permis de mettre en œuvre cet effet de matrice.

³⁶² M. Suchý and R. H. E. Hudson, *Eur. J. Org. Chem.*, **2008**, 2008, 4847-4865.

³⁶³ J. E. Richman and T. J. Atkins, *J. Am. Chem. Soc.*, **1974**, 96, 2268-2270.

³⁶⁴ **a)** G. R. Weisman, S. C. H. Ho and V. Johnson, *Tetrahedron Lett.*, **1980**, 21, 335-338 ; **b)** R. W. Sandnes, J. Vasilevskis, K. Undheim and M. Gacek, **1996**, WO 96/028432 ; **c)** M. Argese, G. Ripa, A. Scala and V. Valle, **1997**, WO 97/049691 ; **d)** G. Hervé, H. Bernard, N. Le Bris, J.-J. Yaouanc, H. Handel and L. Toupet, *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 6861-6864.

³⁶⁵ G. R. Weisman and D. P. Reed, *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 5186-5187.

³⁶⁶ P. S. Athey and G. E. Kiefer, *J. Org. Chem.*, **2002**, 67, 4081-4085.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

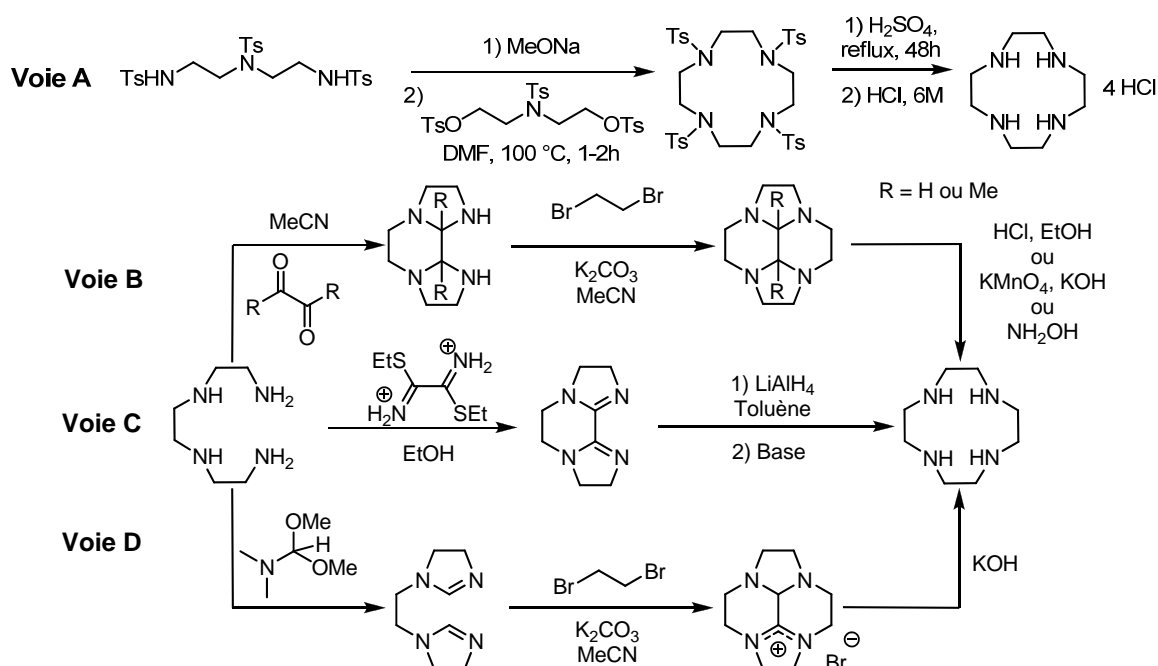


Schéma 35 : Quelques stratégies de synthèse du cyclène.

2 SUBSTITUTION SELECTIVE DES AZOTES DU CYCLENE

2.1. N-MONOALKYLATION

Globalement, deux stratégies conduisent à la monoalkylation sélective du cyclène.³⁶² La première consiste en l'activation d'un seul des atomes d'azote, soit en utilisant un acide de Lewis se coordonnant à trois³⁶⁷ ou à la totalité des atomes d'azote, soit le glyoxal conduisant au bis-aminal (précurseur du cyclène avec R = H de la voie B, Schéma 35).³⁶⁸ Le cyclène monoalkylé s'obtient par réaction avec l'électrophile puis déprotection ou décomplexation. La deuxième méthode est beaucoup plus directe puisqu'elle ne nécessite pas l'étape de protection ou de complexation.³⁶⁹ Par exemple, la monoalkylation d'électrophiles activés (α -bromoesters) et encombrés peut s'effectuer avec seulement un équivalent de cyclène, sans base et dans un solvant apolaire aprotique tel que le chloroforme.^{369a} La sélectivité proviendrait de la formation du bromhydrate, néanmoins soluble dans ce solvant mais diminuant la nucléophilie du cyclène monoalkylé. Une autre méthode plus générale, autorisant en plus la monoalkylation d'électrophiles non activés et moins encombrés, nécessite deux équivalents de cyclène et cinq en carbonate de potassium. Les meilleurs

³⁶⁷ J.-J. Yaouanc, N. Le Bris, G. Le Gall, J.-C. Clement, H. Handel and H. des Abbayes, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1991**, 206-207.

³⁶⁸ W. C. Baker, M. J. Choi, D. C. Hill, J. L. Thompson and P. A. Petillo, *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 2683-2689.

³⁶⁹ a) W. J. Kruper, P. R. Rudolf and C. A. Langhoff, *J. Org. Chem.*, **1993**, *58*, 3869-3876 ; b) C. Li and W.-T. Wong, *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43*, 3217-3220 ; c) J. Yoo, D. E. Reichert and M. J. Welch, *Chem. Commun.*, **2003**, 766-767 ; d) J. Massue, S. E. Plush, C. S. Bonnet, D. A. Moore and T. Gunnlaugsson, *Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48*, 8052-8055.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

rendements sont cette fois atteints dans un solvant polaire aprotique, l'acétonitrile.^{369b} Dans ce cas, l'effet de solvant est important, puisque le chloroforme conduit alors à une mauvaise sélectivité. Une dernière méthode, avantageuse car elle ne requiert aucune étape de purification sur colonne chromatographique contrairement aux deux précédentes, a aussi été décrite.^{369d} Le solvant utilisé est du chloroforme en présence de triéthylamine. En revanche, quatre équivalents de cyclène sont nécessaires.

Ces quelques exemples illustrent parfaitement que cette stratégie est très dépendante des conditions opératoires (solvant, nature de l'électrophile, taille du macrocycle).

Il peut s'avérer plus intéressant de protéger trois des quatre azotes (avec un groupement formyle par exemple) puis, avant leur déprotection, de substituer le dernier par l'électrophile désiré.^{369c}

A noter que l'amination réductrice d'aldéhydes en présence d'un seul équivalent de cyclène conduit préférentiellement à de la monoalkylation et minoritairement à de la dialkylation en position N1 et N7.^{370a} En revanche cette méthode semble plus univoque pour la dialkylation en position N1 et N7 en présence de 0.5 équivalent de cyclène.^{370b}

2.2. N-DIALKYLATION

Deux isomères sont accessibles : le cyclène substitué sur les azotes N1 et N4 (isomère cis) ou sur les azotes N1 et N7 (isomère trans).

2.2.1 ISOMERE CIS

L'isomère cis s'obtient en trois étapes : protection sous forme oxamide (Schéma 36-A) suivie de la substitution des deux autres atomes d'azote et déprotection de l'oxamide en milieu basique ou acide.³⁷¹ Cette voie peut s'avérer néanmoins beaucoup moins efficace si le produit souhaité est substitué par deux groupements différents. Par exemple, si l'un n'est pas issu d'un électrophile activé et/ou le deuxième se montre peu stable dans les conditions requises pour la substitution sur le dernier atome d'azote.³⁷²

Une deuxième voie de synthèse ne nécessitant qu'une seule étape a aussi été mise au point mais elle s'avère beaucoup moins générale puisque les conditions opératoires n'ont été optimisées qu'avec un seul électrophile activé : le bromoacétate de *tert*-butyle.³⁷³

³⁷⁰ a) D. Maffeo and J. A. G. Williams, *Inorg. Chim. Acta*, **2003**, 355, 127-136 ; b) F. Chauv, F. Denat, E. Espinosa and R. Guillard, *Chem. Commun.*, **2006**, 5054-5056.

³⁷¹ a) F. Bellouard, F. Chuburu, N. Kervarec, L. Toupet, S. Triki, Y. Le Mest and H. Handel, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1999**, 3499-3505.

³⁷² K. E. Borbas and J. I. Bruce, *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, 2274-2282.

³⁷³ C. Li and W.-T. Wong, *J. Org. Chem.*, **2003**, 68, 2956-2959.

2.2.2 ISOMERE TRANS

L'isomère trans peut aussi se synthétiser selon une séquence protection-substitution-déprotection. En effet, il a été montré que le produit de condensation du cyclène avec un dialdéhyde donnant le bis-aminale **B-36** adopte une conformation repliée telle que les doublets non-liants des azotes N1 et N7 sont orientés vers l'extérieur (face exo) de façon à offrir une bonne accessibilité pour une attaque sélective sur un électrophile. Même en présence de dix équivalents d'iodométhane les atomes d'azote dont les paires non-liantes sont disposées sur la face endo ne sont pas réactifs.³⁷⁴ La deuxième approche met à profit l'acidité décroissante (10.5, 9.5, 1.6 et 0.8) liée aux étapes successives de protonation des quatre différents atomes d'azote qui impliquent un changement de conformation de façon à minimiser la répulsion électrostatique des amines protonées.³⁷⁵ Soit le pH est maintenu inférieur à 5 afin que deux des atomes d'azote soit protonés,^{375a-c} soit le cyclène joue aussi le rôle de base puis précipite sous forme de chlorhydrate ; un lavage aqueux basique permet alors de récupérer le cyclène trans sous sa forme neutre.^{375d} Les électrophiles utilisés sont des chloroformates pouvant être aisément déprotégés ou réduit ; dans ce dernier cas le cyclène diméthylé est obtenu.^{375e}

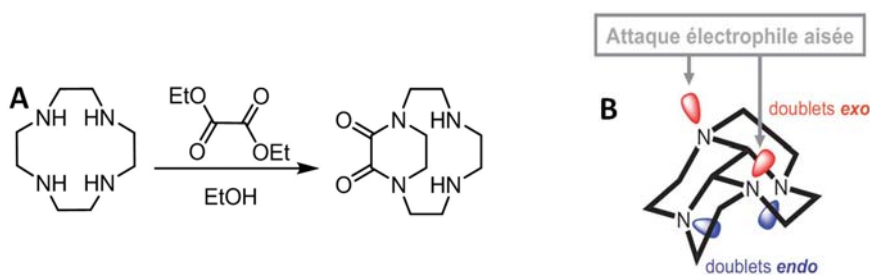


Schéma 36 : Formation du cyclène oxamide (A) ; structure du cyclène bis-aminale (B).³⁷⁶

2.3. N-TRIALKYLATION

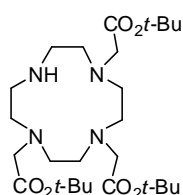


Figure 113 : Structure du DO3At-Bu.

Plusieurs méthodes de *N*-trialkylation (formyle, carbamates) ou *N*-trisulfonylarylation (tosyle) existent.³⁶² Nous nous focaliseront cependant sur les réactions de *N*-trialkylation sélectives puisqu'elles permettent l'insertion de bras complexant le lanthanide (amides ou carboxyates).

Un intermédiaire très souvent rencontré est le DO3At-Bu (Figure 113) dont différentes synthèses, en une étape à partir du cyclène, ont été

³⁷⁴ J. Rohovec, R. Gyepes, I. Cisarova, J. Rudovsky and I. Lukes, *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 1249-1253.

³⁷⁵ a) Z. Kovacs and A. D. Sherry, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1995**, 185-186 ; b) Z. Kovacs and A. D. Sherry, *Synthesis*, **1997**, 759-763 ; c) F. Denat, S. Brandès and R. Guilard, *Synlett*, **2000**, *5*, 561-574 ; d) L. M. De Leon-Rodriguez, Z. Kovacs, A. C. Esqueda-Oliva and A. D. Miranda-Olvera, *Tetrahedron Lett.*, **2006**, *47*, 6937-6940 ; e) G. Piersanti, M. A. Varrese, V. Fusi, L. Giorgi and G. Zappia, *Tetrahedron Lett.*, **2010**, *51*, 3436-3438.

³⁷⁶ F. Denat, D. Deniaud and R. Tripier, *Actual. Chim.*, **2008**, *316*, 10-21.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

décrites, soit dans un solvant polaire aprotique (MeCN, DMAc) avec une base inorganique (AcONa, NaHCO₃)^{50b,377b-d} soit en solvant apolaire aprotique (CHCl₃) et avec une base organique (Et₃N).^{377a} Cette dernière méthode nécessite une purification sur colonne chromatographique alors qu'avec les premières, le produit désiré est obtenu par précipitation dans l'éther ou l'éther de pétrole ou par recristallisation dans le toluène. Entre 3 et 3.5 équivalents de bromoacétate de *tert*-butyle et autant de base par rapport au cyclène sont introduits. Le premier est ajouté au goutte à goutte afin de maintenir une température inférieure à 25 °C, excepté pour un seul mode opératoire où l'ajout s'effectue à -20 °C.^{377d} Celui-ci mène d'ailleurs au meilleur rendement, à savoir 80%, alors que pour les autres les rendements s'échelonnent de 40^{50b} à 77%.^{377a} Ensuite, dans chacun des procédés, le milieu réactionnel est laissé à température ambiante. Le temps d'agitation varie cependant de 20h à cinq jours. Le produit tétraalkylé est rarement observé même si un excès d'électrophile, jusqu'à 8 équivalents,^{377a} est présent (dans ces conditions, CHCl₃/Et₃N, le dernier atome d'azote doit rester protoné). Le produit dialkylé semble plus soluble en milieu basique et ne précipite pas contrairement au dérivé trisubstitué. Le composé final est un bromhydrate ou chlorhydrate dont l'atome d'azote, protoné, est évidemment peu nucléophile et peu réactif surtout vis-à-vis d'électrophiles non-activés.^{50b} Une étape de neutralisation du sel s'avère nécessaire, par exemple avec une résine échangeuse d'ion directement dans le milieu réactionnel³⁷⁸ ou au préalable par trituration dans une solution aqueuse de potasse.^{377d} Des synthèses directes de cyclènes trisubstitués par des substituants acétamides existent mais elles nécessitent des purifications sur colonne chromatographique et les rendements sont globalement moins bons.^{379a-b} Généralement, une séquence incluant des étapes de protection et déprotection sélectives est préférée.^{379c-d}

III. CONCEPTION DE CHELATES FONDES SUR UNE ANTENNE PHOTOACTIVABLE DE TYPE BENZOPHENONE

Quelques exemples de chélates de lanthanides solubles en milieux aqueux et comportant une antenne de type benzophénone ont déjà été rapportés dans la littérature (Figure 114). La présence de la fonction carbonyle conduit, suite à une irradiation photonique, à une transition $n-\pi^*$ entre un doublet non-liant de l'oxygène et une orbitale antiliante du système π qui s'avère moins énergétique qu'une transition $\pi-\pi^*$ (ou $n-\pi^*$ dans le cas où

³⁷⁷ a) C. Li and W.-T. Wong, *Tetrahedron*, **2004**, 60, 5595-5601 ; b) O. Axelsson and A. Olsson, **2006**, WO 06/112723 ; c) D.A. Moore, *Org. Synth.*, **2008**, 85, 10-14 ; d) B. Jagadish, G. L. Brickert-Albrecht, G. S. Nichol, E. A. Mash and N. Raghunand, *Tetrahedron Lett.*, **2011**, 52, 2058-2061.

³⁷⁸ A. Barge, L. Tei, D. Upadhyaya, F. Fedeli, L. Beltrami, R. Stefania, S. Aime and G. Cravotto, *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, 6, 1176-1184.

³⁷⁹ a) S. Aime, A. Barge, M. Botta, J. A. K. Howard, R. Katakya, M. P. Lowe, J. M. Moloney, D. Parker and A. S. de Sousa, *Chem. Commun.*, **1999**, 1047-1048 ; b) T. Gunnlaugsson, J. P. Leonard, S. Mulready and M. Nieuwenhuyzen, *Tetrahedron*, **2004**, 60, 105-113 ; c) M. Woods, G. E. Kiefer, S. Bott, A. Castillo-Muzquiz, C. Eshelbrenner, L. Michaudet, K. McMillan, S. D. K. Mudigunda, D. Ogrin, G. Tircso, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 9248-9256 ; d) K. Nwe, J. P. Richard and J. R. Morrow, *Dalton Trans.*, **2007**, 5171-5178.

l'hétéroatome est directement intégré au sein de la structure aromatique).²²¹ De plus, la différence d'énergie entre l'état S_1 et T_1 de ce type de structure est généralement plus faible et l'efficacité du croisement intersystème est proche de l'unité. Compte tenu du mécanisme de transfert d'énergie au sein des chélates de lanthanides, cette caractéristique devrait conduire à un transfert efficace entre une antenne benzophénone et un lanthanide possédant ses niveaux de réception à une énergie inférieure de celle de l'état triplet de ce chromophore (typiquement l'euprimum et le terbium).

Cependant le rendement quantique de l'un des premiers chélates d'euprimum (**Eu-113**)³⁸⁰ incluant cette antenne demeure modeste (3% en milieu aqueux).⁸⁵ Il n'est pas impossible que cette faible valeur soit le résultat d'une mauvaise protection du lanthanide de la part du ligand vis-à-vis des molécules d'eau. Quant à la structure **114** décrite plus récemment³⁸¹ elle conduit à une sensibilisation significativement augmentée, de plus le rendement quantique du terbium s'élève à 27%. Ces deux dernières valeurs demeurent néanmoins relativement faible au vu de l'efficacité de transfert entre l'état triplet de la benzophénone et le métal estimée à 99% (cette valeur est obtenue en mesurant l'intensité de la phosphorescence de la benzophénone à basse température : plus elle est faible et plus le transfert d'énergie vers le cation métallique est efficace). Cela suggère donc une désexcitation conséquente non-radiative du lanthanide qui pourrait être limitée si la structure chélatante expulsait totalement l'eau (en effet les calculs donnent une valeur de q proche de un pour **Ln-114**).

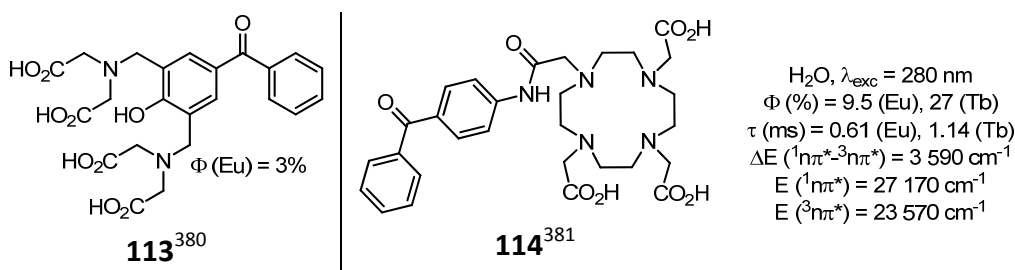


Figure 114 : Exemples de complexes lanthanidiques comportant une antenne de type benzophénone.

En revanche, cette antenne n'a encore jamais été utilisée pour sa capacité photoréactive permettant un accrochage covalent. Il est vrai qu'une fois la réaction terminée le benzhydryl formé devrait absorber à des longueurs d'onde déplacées vers l'UV-C donc plus énergétiques, incompatibles pour des études *in cellulo*.

Dans un premier temps cependant, et afin d'étudier la variation de luminescence de chélates analogues à **Eu/Tb-114** en présence des peptides poly(His) ou poly(Asp) susceptibles de se coordonner au cation métallique nous avons choisi d'incorporer ce motif servant, d'une part, d'antenne et, d'autre part, de réactif photoactivable. De plus, les benzophénones visées

³⁸⁰ J. C. Hinshaw, J. L. Toner and G.A. Reynolds, **1987**, US Patent 4 637 988.

³⁸¹ **a)** A. Beeby, L. M. Bushby, D. Maffeo and J. A. G. Williams, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2000**, 1281-1283 ; **b)** A. J. Wilkinson, D. Maffeo, A. Beeby, C. E. Foster and J. A. G. Williams, *Inorg. Chem.*, **2007**, *46*, 9438-9449.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

initialement s'obtiennent très facilement en une seule étape à partir de produits commerciaux (Schéma 37).

1 SYNTHÈSE DES BENZOPHÉNONES

Trois benzophénones différentes, **B-37**, **D-37** et **F-37** ont été synthétisées à partir de produits commerciaux (Schéma 37) dont une (**B-37**) contient une fonction amide qui pourra intervenir dans la coordination du cation métallique f. Les deux autres ne disposent pas de fonction supplémentaire capable de se coordiner au lanthanide. Enfin, la distance séparant l'antenne du métal sera plus longue avec la benzophénone **F-37**. Cela conduira très probablement à un rendement quantique plus faible, en revanche la contrainte stérique autour du cation pourrait s'avérer plus faible et permettre ainsi une interaction plus aisée avec le tag peptidique.

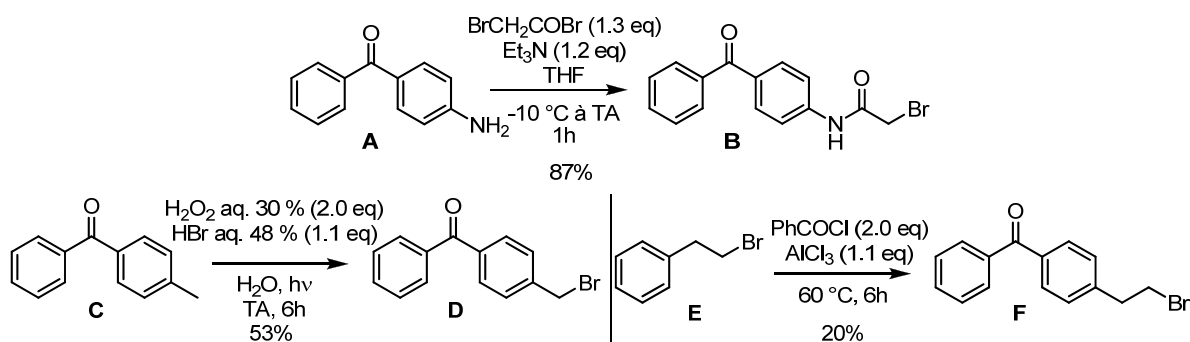


Schéma 37 : Synthèses des benzophénones.

Ces antennes ont été obtenues très simplement à partir de modes opératoires déjà décrits dans la littérature : acylation de la *para*-aminobenzophénone par le bromure de bromoacétyle pour la molécule **B-37** ;^{381b} bromation radicalaire de la *para*-méthylbenzophénone **C-37** en milieu aqueux oxydant (oxydation de l'acide bromhydrique en dibrome) sous irradiation ;^{382b,c} acylation de Friedel-Craft entre le bromoéthylbenzène et le chlorure de benzoyle donnant la benzophénone **F-37** avec un rendement modeste mais non-optimisé de 20%.^{382a}

2 SYNTHÈSE DES LIGANDS

2.1. STRUCTURES CHELATANTES COMPOSEES D'ACIDES CARBOXYLIQUES

Les différents ligands dont la synthèse a été envisagée, comportant une structure complexante cyclique ou ouverte à dendricité variable et fonctionalisée par des fonctions acides carboxyliques sont représentées ci-dessous.

³⁸² a) C. Sundararajan and D. E. Falvey, *Org. Lett.*, **2005**, 7, 2631-2634 ; b) A. Podgorsek, S. Stavber, M. Zupan and J. Iskra, *Tetrahedron Lett.*, **2006**, 47, 7245-7247 ; c) A. Podgorsek, S. Stavber, M. Zupan and J. Iskra, *Tetrahedron*, **2009**, 65, 4429-4439.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

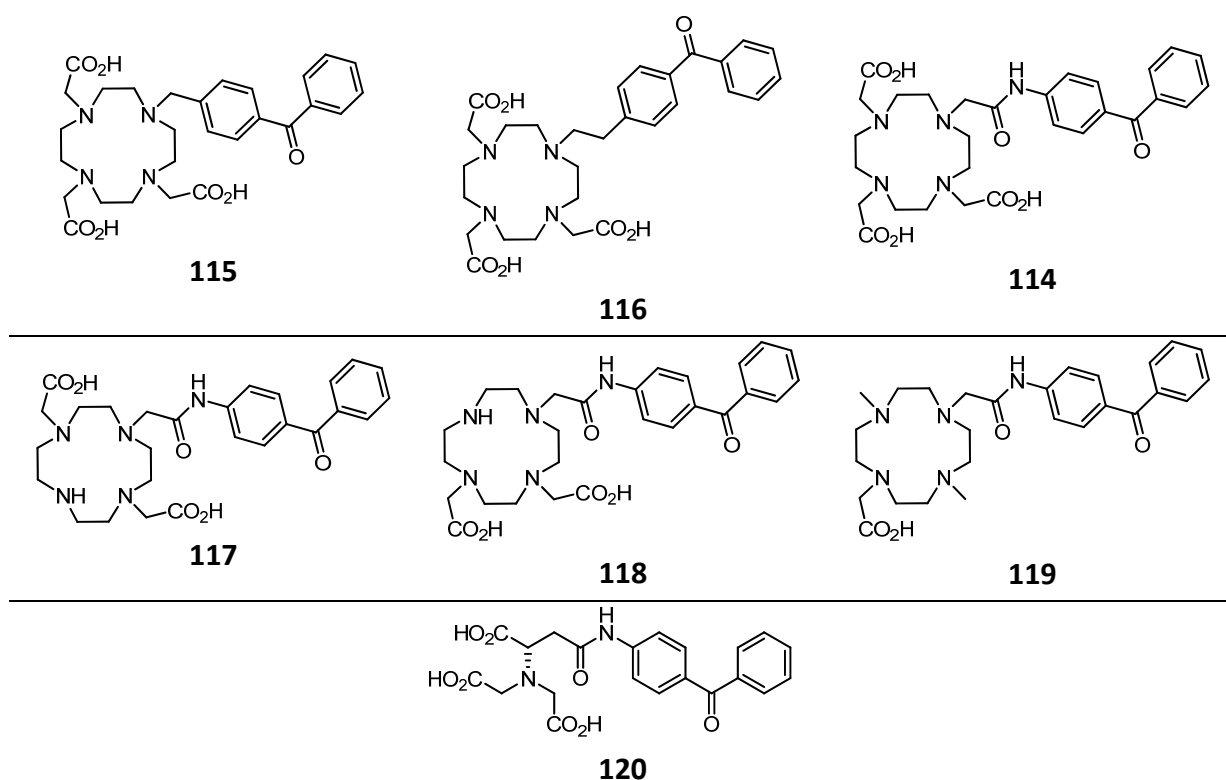


Figure 115 : Ligands envisagés portant des acides carboxyliques.

2.1.1 LIGANDS COMPORTANT TROIS SITES DE COORDINATION CARBOXYLATE

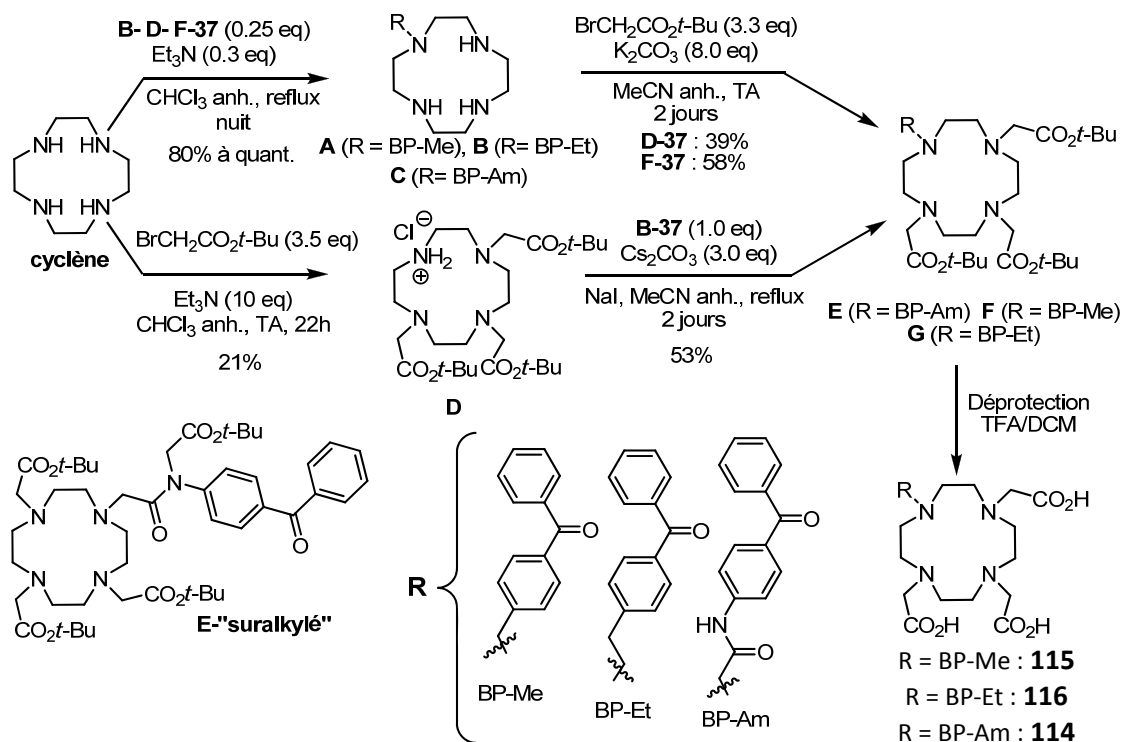


Schéma 38 : Synthèse des ligands comportant trois bras acide carboxylique.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

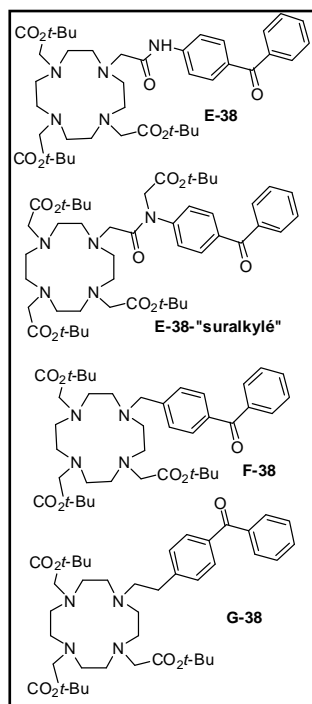
La synthèse des composés **E-**, **F-** et **G-38** substitués sur un atome d'azote par une benzophénone et sur les trois autres par une fonction ester *tert*-butylique a été entreprise selon deux voies.

La première débute par une étape de monoalkylation du cyclène en excès par une benzophénone à bras de liaison électrophile dont le produit est récupéré par simple lavage avec une solution aqueuse basique,^{369d} les rendements varient de 80% à 100% suivant la benzophénone utilisée (*cf.* Partie expérimentale). Elle a été appliquée à la synthèse des composés intermédiaires **F-** et **G-38**.

En effet, la benzophénone bromoéthylée non activée **F-37** s'est montrée très peu réactive vis-à-vis du chlorhydrate **D-38** mais réagit correctement sur le cyclène nu (**B-38**). Le ligand **G-38** comportant cette antenne a donc été obtenu par monoalkylation du cyclène avec le chromophore (80%) suivie par la substitution des trois derniers atomes d'azote du macrocycle azoté par le *tert*-butyle de bromoacétate dans l'acétonitrile à TA pendant deux jours en milieu basique. Après purification chromatographique sur gel d'alumine neutre le produit n'est pas obtenu pur mais à l'étape suivante (déprotection des esters *tert*-butyliques) il sera purifié en phase inverse par HPLC semi-préparative.

Enfin, la synthèse du composé **F-38** contenant la 4-méthyl-benzophénone **D-37** est aussi effectuée selon cette séquence synthétique : monoalkylation (**A-38**) puis trialkylation de la structure azotée par les esters *tert*-butyliques. Le produit **F-38** est alors purifié sur colonne de silice et présente une pureté supérieure à celle de son analogue **G-38**, obtenu après purification sur colonne d'alumine neutre.

La deuxième voie consiste en une trialkylation initiale du cyclène par le bromoacétate de *tert*-butyle précédent l'insertion de l'antenne. Cette méthode, décrite par Wong *et al.*^{377a} a été appliquée mais la quantité obtenue en produit **D-38** après purification



chromatographique sur gel d'alumine neutre est médiocre par rapport au rendement annoncé dans la publication (21% contre 77%), mais suffisante pour continuer la synthèse.

Cette dernière stratégie permet de substituer le dernier atome d'azote du DO3At-Bu.HCl **D-38** par la benzophénone amide **B-37** après deux jours de réaction dans l'acétonitrile à reflux, en présence de base et d'une quantité catalytique en iodure de sodium. Ce réactif peut améliorer la réactivité de l'halogénoester puisque l'atome de brome se retrouve substitué par un meilleur groupe partant, l'anion iodure (réaction de Finkelstein). Cependant, le bromoester s'avère déjà un très bon électrophile grâce à l'effet électroattracteur d'une part du carbonyle et d'autre part du brome (synergie des orbitales de basse énergie $\pi^*_{C=O}/\sigma^*_{C-Br}$). Le produit désiré **E-38** est ensuite récupéré à hauteur de 53% après purification chromatographique en phase normale. Il est

aussi possible d'obtenir la molécule de cyclène monoalkylé par cette antenne (**C-38**) ; en revanche, il est apparu que la nucléophilie de la fonction amide est suffisamment forte pour substituer l'halogène de l' α -bromoester conduisant en partie au composé **E-38** «suralkylé». Il aurait peut-être été plus judicieux d'ajouter lentement l'électrophile à 0 °C et d'utiliser une base moins forte que K_2CO_3 .³⁴⁰ Enfin, la déprotection en milieu acide (TFA/DCM) des esters *tert*-butyliques **E**-, **F**-, et **G-38** conduit respectivement aux ligands **114**, **115** et **116**. Seul ce dernier a été purifié par HPLC semi-préparative (obtention d'un sel de TFA hygroscopique) puisque, comme indiqué précédemment, son précurseur **G-38** n'a pas été récupéré aussi propre que les deux autres molécules **E**- et **F-38** (avec respectivement 53 et 39% de rendement).

2.1.2 LIGANDS COMPORTANT DEUX SITES DE COORDINATION CARBOXYLATE

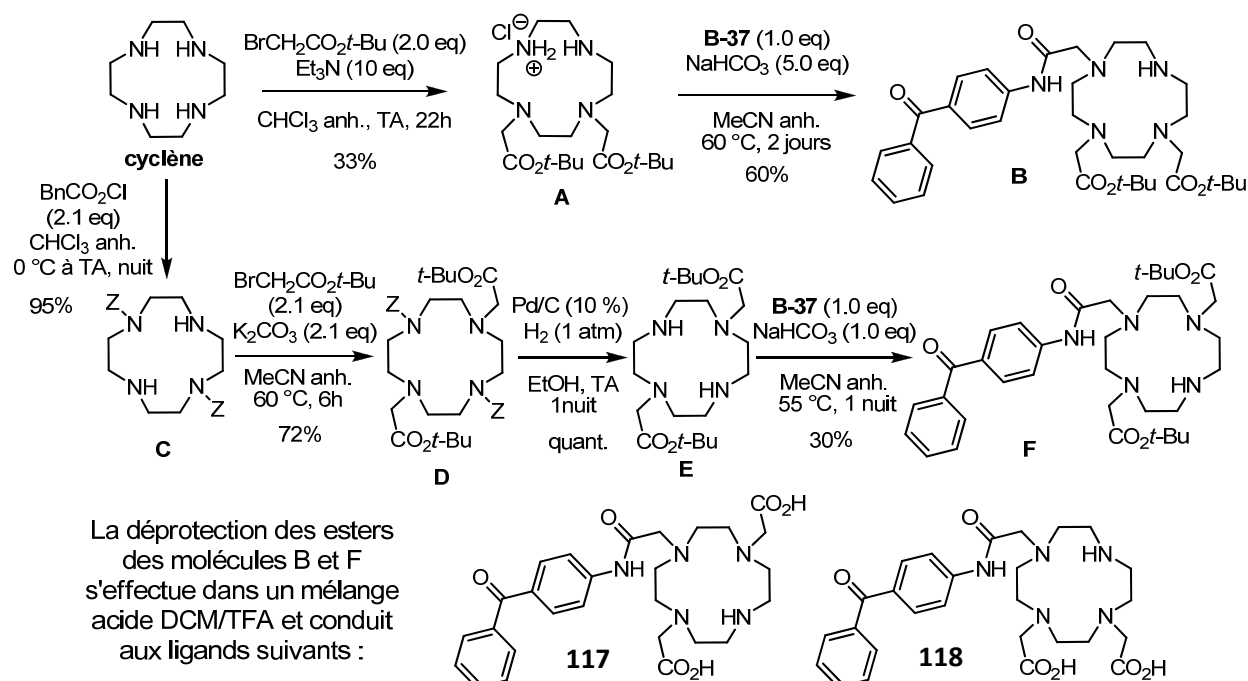


Schéma 39 : Synthèse des ligands comportant deux bras acide carboxylique.

Seule la 4-(bromoacétamidy)-benzophénone **B-37** a été couplée aux cyclènes substitués par deux fonctions esters en position N1 et N7 (**E-39**) ou en N1 et N4 (**A-39**) afin d'obtenir un ligand comportant sept sites de coordination. Si les deux autres antennes avaient été greffées, seulement six sites de complexation auraient été présents, ce qui pourrait potentiellement mené à un chélate trop instable.

Le premier (**E-39**) s'obtient aisément en appliquant le mode opératoire, en trois étapes, de la littérature.^{375d} Le deuxième (**A-39**) en revanche est récupéré avec un faible rendement après purification chromatographique sur gel d'alumine basique (33% ainsi que 8% de DO3At-Bu.HCl ; dans la littérature un rendement de 84% est rapporté),^{373,377a} la quantité en cyclène cis (**A-39**) récupérée s'est néanmoins révélée suffisante pour ne pas avoir à effectuer à nouveau cette réaction. L'obtention de l'isomère cis par l'intermédiaire du cyclène oxamide

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

aurait peut-être été plus efficace mais notre objectif initial est d'obtenir le plus rapidement possible les divers chélates afin d'étudier leur comportement de luminescence en présence de tags poly(Asp) ou poly(His).

Le ligand protégé **F-39** s'obtient par monosubstitution de **E-39**. Elle s'opère dans l'acétonitrile chauffé à 55 °C en présence d'un seul équivalent d'hydrogénocarbonate de sodium pendant une nuit. Après une simple filtration le produit est soumis à une purification chromatographique sur colonne en phase normale (DCM/MeOH+NH₃(≈ 20% en masse)) dont l'analyse HPLC de la fraction la plus propre révèle la présence d'une impureté dérivée de la benzophénone. Celle-ci est aussi détectée en RMN mais pas par spectrométrie de masse (ainsi, ce sous-produit ne contient pas de cyclène, il ne s'agit donc pas du composé comportant deux benzophénones ; en effet, grâce aux amines qui se protonent aisément dans la source ESI cette structure cyclène polyazotée conduit à un signal intense). Suite à la déprotection des esters *tert*-butyliques en acide par un mélange DCM/TFA (2/1 v/v), le ligand **117** est obtenu et le brut sera engagé sans purification supplémentaire dans l'étape de complexation. Les chélates de lanthanides seront alors purifiés en HPLC semi-préparative afin d'éliminer l'impureté.

La monosubstitution par la benzophénone amide **B-37** du cyclène cis **A-39** pour conduire à **B-39** est effectuée à 60 °C dans l'acétonitrile en présence de cinq équivalents de NaHCO₃ pendant deux jours. La purification est directement effectuée en phase inverse par HPLC semi-préparative car celle conduite sur gel de silice appliquée pour **F-39** ne s'est pas révélée optimale. Finalement un rendement plus élevé de 60% est atteint (si le sel possède une stœchiométrie 1/1 en TFA/**B-39**). Enfin, le ligand **118** s'obtient par déprotection habituelle des esters en présence d'un mélange DCM/TFA (1/2 v/v) ; il est ensuite purifié par précipitation dans un mélange MeOH/Et₂O avec un rendement de 49% (en considérant une molécule de TFA par ligand).

2.1.3 LIGANDS COMPORTANT UN SITE DE COORDINATION CARBOXYLATE

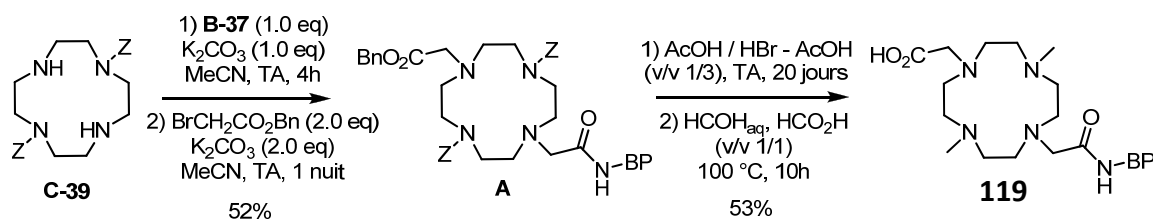
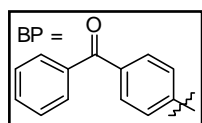


Schéma 40 : Synthèse du ligand **119** comportant une seule fonction acide carboxylique.



Le ligand **119** se synthétise en quatre étapes à partir de l'intermédiaire trans **C-39** dont la synthèse vient d'être présentée. Le composé **A-40** est obtenu par monosubstitution du cyclène trans **C-39** en introduisant un équivalent de benzophénone **B-37** ainsi qu'un équivalent de carbonate de potassium dans l'acétonitrile sans chauffer. Après quatre heures, le bromoacétate de benzyle ainsi que deux équivalents supplémentaires de K₂CO₃ sont rajoutés au milieu réactionnel. Le produit **A-40**

est purifié par colonne sur gel de silice et obtenu avec un rendement de 52%. La déprotection des carbamates et de l'ester benzylique ne peut pas être réalisée comme habituellement par hydrogénation catalytique car cela pourrait aussi engendrer la réduction de la fonction carbonyle de la benzophénone. Néanmoins, l'emploi d'acide bromhydrique à 33% dans l'acide acétique permet d'enlever simultanément les groupements protecteurs, bien que ce réactif soit connu pour être peu efficace vis-à-vis des carbamates de benzyle non-activés (*i.e.* non-substitués par des groupements électro-donneurs favorisant la formation du carbocation benzylique) ; en effet, vingt jours sont nécessaires pour atteindre une conversion complète (suivi par HPLC analytique). Suite à une purification en HPLC semi-préparative le produit est engagé dans une réaction d'Eschweiler-Clarke de méthylation des amines secondaires³⁸³ afin de limiter la désactivation de luminescence du lanthanide par les liaisons N-H. Le ligand **119** est ensuite obtenu après purification en phase normale avec un rendement de 53% sur ces deux étapes.

2.1.4 LIGAND A STRUCTURE OUVERTE DE TYPE NTA

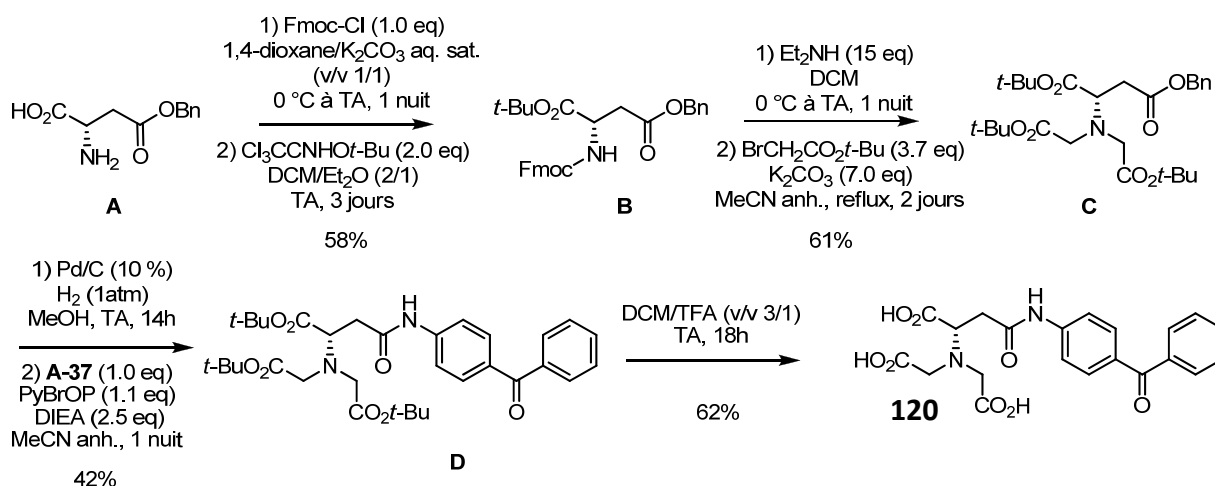


Schéma 41 : Séquence réactionnelle menant au ligand à structure ouverte **120**.

Le ligand **120** est synthétisé en sept étapes à partir de l'acide L-aspartique commercial **A-40** protégé sur sa chaîne latérale par une fonction ester benzylique. La synthèse débute par la protection de l'amine par un groupement Fmoc dans les conditions de Schotten-Baumann suivi de la formation de l'ester *tert*-butylique par le trichloroacétimidate de *tert*-butyle³⁸⁴ qui, après réaction, précipite sous forme de trichloroacétamide. Cette étape de formation d'un ester *tert*-butylique avait été initialement effectuée avec du Boc₂O et de la DMAP dans le *t*-BuOH mais la purification sur colonne de silice ne s'est pas avérée optimale (produits secondaires possédant des rapports frontaux proches du produit attendu). L'élimination du

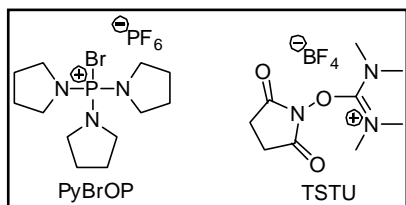
³⁸³ J. I. Bruce, R. S. Dickins, L. J. Govenlock, T. Gunnlaugsson, S. Lopinski, M. P. Lowe, D. Parker, R. D. Peacock, J. J. B. Perry, S. Aime, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 9674-9684.

³⁸⁴ **a)** A. Armstrong, I. Brackenridge, R. F. W. Jackson and J. M. Kirk, *Tetrahedron Lett.*, **1988**, *29*, 2483-2486 ; **b)** D. Foley, M. Pieri, R. Pettecrew, R. Price, S. Miles, H. K. Lam, P. Bailey and D. Meredith, *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *7*, 3652-3656.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

groupement Fmoc est aisément réalisée avec un excès de diéthylamine puis l'amine libre est ensuite dialkylée dans l'acétonitrile à reflux menant sans difficulté au composé **C-41**.

L'introduction de la 4-aminobenzophénone commerciale **A-37** est menée par un couplage peptidique sur l'acide préalablement déprotégé par hydrogénation catalytique. Une



première tentative d'activation de l'acide par le TSTU en milieu basique aboutissant à l'ester de NHS, puis réaction sur la *para*-aminobenzophénone a été un échec. La nucléophilie limitée de cette amine aromatique ne doit pas autoriser une telle réaction (il est important, si un agent de

couplage de type aminium ou uronium comme le TSTU est utilisé, d'activer l'acide au préalable car l'amine peut désactiver l'agent de couplage par formation du dérivé tétraméthylguanidinium). C'est pourquoi le PyBrOP a été engagé afin de former intermédiairement le bromure d'acyle plus réactif même vis-à-vis de nucléophiles faibles.³⁸⁵

Le rendement en amide **D-41** est alors de 42% après purification sur colonne de silice. Le ligand **120** ciblé est ainsi obtenu à hauteur de 62% après déprotection des esters *tert*-butyliques en milieu acide puis purification en phase inverse par HPLC semi-préparative.

2.2. STRUCTURES CHELATANTES COMPOSEES D'ACETAMIDES

Seuls les ligands incluant trois fonctions acétamides, *N*-diméthylées ou libres, ainsi que la benzophénone amide ont été synthétisés, dont la voie d'accès est détaillée ci-dessous. Ces composés conduiront alors à des complexes chargés positivement susceptibles d'être plus affins pour l'étiquette peptidique.

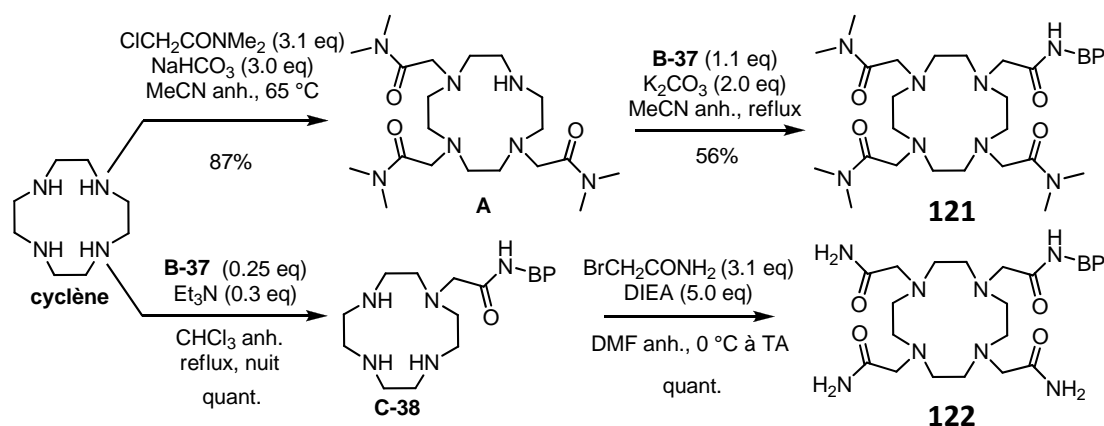


Schéma 42 : Synthèse des ligands acétamides.

La synthèse du ligand **121** substitué par les bras diméthylacétamide débute par la trialkylation du cyclène^{379b} avec le chloro-diméthylacétamide en léger excès dans l'acétonitrile à 65 °C en présence de NaHCO₃. La purification du produit **A-42** s'effectue par

³⁸⁵ Pour des revues sur les agents de couplages : a) E. Valeur and M. Bradley, *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, *38*, 606-631 ; b) A. El-Faham and F. Albericio, *Chem. Rev.*, **2011**, *111*, 6557-6602.

chromatographie sur gel d'alumine neutre ; le rendement indiqué de 87% n'est qu'approximatif car une proportion mineure, difficilement quantifiable par RMN suite aux chevauchements des signaux des isomères dialkylés, a été détectée par spectrométrie de masse. La molécule **A-42** est néanmoins engagée dans l'étape suivante pour conduire au cyclène tétraalkylé **121** avec un rendement de 56% après purification par chromatographie sur gel de silice.

L'analogue non-méthylé **122** est obtenu par monoalkylation du cyclène^{369d} avec la benzophénone **B-37** puis par substitution des trois atomes d'azote libres. Il est ensuite purifié par simple précipitation dans le dichlorométhane. L'application de conditions douces (base organique plus faible que K_2CO_3 et ajout à 0 °C)³⁴⁰ évite l'addition du bromo-acétamide sur la fonction amide de la future antenne comme observé précédemment avec le composé **E-38**.

3 COMPLEXATION DES LIGANDS AVEC LE TERBIUM ET L'EUROPIUM

Les complexes d'euprium et de terbium ont été obtenus en phase aqueuse (concentration de l'ordre de 50 mM) avec environ 1.5 équivalents du sel de lanthanide commercial correspondant ($LnCl_3 \cdot 6H_2O$) à température ambiante. Le pH est maintenu entre 6 et 8. Seul le chélate issu du ligand NTA **120** sera formé directement dans la cuve en quartz de mesure UV. Enfin, cette méthode n'a pas permis l'insertion du lanthanide dans la structure « monocarboxylate » **119** menant probablement à un chélate peu stable.

Les chélates sont tous purifiés en phase inverse par HPLC semi-préparative. Une phase mobile contenant de l'eau ultrapure en mélange avec de l'acétonitrile a été appliquée pour les premiers chélates, **Eu-116** (son homologue au terbium n'a pas été synthétisé) et **Ln-115**. En effet, les complexes dont la partie chélatante est partiellement formée d'acides carboxyliques sont instables en milieu acide fort (par exemple en solution aqueuse contenant 0.1% de TFA). En revanche, même si une quantité suffisante de produit est récupérée (quelques milligrammes), cette phase mobile n'est pas adaptée pour ces complexes : les profils d'élution s'apparentent à de larges « bosses ». Des essais avec du TEAA en HPLC analytique n'ont pas été beaucoup plus concluants. Différentes phases aqueuses acides (acide acétique ou formique), plus douces que le TFA 0.1% ont alors été testées. Celle retenue, une solution aqueuse d'acide acétique 0.01%, conduit à des profils d'élution sans « traînée » et sans décomplexation du chélate (l'acide acétique a été préféré, car, sur le temps de l'analyse, alors que l'acide formique ne semblait pas destabiliser l'architecture complexante, il s'est avéré en HPLC semi-préparative effectuée en présence de cet acide formique, que la majorité du chélate relargue le cation métallique). Quant aux complexes acétamides **Ln-121** et **Ln-122**, ils présentent l'avantage d'être stables en milieu acide. Leurs purifications sont effectuées classiquement avec une phase aqueuse de TFA 0.1% (pH 2) sans qu'aucune décomplexation majeure ne survienne.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

Suite à la formation des chélates, la caractérisation de leurs propriétés d'absorbance en spectrométrie UV-vis a été effectuée et comparée à celle des ligands. Sur l'ensemble des complexes synthétisés, seule l'antenne 4-méthyl-benzophénone (**Ln-115**) ne subit aucune modification notable de son spectre d'absorbance. Un effet hypsochrome d'environ 10 nm est observé dans le cas de la 4-(acétamidy)-benzophénone ($\lambda_{\text{max}}(\text{ligand}) \approx 300$ nm contre 290 nm environ pour le chélate **Ln-114**). La source probable de cet effet est la diminution du caractère donneur de l'amide désormais engagé dans la chélation avec le cation métallique diminuant de fait le transfert de charge vers le carbonyle de la benzophénone. Quant au chromophore 4-éthyl-benzophénone le passage de **116** à **Eu-116** induit un léger effet bathochrome de 5 nm ($\lambda_{\text{max}}(\text{ligand}) \approx 263$ nm contre 268 nm environ pour le chélate). Cette fois, le carbonyle doit interagir avec l'euporium augmentant son caractère accepteur vis-à-vis du caractère faiblement donneur du groupement éthyle. Le plus faible degré de liberté imposé par le lien méthylène sur **Ln-115** ne doit alors pas permettre au carbonyle de l'antenne de s'approcher suffisamment ou d'adopter une géométrie autorisant une interaction avec le cation métallique.

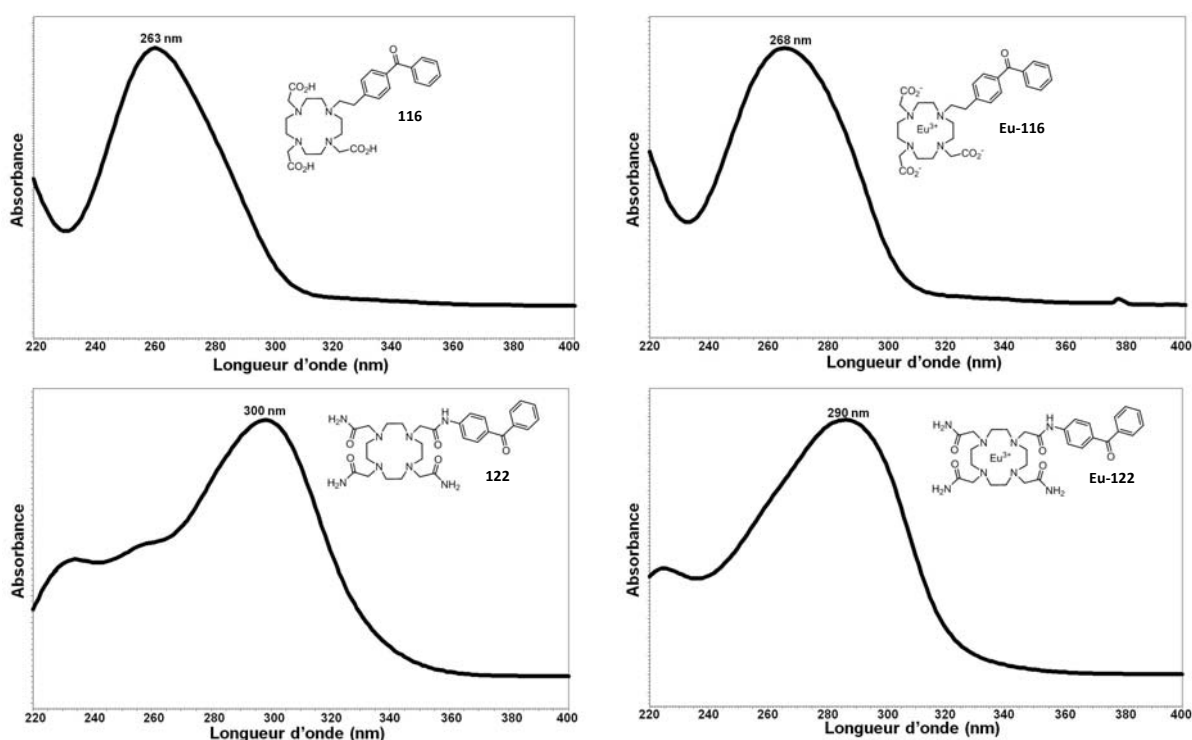


Figure 116 : Spectres modèles d'absorption UV enregistrés lors des analyses HPLC de certains composés avant et après complexation de l'euporium (eau ultrapure/MeCN pour 116 et Eu-116 ou TFA 0.01%/MeCN pour 122 et Eu-122). Ceux du ligand 115, possédant la méthyl-benzophénone, et de ses chélates sont similaires à celui du ligand 116 (concentration de l'échantillon injectée pour chaque analyse : ≈ 0.5 mg.mL⁻¹).

Les propriétés d'émission de ces complexes seront présentées au paragraphe V de ce chapitre.

IV. SYNTHÈSE DES CHELATES COMPORTANT UNE ANTENNE PHOTOACTIVABLE DE TYPE AZIDOCOUMARINE OU AZIDOQUINOLINONE

Plusieurs exemples de chélates d'euprium incluant une coumarine en tant que sensibilisateur sont rapportés dans la littérature. Le premier exemple, à notre connaissance, prouvant que ce chromophore peut être utilisé à cette fin date de 1975 (**Eu-123**).³⁸⁶ Il ne s'agit pas d'un chélate puisque la coumarine est protonée et ne peut se coordiner au cation métallique. En revanche, à basse température et à très forte concentration (10 mM pour l'antenne et 50 mM pour l'euprium) un transfert d'énergie s'opère. Au vue de la position du niveau triplet de cette famille de composés, ceux-ci se montrent le plus souvent incapables à sensibiliser efficacement le terbium.

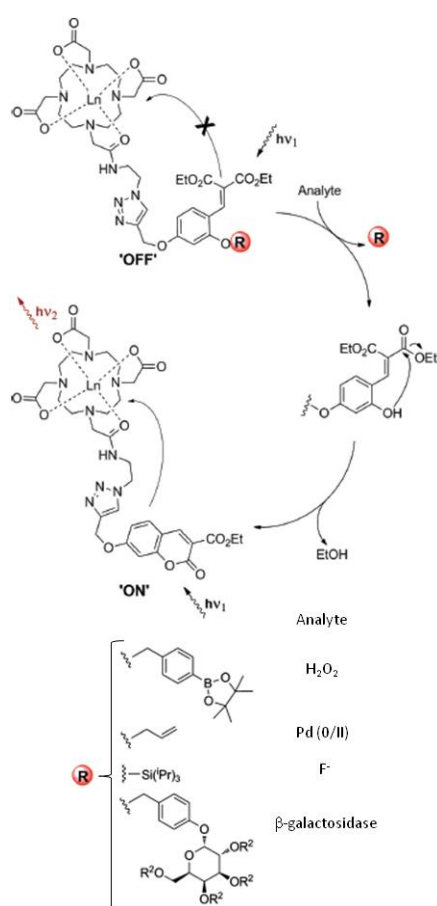


Figure 117: Représentation de la formation du chélate luminescent Ln-133 catalysée par certains analytes.^{331b}

Suite à cette observation, des coumarines intégrant sur leur structure aromatique des fonctions chélatantes reposant presque exclusivement sur un motif polyaminocarboxylate ont été développés dont les ligands **124** à **130** et **134** (Figure 118).³⁸⁷ Le dérivé 2-thiopyridine du chélate **Eu-126**, capable de réagir sur des résidus cystéines, a été appliqué comme sonde luminescente pour la mesure de distance inter- ou intramoléculaire par du FRET (l'accepteur utilisé étant la Cy-5.0).

Les ligands **127** et **128** sont capables de sensibiliser le terbium mais seulement à une longueur d'onde absorbée par la partie benzoyle qui elle seule est capable de transférer, en plus, son énergie au terbium. Si cette entité n'est pas directement reliée à la structure complexante (ligand **129** et **130**) elle se montre incapable de transférer son énergie au lanthanide. A noter que le niveau triplet de la coumarine du ligand **128** ($18\ 100\ \text{cm}^{-1}$) ne permet pas de sensibiliser l'euprium qui ne s'avère luminescent que par l'excitation centrée sur le dérivé benzoyle.

De plus d'autres chélates incorporant un dérivé du cyclène ont aussi été synthétisés, dont le ligand **131**. L'objectif initial désiré était d'obtenir

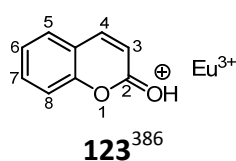
³⁸⁶ P. G. Tarassoff and N. Filipescu, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1975**, 208-209.

³⁸⁷ a) C. B. Castellani and O. Carugo, *Inorg. Chim. Acta*, **1989**, 159, 157-161 ; b) E. Heyduk and T. Heyduk, *Anal. Biochem.*, **1997**, 248, 216-227 ; c) E. Brunet, M. T. Alonso, O. Juanes, O. Velasco and J.-C. Rodriguez-Ubis, *Tetrahedron*, **2001**, 57, 3105-3116 ; d) C. Feau, E. Klein, C. Dosche, P. Kerth and L. Lebeau, *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, 7, 5259-5270.

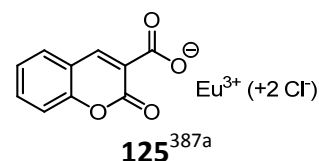
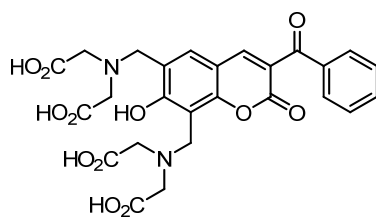
Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

une inhibition de la luminescence du lanthanide après interaction de la base adénosine avec l'ADN (désactivation de l'état excité de la coumarine par transfert d'électron de l'ADN sur cette dernière).³⁷² Quant au chélate **Eu/Tb-133** décrit plus récemment il permet de détecter certains analytes ($\text{Pd}^{0/2+}$, H_2O_2 , F^- , β -galactosidase) qui déclenchent la formation de l'antenne (Figure 117).^{331b}

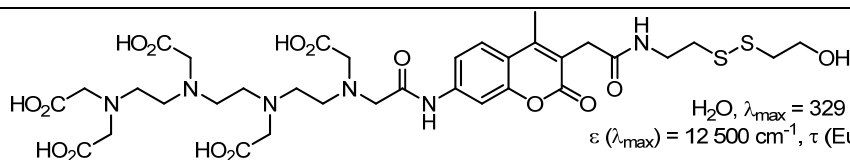
Enfin, l'introduction de la 7-hydroxy-4-méthylcoumarine sur l'acide dipicolinic (ligand **132**) chélatant l'euprimum permet de le sensibiliser en phase aqueuse bien que l'antenne soit éloignée de la partie complexante par un motif PEG.³⁸⁸



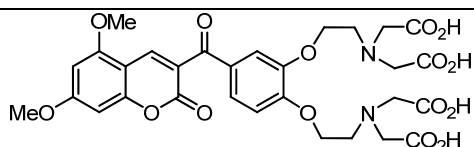
mélange d'acides alkylsulphoniques
 $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$, 77 K
 $E(^3\pi\pi^*) = 22\,300 \text{ cm}^{-1}$, $\Phi(\text{Eu}) = 31\%$



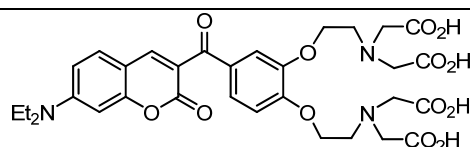
MeOH, $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$
 $\Phi = 7.4\%$
 $E(^3\pi\pi^*) = 21\,500 \text{ cm}^{-1}$



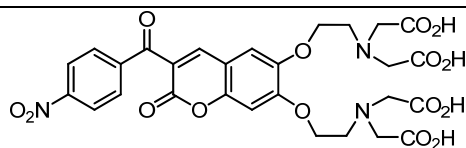
H_2O , $\lambda_{\text{max}} = 329 \text{ nm}$
 $\epsilon(\lambda_{\text{max}}) = 12\,500 \text{ cm}^{-1}$, $\tau(\text{Eu}^{3+}) = 1.13 \text{ ms}$



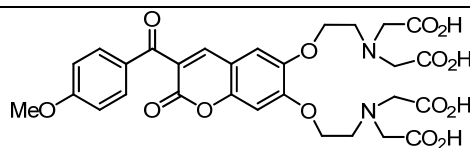
MeOH, $\lambda_{\text{max}} = 328 \text{ nm}$, $E(^3\pi\pi^*) = 20\,400 \text{ cm}^{-1}$
 $\Phi = 0.9\%$ (Eu, $\lambda_{\text{exc}} = \lambda_{\text{max}}$), 0.8% (Tb, $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$)
 $\tau = 0.66 \text{ ms}$ (Eu), 1.15 ms (Tb)



MeOH, $\lambda_{\text{max}} = 427 \text{ nm}$, $E(^3\pi\pi^*) = 18\,100 \text{ cm}^{-1}$
 $\Phi = 0.4\%$ (Eu, $\lambda_{\text{exc}} = 257 \text{ nm}$), 1.2% (Tb, $\lambda_{\text{exc}} = 281 \text{ nm}$)
 $\tau = 0.76 \text{ ms}$ (Eu), 1.71 ms (Tb)



MeOH, $\lambda_{\text{max}} = 367 \text{ nm}$, $E(^3\pi\pi^*) = 19\,900 \text{ cm}^{-1}$
 $\Phi = 0.7\%$ (Eu, $\lambda_{\text{exc}} = \lambda_{\text{max}}$), $\tau = 1.01 \text{ ms}$ (Eu)



MeOH, $\lambda_{\text{max}} = 359 \text{ nm}$, $E(^3\pi\pi^*) = 20\,400 \text{ cm}^{-1}$
 $\Phi = 0.2\%$ (Eu, $\lambda_{\text{exc}} = 357$), $\tau = 1.45 \text{ ms}$ (Eu)

³⁸⁸ J. Andres and A.-S. Chauvin, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2010**, 2700-2713.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

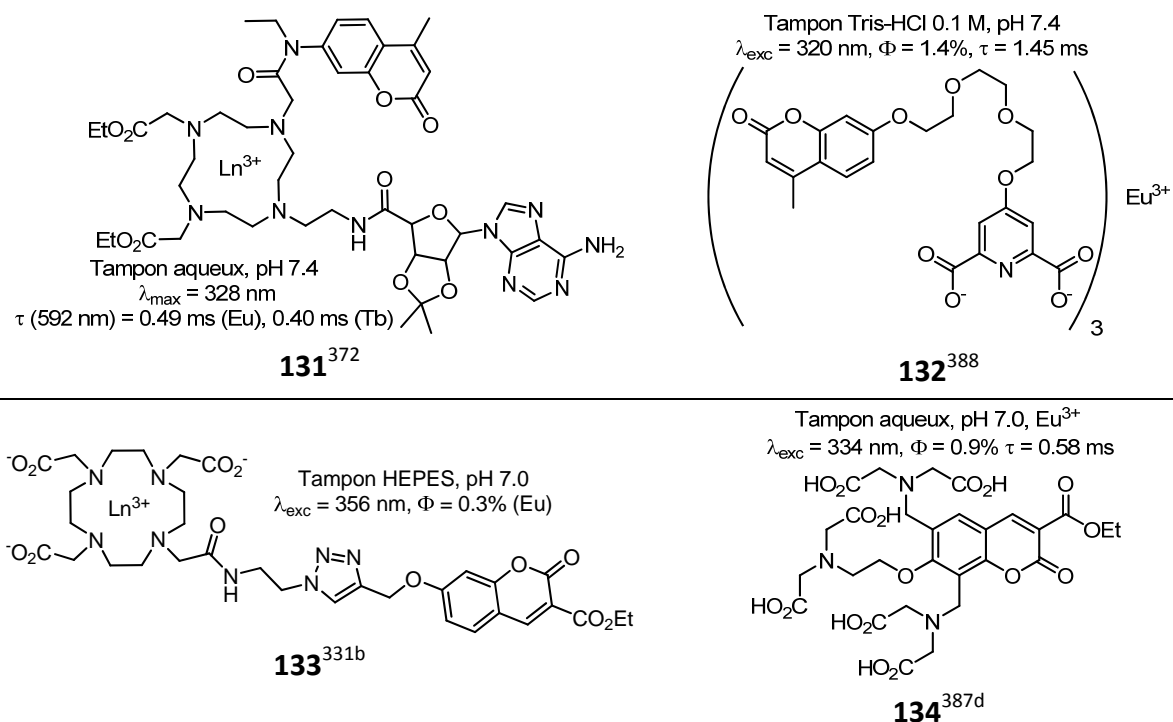


Figure 118 : Exemples de chélates d'euporium sensibilisés par une coumarine.

Il est vrai en revanche que les rendements quantiques de l'euporium en phase aqueuse et sensibilisé par ce type de chromophore demeurent relativement modestes ($\approx 1\%$). C'est probablement l'une des raisons pour laquelle le motif cs124 (dérivé insaturé de la quinolinone) et ses analogues (en particulier le cs124-CF₃), plus stables et sensibilisant généralement plus efficacement l'euporium et le terbium (Φ de l'ordre de 5 à 10%) sont plus souvent rencontrés, bien que leurs longueurs d'onde d'absorption sont plus énergétiques que celles des coumarines (cf. § III-6-1-2, chapitre 1).

Sur les très nombreux exemples impliquant soit une antenne de type coumarine soit de type quinolinone et impliqués dans du marquage de biomolécules, aucun ne fait intervenir une fonction photoréactive alors même que les dérivés de la 7-azidocoumarine sont connus comme sondes pro-fluorescentes utilisables dans des photomarquages d'affinité : la fluorescence du marqueur n'est révélée qu'après que la fonction azido a réagi, générant une liaison covalente avec la biomolécule visée.³⁸⁹ La photolyse conduit à deux produits différents dont l'un, analogue d'une 7-aminocoumarine, est fluorescent. Le deuxième, issu d'une expansion de cycle par la formation du nitrène intermédiaire est probablement le composé majoritaire mais *a priori* n'est pas fluorescent.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

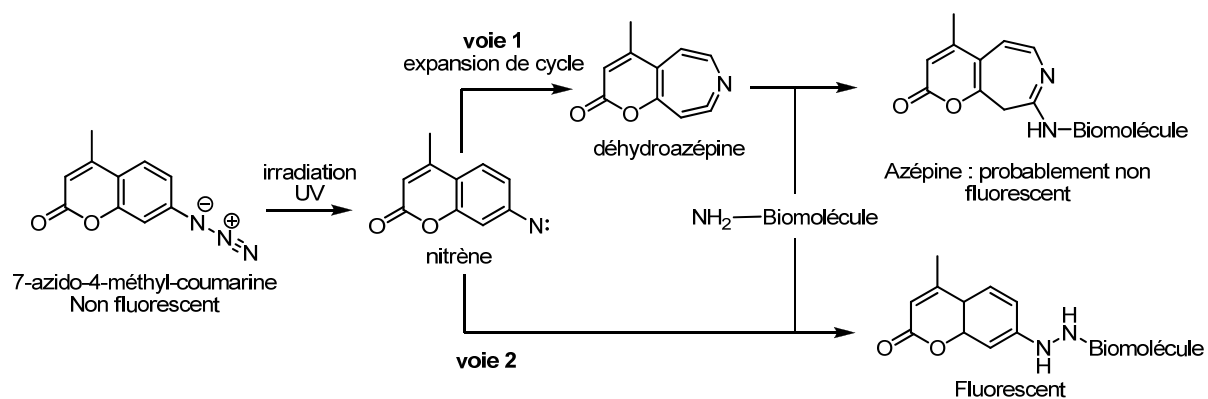


Schéma 43 : Photoactivation d'une 7-azidocoumarine menant à un marquage covalent accompagné d'une exaltation de fluorescence.³⁸⁹

La présence de la fonction azido en position 3 d'une coumarine a aussi pour effet d'inhiber sa fluorescence qui peut être restaurée par formation d'un cycle triazole dans les conditions de la chimie « click ».³⁹⁰ De même qu'un substituant alcyne en 7 éteint la fluorescence et que le triazole dans cette même position l'exalte.³⁹¹ Aucun exemple cependant n'a été rapporté quant à sa potentielle utilisation pour du marquage par photoaffinité.

Quant à l'utilisation d'azidoquinolinones, la majorité des quelques exemples rapportés dans la littérature implique une substitution de l'azoture en position 4 et n'est appliquée qu'à de la chimie « click » dans le but de développer de nouvelles molécules fluorescentes.³⁹²

Le processus de pro-fluorescence de ces composés peut s'expliquer de la façon suivante : l'azoture, qu'il soit en position 3 ou 7 doit affaiblir suffisamment le transfert de charge impliquant une augmentation du niveau fluorescent $^1\pi-\pi^*$ et par suite favorise la transition $S_0 \rightarrow ^1n-\pi^*$. En effet, l'écart d'énergie entre ces deux états devient suffisamment faible, voire même négatif, pour que cette dernière transition se révèle compétitive par rapport à la transition $S_0 \rightarrow ^1\pi-\pi^*$.³⁹³ Le comportement de la 3- ou 7-azidocoumarine peut alors être comparé à celui de la benzophénone, non-fluorescente, pour laquelle le niveau $^1n-\pi^*$ est le moins énergétique. L'origine de la faible fluorescence liée à cette transition peut se justifier par la différence de symétrie des orbitales impliquées : l'échange électronique en leur sein se montre alors beaucoup moins probable. La durée de vie de cet état est donc plus longue que celle de l'état $^1\pi-\pi^*$. En conséquence, le niveau $^1n-\pi^*$ se montre plus réceptif aux phénomènes ne pouvant se produire aussi efficacement avec un état excité court, à savoir désactivation non-radiative ou croisement intersystème.

Pour résumer, il semblerait que les groupements suffisamment riches en électrons (amines, triazoles) favorisent un état de transfert de charge menant à de la fluorescence, alors que

³⁸⁹ G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, **1996**, Academic Press, San Diego, pp 229-286.

³⁹⁰ K. Sivakumar, F. Xie, B. M. Cash, S. Long, H. N. Barnhill and Q. Wang, *Org. Lett.*, **2004**, *6*, 4603-4606.

³⁹¹ Z. Zhou and C. J. Fahrni, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 8862-8863.

³⁹² T. N. Glasnov and C. O. Kappe, *QSAR Comb. Sci.*, **2007**, *26*, 1261-1265.

³⁹³ J. S. Seixas de Melo, R. S. Becker and A. L. Macanita, *J. Phys. Chem.*, **1994**, *98*, 6054-6058.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

d'autres moins densément pourvus (azoture, alcynes), soit désactivent l'état excité par un transfert d'électrons, soit « activent » la transition $S_0 \rightarrow {}^1n-\pi^*$.

L'objectif recherché pour ces chélates comportant une antenne azidocoumarine ou azidoquinolinone est plus, dans un premier temps, d'évaluer la modulation de luminescence du lanthanide (idéalement une augmentation) suite à la photoactivation, que d'obtenir une exaltation de luminescence par la seule expulsion des molécules d'eau *via* l'étiquette peptidique greffée sur la biomolécule d'intérêt.

Par analogie avec les 3- et 7-azidocoumarines dont la fluorescence est éteinte, nous espérons que le mécanisme, sous-jacent à cette extinction du signal lumineux, soit aussi plus favorable que le transfert au lanthanide afin d'obtenir une sonde pro-luminescente.

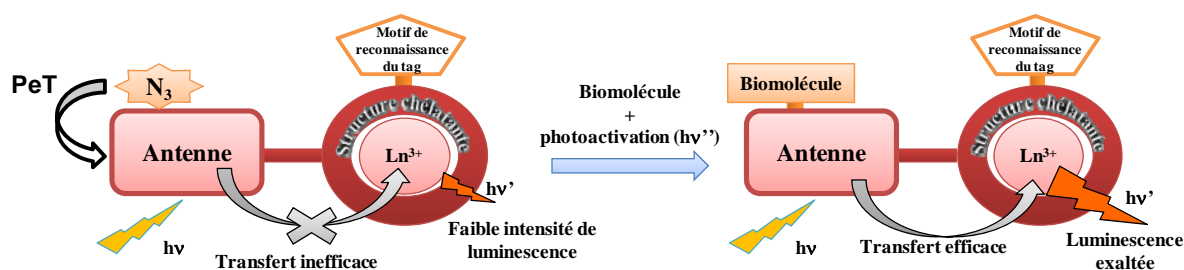


Schéma 44 : Représentation schématique de l'exaltation de luminescence recherchée du chélate suite au photomarquage.

Les différents ligands synthétisés sont présentés à la figure suivante. L'influence de la position du groupement photoactivable sur la coumarine (en position 3 ou 7 qui sont connues pour, selon leur substitution, influencer sensiblement les propriétés photochimiques), celle de la fonction reliant l'antenne au cyclène (position 4, 6 ou 7) ainsi que le mode d'accroche sur ce cycle azoté (amide, méthyl ou éthyl acétamide) seront évalués.

Le premier chromophore photoréactif synthétisé présent sur les chélates **Ln-135** et **Ln-138** est une 7-azidocoumarine originale dont la voie de synthèse a été développée au laboratoire par une stagiaire post-doctorale.³⁹⁴ Cette molécule présente l'avantage d'être plus stable sous irradiation³⁹⁵ à l'instar des azotures d'aryle perfluorés augmentant l'efficacité du photomarquage : l'ajout d'halogènes stabilisant le nitrène intermédiaire et/ou défavorisant l'expansion de cycle.³⁹⁶ La fonction d'accroche sur le cyclène est un acide carboxylique positionné en C4 du cycle aromatique. Les deux autres coumarines dont la synthèse a été partiellement reprise de la littérature disposeront de l'azoture en position 3 et d'un groupement électrophile activé bromo-acétamide soit en position 6, soit en position 7 de la coumarine. Elles seront utilisées pour la synthèse des chélates **Ln-136** et **Ln-137**. La dernière

³⁹⁴ E. Paunescu, L. Louise, L. Jean, A. Romieu and P.-Y. Renard, *Dyes Pigm.*, **2011**, *91*, 427-434.

³⁹⁵ En quelques jours la coumarine non halogénée se dégrade même entreposée à -20 °C et à l'abri de la lumière.

³⁹⁶ N. P. Gritsan and M. S. Platz, *Chem. Rev.*, **2006**, *106*, 3844-3867.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

antenne, greffée sur le chélate **Ln-139** est un analogue de cs124 disposant d'une fonction acide acétique en position 4 et du groupement azido en 7.

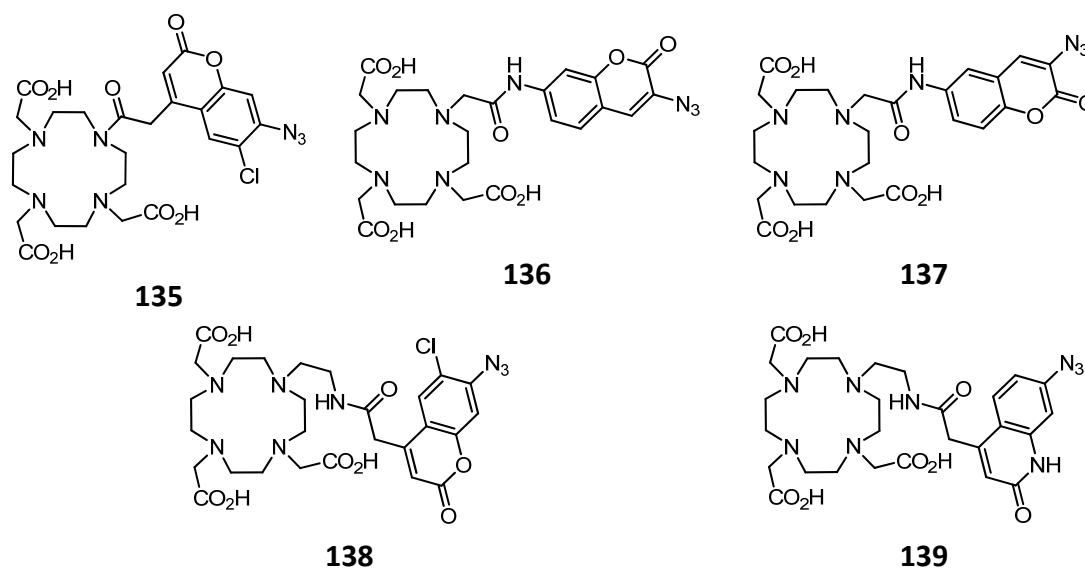


Figure 119 : Présentation des différents ligands synthétisés comportant des dérivés de coumarine.

1 SYNTHÈSE DES ANTENNES

1.1. 7-AMINO-6-CHLORO-4-ACIDE ACÉTIQUE-COUMARINE³⁹⁴

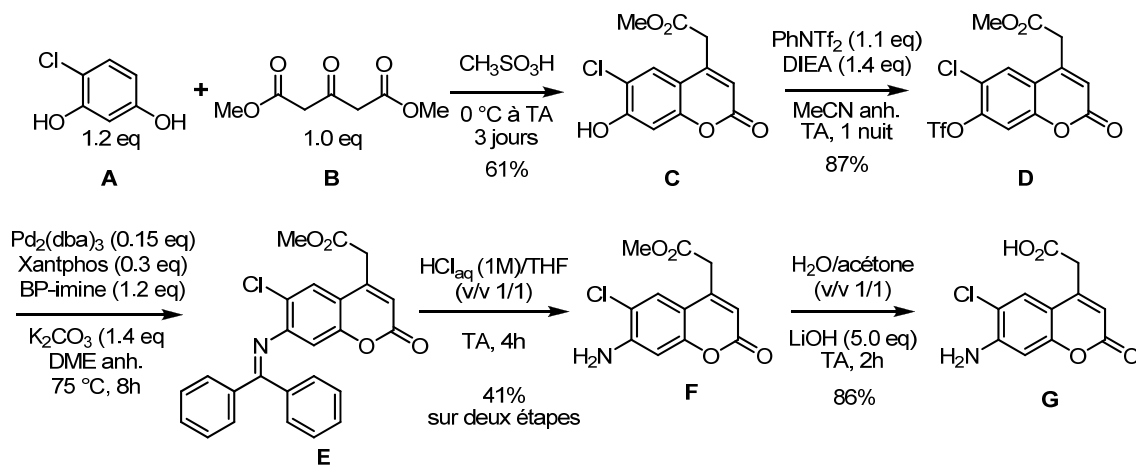


Schéma 45 : Voie de synthèse de la 7-amino-6-chloro-4-acide acétique-coumarine développée au laboratoire par le Dr. Emilia Paunescu.³⁹⁴

La coumarine **F-45** a été synthétisée suivant un protocole développé au laboratoire par le Dr. Emilia Paunescu³⁹⁴ que nous avons légèrement optimisé. La formation du cœur coumarinique incluant à la fois le chlore et un carbamate précurseur de la fonction amine dans les conditions classiques de Pechmann appliquées aux synthèses de coumarines s'est révélée impossible (Schéma 46). Suite à l'optimisation des conditions opératoires réalisée par le Dr. Emilia Paunescu, les meilleures conditions s'avèrent « simplement » être une agitation du 4-chlororésorcinol **A-45** avec le diester **B-45** sans ajout de catalyseurs (acide de

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

Lewis activant l'électrophilie de l'ester) dans l'acide métanesulfonique. En revanche, cette stratégie nécessite l'emploi de chloro-résorcinol qui de fait, allonge la voie de synthèse car la fonction phénol de la position 7 devra être transformée en aniline.

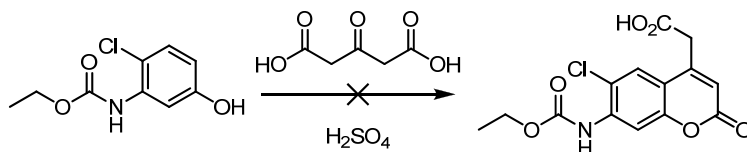


Schéma 46 : Echec de la synthèse de la 7-éthylcarbamate-6-chloro-4-acide acétique-coumarine dans les conditions classiques de Pechmann à partir du 4-chloro-3-éthylcarbamate-phénol. Dans le cas de la coumarine non halogénée cette procédure est efficace.³⁹⁷

A noter que dans le mode opératoire initialement développé le dimère **A-47**, dont la structure a pu être identifiée par spectroscopie RMN et analyse de masse ESI, se forme en

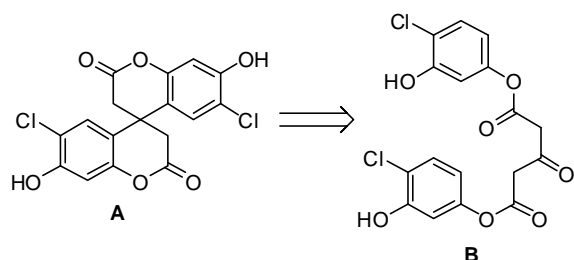


Schéma 47 : Dimère obtenu (A) en mélange avec la coumarine désirée C-45 et son précurseur potentiel (B).

proportion relativement importante ($\approx 15\%$) et la coumarine souhaitée **C-45** n'est obtenue qu'à hauteur de 41% (20.5% par précipitation puis autant après purification sur colonne chromatographique, qui de surcroît se révèle assez laborieuse puisque ces deux produits possèdent des R_f proches). Evidemment, plus la fraction en dimère augmente et moins la

précipitation sélective de la coumarine est efficace. Afin de diminuer la proportion de **A-47** et ainsi éviter une purification fastidieuse par chromatographie sur colonne, le 4-chlororésorcinol **A-45** est simplement ajouté lentement à une solution du diester **B-45**. Finalement la coumarine peut alors être récupérée avec un rendement de 61% en effectuant de simples précipitations (cf. partie expérimentale).

La conversion de la fonction phénol en aniline a pu être réalisée *via* le triflate **D-45** qui, suite à une réaction de couplage au palladium de type Buchwald-Hartwig en présence de benzophénone-imine conduit à l'imine **E-45**. Son hydrolyse en milieu acide aboutit finalement à la 7-aminocoumarine **F-45** désirée avec un rendement, certes modeste, de 36%, à partir de la 7-hydroxycoumarine correspondante.

L'emploi du *N*-phényl triflimide, réactif plus doux que l'anhydride triflique, donne accès au triflate **D-45** avec un meilleur rendement. L'étape délicate de cette séquence réactionnelle et qui a nécessité le plus d'optimisation (solvant, base, ligand) de la part du Dr. Paunescu est l'insertion de l'imine. Aussi paradoxal que cela puisse paraître cette méthodologie reste encore très peu exploitée dans la synthèse de fluorophores organiques.³⁹⁸

³⁹⁷ D. J. Maly, F. Leonetti, B. J. Backes, D. S. Dauber, J. L. Harris, C. S. Craik and J. A. Ellman, *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 910-915.

³⁹⁸ a) D. Audisio, S. Messaoudi, J.-F. Peyrat, J.-D. Brion and M. Alami, *Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48*, 6928-6932 ; b) T. Peng and D. Yang, *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 496-499 ; c) X. Jin, C. Uttamapinant and A. Y. Ting, *ChemBioChem*, **2011**, *12*, 65-70 ; d) J. B. Grimm and L. D. Lavis, *Org. Lett.*, **2011**, *13*, 6354-6357.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

Dans notre cas, le modeste rendement provient de l'électronégativité du chlore qui appauvrit l'oxygène portant le groupement trifluorométhanesulfonyle déjà électroniquement déficient par le caractère électroattracteur de cette fonction. Finalement, bien que le triflate **D-45** à température ambiante et stocké sans précaution particulière ne s'hydrolyse pas, dans les conditions du couplage en revanche, il se montre extrêmement sensible à cette dégradation. Afin de la limiter et de favoriser l'insertion oxydante du palladium, le diméthoxyéthane doit être le plus sec possible (il est même préférable de le distiller juste avant son utilisation) et la quantité en catalyseur élevée (au-delà de 0.15 équivalent aucune amélioration du rendement n'a été observée).

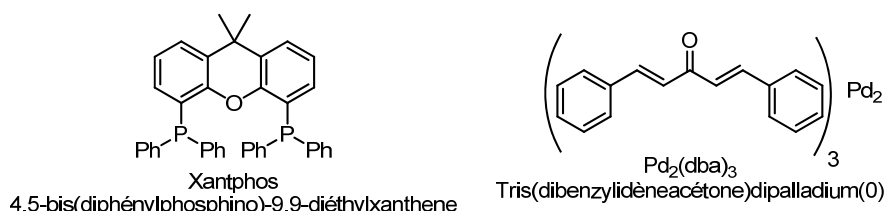


Figure 120 : Représentation du ligand Xantphos et du catalyseur Pd₂(dba)₃ employés dans la réaction de Buchwald-Hartwig menant à la coumarine E-45.

Un substitut à la benzophénone-imine a aussi été testé à savoir la benzylamine mais sa déprotection a échoué. La 7-aminocoumarine **F-45** s'obtient suite à l'hydrolyse acide de l'imine par simple précipitation dans l'éthanol (deux fractions sont obtenues dont la moins propre présente un degré de pureté de 88% déterminé par analyse HPLC en mode « MaxPlot », ³⁹⁹ l'impureté étant probablement un dérivé de ligand Xantphos ou dba).

La saponification de l'ester méthylique de la position 4 dans un mélange acétone/eau contenant cinq équivalents de lithine conduit à la coumarine finale **G-45** avec un rendement de 86% après précipitation en milieu aqueux acide.

L'insertion du motif azido ne sera effectuée qu'après couplage sur le DO3At-Bu ou DO3At-Bu-éthylamine puis déprotection des esters. Différents essais de couplage de la coumarine azoture **A-48** (obtenu suivant des conditions classiques à partir de **G-45**) sur le cyclène nu se sont montrés infructueux. Un nouveau produit est transitoirement détecté lors des analyses HPLC, certainement le produit attendu **B-48** mais celui-ci se réduit en composé **C-48**. Ces essais n'ont pas été effectués à l'abri de la lumière puisque cette coumarine azoture chlorée s'avère par ailleurs stable en solution, au moins dans la même échelle de temps de la réaction (*cf.* réactions suivantes).

³⁹⁹ Ce mode affiche le chromatogramme au maximum d'absorbance de chaque composé.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

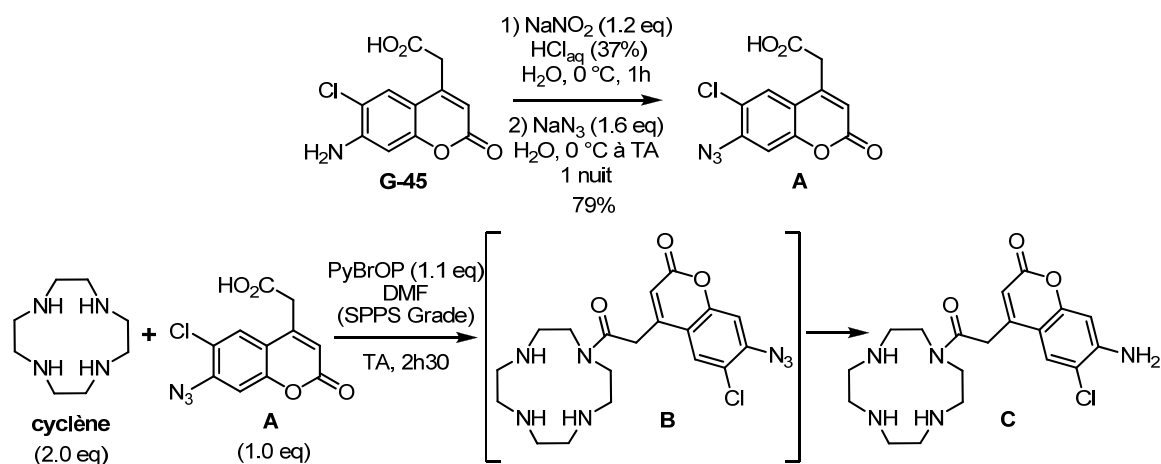


Schéma 48 : Formation de la 7-azidocoumarine A-48 et tentative d'accrochage sur le cyclène.

1.2. DERIVES DE LA 3-AMINOCOUMARINE

Les deux coumarines suivantes comporteront le motif azido en position 3 et seront greffées à la structure chélatante par l'intermédiaire d'un bromo-acétamide situé soit sur le carbone 6 soit sur le carbone 7 de la structure aromatique. La formation de l'azido ne sera réalisée qu'après couplage de la coumarine sur le macrocycle azoté. C'est pourquoi l'amine est protégée sous la forme d'un carbamate (Boc) clivable, comme les esters *tert*-butyliques, en milieu acide.

1.2.1 7-BROMO-ACETAMIDE-3-N-BOC-COUMARINE

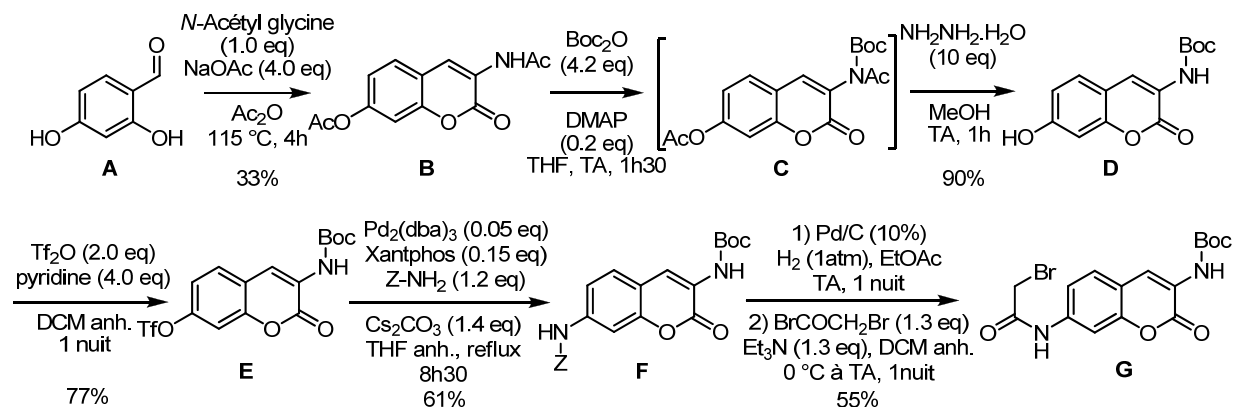


Schéma 49 : Chemin réactionnel menant à la 7-bromo-acétamide-3-N-Boc-aminocoumarine G-49.

La synthèse de la coumarine **G-49** débute par une condensation de Perkin classique dans l'anhydride acétique entre le 2,4-dihydroxybenzaldéhyde et la glycine *N*-acétylée. Cette fonction permet d'éviter l'amination réductrice avec l'aldéhyde. La coumarine diacétylée **B-49** est ainsi obtenue avec un rendement de 33% après purification par précipitation.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

La formation de la coumarine **D-49** est effectuée en deux étapes dans le même milieu réactionnel selon une méthodologie rapportée dans la littérature.⁴⁰⁰ La formation de l'imide intermédiaire **C-49**, réalisé classiquement avec du Boc₂O et de la DMAP, permet ensuite une déprotection sélective dans des conditions douces des deux acétyles conduisant au carbamate **D-49**. Cette déprotection est effectuée avec l'hydrazine, un nucléophile activé par effet α (dans ces conditions, les fonctions *O*-acétate et le *N*-acyle sont toutes les deux labiles).

La suite de la synthèse concerne l'introduction de la fonction amine sur laquelle sera greffé le groupement bromo-acétamide. Elle est calquée sur la même stratégie que précédemment, *i.e.* application de la méthodologie de Buchwald-Hartwig.

Le triflate **E-49**, moins déficient en électron que son homologue chloré **D-45** et par conséquent moins sensible à l'attaque nucléophile de la pyridine, a donc pu être obtenu classiquement en utilisant le sel de pyridinium résultant de la réaction entre la pyridine et l'anhydride triflique avec un rendement correct de 77%. Le couplage pallado-catalysé a été réalisé avec le même couple catalyseur/ligand que lors de la synthèse précédente, mais une quantité trois fois moindre en Pd(0) a néanmoins conduit au produit désiré avec une meilleure efficacité. Le précurseur de l'amine devant être une fonction orthogonale au Boc et insensible aux conditions basiques du couplage, le choix du groupement carbobenzyloxy Z s'est logiquement imposé à nous.

La déprotection de ce carbamate s'est déroulée dans une suspension de palladium sur charbon dans l'acétate d'éthyle (**F-49** se révèle très peu soluble dans l'éthanol, il a d'ailleurs été purifié par précipitation dans ce solvant) et sous atmosphère d'hydrogène.

La dernière étape concerne l'introduction du bromo-acétamide sur l'aniline. Le même mode opératoire appliqué à la synthèse de la 4-(bromoacétamidyl)-benzophénone **B-37** a été mis en œuvre.^{381b} Sur ces deux dernières étapes ne présentant aucune difficulté, la coumarine désirée est obtenue avec un rendement de 55%, et sur toute la séquence avec une efficacité de 7.7%.

⁴⁰⁰ a) M. J. Burk and J. G. Allen, *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 7054-7057 ; b) A. A. Kudale, J. Kendall, C. C. Warford, N. D. Wilkins and G. J. Bodwell, *Tetrahedron Lett.*, **2007**, 48, 5077-5080.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

1.2.2 6-BROMOACETAMIDE-3-N-BOC-AMINOCOUMARINE

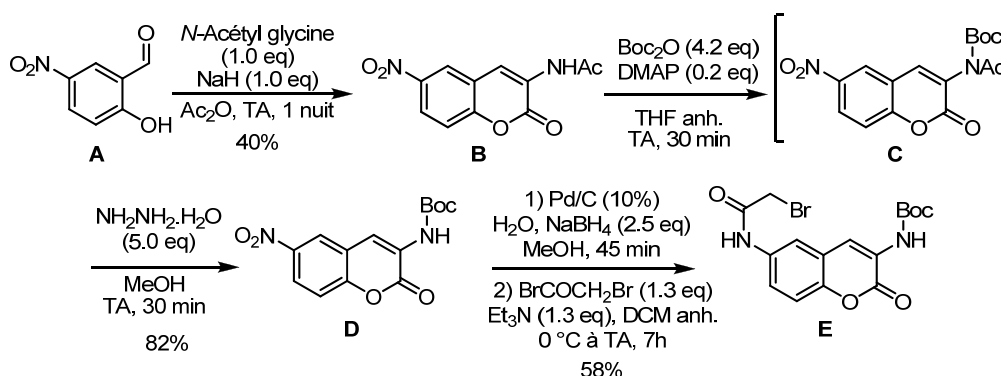


Schéma 50 : Chemin réactionnel menant à la 6-bromo-acétamide-3-N-Boc-aminocoumarine E-50.

L'accès à la coumarine **E-50** est plus direct car celle-ci ne requiert pas une réaction d'amination pallado-catalysée. Dès la formation du cœur coumarinique par une condensation de Perkin entre l'aldéhyde commercial **A-50** et la *N*-acétyl glycine,⁴⁰¹ la fonction nitro, révélant l'amine par simple réduction, est déjà correctement positionnée. L'obtention du carbamate en **C3** repose sur la même méthodologie appliquée précédemment, puis la réduction du nitro en amino suivi de l'introduction du bromo-acétamide sur cette dernière aboutit au produit désiré avec un rendement global de 19%.

2 SYNTHÈSE DU cs124-ACIDE CARBOXYLIQUE

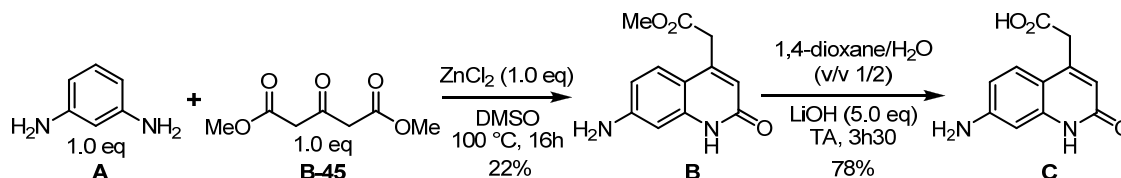


Schéma 51 : Synthèse du cs124 C-51.¹⁰⁹

La voie de synthèse menant au carbostyryle 124 **C-51** est celle décrite par Krasnoperov *et al.*¹⁰⁹ La structure aromatique de type quinolinone est formée par une condensation s'apparentant à une réaction de Pechmann où l'électrophilie du carbonyle est exaltée par le chlorure de zinc(II), un acide de Lewis doux. Le produit **B-51** est récupéré par précipitation en versant le brut réactionnel dans une phase aqueuse légèrement acide (0.1 M en acide citrique). Après une simple saponification le produit désiré **C-51** est obtenu avec un rendement global sur les deux étapes de 17%.

Nous avons aussi cherché à synthétiser l'analogue chloré de **C-51** en appliquant vainement les conditions d'obtention de la quinolinone fluorescente **B-51** ou celles ayant permises la synthèse de la coumarine chlorée **C-45** (Schéma 52). Les analyses HPLC ont cependant

⁴⁰¹ S. Girouard, M.-H. Houle, A. Grandbois, J. W. Keillor and S. W. Michnick, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *127*, 559-566.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

montré la formation très minoritaire d'un produit possédant un spectre d'absorption UV similaire à celui attendu pour des dérivés carbostryriles.

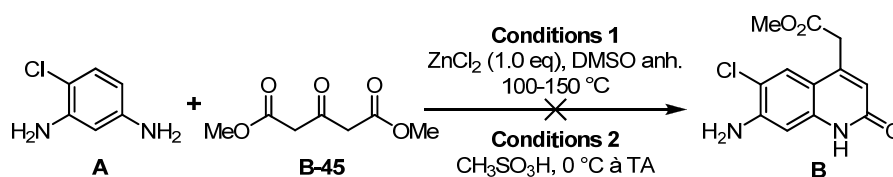


Schéma 52 : Tentatives infructueuses pour la synthèse de la quinolinone chlorée B-52.

3 SYNTHÈSE DES LIGANDS

3.1. INTRODUCTION DE L'ANTENNE SUR LE CYCLÈNE

Ce chemin synthétique consiste, dès la première étape, en une monosubstitution du cyclène par le chromophore, soit par un couplage peptidique si la fonction d'accroche de l'antenne est un acide carboxylique, soit par une réaction S_N2 dans le cas des coumarines bromo-acétamides.

En revanche, avant de nous diriger vers cette voie nous avons d'abord testé le couplage peptidique de la coumarine chlorée **G-45** (puisqu'il s'agit de la première coumarine qui a été synthétisée) sur un dérivé de cyclène trisubstitué, le DO3AM.Me₂ (Schéma 53). Cet ordre des réactions évite en effet une étape de purification en phase inverse par HPLC semi-préparative nécessaire si une monosubstitution du cyclène est d'abord réalisée. De surcroît, cette réaction nécessite un excès de cyclène, favorisant la formation du produit monosubstitué, qui ne peut pas être récupéré lors de la purification puisqu'il est majoritairement élué en mélange avec l'oxyde de phosphine trispyrrolidine.

Malheureusement ce couplage ne s'est pas montré concluant. Il est possible que le cyclène trisubstitué soit trop encombré pour favoriser l'attaque de l'atome d'azote du macrocycle sur le bromure d'acyle intermédiaire résultant de la réaction entre le réactif de couplage et l'acide carboxylique de la coumarine.

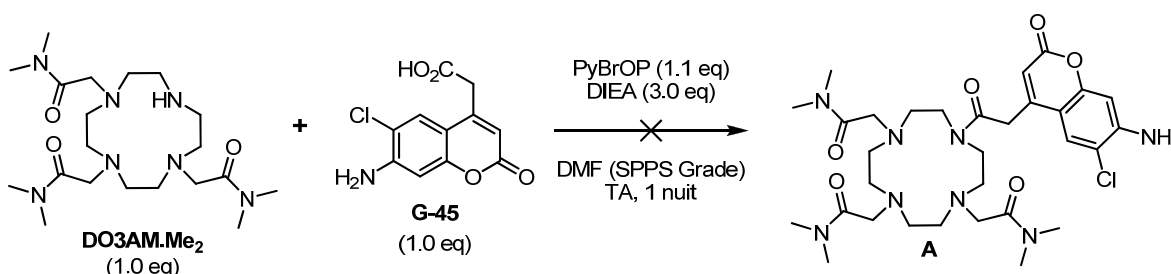


Schéma 53 : Tentative d'accrochage de la coumarine **G-45** sur le cyclène trisubstitué DO3AM.Me₂ par couplage peptidique avec le PyBROP.

En outre, la décarboxylation de la coumarine **G-45** (Schéma 54) semble extrêmement favorable en milieu basique dans un solvant polaire aprotique si bien que la formation de

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

l'amide s'avère totalement inhibée au profit de la réaction menant à la 7-amino-6-chloro-4-méthyl-coumarine **A-54**. Par contraste, ce produit de décarboxylation n'est pas observé lors de la saponification de l'ester méthylique **F-45** en présence de lithine dans un mélange d'acétone et d'eau (ce dernier pouvant stabiliser suffisamment le carboxylate pour empêcher son élimination).

La décarboxylation de la coumarine a été initialement observée lors de l'analyse par spectroscopie RMN dans le DMSO- d_6 . Cependant, lors de ce premier essai, le traitement aqueux permettant de faire précipiter **G-45** n'a été réalisé qu'à pH neutre. Par la suite, l'étape de purification a été entreprise à pH acide, empêchant la décarboxylation baso-catalysée en milieu polaire aprotique. Cet exemple illustre bien la sensibilité de la coumarine **G-45** face à cette réaction non désirée.

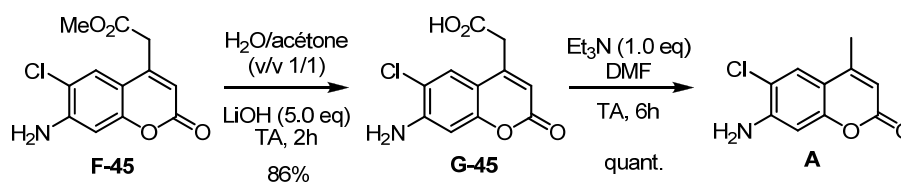


Schéma 54 : Formation de la coumarine décarboxylée A-54.

Le couplage peptidique sur le cyclène, et dans les mêmes conditions, n'a donc été mis en œuvre que suite à cet échec (Schéma 55). A noter qu'aucune base supplémentaire n'est ajoutée, le cyclène en excès jouant parfaitement ce rôle, et qu'afin d'obtenir des rendements corrects, nous avons dû utiliser un phosphonium pour l'activation de l'acide (PyBrOP).

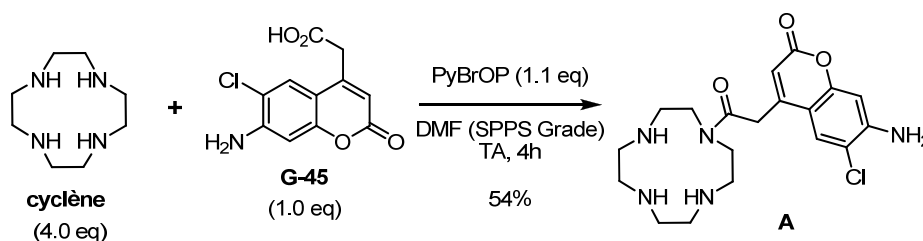


Schéma 55 : Monosubstitution réussie par couplage peptidique de la coumarine G-45.

Suite au succès de l'emploi du PyBrOP dans la formation du lien amide et par simple curiosité, le couple DCC/HOBt, formant un ester activé moins réactif que le bromure d'acyle issu du PyBrOP a été testé. Dans ce cas, la formation de l'ester activé, contrairement au bromure d'acyle, ne nécessite pas l'ajout d'une base pour initier la réaction. La réaction, acido-catalysée, procède très certainement selon un mécanisme concerté.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

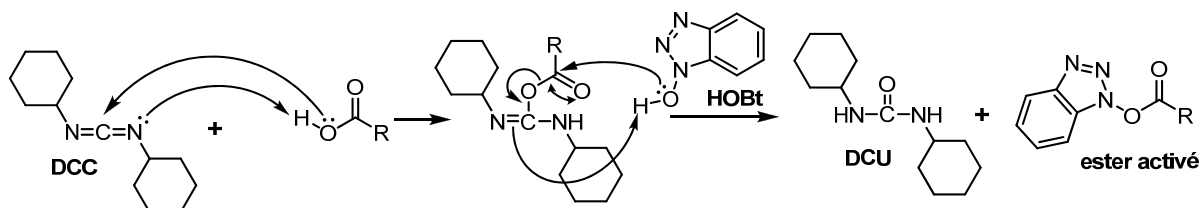


Schéma 56 : Réaction concertée entre un acide carboxylique et le DCC suivi du HOBT menant à l'ester activé.⁴⁰²

Ainsi après avoir laissé réagir la coumarine **G-45** avec le DCC et le HOBT pendant 1h pour former l'ester activé (qui n'a pas pu être détecté par analyse HPLC, probablement s'hydrolyse-t-il ; en revanche la coumarine décarboxylée ne s'est pas non plus formée) deux équivalents de cyclène sont rajoutés. Trois heures après, une décarboxylation totale est révélée par analyse HPLC.

En conclusion, le couplage de la coumarine **G-45** par un lien amide ne semble efficace que si d'une part, le cyclène n'est pas encombré, et d'autre part que si le réactif de couplage conduit à un intermédiaire coumarinique très réactif, limitant l'étape de décarboxylation.

La suite de la synthèse, présentée au Schéma 57, aboutissant au ligand **135** est classique et n'a posé aucune difficulté particulière. A noter que l'aniline en position 7 de la coumarine est nettement moins nucléophile que celle du lien amide du cyclène **E-38** monosubstitué par la benzophénone bromo-acétamide **B-37**. En effet, celle-ci génère, avec le même réactif (le bromoacétate de *tert*-butyle) et dans les mêmes conditions, le produit alkylé sur l'amide (**E-38-« suralkylé »**). Avec 3.3 équivalents de ce même α -bromo ester, l'alkylation sur l'amine aromatique n'est pas observée.

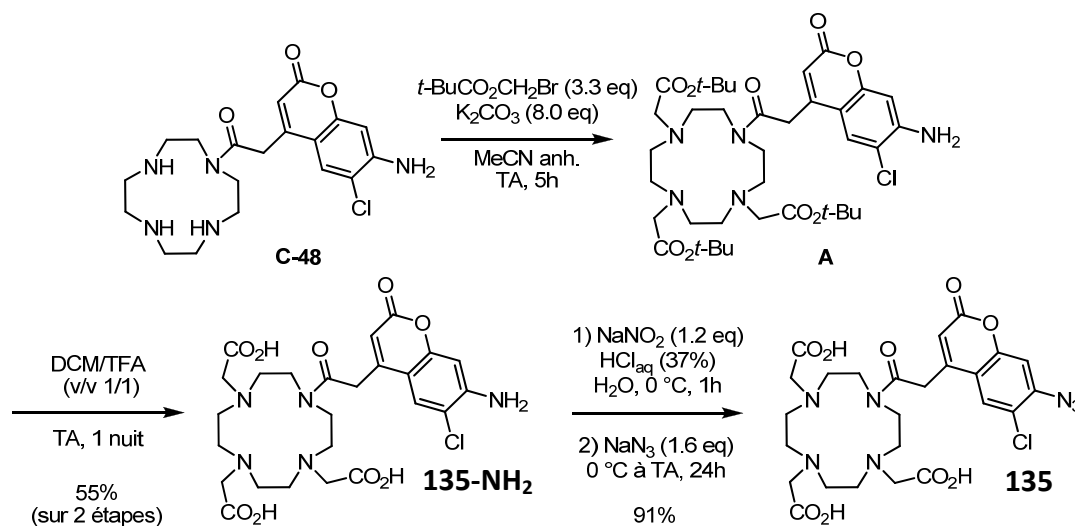


Schéma 57 : Chemin réactionnel classique menant au ligand **135**.

L'allure des spectres d'absorption entre 220 et 400 nm obtenue pendant l'analyse HPLC (dans un mélange TFA 0.1%/MeCN) est présentée à la Figure 121. Deux différences notables sont à remarquer : apparition franche d'une bande entre 280 et 310 nm en passant de la

⁴⁰² Seul un ester de HOBT est représenté mais ils sont au nombre de trois : J. Coste and J.-M. Campagne, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 4253-4256.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

fonction 7-amino à 7-azido accompagnée d'un effet hypsochrome. Son origine doit être liée au caractère donneur moins prononcé de l'azido impliquant un transfert de charge plus faible, d'où une absorption déplacée vers les longueurs d'onde plus énergétiques (355 nm contre 335-340 nm pour l'azoture).

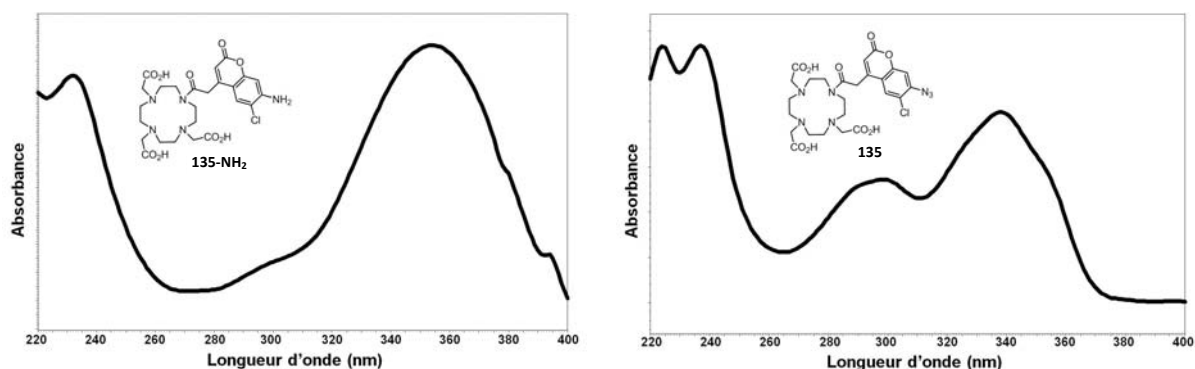


Figure 121 : Spectres d'absorption UV, enregistrés lors des analyses HPLC (éluant TFA 0.1%/MeCN), du ligand 135-NH₂ comportant une antenne 7-aminocoumarine non-photoréactive et celui du ligand 135 substitué par un chromophore photoréactif 7-azidocoumarine (concentration de l'échantillon injectée pour chaque analyse : $\approx 0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Quant à l'incorporation des coumarines comportant le motif bromo-acétamide sur le cyclène, elle a d'abord été envisagée selon la procédure développée par Massue *et al.*^{369d} et appliquée avec succès à l'insertion de la 4-(bromo-acétamidyl)-benzophénone **B-37** sur le cyclène. Un premier essai entre la coumarine **A-58**⁴⁰³ et le cyclène a, comme attendu, donné le produit souhaité (Schéma 58).

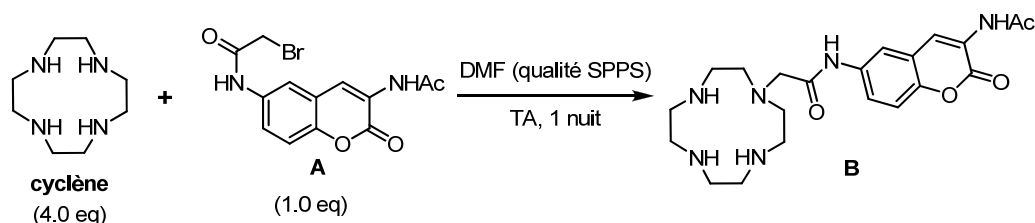


Schéma 58 : Monosubstitution de la 6-bromo-acétamide-3-N-acétyl-coumarine sur le cyclène.

En revanche le traitement aqueux basique permettant d'éliminer totalement le cyclène en excès et de ne récupérer en phase organique que le produit monosubstitué a été un échec : celui-ci restant exclusivement en phase aqueuse. Evidemment, le composé peut être purifié par HPLC semi-préparative, ce qui a d'ailleurs été mis en œuvre au début. Cependant, le gain de temps apporté par ce mode opératoire (même s'il nécessite un excès de cyclène, sa récupération, à notre échelle, n'a même pas été envisagée) s'avère, avec ces coumarines, entièrement contrebalancé par les contraintes liées à la purification HPLC.

⁴⁰³ Synthèse analogue à la coumarine **E-49** sans l'étape de formation du carbamate en position 3. Cependant l'acétyle ne peut pas être déprotégé sans que le lien amide ne se rompe.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

Nous nous sommes alors redirigés vers l'insertion de l'antenne sur un cyclène trisubstitué, le DO3At-Bu, qui est plus réactif vis-à-vis de ces électrophiles activés que face au bromure d'acyle généré lors du couplage peptidique avec le PyBrOP (Schéma 53).

3.2. INTRODUCTION DE L'ANTENNE SUR LE DO3At-Bu

Suite au faible rendement obtenu en DO3At-Bu.HCl, 21%, selon la procédure de Wong *et al.*^{377a} qui annonçait un rendement de 77% (probablement lié à la purification chromatographique sur gel d'alumine « pas totalement maîtrisée »), lors de la synthèse des ligands comportant une benzophénone, nous avons choisi de nous reporter sur une autre synthèse décrite aussi dans la littérature. Cette dernière, récemment détaillée par Jagadish *et al.*,^{377d} se rapproche du mode opératoire développé par GE Healthcare^{377b} pour l'obtention du DO3At-Bu.HBr, à la différence que l'ajout de l'électrophile s'opère à une température plus basse (-20 °C contre 0 °C) et en léger excès (3.3 équivalents contre 3.0 équivalents). Le temps de la réaction est alors réduit de cinq jours à une nuit (selon un autre protocole similaire, décrit par Moore,^{377c} dont la température du milieu réactionnel pendant l'ajout est maintenue inférieure à 25 °C, si le temps de réaction est inférieure à 48h au lieu de 60h une baisse de 10 à 15% de rendement est observée ; pourtant leur milieu réactionnel est plus concentré (40 mL contre 60 mL de DMAc pour 5 g de cyclène)). Enfin, l'avantage de cette méthode est qu'elle conduit de manière fiable au DO3At-Bu, évidemment plus nucléophile que son sel.

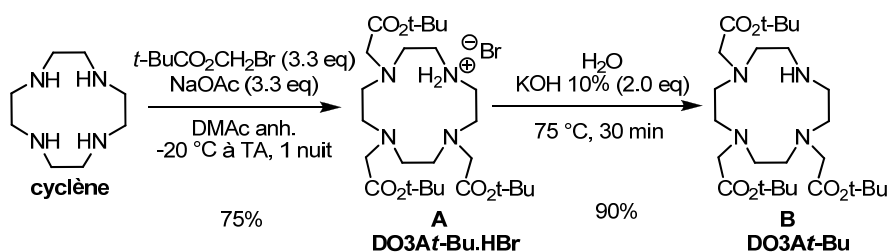


Schéma 59 : Synthèse du DO3At-Bu à partir du cyclène par la procédure développée par Jagadish *et al.*^{377d} Selon l'article, sur une échelle de 5 g en cyclène, un rendement de 75% (79% pour la trialkylation et 95% pour la neutralisation du bromhydrate) est obtenu. Quant à nous, et sur une échelle moindre de 0.7 g, un rendement légèrement plus faible de 68% est atteint.

L'introduction sur le dernier atome d'azote du DO3At-Bu des deux coumarines bromo-acétamides **G-49** et **E-50** est simplement réalisée dans le DMF en présence de K₂CO₃ à température ambiante. Le produit tétraalkylé n'est alors pas purifié sur colonne chromatographique. Après un simple traitement aqueux et une extraction de la suspension avec l'acétate d'éthyle le produit est engagé dans l'étape de déprotection en milieu acide des esters *tert*-butyliques et du groupement Boc. Dans les deux cas, le produit est alors soumis à une purification en phase inverse par HPLC semi-préparative. Les rendements sur

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

les deux étapes sont proches de 75% (en supposant qu'il y ait deux molécules de TFA par molécule ligand).⁴⁰⁴

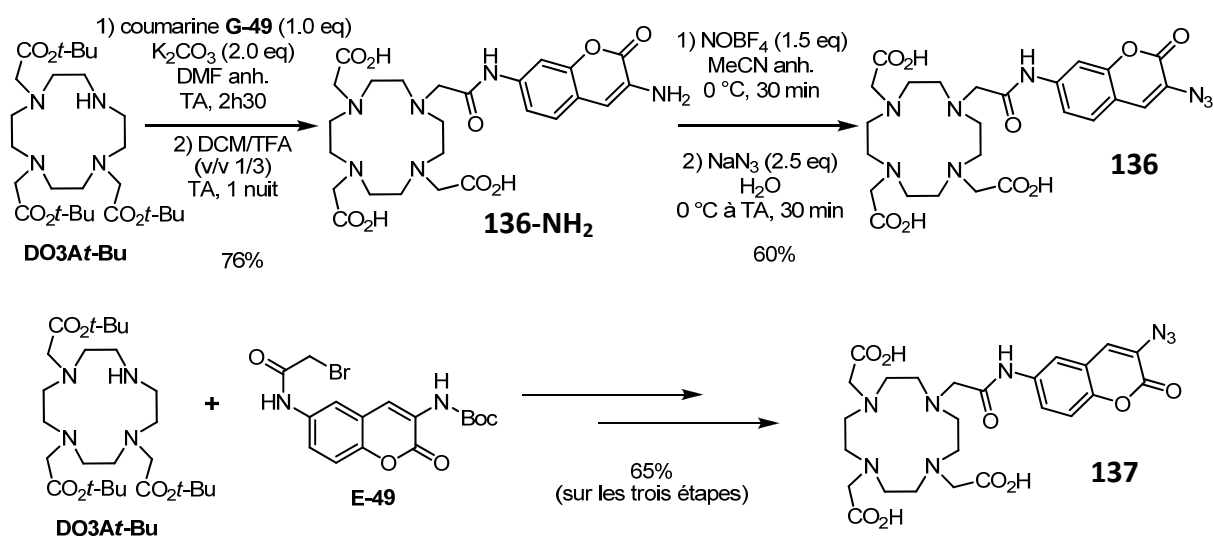


Schéma 60 : Séquence réactionnelle donnant accès aux ligands possédant une 3-azidocoumarine. Les conditions opératoires menant à 137 sont identiques à celles mises en œuvre pour 136.

Le seul point délicat de la synthèse a été la formation, à partir de l'aniline, du groupement azido. La méthode classique appliquée aux 7-aminocoumarines et utilisant le nitrite de sodium dans l'acide chlorhydrique aqueux pour former *in situ* le cation nitrosonium se condensant sur l'amine pour former le sel de diazonium s'est avérée peu concluante.

Quelques synthèses de 3-azidocoumarines sont néanmoins rapportées dans la littérature, en particulier par le groupe de Wang.³⁹⁰ En revanche le mode opératoire reste similaire par rapport aux 7-aminocoumarines si ce n'est qu'avant l'introduction de l'azote de sodium, de l'acétate de sodium est ajouté afin de maintenir le pH vers 4 probablement afin d'éviter la formation de HN₃ en milieu acide (cette procédure n'est pourtant pas systématiquement appliquée). Ce mode opératoire a cependant été mis en œuvre mais ne s'est pas montré franchement plus efficace. Un moyen simple de limiter la dégradation du sel de diazonium est de laisser réagir moins de quinze minutes le cation nitrosonium avec la 3-aminocoumarine. Cependant, les essais manquent de reproductibilité et dans le meilleur des cas la teneur du brut en produit final, d'après l'analyse HPLC ne s'élève pas à plus de 40-50%. Finalement un autre réactif s'est révélé beaucoup plus efficace : le tétrafluoroborate de nitrosonium (NOBF₄). Bien que ce composé soit très largement utilisé dans la synthèse de

⁴⁰⁴ Il est difficile de déterminer précisément cette valeur en analyse élémentaire, d'autant que ces sels sont hygroscopiques. Enfin cela nous renseignerait seulement sur les rendements exacts des réactions (à condition que l'analyse élémentaire soit aussi exacte) ce qui n'est pas vraiment le but recherché ; l'important étant d'obtenir les ligands et les chélates les plus purs possibles. Qu'ils contiennent ou non deux ou trois molécules de TFA n'est pas gênant, d'autant que les chélates seront amenés à être étudiés dans des tampons aqueux. Le seul inconvénient est qu'il est impossible de calculer précisément le coefficient d'absorption des ligands et des chélates. La méthode des ajouts dosés ne pouvant pas permettre de déterminer la concentration puisque l'antenne n'intervient pas « autant » que les antennes de type terpyridine dans la chélation du métal : la variation du spectre d'absorption entre le ligand et le chélate demeure minime.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

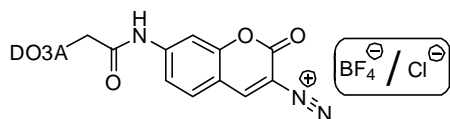


Figure 122 : Sels de diazonium intermédiaires.

colorants diazoïques ou même dans celle d'azotures d'aryle ou d'acyle à partir du motif hydrazine,⁴⁰⁵ à notre connaissance, un seul exemple d'utilisation de ce réactif est rapporté pour la formation d'un azoture (de bromopyridine) à partir du produit aminé correspondant.⁴⁰⁶ Ainsi, dans notre cas, le cation 3-diazoniocoumarine portant un contre-ion tétrafluoroborate (Figure 122) s'est montré suffisamment stable même dans les conditions d'élution acide de la HPLC analytique, son profil étant « monopic ». A l'inverse, les 7-diazoniocoumarines disposant d'un contre-ion chlorure ne sont pas détectées en HPLC. Les ligands **136** et **137** ont été récupérés suite à une purification par HPLC semi-préparative. En revanche, seul le composé **137** a été analysé en spectroscopie RMN. En effet, celle-ci a révélé une faible stabilité de l'azoture en milieu aqueux basique (de la soude deutérée ayant dû être rajoutée pour solubiliser le ligand). La pureté de ces deux produits a seulement été déterminée par HPLC analytique et elle est supérieure à 90% (pour **137** : 94% puis 88% après l'expérience RMN). Enfin, l'analyse par spectrométrie de masse après purification confirme la présence de l'azoture dans les deux cas.

Les spectres d'absorption des ligands 3-amino et 3-azido sont rapportés à la figure suivante. Dans le cas où l'accrochage du motif chélatant s'effectue par la position 6 du cœur coumarinique (ligands **137-NH₂** et **137**) le passage à l'azoture provoque un déplacement hypsochrome de la bande de plus basse énergie confirmant un transfert de charge moins puissant. A l'inverse, si la fonction amide est localisée en C7 (ligands **136-NH₂** et **136**), la formation de l'azoture induit un léger effet bathochrome de la bande de plus basse énergie (340 nm à 345-350 nm) comme si l'aniline en position 3 et l'amide en 7 agissaient de manière opposée au transfert de charge.

Enfin, la transformation de l'aniline en azoture modifie nettement l'allure de la courbe d'absorbance seulement si l'amide est en C6. Cette dernière position semble donc jouer un rôle *a priori* mineur, ou moins important que la position C3 lorsque celle-ci est substituée par une fonction amine ou azoture, sur les probabilités et les niveaux des transitions électroniques.

⁴⁰⁵ V. Pozsgay and H. J. Jennings, *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28, 5091-5092.

⁴⁰⁶ V. Stockmann and A. Fiksdahl, *Tetrahedron*, **2008**, 64, 7626-7632.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

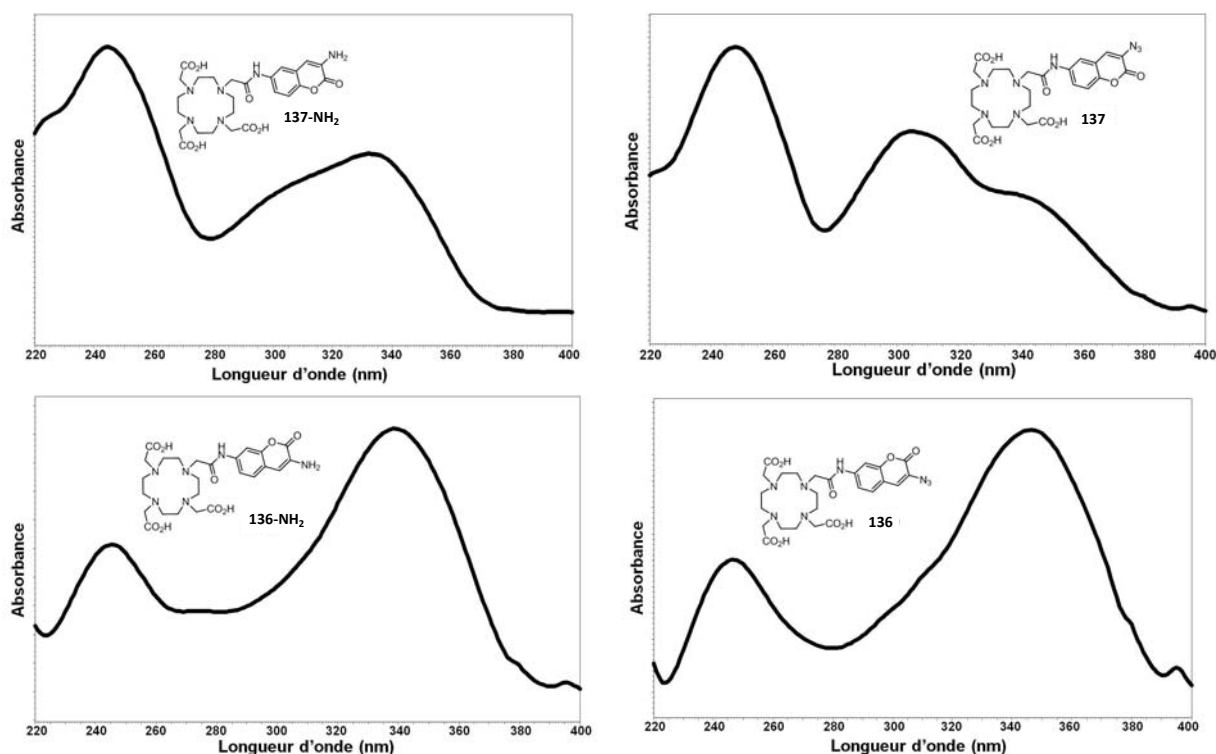


Figure 123 : Spectres d'absorption UV des ligands comportant une antenne 3-aminocoumarine non photoréactive et ceux des ligands substitué par un chromophore photoréactif 3-azidocoumarine. Ils ont été obtenus lors de l'analyse HPLC dans un éluant TFA 0.1%/MeCN (concentration de l'échantillon injectée pour chaque analyse : $\approx 0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

3.3. INTRODUCTION DE L'ANTENNE SUR LE DO3At-Bu aminoéthyle

Le dérivé 4-acide acétique coumarine **G-45** et l'analogue acide acétique **C-51** du cs124 peuvent aussi être couplés par l'intermédiaire de l'amine primaire du 2-(aminoéthyl)-DO3At-Bu **B-61**, composé obtenu à partir de DO3At-Bu et du bromoacétonitrile selon un protocole décrit dans la littérature (Schéma 61).⁴⁰⁷

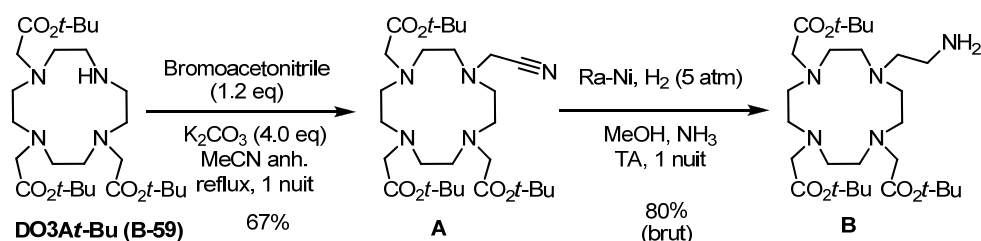


Schéma 61 : Synthèse du 2-(aminoéthyl)-DO3At-Bu.

Le composé tétraalkylé **A-61** est récupéré avec un rendement de 67% après purification par colonne chromatographique sur gel de silice en éluant avec du dichlorométhane et du méthanol. La réduction du nitrile s'effectue sous cinq atmosphères d'hydrogène *via* une

⁴⁰⁷ A. Mishra, P. Fouskova, G. Angelovski, E. Balogh, A. K. Mishra, N. K. Logothetis and E. Toth, *Inorg. Chem.*, **2008**, 47, 1370-1381.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

catalyse par le nickel de Raney dans le méthanol. Le solvant est saturé en ammoniac afin d'empêcher la formation de l'amine secondaire. En effet l'imine intermédiaire (RCH=NH) peut réagir sur l'amine primaire pour former le composé de transimination (RCH₂-NH=CHR) qui après réduction conduit à l'amine secondaire non-désirée. L'ammoniac a donc pour rôle de déplacer l'équilibre de cette réaction secondaire vers l'imine intermédiaire RCH=NH. Le produit réduit souhaité est ensuite obtenu par simple filtration et est engagé sans purification supplémentaire dans l'étape de couplage avec l'antenne.

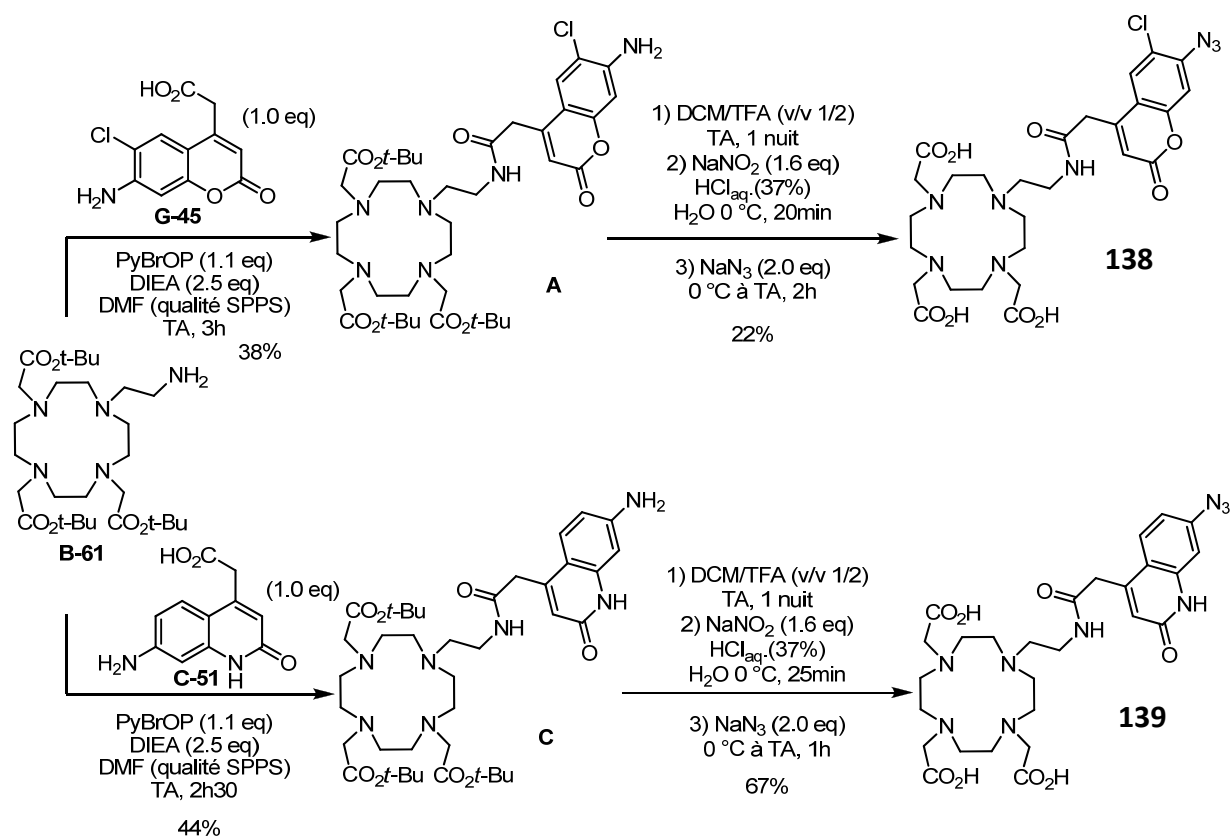


Schéma 62 : Voies de synthèse des ligands incorporant indirectement sur le DO3A la coumarine ou le cs124 7-azido.

La synthèse mise en œuvre pour atteindre ces ligands suit un enchaînement classique de réactions : couplage peptidique par l'intermédiaire du PyBrOP avec, après purification chromatographique sur gel de silice, un rendement modeste (le brut **B-61** doit contenir une proportion en impuretés non négligeable (peut-être des résidus du catalyseur, car les spectres ¹H et ¹³C n'indiquent pas la présence notable de produits secondaires) ; enfin, la déprotection des esters *tert*-butyliques suivie de la formation du sel de diazonium et de sa substitution par l'azoture de sodium conduit aux ligands souhaités **138** et **139** avec des rendements très variables de 22% à 67% sur cette dernière séquence. Le faible rendement de 22% peut être attribué au degré de pureté médiocre de **A-62** : la fraction contenant le produit est obtenue avec un rendement de 38% (alors que l'analyse HPLC a révélé une conversion complète) qui de surcroît comprend une part importante de DMF. Cette réaction

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

n'a pu être reproduite faute de temps pour synthétiser à nouveau les réactifs. Seuls les produits **138** et **139** ont été purifiés en phase inverse par HPLC semi-préparative.

Les spectres d'absorption des ligands substitués par le motif cs124 sont présentés à la figure suivante. Quant à ceux des ligands **138-NH₂** et **138** ils sont identiques aux composés **135-NH₂** et **135** contenant les mêmes antennes (*cf.* Figure 121).

D'après ces spectres, la transformation de l'aniline en azido conduit à un effet bathochrome seulement de la bande de « moyenne énergie » (260-280 nm à 280-300 nm). L'intensité du transfert de charge induit par une aniline ou un azido en position 7, si seule la position 4 est substituée par un méthylène, demeure presque inchangée. En effet, la bande de plus faible énergie ne subit pas un effet hypsochrome notable entre l'antenne 7-amino et 7-azido (le chromophore 7-amino montre cependant une faible absorbance à 370 nm alors que cette dernière est nulle pour le composé 7-azido). De plus, la formation de l'azido a structuré la large bande de plus faible énergie en deux plus étroites (l'allure du spectre est alors similaire aux ligands dont la partie chélatante est greffé par un lien amide en cette même position : ligands **45** et **47** par exemple (Figure 35, chapitre 1)).

En règle générale, les spectres d'absorption et d'émission de ces chromophores sont moins sensibles à la substitution du cœur aromatique que dans le cas des coumarines.⁴⁰⁸

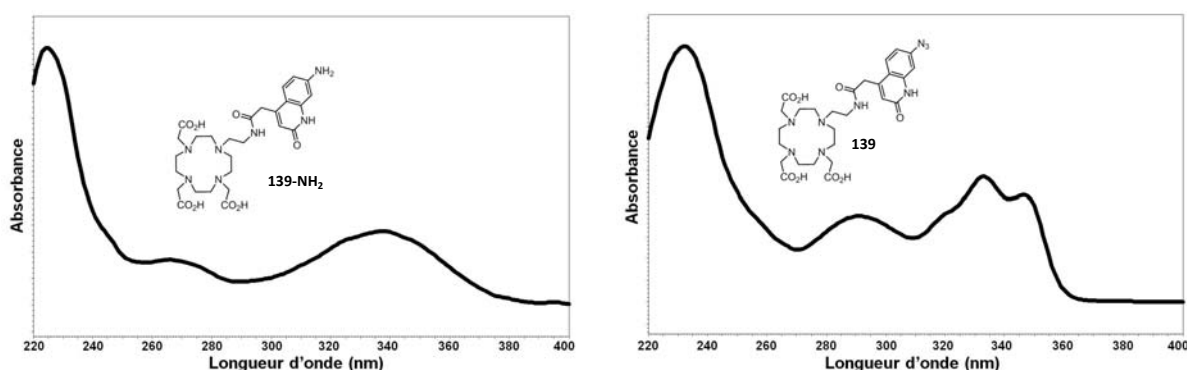


Figure 124 : Spectres d'absorption UV du ligand comportant une antenne de type cs124 non photoréactive et du ligand possédant une antenne photoréactive 7-azido-cs124. Ils ont été obtenus lors de l'analyse HPLC dans un éluant TFA 0.1%/MeCN (concentration de l'échantillon injectée pour chaque analyse : $\approx 0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

4 COMPLEXATION DES LIGANDS AVEC LE TERBIUM ET L'EUROPIUM

Les chélates d'euprium et de terbium de chacun des ligands (azido et précurseur amino) ont été synthétisés. Malheureusement, dans les conditions opératoires testées, les chélates Ln-**135-NH₂**, dont l'antenne est directement greffée sur le dernier azote du DO3A par un lien amide n'ont pu être obtenus (Schéma 63). A noter que dans les conditions 1, si le pH devient inférieur à 5, un précipité se forme : il s'agit du ligand, mais s'il n'est pas purifié, l'analyse par

⁴⁰⁸ W. M. F. Fabian, K. S. Niederreiter, G. Uray and W. Stadlbauer, *J. Mol. Struct.*, **1999**, 477, 209-220.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

spectrométrie de masse indique seulement l'adduit ligand-lanthanide ou le chélate qui se formerait alors dans la chambre d'ionisation.

C'est en fait suite à cet échec que nous nous sommes attelés à la synthèse de ligands dont le chromophore n'est pas accroché par un amide sur l'azamacrocycle mais par un acétamide ou un éthylamide.

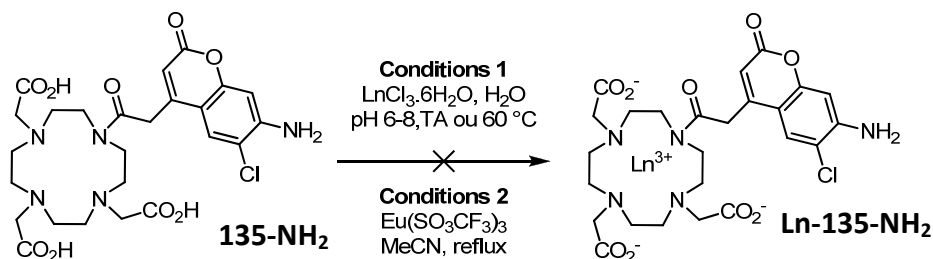
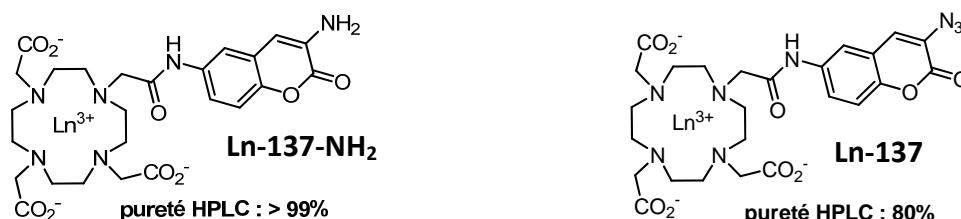


Schéma 63 : Tentative de formation des chélates Ln-135-NH₂.

Tous les autres chélates se sont formés en appliquant les conditions 1 (température ambiante) du Schéma 63. Il est préférable, suites aux déboires rencontrés précédemment, de suivre la réaction par HPLC analytique (AcOH 0.01% et MeCN comme phase mobile) et non par spectrométrie de masse. Les complexes sont ensuite tous purifiés en phase inverse par HPLC semi-préparative avec un éluant composé d'acétonitrile et d'une phase aqueuse contenant 0.01% d'acide acétique. Les rendements de cette dernière étape ne sont pas mentionnés puisque d'une part, elle s'effectue à faible échelle et que d'autre part, la quantité de matière en ligand n'est pas précisément connue, s'agissant d'un sel hygroscopique de TFA. En revanche, après purification, des quantités amplement suffisantes pour les mesures spectrales ciblées, de l'ordre du mg à la dizaine de mg sont récupérées.

Cependant, selon les chromatogrammes obtenus lors de l'analyse HPLC, les spectres d'absorption ne sont pas sensiblement modifiés suite à la complexation, ce qui indiquerait que les antennes n'interagissent pas avec le cation métallique.

Enfin, il est probable que les coumarines portant l'azoture en position 3 souffrent d'une légère instabilité car le degré de pureté (obtenu par HPLC analytique) des chélates correspondant oscillent entre 64 et 80% alors que leurs analogues, d'une part 3-amino et d'autre part 7-azido (coumarine et cs124) possèdent des valeurs voisines de 90% (Figure 125 et Figure 126).



Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.



Figure 125 : Degrés de pureté des chélates 3-amino et 3-azido.

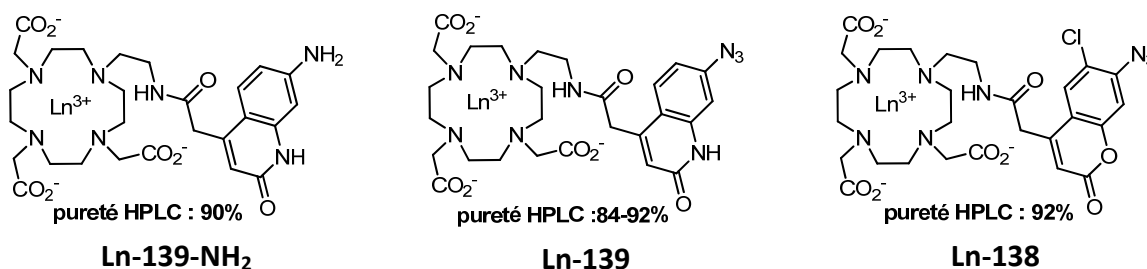


Figure 126 : Degrés de pureté des chélates 7-amino et 7-azido (le composé Ln-138-NH₂ n'a pas été synthétisé faute de produit en quantité suffisante).

Si le motif azido se montre légèrement instable dans les conditions de formation du chélate, il pourrait être envisagé de n'introduire cette fonction qu'une fois le lanthanide inséré dans le macrocycle azoté. Dans le cas des chélates instables en milieu acide, comme ceux incorporant les bras carboxylates, l'emploi du réactif NOBF₄ serait une alternative crédible puisqu'il ne nécessite pas de condition acide.

V. PROPRIETES PHOTOPHYSIQUES

1 DES CHELATES SENSIBILISES PAR UNE ANTENNE BENZOPHENONE

1.1. SPECTRES D'EMISSION

La différence majeure entre ces différents spectres d'émission représentés à la Figure 127 réside dans l'intensité relative des transitions $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ et $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ dont le rapport traduit le degré de symétrie de la sphère de coordination. Une faible symétrie conduit à une augmentation de l'intensité de la transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$, dite hypersensible, alors que celle conduisant au niveau 7F_1 y est faiblement dépendante (cf. § III-2, chapitre 1).⁷⁵ Ainsi, les chélates synthétisés présentant un site de coordination sur chaque atome d'azote du macrocycle possèdent une plus haute symétrie du centre lanthanidique que ceux ne disposant que de trois fonctions complexantes (**Eu-115/116/114**).

L'intensité de la transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_4$ varie aussi fortement selon l'environnement du cation lanthanide. Dans notre cas, l'intensité s'avère toujours sensiblement égale à celle de la transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$; en revanche, son allure se trouve parfois modifiée : l'intensité relative des pics du doublet (≈ 688 nm et ≈ 700 nm) est changeante.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

Enfin, contrairement aux chélates à structure terpyridine ou bis-pyridinylpyrazine chélatant aussi le cation par un motif acide iminodiacétique (Figure 76, chapitre 2), la transition non dégénérée $^5D_0 \rightarrow ^7F_0$ (579-580 nm) est, pour tous les chélates suivants, bien distincte de la transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$.

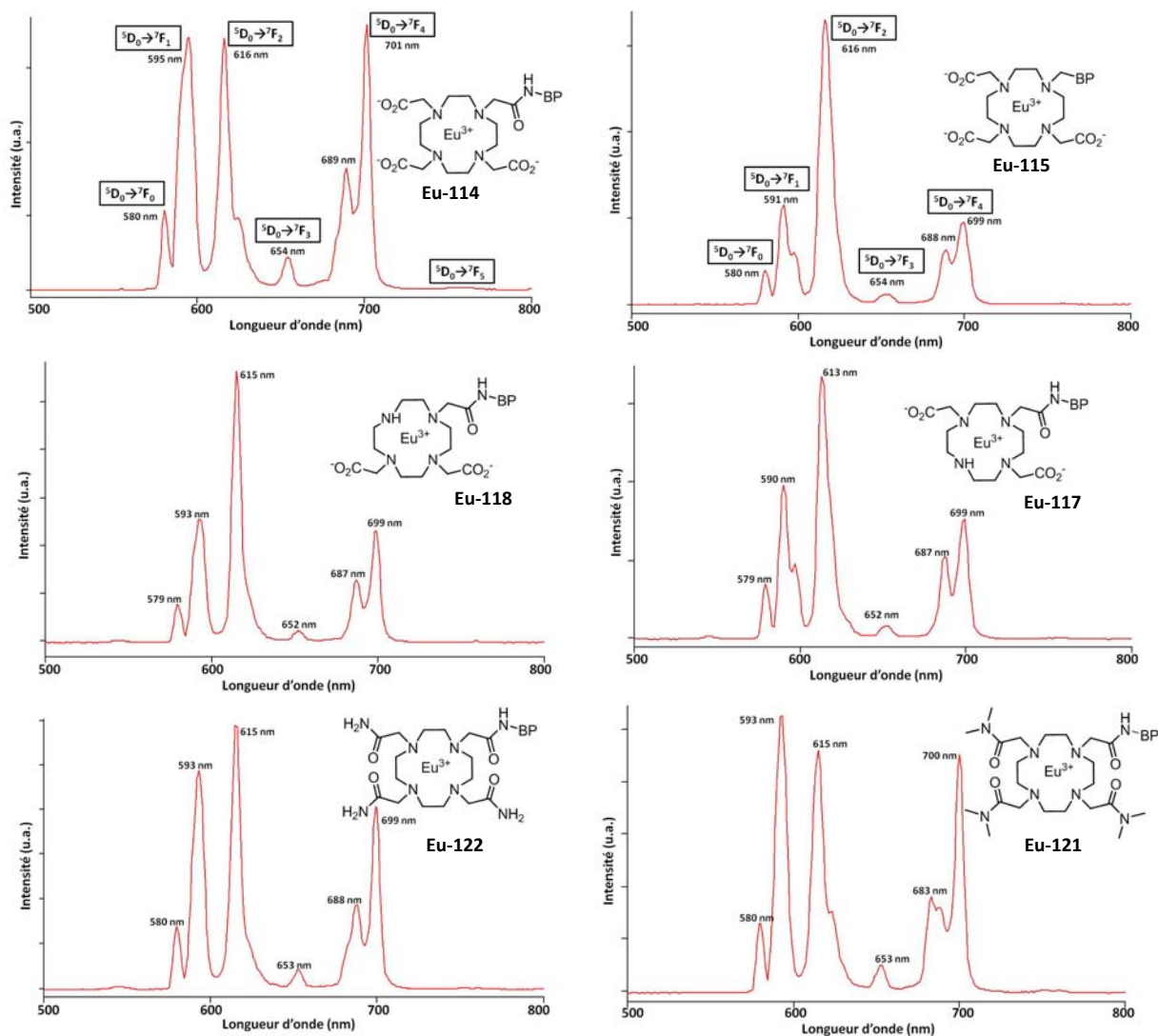


Figure 127 : Spectres d'émission des chélates d'euprium sensibilisés par une antenne benzophénone (concentration non déterminée ($Abs(\lambda_{max}) < 0.1$), eau ultrapure, $\lambda_{exc} = 290$ nm, 25 °C) ; BP : benzophénone. Le spectre de Eu-116 est similaire à celui de Eu-115 et n'est donc pas présenté ici. L'enregistrement des spectres a été effectué en mode phosphorescence, avec les paramètres suivants : delay time 0.1 ms, gate time 3 ms et total decay time 10 ms.

L'allure des spectres d'émission des chélates de terbium est moins dépendante de la géométrie imposée par la structure complexante du cation métallique. L'intensité de la bande la plus forte, liée à la transition $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$, est la plus sensible aux variations de la géométrie. Seuls deux spectres sont présentés à la figure suivante ; ils correspondent à la plus grande variation observée du rapport d'intensité entre les bandes des transitions $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$ et $^5D_4 \rightarrow ^7F_6$.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

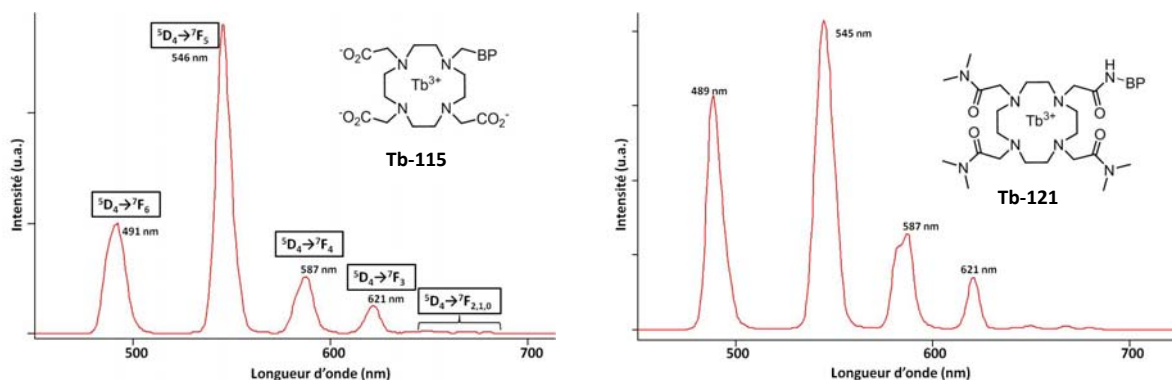


Figure 128 : Spectres d'émission des chélates Tb-115 et Tb-121 mesurés dans des conditions similaires et avec les mêmes paramètres d'enregistrement que ceux représentés à la Figure 127.

1.2. CALCUL DU NOMBRE DE MOLECULES D'EAU COORDINEES AU METAL

La détermination de cette valeur a été réalisée par la mesure des durées d'émission de la transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$, pour les chélates d'euprium, et de la transition $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$, pour les chélates de terbium dans l'eau ultrapure puis dans l'eau deutérée, à 25 °C et pour une concentration de l'ordre de 10 μ M. Les valeurs de q sont rassemblées dans les tableaux 16 et 17.

Les deux formules appliquées, respectivement pour l'euprium et le terbium (en effet, l'eau n'inhibe pas la luminescence de ces deux lanthanides avec la même efficacité), sont celles qui ont été développées par Beeby *et al.*,⁴⁰⁹ spécifiquement pour des chélates possédant une structure complexante fondée sur le cyclène substitué par des bras carboxylates ou carboxamides.

$$q_{H_2O}(Eu^{3+}) = 1.2 \times \left(\frac{1}{\tau_{H_2O}} - \frac{1}{\tau_{D_2O}} - 0.25 - n^{CONHR} \right); \quad q_{H_2O}(Tb^{3+}) = 5.0 \times \left(\frac{1}{\tau_{H_2O}} - \frac{1}{\tau_{D_2O}} - 0.06 \right).$$

n^{CONHR} se réfère au nombre de vibrateurs NH d'un lien amide situés proche du métal (typiquement des amides impliqués dans la chélation). Ce type d'oscillateur ne désactive pas aussi efficacement le terbium pour qu'il soit pris en compte dans son calcul de q .

A noter que deux chélates contiennent une amine secondaire (**Ln-117** et **Ln-118**) coordonnée au lanthanide qui désactive fortement la luminescence (*cf.* τ de ces chélates par rapport à ceux de **Ln-114**, Tableau 16 et Tableau 17). Cette puissante extinction peut être attribuée à la distance plus courte qui sépare cet oscillateur des vibrateurs O-H des molécules d'eau de la sphère interne, dont l'énergie de leur phonon est plus apte à éteindre la luminescence (*cf.* § II-7-4, chapitre 1). En revanche, soit la vitesse d'échange H/D est lente par rapport à l'émission ou bien elle ne se produit simplement pas car la durée d'émission dans l'eau

⁴⁰⁹ A. Beeby, I. M. Clarkson, R. S. Dickins, S. Faulkner, D. Parker, L. Royle, A. S. de Sousa, J. A. Gareth Williams and M. Woods, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1999**, 493-504.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

lourde s'avère aussi très courte. C'est pourquoi la désactivation liée à ce vibreur n'est pas insérée dans les formules ci-dessus. D'ailleurs, si elle était intégrée au calcul (facteur correctif de -1.2 ms^{-1}),⁴⁰⁹ une valeur de 0.6 pour **Eu-117** serait trouvée, ce qui est sans nul doute erroné puisque même **Eu-114**, qui dispose d'une fonction complexante supplémentaire ne possède pas une valeur aussi basse.

Enfin, concernant le chélate acétamide **Eu-122** disposant de trois fonctions amides primaires, la propension des trois dernières liaisons à inhiber la luminescence est arbitrairement atténuée de 50%.⁴⁰⁹ La raison de cette baisse provient du fait que le deuxième lien N-H n'est pas situé à la même distance que le premier.

Comme attendu, les ligands expulsant le plus efficacement les molécules d'eau sont ceux comportant huit sites de complexation.

1.3. ETUDE DES EFFETS DE TAMPON SUR LA LUMINESCENCE

Le rendement quantique ainsi que la durée d'émission de la bande principale, centrée à 615 (pour la majorité des chélates synthétisés) et 545 nm pour, respectivement, l'euprimum et le terbium, des différents chélates ont été déterminés dans différents tampons aqueux à des pH oscillant entre 5.1 et 7.5. En effet, la luminescence du lanthanide peut être plus ou moins affectée selon la nature chimique du tampon. En revanche, sa propension à désactiver ou exalter l'émission lumineuse du cation n'est pas toujours prévisible. Dans un premier temps nous nous sommes donc intéressés à mesurer le rendement quantique des chélates dans différentes phases aqueuses tamponnées. L'objectif serait d'utiliser un tampon qui, par rapport à l'eau ultrapure, inhibe partiellement la luminescence déjà affaiblie par la présence d'une ou deux molécules d'eau dans la sphère de coordination du cation métallique f. Ainsi, en espérant que l'interaction de l'étiquette peptidique pour le lanthanide soit plus forte que

celle avec les molécules d'eau et les molécules organiques du tampon, l'augmentation de luminescence serait d'autant plus marquée.

Les rendements quantiques ont été déterminés à 25 °C par la méthode comparative qui est détaillée au chapitre 2 (cf. § II-3-1). Le standard utilisé est le complexe de ruthénium $\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2$ (2.8% dans l'eau ultrapure). Ce dernier, ainsi que les chélates, sont dilués afin que leur densité optique à la longueur d'onde d'excitation (290 nm) soit inférieure à 0.1 unité d'absorbance. La mesure du temps d'émission des complexes est effectuée dans une solution diluée à, approximativement, 10 μM en espèce luminescente.

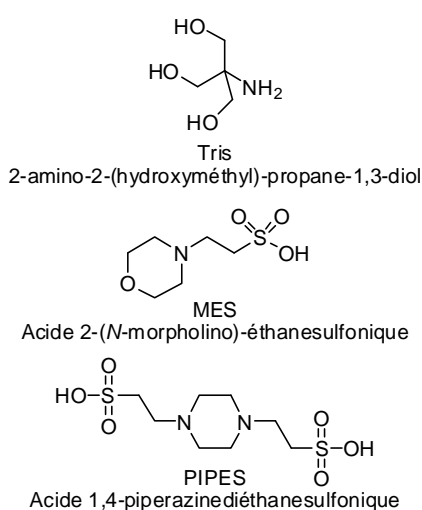


Figure 129 : Structure chimique des tampons Tris, MES et PIPES.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

Ces données sont résumées dans les deux tableaux 16 et 17. Les structures des molécules organiques des différents tampons utilisés sont présentées dans la Figure 129.

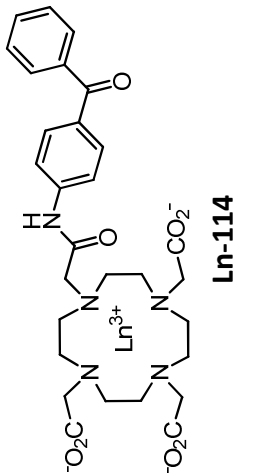
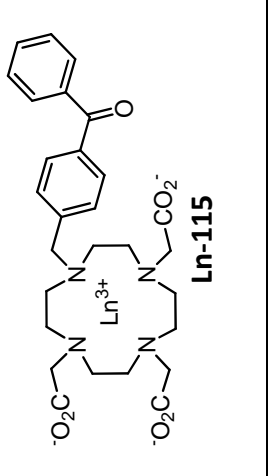
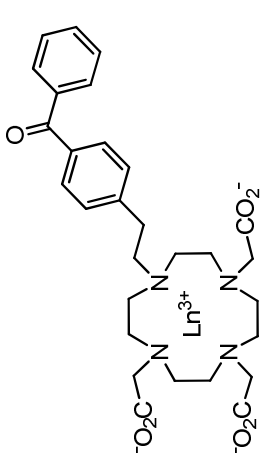
	Ln	q	Φ (%) τ (ms)			
			Eau ultrapure	Tris-HCl 50 mM, pH 7.5	PIPES-NaOH, NaCl 100 mM, 50 mM, pH 7.1	AcONa-AcOH, 20 mM, NaCl 100 mM, pH 5.1
 <p style="text-align: center;">Ln-114</p>	Eu ³⁺	1.0	6.6 0.62	6.8 0.63	5.7 -	6.2 0.62
	Tb ³⁺	0.4	57 1.81	1.3 0.08	9.7 -	48 1.79
 <p style="text-align: center;">Ln-115</p>	Eu ³⁺	2.0	4.3 0.40	4.3 0.49	0.5 -	14 0.89
	Tb ³⁺	1.5	14 1.39	14 1.53	3.8 -	32 2.16
 <p style="text-align: center;">Ln-116</p>	Eu ³⁺	2.0	1.9 0.40	2.5 0.45	0.6 0.40	10 0.89

Tableau 16 : Rendements quantiques, durées d'émission (à 545 nm pour le terbium et 615 nm pour l'europlum) et nombre de molécules d'eau, q, coordonnées au métal (valeurs déterminées selon la formule développée par Beeby *et al.*)⁴⁰⁹ des chélates non chargés dans différentes solutions aqueuses.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

Ln	q	Φ (%) τ (ms)				
		Eau ultra-pure	Tris-HCl 50 mM, pH 7.5	MES-NaOH, 20 mM, NaCl 100 mM, pH 6.5	PIPES-NaOH, 50 mM, NaCl 100 mM pH 7.1	AcONa-AcOH, 20 mM, NaCl 100 mM, pH 5.1
 Ln-118	2.0	3.0 0.28	3.4 0.30	2.9 0.28	3.0 0.28	4.4 0.31
	2.1	40 1.16	1.1 0.10	25 0.78	10 0.35	51 1.38
 Ln-117	2.0	2.9 0.28	3.2 0.29	2.9 0.28	3.1 0.28	3.6 0.30
	2.0	41 1.17	0.6 0.09	28 0.83	13 0.39	48 1.26
 Ln-122	0.9	3.9 0.53	1.4 0.24	3.6 0.52	3.1 0.45	4.1 0.54
	1.5	51 1.31	0.1 0.02	17 0.54	3.6 0.16	53 1.43
 Ln-121	0.9	5.2 0.62	3.1 0.39	5.2 0.62	5.1 0.58	5.7 0.62
	1.0	53 1.51	-	21 0.61	4.9 0.18	58 1.70

Tableau 17 : Rendements quantiques, durées d'émission (à 545 nm pour le terbium et 615 nm pour l'europium) et nombre de molécules d'eau, q, coordonnées au métal (valeurs déterminées selon la formule développée par Beeby et al.)⁴⁰⁹ des chélates chargés dans différentes solutions aqueuses.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

La première tendance générale que nous pouvons observer est que la luminescence des chélates d'euporium est moins dépendante de la nature du tampon utilisé que celle de leurs analogues au terbium ; elle est aussi sensiblement plus faible.

Les trois structures du Tableau 16, dont seule la nature du bras d'accroche de l'antenne au macrocycle varie (acétamidyl-, méthyl- ou éthyl-benzophénone), se comportent différemment dans les diverses solutions aqueuses testées. Le chélate **Ln-114** dispose d'un huitième site de coordination constitué par le motif amide de la benzophénone alors que les deux autres en possèdent un de moins. Par conséquent, cela lui confère une meilleure protection vis-à-vis de l'environnement extérieur ce qui se traduit par un rendement quantique supérieur et, concernant l'euporium, une linéarité plus marquée de sa valeur : entre 6 et 7%⁴¹⁰ alors que, **Eu-116** oscille entre 0.5 et 14%, et **Eu-115** entre 0.6 et 10%. En revanche, la coordinance moindre des deux derniers conduit à une nette exaltation de luminescence dans le tampon acétate : augmentation d'un facteur 3.5 pour **Eu-115** et 5 pour **Eu-116** par rapport aux mesures effectuées dans l'eau ultrapure. Ceci s'expliquant par une expulsion plus efficace des molécules d'eau par l'anion acétate du tampon. Le rendement quantique plus faible pour ce dernier (**Eu-116**) s'explique aisément par la distance accrue entre le chromophore et le cation métallique (pourtant, d'après les spectres d'absorption (cf. Figure 116), il semblerait que l'antenne éthyl-benzophénone interagisse avec le lanthanide contrairement à la méthyl-benzophénone ce qui devrait la rapprocher du centre métallique).

Les chélates de terbium de cette première série n'ont pas tous été analysés mais ils présentent une très grande variabilité. A l'inverse de l'euporium, le terbium est très peu sensible à la réduction (cf. Figure 10, chapitre 1) et sa luminescence ne peut pas être désactivée par ce processus. En revanche, elle l'est de façon beaucoup plus significative par transfert d'énergie en retour si le niveau triplet du chromophore devient trop proche du niveau 5D_4 ($20\,500\text{ cm}^{-1}$), plus énergétique que le 5D_0 de l'euporium ($17\,300\text{ cm}^{-1}$). Pourtant l'état triplet de la benzophénone amide (ligand **114**), localisé à $23\,570\text{ cm}^{-1}$,^{381a} ne devrait pas conduire à ce processus à moins que les molécules de tampon agissent spécifiquement sur cet état. Le spectre d'absorption n'étant pas altéré dans ce milieu, ce mode de désactivation paraît improbable. Un moyen de le déterminer aurait été de dégazer la solution car l'oxygène moléculaire est connu pour désactiver l'état triplet.

Ce qui demeure inexplicable, est la différence notable des rendements quantiques, toujours dans le tampon Tris, entre **Tb-114** ($\Phi = 1.3\%$) et **Tb-115** ($\Phi = 14\%$). Dans le tampon PIPES, qui désactive aussi la luminescence, cet ordre est inversé (10% pour **Tb-114** et 4% pour **Tb-115**). A noter que ce milieu est aussi délétère pour les chélates d'euporium hepta-coordinés.

⁴¹⁰ Les articles de la référence 381 indiquent un rendement quantique de 9.5% pour **Eu-114** et de 27% pour **Tb-114** dans l'eau à 25 °C.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

Les chélates hepta-coordinés des isomères **Eu-117** et **Eu-118** disposant de deux bras carboxylates se comportent de façon très similaire si ce n'est, peut-être, une affinité légèrement plus forte de la part de **Eu-118** pour le tampon acétate (4.4% contre 3.6% pour **Eu-117**). Excepté cette légère différence, la désactivation radiative de ces complexes d'euporium est encore peu influencée par la nature des tampons utilisés. A l'inverse, le Tris inhibe encore très fortement la luminescence du terbium (le rendement quantique passe de 40% dans l'eau ultrapure à 1.1% dans ce tampon), le PIPES un peu moins (10-13%) et le MES encore un peu moins (25%).

De plus, l'accessibilité du métal dans ces deux composés doit être différente puisque, même si cela n'est pas visible avec l'euporium, les rendements quantiques du terbium dans ces deux structures diffèrent légèrement.

Enfin, la diminution de luminescence se montre nettement moins prononcée pour les deux chélates de terbium ($\approx 40\%$) par rapport à ceux à l'euporium ($\approx 3\%$) vis-à-vis de leur complexe correspondant **Ln-114** (57% pour **Tb-114** et 6.6% pour **Eu-114**) qui possèdent une fonction carboxylate chélatante supplémentaire. Cela est en accord avec le fait que le terbium est moins enclin à une désactivation non-radiative par transfert d'énergie aux oscillateurs O-H.

Les chélates acétamide, **Eu-122**, et diméthylacétamide **Eu-121** ont généralement un comportement similaire à celui de leurs analogues carboxylates ; la seule différence est qu'ils s'avèrent désormais plus sensibles à la désactivation par le tampon Tris (diminution d'un facteur 1.7 à 2.8 avec l'eau ultrapure). En outre, la luminescence du complexe acétamide est moins intense que celle du diméthylacétamide suite à la désactivation imputable aux oscillateurs N-H.

Les remarques émises pour les chélates carboxylates au terbium restent globalement valables pour les dérivés acétamides.

A noter que le groupement acide sulfonique module la luminescence de l'euporium et encore plus celle du terbium dont l'acidité de Lewis est plus marquée du fait de son rayon ionique moins étendu (1.095 Å contre 1.120 Å pour l'euporium ; cf. Tableau 5, chapitre 1). Aussi, le MES ne disposant que d'un seul motif $-SO_3H$, son effet est plus limité par rapport à celui du PIPES qui en possède deux (Figure 129).

En conclusion de ces observations, les complexes qui pourraient induire la plus forte hausse d'intensité de luminescence sont ceux au terbium, puisqu'elle présente une large variabilité selon le milieu tamponné. Une condition *sine qua non* de cette augmentation est que le tag peptidique soit capable de contrecarrer l'effet du tampon en interagissant avec le centre métallique. De plus, il apparaît peu probable, au vu de ces premiers résultats d'obtenir une sonde pro-luminescente par la seule expulsion de molécules d'eau coordonnées au lanthanide

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

par le peptide (*i.e.*, réaction de chélation pro-luminescente). En effet, même les complexes hepta-coordinés ne conduisent pas à une exaltation importante entre un milieu constitué uniquement d'eau ultrapure et le tampon acétate.

1.4. INFLUENCE DE L'ÉTIQUETTE PEPTIDIQUE SUR LA LUMINESCENCE

Afin de mimer les étiquettes peptidiques incorporées dans les protéines de fusion à des fins de marquages non-covalents et qui reposent sur un enchaînement d'acides aminés L-histidine ou acide L-aspartique, nous avons synthétisé les hexa-peptides *N*-acétylés sur leur extrémité *N*-terminale selon une stratégie « Fmoc/tBu » mise en œuvre sur l'automate de synthèse de notre laboratoire. Leurs formules développées sont représentées dans la figure suivante.

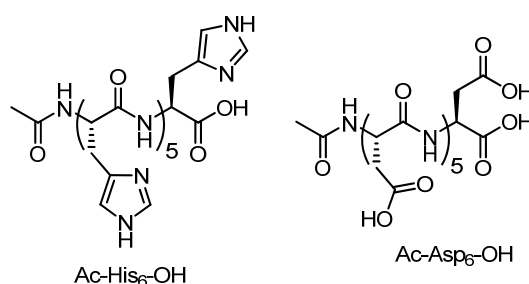


Figure 130 : Hexa-peptides poly(His) ou poly(Asp) utilisés pour mimer l'interaction et l'effet d'une protéine étiquetée par ces motifs sur la luminescence du lanthanide.

En pratique, après l'ajout d'une solution mère en peptide dans la cuve en quartz utilisée pour les mesures UV-visible, la solution est laissée agitée deux à trois minutes avant l'enregistrement du spectre de luminescence. La concentration en chélate est de l'ordre de 1 à 10 μM .

1.4.1 CHELATES D'EUROPIUM

L'influence des peptides poly(Asp) et poly(His) sur la luminescence des chélates d'euporium non-chargés issus des ligands **115**, **116** et **114** a été analysée dans les tampons Tris et PIPES. Les deux graphes suivants présentent donc la variation de luminescence du chélate **Eu-116** dans le tampon Tris (spectre de gauche) et PIPES (spectre de droite) suite à l'ajout dosé du peptide poly(Asp). La variation de luminescence s'avère minime et l'introduction d'un trop large excès, environ 40 à 50 équivalents du peptide, dans les deux cas, conduit à une légère diminution de l'intensité. Nous n'avons pas cherché à atteindre le palier, puisque même après l'ajout de 190 équivalents de poly(Asp) dans le tampon Tris la diminution de luminescence était encore perceptible.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

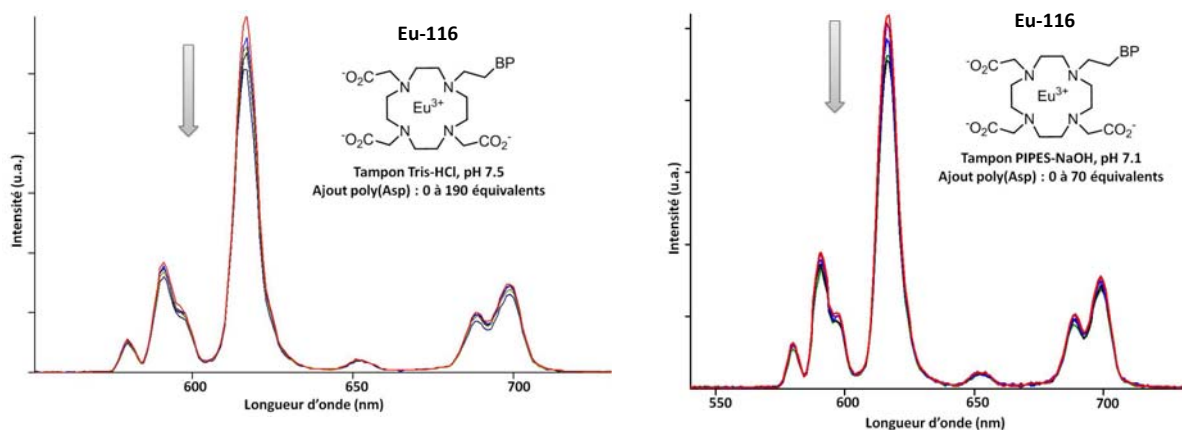


Figure 131 : Influence de l'étiquette poly(Asp) sur la luminescence du complexe Eu-116 excité à 290 nm et dilué à 10 μM en solutions aqueuses tamponnées (à gauche : Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 ; à droite : PIPES-NaOH 50 mM, pH 7.1, 25 $^{\circ}\text{C}$).

En parallèle, la durée d'émission de la transition $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ a aussi été mesurée. En effet, en plus d'augmenter l'intensité d'émission, le déplacement des molécules d'eau coordonnées au métal par un analyte d'intérêt devrait aussi conduire à un allongement de la durée d'émission.³⁸³ Sans grande surprise, cette valeur n'a jamais évoluée (0.40 ms dans le tampon PIPES et 0.44 ms dans le tampon Tris).

Le complexe **Eu-114** a été soumis au même test seulement dans le tampon Tris mais aussi avec l'étiquette poly(His). Les courbes d'émission représentées à la figure suivante montrent une nouvelle fois la faible modulation du signal qui subit encore une diminution de son intensité au fur et à mesure que du peptide est ajouté. Nous n'avons pas introduit plus de 10 équivalents de peptide poly(His) puisque d'une part, aucune augmentation du signal n'est observée, et que d'autre part, même après 190 équivalents de poly(Asp) l'intensité du signal continuait à baisser (dans le même temps la durée d'émission est passée de 0.62 à 0.60 ms).

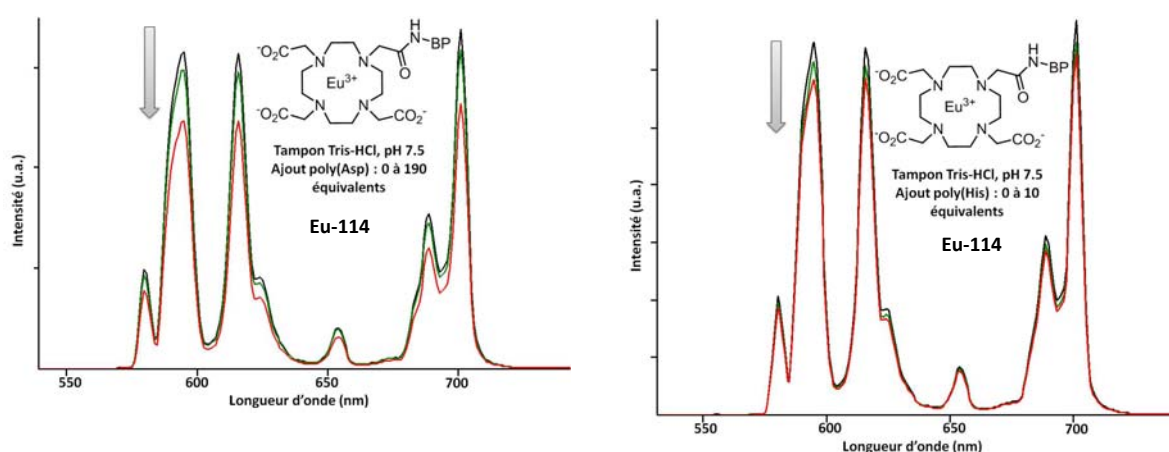


Figure 132 : Influence de l'étiquette poly(Asp), à gauche, et poly(His), à droite, sur la luminescence du complexe Eu-114 excité à 290 nm et dilué à 10 μM dans le tampon Tris-HCl, 50 mM, pH 7.5, 25 $^{\circ}\text{C}$.

Le dernier complexe neutre d'euprium, **Eu-115**, a aussi été analysé dans le tampon Tris, et son comportement en présence de poly(Asp) est identique aux deux précédents.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

Ces premiers essais infructueux confirment que l'euporium seul est incapable, en solution tamponnée, d'interagir et donc de se lier de manière non-covalente avec une étiquette carboxylate poly(Asp), ou à l'instar du Ni(II), avec un peptide poly(His) ou, que s'il y a liaison il n'y a pas de modulation de l'intensité de luminescence. De plus, le fait que le complexe soit octa- ou hepta-coordiné n'a aucune incidence non plus. En revanche cela n'est pas le cas pour l'anion HCO_3^- qui se révèle affiné pour des chélates hepta-coordinés d'euporium, même neutres (Figure 133). L'analogue **Eu-114** ne disposant que d'un site de coordination vacant s'avère totalement insensible, dans les mêmes conditions, à l'ajout de l'anion HCO_3^- . Cette propriété est d'ailleurs bien connue des chélates hepta-coordinés composés d'un dérivé de cyclène (Figure 133).^{357,383}

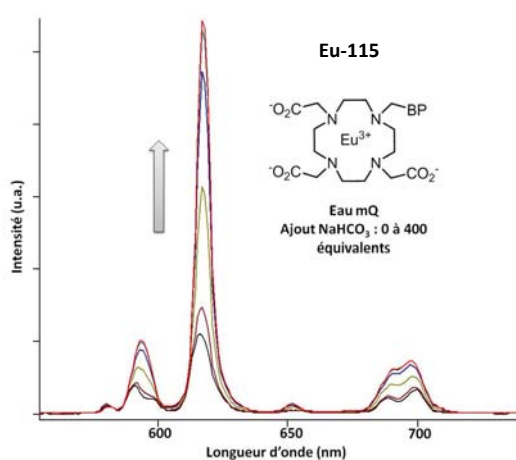


Figure 133 : Variation de luminescence consécutive à l'ajout d'hydrogénocarbonate de sodium du complexe Eu-115 excité à 290 nm et dilué à 10 μM dans l'eau ultrapure à 25 °C. Entre 0 et 300 équivalents (au-delà l'augmentation devient mineure), l'intensité du signal est augmentée d'un facteur trois et la durée d'émission de la bande hypersensible passe de 0.40 à 0.74 ms.

A la suite de ces résultats, nous nous sommes focalisés sur les chélates de terbium qui, grâce à l'acidité de Lewis plus prononcée de leur cation métallique, pourrait les rendre plus affins, du moins pour l'étiquette constituée de bases de Lewis à caractère dur comme peut l'être le peptide poly(Asp).

1.4.2 CHELATES DE TERBIUM

Les deux chélates de terbium non-chargés **Tb-114** et **Tb-115** ont été soumis à des expériences d'ajouts dosés du peptide poly(Asp) dans le tampon Tris. L'évolution de la luminescence a été suivie jusqu'à l'addition d'environ 200 équivalents en peptide.

Comme indiqué à la figure ci-dessous la luminescence du chélate octa-coordiné **Tb-114** est nettement influencée par la présence du peptide : entre 0 et 220 équivalents l'intensité est augmentée de 750% (τ (545 nm) s'allonge de 0.08 ms à 0.40 ms)⁴¹¹ alors qu'entre 0 et 170

⁴¹¹ Si l'étiquette contrecarre l'effet du tampon une valeur au moins similaire à celle trouvée dans l'eau ultrapure, à savoir 1.81 ms devrait être atteinte. Or, même avec 220 équivalents de peptide cette durée ne s'élève qu'à 0.40 ms.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

équivalents une hausse de 13% seulement est observée pour la luminescence de **Tb-115** (τ (545 nm) n'évolue pas et stagne à 1.53 ms). Aucun palier cependant n'est atteint. A noter qu'après une nuit d'agitation, la luminescence de **Tb-114** en présence de 220 équivalents de poly(Asp) n'a pas évolué indiquant que l'interaction entre le peptide et le métal atteint rapidement son équilibre.

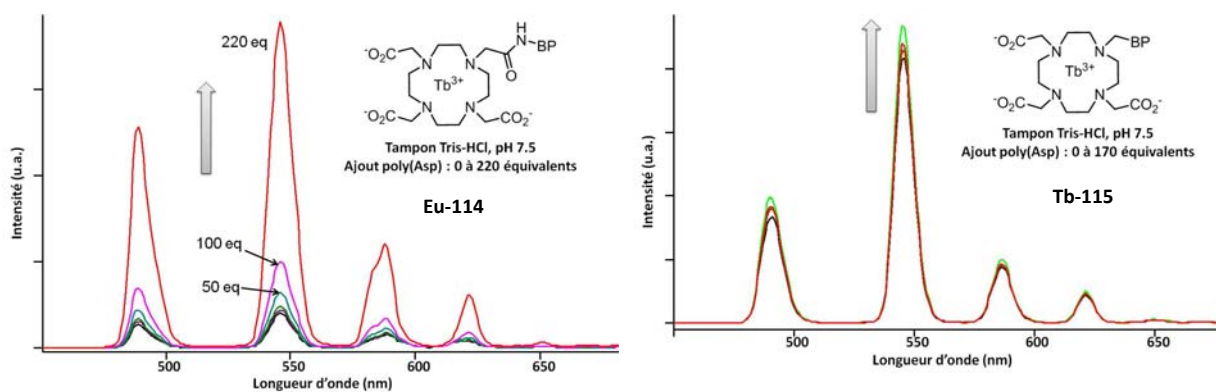


Figure 134 : Influence de l'étiquette poly(Asp) sur la luminescence des complexes Tb-114 et Tb-115 excité à 290 nm et dilué à 10 μ M dans le tampon Tris-HCl, 50 mM, pH 7.5, 25 $^{\circ}$ C.

Ces deux essais indiquent que le terbium, s'il est inséré dans le ligand **114** est plus apte à interagir avec le peptide que lorsqu'il est complexé à la structure **115** laissant pourtant un site de coordination vacant en plus. Il se pourrait donc que la benzophénone, fixée de façon moins rigide dans ce chélate, puisque ne disposant pas de lien amide pour complexer le terbium, empêche l'accès à la première sphère de coordination du métal.

De plus, et contrairement aux chélates d'euporium, l'interaction de ce peptide avec les complexes de terbium conduit à une augmentation significative de l'intensité de luminescence. Dans le cas de **Tb-114** celle-ci est nettement plus importante que la diminution de celle de **Eu-114**, dans le même tampon Tris, ce qui est bien en accord avec l'acidité de Lewis plus marquée du terbium face à l'euporium.

En parallèle de ces essais, le complexe **Tb-114** a aussi été confronté à l'ajout d'acide trifluoroacétique (TFA) et d'acide L-aspartique (Asp). En effet, le TFA peut se complexer partiellement au cation lanthanidique et il est inévitablement présent dans les échantillons de peptides utilisés puisqu'ils sont purifiés par HPLC semi-préparative en phase inverse, utilisant le TFA 0.1% aq. comme phase mobile.⁴¹² Dans le tampon Tris, l'introduction de 140 équivalents de TFA provoque une augmentation de luminescence de 20% contre 240% pour la même quantité en poly(Asp). Bien que la proportion en TFA contenue dans le peptide poly(Asp) soit inconnue il apparaît néanmoins, au vue de la grande différence entre ces deux valeurs, que l'effet du TFA par rapport au peptide reste limité.

⁴¹² Les concentrations en peptides des solutions mères ont pu être obtenues par spectrométrie d'absorption UV-visible à 214 nm selon une méthode décrite dans l'article suivant : B. J. H. Kuipers and H. Gruppen, *J. Agric. Food. Chem.*, **2007**, 55, 5445-5451.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

Enfin, dans le but de confirmer l'effet synergique du poly(Asp) sur la complexation, l'ajout d'acide L-aspartique a été étudié, toujours dans le tampon Tris. Après l'introduction de 600 équivalents en Asp une augmentation de 60% est observée, contre 135% suite à l'ajout de 100 équivalents en poly(Asp). Il semblerait que, proportionnellement, l'hexa-peptide poly(Asp) soit plus affiné que son monomère.

De ces différentes expériences, il apparaît de plus en plus évident que le tampon, probablement plus du fait de sa forte concentration que de son affinité pour le lanthanide, empêche l'étiquette peptidique d'atteindre efficacement la première sphère de coordination du cation métallique. En effet, même en ajoutant un large excès de peptide, l'intensité de la luminescence du métal ne parvient jamais à l'équilibre. Il en est de même de sa durée d'émission, qui de surcroît demeure courte.

Nous avons alors étudié les chélates de terbium portant une charge globale positive « +3 » (**Tb-121** et **Tb-122**) dans le tampon PIPES. D'une part, cette charge devrait encore augmenter l'affinité pour l'étiquette poly-carboxylate. D'autre part, le choix du tampon a été guidé par sa capacité à inhiber moins fortement la luminescence que le tampon Tris. Il doit donc, *a priori*, conduire à une interaction avec le terbium moins prononcée que celle qu'exerce le tampon Tris sur ce lanthanide permettant à l'étiquette peptidique d'interagir plus facilement avec le cation. De plus, l'effet du PIPES reste plus marqué sur la luminescence que celui du MES, amenant potentiellement une exaltation de luminescence plus forte, si le peptide se montre capable de se complexer au cation.

Dans la Figure 135 sont donc représentés les spectres d'émission du chélate **Tb-122** dans le tampon PIPES suite à l'ajout des l'étiquettes poly(Asp) et poly(His). Seuls 20 et 15 équivalents, respectivement, ont été introduits puisque, d'après les valeurs de τ (0.21 et 0.18 ms ; dans l'eau ultrapure τ s'élève déjà à 1.24 ms), l'équivalence est une nouvelle fois loin d'être atteinte.

Quant à l'augmentation de luminescence, elle s'avère encore plus prononcée avec poly(Asp) qu'avec poly(His) :⁴¹³ 60% contre 20% (la superposition des spectres d'émission, représentée à la figure suivante suite à l'ajout de poly(His) reflète mal cette augmentation de 20% puisque la solution mère de ce peptide était moins concentrée, impliquant un facteur de dilution non négligeable).

⁴¹³ Cela conforte le fait que le TFA, dans le pire des cas, n'intervient que de façon mineure dans la variation de luminescence puisque les deux peptides ont été purifiés avec une phase mobile aq. contenant du TFA.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

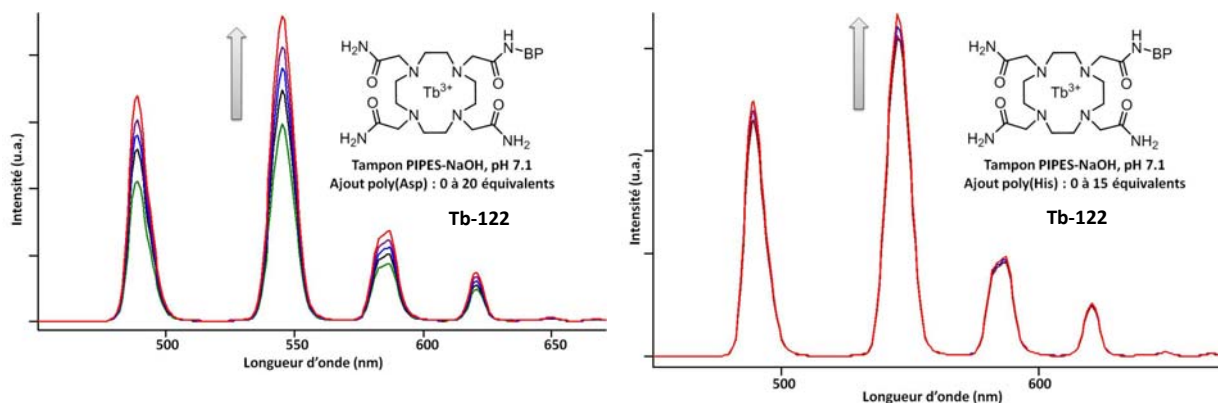


Figure 135 : Influence de l'étiquette poly(Asp) (à gauche) et poly(His) (à droite) sur la luminescence du complexe Tb-122 excité à 290 nm et dilué à 10 μM dans le tampon PIPES-NaOH, 50 mM, pH 7.1, 25 °C

Ces deux mesures indiquent malheureusement que l'effet du tampon demeure prépondérant.

La variation de luminescence de **Tb-122** en présence de poly(Asp) a alors été analysée simplement dans l'eau ultrapure et effectivement, à partir de 20 équivalents, la luminescence n'évolue plus. L'intensité du signal est augmentée de 50% pour **Tb-122** (τ (545 nm) passe de 1.10 à 1.50 ms) et de 40% pour **Tb-121** (τ (545 nm) passe de 1.40 à 1.70 ms).

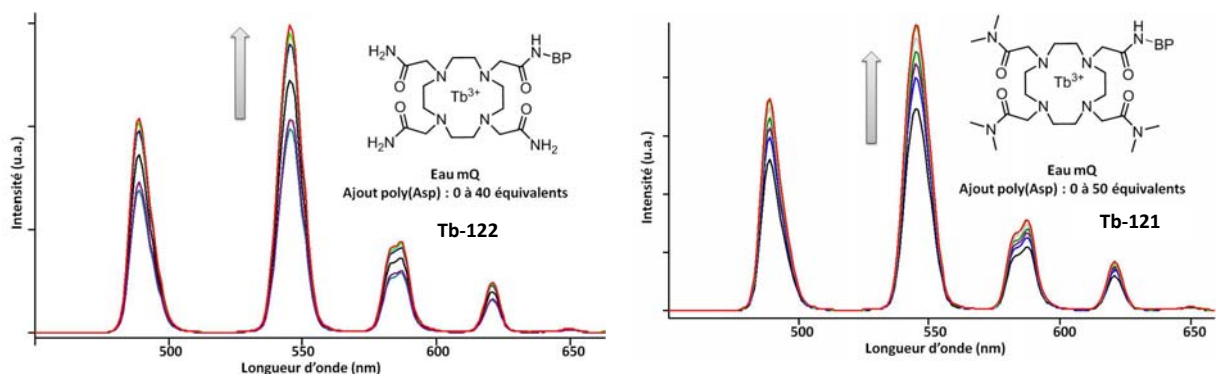


Figure 136 : Influence de l'étiquette poly(Asp) sur la luminescence des complexes Tb-121 et Tb-122 excités à 290 nm et dilués à 10 μM dans l'eau ultrapure à 25 °C. Après l'ajout de 50 équivalents de peptide, le pH de la solution aqueuse contenant Tb-121 est de 4.5-5.

En marge de ces complexes, la luminescence du chélate de terbium à structure ouverte fondé sur le motif NTA a aussi été analysée en présence du peptide poly(Asp) dans l'eau ultrapure. Le complexe a été formé *in situ* par ajout progressif d'une solution de $\text{TbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. La courbe représentant l'augmentation de luminescence suite à la complexation du lanthanide par le ligand **120** indique qu'il s'avère nécessaire d'ajouter un excès de chlorure de terbium, environ deux équivalents, (en supposant que le ligand contienne une molécule de TFA) pour favoriser la formation du chélate. Un large excès de terbium a été additionné (13 équivalents) mais l'intensité du signal est restée inchangée. C'est alors que le peptide a été introduit, aboutissant à une faible augmentation du signal mais qui, dès 0.5 équivalent de peptide, semble avoir atteint son maximum.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

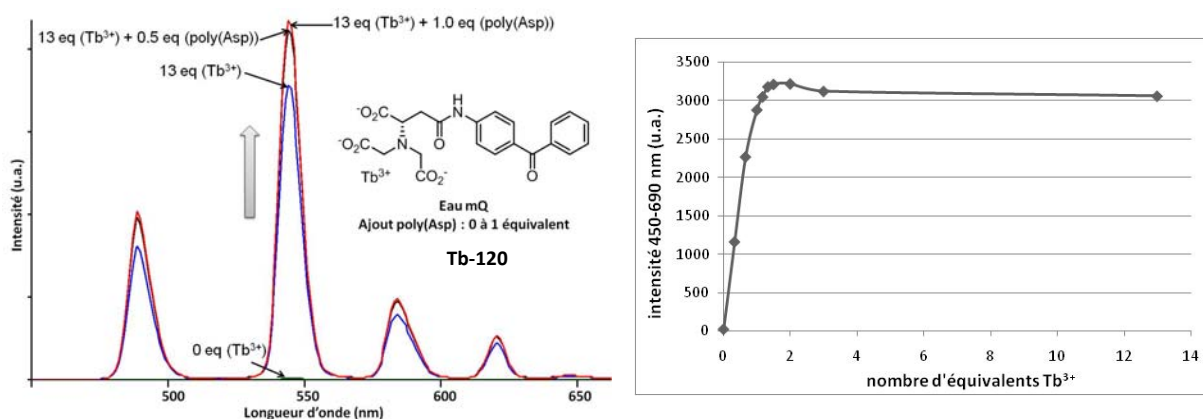


Figure 137 : Influence de l'étiquette poly(Asp) sur la luminescence du complexe Tb-120 excités à 290 nm et dilué à environ 7 μM dans l'eau ultrapure à 25 °C. A droite est représentée la variation de l'intensité de luminescence du chélate en fonction du nombre d'équivalents, par rapport au ligand 120, de terbium.

Ce complexe à structure ouverte est donc plus sensible à l'ajout du peptide, mais l'augmentation de luminescence demeure toujours faible.

Pour une conclusion et une discussion sur les perspectives de ce projet le lecteur pourra se référer au paragraphe VI de ce chapitre.

2 DES CHELATES SENSIBILISES PAR LES ANTENNES AZIDOCOUMARINE ET AZIDOCARBOSTYRILE

2.1. AVANT PHOTOACTIVATION

Les spectres d'absorption et d'émission de luminescence (enregistrés en mode phosphorescence) ainsi que de fluorescence des chélates azido, mais aussi de leurs dérivés amino ont été effectuée dans l'eau ultrapure. L'objectif est, dans un premier temps, d'évaluer qualitativement si l'efficacité de transfert d'énergie de l'antenne au lanthanide se trouve modifiée par cette substitution différente.

Les différents spectres des complexes dont la coumarine est reliée à la partie chélatante par sa position 6 sont présentés aux deux figures suivantes.

Le chélate **Eu-137-NH₂** n'est ni fluorescent, ni luminescent (Figure 138), d'autant plus que les valeurs d'absorbance à 247 et 330 nm sont respectivement de 0.29 et 0.19. Les spectres de son homologue au terbium ne sont pas indiqués car ils sont similaires.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

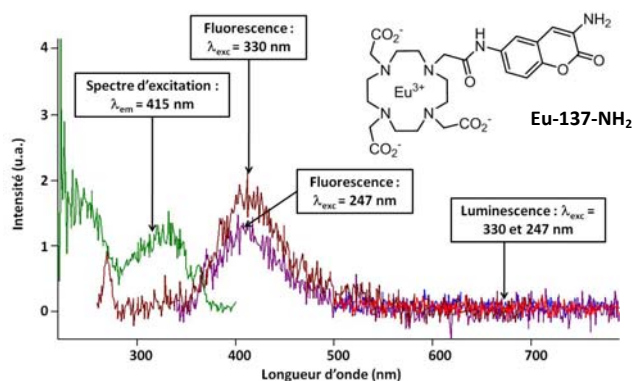


Figure 138 : Spectres de luminescence, fluorescence et d'excitation du chélate Eu-137-NH₂ (eau ultrapure, 25 °C).

Quant aux chélates azido correspondant ils se montrent toujours non-fluorescents et extrêmement peu luminescents (et seulement s'ils sont excités à leur λ_{max} , *i.e.* 250 nm). De surcroît, les valeurs d'absorbance (spectres non représentés) aux longueurs d'onde d'excitation sont très élevées (0.95, 0.49 et 0.34 à, respectivement, 250, 330 et 350 nm pour le chélate d'euporium et 0.25 et 0.12 à, respectivement, 250 et 330 nm pour le complexe de terbium). Le spectre d'excitation du terbium à $\lambda_{\text{em}} = 545$ nm confirme que seule la bande d'absorbance la plus énergétique transfère, et de manière très inefficace, l'énergie au terbium.

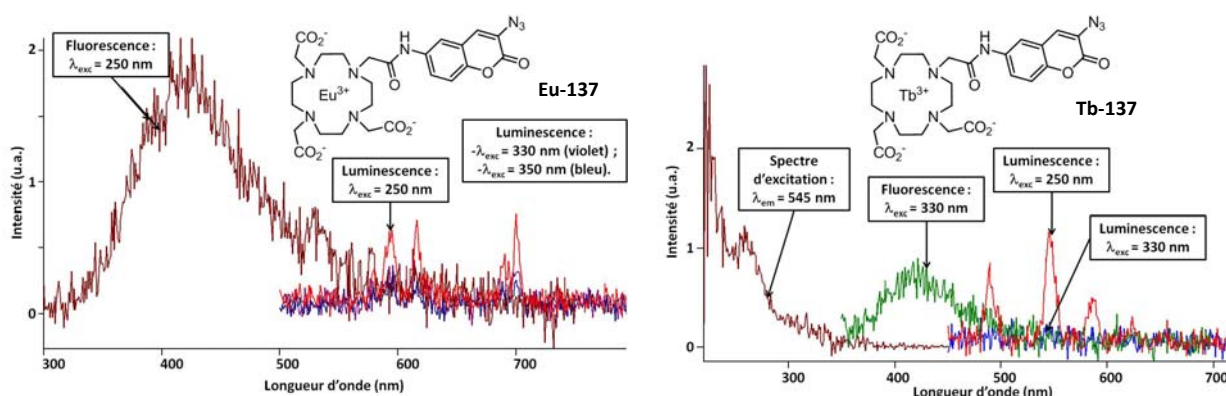


Figure 139 : Spectres de luminescence, fluorescence et d'excitation des chélates Eu-137 et Tb-137 (eau ultrapure, 25 °C).

Les différents spectres des complexes dont la coumarine est maintenant reliée à la partie chélatante par sa position 7 sont présentés aux deux figures suivantes.

Les composés **Eu-136-NH₂** et **Tb-136-NH₂** présentent une luminescence très peu intense. De surcroît une excitation vers 250 nm est nécessaire. Les spectres d'excitation des deux complexes centrés sur leur bande de luminescence principale respective sont donc différents (dans le cas de l'euporium le spectre possède la même allure que le spectre d'excitation de fluorescence signifiant probablement que « toute la structure coumarinique » intervient dans le transfert). Enfin, la plus faible fluorescence du complexe d'euporium, alors que la valeur d'absorbance à 337 nm est plus élevée (0.33 contre 0.24 pour le complexe de terbium, les spectres ne sont pas représentés) peut provenir d'un meilleur transfert sur le lanthanide.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

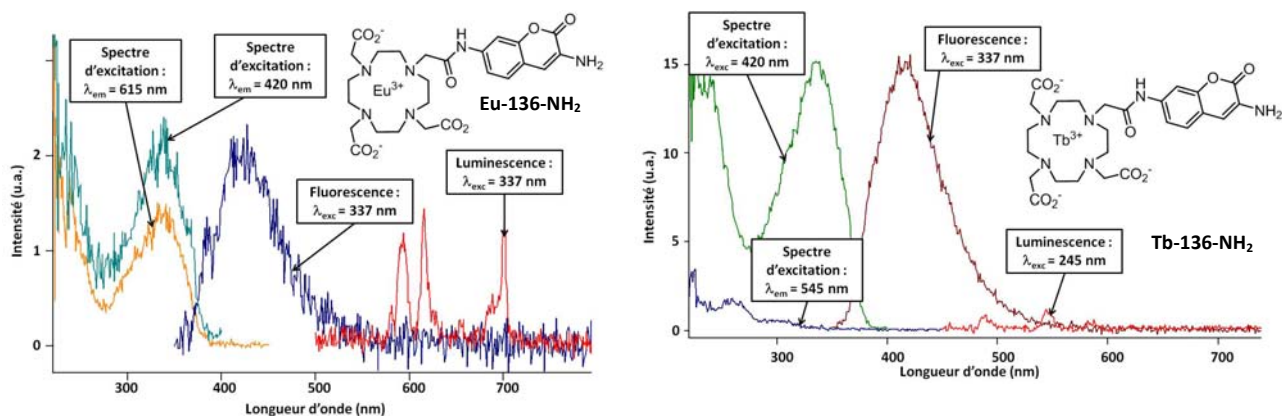


Figure 140 : Spectres de luminescence, fluorescence et d'excitation des chélates Eu-136-NH₂ et Tb-136-NH₂ (eau ultrapure, 25 °C).

A la Figure 141 sont détaillés les divers spectres obtenus avec l'analogue azido. Le complexe d'euprimum requiert désormais une excitation vers 250 nm pour émettre une très faible luminescence (l'absorbance à 247, 320 et 345 nm est de respectivement 0.126, 0.121 et 0.145). Aussi, les mesures effectuées sur le chélate de terbium nous révèlent que l'azote est instable. En effet, l'allure du spectre d'absorption avant et après les mesures d'émission a été modifiée. Dans le même temps, la luminescence, suite à cette dégradation a augmenté mais requiert toujours une excitation à des longueurs d'onde énergétiques (UV-C, ≈ 250 nm). D'ailleurs, les spectres d'excitation de fluorescence et de luminescence sont différents et seul le dernier reflète l'allure d'un spectre d'absorption de coumarine.

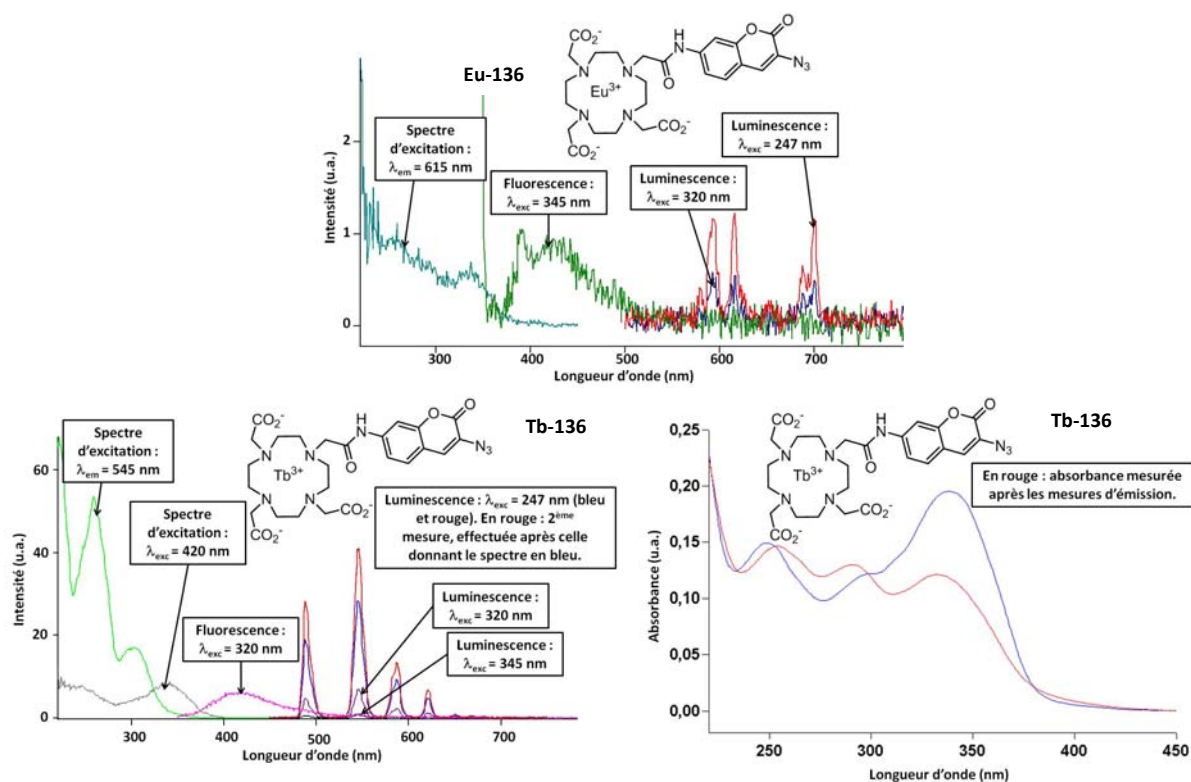


Figure 141 : Spectres de luminescence, fluorescence et d'excitation des chélates Eu-136 et Tb-136. Le spectre d'absorption de ce dernier est aussi indiqué (eau ultrapure, 25 °C).

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

Seuls les chélates d'euprium et de terbium possédant la 7-azidocoumarine chlorée en position 6 ont été synthétisés. Leur spectre de luminescence révèlent un transfert d'énergie totalement inefficace quelque soit les longueurs d'onde d'excitation appliquées et centrées sur les différentes bandes d'absorbance.

Comme prévu, cette coumarine s'avère plus stable et le spectre d'absorption n'est altéré ni au cours du temps ni par les mesures effectuées.

Le complexe de terbium se montre plus fluorescent car sa purification s'est révélée moins efficace que celle menée sur son dérivé à l'euprium (92% contre 96%). La proportion plus importante d'une impureté fluorescente (non-azido au vu de l'allure du spectre d'excitation) dans le complexe de terbium doit expliquer la fluorescence plus élevée mais n'est en rien liée à la coumarine azido non-fluorescente.

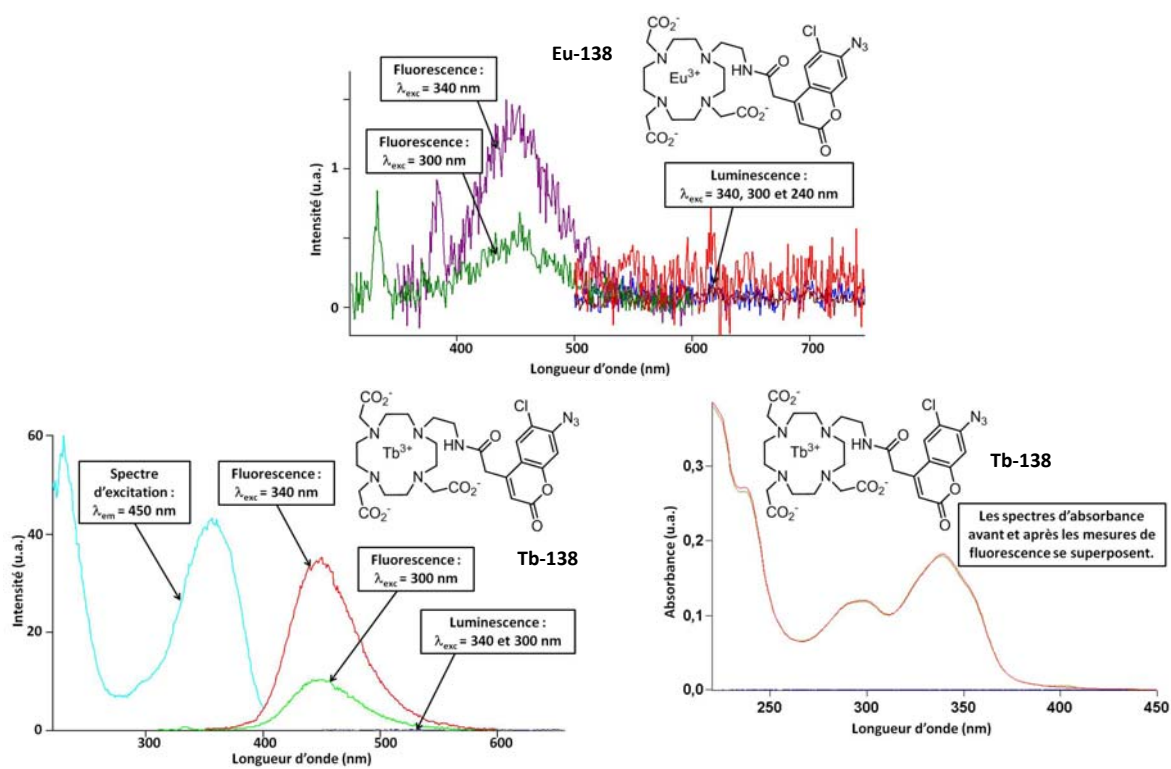


Figure 142 : Spectres de luminescence, fluorescence et d'excitation des chélates Eu-138 et Tb-138. Le spectre d'absorption de ce dernier est aussi indiqué (eau ultrapure, 25 °C).

Les dernières mesures concernent les chélates dont le lanthanide est sensibilisé par le cs124 et son analogue azido. Le transfert d'énergie vers l'euprium est totalement inefficace : soit l'antenne est trop éloignée du centre métallique ou soit le motif aniline réduit l'euprium(III). En effet le cs124 est connu pour sensibiliser ce lanthanide, mais dans tous les cas, l'amine servant de point d'accroche à la partie chélatante se retrouve sous forme d'amide. En revanche, le terbium est luminescent (le rendement quantique n'a pas été calculé mais il semblerait plus élevé que dans tous les exemples précédents) et le spectre d'excitation correspond bien à celui d'absorbance de ce chromophore.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

Ce qui reste inexpliqué cependant est la saturation du signal fluorescent dans le cas du terbium, alors que, pour une valeur d'absorbance à 347 nm similaire (0.13 pour le complexe d'euprimum et 0.157 pour celui au terbium) le signal issu du composé à l'euprimum est très loin de la saturation.

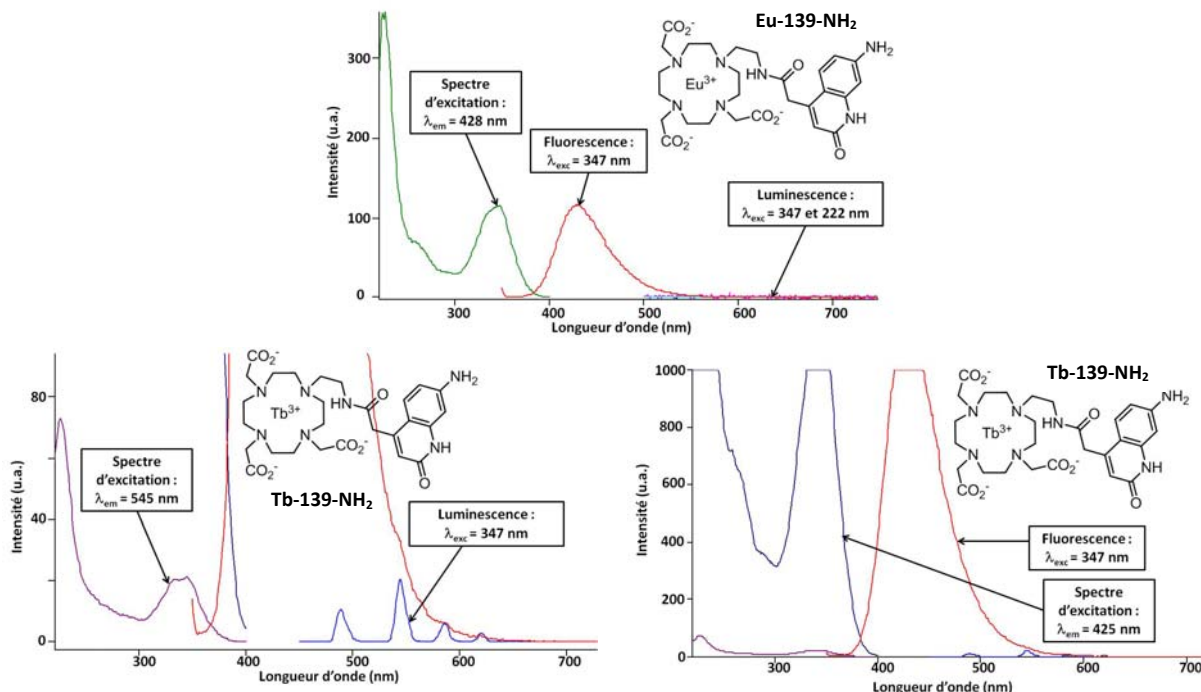


Figure 143 : Spectres de luminescence, fluorescence et d'excitation des chélates Eu-139-NH₂ et Tb-139-NH₂ (eau ultrapure, 25 °C).

Les chélates à antenne 7-azidoquinolinone, comme ceux à antenne 7-azidocoumarine, sont aussi non-fluorescents. Dans le cas du complexe de terbium, l'allure du spectre d'excitation de fluorescence confirme que le résidu de fluorescence provient du cs124 et non de son dérivé azido (Figure 144).

L'azidoquinolinone semble aussi sensibiliser de façon assez inefficace le terbium (l'absorbance est du même ordre de grandeur que précédemment, à savoir 0.116 à 347 nm et 0.102 à 326 nm). De plus, cette antenne transfère très mal son énergie à l'euprimum mais, contrairement au cas du cs124 où la luminescence était nulle, l'excitation à 230 nm induit néanmoins une très faible luminescence (mais l'absorbance à 230 nm est conséquente : 0.30 contre 0.1 environ pour les trois autres longueurs d'onde testées).

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

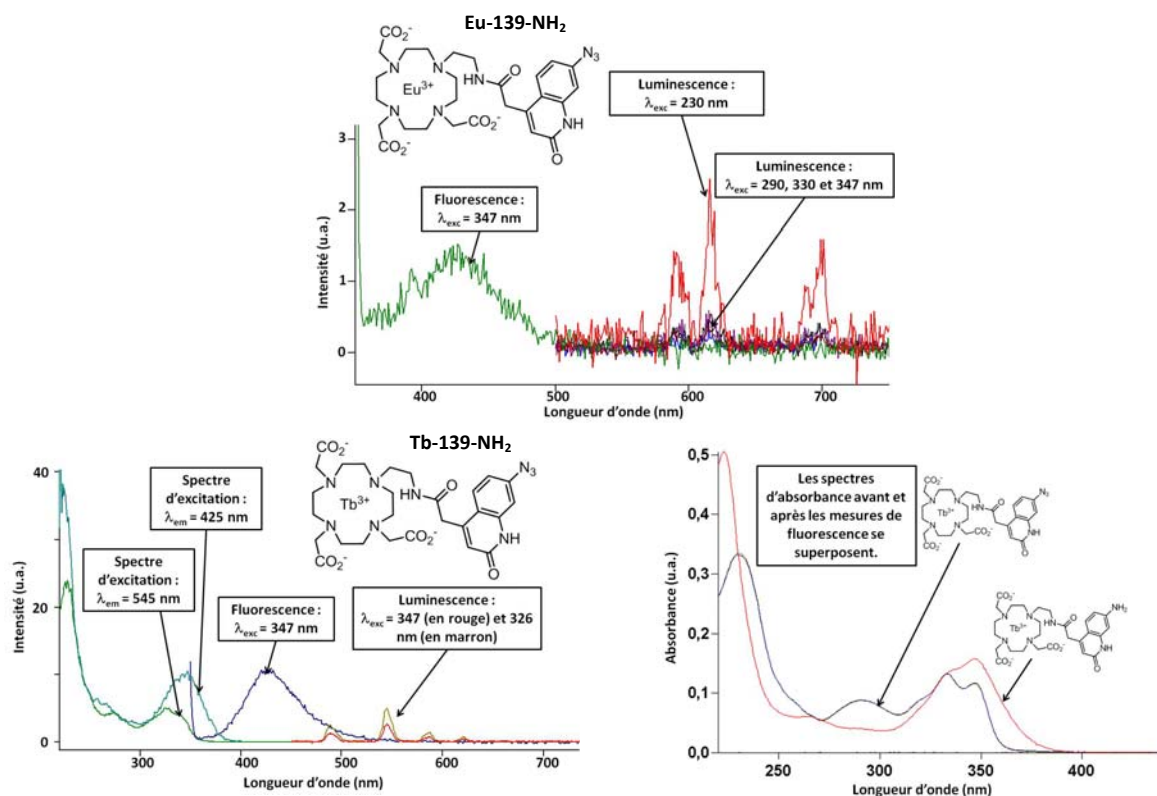


Figure 144 : Spectres de luminescence, fluorescence et d'excitation des chélates Eu-139 et Tb-139. Les spectres d'absorption de ce dernier ainsi que de Tb-139-NH₂ sont aussi indiqués (eau ultrapure, 25 °C).

Il apparaît, au vu de ces mesures préliminaires que l'efficacité de transfert est globalement nulle pour les coumarines, qu'elles soient des dérivés aniline ou azido. De plus, les transferts les moins mauvais sont obtenus suite à une excitation très énergétique dans l'UV-C, aux alentours de 250 nm.

Les quinolinones transfèrent plus efficacement leur énergie au terbium mais la différence ne semble pas significative entre les dérivés aniline et azido.

Enfin, que les différentes antennes azido sensibilisent très mal l'euporium et le terbium est une bonne chose, à condition, évidemment, que le chromophore, après photoactivation et marquage covalent de la protéine ciblée, soit capable de transférer de façon optimale son énergie au lanthanide.

Dans le paragraphe suivant sont résumées les premières expériences de photoactivation réalisées sur trois chélates de terbium dans l'eau ultrapure, en présence d'un excès de L-lysine (cinq équivalents), acide aminé comportant une fonction amine primaire apte à réagir avec l'intermédiaire nitrène résultant de l'activation photochimique de l'azoture.

2.2. APRES PHOTOACTIVATION

Il a été montré précédemment que la luminescence du chélate **Tb-136** a tendance à augmenter suite à sa dégradation. Nous avons donc soumis ce composé à une irradiation lumineuse dans l'UV-B (300 nm) pendant 220 minutes en présence de cinq équivalents de L-lysine. Une augmentation de luminescence de 30% suite à une excitation de l'antenne à 300

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

nm a été observée. Un échantillon analysé par HPLC confirme que le complexe a entièrement réagi. En revanche aucun autre produit majoritaire ne s'est formé, et il semblerait que le chélate photoactivé se soit plutôt dégradé en un produit non-fluorescent, d'autant plus qu'il s'avère peu stable. En effet, le spectre d'absorption à t_0 indique déjà une dégradation partielle.

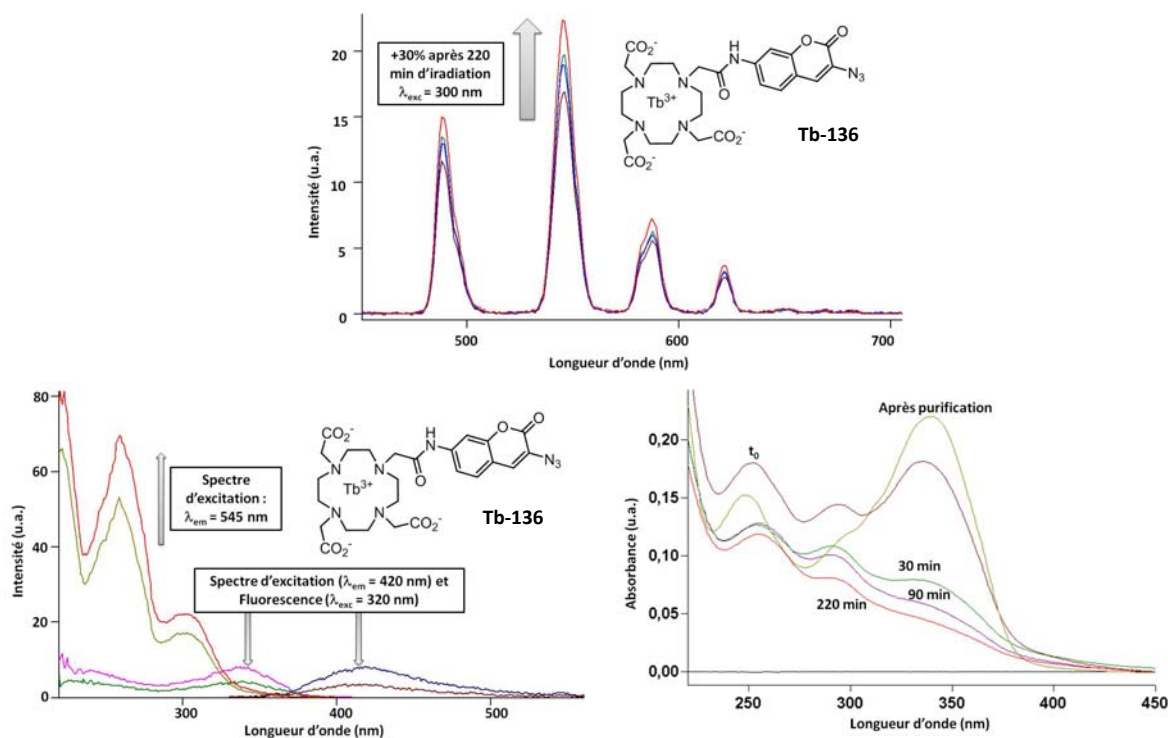


Figure 145 : Variation des spectres d'émission de luminescence et de fluorescence, d'excitation de luminescence et de fluorescence et variation des spectres d'absorption du chélate Tb-136 au cours de la réaction de photoactivation (eau ultrapure, 25 °C).

Il est donc fort probable que cette 7-azidocoumarine ne soit pas suffisamment stable pour conduire à une étape d'accrochage efficace par photoactivation sur une amine primaire.

En outre, les résultats obtenus avec le chélate de terbium portant la 7-azidocoumarine chlorée en position 6 sont aussi décevants. Après cinq minutes sous irradiation à 300 nm la luminescence observée est faible. Quant au résidu de fluorescence il provient toujours de l'impureté qui doit être un dérivé de 7-aminocoumarine.

Il semblerait à nouveau que l'antenne se soit dégradée. Le chromatogramme issu de l'analyse HPLC ne révèle qu'un seul pic majoritaire qui s'avère être celui de l'impureté, présente initialement à hauteur de 2-3% seulement.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

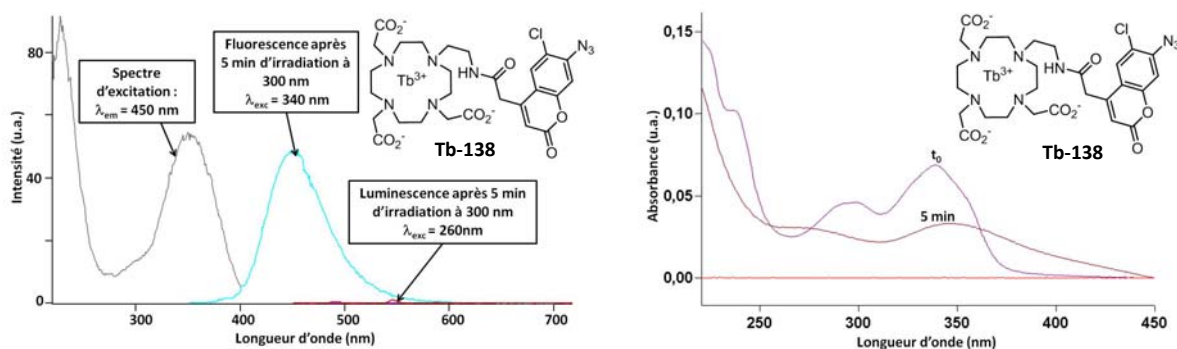


Figure 146 : Spectres d'émission (fluorescence et luminescence), d'excitation de fluorescence et spectres d'absorption du chélate Tb-138 lors de la tentative d'accrochage du chélate sur la L-lysine par voie photochimique (eau ultrapure, 25 °C).

Le dernier chélate soumis à cette réaction est le composé **Tb-139** disposant de l'antenne 7-azidoquinolinone. Après 25 minutes d'irradiation à 300 nm, la luminescence se trouve diminuée de 37%. L'analyse HPLC indique une conversion totale, mais les seuls pics nettement visibles sont ceux correspondant déjà aux impuretés présentes après dans le chélate purifié et qui doivent contribuer à la fluorescence résiduelle dont l'intensité diminue au cours de la photoactivation.

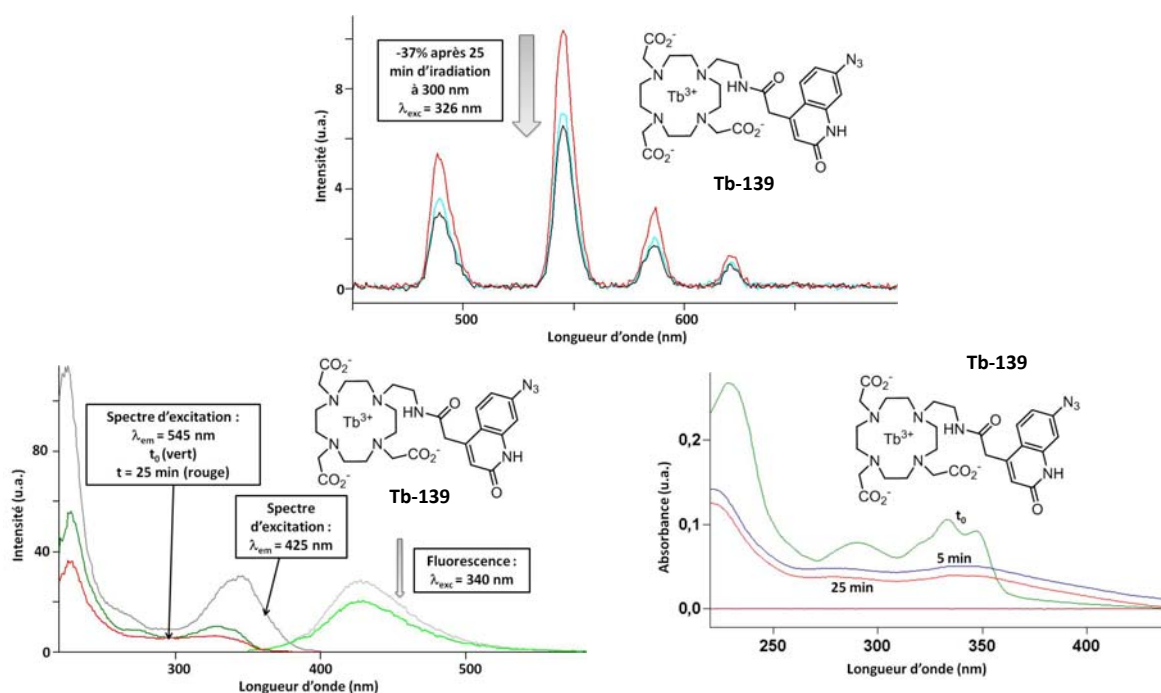


Figure 147 : Spectres d'émission (fluorescence et luminescence), d'excitation de fluorescence et spectres d'absorption du chélate Tb-139 lors de la tentative d'accrochage du chélate sur la lysine par voie photochimique.

A la suite de ces expériences infructueuses, et afin de confirmer la validité de notre mode opératoire, nous avons appliqué ces conditions de photoactivation à une coumarine modèle pro-fluorescente, ayant déjà fait ses preuves dans de telles réactions. La 7-azido-6-chloro-4-méthyl-coumarine **A-54** a donc été irradiée dans des conditions semblables. Cependant, ce

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

composé étant peu soluble en phase aqueuse, du DMSO a dû être rajouté (DMSO : eau ultrapure v/v 3/5).

Cette réaction conduit en effet, après dix minutes, à une exaltation de fluorescence mais qui s'atténue si l'irradiation est prolongée. Le spectre d'excitation centrée sur la bande de fluorescence indique que cette émission ne provient pas d'une 7-aminocoumarine. En outre, l'analyse du brut en HPLC montre sans ambiguïté la formation d'un produit majoritaire dont le temps de rétention est différent de la 7-azidocoumarine. Son spectre d'absorption obtenu lors de cette analyse est identique au spectre d'excitation.

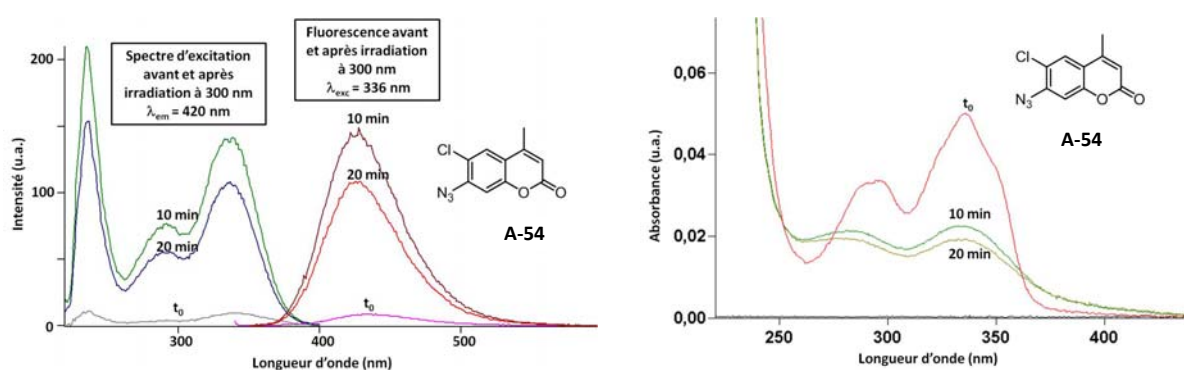


Figure 148 : Spectres d'émission de fluorescence, d'excitation de fluorescence et d'absorption de la 7-azidocoumarine modèle montrant l'évolution de la réaction de marquage par photoactivation.

L'unique produit issu de cette réaction de photoactivation n'a pas encore pu être identifié. Elle semble malheureusement confirmer que le mode opératoire mis en œuvre doit conduire, au moins pour le chélate **Tb-138** disposant de la même antenne à un seul produit majoritaire qui de surcroît devrait conduire à une fluorescence plus intense que celle observée mais qui provient sûrement des impuretés (en effet le spectre d'excitation ne correspond pas à celui obtenu avec la coumarine modèle).

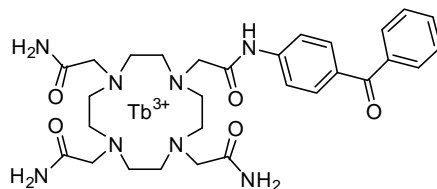
Une réaction de photoactivation en présence de la même quantité de DMSO et du chélate **Tb-138** devrait aussi être effectuée pour déterminer si ce solvant est inerte ou s'il est à l'origine de la photoactivation, sans dégradation, de la coumarine modèle **A-54**.

VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le premier axe de ce deuxième projet de recherche visant à concevoir une sonde lanthanidique à sphère de coordination incomplète exaltant sa luminescence par la seule interaction électrostatique d'une étiquette peptidique avec son cation métallique expulsant ses molécules d'eau a été exploré. La structure des sondes étudiées repose sur une cage DO3A complexant les cations europium(III) ou terbium(III), qui sont sensibilisés *via* une antenne benzophénone photoactivable qui permettrait, suite à l'interaction avec le tag peptidique et une irradiation dans l'UV-A (≈ 350 nm, transition $n \rightarrow \pi^*$), de se lier de manière covalente à l'étiquette.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

Il ressort de cette étude préliminaire que, dans le meilleur des cas, une augmentation de luminescence modeste de 40% du terbium(III), inséré dans le ligand **122**, est observée suite à l'ajout d'un excès important, 20 équivalents, du peptide hexa-aspartate (poly(Asp)) et d'une excitation à 290 nm. En outre, ce résultat est obtenu pour un complexe portant une charge globale positive « +3 » dissous uniquement dans l'eau pure.



Tb-122

Ces expériences ont aussi été menées dans différents tampons aqueux usuels (Tris, MES, PIPES, AcONa) mais l'influence que ces derniers exercent *in fine* sur la luminescence, généralement négative par rapport à l'eau ultrapure, excepté le tampon acétate grâce aux groupements carboxylates (*cf.* Tableau 16 et Tableau 17), n'est pas efficacement contrecarrée par l'ajout de l'hexa-peptide poly(Asp) et encore moins par son analogue histidine poly(His). En effet, l'augmentation de l'intensité de luminescence dans les solutions aqueuses tamponnées est nettement visible pour les complexes de terbium, qu'ils soient neutres d'ailleurs, ou chargés positivement, mais cette exaltation semble « infinie », sans que la durée d'émission ne soit significativement allongée. Dans le cas des chélates neutres d'euprimum(III), l'ajout de l'hexa-peptide (poly(Asp) ou poly(His)) implique une diminution de l'intensité de luminescence, elle aussi, n'atteignant pas de valeur limite après l'ajout d'un large excès de l'étiquette (≈ 200 équivalents).

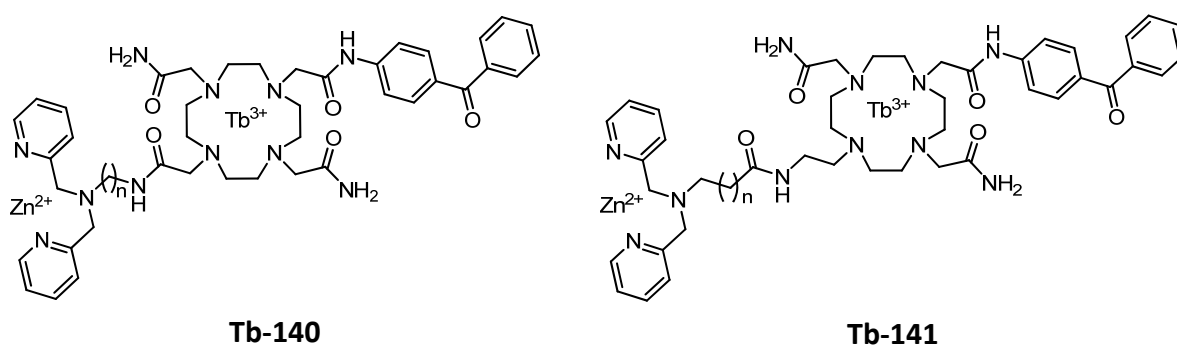
Ce phénomène global, qu'il conduise à une hausse ou à une baisse d'intensité du signal lumineux, doit simplement traduire le fait que l'interaction du cation métallique avec l'étiquette peptidique est insignifiante comparée à celle issue des molécules de tampon dont la concentration, il est vrai, est sans commune mesure supérieure à celle du tag : de l'ordre de 10 mM pour le tampon contre 10 μ M pour le peptide. En revanche, la très forte inhibition de certains tampons, en particuliers le Tris et le PIPES,⁴¹⁴ sur la luminescence du terbium, pourrait, dans notre optique de développer une sonde pro-luminescente, s'avérer un atout, à la condition que l'étape de reconnaissance étiquette/lanthanide(III) soit nettement plus favorable. En outre, pour des applications *in cellulo* futures, le problème de la sélectivité se posera inévitablement, étant donnée la variabilité, en espèces et en concentration, des anions présents dans ce contexte biologique.

⁴¹⁴ Le tampon Tris, utilisé seulement à des fins de comparaison, ne pourra pas être employé lors de l'étape de marquage par photoaffinité car la fonction amine est réactive vis-à-vis des intermédiaires réactifs formés.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

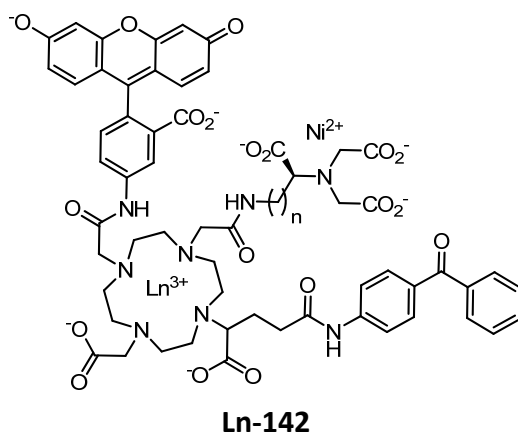
Ainsi, un ligand spécifique du tag peptidique devra être intégré à la structure complexante afin de forcer le centre métallique à s'approcher de l'étiquette. Celle-ci sera alors plus à même d'expulser efficacement les molécules d'eau de la sphère de coordination interne du lanthanide(III) et celles, si possible, du tampon diffusant dans sa sphère externe mais jouant un rôle non négligeable sur l'intensité de sa désactivation radiative.

Tout naturellement, un motif Dpa-Zn²⁺ sélectif du tag poly(Asp)^{264,265} pourra être accroché de façon à obtenir, soit un chélate octa-coordiné (**Tb-140**), soit hepta-coordiné (**Tb-141**). En effet, l'interaction de l'amide portant le groupement Dpa-Zn²⁺ avec le terbium(III) complexe moins fortement le cation trivalent suite à la formation d'un cycle à sept chaînons moins favorable.

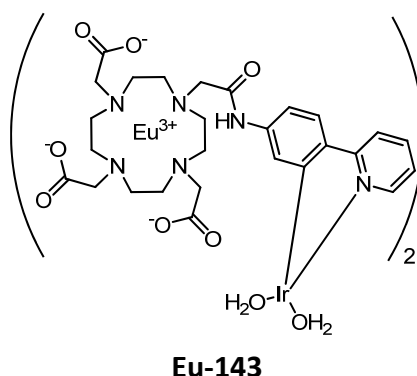


Le couple NTA-Ni²⁺/poly(His) pourrait aussi être appliqué. Dans ce cas, et à la manière du système fluorogène conçu par le groupe de T. Higuchi,²⁶⁰ dès que le Ni(II) est complexé aux résidus imidazole de l'étiquette poly(His), l'état excité du fluorophore, dans ce cas une 7-hydroxycoumarine ou une fluorescéine, peut se désactiver par voie radiative. Il serait donc intéressant d'incorporer un fluorophore à phénol sensibilisant des lanthanides pour l'obtention d'une sonde pro-luminescente. La fluorescéine étant par ailleurs connue pour transférer une partie de son énergie sur les lanthanides émettant dans le proche IR comme l'ytterbium(III), le néodyme(III) ou l'erbium(III)^{53,186} la structure **Ln-142** serait donc envisageable. Le seul inconvénient, inhérent aux lanthanides émettant exclusivement dans le proche IR, demeure la faible brillance du chélate auquel ils sont associés, en dépit d'une antenne possédant un fort coefficient d'absorption molaire ($\epsilon \approx 80\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ à 519 nm, pH 9.5 pour la fluorescéine).

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.



Un autre système potentiellement pro-luminescent impliquant toujours une étiquette poly(His) repose sur le composé hybride lanthanide-iridium suivant (**Eu-143**). En effet il a été montré, d'une part, que les chélates d'iridium permettent une sensibilisation efficace de l'euporium⁴¹⁵ et que d'autre part, la fluorescence du complexe $[\text{Ir}(\text{ppy})(\text{OH}_2)]^+$ est exaltée en présence d'une étiquette poly(His).²⁶³

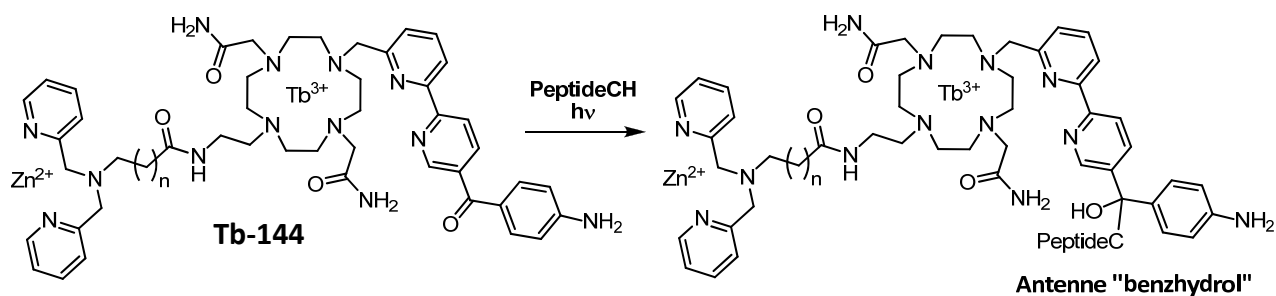


Enfin, il pourrait aussi être intéressant d'étudier si l'antenne dérivée de la benzophénone mais comportant un état de transfert de charge (**Tb-144**), est aussi susceptible de conduire à du photomarquage. C'est certes, peu probable, puisque la photoactivation provient de la transition $n \rightarrow \pi^*$ qui dans le cas de la benzophénone est nettement séparée de la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ plus énergétique (vers 260 nm). En revanche, l'insertion d'une fonction aniline à la place du cycle benzénique, de surcroît conjugué à une bipyridine qui après complexation sur le cation métallique agit comme un groupement électro-attracteur, rapproche ces deux transitions. L'intérêt potentiel réside dans le fait qu'avant l'étape de photomarquage, l'état de transfert de charge, *a priori* trop bas en énergie (toutes les antennes présentant un tel état sont incapables de transférer efficacement leur énergie au Tb^{3+}) pour transférer l'énergie efficacement sur le niveau $^5\text{D}_4$ est rompu par l'insertion du peptide sur le

⁴¹⁵ F.-F. Chen, Z.-Q. Bian, Z.-W. Liu, D.-B. Nie, Z.-Q. Chen and C.-H. Huang, *Inorg. Chem.*, **2008**, *47*, 2507-2513.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

carbonyle. Or, les bipyridines sont connues pour être de bonnes antennes ($\lambda_{\text{exc}} = 310 \text{ nm}$, $\Phi = 14\%$) de ce lanthanide.^{44b}



L'avantage de ce dernier système est qu'il conduit, si le photomarquage fonctionne, à une sonde luminescente initialement silencieuse. De plus la longueur d'onde d'excitation de la bipyridine, bien que toujours énergétique demeure supérieur à 300 nm, ce qui n'est pas le cas du benzhydryl ($\lambda_{\text{exc}} = 230 \text{ nm}$).

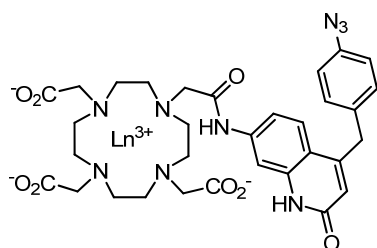
Les résultats du premier axe de recherche dont l'objectif était de mettre à profit l'exaltation de luminescence du lanthanide par expulsion des molécules d'eau par un tag peptidique de reconnaissance se sont révélés peu concluants. C'est pourquoi, dans un second temps, nous avons souhaité étudier des antennes photoréactives alternatives. En particulier des coumarines et des quinolinones photoactivables, *via* un motif azido qui pourrait permettre de différencier, en mode ratiométrique et/ou par simple, de préférence, augmentation du signal de luminescence, le chélate libre ou accroché par liaison covalente issue de la photoactivation. Ces antennes conduisent généralement à des transferts d'énergie sur le lanthanide (Eu^{3+} ou Tb^{3+})^{105d,331b} moins efficaces que ceux observés avec les benzophénones mais les longueurs d'onde d'absorption, avant et après photoactivation, sont nettement moins énergétiques car situées dans l'UV-A ($\approx 330 - 355 \text{ nm}$).

Ainsi, afin de valider cette hypothèse, des complexes simples d'euporium(III) et de terbium(III), *i.e.* dépourvus d'un motif de reconnaissance spécifique comme Dpa-Zn²⁺ ou NTA-Ni²⁺ ont été synthétisés toujours à partir d'une structure de type cyclène. Les différents complexes « azido » s'avèrent pas ou peu luminescents ; de plus, les quelques essais de photomarquage *in vitro* avec un acide aminé modèle, la L-lysine, comportant un résidu amine primaire capable de réagir sur l'intermédiaire nitrène pour former une liaison covalente, se sont elles aussi révélées non concluantes. L'analyse du brut réactionnel par HPLC indique une conversion totale des chélates « azido », ou plutôt une dégradation, le chromatogramme révélant des massifs de pics de très faible intensité.

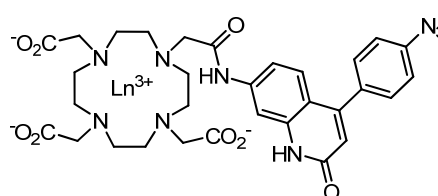
Des études supplémentaires devront être réalisées pour au moins définir un protocole viable de photoactivation et vérifier si les chélates issus du photomarquage présentent réellement une exaltation de luminescence.

Chapitre 4 : Synthèse de sondes lanthanidiques luminescentes pour le marquage covalent de protéines étiquetées.

Enfin, d'autres antennes « azido » peuvent être envisagées comme celles dérivant des quinolinones décrites par les groupes de T.Nagano (Schéma 27, chapitre 3),^{338a} **Ln-145**, ou D.Sames,³⁴⁰ **Ln-146**.



Ln-145



Ln-146

Ces types de sondes ont été conçues et utilisées pour détecter des activités enzymatiques. A la place du motif azoture, un résidu aniline substitué de façon à être reconnu spécifiquement par l'enzyme est présent. Son action sur ce pseudo-substrat restitue l'aniline qui ensuite désactive par PeT l'état excité de l'antenne, faisant chuter le rendement quantique de luminescence.

Dans notre cas, il serait intéressant de déterminer si d'une part, l'azoture d'aryle du complexe **Ln-145** est toujours suffisamment riche en électrons pour désactiver l'antenne par PeT, et que d'autre part si son produit issu du marquage par photoactivation n'interfère plus avec le mécanisme de sensibilisation.

Dans le cas du complexe **Ln-146**, le groupement photoréactif est directement inséré dans la structure aromatique. Cette sonde pourrait donc être appliquée à de la détection en mode ratiométrique puisque le spectre d'absorption, avant et après photomarquage de l'antenne, sera modifié.

Enfin, en parallèle des réactions de photoactivation, le motif azido pourrait aussi être appliqué à des réactions de « click », d'autant que les 3- ou 7-azidocoumarines sont utilisées comme sondes fluorogènes, la formation du cycle triazole exaltant la fluorescence du cœur coumarinique.^{390,391} La sonde lanthanidique serait alors pro-luminescente si cette modification induit aussi une amélioration du transfert d'énergie de la coumarine au cation métallique. Elle pourrait alors être appliquée, dans le contexte des réactions bioorthogonales, comme marqueur *on/off*.

CHAPITRE 5

PARTIE EXPERIMENTALE

I. GENERAL PROCEDURES

Chemicals and Reagents. All solvents were dried following standard procedures: **CH₃CN**: distillation over CaH₂, **DCM** stabilised over amylene: distillation over P₂O₅, **THF** and **Et₂O**: distillation over Na_(s)/benzophenone, **pyridine**: distillation over KOH and kept on BaO, **DMSO**: distillation over CaH₂ and kept on molecular sieves (4 Å), 1,2-Dichloroethane (DCE): distillation over P₂O₅, **N,N-diisopropylethylamine (DIEA)**: distillation then stored on KOH, **triethylamine**: distillation on CaH₂ then stored on KOH or BaO. **DMF** (peptide synthesis grade), **NMP** (peptide synthesis grade), **piperidine** and **polystyrene PHB Wang resin** (1% DVB, 100-200 mesh, loading: 0.9 mmol.g⁻¹) were provided by Iris Biotech GmbH. Anhydrous **DMF** was purchase from Fisher scientific.

Automated solid-phase peptide synthesis was performed with an ABI 433A Peptide Synthesizer from Applied Biosystems using FastMocTM chemistry run and HBTU/HOBt coupling reageny.

Flash column chromatography purifications were performed on Geduran[®] Si 60 silica gel (40-63 µm) from Merck or on Geduran[®] Si 60 silica gel (63-200 µm) from Merck or by neutral or basic aluminium oxide (Brockmann 1, 50-200 µm) from Acros or by an **automated flash purification system** (Biotage[®] Isolera One) using various SNAP flash-chromatography cartridge (10 g, 25 g, 50 g, 100 g, Biotage[®] KP-Sil). **Filtrations** were performed on Celite[®] SDS 545 from Acros. **TLC** was carried out in Hellendahl staining jars (50 x 30 x 90 mm), using Merck DC Kieselgel 60 F-254 aluminium sheets. The spots were visualised by illumination with UV lamp ($\lambda = 254$ nm or 365 nm) and/or staining with KMnO₄ solution and/or ninhydrin solution and/or phosphomolybdic acid solution.

Analytical HPLC was performed on a Thermo Scientific Surveyor Plus instrument equipped with a PDA detector. **Semi-preparative HPLC** was performed on a Thermo Scientific SPECTRASYSTEM liquid chromatography system (P4000) equipped with a UV-visible 2000 detector. The HPLC-gradient grade CH₃CN and CH₃OH were obtained from VWR and *aq.* mobile phases for HPLC was prepared using deionised water purified with a Milli-Q system (purified to 18.2 MΩ.cm). Triethylammonium acetate (TEAA, 2.0 M) and triethylammonium bicarbonate (TEAB, 1.0 M) buffers were prepared from distilled triethylamine and glacial acetic acid or CO₂ gas.

Mass spectra were obtained with a Finnigan LCQ Advantage MAX (ion trap) apparatus equipped with an electrospray (ESI) or APCI source.

Infrared (IR) spectra were recorded with an universal ATR sampling accessory on a Perkin Elmer FT-IR Spectrum 100 spectrometer

^1H , ^{19}F and ^{13}C spectra were recorded on a Bruker DPX 300 (300 MHz for ^1H , 75.4 MHz for ^{13}C and 282.5 MHz for ^{19}F) or 200 (200 MHz for ^1H and 50.2 MHz for ^{13}C) spectrometer (Bruker, Wissembourg, France). Chemical shifts (δ) are expressed in parts per million (ppm) from CDCl_3 ($\delta_{\text{H}} = 7.26$, $\delta_{\text{C}} = 77.16$), $\text{DMSO-}d_6$ ($\delta_{\text{H}} = 2.50$, $\delta_{\text{C}} = 39.50$), CD_3OD ($\delta_{\text{H}} = 3.30$, $\delta_{\text{C}} = 49.00$), D_2O ($\delta_{\text{H}} = 4.79$), $\text{acetone-}d_6$ ($\delta_{\text{H}} = 2.05$, $\delta_{\text{C}} = 29.84$).⁴¹⁶ Coupling constants values are expressed in Hz. The following abbreviations are used for the signals: s (singlet), bs (broad singlet), d (doublet), dd (doublet of doublet), t (triplet), td (doubled triplet), q (quadruplet) and m (multiplet).

II. RP-HPLC METHODS

1 SYSTEMS USED FOR MOLECULES SYNTHESISED IN CHAPTER 2

System A2: RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C_{18} column, 5 μm , 4.6 \times 100 mm) with MeCN and 0.1% aq. trifluoroacetic acid (aq. TFA, 0.1%, v/v, pH 2.2) as eluents [100% TFA (5 min), followed by linear gradient from 0 to 80% (40 min) of MeCN] at a flow rate of 1.0 mL min^{-1} . UV detection was achieved in *MaxPlot* mode.⁴¹⁷ **System B2:** RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C_{18} column, 5 μm , 4.6 \times 100 mm) with MeOH and 0.1% aq. TFA, 0.1% as eluents [90% TFA (5 min), followed by linear gradient from 10 to 90% (40 min) of MeOH] at a flow rate of 1.0 mL min^{-1} . Triple UV detection was achieved at 220, 290 and 320 nm. **System C2:** RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C_{18} column, 5 μm , 4.6 \times 100 mm) with MeOH and triethylammonium acetate buffer (TEAA 25 mM, pH 7.0) as eluents [100% TEAA (10 min), followed by linear gradient from 50 to 100% (25 min) of MeOH] at a flow rate of 1.0 mL min^{-1} . Triple UV detection was achieved at 220, 290 and 345 nm. **System D2:** RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C_{18} column, 5 μm , 4.6 \times 100 mm) with MeCN and aq. TFA, 0.1% as eluents [80% TFA (5 min), followed by linear gradient from 20 to 100% (32 min) of MeCN] at a flow rate of 1.0 mL min^{-1} . Triple UV detection was achieved at 220, 260 and 285 nm. **System E2:** RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C_{18} column, 5 μm , 4.6 \times 100 mm) with MeCN and TEAA (25 mM, pH 7.0) as eluents [100% TEAA (2 min), followed by linear gradient from 0 to 80% (40 min) of MeCN] at a flow rate of 1.0 mL min^{-1} . Dual UV detection was achieved at 254 and 345 nm. **System F2:** semi-preparative RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C_{18} column, 5 μm , 21.2 \times 250 mm) with MeCN and aq. TFA, 0.1% as eluents [80% TFA (5 min), followed by linear gradient from 20 to 60% (13 min) then from 60 to 100% (32 min) of MeCN] at a flow rate of 16.0 mL min^{-1} . Dual UV detection was achieved at 260 and 285 nm. **System G2:** semi-preparative RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C_{18} column, 5 μm , 21.2 \times 250 mm) with MeOH and aq. TFA, 0.1% as eluents [100% TFA (5 min) followed by a linear gradient from 0 to 10% (3 min) then

⁴¹⁶ a) G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw and K. I. Goldberg, *Organometallics*, **2010**, *29*, 2176-2179 ; b) H. E. Gottlieb, V. Kotlyar and A. Nudelman, *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 7512-7515.

⁴¹⁷ Chromatogram at absorbance maximum for each compound. Purity was obtained according to this mode.

from 10 to 90% (40 min) of MeOH] at a flow rate of 14.0 mL min⁻¹. Dual UV detection was achieved at 260 and 285 nm. **System H2:** semi-preparative RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 µm, 10 × 100 mm) with MeCN and triethylammonium bicarbonate buffer (TEAB 50 mM, pH 7.5) as eluents [100% TEAB (5 min) followed by linear gradient from 0 to 80% (80 min) of MeCN] at a flow rate of 4.0 mL min⁻¹. Dual UV detection was achieved at 254 and 345 nm. **System I2:** LC-MS with RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 µm, 2.1 × 150 mm) with MeCN and TEAB (50 mM, pH 7.5) as eluents [95% TEAB (2 min) followed by linear gradient from 5 to 85% (40 min) of MeCN] at a flow rate of 0.25 mL min⁻¹. Dual UV detection was achieved at 220 and 345 nm. ESI-MS detection in the negative mode (full scan, 150-1500 a.m.u., data type: centroid, sheat gas flow rate: 60 arb unit, aux/sweep gas flow rate: 20, spray voltage: 4.5 kV, capillary temp: 270 °C, capillary voltage: -10 V, tube lens offset: -50 V).

2 SYSTEMS USED FOR MOLECULES SYNTHESISED IN CHAPTER 4

System A4: HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 µm, 4.6 × 100 mm) with MeCN and aq. TFA, 0.1% as eluents [100% TFA (2 min), followed by linear gradient from 0 to 100% (33 min) of MeCN] at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. UV detection was achieved in *MaxPlot* mode. Purity was obtained according to this mode. **System B4:** semi-preparative RP-HPLC (Varian Kromasil C₁₈ column, 10 µm, 21.2 × 250 mm) with MeCN and aq. TFA, 0.1% as eluents [90% TFA (2 min), followed by linear gradient from 10 to 40% (10 min) and from 40 to 100% (120 min) of MeCN] at a flow rate of 20.0 mL min⁻¹. Dual UV detection was achieved at 280 and 320 nm. **System C4:** semi-preparative RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 µm, 21.2 × 250 mm) with MeCN and aq. TFA, 0.1% as eluents [100% TFA (2 min), followed by linear gradient from 0 to 20% (8 min), then from 20 to 30% (10 min) and from 30 to 100% (35 min) of MeCN] at a flow rate of 16.0 mL min⁻¹. Dual UV detection was achieved at 220 and 280 nm. **System D4:** semi-preparative RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 µm, 21.2 × 250 mm) with MeCN and aq. TFA, 0.1% as eluents [100% TFA (2 min), followed by linear gradient from 0 to 25% (5 min), then no gradient (3 min), followed by linear gradient from 25 to 45% (20 min) and from 45 to 100% (15 min) of MeCN] at a flow rate of 16.0 mL min⁻¹. Dual UV detection was achieved at 240 and 330 nm. **System E4:** semi-preparative RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 µm, 21.2 × 250 mm) with MeCN and aq. TFA, 0.1% as eluents [100% TFA (2 min), followed by linear gradient from 0 to 25% (5 min), then no gradient (3 min), followed by linear gradient from 25 to 30% (10 min) and from 30 to 50% (20 min) of MeCN] at a flow rate of 16.0 mL min⁻¹. Dual UV detection was achieved at 240 and 330 nm. **System F4:** semi-preparative RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 µm, 21.2 × 250 mm) with MeCN and aq. TFA, 0.1% as eluents [90% TFA (2 min), followed by linear gradient from 10 to 35% (25 min) and from 35 to 100% (13 min) of MeCN] at a flow rate of 16.0 mL min⁻¹. Dual UV detection was achieved at 260 and 320 nm. **System G4:** semi-preparative RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 µm, 21.2 × 250 mm) with MeCN

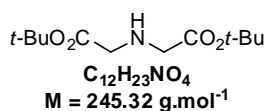
and aq. TFA, 0.1% as eluents [100% TFA (7 min), followed by linear gradient from 0 to 15% (15 min) and from 15 to 20% (10 min) of MeCN] at a flow rate of 16.0 mL min⁻¹. Dual UV detection was achieved at 260 and 320 nm. **System H4**: semi-preparative RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 μm, 21.2 × 250 mm) with MeCN and aq. TFA, 0.1% as eluents [100% TFA (5 min), followed by linear gradient from 0 to 20% (10 min) and from 20 to 40% (20 min) of MeCN] at a flow rate of 16.0 mL min⁻¹. Dual UV detection was achieved at 260 and 320 nm. **System I4**: semi-preparative RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 μm, 10 × 250 mm) with MeCN and aq. TFA, 0.1% as eluents [100% TFA (2 min), followed by linear gradient from 0 to 15% (3 min), then from 15 to 25% (5 min) and from 25 to 45% (20 min) of MeCN] at a flow rate of 5.0 mL min⁻¹. Dual UV detection was achieved at 260 and 320 nm. **System J4**: semi-preparative RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 μm, 21.2 × 250 mm) with MeCN and aq. TFA, 0.1% as eluents [100% TFA (5 min), followed by linear gradient from 0 to 15% (5 min) and from 15 to 35% (20 min) of MeCN] at a flow rate of 16.0 mL min⁻¹. Dual UV detection was achieved at 280 and 330 nm. **System K4**: semi-preparative RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 μm, 10 × 250 mm) with MeCN and aq. TFA, 0.1% as eluents [100% TFA (5 min), followed by linear gradient from 0 to 20% (5 min) and from 20 to 40% (20 min) of MeCN] at a flow rate of 5.0 mL min⁻¹. UV detection was achieved at 330 nm. **System L4**: semi-preparative RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 μm, 21.2 × 250 mm) with MeCN and aq. TFA, 0.1% as eluents [100% TFA (5 min), followed by linear gradient from 0 to 20% (5 min), then from 20 to 22% (2 min) and from 22 to 32% (20 min) of MeCN] at a flow rate of 16.0 mL min⁻¹. Dual UV detection was achieved at 276 and 330 nm. **System M4**: semi-preparative RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 μm, 21.2 × 250 mm) with MeCN and aq. TFA, 0.1% as eluents [100% TFA (4 min), followed by linear gradient from 0 to 15% (3 min), then from 15 to 19% (2 min), from 19 to 32% (13 min) and from 32 to 100% (8 min) of MeCN] at a flow rate of 16.0 mL min⁻¹. UV detection was achieved at 345 nm. **System N4**: semi-preparative RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 μm, 21.2 × 250 mm) with MeCN and aq. TFA, 0.1% as eluents [100% TFA (5 min), followed by linear gradient from 0 to 20% (5 min), then from 20 to 35% (15 min), from 35 to 39% (2 min) and from 39 to 100% (8 min) of MeCN] at a flow rate of 16.0 mL min⁻¹. UV detection was achieved at 280 nm. **System O4**: semi-preparative RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 μm, 21.2 × 250 mm) with MeCN and deionised water as eluents [100% H₂O (2 min), followed by linear gradient from 0 to 15% (10 min), then from 15 to 30% (28 min) and from 30 to 50% (20 min) of MeCN] at a flow rate of 16.0 mL min⁻¹. Dual UV detection was achieved at 260 or 290 and 320 nm. **System P4**: semi-preparative RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 μm, 10 × 100 mm) with MeCN and deionised water as eluents [100% H₂O (2 min), followed by linear gradient from 0 to 15% (10 min), then from 15 to 30% (28 min) and from 30 to 50% (20 min) of MeCN] at a flow rate of 4.0 mL min⁻¹. Dual UV detection was achieved at 260 and 280 nm. **System Q4**: semi-preparative RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 μm, 10 × 250 mm) with MeCN and aq. AcOH, 0.01% as eluents [100% AcOH (2 min), followed by linear

gradient from 0 to 20% (10 min) and from 20 to 50% (10 min) of MeCN] at a flow rate of 5.0 mL min⁻¹. Dual UV detection was achieved at 280 and 310 nm. **System R4**: semi-preparative RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 μm, 10 × 250 mm) with MeCN and aq. AcOH, 0.01% as eluents [85% AcOH (1 min), followed by linear gradient from 15 to 30% (10 min) and from 30 to 100% (20 min) of MeCN] at a flow rate of 5.0 mL min⁻¹. Dual UV detection was achieved at 270 and 310 nm. **System S4**: semi-preparative RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 μm, 21.2 × 250 mm) with MeCN and aq. AcOH, 0.01% as eluents [100% AcOH (5 min), followed by linear gradient from 0 to 10% (10 min) and from 10 to 100% (25 min) of MeCN] at a flow rate of 16.0 mL min⁻¹. Dual UV detection was achieved at 280 and 310 nm. **System T4**: semi-preparative RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 μm, 10 × 250 mm) with MeCN and aq. AcOH, 0.01% as eluents [100% AcOH (5 min), followed by linear gradient from 0 to 10% (10 min) and from 10 to 100% (15 min) of MeCN] at a flow rate of 5.0 mL min⁻¹. Dual UV detection was achieved at 270 and 310 nm. **System U4**: semi-preparative RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 μm, 21.2 × 250 mm) with MeCN and aq. TFA, 0.1% as eluents [90% TFA (2 min), followed by linear gradient from 10 to 25% (10 min) then from 25 to 45% (10 min) of MeCN] at a flow rate of 16.0 mL min⁻¹. Dual UV detection was achieved at 280 and 310 nm. **System V4**: semi-preparative RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 μm, 10 × 250 mm) with MeCN and aq. AcOH, 0.01% as eluents [100% AcOH (5 min), followed by linear gradient from 0 to 30% (30 min) of MeCN] at a flow rate of 5.0 mL min⁻¹. Dual UV detection was achieved at 280 and 310 nm. **System W4**: semi-preparative RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 μm, 10 × 250 mm) with MeCN and aq. AcOH, 0.01% as eluents [100% AcOH (5 min), followed by linear gradient from 0 to 10% (10 min) then from 10 to 20% (20 min) of MeCN] at a flow rate of 5.0 mL min⁻¹. Dual UV detection was achieved at 280 and 310 nm. **System X4**: semi-preparative RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 μm, 10 × 250 mm) with MeCN and aq. AcOH, 0.01% as eluents [100% AcOH (5 min), followed by linear gradient from 0 to 10% (2 min) then from 10 to 25% (15 min) of MeCN] at a flow rate of 5.0 mL min⁻¹. Dual UV detection was achieved at 280 and 310 nm. **System Y4**: semi-preparative RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 μm, 10 × 250 mm) with MeCN and aq. AcOH, 0.01% as eluents [100% AcOH (5 min), followed by linear gradient from 0 to 10% (2 min) then from 10 to 30% (20 min) of MeCN] at a flow rate of 5.0 mL min⁻¹. UV detection was achieved at 345 nm. **System Z4**: semi-preparative RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 μm, 10 × 250 mm) with MeCN and aq. AcOH, 0.01% as eluents [100% AcOH (4 min), followed by linear gradient from 0 to 15% (3 min) then from 15 to 19% (2 min) and from 19 to 29% (10 min) of MeCN] at a flow rate of 5.0 mL min⁻¹. UV detection was achieved at 345 nm. **System AA4**: semi-preparative RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 μm, 10 × 100 mm) with MeCN and aq. AcOH, 0.01% as eluents [100% AcOH (2 min), followed by linear gradient from 0 to 20% (5 min) of MeCN and from 20 to 35% (15 min) of MeCN] at a flow rate of 5.0 mL min⁻¹. UV detection was achieved at 265 nm.

III. MOLECULES FROM CHAPTER 2

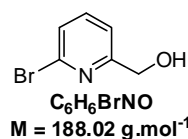
1 SYNTHESIS OF BIS-PYRIDINYLPYRAZINE LIGAND 104

Di-*tert*-butyl iminodiacetate H-1



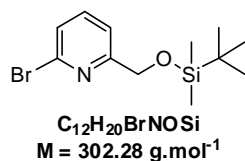
Amine **H-1** was synthesised following a literature procedure.²¹³

2-Bromo-6-hydroxymethyl-pyridine B-2



Compound **B-2** was synthesised from commercial 2,6-dibromopyridine according to the procedure developed by Cai et al.²¹⁰

2-Bromo-6-*tert*-butyldimethylsilyloxymethyl-pyridine C-2



Alcohol **B-2** (2.12 g, 11.3 mmol) was dissolved in dry DMF (10.0 mL). Imidazole (3.08 g, 45.2 mmol) and TBS-Cl (2.04 g, 13.5 mmol) were sequentially added and the resulting reaction mixture was stirred at RT for 25 min. Thereafter, the reaction mixture was extracted with Et₂O (2

× 30 mL). The organic phase was washed with deionised water (3 × 5 mL), dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The resulting yellow oily residue was purified by flash-chromatography on a silica gel column with a step gradient of AcOEt (1-3%) in cyclohexane. The desired TBS ether **C-2** was obtained as a viscous turbid liquid (3.01 g, yield 88%).

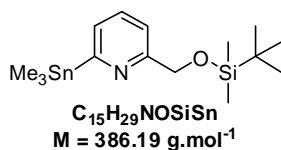
R_f(cyclohexane-EtOAc, 99/1, v/v) 0.15.

δ_H (300 MHz, CDCl₃) 7.57 (1H, t, *J* 7.7), 7.47 (1H, dd, *J* 7.7 and 0.9), 7.33 (1H, dd, *J* 7.7 and 0.8), 4.80 (2H, s), 0.95 (9H, s), 0.11 (6H, s).

δ_C (75.4 MHz, CDCl₃) 163.3, 141.0, 139.1, 126.1, 118.7, 65.5, 26.0, 18.4, -5.3.

MS (ESI⁺): *m/z* 302.07 and 304.00 [M + H]⁺.

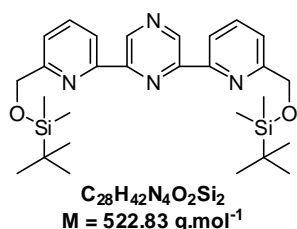
2-Trimethyltin-6-*tert*-butyldimethylsilyloxymethyl-pyridine D-2



To a solution of silyl ether **C-2** (2.0 g, 6.62 mmol) in dry THF (14.0 mL) was added dropwise, under an Ar atmosphere at -78°C , a solution of *n*-BuLi in hexane (1.4 M, 5.2 mL, 7.3 mmol). The dark red solution was stirred during 90 min at -78°C before adding a solution of trimethyltin chloride (1.38 g, 6.95 mmol) in dry THF (14.0 mL). The reaction mixture was left running at RT for 4h under an Ar atmosphere. Thereafter, the mixture was evaporated to dryness and the resulting yellow-brown paste was triturated twice with Et_2O and filtrated. The filtrate was evaporated and stannane derivative **D-2** was obtained as an orange oil and used in the next step without further purification (2.40 g, yield 89%).

δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 7.53 (1H, t, J 7.6), 7.35 (1H, d, J 7.3), 7.29 (1H, d, 7.2), 4.85 (2H, s), 0.96 (9H, s), 0.32 (9H, s), 0.12 (6H, s).

2,6-bis-(*tert*-Butyldimethylsilyloxymethyl-pyridin2-yl)-pyrazine E-2



To a xylene solution (6 mL) deaerated with argon were added $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (87 mg, 0.08 mmol), 2,6-dichloropyrazine (224 mg, 1.50 mmol) and trimethyltin derivative **D-2** (1.27 g, 3.30 mmol). The resulting reaction mixture was heated at 110°C overnight. The desired compound as well as the monocoupling derivative were detected by NMR analyses. Further amounts of stannane (270 mg, 0.70 mmol) and $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (12 mg, 0.01 mmol) were therefore added and the mixture was left running 24h at 110°C . The reaction mixture was filtrated on a Celite[®] 545 pad. After solvent removal, a brown solid (1.25 g) was recovered. Purification of this crude product was achieved by flash-chromatography on a silica gel column with a step gradient of EtOAc (2-4%) in cyclohexane as the mobile phase to give bis-pyridylpyrazine derivative **E-2** as a white foam (520 mg, yield 50%).

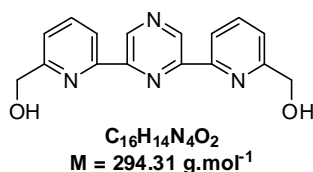
R_f (cyclohexane-EtOAc, 96/4, v/v) 0.24.

δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 9.62 (2H, s), 8.39 (2H, d, J 7.8), 7.89 (2H, t, J 7.8), 7.59 (2H, d, J 7.7), 4.95 (4H, s), 0.99 (18H, s), 0.17 (12H, s).

δ_{C} (75.4 MHz, CDCl_3) 161.4, 153.4, 149.7, 142.7, 137.7, 120.9, 119.7, 66.3, 26.1, 18.5, -5.2.

MS (ESI+): m/z 523.33 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

2,6-bis-(Hydroxymethyl-pyridin2-yl)-pyrazine F-2



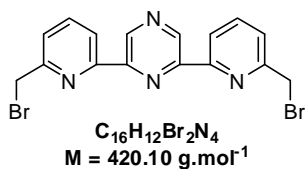
To a solution of bis-silyl ether **E-2** (547 mg, 1.05 mmol) in THF (10 mL) was added a 1.0 M solution of TBAF in THF (2.4 mL, 2.41 mmol). The resulting reaction mixture was stirred at RT for 3h and concentrated under reduced pressure to give an orange-brown viscous oily residue. This crude product was first triturated in cyclohexane and then in a mixture of aq. TFA 0.1% and MeOH (1/1, v/v) to give bis-alcohol **F-2** as a white solid which was dried by lyophilisation (244 mg, yield 79%).

δ_H (300 MHz, DMSO- d_6) 9.57 (2H, s), 8.45 (2H, d, J 7.7), 8.06 (2H, t, J 7.8), 7.63 (2H, d, J 7.6), 5.58 (2H, t, J 5.8), 4.71 (4H, d, J 5.2).

δ_C (75.4 MHz, DMSO- d_6) 162.2, 152.3, 149.1, 142.1, 138.2, 121.6, 119.5, 64.3.

MS (ESI+): m/z 295.20 [$M + H$] $^+$.

2,6-bis-(Bromomethyl-pyridin2-yl)-pyrazine 105



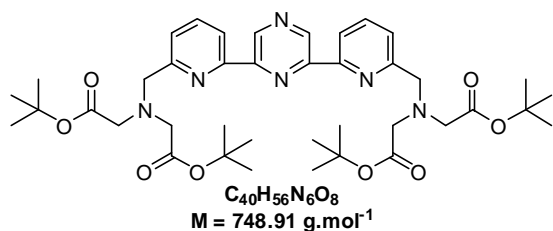
PBr_3 (0.29 mL, 3.1 mmol) was added in dry DMF (10 mL) under an Ar atmosphere and the resulting solution was cooled to 0 °C. Bis-alcohol **F-2** (303 mg, 1.03 mmol) previously dissolved in dry DMF (10 mL) was added to the PBr_3 solution. The resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 4h. After DMF removal under high vacuum, the resulting residue was diluted in CH_2Cl_2 (50 mL) and washed with aq. sat. $NaHCO_3$ (2 × 30 mL). The aq. phase was then re-extracted with CH_2Cl_2 (30 mL). The organic phases were combined and washed with brine (40 mL), dried over anhydrous $MgSO_4$, filtrated and concentrated. A pale brown solid was obtained. The compound was used in the next step without further purification (410 mg, yield 95%).

R_f (cyclohexane-EtOAc, 9/1, v/v) 0.20.

δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) 9.71 (2H, s), 8.45 (2H, dd, J 7.7 and 0.8), 7.90 (2H, t, J 7.9), 7.55 (2H, dd, J 7.7 and 0.8), 4.67 (4H, s).

δ_C (75.4 MHz, $CDCl_3$) 156.9, 154.2, 149.1, 143.3, 138.2, 124.3, 120.7, 33.9.

Full-protected symmetrical bis-pyridinylpyrazine ligand **A-4**



To a solution of di-brominated derivative **105** (157 mg, 0.37 mmol) and NaI (61 mg, 0.41 mmol) in dry DMF (8 mL) were added DIEA (0.65 mL, 3.7 mmol) and secondary amine **H-1** (200 mg, 0.81 mmol). The reaction mixture was stirred at RT for 6h and DMF was removed under

high vacuum. The resulting residue was dissolved in CH_2Cl_2 (50 mL) and the organic phase was washed with an aq. sat. $NaHCO_3$ solution (3×20 mL). The aq. phase was re-extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic phases were washed with brine, dried over anhydrous $MgSO_4$, filtrated and evaporated to dryness. The resulting brown viscous oily residue was purified by flash-chromatography on a silica gel column with a step gradient of MeOH (0-5%) in CH_2Cl_2 to afford *tert*-butyl ester **A-4** as a yellow oil (199 mg, yield 64%).

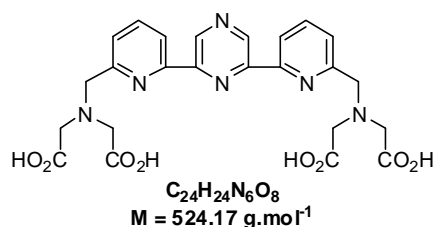
R_f (DCM-MeOH, 95/5, v/v) 0.30.

δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) 9.66 (2H, s), 8.42 (2H, d, J 7.8), 7.87 (2H, t, J 7.8), 7.73 (2H, d, J 7.7), 4.15 (4H, s), 3.56 (8H, s), 1.48 (36H, s).

δ_C (75.4 MHz, $CDCl_3$) 170.7, 159.3, 153.6, 149.7, 142.8, 137.7, 124.1, 119.9, 81.2, 59.7, 55.9, 28.3.

MS (ESI+): m/z 749.20 $[M + H]^+$, 771.27 $[M + Na]^+$ and 787.33 $[M + K]^+$.

Bis-pyridinylpyrazine ligand **104**



Tetrakis-*tert*-butyl ester **A-4** (200 mg, 0.27 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (10 mL) and deionised water (0.5 mL) and cooled to 0 °C. TFA (10 mL) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 5h. Thereafter, the mixture was evaporated to dryness and the residue was co-evaporated thrice with cyclohexane

and finally triturated with Et_2O to give a pale brown powder. This solid was diluted in deionised water and lyophilised. A white amorphous powder was obtained (170 mg). A batch of 100 mg was purified by flash-chromatography on a RP- C_{18} silica gel column with a step gradient of MeOH (0-30%) in aq. TFA 0.1%. The product-containing fractions were lyophilised to afford the TFA salt of ligand **104** as a pale yellow solid (40 mg). UV-vis titration experiments gave an average value of 0.5 molecule of TFA per molecule of ligand (yield 44%).

δ_H (300 MHz, $DMSO-d_6$) 9.56 (2H, s), 8.48 (2H, d, J 7.5), 8.06 (2H, t, J 7.8), 7.69 (2H, d, J 7.3), 4.17 (4H, s), 3.64 (8H, s).

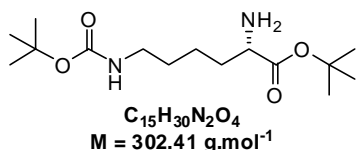
δ_C (75.4 MHz, $DMSO-d_6$) 172.0, 152.6, 149.0, 142.2, 138.4, 124.3, 120.0, 59.0, 54.4.

MS (ESI+): m/z 525.27 $[M + H]^+$.

HPLC (system B2): $t_R = 13.8$ min, purity 93%.

2 SYNTHESIS OF NON-SYMMETRICAL BIS-PYRIDINYLPYRAZINE LIGAND 106

H-L-Lys(Boc)-Ot-Bu D-3



(a) Fmoc-L-Lys(Boc)-Ot-Bu: Fmoc-L-Lys(Boc)-OH (1.0 g, 2.13 mmol) was dissolved in *tert*-butanol (8 mL) and DMAP (78 mg, 0.64 mmol) and Boc₂O (932 mg, 4.27 mmol) were sequentially added. The resulting reaction mixture was stirred at 35 °C

under an Ar atmosphere for 22h. Thereafter, the reaction mixture was diluted in EtOAc (30 mL) and the organic phase was washed with a 1.0 M aq. KHSO₄ (2 × 10 mL) and a 5% aq. NaHCO₃ (2 × 10 mL). The aq. phases were collected and re-extracted with CH₂Cl₂ (2 × 30 mL). The combined organic phases were washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄, filtrated and evaporated to dryness. The resulting yellow foam was purified by flash-chromatography on a silica gel column with a mixture cyclohexane-EtOAc (8/2, v/v). The desired full-protected lysine derivative was obtained as a white solid (750 mg, yield 67%).

R_f (cyclohexane-EtOAc, 8/2, v/v) 0.24.

δ_H (300 MHz, CDCl₃) 7.77 (2H, d, *J* 7.4), 7.61 (2H, d, *J* 7.4), 7.40 (2H, t, *J* 7.4), 7.32 (2H, t, *J* 7.4), 5.36 (1H, bs), 4.55 (1H, bs), 4.41-4.35 (2H, m), 4.28-4.19 (2H, m), 3.15-3.05 (2H, m), 1.90-1.30 (24H, m).

δ_C (75.4 MHz, CDCl₃) 171.7, 156.1, 156.0, 144.1, 144.0, 141.4, 127.8, 127.2, 125.3, 120.1, 82.3, 67.0, 54.3, 47.3, 40.3, 32.6, 29.7, 28.5, 28.1, 22.4.

MS (ESI⁺): *m/z* 525.00 [M + H]⁺, 541.87 [M + H₂O]⁺ (water cluster formed during the ionisation process) and 547.20 [M + Na]⁺, calcd for C₃₀H₄₀N₂O₆: 524.65.

(b) H-L-Lys(Boc)-Ot-Bu: Fmoc-L-Lys(Boc)-Ot-Bu (744 mg, 1.42 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (12 mL) and cooled to 0 °C. *N,N*-Diethylamine (2.2 mL, 21.3 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. After solvent removal under reduced pressure, purification by flash-chromatography on a silica gel column with cyclohexane/EtOAc (8/2, v/v) followed by CH₂Cl₂/MeOH 95/5, v/v) yielded the compound H-L-Lys(Boc)-Ot-Bu as a pale brown oil (404 mg, yield 94%).

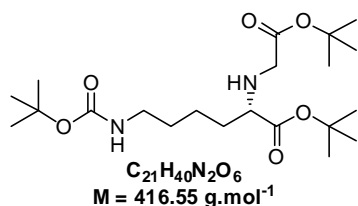
R_f (DCM-MeOH, 95/5, v/v) 0.28.

δ_H (300 MHz, CDCl₃) 4.54 (1H, bs), 3.29 (1H, dd, *J* 7.2 and 5.4), 3.16-3.06 (2H, m), 1.76-1.30 (24H, m).

δ_C (75.4 MHz, CDCl₃) 175.6, 156.1, 81.1, 55.0, 40.5, 34.7, 30.0, 28.6, 28.2, 23.0.

MS (ESI⁺): *m/z* 303.12 [M + H]⁺.

tert-Butylacetate-L-Lys(Boc)-Ot-Bu E-3



H-L-Lys(Boc)-OH (400 mg, 1.32 mmol) and anhydrous K_2CO_3 (914 mg, 6.61 mmol) were dissolved in dry MeCN (8 mL) and *tert*-butylbromoacetate (195 μ L, 1.32 mmol) was added. After heating under reflux for 5h, a further amount of *tert*-butylbromoacetate (40 μ L, 0.26 mmol) was added. The reaction

mixture was stirred at RT overnight. The suspension was filtrated and the filtrate was evaporated. The resulting residue was purified by flash-chromatography on a silica gel column with a step gradient of EtOAc (10-20%) in cyclohexane. Desired secondary amine **E-3** was obtained as a colourless oil (400 mg, yield 72%).

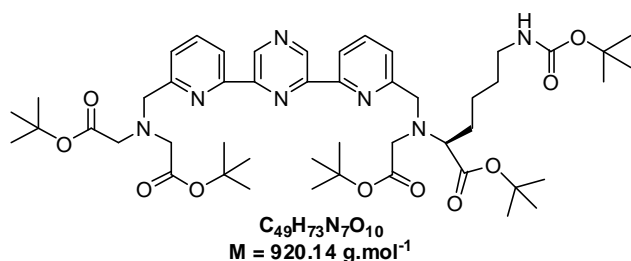
R_f (cyclohexane-EtOAc, 7/3, v/v) 0.33.

δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) 4.55 (1H, bs), 3.32 (1H, d, J 17.0), 3.21 (1H, d, J 17.0), 3.15-3.06 (3H, m), 1.70-1.55 (2H, m), 1.55-1.35 (31H, m).

δ_C (75.4 MHz, $CDCl_3$) 174.0, 171.1, 156.0, 81.3, 61.2, 50.0, 40.4, 33.0, 29.9, 28.5, 28.2, 23.0.

MS (ESI+): m/z 417.13 $[M + H]^+$.

Full-protected non-symmetrical bis-pyridinylpyrazine ligand B-4



To a solution of di-brominated derivative **105** (122 mg, 0.29 mmol) in dry DMF (5 mL) were introduced NaI (25 mg, 0.17 mmol), anhydrous K_2CO_3 (601 mg, 4.35 mmol) and secondary amine **E-3** (133 mg, 0.32 mmol). The resulting reaction mixture

was stirred at RT for 9h. Thereafter symmetrical secondary amine **H-1** was added in several portions: 21.0 mg (0.09 mmol), 21.0 mg (0.09 mmol) after 27h and 31.0 mg (0.12 mmol) after two days. The reaction mixture was finally stirred at RT for additional 24h after the addition of the third aliquot of **H-1**. Thereafter DMF was evaporated and the residue was diluted in a mixture of cyclohexane/EtOAc (1/1, v/v) which was filtrated. The filtrate was evaporated to dryness and the resulting orange viscous oily residue was firstly purified by flash-chromatography on a silica gel column cyclohexane/EtOAc (6/4, v/v). Thereafter, a second purification was achieved by semi-preparative RP-HPLC (system F2). The product-containing fractions were lyophilised to give the desired ligand as a brown foam (47 mg, yield 18%).

δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) 9.67 (1H, s), 9.64 (1H, s), 8.49 (1H, d, J 7.7), 8.40 (1H, d, J 7.6), 7.93 (1H, t, J 7.8), 7.90 (1H, t, J 7.8), 7.81 (1H, d, J 7.6), 7.70 (1H, d, J 7.5), 4.63 (1H, bs), 4.23 (2H, s), 4.20 (1H, d, J 15.2), 4.10 (1H, d, J 15.3), 3.83 (4H, s), 3.54 (2H, s), 3.38 (1H, t, J 7.4), 3.07 (2H, bs), 1.77-1.65 (2H, m), 1.58-1.30 (49 H, m).

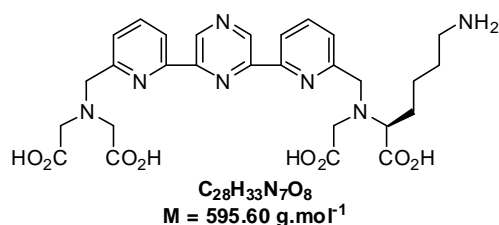
Chapitre 5 : Partie expérimentale.

δ_C (75.4 MHz, CDCl₃) 172.3, 170.9, 168.7, 168.6, 159.5, 156.1, 155.7, 153.7, 153.0, 149.8, 149.4, 142.7, 142.3, 138.5, 138.0, 125.1, 124.3, 120.9, 120.1, 82.8, 81.7, 81.3, 79.1, 64.4, 58.8, 58.2, 55.1, 53.5, 40.4, 29.7, 29.6, 28.5, 28.4, 28.2, 23.5.

MS (ESI+): m/z 920.33 [M + H]⁺, 942.27 [M + Na]⁺ and 958.33 [M + K]⁺.

HPLC (system C2): t_R = 26.7 min.

Non-symmetrical bis-pyridinylpyrazine ligand **106**



Full-protected **B-4** (60 mg, 66 μmol) was dissolved in a mixture of CH₂Cl₂ (1.9 mL) and deionised water (90 μL) and cooled to 0 °C. Then, TFA (1.9 mL) was added and the resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 7h. The reaction was checked

for completion by RP-HPLC (system B2). Further amount of TFA (0.3 mL) was added and the reaction mixture was stirred overnight. Thereafter, the reaction mixture was evaporated to dryness and the resulting brownish paste was purified by semi-preparative RP-HPLC (system G2). The product-containing fractions were lyophilised to afford the TFA salt of non-symmetrical bis-pyridinylpyrazine ligand **106** as a brown amorphous powder (26.3 mg). UV-vis titration experiments gave an average value of 1.3 molecules of TFA per molecule of ligand (yield 54%).

δ_H (300 MHz, DMSO-*d*₆+D₂O) 9.55 (1H, s), 9.53 (1H, s), 8.47 (1H, d, *J* 7.2), 8.44 (1H, d, *J* 7.2), 8.05 (1H, t, *J* 7.7), 8.03 (1H, t, *J* 7.7), 7.73 (1H, d, *J* 7.7), 7.68 (1H, d, *J* 7.6), 4.19 (2H, s), 4.13 (1H, d, *J* 15.5), 4.03 (1H, d, *J* 15.3), 3.67 (4H, s), 3.55 (2H, s), 3.39 (1H, t, *J* 7.3), 2.77-2.69 (2H, m), 1.74-1.64 (2H, m), 1.56-1.43 (4H, m).

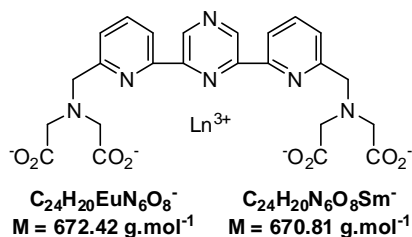
δ_C (75.4 MHz, DMSO-*d*₆+D₂O) 174.1, 172.7, 172.1, 159.8, 158.5, 152.6, 152.5, 149.1, 149.0, 142.1, 138.3, 138.2, 124.3, 123.9, 119.9, 119.8, 63.2, 59.0, 57.4, 54.4, 52.6, 38.7, 29.0, 26.8, 22.8.

MS (ESI+): m/z 596.27 [M + H]⁺.

HPLC (system B2): t_R = 13.7 min, purity 92%.

3 SYNTHESIS OF Ln(III) CHELATES

Eu(III) and Sm(III) symmetrical chelates



Europium chelate: Bis-pyridinylpyrazine ligand **104** (TFA salt, 70 mg, 48 μmol) was dissolved in deionised water (1 mL) and NaHCO_3 was added to adjust the pH of the medium to approximately 7.5. Then, $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (43 mg, 120 μmol) was added and the resulting reaction mixture was stirred at RT for 1h. Thereafter, the crude Eu(III) complex was purified by flash-chromatography on a RP- C_{18} silica gel column with deionised water. The product-containing fractions were lyophilised to afford desired Eu(III) chelate **Eu-104** in a pure form as a white solid (Na salt, 34.3 mg, 49.3 μmol , quantitative yield).

MS (ESI-): m/z 671.20 and 673.20 $[\text{M} - \text{H}]^-$.

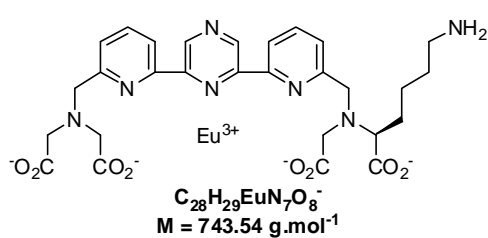
HPLC (system C2): $t_R = 8.4$ min, purity 100%.

Samarium chelate: Bis-pyridinylpyrazine **104** (TFA salt, 3.4 mg, 5.8 μmol) was dissolved in 0.1 M aq. NaHCO_3 (200 μL , pH 8.7). Thereafter, a 41 mM aq. SmCl_3 solution (143 μL , 6.0 μmol) was added and the resulting reaction mixture was stirred at RT for 1h. Thereafter, the reaction mixture was purified by flash-chromatography on a RP- C_{18} silica gel column with deionised water. The product-containing fractions were lyophilised to afford desired Sm(III) chelate **Sm-104** in a pure form as a white amorphous powder (Na salt, 3.7 mg, 5.3 μmol , yield 92%).

MS (ESI-): m/z 667.33, 669.33, 672.40, 674.20 $[\text{M} - \text{H}]^-$.

HPLC (system C2): $t_R = 11.3$ min.

Eu(III) non-symmetrical chelate Eu-106



This complex was prepared and purified according to the same procedure used **Eu-104**, and obtained as a pale brown amorphous powder (Na salt, 6.3 mg, 8.2 μmol , yield 78%).

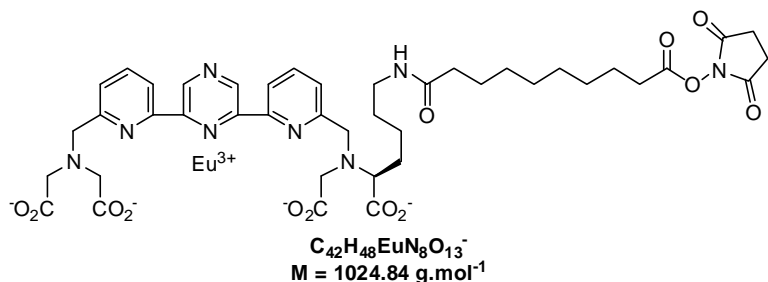
MS (ESI+): m/z 744.07 and 746.13 $[\text{M} + \text{H}]^+$; MS (ESI-): m/z 742.20 and 744.13 $[\text{M} - \text{H}]^-$ and 855.87 and

857.87 $[\text{M} + \text{TFA} - \text{H}]^-$.

HPLC (system C2): $t_R = 5.2$ min, purity 98%.

4 ACTIVATION OF Eu(III) NON-SYMMETRICAL CHELATE **Eu-106**

DSSEB activation of Eu(III) non-symmetrical chelate **A-7**



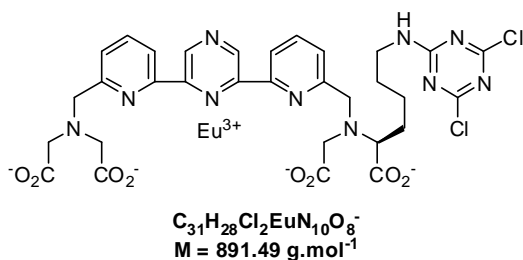
To a solution of DSSEB reagent (0.55 mg, 1.4 μmol) in DMSO (50 μL) was added at RT, every 30 min, 10 μL of a mixture containing **Eu-106** (1.0 mg, 1.3 μmol) and Et_3N (2 μL) in DMSO (98 μL). After each addition, the

reaction mixture was vortexed and finally left at RT for 45 min. The reaction was checked for completion by LC-MS (system I2). Crude NHS **A-7** was stored at 4 °C and used in the next bioconjugation step without further purification.

MS (ESI-): m/z 1023.31 and 1025.29 [$\text{M} - \text{H}$] $^-$.

HPLC (system C2): $t_R = 16.2$ min.

Triazine activation of Eu(III) non-symmetrical chelate **C-7**



Eu-106 (1.0 mg, 1.3 μmol) was dissolved in 0.1 M aq. NaHCO_3 (200 μL , pH 8.7). Thereafter, a 13 mM cyanuric chloride solution in HPLC-grade acetone (100 μL , 1.3 μmol) was added at 0 °C. The resulting reaction mixture was stirred at 0 °C for 4 h. The reaction was checked for completion by ESI-MS.

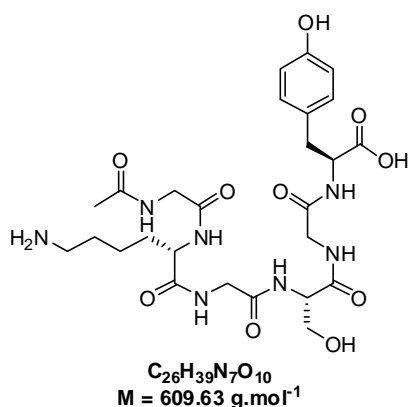
Crude activated Eu(III) chelate **C-7** was used in the next bioconjugation step without further purification.

MS (ESI-): m/z 891.07 [$\text{M} - \text{H}$] $^-$.

HPLC (system E2): $t_R = 13.5$ min.

5 PEPTIDE SYNTHESIS

Ac-Gly-Lys-Gly-Ser-Gly-Tyr-OH **107**



The synthesis of hexa-peptide **107** was carried out on an Applied Biosystems 433A peptide synthesizer using the standard Fmoc/tBu chemistry and the Wang resin (Iris Biotech, loading 0.9 mmol/g) on a scale of 0.1 mmol. Coupling reactions were performed with commercial Fmoc-protected amino acids from Iris Biotech (10 equiv.) and HBTU (10 equiv.), HOBT (10 eq) and DIEA (30 eq) in peptide-grade DMF. The resin loading with the first Fmoc-protected amino acid (10 eq) was performed with *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC, 10 equiv.) and DMAP (0.036 eq) in a mixture of DCM-NMP (1/1, v/v). Final acetylation of the free amino group from the *N*-terminal side of hexa-peptide was achieved by treatment with Ac₂O (10 eq), DIEA (10 eq) and DMAP (0.1 eq) in NMP for 90 min. The completion of reaction was also checked by the Kaiser ninhydrin test (negative after this treatment) and the resin was washed with NMP (3 × 2 mL), MeOH (3 × 2 mL) and CH₂Cl₂ (3 × 2 mL). A pre-cooled TFA solution (4 mL for 250 mg of resin) containing triisopropylsilane (TIPS, 2.5%, v/v) and deionised water (2.5%, v/v) was added to the resin. After 3h of stirring, the resin was filtered and washed with TFA. The filtrate was evaporated to dryness and cold Et₂O was added to the oily residue. The resulting white precipitate was isolated by centrifugation, lyophilised and purified by semi-preparative RP-HPLC (system A2). The product-containing fractions were lyophilised to give the TFA salt of hexa-peptide **107** as a white amorphous powder (54 mg, yield 75%).

MS (ESI-): m/z 608.40 [M - H]⁻ and 722.07 [M + TFA - H]⁻.

HPLC (system A2): $t_R = 9.8$ min.

6 BIOCONJUGATION EXPERIMENTS

6.1. PEPTIDE LABELLING

(a) **Labelling with activated Eu(III) chelate C-7:** Hexa-peptide **107** was dissolved in 0.1 M aqueous NaHCO₃ pH 8.7 (22.13 μM, 9.8 μL, 217 nmol) and mixed with crude activated Eu(III) chelate **C-7** (150 μL, 650 nmol, the activation of amino chelate was assumed to be quantitative). The resulting reaction mixture was stirred at RT overnight. The completion of the reaction was checked by RP-HPLC (system E2) and purified by semi-preparative RP-HPLC (system H2). The fractions containing the luminescent labelled peptide were lyophilised.

MS (ESI+): m/z 1464.40 [M - H]⁻, calcd for C₅₇H₆₇ClEuN₁₇O₁₈: 1465.67.

HPLC (system E2): $t_R = 12.4$ min, purity 95%.

(b) Labelling with activated Eu(III) chelate A-7: The same procedure as described above.

MS (ESI-): m/z 1519.67 [M - H]⁻, calcd for C₆₄H₈₃EuN₁₄O₂₀: 1520.41.

HPLC (system E2): t_R = 12.2 min, purity 97%.

For both labelling reactions, the bioconjugation yield was determined through quantification of the labelled peptide by UV-vis spectroscopy at the λ_{max} of the chelate (*i.e.*, 345 nm, ϵ = 16 600 M⁻¹ cm⁻¹).

6.2. mAb LABELLING

(a) Labelling of anti c-myc 9E10 mAb: An aq. solution of anti c-myc 9E10 mAb (0.7 mg cm⁻³, 500 μ L, 2.33 nmol) in phosphate buffer (0.1 M, pH 6.5) was mixed with crude activated Eu(III) chelate **A-7** (72 equiv., the activation of amino chelate was assumed to be quantitative). The resulting reaction mixture was left at RT overnight without stirring. Thereafter, the crude mixture was purified by affinity chromatography (*vide infra*).

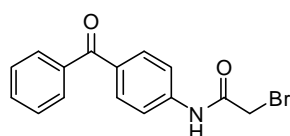
(b) Labelling of anti HA 12CA5 mAb: The same procedure as described above was applied to an aq. solution of anti HA 12CA5 mAb (1.8 mg cm⁻³, 500 μ L, 6.00 nmol) in phosphate buffer pH 6.5.

(c) Purification by affinity chromatography: \approx 1 mL of a gel-immobilised protein A was used. First, the gel was rinsed with 0.1 M borate buffer (containing 0.15 M NaCl, pH 8.5, 20 mL). The binding step was carried out with the same buffer and the elution of the labelled antibodies was performed with a glycine buffer (0.1 M, pH 3.5). Each acidic fraction (\approx 750 μ L) was neutralised by adding 50 μ L of Tris-HCl buffer (0.5 M, pH 8.5). The elution of the desired labelled antibodies was checked by UV absorbance measurements. The luminescence features of labelled mAb were directly determined in this mixture of buffers. After using, the column was washed with a solution of aq. HCl (pH 1.5), neutralised with borate buffer and stored in PBS buffer containing NaN₃ 0.01% at 4 °C.

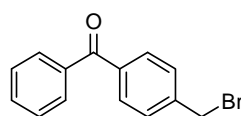
IV. MOLECULES FROM CHAPTER 4

1 ANTENNAE

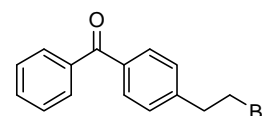
1.1. BENZOPHENONE DERIVATIVES



B-37



D-37

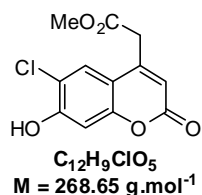


F-37

Benzophenone derivatives were obtained according to literature protocols from 4-aminobenzophenone leading to 4-bromoacetamide-benzophenone **B-37**,^{382c} 4-methyl-benzophenone leading to 4-bromomethyl-benzophenone **D-37**^{382d} or 2-bromoethyl-benzene leading to 4-(2-bromoethyl)-benzophenone **F-37**.^{382a}

1.2. COUMARINS AND QUINOLINONES

7-Hydroxy-6-chloro-4-methylacetate-coumarin G-45

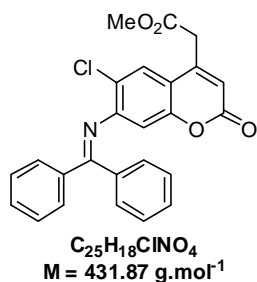
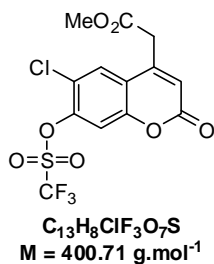


To a solution of 1,3-dimethyl-acetonedicarboxylate (2.03 mL, 13.8 mmol) diluted in methanesulfonic acid (10 mL) was added a solution of 4-chlororesorcinol (2.0 g, 13.8 mmol) diluted in methanesulfonic acid (20 mL) by a dropping funnel over 4h at 0 °C. The reaction mixture was left stirring overnight at RT. The reaction was checked for completion by RP-HPLC (system A4) and revealed the presence of desired coumarin as well as dimer **A-45** (56% and 44% respectively). An additional amount of 4-chlororesorcinol (0.2 eq) diluted in methanesulfonic acid (5 mL) was added dropwise to the reaction mixture cooled to 0 °C. Thereafter the reaction was left stirring over the week-end at RT but the conversion rate remained unchanged. Then, the resulting suspension was filtrated and successively washed with DCM (50 mL), Et₂O (50 mL) and acetone (50 mL) to afford, after drying, a pale brown powder as the desired compound (1.094 g). The acetone phase was chilled to -20 °C for 2h and the resulting precipate was filtrated leading to a second crop of pure product **G-45** (0.675 g). The filtrate was concentrated up to 20-30 mL and stocked at -20 °C overnight. A third fraction of the desired molecule was finally obtained (0.460 g, m_{total} = 2.229 g, 61%).

NMR and mass spectrometry spectra: *cf.* ref. 394.

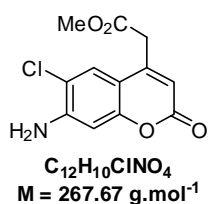
HPLC (system A4): $t_R = 14.5$ min.

7-Triflate-6-chloro-4-methylacetate-coumarin D-45 and 7-Benzophenone-imine-6-chloro-4-methylacetate-coumarin E-45.



These two coumpounds were obtained following the protocol recently described by Paunescu *et al.*³⁹⁴

7-Amino-6-chloro-4-methylacetate-coumarin F-45

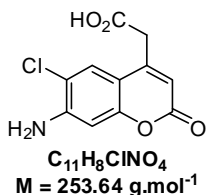


To a solution of non-fluorescent benzophenone-imine coumarin **E-45** (yellow foam, 815 mg, impure fraction containing some unreacted benzophenone-imine) dissolved in THF (15 mL) was added an aqueous solution of 1.0 M HCl (15 mL) at RT. The reaction mixture was stirred for 4h and the completion of the reaction was checked by TLC. Afterwards, the resulting yellow precipitate was recovered by filtration and was triturated with EtOH (6 mL) followed by Et₂O (2 mL) to yield the desired aminocoumarin (98 mg, purity (HPLC) 88%). The filtrate was concentrated and the residual acidic aqueous phase was extracted twice with EtOAc (40 mL). The organic phase was washed with a 5% aq. NaHCO₃ solution (30 mL) and brine. After drying over anhydrous MgSO₄, filtration and concentration the orange powder was triturated with Et₂O to afford a pale yellow powder (213 mg, purity (HPLC) 97%, mtotal = 311 mg, 41% from triflate coumarin **D-45**).

NMR spectra and mass spectrometry analysis: *cf.* ref. 394.

HPLC (system A4): $t_R = 14.7 \text{ min.}$

7-Amino-6-chloro-4-methylacetic acid-coumarin G-45



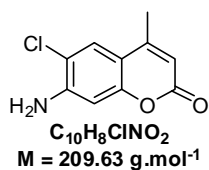
Methylacetate-coumarin **F-45** (99 mg, 0.37 mmol) was dissolved in acetone (5 mL). 5 mL of an aqueous LiOH solution (44 mg, 1.84 mmol) was then poured on the organic reaction mixture which was subsequently stirred for 2h. The reaction was checked for completion by RP-HPLC (system A4). Thereafter, acetone was evaporated and the aqueous phase was acidified to approximately pH 1 with a 10% aq. HCl solution leading to precipitation. The solid was got back by centrifugation, washed with water and dried affording a yellow powder (80 mg, 86%).

δ_H (200 MHz, DMSO-*d*₆) 12.78 (1H, bs), 7.56 (1H, s), 6.66 (1H, s), 6.35 (2H, s), 6.09 (1H, s), 3.80 (2H, s).

δ_C (50.2 MHz, DMSO-*d*₆) 170.7, 160.2, 153.8, 149.7, 148.4, 125.8, 114.0, 110.6, 109.2, 100.1, 37.1.

HPLC (system A4): $t_R = 12.1 \text{ min, purity } 92\%.$

7-Amino-6-chloro-4-Methyl-coumarin A-54



To a solution of coumarin **G-45** (80 mg, 0.32 mmol) dissolved in DMF (7 mL) was added Et_3N . The reaction mixture was left stirring at RT for 6h. Afterwards the solvent was evaporated and the resulting oily residue was dried extensively under high vacuum to yield a yellow powder containing DMF traces (74 mg).

δ_H (200 MHz, $DMSO-d_6$) 7.59 (1H, s), 6.67 (1H, s), 6.32 (2H, s), 6.00 (1H, s), 2.31 (3H, s).

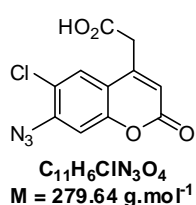
δ_C (50.2 MHz, $DMSO-d_6$) 160.3, 153.6, 153.2, 148.4, 125.6, 114.0, 109.9, 109.0, 100.1, 18.0.

HPLC (system A4): $t_R = 15.3 \text{ min}$.

MS (ESI+): m/z 210.11 and 212.18 $[M + H]^+$.

MS (ESI-): m/z 208.07 and 210.13 $[M + H]^+$.

7-azido-6-chloro-4-methylacetic acid-coumarin A-48



To a solution of 7-amino-coumarin **G-45** (37 mg, 0.146 mmol) dissolved in a 37% aq. solution of HCl (3 mL) was added dropwise at 0 °C $NaNO_2$ (12.1 mg, 0.175 mmol) dissolved in deionised water (0.5 mL). The reaction mixture was stirred for 1h at 0 °C before an aq. solution of NaN_3 (15.2 mg, 0.234 mmol) was slowly added. The mixture was left running overnight at RT. The

reaction was checked for completion by RP-HPLC (system A4). The resulting precipitate was filtered and washed with cold deionised water to give after drying a beige solid (32.1 mg, 79%).

δ_H (200 MHz, $acetone-d_6$) 7.88 (1H, s), 7.39 (1H, s), 6.49 (1H, s), 4.00 (2H, s).

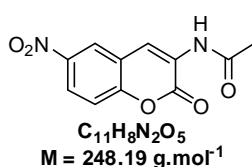
δ_C (50.2 MHz, $acetone-d_6$) 170.4, 159.7, 154.1, 149.0, 141.7, 127.8, 120.8, 118.1, 117.2, 109.1, 37.6.

MS (ESI-): m/z 277.73 and 279.93 $[M - H]^-$; 233.87 and 235.80 $[M - H]^-$ (compound resulting from decarboxylation during the ionisation process).

IR (ν_{max} , cm^{-1}): 3054, 2920, 2848, 2117, 1731, 1695, 1608, 1374, 1295, 1246, 1207, 884, 737.

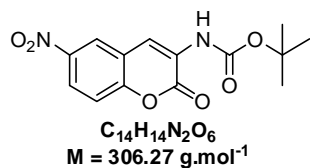
HPLC (system A4): $t_R = 15.8 \text{ min}$, purity 99%.

6-Nitro-3-N-acetyl-3-amino-coumarin B-50



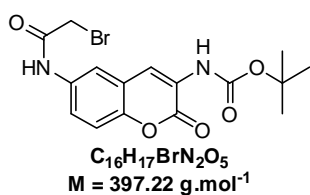
Compound **B-50** was synthesised from commercial 2-hydroxy-5-nitrobenzaldehyde and *N*-acetylglycine following the procedure described by Girouard *et al.*⁴⁰¹

6-Nitro-3-*N*-Boc-3-amino-coumarin D-50⁴⁰⁰



To a yellow suspension of 6-nitrocoumarin **B-50** (830 mg, 3.34 mmol) in dry THF (8 mL) was added a solution of Boc_2O (3.065 g, 14.05 mmol) in dry THF (8 mL). DMAP (82 mg, 0.67 mmol) was added and the suspension turned red then purple. The reaction mixture was left stirring at RT under an Ar atmosphere for 30 min before adding a solution of monohydrate hydrazine (814 μL , 16.7 mmol) diluted in MeOH (16 mL). After 30 min of additional stirring, the solvents were evaporated leading to an orange paste. The crude residue was dissolved in DCM (60 mL) and was sequentially washed with a 1.0 M aq. solution of HCl (30 mL), a 1M aq. solution of $CuSO_4$ (30 mL) and a saturated aq. solution of $NaHCO_3$ (30 mL). The $NaHCO_3$ aq. phase was re-extracted with DCM since at this last washing step an emulsion occurred. The organic phases were gathered, washed with brine, dried over anhydrous $MgSO_4$, filtrated and concentrated under reduced pressure. The greenish residue was purified by flash-chromatography on a silica gel column with a step gradient of EtOAc (10-20%) in cyclohexane. The desired coumarin was obtained as a white solid (835 mg, 82%).
 δ_H (200 MHz, $CDCl_3$) 8.39-8.31 (2H, m), 8.29-8.21 (1H, m), 7.48-7.39 (2H, m), 1.54 (9H, s).
 δ_C (50.2 MHz, $CDCl_3$) 157.2, 152.5, 152.0, 144.7, 126.3, 123.5, 122.8, 120.5, 118.2, 117.3, 82.3, 28.1 (CH_3 *t*-Bu).
MS (ESI-): m/z 305.00 [$M - H$]⁻.

6-*N*-(Bromoacetyl)-3-*N*-Boc-3,6-diamino-coumarin E-50



(a) 3-*N*-Boc-3,6-diaminocoumarin: To a suspension of Pd/C (10% w/w, 60 mg) in deionised water (3.4 mL) containing NaBH₄ (185 mg, 4.90 mmol) was added dropwise over approximately 30 min to a solution of 6-nitro-coumarin **D-50** (600 mg, 1.96 mmol) partially dissolved in MeOH (100 mL). After the addition was completed, the

reaction mixture was stirred for 30 min. The reaction was checked for completion by TLC. Thereafter the suspension was filtered on a Celite® 545 pad and the organic phase was concentrated under reduced pressure. A yellow/orange solid (1.1 g) was obtained and was purified by flash-chromatography on a silica gel column with a step gradient of EtOAc (40-50%) in cyclohexane. The desired coumarin was obtained as a yellow solid (436 mg, 81%).

R_f (cyclohexane-EtOAc, 7/3, v/v) 0.20.

δ_{H} (200 MHz, CDCl₃) 8.13 (1H, s), 7.41 (1H, bs), 7.14-7.09 (1H, m), 6.77-6.66 (2H, m), 3.70 (2H, m), 1.53 (9H, s).

δ_{C} (50.2 MHz, CDCl₃) 158.9, 152.5, 143.7, 143.0, 124.8, 120.7, 120.3, 117.0 (2C), 111.3, 81.6, 28.3 (CH₃ *t*-Bu).

(b) 6-*N*-(Bromoacetyl)-3-*N*-Boc-3,6-diaminocoumarin E-50: To a solution of the previous 6-amino coumarin derivative (430 mg, 1.56 mmol) dissolved in dry DCM (16 mL) were added Et₃N (282 μ L, 2.02 mmol) and bromoacetyl bromide (176 μ L, 2.02 mmol) in three portions at 0 °C. The yellow then pink homogeneous solution became viscous. After the complete addition of bromoacetyl bromide the resulting mixture was left stirring at RT for 7h. The reaction was checked for completion by TLC. The solvent was evaporated to dryness and the resulting brownish paste residue was diluted in EtOAc (100 mL). The organic phase was sequentially washed with a 1.0 M aq. solution of HCl (2 x 40 mL), brine and was dried over anhydrous MgSO₄. After filtration and evaporation, a pale brown solid was recovered (623 mg) which was purified by flash-chromatography on a silica gel column with a step gradient of EtOAc (30-60%) in cyclohexane. The product-containing fractions were collected together, evaporated and the pale yellow solid was diluted in acetone (25 mL) and was chilled to -20 °C overnight and the precipitate was filtrated. The desired coumarin was obtained as a white solid (441 mg, 71%).

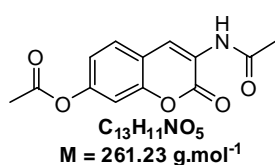
R_f (cyclohexane-EtOAc, 7/3, v/v) 0.25.

δ_{H} (300 MHz, DMSO-*d*₆) 10.56 (1H, s), 8.52 (1H, s), 8.14 (1H, s), 7.88 (1H, d, *J* 2.3), 7.60 (1H, dd, *J* 8.9 and 2.3), 7.38 (1H, d, *J* 8.9), 4.06 (2H, s), 1.48 (9H, s).

δ_{C} (75.4 MHz, DMSO-*d*₆) 164.9, 157.4, 152.5, 145.7, 135.4, 125.1, 122.1, 120.8, 119.7, 117.0, 116.3, 80.5, 30.3, 27.9 (CH₃ *t*-Bu).

HPLC (system A4): *t_R* = 19.3 min, purity 95%.

7-Acetoxy-3-*N*-acetyl-3-aminocoumarin B-49^{400b}



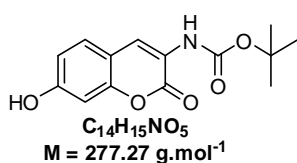
To a solution of 2,4-hydroxybenzaldehyde (10.0 g, 72.4 mmol) and *N*-acetyl glycine (8.48 g, 72.4 mmol) dissolved in acetic anhydride (56 mL) was added in several portions sodium acetate (23.8 g, 289.6 mmol) which resulted after several minutes to solidification of the reaction mixture. The reaction mixture was heated to 115 °C for 4h and the orange mixture became highly viscous. Upon cooling to RT the resulting solid was triturated with cold water (100 mL), filtered and washed with cold deionised water (3 x 100 mL) again. Afterwards the dried solid was sonicated in EtOAc (50 mL) and filtrated to afford a beige powder (6.19 g, 33%).

R_f (cyclohexane-EtOAc, 1/1, v/v) 0.37.

δ_H (200 MHz, $CDCl_3$) 8.67 (1H, s), 8.03 (1H, bs), 7.55-7.47 (1H, m), 7.15-7.03 (2H, m), 2.34, (3H, s), 2.24 (3H, s).

δ_C (50.2 MHz, $CDCl_3$) 169.5, 169.0, 158.6, 151.5, 150.3, 128.5, 123.7, 122.9, 119.3, 117.8, 110.2, 24.9, 21.2.

7-Hydroxy-3-*N*-Boc-3-aminocoumarin D-49⁴⁰⁰



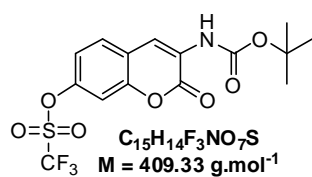
To a beige suspension of di-acetyl coumarin **B-49** (2.0 g, 7.66 mmol) in dry THF (18 mL) was added a solution of Boc_2O (7.02 g, 32.2 mmol) in dry THF (18 mL). DMAP (187 mg, 1.53 mmol) was then added and the suspension turned to orange color. The reaction mixture was left stirring at RT under an Ar atmosphere for 90 min before adding a solution of monohydrate hydrazine (3.73 mL, 76.6 mmol) diluted in MeOH (36 mL). After 1h of additional stirring, the solvents were evaporated to dryness giving an orange oil as well as a beige paste. The crude residue was dissolved in DCM (150 mL) and was washed sequentially with a 1.0 M aq. solution of HCl (80 mL), a 1.0 M aq. solution of $CuSO_4$ (80 mL) and a saturated aq. solution of $NaHCO_3$ (80 mL). The organic phase was washed with brine, dried over anhydrous $MgSO_4$, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash-chromatography on a silica gel column with a step gradient of EtOAc (10-30%) in cyclohexane. The desired coumarin was obtained as a white solid (1.91 mg, 90%).

δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) 8.23 (1H, s), 7.29 (1H, d, J 8.5), 7.20 (1H, bs), 6.89 (1H, d, J 2.4), 6.84 (1H, dd, J 8.4 and 2.4), 1.53 (9H, s).

δ_C (75.4 MHz, $CDCl_3$) 159.5, 158.0, 152.9, 151.0, 128.6, 122.3, 121.8, 114.2, 113.2, 103.1, 81.8, 28.4 (CH_3 *t*-Bu).

HPLC (system A4): $t_R = 18.4$ min.

7-Triflate-3-*N*-Boc-3-aminocoumarin E-49



To a suspension of 7-hydroxycoumarin **D-49** (500 mg, 1.80 mmol) in dry DCM (7 mL) was added anhydrous pyridine (582 μL , 7.2 mmol) at 0 °C affording a homogenous solution. Thereafter triflic anhydride (591 μL , 3.60 mmol) was introduced into the reaction mixture which was left stirring at RT overnight under an Ar atmosphere. The reaction was checked for completion by TLC. The crude mixture was diluted in water (50 mL) and extracted twice with DCM (30 mL). The organic phase was washed with a sat. aq. solution of CuSO_4 (25 mL) followed by brine. Afterwards DCM phase was dried over anhydrous MgSO_4 , filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude material (700 mg) was purified by flash-chromatography on a silica gel column with a step gradient of EtOAc (2-5%) in cyclohexane. Desired coumarin **E-49** was obtained as a white solid (567 mg, 77%).

R_f (cyclohexane-EtOAc, 7/3, v/v) 0.67.

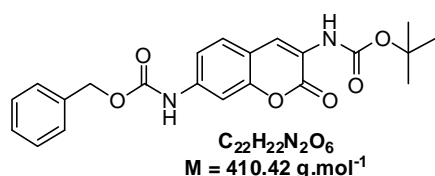
δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 8.29 (1H, s), 7.53 (1H, d, J 8.6), 7.41 (1H, bs), 7.26 (1H, d, the doublet overlaps partially with CDCl_3 peak), 7.22 (1H, dd, J 8.6 and 2.4), 1.54 (9H, s).

δ_{C} (50.2 MHz, CDCl_3) 157.7, 152.4, 149.6, 148.7, 128.6, 125.6, 120.5, 118.7, 118.8 (q, J 321) 118.5, 110.2, 82.4, 28.3 (CH_3 *t*-Bu).

δ_{F} (282.5 MHz, CDCl_3) -72.6.

HPLC (system A4): $t_{\text{R}} = 24.5$ min, purity 99%.

7-*N*-Z-3-*N*-Boc-3,7-diaminocoumarin F-49



Prior to use, dry THF was degassed for at least 30 min under an Ar flow. To a suspension of $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (66.5 mg, 0.073 mmol), Xantphos (126 mg, 0.218 mmol), Cs_2CO_3 (661 mg, 2.03 mmol) and 7-*O*-triflate coumarin **E-49** in dry THF (30 mL) was added benzylcarbamate (263 mg, 1.74 mmol). The resulting suspension was degassed with Ar before refluxing for 3h. A RP-HPLC analyse (system A4) revealed an incomplete conversion. 1/10 of initial amount of all reagents, except 7-*O*-triflate coumarin, were added and the suspension was refluxed until a complete conversion was reached (5h30). The reaction mixture was filtered on a Celite® 545 pad and the solvent was evaporated leading to a brown solid which was subsequently triturated in absolute EtOH (10-15 mL). The precipitate was filtrated and desired coumarin **F-49** was obtained as a yellow solid (361 mg, 61%).

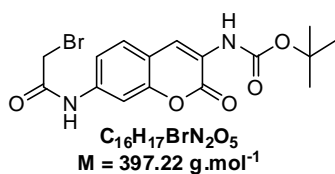
R_f (cyclohexane-EtOAc, 7/3, v/v) 0.52.

δ_{H} (200 MHz, CDCl_3) 8.22 (1H, s), 7.55 (1H, d, J 2.0), 7.42-7.30 (7H, m), 7.21 (1H, dd, J 8.5 and 2.1), 5.23 (2H, s), 1.53 (9H, s).

δ_{C} (50.2 MHz, CDCl_3) 158.8, 153.0, 152.7, 150.4, 139.0, 135.8, 128.8 (2C), 128.7, 128.6 (2C), 127.9, 123.4, 120.7, 115.7, 115.6, 106.0, 81.8, 67.6, 28.4 (CH_3 *t*-Bu).

HPLC (system A4): $t_{\text{R}} = 23.6$ min, purity 97%.

7-*N*-(Bromoacetyl)-3-*N*-Boc-3,7-diaminocoumarin G-49



(a) 3-*N*-Boc-3,7-diaminocoumarin: To a solution of **F-49** (312 mg, 0.76 mmol) dissolved in EtOAc (25 mL) was added Pd/C (10% w/w, 75 mg). The reaction mixture was left stirring overnight at RT under an H₂ atmosphere. Thereafter, the suspension was

filtrated on a Celite® 545 pad and the solvent was evaporated to dryness to give the desired free 7-amino coumarin as a yellow solid (127 mg, 60%).

R_f (cyclohexane-EtOAc, 7/3, v/v) 0.27.

δ_H (200 MHz, CDCl₃) 8.18 (1H, s), 7.26-7.18 (2H, m), 6.62-6.55 (2H, m), 4.02 (2H, s), 1.52 (9H, s).

HPLC (system A4): t_R = 16.7 min, purity 91%.

(b) 7-*N*-(Bromoacetyl)-3-*N*-Boc-3,7-diaminocoumarin G-49: To a solution of 3-*N*-Boc-3,7-diaminocoumarin (127 mg, 0.46 mmol) and Et₃N (84 μL, 0.60 mmol) in dry DCM (8 mL) was introduced in three portions bromoacetyl bromide (52 μL, 0.60 mmol) at 0 °C. Then the reaction mixture was left running overnight. The reaction was checked for completion by TLC and RP-HPLC (system A4). The crude reaction mixture was washed with a 1.0 M aq. solution of HCl (25 mL) and brine. The organic phase was dried over anhydrous MgSO₄, filtered and evaporated. The resulting solid was triturated in acetone and chilled to -20 °C for 4h. The precipitate was recovered by centrifugation and the desired compound was obtained as a pale yellow powder (56 mg, 30%). The filtrate was concentrated and a second fairly pure crop was obtained (111 mg, 61%).

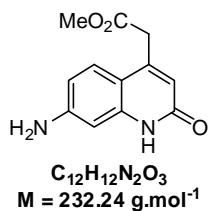
R_f (petroleum ether-EtOAc, 7/3, v/v) 0.25 (the starting amino coumarin possesses a similar R_f nevertheless the desired compound is non-fluorescent contrary to the starting material).

δ_H (200 MHz, CDCl₃) 8.24 (2H, s), 7.74 (1H, d, *J* 1.8), 7.47-7.31 (3H, m), 4.05 (2H, s), 1.53 (9H, s).

δ_C (50.2 MHz, CDCl₃) 163.8, 158.7, 152.6, 150.0, 137.9, 127.9, 124.0, 120.3, 117.1, 116.9, 107.5, 81.9, 29.4, 28.3 (CH₃ *t*-Bu).

HPLC (system A4): t_R = 19.8 min.

Cs124-methylester B-51¹⁰⁹



To a solution of 1,3-diaminobenzene (3.0 g, 27.7 mmol) and 1,3-dimethyl-acetonedicarboxylate (4.0 mL, 27.7 mmol) dissolved in DMSO (15 mL) was added $ZnCl_2$ (3.8 g, 27.7 mmol) and the resulting suspension was heated at 100 °C and stirred for 16h. The reaction was checked for completion by RP-HPLC (system A4). The dark purple reaction mixture was diluted with MeOH (25 mL) and poured in a 0.1 M aq. solution of citric acid (300 mL). The suspension was chilled to 5 °C for *ca.* 3h and the precipitate was filtrated. The solid was sequentially washed with deionised water (2 x 20 mL) and MeCN (2 x 10 mL). After drying the desired quinolinone was obtained as a red/brown powder (1.41 g, 22%).

Rf (DCM-MeOH, 9/1, v/v) 0.39.

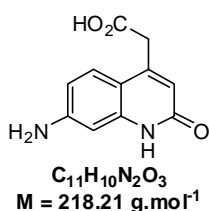
δ_H (200 MHz, DMSO-*d*₆) 11.28 (1H, s), 7.25 (1H, d, *J* 8.7), 6.43 (1H, dd, *J* 8.7 and 1.9), 6.37 (1H, d, *J* 1.8), 6.01 (1H, s), 5.81 (2H, bs), 3.79 (2H, s), 3.62 (3H, s).

δ_C (50.2 MHz, DMSO-*d*₆) 170.6, 162.1, 151.1, 144.3, 141.0, 125.4, 116.2, 110.6, 109.6, 96.8, 51.9, 37.2.

HPLC (system A4): $t_R = 9.0$ min.

MS (ESI+): m/z 233.20 [M + H]⁺.

Cs124 free acid C-51¹⁰⁹



To a suspension of methyl ester derivative **B-51** (1.4 g, 6.03 mmol) in 1,4-dioxane (20 mL) was added LiOH (722 mg, 30.1 mmol) dissolved in deionised water (35 mL) leading to a homogenous solution which was stirred at RT for 3h30. The reaction was checked for completion by TLC. Thereafter the reaction mixture was diluted in deionised water (100 mL)

and 1,4-dioxane, extracted by Et₂O (2 x 250 mL). The aqueous phase was acidified to about pH 2 by a 10% aq. solution of H₂SO₄ (*ca.* 6 mL). The resulting precipitate was filtered and dried to afford the desired free acid as a brown powder (1.026 g, 78%).

Rf (DCM-MeOH, 9/1, v/v) 0.00.

δ_H (200 MHz, DMSO-*d*₆) 11.24 (1H, s), 7.28 (1H, d, *J* 8.6), 6.43 (1H, dd, *J* 8.7 and 2.1), 6.40 (1H, d, *J* 2.0), 6.00 (1H, bs), 5.78 (2H, bs), 3.66 (2H, s).

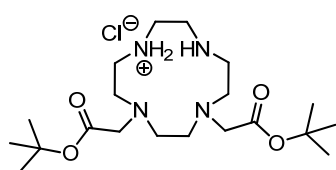
δ_C (50.2 MHz, DMSO-*d*₆) 171.6, 162.2, 151.1, 145.0, 141.0, 125.5, 116.1, 110.5, 109.8, 96.8, 38.0.

HPLC (system A4): $t_R = 7.5$ min.

MS (ESI+): m/z 219.20 [M + H]⁺.

2 CHELATING PART SCAFFOLDS BASED ON CYCLEN

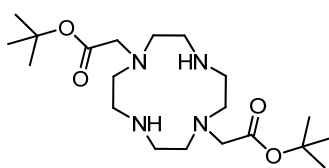
2.1. DISUBSTITUTED CYCLEN



cis DO2At-Bu.HCl

A-39

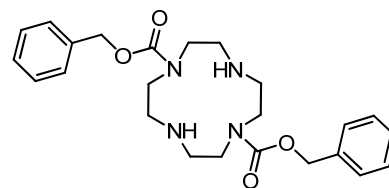
Synthesised according to
ref. 373.



DO2At-Bu

E-39

Synthesised according to
ref. 375a et 375d.

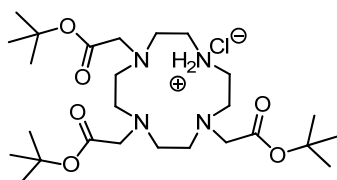


Z-Trans Cyclen

C-39

Synthesised according to ref.
375a et 375d.

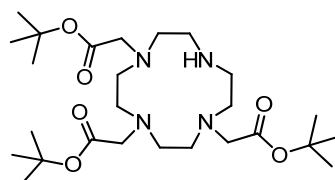
2.2. TRISUBSTITUTED CYCLEN



DO3At-Bu.HCl

D-38

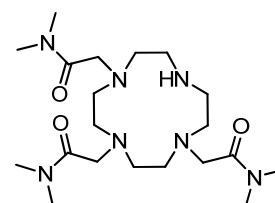
Synthesised according to ref.
377a.



DO3At-Bu

B-59

Synthesised according to ref.
377d.

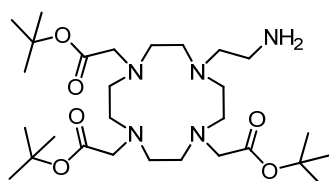


DO3AM.Me₂

A-42

Synthesised according to
ref. 379b.

2.3. TETRASUBSTITUTED CYCLEN



B-61

Aminoethyl DO3At-Bu **B-61** was synthesised in two steps from
DO3At-Bu according to the procedure described in ref. 407.

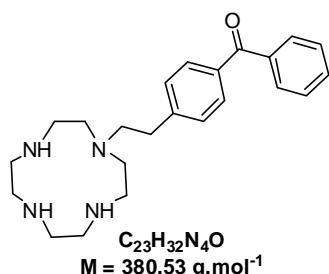
3 LIGANDS AND CHELATES CONTAINING A BENZOPHENONE

3.1. MONOALKYLATED CYCLENS

The following typical procedure, as described by Massue *et al.*,^{369d} was applied for the monosubstitution of cyclen by benzophenones **B-**, **D-** and **F-37**.

A mixture of cyclen (400 mg, 2.32 mmol), Et₃N (97 μL, 0.7 eq) and benzophenone electrophile (**B-37**, **D-37** or **F-37**; 0.58 mmol) diluted in dry CHCl₃ (9 mL) was refluxed under an Ar atmosphere overnight. After cooling to RT the organic solution was washed thrice with 6 mL of a 1.0 M NaOH solution to get rid of the unalkylated cyclen and thrice with 4 mL of deionised water. The aq. phase was re-extracted twice with CHCl₃ (15 mL). The organic phases were combined, dried over anhydrous MgSO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. A yellowish oily residue was obtained.

4-(2-Cyclen-*N*-ethyl)-benzophenone **B-38**

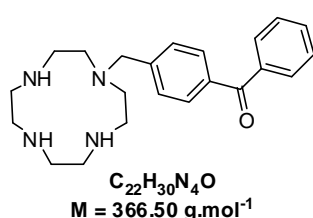


δ_H (300 MHz, CDCl₃) 7.82-7.68 (4H, m), 7.60-7.54 (1H, m), 7.54-7.40 (2H, m), 7.40-7.28 (2H, m), 2.94-2.70 (8H, m), 2.68-2.58 (8H, bs), 2.56-2.44 (4H).

δ_C (75.4 MHz, CDCl₃) 196.7, 145.8, 137.7, 135.4, 132.1, 130.0 (2C), 129.7 (2C), 128.6 (2C), 128.0 (2C), 55.9, 51.4 (2C), 47.1 (2C), 46.0 (2C), 45.4 (2C), 33.8.

MS (ESI+): m/z 381.36 [M + H]⁺.

4-(Cyclen-*N*-methyl)-benzophenone **A-38**



δ_H (300 MHz, CDCl₃) 7.82-7.74 (4H, m), 7.60-7.54 (1H, m), 7.50-7.40 (4H, m), 3.69 (2H, s), 2.85-2.77 (4H, m), 2.74-2.66 (4H, m), 2.64-2.54 (8H, m).

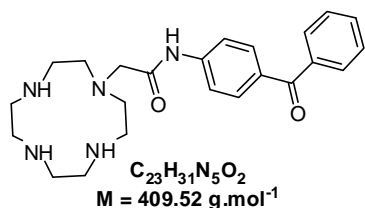
δ_C (75.4 MHz, CDCl₃) 196.0, 144.1, 137.5, 135.9, 131.9, 130.1 (2C), 129.6 (2C), 128.4 (2C), 127.9 (2C), 58.7, 51.1 (2C), 46.8 (2C), 45.9

(2C), 44.7 (2C).

MS (ESI+): m/z 367.40 [M + H]⁺.

HPLC (system A4): t_R = 12.4 min, purity 71%.

4-(Cyclen-*N*-acetamidyl)-benzophenone C-38



δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) 10.5 (1H, bs), 7.90-7.74 (6H, m), 7.61-7.54 (1H, m), 7.50-7.45 (2H, m), 3.31 (2H, s), 2.87-2.79 (4H, m), 2.78-2.71 (8H, m), 2.70 (4H, bs).

δ_C (75.4 MHz, $CDCl_3$) 195.7, 170.8, 142.5, 138.1, 132.5, 132.1, 131.6 (2C), 129.9 (2C), 128.2 (2C), 118.7 (2C), 59.7, 53.8 (2C),

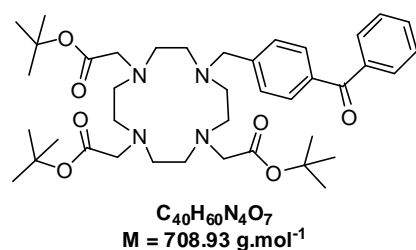
47.4, 47.3, 46.2 (2C), 45.9 (2C).

MS (ESI+): m/z 410.33 $[M + H]^+$.

HPLC (system A4): $t_R = 12.5$ min, purity 91%.

3.2. PROTECTED CYCLEN LIGANDS

4-(DO3At-*Bu-N*-methyl)-benzophenone F-38



A-38 (179 mg, 0.49 mmol) was dissolved in freshly distilled MeCN (8 mL). To this solution, *tert*-butyl bromoacetate (238 μ L, 1.61 mmol) and anhydrous K_2CO_3 (542 mg, 3.92 mmol) were added and the resulting suspension was stirred overnight at RT under an Ar atmosphere. The completion of the reaction was checked by RP-HPLC (system A4). After solvent removal, the resulting residue

was diluted in DCM (20 mL) and washed with deionised water (50 mL). The aqueous phase was re-extracted twice with DCM (20 mL) and the organic phases were combined, washed with brine, dried over anhydrous $MgSO_4$, filtrated and concentrated. The sticky yellow foam (358 mg) was subjected to a flash-chromatography on a silica gel column with a step gradient of EtOH (5-10%) in DCM. Desired tetraalkylated cyclen **A-38** was obtained as a yellow foam (132 mg, yield 39%).

R_f (DCM-EtOH, 97/3, v/v) 0.18.

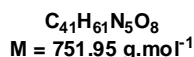
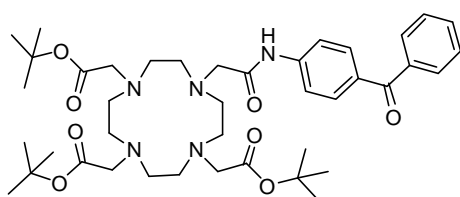
δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) 7.79-7.73 (4H, m), 7.65-7.57 (3H, m), 7.54-7.47 (2H, m), 3.80-2.10 (24H, m), 1.48-1.42 (27H, bs).

δ_C (75.4 MHz, $CDCl_3$) 196.2; 173.4 (1C or 2C), 172.4 (2C or 1C), 142.4, 137.3, 136.6, 132.6, 130.3 (2C), 129.9 (2C), 129.7 (2C), 128.3 (2C), 82.9 (2C), 82.3 (1C), 59.2, 55.8 (2C), 55.6, 53-48 (CH_2 cyclen), 27.8 (CH_3 *t*-Bu), 27.7 (CH_3 *t*-Bu).

MS (ESI+): m/z 709.47 $[M + H]^+$.

HPLC (system A4): $t_R = 21.1$ min, purity 94%.

4-(DO3At-Bu-N-acetamidyl)-benzophenone E-38



To a solution of DO3At-Bu.HCl (79 mg, 0.14 mmol) and benzophenone **B-37** (44.5 mg, 0.14 mmol) in freshly distilled MeCN (4 mL) were added anhydrous Cs_2CO_3 (137 mg, 0.42 mmol) and a catalytic amount of NaI. The suspension was refluxed under an Ar atmosphere over the week-end. The completion of the reaction was

checked by RP-HPLC (system A). After filtration of the suspension and evaporation of MeCN, the resulting orange oil was dissolved in DCM (15 mL) and the organic phase was washed with deionised water (15 mL). An emulsion occurred and was broken by adding brine (10 mL). The aqueous phase was re-extracted twice with DCM (15 mL) and the organic phases were finally washed with deionised water (15 mL), brine (15 mL) and dried over anhydrous $MgSO_4$. After filtration and evaporation the oily residue (111 mg) was purified with a flash-chromatography on a silica gel column with a step gradient of EtOH (5-10%) in DCM. Desired tetraalkylated cyclen **E-38** was obtained as a yellow foam (56 mg, yield 53%).

Rf (DCM-EtOH, 97/3, v/v) 0.16.

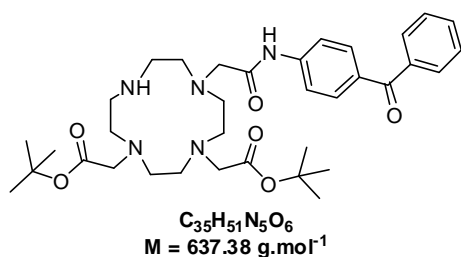
δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) 11.74 (1H, s), 8.13-8.05 (2H, m), 7.80-7.65 (4H, m), 7.60-7.50 (1H, m), 7.50-7.40 (2H, m), 3.77 (2H, s), 3.60-1.90 (22H, m), 1.50-1.35 (27 H, m).

δ_C (75.4 MHz, $CDCl_3$) 196.1, 172.4 (2C), 172.0 (2C), 143.8, 138.3, 132.0, 131.6, 131.0 (2C), 129.9 (2C), 128.1 (2C), 119.5 (2C), 82.2 (2C), 82.0 (1C), 56.9, 55.7 (2C), 55.6, 52-47 (CH_2 cyclen), 28.0 (CH_3 t-Bu), 27.9 (CH_3 t-Bu).

MS (ESI+): m/z 752.33 [$M + H$]⁺.

HPLC (system A4): $t_R = 21.3$ min, purity 96%.

4-(cis DO2At-Bu-N-acetamidyl)-benzophenone B-39



Cis DO2At-Bu.HCl (60 mg, 0.14 mmol) was dissolved in dry MeCN (5 mL). Thereafter NaHCO_3 (58.8 mg, 0.70 mmol) was added. To this suspension a solution of benzophenone **B-37** (44.5 mg, 0.14 mmol) diluted in dry MeCN (10 mL) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at RT under an Ar

atmosphere for 5h. ESI mass analysis by mass revealed no conversion and the mixture was left stirring overnight at 60 °C. An uncomplete conversion was found through RP-HPLC analysis (system A4). Thereafter, anhydrous K_2CO_3 (97 mg, 0.70 mmol) was added and the reaction mixture was stirred under reflux for 24h. ESI mass analysis revealed no trace of Cis DO2At-Bu. Then, the reaction mixture was filtrated, concentrated and the residue was purified by semi-preparative RP-HPLC (system B4). The product-containing fractions were lyophilised to give the desired compound (66 mg, yield 63%, if the product contains only one molecule of TFA).

δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 9.83 (1H, s), 7.78-7.64 (6H, m), 7.62-7.54 (1H, m), 7.51-7.43 (2H, m), 4.20-2.60 (22H, m), 1.45 (9H, bs), 1.23 (9H, bs).

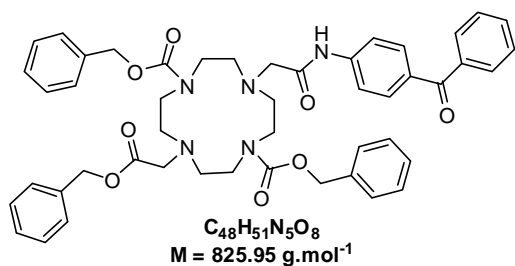
δ_{C} (75.4 MHz, CDCl_3) 195.9, 170.5 (1C or 2C), 169.9 (2C or 1C), 142.5, 137.8, 132.7, 132.5, 131.2 (2C), 129.9 (2C), 128.4 (2C), 119.3 (2C), 82.7 (2C), 54.8, 54.1, 53.6, 52.6, 52.3, 50.9, 49.6, 49.1, 47.5, 42.9, 42.6, 28.0 (CH_3 *t*-Bu), 27.9 (CH_3 *t*-Bu).

δ_{F} (282.5 MHz, CDCl_3) -75.5.

MS (ESI+): m/z 638.33 [$\text{M} + \text{H}$]⁺.

HPLC (system A4): $t_{\text{R}} = 18.3$ min, purity 98%.

4-(Cyclen-[1,7-Z-10-methyl(benzoyloxycarbonyl)-4-acetamidyl])-benzophenone A-40



To a solution of Z-trans cyclen **C-39** (300 mg, 0.68 mmol) dissolved in dry MeCN (60 mL) were added benzophenone **B-37** (217 mg, 0.68 mmol) and anhydrous K_2CO_3 (94 mg, 0.68 mmol). The resulting reaction mixture was left running at RT for 4h. The completion of the monosubstitution was checked

by RP-HPLC (system A4). After filtration and the evaporation of the solvent, the crude material was dissolved in 15 mL of dry MeCN and 5 mL of the solution was engaged in the final substitution (scale: 0.23 mmol). To this solution, benzylbromoacetate (0.45 mmol, 72 μ L) and anhydrous K_2CO_3 (62 mg, 0.45 mmol) were sequentially added and the resulting suspension was stirred overnight under an Ar atmosphere at RT. The completion of the S_N2 reaction was checked by RP-HPLC (system A4). Thereafter, the reaction mixture was filtrated and concentrated under reduced pressure to yield a viscous orange oily residue which was purified by flash-chromatography on a silica gel column with a step gradient of EtOAc (50-60%) in cyclohexane. A white foam was recovered (98 mg, 52 %).

R_f (EtOAc-cyclohexane, 7/3, v/v) 0.08.

δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) 10.1 (1H, bs), 7.96-7.86 (2H, m), 7.82-7.72 (4H, m), 7.60-7.52 (1H, m), 7.50-7.42 (2H), 7.38-7.26 (15H, m), 5.15-5.02 (6H, m), 3.55-3.25 (12H, m), 2.95-2.70 (8H, m).

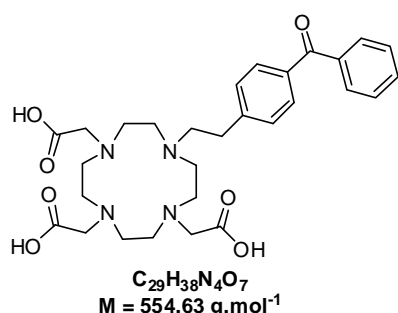
MS (ESI+): m/z 826.47 $[M + H]^+$.

HPLC (system A4): $t_R = 24.4$ min.

3.3. CYCLEN LIGANDS

3.3.1 FUNCTIONALISED WITH CARBOXYLIC ACID ARMS

4-(DO3A-*N*-ethyl)-benzophenone 116



(a) 4-(DO3At-Bu-*N*-ethyl)-benzophenone: Monoalkylated cyclen **B-38** (145 mg, 0.38 mmol) was dissolved in freshly distilled MeCN (4 mL). To this solution, *tert*-butyl bromoacetate (185 μ L, 1.26 mmol) and anhydrous K_2CO_3 (492 mg, 3.04 mmol) were added and the resulting suspension was stirred overnight under an Ar atmosphere at RT. After evaporation of solvent, the residue was diluted in

DCM (20 mL) and washed with deionised water (50 mL). The aqueous phase was re-extracted twice with DCM (20 mL) and the organic phases were collected, washed with brine, dried over anhydrous $MgSO_4$, filtrated and concentrated. A yellowish foam (286 mg) was subjected to a flash-chromatography on a neutral alumina gel column with the mixture (DCM/MeOH 98/2 v/v) as eluent. Desired tetraalkylated cyclen **G-38** was obtained with a moderate purity as a yellowish oil (194 mg).

MS (ESI+): m/z 723.40 $[M + H]^+$, calcd for $C_{41}H_{62}N_4O_7$: 722.95.

HPLC (system A4): $t_R = 21.6$ min, purity 80%.

(b) 4-(DO3A-*N*-ethyl)-benzophenone 116: 4-(DO3At-Bu-*N*-ethyl)-benzophenone (194 mg), was dissolved in 20 mL of a mixture of DCM/TFA (1/1, v/v). The solution was left running at RT overnight. The completion of the reaction was checked with RP-HPLC (system A4). After evaporation under reduced pressure (water-pump) and co-evaporation with $CHCl_3$, the brownish foam obtained (300 mg) was purified by semi-preparative RP-HPLC (system C4). The product-containing fractions were lyophilised to give the desired compound as a highly hygroscopic pale yellow foam (99 mg, overall yield 39% for the two step, if the product contains only one molecule of TFA).

δ_H (300 MHz, D_2O) 7.73-7.61 (5H, m), 7.54-7.46 (2H, m), 7.45-7.37 (2H, m), 3.91 (2H, s), 3.68-3.32 (14H, m), 3.25-2.90 (10H, m).

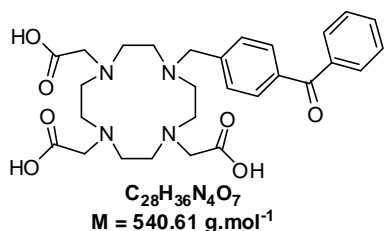
δ_C (75.4 MHz, D_2O) 198.1, 173.7 (2C), 169.2, 141.6, 136.3, 135.1, 132.9, 130.4 (2C), 129.7 (2C), 128.9 (2C), 128.2 (2C), 55.2, 54.6, 52.9 (2C), 51.3 (2C), 49.9 (2C), 48.2 (4C), 29.4.

δ_F (282.5 MHz, D_2O) -75.7.

MS (ESI+): m/z 555.27 $[M + H]^+$.

HPLC (system A4): $t_R = 13.8$ min.

4-(DO3A-*N*-methyl)-benzophenone 115



Compound **F-38** (123, 0.17 mmol) was dissolved in 2 mL of a mixture of DCM/TFA (1/4, v/v). The solution was left running at RT overnight. The completion of the reaction was checked with RP-HPLC (system A4). After evaporation under reduced pressure (water-pump) and co-evaporation with $CHCl_3$, a yellowish sticky foam was obtained (194 mg) which was used in the complexation step without further purification.

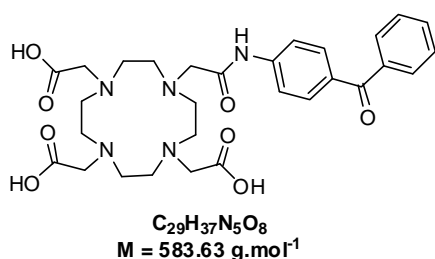
δ_H (300 MHz, D_2O) 7.78-7.56 (7H, m), 7.54-7.46 (2H, m), 4.50-2.70 (24H, m).

Carbon spectrum was very noisy except for the aromatic region related to the benzophenone moiety.

MS (ESI+): m/z 541.27 $[M + H]^+$.

HPLC (system A4): $t_R = 11.9$ min.

4-(DO3A-*N*-acetamide)-benzophenone 114



Compound **E-38** (56 mg, 0.074 mmol) was dissolved in 1 mL of a mixture of DCM/TFA (1/4, v/v). The solution was left running at RT overnight. The completion of the reaction was checked with RP-HPLC (system A4). After evaporation (water-pump) and co-evaporation with $CHCl_3$, a yellowish sticky foam was obtained (81 mg)

which was used in the complexation step without further purification.

δ_H (300 MHz, D_2O) 7.77-7.54 (7H, m), 7.54-7.46 (2H, m), 4.40-2.70 (24H, m).

δ_C (75.4 MHz, D_2O) 198.4, 138.5, 136.5, 133.0, 131.7 (2C), 129.8 (2C), 128.3 (2C), 118.8 (2C), 55-47.

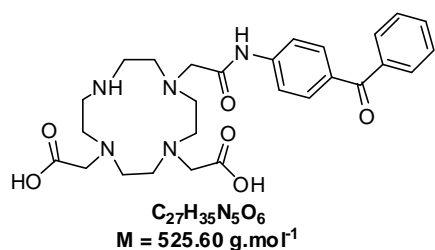
Only carbonyl from the benzophenone structure was detected. The very broad band between 55 and 47 ppm may also include CH_2 from carboxylic and acetamide side-chains.

δ_F (282.5 MHz, D_2O) -75.8.

MS (ESI+): m/z 584.27 $[M + H]^+$.

HPLC (system A4): $t_R = 12.7$ min.

4-(cis DO2A-*N*-acetamide)-benzophenone 118



Compound **B-39** (59 mg, 0.078 mmol) was dissolved in 1.2 mL of a mixture of DCM/TFA (1/2, v/v). The solution was left running at RT overnight. The completion of the reaction was checked with RP-HPLC (system A4). After evaporation under reduced pressure (water-pump) and co-evaporation with $CHCl_3$, a brown solid was obtained

(53 mg). The crude material was dissolved in MeOH (200 μ L) and a brown precipitate appeared upon Et_2O addition (800 μ L). The solid was filtrated and dried under vacuum to afford a brown solid (24.3 mg, 0.038 mmol, if the product contains only one molecule of TFA, 49%).

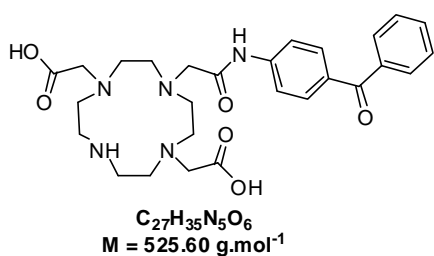
δ_H (300 MHz, D_2O) 7.70-7.30 (9H, m), 3.88 (s, 2H), 3.75-2.70 (20H, m).

δ_C (75.4 MHz, D_2O) 199.1, 174.4, 170.4, 169.4, 142.0, 136.7, 133.1, 132.0, 131.8 (2C), 130.0 (2C), 128.4 (2C), 119.3 (2C), 55.8, 54.6, 53.0, 51.7, 51.6, 49.5, 48.5, 48.2, 47.3, 42.3, 42.0.

MS (ESI+): m/z 526.33 [$M + H$] $^+$.

HPLC (system A4): $t_R = 12.8$ min.

4-(DO2A-*N*-acetamide)-benzophenone 117



(a) 4-(DO2At-Bu-*N*-acetamide)-benzophenone: A suspension of NaHCO_3 (31 mg, 0.37 mmol) in freshly distilled MeCN (10 mL) containing DO2At-Bu (150 mg, 0.37 mmol) was warmed to 55 °C. To this mixture a solution of benzophenone **B-37** (119 mg, 0.37 mmol) in dry MeCN (5 mL) was then added dropwise and left stirring at 55 °C for

5h. The completion of the reaction was checked by RP-HPLC (system A4). Afterwards, the reaction mixture was filtrated and concentrated under reduced pressure to give an orange foam (275 mg). Purification of this crude product was achieved by flash-chromatography on a silica gel column with a step gradient of $\text{MeOH}_{\text{NH}_3}$ (1-3%) in DCM as the mobile phase to give a yellow glassy solid as a mixture of the desired compound and an unidentified benzophenone derivative (70 mg).

MS (ESI+): m/z 638.33 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 660.33 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{51}\text{N}_5\text{O}_6$: 637.81.

HPLC (system A4): $t_R = 18.5$ min, purity 68%.

(b) 4-(DO2A-*N*-acetamide)-benzophenone 117: Unpure compound **F-39** (70 mg) was dissolved in 1.2 mL of a mixture of DCM/TFA (2/1, v/v). The solution was left running at RT over the week-end. The completion of the reaction was checked with RP-HPLC (system A4). After evaporation (water-pump) and co-evaporation with CHCl_3 , a brownish sticky foam was obtained (117 mg) which was used in the complexation step without further purification.

^1H and ^{13}C spectra were carried out with the pure fractions recovered from the purifications performed by semi-preparative RP-HPLC of the corresponding chelates, which partly underwent decomplexation under the acidic conditions (formic acid 0.1%) used for the aq. mobile phase.

δ_{H} (300 MHz, D_2O) 7.95-7.20 (9H, m), 3.90-2.55 (22H, m).

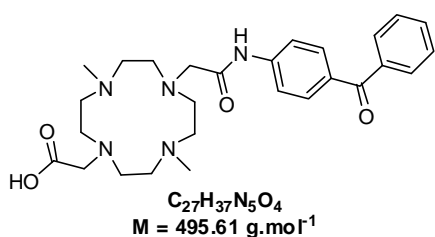
δ_{C} (75.4 MHz, D_2O) 199.5, 174.3 (2C), 163.9, 141.1, 136.8, 133.4, 133.1, 131.9 (2C), 130.1 (2C), 128.6 (2C), 119.8 (2C), 55.5, 53.2 (2C), 52.2 (2C), 49.1 (2C), 47.8 (2C), 42.3 (2C).

δ_{F} (282.5 MHz, D_2O) -75.7.

MS (ESI+): m/z 526.33 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

HPLC (system A4): $t_R = 13.0$ min.

4-(Cyclen-1-acetic acid-4,10-dimethyl-7-acetamidyl)-benzophenone 119



(a) 4-(Cyclen-1-acetic acid-7-acetamidyl)-benzophenone:

A solution of compound **A-40** (140 mg, 0.17 mmol) dissolved in glacial acetic acid (1 mL) and bromohydric acid (33%, w/w in acetic acid) was stirred overnight at RT. An ESI mass spectrometry analysis showed the cleavage

of the two carbamate functions. Additional amount of HBr/AcOH (33%, w/w, 1 mL) was then added as well as sulfuric acid (96%, 0.4 mL). The progress of the reaction was periodically checked by HPLC (system A4). A complete conversion was reached after 20 days of stirring. Thereafter, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by semi-preparative RP-HPLC (system D4). The product-containing fractions were lyophilised to give the desired compound (99 mg).

δ_H (300 MHz, CD₃OD) 7.78-7.69 (6H, m), 7.67-7.59 (1H, m), 7.55-7.48 (2H, m), 3.68 (2H, s), 3.60 (2H, s), 3.30-2.85 (16H, m).

δ_C (75.4 MHz, CD₃OD) 197.6, 174.5, 172.4, 143.7, 139.0, 134.0, 133.6, 132.4 (2C), 130.7 (2C), 129.5 (2C), 120.5 (2C), 56.7, 54.5, 51.1 (2C), 50.8 (2C), 44.1 (2C), 44.0 (2C).

MS (ESI⁺): m/z 468.40 [M + H]⁺, calcd for C₂₅H₃₃N₅O₄: 467.56.

HPLC (system A4): t_R = 12.5 min.

(b) 4-(cyclen-1-acetic acid-4,10-dimethyl-7-acetamidyl)-benzophenone 119: A solution of the previous compound (99 mg, 0.142 mmol, if the product contains two molecules of TFA) dissolved in a mixture of formic acid (2 mL) and a 37% aq. solution of formaldehyde stabilised on MeOH (2 mL) was refluxed (*ca.* 100 °C) overnight. The reaction was checked for completion by RP-HPLC (system A4). The reaction mixture was concentrated under reduced pressure (water-pump). A white solid was obtained and dissolved in a 5% aq. solution of NaHCO₃ (20 mL). The aq. phase was extracted with DCM (20 mL) but an emulsion was occurred. A 1.0 M aq. solution of NaOH was then added (15 mL). The aq. phase was re-extracted once with DCM (20 mL). The organic phases were gathered, dried over anhydrous MgSO₄, filtrated and evaporated to afford a yellow foam (69 mg). The crude product was purified by semi-preparative RP-HPLC (system E4). The product-containing fractions were lyophilised to give the desired compound (65.2 mg, yield 53%, over two steps and if the product contains two molecules of TFA).

δ_H (200 MHz, CD₃OD) 7.83-7.70 (6H, m), 7.70-7.60 (1H, m), 7.59-7.49 (2H, m), 3.71 (2H, s), 3.66-2.90 (26H, m).

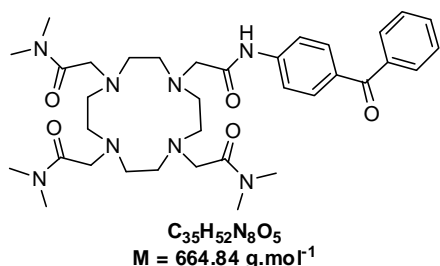
δ_C (50.2 MHz, CD₃OD) 195.6, 175.1, 172.6, 143.7, 139.0, 134.1, 133.7, 132.4 (2C), 130.8 (2C), 129.5 (2C), 120.5 (2C), 56.3, 54.4 (2C), 54.0 (3C), 50.8 (2C), 50.2 (2C), 43.7 (2C).

MS (ESI⁺): m/z 496.40 [M + H]⁺.

HPLC (system A4): t_R = 13.1 min.

3.3.2 FUNCTIONALISED WITH ACETAMIDE ARMS

4-(DO3AM.Me₂-N-acetamidyl)-benzophenone 121



To a solution of **DO3AM.Me₂ A-42** (200 mg, 0.47 mmol, its purity is not optimal) and **BP-37** (164 mg, 0.51 mmol) dissolved in freshly distilled MeCN (15 mL) was added anhydrous K₂CO₃ (130 mg, 0.94 mmol). The resulting suspension was refluxed overnight under an Ar atmosphere. The reaction was checked for completion

by RP-HPLC (system A4). Thereafter, the suspension was filtrated and the filtrate was concentrated under reduced pressure affording a glassy orange solid (320 mg). The crude material was purified by flash-chromatography on a silica gel column with a mixture of DCM-MeOH_{NH3} (9/1, v/v) to give a glassy yellow solid (175 mg, 56 %).

R_f (DCM-MeOH_{NH3}, 9/1, v/v) 0.25.

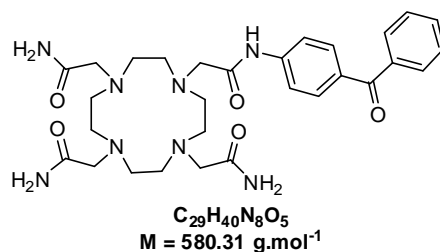
δ_H (300 MHz, CDCl₃) 11.03 (1H, s), 8.15-8.08 (2H, m), 7.75-7.68 (4H, m), 7.58-7.41 (3H, m), 3.75 (2H, s), 3.50-3.10 (6H, m), 3.00-2.70 (18H, m), 2.70-2.20 (16H, m).

δ_C (75.4 MHz, CDCl₃) 195.9, 171.7, 170.9, 170.8, 170.6, 143.7, 138.1, 132.0, 131.7, 131.0 (2C), 129.8 (2C), 128.1 (2C), 119.1 (2C), 57.7, 55.0 (2C), 54.9, 53-48 (CH₂ cyclen), 36.2, 36.1, 36.0, 35.6, 35.5, 35.4.

MS (ESI⁺): m/z 665.32 [M + H]⁺ and 681.35 [M + H₂O]⁺ (water cluster formed during the ionisation process).

HPLC (system A4): $t_R = 15.4$ min, purity 82%.

4-(Cyclen-4,7,10-acetamide-1-acetamidyl)-benzophenone 122



To a solution of DIEA (244 μ L, 1.40 mmol) and monoalkylated cyclen **C-38** (115 mg, 0.28 mmol) dissolved in dry DMF (4 mL) was added at 0 °C a solution of bromoacetamide (128 mg, 0.92 mmol) dissolved in dry DMF (1 mL). A RP-HPLC (system A4) analysis showed a total conversion after the reaction mixture was stirred

overnight. Afterwards, DMF was evaporated and the resulting orange paste (380 mg) turned out to precipitate in DCM. Trituration and filtration yielded a beige solid (170 mg, quant. yield).

R_f (DCM-MeOH_{NH3}, 9/1, v/v) 0.10.

δ_H (300 MHz, CD₃OD) 7.85-7.70 (6H, m), 7.68-7.59 (1H, m), 7.57-7.49 (2H, m), 3.70-3.35 (8H, m), 3.15-2.85 (16H, m).

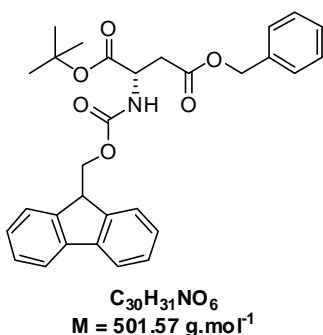
δ_C (50.2 MHz, CD₃OD) 197.6, 174.5, 173.5 (2C), 170.7, 143.9, 139.1, 133.8, 133.6, 132.4 (2C), 130.8 (2C), 129.5 (2C), 120.4 (2C), 58.9, 57.7, 57.3 (2C), 54-52 (CH₂ cyclen).

MS (ESI⁺): m/z 581.36 [M + H]⁺.

HPLC (system A4): $t_R = 12.0$ min, purity 88%.

3.4. LINEAR LIGAND

Fmoc-L-Asp(Bn)-Ot-Bu B-41



(a) Fmoc-L-Asp(Bn)-OH: To a cold solution (4 °C) of commercial L-Asp(Bn)-OH **A-41** (1.0 g, 4.5 mmol) diluted in a sat. K_2CO_3 aq. solution (10 mL) was added dropwise a solution of dioxane (10 mL) containing Fmoc-Cl (1.16 g, 4.5 mmol). The reaction mixture was left stirring overnight at RT and then diluted in deionised water (100 mL). The aqueous phase was extracted twice with DCM (50 mL). The organic phase was sequentially washed with 10% aq. HCl (50 mL), brine and was dried over anhydrous $MgSO_4$.

After filtration and evaporation of the solvent, a pale yellow oil was yielded (2.8 g) and was subsequently purified by flash-chromatography on a silica gel column with a step gradient of MeOH (5-20%) in DCM as the mobile phase to give a white foam (1.58 g, 79%).

R_f (DCM-MeOH, 9/1, v/v) 0.41.

δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) 7.79-7.65 (2H, m), 7.61-7.49 (2H, m), 7.42-7.26 (9H, m), 6.00-5.80 (1H, bs), 5.13 (2H, s), 4.75-4.63 (1H, m), 4.47-4.28 (2H, m), 4.24-4.13 (1H, m), 3.18-2.83 (2H, m).

δ_C (75.4 MHz, $CDCl_3$) 175.5, 171.2, 156.4, 143.8, 143.7, 141.3 (2C), 135.3, 128.6 (2C), 128.4, 128.3 (2C), 127.8 (2C), 127.1 (2C), 125.2 (2C), 120.0 (2C), 67.5, 67.0, 50.6, 47.0, 36.6.

MS (ESI-): m/z 443.93 $[M - H]^-$, calcd for $C_{26}H_{23}NO_6$: 445.46.

(b) Fmoc-L-Asp(Bn)-Ot-Bu B-41: To a solution of the previous compound (500 mg, 1.12 mmol) dissolved in freshly distilled DCM (3 mL) was introduced *tert*-butyltrichloroacetimidate (401 μ L, 2.24 mmol) and the reaction was left running overnight at RT and a precipitate appeared (trichloroacetamide). The completion was checked by TLC. After cooling the reaction mixture to -78 °C, the precipitate was filtrated. After the evaporation of the filtrate, a pale yellow oil was obtained (723 mg) and its purification was achieved by flash-chromatography on a silica gel column with a step gradient of EtOAc (10-20%) in cyclohexane as the mobile phase to give a colorless oil which cristallised (416 mg, 74%).

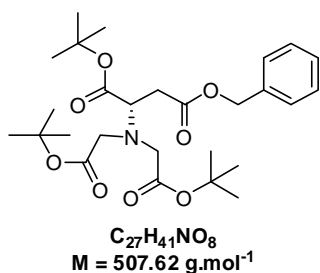
R_f (cyclohexane-EtOAc, 8/2, v/v) 0.36.

δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) 7.76 (2H, d, J 7.5), 7.59 (2H, d, J 7.4), 7.44-7.26 (9H, m), 5.76 (1H, bs), 5.22-5.08 (2H, m), 4.58-4.49 (1H, m), 4.44-4.28 (2H, m), 4.26-4.18 (1H, m), 3.10-2.81 (2H, m), 1.43 (9H, s).

δ_C (75.4 MHz, $CDCl_3$) 170.6, 169.5, 155.9, 143.8, 143.7, 141.2 (2C), 135.4, 128.5 (2C), 128.3, 128.2 (2C), 127.6 (2C), 127.0 (2C), 125.1 (2C), 119.9 (2C), 82.4, 67.1, 66.6, 50.9, 47.0, 36.8, 27.7 (CH_3 *t*-Bu).

MS (ESI+): m/z 502.00 $[M + H]^+$, 518.93 $[M + H_2O]^{+\bullet}$ (water cluster formed during the ionisation process), 524.20 $[M + Na]^+$ and 539.93 $[M + K]^+$.

Di-tert-butylacetate-L-Asp(Bn)-Ot-Bu C-41



(a) L-Asp(Bn)-Ot-Bu: To a cold solution (4 °C) of compound **B-41** (416 mg, 0.83 mmol) dissolved in DCM (8 mL) was added Et_2NH (1.3 mL, 12.5 mmol). The resulting reaction mixture was stirred overnight at RT. The completion of the reaction was checked by TLC. Thereafter, volatiles were evaporated and the resulting pale yellow paste (406 mg) was purified by flash-

chromatography on a silica gel column with a step gradient of MeOH (0-2%) in DCM as the mobile phase to give a pale yellow oil (229 mg, 97%).

R_f (DCM-MeOH, 95/5, v/v) 0.46.

δ_H (200 MHz, $CDCl_3$) 7.40-7.30 (5H, m), 5.14 (2H, s), 3.76-3.68 (1H, m), 2.88-2.62 (2H, m).

δ_C (50.2 MHz, $CDCl_3$) 173.2, 171.0, 135.6, 128.4 (2C or 3C), 128.1 (3C or 2C), 81.3, 66.3, 51.7, 39.1, 27.8 (CH_3 *t*-Bu).

MS (ESI+): m/z 279.97 [$M + H$]⁺, calcd for $C_{15}H_{21}NO_4$: 279.33.

(b) Di-tert-butylacetate-L-Asp(Bn)-Ot-Bu C-41: A suspension in freshly distilled MeCN (5 mL) containing the previous compound (226 mg, 0.81 mmol), *tert*-butylbromoacetate (263 μ L, 1.78 mmol) and anhydrous K_2CO_3 (560 mg, 4.1 mmol) was refluxed overnight. The completion of the reaction was checked by TLC and NMR analyses. Afterwards, the reaction mixture was filtrated and the solvent was evaporated to give brownish residue (528 mg) which was subjected to a purification by flash-chromatography on a silica gel column with cyclohexane/EtOAc (95/5, v/v). A pale yellow oil was recovered (265 mg, 64%).

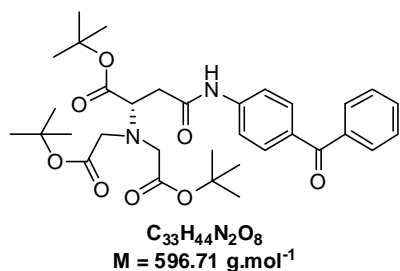
R_f (cyclohexane-EtOAc, 8/2, v/v) 0.57.

δ_H (200 MHz, $CDCl_3$) 7.38-7.30 (5H, m), 5.11 (2H, s), 3.91-3.81 (1H, m), 3.49 (4H, s), 2.93-2.70 (2C), 1.43 (27H, bs).

δ_C (50.2 MHz, $CDCl_3$) 170.6, 170.4, 170.2, 168.8, 135.8, 128.3 (2C), 128.1 (2C), 128.0, 81.5, 81.4, 80.5, 66.2, 61.9, 53.9 (2C), 36.0, 27.9 (CH_3 *t*-Bu).

MS (ESI+): m/z 530.27 [$M + Na$]⁺ and 546.13 [$M + K$]⁺.

Di-tert-butylacetate-L-Asp(benzophenone)-Ot-Bu D-41



(a) Di-tert-butylacetate-L-Asp-Ot-Bu: To a solution of **C-41** (260 mg, 0.51 mmol) dissolved in MeOH (4 mL) was added Pd/C (10%, w/w, 10 mg). The resulting suspension was left stirring overnight under an H₂ atmosphere. The reaction mixture was filtrated on a Celite[®] 545 pad. After solvent removal, a pale yellow oil (219 mg) was recovered.

Purification of this crude product was achieved by flash-chromatography on a silica gel column with a step gradient of MeOH (3-5%) in DCM as the mobile phase to give the desired compound as a colorless oil (126 mg, 59%).

R_f (DCM-MeOH, 95/5, v/v) 0.40.

δ_H (300 MHz, CDCl₃) 3.77 (1H, dd, *J* 11.7 and 4.3), 3.51 (4H, s), 2.71 (2H, ddd, *J* 17.0, 11.7 and 4.3), 1.47 (27H, bs).

δ_C (75.4 MHz, CDCl₃) 173.1, 169.9 (2C), 169.4, 82.6, 82.0 (2C), 61.6, 54.3 (2C), 34.8, 28.1 (CH₃ *t*-Bu), 28.0 (CH₃ *t*-Bu).

MS (ESI⁺): *m/z* 418.13 [M + H]⁺ and 440.13 [M + Na]⁺; MS (ESI⁻): *m/z* 416.27 [M - H]⁻, calcd for C₂₀H₃₅NO₈: 417.49.

(b) Di-tert-butylacetate-L-Asp(benzophenone)-Ot-Bu D-41: To a solution of the previous molecule (66 mg, 0.16 mmol) dissolved in freshly distilled MeCN (1.5 mL) were added 4-aminobenzophenone (32 mg, 0.16 mmol), PyBrOP salt (79 mg, 0.17 mmol) and DIEA (70 μ L, 0.40 mmol). The resulting reaction mixture was left running overnight under an Ar atmosphere. The reaction was checked for completion by RP-HPLC (system A4). Thereafter, solvent was evaporated under reduced pressure and the resulting yellow oily residue was purified by flash-chromatography on a silica gel column with a step gradient of EtOAc (10-20%) in cyclohexane as the mobile phase to give desired compound **D-41** as a white foam (68 mg, 71%).

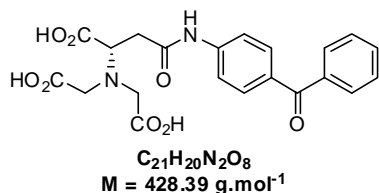
R_f (cyclohexane-EtOAc, 9/1, v/v) 0.12.

δ_H (300 MHz, CDCl₃) 10.78 (1H, s), 7.92-7.84 (2H, m), 7.82-7.73 (4H, m), 7.60-7.53 (1H, m), 7.50-7.42 (2H, m).

δ_C (50.2 MHz, CDCl₃) 196.0, 170.5 (2C), 170.0, 168.9, 143.1, 138.3, 132.4, 132.0, 131.4 (2C), 129.9 (2C), 128.2 (2C), 119.6 (2C), 82.7, 82.0 (2C), 62.1, 54.3 (2C), 37.2, 28.2 (CH₃ *t*-Bu), 28.1 (CH₃ *t*-Bu).

HPLC (system A4): *t_R* = 28.4 min.

Di-acetic acid-L-Asp(benzophenone)-OH 120



Compound **D-41** (68 mg, 0.11 mmol) was dissolved in 2.1 mL of a mixture of DCM/TFA (2/1, v/v). The solution was left running at RT overnight. The completion of the reaction was checked by RP-HPLC (system A4). After evaporation under reduced pressure (water-pump) and co-

evaporation with $CHCl_3$, the resulting residue was purified by semi-preparative RP-HPLC (system F4). The product-containing fractions were lyophilised to give the desired compound as an hygroscopic white powder (37 mg, 0.068 mmol if the product contains only one molecule of TFA, 62%).

δ_H (300 MHz, CD_3OD) 7.84-7.71 (6H, m), 7.69-7.59 (1H, m), 7.58-7.47 (2H, m), 4.23-4.03 (1H, m), 3.82-3.66 (4H, m), 3.00-2.80 (2H, m).

δ_C (75.4 MHz, CD_3OD) 197.7, 174.6 (2C), 173.7, 171.2, 144.3, 139.1, 133.7, 133.5, 132.3 (2C), 130.8 (2C), 129.5 (2C), 120.5 (2C), 63.1, 55.0 (2C), 37.5.

δ_F (282.5 MHz, D_2O) -76.9, -77.7.

MS (ESI-): m/z 427.00 $[M - H]^-$, 444.07 $[M + NH_4^+ - 2H]^-$, 461.07 $[M + 2NH_4^+ - 3H]^-$.

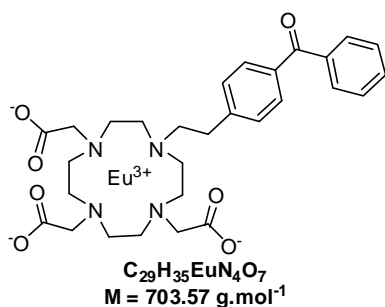
HPLC (system A4): $t_R = 15.1$ min, purity 95%.

3.5. EUROPIUM AND TERBIUM CHELATES

General procedure

Europium (III) and terbium (III) chelates were obtained by dissolving the desired ligand (1.0 eq, usually between 0.01 and 0.02 mmol) in a slightly basic aq. solution (400-500 μL) with the corresponding $LnCl_3 \cdot 6H_2O$ salt (approximately 1.5 eq). The pH was maintained between 6 and 8 by adding adequate volumes of an aq. basic solution (1.0 M aq. NaOH as a general rule). The solution was stirred at RT for one to several hours. The reaction was checked for completion by RP-HPLC (system A4 with either deionised water or AcOH 0.01% instead of TFA 0.1% except for acetamide chelates which are stable under TFA 0.1%). Generally, the crude mixture was submitted without work-up to purification by semi-preparative RP-HPLC (the mobile phase was composed of MeCN and an aq. phase (either pure deionised water, AcOH 0.01% or TFA 0.1%). After freeze-drying of the product-containing fractions, an amorphous powder, sometimes highly hygroscopic, was recovered (ca. 1-10 mg).

4-(DO3A-N-ethyl)-benzophenone Eu(III) chelate Eu-116

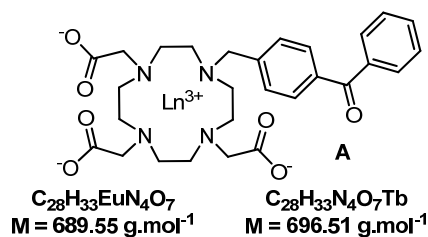


Semi-preparative RP-HPLC: system O4.

MS (ESI-): 815.07 and 817.00 $[M + TFA - H]^-$.

HPLC (system A4 with deionised water): $t_R = 13.8$ min; t_R (ligand) = 13.2 min.

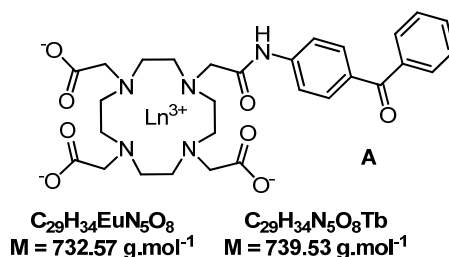
4-(DO3A-*N*-methyl)-benzophenone chelate Ln-115



	Europium	Terbium
Semi-preparative RP-HPLC	System O4	System P4*
MS	(ESI-): 801.07 and 803.13 [M + TFA - H] ⁻	(ESI+): 697.33 [M + H] ⁺ (ESI-): 809.07 [M + TFA - H] ⁻
HPLC	$t_R = 13.1 \text{ min}$, purity 99%	$t_R = 13.1 \text{ min}$
System A4 (H ₂ O)	t_R (ligand) = 10.9 min	

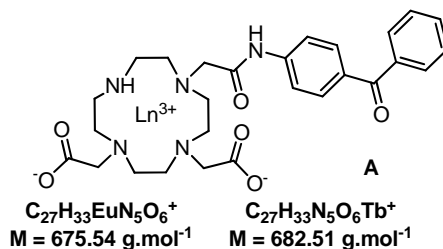
*an attempt of purification with an aq. solution of formic acid 0.1% was performed leading to a partial decomplexation of the chelate whereas in analytical HPLC no significant release of cation was observed.

4-(DO3A-*N*-acetamide)-benzophenone chelate Ln-114



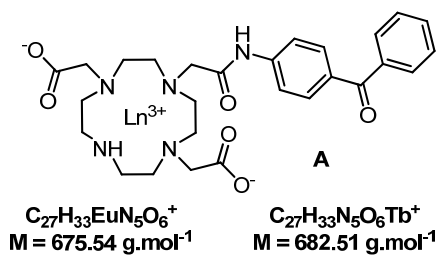
	Europium	Terbium
Semi-preparative RP-HPLC	System O4	System O4
MS	(ESI+): 754.20 and 756.20 [M + Na] ⁺ (ESI-): 730.27 and 732.20 [M - H] ⁻ 845.93 [M + TFA - H] ⁻	(ESI+): 740.33 [M + H] ⁺ (ESI-): 738.20 [M - H] ⁻ 852.00 [M + TFA - H] ⁻
HPLC	$t_R = 11.3 \text{ min}$, purity > 95%	$t_R = 11.2 \text{ min}$
System A4 (H ₂ O)	-	

4-(cis DO2A-*N*-acetamide)-benzophenone chelate Ln-118



	Europium	Terbium
Semi-preparative RP-HPLC	System Q4	System Q4
MS	(ESI+): 675.27 [M]	(ESI+): 682.20 [M]
HPLC	$t_R = 9.6 \text{ min}$, purity 95%	$t_R = 10.0 \text{ min}$, purity 92%
System A4 (AcOH 0.01%)	t_R (ligand) = 12.2 min	

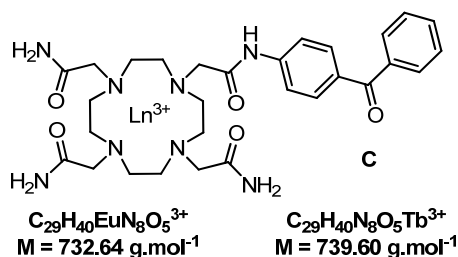
4-(DO2A-*N*-acetamide)-benzophenone chelate Ln-117



	Europium	Terbium
Semi-preparative RP-HPLC	System R4	System R4
MS	(ESI+): 675.27 [M]	(ESI+): 682.27 [M] (ESI-): 908.00 [M + 2TFA - 2H] ⁻
HPLC	$t_R = 10.0 \text{ min}$, purity 90%	$t_R = 10.1 \text{ min}$, purity 99%
System A4 (AcOH 0.01%)*	t_R (ligand) = 12.7 min	

*A sample of Tb(III) chelate was also analysed with system A4 (TFA 0.1%) and revealed no decomplexation. Nevertheless, the purification of this class of chelates performed by semi-preparative RP-HPLC with the same mobile phase was not carried out since the attempt with a milder acid, namely formic acid, was unsuccessful (*cf.* chelate **Ln-115**).

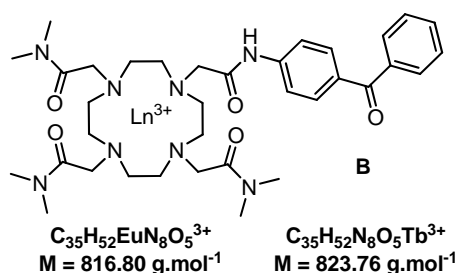
4-(Cyclen-4,7,10-acetamide-1-acetamidyl)-benzophenone chelate Ln-122



	Europium	Terbium
Semi-preparative RP-HPLC	System S4	System T4
MS*	(ESI+): 243.93 [M] ³⁺ 257.93 [M - H + K] ³⁺ 270.93 [M - 2H + 2K] ³⁺ 365.07 [M - H] ²⁺	(ESI+): 246.53 [M] ³⁺ 259.93 [M - H + K] ³⁺ 273.47 [M - 2H + 2K] ³⁺ 369.13 [M - H] ²⁺
HPLC System A4	$t_R = 11.2 \text{ min}$, purity 99%	$t_R = 11.3 \text{ min}$, purity 99%
$t_R \text{ (ligand)} = 12.0 \text{ min}$		

*Unidentified peaks at 285.07 and 298.07 appeared for the Eu(III) chelate as well as 287.20 and 299.73 for the Tb(III) derivative.

4-(DO3AM.Me₂-N-acetamidyl)-benzophenone chelate Ln-121

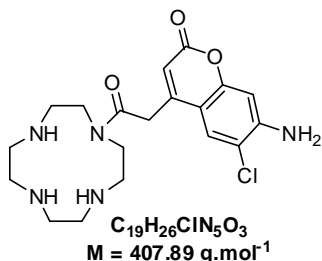


	Europium	Terbium
Semi-preparative RP-HPLC	System U4	System U4
MS*	(ESI+): 285.27 [M - H + K] ³⁺ 298.87 [M - 2H + 2K] ³⁺ 408.13 [M - H] ²⁺ 465.07 [M + TFA - H] ⁻	(ESI+): 287.87 [M - H + K] ³⁺ 301.33 [M - 2H + 2K] ³⁺ 411.27 [M - H] ²⁺ 468.07 [M + TFA - H] ⁻
HPLC System A4	$t_R = 12.8 \text{ min}$, purity 93%	$t_R = 12.7 \text{ min}$, purity 99%
$t_R \text{ (ligand)} = 15.4 \text{ min}$		

4 LIGANDS AND CHELATES CONTAINING A COUMARIN OR QUINOLINONE

4.1. MONO- AND TETRASUBSTITUTED CYCLEN

7-Amino-6-chloro-4-[1-oxo-1-(cyclen-1-yl)-ethan-2-yl]-coumarin C-48



To a solution of **7-Amino-6-chloro-4-methylacetic acid-coumarin G-45** (133 mg, 0.52 mmol) dissolved in SPPS grade DMF (5.3 mL) were added cyclen (361 mg, 2.10 mmol) and PyBrOP salt (267 mg, 0.57 mmol). The resulting reaction mixture was left stirring at RT under an Ar atmosphere for 4h. The completion of the reaction was checked by RP-HPLC (system A4). After evaporation of the solvent the resulting orange paste was purified by semi-

preparative RP-HPLC (system G4). The product-containing fractions were lyophilised to give the desired compound as a pale yellow powder (210 mg, 54% if the product contains three molecules of TFA).

δ_H (300 MHz, CD_3OD) 7.54 (1H, s), 6.67 (1H, s), 5.99 (1H, s) 3.99 (2H, bs), 3.86-3.70 (4H, m), 3.290-3.17 (12H, m).

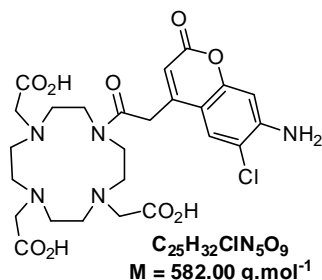
δ_C (75.4 MHz, CD_3OD) 173.4, 163.4, 155.4, 151.9, 150.0, 126.7, 116.6, 111.3, 111.2, 101.5, 47.1, 47.0 (2C), 46.2, 45.4, 44.9, 44.2, 38.2.

An HMQC experiment showed one carbon hidden by CD_3OD multiplet.

MS (ESI+): m/z 408.27 and 410.20 $[M + H]^+$.

HPLC (system A4): $t_R = 9.5$ min, purity 99%.

7-Amino-6-chloro-4-(1-oxo-1-DO3A-ethan-2-yl)-coumarin 135-NH₂



(a) 7-Amino-6-chloro-4-(1-oxo-1-DO3At-Bu-ethan-2-yl)-coumarin

A-57: A suspension of monosubstituted cyclen **C-48** (23 mg, 0.031 mmol), *tert*-butyl bromoacetate (15 μ L, 0.101 mmol) and anhydrous K_2CO_3 (34 mg, 0.248 mmol) in dry MeCN (1 mL) was stirred under an Ar atmosphere for 5h. The reaction was checked for completion by RP-HPLC (system A4). The crude suspension was filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The resulting off-white foam was engaged in the next step without further purification.

R_f (cyclohexane-EtOAc-MeOH_{NH3}, 50/50/1, v/v/v) 0.09.

δ_H (200 MHz, $CDCl_3$) 7.43 (1H, s), 6.64 (1H, s), 6.06 (1H, s), 4.62 (2H, s), 3.83 (2H, s), 3.78-3.67 (2H, m), 3.62-3.50 (2H, m), 3.33 (2H, s), 3.31 (2H, s), 3.25 (2H, s), 3.15-3.04 (2H, m), 2.98-2.80 (4H, m), 2.74 (6H, bs), 1.46 (9H, s), 1.44 (9H, s), 1.41 (9H, s).

MS (ESI+): m/z 750.27 $[M + H]^+$, calcd for $C_{37}H_{56}ClN_5O_9$: 750.32.

HPLC (system A4): $t_R = 22.4$ min, purity 88%.

(b) 7-Amino-6-chloro-4-(1-oxo-1-DO3A-ethan-2-yl)-coumarin 135-NH₂: compound **A-57**

(approximately 0.06 mmol recovered from two different batches) was dissolved in 1.6 mL of a mixture of DCM/TFA (1/1, v/v). The solution was left running at RT overnight. The completion of the reaction was checked with RP-HPLC (system A4). After evaporation (water-pump) and co-evaporation with $CHCl_3$, the residue was purified by semi-preparative RP-HPLC (system H4). The product-containing fractions were lyophilised to give the desired compound (27.8 mg, 0.034 mmol if the product contains only two molecules of TFA, 55% over the two steps).

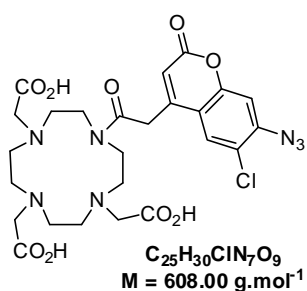
δ_H (200 MHz, CD_3OD) 7.47 (1H, s), 6.68 (1H, s), 6.11 (1H, 1s), 4.10-3.40 (14H, m), 3.30-2.80 (10H, m).

δ_H (50.2 MHz, CD_3OD) 174.0, 173.0, 172.2, 171.5, 164.0, 155.4, 152.5, 149.9, 126.7, 116.6, 111.9, 111.6, 101.6, 55.5, 55.2, 54.8, 54.7, 54.5, 52.9, 52.6, 51.1, 47.2, 37.5 (HMQC experiment did not allow to identify the peaks which correlate with two $-CH_2$ or if CD_3OD multiplet overlaps with a methylene peak).

MS (ESI+): m/z 582.20 $[M + H]^+$.

HPLC (system A4): $t_R = 11.0$ min.

7-azido-6-chloro-4-[1-oxo-1-DO3A-ethan-2-yl]-coumarin 135



To a solution of compound **135-NH₂** (25 mg, 0.031 mmol) dissolved in a 37% aq. solution of HCl (1 mL) was added dropwise at 0 °C NaNO₂ (0.052 mmol) dissolved in deionised water (0.2 mL of a stock solution at 18 mg.mL⁻¹ in sodium nitrite). The reaction mixture was stirred for 1h at 0 °C before an aq. solution of NaN₃ (0.069 mmol) was slowly added (0.2 mL of a stock solution at 22.5 mg.mL⁻¹ in sodium azide). The reaction was checked for completion by RP-

HPLC (system A4). After the solution was stirred for 24h at RT the reaction mixture was purified by semi-preparative RP-HPLC (system I4). The product-containing fractions were lyophilised to give the desired compound as a white amorphous powder (23 mg).

δ_H (200 MHz, CD₃OD) 7.68 (1H, s), 7.35 (1H, s), 6.44 (1H, s), 4.20-3.40 (14H, m), 3.30-2.85 (10H, s).

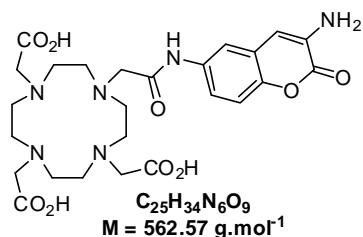
δ_C (50.2 MHz, CD₃OD) 174.0, 172.6, 172.1, 171.7, 162.2, 154.2, 151.4, 142.3, 128.1, 121.9, 118.9, 117.5, 109.1, 55.5, 55.2, 54.7, 54.4, 52.9, 52.4, 51.0, 47.2, 37.4 (no 2D experiment was performed since this analysis applied for the former compound was not able to accurately assign which carbon peak correlates with two methylene substituents).

MS (ESI+): *m/z* unidentified peaks 588.10, 607.92 and 612.05.

MS (ESI-): *m/z* unidentified peaks 609.7, 610.93, 611.80 and 723.87.

HPLC (system A4): *t_R* = 13.6 min.

6-(DO3A-*N*-acetamidyl)-3-amino-coumarin 137-NH₂



(a) 6-(DO3At-Bu-*N*-acetamidyl)-3-Boc-coumarin: To a solution of DO3At-Bu (259 mg, 0.50 mmol) and 6-*N*-(bromoacetyl)-3-*N*-Boc-3,6-diaminocoumarin **E-49** (200 mg, 0.50 mmol) in dry DMF (5 mL) was introduced anhydrous K₂CO₃ (138 mg, 1.00 mmol). The resulting suspension was stirred under an Ar atmosphere at RT for 9h. The reaction was checked for

completion by TLC. Thereafter, the reaction mixture was diluted in deionised water (50 mL), and the suspension of the aqueous/DMF phase was extracted with EtOAc (2 x 50 mL). The organic phase was dried over anhydrous MgSO₄, filtered and evaporated.

Another procedure leading to a better removal of DMF consists of precipitating the product by pouring water in the reaction mixture. The solid was recovered by centrifugation, washed with deionised water and dissolved in EtOAc. The organic phase was dried over anhydrous MgSO₄, filtrated and concentrated to afford a yellow solid without DMF. The crude product was engaged in the *t*-Bu and Boc deprotection step without further purification.

δ_H (300 MHz, CDCl₃) 10.60 (1H, s), 8.28 (1H, s), 8.25 (1H, d, *J* 2.3), 7.65 (1H, dd, *J* 8.9 and 2.4), 7.38 (1H, s), 7.23 (1H, d, overlapping with the peak corresponding to CDCl₃), 3.35 (2H, s), 3.21 (2H, s), 3.12 (4H, s), 2.92 (8H, s), 2.77 (4H, bs), 2.68 (4H, bs), 1.53 (9H, s), 1.47 (9H, s), 1.38 (18H, s).

MS (ESI+): *m/z* 853.13 [M + Na]⁺, calcd for C₄₂H₆₆N₆O₁₁: 831.01.

HPLC (system A4): *t_R* = 22.3 min.

(b) 6-(DO3A-*N*-acetamidyl)-3-amino-coumarin 137-NH₂: The previous crude compound was dissolved in 6.0 mL of a mixture of DCM/TFA (1/3, v/v). The solution was left running at RT overnight. The completion of the reaction was checked with RP-HPLC (system A4). After evaporation (water-pump) and co-evaporation with CHCl₃, the residue was purified by semi-preparative RP-HPLC (system J4). The product-containing fractions were lyophilised to give the desired compound as a white amorphous powder (306 mg, 0.39 mmol, if the product contains only two molecules of TFA, 77% over the two steps).

δ_H (300 MHz, D₂O) 7.30 (1H, d, *J* 2.0), 7.18 (1H, dd, *J* 9.0 and 2.1), 7.03 (1H, d, *J* 8.9), 6.68 (1H, s), 3.87 (4H, bs), 3.69 (2H, s), 3.56-3.32 (10H, m), 3.30-3.10 (8H, m).

δ_C (75.4 MHz, D₂O) 178.0 (3C), 170.2, 160.9, 145.1, 133.7, 131.8, 121.0, 119.3, 116.3, 116.1, 114.1, 56.6 (2C), 55.9, 55.2, 51.7 (2C), 51.2 (2C), 48.2 (4C).

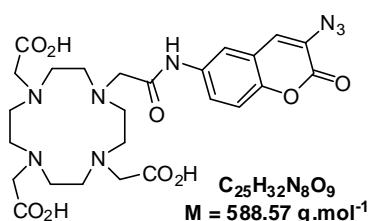
In order to dissolve the compound in D₂O (\approx 550 μ L) a 1.0 M NaOD solution in D₂O was added (\approx 40 μ L).

MS (ESI+): *m/z* 563.27 [M + H]⁺ and 601.13 [M + K]⁺.

MS (ESI-): *m/z* 561.13 [M - H]⁻.

HPLC (system A4): *t_R* = 9.0 min, purity 98%.

6-(DO3A-*N*-acetamidyl)-3-azido-coumarin **137**



To a suspension of 3-amino-coumarin (20 mg, 0.025 mmol) in freshly distilled MeCN (1 mL) was added at 0 °C $NOBF_4$ (\approx 4.2 mg, 0.036 mmol). The colorless reaction mixture became homogenous and turned to yellow. The formation of the diazonium salt was detected by RP-HPLC ($t_R = 8.5$ min with system A4) and after stirring for 20 min, a complete conversion was reached. Thereafter, sodium azide (4.7 mg, 0.072 mmol) diluted in deionised water (0.5 mL) was added and the reaction mixture was left stirring for 30 min at RT. An HPLC analysis revealed a complete conversion. Then, the solution was chilled to 5 °C overnight affording desired 3-azido coumarin **137** as a precipitate which was recovered by centrifugation. Afterwards the solid was washed with MeCN and dried to give compound **137** as a beige solid (11.8 mg). The remaining aqueous phase was purified by semi-preparative RP-HPLC (system K4). The product-containing fractions were lyophilised to give the desired compound as a white amorphous powder (2.6 mg, $m_{\text{total}} = 14.4$ mg, 84%, 0.021 mmol if the product contains one molecule of TFA).

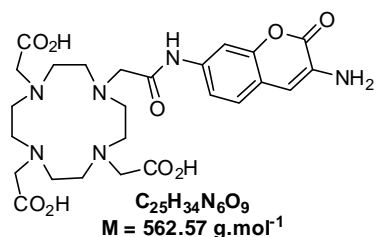
MS (ESI+): m/z 589.13 $[M + H]^+$ and 611.07 $[M + Na]^+$.

MS (ESI-): m/z 587.13 $[M - H]^-$ and 700.67 $[M + TFA - H]^-$.

HPLC (system A4): $t_R = 11.1$ min, purity 94%.

The desired coumarin is neither soluble in CD_3OD nor in acetone- d_6 . Therefore, NMR spectra were performed in D_2O with NaOD. In spite of a good purity according to HPLC, 1H NMR spectrum did not reveal a same degree of purity. Thus, a second HPLC analysis was carried out and unveiled a lower purity (88%).

7-(DO3A-*N*-acetamidyl)-3-amino-coumarin 136-NH₂



(a) 7-(DO3At-Bu-*N*-acetamidyl)-3-*N*-Boc-3-aminocoumarin :

To a solution of DO3At-Bu (143 mg, 0.28 mmol) and 7-*N*-(bromoacetyl)-3-*N*-Boc-3,7-diaminocoumarin **G-49** (110 mg, 0.28 mmol) in SPPS grade DMF (3 mL) was introduced anhydrous K₂CO₃ (77 mg, 0.55 mmol). The suspension was stirred under an Ar atmosphere at RT for 2h30. The reaction

was checked for completion by RP-HPLC (system A4). Thereafter, the reaction mixture was diluted in deionised water (50 mL), and the suspension of the aqueous/DMF phase was extracted with EtOAc (2 x 25 mL). The organic phase was dried over anhydrous MgSO₄, filtered and evaporated to afford a dark yellow foam which was engaged in the next step without further purification.

HPLC (system A4): $t_R = 22.4 \text{ min}$.

(b) 7-(DO3A-*N*-acetamidyl)-3-amino-coumarin 136-NH₂: The previous crude compound was dissolved in 4.0 mL of a mixture of DCM/TFA (1/3, v/v). The solution was left running at RT overnight. The completion of the reaction was checked by RP-HPLC (system A4). After evaporation (water-pump) and co-evaporation with CHCl₃, the residue was purified by semi-preparative RP-HPLC (system J4). The product-containing fractions were lyophilised to give the desired compound as a yellow/orange powder (166 mg, 0.21 mmol if the product contains only two molecules of TFA, 76% over the two steps).

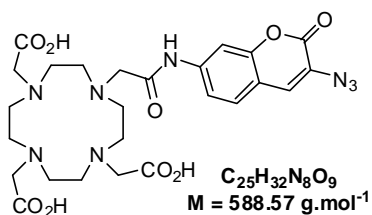
δ_H (300 MHz, D₂O) 7.15 (1H, bs), 6.97-6.85 (2H, m), 6.85-6.76 (1H, m), 4.30-2.60 (24H, m).

δ_C (75.4 MHz, D₂O) 170-168, 160.0, 149.4, 138.0, 127.0, 124.7, 116.1, 115.4, 106.0, 56-47 (contrary to its isomer **137-NH₂** the resolution of ¹³C spectrum of compound **136-NH₂** is very poor; that is why some peaks are missing).

NaOD was used too but the 7-isomer seems to be more soluble in D₂O as well as in MeOD as its 6-isomer.

HPLC (system A4): $t_R = 9.0 \text{ min}$, purity 90%.

7-(DO3A-*N*-acetamidyl)-3-azido-coumarin 136



To a suspension of 3-amino-coumarin **136-NH₂** (50 mg, 0.070 mmol) in freshly distilled MeCN (2.5 mL) was added at 0 °C NOBF₄ (12.5 mg, 0.107 mmol). The resulting reaction mixture was stirred for 30 min before the addition of sodium azide (11.6 mg, 0.178 mmol) diluted in deionised water (1 mL) was

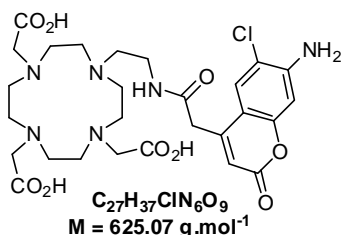
done. The reaction mixture was left stirring at RT for 30 min at RT. A RP-HPLC analysis (system A4) revealed a complete conversion. Afterwards, the crude mixture was concentrated under reduced pressure resulting in a white precipitate which was recovered by centrifugation and freeze-dried (21.7 mg). The remaining aqueous phase was purified by semi-preparative RP-HPLC (system L4). The product-containing fractions were lyophilised to give the desired compound as a yellow amorphous powder (11 mg, $m_{\text{total}} = 32.7 \text{ mg}$, 60%, 0.043 mmol if the product contains one molecule of TFA).

MS (ESI+): m/z 589.13 $[M + H]^+$ and 611.07 $[M + Na]^+$.

MS (ESI-): m/z 587.00 $[M - H]^-$ and 700.53 $[M + TFA - H]^-$.

HPLC (system A4): $t_R = 11.1 \text{ min}$, purity 91%.

4-(DO3A-*N*-ethanacetamidyl)-6-chloro-7-amino-coumarin 138-NH₂



(a) **4-(DO3At-Bu-*N*-ethanacetamidyl)-6-chloro-7-amino-coumarin A-57**: to a solution of 2-(aminoethyl)-DO3At-Bu **B-61** (140 mg, 0.25 mmol) dissolved in SPPS grade DMF (1 mL) were added 7-amino-6-chloro-4-methylacetic acid-coumarin **G-45** (57 mg, 0.22 mmol), PyBrOP salt (115 mg, 0.25 mmol) followed by DIEA (98 μL , 0.56 mmol). The resulting solution was stirred at RT

under an Ar atmosphere for 3h. The reaction was checked for completion by RP-HPLC. After solvent removal the oily residue was purified by flash-chromatography on a silica gel column with a step gradient of MeOH (2-5%) in DCM as the mobile phase to give desired compound **A-57** as a yellow paste (68 mg, "38%" ("0.085" mmol) as the fraction was not pure).

R_f (DCM-MeOH, 98/2, v/v) 0.10.

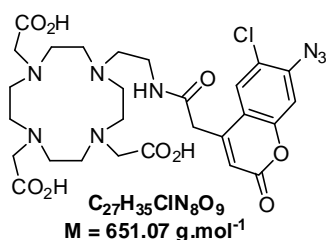
MS (ESI+): m/z 793.20 $[M + H]^+$ and 815.20 $[M + Na]^+$, calcd for $C_{39}H_{61}ClN_6O_9$: 793.39.

HPLC (system A4): $t_R = 18.3 \text{ min}$.

(b) **4-(DO3A-*N*-ethanacetamidyl)-6-chloro-7-amino-coumarin 138-NH₂**: The previous compound (68 mg, "0.085" mmol) was dissolved in 3.0 mL of a mixture of DCM/TFA (1/2, v/v). The solution was left running at RT for 2h30. The completion of the reaction was checked by RP-HPLC (system A4). After evaporation (water-pump) and co-evaporation with CHCl₃, the residue was engaged in the next step without further purification.

HPLC (system A4): $t_R = 9.9 \text{ min}$.

4-(DO3A-*N*-ethanacetamidyl)-6-chloro-7-azido-coumarin **138**

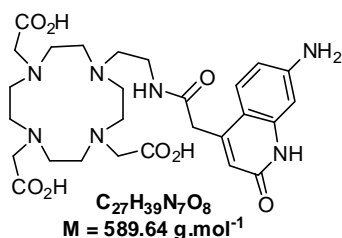


To a solution of compound **138-NH₂** ("0.085" mmol) dissolved in a 37% aq. solution of HCl (1 mL) was added dropwise at 0 °C NaNO₂ (0.136 mmol) dissolved in deionised water (0.25 mL). The resulting reaction mixture was stirred for 20 min at 0 °C followed by the addition of an aq. solution of NaN₃ (0.17 mmol in 0.25 mL). The reaction was checked for completion by RP-HPLC (system

A4). After the solution was stirred for 2h at RT the reaction mixture was purified by semi-preparative RP-HPLC (system N4). The product-containing fractions were lyophilised to give the desired compound (16.2 mg, 0.018 mmol, if the product contains two molecules of TFA, 21% over the two steps).

HPLC (system A4): $t_R = 12.3 \text{ min}$, purity 85%.

4-(DO3A-*N*-ethanacetamidyl)-cs124 **139-NH₂**



(a) 4-(DO3At-Bu-*N*-ethanacetamidyl)-cs124: to a solution of 2-(aminoethyl)-DO3At-Bu **B-61** (50 mg, 0.09 mmol) dissolved in SPPS grade DMF (900 μL) were added cs124-carboxylic acid **C-51** (20 mg, 0.09 mmol), PyBrOP salt (46 mg, 0.01 mmol) followed by DIEA (39 μL, 0.22 mmol). The resulting solution was stirred at RT under an Ar atmosphere for 2h30. The reaction was checked for

completion by ESI mass spectrometry. After evaporating the solvent the oily, residue was purified by flash-chromatography on a silica gel column with a step gradient of MeOH (10-20%) in DCM as the mobile phase to give desired compound **C-62** as a brown powder (30 mg, 44%).

MS (ESI+): m/z 758.33 $[M + H]^+$ and 780.33 $[M + Na]^+$, calcd for $C_{39}H_{63}N_7O_8$: 757.96.

HPLC (system A4): $t_R = 16.4 \text{ min}$, purity 75%.

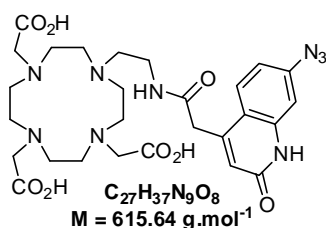
(b) 4-(DO3A-*N*-ethanacetamidyl)-cs124 **139-NH₂:** The previous compound (64 mg, 0.084 mmol) was dissolved in 3.0 mL of a mixture of DCM/TFA (1/2, v/v). The solution was left running at RT overnight. The completion of the reaction was checked by RP-HPLC (system A4). After evaporation (water-pump) and co-evaporation with CHCl₃, the residue was engaged in the next step without further purification.

MS (ESI+): m/z 590.40 $[M + H]^+$.

MS (ESI-): m/z 588.13 $[M - H]^-$ and 701.93 $[M + TFA - H]^-$.

HPLC (system A4): $t_R = 7.4 \text{ min}$.

4-(DO3A-*N*-ethanacetamidyl)-7-azido-cs124 139



To a solution of compound **139-NH₂** (0.084 mmol, the previous deprotection step was assumed to be quantitative) dissolved in a 37% aq. solution of HCl (1 mL) was added dropwise at 0 °C NaNO₂ (0.134 mmol) dissolved in deionised water (0.25 mL). The reaction mixture was stirred for 30 min at 0 °C followed by an aq. solution of NaN₃ (0.168 mmol in 0.25 mL). The reaction was checked for completion by RP-HPLC (system A4). After the solution was stirred for 2h at RT the reaction mixture was purified by semi-preparative RP-HPLC (system M4). The product-containing fractions were lyophilised to give the desired compound (47.8 mg, 0.057 mmol, if the product contains two molecules of TFA, 67% over the two steps).

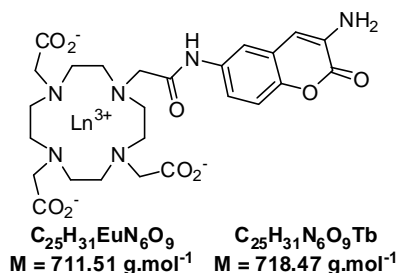
HPLC (system A4): $t_R = 10.2 \text{ min}$, purity 80%.

4.2. EUROPIUM AND TERBIUM CHELATES

General procedure

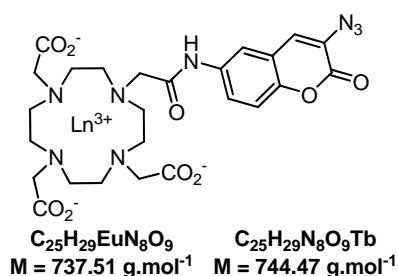
Europium (III) and terbium (III) chelates were obtained by dissolving the desired ligand (1.0 eq) in a slightly basic aq. solution with the corresponding LnCl₃.6H₂O salt (approximately 1.5 eq). The pH was maintained between 6 and 8 by adding adequate volumes of an aq. basic solution (aq. 1.0 M NaOH as a general rule). The solution was stirred at RT for one to several hours. The reaction was checked for completion by RP-HPLC (system A4 with AcOH 0.01 % instead of TFA 0.1%). Generally the crude mixture was submitted without work-up to purification by semi-preparative RP-HPLC (AcOH 0.01% and MeCN as eluents). After freeze-drying of the product-containing fractions an amorphous powder, sometimes highly hygroscopic, was recovered (between 1 to 10 mg).

6-(DO3A-*N*-acetamidyl)-3-amino-coumarin chelate Ln-137-NH₂



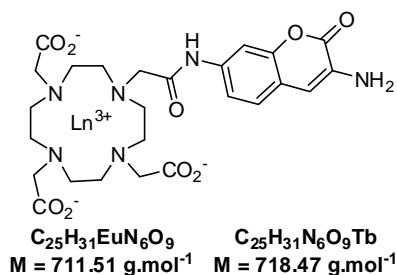
	Europium	Terbium
Semi-preparative RP-HPLC	System V4	System W4
MS	(ESI-): 709.07 and 711.07 [M - H] ⁻ 822.73 and 824.67 [M + TFA - H] ⁻	(ESI-): 717.07 and 717.93 [M - H] ⁻ 830.53 and 831.53 [M + TFA - H] ⁻
HPLC System A4 (AcOH 0.01%)	$t_R = 9.5 \text{ min}$, purity > 99%	$t_R = 9.3 \text{ min}$, purity > 99%
	t_R (ligand) = 8.9 min	

6-(DO3A-*N*-acetamidyl)-3-azido-coumarin chelate Ln-137



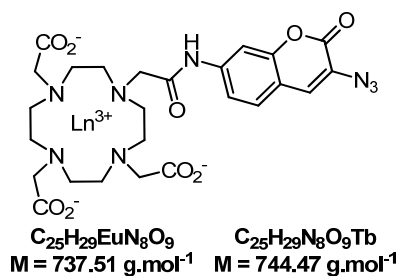
	Europium	Terbium
Semi-preparative RP-HPLC	System X4	System X4
MS	(ESI+): 737.00 and 739.00 [M + H] ⁺ (ESI-): 734.87 and 736.87 [M - H] ⁻ 850.53 [M + TFA - H] ⁻	(ESI-): 742.87 and 744.00 [M - H] ⁻ 856.67 [M + TFA - H] ⁻
HPLC System A4 (AcOH 0.01%)	$t_R = 10.8 \text{ min}$	$t_R = 10.4 \text{ min}$, purity 80%
	t_R (ligand) = 10.9 min	

7-(DO3A-*N*-acetamidyl)-3-amino-coumarin chelate Ln-136-NH₂



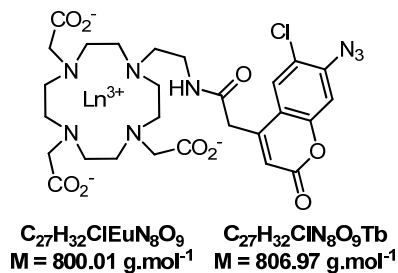
	Europium	Terbium
Semi-preparative RP-HPLC	System V4	System V4
MS	(ESI-): 709.07 and 711.00 [M - H] ⁻ 822.60 and 824.67 [M + TFA - H] ⁻	(ESI-): 717.07 and 717.93 [M - H] ⁻ 830.60 and 831.73 [M + TFA - H] ⁻
HPLC	$t_R = 8.9 \text{ min}$, purity 96%	$t_R = 8.9 \text{ min}$, purity 99%
System A4 (AcOH 0.01%)	t_R (ligand) = 8.7 min	

7-(DO3A-*N*-acetamidyl)-3-azido-coumarin chelate Ln-136



	Europium	Terbium
Semi-preparative RP-HPLC	System X4	System X4
MS	(ESI-): 735.02 and 736.80 [M - H] ⁻ 848.60 and 850.60 [M + TFA - H] ⁻	(ESI-): 743.00 and 743.93 [M - H] ⁻ 856.60 and 857.67 [M + TFA - H] ⁻
HPLC	$t_R = 10.6 \text{ min}$, purity 70%	$t_R = 10.7 \text{ min}$, purity 64%
System A4 (AcOH 0.01%)	t_R (ligand) = 10.9 min	

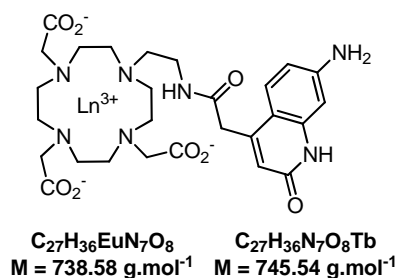
4-(DO3A-*N*-ethanacetamidyl)-6-chloro-7-azido-coumarin Ln-138



	Europium	Terbium
Semi-preparative RP-HPLC	System AA4	System AA4
MS	(ESI+): 799.07 and 801.13 [M + H] ⁺ (ESI-): 798.93 [M - H] ^{-*}	(ESI+): 807.13, 808.20 and 809.13 [M + H] ⁺
HPLC	$t_R = 12.4 \text{ min}$, purity 96%	$t_R = 12.4 \text{ min}$, purity 92%
System A4 (AcOH 0.01%)	t_R (ligand) = 11.8 min	

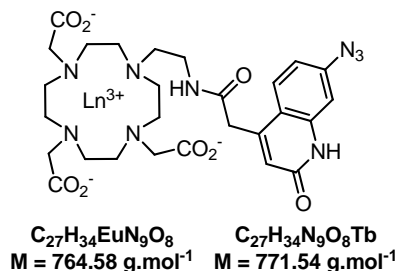
*minor peak; unidentified peaks with europium isotopic pattern were detected at 832, 845 and 862.

4-(DO3A-*N*-ethanacetamidyl)-cs124 chelate Ln-139-NH₂



	Europium	Terbium
Semi-preparative RP-HPLC	System Y4	System Y4
MS	(ESI-): 735.93 and 738.07 [M - H] ⁻ 851.87 [M + TFA - H] ⁻ (ESI+): 738.07 and 740.07 [M + H] ⁺	(ESI-): 742.07 and 743.20 [M - H] ⁻ 857.80 [M + TFA - H] ⁻ (ESI+): 746.27 and 746.87 [M + H] ⁺
HPLC	$t_R = 8.3 \text{ min}$, purity 90%	$t_R = 8.3 \text{ min}$
System A4 (AcOH 0.01%)	Ligand 139 was not properly eluted contrary to the chelates.	

4-(DO3A-*N*-ethanacetamidyl)-cs124 chelate Ln-139



	Europium	Terbium
Semi-preparative RP-HPLC	System Z4	System Z4
MS	(ESI-): 876.07 and 877.93 [M + TFA - H] ⁻	(ESI-): 883.80 and 884.73 [M + TFA - H] ⁻
HPLC System A4 (AcOH 0.01%)	$t_R = 10.5 \text{ min}$, purity 92%	$t_R = 10.5 \text{ min}$, 84%
	t_R (ligand) = 9.8 min	

V. ABSORPTION AND LUMINESCENT MEASUREMENTS

UV-visible absorption spectra were obtained on a Varian Cary 50 scan spectrophotometer by using a rectangular quartz cell (Varian, standard cell, Open Top, 10 × 10 mm, 3.5 mL or Hellma, 108.002-QS, light path: 10 mm, 500 μL). **Fluorescence spectroscopic** studies (emission/excitation spectra) were performed on a Varian Cary Eclipse spectrophotometer with a semi-micro quartz fluorescence cell (Hellma, 104F-QS, 10 × 4 mm, 1400 μL or Hellma, 105.251-QS, light path: 3 × 3 mm, 45 μL).

Relative quantum yields were measured in deionised water or EtOH at 25 °C by a relative method using rhodamine 6G (R6G, $\Phi = 0.88$ in ethanol) or [Ru(bpy)₃]Cl₂ ($\Phi = 0.028$ in water).²¹⁷ The following equation was used to determine the relative fluorescence quantum yield:

$$\Phi(X) = (A_S/A_X) (F_X/F_S) (n_X/n_S)^2 \Phi(S)$$

where A is the absorbance (in the range 0.01–0.1 a.u.), F is the area under the emission curve, n is the refractive index of the solvents (at 25 °C) used in measurements (n = 1.333 for deionised water and 1.361 for EtOH), and the subscripts s and x represent standard and unknown, respectively.

Emission spectra were recorded in “phosphorescence mode” with the following parameters: delay time: 0.1 ms, gate time: 3 ms, total decay time: 10 ms, flash number: 1, scan rate 606.06 nm min⁻¹, data interval: 1.0 nm, excitation slit: 5 nm, emission slit: 5 nm, excitation filter: auto, emission filter: auto. Emission spectra were not corrected.

Chapitre 5 : Partie expérimentale.

Lifetime measurements were achieved by using the following parameters: delay time: 0 ms, flash number: 1, excitation slit: 5 nm, emission slit: 10 nm, total decay time: 10 ms, cycle number: 20 and PMT (sensitivity): low to high.

Synthesis and luminescence properties of new red-shifted absorption lanthanide(III) chelates suitable for peptide and protein labelling†

Nicolas Maindron,^a Séverine Poupart,^a Maxime Hamon,^a Jean-Baptiste Langlois,^a Nelly Plé,^{b,c} Ludovic Jean,^{a,b} Anthony Romieu^{*a,b} and Pierre-Yves Renard^{*a,b,d}

Received 5th October 2010, Accepted 23rd December 2010

DOI: 10.1039/c0ob00832j

The synthesis and photo-physical properties of an original bis-pyridinylpyrazine chromophore efficiently sensitising europium(III) and samarium(III) are described. The corresponding lanthanide(III) complexes display in aqueous solutions a maximum excitation wavelength which is significantly red-shifted compared to the usual terpyridine-based chelates, and a valuable luminescence brightness above 2 000 dm³ mol⁻¹ cm⁻¹ at 345 nm was obtained with a europium(III) derivative. Further functionalisation with three different bioconjugatable handles was also investigated and their ability to efficiently label a model hexapeptide was evaluated and compared. Finally, the best bioconjugatable europium(III) chelate was used in representative labelling experiments involving monoclonal antibodies and the luminescence features of the corresponding bioconjugates remained satisfactory.

Introduction

A wide range of bio-analytical and biomedical applications involved in various fields such as diagnostic, drug discovery and molecular imaging (both *in cellulo* and *in vivo* contexts),¹ require accurate investigations of biological events and/or materials through the use of optical bioprobes. Since the targeted analytes are often present in minute concentrations in complex biological media, these biomolecular tools must be as sensitive as possible. Besides, they have to give rise to a specific and easy-to-measure signal. For more than 25 years,^{2,3} luminescence bioprobes based on lanthanide complexes, have turned out to be well-suited tools for such challenging applications.^{4,5} Indeed, these luminescent chelates possess remarkable photophysical properties.⁶ For instance, long-lived emission of lanthanide(III) cations can be temporally resolved from scattered light and background fluorescence (*e.g.*, from biological matrix) to dramatically enhance measurement sensitivity.

The poor absorption of a lanthanide ion can be overcome by its insertion inside an adequate organic ligand which is able to absorb UV-visible light and subsequently transfer it onto the metal ion *via* its triplet state (a process called luminescence sensitisation or antenna effect).⁶ This transfer leads also to an important apparent Stokes' shift of up to about 250 nm (compared to 30–50 nm for most organic fluorescent dyes).² These unique spectroscopic features combined with lanthanide(III) cation's narrow emission bands in the red-light region explain why lanthanide luminescent chelates are valuable tools in a large panel of highly sensitive bioaffinity assays.⁷ Using these lanthanide(III) chelates, a sub-picomolar detection threshold is readily achieved,⁸ whereas with other fluorescent probes the highest limit of detection reached is in the picomolar range.²

A lanthanide luminescent bioprobe must fulfil several requirements to be efficient: high thermodynamic stability as well as kinetic inertness in various biological matrices and at physiological pH, good absorption and emission properties, photostability and water solubility (for *in cellulo* applications, non-cytotoxicity is also needed).⁴ Finally, one of the challenges in the design of luminescent lanthanide probes dedicated to bioanalyses and bioimaging applications, is to be able to increase the excitation wavelength as high as possible. The long-wave UV region or visible spectrum are preferred and targeted (especially wavelengths around or above 350 nm) for two intrinsic reasons: biomolecules/biopolymers (*e.g.*, DNA) are usually damaged by short- or medium-wave UV light, and tissues' autofluorescence excitation wavelengths are usually below 320 nm. Three strategies are generally adopted to extend the excitation window of Ln(III) complexes (mainly applied to Eu(III) complexes) to a long-wavelength region.⁹ Diminishing the energy gap between the lowest S₁ state and the T₁ state of the antenna ligand is considered as an effective way to extend the

^aEquipe de Chimie Bio-Organique, COBRA-CNRS UMR 6014 & FR 3038, rue Lucien Tesnière, 76131 Mont-Saint-Aignan, France. E-mail: pierre-yves.renard@univ-rouen.fr, anthony.romieu@univ-rouen.fr; Fax: +33 2-35-52-29-71; Tel: +33 2-35-52-24-14 (or 24-15); Web: <http://ircof.crihan.fr>

^bUniversité de Rouen, Place Emile Blondel, 76821 Mont-Saint-Aignan, France

^cEquipe de Chimie Hétérocyclique, COBRA-CNRS UMR 6014 & FR 3038, rue Lucien Tesnière, 76131 Mont-Saint-Aignan, France

^dInstitut Universitaire de France, 103 Boulevard Saint-Michel, 75005 Paris, France

† Electronic supplementary information (ESI) available: Detailed synthetic procedures for compounds **16** and **25**, characterisation data for compounds **6**, **8**, **10**, **17** and **18**, ESI mass spectra of Ln(III) chelates, bioconjugatable derivatives and luminescent labelled peptides. See DOI: 10.1039/c0ob00832j

excitation wavelength for the Eu(III) complex into the visible-light region through the usual triplet energy-transfer.^{10,11} Another promising means of longer-wavelength sensitisation of Eu(III) emission is through the singlet pathway, in which the excited-state energy of a chromophore is directly transferred from its S_1 state to the luminescent states of the Eu(III) center (*i.e.*, charge transfer transitions).¹² Two- (or multi-) photon excitation, that is, simultaneous absorption of two photons of half energy is the third way to circumvent the use of UV light and has recently been successfully applied to Eu(III) complexes and nanoprobes for live cell imaging applications.¹³

With the goal in mind to develop a new structurally simple Ln(III) chelate bio-labelling reagent that displays UV-A or visible absorption maximum, we thought to implement the first strategy to Ln(III) chelates comprising a terpyridine unit as antenna, by replacing its central pyridine ring by a pyrazine moiety. Indeed, the commercially available Ln(III) terpyridine-based chelates cur-

rently used for diagnostics or drug discovery purposes, generally possess a maximum excitation wavelength below 340 nm. These stable luminescent complexes are generally composed of a 4'-aryl-substituted 2,2':6',2''-terpyridine unit as the light-absorbing moiety, methylenitrilo diacetic acids as the chelating arms, and a bioconjugatable group for coupling to biomolecules/biopolymers (Fig. 1).¹⁴ To date, to our knowledge, there are only two Ln(III) chelate labels bearing a diazine ring within their chromophoric moiety (Fig. 2).^{15,16} The first one is the bis-pyrazolopyrazine Ln(III) chelate **4** that displays in borate buffer (pH 8.5) a moderate luminescence brightness ($\epsilon \times \Phi$) $250 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 336 nm for Eu(III) ion,¹⁷ and a good value of $6380 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for Tb(III) ion thanks to the sensitiser triplet-state energy level. Interestingly, the introduction of this pyrazine unit instead of the central pyridine ring of the original bis-pyrazolepyridine Ln(III) chelate, leads to a significant bathochromic shift of 15 nm of the excitation wavelength.^{18,19} The second one **5**, based on a

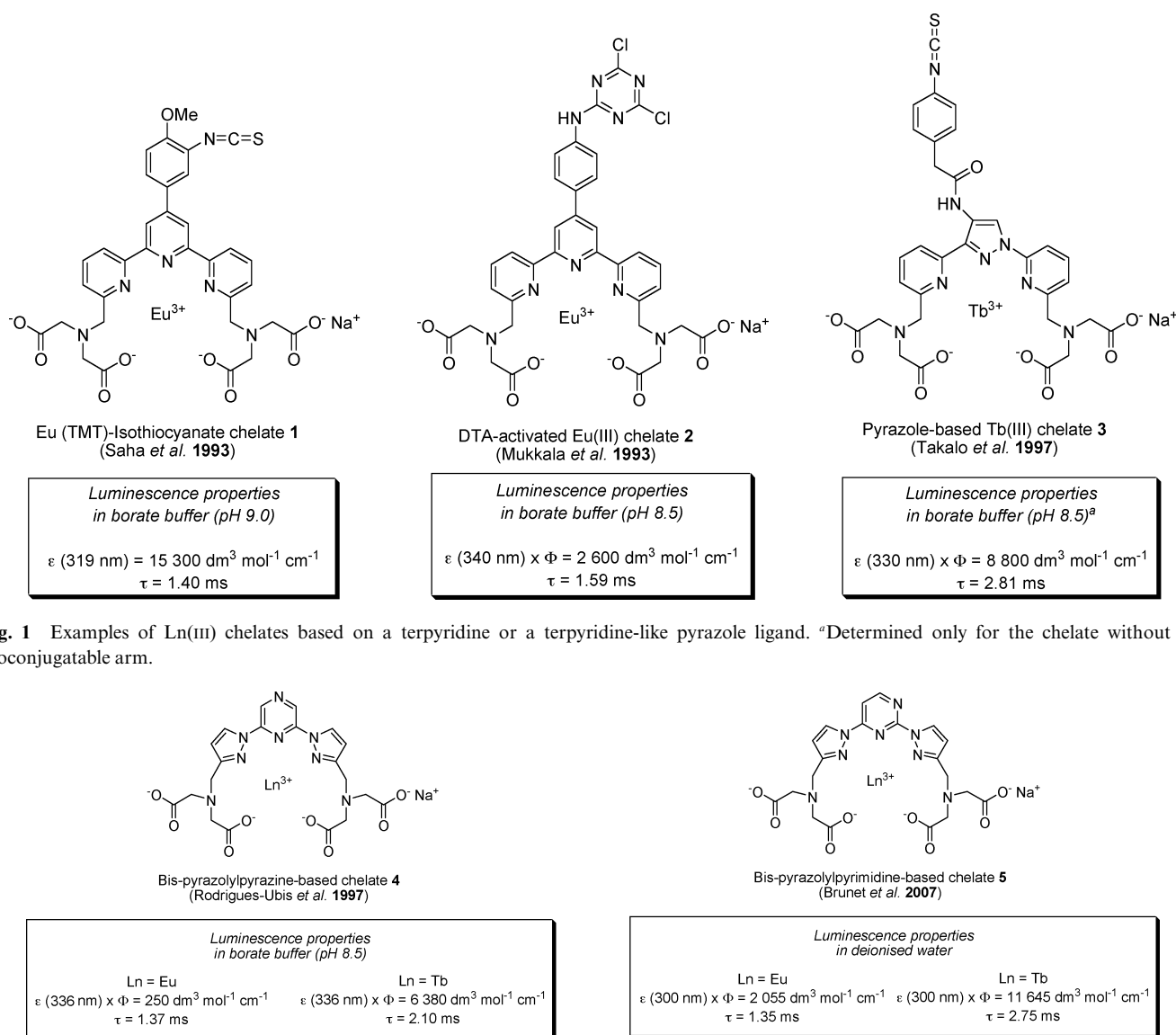


Fig. 1 Examples of Ln(III) chelates based on a terpyridine or a terpyridine-like pyrazole ligand. ^aDetermined only for the chelate without the bioconjugatable arm.

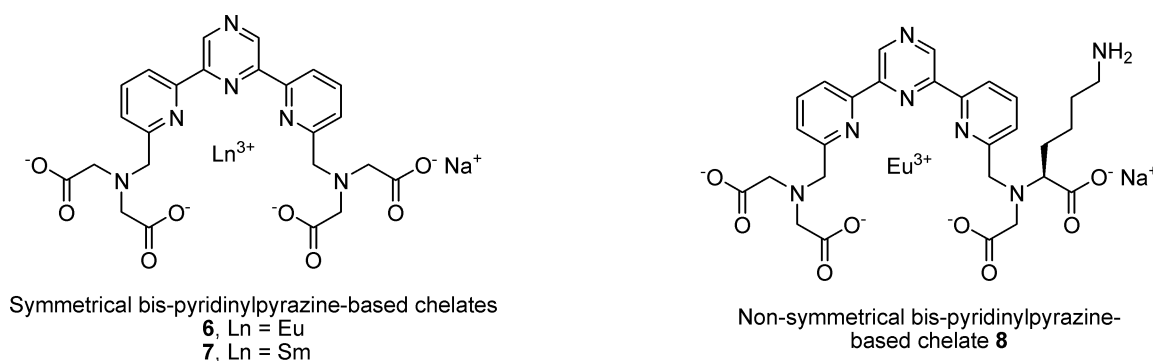


Fig. 3 Structures of lanthanide(III) chelates composed of a bis-pyridinylpyrazine unit as the energy-absorbing and donating ligand, studied in this work.

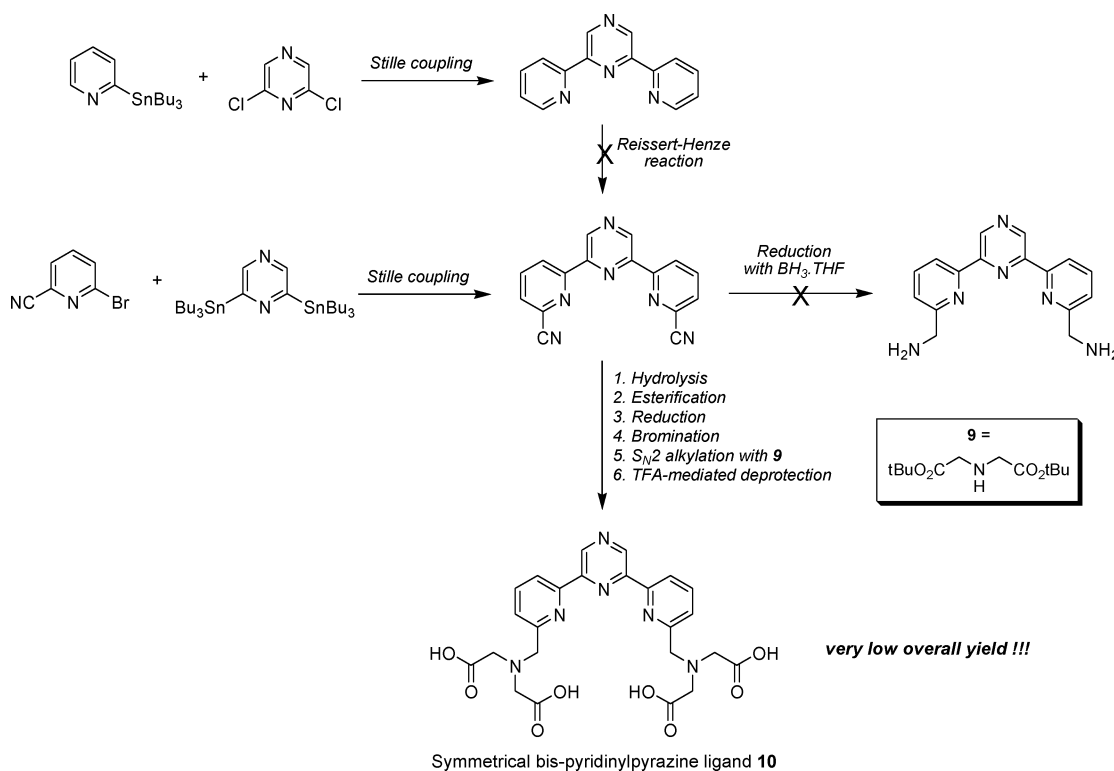


Fig. 4 First synthetic pathways explored for the preparation of symmetrical bis-pyridinylpyrazine ligand **10**.

bis-pyrazolopyrimidine ligand, shows better luminescence brightness in water for both Eu(III) and Tb(III) ions: $2\,055\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ and $11\,645\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ respectively. However, the main drawback of such chelates remains an excitation maximum at the more energetic wavelength of 300 nm. Thus, it seems relevant to examine the chemistry of 2,6-di(2-pyridinyl)pyrazine ligand²⁰ whose functionalisation with chelating arms and its subsequent complexation with Ln(III) ions have never been explored.

Here we report the first synthesis along with the photophysical properties of Eu(III) chelate **6** based on a bis-pyridinylpyrazine chromophoric moiety functionalised with two methylenedicarboxylic acid moieties (Fig. 3). The preparation of the non-symmetrical derivative **8** bearing a lysine residue within one of the two chelating arms is also described. Its potential utility in the context of luminescent bio-labelling is illustrated through its conjugation to a model hexapeptide and monoclonal antibodies.

Results and discussion

Synthesis of the symmetrical functionalised bis-pyridinylpyrazine ligand

The bis-pyridinylpyrazine core structure was obtained *via* a tricky to optimise and efficient Stille cross-coupling reaction between 2,6-dichloropyridine and 2-(tributylstannyl)pyridine (Fig. 4). The most frequently used synthetic method to introduce the chelating arms onto the 6,6''-positions of a terpyridine scaffold, involves a key di-cyano derivative which is obtained through a modified Reissert–Henze reaction.²¹ Thus, it was theoretically possible to get the targeted 6,6''-functionalised bis-pyridinylpyrazine ligand **10** by using one of the two following synthetic strategies: (1) the nitrile functions could be reduced with borane–tetrahydrofuran complex to afford the corresponding primary bis-amine which would then be twice carboxymethylated with an alkyl bromoacetate followed

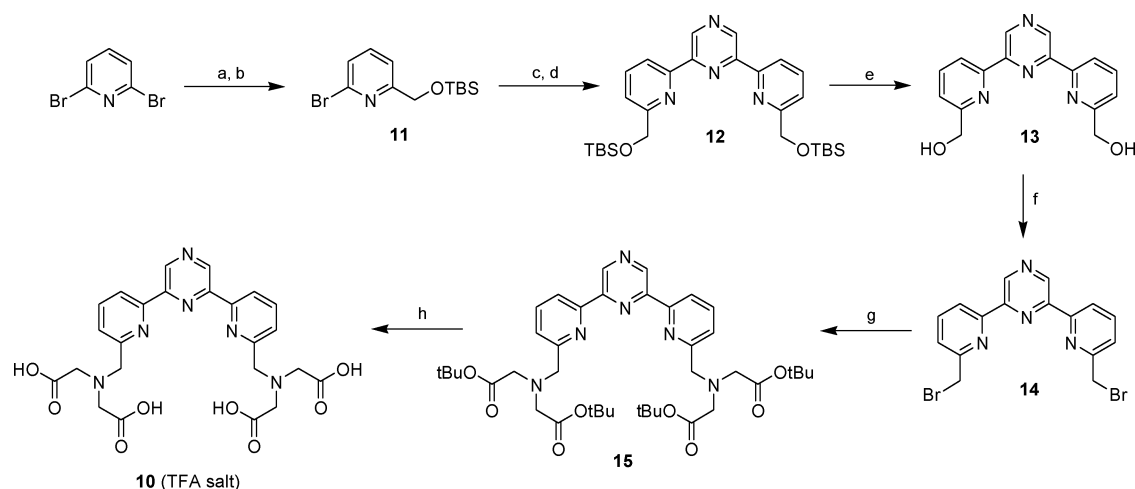
by hydrolysis of the esters to give the free methylenitrilo diacetic acids, or (2) the nitrile functions could be hydrolysed to carboxylic acids, which would be esterified and subsequently reduced to alcohols. Thereafter, the primary bis-alcohol would be converted into the corresponding bis-bromide by treatment with PBr_3 which could undergo $\text{S}_{\text{N}}2$ reaction with an iminoacetic acid ester followed by hydrolysis to give the desired ligand.²² However, introduction of nitrile functions onto the bis-pyridinylpyrazine scaffold by means of the Reissert–Henze reaction gave poor yields, thus we decided to perform their incorporation prior to the Stille cross-coupling reaction. The optimised Stille reaction between 2,6-(tributylstannyl)pyrazine and 2-bromo-6-cyanopyridine efficiently afforded the bis-nitrile derivative.²³ Reduction with borane–tetrahydrofuran complex failed but nitriles hydrolysis followed by esterification was successful. The main drawback of this synthetic scheme is that the hydride source (NaBH_4 or DIBAL-H), used for reduction of esters, led to an unresolved mixture of desired bis-alcohol and boron (or aluminium) complex salts. Consequently, the PBr_3 -mediated bromination reaction was performed on the crude reduction mixture to give the bis-bromide derivative with an unsatisfactory 9% overall yield for the two steps. The substitution of the bromine atoms by di-*tert*-butyl iminodiacetate **9** followed by *tert*-butyl deprotection gave ligand **10** with a low 13% overall yield for this two-step reaction sequence. The insignificant overall yield for this 8-step synthetic procedure, which amounted to 0.2%, led us to discard this approach and develop another synthetic route able to circumvent the tedious ester reduction step.

We decided then to investigate a synthetic strategy involving the introduction of a protected 2-(hydroxymethyl) pyridine moiety on the 2,6-dichloropyrazine *via* the same Stille cross-coupling reaction (Scheme 1). The required trimethyltin derivative was easily obtained from the commercially available 2,6-dibromopyridine in three steps and with a good 72% yield: the first step allowed to replace one of the two bromine atoms by the hydroxymethyl group in almost quantitative yield as described by Cai *et al.*²⁴ Thereafter, the primary alcohol was protected as a

tert-butyldimethylsilyl (TBS) ether to afford compound **11**. The key trimethyltin derivative was efficiently generated by trapping the lithiated intermediate with trimethyltin chloride in dry THF from -78°C to room temperature for 4 h (89% yield for the crude product). The Stille cross-coupling reaction between this stannane intermediate and 2,6-dichloropyrazine was performed with $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ as a $\text{Pd}(0)$ catalyst in an argon deaerated xylene solution at 110°C overnight to give the desired bis-TBS ether **12** of bis-pyridinylpyrazine in a moderate 50% yield. The removal of TBS ethers was performed with a 1.0 M solution of TBAF in THF and afforded the desired bis-alcohol **13**. This bis-pyridinylpyrazine derivative was isolated in a pure form by simple precipitation in a 0.1% aq. trifluoroacetic acid (TFA) and MeOH (1 : 1) mixture (79% yield). Next, bis-bromination reaction of **13** was carried out in dry DMF with PBr_3 to give the bis-halide compound **14** in a quantitative yield. This crude product was then directly engaged in the substitution step with *tert*-butyliminoacetate **9**. This latter reaction was performed with DIEA as base, NaI as catalyst and in dry DMF. Finally, the removal of *tert*-butyl esters was achieved in a mixture of TFA and CH_2Cl_2 (1 : 1) containing 2.5% of water. The symmetrical tetrakis(acetic acid) ligand **10** was purified by flash-chromatography on a RP- C_{18} silica gel column. All spectroscopic data, in particular NMR and mass spectrometry, were in agreement with the structure assigned (see ESI[†]). By comparison with the synthetic route initially explored (Fig. 1), this alternative pathway led to the desired ligand **10** with an improved overall yield of 7.6%.

Synthesis of the non-symmetrical functionalised bis-pyridinylpyrazine ligand suitable for bioconjugation studies

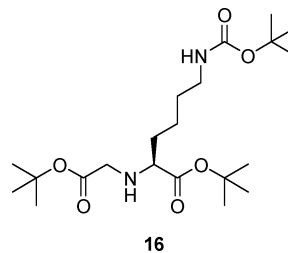
In order to have a suitable chemically reactive group for the bioconjugation of the corresponding $\text{Ln}(\text{III})$ chelates derived from bis-pyridinylpyrazine ligand to various biomolecules/biopolymers, we also explored the synthesis of the non-symmetrical ligand **18** bearing a lysine residue from the dibromide derivative **14**



Scheme 1 Reagents and conditions: a) $n\text{BuLi}$ (1.0 equiv.), THF, -70°C , 15 min then DMF (1.5 equiv.), -78°C , 15 min then MeOH, $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$, -78°C to rt then NaBH_4 (1.0 equiv.), rt, 92%; b) TBS-Cl (1.2 equiv.), imidazole (4.0 equiv.), DMF, rt, 25 min, 88%; c) $n\text{BuLi}$ (1.1 equiv.), THF, -78°C , 90 min then Me_3SnCl (1.05 equiv.), rt, 4 h, 89%; d) 2,6-dichloropyrazine (0.75 equiv.), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.05 equiv.), xylene, 110°C , 6 h, 50%; e) 1 M TBAF in THF (2.3 equiv.), THF, rt, 2 h 30, 79%; f) PBr_3 (3.0 equiv.), DMF, 0°C to rt, 4 h, 95%; g) secondary amine **9** (2.2 equiv.), NaI (1.1 equiv.), DIEA (10 equiv.), DMF, rt, 6 h 30, 64%; h) TFA, H_2O (50 equiv.), CH_2Cl_2 , 0°C to rt, 5 h, 44%.

(Scheme 2). Indeed, the post-synthetic derivatisation of the ϵ -amino group of this original chelating arm with an homobifunctional (or trifunctional) cross-linker should enable the introduction of a bioconjugatable moiety reactive towards the primary amines of proteins (e.g., *N*-hydroxysuccinimidyl ester, NHS ester). Firstly, the required fully-protected chelating arm **16** derived from lysine was readily prepared from commercially available Fmoc-L-Lys(Boc)-OH using a three-step method (see ESI†). The one-pot synthesis leading to fully-protected non-symmetrical intermediate **17** was a tricky step. Indeed, dibromide derivative **14** was flanked by two equivalent reactive sites, whereas the two amines involved in the alkylation process did not exhibit the same reactivity (presumably due to steric considerations, secondary amine **9** was found to react faster than the lysine derivative **16**). Consequently, a slight excess (1.1 equiv.) of less reactive secondary amine **16** was first added to a dry DMF solution containing **14**. The mixture was stirred at room temperature for 9 h prior to the addition of secondary amine **9** in several portions over a period of 48 h. Eventually, the desired compound **17** was isolated from the complex reaction mixture (containing **17** and the two possible symmetrical compounds) with a modest 18% yield after two successive purifications: a normal phase flash-chromatography followed by a semi-preparative RP-HPLC purification. The removal of acid-labile protecting groups Boc and *tert*-butyl was carried out with a mixture of TFA-CH₂Cl₂ (1 : 1) containing 2.5% of water. The non-symmetrical ligand **18** was isolated in a pure form by semi-preparative RP-HPLC. Its structure was confirmed by NMR and ESI mass spectrometry measurements (see ESI†). This desymmetrisation process involving a sequential alkylation of two different secondary amines led logically to the desired ligand **18**

with a lower overall yield (2.6%) than the one obtained for ligand **10**.

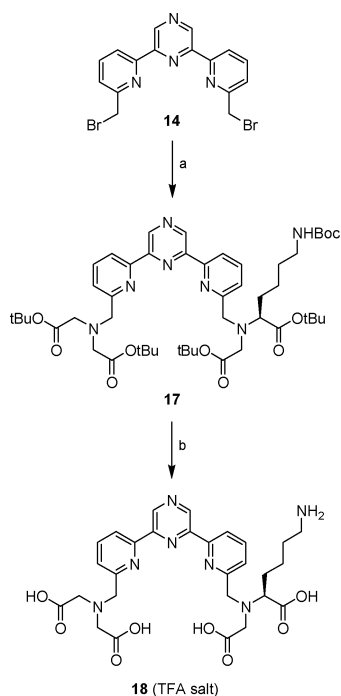


Synthesis and characterisation of Ln(III) chelates

Bis-pyridinylpyrazine ligands **10** and **18** were converted to the corresponding Eu(III) chelates by treatment with aq. europium(III) chloride. The completion of these latter reactions was checked by UV–visible spectrophotometric measurements and purification was achieved by flash-chromatography on a RP-C₁₈ silica gel column. The stoichiometry [1 : 1] and structures of these Eu(III) chelates were confirmed by ESI mass spectrometry analyses (see ESI†). Interestingly, the Tb(III) and Sm(III) complexes of symmetrical ligand **10** were also prepared from their respective hexahydrate trichloride salts (for ESI mass spectra, see ESI†). The Tb(III) chelate was found to be non luminescent whereas Sm(III) chelate **7** exhibited a modest quantum yield of 0.5%.²⁵ Thus, we decided to focus our next comprehensive spectral and bioconjugation studies only on the Eu(III) chelates.

Photo-physical properties of the bis-pyridinylpyrazine ligands and the corresponding Eu(III) chelates

The photo-physical features for Eu(III) chelates **6** and **8** are presented in Table 1. The ligand triplet-state level was not measured; nevertheless, since the Tb(III) chelate was not luminescent contrary to the Sm(III) derivative, we can reasonably postulate an energy level of around 20 000 cm⁻¹. The UV–vis absorption spectra in deionised water (see Fig. 5 for ligand **18**) displayed for both ligands **10** and **18** a broad band between 260 and 350 nm with two maxima located at 293 ($\epsilon = 13\,600\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) and 310 nm ($\epsilon = 14\,000\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). The molar extinction coefficients are virtually the same for each ligand. Upon complexation with Eu(III) cation, the broad absorption band splits into two narrower bands with a large bathochromic shift from 310 to 344 nm due to conformational changes leading to an improvement of the flatness of the structure which favours the π -electron delocalisation (Fig. 5).²⁶ In this case, the red-shift was accompanied with a slight hyperchromic effect ($\epsilon = 15\,500\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). The higher energy absorption band of the free ligand underwent no significant shift ($\lambda = 296\text{ nm}$), but its absorption coefficient decreased ($\epsilon = 11\,200\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). The corresponding emission spectra of Eu(III) chelates **6** and **8** present the usual ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_J$ ($J = 1-4$) transitions typical of the Eu(III) ion. The luminescence brightness of Eu(III) chelates **6** and **8** were measured in deionised water by using a relative method²⁷ using rhodamine 6G²⁸ and the Eu(TMT)AP₃ chelate **19** recently reported by us,²⁹ as standards.



Scheme 2 Reagents and conditions: a) secondary amine **16** (1.1 equiv.), NaI (0.6 equiv.), K₂CO₃ (15 equiv.), DMF, rt, 9 h then secondary amine **9** (1.05 equiv.), rt, 72 h, 18%; b) TFA, H₂O (40 equiv.), CH₂Cl₂, 0 °C to rt, 20 h, 54%.

Table 1 Photophysical properties of Eu(III) chelates in borate buffer pH 8.5 (chelates **4** and **20**) or in deionised water (chelates **6** and **8**) at 25 °C

Chelate	$\lambda_{\text{abs, max}}$ (nm)	ϵ (dm ³ mol ⁻¹ cm ⁻¹)	$\lambda_{\text{em, max}}$ (nm) ^c	Φ (%)	$\tau_{\text{H}_2\text{O}}$ (ms)	$\tau_{\text{D}_2\text{O}}$ (ms)	$q_{\text{H}_2\text{O}}$ ^g
4 ^a	335 (336)	8 400 (10 900)	621	3.0 (13.0)	1.37 (1.30)	—	0.5
20 ^b	333	12 100	—	17.6	1.31	—	—
6	344	15 500	615	15.7 (14.2) ^d	1.35 ^e	2.35 ^f	0.3 (0)
8	345	15 500	616	14.5 (13.2) ^d	1.30 ^e	2.30 ^f	0.35 (0)

^a Data reported by Rodrigues-Ubis *et al.*¹⁶ and values inside brackets reported by Latva *et al.*¹⁹ ^b Data reported by Mukkala *et al.*³⁸ and Latva *et al.*¹⁹

^c Only the most intense emission band corresponding to the ³D₀ → ⁷F₂ transition is reported. ^d Determined by using Eu(TMT)-AP₃ **19** (Φ = 16.9% in deionised water)²⁹ or R6G (Φ = 88% in ethanol, values inside brackets)²⁸ as standard (excitation at 345 nm). ^e A solution of chelate in deionised water at 10 μ M was used. ^f A solution of chelate in heavy water at 10 μ M was used. ^g Calculated according to the following equations: $q_{\text{H}_2\text{O}} = 1.05[(\tau_{\text{H}_2\text{O}})^{-1} - (\tau_{\text{D}_2\text{O}})^{-1}]^{32}$ or $q_{\text{H}_2\text{O}} = 1.11[(\tau_{\text{H}_2\text{O}})^{-1} - (\tau_{\text{D}_2\text{O}})^{-1} - 0.31]^{31}$ (inside brackets).

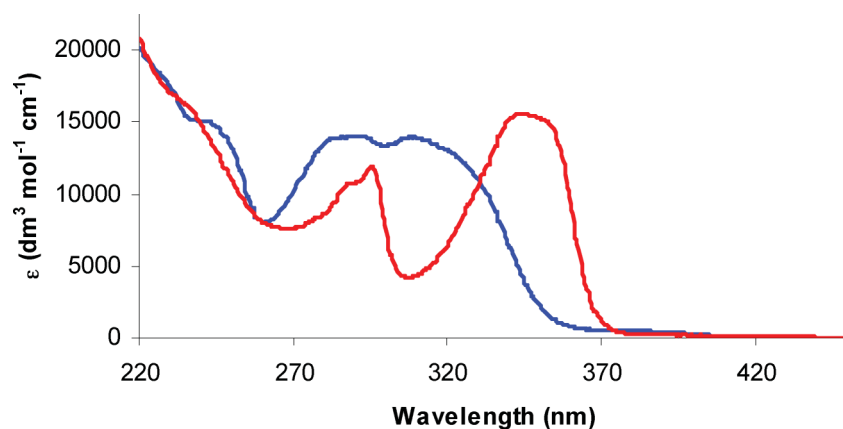
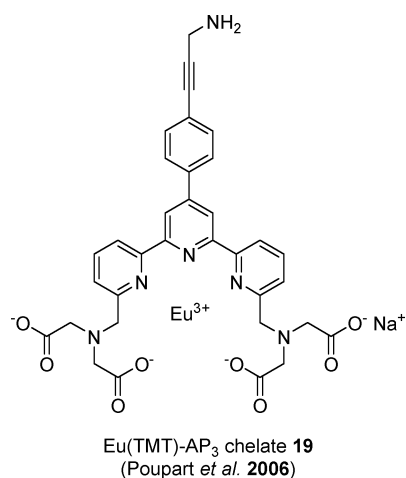
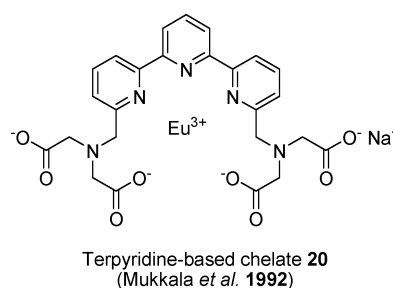


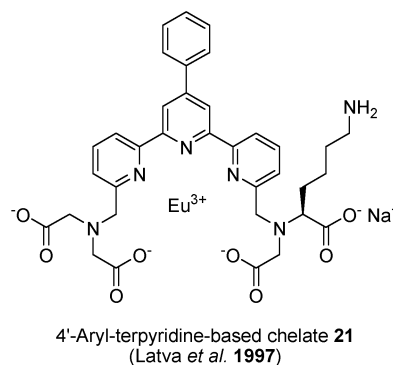
Fig. 5 Absorption spectra of non-symmetrical bis-pyridinylpyrazine ligand **18** (—) and corresponding Eu(III) chelate **8** (—) in deionised water at 25 °C (concentration: 9.0 μ M).



yield was also observed (Table 1, see entries 2–4). Interestingly, the small size of this novel chromophoric unit also has a beneficial effect on the water-solubility of the resulting lanthanide(III) chelates. Indeed, **6** and **8** were found to be perfectly soluble in water and related aq. buffers in the concentration range of 1 μ M to



Under excitation at 345 nm, the luminescence brightness varied from 2 200 to 2 500 for **6** and from 2 000 to 2 250 for **8** according to the reference used. Interestingly, the presence of a free primary amine within the structure of chelate **8** does not lead to a substantial quantum yield loss as previously observed for the terpyridine analogue **21**.¹⁹ As compared with chelate **4**, the replacement of the two pyrazole rings by pyridine moieties, in spite of a lack of luminescence in the case of Tb(III), leads to better spectroscopic properties for Eu(III) derivative. Moreover, compared to terpyridine analogue **20**³⁰, the pyrazine introduction has been revealed to be beneficial because the excitation maximum was red-shifted (10 nm), and a slight improvement of luminescence



1 mM, contrary to 4'-aryl-substituted 2,2':6',2''-terpyridine-based chelates such as **19**.

Finally, luminescence lifetime measurements in water and heavy water were performed to calculate, according to the two equations reported in the literature,^{31,32} the average number (q) of water molecules in the first coordination sphere of Eu(III), which was found to be close to 0. It clearly indicates that the complexation provided by the nine binding sites efficiently expels water molecules from the inner coordination sphere of the metal ion thus avoiding strong luminescence quenching through OH oscillators.

Selection of the best bioconjugatable group for protein labelling with luminescent Eu(III) chelate **8**

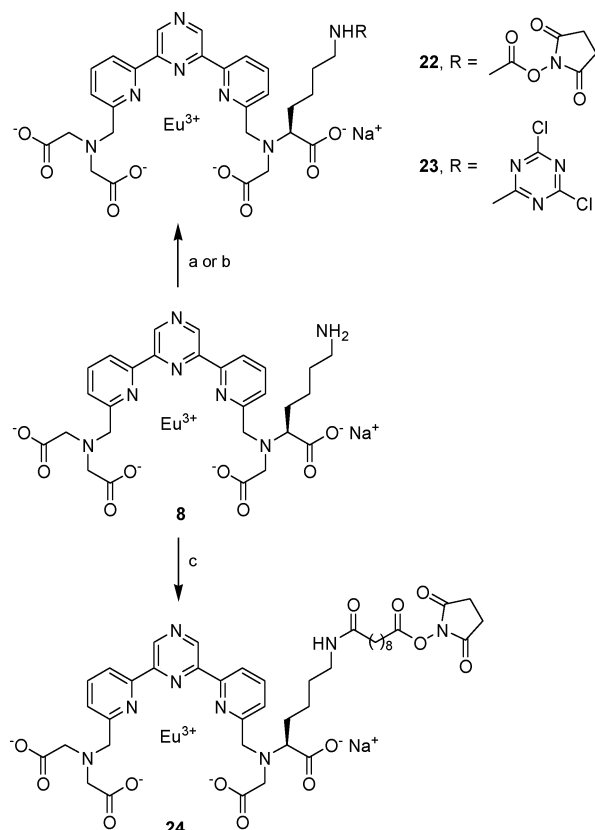
To demonstrate the potential utility of Eu(III) chelate **8** as a reagent for biopolymer labelling (especially proteins), it was necessary to derivatise its primary amino group under mild conditions in order to introduce a bioconjugatable moiety reactive towards the NH₂ groups of ϵ -lysine residues present in selected proteins. Thus, we investigated the conversion of **8** into three different derivatives **22–24** by reaction with *N,N'*-disuccinimidyl carbonate (DSC), cyanuric chloride (*i.e.*, 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine) and disuccinimidyl sebacate (DSSEB) respectively (Scheme 3). The identity of the reaction products was confirmed by ESI mass analyses (see ESI[†]). Firstly, the reaction of **8** with DSC in dry DMSO containing TEA was found to be complete only by using an excess of this reagent, probably due to the steric

hindrance. Thus, to remove the unreacted reagent, the activated-carbonate chelate **22** was purified by RP-HPLC but premature hydrolysis of its active carbamate moiety occurred despite the use of a non-basic aq. mobile phase (*i.e.*, deionised water). Conversely, the complete amidification of the amino group of **8** with DSSEB was successfully achieved with only one equivalent of this homobifunctional cross-linking reagent. Interestingly, RP-HPLC analysis of the crude reaction mixture has shown that roughly one third of the newly formed NHS ester chelate **24** underwent a further reaction with a second chelate unit to give the corresponding dimer, chemically unreactive towards the proteins. Thus, no chromatographic purification was required and it was possible to use directly the crude activated chelate **24** in peptide and protein labelling (*vide infra*). Finally, we have also studied the S_NAr reaction between **8** and cyanuric chloride, aimed at getting the corresponding dichlorotriazinyl activated chelate **23**, even if solely the mono-substitution of chlorine atoms by primary amines is quite difficult to obtain.³³ This reaction was performed in a mixture of aq. NaHCO₃ buffer (0.1 M, pH 8.7) and acetone at 0 °C for 4 h and provided a mixture of target activated chelate **23**, a dimer (resulting from two chlorine substitutions) and starting free amino chelate **8** in a ratio of 60:4:36. This crude mixture was also used in labelling reactions without purification.

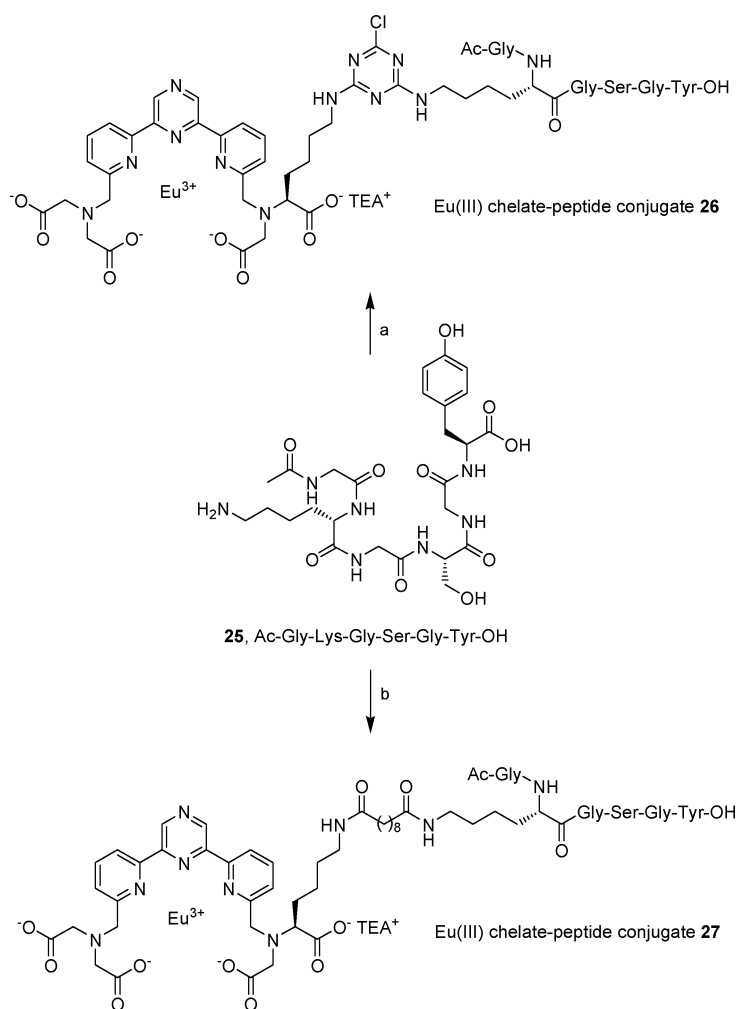
In order to select the best bioconjugatable group between the succinimidyl sebacate and the dichlorotriazinyl moiety from the point of view of chemoselectivity (towards NH₂ groups) and efficiency of labelling, we studied the reaction of activated chelates **23** and **24** with model hexapeptide Ac-Gly-Lys-Gly-Ser-Gly-Tyr-OH **25** under mild aq. conditions (Scheme 4). This short sequence was chosen to get within the same peptidyl architecture the three representative nucleophilic amino acid side-chains able to react with the studied bioconjugatable moieties (*i.e.*, primary amine, primary alcohol and phenol). These labelling reactions were carried out in aq. NaHCO₃ buffer (0.1 M, pH 8.5) with three equivalents of activated chelates **23** or **24**. As expected, the lysine residue of **25** readily reacted on each one of the two activated chelates, contrary to its serine. The resulting Eu(III) chelate-peptide conjugates **26** and **27** were isolated by RP-HPLC and their structures confirmed by ESI mass spectrometry (see ESI[†]). Interestingly, LC-MS analysis of the crude labelling mixture with activated chelate **23** (see ESI[†]) revealed the significant formation of two other peptides derivatives which were identified as the mono-labelled cyclo-peptide **28** ($t_R = 13.1$ min, 1428.37 [M – H][–]) and bis-labelled derivative **29** ($t_R = 15.1$ min, 1159.11 [M – 2H]^{2–}). The formation of these non-desired side-products can be inferred from the chemical modification of tyrosine residue.³⁴ It led to a decrease in the mono-labelling efficiency (5.3% isolated yield for **23** against 16.6% for **24**). Thus, these preliminary experiments have clearly shown the superior ability of the NHS activated Eu(III) chelate **24** to label selectively the lysine residues within peptides. This latter bio-labelling reagent was chosen for the further bioconjugation experiments involving monoclonal antibodies (mAb).

Antibody labelling using activated chelate **24**

The commonly used mAb 9E10 and 12CA5 that recognise the c-myc epitope tag³⁵ and influenza hemagglutinin (HA) epitope tag³⁶



Scheme 3 Reagents and conditions: a) DSC (4 equiv.), DMSO, TEA, rt, 24 h; b) cyanuric chloride (1.0 equiv.), acetone, aq. NaHCO₃ (pH 8.7), 0 °C, 4 h; c) DSSEB (1 equiv.), TEA, DMSO, rt, 6 h.



Scheme 4 Reagents and conditions: a) activated Eu(III) chelate **23** (3.0 equiv.), 0.1 M aq. NaHCO₃ (pH 8.5), rt, overnight; b) activated Eu(III) chelate **24** (3.0 equiv.) under the same conditions. TEA⁺ = triethylammonium counter ion.

respectively, were chosen as the representative proteins. Anti-c-myc and anti-HA mAb were labelled through incubation with a 70-fold molar excess of activated Eu(III) chelate **24** in phosphate buffer (pH 6.5). The resulting protein luminescent conjugates were initially purified by size-exclusion chromatography over a Sephadex® G-25 column but a very poor resolution between unreacted labelling reagent and labelled proteins was obtained. Thus, the luminescent mAb had to be isolated by affinity chromatography using a gel-immobilised protein A. Table 2 reports quantum yields of luminescent proteins in Tris-HCl/glycine buffer, together with the attached chelate to protein molar ratios (F/P), estimated from the relative intensities of protein and chelate absorptions. As an illustrative example, the absorption/excitation/emission

Table 2 Quantum yields (excitation at 345 nm) and chelate to protein molar ratios of luminescent bioconjugates determined at 25 °C

Luminescent bioconjugate	Φ (%) (Eu(TMT)-AP ₃)	Φ (%) (R6G)	F/P
Anti c-myc 9E10	10.9	9.3	3.6
Anti-HA 12CA5	10.0	8.5	7.7
Hexapeptide 27	13.3	10.3	1.0

spectra of chelate-12CA5 conjugate are also presented in Fig. 6. Monoclonal antibody 12CA5 was found to be labelled more efficiently as inferred from an F/P ratio twice as high as the one determined for mAb 9E10.³⁷ Even though the difference of reactive lysine residues between these two mAb is unknown, the significant ratio improvement could be partly ascribed to the lower concentration of the 9E10 mAb aliquots used in these bioconjugation experiments (*i.e.*, 0.7 against 1.8 mg cm⁻³). When compared to the non-covalently bound Eu(III) chelate **8**, the excitation/emission maxima of the luminescent protein conjugates remain unchanged (Fig. 6). Furthermore, the quantum yield of grafted Eu(III) chelate was slightly reduced by the same extent with mAb 9E10 and 12CA5 (Table 2) as compared to the value of free luminescent label (Table 1, see entries 3–4). However, the luminescence brightness remains satisfactory and proved that the activated Eu(III) chelate **24** is a suitable luminescent tag for various bio-analytical applications.

Conclusion and future work

In summary, we have achieved the synthesis of new luminescent water-soluble Ln(III) chelates based on an original

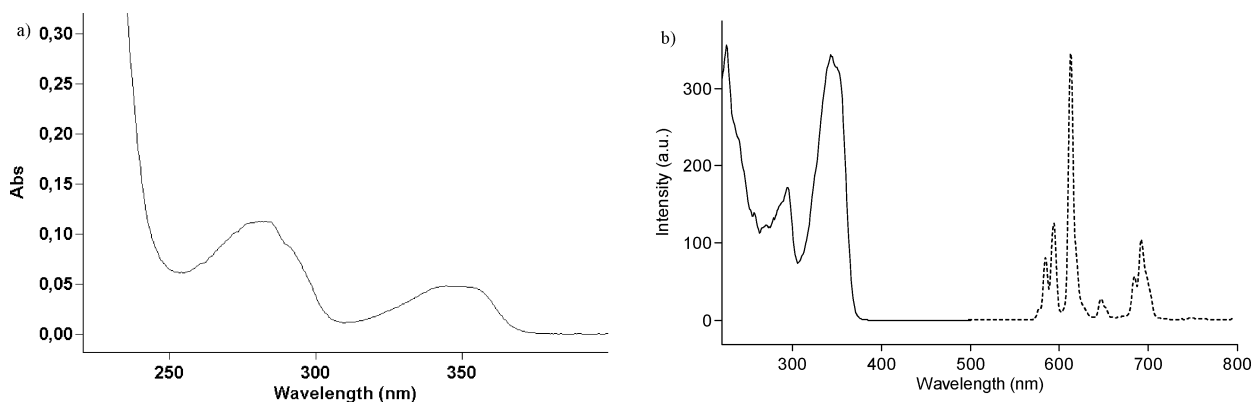
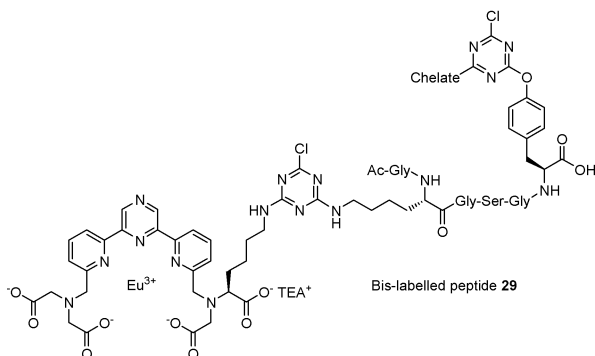
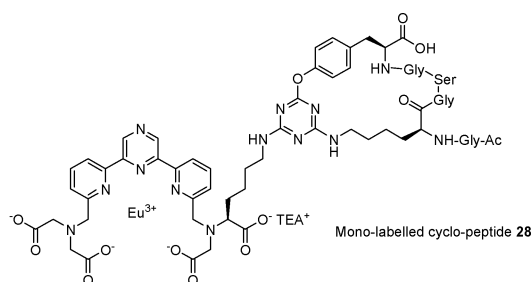


Fig. 6 (a) Absorption spectrum of luminescent labelled mAb anti-HA 12CA5 in Tris-HCl/glycine buffer at 25 °C; (b) Excitation (—) (Em. 615 nm) and emission (---) (Ex. 345 nm) spectra of luminescent labelled mAb anti-HA 12CA5 in Tris-HCl/glycine buffer at 25 °C.



bis-pyridinylpyrazine ligand which was functionalised at the 6,6''-positions through an original synthetic pathway aimed at introducing the chelating arms. The ability of these tri-azaheterocyclic ligands to efficiently sensitise europium(III) was also proved. Indeed, the corresponding chelates **6** and **8** have shown good luminescence properties in water: luminescence yield above $2000 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and a decay time around 1.30 ms. The most interesting feature is the red-shift of the maximum absorption wavelength compared to the usual terpyridine-based Ln(III) chelates. Indeed, the absorption maximum is located at 344 nm and stays barely unaltered until 354 nm. Furthermore, a comprehensive bioconjugation study conducted with the non-symmetrical Eu(III) chelate **8** and a model hexapeptide, has enabled us to select the most appropriate bioconjugatable group (*i.e.*, succinimidyl sebacate) for an efficient labelling of lysine residues of proteins. Thus, Eu(III) chelates based on this new scaffold could be potential candidates as luminescent markers for bioaffinity assays. However, a more straightforward synthetic pathway for the introduction of the bioconjugation arm within the ligand scaffold would improve the global process. As

a general rule, location of the bioconjugatable moiety on the pyrazine-chromophoric moiety would be beneficial. With this goal in mind, a new synthetic strategy involving an aminopyrazine derivative is currently under investigation.

Experimental Section

See ESI† for general remarks and details on experimental procedures for peptide synthesis.

High-performance liquid chromatography separations

Several chromatographic systems were used for the analytical experiments and the purification steps. **System A:** HPLC (Thermo Hypersil GOLD C_{18} column, $5 \mu\text{m}$, $4.6 \times 100 \text{ mm}$) with CH_3CN and 0.1% aq. trifluoroacetic acid (aq. TFA, 0.1%, v/v, pH 2.2) as eluents [100% TFA (5 min), followed by linear gradient from 0 to 80% (40 min) of CH_3CN] at a flow rate of 1.0 mL min^{-1} . Dual UV detection was achieved at 220 and 254 nm. **System B:** RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C_{18} column, $5 \mu\text{m}$, $4.6 \times 100 \text{ mm}$) with MeOH and 0.1% aq. TFA, 0.1% as eluents [90% TFA (5 min), followed by linear gradient from 10 to 90% (40 min) of MeOH] at a flow rate of 1.0 mL min^{-1} . Triple UV detection was achieved at 220, 290 and 320 nm. **System C:** RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C_{18} column, $5 \mu\text{m}$, $4.6 \times 100 \text{ mm}$) with MeOH and triethylammonium acetate buffer (TEAA 25 mM, pH 7.0) as eluents [100% TEAA (10 min), followed by linear gradient from 50 to 100% (25 min) of MeOH] at a flow rate of 1.0 mL min^{-1} . Triple UV detection was achieved at 220, 290 and 345 nm. **System D:** RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C_{18} column, $5 \mu\text{m}$, $4.6 \times 100 \text{ mm}$) with CH_3CN and aq. TFA, 0.1% as eluents [80% TFA (5 min), followed by linear gradient from 20 to 100% (32 min) of CH_3CN] at a flow rate of 1.0 mL min^{-1} . Triple UV detection was achieved at 220, 260 and 285 nm. **System E:** RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C_{18} column, $5 \mu\text{m}$, $4.6 \times 100 \text{ mm}$) with CH_3CN and TEAA (25 mM, pH 7.0) as eluents [100% TEAA (2 min), followed by linear gradient from 0 to 80% (40 min) of CH_3CN] at a flow rate of 1.0 mL min^{-1} . Dual UV detection was achieved at 254 and 345 nm. **System F:** semi-preparative RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C_{18} column, $5 \mu\text{m}$, $21.2 \times 250 \text{ mm}$) with CH_3CN and aq. TFA, 0.1% as eluents [80% TFA (5 min), followed by linear gradient from 20 to 60% (13 min) then from 60 to 100% (32 min) of CH_3CN] at a

flow rate of 16.0 mL min⁻¹. Dual UV detection was achieved at 260 and 285 nm. **System G**: semi-preparative RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 μm, 21.2 × 250 mm) with MeOH and aq. TFA, 0.1% as eluents [100% TFA (5 min) followed by a linear gradient from 0 to 10% (3 min) then from 10 to 90% (40 min) of MeOH] at a flow rate of 14.0 mL min⁻¹. Dual UV detection was achieved at 260 and 285 nm. **System H**: semi-preparative RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 μm, 10 × 100 mm) with CH₃CN and triethylammonium bicarbonate buffer (TEAB 50 mM, pH 7.5) as eluents [100% TEAB (5 min) followed by linear gradient from 0 to 80% (80 min) of CH₃CN] at a flow rate of 4.0 mL min⁻¹. Dual UV detection was achieved at 254 and 345 nm. **System I**: LC-MS with RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 μm, 2.1 × 150 mm) with CH₃CN and TEAB (50 mM, pH 7.5) as eluents [95% TEAB (2 min) followed by linear gradient from 5 to 85% (40 min) of CH₃CN] at a flow rate of 0.25 mL min⁻¹. Dual UV detection was achieved at 220 and 345 nm. ESI-MS detection in the negative mode (full scan, 150–1500 a.m.u., data type: centroid, sheat gas flow rate: 60 arb unit, aux/sweep gas flow rate: 20, spray voltage: 4.5 kV, capillary temp: 270 °C, capillary voltage: –10 V, tube lens offset: –50 V).

2-Bromo-6-[(*tert*-butyldimethylsilyloxy)methyl]pyridine (11)

(a) *2-Bromo-6-(hydroxymethyl)pyridine*: To a cooled mixture of dry THF (8.0 mL) and *n*-BuLi in hexane (1.35 M, 9.4 mL, 12.7 mmol), a solution of 2,6-dibromopyridine (3.0 g, 12.7 mmol) in dry THF (16.0 mL) was added dropwise under an argon atmosphere, in order to keep the mixture below –70 °C. The resulting reaction mixture was left stirring for 15 min. and dry DMF (1.5 mL, 19.7 mmol) was added. The reaction solution was further stirred at –78 °C for 15 min, followed by addition of acetic acid (810 μL) in methanol (12.0 mL). Afterwards, NaBH₄ (0.48 g, 12.7 mmol) was introduced in several portions. The cooling bath was removed and the reaction mixture was warmed up to room temperature overnight. Thereafter, the reaction mixture was carefully quenched with sat. NH₄Cl (40 mL), then extracted with AcOEt (2 × 40 mL). The organic phase was washed with brine (40 mL), dried over MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. The resulting yellow oil was purified by flash-chromatography on a silica gel column with a step gradient of AcOEt (20–30%) in cyclohexane to afford the primary alcohol as a pale yellow oil (2.20 g, yield 92%). *Rf* (cyclohexane–AcOEt, 7: 3, v/v) 0.29; δ_H (300 MHz, CDCl₃) 7.55 (1H, t, *J* 7.7), 7.39 (1H, d, *J* 7.7), 7.28 (1H, d, *J* 7.6), 4.74 (2H, s), 3.20 (1H, bs); δ_C (75.4 MHz, CDCl₃) 161.6, 141.3, 139.3, 126.6, 119.5, 64.2; MS (ESI+): *m/z* 188.07 and 190.07 [M + H]⁺, calcd for C₆H₆BrNO: 188.02.

(b) *Silylation*: The alcohol (2.12 g, 11.3 mmol) was dissolved in dry DMF (10.0 mL). Imidazole (3.08 g, 45.2 mmol) and TBS-Cl (2.04 g, 13.5 mmol) were sequentially added and the resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 25 min. Thereafter, the reaction mixture was extracted with Et₂O (2 × 30 mL). The combined ethereal phases were washed with deionised water (3 × 5 mL), dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The resulting yellow oily residue was purified by flash-chromatography on a silica gel column with a step gradient of AcOEt (1–3%) in cyclohexane. The desired TBS ether **11** was obtained as a viscous turbid liquid (3.01 g, yield 88%). *Rf* (cyclohexane–AcOEt, 99: 1, v/v) 0.15; δ_H (300 MHz, CDCl₃) 7.57 (1H, t, *J* 7.7), 7.47 (1H, dd,

J 7.7 and 0.9), 7.33 (1H, dd, *J* 7.7 and 0.8), 4.80 (2H, s), 0.95 (9H, s), 0.11 (6H, s); δ_C (75.4 MHz, CDCl₃) 163.3, 141.0, 139.1, 126.1, 118.7, 65.5, 26.0, 18.4, –5.3; MS (ESI+): *m/z* 302.07 and 304.00 [M + H]⁺, calcd for C₁₂H₂₀BrNOSi: 302.29.

2,6-Bis[6-((*tert*-butyldimethylsilyloxy)methyl)pyridin-2-yl]pyrazine (12)

(a) *2-Trimethyltin-6-[(tert-butyldimethylsilyloxy)methyl] pyridine*: To a solution of silyl ether **11** (2.0 g, 6.62 mmol) in dry THF (14.0 mL) was added dropwise, under an argon atmosphere at –78 °C, a solution of *n*-BuLi in hexane (1.4 M, 5.2 mL, 7.3 mmol). The dark red solution was stirred during 90 min at –78 °C before adding a solution of trimethyltin chloride (1.38 g, 6.95 mmol) in dry THF (14.0 mL). The reaction mixture was left running at room temperature for 4 h under an argon atmosphere. Thereafter, the mixture was evaporated to dryness and the resulting yellow-brown paste was triturated twice with Et₂O and filtered. The filtrate was evaporated and the stannane derivative was obtained as an orange oil and was used in the next step without further purification (2.40 g, yield 89%). δ_H (300 MHz, CDCl₃) 7.53 (1H, t, *J* 7.6), 7.35 (1H, d, *J* 7.3), 7.29 (1H, d, *J* 7.2), 4.85 (2H, s), 0.96 (9H, s), 0.32 (9H, s), 0.12 (6H, s).

(b) *Stille-coupling reaction*: To a xylene solution (6 mL) deaerated with argon were added Pd(PPh₃)₄ (87 mg, 0.08 mmol), 2,6-dichloropyrazine (224 mg, 1.50 mmol) and trimethyltin derivative (1.27 g, 3.30 mmol). The resulting reaction mixture was heated to 110 °C overnight. The desired compound as well as the monocoupling derivative were detected by NMR analyses. Further amounts of stannane (270 mg, 0.70 mmol) and Pd(PPh₃)₄ (12 mg, 0.01 mmol) were therefore added and the mixture was left running 24 h at 110 °C. The reaction mixture was filtrated on a Celite® pad. After solvent removal, a brown solid was recovered. Purification of this crude product was achieved by flash-chromatography on a silica gel column with a step gradient of AcOEt (2–4%) in cyclohexane as the mobile phase to give the bis-pyridylpyrazine derivative **12** as a white foam (520 mg, yield 50%). *Rf* (cyclohexane–AcOEt, 96: 4, v/v) 0.24; δ_H (300 MHz, CDCl₃) 9.62 (2H, s), 8.39 (2H, d, *J* 7.8), 7.89 (2H, t, *J* 7.8), 7.59 (2H, d, *J* 7.7), 4.95 (4H, s), 0.99 (18H, s), 0.17 (12H, s); δ_C (75.4 MHz, CDCl₃) 161.4, 153.4, 149.7, 142.7, 137.7, 120.9, 119.7, 66.3, 26.1, 18.5, –5.2; MS (ESI+): *m/z* 523.33 [M + H]⁺, calcd for C₂₈H₄₂N₄O₂Si₂: 522.83.

2,6-Bis[6-(hydroxymethyl)pyridin-2-yl]pyrazine (13)

To a solution of bis-silyl ether **12** (547 mg, 1.05 mmol) in THF (10 mL) was added a 1.0 M solution of TBAF in THF (2.4 mL, 2.41 mmol). The resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h and concentrated under reduced pressure to give an orange-brown viscous oily residue. This crude product was first triturated in cyclohexane and then in a mixture of aq. TFA 0.1% and methanol (1: 1, v/v) to give a the bis-alcohol **13** as a white solid which was dried by lyophilisation (244 mg, yield 79%). δ_H (300 MHz, DMSO-*d*₆) 9.57 (2H, s), 8.45 (2H, d, *J* 7.7), 8.06 (2H, t, *J* 7.8), 7.63 (2H, d, *J* 7.6), 5.58 (2H, t, *J* 5.8), 4.71 (4H, d, *J* 5.2); δ_C (75.4 MHz, DMSO-*d*₆) 162.2, 152.3, 149.1, 142.1, 138.2, 121.6, 119.5, 64.3; MS (ESI+): *m/z* 292.50 [M + H]⁺, calcd for C₁₆H₁₄N₄O₂: 294.31.

2,6-Bis[6-(bromomethyl)pyridin-2-yl]pyrazine (14)

PBr₃ (0.29 mL, 3.1 mmol) was added to dry DMF (10 mL) under an argon atmosphere and the resulting solution was cooled to 0 °C. Bis-alcohol **13** (303 mg, 1.03 mmol) previously dissolved in dry DMF (10 mL) was added to the PBr₃ solution. The resulting reaction mixture was stirred at room temperature for h. After DMF removal under high vacuum, the resulting residue was diluted in CH₂Cl₂ (50 mL) and washed with aq. sat. NaHCO₃ (2 × 30 mL). The aq. phase was then re-extracted with CH₂Cl₂ (30 mL). The organic phases were collected and washed with brine (40 mL), dried over MgSO₄, filtered and concentrated. A clear brown solid was obtained. The compound was used in the next step without further purification (410 mg, yield 95%). *Rf* (cyclohexane–AcOEt, 9: 1, v/v) 0.20; δ_H (300 MHz, CDCl₃) 9.71 (2H, s), 8.45 (2H, dd, *J* 7.7 and 0.8), 7.90 (2H, t, *J* 7.9), 7.55 (2H, dd, *J* 7.7 and 0.8), 4.67 (4H, s); δ_C (75.4 MHz, CDCl₃) 156.9, 154.2, 149.1, 143.3, 138.2, 124.3, 120.7, 33.9.

Fully-protected symmetrical bis-pyridinylpyrazine ligand (15)

To a solution of di-brominated derivative **14** (157 mg, 0.37 mmol) and NaI (61 mg, 0.41 mmol) in dry DMF (8 mL) were added DIEA (0.65 mL, 3.7 mmol) and secondary amine **9** (200 mg, 0.81 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 6 h and DMF was removed under high vacuum. The resulting residue was dissolved in CH₂Cl₂ (50 mL) and the organic phase was washed with an aq. sat. NaHCO₃ solution (3 × 20 mL). The aq. phase was re-extracted with CH₂Cl₂. The combined organic phases were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and evaporated to dryness. The resulting brown viscous oily residue was purified by flash-chromatography on a silica gel column with a step gradient of MeOH (0–5%) in CH₂Cl₂ to afford the *tert*-butyl ester **15** as a yellow oil (199 mg, yield 64%). *Rf* (CH₂Cl₂–MeOH, 95: 5, v/v) 0.30; δ_H (300 MHz, CDCl₃) 9.66 (2H, s), 8.42 (2H, d, *J* 7.8), 7.87 (2H, t, *J* 7.8), 7.73 (2H, d, *J* 7.7), 4.15 (4H, s), 3.56 (8H, s), 1.48 (36H, s); δ_C (75.4 MHz, CDCl₃) 170.7, 159.3, 153.6, 149.7, 142.8, 137.7, 124.1, 119.9, 81.2, 59.7, 55.9, 28.3; MS (ESI+): *m/z* 749.20 [M + H]⁺, 771.27 [M + Na]⁺ and 787.33 [M + K]⁺, calcd for C₄₀H₅₆N₆O₈: 748.91.

Bis-pyridinylpyrazine ligand (10)

Tetrakis-*tert*-butyl ester **15** (200 mg, 0.27 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (10 mL) and deionised water (0.5 mL) and cooled to 0 °C. TFA (10 mL) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 5 h. Thereafter, the mixture was evaporated to dryness and the residue was co-evaporated thrice with cyclohexane and finally triturated with Et₂O to give a pale brown powder. This solid was diluted in deionised water and lyophilised. A white amorphous powder was obtained (170 mg). A batch of 100 mg was purified by flash-chromatography on a RP-C₁₈ silica gel column with a step gradient of MeOH (0–30%) in aq. TFA 0.1%. The product-containing fractions were lyophilised to afford the TFA salt of ligand **10** as a pale yellow solid (40 mg, yield 44%). δ_H (300 MHz, DMSO-*d*₆) 9.56 (2H, s), 8.48 (2H, d, *J* 7.5), 8.06 (2H, t, *J* 7.8), 7.69 (2H, d, *J* 7.3), 4.17 (4H, s), 3.64 (8H, s); δ_C (75.4 MHz, DMSO-*d*₆) 172.0, 152.6, 149.0, 142.2, 138.4, 124.3, 120.0, 59.0, 54.4; MS (ESI+): *m/z* 525.27 [M + H]⁺, calcd for C₂₄H₂₄N₆O₈: 524.48; HPLC (system B): *t_R* =

13.8 min, purity 96% (max plot 220–450 nm); λ_{max} (recorded during the HPLC analysis)/nm 229, 243, 283, and 310. The elemental composition was accurately determined by UV-titration with an aq. solution of known concentration of EuCl₃ and by assuming the expected stoichiometry [1 : 1] for the complex. An average value of 0.5 molecule of TFA per molecule of ligand was found.

Eu(III) chelate (6)

Bis-pyridinylpyrazine ligand **10** (TFA salt, 70 mg, 48 μmol) was dissolved in deionised water (1 mL) and NaHCO₃ was added to adjust the pH of the medium to approximately 7.5. Then, EuCl₃·6H₂O (43 mg, 120 μmol) was added and the resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. Thereafter, the crude Eu(III) complex was purified by flash-chromatography on a RP-C₁₈ silica gel column with deionised water. The product-containing fractions were lyophilised to afford the desired Eu(III) chelate **6** in a pure form as a white solid (Na salt, 34.3 mg, 49.3 μmol, quantitative yield). MS (ESI–): *m/z* 671.20 and 673.20 [M – H][–], calcd for C₂₄H₂₁EuN₆O₈: 673.42; HRMS (ESI–): *m/z* 671.0541 and 673.0555 for C₂₄H₂₀EuN₆O₈. HPLC (system C): *t_R* = 8.4 min, purity 100% (345 nm); λ_{max} (recorded during the HPLC analysis)/nm 229, 295 and 344.

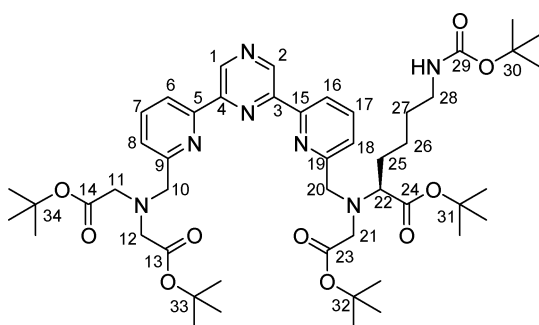
Sm(III) chelate (7)

Bis-pyridinylpyrazine **10** (TFA salt, 3.4 mg, 5.8 μmol) was dissolved in 0.1 M aq. NaHCO₃ (200 μL, pH 8.7). Thereafter, a 41 mM SmCl₃·6H₂O solution in deionised water (143 μL, 6.0 μmol) was added and the resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. Thereafter, the reaction mixture was purified by flash-chromatography on a RP-C₁₈ silica gel column with deionised water. The product-containing fractions were lyophilised to afford the desired Sm(III) chelate **7** in a pure form as a white powder (Na salt, 3.7 mg, 5.3 μmol, yield 92%). MS (ESI–): *m/z* 667.33, 669.33, 672.40, 674.20 [M – H][–], calcd for C₂₄H₂₁SmN₆O₈: 671.82; HPLC (system C): *t_R* = 11.3 min; λ_{max} (recorded during the HPLC analysis)/nm 233, 294 and 343.

Protected non-symmetrical bis-pyridinylpyrazine ligand (17)

To a solution of di-brominated derivative **14** (122 mg, 0.29 mmol) in dry DMF (5 mL) were introduced NaI (25 mg, 0.17 mmol), anhydrous K₂CO₃ (601 mg, 4.35 mmol) and secondary amine **16** (133 mg, 0.32 mmol). The resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 9 h. Thereafter symmetrical secondary amine **9** was added in several portions: 21.0 mg (0.09 mmol), 21.0 mg (0.09 mmol) after 27 h and 31.0 mg (0.12 mmol) after two days. The reaction mixture was finally stirred at room temperature for additional 24 h after the addition of the third aliquot of **9**. Thereafter DMF was evaporated and the residue was diluted in a mixture of cyclohexane/AcOEt (1: 1, v/v) which was filtered. The filtrate was evaporated to dryness and the resulting orange viscous oily residue was firstly purified by flash-chromatography on a silica gel column cyclohexane/AcOEt (6: 4, v/v). Thereafter, a second purification was achieved by semi-preparative RP-HPLC (system F). The product-containing fractions were lyophilised to give the desired ligand as a brown foam (47 mg, yield 18%). δ_H (300 MHz, CDCl₃) 9.67 (1H, s, H₁ or

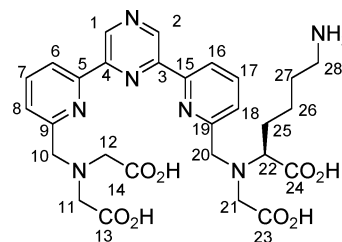
H₂), 9.64 (1H, s, H₂ or H₁), 8.49 (1H, d, *J* 7.7, H₆ or H₁₆), 8.40 (1H, d, *J* 7.6, H₁₆ or H₆), 7.93 (1H, t, *J* 7.8, H₇ or H₁₇), 7.90 (1H, t, *J* 7.8, H₁₇ or H₇), 7.81 (1H, d, *J* 7.6, H₈ or H₁₈), 7.70 (1H, d, *J* 7.5, H₁₈ or H₈), 4.63 (1H, bs, NH), 4.23 (2H, s, H₁₀), 4.20 (1H, d, *J* 15.2, H₂₀), 4.10 (1H, d, *J* 15.3, H₂₀), 3.83 (4H, s, H₁₁, H₁₂), 3.54 (2H, s, H₂₁), 3.38 (1H, t, *J* 7.4, H₂₂), 3.07 (2H, bs, H₂₈), 1.77–1.65 (2H, m, H₂₅), 1.58–1.30 (49 H, m, H, H₂₆, H₂₇, H_{t-Bu}); δ_C (75.4 MHz, CDCl₃) 172.3 (C₂₃), 170.9 (C₂₄), 168.6 (C₁₄, C₁₃), 159.5 (C₂₉), 156.1 (C₉ or C₁₉), 155.7 (C₁₉ or C₉), 153.7 (C₅ or C₁₅), 153.0 (C₁₅ or C₅), 149.8 (C₃ or C₄), 149.4 (C₄ or C₃), 142.7 (C₁ or C₂), 142.3 (C₂ or C₁), 138.5 (C₇ or C₁₇), 138.0 (C₁₇ or C₇), 125.1 (C₈ or C₁₈), 124.3 (C₁₈ or C₈), 120.9 (C₆ or C₁₆), 120.1 (C₁₆ or C₆), 82.8 (C₃₃, C₃₄), 81.7 (C₃₁ or C₃₂), 81.3 (C₃₂ or C₃₁), 79.1 (C₃₀), 64.4 (C₂₂), 58.8 (C₁₀), 58.2 (C₂₀), 55.1 (C₁₁, C₁₂), 53.5 (C₂₁), 40.4 (C₂₈), 29.7 (C₂₅ or C₂₇), 29.6 (C₂₇ or C₂₅), 28.5 (C_{t-Bu}), 28.4 (C_{t-Bu}), 28.2 (C_{t-Bu}), 23.5 (C₂₆); MS (ESI+): *m/z* 920.33 [M + H]⁺, 942.27 [M + Na]⁺ and 958.33 [M + K]⁺ calcd for C₄₉H₇₃N₇O₁₀: 920.14; HPLC (system C): *t_R* = 26.7 min; λ_{max} (recorded during the HPLC analysis)/nm 230, 243, 283 and 312.



Non-symmetrical bis-pyridinylpyrazine ligand (18)

Fully-protected ligand **17** (60 mg, 66 μmol) was dissolved in a mixture of CH₂Cl₂ (1.9 mL) and deionised water (90 μL) and cooled to 0 °C. Then, TFA (1.9 mL) was added and the resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 7 h. The reaction was checked for completion by RP-HPLC (system B). Further amount of TFA (0.3 mL) was added and the reaction mixture was stirred overnight. Thereafter, the reaction mixture was evaporated to dryness and the resulting brownish paste was purified by semi-preparative RP-HPLC (system G). The product-containing fractions were lyophilised to afford the TFA salt of non-symmetrical bis-pyridinylpyrazine ligand **18** as a brown powder (26.3 mg, yield 54%). δ_H (300 MHz, DMSO-*d*₆+D₂O) 9.55 (1H, s, H₁ or H₂), 9.53 (1H, s, H₂ or H₁), 8.47 (1H, d, *J* 7.2, H₆ or H₁₆), 8.44 (1H, d, *J* 7.2, H₁₆ or H₆), 8.05 (1H, t, *J* 7.7, H₇ or H₁₇), 8.03 (1H, t, *J* 7.7, H₁₇ or H₇), 7.73 (1H, d, *J* 7.7, H₈ or H₁₈), 7.68 (1H, d, *J* 7.6, H₁₈ or H₈), 4.19 (2H, s, H₁₀), 4.13 (1H, d, *J* 15.5, H₂₀), 4.03 (1H, d, *J* 15.3, H₂₀), 3.67 (4H, s, H₁₁, H₁₂), 3.55 (2H, s, H₂₁), 3.39 (1H, t, *J* 7.3, H₂₂), 2.77–2.69 (2H, m, H₂₈), 1.74–1.64 (2H, m, H₂₅), 1.56–1.43 (4H, m, H₂₆, H₂₇); δ_C (75.4 MHz, DMSO-*d*₆+D₂O) 174.1 (C₂₄), 172.7 (C₂₃), 172.1 (C₁₃, C₁₄), 159.8 (C₁₉), 158.5 (C₉), 152.6 (C₅ or C₁₅), 152.5 (C₁₅ or C₅), 149.1 (C₃ or C₄), 149.0 (C₄ or C₃), 142.1 (C₁, C₂), 138.3 (C₇ or C₁₇), 138.2 (C₁₇ or C₇), 124.3 (C₈), 123.9 (C₁₈), 119.9 (C₆ or C₁₆), 119.8 (C₁₆ or C₆), 63.2 (C₂₂), 59.0 (C₁₀), 57.4 (C₂₀), 54.4 (C₁₁, C₁₂), 52.6 (C₂₁), 38.7 (C₂₈), 29.0 (C₂₅), 26.8 (C₂₇), 22.8 (C₂₆); MS (ESI+): *m/z* 596.27 [M + H]⁺, calcd for C₂₈H₃₃N₇O₈: 595.60; HPLC (system B): *t_R* =

13.7 min, purity 93% (max plot 220–450 nm); λ_{max} (recorded during the HPLC analysis)/nm 229, 243, 282 and 315. The elemental composition was accurately determined by UV-titration with an aq. solution of known concentration of EuCl₃ and by assuming the expected stoichiometry [1 : 1] for the complex. An average value of 1.3 molecules of TFA per molecule of ligand was found.



Non-symmetrical Eu(III) chelate (8)

This complex was prepared and purified by the same procedure used for **6**, and obtained as a pale brown powder (Na salt, 6.3 mg, 8.2 μmol, yield 78%). MS (ESI+): *m/z* 744.07 and 746.13 [M + H]⁺; MS (ESI–): *m/z* 742.20 and 744.13 [M – H][–] and 855.87 and 857.87 [M + TFA – H][–], calcd for C₂₈H₃₀EuN₇O₈: 744.55; HRMS (ESI–): *m/z* 742.1276 and 744.1290 for C₂₈H₂₉EuN₇O₈; HPLC (system C): *t_R* = 5.2 min (broad peak), purity 98% (345 nm); λ_{max} (recorded during the HPLC analysis)/nm 224, 294 and 344.

Dichlorotriazine derivative (23)

Amino Eu(III) chelate **8** (1.0 mg, 1.3 μmol) was dissolved in 0.1 M aq. NaHCO₃ (200 μL, pH 8.7). Thereafter, a 13 mM cyanuric chloride solution in HPLC-grade acetone (100 μL, 1.3 μmol) was added at 0 °C. The resulting reaction mixture was stirred at 0 °C for 4 h. The reaction was checked for completion by ESI-MS. The crude activated Eu(III) chelate **23** was used in the next bioconjugation step without further purification. MS (ESI–): *m/z* 891.07 [M – H][–], calcd for C₃₁H₂₉Cl₂EuN₁₀O₈: 892.50; HPLC (system E): *t_R* = 13.5 min; λ_{max} (recorded during the HPLC analysis)/nm 234, 295 and 344.

Succinimidyl sebacate derivative (24)

To a solution of DSSEB reagent (0.55 mg, 1.4 μmol) in DMSO (50 μL) was added at room temperature, every 30 min, 10 μL of a mixture containing amino Eu(III) chelate **8** (1.0 mg, 1.3 μmol) and TEA (2 μL) in DMSO (98 μL). After each addition, the reaction mixture was vortexed and finally left at room temperature for 45 min. The reaction was checked for completion by LC-MS (system I). The crude NHS ester **24** was stored at 4 °C and used in the next bioconjugation step without further purification. MS (ESI–): *m/z* 1023.31 and 1025.29 [M – H][–], calcd for C₄₂H₄₉EuN₈O₁₃: 1025.85. HPLC (system C): *t_R* = 16.2 min; λ_{max} (recorded during the HPLC analysis)/nm 234, 294 and 343.

Luminescent labelling of hexapeptide 25 with activated Eu(III) chelates 23 and 24

(a) *Labelling with 23*: Hexapeptide **26** was dissolved in 0.1 M aqueous NaHCO₃ pH 8.7 (22.13 μM, 9.8 μL, 217 nmol) and mixed with the crude activated Eu(III) chelate **23** (150 μL, 650 nmol, the activation of amino chelate was assumed to be quantitative).

The resulting reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The completion of the reaction was checked by HPLC (system E) and purified by semi-preparative RP-HPLC (system H). The fractions containing the luminescent labelled peptide were lyophilised. MS (ESI⁻): m/z 1464.40 [M - H]⁻, calcd for C₅₇H₆₇ClEuN₁₇O₁₈: 1465.67; HPLC (system E): t_R = 12.4 min, purity 95%; λ_{\max} (recorded during the HPLC analysis)/nm 229, 295, 343 nm.

(b) *Labelling with 24*: The same procedure as described above. MS (ESI⁻): m/z 1519.67 [M - H]⁻, calcd for C₆₄H₈₃EuN₁₄O₂₀: 1520.41; HPLC (system E): t_R = 12.2 min, purity 97%; λ_{\max} (recorded during the HPLC analysis)/nm 227, 295 and 343.

For both labelling reactions, the bioconjugation yield was determined through quantification of the labelled peptide by UV-vis spectroscopy at the λ_{\max} of the chelate (*i.e.*, 345 nm)

Labelling of mAb with activated Eu(III) chelate 24

(a) *Labelling of anti c-myc 9E10 mAb*: An aq. solution of anti c-myc 9E10 mAb (0.7 mg cm⁻³, 500 μ L, 2.33 nmol) in phosphate buffer (0.1 M, pH 6.5) was mixed with the crude activated Eu(III) chelate **24** (72 equiv., the activation of amino chelate was assumed to be quantitative). The resulting reaction mixture was left at room temperature overnight without stirring. Thereafter, the crude mixture was purified by affinity chromatography (*vide infra*).

(b) *Labelling of anti HA 12CA5 mAb*: The same procedure as described above was applied to an aq. solution of anti HA 12CA5 mAb (1.8 mg cm⁻³, 500 μ L, 6.00 nmol) in phosphate buffer pH 6.5.

(c) *Purification by affinity chromatography*: ~ 1 mL of a gel-immobilised protein A was used. First, the gel was rinsed with 0.1 M borate buffer (containing 0.15 M NaCl, pH 8.5, 20 mL). The binding step was carried out with the same buffer and the elution of the labelled antibodies was performed with a glycine buffer (0.1 M, pH 3.5). Each acidic fraction (~750 μ L) was neutralised by adding 50 μ L of Tris-HCl buffer (0.5 M, pH 8.5). The elution of the desired labelled antibodies was checked by UV absorbance measurements. The luminescence features of labelled mAb were directly determined in this mixture of buffers. After using, the column was washed with a solution of aq. HCl (pH 1.5), neutralised with borate buffer and stored in PBS buffer containing NaN₃ 0.01% at 4 °C.

(d) *Labelling molar ratio F/P*: They were measured by recording the UV absorbance at 280 and 345 nm respectively. The absorbance value at 345 nm enabled us to determine the concentration of Eu(III) chelate grafted to the protein. At this wavelength, the Eu(III) chelates were the unique absorbing-species. The mAb concentration could be measured by subtracting from the UV absorbance value at λ = 280 nm the residual absorbance at the same wavelength coming from grafted Eu(III) chelates (the chelate absorbance value at 345 nm was found to be twice higher than the one at 280 nm). The measured values were inserted into the following equation:

$$[\text{mAb}] (\mu\text{M}) = (A_{280} - 0.5 \times A_{345}) / (1.48 \times 0.15)$$

The average molecular weights of the two mAb are 150 000 Da (hence 0.15 in the former formula).

Luminescent measurements

Fluorescence spectroscopic studies were performed with a Varian Cary Eclipse spectrophotometer using either a semi-micro quartz fluorescence cell (Hellma, 104F-QS, light path: 10 \times 4 mm, 1400 μ L) for ligands and Eu(III) chelates, or an ultra-micro fluorescence cell (Hellma®, 105.51-QS, light patch: 3 \times 3 mm, 45 μ L) for labelled mAb. Emission spectra were recorded in “phosphorescence mode” with the following parameters: delay time: 0.1 ms, gate time: 3 ms and total decay time: 10 ms, and after excitation at 345 nm. Lifetime measurements were achieved by using the following parameters: delay time: 0 ms, flash number: 1, excitation slit: 5 nm, emission slit: 10 nm, total decay time: 10 ms, cycle number: 20 and PMT (sensitivity): medium, λ_{exc} : 345 nm, λ_{em} : 615 nm. The luminescence quantum yields were measured in deionised water (except for labelled mAb which were performed in a mixture of Tris-HCl and glycine buffers, *vide supra*) at 25 °C by a relative method²⁷ using two standards: rhodamine 6G (Φ = 88% in ethanol)²⁸ and Eu(TMT)-AP₃ (Φ = 16.9% in deionised water)²⁹. All Φ are corrected for changes in refractive index. Excitation was achieved at 345 nm. To minimise the inner filter effect, samples with an absorbance below 0.1 unit were used.

UV-visible titrations

A solution of bis-pyridinylpyrazine ligand (estimated concentration: 10 μ M) was prepared in deionised water and transferred into a quartz UV-cell (Varian, 6610000800, cell Open Top, 10 \times 10 mm, 3.5 mL). Titration was performed by adding periodically aliquots (usually 10 μ L then 2 μ L when the ratio between the ligand and the metal was closed to 1 : 1) of an exactly known concentration aq. EuCl₃ in deionised water ([EuCl₃] = 0.48 or 0.24 mM). After each addition, the solution was stirred for 5 min before recording the corresponding UV-visible spectrum (220–450 nm) at 25 °C. For drawing the titration curves, changes of absorbance at 354 nm was used.

Acknowledgements

This work was supported by the “Ministère de l’enseignement supérieur et de la recherche” through a young investigator grant (ACI-JC 4064), and a PhD grant for Séverine Poupert. La Région Haute-Normandie *via* the CRUNCH program (CPER 2007–2013), and *via* a shared CNRS - Région Haute-Normandie grant for Nicolas Maindron, and Institut Universitaire de France (IUF) are also greatly acknowledged for their financial support. We thank Albert Marcual (COBRA-CNRS UMR 6014) for high-resolution mass analyses and Dr Hervé Volland (iBiTecS, LERI, CEA-Saclay) for kind gift of monoclonal antibodies and gel-immobilised protein A.

Notes and references

- (a) H. Bazin, E. Trinquet and G. Mathis, *Rev. Mol. Biotechnol.*, 2002, **82**, 233; (b) G. Mathis, *Clin. Chem.*, 1995, **41**, 1391; (c) C. P. Montgomery, B. S. Murray, E. J. New, R. Pal and D. Parker, *Acc. Chem. Res.*, 2009, **42**, 925; (d) C. P. Montgomery, E. J. New, L. O. Palsson, D. Parker, A. S. Batsanov and L. Lamarque, *Helv. Chim. Acta*, 2009, **92**, 2186.
- I. Hemmilä, *Clin. Chem.*, 1985, **31**, 359.
- E. Soini and I. Hemmilä, *Clin. Chem.*, 1979, **25**, 353.
- J.-C. G. Bünzli, *Chem. Rev.*, 2010, **110**, 2729.

- 5 E. G. Moore, A. P. S. Samuel and K. N. Raymond, *Acc. Chem. Res.*, 2009, **42**, 542.
- 6 J.-C. G. Bünzli and C. Piguet, *Chem. Soc. Rev.*, 2005, **34**, 1048.
- 7 (a) J. C. G. Bünzli, *Springer Ser. Mater. Sci.*, 2005, **83**, 462; (b) I. Hemmilä and V.-M. Mikkala, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 2001, **38**, 441; (c) E. F. Dickson Gudgin, A. Pollak and E. P. Diamandis, *Pharmacol. Ther.*, 1995, **66**, 207.
- 8 P. R. Selvin, in *Top. Fluoresc. Spectrosc.*, ed. J. R. Lacowicz, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2003, vol. 7, pp. 177.
- 9 For recent reviews describing these strategies, see: (a) Y. Ma and Y. Wang, *Coord. Chem. Rev.*, 2010, **254**, 972; (b) S. V. Eliseeva and J.-C. G. Bünzli, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 189.
- 10 For selected examples, see: (a) M. H. V. Werts, M. A. Duin, J. W. Hofstraat and J. W. Verhoeven, *Chem. Commun.*, 1999, 799; (b) A. Beeby, L. M. Bushby, D. Maffeo and J. A. G. Williams, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2000, 1281; (c) A. Dadabhoy, S. Faulkner and P. G. Sammes, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2002, 348; (d) R. Van Deun, P. Nockemann, P. Fias, K. Van Hecke, L. Van Meervelt and K. Binnemans, *Chem. Commun.*, 2005, 590.
- 11 For selected publications about sensitisation of lanthanide luminescence with azaxanthone-DOTA ligands, see: (a) P. Atkinson, K. S. Findlay, F. Kielar, R. Pal, D. Parker, R. A. Poole, H. Puschmann, S. L. Richardson, P. A. Stenson, A. L. Thompson and J. Yu, *Org. Biomol. Chem.*, 2006, **4**, 1707; corrigendum; , *Org. Biomol. Chem.*, 2006, **4**, p. 3708; (b) R. A. Poole, G. Bobba, M. J. Cann, J.-C. Frias, D. Parker and R. D. Peacock, *Org. Biomol. Chem.*, 2005, **3**, 1013; (c) R. A. Poole, F. Kielar, S. L. Richardson, P. A. Stenson and D. Parker, *Chem. Commun.*, 2006, 4084; corrigendum; , *Chem. Commun.*, 2006, p. 4862; (d) R. A. Poole, C. P. Montgomery, E. J. New, A. Congreve, D. Parker and M. Botta, *Org. Biomol. Chem.*, 2007, **5**, 2055; (e) J. Yu, D. Parker, R. Pal, R. A. Poole and M. J. Cann, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 2294.
- 12 For selected examples, see: (a) C. Yang, L.-M. Fu, Y. Wang, J.-P. Zhang, W.-T. Wong, X.-C. Ai, Y.-F. Qiao, B.-S. Zou and L.-L. Gui, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2004, **43**, 5010; (b) A. D'Aleo, A. Picot, A. Beeby, J. A. Gareth Williams, B. Le Guennic, C. Andraud and O. Maury, *Inorg. Chem.*, 2008, **47**, 10258.
- 13 For selected examples, see: (a) L.-O. Pålsson, R. Pal, B. S. Murray, D. Parker and A. Beeby, *Dalton Trans.*, 2007, 5726; (b) A. Picot, A. D'Aleo, P. L. Baldeck, A. Grichine, A. Duperray, C. Andraud and O. Maury, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 1532; (c) G. Shao, R. Han, Y. Ma, M. Tang, F. Xue, Y. Sha and Y. Wang, *Chem.-Eur. J.*, 2010, **16**, 8647.
- 14 (a) V. M. Mikkala, M. Helenius, I. Hemmilä, J. Kankare and H. Takalo, *Helv. Chim. Acta*, 1993, **76**, 1361; (b) A. K. Saha, K. Kross, E. D. Kloszewski, D. A. Upson, J. L. Toner, R. A. Snow, C. D. V. Black and V. C. Desai, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 11032; (c) H. Takalo, V. M. Mikkala, L. Merio, J. C. Rodriguez-Ubis, R. Sedano, O. Juanes and E. Brunet, *Helv. Chim. Acta*, 1997, **80**, 372.
- 15 E. Brunet, O. Juanes, R. Sedano and J. C. Rodriguez-Ubis, *Tetrahedron Lett.*, 2007, **48**, 1091.
- 16 J. C. Rodriguez-Ubis, R. Sedano, G. Barroso, O. Juanes and E. Brunet, *Helv. Chim. Acta*, 1997, **80**, 86.
- 17 A value of $1\ 400\ \text{dm}^3\ \text{mol}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ was reported by Latva *et al.* (ref. 19) but the nature and pH of aq. buffer for such measurement was not specified.
- 18 See photo-physical properties of compounds **9** and **12**, reported by Latva *et al.* (ref. 19).
- 19 M. Latva, H. Takalo, V.-M. Mikkala, C. Matachescu, J. C. Rodriguez-Ubis and J. Kankare, *J. Lumin.*, 1997, **75**, 149.
- 20 M. Darabantu, L. Bouilly, A. Turck and N. Plé, *Tetrahedron*, 2005, **61**, 2897.
- 21 W. K. Fife, *J. Org. Chem.*, 1983, **48**, 1375.
- 22 J. Hovinen and P. M. Guy, *Bioconjugate Chem.*, 2009, **20**, 404.
- 23 For the use of Stille cross-coupling reaction for the preparation of 4'-substituted 2,2':6',2''-terpyridines, see: R.-A. Fallahpour, *Synthesis*, 2003, 155.
- 24 D. Cai, D. L. Hughes and T. R. Verhoeven, *Tetrahedron Lett.*, 1996, **37**, 2537.
- 25 H. Hakala, P. Liitti, J. Peuralahti, J. Karvinen, V.-M. Mikkala and J. Hovinen, *J. Lumin.*, 2005, **113**, 17.
- 26 K. Nakamoto, *J. Phys. Chem.*, 1960, **64**, 1420.
- 27 A. T. R. Williams, S. A. Winfield and J. N. Miller, *Analyst*, 1983, **108**, 1067.
- 28 J. Olmsted, III, *J. Phys. Chem.*, 1979, **83**, 2581.
- 29 S. Poupart, C. Boudou, P. Peixoto, M. Massonneau, P.-Y. Renard and A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.*, 2006, **4**, 4165; corrigendum; , *Org. Biomol. Chem.*, 2008, **6**, p. 4669.
- 30 V. M. Mikkala, C. Sund, M. Kwiatkowski, P. Pasanen, M. Hogberg, J. Kankare and H. Takalo, *Helv. Chim. Acta*, 1992, **75**, 1621.
- 31 R. M. Supkowski and W. D. Horrocks, Jr., *Inorg. Chim. Acta*, 2002, **340**, 44.
- 32 W. D. Horrocks, Jr. and D. R. Sudnick, *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, **101**, 334.
- 33 H. Karsilayan, I. Hemmilä, H. Takalo, A. Toivonen, K. Pettersson, T. Lövgren and V. M. Mikkala, *Bioconjugate Chem.*, 1997, **8**, 71.
- 34 Y. Gotoh, M. Tsukada and N. Minoura, *Bioconjugate Chem.*, 1993, **4**, 554.
- 35 G. I. Evan, G. K. Lewis, G. Ramsay and J. M. Bishop, *Mol. Cell. Biol.*, 1985, **5**, 3610.
- 36 (a) C. Chidley, K. Mosiewicz and K. Johnsson, *Bioconjugate Chem.*, 2008, **19**, 1753; (b) D. Maurel, J. Kniazeff, G. Mathis, E. Trinquet, J.-P. Pin and H. Ansanay, *Anal. Biochem.*, 2004, **329**, 253.
- 37 As reported by Perkin Elmer for LANCE® Eu-activated chelates (see http://las.perkinelmer.com/Content/manuals/man_ad0020.pdf), a F/P value of 4–10 chelates per protein (whose molecular weight is higher than 100 000) is a good labelling yield.
- 38 V. M. Mikkala, H. Takalo, P. Liitti and I. Hemmilä, *J. Alloys Compd.*, 1995, **225**, 507.

Résumé : Les complexes de lanthanides, grâce à un temps de décroissance de luminescence élevé, sont parmi les sondes les plus sensibles puisqu'ils permettent une mesure de luminescence en temps résolu. Ces complexes sont à la base de certaines technologies permettant, *in vitro* et/ou *in cellulo*, la détection d'interactions entre biomolécules et/ou leur quantification et localisation. Elaborer des complexes de lanthanides présentant un maximum d'absorption au-delà de 350 nm reste un des défis majeurs alors qu'à ces rayonnements UV le matériel biologique se dégrade moins. Un chélate luminescent d'Eu(III) fondé sur une structure original bis-pyridinylpyrazine possédant un maximum d'absorption à 345 nm, stable jusqu'à 355 nm, a été synthétisé. Un analogue portant une fonction bioconjugable a permis, après activation par un réactif de couplage homo-bifonctionnel, de marquer des anticorps anti c-myc et anti HA. La deuxième partie du projet porte sur le développement de sondes lanthanidiques photoréactives capables de détecter spécifiquement, puis de s'accrocher de façon covalente à des protéines d'intérêt taguées (polyHis ou polyAsp), afin de suivre leur trafic cellulaire et leurs interactions avec d'autres biomolécules. Idéalement, l'étape de reconnaissance devrait avoir lieu entre l'étiquette et le cation métallique suivi par l'accrochage covalent initié par photoactivation. Ceci devrait conduire à une modulation du signal émis par le marqueur lanthanidique. Pour ce faire, différents complexes comportant des benzophénones, azido-coumarines ou azidoquinolinones ont été synthétisés.

Mots clés : lanthanide, pyrazine, biomarqueur, protéine taguée, marquage covalent, photoactivation, azidocoumarine, azidoquinolinone.

Abstract: Thanks to their unique luminescence properties lanthanide chelates are often used as non-radioactive markers in a wide variety of applications such as diagnostics, research and high-throughput screening. Since they are known to have long decay-time luminescence (from few μ s up to several ms) lanthanide chelates turn out to be ideal labels for time-resolved fluorometric assays. These methods are highly sensitive by reducing the background significantly compared to traditional prompt fluorescence measurements. Moreover, one of the challenges in the design of luminescent lanthanide tags dedicated to bioanalyses and bioimaging applications is to get an excitation wavelength as high as possible (especially wavelengths around or above 350 nm) since biomolecules are usually damaged by UV light. An Eu(III) chelate based on an original bis-pyridinylpyrazine structure has been synthesized and possesses an absorption maximum around 345 nm, which is significantly red-shifted in comparison with commercial terpyridine-based Eu(III) chelate. Further amine derivatisation with homo-bifunctional cross-linking reagents allowed monoclonal antibodies labelling. The second aim of this work is to develop a new photoreactive lanthanide luminescent probe to specifically detect and react covalently with tagged proteins (polyHis or polyAsp) in order to determine *in cellulo* their distribution and their interactions with other proteins. Ideally, the recognition step would occur between the tag and the lanthanide cation followed by the covalent attachment event through photoactivation. This would result in a modulation of the signal emitted by the probe. To this end lanthanide chelates based on benzophenones, azidocoumarins and azidoquinolinones were synthesized.

Keywords: lanthanide, pyrazine, bioprobe, tagged protein, photoaffinity labeling, azidocoumarin, azidoquinolinone.