



HAL
open science

Synthèse de complexes rédox-actifs pour l'imagerie médicale

Damien Mouchel Dit Leguerrier

► **To cite this version:**

Damien Mouchel Dit Leguerrier. Synthèse de complexes rédox-actifs pour l'imagerie médicale. Chimie organique. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2022. Français. NNT: 2022GRALV003. tel-03675192

HAL Id: tel-03675192

<https://theses.hal.science/tel-03675192>

Submitted on 23 May 2022

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : Chimie organique

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Damien MOUCHEL DIT LEGUERRIER

Thèse dirigée par **Fabrice THOMAS**, professeur
et co-encadrée par **Jennifer MOLLOY**, CNRS

préparée au sein du **Laboratoire Département de Chimie
Moléculaire**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Synthèse de complexes rédox-actifs pour l'imagerie médicale

Synthesis of redox active complexes for medical imaging

Thèse soutenue publiquement le **24 janvier 2022**,
devant le jury composé de :

Monsieur Fabrice THOMAS

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes,
Directeur de thèse

Madame Célia BONNET

CHARGE DE RECHERCHE HDR, CNRS délégation Limousin Poitou-
Charentes, Rapporteur

Monsieur Olivier MAURY

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS délégation Rhône-Auvergne,
Rapporteur

Monsieur Raphaël TRIPIER

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de Bretagne
Occidentale, Examineur

Monsieur Olivier SENEQUE

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS délégation Alpes, Président



*A mes parents,
A ma petite sœur,
A ma famille,*

Remerciements

J'ai effectué ce travail de thèse dans le département de chimie moléculaire au sein de l'équipe de Chimie Inorganique et Redox. Cette recherche a été financée par le projet Idex « Initiative d'excellence » de l'université Grenoble Alpes et par le Labex Arcane.

Je souhaite remercier Mme Célia Bonnet et Mr Olivier Maury d'avoir évalué et jugé ce travail ainsi que les commentaires très pertinents qu'ils m'ont apporté. Je remercie Mrs Olivier Sénèque et Raphaël Tripier d'avoir fait partie de ce jury de thèse. Merci à vous tous pour la discussion que nous avons pu avoir lors de la soutenance.

Je remercie Fabrice Thomas, mon directeur de thèse, pour m'avoir guidé sur les nombreuses techniques que je ne maîtrisais pas avant la thèse, notamment la RPE ou l'électrochimie. Merci pour le temps passé aux relectures du manuscrit.

Je remercie chaleureusement Jennifer Molloy, qui a co-encadré cette thèse pour m'avoir fait confiance pendant ces trois années. Merci de m'avoir initié à la chimie des lanthanides et du cyclène ainsi qu'à la luminescence. L'histoire a commencé lors de discussion dans la cafétéria lorsque tu as cherché avec détermination un financement pour me garder au laboratoire ! Il en est ressorti un nouveau projet ambitieux où tout était à découvrir. J'espère que ces travaux t'ont permis et vont encore te permettre d'avancer plus loin dans tes recherches !

Je remercie Pascale Fries et Daniel Imbert pour le temps qu'ils m'ont accordé sur la relaxométrie et sur la luminescence au CEA, bien que le COVID-19 ait compliqué les échanges.

Je souhaite remercier Nicolas Leconte, qui m'a permis d'intégrer le DCM lors de mon stage de Master 1 puis de Master 2, avec qui j'ai partagé d'excellents moments, tant scientifiques qu'humains jusqu'à la fin de la thèse. Merci de m'avoir enseigné comment faire de la chimie « Clean », de m'avoir montré ce qu'était la recherche. Je n'aurai pas pu avoir meilleur formateur que toi ! Merci...

Merci à Isabelle, Marie-Carmen et Romain pour leur aide avec la RMN et le CEST.

Merci à Christian et Nicolas pour la cristallographie et leurs cheveux arrachés sur mes structures.

Il est, selon moi, très important de se lever le matin et d'avoir envie d'aller travailler. En plus d'aimer ce qu'on fait, avoir des collègues et des amis en or y joue pour beaucoup. Ces trois années ont été un réel plaisir grâce à vous.

Merci à Richard, #Dupond, mon camarade de paillasse. On a commencé un sujet nouveau ensemble coude à coude. Je trinque à tous ces moments de discussions, d'interrogations (« Mais pourquoi tes complexes sortent en masse et pas les miens ??? »), de réussites et d'échecs. Dupont et Dupond auront réussi à aller au bout de ce travail ! Maintenant une nouvelle aventure commence.

Merci à Baptiste, #PèreCastor. Ces instants de pêche post-labo, cette truite de 53 cm restera gravée dans ma mémoire. Tes nombreuses histoires et tes blagues ont contribué à la bonne humeur générale. Mais des discussions sérieuses autour d'un apéro et d'un bon repas avec Richard ont mené au challenge Out of Labs puis au comité d'investissement et maintenant on va tout donner pour notre projet FuelSea !

Merci à Clarisse, notre cheffe impératrice de Glob'alps. Leader dans l'âme tu nous as permis de vivre d'incroyables moments à travers l'association. Des afterworks, des Pints of science, des webinaires alumni et tant d'autres. Ma camarade de bureau me manquera, merci d'avoir été là ! :D

Merci à Romain, #LaPoutre tout d'abord camarade de labo en stage puis camarade exilé chez les canadiens durant la pandémie. Compagnon de galère des cœurs, on a pu se soutenir dans les moments difficiles ! Merci à toi mon Roro :D

Merci à Thibault, camarade du CEA et voisin du 1^{er}. Tes histoires infinies de cœur sont une source d'inspiration pour un livre ou une série Netflix ! Promis si j'ai un contact, tu seras une star. Ton soutien dans les moments difficiles fait chaud au cœur, t'es un gars qui en a un grand (de cœur), plein de valeurs. Merci Thibthib.

Merci à Enzo, binôme depuis le premier jour au DLST. « Salut, tu veux être mon pote ? » Grand maître de la rigueur, notre binôme ne pouvait que fonctionner. Je me rappellerai ces moments passés au Japon ensemble, au top ! Hâte de découvrir ce qui se passera dans l'avenir.

Merci à Phoulinh, découvert pendant le raid patate à l'IMBG. A nos partages de connaissance en bourse, aux appels à 9h en criant « on est riiiiiche ».

Merci à Zak et Elarbi, nos génies de la chimie orga, du DHP. Camarade de labo pendant la thèse, nos longues heures de synthèse en musique ont été incroyables !

Merci à Gisèle, notre maman à tous dans le labo puis à Neven, qui a pris la suite. Sans vous, on serait perdu !

Merci à tous les stagiaires : Chloé, Adrian, Lucas, Anissa et Calypso pour votre bonne humeur et merci d'avoir participé à ce projet.

Merci à tous les collègues au laboratoire pour les bons moments passés ensemble, Olivier, Amaury, Aurore, Saïoa, Guy, Catherine, Jules, Mélanie, Patrick, Lorna, Guanqi, Javier, Emiliano.

Je voudrais remercier mes amis, Stévy, Jérôme, Benjamin, Benoit, Anne laure, Marc, Charlotte, Myriam, Tony, Marie, Louise, Cathie, Justine et tous les autres...

Enfin je voudrais remercier ma famille, mon père qui a toujours tout donné pour que je puisse arriver jusqu'ici. Ma mère pour son soutien sans faille depuis toujours. Ma sœur pour s'être occupée de tout, de Java, de Maiko, de Snoopy, de Sydney, de Sania et d'Anouchka. Et enfin, Louison, mon amour, qui m'a supporté pendant la période de rédaction, pour m'avoir

fait des bons petits plats dans les moments difficiles. Vous êtes la meilleure famille qu'on puisse rêver.

Abréviations

AC : agent de contraste
ADN : acide désoxyribonucléique
CAT : catalases
Cbz : carboxybenzyle
CCM : chromatographie sur couche mince
CEST : chemical Exchange Saturation Transfer
CV : voltampérométrie cyclique
DFT : théorie de la fonctionnelle de la densité
DO2A : acide 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,7-diacétique
DO3A : acide 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triacétique
DOTA : acide 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacétique
DOTAM : 1,4,7,10-Tetrakis(carbamoylmethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane
DO2AM : 1,4,7,10-Tetrakis(carbamoylmethyl)-1,7-tetraazacyclododecane
DPV : voltampérométrie à impulsion différentielle
DTPA : acide diethylenetriaminepentaacétique
ECS : électrode au calomel saturée
EDTA : acide Ethylenediaminetetraacétique
EDG : groupement « donneur d'électron »
EWG : groupement « attracteur d'électron »
FDA : food and drug administration
FFC-NMR : RMN en champ cyclé (Fast Field Cycling NMR)
FRET : Förster resonance energy transfer
GPx : glutathion peroxydases
HEPES : acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-(2-éthanesulfonique)
HSA : human serum albumine
IRM : imagerie par résonance magnétique
LMCT : transfert de charge du ligand au métal
MLCT : transfert de charge du métal au ligand
MS-ESI : spectrométrie de masse – Ionisation par spray d'électron
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide
NIR : proche infrarouge
NOTA : acide 1,4,7-triazacyclononane-N,N',N''-triacétique
ORCA : organic radical contrast agent, Agent de contraste basé sur des radicaux organiques
ParaCEST : paramagnetic chemical exchange saturation transfer
PCET : transfert de proton couplé au transfert d'électron
PCTA : acide 3,6,9,15-tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-triene-3,6,9-triacetate
PET : photoinduced electron transfer (transfert d'électron photo-induit)
RDE : électrode à disque tournant
RMN : résonance magnétique nucléaire

RNS : reactive nitrogen species, espèces réactives de l'azote
ROS : reactive oxygen species, espèces réactives de l'oxygène
RPE : résonance paramagnétique électronique
RX : rayon X
SAP : conformation anti prismatique carré
SOD : superoxydes dismutases
TEMPO : (2,2,6,6-tétraméthylpipéridin-1-yl)oxyl
TEMPOH : (2,2,6,6-tétraméthylpipéridin-1-yl)hydroxylamine
TETA : acide 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane-1,4,8,11-tetraacétique
TFA : acide trifluoroacétique
TPT : 1,4,7-tris(pyrazol-3-ylmethyl)-1,4,7-triazacyclononane
TSAP : conformation anti prismatique carré distordu
TTHA : acide triéthylènetétraaminehexaacétique
UV-Vis : ultraviolet - visible

Sommaire

| | |
|---|------------|
| I. CHAPITRE 1 : INTRODUCTION | 16 |
| I.1 LES LANTHANIDES..... | 16 |
| I.1.1 Configuration électronique..... | 16 |
| I.1.2 La contraction des lanthanides | 17 |
| I.1.3 Chimie de coordination et toxicité..... | 18 |
| I.1.4 Propriétés magnétiques | 18 |
| I.1.5 Propriétés spectroscopiques..... | 20 |
| I.2 IMAGERIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE | 21 |
| I.2.1 Fonctionnement d'une IRM..... | 22 |
| I.2.2 Résolution et contraste de l'IRM | 23 |
| I.2.3 Les agents de contraste..... | 24 |
| I.3 LA TECHNIQUE CEST..... | 30 |
| I.3.1 Le principe de la technique CEST | 30 |
| I.3.2 Applications de sondes CEST | 34 |
| I.4 LA LUMINESCENCE | 40 |
| I.4.1 Définition..... | 41 |
| I.4.2 Effet antenne..... | 43 |
| I.4.3 Exemple de sondes luminescentes à base de lanthanides..... | 44 |
| I.5 LES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE | 48 |
| I.5.1 Définition..... | 48 |
| I.5.2 L'origine biologique du stress oxydant | 49 |
| I.6 SONDES REDOX POUR LA DETECTION DES ROS..... | 52 |
| I.6.1 Complexes de lanthanides pour la detection selective des ROS..... | 53 |
| I.6.2 Complexes de lanthanides pour la detection du stress oxydant..... | 55 |
| I.6.3 Radicaux organiques pour la détection des ROS..... | 57 |
| I.7 OBJECTIF DE CE TRAVAIL..... | 62 |
| II. CHAPITRE 2 : COMPLEXES INTEGRANT UN RADICAL STABLE : D₁, D₂..... | 66 |
| II.1 DESIGN DES COMPLEXES [Ln.D ₁] ³⁺ ET [Ln.D ₂] ³⁺ | 67 |
| II.2 SYNTHÈSE DES LIGANDS ET DES COMPLEXES..... | 69 |
| II.2.1 Synthèse du ligand D ₁ | 70 |
| II.2.2 Synthèse du ligand D ₂ | 74 |
| II.2.3 Formation des complexes..... | 78 |
| II.3 ETUDES ELECTROCHIMIQUES ET SPECTROSCOPIQUES DES COMPLEXES..... | 80 |
| II.3.1 Etude électrochimique des ligands et complexes | 80 |
| II.3.2 Etudes des complexes par spectroscopie d'absorption et luminescence..... | 88 |
| II.3.3 Etudes des complexes par Résonance paramagnétique électronique..... | 94 |
| II.3.4 Spectroscopie CEST des complexes..... | 100 |
| II.3.5 Etude théorique par la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) | 106 |
| II.3.6 Etudes de la relaxivité des complexes | 109 |
| II.3.7 Etudes biologiques des complexes | 110 |
| II.4 BILAN ET PERSPECTIVES..... | 113 |
| III. CHAPITRE 3 : COMPLEXES INTEGRANT UNE ANTENNE : D₃ ET D₄..... | 116 |
| III.1 DESIGN DES COMPLEXES [Ln.D ₃] ³⁺ ET [Ln.D ₄] ³⁺ | 117 |
| III.1.1 Intérêt de la fonction phénylacétamide en CEST..... | 117 |
| III.1.2 Intérêt de la fonction CF ₃ en RMN du ¹⁹ F..... | 120 |
| III.1.3 Choix du lanthanide et de l'antenne..... | 120 |
| III.1.4 Design des ligands D ₃ et D ₄ | 121 |
| III.2 SYNTHÈSE DES LIGAND ET DES COMPLEXES PRECURSEURS | 122 |

| | | |
|---------|---|-----|
| III.2.1 | Synthèse des précurseurs | 122 |
| III.2.2 | Synthèse des ligands D_3 et D_4 | 127 |
| III.2.3 | Formation des complexes..... | 129 |
| III.3 | ETUDES DES LIGANDS ET COMPLEXES PAR ELECTROCHIMIE | 130 |
| III.3.1 | Etude électrochimique des espèces organiques | 130 |
| III.4 | ETUDES DES COMPLEXES PAR SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION ET LUMINESCENCE | 135 |
| III.4.1 | Spectroscopie d'absorption UV-Vis | 135 |
| III.4.2 | Spectroscopie de luminescence | 137 |
| III.5 | ETUDES PAR RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE..... | 144 |
| III.5.1 | Spectroscopie RPE des ligands..... | 144 |
| III.5.2 | Spectroscopie RPE des complexes de lanthanides..... | 146 |
| III.6 | SPECTROSCOPIE CEST DES COMPLEXES | 147 |
| III.6.1 | Spectres CEST de la série D_3 | 148 |
| III.6.2 | Spectres CEST de la série D_4 | 149 |
| III.6.3 | Influence de l'état rédox sur l'activité CEST..... | 149 |
| III.7 | BILAN ET PERSPECTIVES..... | 150 |

IV. CHAPITRE 4 : COMPLEXES SYMETRIQUES INTEGRANT DEUX UNITES

REDOX : D_5 ET D_6 152

| | | |
|--------|---|-----|
| IV.1 | DESIGN DES COMPLEXES $[Ln.D_5]^{3+}$ ET $[Ln.D_6]^{3+}$ | 153 |
| IV.2 | SYNTHESE DES LIGANDS ET DES COMPLEXES..... | 153 |
| IV.2.1 | Synthèse du ligand D_5 | 153 |
| IV.2.2 | Synthèse du ligand D_6 | 154 |
| IV.2.3 | Formation des complexes..... | 157 |
| IV.3 | ETUDE ELECTROCHIMIQUE DES LIGANDS ET COMPLEXES | 158 |
| IV.3.1 | Etude électrochimique des ligands | 158 |
| IV.4 | ETUDES DES COMPLEXES PAR SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION ET LUMINESCENCE | 160 |
| IV.4.1 | Spectroscopie d'absorption UV-Vis | 160 |
| IV.4.2 | Spectroscopie de luminescence | 161 |
| IV.5 | ETUDES DES COMPLEXES PAR RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE..... | 166 |
| IV.5.1 | Spectres des ligands D_5 et D_6 | 166 |
| IV.5.2 | Complexes de lanthanides..... | 167 |
| IV.6 | SPECTROSCOPIE CEST DES COMPLEXES | 171 |
| IV.6.1 | Spectroscopie CEST des complexes d'euprium | 171 |
| IV.6.2 | Spectroscopie CEST des complexes d'ytterbium | 176 |
| IV.7 | CYTOTOXICITE DES COMPLEXES..... | 178 |
| IV.8 | BILAN ET PERSPECTIVES..... | 179 |

V. CHAPITRE 5 : COMPLEXES SYMETRIQUES INTEGRANT UNE ANTENNE

REDOX-ACTIVE : D_7 182

| | | |
|-------|--|-----|
| V.1 | DESIGN DES COMPLEXES $[Ln.D_7]^{3+}$ | 183 |
| V.2 | SYNTHESE DES LIGANDS ET DES COMPLEXES..... | 184 |
| V.2.1 | Synthèse des précurseurs | 185 |
| V.2.2 | Synthèse du ligand D_7 | 187 |
| V.2.3 | Formation des complexes..... | 190 |
| V.3 | ETUDES DU LIGAND ET DES COMPLEXES PAR SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION ET LUMINESCENCE | 192 |
| V.3.1 | Spectroscopie d'absorption UV-Vis | 192 |
| V.3.2 | Spectroscopie de luminescence | 194 |
| V.4 | ETUDE DE L'ACTIVITE CEST DES COMPLEXES | 198 |
| V.4.1 | Temps de relaxation | 198 |
| V.4.2 | Spectres CEST sur la série $Ln.D_7^{3+}$ | 198 |
| V.5 | BILAN ET PERSPECTIVES..... | 200 |

| | |
|---|------------|
| VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES | 202 |
| VII. CHAPITRE 7 : PARTIE EXPERIMENTALE | 204 |
| VII.1 MOLECULES DU CHAPITRE 2..... | 209 |
| VII.2 MOLECULES DU CHAPITRE 3..... | 217 |
| VII.3 MOLECULES DU CHAPITRE 4..... | 226 |
| VII.4 MOLECULES DU CHAPITRE 5..... | 230 |
| VIII. BIBLIOGRAPHIE..... | 234 |
| IX. ANNEXES | 241 |
| IX.1 RMN..... | 241 |
| IX.2 INFRA ROUGE | 245 |
| IX.3 LUMINESCENCE | 247 |
| IX.4 CEST | 250 |
| IX.5 RPE..... | 256 |
| IX.6 MAGNETISME | 259 |
| IX.7 CHROMATOGRAPHY | 260 |
| IX.8 X-RAY STRUCTURE DETERMINATION | 261 |

Avant-propos

L'histoire de la médecine occidentale est née en -460 avant J.C. avec Hippocrate. Voilà près de 2500 ans que les Hommes cherchent à observer, comprendre et soigner les Hommes. Jusqu'à la fin du XIX^{ème} siècle, il fallait ouvrir un corps pour pouvoir l'observer de l'intérieur mais c'est en 1895 que les choses vont commencer à changer, lorsque le physicien allemand Wilhelm Röntgen découvre les rayons X. Le célèbre cliché de la main de l'épouse du physicien fait la fascination générale des scientifiques et du grand public, il n'aura fallu que quelques mois pour que cela se diffuse. En passant par la tomographie jusqu'à l'invention du scanner en 1972 par Hounsfield, il s'agit alors de reconstruire les images en 3D afin d'observer le corps en profondeur. En parallèle, la naissance de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) marque un progrès majeur dans l'histoire de la radiologie^[1,2] (figure 0-1).

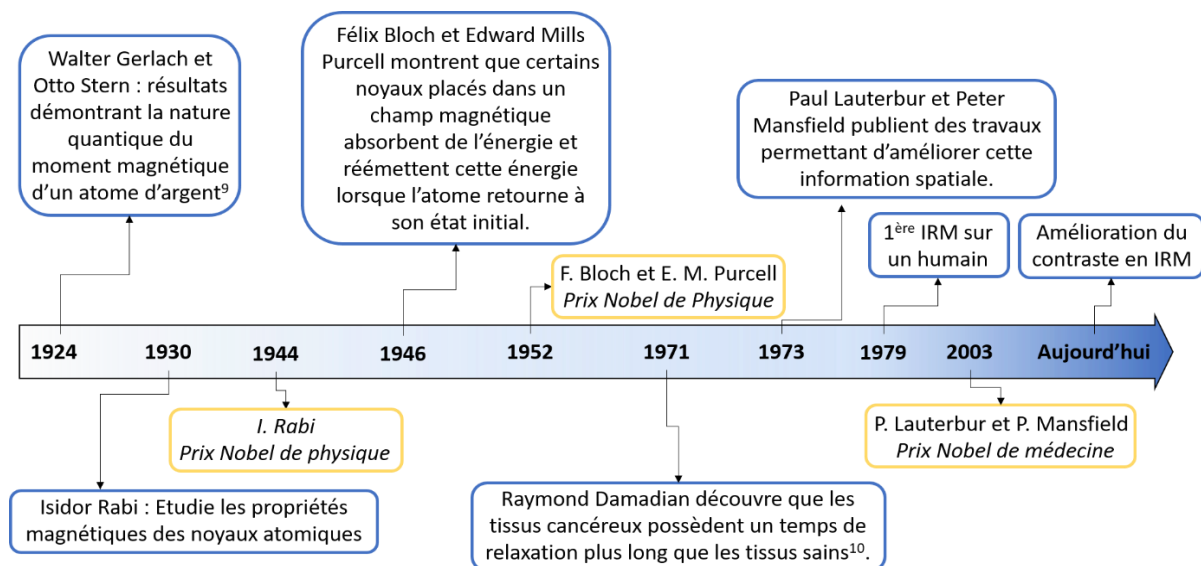


Figure 0-1 : Frise chronologique retraçant l'histoire de l'IRM.

Depuis bientôt 50 ans, l'IRM est devenu un outil d'imagerie et de diagnostic indispensable. En 2018, la France disposait d'environ 960 machines d'IRM sur son territoire avec une évolution constante chaque année. Un des principaux objectifs actuels est d'obtenir un meilleur contraste et une meilleure sensibilité afin de comprendre les phénomènes biochimiques et biologiques pour de meilleurs diagnostics des patients, on parle alors d'imagerie moléculaire. Le principe de cette discipline est de détecter spécifiquement une cible telle que des séquences d'ADN, des marqueurs cellulaires, des enzymes, des espèces réactives... Il sera alors possible par exemple, de détecter des cancers naissant.

Les espèces à étudier sont souvent présentes en très faibles quantités dans les tissus et nécessitent des techniques d'imageries ayant une très bonne sensibilité. L'IRM dispose d'une très bonne résolution mais souffre d'un manque de sensibilité. C'est pourquoi des agents de contraste sont ajoutés afin de gagner en sensibilité. A contrario, l'imagerie optique bénéficie

d'une sensibilité accrue mais ne permet pas une étude en profondeur. En couplant ces deux techniques, il serait alors possible d'étudier avec précision les mécanismes moléculaires au plus profond des tissus.

C'est dans cette optique que ces travaux de thèse sont nés, afin de mettre au point des agents de contraste à base de lanthanides et de ligands non innocents répondant spécifiquement au stress oxydant.

I. CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

I.1 LES LANTHANIDES

Le terme de « Lanthanide » désigne une famille de métaux aux numéros atomiques croissant allant de Z=57 à Z=71 et appartenant au bloc f du tableau périodique des éléments (Figure I-1). Cette famille est donc composée de 15 éléments allant du Lanthane au Lutécium. On retrouve de manière un peu plus courante la dénomination de « terres rares », lorsque l'on parle de la 3^{ème} colonne du tableau et que l'on inclut le scandium et l'yttrium. Ce terme ne se réfère pas à la rareté des éléments puisque leur abondance est quasi similaire aux métaux de transition (le cérium étant aussi présent que le cuivre ; le lutécium, le moins abondant des terres rares non radioactifs, est plus abondant que l'argent sur terre) mais plutôt au fait qu'ils soient dispersés aux quatre coins de la planète et que leur identification se soit faite de manière progressive pendant plus d'un siècle.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|--|--------------------------------------|---|--------------------------------------|--|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--|--|---------------------------------------|--|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| 1 1.008* H hydrogen | | | | | | | | | | | | | | | | | 2 4.003 He helium |
| 3 6.94* Li lithium | 4 9.012 Be beryllium | | | | | | | | | | | 5 10.81* B boron | 6 12.01* C carbon | 7 14.01* N nitrogen | 8 16.00* O oxygen | 9 19.00 F fluorine | 10 20.18 Ne neon |
| 11 22.99 Na sodium | 12 24.31* Mg magnesium | | | | | | | | | | | 13 26.98 Al aluminium | 14 28.09* Si silicon | 15 30.97 P phosphorus | 16 32.06* S sulfur | 17 35.45* Cl chlorine | 18 39.95 Ar argon |
| 19 39.10 K potassium | 20 40.08 Ca calcium | 21 44.96 Sc scandium | 22 47.87 Ti titanium | 23 50.94 V vanadium | 24 52.00 Cr chromium | 25 54.94 Mn manganese | 26 55.85 Fe iron | 27 58.93 Co cobalt | 28 58.69 Ni nickel | 29 63.55 Cu copper | 30 65.38* Zn zinc | 31 69.72 Ga gallium | 32 72.63 Ge germanium | 33 74.92 As arsenic | 34 78.97* Se selenium | 35 79.90* Br bromine | 36 83.80 Kr krypton |
| 37 85.47 Rb rubidium | 38 87.62 Sr strontium | 39 88.91 Y yttrium | 40 91.22 Zr zirconium | 41 92.91 Nb niobium | 42 95.95* Mo molybdenum | 43 [98] Tc technetium | 44 101.1 Ru ruthenium | 45 102.9 Rh rhodium | 46 106.4 Pd palladium | 47 107.9 Ag silver | 48 112.4 Cd cadmium | 49 114.8 In indium | 50 118.7 Sn tin | 51 121.8 Sb antimony | 52 127.6 Te tellurium | 53 126.9 I iodine | 54 131.3 Xe xenon |
| 55 132.9 Cs caesium | 56 137.3 Ba barium | 57-71 lanthanides | 72 178.5 Hf hafnium | 73 180.9 Ta tantalum | 74 183.8 W tungsten | 75 186.2 Re rhenium | 76 190.2 Os osmium | 77 192.2 Ir iridium | 78 195.1 Pt platinum | 79 197.0 Au gold | 80 200.6 Hg mercury | 81 204.4* Tl thallium | 82 207.2 Pb lead | 83 209.0 Bi bismuth | 84 [209] Po polonium | 85 [210] At astatine | 86 [222] Rn radon |
| 87 [223] Fr francium | 88 [226] Ra radium | 89-103 actinides | 104 [267] Rf rutherfordium | 105 [268] Db dubnium | 106 [269] Sg seaborgium | 107 [270] Bh bohrium | 108 [277] Hs hassium | 109 [278] Mt meitnerium | 110 [281] Ds darmstadtium | 111 [282] Rg roentgenium | 112 [285] Cn copernicium | 113 [286] Nh nihonium | 114 [289] Fl flerovium | 115 [290] Mc moscovium | 116 [293] Lv livermorium | 117 [294] Ts tennessine | 118 [294] Og oganesson |
| | | | 57 138.9 La lanthanum | 58 140.1 Ce cerium | 59 140.9 Pr praseodymium | 60 144.2 Nd neodymium | 61 [145] Pm promethium | 62 150.4 Sm samarium | 63 152.0 Eu europium | 64 157.3 Gd gadolinium | 65 158.9 Tb terbium | 66 162.5 Dy dysprosium | 67 164.9 Ho holmium | 68 167.3 Er erbium | 69 168.9 Tm thulium | 70 173.0 Yb ytterbium | 71 175.0 Lu lutetium |
| | | | 89 [227] Ac actinium | 90 [232] Th thorium | 91 [231] Pa protactinium | 92 [238] U uranium | 93 [237] Np neptunium | 94 [244] Pu plutonium | 95 [243] Am americium | 96 [243] Cm curium | 97 [247] Bk berkelium | 98 [247] Cf californium | 99 [251] Es einsteinium | 100 [252] Fm fermium | 101 [257] Md mendelevium | 102 [259] No nobelium | 103 [260] Lr lawrencium |

Figure I-1 : Tableau périodique des éléments de Mendeleïev

I.1.1 Configuration électronique

De manière générale, les lanthanides ont une configuration du type $[\text{Xe}] 6s^2 4f^{0 < n < 14}$. Les électrons appartenant à la couche f sont plus proches du noyau et sont écrantés par les couches pleines $5s^2$ et $5p^6$. Ils sont donc peu sensibles à leur environnement et sont moins

impliqués dans la formation de liaisons chimiques covalentes. Les potentiels d'ionisation des terres rares sont relativement faibles et leur faible électronégativité fait que ces métaux existent principalement sous formes ioniques Ln^{3+} dans la nature^[3]. Deux autres degrés d'oxydation sont accessibles pour certains lanthanides mais ils restent moins stables que leur forme Ln(III) . Cette stabilité particulière est associée à la configuration « vide, $4f^0$ », « moitié pleine, $4f^7$ » et « pleine, $4f^{14}$ » de la couche $4f$.

- Le scandium, l'yttrium et le lanthane forment exclusivement l'ion M^{3+} car il en résulte la configuration du gaz inerte qui les précède.
- Le gadolinium et le lutécium forment eux aussi l'ion Ln^{3+} en atteignant la configuration stable $4f^7$ et $4f^{14}$ respectivement.
- Le cérium et le terbium peuvent se trouver sous le degré d'oxydation Ln^{4+} en atteignant les configurations $4f^0$ et $4f^7$ respectivement.
- Enfin l'euporium et l'ytterbium peuvent se trouver sous le degré d'oxydation Ln^{2+} atteignant ainsi les configurations $4f^7$ et $4f^{14}$, respectivement.

I.1.2 La contraction des lanthanides

Lorsque l'on avance dans la série, la charge nucléaire croissante a une attraction plus importante sur les électrons de la couche $4f$ et de ce fait, la taille des lanthanides diminue. Ce phénomène appelé « contraction des lanthanides » a plusieurs conséquences sur leurs propriétés physiques, qui évoluent le long de la série. Plus leur taille diminue, plus cela accroît leur densité, leur dureté, leur température de fusion (Tableau I-A). Sous forme atomique, l'euporium et l'ytterbium ne suivent pas cette tendance et cela semble être dû à leur stabilité relative lors du remplissage de leur couche $4f$.

Tableau I-A : Propriétés électroniques et physiques des lanthanides.

| ^ZLn | Configuration électronique de l'atome | Configuration électronique de l'ion Ln^{3+} | Rayon ionique (Å) |
|------------------|---------------------------------------|--|-------------------|
| ^{57}La | $[\text{Xe}] 5d^1 6s^2$ | $[\text{Xe}]$ | 1,061 |
| ^{58}Ce | $[\text{Xe}] 4f^1 5d^1 6s^2$ | $[\text{Xe}] 4f$ | 1,034 |
| ^{59}Pr | $[\text{Xe}] 4f^3 6s^2$ | $[\text{Xe}] 4f^2$ | 1,013 |
| ^{60}Nd | $[\text{Xe}] 4f^4 6s^2$ | $[\text{Xe}] 4f^3$ | 0,995 |
| ^{61}Pm | $[\text{Xe}] 4f^5 6s^2$ | $[\text{Xe}] 4f^4$ | 0,979 |
| ^{62}Sm | $[\text{Xe}] 4f^6 6s^2$ | $[\text{Xe}] 4f^5$ | 0,964 |
| ^{63}Eu | $[\text{Xe}] 4f^7 6s^2$ | $[\text{Xe}] 4f^6$ | 0,950 |
| ^{64}Gd | $[\text{Xe}] 4f^7 5d^1 6s^2$ | $[\text{Xe}] 4f^7$ | 0,938 |
| ^{65}Tb | $[\text{Xe}] 4f^9 6s^2$ | $[\text{Xe}] 4f^8$ | 0,923 |
| ^{66}Dy | $[\text{Xe}] 4f^{10} 6s^2$ | $[\text{Xe}] 4f^9$ | 0,908 |
| ^{67}Ho | $[\text{Xe}] 4f^{11} 6s^2$ | $[\text{Xe}] 4f^{10}$ | 0,894 |
| ^{68}Er | $[\text{Xe}] 4f^{12} 6s^2$ | $[\text{Xe}] 4f^{11}$ | 0,881 |
| ^{69}Tm | $[\text{Xe}] 4f^{13} 6s^2$ | $[\text{Xe}] 4f^{12}$ | 0,869 |

Chapitre 1

| | | | |
|------------------|---|-----------------------|-------|
| ⁷⁰ Yb | [Xe] 4f ¹⁴ 6s ² | [Xe] 4f ¹³ | 0,858 |
| ⁷¹ Lu | [Xe] 4f ¹⁴ 5d ¹ 6s ² | [Xe] 4f ¹⁴ | 0,848 |

Comme dit précédemment, les électrons de la couche 4f sont plus proches du noyau que les couches 5s et 5p et ont un comportement de type « électrons de cœur ». Les propriétés spectroscopiques et magnétiques sont donc largement indépendantes de leur environnement. De plus les liaisons métal-ligand dans les complexes seront essentiellement ioniques.

I.1.3 Chimie de coordination et toxicité

Les terres rares possèdent des propriétés chimiques assez homogènes. Les lanthanides peuvent donc être coordonnés de façon similaire au même ligand. Selon la classification de Pearson, ce sont des acides durs. Ils interagissent par conséquent préférentiellement avec des ligands durs, donneurs tels que l'eau, des ligands azotés ou oxygénés... Le nombre de coordination varie aussi selon la contraction des lanthanides. Les ions les plus gros auront tendance à former 9 à 10 liaisons de coordinations alors que les plus petits n'en formeront que 8. Les ions intermédiaires resteront assez mixtes. Une fois le complexe formé, celui-ci aura tendance à compléter sa sphère de coordination avec des molécules d'eau^[4].














Une bonne coordination du métal est indispensable pour limiter sa toxicité lors d'une utilisation en milieu médical. Il existe de nombreuses études concernant la toxicité du gadolinium. Cela est dû à sa forte utilisation au sein de complexes comme agent de contraste pour l'imagerie médicale. La toxicité de l'ion Gd³⁺ libre est importante (sa dose létale médiane, la LD₅₀, qui tue la moitié des sujets n'est que de 0,35 mmol/kg pour du GdCl₃ injecté en intraveineuse)^[5]. Sa toxicité vient du fait que ce soit un bio-isostère de l'ion Ca²⁺ et perturbe ainsi la balance calcique. Le calcium étant présent en très petite quantité au sein des cellules, une perturbation de sa concentration mène rapidement à des perturbations de la signalisation cellulaire, des canaux sodiques dépendant du voltage, troubles musculaires, etc... Des nécroses cellulaires^[6], fibroses et lésions liées aux dépôts minéraux ainsi que des dépôts au niveau cérébral sont aussi observés (la FDA présente cependant dans un rapport de 2017, l'absence d'effet indésirable lié à ce dépôt dans le cerveau)^[7]. Même si la toxicité des autres lanthanides est moins étudiée, leur similarité au sein de la série fait qu'ils sont très vraisemblablement aussi toxiques les uns que les autres. Il est donc crucial d'avoir des ligands ayant une très bonne affinité et une importante stabilité cinétique pour ne pas être relargué dans le milieu biologique.

I.1.4 Propriétés magnétiques

A l'exception du La³⁺ et du Lu³⁺, les ions lanthanides possèdent tous des électrons non appariés et sont donc paramagnétiques (Tableau I-B). Leurs propriétés magnétiques sont entièrement déterminées par leur état de plus basse énergie puisque la grande différence

entre le niveau d'énergie de l'état excité et de l'état fondamental fait que l'état excité est thermiquement inaccessible (à l'exception du Sm^{3+} et de l' Eu^{3+}).

Tableau I-B : Nombre d'électrons non appariés selon les lanthanides.

| Lanthanide | Configuration électronique de l'ion Ln^{3+} | Nombre d'électrons non appariés | Moment magnétique effectif μ^{eff} | Anisotropie de la densité 4f | temps de relaxation électronique (sec) |
|------------|--|---------------------------------|---|---|--|
| La | [Xe] | 0 | - | - | - |
| Ce | [Xe] 4f | 1 | 2,54 |  Oblate | |
| Pr | [Xe] 4f ² | 2 | 3,58 |  Oblate | |
| Nd | [Xe] 4f ³ | 3 | 3,62 |  Oblate | |
| Pm | [Xe] 4f ⁴ | 4 | 2,68 |  Prolate | |
| Sm | [Xe] 4f ⁵ | 5 | 0,85 |  Prolate | |
| Eu | [Xe] 4f ⁶ | 6 | 0 | J = 0 | 10^{-12} - 10^{-13} |
| Gd | [Xe] 4f ⁷ | 7 | 7,94 |  Isotrope | 10^{-9} |
| Tb | [Xe] 4f ⁸ | 6 | 9,72 |  Oblate | 10^{-12} |
| Dy | [Xe] 4f ⁹ | 5 | 10,65 |  Oblate | 10^{-12} - 10^{-13} |
| Ho | [Xe] 4f ¹⁰ | 4 | 10,61 |  Oblate | 10^{-12} - 10^{-13} |
| Er | [Xe] 4f ¹¹ | 3 | 9,58 |  Prolate | |
| Tm | [Xe] 4f ¹² | 2 | 7,56 |  Prolate | |
| Yb | [Xe] 4f ¹³ | 1 | 4,54 |  Prolate | |
| Lu | [Xe] 4f ¹⁴ | 0 | - |  Isotrope | |

Les propriétés paramagnétiques particulières des lanthanides sont d'un très grand intérêt. Ils sont caractérisés par un moment magnétique intense (μ_{eff}) et par une forte anisotropie intrinsèque^[8,9] (à l'exception de l'euprimum dont le moment magnétique à l'état fondamental est nul et le gadolinium qui est isotrope, Tableau I-B). L'ion gadolinium et ses 7 électrons célibataires possèdent le temps de relaxation électronique le plus important (T_{1e} de l'ordre de 10^{-9} s en comparaison aux autres lanthanides dont le T_{1e} est de l'ordre de 10^{-13} s)^[10]. Ces propriétés confèrent au gadolinium un couplage dipolaire efficace avec les protons qui l'entourent et en font l'élément le plus intéressant pour concevoir des agents de contraste d'IRM classique. D'autres lanthanides induiront un déplacement chimique des protons les entourant ainsi qu'un élargissement plus ou moins important de leur spectre

RMN. Ces propriétés nous seront très utiles dans le développement de sondes spécifiques, notamment en ParaCEST.

I.1.5 Propriétés spectroscopiques

Les lanthanides possèdent des propriétés spectroscopiques particulières, qui ont été très largement exploitées dans diverses applications que nous décrirons brièvement.

Les transitions $f-f$ sont théoriquement interdites par la règle de Laporte et il en découle que les coefficients d'extinction molaire des lanthanides sont très faibles ($1-10 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) et c'est en partie pour cela que leurs sels sont souvent incolores. La majorité des lanthanides sont luminescents et leurs propriétés d'émission sont gouvernées par la facilité avec laquelle l'état excité se peuple et avec la minimisation des mécanismes de désactivation non-radiative. Le rendement quantique intrinsèque du lanthanide dépend majoritairement de la différence d'énergie entre les niveaux excités et le niveau fondamental. Plus la différence d'énergie est faible, plus la probabilité de désactivation par des processus non radiatifs sera grande. Ces différences d'énergies sont représentées sur le diagramme partiel d'énergie des ions lanthanides (III) aqueux (Figure I-2) issu des travaux de J. C. Bünzli *et al.*^[11].

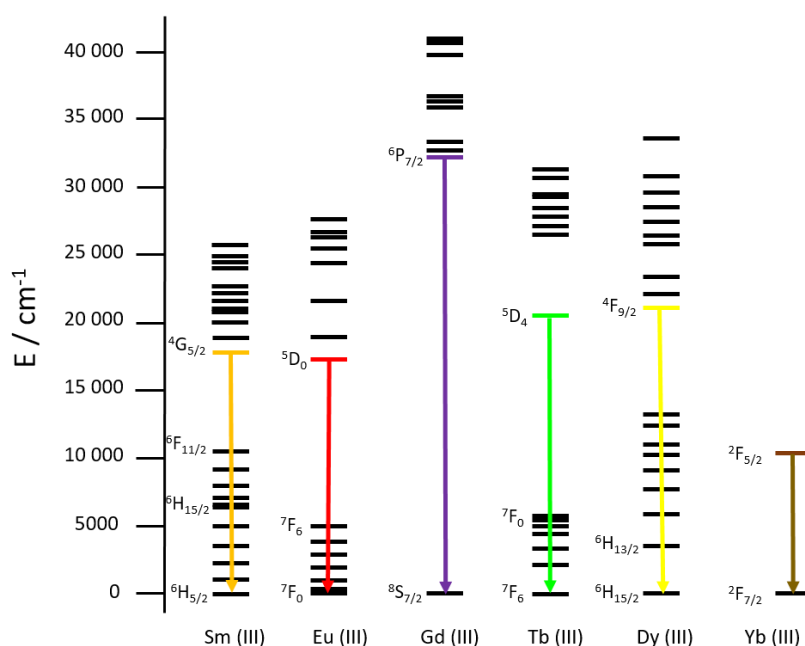


Figure I-2 : Diagramme d'énergie de certains ions Ln^{III} aqueux et leurs principaux niveaux de luminescence. Image adaptée de la référence^[11].

Les cations $\text{Eu}(\text{III})$ et $\text{Tb}(\text{III})$ sont luminescents dans la fenêtre visible : ils émettent dans le rouge ($\lambda_{\text{em}} = 615 \text{ nm}$) pour l'euporium et dans le vert ($\lambda_{\text{em}} = 550 \text{ nm}$) pour le terbium. Ce sont les cations lanthanides les plus employés pour réaliser des sondes luminescentes en bioimagerie. Le $\text{Sm}(\text{III})$ et le $\text{Dy}(\text{III})$ sont aussi utilisés mais dans une moindre mesure avec une émission dans l'orange ($\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$) et dans le jaune-orange ($\lambda_{\text{em}} = 570 \text{ nm}$) respectivement. Les ions tels que l' $\text{Yb}(\text{III})$, le $\text{Nd}(\text{III})$ et l' $\text{Er}(\text{III})$ émettent dans le proche

infrarouge ($\lambda_{em} = 978 \text{ nm}$, 1065 nm et 1509 nm , respectivement). Ils sont le plus largement employés dans le développement de fibres optiques^[12], de lasers^[13] mais suscitent de plus en plus d'intérêt dans le développement de sondes biomédicales^[14]. Leurs longueurs d'onde étant situées en dehors de la fenêtre d'absorption biologique, une exploration plus en profondeur des tissus devient possible. Enfin le gadolinium émet dans l'ultraviolet, sa luminescence interfère donc avec les processus d'absorption ou d'émission des composés organiques et biologiques.

Les niveaux d'énergies des états excités des ions lanthanides sont très peu sensibles au champ de ligand (couche f écrantée). Ils sont donc bien définis et permettent d'observer des bandes d'absorption et d'émission fines et propres à chaque lanthanide (Figure I-3)^[15] (à l'exception du La^{3+} et du Lu^{3+} qui ne sont pas luminescents).

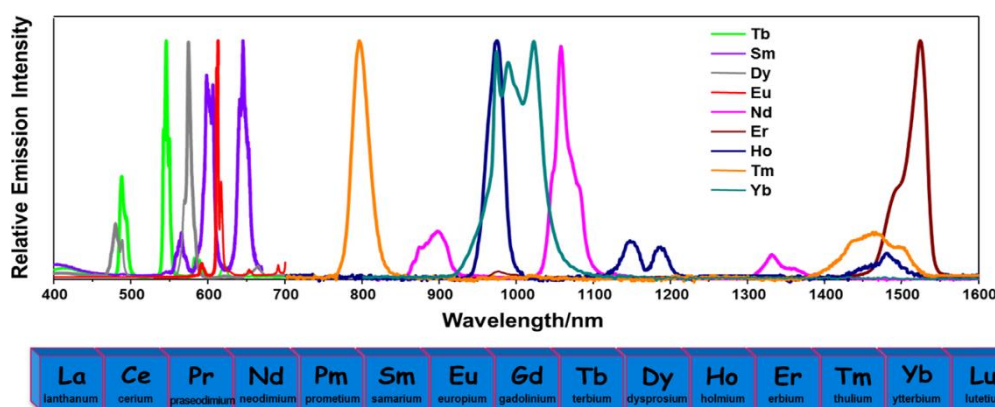


Figure I-3 : Bandes d'émissions normalisées de différents complexes de lanthanides. Image empruntée à la référence^[15].

De plus, le temps de vie de l'état excité peut être long pour certains lanthanides comme l' Eu^{3+} ou le Tb^{3+} (de l'ordre de la milliseconde). Enfin l'excitation directe du lanthanide est peu efficace. Ils doivent donc être excités de manière indirecte via une antenne afin d'observer une luminescence significative.

Ce sont les propriétés magnétiques et spectroscopiques si particulières qui font des lanthanides des éléments de choix dans le développement de sondes pour l'imagerie médicale. Nous allons par la suite nous focaliser sur les applications des lanthanides en tant qu'agents de contraste pour l'IRM.

1.2 IMAGERIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE

L'imagerie par résonance magnétique est une technique de choix lorsqu'on cherche à observer les tissus d'un système biologique vivant. D'une bonne résolution et non invasive, elle permet de ne pas se limiter à la surface du tissu et de pouvoir l'observer en profondeur.

I.2.1 Fonctionnement d'une IRM

L'imagerie par résonance magnétique est une technique permettant d'obtenir une image tridimensionnelle de la répartition de l'eau contenue dans un être vivant de manière non invasive. Elle est basée sur la résonance magnétique nucléaire (RMN) des protons de l'eau des différents tissus de l'organisme, c'est à dire sur la réponse des noyaux lorsqu'ils sont soumis à un champ magnétique externe et à une impulsion électromagnétique.

En l'absence de champ magnétique, les spins des protons des molécules d'eau du patient sont positionnés aléatoirement dans toutes les directions de l'espace. Lorsque le patient est placé dans l'IRM, un champ magnétique B_0 (de 0,5 à 3 T pour les machines utilisées dans le milieu hospitalier) statique est appliqué suivant un axe O_z (Figure I-4, a). Il permet d'aligner les spins des protons des molécules d'eau : c'est l'état d'équilibre.

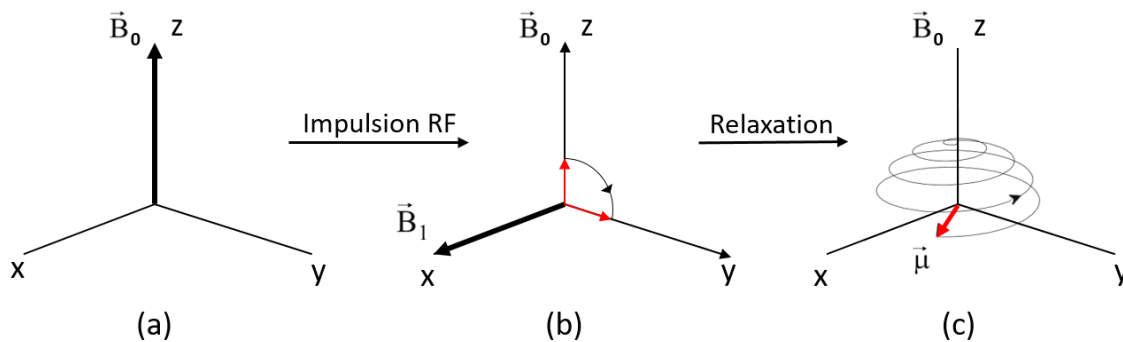


Figure I-4 : Principe de résonance magnétique. A = état d'équilibre où les spins des protons sont alignés. B = Application d'une onde radiofréquence. C = Phénomène de relaxation permettant le retour à l'équilibre.

Un deuxième champ magnétique est appliqué sous la forme d'une impulsion radiofréquence B_1 qui oriente les moments magnétiques dans le plan xOy (Figure I-4, b). Dès lors que cette impulsion se termine, les moments magnétiques vont revenir à leur état d'équilibre : c'est le phénomène de relaxation (Figure I-4, c).

La projection de la magnétisation en fonction du temps sur l'axe y est un signal sinusoïdal décroissant appelé FID (Free Induction Decay, Figure I-5).

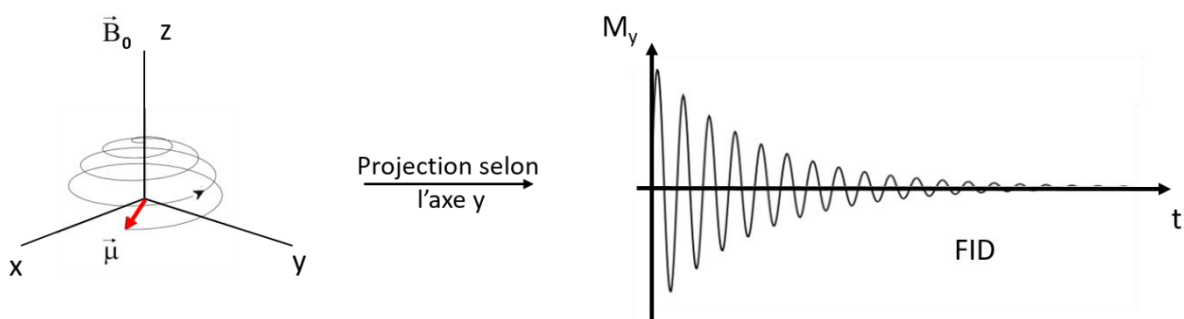


Figure I-5 : Relaxation après excitation et (FID) de l'onde émise lors de la relaxation.

Le retour à l'équilibre se définit par le temps de relaxation longitudinal T_1 et le temps de relaxation transversal T_2 . Le temps de relaxation longitudinal T_1 est caractérisé par un retour à l'équilibre des moments magnétiques M_z selon l'axe z . Il est aussi appelé relaxation spin-réseau car le retour à l'équilibre se fait via des échanges avec le milieu environnant, puis par dissipation thermique selon une loi exponentielle avec une constante de temps T_1 .

$$M_z = M_0 \left(1 - e^{-\frac{t}{T_1}}\right)$$

Le temps de relaxation transversal T_2 est caractérisé par un retour à l'équilibre des moments magnétiques (M_{xy}) selon le plan xy . Il est aussi appelé relaxation spin-spin car le retour à l'équilibre se fait via des interactions entre spins sans transfert d'énergie.

$$M_{xy} = M_0 e^{-\frac{t}{T_2}}$$

A la différence de la RMN, l'IRM nécessite une séquence d'encodage de l'information spatiale de chaque noyau. L'encodage se fait grâce à un gradient de champs magnétique appliqué selon l'axe z , mais aussi x et y .

1.2.2 Résolution et contraste de l'IRM

La résolution définit la distance minimale qui permet de distinguer deux objets. Les longueurs d'ondes radiofréquence sont de l'ordre du mètre alors que la résolution spatiale pour l'IRM est de l'ordre du millimètre. La résolution est dépendante de la façon dont le rapport signal sur bruit est échantillonné et filtré. Elle est donc seulement limitée par la diffusion des protons à travers les tissus et par la non uniformité du champ magnétique local autour du proton^[16].

L'intensité sur une image en IRM est mesurée par élément de volume appelé voxel. Elle est dépendante du temps de relaxation des différents tissus et de leur concentration en eau. Le contraste dépend alors de 3 facteurs : la densité de spin et les temps de relaxation T_1 et T_2 . C'est cette différence de temps de relaxation qui a permis à R. Damadian *et al.* de démontrer qu'il était possible de détecter des tumeurs par IRM car celles-ci présentaient des temps de relaxation différents des tissus sains^[2]. Cependant la sensibilité de la méthode est insuffisante pour la plupart des examens IRM.

Nous pouvons donc dire que l'imagerie par résonance magnétique est une technique aux avantages multiples ; ne nécessitant pas de rayonnement ionisant donc non délétère pour les tissus ; sans limitation sur la pénétration à l'intérieur des tissus et disposant d'une résolution spatiale de l'ordre du millimètre en clinique et du micromètre sur les appareils de recherche.

Malgré ses nombreux avantages, l'IRM manque à la fois de sensibilité et de spécificité. Le contraste induit par certaines pathologies n'est pas suffisant pour établir un diagnostic clair. Pour passer outre ces contraintes, des agents de contraste paramagnétiques ont fait leur

apparition dans les années 80 et sont depuis largement utilisés. Ces agents de contraste sont composés le plus souvent de gadolinium, le plus paramagnétique de tous les lanthanides.

1.2.3 Les agents de contraste

L'imagerie médicale repose sur la différence de comportement que peuvent présenter des tissus mous et des organes exposés à un stimulus comme le champ magnétique lors d'une IRM. Même si la plupart du temps, le seul stimulus suffit à obtenir assez de signal et une image de bonne qualité, il est parfois nécessaire d'administrer des agents dit « de contraste » qui aideront à amplifier le signal recueilli ainsi que la qualité de l'image. Il existe différents types d'agents de contraste que l'on classe en grandes familles en fonction de l'effet qu'ils ont sur leur environnement. Des agents de contraste dit positifs auront pour effet de raccourcir le temps de relaxation T_1 du proton. Les tissus gras apparaîtront plus clair (hypersignal en blanc) alors que les tissus riches en eau apparaîtront plus foncés (hyposignal en noir) sur l'image. D'autres agents de contraste dit négatifs, agiront sur le temps de relaxation T_2 et donneront l'effet inverse sur l'image.

1.2.3.1 Agents de contraste T_1

1.2.3.1.1 Généralités

Les agents de contraste dit T_1 ont une influence sur le temps de relaxation longitudinal T_1 des protons des molécules d'eau. Même si ceux-ci ont aussi un effet sur le T_2 (temps de relaxation transversal) il reste souvent négligeable pour de faibles concentrations. Par diminution du T_1 , ces agents vont provoquer un contraste positif sur les images IRM. Environ 30% des examens IRM se font avec ajout d'un agent de contraste^[17] principalement gadoliné. Ci-dessous sont regroupés les principaux agents de contrastes commerciaux et leurs principales caractéristiques (Tableau I-C)^[18].

Tableau I-C : Caractéristiques des différents agents de contraste utilisés cliniquement.

| Marque | Formule | Structure | Ionicité | Relaxivité r_1 ($mM^{-1}s^{-1}$) | Log K | $\frac{1}{2}$ vie d'élimination (h) |
|------------|--------------|---------------|-------------|---|-------|--|
| Dotarem® | Gd-DOTA | Macrocyclique | Ionique | 4,2 | 25,3 | 1,4-2,0 |
| ProHance® | Gd-HP-DO3A | Macrocyclique | Non-ionique | 4,4 | 23,8 | 1,57 |
| Gadovist® | Gd-BT-DO3A | Macrocyclique | Non-ionique | 5,3 | 20,8 | 1,81 |
| Magnevist® | Gd-DTPA | Linéaire | Ionique | 4,3 | 22,2 | 1,60 |
| Omniscan® | Gd-DTPA-BMA | Linéaire | Non-ionique | 4,6 | 16,8 | 1,30 |
| OptiMARK® | Gd-DTPA-BMEA | Linéaire | Non-ionique | 5,2 | 16,8 | 1,73 |

| | | | | | | |
|--------------------------------|-------------|----------|---------|-----|------|-------|
| <i>MultiHance</i> [®] | Gd-BOPTA | Linéaire | Ionique | 6,7 | 18,4 | 1,2-2 |
| <i>Primovist</i> [®] | Gd-EOB-DTPA | Linéaire | Ionique | 7,3 | 23,5 | 1,0 |
| <i>Vasovist</i> [®] | MS-325 | Linéaire | Ionique | 19 | 23,2 | 18,5 |

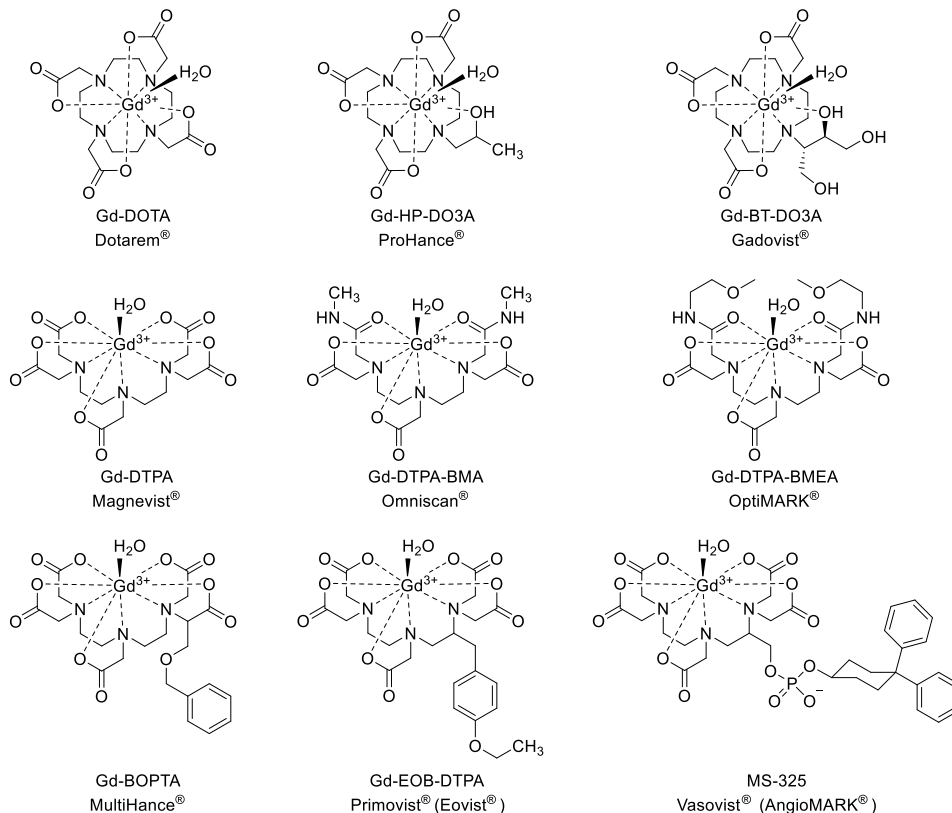


Figure I-6 : Agents de contraste utilisés cliniquement.

Les complexes de gadolinium présentés en Figure I-6 possèdent tous des constantes de stabilité thermodynamique élevées (supérieures à 16,8) et s'éliminent du corps en quelques heures. Ces complexes possèdent une molécule d'eau nécessaire à l'obtention d'un contraste et permettent d'obtenir des valeurs de relaxivité r_1 de l'ordre de 4 à 19 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

I.2.3.1.2 Des ligands bien ajustés

Une des préoccupations majeures pour une application *in vivo* de complexes de lanthanides est la stabilité thermodynamique et l'inertie cinétique. On retrouve deux types de chélateurs forts pour la complexation de lanthanides : les ligands linéaires et les ligands macrocycliques. Parmi les ligands linéaires les plus courants on retrouve des ligands dérivés (Figure I-7) :

- de l'EDTA^[19–21], qui est hexadente avec des log K aux alentours de 15-20,
- du DTPA^[22], partiellement octadente,
- du TTHA^[23], qui est décadente et exclut les molécules d'eau de la première sphère de coordination,
- mais aussi des ligands tripodaux^[24] comme ceux synthétisés dans notre laboratoire et présentant la particularité d'être rédox-actif.

Chapitre 1

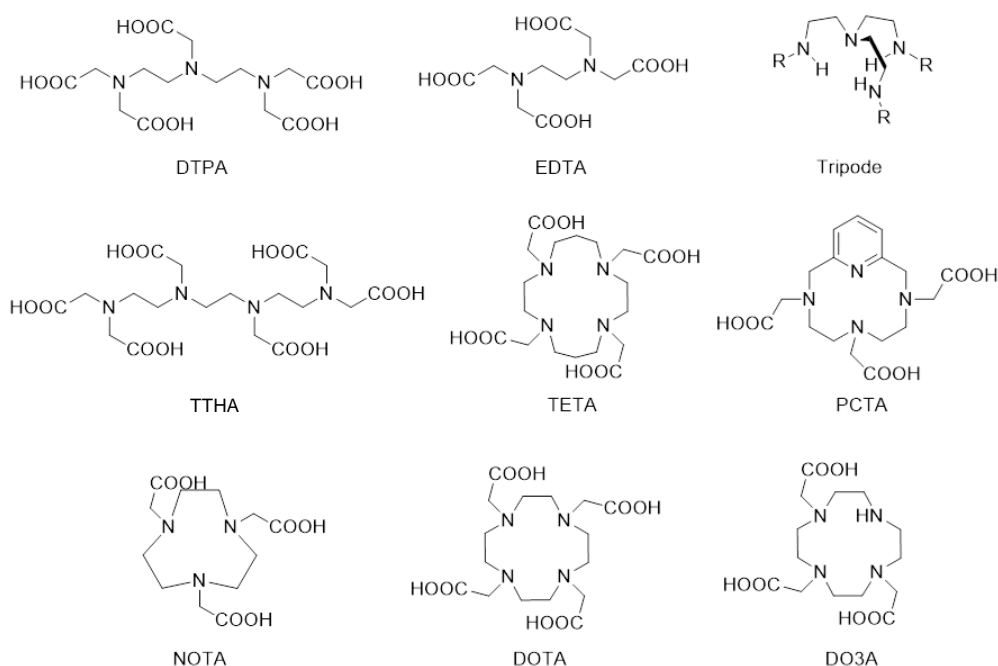


Figure I-7 : Différents types de ligands utilisés de manière courante pour la complexation des lanthanides.

Les ligands macrocycliques se distinguent des ligands linéaires par une inertie cinétique importante (Tableau I-D) du fait d'un fort effet chélate^[25]. Des complexes de gadolinium dérivés de la charpente DOTA sont très utilisés pour l'imagerie médicale.

Tableau I-D : Constantes de stabilité de différents types de complexes de lanthanides.

| M^{3+} | DTPA | EDTA ^[26] | TETA | PCTA | NOTA | DOTA | DO3A |
|-----------|------|----------------------|------|------|------|-------------|----------------------|
| Tb^{3+} | 22,7 | 17,9 | 14,8 | - | - | 24,4 | - |
| Eu^{3+} | 22,4 | 17,4 | 14,0 | 20,3 | 13,9 | 23,5 | 20,7 ^[27] |
| Gd^{3+} | 22,5 | 19,8 | 13,8 | 20,4 | 14,3 | 24,7 | 21,1 |

De nombreuses sondes sont conçues à partir du macrocycle DO3A (Figure I-7) qui permet une fonctionnalisation sur une amine pour ajouter une antenne ou des groupements responsifs. Cela permet de conserver une stabilité importante pour une utilisation *in vivo* tout en ajoutant une fonctionnalité au complexe.

I.2.3.1.3 Relaxivité d'un agent de contraste

La relaxivité « r » définit l'efficacité avec laquelle l'agent de contraste influence les molécules d'eau autour de lui^[28]. Plus précisément il s'agit de l'augmentation de la vitesse de relaxation ($1/T$) des protons des molécules d'eau induite par une millimole par litre d'élément actif. Plus la relaxivité est importante, meilleur sera l'agent de contraste. La théorie générale de la relaxation nucléaire en présence d'un agent de contraste paramagnétique a été développée entre autres par N. Bloembergen et I. Solomon et se décrit par l'équation suivante :

$$R_{i(obs)} = \left(\frac{1}{T_{i(obs)}} \right) = \left(\frac{1}{T_{i(dia)}} \right) + \left(\frac{1}{T_{i(para)}} \right) = \left(\frac{1}{T_{i(dia)}} \right) + r_i C; \quad i = 1 \text{ ou } 2$$

Ici $R_{i(obs)}$ et $1/T_{i(obs)}$ représentent la vitesse de relaxation globale du système exprimée en s^{-1} , $T_{i(dia)}$ représente le temps de relaxation du système avant l'ajout de l'agent de contraste (donc du solvant), C est la concentration de l'AC (en $mmol.L^{-1}$) et r_i est la relaxivité de l'AC en ($s^{-1} mmol^{-1} L$).

Le temps de relaxation total observé est la somme des temps de relaxation diamagnétique et paramagnétique. Cette équation assez générale n'est valide que pour une solution diluée d'agent paramagnétique. On remarque aussi dans la seconde partie de l'équation que le temps de relaxation résultant de la présence de l'agent paramagnétique est linéairement proportionnel à sa concentration. La relaxivité « r » est propre à chaque agent de contraste et plusieurs paramètres influencent cette valeur.

I.2.3.1.4 Paramètres influençant la relaxivité des agents de contraste dit « T_1 »

La relaxivité d'un agent de contraste peut être modulée par plusieurs paramètres qui sont présentés schématiquement sur la Figure I-8. Le temps de relaxation $1/T_1$ peut être défini par l'équation suivante lorsque l'on considère la première sphère de coordination :

$$r_1 = \left(\frac{1}{T_1} \right) = \frac{Cq}{55.5} \left(\frac{1}{T_1 + \tau_m} \right)$$

C étant la concentration de l'AC en $mol.L^{-1}$, q est le nombre de molécule d'eau coordonnée au métal, T_1 est le temps de relaxation longitudinal et τ_m le temps de résidence de la molécule d'eau en 1^{ère} sphère de coordination.

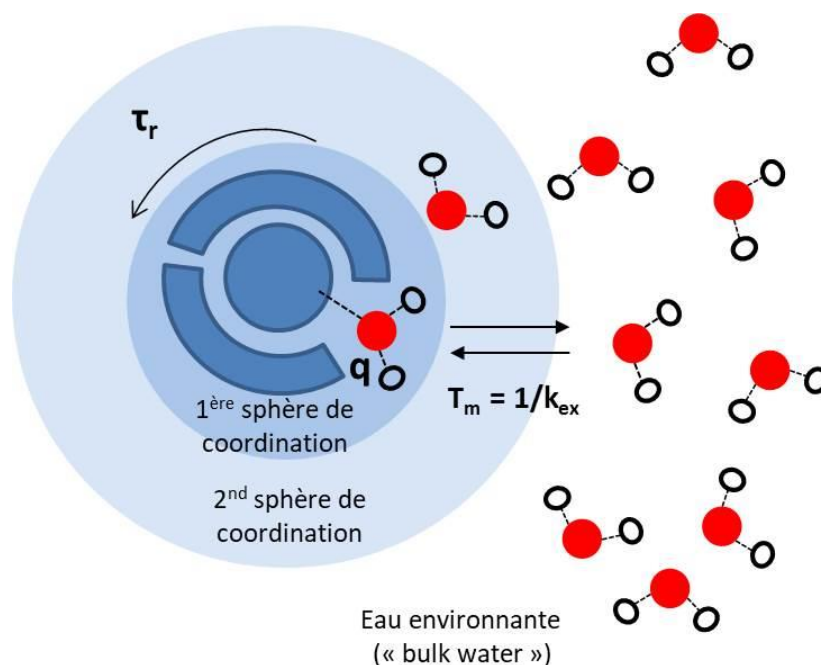


Figure I-8 : Paramètres influençant la relaxivité d'un agent de contraste.

Le premier paramètre influençant la relaxivité (inverse du temps de relaxation paramagnétique) est donc le nombre de molécules d'eau. La relaxivité d'un agent de contraste est proportionnelle au nombre de molécules d'eau « q » coordonnées au centre

Chapitre 1

métallique. La plupart des agents commerciaux ont donc une molécule d'eau dans leur première sphère de coordination. Augmenter ce nombre est un moyen évident d'atteindre des valeurs plus élevées de relaxivité. On peut voir dans le Tableau I-E ci-dessous quelques valeurs de relaxivité de complexes de gadolinium possédant 1, 2 et 8 molécules d'eau^[29]. Passer d'une à 2 molécules d'eau améliore la relaxivité r_1 , mais provoque cependant une diminution de la stabilité thermodynamique du complexe de 4 ordres de grandeurs.

Tableau I-E : Constantes de stabilité et relaxivité de complexes de gadolinium.

| Formule | Nombre de molécules d'eau coordonnées « q » | Relaxivité r_1 ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 20 MHz et 37 °C) | Log K (25 °C) |
|--|---|---|-----------------------|
| [Gd-DOTA] ⁻ | 1 | 3.56 | 24.7 ^[30] |
| [Gd-DO3A] | 2 | 4.80 | 21.0 ^[30] |
| [Gd-DOTAM] ³⁺ | 1 | 2.5 ^[31] | 13.12 ^[32] |
| [Gd(H ₂ O) ₈] ³⁺ | 8 | 10.5 | |

La stabilité cinétique et thermodynamique de complexe bishydraté est souvent considérée comme insuffisante pour une application en médecine humaine. Une deuxième considération à prendre en compte est le fait que deux molécules d'eau *cis*-coordinées peuvent souvent être remplacées par des anions coordinants *in vivo*. Cet effet est illustré par les travaux du groupe de V. Pierre *et al.*^[33] qui ont montré qu'un complexe de Tb(III) pouvait passer de deux à zéro molécule(s) d'eau en présence d'anions coordinants.

Un second paramètre important est la vitesse d'échange « k_{ex} » (exprimée en s^{-1}) des molécules d'eau et/ou protons des molécules. Lorsqu'une molécule d'eau est coordonnée au centre métallique, cette molécule s'échange avec les molécules d'eau environnantes. De plus, les protons de cette molécule d'eau s'échangent eux aussi avec les protons des molécules d'eau environnantes. Ces deux types d'échanges ont lieu indépendamment l'un de l'autre mais à pH neutre les deux événements sont considérés comme ayant des vitesses d'échanges équivalentes^[28]. On retrouve aussi souvent dans la littérature la constante « τ_m » (exprimée en seconde) qui définit le temps de résidence des protons (qui n'est autre que l'inverse de k_{ex}). Ce paramètre est largement influencé par la densité électronique présente à proximité du métal. Plus elle est importante, plus la liaison avec la molécule d'eau sera faible et donc la vitesse d'échange sera rapide. Ainsi dans le cas d'une fonction carboxylate, la charge portée par l'atome d'oxygène va augmenter la densité électronique autour du métal. On se retrouvera dans un système en échange rapide. Dans le cas d'une fonction amide, la charge sur l'atome d'oxygène est plus faible ; c'est un système en échange lent. Dans le cas d'une fonction cétone, la densité électronique est encore plus faible autour du métal ; c'est un système en échange très lent (Figure I-9).

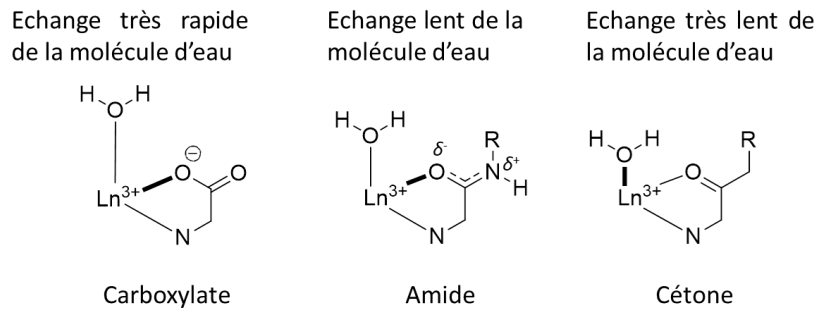


Figure I-9 : Vitesse d'échange de la molécule d'eau en fonction des groupements chimiques du ligand.

Le troisième paramètre important est le temps de corrélation rotationnel « τ_r » qui correspond à la mobilité (rotation) du complexe. Il est influencé par le temps de résidence des molécules d'eau mais aussi par la taille du complexe. On peut prendre pour exemple l'étude menée par P. Caravan *et al.*^[34] sur différents complexes de gadolinium, qui se lient de manière non covalente à une protéine comme la HSA (Human Serum Albumin). En l'absence de protéine, la relaxivité est d'environ $8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 20 MHz (Figure I-10, A). Après l'ajout de 4,5% de HSA, le complexe se lie de manière non covalente à celle-ci, augmentant le nombre de molécules d'eau dans la seconde sphère de coordination mais aussi en augmentant considérablement le temps de rotation corrélationnel. La relaxivité du complexe $[\text{Gd}(\text{MS-325})]^{3-}$ passe alors à près de $50 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 20 MHz (Figure I-10, B).

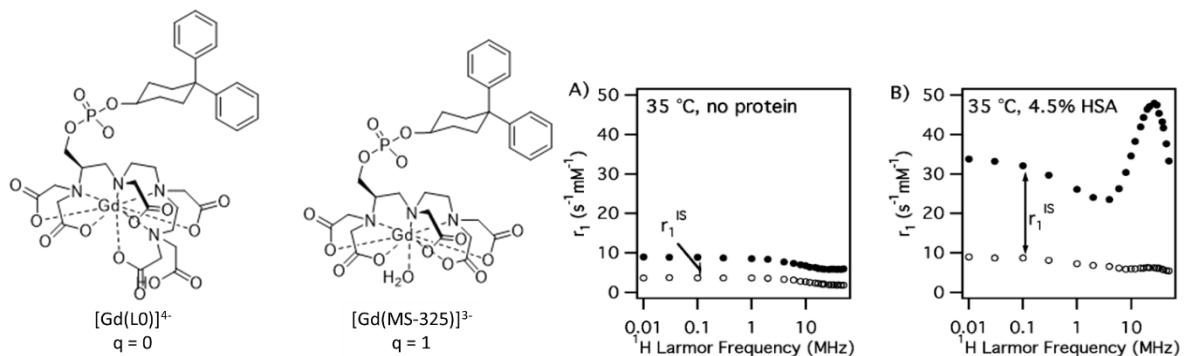


Figure I-10 : Effet de la fixation d'un complexe de gadolinium sur une protéine. Relaxivité des complexes $[\text{Gd}(\text{LO})]^{4-}$ (○) et $[\text{Gd}(\text{MS-325})]^{3-}$ (●). A) en absence de protéine, B) en présence de protéine.

Une nouvelle classe d'agents de contraste a émergé plus récemment : les agents CEST. Contrairement aux agents T_1 , leur action n'est pas directement basée sur la modification du temps de relaxation des molécules d'eau. Ce sont des molécules qui possèdent des hydrogènes chimiquement échangeables (comme les amines $-\text{NH}_2$) avec les hydrogènes des molécules d'eau. En saturant sélectivement un proton échangeable lors d'une IRM, l'intensité du signal d'eau va diminuer et créer un contraste. Cette technique permet de gagner en sélectivité lors d'une expérience d'IRM.

I.3 LA TECHNIQUE CEST

I.3.1 Le principe de la technique CEST

Au début des années 90, R. Balaban *et al.* introduisent le transfert de saturation par échange chimique (CEST pour *Chemical Exchange Saturation Transfer*) comme une nouvelle technique permettant l'amélioration du contraste en IRM^[35]. Cette technique est basée sur la saturation sélective de protons échangeables avec ceux des molécules d'eau, permettant ainsi de créer un contraste négatif en diminuant localement le signal de l'eau. En appliquant une irradiation à la fréquence sélective d'un proton échangeable (**zone B**), ce proton « saturé » va voir l'intensité de son signal diminuer (Figure I-11, gauche (b))^[36]. Par échange chimique avec les protons des molécules d'eau adjacentes (**zone A**), un transfert de saturation va avoir lieu. Après de multiples échanges, l'intensité du signal de l'eau environnante va diminuer (Figure I-11, gauche (c)). En suivant l'intensité du signal de l'eau à toutes les fréquences irradiées (exprimé en ppm), on obtient un spectre Z (M_Z/M_0) qui permet d'obtenir le déplacement chimique du proton échangeable à une température donnée (Figure I-11, droite).

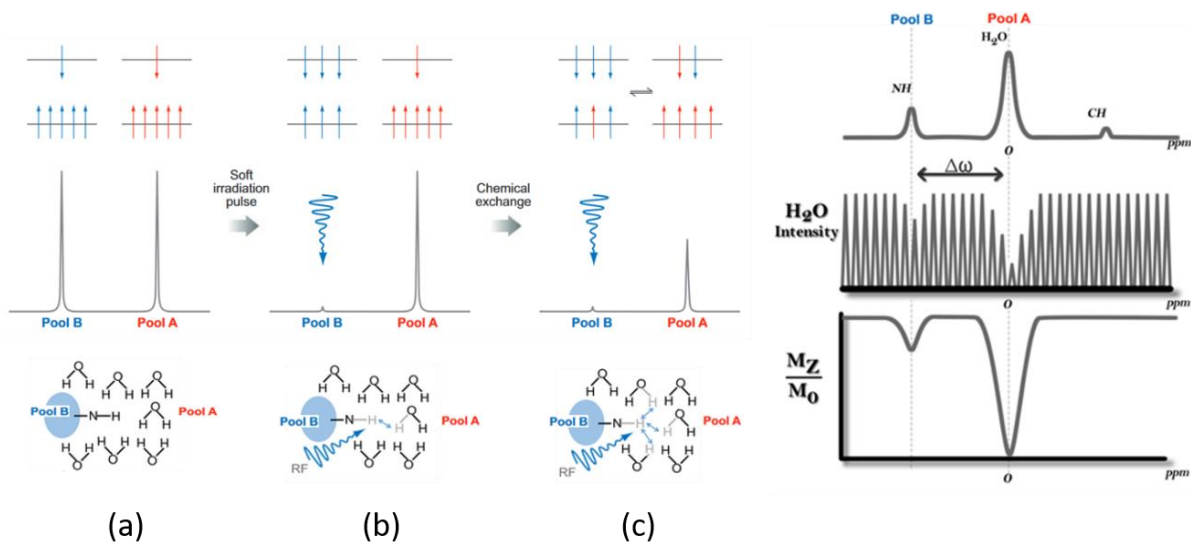


Figure I-11 : Principe du fonctionnement du CEST, image tirée et adaptée des travaux de D. Sherry et M. Woods^[36].

Pour obtenir un contraste en IRM, une irradiation à la fréquence sélective du proton échangeable est appliquée en continue : le transfert de saturation s'opère alors vers de nombreuses molécules d'eau, amplifiant d'autant plus l'effet. Un avantage du CEST est de pouvoir commuter de manière ON/OFF le contraste des images via une pré-saturation par une irradiation radiofréquence dite « douce ». Cependant pour qu'un signal CEST puisse être observé, le système doit être en échange chimique.

I.3.1.1 Les conditions d'échanges chimiques

Pour observer un signal CEST, le système doit être en échange assez lent pour que le transfert de saturation soit complet, c'est la condition de non-coalescence décrite dans l'équation 1.1. Sur un spectre RMN classique cette condition revient à avoir deux signaux distincts pour pouvoir n'en exciter qu'un seul.

$$\text{Eq. 1.1} \quad k_{Ex}^{CEST} \leq \Delta\omega \quad \Delta\omega : \text{différence de résonance entre le proton échangeable et l'eau en } s^{-1}$$

Cependant l'échange doit être assez rapide pour transférer la saturation à un maximum de molécules d'eau avant qu'elles ne relaxent en suivant l'équation 1.2. On cherche donc à vérifier l'équation suivante pour un système en échange lent :

$$\text{Eq. 1.2} \quad k_{Ex}^{Eau} \geq 1 / T_1$$

Ces deux vitesses d'échanges sont reliées entre elles par l'équation 1.3 qui suit :

$$\text{Eq. 1.3} \quad k_{Ex}^{CEST} = k_{Ex}^{Eau} \frac{2 [Eau]}{n [AC]} = k_{Ex}^{Eau} \frac{111,2}{n [AC]}$$

$[Eau] = 55.6 \text{ mol.L}^{-1}$: la concentration molaire de l'eau, n : le nombre de protons équivalents responsables de l'effet CEST, $[AC]$: la concentration molaire de l'agent de contraste en mol.L^{-1}

L'influence de la vitesse d'échange sur le spectre CEST est illustrée dans la Figure I-12^[28]. On remarque que plus la vitesse d'échange augmente, plus l'effet CEST est important. Cependant au-delà d'une certaine valeur, l'effet CEST diminue et finit par s'éteindre, ce qui correspond à la coalescence du signal de l'eau et du proton échangeable.

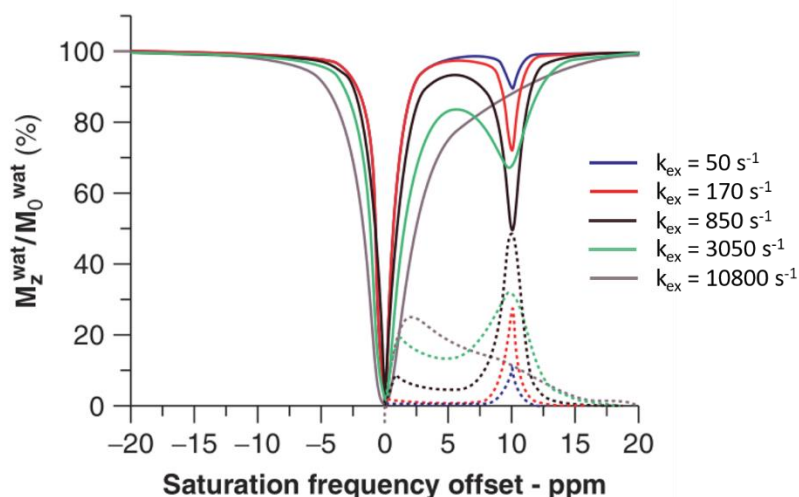


Figure I-12 : Influence de la vitesse d'échange sur le signal CEST. D'après la référence^[28].

Dans le cas où l'on utilise un agent diamagnétique, $\Delta\omega$ est faible (généralement $<5 \text{ ppm}$ soit 315 Hz à $1,5 \text{ T}$ ou 630 Hz à 3 T). Cela signifie que l'échange doit être inférieur à 1980 s^{-1} à $1,5 \text{ T}$ ou 3960 s^{-1} à 3 T si on veut observer un signal CEST. De plus, si $\Delta\omega$ est faible, la fréquence

de pré-saturation appliquée au système sera proche de celle de l'eau et entrainera une saturation directe et partielle de l'eau non désirée (résonance « off »).

Cette technique possède des avantages multiples. Le signal CEST lors d'une IRM peut être activé ou désactivé à souhait en appliquant simplement une irradiation particulière. On peut donc à la fois réaliser une IRM et avoir l'image CEST. Si l'on dispose d'un agent de contraste possédant 2 signaux CEST ou plus, il est alors possible de sélectionner la fréquence d'irradiation que l'on désire et disposer ainsi d'une sonde très spécifique comme le montre par exemple les travaux de A. Thorarinsdottir *et al.*^[37].

Cependant cette technique possède aussi des inconvénients. En effet, la vitesse d'échange des protons échangeables est fonction de nombreux facteurs tels que la température, le pH etc... De plus si $\Delta\omega$ est trop faible, le phénomène de résonance « off » peut être gênant pour l'acquisition d'un signal « propre ». Il existe une technique capable d'augmenter l'écart entre les 2 signaux d'intérêt et donc répondre à la seconde problématique qui est l'ajout d'une entité paramagnétique à l'agent CEST : le ParaCEST.

1.3.1.2 Le ParaCEST

L'ajout d'une entité paramagnétique « ParaCEST » a pour effet d'éloigner la fréquence de résonance des protons échangeables de celle de l'eau environnante ($\Delta\omega$ devient donc plus important) et ainsi limiter le phénomène de résonance « off ». Cela permet aussi d'élargir la gamme de vitesse d'échange accessible pour l'observation du signal CEST puisqu'en augmentant $\Delta\omega$, les vitesses d'échanges des protons peuvent atteindre des valeurs plus importantes (équation 1.1). Les lanthanides ou d'autres métaux de transitions comme le manganèse ou le cobalt constituent des métaux paramagnétiques capables d'engendrer une activité ParaCEST. Les électrons non appariés de ces espèces génèrent de puissants champs magnétiques locaux. Les couplages hyperfins entre les spins des protons échangeables et les électrons non appariés peuvent provoquer un blindage ou un déblindage important et donc un déplacement conséquent de leur fréquence de résonance.

Le déplacement chimique d'un noyau situé à proximité d'un lanthanide va être la somme de la contribution diamagnétique du noyau (due à son environnement chimique en l'absence du lanthanide) et d'une contribution paramagnétique provoquée par la présence du lanthanide.

Soit l'équation suivante : $\delta = \delta^{dia} + \delta^{para}$

Le déplacement chimique paramagnétique (δ^{para}) est la somme de deux contributions différentes : une première de contact qui passe à travers les liaisons δ^C et une seconde dit de pseudo-contact qui passe à travers l'espace δ^{PC} .

Soit l'équation : $\delta^{para} = \delta^C + \delta^{PC}$

Ces deux paramètres dépendent principalement de facteurs géométriques liés à l'anisotropie magnétique des lanthanides. Ces anisotropies ont été modélisées par B. Bleaney *et al.*^[38] dans les années 70 et regroupées dans le Tableau I-F. Ces valeurs

permettent d'avoir une idée de la capacité des lanthanides à induire un déplacement chimique^[39].

Tableau I-F : Anisotropie modélisée par Bleaney, C_J est la constante de Bleaney, O : oblate, P : prolate, I : isotrope.

| Ln^{3+} | Ce^{3+} | Pr^{3+} | Nd^{3+} | Pm^{3+} | Sm^{3+} | Eu^{3+} | Gd^{3+} | Tb^{3+} | Dy^{3+} | Ho^{3+} | Er^{3+} | Tm^{3+} | Yb^{3+} |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Configuration électronique de l'ion Ln^{3+} | $4f^1$ | $4f^2$ | $4f^3$ | $4f^4$ | $4f^5$ | $4f^6$ | $4f^7$ | $4f^8$ | $4f^9$ | $4f^{10}$ | $4f^{11}$ | $4f^{12}$ | $4f^{13}$ |
| Electrons non appariés | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 6 | 5 | 4 | 3 | 2 | 1 |
| C_J | -6,3 | -11,0 | -4,2 | 2,0 | -0,7 | 4,0 | 0,0 | -86 | -100 | -39 | 33 | 53 | 22 |
| Anisotropie | O | O | O | P | P | Dia | I | O | O | O | P | P | P |

1.3.1.3 Les paramètres d'acquisitions

L'obtention du spectre CEST dépend de plusieurs paramètres :

- le champ magnétique du spectromètre utilisé B_0 ,
- le temps D_1 d'application de l'impulsion radiofréquence B_1 ,
- le nombre de protons échangeables de l'échantillon en lui-même,
- et leur vitesse d'échange.

Ces différents facteurs ont été étudiés par S. Aime *et al.*^[28]. Le champ magnétique B_0 est propre au spectromètre utilisé. On peut voir sur la Figure I-13 que l'augmentation du champ magnétique B_0 a un effet bénéfique sur la détection de signal CEST pour de faibles valeurs de $\Delta\omega$. C'est d'ailleurs un paramètre important à prendre en compte lorsqu'on transpose des résultats d'un agent de contraste d'une machine clinique à une autre.

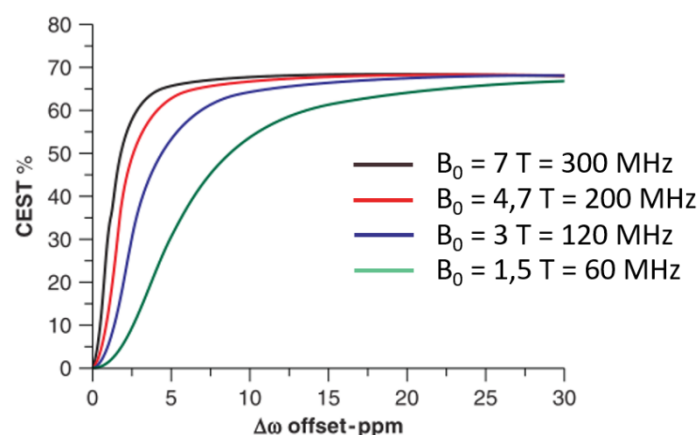


Figure I-13 : Influence du champ magnétique B_0 sur l'effet CEST en fonction de la différence de fréquence de résonance.

Si on considère un signal CEST à 10 ppm et que l'on accroît l'intensité du champ B_1 de 1 à 6 μT , on observe une augmentation de l'intensité du signal de 20% à près de 70% (Figure I-14) avec un maximum qui dépend de la vitesse d'échange. Un décalage du maximum d'effet CEST est observé puisqu'il passe de $300 s^{-1}$ à 1 μT à environ $2000 s^{-1}$ à 6 μT . Le recouvrement

Chapitre 1

pour des faibles vitesses d'échanges signifie que la variation de champ n'affecte que peu les échanges lents.

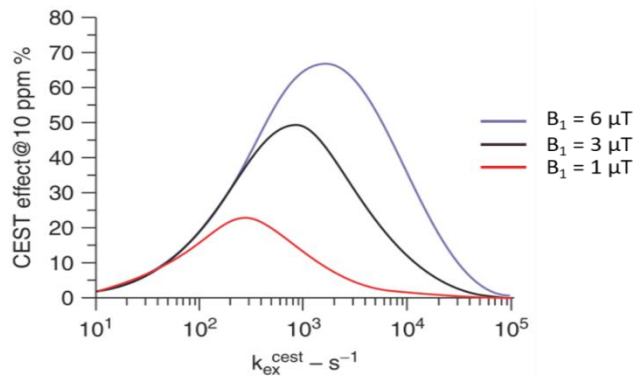


Figure I-14 : Influence de la puissance de l'irradiation B_2 appliquée.

Le dernier facteur à prendre en compte est le temps d'application D_1 du champ B_1 (c'est-à-dire le temps d'irradiation avec l'onde radiofréquence). L'intensité du signal CEST augmente lorsque le temps de saturation D_1 augmente, jusqu'à l'obtention d'un plateau (Figure I-15). Ce phénomène correspond au temps nécessaire pour atteindre le régime stationnaire lié au fait que la molécule transfère sa saturation aux protons adjacents. Pour une molécule possédant un temps de relaxation des protons élevé, il faudra lui laisser plus de temps pour transférer sa saturation en augmentant le temps D_1 **(a)**. Une molécule possédant un échange rapide pourra atteindre ce régime stationnaire plus tôt **(b)**.

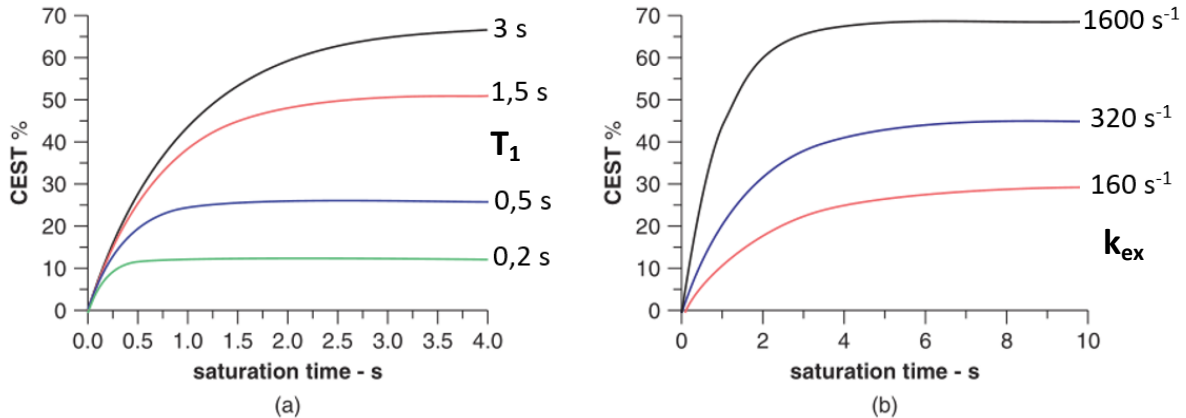


Figure I-15 : Influence du temps de saturation D_1 sur l'effet CEST en fonction du temps de relaxation T_1 (gauche) et de la vitesse d'échange k_{ex} (droite).

Ces facteurs influençant le signal CEST peuvent être optimisés pour recueillir un maximum de signal et utilisés pour étudier des mécanismes biologiques. On retrouve dans la littérature de très nombreuses sondes d'intérêt physiologique, notamment des sondes de pH, de température, de métabolites ou encore d'activité rédox.

I.3.2 Applications de sondes CEST

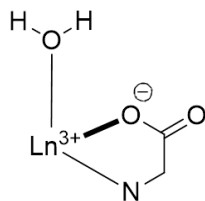
Le contraste obtenu par des agents CEST étant basé sur le transfert de saturation par des protons échangeables, il est directement relié à l'environnement autour de l'agent de

contraste. Des facteurs tels que le pH, la température, les métabolites ou l'état rédox des cellules peuvent influencer la vitesse d'échange des protons et par conséquent le contraste.

1.3.2.1 Senseurs de pH

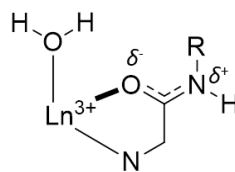
Il existe de nombreuses sondes pouvant détecter des variations de pH dans les cellules. Cependant pour une application médicale, la réponse optimale doit se trouver dans la gamme des pH physiologiques (c'est-à-dire environ pH = 7,4) et doit inclure une gamme de pH plus acides (pH \approx 6-7) pour des cellules pathologiques. Les complexes utilisés comme agents de contraste ParaCEST contiennent très souvent des fonctions amides, permettant un échange lent de la molécule d'eau (par rapport aux carboxylates). La charge partielle négative est moins importante que dans le cas d'un carboxylate ; la molécule d'eau se trouve donc plus proche du métal. La vitesse d'échange des protons de la molécule d'eau est par conséquent ralentie (Figure I-9).

Echange très rapide
de la molécule d'eau



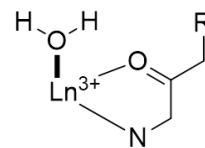
Carboxylate

Echange lent de la
molécule d'eau



Amide

Echange très lent de
la molécule d'eau



Cétone

Figure I-9 : Influence des fonctions chélatantes du lanthanide sur la vitesse d'échange de la molécule d'eau.

La vitesse d'échange des protons d'une fonction amide est pH-dépendante^[40]. R. Hudson *et al.* ont mis au point des sondes pH en utilisant des complexes de lanthanides basés sur des charpente DOTAM incorporant des anilines para-substitués par des groupements méthoxys^[41]. Le complexe de thulium présente un signal CEST à -83 ppm avec un effet optimal pour un pH compris entre 7 et 7,5.

Dans les travaux de A. Thorarinsdottir *et al.*^[42], la dépendance inverse au pH de l'effet CEST d'une fonction amine et d'une fonction amide est utilisée pour déterminer le pH (Figure I-16). Le complexe [2-Co(nitrophenol)] est un dinucléaire de cobalt (II). Le signal CEST provenant des protons des fonctions amides (en vert sur le schéma) augmente lorsque le pH augmente. A l'inverse, le signal CEST provenant des protons de la fonction amine diminue (ammonium en violet) lorsque le pH augmente. Cette dépendance opposée permet de réaliser une courbe de calibration et de pouvoir mesurer le pH en fonction du ratio des deux signaux CEST obtenus.

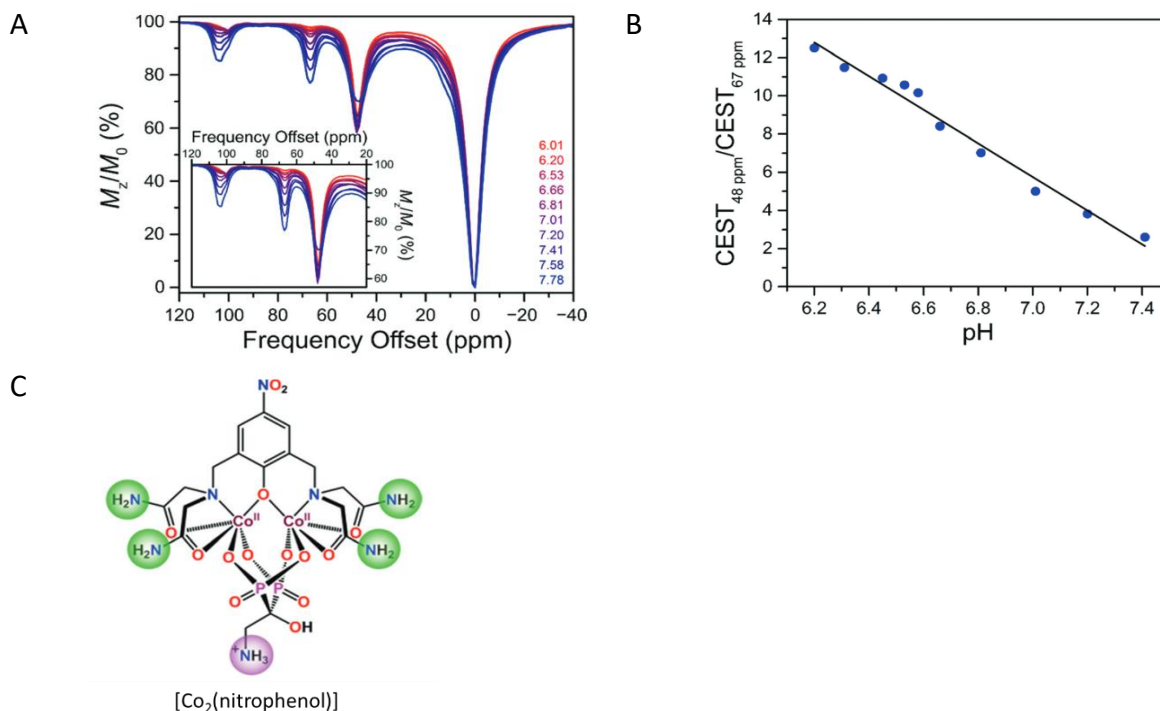


Figure I-16 : Agent de contraste ParaCEST pour la mesure du pH. A = Spectre CEST obtenu en fonction du pH. B = Ratio des intensités obtenues en CEST après une irradiation à 48 et 67 ppm pour une solution aqueuse tamponnée à 9 mM en fonction du pH. C = Complexe [2-Co(nitrophenol)].

1.3.2.2 Senseurs de température

La température est aussi un facteur qui influe sur la vitesse d'échange des protons des fonctions amides. Il est ainsi possible de créer des sondes pour la détection de variations de température. C'est avec des complexes macrocycliques tétraamides et des métaux de transitions (Fe, Co et Ni) que J. Morrow *et al.*^[43] ont pu étudier les effets de la température (Figure I-17).

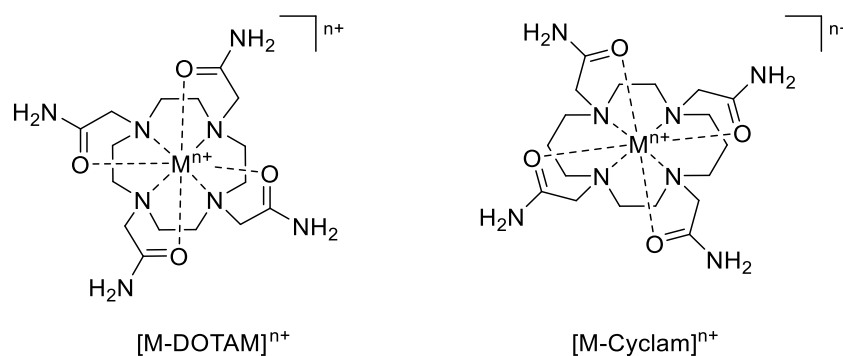


Figure I-17 : Complexes [M-DOTAM]ⁿ⁺ et [M-Cyclam]ⁿ⁺^[43].

Le déplacement chimique du signal obtenu en CEST évolue linéairement en fonction de la température, entre 25 et 50°C. C'est ainsi qu'une courbe de calibration peut être établie et on peut en extraire des valeurs de température.

Un second exemple de sonde répondant à la température est le complexe [Yb-HPDO3A] étudié par S. Aime *et al.*^[40]. Deux signaux CEST à 71 et 99 ppm sont observés et

correspondent au groupement OH dans les deux isomères présents en solution. Entre 17°C et 37°C, le déplacement chimique des protons actifs en CEST évolue de 99 à 90 ppm pour un isomère et de 72 à 65 ppm pour le deuxième isomère (Figure I-18).

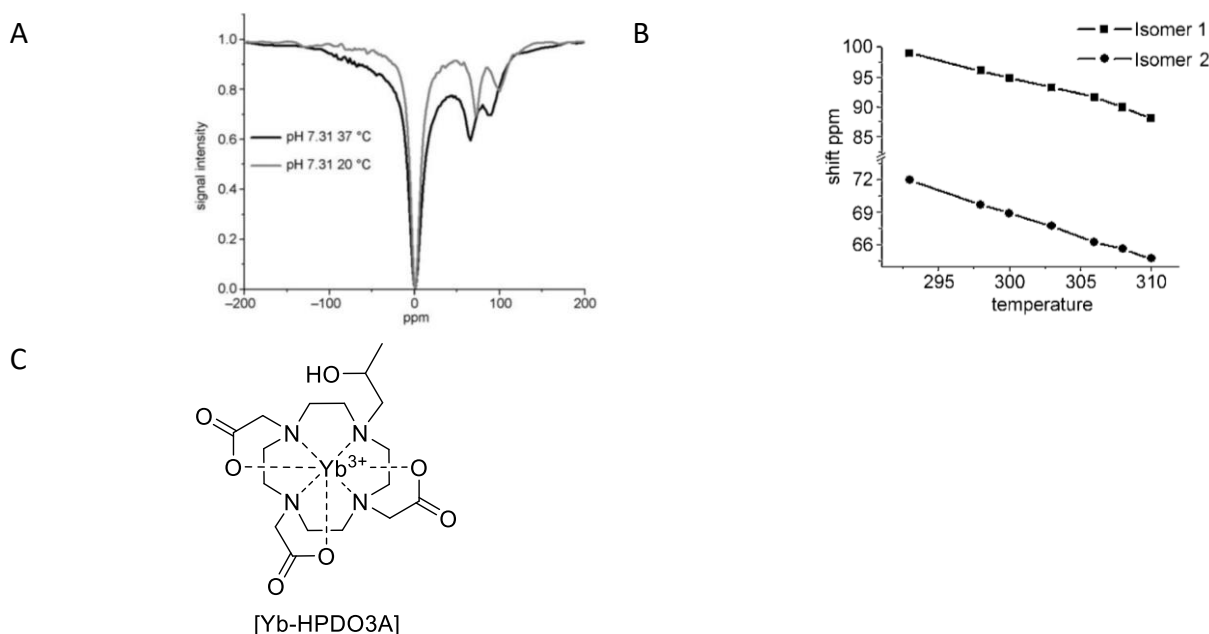


Figure I-18 : Effet de la température sur le spectre CEST du complexe [Yb-HPDO3A]. A = Spectre CEST du complexe [Yb-HPDO3A] à 20°C et 37°C (7 T, 20 mm, pH 7.3, puissance d'irradiation : 24 mT), B = Dépendance du déplacement chimique du proton de l'alcool des deux isomères en fonction de la température. C = complexe [Yb-HPDO3A].

1.3.2.3 Senseurs de métabolites

Certains métabolites présents *in vivo* à des concentrations relativement élevées (supérieures à 1 mM) sont de bons candidats pour être détectés par des agents de contraste CEST et IRM^[44]. De nombreux métabolites peuvent être détectés par des agents ParaCEST comme le glucose, le lactate ou encore le monoxyde d'azote. D. Sherry *et al.* ont mis au point le complexe [EuDOTAM-2M-2PB]³⁺ portant deux unités acide phénylboronique^[45]. Il est capable de lier du glucose avec un rapport 1:1, provoquant une diminution drastique de la vitesse d'échange de la molécule d'eau lié à l'euprium et causant une diminution de 38% de l'intensité du signal CEST à 50 ppm (Figure I-19). Bien que le mécanisme responsable de la diminution de la vitesse d'échange de la molécule d'eau ne soit pas entièrement établi, les auteurs rapportent qu'au moins deux contributions entrent en jeu. D'une part le glucose forme un « chapeau » directement sur la molécule d'eau et bloque physiquement la dissociation de la molécule d'eau du centre métallique. D'autre part, le pont glucose entre les deux unités d'acide phénylboronique ralentit la dynamique moléculaire du système et l'interconversion des deux isomères SAP (conformation anti prismatique carré) et TSAP (conformation anti prismatique carré distordu) présents en solution. Un second exemple concerne le complexe [Yb(MBDO3AM)]³⁺ sensible au lactate^[46] (Figure I-19). L'interaction avec ce métabolite provoque un déplacement chimique du signal CEST de -29,1 ppm à -15,5 ppm. La haute affinité de ce complexe pour le lactate ainsi que son échange lent suggèrent

que le proton de la fonction amide peut être irradié sélectivement et rend donc possible sa détection.

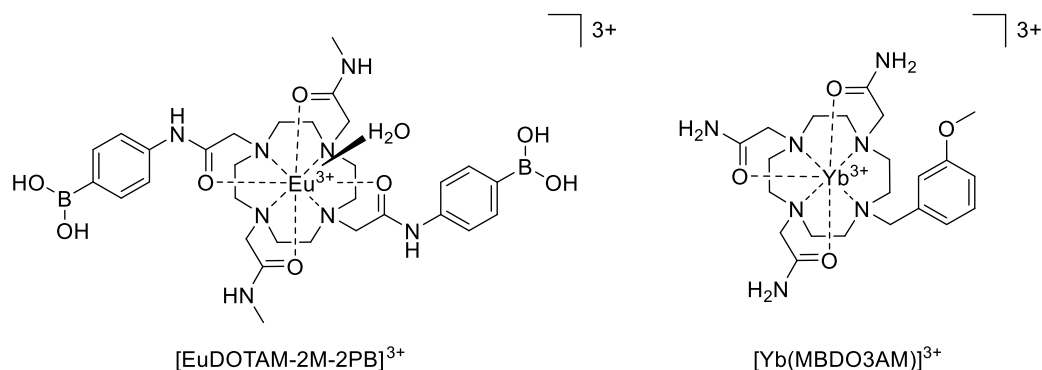


Figure I-19 : Complexe d'euprium $[Eu(DOTAM-2M-2PB)]^{3+}$ utilisé comme sonde de glucose (gauche). Complexe d'ytterbium $[Yb(MBDO3AM)]^{3+}$ utilisé comme sonde de lactate (droite).

I.3.2.4 Senseurs de l'état redox

Afin de détecter une activité redox, le complexe doit être capable de changer son état d'oxydation. L'activité rédox peut être basée sur le métal ou sur le ligand^[47,48] (Figure I-20).

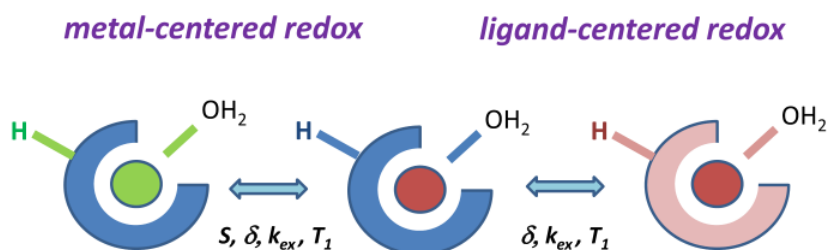


Figure I-20 : La détection de l'état redox par deux voies différentes.

Pour les sondes basées sur un changement de degré d'oxydation du métal, on peut retrouver des complexes d'euprium (II/III)^[49], de manganèse (II/III)^[50,51], de cuivre(I/II), de cobalt (II/III)^[52] et de fer (II/III).

J. Morrow *et al.* ont développé le complexe de cobalt $[Co-TCN]^{2+}$ (Figure I-21). Ce complexe est paramagnétique et donc actif en ParaCEST avec un proton échangeable de pyrazole situé à 135 ppm. Après oxydation du Co(II) en Co(III) par l'oxygène, le complexe $[Co-TCN]^{3+}$ devient diamagnétique et donc inactif en ParaCEST. Ce phénomène est réversible puisqu'en partant du complexe $[Co-TCN]^{3+}$ et après ajout d'un réducteur, le complexe $[Co-TCN]^{2+}$ redevient actif.

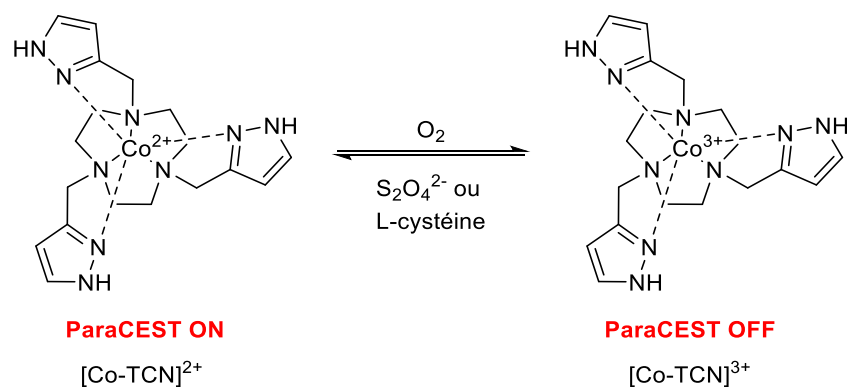


Figure I-21 : Complexe $[\text{Co-TCN}]^{2+}$ actif en ParaCEST.

A l'exception de certains complexes d'euprium, les lanthanides sont connus pour adopter exclusivement leur degré d'oxydation (+III) en condition physiologique. Un moyen de sonder l'état rédox du milieu peut donc être d'utiliser un ligand rédox non-innocent comme sonde rédox. Peu de composés opérant de la sorte ont été développés. On retrouve sur la Figure I-22, quelques exemples de complexes d'euprium sensibles à l'état rédox de leur environnement. Différentes réactions peuvent donner lieu à un switch ON/OFF en CEST. Dans le complexe $[\text{EuDO3AM-nitro}]^{3+}$, un groupement nitro (NO_2) présentant une activité CEST se réduit de manière irréversible en fonction amine (NH_2)^[53]. La densité électronique à proximité du métal et la vitesse d'échange de la molécule d'eau évoluent et le signal diminue. Cependant le potentiel de réduction reste assez loin de la fenêtre biologique ce qui limite son utilisation *in vivo* (Figure I-22, A). Les complexes d'euprium $[\text{EuDOTAM}-(\text{N-Qui})(\text{CF}_3\text{SO}_3)]^{3+}$ et $[\text{EuDOTAM}-(\text{N-Qui})_2(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2]^{3+}$ présentés sur la Figure I-22 (B et C), contiennent des unités N-méthylquinolinium, qui jouent le rôle de groupements rédox-actifs. Après réduction en unité N-méthylquinoléine par le NADH, une augmentation du signal CEST est observée^[54]. Enfin le complexe d'euprium $[\text{EuDOTAM}-(\text{TEMPO-ACT})_2]^+$ présenté sur la Figure I-22 (D), contenant deux unités nitroxydes stables a été développé par D. Sherry *et al.* Après réduction des unités nitroxydes en hydroxylamines, une augmentation de 20% du signal CEST est observée^[55]. Les nitroxydes, dont l'effet était de diminuer le temps de relaxation T_1 deviennent alors des espèces diamagnétiques qui n'influencent plus le temps de relaxation T_1 .

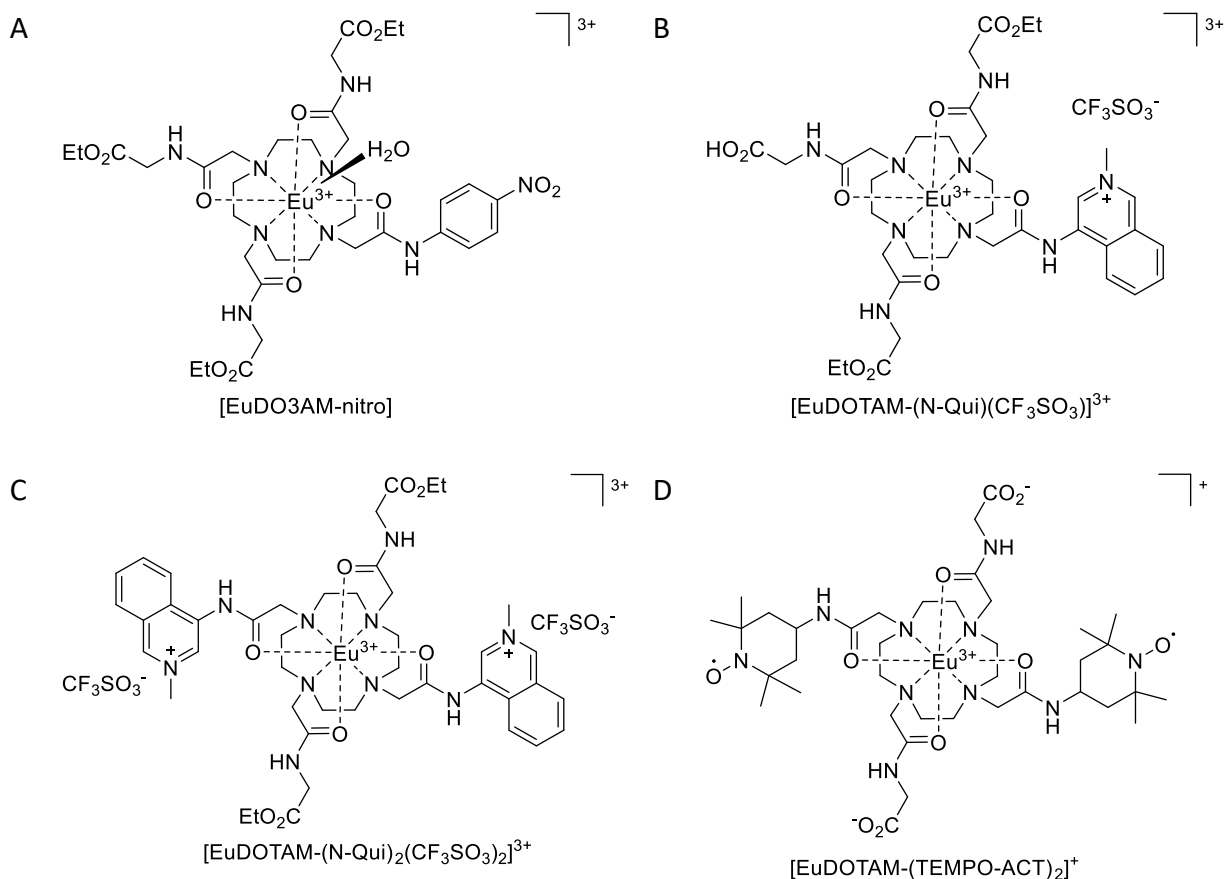


Figure I-22 : Exemples de complexes dont l'activité rédox est basée sur le ligand.

Les complexes de lanthanides sont donc largement employés en tant que senseurs d'évènements biologiques tels que le pH, la température, la détection de métabolites ou l'activité rédox grâce à leurs propriétés magnétiques. Bien que l'IRM soit une technique de choix pour l'observation de processus *in vivo* et pour obtenir des informations anatomiques des tissus profonds, elle peut manquer de sensibilité. L'imagerie optique est une technique d'imagerie complémentaire qui possède une sensibilité extraordinaire avec cependant une capacité moindre à pénétrer les tissus. Les complexes de lanthanides possèdent des propriétés photophysiques particulières qui les prédisposent à l'imagerie optique.

1.4 LA LUMINESCENCE

L'imagerie optique est une technique possédant une très haute sensibilité, une bonne résolution microscopique et est surtout peu coûteuse. Elle souffre cependant d'une faible pénétration au sein des tissus et est donc limitée à une observation de surface ou *in vitro*^[56] (Tableau I-G).

Tableau I-G : Caractéristiques de différentes techniques d'imagerie.

| Technique d'imagerie | Résolution spatiale | Sensibilité | Avantages | Inconvénients |
|-----------------------|---------------------|--------------------------|---|--|
| Imagerie optique (IO) | 1-2 mm | 10^{-9} - 10^{-11} M | Sensibilité, simple et peu coûteux | Résolution spatiale, Applications clinique limitée |
| IRM-ParaCEST | 100 μ m | 10^{-3} - 10^{-6} M | Résolution spatiale, Contraste, Applications clinique | Sensibilité |

I.4.1 Définition

La luminescence est le terme désignant l'émission de lumière résultant de l'excitation d'une substance et mettant en jeu des états d'excitations électroniques^[57]. Lorsqu'un composé qui se trouve à son état fondamental singulet S_0 absorbe un photon, il passe à un état dit « excité » qui a une énergie supérieure (S_1 , S_2 , etc) si le photon a l'énergie correspondant à la différence $E = E_{S_1} - E_{S_0}$ (ou $E_{S_2} - E_{S_0}$...). La molécule dans cet état instable va retourner à son état fondamental S_0 en se désexcitant soit via des processus vibrationnels (10^{-12} - 10^{-14} s), soit par l'émission d'un photon : c'est ce que l'on nomme la luminescence. En fonction des états électroniques impliqués et des temps caractéristiques, on distingue deux grandes catégories de luminescence : la fluorescence et la phosphorescence.

- La fluorescence : l'état d'excitation est « singulet » (S_1 , Figure I-23), un électron est situé dans l'orbitale excitée et un second électron est situé dans l'orbitale à son état fondamental, non excité (S_0 , Figure I-23). Le retour à l'état fondamental est autorisé et survient rapidement par émission d'un photon. Le temps de vie typique d'une émission par fluorescence est de l'ordre de la dizaine de nanosecondes.
- La phosphorescence : c'est une émission de lumière depuis l'état triplet (T_1 , Figure I-23). La transition est théoriquement interdite (mais favorisée par la présence d'atomes lourds comme les lanthanides) et il en découle un temps de vie plus long allant de la milliseconde à la seconde.

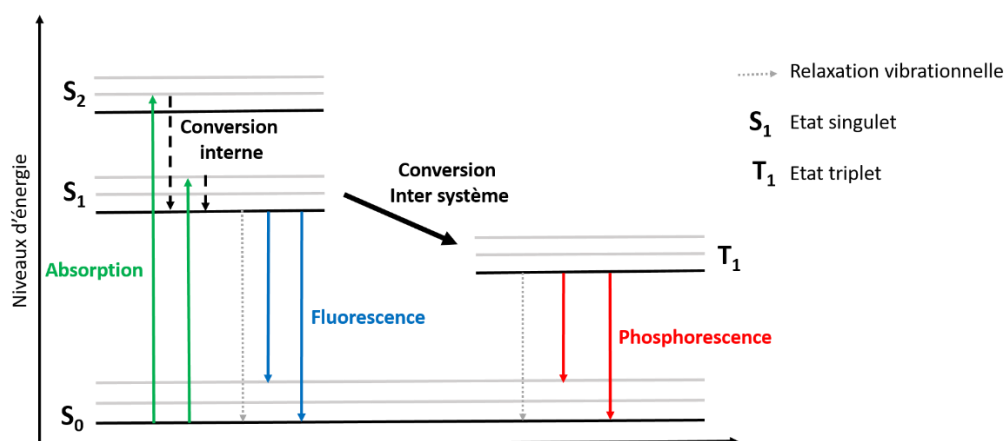


Figure I-23 : Diagramme de Perrin-Jablonski simplifié.

La distinction entre fluorescence et phosphorescence n'est pas toujours claire et certaines transitions (comme les transferts de charge du métal au ligand ou du ligand au métal) peuvent montrer des états mélangés singulet-triplet. Comme cela a été démontré pour le complexe $[\text{Eu}(\text{DPPE})_3][\text{NO}_3]_3$ les processus de transfert d'énergie passent à la fois par les états singulet et triplet du ligand (Figure I-24)^[58]. De plus le processus de transfert d'électron peut mener à une séparation de charge ($\text{L}^+ \text{Eu}^{2+}$) et apparait comme le chemin de désexcitation le plus efficace (PET : photoinduced electron transfer) de l'état $^1\text{S}_1$ du ligand, expliquant le faible rendement quantique de luminescence de l'euporium.

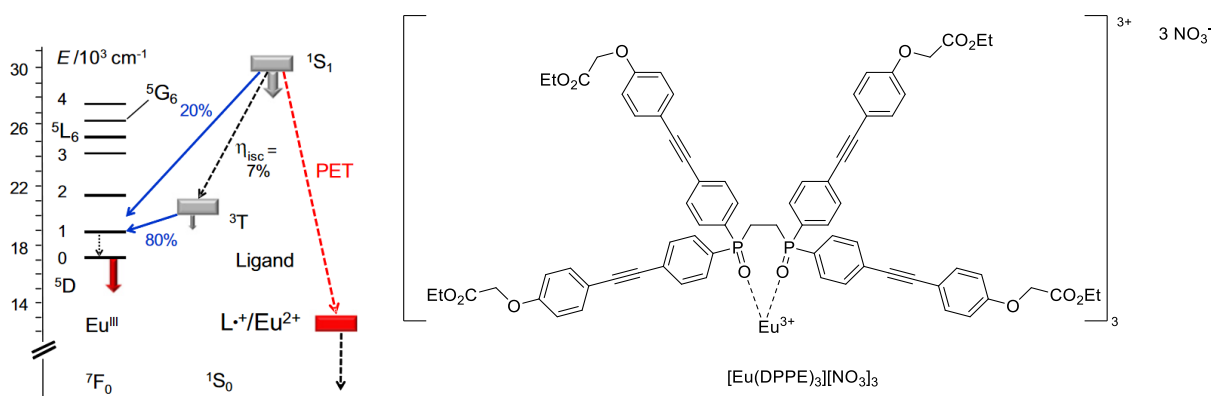


Figure I-24 : Diagramme schématique (gauche) des niveaux d'énergie montrant le détail des différents chemins de désexcitation et de conversion d'énergie du complexe d'euporium $[\text{Eu}(\text{DPPE})_3][\text{NO}_3]_3$ (droite)^[58,59].

On notera que le processus de désexcitation peut se faire aussi par relaxation vibrationnelle (10^{-12} - 10^{-14} s), par des systèmes non radiatifs tels que les collisions avec le solvant, la vibration d'oscillateurs O-H, etc... Ces processus sont non négligeables et devront être pris en considération lors de la conception des sondes car il aura un effet d'extinction de la luminescence.

I.4.2 Effet antenne

Les transitions ayant lieu entre les électrons des couches f au sein des lanthanides sont théoriquement interdite par les règles de Laporte. L'excitation directe des cations lanthanides mène rarement à des complexes ou des matériaux très luminescents. Une excitation indirecte est possible en excitant sélectivement le ligand qui transfère alors son énergie vers l'ion métallique. Ce phénomène, appelé « effet antenne » peut être décrit en 3 étapes : absorption de photons par le ligand, transfert d'énergie sur l'ion métallique et enfin une émission de lumière centrée sur le métal (Figure I-25).

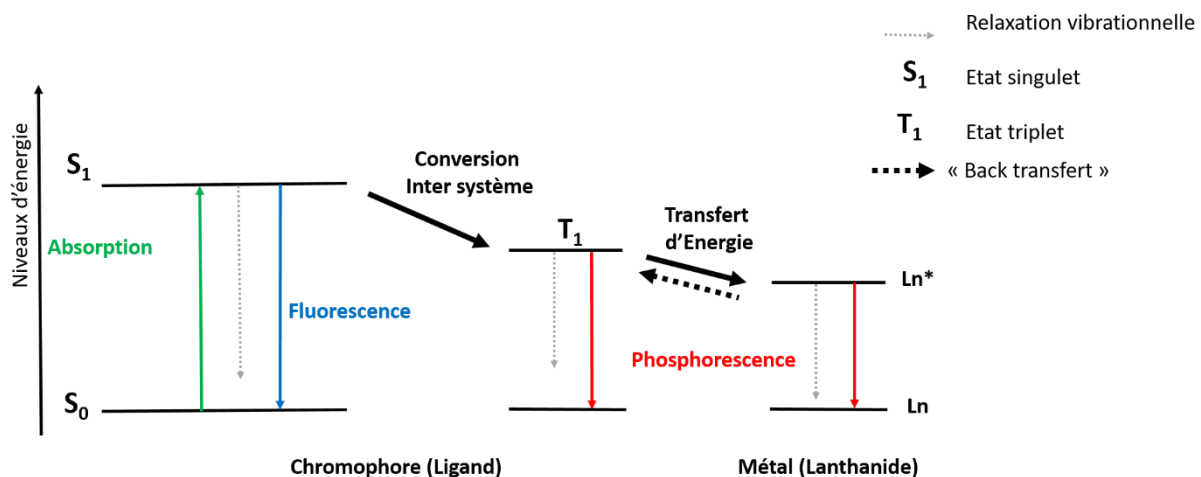


Figure I-25 : Effet d'antenne et transfert d'énergie sur le lanthanide.

Le processus généralement impliqué dans la sensibilisation des lanthanides met en jeu l'état triplet de son ligand. L'excitation d'un ligand organique possédant une unité qui absorbe la lumière (groupe chromophore) entraîne le peuplement de son état singulet S_1 . Par conversion inter-système l'état triplet T_1 se trouve peuplé à son tour. Deux mécanismes de transfert d'énergie ont été proposés et modélisés théoriquement : le mécanisme de Dexter (Figure I-26, gauche) et celui de Förster (Figure I-26, droite)^[60].

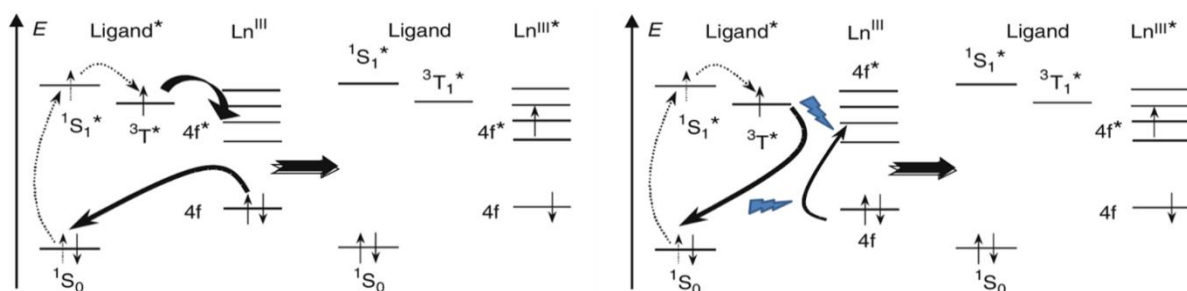


Figure I-26 : Mécanismes de transfert d'énergie du ligand vers l'ion lanthanide proposés par Dexter (gauche) et Förster (droite).

La théorie de Dexter est basée sur un double échange d'électrons. Alors qu'un électron passe de l'état triplet du ligand à un état excité du métal, un second électron va passer de l'état fondamental du lanthanide à celui du ligand. Ce mécanisme est limité par la distance d

séparant les orbitales du donneur et de l'accepteur selon une loi exponentielle e^{-d} , et n'est efficace que pour des distances d'environ 3-5 Å.

Le mécanisme de Förster implique un couplage dipolaire entre le donneur et l'accepteur. C'est la désexcitation du ligand qui entraîne l'excitation du lanthanide. Ce mécanisme dépend de la distance d selon une loi d^{-6} , qui permet au transfert d'être efficace sur des distances plus longues (de l'ordre de la centaine d'angström).

Une fois que le transfert d'énergie de l'état triplet aux états excités du lanthanide a eu lieu, le métal peut émettre sa luminescence. Le mécanisme complet de conversion d'énergie est en réalité plus compliqué, incluant près d'une trentaine de constantes d'échanges, de « transfert en retour » que nous ne détaillerons pas ici. L'efficacité du transfert d'énergie peut être estimée par le rendement quantique (Φ), qui est le rapport du nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés. Plus ce rendement sera haut, plus l'efficacité du transfert sera importante. On peut également définir la brillance B qui est le produit du rendement quantique et du coefficient d'extinction molaire pour une longueur d'onde donnée ($B = \Phi \times \epsilon$).

1.4.3 Exemple de sondes luminescentes à base de lanthanides

Pour optimiser le transfert d'énergie intramoléculaire, le niveau d'énergie de l'état triplet T_1 doit être légèrement supérieur à l'état excité du lanthanide. Des ligands contenant des antennes très efficaces ont été mis au point par D. Parker, O. Maury *et al.* Un rendement quantique de luminescence de l'ordre de 25-50% peut par exemple être atteint pour des complexes d'euporium [Eu-TCN-(Pico-Ar)₃] qui sont les plus brillants dans l'eau à ce jour, montrant l'efficacité du processus de sensibilisation (Figure I-27). Les transitions de transfert de charge mènent généralement à des coefficients d'extinction molaire très élevés, ce qui permet d'atteindre des brillances de 23 000 M⁻¹.cm⁻¹ ([Tb-TCN-(Pico-OPeg)₃]^[61]) et 30 000 M⁻¹.cm⁻¹ ([Eu-TCN-(Pico-Ar)₃]^[62]).

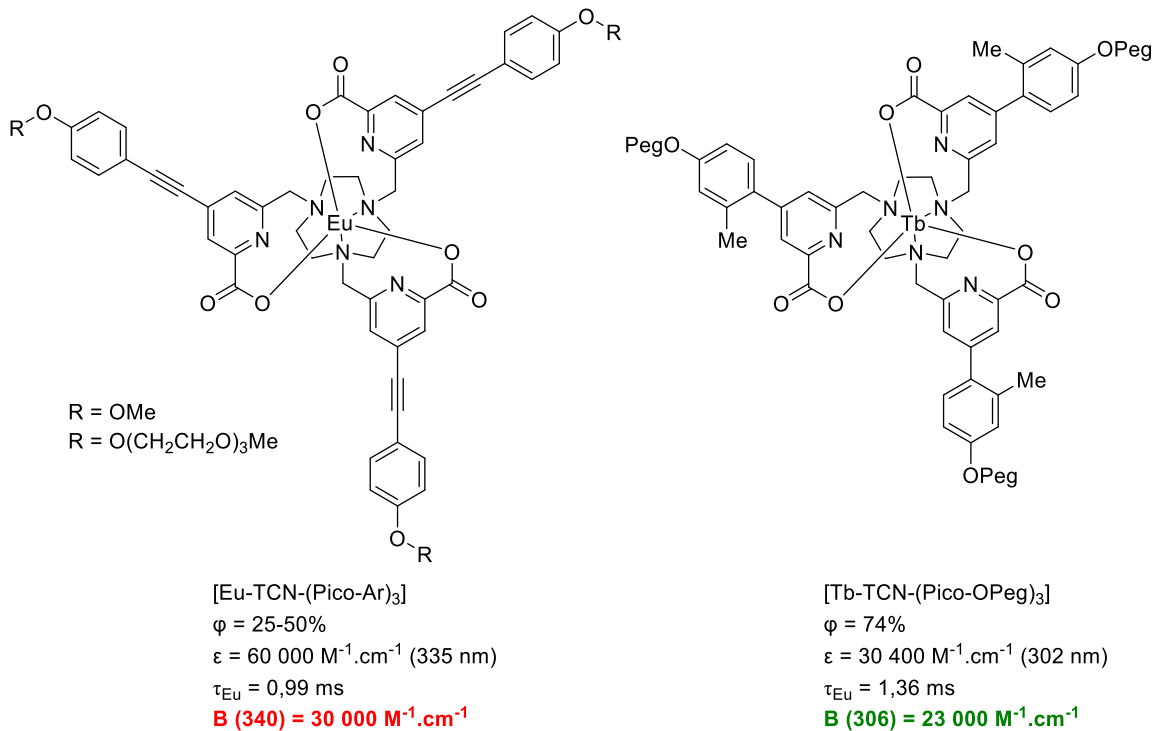


Figure I-27 : Complexes conçus pour être très brillants^[61, 62].

1.4.3.1 Emission dans le proche infra-rouge

L'utilisation d'une lumière proche infrarouge (NIR) en luminescence présente de nombreux avantages par rapport à l'utilisation de lumière ultra violette (UV) ou visible^[60]. Le milieu biologique étant composé de nombreuses molécules contenant des cycles aromatiques (acides aminés, cofacteurs, acides nucléiques...), l'utilisation d'UV peut engendrer de la fluorescence résiduelle. De plus, les longueurs d'ondes associées vont limiter la profondeur observable de l'échantillon et des dommages peuvent être causés par le rayonnement de haute énergie (UV notamment). Afin d'explorer plus profondément les tissus sans les endommager, il est possible d'exploiter la fenêtre proche infra-rouge, la zone de transparence du milieu biologique se situant entre 650 et 1450 nm^[15]. Certains cations lanthanides émettent dans cette fenêtre comme Yb³⁺, Er³⁺... L'excitation peut se faire via une antenne très conjuguée ou absorbant à haute longueur d'onde via une excitation bi-photonique^[63,64]. Avec un ligand absorbant vers 350 nm, l'absorption bi-photonique consiste à irradier l'échantillon aux alentours du double de la longueur d'onde et provoquer l'absorption de deux photons simultanément (Figure I-28). L'énergie administrée est donc moins intense et donc moins délétère pour les tissus.

Chapitre 1

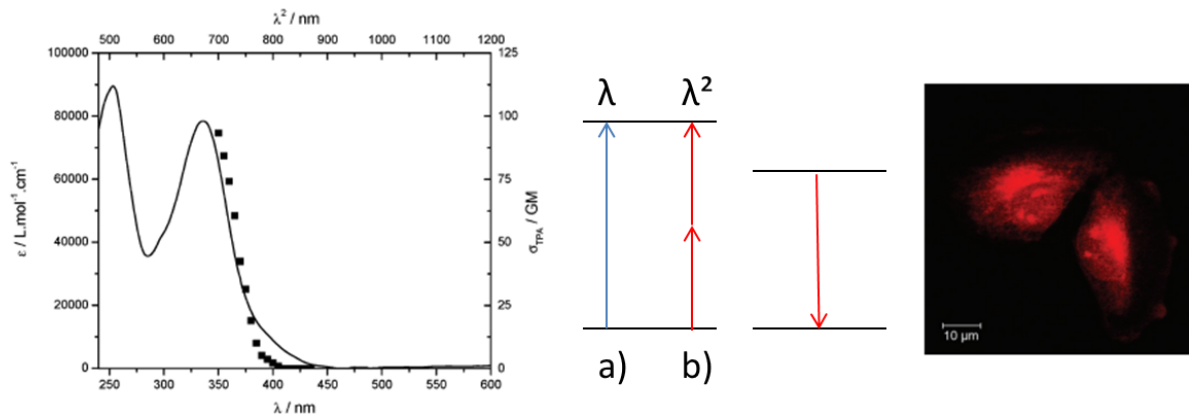


Figure I-28 : Excitation à 2 photons. A gauche, spectre d'absorption du complexe d'euporium dans l'eau. Sur le dessus le spectre d'absorption à deux photons. Milieu, principe de l'excitation bi photonique. A droite, luminescence avec une excitation à deux photons ($\lambda_{ex} = 760$ nm).

Ces techniques demandent cependant l'utilisation de microscope possédant les filtres adéquats ainsi que des lasers pulsés (de l'ordre de la fs). Ces lasers sont extrêmement coûteux ce qui reste leur principale limitation.

1.4.3.2 Quelques applications de sondes luminescentes

Les sondes luminescentes sont souvent utilisées pour la détection d'analytes (métaux, ions, acides aminés, protéines...) ou d'évènements biologiques tels que le pH ou le statut redox par modulation du signal observée (activation ou désactivation de la luminescence). La détection d'analytes peut être réalisée par différents mécanismes qui vont venir moduler la luminescence émise par le complexe^[11] (Figure I-29).

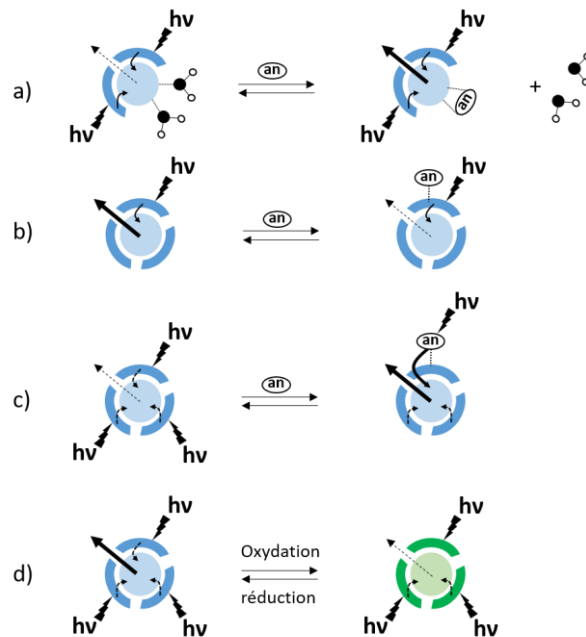


Figure I-29 : Différents modèles de détection d'analytes pour des sondes luminescentes. Image redessinée de la référence^[11].

L'analyte peut venir remplacer des molécules d'eau sur le métal (Figure I-29, a), influencer les propriétés photophysiques du ligand (Figure I-29, b), s'ajouter sur le ligand et

sensibiliser un complexe faiblement luminescent (Figure I-29, c) ou effectuer un changement de degré d'oxydation sur le métal ou le ligand pour influencer la luminescence du complexe (Figure I-29, d).

La première situation (a, Figure I-29) peut être illustrée par les travaux de T. Gunnlaugsson *et al.*^[65] pour la détection du zinc. Il s'agit d'une détection indirecte qui utilise un complexe d'ytterbium [Yb-DOTAM-8-HQS]⁺ contenant une 8-hydroxyquinoline sulfonée (8-HQS) comme antenne (Figure I-30). La 8-HQS possède deux sites chélatants et vient fermer la sphère de coordination de l'ytterbium. Après addition de Zn²⁺, la 8-HQS va former un complexe stable [Zn-(8-HQS)₂]. Le complexe d'ytterbium [Yb-DOTAM]³⁺, libéré de son antenne, va démontrer une diminution drastique de sa luminescence. Par ajout d'EDTA, la luminescence peut être rétablie montrant une réversibilité de cette détection.

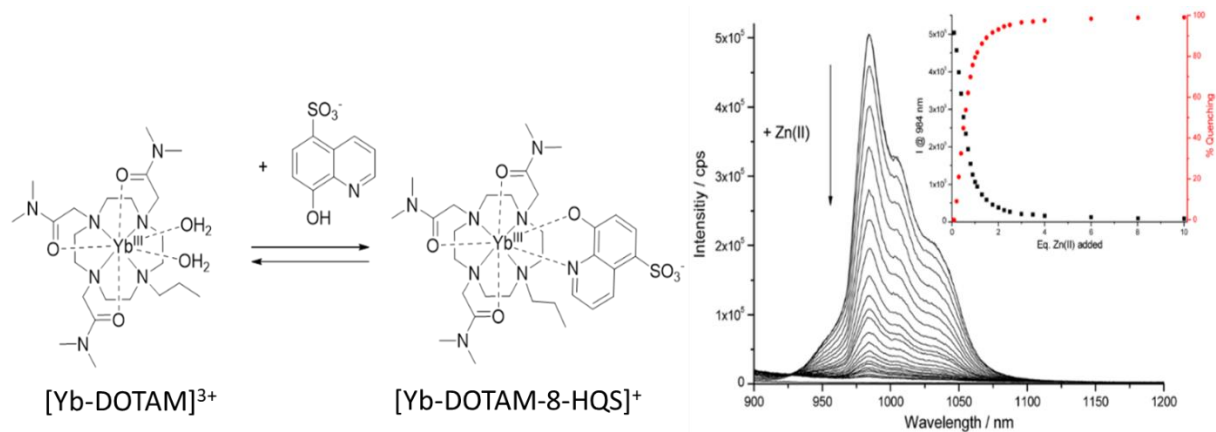


Figure I-30 : Détection de zinc par le complexe [Yb-DOTAM-8-HQS]⁺. Image issue de la référence^[65].

La deuxième situation (b, Figure I-29) peut être illustrée par les travaux de S. Butler *et al.*^[66] qui a décrit un complexe d'euporium [Eu.8-HQ-B(OH)₂] comportant une fonction hydroxyquinoléine fonctionnalisée servant d'antenne. Par réaction avec le peroxy-nitrite (ONOO⁻), la coupure oxydante du groupement acide phénylboronique vient provoquer une modification de l'antenne sur le ligand. Il n'est dès lors plus capable de sensibiliser l'euporium, ce qui provoque une extinction de sa luminescence (Figure I-31). Il existe des différences dans les spectres de ces deux complexes. Un changement du spectre UV-Vis du complexe avant et après ajout de peroxy-nitrite montre qu'un transfert de charge a lieu lors de la modification de l'antenne. Cela signifie qu'un transfert de densité de charge a lieu de l'atome d'oxygène de la quinoline vers l'unité quinoline. L'énergie de l'état excité de la quinoline diminue (autour de 17 100 cm⁻¹). Cet état n'est plus suffisamment haut pour que l'énergie soit transférée sur l'état excité de l'euporium. L'antenne qui servait donc à sensibiliser l'euporium dans le complexe [Eu.8-HQ-B(OH)₂] ne sensibilise plus le complexe [Eu.8-HQ]⁻ et sa luminescence se retrouve éteinte en présence de peroxy-nitrite de manière irréversible.

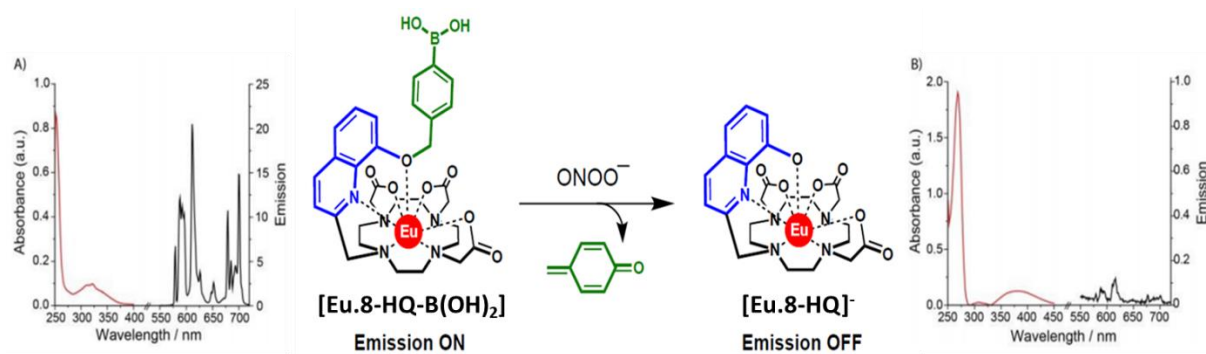


Figure I-31 : Détection du peroxyne (ONOO-) par le complexe $[Eu.8-HQ-B(OH)_2]^{[66]}$.

Afin de gagner en spécificité, il est possible de cibler des événements ayant lieu dans les cellules.

Pour mieux comprendre les mécanismes biochimiques et avoir des agents de contraste spécifiques, il est possible de cibler une catégorie particulière de molécules impliquées à des stades précoces dans le développement de nombreuses pathologies : les espèces réactives de l'oxygène. Leur détection peut être un excellent moyen de détecter les changements d'états rédox au sein d'un système biologique. C'est précisément à ces espèces que nous allons nous intéresser au cours de ces travaux de thèse. Nous allons dans les chapitres suivants en détailler l'origine, les implications pathologiques et les stratégies basées sur l'utilisation des complexes de lanthanides pour les détecter.

1.5 LES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE

1.5.1 Définition

Le terme « ROS » est utilisé pour décrire un ensemble de molécules et de radicaux libres provenant de l'oxygène moléculaire^[67]. A son état fondamental, l'oxygène moléculaire est un diradical. On lui donne le nom d'état triplet. Les deux électrons possédant le même spin, l'oxygène triplet ne peut réagir qu'avec des espèces radicalaires, le rendant assez peu réactif envers les deux électrons antiparallèles d'une liaison chimique dans une molécule diamagnétique.

En revanche, si un des deux électrons est excité et par conséquent change de spin, on se retrouve avec l'oxygène dit « singulet » qui est un oxydant puissant et rapide. Les deux électrons avec leurs spins opposés peuvent alors réagir très rapidement avec une autre paire d'électrons.

Si à présent l'oxygène est réduit par un électron cela génère une espèce radicalaire plus réactive : l'anion superoxyde. Cet anion peut à nouveau être réduit par un électron et ainsi de suite. On obtient alors une première série de ROS comme cela est représenté sur la Figure I-32, avec le radical hydroxyle OH^\bullet qui est l'espèce la plus réactive.

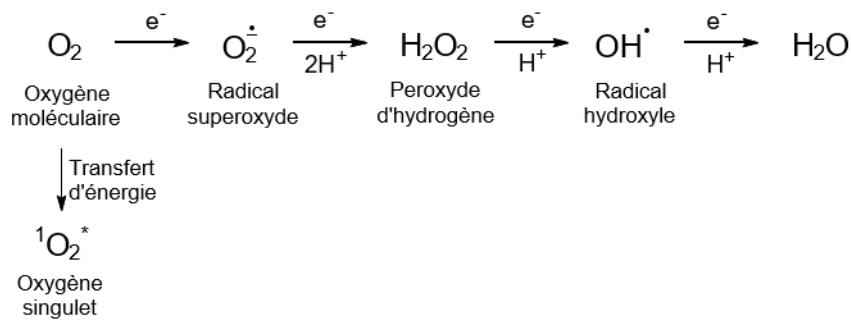


Figure I-32 : Espèces réactives de l'oxygène.

Lorsqu'on inclue les espèces dérivées de l'azote telles que le monoxyde d'azote (NO) ou le peroxydinitrite (ONOO⁻), on parlera de RO/NS (pour les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote). Les RO/NS sont des espèces assez paradoxales puisqu'à des concentrations relativement élevées elles sont très toxiques pour les cellules mais à des concentrations physiologiques ce sont d'importantes molécules de signalisation et de défense.

1.5.2 L'origine biologique du stress oxydant

En condition physiologique, il existe un équilibre entre la génération des ROS et le système de défense, de réparation du corps : c'est l'**homéostasie rédox**. En cas de déséquilibre de cette balance par surproduction des ROS, les systèmes biologiques peuvent être dépassés, on parle alors de **stress oxydant**. La présence de ces espèces en quantité mène souvent à l'apoptose ou mort cellulaire programmée. Le stress oxydant est maintenant connu comme étant à l'origine du vieillissement^[68], mais aussi d'autres pathologies majeures telles que des cancers^[69], le diabète^[70], les maladies neurodégénératives^[71] ou encore cardiaques^[72]. L'origine des ROS est multiple^[73], à la fois endogène mais aussi exogène^[74].

1.5.2.1 Les sources exogènes de ROS

Les sources exogènes sont liées à divers facteurs environnementaux (Figure I-33). L'exposition à des rayons ionisants ou non ionisants tels que les ultra-violets : ainsi les UV-C (<290 nm), UV-B (290–320 nm) et UV-A (320–400 nm) peuvent indirectement produire des ROS incluant l'oxygène singulet, le peroxyde d'hydrogène ou les anions superoxydes. Les polluants de l'air tels que les émissions des voitures, la fumée de cigarette, les contaminants industriels englobant des dérivés du NO constituent une source majeure de ROS qui attaquent les organismes par interaction directe avec la peau ou après inhalation dans les poumons. Les drogues, les narcotiques et les xénobiotiques sont une autre source de production de ROS comme sous-produits lors de leur métabolisme in vivo.

| Facteurs environnementaux : | |
|-----------------------------|----------|
| Irradiation | Alcool |
| Infection | Drogues |
| Pollution | Tabac... |
| Xénobiotiques | |

Figure I-33 : Facteurs environnementaux pour la production de ROS. Image adaptée de la référence^[75].

1.5.2.2 Les sources endogènes de ROS

Bien que l'exposition à des sources exogènes soit la plus facile à visualiser et retirer de notre environnement, la production des ROS endogène est importante et continue dans les cellules. Les ROS sont produits par différents processus physiologiques et biochimiques et de nombreuses enzymes sont impliquées dans leur formation. La majeure partie de la production de ROS intracellulaires provient de la mitochondrie et de sa chaîne respiratoire. Celle-ci réduit le dioxygène en eau grâce à quatre électrons provenant de deux molécules de NADH. Il est estimé qu'environ 1 à 2 % du dioxygène n'est pas complètement réduit par les complexes I et III et forment l'anion superoxyde. Cet ion est ensuite rapidement converti en peroxyde d'hydrogène (bien moins réactif) par une enzyme mitochondriale : la superoxyde dismutase (Figure I-34).

Une autre source biologique importante de ROS provient des peroxysomes et du réticulum endoplasmique^[76]. Les peroxysomes sont des organelles cytoplasmiques ubiquitaires jouant un rôle important dans la β -oxydation des longues chaînes d'acides gras. Les systèmes enzymatiques de production de ROS dans les peroxysomes sont des oxydases qui libèrent principalement du peroxyde d'hydrogène. Le réticulum endoplasmique joue des rôles cellulaires multiples tels que la détoxification ou le métabolisme des acides gras. Ces processus utilisent une oxydase, le cytochrome P450, capable de libérer des ROS comme sous-produits.

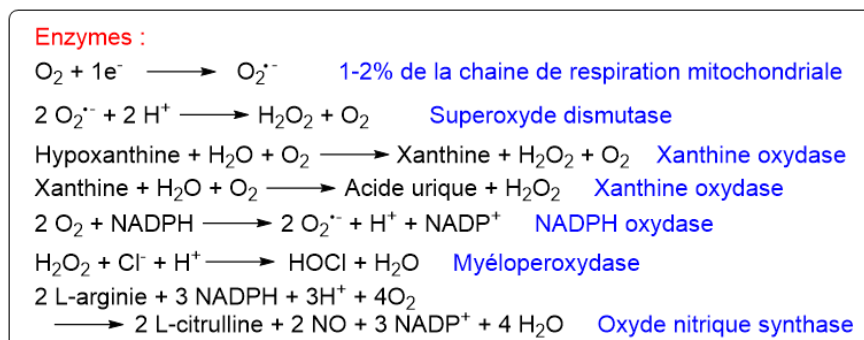


Figure I-34 : Formation enzymatique de ROS. Image adaptée de la référence^[75].

La xanthine oxydase est une autre enzyme très largement distribuée dans l'organisme et impliquée dans la production de ROS. Elle est présente principalement dans les reins et le foie. Elle catalyse les deux dernières étapes du catabolisme de la purine. Elle convertit

l'hypoxanthine en xanthine puis en acide urique en deux réactions couplées à la production de peroxyde d'hydrogène^[75].

On peut trouver une autre production enzymatique de ROS dans les cellules polymorphonucléaires sous des conditions particulières. Les leucocytes (neutrophiles, éosinophiles et basophiles) sont des familles de globules blancs relâchés pendant une infection pour neutraliser les agents pathogènes. Ce processus entraîne la production d'un cocktail toxique de ROS ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , HOCl) et de RNS pour tuer l'envahisseur. Pour cela, la NAD(P)H oxydase, qui permet principalement la réduction du dioxygène en $O_2^{\bullet-}$, est activée : c'est l'explosion oxydante (« oxidative burst »). A titre d'exemple, les neutrophiles activés peuvent produire jusqu'à 10 nmol de superoxyde par minute par millions de neutrophiles au cours de l'explosion oxydante.

Enfin la concentration de certains métaux libres comme le fer et le cuivre influence la distribution des ROS. Par des réactions telles que Fenton et Haber-Weiss (Figure I-35), le radical hydroxyle peut être généré depuis le peroxyde d'hydrogène (qui est moins réactif) en présence de fer. Celui-ci peut provenir par exemple, du relargage de Fe^{2+} d'un complexe fer-soufre du complexe I de la chaîne mitochondriale, en présence d'une forte concentration de superoxyde ou d'acidose lactique associée à une ischémie.

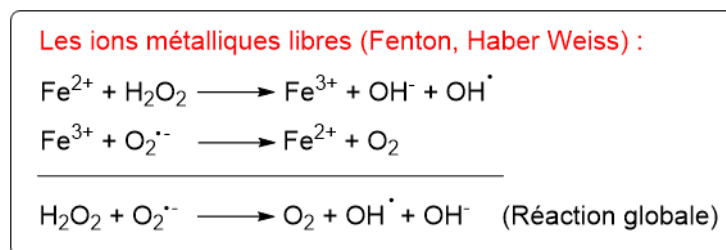


Figure I-35 : Réaction de Fenton et Haber-Weiss entraînant la formation du radical hydroxyle. Image adaptée de la référence^[75].

1.5.2.3 Système de défense antioxydant

Pour lutter contre l'excès de ROS, notre organisme a mis au point un système de défense intégré efficace (Figure I-36). La production d'espèces réactives de l'oxygène est contrebalancée par une défense basée sur des systèmes enzymatiques et non enzymatiques. Ainsi, des enzymes telles que la catalase (CAT), des superoxydes dismutases (SOD) ou des glutathions peroxydases (GPx) additionnées à des peptides comme le glutathion ou des vitamines (A, C et E) régulent la quantité de ROS nécessaire à l'homéostasie physiologique. L'antioxydant moléculaire le plus abondant produit par les cellules est le tripeptide γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine, aussi connu sous le nom de glutathion (GSH). Le groupement sulfhydryle est rédox-actif et capable de passer de la forme réduite (-SH) à la forme oxydée (S-S) qui sont toutes les deux stables (avec des potentiels entre -260 mV et -150 mV). Dans des conditions normales, la forme majoritaire du glutathion est la forme réduite. Elle est

Chapitre 1

impliquée dans de nombreux processus physiologiques importants comme la régulation du cycle cellulaire et contribue largement à l'élimination des ROS.

L'acide ascorbique, aussi appelé vitamine C est un autre antioxydant ubiquitaire et considéré comme le principal antioxydant du plasma. Il est essentiel aux humains mais doit être trouvé dans la nourriture car il n'est pas synthétisé naturellement dans le corps. Il participe au maintien de l'intégrité vasculaire, dans la synthèse du collagène et du système immunitaire^[77]. Il agit aussi comme cofacteur dans des réactions essentielles dans le cerveau comme la biosynthèse des catécholamines et contribue à l'absorption du fer. L'acide ascorbique est capable de neutraliser directement une grande variété de ROS et RNS telles que les radicaux OH^\bullet et $\text{O}_2^{\bullet-}$.

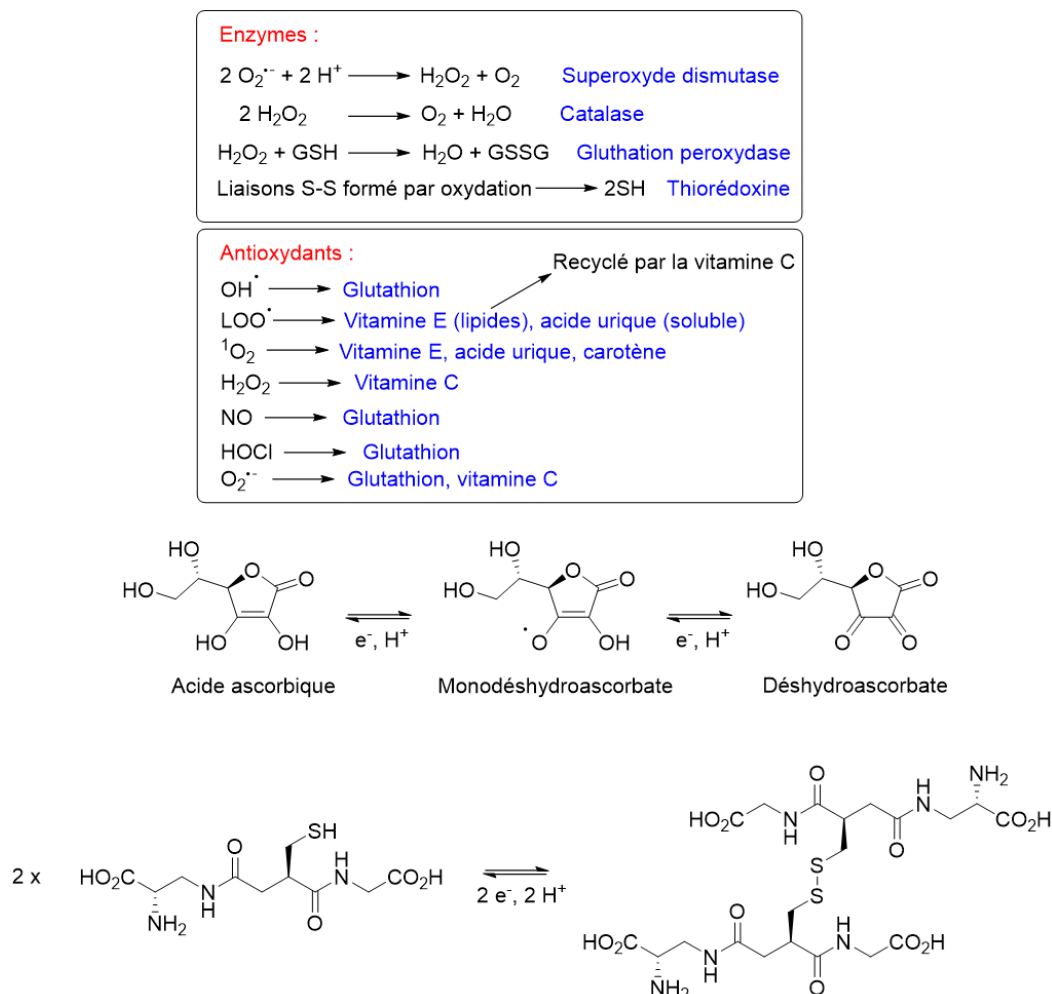


Figure I-36 : Systèmes de défense contre les ROS. Acide ascorbique = Vitamine C. Image adaptée de la référence^[75].

1.6 SONDES REDOX POUR LA DETECTION DES ROS

Les tissus sains sont donc caractérisés par de faibles niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (« ROS ») et des niveaux constants de réducteurs biologiques. L'augmentation du niveau de ROS au-delà d'un seuil critique mène à une instabilité génomique et à une

prolifération incontrôlée des cellules qui peuvent alors devenir malignes. Les espèces réactives de l'oxygène sont pour certaines d'entre elles très difficiles à détecter due à leur extrême réactivité. Leurs temps de vie sont très faibles (par exemple l'ion hypochlorite HOCl est plus réactif que le peroxyde d'hydrogène avec un temps de vie d'environ 33 ns contre 1,1 s, respectivement^[74] en milieu biologique) et rendent leur détection compliquée. De nombreuses techniques sont utilisées pour étudier la génération et l'évolution des ROS (HPLC, spectrométrie de masse, RPE...). Ces méthodes ont l'inconvénient d'être souvent destructives, de ne donner des informations que sur le produit final de la réaction et non sur la localisation et la cinétique de leur production.

Une altération de l'homéostasie cellulaire par surexposition aux ROS pourrait conceptuellement être détectée par des sondes à base de lanthanides. Pour rapporter des changements de l'environnement rédox d'un complexe, celui-ci doit pouvoir adopter au moins deux états d'oxydation distincts dans la gamme des potentiels rédox d'intérêt. Chaque espèce doit avoir une signature spectroscopique différente, ou directement réagir avec des ROS. Enfin, ces changements doivent induire une modification du temps de vie de l'état excité, une altération du temps de relaxation... Comme les cations lanthanides existent principalement sous leur degré d'oxydation +III en conditions physiologiques, les changements d'état rédox doivent avoir lieu sur le ligand qui pourra transmettre l'information au lanthanide, qui pourra être détectée. Nous allons dans les sections suivantes nous focaliser sur les différentes stratégies associées.

I.6.1 Complexes de lanthanides pour la détection sélective des ROS

Certains complexes de lanthanides sont capables de détecter sélectivement les ROS comme le peroxyde d'hydrogène^[78-81], l'ion hypochlorite^[82-84], le radical hydroxyle^[33,85], le péroxynitrite^[66,86-89]... Pour la plupart, la détection des ROS a été réalisée en exploitant des changements de luminescence de la sonde mais il existe quelques exemples de complexes capables de donner une réponse en IRM.

E. Borbas *et al.* ont synthétisé le complexe d'euporium [EuDO3A-OFF] sur la base d'un ligand DO3A et d'une pré-antenne à base d'acide boronique (Figure I-37)^[80]. Cette pré-antenne n'étant pas capable de sensibiliser l'euporium, le complexe n'est pas luminescent. Par réaction spécifique entre le peroxyde d'hydrogène et l'acide boronique, l'éther phénolique se retrouve sous la forme d'un groupement phénol qui se cyclise et forme une coumarine. Cette unité coumarine va intervenir dans le processus de sensibilisation pour exalter la luminescence de l'euporium.

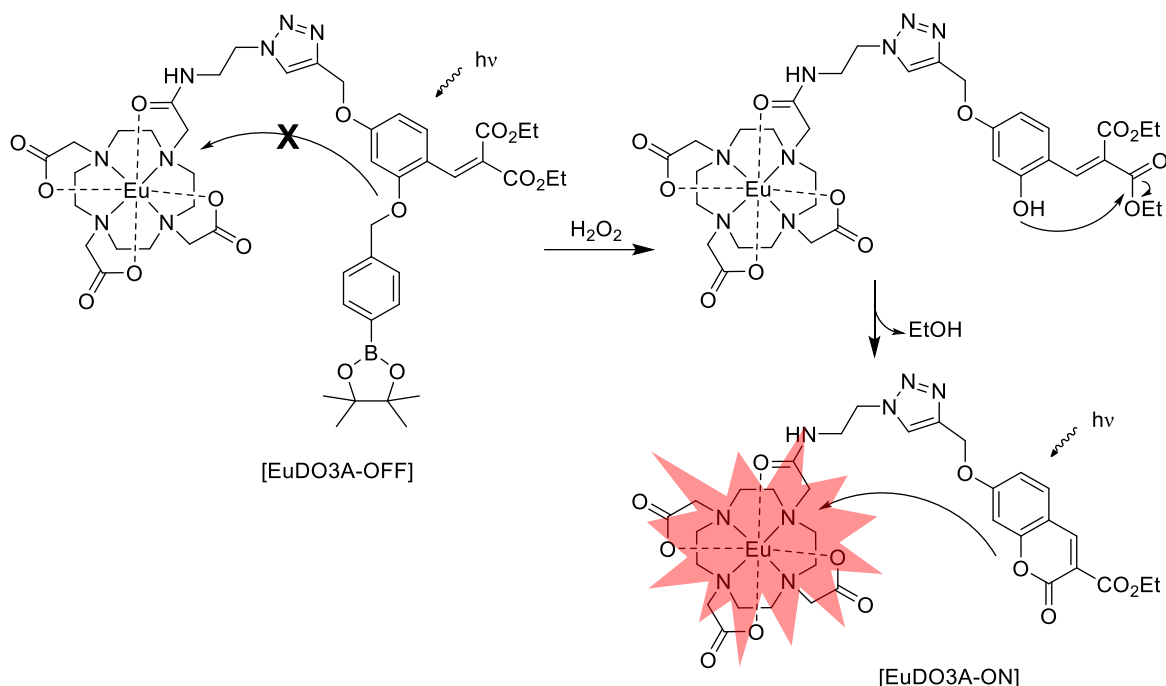


Figure I-37 : Mode de fonctionnement du complexe d'euporium [EuDO3A-OFF] pour la détection sélective du peroxyde d'hydrogène. Image adaptée de la référence^[75].

Le complexe de terbium [Tb-Terpy-OFF]⁻ synthétisé par J. Yuan *et al.* permet la détection sélective d'ion hypochlorite (HOCl) grâce à un mécanisme de FRET « transfert d'énergie par résonance de type Förster » qui associe un complexe de terbium avec un ligand de type terpyridine polyacide (FRET donneur) et une unité rhodamine en tant qu'accepteur de FRET^[84]. En l'absence d'ion hypochlorite, l'unité rhodamine adopte une forme de spirolactame qui l'empêche d'agir comme un accepteur FRET. La luminescence détectée est alors seulement due au terbium. Après réaction, le spirolactame est décomposé et la rhodamine libre agit comme accepteur FRET. Le transfert d'énergie du terbium à la rhodamine est restauré et le ratio d'émission I_{560}/I_{540} augmente (Figure I-38).

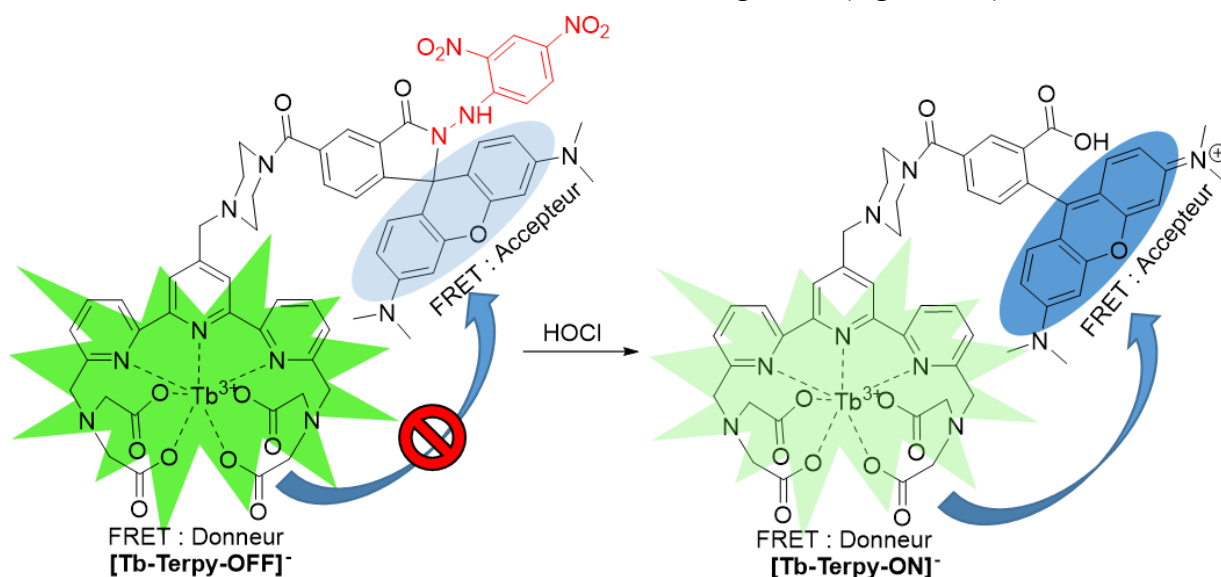


Figure I-38 : Mécanisme FRET entre un complexe de terbium (donneur) et une unité rhodamine (accepteur). Image adaptée de la référence^[75].

La détection de ROS de manière sélective peut aussi se faire en utilisant des sondes IRM/ParaCEST. D. Sherry *et al.* ont mis au point le seul complexe d'euporium [EuDOTAM-anthryle] capable de détecter sélectivement l'oxygène singulet^[90]. Avant réaction, le complexe d'euporium possède un signal CEST à 50 ppm, typique d'une molécule d'eau coordonnée au centre métallique. Après réaction avec $^1\text{O}_2$ et formation de l'endoperoxyde, le signal est déplacé vers 53 ppm. La différence de 3 ppm s'est avérée suffisante pour obtenir une détection ratiométrique dans la gamme de 0 à 20 mM. En parallèle, le temps de résidence de la molécule d'eau sur l'euporium a augmenté, passant de 90 μs à 137 μs et jouant ainsi sur l'intensité de l'effet CEST avec une augmentation d'environ 8 à 14% (Figure I-39).

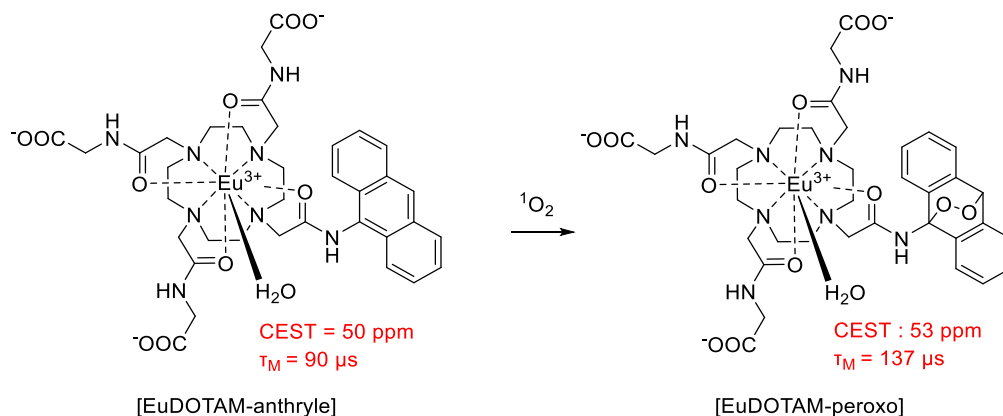


Figure I-39 : Complexe [EuDOTAM-anthryle] pour la détection spécifique de l'oxygène singulet par CEST.

L'ensemble de ces complexes prouve donc qu'il est possible de détecter des ROS de manière spécifique et d'obtenir une réponse en luminescence ou en CEST. Pour la détection du stress oxydant, il est aussi possible de détecter les ROS de manière non spécifique.

1.6.2 Complexes de lanthanides pour la détection du stress oxydant

Certains complexes de lanthanides sont capables de répondre au stress oxydant, c'est-à-dire de répondre à l'environnement rédox. Les lanthanides étant très stables à leur degré d'oxydation +III, ils ne sont que peu employés en tant que sonde rédox. On peut trouver dans la littérature quelques exemples de complexes d'euporium dans lesquels le métal oscille entre les degrés d'oxydation +II et +III^[49,91]. L'euporium (II) est iso-électronique du gadolinium (III) et peut donc être utilisé pour l'IRM. Après oxydation en euporium (III), celui-ci perd sa capacité à influencer la relaxation des protons de l'eau et une absence de signal est observée en IRM. M. J. Allen *et al.* ont mis au point le complexe d'euporium [EuDOTAM-CF₃]²⁺ (Figure I-40) qui possède des propriétés en IRM de ^1H , ^{19}F et en CEST. Avant oxydation, le complexe [EuDOTAM-CF₃]²⁺ permet l'obtention d'un signal en IRM avec une relaxivité

Chapitre 1

d'environ $5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 37°C . Après oxydation, le signal est observé en CEST et en IRM du ^{19}F seulement.

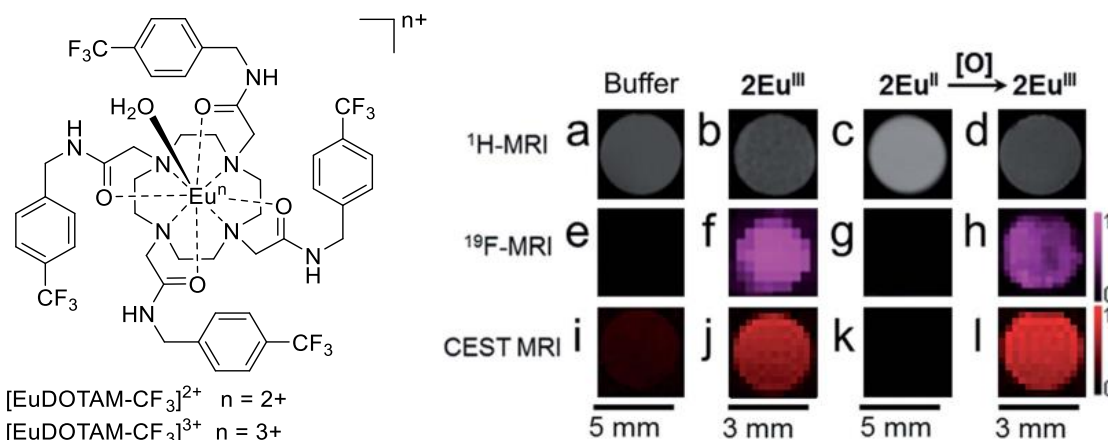


Figure I-40 : Utilisation du complexe $[\text{EuDOTAM-CF}_3]^{2+}$ comme agent de contraste IRM. Image extraite de la référence^[49].

De plus $[\text{EuDOTAM-CF}_3]^{2+}$ peut être utilisé comme sonde thermométrique puisqu'il est sensible aux variations de température. Grâce aux interactions entre groupements fluorés (CF_3) présents au bout des bras, la molécule d'eau est « emprisonnée » au sein du complexe et ses échanges avec l'eau environnante sont fortement atténués. Lorsque la température augmente, les interactions fluorées diminuent et permettent à la molécule d'eau de s'échanger librement avec l'eau environnante. La vitesse d'échange de la molécule d'eau, indispensable pour observer un signal est donc influencée par la température et évolue d'une valeur de $2,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 20°C à environ $5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 37°C (Figure I-41).

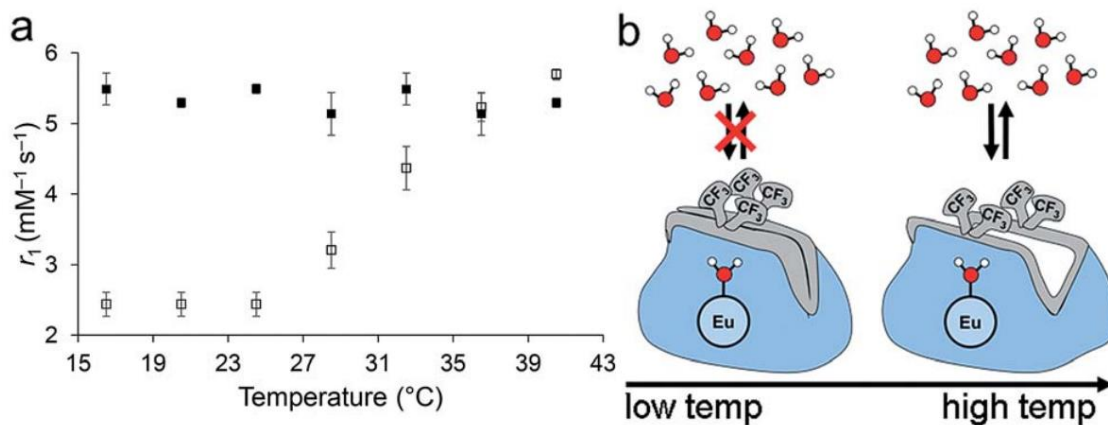


Figure I-41 : Utilisation du complexe $[\text{EuDOTAM-CF}_3]^{2+}$ pour sonder la température par IRM. Image extraite de la référence^[49].

Si le lanthanide reste préférentiellement sous son état d'oxydation (+III), un ligand possédant une fonction rédox peut être utilisé comme sonde rédox. Le complexe de fer basé sur un ligand DO3A portant une fonction ferrocène a été développé par S. Faulkner *et al.*^[92]. En fonction de l'état oxydé (Fe^{3+}) ou réduit (Fe^{2+}) du ferrocène, la luminescence du métal est influencée de manière entièrement réversible par voie électrochimique.

Un second exemple de complexe de lanthanide possédant un ligand rédox actif a été développé par A. Louie *et al.*^[93,94]. Il s'agit d'un complexe de Gadolinium [Gd.Spiro.fermé] portant une unité spiropyrane (Figure I-42). Le passage d'une forme fermée à ouverte influence l'accessibilité de la molécule d'eau coordonnée au gadolinium et modifie donc les propriétés de contraste du complexe. Ce changement de conformation peut être influencé par la lumière mais aussi par l'ajout de réducteur tel que le NADH. L'effet de la lumière ou de NADH influence la relaxivité, qui passe de $2,51 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour la forme ouverte à $2,05 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour la forme fermée. Cette différence n'est pas très importante, mais valide cependant la preuve de concept selon laquelle il est possible d'obtenir un signal réversible en IRM lors d'un changement de l'état rédox du ligand.

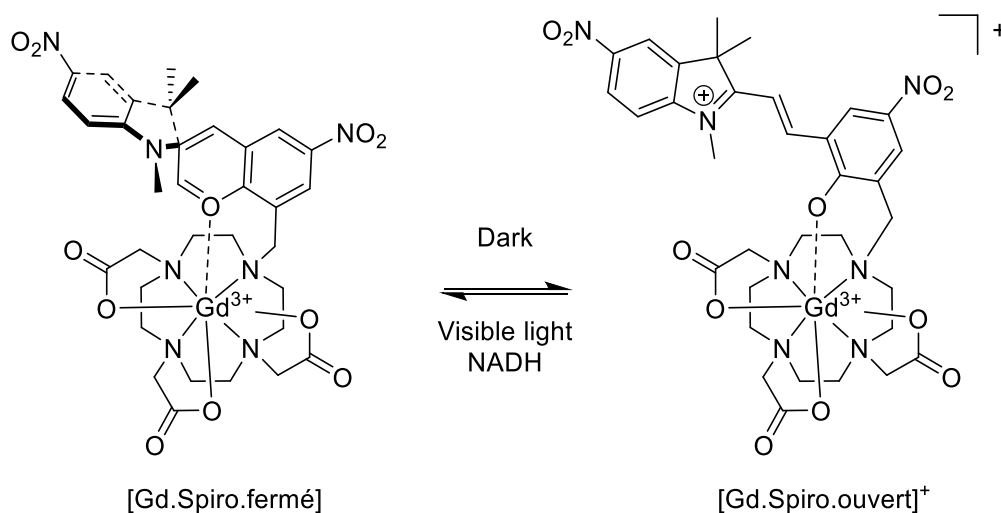


Figure I-42 : Isomérisation proposée par les auteurs^[93,94].

Il existe d'autres types de fonctions chimiques qui sont capables de donner un contraste en imagerie après changement de leur état rédox, les nitroxydes.

I.6.3 Radicaux organiques pour la détection des ROS

I.6.3.1 Agents de contraste incorporant des radicaux organiques

Les radicaux nitroxydes sont de petites molécules paramagnétiques sensibles à l'état rédox de leur environnement. Par transfert d'électron (oxydation ou réduction par des espèces présentes *in vivo*), ces unités peuvent former des espèces diamagnétiques (hydroxylamine ou oxo-ammonium) qui n'influencent pas le temps de relaxation. De manière générale, le milieu cellulaire, réducteur, aura tendance à favoriser la formation de la forme réduite hydroxylamine. Par réaction avec des radicaux superoxydes à pH physiologique, le radical nitroxyde retrouve son caractère paramagnétique et donne un contraste en imagerie (Figure I-43)^[95].

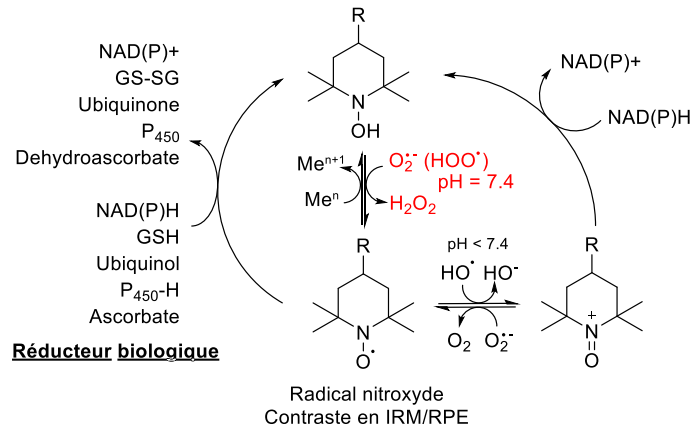


Figure I-43 : Cycle rédox du nitroxyde comme agent de contraste, Abréviations : O_2^\bullet , radical superoxyde ; HOO^\bullet , forme protonée du radical superoxyde ; H_2O_2 , peroxyde hydrogène ; HO^\bullet , radical hydroxyle ; Me^{n+}/Me^{n+1} , ions de métaux de transitions ; $GSH/GS-SG$, glutathion sous forme réduite/oxydée ; P_{450}/P_{450-H} , cytochrome P_{450} sous forme oxydée/réduite.

L'utilisation de radicaux organiques pour l'imagerie des cancers *in vivo* est basée sur l'activité rédox des tissus. En effet il existe une différence de vitesse de réduction entre les tissus malades et les tissus sains^[95,96]. Dans le cas de tissus possédant une concentration plus importante de ROS, la dynamique de réduction sera ralentie et le contraste persistera plus longtemps (Figure I-44).

(C) Neuroblastoma-bearing mice - difference between cancer and "normal" hemispheres

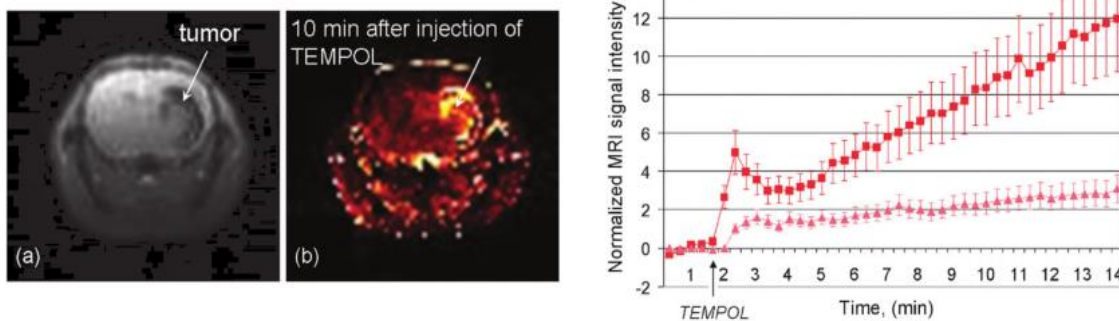
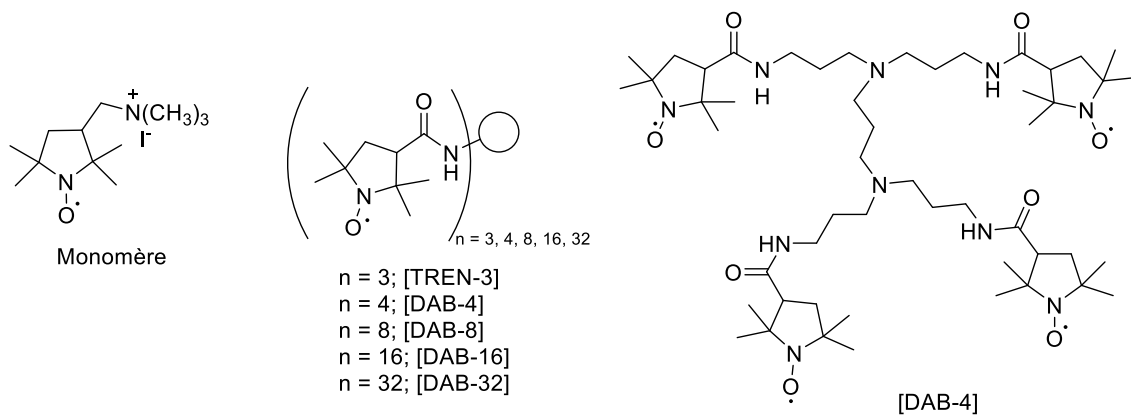


Figure I-44 : Exemple d'utilisation d'un nitroxyde dans l'IRM.

La plupart des agents de contraste à base de radicaux organiques sont des agents « T_2 », c'est-à-dire qu'ils vont avoir un effet de contraste négatif en réduisant le temps de relaxation transverse des protons environnants par des interactions de type spin-spin^[97]. L'inconvénient des nitroxydes est qu'ils ne possèdent qu'un seul électron non apparié. Leur relaxivité est donc par nature plus faible que les agents classiques à base de gadolinium. Afin d'avoir des agents T_2 créant un contraste suffisamment important, la principale stratégie employée est de créer un polymère de nitroxyde où le faible effet du nitroxyde est multiplié par le nombre d'unités présentes sur le polymère^[98]. Ainsi C. Winalski *et al.* ont démontré que les dendrimères de nitroxydes possèdent une résistance à la bioréduction et une relaxivité suffisante pour être des agents de contraste. (Figure I-45).



| Nitroxyde | Ligand dendrimère | Nombre de nitroxydes par molécule | Masse moléculaire (g/mol) | Nombre de charges à pH physiologique | $r_1 \pm SD$ ($s^{-1} mM^{-1}$) | $r_2 \pm SD$ ($s^{-1} mM^{-1}$) |
|------------|-------------------|-----------------------------------|---------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| [Monomère] | Monomère | 1 | 341 | 1+ | $0,18 \pm 0,003$ | $0,21 \pm 0,001$ |
| [TREN-3] | TREN | 3 | 651 | 1+ | $0,55 \pm 0,004$ | $0,62 \pm 0,003$ |
| [DAB-4] | DAB | 4 | 989 | 2+ | $0,78 \pm 0,01$ | $0,88 \pm 0,02$ |
| [DAB-8] | DAB | 8 | 2119 | 6+ | $1,57 \pm 0,03$ | $1,82 \pm 0,002$ |
| [DAB-16] | DAB | 16 | 4378 | 14+ | $2,93 \pm 0,06$ | $3,53 \pm 0,2$ |
| [DAB-32] | DAB | 32 | 8890 | 30+ | $5,17 \pm 0,08$ | $5,81 \pm 0,02$ |
| [Gd DTPA] | | | 548 | 2- | $4,76 \pm 0,2$ | $5,42 \pm 0,2$ |

Figure I-45 : Structure des dendrimères de nitroxydes [Monomère], [TREN], [Gd DTPA] et [DAB-3-32] et valeurs de relaxivité associées, mesuré à température ambiante et à 1,5 T. DAB : polypropylenimide.

Les agents de contraste sans métaux pour l'IRM sont étudiés pour palier le problème de la toxicité liée aux métaux dans certaines populations. L'utilisation de polymère de radicaux organiques permet donc d'avoir des valeurs de relaxivité similaires aux agents de contraste classiques mais avec une toxicité amoindrie. J. Johnson^[97] *et al.* ont mis au point un agent de contraste macromoléculaire à base de nitroxyde BASP-ORCA qui est très stable, soluble et très peu toxique et qui atteint des valeurs de relaxivité r_1 de $37,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et r_2 de $428,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, bien supérieures aux agents de contraste classiques à base de gadolinium (Figure I-46). Ces agents de contraste doivent cependant rapidement pénétrer les tissus et les cellules pour permettre une visualisation des cancers.

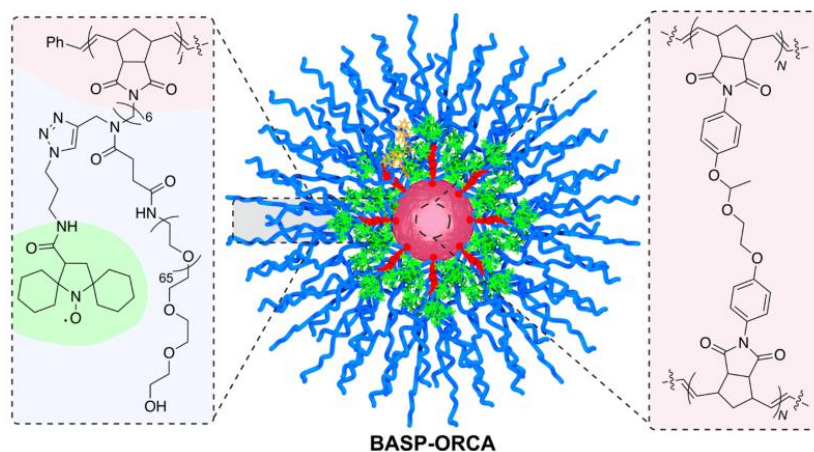


Figure I-46 : BASP-ORCA (Brush-arm star polymer organic radical contrast agents).

1.6.3.2 Complexes de lanthanides incorporant des ligands radicalaires

En associant les radicaux nitroxydes à des complexes de lanthanides il deviendrait possible de suivre un statut rédox par diverses techniques complémentaires. Alliant la luminescence et la RPE^[99], X. Guo *et al.* ont mis au point le complexe de terbium [Tb-DTPA] agissant comme sonde de radicaux libres. Sous sa forme oxydée, la fonction nitroxyde (TEMPO) atténue la luminescence du terbium et peut être détectée en RPE sous la forme d'un signal à 3 bandes typiques. En présence d'ascorbate, le radical TEMPO est réduit en hydroxylamine (TEMPOH). La luminescence du lanthanide est alors rétablie. L'hydroxylamine étant diamagnétique, il est aussi possible de suivre la réduction du signal du TEMPO par une diminution du signal RPE à température ambiante (Figure I-47).

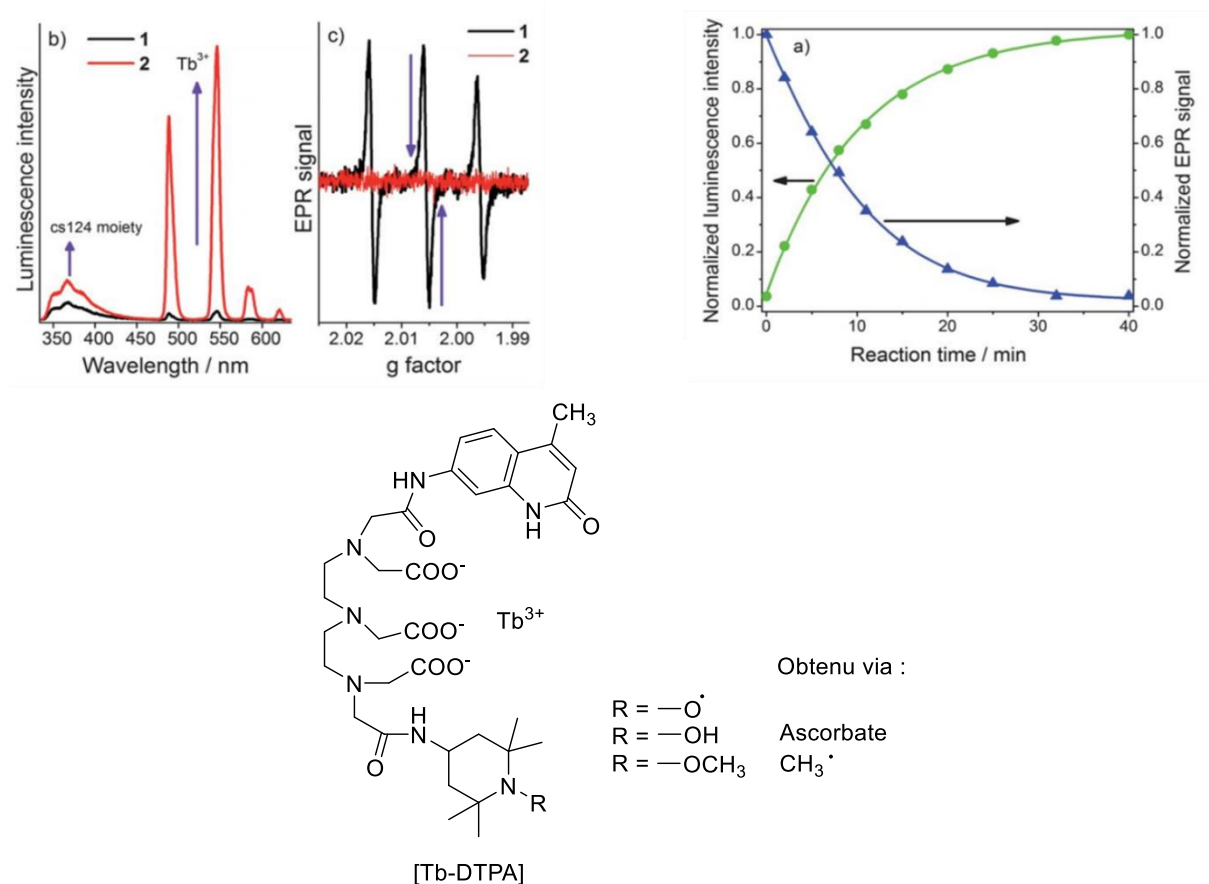


Figure I-47 : Sonde bimodale IO/RPE du groupe de X. Guo et al. Image modifiée de la référence^[99].

1.6.3.3 Travaux précédents de notre équipe

Notre équipe possède une expertise dans le design de nouveaux ligands pro-radicalaires et a récemment synthétisé des complexes de lanthanide dont le ligand contient des groupements phénolates^[100]. Il s'agit de structures tripodes contenant trois unités phénolates tertbutylées et méthoxylées. Ainsi l'oxydation des groupements phénolates en phénoxyles provoque une diminution drastique de la luminescence (Figure I-48). Ce

phénomène peut s'expliquer par une modification des niveaux d'énergie du ligand ou une altération du processus de transfert d'énergie au lanthanide.

- 1ère Oxydation (0,2 V):

Extinction de luminescence 75%

- 2ème Oxydation (0,5 V):

Extinction de luminescence 90 %

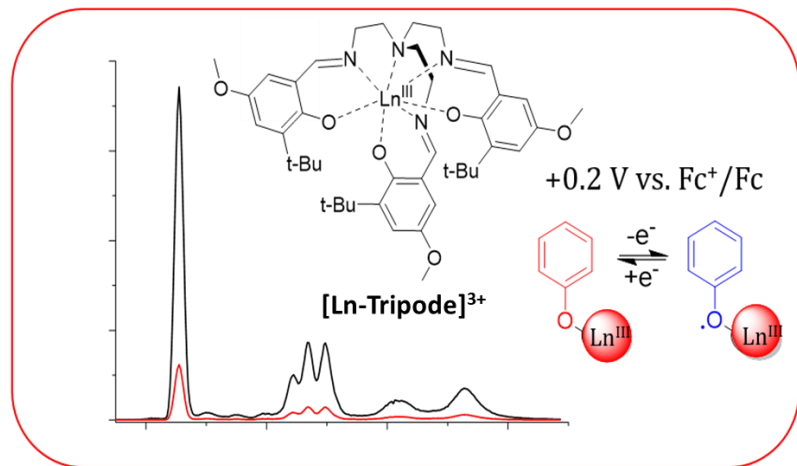


Figure I-48 : Extinction de la luminescence d'un complexe de lanthanide $[\text{Ln-Tripode}]^{3+}$ développé par notre équipe^[100].

L'incorporation des unités rédox dans des macrocycles stables semble donc être un bon moyen de détecter le stress oxydant. Notre équipe par la suite a mis au point deux complexes d'ytterbium et d'euprimum $[\text{Ln-Tripode}]^{3+}$ comportant une unité α -iminohydroxylamine (IH) qui agissent comme sondes pour radicaux libres. Isolés sous forme d'une α -iminohydroxylamine, ces complexes montrent une luminescence propre au métal et une absence de signal en RPE puisqu'il s'agit d'une unité diamagnétique (ces deux lanthanides relaxent trop vite à température ambiante). En présence de radicaux OH^\bullet , une oxydation du groupement IH en groupement iminonitroxyde (IN) a lieu (Figure I-49). Ceci provoque une diminution de la luminescence de l'ordre de 20% et l'apparition d'un signal caractéristique en RPE. Après plusieurs jours, le signal continue d'évoluer et le complexe est converti en radical nitronyl nitroxyde^[101].

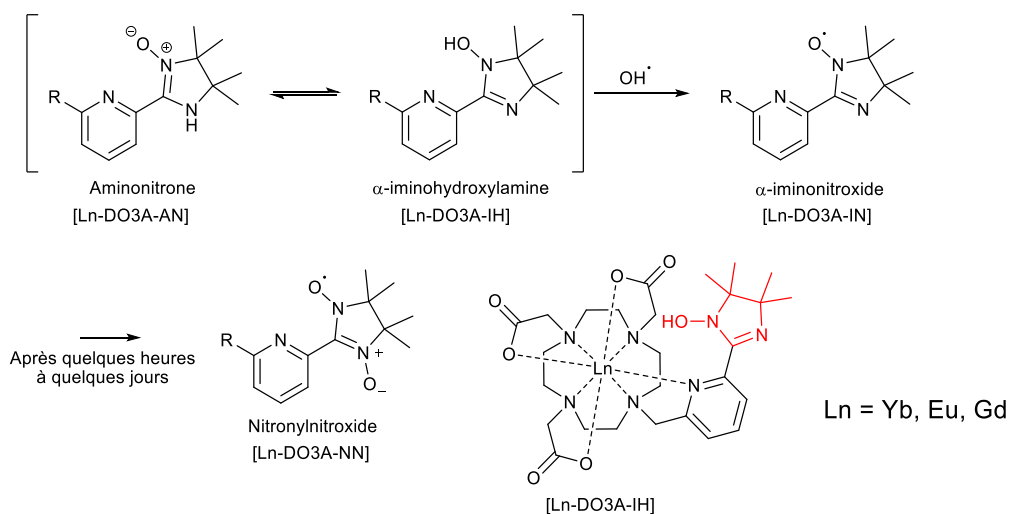


Figure I-49 : Principe de détection de radicaux hydroxydes par des sondes pro-radicalaires α -iminohydroxylamine et structure de $[\text{Ln-DO3A-IH}]^{3+}$ ^[101].

Ces complexes valident donc une preuve de concept qui montre qu'une détection en RPE et en luminescence des ROS est possible lorsqu'on utilise des complexes de lanthanides et des ligands pro-radicalaires. Ceci démontre l'intérêt de mettre au point des nouveaux complexes avec des ligands rédox-actifs sensibles à l'environnement rédox et un lanthanide comme rapporteurs de cette détection.

1.7 OBJECTIF DE CE TRAVAIL

Cette thèse a pour objectif de concevoir, synthétiser et étudier en détail des sondes rédox-actives contenant des lanthanides (III) et une fonction rédox pour une détection du stress oxydant par ParaCEST et par luminescence.

Mon projet s'appuie sur la forte expérience de l'équipe CIRE sur les ligands rédox non-innocents pour préparer de nouvelles sondes utilisant les lanthanides. Notre approche exploite l'activité rédox du ligand pour détecter le stress oxydant et les lanthanides comme rapporteurs. En fonction de l'état d'oxydation du ligand, les propriétés magnétiques et spectroscopiques du lanthanide seront altérées et donneront des signaux distincts (Figure I-50).

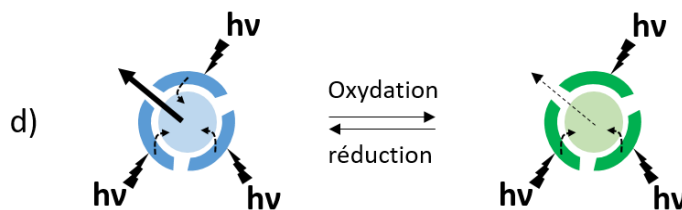


Figure I-50 : Altération du signal dépendant de l'état d'oxydation du ligand.

Le design des ligands doit être tel que la détection par luminescence et/ou ParaCEST soit possible. Alors qu'un bon agent de contraste en IRM nécessitera une à deux molécules d'eau dans sa sphère de coordination, le métal disposera de nombreux oscillateurs qui atténueront sa luminescence. Contrôler le nombre de molécule d'eau dans la première sphère de coordination du métal est donc un objectif primordial (Figure I-51).

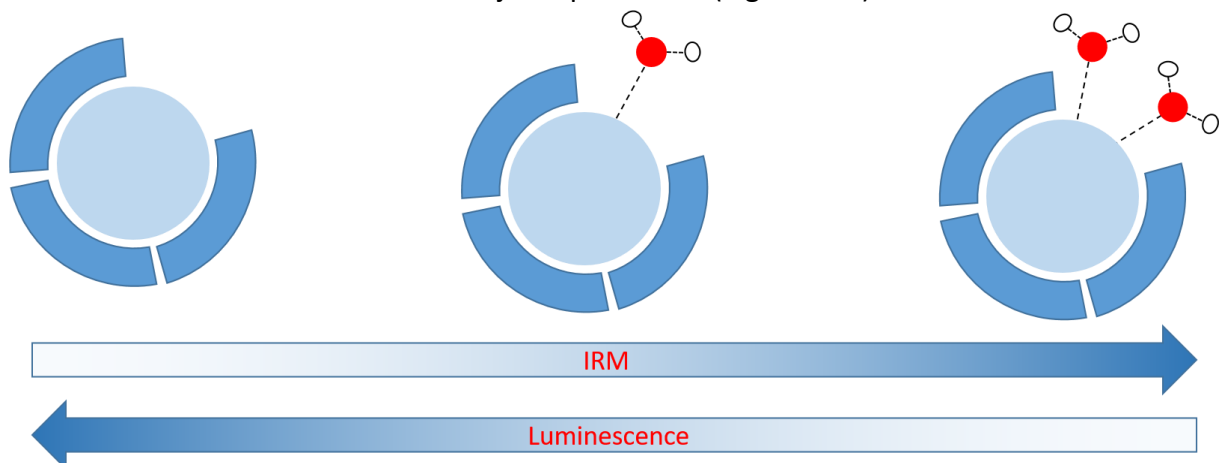


Figure I-51 : Compromis à adopter pour obtenir une sonde bimodale.

En élaborant un complexe ne possédant pas de molécule d'eau coordonnée et possédant des protons issus de fonctions amides échangeables, nous pourrions par exemple disposer d'un agent de contraste bimodal efficace. Pour résumer, il nous faudra considérer les éléments suivants pour la conception des ligands :

- *Le macrocycle (en noir, Figure I-52)* : le cyclène (1,4,7,10-tetraazacyclododécane) possède 4 azotes pouvant être fonctionnalisés par simple substitutions nucléophiles et bénéficie de l'effet chélate pour la bonne stabilité des complexes de lanthanides.
- *Le métal (en noir, Figure I-52)* : les propriétés magnétiques et spectroscopiques des lanthanides rendent ces métaux particulièrement intéressants en tant que rapporteurs pour une détection spécifique et sensible. Nous nous focaliserons sur l'euporium principalement dans ce travail.
- *Un bras versatile (en vert, Figure I-52)* : l'incorporation d'un bras versatile permet de pouvoir modifier à sa guise le complexe une fois formé. Nous pouvons alors ajouter un alcyne et le fonctionnaliser par chimie « click » afin d'ajouter des chromophores, des peptides, des chaînes alkyles, etc... Il est aussi possible de fonctionnaliser directement le chromophore lors de la synthèse ou encore incorporer un second bras rédox.
- *Une unité active en CEST (en bleu, Figure I-52)* : la technique CEST étant extrêmement sensible à l'environnement, il est difficile de prévoir l'activité en CEST. Par contre la présence de bras contenant des protons échangeables et/ou une molécule d'eau dans la sphère de coordination peut donner lieu à des signaux CEST. Afin de disposer d'un grand nombre de protons échangeables, nous avons choisi de nous focaliser dans un premier temps sur des fonctions amides simples. Par la suite ces fonctions amides seront substituées de sorte à obtenir un signal plus important.
- *Une unité rédox active (en rouge, Figure I-52)* : afin de détecter le stress oxydant, notre ligand doit disposer d'une unité stable, réversible et capable de changer en fonction de l'état rédox de son environnement. Nous allons nous concentrer sur deux différents précurseurs qui sont dérivés de nitroxydes (l'aminotEMPO et le nitronyl nitroxyde). Ces unités possèdent des potentiels d'oxydo-réductions compatibles avec la fenêtre rédox biologique et ses applications. De plus, ils peuvent exister sous au moins deux états d'oxydation stable (radicale et diamagnétique). La distance entre l'unité rédox active et le lanthanide doit être contrôlée afin qu'un changement de degré d'oxydation sur le ligand influence significativement les propriétés de luminescence et magnétique du métal.

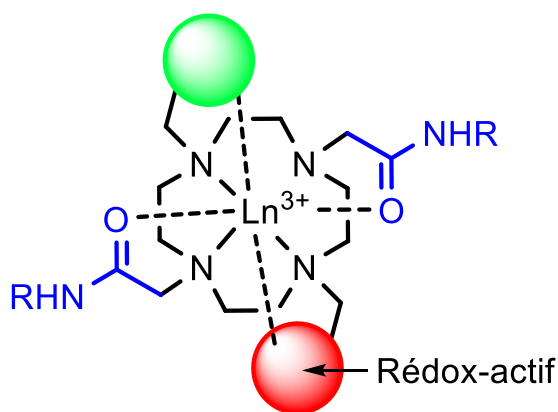


Figure I-52 : Design général des complexes de lanthanides.

Les travaux présentés dans ce manuscrit portent donc sur le développement de nouveaux complexes combinant ces différentes propriétés. Leurs synthèses, caractérisations, efficacités de détection et propriétés biologiques seront décrites dans les prochains chapitres.

- ❖ Le premier chapitre portera sur l'étude de composés simples, possédant une seule unité rédox. Les effets du nitroxyde sur l'activité CEST pourront alors être étudiés en détails.
- ❖ Le deuxième chapitre portera sur l'étude de composé dissymétrique comportant une unité rédox active et une antenne permettant une détection en luminescence et en CEST.
- ❖ Le troisième chapitre portera sur l'étude des composés symétriques comportant deux unités rédox actives identiques pour une sensibilité accrue.
- ❖ Enfin le dernier chapitre portera sur l'étude des composés symétriques comportant deux unités qui auront à la fois une activité rédox et le rôle d'antenne.

II. CHAPITRE 2 : COMPLEXES INTEGRANT UN RADICAL STABLE : D₁, D₂

| | | |
|------------|--|-----|
| II.1 | DESIGN DES COMPLEXES [Ln.D ₁] ³⁺ ET [Ln.D ₂] ³⁺ | 67 |
| II.2 | SYNTHESE DES LIGANDS ET DES COMPLEXES | 69 |
| II.2.1 | <i>Synthèse du ligand D₁</i> | 70 |
| II.2.2 | <i>Synthèse du ligand D₂</i> | 73 |
| II.2.2.1 | Voie de Sherry et Woods pour obtenir le DO2AM (9) | 73 |
| II.2.2.2 | Voie « Glyoxal » pour obtenir le DO2AM (9) | 75 |
| II.2.2.3 | Incorporation des fonctions alcyne et TEMPO | 76 |
| II.2.2.4 | Structure du ligand D ₂ | 77 |
| II.2.3 | <i>Formation des complexes</i> | 77 |
| II.3 | ETUDES ELECTROCHIMIQUES ET SPECTROSCOPIQUES DES COMPLEXES | 80 |
| II.3.1 | <i>Etude électrochimique des ligands et complexes</i> | 80 |
| II.3.1.1 | Etude des ligands et de leurs complexes dans l'acétonitrile | 81 |
| II.3.1.1.1 | Généralités sur les propriétés rédox des fonctions nitroxydes | 81 |
| II.3.1.1.2 | Etude électrochimique des ligands et complexes | 82 |
| II.3.1.1.3 | Etude électrochimique de nitroxydes précurseurs dans l'acétonitrile et dans l'eau | 85 |
| II.3.1.1.4 | Etude électrochimique des complexes en présence d'acide et base dans l'acétonitrile | 87 |
| II.3.1.1.5 | Etude des ligands et de leurs complexes dans l'eau | 87 |
| II.3.2 | <i>Etudes des complexes par spectroscopie d'absorption et luminescence</i> | 88 |
| II.3.2.1 | Spectroscopie d'absorption UV-Vis | 88 |
| II.3.2.2 | Spectroscopie de luminescence | 90 |
| II.3.2.3 | Détermination du nombre de molécule d'eau coordonnée | 92 |
| II.3.3 | <i>Etudes des complexes par Résonance paramagnétique électronique</i> | 94 |
| II.3.3.1 | Spectres RPE des ligands D ₁ et D ₂ | 95 |
| II.3.3.2 | Spectres RPE des complexes de lanthanides [Ln.D ₁] ³⁺ et [Ln.D ₂] ³⁺ | 96 |
| II.3.3.2.1 | Complexes d'Ytterbium | 96 |
| II.3.3.2.2 | Complexes de Dysprosium | 98 |
| II.3.3.2.3 | Complexes d'Europium | 99 |
| II.3.3.2.4 | Complexes de Gadolinium | 99 |
| II.3.4 | <i>Spectroscopie CEST des complexes</i> | 100 |
| II.3.4.1 | Spectroscopie CEST des complexes d'europium | 101 |
| II.3.4.2 | Spectroscopie CEST des complexes d'ytterbium et de dysprosium | 103 |
| II.3.4.3 | Influence de l'état rédox sur l'activité CEST | 104 |
| II.3.5 | <i>Etude théorique par la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT)</i> | 106 |
| II.3.6 | <i>Etudes de la relaxivité des complexes</i> | 109 |
| II.3.7 | <i>Etudes biologiques des complexes</i> | 110 |
| II.3.7.1 | Les tests de cytotoxicité | 110 |
| II.3.7.2 | Pénétration cellulaire | 111 |
| II.4 | BILAN ET PERSPECTIVES | 113 |

II.1 DESIGN DES COMPLEXES [Ln.D₁]³⁺ ET [Ln.D₂]³⁺

L'objectif de cette première partie est d'évaluer l'influence du caractère paramagnétique de la fonction nitroxyde sur l'effet CEST des protons échangeables dans une série de complexes. Le premier complexe (Figure II-1, gauche) est composé de trois fonctions acétamides et d'une fonction nitroxyde. Pour permettre une fonctionnalisation ultérieure, le design de la deuxième famille de complexes a inclus une fonction alcyne. Il sera ainsi possible par chimie « click » de fonctionnaliser ce complexe avec des unités de vectorisation, des antennes, etc...

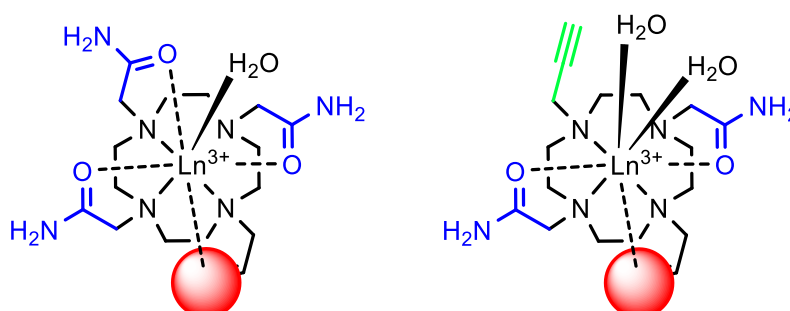


Figure II-1 : Design général des deux premières séries de complexes. A gauche : le complexe [Ln.D₁]³⁺ ; à droite : le complexe [Ln.D₂]³⁺.

Afin qu'un signal soit visible en ParaCEST, la vitesse d'échange du proton que l'on souhaite observer doit être ni trop rapide, ni trop lente. Le type de fonction chélatante utilisée influence grandement les vitesses d'échanges dans un complexe de lanthanide (Figure I-9). Dans le cas des complexes portant des fonctions carboxylates (du type DOTA), la charge négative est proche du métal ; la liaison métal-H₂O est faible et la molécule d'eau s'échange rapidement. Pour un complexe de [Gd(DOTA)], la vitesse d'échange de la molécule d'eau est de l'ordre de $4,1 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$, soit un temps de résidence de la molécule d'eau sur le centre métallique de 24 ns^[102,103]. Lorsqu'on substitue les fonctions carboxylates par des fonctions acétamides, la charge partielle δ^- se délocalise et s'éloigne du métal. La liaison métal-H₂O est raccourcie avec pour conséquence une diminution de la vitesse d'échange.

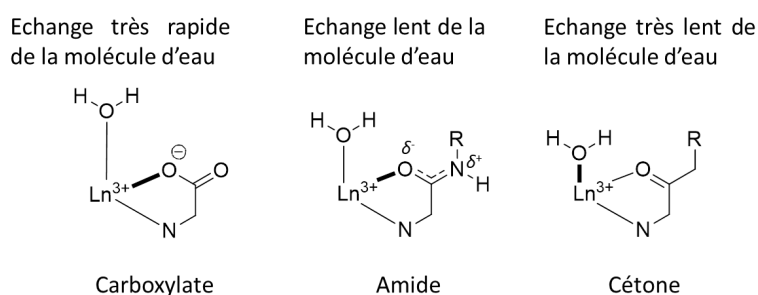


Figure I-9 : Influence des fonctions chimiques sur la vitesse d'échange de la molécule d'eau.

Pour le complexe [Gd(DOTAM)]³⁺ il existe deux conformations (deux isomères) appelés SAP (conformation anti prismatique carrée) et TSAP (conformation anti prismatique carrée

distordue) qui diffèrent par une inversion du sens des bras et une inversion du cycle (Figure II-2). Chaque forme se trouve en équilibre en solution et possède sa propre vitesse d'échange et temps de résidence. Le temps de résidence est $3 \mu\text{s}$ pour un isomère (vitesse d'échange de $0,33 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$) et $120 \mu\text{s}$ pour l'autre.

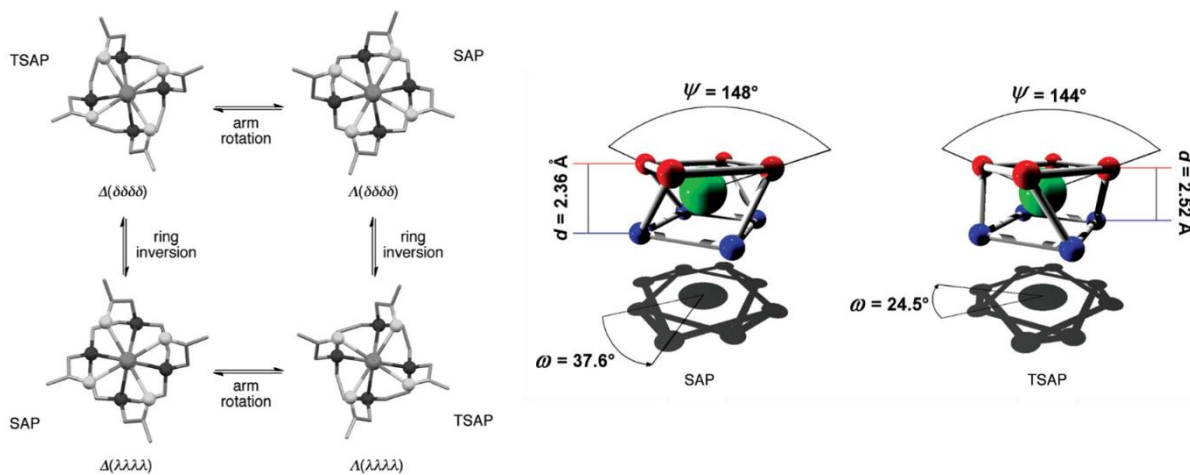


Figure II-2 : Stéréochimie d'un complexe métallique avec un ligand de type cyclène. Images empruntées des références^{[104][18]}.

Le gadolinium bien que largement utilisé comme agent de contraste en IRM n'est pas utilisé en imagerie ParaCEST ; celui-ci n'induit en effet pas de déplacement de résonance à cause de son isotropie et la vitesse d'échange est de manière générale trop élevée.

Afin d'obtenir un contraste de type ON/OFF lors d'un stimulus rédox, une différence notable d'effet CEST doit être observée lors du changement d'état rédox de la fonction nitroxyde. Le déplacement chimique d'un noyau situé à proximité d'un lanthanide est la somme de la contribution diamagnétique du noyau (due à son environnement chimique en l'absence du lanthanide) et d'une contribution paramagnétique provoquée par la présence du lanthanide (soit $\delta = \delta^{\text{dia}} + \delta^{\text{para}}$).

Dans notre cas, il existe deux contributions paramagnétiques différentes lorsque notre complexe est oxydé sous sa forme nitroxyde : $\delta = (\delta^{\text{dia}} + \delta^{\text{para}}_{\text{lanthanide}} + \delta^{\text{para}}_{\text{nitroxyde}})$. Lorsque le complexe est sous sa forme réduite, la seule contribution paramagnétique est celle du lanthanide.

Dans ses travaux de 2013^[105], D. Sherry *et al.* ont mis au point un complexe d'euprium symétrique comportant deux unités nitroxydes et deux fonctions acétamides substituées (Figure II-3). Le complexe sous cette forme présente un signal paraCEST à 51 ppm provenant de la molécule d'eau coordonnée sur l'euprium avec une activité faible de 2%. Le temps de relaxation longitudinal de ce complexe est de 0,2 seconde. Après réduction des nitroxydes en hydroxylamines par l'acide ascorbique, l'activité CEST s'accroît à près de 20%. Le temps de relaxation longitudinal de ce complexe atteint 2,6 secondes, provoqué par la diminution du paramagnétisme lors de la réduction des nitroxydes portés par le ligand. Le temps de résidence τ_M d'environ $85 \mu\text{s}$, n'évolue pas, montrant que la vitesse d'échange de la molécule d'eau n'est pas à l'origine de l'augmentation de l'activité en CEST.

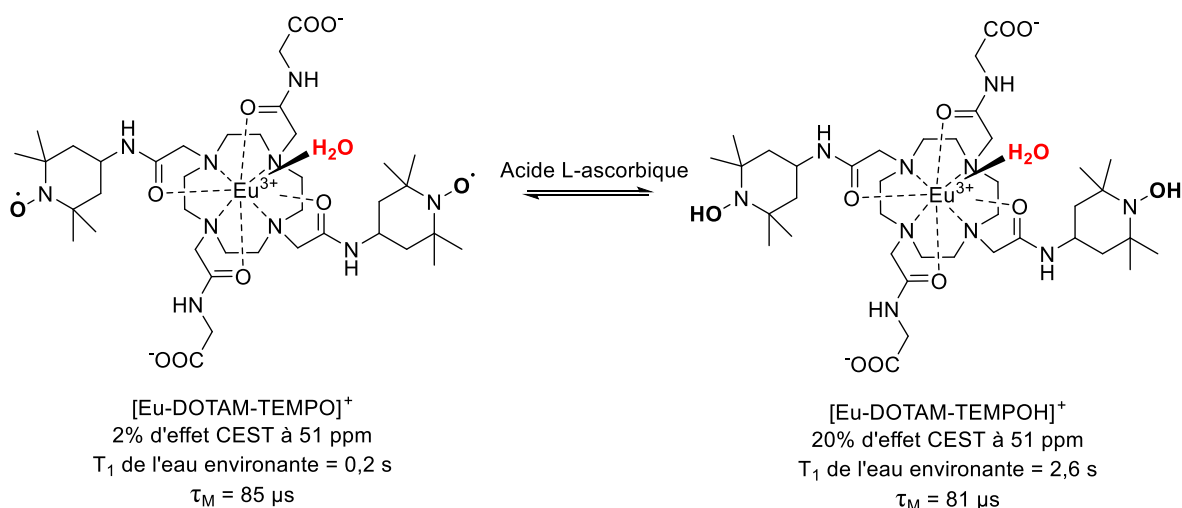


Figure II-3 : Complexe $[\text{Eu-DOTAM-TEMPO}]^+$ présentant un effet CEST à 51 ppm dont l'intensité augmente lors de la réduction des nitroxydes en hydroxylamines.

Les auteurs ont donc conclu que le signal CEST de la molécule d'eau liée au métal peut être modulé par le temps de relaxation T_1 des protons de l'eau, qui est lui-même contrôlé par l'état rédox des groupements nitroxydes.

II.2 SYNTHÈSE DES LIGANDS ET DES COMPLEXES

La chimie du cyclène est très décrite dans la littérature et les synthèses de dérivés sont généralement focalisées sur de « simples » fonctionnalisations. La purification est par contre un challenge à part entière. Nous avons synthétisé des complexes de type DOTAM dissymétriques. Il existe de nombreuses fonctions de protection qui permettent de désymétriser et fonctionnaliser les cyclènes régiosélectivement^[106,107]. En choisissant les différentes protections judicieusement, il est possible de proposer plusieurs voies de synthèse pour chaque ligand. Pour la synthèse du premier ligand D₁, deux voies de synthèse sont possibles, soit en incorporant les fonctions acétamides puis l'unité aminoTEMPO (Figure II-4, a), soit la séquence inverse plus courte (Figure II-4, b) que nous avons choisi de suivre.

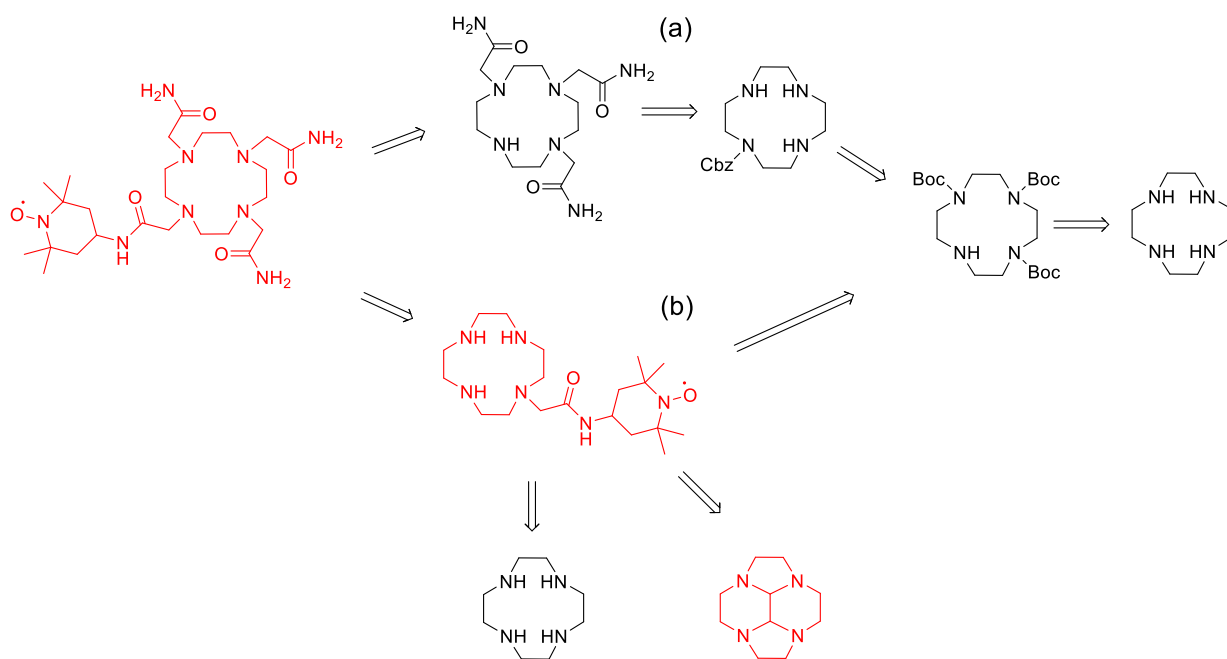


Figure II-4 : Rétrosynthèse possible du ligand D_1 . En rouge le chemin suivi préférentiellement.

Concernant la synthèse du ligand D_2 , trois fonctions différentes sont présentes sur le cyclène ce qui entraîne une phase d'optimisation plus importante. Deux voies ont retenu notre attention : la première (Figure II-5, a) consiste à protéger un cyclène par des groupements Cbz (carboxybenzyles) qui ont la particularité de substituer régiosélectivement les 2 azotes opposés. La deuxième voie envisagée (Figure II-5, b) utilise un cyclène préalablement protégé par une fonction aminale que nous appellerons par la suite « cyclène glyoxal ». Ces deux voies de synthèse ont été étudiées.

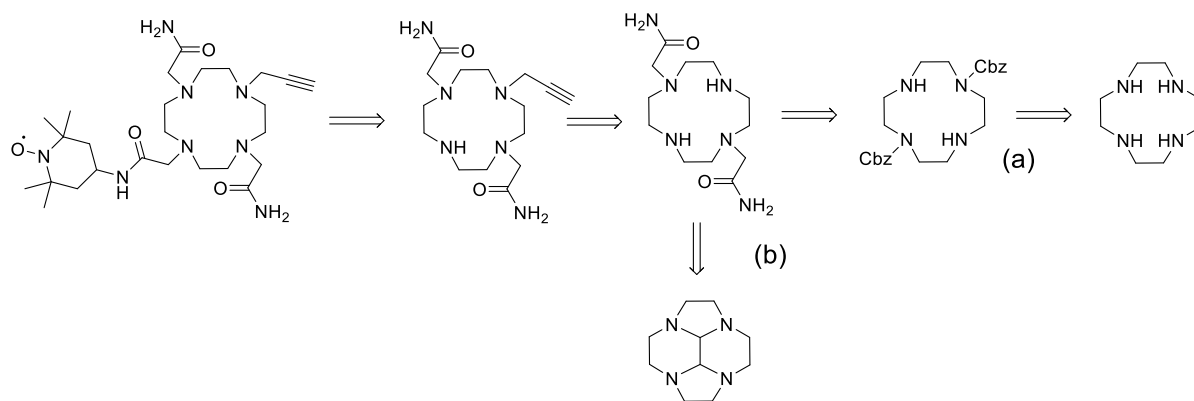


Figure II-5 : Rétrosynthèse possible du ligand D_2 .

II.2.1 Synthèse du ligand D_1

La première étape (commune aux deux ligands D_1 et D_2) est la synthèse de l'unité redox active à coupler au macrocycle, le radical 4-(2-chloroacétamido)-2',2',6',6',-tetraméthylpiperidine-1'-oxyl (2). L'aminotEMPO est choisi dans un premier temps car c'est

un radical stable à l'air, facile à manipuler et étudié depuis de nombreuses années (Cf introduction). Le produit commercial 4-aminoTEMPO (1) a été couplé avec le chlorure de chloroacétyle afin d'obtenir le composé (2) avec un rendement de 85% (Figure II-6). Le chloroacétamide permet par la suite de réaliser une réaction de substitution nucléophile sur une des fonctions amines libres du cyclène.

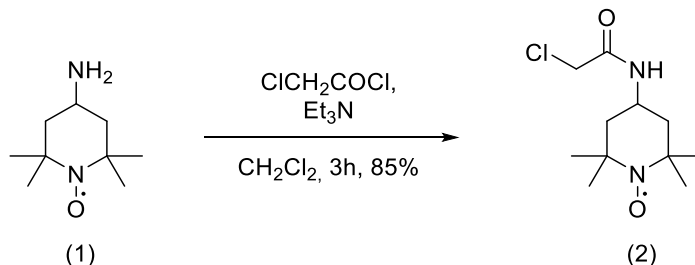


Figure II-6 : Formation de l'unité aminoTEMPO (2).

Différentes voies de synthèse peuvent mener à un cyclène monosubstitué^[106] : la plus simple consiste à fonctionnaliser le cyclène commercial (3) en se plaçant en milieu dilué et en utilisant 1 équivalent de l'unité aminoTEMPO (2). Les radicaux organiques sont connus pour être réactifs et par conséquent sensibles aux conditions expérimentales. Les conditions de protection/déprotection employées peuvent être trop extrêmes et affecter la stabilité du nitroxyde. Pour cette raison, la substitution préalable du nitroxyde a été réalisée, suivie par la fonctionnalisation des autres fonctions acétamides (Figure II-7).

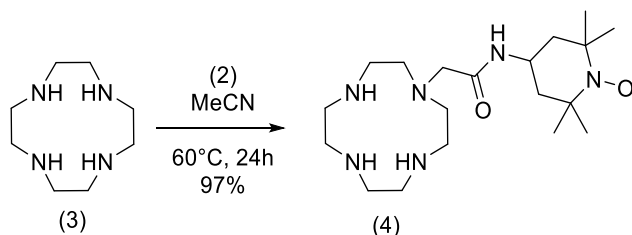


Figure II-7 : Monosubstitution du bras aminoTEMPO (2) sur le cyclène.

La conversion de la réaction de substitution du composé (2) est totale (97%) mais conduit à un mélange de cyclène monosubstitué ou bisubstitué dont la séparation sur colonne est un défi à part entière. Une difficulté supplémentaire dans la purification de ces espèces est la tendance du nitroxyde à se réduire en conditions acides, donnant plusieurs espèces sur la CCM (chromatographie sur couche mince). Nous avons donc exploré d'autres voies de synthèse utilisant des protections sélectives des fonctions amines. R. Tripier^[107] *et al.* ont montré par exemple qu'en faisant réagir le 2-bromoacétamide avec du cyclène glyoxal (5) (Figure II-8) dans le THF, une mono-alkylation quantitative était possible.

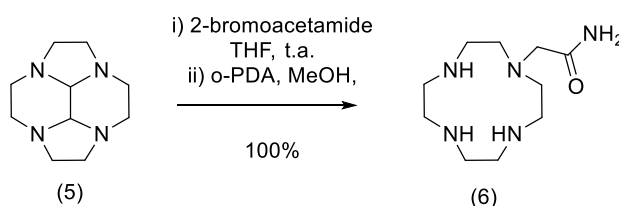


Figure II-8 : Monosubstitution du cyclène glyoxal.

Chapitre 2

En suivant donc ce schéma, nous avons fait réagir notre unité aminoTEMPO (2) avec le cyclène glyoxal (5) dans le THF (Figure II-9). Après déprotection en utilisant de l'*o*-phénylènediamine (*o*-PDA), le composé monosubstitué (4) est obtenu avec un rendement de 33%.

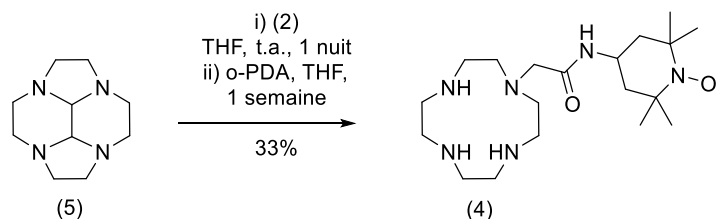


Figure II-9 : Monosubstitution de l'unité aminoTEMPO (2) sur le cyclène glyoxal.

L'étape qui suit consiste à substituer les atomes d'azotes restants par le 2-bromoacétamide. Le premier ligand D_1 est obtenu avec un rendement de 99% (Figure II-10).

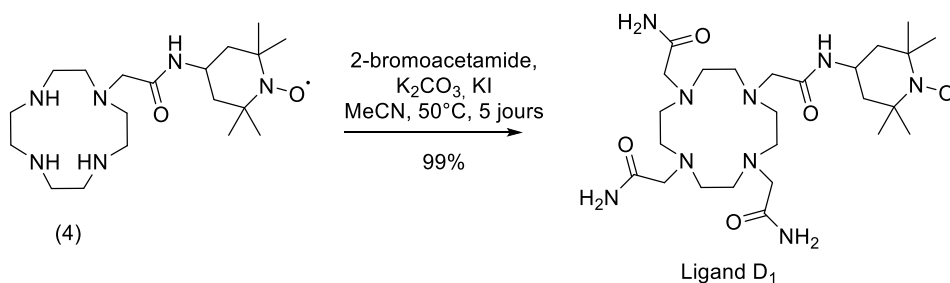
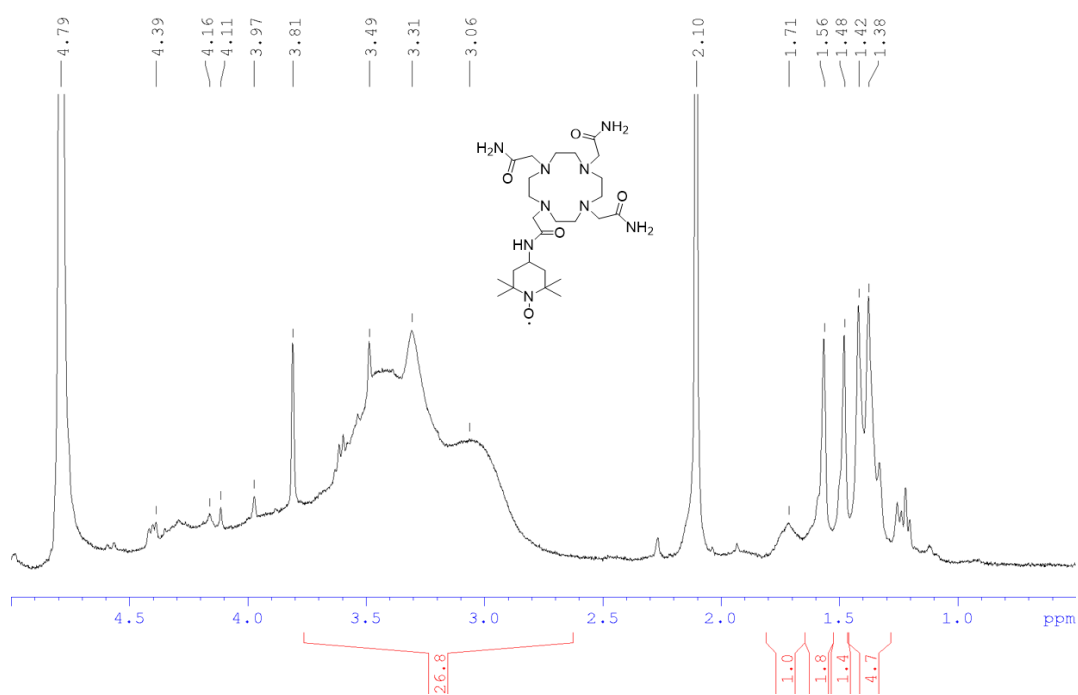
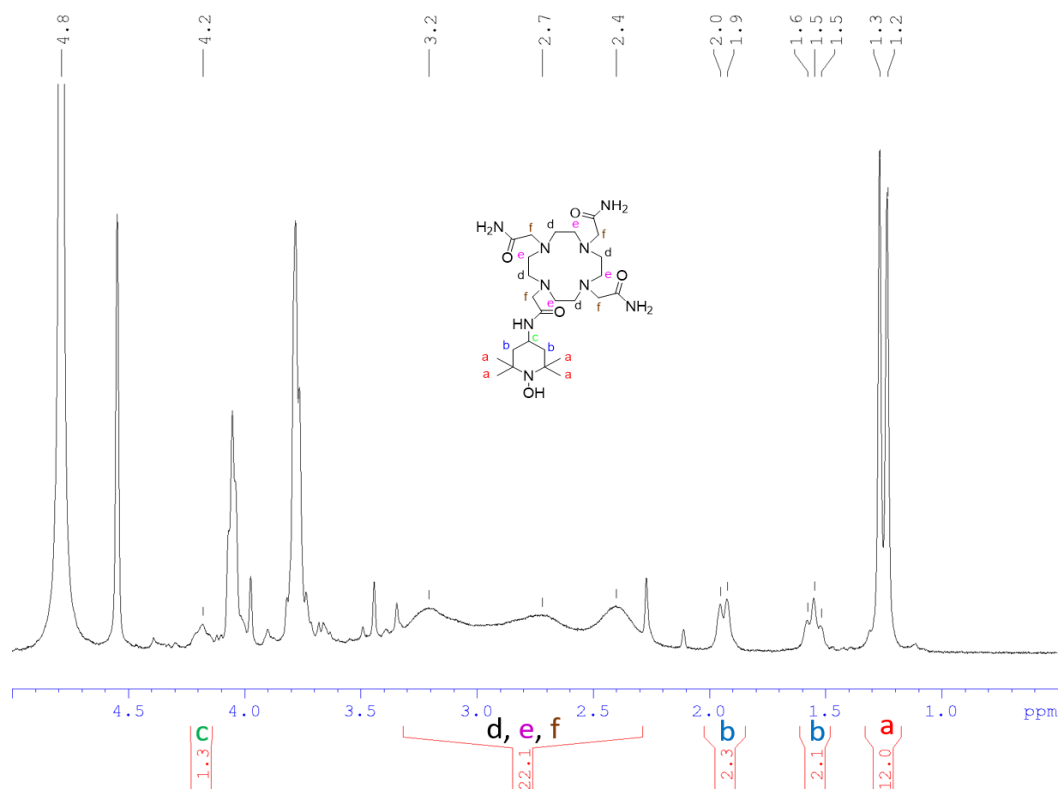


Figure II-10 : Réaction de trisubstitution du 2-bromoacétamide pour obtenir le ligand D_1 .

Le spectre RMN du ligand D_1 est difficilement interprétable du fait du paramagnétisme associé au nitroxyde (Figure II-11). Il a donc également été enregistré en présence d'ascorbate de sodium, visant à réduire la fonction nitroxyde en hydroxylamine diamagnétique (Figure II-12).



Dans ces conditions des signaux caractéristiques du TEMPOH (forme hydroxylamine) apparaissent (Figure II-12). Le doublet à 1,25 ppm correspondant aux 4 CH₃ (a) du TEMPOH. Le triplet à 1,55 ppm et le doublet à 1,94 ppm intégrant chacun pour 2 hydrogènes et correspondant aux protons du cycle TEMPOH (b). Sous une conformation chaise^[108], les signaux issus des protons axiaux et équatoriaux ne sont pas entièrement équivalents expliquant cette multiplicité.



II.2.2 Synthèse du ligand D₂

Le ligand D₂ se différencie du ligand D₁ par la présence d'une fonction alcyne à la place d'une fonction acétamide. La synthèse du ligand D₂ est donc plus délicate et nécessite l'utilisation de groupements protecteurs. La voie de synthèse permettant d'obtenir le DO2AM (9) est basée sur la protection par des groupements Cbz (carboxybenzyle), suivie de la substitution successive des deux autres atomes d'azotes et de la déprotection des groupements Cbz.

II.2.2.1 Voie de Sherry et Woods pour obtenir le DO2AM (9)

Une voie de synthèse a été développée par D. Sherry *et al.*^[109] en 2007 mais présente cependant l'inconvénient d'être assez longue (environ 6 jours de réaction pour un rendement global de 57%) (Figure II-13).

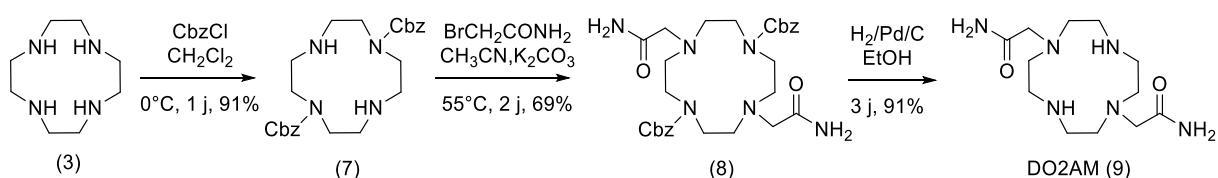


Figure II-13 : Voie de synthèse du DO2AM développée par D. Sherry et M. Woods^[109].

Dans l'optimisation d'une molécule assez similaire telle que le DO2A-*t*Bu (11), une méthode plus rapide a été développée par M. Allen *et al.*^[110] et a permis d'obtenir la molécule avec un rendement global de 63% pour moins de 2 heures de réaction (Figure II-14), avec des températures un peu plus élevées et une déprotection pallado-catalysée au micro-onde.

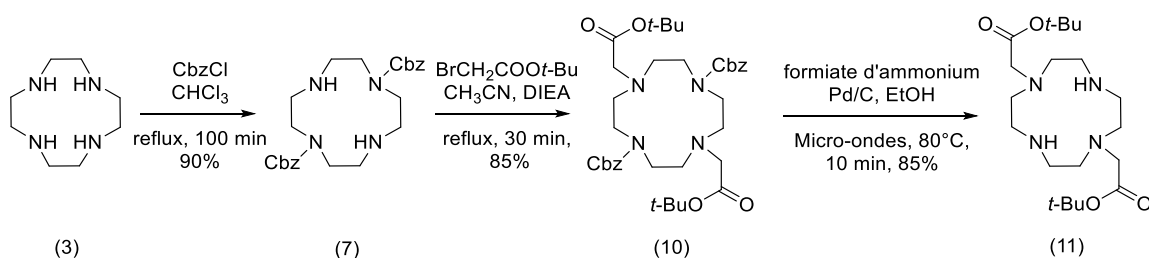


Figure II-14 : Voie de synthèse du DO2A développée par L. Hopper et M. Allen^[110].

En combinant les deux voies de synthèse et en appliquant les conditions optimisées par M. Allen pour obtenir le composé DO2AM (9), les temps de réaction ont été largement réduits permettant l'isolation du produit en une journée de réaction (au lieu des 6 jours) et efficace avec un rendement global sur 3 étapes de 62% (Figure II-15).

Complexes intégrant un radical stable : D₁, D₂

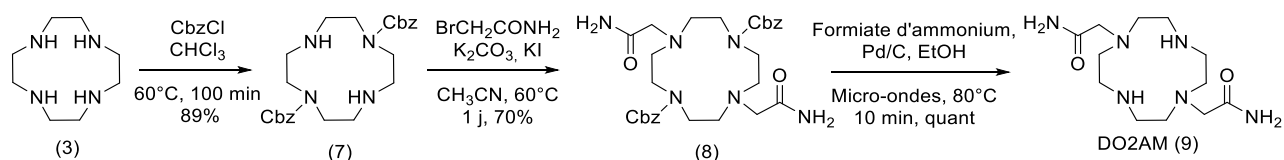


Figure II-15 : Voie de synthèse développée dans ce travail.

Cette synthèse rapide et efficace du DO2AM présente malgré tout quelques inconvénients. L'étape de déprotection au micro-onde est problématique car malgré l'excellent rendement, la quantité de réactif à déprotéger est conséquente et nécessite une dizaine de manipulations. La formation d'un sel est aussi constatée lors de l'utilisation du formiate d'ammonium (agent de déprotection). Ceci entraîne la rigidification de la structure et donne une belle définition des signaux en RMN (Figure II-16). Cependant la nature du sel obtenu n'a pas pu être clairement établie et la masse de ligand ne peut donc être déterminée précisément, ce qui rend les quantités engagées dans les synthèses suivantes moins fiables.

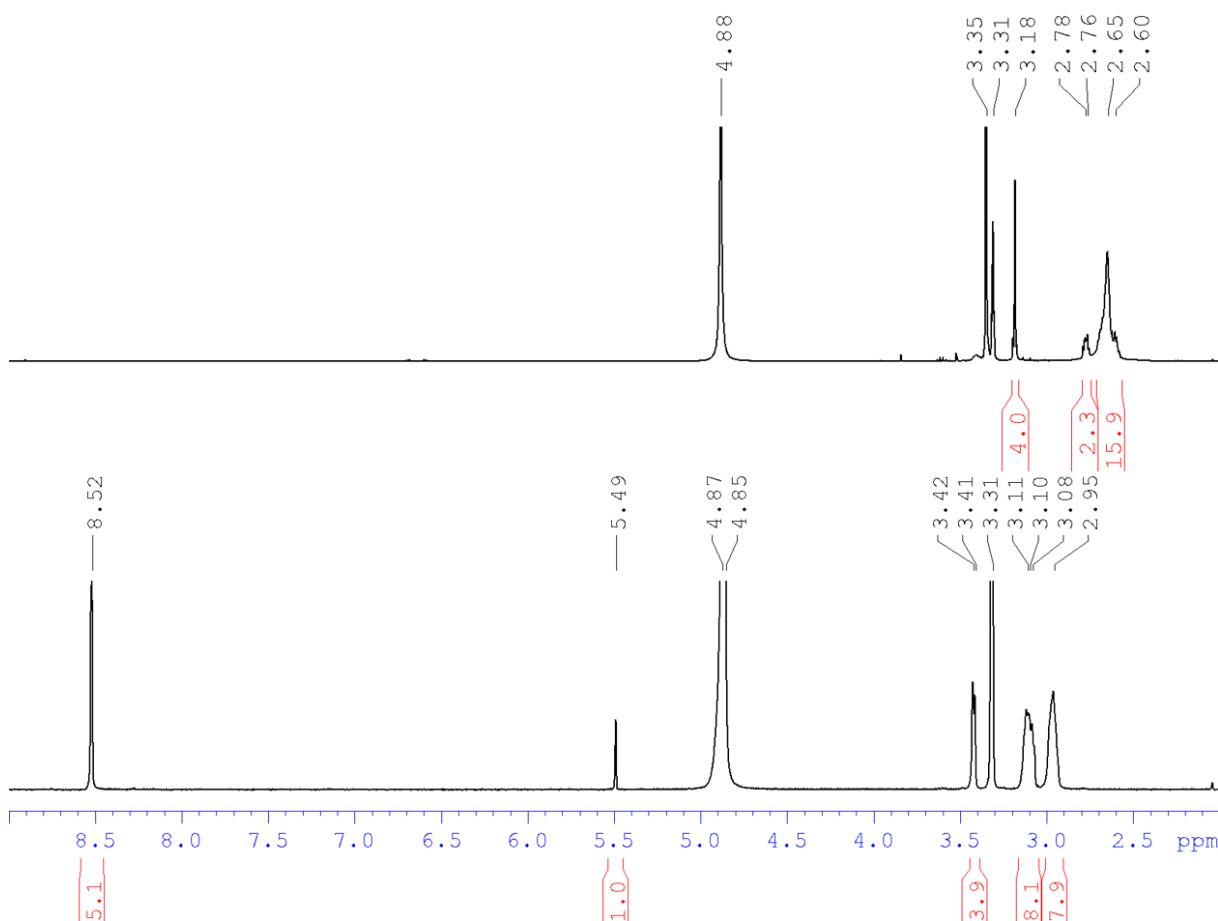


Figure II-16 : En haut : spectre RMN ¹H du DO2AM obtenu via la méthode de R. Tripiet et al. En bas : le spectre RMN du DO2AM obtenu après déprotection au formiate d'ammonium au micro-onde.

Le produit (9) en présence d'un équivalent de bromure de propargyle après 4 jours de réaction à 50°C permet d'obtenir le composé (12) avec un rendement n'excédant pas 39% (Figure II-17).

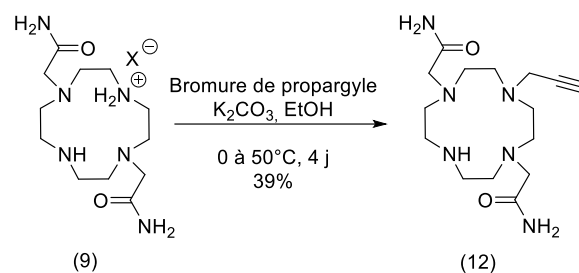


Figure II-17 : Substitution du bromure de propargyle rendu difficile par un sel situé sur le cyclène.

II.2.2.2 Voie « Glyoxal » pour obtenir le DO2AM (9)

Une deuxième voie de synthèse permettant d'obtenir le DO2AM (9) a été mise au point par R. Tripier *et al.*^[107]. En partant d'un cyclène protégé par une fonction aminale (5) en réaction avec le 2-bromoacétamide dans de l'acétonitrile, le sel (5') précipite sélectivement (Figure II-18). Après une déprotection en utilisant de l'*ortho*-phénylènediamine suivie d'une déprotonation en présence de carbonate de césium, le produit désiré (9) est obtenu avec un excellent rendement de 98% sur 3 étapes. Cette voie sera privilégiée pour la suite.

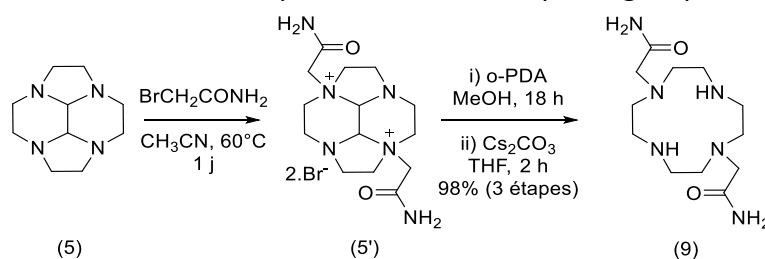


Figure II-18 : Synthèse du DO2AM en utilisant la méthode décrite par R. Tripier *et al.*

II.2.2.3 Incorporation des fonctions alcyne et TEMPO

Les fonctions propargyle et TEMPO sont introduites sur (9) de façon séquentielle : la fonction propargyle est incorporée en premier et la fonction TEMPO est ajoutée en dernier lieu pour faciliter les caractérisations. En effet le paramagnétisme du TEMPO complique l'analyse des spectres RMN. Expérimentalement nous avons remarqué que le DO2AM est plus difficile à fonctionnaliser que le DO2A, avec une cinétique plus longue. La réaction de monosubstitution sélective est donc plus simple à réaliser sur le DO2AM. Le bromure de propargyle est ainsi ajouté dilué à 0°C en présence d'acétate de sodium (comme base). La réaction est chauffée à 50°C pendant 4 jours pour obtenir le composé (12) avec un très bon rendement de 93%.

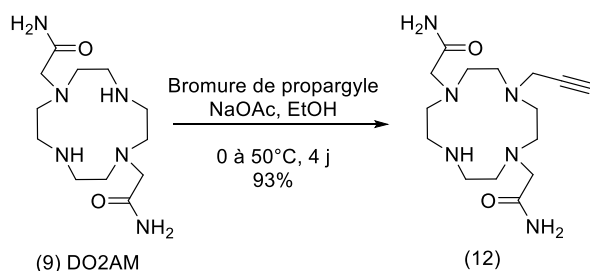


Figure II-19 : Ajout de la fonction alcyne, étape clé dans la formation du ligand D₂.

La fonction TEMPO est introduite sur le synthon (12). Afin de favoriser cette 4^{ème} substitution, le bicarbonate de potassium est utilisé comme base et l'iodure de potassium est ajouté en quantité stœchiométrique pour favoriser la substitution nucléophile (Figure II-20).

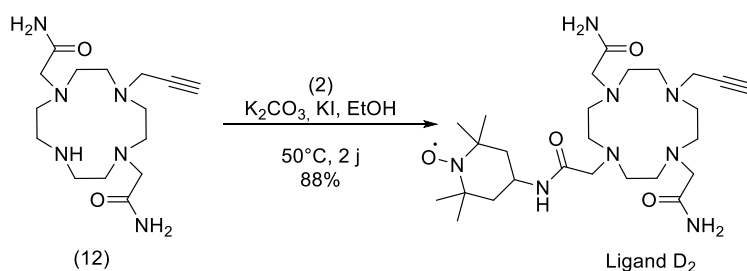


Figure II-20 : Formation du ligand D₂.

Le rendement est de 88% sur cette dernière étape ; le ligand D₂ est ainsi obtenu avec un rendement global sur 4 étapes de 80%. Le ligand cristallise sous forme de blocs orangés par évaporation lente d'une solution aqueuse de D₂.

II.2.2.4 Structure du ligand D₂

La structure par diffraction des RX du ligand D₂ est présentée dans la Figure II-21. Dans cette structure un cation Na⁺ est chélaté par le macrocycle et des halogénures (0,5 Br⁻ et 0,5 Cl⁻) compensent la charge apportée par le métal.

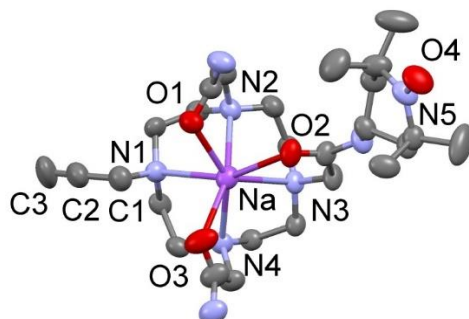


Figure II-21 : Structure par diffraction des rayons X du ligand D₂ complexé au sodium (les contre ions et les atomes d'hydrogènes sont omis).

L'ion sodium est heptacoordiné. Les distances Na-N sont comprises entre 2,527 et 2,436 Å, tandis que les distances Na-O sont comprises entre 2,398 et 2,436 Å. La liaison C2-C3 du bras

portant la fonction alcyne est de 1,17 Å, ce qui confirme le caractère triple de la liaison. Enfin la longueur de la liaison N5-O4 sur le bras opposé est de 1,289 Å, ce qui correspond aux distances classiques d'un radical TEMPO.

II.2.3 Formation des complexes

Les deux ligands étant solubles dans l'eau, les complexes de lanthanides sont formés dans l'eau à pH contrôlé. Le contrôle du pH lors de la complexation est nécessaire car un pH trop acide entrainerait la protonation du ligand et pourrait ralentir ou empêcher la complexation. A l'inverse un pH trop élevé entrainerait la précipitation de l'hydroxyde de lanthanide $\text{Ln}(\text{OH})_3$. Le ligand D_1 est donc mis en réaction avec les différents sels de triflates dans l'eau à $\text{pH} = 7$. Après une nuit à 60°C , les complexes de la série $[\text{Ln}.\text{D}_1]^{3+}$ sont obtenus avec des rendements allant de 27% à 100%. Les complexes résultants sont trichargés, possèdent trois contre-ions et sont isolés par précipitation dans l'éther diéthylique (Figure II-22).

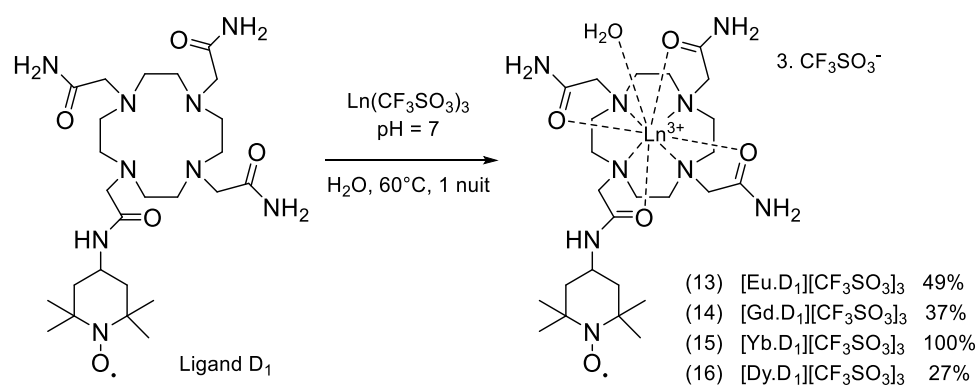


Figure II-22 : Complexation du ligand D_1 dans l'eau.

Les complexes de la série $[\text{Ln}.\text{D}_2]^{3+}$ sont synthétisés de la même manière et sont obtenus avec des rendements allant de 83% à 96%. Les complexes résultants sont trichargés, possèdent trois contre-ions et sont isolés par précipitation dans l'éther diéthylique (Figure II-23).

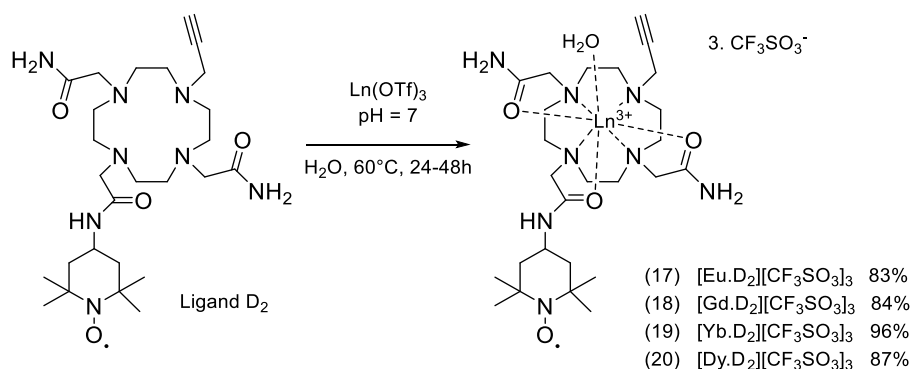


Figure II-23 : Complexation du ligand D_2 dans l'eau.

Les complexes ont été caractérisés par spectroscopie RMN, RPE, infrarouge et spectrométrie de masse. Le caractère paramagnétique des lanthanides et des ligands rend toutefois l'interprétation des spectres RMN très ardue. Le blindage ou le déblindage dépendent fortement du métal utilisé. Le complexe [Yb.D₁]³⁺ sous forme réduite (hydroxylamine) par exemple comporte des résonances distribuées dans une gamme comprise entre -60 et 100 ppm alors que le complexe [Yb.D₂]³⁺ montre des signaux bien définis sur une gamme allant de -83 à 80 ppm (Figure II-24, haut). Les signaux provenant des protons des fonctions amides (celles qui nous intéresseront pour les mesures CEST) se situent généralement entre -20 et 25 ppm^[40,111] mais ne peuvent malheureusement pas être clairement attribués. Le complexe [Eu.D₂]³⁺ présente des signaux très larges et mal définis dans une gamme allant de -20 à 25 ppm (Figure II-24, bas). De plus, les signaux associés aux protons proches du nitroxyde s'élargissent tellement qu'ils ne sont plus observables.

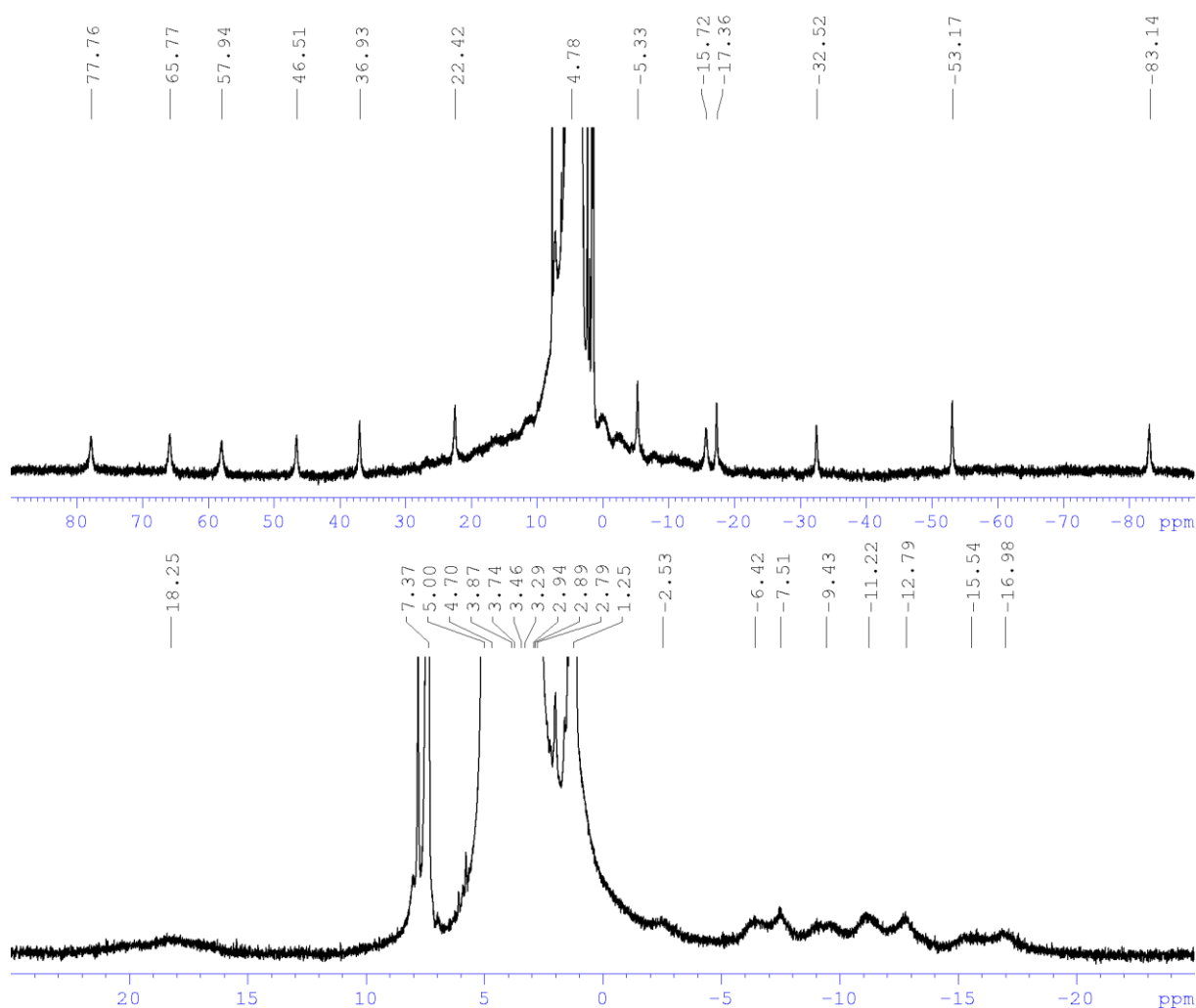


Figure II-24 : RMN de [Yb.D₂]³⁺ dans D₂O après réduction à l'ascorbate (haut) à 500 MHz ; RMN de [Eu.D₂]³⁺ dans D₂O à 400 MHz (bas).

En spectrométrie de masse, les complexes se sont avérés être très sensibles à la puissance d'ionisation rendant l'obtention d'un spectre délicate. Les complexes [Gd.D₁]³⁺ et [Yb.D₁]³⁺ présente le pic moléculaire attendu pour une masse [M+(CF₃SO₃)]²⁺, avec un m/z expérimental de 431.13 et 440.77, respectivement, et des profils caractéristiques des

lanthanides utilisés (Figure II-25). On notera à cet effet que la molécule d'eau coordonnée au lanthanide, si elle est présente n'est pas observable en spectrométrie de masse (liaison M-O trop faible). La masse M utilisée dans le calcul est donc celle du complexe en absence de cette molécule d'eau. Le complexe $[\text{Eu.D}_1]^{3+}$ présente le pic associé à l'espèce $[\text{M}+2(\text{CF}_3\text{SO}_3)]^+$, avec un m/z expérimental de 1005,18, tandis que le complexe $[\text{Dy.D}_1]^{3+}$ présente le pic associé au complexe sans contre-ion.

La série D₂ est la plus sensible à l'ionisation et seuls les complexes $[\text{Eu.D}_2]^{3+}$ et $[\text{Yb.D}_2]^{3+}$ ont donné une réponse en spectrométrie de masse, avec un pic à m/z = 229.39 ($[\text{M}]^{3+}$) pour le premier et 1304.89 ($[\text{M}+4(\text{CF}_3\text{SO}_3)]^-$) pour le deuxième.

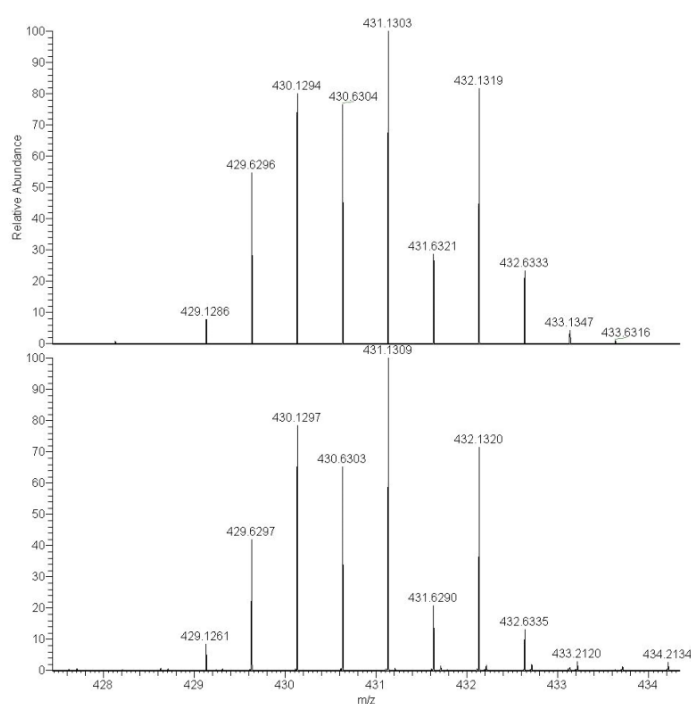


Figure II-25 : Spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS) obtenue pour le complexe de $[\text{Gd.D}_1]^{3+}$. Spectre calculé pour $\text{C}_{25}\text{H}_{49}\text{O}_5\text{N}_9\text{GdCF}_3\text{SO}_3$ $[\text{M}+\text{CF}_3\text{SO}_3]^{2+}$ m/z = 431,1303 (dication, haut) ; Spectre expérimental pour $[\text{Gd.D}_1]^{3+}(\text{CF}_3\text{SO}_3)$ m/z = 431,1309 (dication, bas).

La spectroscopie RPE des complexes sera présentée en détails dans la suite de ce travail.

II.3 ETUDES ELECTROCHIMIQUES ET SPECTROSCOPIQUES DES COMPLEXES

II.3.1 Etude électrochimique des ligands et complexes

L'électrochimie est une technique qui nous permet d'étudier et de caractériser des processus rédox pouvant être associés au ligand (plus spécifiquement à l'unité nitroxyde) ou au métal. En combinant des techniques comme la voltampérométrie cyclique (CV), la voltampérométrie à impulsion différentielle (DPV) et la voltampérométrie par électrode

tournante (RDE), il est possible de déterminer le potentiel rédox, la réversibilité et le mécanisme rédox. Les ligands et complexes des séries [Ln.D₁]³⁺ et [Ln.D₂]³⁺ ont été étudiés dans l'acétonitrile contenant 0,1 M de TBAP (perchlorate de tétra-n-butylammonium) et dans l'eau contenant 0,1 M de tampon TRIS/HCl à 298K. Les potentiels électrochimiques seront rapportés soit au couple Fc⁺/Fc utilisé comme référence externe dans l'acétonitrile (potentiel d'environ 0,09 V par rapport à l'électrode de référence utilisée, AgNO₃ à 0,01 M) soit au couple Fc⁺-Et₃N⁺/Fc-Et₃N⁺ utilisé comme référence externe dans l'eau (potentiel d'environ 0,376 V par rapport à l'électrode de référence utilisée, Electrode au Calomel Saturé – ECS). A titre de comparaison, le potentiel du couple Fc⁺-Et₃N⁺/Fc-Et₃N⁺ dans le tampon TRIS/HCl est de 0,073 V vs AgNO₃ 0,01 M dans MeCN. Pour convertir les potentiels mesurés on utilisera la relation suivante : E (vs ECS) = E (vs ENH) - 0,241 V.

II.3.1.1 Etude des ligands et de leurs complexes dans l'acétonitrile

II.3.1.1.1 Généralités sur les propriétés rédox des fonctions nitroxydes

Les nitroxydes sont des espèces présentant deux processus rédox distincts. Le nitroxyde (TEMPO) peut s'oxyder en oxo-ammonium (TEMPO⁺) ou se réduire en hydroxylamine (TEMPOH) (Figure II-26).

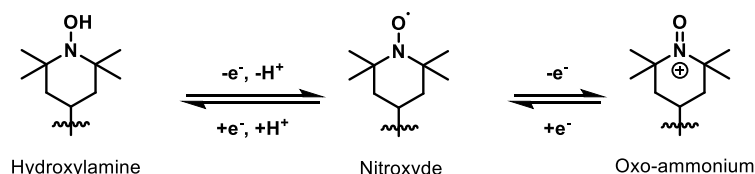


Figure II-26 : Réactions rédox ayant lieu autour du nitroxyde.

Lorsqu'on étudie ces systèmes par voltampérométrie cyclique, on observe la vague associée au système oxo-ammonium/nitroxyde lors d'un balayage en oxydation, (Figure II-27). Lorsque l'oxo-ammonium formé est stable à l'échelle de temps de la mesure, la vague est réversible et la différence entre les potentiels de pic anodique (E_p^a) et cathodique (E_p^c) est de 0,059 V à 298 K. Si l'oxo-ammonium est instable à l'échelle de temps de la mesure, une vague irréversible est observée, qui se traduit par l'observation d'un pic anodique (E_p^a), sans pic cathodique (E_p^c) associé situé 0,059 V plus bas. Lors d'un balayage en réduction, une vague associée au couple nitroxyde/hydroxylamine est observée. Cette vague est systématiquement irréversible du fait d'une réaction chimique couplée au transfert d'électron. Cette réaction est un transfert de proton couplé au transfert d'électron (« PCET »).

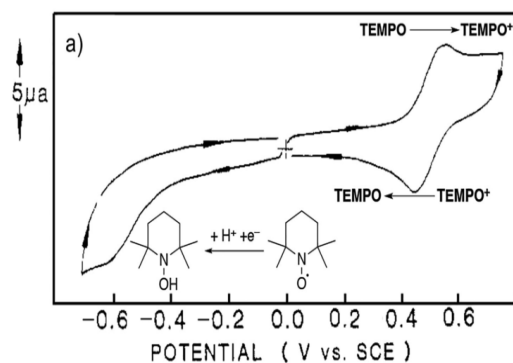


Figure II-27 : Voltampérométrie cyclique d'un TEMPO classique. Repris de la référence^[116].

Des unités TEMPO ont été étudiées dans la littérature (Tableau II-A) et ces études montrent que le substituant porté par l'unité TEMPO influence les potentiels rédox du nitroxyde. Le processus d'oxydation est indépendant du pH et s'observe à des potentiels compris entre 0,74 V (pour les composés nommés s-TEMPO, Amine-TEMPO, 8-cyclo-TEMPO) et 0,90 V (O-TEMPO) vs NHE en fonction du substituant présent sur le cycle^[117] (Figure II-28).

Tableau II-A : Potentiel $E_{1/2}$ (V vs NHE) des différents nitroxydes issus de la référence^[117]. Le potentiel $E_{1/2}$ (V vs $Fc^+-Et_3N^+ / Fc-Et_3N^+$) a été calculé à partir du potentiel $E_{1/2}$ (V vs NHE) pour comparer avec les composés issus de ce travail.

| Composé | $E_{1/2}$ (V vs NHE) | $E_{1/2}$ (V vs $Fc^+-Et_3N^+ / Fc-Et_3N^+$) | ref |
|---------------|----------------------|---|-------|
| s-TEMPO | 0,75 | 0,07 | [117] |
| Amide-TEMPO | 0,86 | 0,18 | [117] |
| O-TEMPO | 0,90 | 0,22 | [117] |
| Amine-TEMPO | 0,74 | 0,06 | [117] |
| 8-cyclo-TEMPO | 0,74 | 0,06 | [117] |

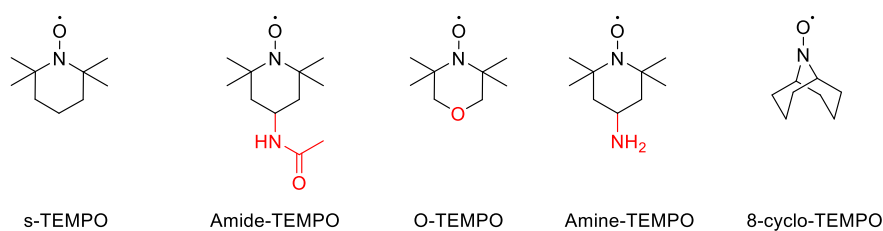


Figure II-28 : Composés de la littérature étudiés et renommés depuis la référence^[117].

II.3.1.1.2 Etude électrochimique des ligands et complexes

Les courbes de voltampérométrie cyclique des ligands D_1 et D_2 comportent une vague réversible en oxydation à $E_{1/2} = 0,25$ et $0,31V$ respectivement, associée au système oxo-ammonium ($TEMPO^+$) / nitroxyde (TEMPO) et un système irréversible en réduction à $E_p^c \approx -1,1 V$ vs Fc^+/Fc associé à la réduction du nitroxyde en hydroxylamine. Cette valeur est proche de celle de la réduction de l'oxygène dans le solvant considéré. La différence de potentiel d'oxydation est surprenante compte tenu de la distance importante entre l'unité TEMPO (identique pour les deux composés) et les fonctions acétamide/alcyne qui seules diffèrent dans le ligand libre. Une hypothèse permettant d'expliquer ce phénomène est la

coordination d'un ion sodium Na⁺. L'effet de substituant pourrait alors se manifester via la différence de coordination et donc de charge partielle au niveau du métal. La fonction acétamide de l'unité TEMPO étant coordonnée, la valeur du potentiel E_{1/2} sera alors affectée sensiblement (Figure II-29). Une vague d'oxydation supplémentaire, irréversible (Figure II-29, *), s'observe à un potentiel E_p^a ≈ 0 - 0,1 V vs Fc⁺/Fc.

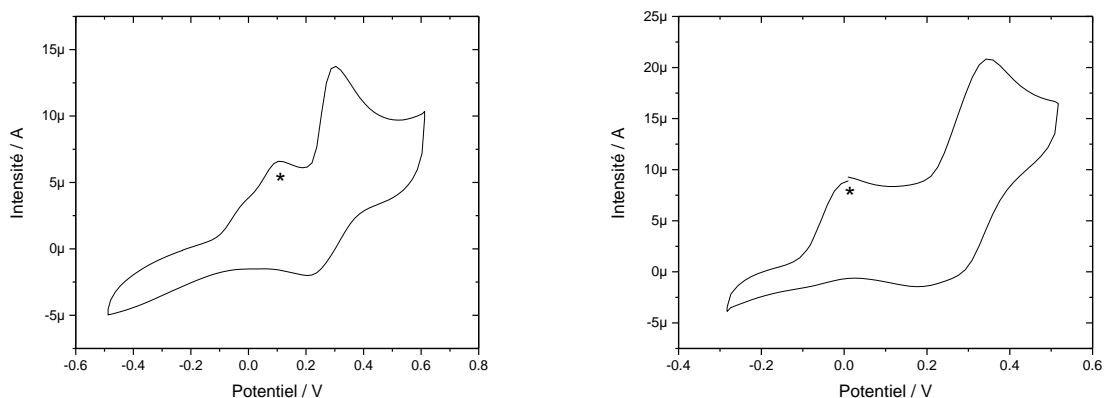


Figure II-29 : Courbes de voltampérométrie cyclique des ligands D₁ (gauche) et D₂ (droite) à 0,5 mM dans une solution de CH₃CN contenant 0,1 M de TBAP comme électrolyte de support. Toutes les valeurs de potentiels sont données en V par rapport au couple rédox Fc⁺/Fc. T = 298 K ; vitesse de balayage : 0,1 V/sec. Les paramètres pour le ferrocène par rapport à la référence utilisée (AgNO₃ à 0,01 M) : E_{1/2} = 0,090 V.

Les complexes [Ln.D₁]³⁺ et [Ln.D₂]³⁺ présentent un profil électrochimique très proche (Tableau II-B), c'est-à-dire une vague d'oxydation réversible située entre 0,26 et 0,28 V (pour [Ln.D₁]³⁺) et entre 0,33 et 0,35 V (pour [Ln.D₂]³⁺) correspondant à l'oxydation du nitroxyde (TEMPO) en oxo-ammonium (TEMPO⁺)^[118], ainsi qu'une vague irréversible en réduction correspondant à la réduction du nitroxyde (TEMPO) en hydroxylamine (TEMPOH) à un potentiel de l'ordre de -1,1 V. Les potentiels sont regroupés dans le Tableau II-B.

Tableau II-B : Potentiels d'oxydation E_{1/2} des différents complexes obtenus par électrochimie pour 0,5 mM de complexes dans une solution de CH₃CN contenant 0,1 M de TBAP comme électrolyte de support. Toutes les valeurs de potentiels sont données en V par rapport au couple rédox Fc⁺/Fc. T = 298 K ; vitesse de balayage : 0,1 V/sec. Les paramètres pour le ferrocène par rapport à la référence utilisée (AgNO₃ à 0,01 M) : E_{1/2} = 0,090 V.

| Complexes | E _{1/2} ^{ox} | Complexes | E _{1/2} ^{ox} |
|------------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|
| Ligand D ₁ | 0,25 | Ligand D ₂ | 0,31 |
| [Gd.D ₁] ³⁺ | 0,26 | [Gd.D ₂] ³⁺ | 0,35 |
| [Eu.D ₁] ³⁺ | 0,26 | [Eu.D ₂] ³⁺ | 0,34 |
| [Dy.D ₁] ³⁺ | 0,28 | [Dy.D ₂] ³⁺ | 0,34 |
| [Yb.D ₁] ³⁺ | 0,28 | [Yb.D ₂] ³⁺ | 0,33 |

Une vague d'oxydation supplémentaire et irréversible (matérialisée par la petite étoile, Figure II-30) est observée à un potentiel E_p^a ≈ 0 V (Figure II-30) vs Fc⁺/Fc, comme c'était déjà le cas pour le ligand mais avec une intensité moindre. Les mesures sont effectuées dans l'acétonitrile donc le pH n'est pas contrôlé. Un processus PCET peut donc être à l'origine de cette vague, ce que nous allons confirmer par la suite.

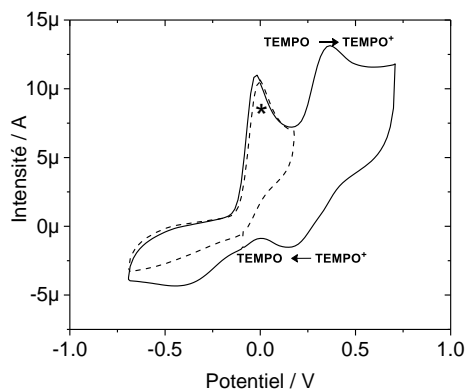
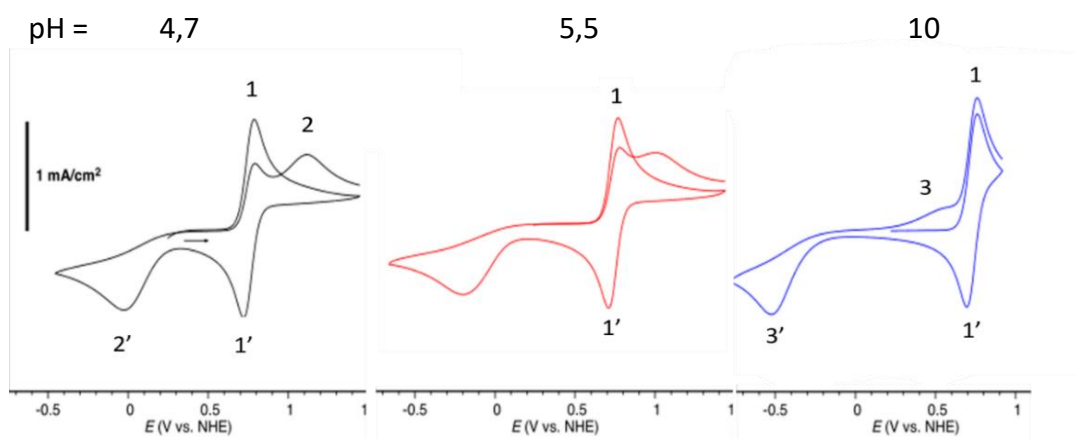


Figure II-30 : Courbes de voltampérométrie cyclique du complexe $[Eu.D_2]^{3+}$ à 0,5 mM en solution dans CH_3CN contenant 0,1 M de TBAP comme électrolyte de support. Toutes les valeurs de potentiels sont données en V par rapport au couple rédox Fc^+/Fc . $T = 298 K$; vitesse de balayage : 0,1 V/sec. Les paramètres pour le ferrocène par rapport à la référence utilisée ($AgNO_3$ à 0,01 M) : $E_{1/2} = 0,090 V$. En pointillé : CV du complexe dans des gammes de potentiels moins larges.

Stahl *et al.* ont effectué une étude électrochimique du TEMPO à différent pH^[117] dans l'eau (Figure II-31). A pH = 4,7 et 5,5, deux vagues sont observées lors d'un balayage en oxydation. Le système (1) dont le potentiel n'évolue pas avec le pH, correspond à l'oxydation du nitroxyde TEMPO en oxo-ammonium $TEMPO^+$. Le système (2) correspond à l'oxydation de l'hydroxylammonium $TEMPOH_2^+$ (Figure II-31) en $TEMPO^+$. A pH = 10, le système (3) correspond à l'oxydation de l'hydroxylamine TEMPOH (Figure II-31) en TEMPO. On pourrait donc imaginer que de l'hydroxylamine (ou l'hydroxylammonium) puisse être présente en solution avant balayage en oxydation dans notre cas et donc qu'un processus PCET se superpose au processus ET (de transfert d'électron) simple du couple $TEMPO^+/TEMPO$. Sa présence pourrait être favorisée en milieu acétonitrile (acide).



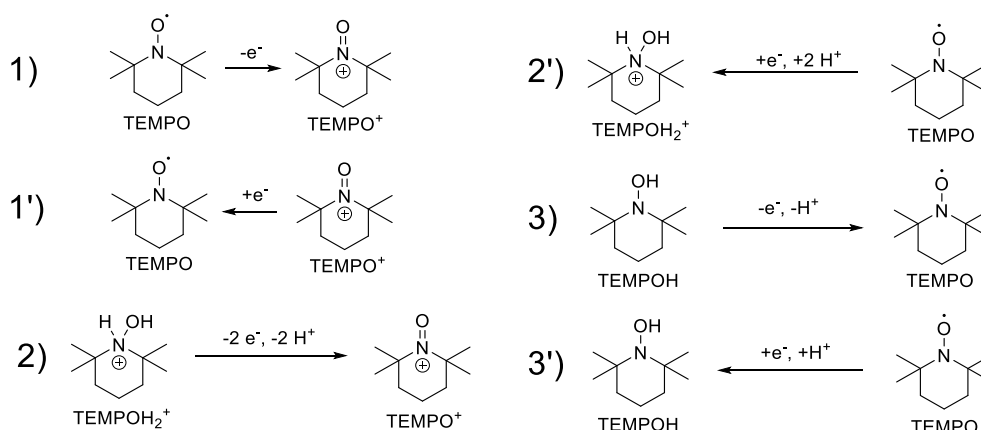


Figure II-31 : Voltampérométrie cyclique d'un nitroxyde de type TEMPO et équilibres rédox associés à différents pH (noir : pH = 4,7 ; rouge : pH = 5,5 ; bleu : pH = 10). Image issue de la référence^[117].

II.3.1.1.3 Etude électrochimique de nitroxydes précurseurs dans l'acétonitrile et dans l'eau

Afin de mieux appréhender ce phénomène de PCET, des précurseurs des complexes [Ln.D₁]³⁺ et [Ln.D₂]³⁺ : le ligand D₂, l'intermédiaire Cl-ACT-TEMPO (2) et le TEMPONMe₂ (21) ont été étudiées. Cette étude a été effectuée dans les mêmes conditions expérimentales que les ligands et complexes (voir ci-dessus) et que les nitroxydes publiés dans la littérature (milieu aqueux) (Figure II-32 et Tableau II-C).

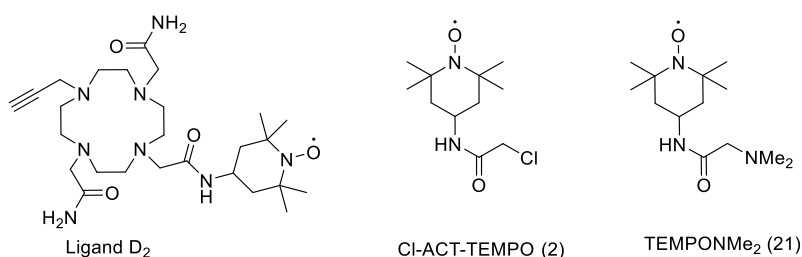


Figure II-32 : Composés étudiés.

Tableau II-C : Valeurs de potentiels $E_{1/2}$ donnés en V vs $Fc^+ - Et_3N^+ / Fc - Et_3N^+$ dans l'eau à pH = 7,4 tamponnée avec 0,1 M de Tampon TRIS/HCl.

| Composé | $E_{1/2}$ (V) (vs NHE) | E_p^c (V) (vs NHE) |
|----------------------------|------------------------|----------------------|
| Ligand D ₂ | 0,05 / (0,73) | - |
| Cl-ACT-TEMPO (2) | 0,17 / (0,85) | -1,1 / (-0,42) |
| TEMPONMe ₂ (21) | 0,21 / (0,89) | -1,0 / (-0,32) |

La voltampérométrie cyclique du composé Cl-ACT-TEMPO (2) montre une vague d'oxydation réversible à un potentiel de 0,17 V vs $Fc^+ - Et_3N^+ / Fc - Et_3N^+$ (Figure II-33) dans l'eau, qui est attribuée au couple $TEMPO^+ / TEMPO$ et qui est conforme aux valeurs rapportées dans la littérature pour des radicaux aminoTEMPO^[117]. Une vague irréversible de réduction s'observe à un potentiel E_p^c de -1,1 V (vs $Fc^+ - Et_3N^+ / Fc - Et_3N^+$) qui semble correspondre à la réduction du nitroxyde TEMPO en hydroxylamine TEMPOH. Le même comportement s'observe dans l'acétonitrile.

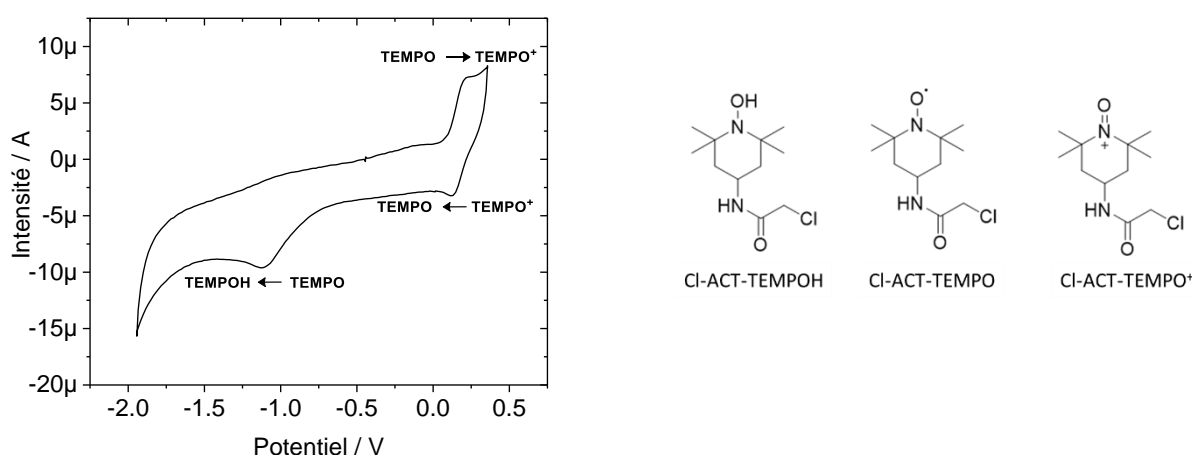


Figure II-33 : Courbe de voltampérométrie cyclique de Cl-ACT-TEMPO (2) en milieu aqueux à 0,5 mM dans tampon TRIS/HCl 0,1 M, pH 7,4. Les valeurs de potentiels sont données en V par rapport au couple rédox $Fc^+-Et_3N^+/Fc-Et_3N^+$. Vitesse de balayage : 0,1 V/s. $T = 298 K$

Lorsque l'unité redox est fonctionnalisée sur une fonction amine du cyclène, on introduit une fonction amine à proximité du nitroxyde. La réduction d'un nitroxyde en hydroxylamine étant gouvernée par un processus PCET, l'introduction d'un groupement acido-basique à sa proximité peut influencer ce processus. Le dérivé TEMPONMe₂ (21) peut servir de référence associant un radical TEMPO et une amine tertiaire de type diméthylamine à proximité (Figure II-32).

La voltampérométrie cyclique du TEMPONMe₂ (21) à pH 7,4 dans l'eau montre une vague d'oxydation réversible associée au couple TEMPO⁺/TEMPO (Figure II-34, gauche). L'introduction d'une amine tertiaire a pour effet d'augmenter sensiblement le potentiel par rapport au Cl-ACT-TEMPO (2) (Tableau II-C).

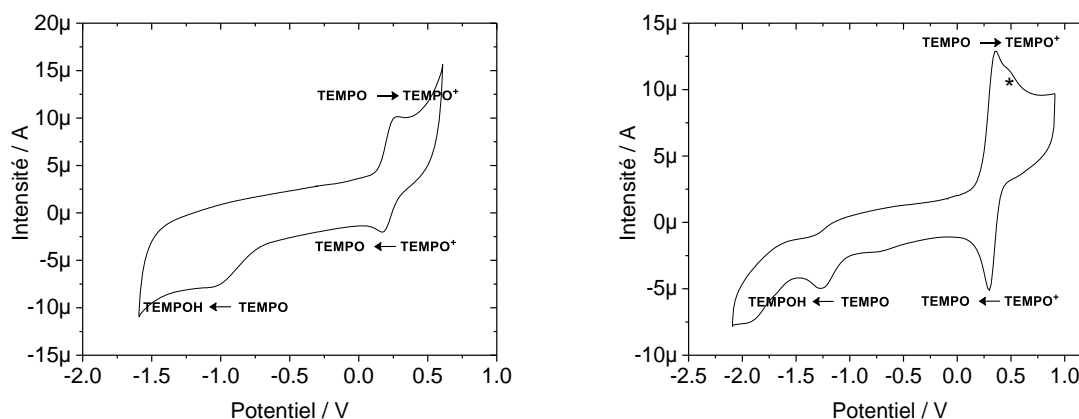


Figure II-34 : (Gauche) Courbes de voltampérométrie cyclique de TEMPONMe₂ (21) à 0,5 mM en milieu aqueux à 0,5 mM dans tampon TRIS/HCl 0.1M, pH 7,4. Potentiel en V vs $Fc^+-Et_3N^+/Fc-Et_3N^+$. (Droite) Courbes de voltampérométrie cyclique de TEMPONMe₂ (21) à 0,5 mM dans le MeCN contenant du TBAP comme électrolyte support (0,1M). Potentiel en V vs Fc^+/Fc . Vitesse de balayage : 0,1 V/s. $T = 298 K$

Dans l'acétonitrile (Figure II-34, droite), la vague d'oxydation réversible est clairement visible tout comme une vague supplémentaire à $E_p^a = 0,4 V$ (*). On peut donc raisonnablement

penser que cette vague supplémentaire est associée à la présence d'une amine au voisinage du nitroxyde et qu'elle s'observe plus facilement dans l'acétonitrile.

II.3.1.1.4 Etude électrochimique des complexes en présence d'acide et base dans l'acétonitrile

Dans le cas des complexes, nous avons étudié l'effet de l'ajout d'un acide comme HClO₄ ou d'une base comme la pyridine. L'évolution de la courbe de voltampérométrie cyclique de [Gd.D₂]³⁺ dans l'acétonitrile au cours de l'ajout d'acide est présentée dans la Figure II-36. Le potentiel de la vague irréversible 1 (Figure II-35) autour de 0 V vs Fc⁺/Fc augmente lorsqu'on ajoute de l'acide perchlorique

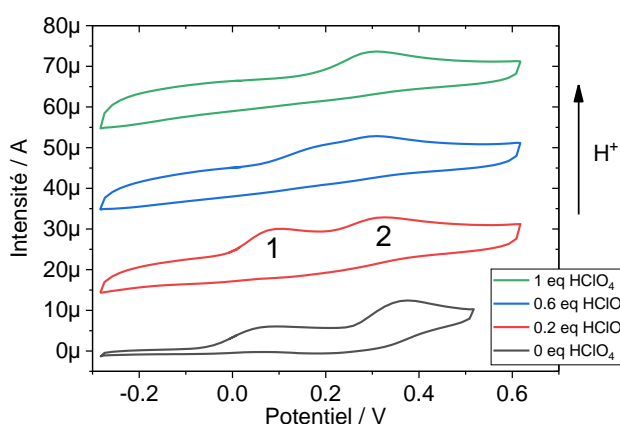


Figure II-36 : Courbes de voltampérométrie cyclique du complexe [Gd.D₂]³⁺ à 0,5 mM dans le MeCN, contenant du TBAP comme électrolyte support (0,1 M) après différents ajout d'acide perchlorique. Potentiel en V vs Fc⁺/Fc. Vitesse de balayage : 0,1 V/s. T = 298 K

Après l'addition d'un équivalent d'acide perchlorique au complexe [Gd.D₂]³⁺, la vague associée au système 1 s'est combinée avec celle du système 2 et seule la vague associée au couple oxo-ammonium/nitroxyde est observée. A l'inverse, l'ajout de pyridine éloigne les 2 systèmes (1 et 2) ce qui signifie que deux espèces en équilibre acido-basique existent en solution et ont des potentiels rédox différents. Afin d'aller plus loin dans la compréhension de ce phénomène, l'étude a été poursuivie dans l'eau en milieu tamponné à différents pH.

II.3.1.1.5 Etude des ligands et de leurs complexes dans l'eau

Le composé [Gd.D₂]³⁺ et son ligand D₂ seront utilisés pour illustrer les résultats de cette étude en fonction du pH. Les composés ont été étudiés en solution aqueuse tamponnée avec (TRIS/HCl) et le pH a été progressivement augmenté par ajout de soude. A pH acide, deux vagues réversibles ou quasi-réversibles coexistent (en rouge, Figure II-37). Lorsqu'on augmente le pH, les deux vagues se combinent en une seule (en bleu, Figure II-37) et définissent un processus à 2 électrons. La différence de potentiels de pic $\Delta E = E_p^a - E_p^c$ est grande, ce qui montre qu'une réaction chimique est couplée au transfert d'électron.

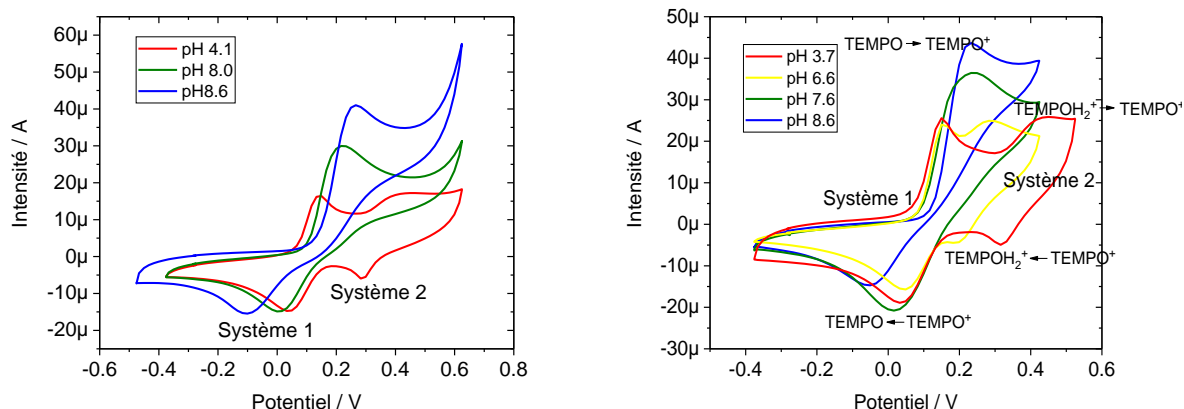


Figure II-37 : Courbes de voltampérométrie cyclique du (gauche) complexe $[Gd.D_2]^{3+}$ et (droite) ligand D_2 en fonction du pH en milieu aqueux. $[TRIS/HCl] = 0,01 M$. $[Gd.D_2]^{3+} = 0,5 mM$. Droite : $[Ligand D_2] = 0,5 mM$.

L’hypothèse la plus probable pour expliquer ces résultats est un équilibre acido-basique au niveau de l’unité TEMPO (Figure II-38). Cette unité existerait sous deux formes s’oxydant à des potentiels distincts, correspondant aux systèmes 1 et 2. Le système 1 serait associé à l’oxydation du TEMPO en $TEMPO^+$ et le système 2 à l’oxydation du $TEMPOH_2^+$ en TEMPO. En milieu basique, le système à deux électrons pourrait donc provenir de l’oxydation à deux électrons et deux protons du TEMPOH en $TEMPO^+$.

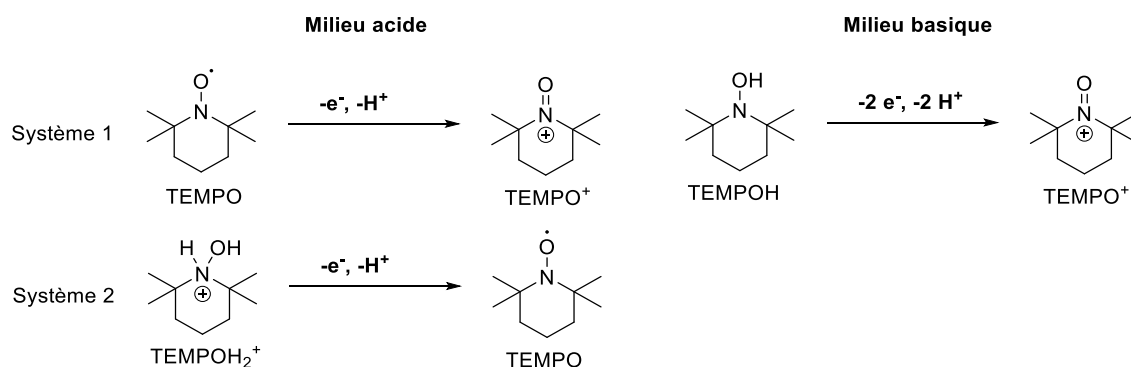


Figure II-38 : Processus rédox associés au TEMPO en fonction du pH.

II.3.2 Etudes des complexes par spectroscopie d’absorption et luminescence

II.3.2.1 Spectroscopie d’absorption UV-Vis

Les spectres d’absorption des ligands et des complexes en solution aqueuse sont présentés en Figure II-39. Les longueurs d’ondes des maxima d’absorption ainsi que leurs coefficients d’extinction molaire sont regroupés dans le Tableau II-D. Les spectres d’absorption UV-Vis des deux séries de complexes sont très proches. Ils comportent une bande majeure à 227 nm avec des coefficients d’extinction molaire compris entre 27 000 et 40 000 $M^{-1}.cm^{-1}$ pour la série D_1 et compris entre 14 000 et 24 000 $M^{-1}.cm^{-1}$ pour la série D_2 , associée aux

transitions $\pi\pi^*$ des fonctions acétamides^[120]. La seconde bande à 268 nm est attribuée à une transition de la fonction nitroxyde^[121].

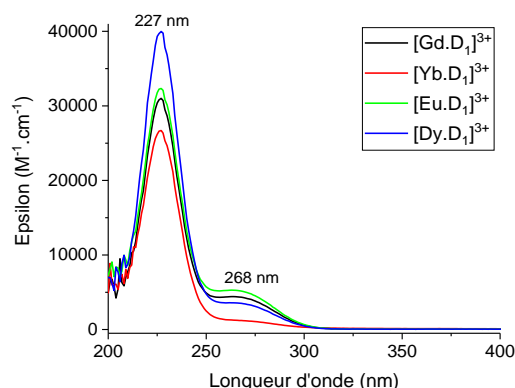


Figure II-39 : Spectres UV-Vis des ligands et des complexes $[Ln.D_1]^{3+}$ à 0,5 mM en solution aqueuse.

Les spectres des complexes $[Ln.D_1]^{3+}$ et $[Ln.D_2]^{3+}$ en solution dans l'acétonitrile montre un léger décalage des longueurs d'onde des maxima d'absorption vers le rouge. On peut supposer que cet effet est dû à une solvataion différente des états impliqués dans les transitions électroniques entre l'eau et l'acétonitrile.

Tableau II-D : Valeurs des longueurs d'onde λ_{max} et coefficients d'extinction molaire ϵ obtenus par spectroscopie d'absorption UV-Vis des ligands et complexes $[Ln.D_1]^{3+}$ et $[Ln.D_2]^{3+}$ en solution à 0,5 mM dans MeCN contenant du TBAP comme électrolyte support (0,1 M). $T = 298$ K. Les complexes ont été électrolysés à 0 V pour s'affranchir de la présence éventuelle d'hydroxylamine/ammonium.

| Complexe | λ_{max} (nm) / ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$) – H ₂ O | λ_{max} (nm) / ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$) – MeCN | Complexe | λ_{max} (nm) / ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$) – H ₂ O | λ_{max} (nm) / ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$) – MeCN |
|-----------------------|---|---|-----------------------|---|---|
| Ligand D ₁ | - | 246 (14200), 286 (350) | Ligand D ₂ | 226 (24000), 297 (2200) | 246 (22500), 286 (1600) |
| $[Gd.D_1]^{3+}$ | 227 (31000), 268 (4300) | 245 (30000), 292 (5800), 363 (3000) | $[Gd.D_2]^{3+}$ | 227 (21000), 269 (5400) | 292 (4000), 363 (1800) |
| $[Eu.D_1]^{3+}$ | 227 (32500), 268 (5000) | 245 (27000), 292 (8100), 363 (4300) | $[Eu.D_2]^{3+}$ | 227 (14000), 269 (800) | 292 (3900), 363(1900) |
| $[Dy.D_1]^{3+}$ | 227 (40000), 268 (3500) | 245 (34200), 292 (3600), 363 (1800) | $[Dy.D_2]^{3+}$ | 227 (15000), 269 (1800) | 288 (7100), 363 (2000) |
| $[Yb.D_1]^{3+}$ | 227 (27000), 268 (1200) | 246 (23000), 292 (5200), 363 (2700) | $[Yb.D_2]^{3+}$ | 227 (16500), 269 (800) | 279 (9000), 363 (900) |

II.3.2.2 Spectroscopie de luminescence

Les lanthanides montrent des spectres de luminescence spécifiques à chaque métal. Le spectre de luminescence du cation Eu^{3+} est sensible à son environnement et peut donc apporter des informations sur la symétrie autour du métal. L'ion Eu^{3+} possède un nombre pair d'électron dans sa couche 4f ($[\text{Xe}] 4f_6$). Le niveau d'énergie de départ des transitions dans le spectre d'absorption et d'émission n'est pas dégénéré ($J=0$). De plus, l'interprétation de son spectre est facilitée par le faible moment angulaire total J des derniers niveaux énergétiques dans les transitions. Ainsi, la forme des raies correspondant aux transitions ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_J$ dans le spectre de luminescence permet d'appréhender la symétrie autour de l'ion Eu^{3+} . Certaines généralités peuvent ainsi être émises^[122].

- La présence (ou non) de la transition ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_0$ donne une indication sur la symétrie du complexe (généralement symétrie C si elle est présente).
- La transition ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_1$ est une transition de type dipôle magnétique. Elle est indépendante de l'environnement de l'ion Eu^{3+} . Son intensité est donc souvent considérée comme constante et sert à calibrer l'intensité des spectres de luminescence des complexes d'euprium.
- La transition ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$ est appelé transition hypersensible. Son intensité est très influencée par la symétrie locale de l'ion et la nature du ligand, par rapport aux autres transitions. Le ratio $R = I({}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2) / I({}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_1)$ est souvent utilisé pour comparer différents complexes d'euprium. Un rapport d'intensité élevé est attribué à une basse symétrie de l'ion Eu^{3+} .
- La transition ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_3$ est en général très peu intense et peut gagner en intensité en cas d'un fort mélange de J ou d'une forte perturbation du champ cristallin.
- La transition ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_4$ ne se considère pas en valeur absolue mais plutôt en comparaison avec l'intensité de la transition du dipôle magnétique ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_1$. Dans le cas de complexe de symétrie D_{4d} , les spectres de luminescence sont souvent dominés par la transition ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_4$ à cause de l'absence du centre de symétrie.

Les spectres de luminescence des complexes $[\text{Eu.D}_1]^{3+}$ et $[\text{Eu.D}_2]^{3+}$ ont été enregistrés dans l'eau en excitant dans la transition ${}^7\text{F}_0 \rightarrow {}^5\text{L}_6$ de l'euprium à $\lambda_{\text{ex}} = 395 \text{ nm}$ ^[122]. Ils sont présentés dans la Figure II-40.

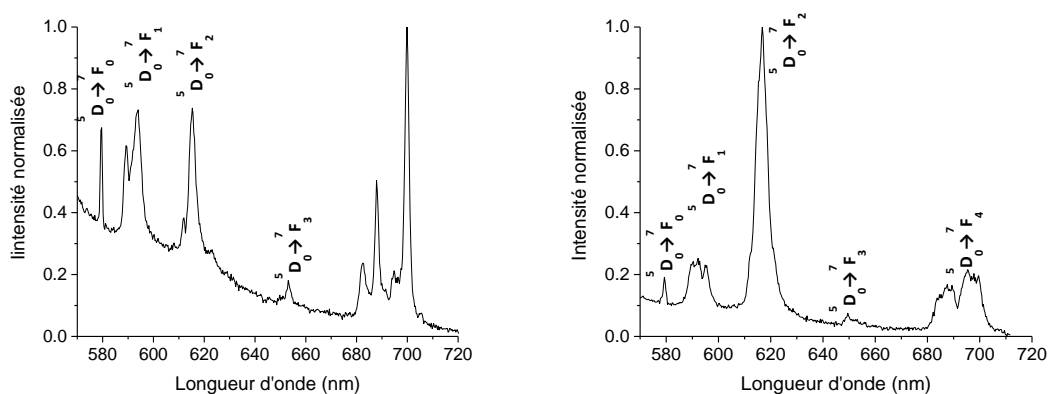


Figure II-40 : Spectres d'émission normalisés des complexes d'euporium $[Eu.D_1]^{3+}$ (gauche) et $[Eu.D_2]^{3+}$ (droite) après excitation à 395 nm dans D₂O à 298K.

Ces spectres montrent une bande à 580 nm associée à la transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_0$. Cette transition n'est visible que dans les symétries C_n , C_{nv} et C_s ^[122] et donc caractéristique des complexes dont le ligand macrocyclique est un cyclène comme les DOTA. Le signal associé à la transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ est très peu affecté par la géométrie autour de l'euporium. Cependant ce signal peut présenter un nombre et une forme de bande différente qui est significatif d'une symétrie donnée. Cette étude spectroscopique permet de donner une indication sur la symétrie des complexes synthétisés. La structure fine associée à la transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ est différente dans les deux complexes $[Eu.D_1]^{3+}$ et $[Eu.D_2]^{3+}$. On peut distinguer 2 bandes dans le spectre du complexe $[Eu.D_1]^{3+}$ alors que 3 bandes sont clairement visibles dans le spectre du complexe $[Eu.D_2]^{3+}$. L'environnement autour du métal est donc différent dans les deux complexes. La bande associée à la transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ est de type dipôle magnétique et par conséquent, son intensité est très peu influencée par l'environnement du métal. A l'inverse, la transition hypersensible $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ est très influencée par la symétrie locale de l'ion et la nature du ligand et on peut voir que son intensité est radicalement différente dans nos deux complexes. Les rapports R des valeurs d'intégrations des bandes associées aux transitions $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$, $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ et $^5D_0 \rightarrow ^7F_4$ permettent en général d'obtenir des informations sur la géométrie autour du métal selon l'équation ci-dessous :

$$R_{\text{Complexe d'Eu}} = I(^5D_0 \rightarrow ^7F_x) / I(^5D_0 \rightarrow ^7F_1) \quad (\text{avec } x = 2 \text{ ou } 4) \quad \text{Eq. 2.1}$$

L'intensité de la bande associée à la transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_4$ est privilégiée en l'absence du centre de symétrie car elle est souvent dominante. Le rapport des intégrations des bandes associées aux différentes transitions (Figure II-41) est regroupé dans le Tableau II-E.

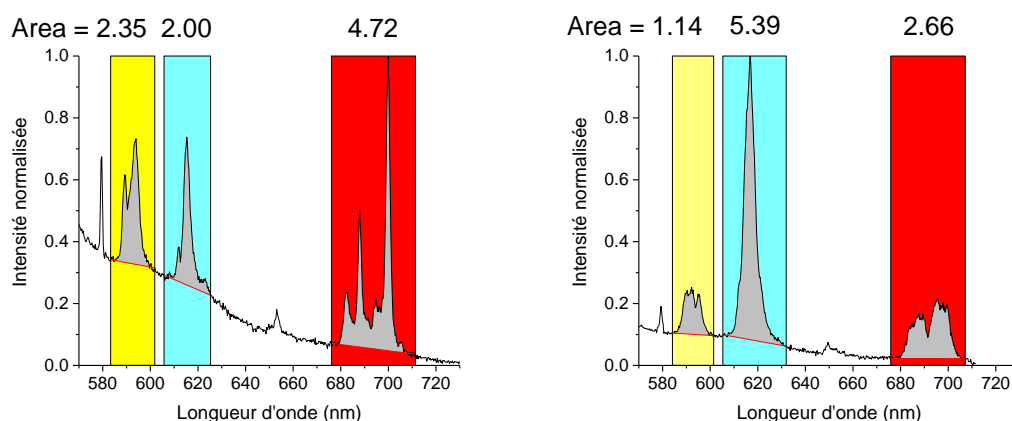


Figure II-41 : Intégration des bandes de luminescence associées aux transitions $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ (jaune), $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ (bleu) et $^5D_0 \rightarrow ^7F_4$ (rouge) après excitation à 395 nm. Gauche : $[Eu.D_1]^{3+}$, droite : $[Eu.D_2]^{3+}$.

Tableau II-E : Rapport des intégrations des bandes de luminescence du complexe $[Eu.D_1]^{3+}$ et $[Eu.D_2]^{3+}$.

| Rapport R | $I(^5D_0 \rightarrow ^7F_2) / I(^5D_0 \rightarrow ^7F_1)$ | $I(^5D_0 \rightarrow ^7F_4) / I(^5D_0 \rightarrow ^7F_1)$ |
|-----------------|---|---|
| $[Eu.D_1]^{3+}$ | 0,9 | 2,0 |
| $[Eu.D_2]^{3+}$ | 4,7 | 2,3 |

Le rapport d'intégration des bandes associées aux transitions $^5D_0 \rightarrow ^7F_4$ et $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ est quasiment similaire pour les deux complexes. Toutefois le rapport $R = I(^5D_0 \rightarrow ^7F_2) / I(^5D_0 \rightarrow ^7F_1)$ donne des valeurs de 0,9 et 4,7 pour les complexes $[Eu.D_1]^{3+}$ et $[Eu.D_2]^{3+}$ respectivement. L'environnement autour de l'euprômium dans $[Eu.D_2]^{3+}$ est donc certainement moins symétrique que dans $[Eu.D_1]^{3+}$.

II.3.2.3 Détermination du nombre de molécule d'eau coordinée

Une méthode simple pour confirmer la différence de symétrie entre les deux complexes pourrait être basée sur le calcul du nombre de molécules de solvant coordonnées au centre métallique et en déduire ainsi le nombre de site de coordination impliqué dans la complexation. Le temps de vie de luminescence des complexes d'euprômium peuvent être utilisés pour calculer le nombre de molécules d'eau coordonnées « q » au centre métallique^[60]. Pour cela il est nécessaire de mesurer le temps de vie des états excités de l'euprômium dans l'eau et dans l'eau lourde (D₂O). Une équation empirique a été proposée par W. Horrocks et al.^[123] en 2002 sur la base de l'étude systématique de nombreux complexes d'euprômium. Elle tient compte des différents oscillateurs -OH, -NH et -CONHR pouvant être présents dans le ligand :

$$q = 1,11 [\Delta k_{obs} - 0,31 - 0,45q^{OH} - 0,99q^{NH} - 0,075q^{CONH}] \quad \text{Eq. 2.2}$$

où $\Delta k_{obs} = k_{H_2O} - k_{D_2O} = 1/\tau_{H_2O} - 1/\tau_{D_2O}$, où q^{OH} désigne le nombre d'oscillateur -OH dans la première sphère de coordination, q^{NH} désigne le nombre d'oscillateur amine -NH dans la première sphère de coordination, q^{CONH} désigne le nombre d'oscillateur amide -CONH dans la première sphère de coordination, les oscillateurs de type NH des fonctions amides primaires sont diastéréoscopiques et atténuent la luminescence de manière différente. Une réduction arbitraire de 50% sur le second lot de fonctions NH a été appliquée conformément à la littérature^[124].

Pour des complexes contenant 4 fonctions amides comme ceux de la série D₁ on obtient donc l'équation ci-dessous :

$$q = 1,11 [\Delta k_{\text{obs}} - 0,31 - 0,3 - 0,11] \quad \text{Eq. 2.3}$$

soit $q = 1,11 [\Delta k_{\text{obs}} - 0,72]$

Pour des complexes contenant 3 fonctions amides comme ceux de la série D₂ on obtient donc l'équation ci-dessous :

$$q = 1,11 [\Delta k_{\text{obs}} - 0,31 - 0,225 - 0,075] \quad \text{Eq. 2.4}$$

soit $q = 1,11 [\Delta k_{\text{obs}} - 0,61]$

Une seconde équation a été proposée par D. Parker *et al.*^[124] et s'intéresse à de nombreux complexes d'euporium différents, en tenant compte des différents oscillateurs -OH, -NH et -CH qui viennent atténuer la luminescence dans la première sphère de coordination :

$$q = 1,2 [\Delta k_{\text{obs}} - 0,25 - 0,075q^{\text{CONHR}}] \quad \text{Eq. 2.5}$$

où q^{CONHR} désigne le nombre de fonction amide présente dans le complexe, les oscillateurs de type NH des fonctions amides primaires sont diastéréoscopiques et atténuent la luminescence de manière différente. Une réduction arbitraire de 50% sur le second lot de fonctions NH a été appliquée conformément à la littérature^[124].

Pour des complexes contenant 4 fonctions amides comme nos complexes de la série D₁ on obtient donc l'équation ci-dessous :

$$\text{Pour la série D}_1 : q = 1,2 [\Delta k_{\text{obs}} - 0,66] \quad \text{Eq. 2.6}$$

Pour des complexes contenant 3 fonctions amides comme nos complexes de la série D₂ on obtient l'équation ci-dessous :

$$\text{Pour la série D}_2 : q = 1,2 [\Delta k_{\text{obs}} - 0,55] \quad \text{Eq. 2.7}$$

En utilisant les équations précédentes et à partir des données de temps de vie, on obtient les valeurs de q regroupées dans le Tableau II-F pour nos complexes d'euporium.

Tableau II-F : Valeurs des temps de vie de luminescence des complexes $[D_1.Eu]^{3+}$ et $[D_2.Eu]^{3+}$ mesurés dans l'eau et l'eau lourde et valeur de q déterminées. $\Delta k_{\text{obs}} = k_{H_2O} - k_{D_2O} = 1/\tau_{H_2O} - 1/\tau_{D_2O}$. TEMPO[•] : Complexe radicalaire ; TEMPOH : Complexe réduit par l'ascorbate de sodium.

| Complexe d'euporium | τ_{H_2O} (ms) | τ_{D_2O} (ms) | Δk_{obs} | q |
|---------------------------------------|--------------------|--------------------|-------------------------|-----------------------------|
| $[D_1.Eu]^{3+}$ (TEMPO [•]) | 0,43 | 1,32 | 1,56 | 0,9 (Eq 2.3) / 1,1 (Eq 2.6) |
| $[D_1.Eu]^{3+}$ (TEMPOH) | 0,41 | 1,10 | 1,53 | 0,9 (Eq 2.3) / 1,0 (Eq 2.6) |
| $[D_2.Eu]^{3+}$ (TEMPO [•]) | 0,5 | 1,38 | 1,28 | 0,7 (Eq 2.4) / 0,9 (Eq 2.7) |
| $[D_2.Eu]^{3+}$ (TEMPOH) | 0,47 | 1,03 | 1,16 | 0,6 (Eq 2.4) / 0,7 (Eq 2.7) |

Les résultats suggèrent que les deux complexes possèdent une molécule d'eau en première sphère de coordination. Ainsi, les complexes de la série D₁ possèdent 9 sites de coordination contre seulement 8 pour les complexes de la série D₂ (Figure II-42) ce qui suggère que le remplacement d'une fonction amide par une fonction alcyne ne favorise pas la coordination d'une seconde molécule d'eau. On peut donc proposer les structures suivantes pour nos complexes :

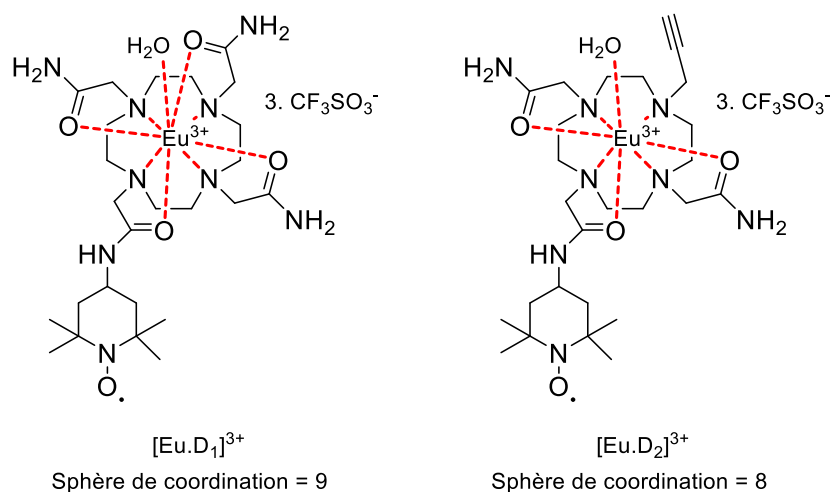


Figure II-42 : Structures proposées pour les complexes d'euprium.

Une autre information importante que l'on peut extraire de ce tableau est le fait qu'un changement de degré d'oxydation du groupement TEMPO n'a pas d'influence sur le nombre de molécules d'eau coordonnées. En effet, des mesures ont été réalisées en présence d'ascorbate de sodium, qui est un réducteur vis-à-vis des fonctions nitroxydes. Les valeurs de Δk_{obs} et donc q sont très proches que l'ascorbate soit présent ou non.

II.3.3 Etudes des complexes par Résonance paramagnétique électronique

La résonance paramagnétique électronique (RPE) est une technique de caractérisation de composés possédant des électrons non appariés (Cf annexe 1). Les ligands et certains précurseurs sont paramagnétiques du fait de la présence d'un groupement nitroxyde. Dans nos complexes, les électrons non appariés peuvent provenir de deux sources différentes : le nitroxyde et le cation lanthanide et ils peuvent être couplés magnétiquement.

Le nitroxyde peut être observé à température ambiante en solution fluide et les spectres résultants vont nous renseigner sur sa mobilité. Il peut également être observé à basse température (spectre anisotrope), toutefois l'interprétation est moins évidente. La largeur de raie est en effet trop importante pour permettre la détermination des 3 valeurs principales des tenseurs g et A . Le temps de relaxation électronique des lanthanides étant très court, leur observation ne se fait pas à température ambiante (à l'exception du gadolinium du fait de son état S). Leurs résonances seront donc absentes des spectres

enregistrés à température ambiante. Leurs composantes deviendront visibles à $T < 40$ K (spectres en solution gelée).

II.3.3.1 Spectres RPE des ligands D₁ et D₂

Les spectres RPE des ligands D₁ et D₂ se caractérisent par un signal isotrope composé de 3 raies espacées de 1,7 mT (Figure II-44). Ces 3 bandes sont dues au couplage hyperfin entre le spin électronique ($S = \frac{1}{2}$) et le spin nucléaire de l'atome d'azote ($I = 1$) (Figure II-43). Il confirme la délocalisation du radical sur l'atome d'azote. Le signal est centré à $g_{iso} = 2,006$, valeur typique pour des radicaux nitroxydes. Enfin les raies sont relativement fines, montrant que nous sommes dans un régime de mouvement rapide.

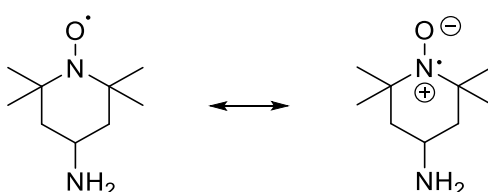


Figure II-43 : Forme limite du radical aminoTEMPO.

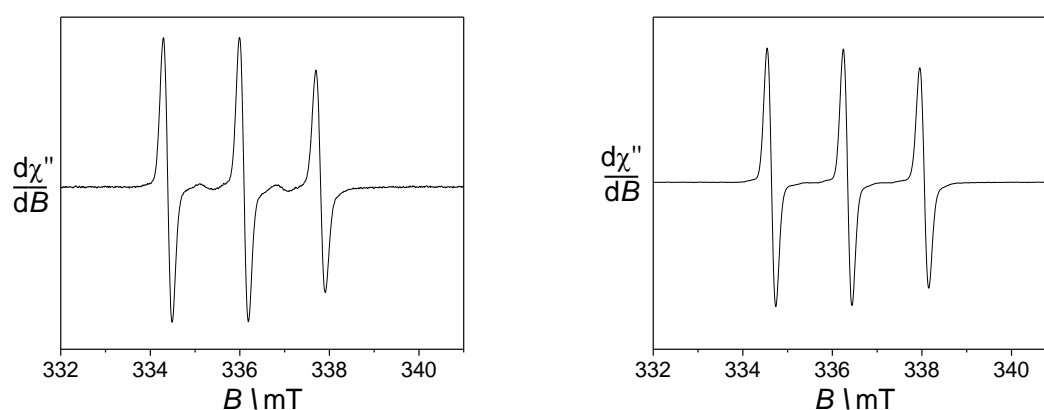


Figure II-44 : Spectres RPE en bande X des ligands D₁ (Gauche) et D₂ (Droite) en solution aqueuse à 0,5 mM à $T = 293$ K. Fréquence micro-onde : 9,42 GHz ; puissance : 3,2 mW (gauche), 3,5 mW (droite) ; modulation d'amplitude : 0,2 mT, modulation de fréquence : 100 KHz.

Les hauteurs relatives des 3 raies $h_{(+1)}$, $h_{(0)}$ et $h_{(-1)}$ (le chiffre entre parenthèses réfère au $m_{(l)}$ de la transition) ne sont pas strictement identiques, bien que les intensités soient les mêmes. Cette particularité provient du fait que le nitroxyde se meut à une vitesse non infinie. Cette faible « anisotropie » peut être utilisée pour calculer le temps de corrélation rotationnel τ_c , qui correspond au temps nécessaire à la molécule étudiée pour tourner d'un radian en utilisant la formule de Kivelson^[125].

$$\tau_c = C \Delta H_{(+1)} [(h_{(+1)}/h_{(-1)})^{1/2} - 1]$$

Eq 2.8

Où C est une constante calculée des valeurs principales de g et du tenseur A du radical nitroxyde ($6,6 \cdot 10^{-10}$), $\Delta H_{(+1)}$ est la largeur d'un pic à l'autre des lignes à bas champs (en mT), $h_{(+1)}$ et $h_{(-1)}$ sont les hauteurs des résonances à haut et bas champs respectivement.

Chapitre 2

Le temps de corrélation rotationnel τ_c calculé pour D_1 est de $1,60 \cdot 10^{-10}$ s et de $1,36 \cdot 10^{-10}$ s pour D_2 , ce qui est cohérent avec un rayon hydrodynamique très proche des deux ligands. Lorsqu'on enregistre le spectre à $T = 9$ K, la forme du spectre change. Le signal est anisotrope, ce qui correspond à une immobilisation totale (Figure II-45).

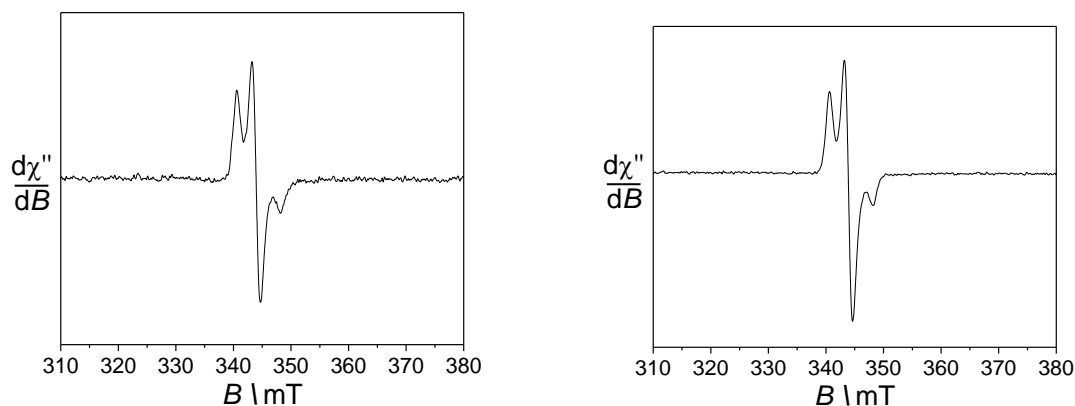


Figure II-45 : Spectres RPE en bande X des ligands D_1 (Gauche) et D_2 (Droite) en solution aqueuse à 0,45 mM contenant 10% de Glycérol. Fréquence micro-onde : 9,63 GHz, puissance : 2 mW, modulation d'amplitude : 0,4 mT, modulation de fréquence : 100 KHz. Température : 8,8 K (gauche), 10,7 K (droite).

II.3.3.2 Spectres RPE des complexes de lanthanides $[Ln.D_1]^{3+}$ et $[Ln.D_2]^{3+}$

Une étude à basse température est nécessaire (entre 4 et 50 K) afin de caractériser le centre métallique dans le cas des complexes d'ytterbium et de dysprosium. Les complexes de gadolinium pourront s'observer à température ambiante si la relaxation est suffisamment lente.

II.3.3.2.1 Complexes d'Ytterbium

Le spectre de $[Yb.D_1]^{3+}$ mesuré à 4 K montre un doublet intense à $g = 2,00$ (Figure II-46), correspondant à la signature d'un radical mais qui diffère du schéma classique (Figure II-45) d'un nitroxyde comme dans le ligand D_1 . A cette température, on peut donc penser qu'une interaction magnétique entre l'ytterbium et le nitroxyde est présente. Si on s'intéresse aux cristaux obtenus sur le ligand D_2 avec un ion Na^+ coordonné, on peut estimer la distance métal-nitroxyde à environ 7,8 Å, confirmant qu'une interaction magnétique est possible. En considérant les spins électroniques de l'ion Yb^{3+} ($S_{Yb} = \frac{1}{2}$) et celui du nitroxyde ($S_{nit} = \frac{1}{2}$), on peut supposer qu'un état triplet ($S_{tot} = 1$) est accessible.

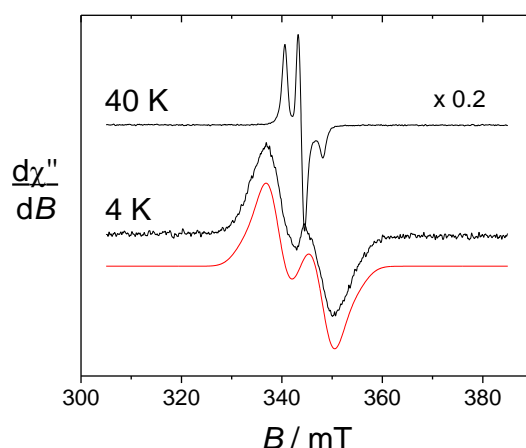


Figure II-46 : Spectre RPE en bande X du complexe $[\text{Yb.D}_1]^{3+}$ à 0,5 mM dans l'eau. En noir, le spectre expérimental, en rouge se trouve le spectre simulé en utilisant les paramètres suivant : ($S = 1$), $|D| = 300$ MHz, $g_{\text{iso}} = 2,00$, fréquence micro-onde : 9,636 GHz, puissance : 0,2 mW, modulation d'amplitude : 0,4 mT, modulation de fréquence : 100 KHz.

A 45K le spectre dans la région 310-380 mT est typique d'un radical nitroxy isolé. On peut en déduire que le couplage est très inférieur à 45K, ce qui est cohérent avec une distance interspin de 7-8 Å. Le complexe de $[\text{Yb.D}_2]^{3+}$ montre essentiellement le même comportement (Figure II-47).

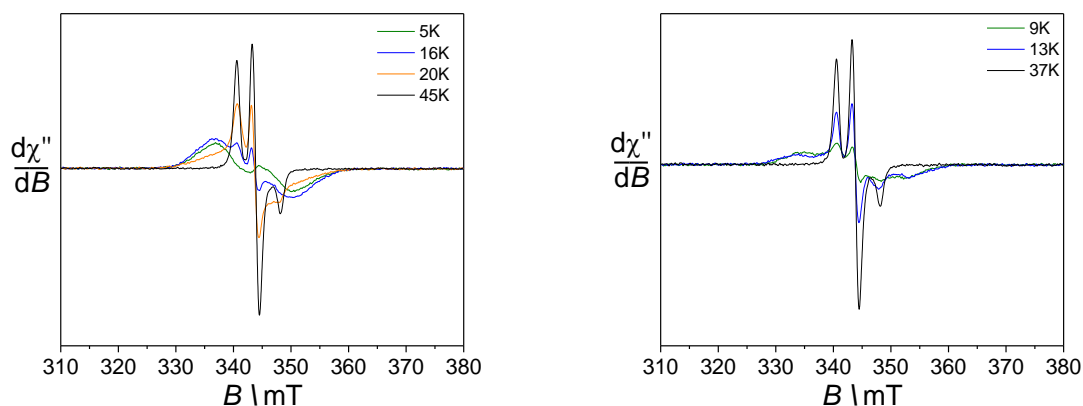


Figure II-47 : Spectres RPE en bande X du complexe $[\text{Yb.D}_1]^{3+}$ (gauche) et $[\text{Yb.D}_2]^{3+}$ (droite) en solution aqueuse à 0,45 mM contenant 10% de glycérol. Evolution de la température de 5K à 45K. Fréquence micro-onde : 9,63 GHz, puissance : 0,2 mW, modulation d'amplitude : 0,4 mT, modulation de fréquence : 100 KHz.

Après addition d'ascorbate de sodium, le nitroxyde est réduit en hydroxylamine et une extinction des bandes est observée dans la région 310-380 mT. On observe en revanche l'apparition de résonances à $g = 8,6$, $6,41$ et $5,2$ (Figure II-48). Le domaine de champs concerné est typique de l'ion ytterbium isolé. Les intensités relatives des 3 signaux sont corrélées à l'abondance naturelle des isotopes paramagnétiques de l' Yb^{3+} , confirmant cette attribution^[126].

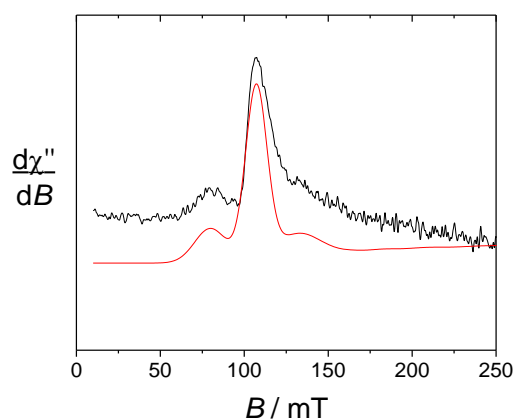


Figure II-48 : Spectre RPE en bande X de $[\text{Yb.D}_1]^{3+}$ à 4 mM dans l'eau après addition de 2 équivalents d'ascorbate de sodium. En noir, le spectre expérimental, en rouge se trouve le spectre simulé en utilisant les paramètres suivants : $g = 8,6, 6,41$ et $5,2$, fréquence micro-onde : 9,636 GHz, puissance : 0,2 mW, modulation d'amplitude : 1 mT, modulation de fréquence : 100 KHz. $T = 5$ K.

II.3.3.2.2 Complexes de Dysprosium

Le spectre RPE du complexe $[\text{Dy.D}_1]^{3+}$ à $T = 8\text{K}$ montre un signal composé de deux contributions différentes (Figure II-49). Dans la fenêtre 340-350 mT, le spectre est typique d'un radical nitroxyde libre. Dans la fenêtre 300-400 mT, des raies supplémentaires sont observées (plus extérieures). Elles sont séparées d'environ 60 mT, ce qui est largement supérieur à ce qui est attendu pour un radical isolé et donc signe d'un couplage du nitroxyde avec le métal. Cette fenêtre est plus large que dans le cas de $[\text{Yb.D}_1]^{3+}$, nous indiquant une influence différente du lanthanide sur le radical nitroxyde. Dans ce cas cependant, même à 8K, le spectre contient à la fois une composante nitroxyde et l'espèce couplée, ce qui pourrait signifier un couplage magnétique plus faible.

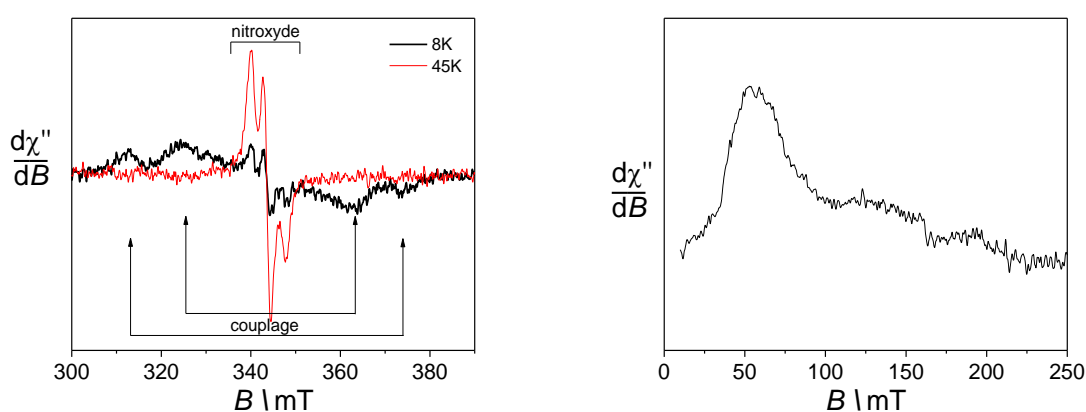


Figure II-49 : Spectres RPE d'une solution aqueuse de $[\text{Dy.D}_1]^{3+}$ à 4 mM à 8K (noir) et à 45K (rouge) (gauche) et après addition de 2 équivalents d'ascorbate à 8K (droite). Fréquence micro-onde : 9,64 GHz ; puissance : 2 mW ; modulation d'amplitude : 1 mT ; modulation de fréquence : 100 KHz.

Après l'addition d'ascorbate de sodium, le signal dans la fenêtre 300-400 mT disparaît presque totalement, signe que le radical est réduit en hydroxylamine. Une résonance

intense peut alors être observée à $g_{eff} \approx 11,6$, valeur caractéristique d'un complexe isolé de Dy³⁺ (Figure II-49).

Le couplage magnétique dans le cas du complexe [Dy.D₂]³⁺ est plus faible que pour [Dy.D₁]³⁺, il n'est pas détectable en RPE, seul le signal du nitroxyde isolé étant observé sur toute la gamme de température. De même, seule la résonance à bas champs du métal est observable après addition d'ascorbate mais elle est détectée à une valeur de $g_{eff} \approx 15,4$ supérieure à celle observée pour [Dy.D₁]³⁺.

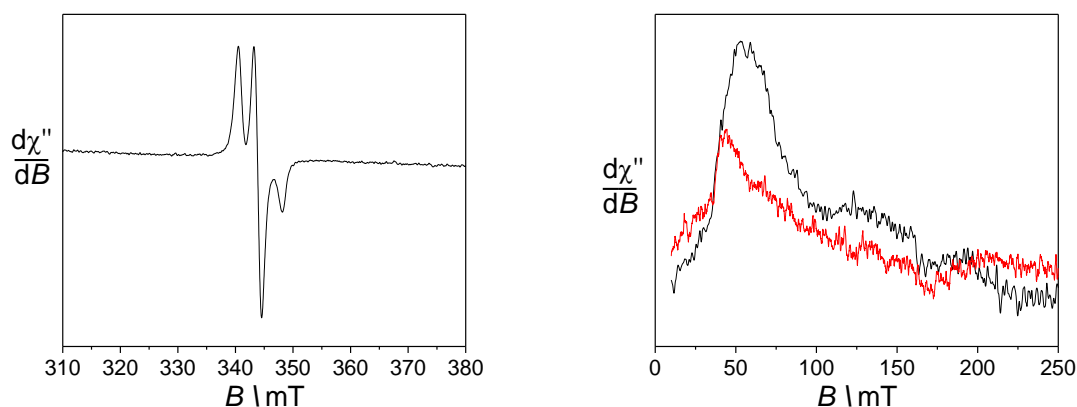


Figure II-50 : Spectres RPE en bande X du complexe [Dy.D₂]³⁺ en solution aqueuse à 0,45 mM contenant 10% de glycérol à 10K. Avant addition d'ascorbate et centré sur le nitroxyde (gauche) et après addition de deux équivalents d'ascorbate sur la gamme spectrale entière pour observer le dysprosium (droite, en noir : [Dy.D₁]³⁺, en rouge : [Dy.D₂]³⁺). Fréquence micro-onde : 9,63 GHz ; puissance : 2 mW (gauche et droite en noir), 20 mW (droite en rouge) ; modulation d'amplitude : 0,4 mT (gauche), 1mT (droite, noir) et 0,6 mT (droite, rouge) ; modulation de fréquence : 100 KHz.

II.3.3.2.3 Complexes d'Europium

Les spectres RPE des complexes d'europium [Eu.D₁]³⁺ et [Eu.D₂]³⁺ présentent le même signal que celui des ligands libres à 40K, avec une intensité comparable. Le signal n'évolue pas en termes de forme sur la gamme de température 4-40K. Ce comportement s'explique par le faible moment magnétique de l'europium qui se comporte comme un métal diamagnétique dans ces conditions.

II.3.3.2.4 Complexes de Gadolinium

Les spectres des complexes de gadolinium [Gd.D₁]³⁺ et [Gd.D₂]³⁺ montrent tout deux les 3 bandes fines à température ambiante caractéristiques du radical nitroxyde à $g_{iso} = 2,006$ ($A_N = 0,28$ mT) avec une intensité plus faible que le signal du ligand seul. Dans le cas du [Gd.D₁]³⁺, une résonance intense beaucoup plus large (largeur de pic à pic de 3 mT, $g_{iso} = 1,99$) se superpose au signal du nitroxyde. Ce signal correspond au cation Gd³⁺ (configuration S = couche demi remplie). Le fait que la bande large associée au cation Gd³⁺ ne soit pas visible à température ambiante dans le cas de [Gd.D₂]³⁺ suggère une relaxation plus rapide du métal. Le ligand a donc une influence non négligeable sur la relaxation du métal, du fait d'une géométrie et/ou d'une sphère de coordination différente.

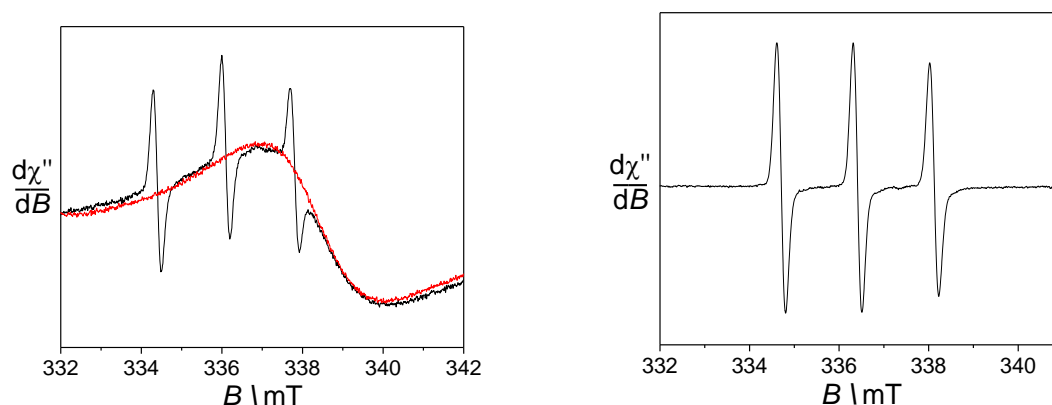


Figure II-51 : Spectres RPE en bande X en solution aqueuse à $T = 293\text{K}$. Gauche : 2 mM du complexe $[\text{Gd.D}_1]^{3+}$, en noir. En présence de deux équivalents d'ascorbate, en rouge. Fréquence micro-onde : 9,42 GHz ; puissance : 1,7 mW ; modulation d'amplitude : 0,2 mT ; modulation de fréquence : 100 KHz. Droite : 2 mM du complexe $[\text{Gd.D}_2]^{3+}$ à pH = 7,9 dans solution d'HEPES 0,1 M. Fréquence micro-onde : 9,42 GHz ; puissance : 3,5 mW ; modulation d'amplitude : 0,2 mT ; modulation de fréquence : 100 KHz.

Enfin, l'addition d'ascorbate de sodium vient réduire le radical nitroxyde en fonction hydroxylamine, éteignant cette composante sans affecter le signal du gadolinium lorsqu'il était observable au préalable.

II.3.4 Spectroscopie CEST des complexes

Ce projet est le premier utilisant la technique CEST développé dans le laboratoire. La technique CEST n'était pas une technique connue dans notre laboratoire. Pour cette raison, un travail d'optimisation des séquences a donc été entrepris dans un premier temps en utilisant l'acide salicylique dans l'eau à pH 7,2 comme agent CEST. Un effet CEST de l'ordre de 20% à 9 ppm a finalement pu être observé, conformément à la littérature^[127] (Figure II-52), validant la séquence utilisée. Dans la Figure II-52 la quantité M_0 est obtenue en intégrant le signal de l'eau en l'absence d'irradiation. La quantité M_z est obtenue en appliquant une irradiation sélective à chaque fréquence du spectre et en intégrant le signal de l'eau environnante manuellement. Le rapport du signal M_z sur M_0 permet de tracer le spectre Z ci-dessous.

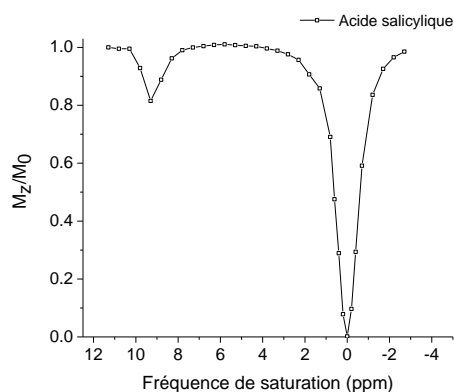


Figure II-52 : Spectre CEST d'une solution d'acide salicylique à 20 mM. Spectres enregistrés à 11,7 T, 298 K, dans un mélange $\text{H}_2\text{O}:\text{CD}_3\text{CN}$ (2:1), $[\text{HEPES}] = 0,07\text{M}$ à pH 7,5, $B_1 = 2 \mu\text{T}$, et un temps d'irradiation de 3 s.

Les paramètres utilisés pour analyser les complexes d'Eu³⁺, Yb³⁺ et Dy³⁺ sont décrits dans la partie expérimentale. Le signal CEST étant sensible à son environnement comme la température, le pH et le ligand autour du métal, il est difficile de prévoir l'activité d'une molécule. Ainsi, nous considérerons initialement que les complexes de la famille [Ln.D₁]³⁺ et [Ln.D₂]³⁺ comportent 4 types de protons échangeables qui pourraient être à priori observés (s'ils possèdent des vitesses d'échanges dans la gamme « visible » du CEST) (Figure II-53) :

- les protons des fonctions amides non-substituées,
- le proton de la fonction amide portant l'unité TEMPO,
- une molécule d'eau coordonnée au métal,
- après réduction, le proton de la fonction hydroxylamine.

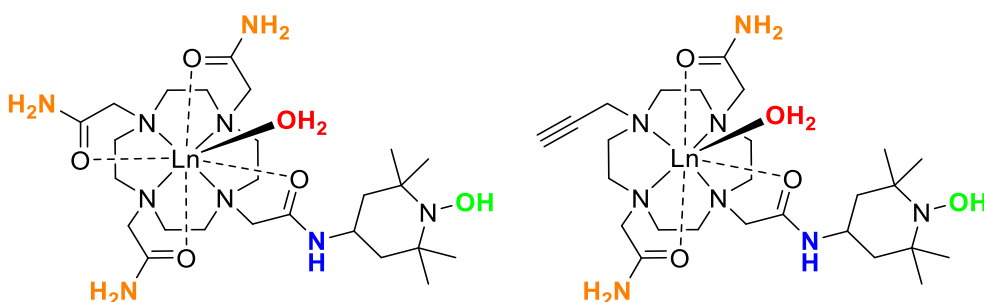


Figure II-53 : Protons échangeables potentiellement visibles en CEST.

Les spectres Z des différents complexes de [Ln.D₁]³⁺ et [Ln.D₂]³⁺ ont été mesurés à 25°C, à un pH de 7,4 dans un tampon HEPES à 0,1 M pour des solutions à 13 ou 14 mM (pour [Ln.D₁]³⁺) et à 20 mM (pour [Ln.D₂]³⁺) dans un mélange d'eau et d'acétonitrile deutéré (67/33). Initialement, les complexes ont été solubilisés dans une solution aqueuse tamponnée mais à de telles concentrations, une précipitation a été observée. Il a donc été nécessaire d'utiliser un mélange de solvants pour solubiliser intégralement nos complexes^[41]. Des complexes de type DOTA tétraamide mis au point par D. Sherry^[53] *et al.* montrent des activités CEST à des concentrations de 20 mM dans des mélanges 50/50 (v/v) d'eau et d'acétonitrile deutéré. Nous avons choisi ces mêmes solvants, mais travaillé avec un mélange comprenant d'avantage d'eau : 66/34 (v/v) d'eau tamponnée et d'acétonitrile deutéré.

Les deux états d'oxydation de chaque complexe ont été étudiés, la forme oxydée « [Ln.D_i]³⁺ Ox » lorsque le radical TEMPO est présent (forme nitroxyde) et réduite « [Ln.D_i]³⁺ Red » lorsque le TEMPO est réduit en hydroxylamine par l'ascorbate. Cette forme est importante car le potentiel de réduction du nitroxyde est tel qu'il pourrait être réduit dans des fluides cellulaires.

II.3.4.1 Spectroscopie CEST des complexes d'euporium

Le spectre Z du complexe [Eu.D₁]³⁺ sous sa forme nitroxyde est présenté dans la Figure II-54. Un signal est observable à 51 ppm avec une intensité d'environ 6%. Après réduction du radical nitroxyde en hydroxylamine, l'intensité de ce signal augmente et atteint une valeur

de l'ordre de 12% (Figure II-54, gauche). Le déplacement chimique à 51 ppm est caractéristique du signal d'une molécule d'eau coordonnée à un complexe d'euporium^[49,54,112]. Les protons des fonctions acétamides n'ont pas pu être détectés pour ce complexe dans ces conditions de température, de pH et de puissance d'irradiation.

Bien que le complexe $[\text{Eu.D}_2]^{3+}$ possède une structure très proche de celle du complexe $[\text{Eu.D}_1]^{3+}$, son spectre CEST ne présente aucun signal, ni sous sa forme nitroxyde, ni sous sa forme réduite (Figure II-54, droite). Ce complexe possède une molécule d'eau en première sphère de coordination (cf. partie luminescence), mais celle-ci ne peut donc être détectée dans nos conditions expérimentales.

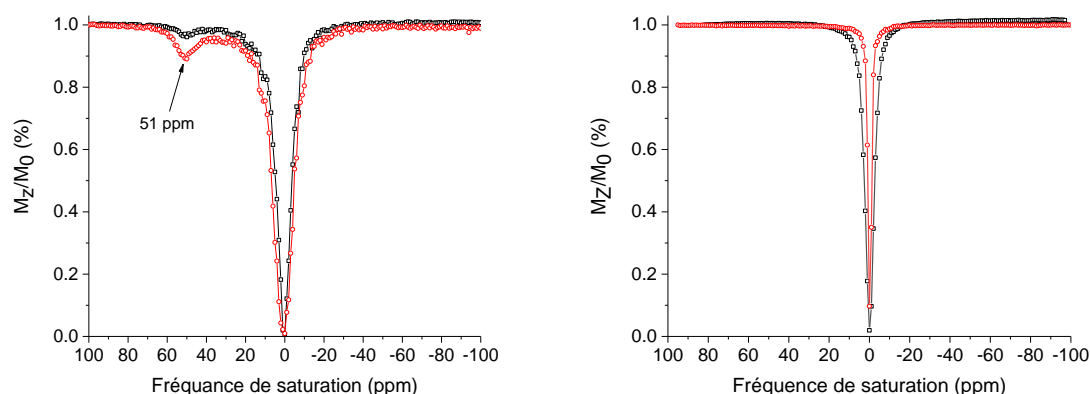


Figure II-54 : Spectres CEST d'une solution de $[\text{Eu.D}_1]^{3+}$ à 14 mM (gauche) et de $[\text{Eu.D}_2]^{3+}$ à 20 mM (droite) sous leur forme oxydée en noir et réduite en rouge en utilisant 2 équivalents d'ascorbate de sodium. Spectres enregistrés à 11,7 T, 298 K, dans un mélange $\text{H}_2\text{O}:\text{CD}_3\text{CN}$ (2:1), $[\text{HEPES}] = 0,07\text{M}$ à pH 7,4, $B_1 = 25 \mu\text{T}$ et un temps d'irradiation de 3 s.

Différentes hypothèses peuvent être émises concernant la différence de comportement entre $[\text{Eu.D}_2]^{3+}$ et $[\text{Eu.D}_1]^{3+}$. La distance entre le proton échangeable (d'une molécule d'eau ou d'une fonction amide) et le métal ainsi que la coordination du ligand sont des facteurs influençant l'activité CEST^[128]. Si le proton échangeable est plus éloigné du métal, une diminution du déplacement chimique ($\Delta\omega$) peut être observée. La condition d'échange $\Delta\omega \geq k_{\text{ex}}$ nécessaire à l'observation du transfert de saturation peut ne plus être respectée et aucune activité CEST n'est alors observée. Une hypothèse probable dans notre cas serait que la vitesse d'échange avec l'eau environnante est trop importante pour permettre la détection de la molécule d'eau coordonnée sur l'euporium dans le complexe $[\text{Eu.D}_2]^{3+}$. Le complexe $[\text{Eu.D}_2]^{3+}$ présente une sphère de coordination différente de $[\text{Eu.D}_1]^{3+}$ ce qui influencera le temps de résidence de la molécule d'eau. La conformation du cyclène (type SAP/TSAP) peut elle aussi être à l'origine de cet effet car elle influence grandement le temps de résidence de la molécule d'eau, avec un facteur de 50 entre les deux conformations^[129]. Nous n'avons cependant pas suffisamment de données pour vérifier l'influence de la conformation.

II.3.4.2 Spectroscopie CEST des complexes d'ytterbium et de dysprosium

Les spectres CEST des complexes [Yb.D₁]³⁺ et [Yb.D₂]³⁺ ont été mesurés pour des solutions à 13 et 20 mM respectivement. Quel que soit la forme radicalaire (Figure II-55, en noir) ou réduite (Figure II-55, en rouge), aucune activité CEST n'a été détectée pour les deux complexes. La vitesse d'échange des protons des molécules d'eau ainsi que les protons échangeables provenant des fonctions acétamides n'est certainement pas adéquate pour permettre l'observation d'un signal CEST.

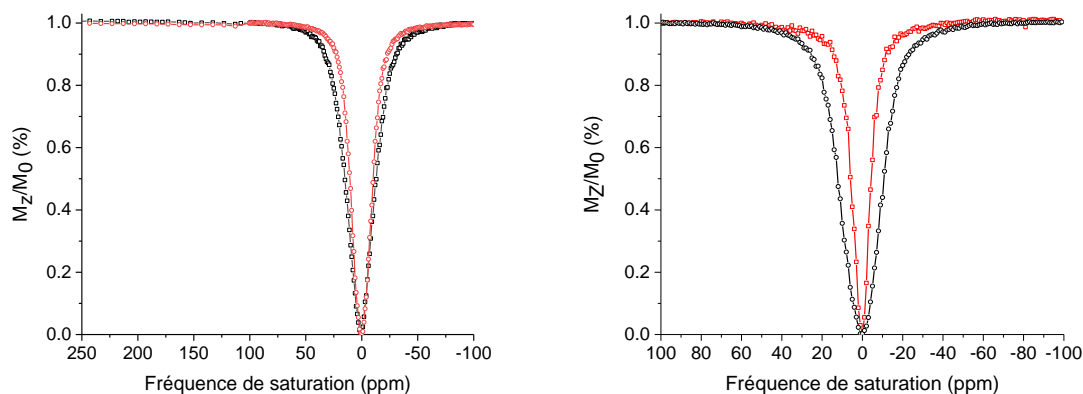


Figure II-55 : Spectres CEST d'une solution à 13 mM de [Yb.D₁]³⁺ et de 20 mM de [Yb.D₂]³⁺ sous leur forme oxydée en noir et réduite en rouge en utilisant 2 équivalents d'ascorbate de sodium. Spectres enregistrés à 11,7 T, 298 K, dans un mélange H₂O:CD₃CN (2:1), [HEPES] = 0,07M à pH 7,4, B₁ = 25 μT et un temps d'irradiation de 3 s.

Pour des complexes de dysprosium de type [Dy.DOTA-(gly)_x]^[111], la molécule d'eau coordonnée ou les protons des fonctions amides peuvent s'observer à des fréquences très négatives. C'est dans cette optique que le spectre CEST du complexe [Dy.D₁]³⁺ a été enregistré entre 100 et -600 ppm. Aucune activité n'a été observée lorsque le nitroxyde est sous forme oxydée. Le spectre présente une déformation de ligne de base entre 30 et 100 ppm, lorsque le complexe est sous forme réduite (Figure II-56, droite). Il est cependant difficile d'attribuer cet effet à une activité CEST. Dans le cas du complexe [Dy.D₂]³⁺, aucune activité n'a pu être observée ni sous forme oxydée ni sous forme réduite.

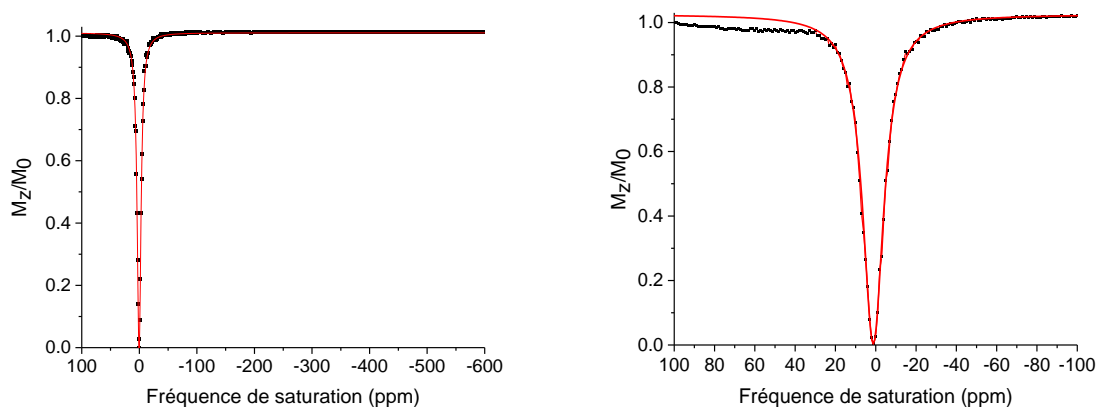


Figure II-56 : Spectres CEST d'une solution à 13 mM de [Dy.D₁]³⁺ sous sa forme oxydée (gauche) et réduite (droite) en utilisant 2 équivalents d'ascorbate de sodium. Spectres enregistrés à 11,7 T, 298 K, dans un mélange H₂O:CD₃CN (2:1), [HEPES] = 0,07M à pH 7,4, B₁ = 25 μT et un temps d'irradiation de 3 s.

Pour conclure sur cette première série de complexe, les protons provenant des fonctions amides ne semblent pas particulièrement adaptés à l'imagerie CEST dans ce type de complexes (europium, ytterbium, dysprosium). Les protons provenant de la molécule d'eau coordonnée sur l'euporium nous permettent cependant d'obtenir un signal dans le cas du complexe $[\text{Eu.D}_1]^{3+}$.

II.3.4.3 Influence de l'état rédox sur l'activité CEST

L'influence de l'état rédox sur l'activité CEST a été étudiée par D. Sherry *et al.* sur un complexe d'euporium portant deux unités nitroxydes^[105]. Pour des agents contenant une molécule d'eau coordonnée dans un système d'échange lent avec son environnement, le temps de résidence de la molécule d'eau sera sensible aux effets électroniques des substituants incorporés sur le ligand et à l'altération de la géométrie de coordination autour du métal^[53,113].

Le temps de relaxation longitudinal T_1 des protons de l'eau environnante peut être modulé par la présence d'unités paramagnétiques. C'est dans cette optique que l'équipe de D. Sherry puis la nôtre avons conçus des agents de contrastes ParaCEST responsifs contenant des unités nitroxydes qui influence ce paramètre.

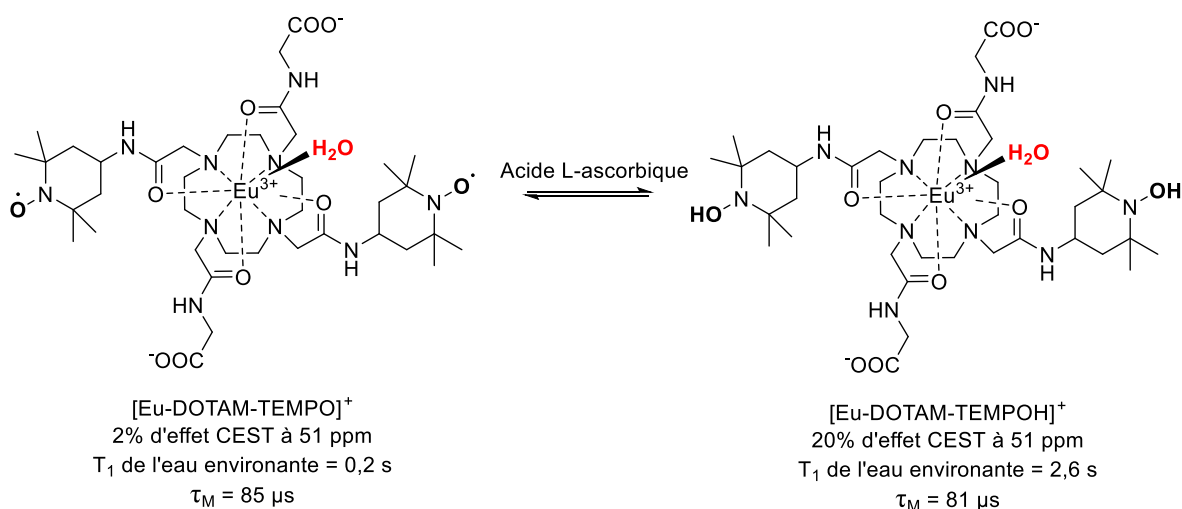


Figure II-57 : Complexe $[\text{Eu-DOTAM-TEMPO}]^+$ présentant un effet CEST à 51 ppm dont l'intensité augmente lors de la réduction des radicaux nitroxydes en hydroxylamines.

Pour appuyer leur hypothèse, D. sherry *et al.* ont synthétisé un ligand comportant deux unités TEMPO qui influencent le T_1 de l'eau environnante en fonction de leur état rédox. Sous formes oxydées, ils ont pour effet de raccourcir le temps de relaxation longitudinal. Sous formes réduites, ils n'ont plus d'effet.

Le complexe d'euporium comportant ce ligand montre ainsi une activité CEST provenant de la molécule d'eau coordonnée sur l'euporium et son activité évolue entre 2 et 20% en fonction de l'état rédox de ces deux unités TEMPO. Le temps de relaxation longitudinal T_1 a été mesuré (par la méthode d'inversion et récupération standard) sur une solution du complexe d'euporium à 10 mM (à pH 7, 25°C, 9,4T) donne une valeur de 0,2 s. Cette faible valeur de T_1

est causée par l'effet du paramagnétisme provenant des électrons non appariés des nitroxydes présents sur le ligand.

Après la réduction des radicaux nitroxydes en hydroxylamines par de l'ascorbate de sodium, le T₁ mesuré évolue de 0,2 à 2,6 s. Le signal CEST évolue passant de 2 à 20%. Le temps de résidence de la molécule d'eau a aussi pu être estimé à 81 μs et n'évolue pas après réduction des nitroxydes. L'augmentation du signal CEST ne provient donc pas d'une vitesse d'échange différente. Cette équipe a donc pu démontrer qu'il était possible de moduler l'activité CEST d'une molécule d'eau coordonnée au métal par modification du temps de relaxation longitudinal T₁, lui-même contrôlé par l'état rédox des groupements nitroxydes.

C'est dans cette même logique que nous avons étudié nos complexes. Même si l'état rédox n'influence en théorie pas la vitesse d'échange de la molécule d'eau, celle-ci a été mesurée sur le complexe [Eu.D₁]³⁺ en fonction de l'état oxydé et réduit du nitroxyde présent sur la molécule (Tableau II-G). Cette vitesse d'échange a été calculée grâce à une technique appelée « oméga-plot » et qui s'obtient en mesurant l'intensité du signal CEST en fonction de la puissance de l'irradiation appliquée^[130] (Cf annexe CEST). Le temps de résidence de la molécule d'eau est d'environ 300 μs ce qui est cohérent avec les valeurs de la littérature pour des complexes EuDOTA-tetraamide^[53]. Une différence d'environ 25% semble présente mais peut être expliquée par l'incertitude de la mesure existante pour les faibles valeurs de l'activité CEST du complexe sous forme oxydée.

Tableau II-G : Détermination de la vitesse d'échange de la molécule d'eau portée par le complexe [Eu.D₁]³⁺ sous sa forme oxydée (Ox, TEMPO) et sous sa forme réduite (Red, TEMPOH).

| Complexe | Vitesse d'échange (s ⁻¹) | Temps de résidence τ _M (μs) | 1 - (M _z /M ₀) Activité CEST |
|--|--------------------------------------|--|--|
| [Eu.D ₁] ³⁺ Ox | 3057 | 327 | 6 % |
| [Eu.D ₁] ³⁺ Red | 4200 | 231 | 12 % |

La vitesse d'échange n'est donc pas à l'origine de l'augmentation de l'activité CEST. Le paramètre majoritairement influencé par l'état rédox et influençant le plus l'activité CEST vient du temps de relaxation longitudinal T₁. Le paramagnétisme provenant de l'électron non apparié du nitroxyde sur le ligand influence le T₁ du complexe et peut être mesuré par une méthode de d'inversion et récupération standard.

De manière générale, la relaxivité diminue après réduction des nitroxydes et est alors proche de zéro (à l'exception des complexes de dysprosium qui gardent une relaxivité 5 à 10 fois supérieure aux autres complexes, sans doute dû au grand nombre d'électrons non appariés de ce lanthanide).

Le complexe [Eu.D₁]³⁺, montrant une activité CEST, possède un T₁ qui évolue de 0,89 s à environ 2,73 s (temps de relaxation de l'eau libre) après réduction. Le complexe [Eu.D₂]³⁺ possède des valeurs de T₁ relativement proche, montrant ainsi que son absence d'activité n'est pas dû au temps de relaxation du complexe.

Tableau II-H : Temps de relaxation de l'ensemble des complexes des séries D_1 et D_2 enregistrés à 11,7 T à 298K dans un mélange $H_2O:CD_3CN$ (2:1), $[HEPES] = 0,07M$ à pH 7,4.

| Complexe | T_1^{OX} (s) | T_1^{RED} (s) | Activité CEST |
|-------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| $[Eu.D_1]^{3+}$ (14 mM) | $0,89 \pm 0,03$ | $2,73 \pm 0,14$ | 51 ppm (6%/12%) |
| $[Yb.D_1]^{3+}$ (13 mM) | $0,67 \pm 0,03$ | $1,77 \pm 0,07$ | - |
| $[Dy.D_1]^{3+}$ (13 mM) | $0,13 \pm 0,01$ | $0,33 \pm 0,01$ | - |
| $[Eu.D_2]^{3+}$ (20 mM) | $0,24 \pm 0,01$ | $2,2 \pm 0,09$ | - |
| $[Yb.D_2]^{3+}$ (20 mM) | $0,44 \pm 0,03$ | $1,06 \pm 0,11$ | - |
| $[Dy.D_2]^{3+}$ (20 mM) | $0,06 \pm 0,01$ | $0,11 \pm 0,01$ | - |

Si l'absence d'activité CEST du complexe $[Eu.D_2]^{3+}$ n'est pas due à la relaxation de la molécule d'eau, c'est que sa vitesse d'échange est différente. Afin de comprendre comment se comporte cette molécule d'eau, une étude théorique a été entreprise.

II.3.5 Etude théorique par la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT)

Afin de comprendre comment interagit la molécule d'eau avec son environnement, une étude a été réalisée par DFT. La structure cristallographique du ligand D_2 a été utilisée comme référence pour modéliser le complexe et pour simplifier les calculs de DFT. Afin d'avoir des temps de calculs raisonnables, le lanthanide a été substitué par l'yttrium, qui sert souvent d'analogue au gadolinium. Une première série de calculs a été réalisée pour étudier la position de la triple liaison. Le minimum d'énergie a été localisé lorsque la triple liaison pointe à l'extérieur du complexe (Figure II-58).

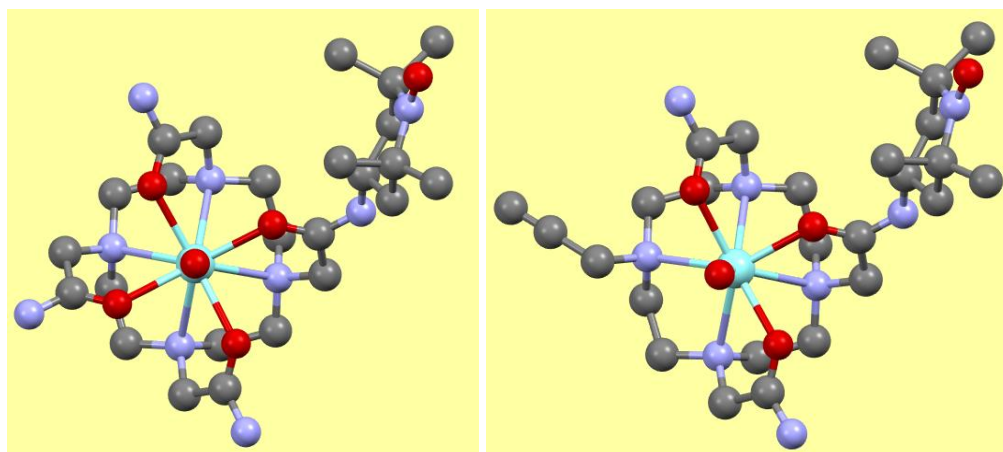


Figure II-58 : Structures optimisées pour les complexes $[Y.D_1]^{3+}$ (gauche) et $[Y.D_2]^{3+}$ (droite). En gris : atome de carbone, en violet : atome d'azote, en rouge : atome d'oxygène, en blanc : atome d'hydrogène de la molécule d'eau. Les autres atomes d'hydrogène ont été omis pour plus de clarté.

Une deuxième série de calculs a été réalisée pour étudier la position de la molécule d'eau coordonnée sur le centre métallique. L'angle scanné est celui du dièdre formé par l'atome

d'oxygène de la fonction amide, l'atome d'yttrium ainsi que les atomes d'oxygène et d'hydrogène de la molécule d'eau coordonnée (Figure II-59).

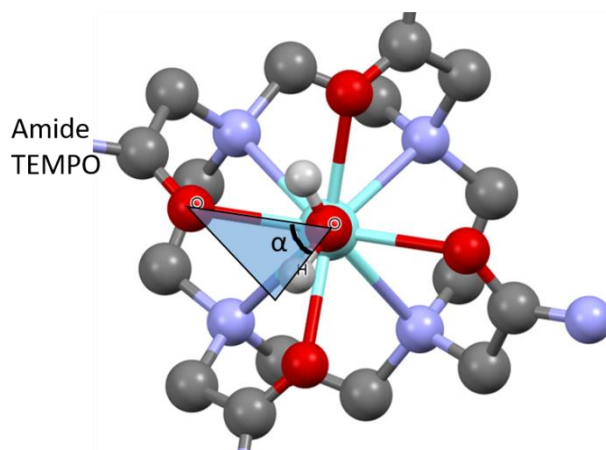


Figure II-59 : Angle utilisé pour la rotation de la molécule d'eau afin de calculer les niveaux énergétiques des interactions. En gris : atome de carbone, en violet : atome d'azote, en rouge : atome d'oxygène, en blanc : atome d'hydrogène de la molécule d'eau. Les autres atomes d'hydrogène ont été omis pour plus de clarté.

Dans la série de complexes $[Ln.D_1]^{3+}$, les atomes d'hydrogène de la molécule d'eau sont en liaisons hydrogène avec les atomes d'oxygène des carbonyles. Le minimum d'énergie se situant lorsque les atomes d'hydrogène pointent en direction de 2 fonctions carbonyles adjacentes (Figure II-60, gauche). Après une rotation de 50 degrés, les atomes d'hydrogène de la molécule d'eau pointent entre les unités carbonyles, donnant un maximum d'énergie (Figure II-60, droite). Cependant, la différence d'énergie est très faible, environ 0,3 kcal/mol, ce qui signifie que la rotation de la molécule d'eau est largement possible.

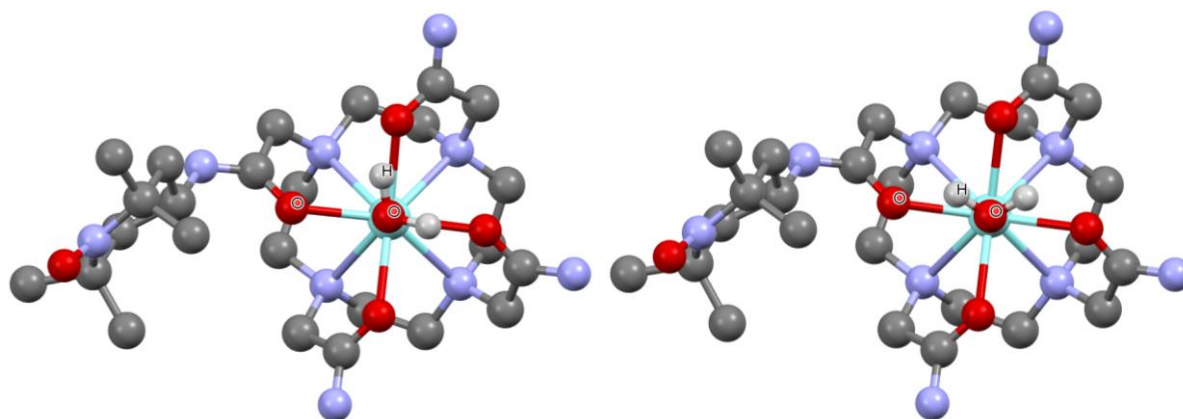


Figure II-60 : Rotation de la molécule d'eau sur $[Y.D_1]^{3+}$ menant aux niveaux énergétiques minimum (gauche) et maximum (droite) des interactions. En gris : atome de carbone, en violet : atome d'azote, en rouge : atome d'oxygène, en blanc : atome d'hydrogène de la molécule d'eau. Les autres atomes d'hydrogène ont été omis pour plus de clarté.

Pour le complexe $[Y.D_2]^{3+}$, seulement 3 fonctions carbonyles sont présentes sur la molécule, la fonction alcyne ne pouvant pas intervenir dans des liaisons hydrogène. Le minimum d'énergie s'obtient lorsque les deux atomes d'hydrogène de la molécule d'eau pointent en direction de deux fonctions carbonyles (Figure II-61, gauche). Lorsque la molécule d'eau tourne, ses atomes d'hydrogène se trouvent en face de la fonction alcyne, menant à un maximum d'énergie (Figure II-61, droite).

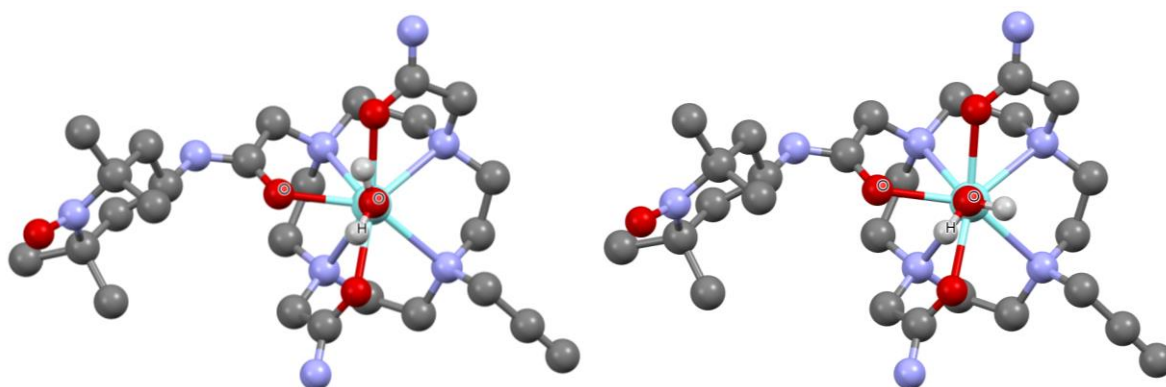


Figure II-61 : Rotation de la molécule d'eau sur $[Y.D_2]^{3+}$ menant aux niveaux énergétiques minimum (gauche) et maximum (droite) des interactions. En gris : atome de carbone, en violet : atome d'azote, en rouge : atome d'oxygène, en blanc : atome d'hydrogène de la molécule d'eau. Les autres atomes d'hydrogène ont été omis pour plus de clarté.

Lorsque la fonction alcyne est présente sur le ligand, la différence d'énergie entre le minimum et le maximum est d'environ 3 kcal/mol, soit 10 fois plus importante que dans le profil de $[Y.D_1]^{3+}$ (de 0,3 kcal/mol). La molécule d'eau ne peut donc pas tourner aussi librement que lorsque les 4 fonctions acétamides sont présentes (dans le cas d' $[Y.D_1]^{3+}$, Figure II-62, noir). Cette différence peut être à l'origine de la différence d'activité observée en CEST.

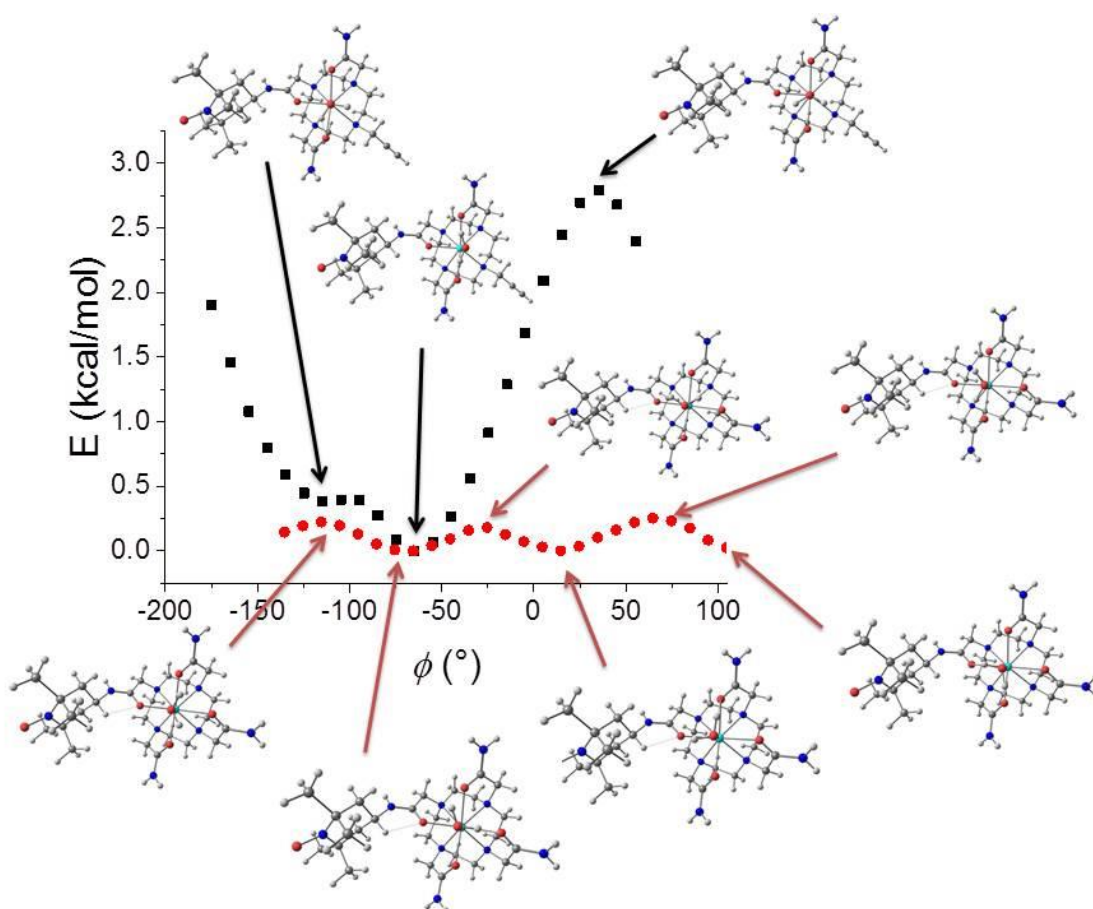


Figure II-62 : Niveau d'énergie moléculaire en fonction du degré de rotation de la molécule d'eau sur l'yttrium. Image issue de la référence^[131].

II.3.6 Etudes de la relaxivité des complexes

La faible relaxation électronique des 7 électrons f^7 du gadolinium rend ce métal inefficace en tant que qu'agent de contraste ParaCEST mais le rend très intéressant pour l'IRM. La relaxivité r_1 des complexes $[\text{Gd.D}_1]^{3+}$ et $[\text{Gd.D}_2]^{3+}$ a été étudiée par Fast Field Cycling (FFC)-NMR. Cette technique permet d'étudier le temps de relaxation des protons de l'eau influencé par un complexe de gadolinium en fonction du champ magnétique appliqué, généralement entre 30 kHz et 30 MHz. Les profils de ces deux complexes sont présentés dans la Figure II-63, en fonction de leur état d'oxydation, oxydé ou réduit.

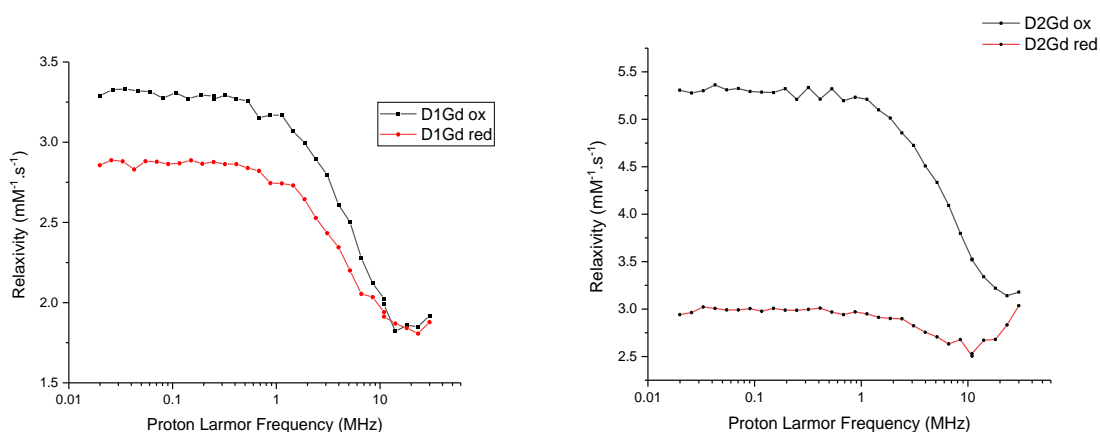


Figure II-63 : Profil de relaxivité des complexes $[\text{Gd.D}_1]^{3+}$ (gauche) et $[\text{Gd.D}_2]^{3+}$ (droite) pour des solutions à 2 mM dans H_2O à pH 7,4 (0.1 M de tampon HEPES) à 298 K.

A haut champ (30 MHz), le complexe de $[\text{Gd.D}_1]^{3+}$ possède un temps de relaxation de 0,26 s correspondant à une relaxivité r_1 de $1,92 \text{ mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$. Similairement, le complexe $[\text{Gd.D}_2]^{3+}$ possède un temps de relaxation de 0,16 s, soit un r_1 de $3,18 \text{ mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$. Une diminution de la relaxivité lors de la réduction des nitroxydes de l'ordre de 2% et 4% est observée pour $[\text{Gd.D}_1]^{3+}$ et de $[\text{Gd.D}_2]^{3+}$ respectivement. Dans cette région, une faible vitesse d'échange de la molécule en première sphère de coordination et un temps de rotation corrélational court limite la relaxivité des complexes de gadolinium.

A bas champ (30 kHz), le complexe de $[\text{Gd.D}_1]^{3+}$ possède un temps de relaxation de 0,15 s correspondant à une relaxivité r_1 de $3,33 \text{ mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$ et le complexe $[\text{Gd.D}_2]^{3+}$ possède un temps de relaxation de 0,09 s, soit un r_1 de $5,28 \text{ mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$. Une diminution de la relaxivité lors de la réduction des nitroxydes de l'ordre de 13% et 44% est alors observée pour $[\text{Gd.D}_1]^{3+}$ et de $[\text{Gd.D}_2]^{3+}$ respectivement. Dans cette région, une relaxation électronique rapide limite la relaxivité^[132]. Les grandes valeurs de relaxivité sont typiques des complexes de gadolinium symétriques avec des temps de relaxations électroniques longs^[31]. La différence de r_1 suggère que le complexe $[\text{Gd.D}_1]^{3+}$ possède une symétrie plus importante que le $[\text{Gd.D}_2]^{3+}$. A bas champ, la forme réduite du $[\text{Gd.D}_2]^{3+}$ montre une relaxivité similaire au complexe $[\text{Gd.D}_1]^{3+}$ mais présente une relaxivité supérieure à haut champ. On peut noter aussi que l'état rédox a une influence moins importante pour $[\text{Gd.D}_1]^{3+}$ avec une augmentation de 20% à bas champ et moins de 5% à haut champ lors de l'oxydation. Le complexe $[\text{Gd.D}_2]^{3+}$ montre

ainsi une réponse supérieure au stimulus rédox avec une augmentation de près de 75% à bas champ lors de l'oxydation de l'hydroxylamine en nitroxyde.

Le temps de relaxation T_1 des molécules d'eau est modulé par l'état rédox sans influencer la vitesse d'échange comme a pu le démontrer D. Sherry *et al.*^[105] La formation d'un radical paramagnétique aux alentours du gadolinium altère donc significativement la relaxation des protons de la molécule d'eau coordonnée. Les complexes $[\text{Gd.D}_1]^{3+}$ et $[\text{Gd.D}_2]^{3+}$ peuvent donc être considérés comme des sondes rédox à base de gadolinium mais leur faible relaxivité limite leur utilisation en tant que sonde pour l'IRM.

II.3.7 Etudes biologiques des complexes

II.3.7.1 Les tests de cytotoxicité

La toxicité des complexes $[\text{Ln.D}_1]^{3+}$ et $[\text{Ln.D}_2]^{3+}$ a été évaluée sur des lignées cellulaires M21. Le but est de vérifier qu'ils puissent être utilisés comme sonde rédox biologique en étant non toxiques. Ces études nous donnent aussi une information sur l'éventuelle pénétration cellulaire. Les cellules ont été incubées avec des solutions de complexes à différentes concentrations (1-40 μM) sur des temps de 24h, 48h et 72h. La viabilité des cellules en présence des complexes est présentée dans la Figure II-64 ci-dessous. L'ensemble des complexes de la série $[\text{Ln.D}_1]^{3+}$ ne présente qu'une cytotoxicité négligeable, même après 72h d'incubation et avec une concentration en complexe élevée de 40 μM (Figure II-64).

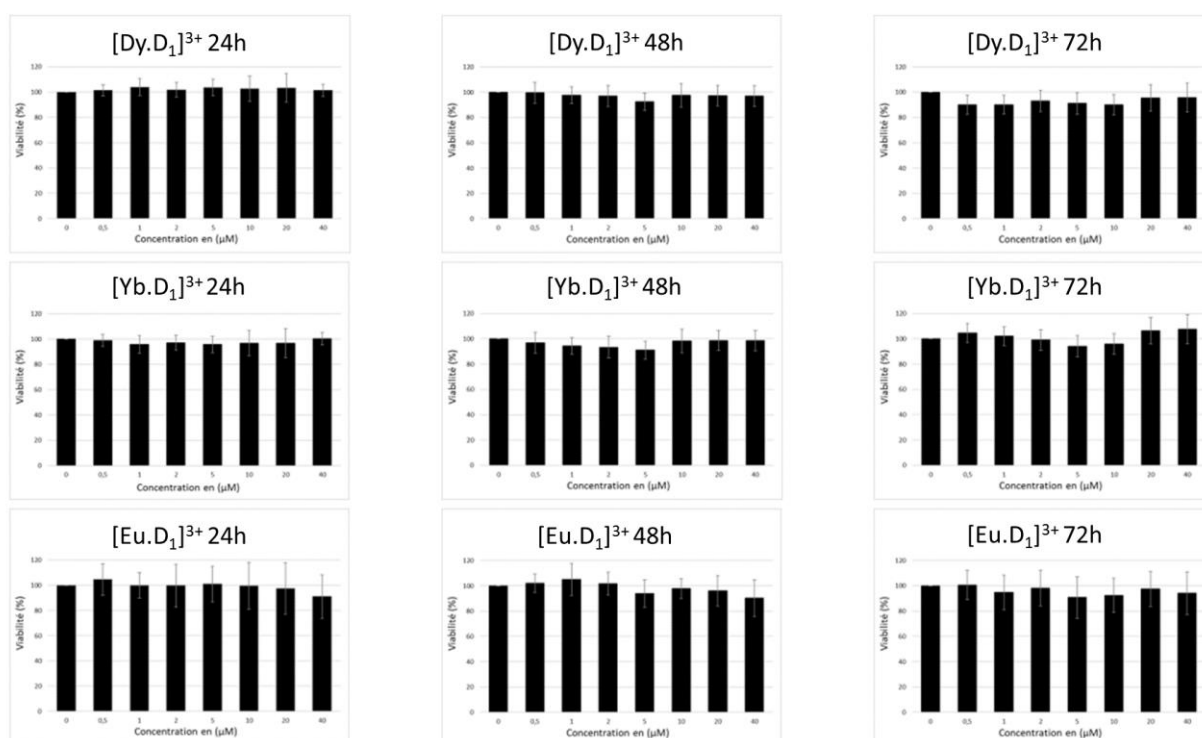


Figure II-64 : Résultats des tests MTT sur la série de complexes $[\text{Ln.D}_1]^{3+}$.

Les complexes de la série [Ln.D₂]³⁺ présentent une cytotoxicité légèrement plus élevée avec une viabilité cellulaire de l'ordre de 60-70% (invariable pour des concentrations entre 1 et 40 μM). La raison exacte de la différence de toxicité entre [Ln.D₁]³⁺ et [Ln.D₂]³⁺ est difficile à interpréter à l'heure actuelle.

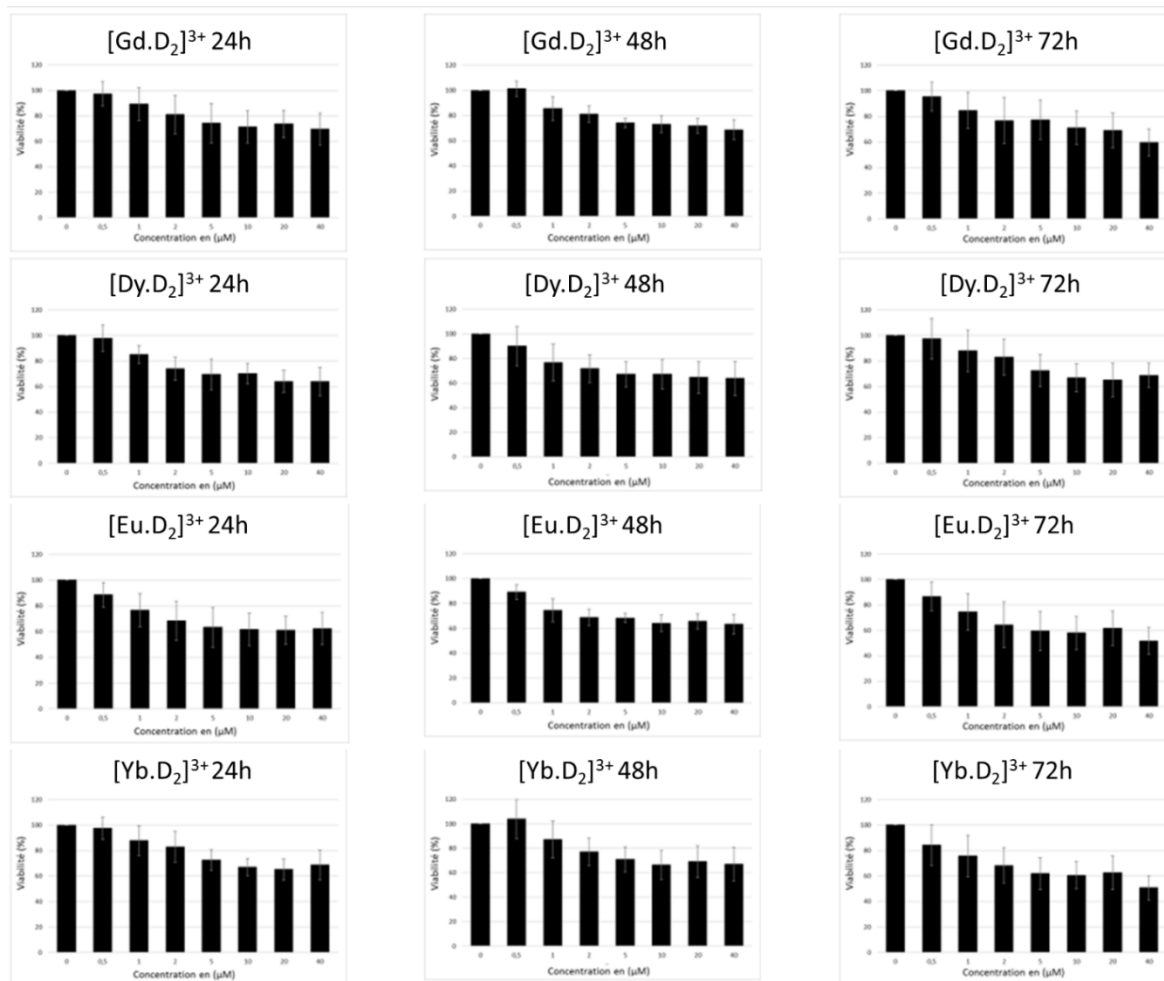


Figure II-65 : Résultats des tests MTT sur la série de complexes [Ln.D₂]³⁺.

On retiendra que la toxicité des complexes des deux séries est faible ou négligeable, et donc compatible avec leur utilisation en tant que sonde biologique. Une potentielle explication pour l'absence ou la très faible toxicité des complexes [Ln.D₁]³⁺ et [Ln.D₂]³⁺ pourrait être une pénétration cellulaire négligeable, en lien avec les agents de contraste classiques pour l'IRM qui sont injectés dans la circulation sanguine. Grâce au signal du radical nitroxyde, il est possible d'évaluer cette pénétration cellulaire.

II.3.7.2 Pénétration cellulaire

La pénétration cellulaire a été quantifiée en utilisant un complexe de dysprosium représentatif de la série et en utilisant la spectroscopie RPE. Le complexe a été incubé avec des cellules M21 à une concentration en métal de 200 μM. Cette concentration est plus importante que pour l'étude de toxicité pour permettre une détection plus aisée du signal RPE du nitroxyde. Le surnageant, le culot cellulaire ainsi que le lysat ont ensuite été analysés

Chapitre 2

par RPE à des temps croissants (0, 5, 10, 30 et 60 min). L'intensité du signal du nitroxyde a été quantifiée en conditions non saturantes. Dans les limites de conditions de la RPE, aucun signal n'a été détecté dans le culot (Figure II-67 et Figure II-68, droite) ou le lysat (Figure II-67 et Figure II-68, gauche) des cellules. Ceci signifie que soit le complexe n'est ni internalisé, ni en interaction avec la membrane, soit que le nitroxyde a été réduit. L'analyse du surnageant et sa comparaison avec un blanc constitué du complexe à la même concentration montre que 100% du composé est encore présent en solution (Figure II-66). Ces résultats démontrent ainsi que le complexe n'est pas internalisé, vraisemblablement à cause de sa nature polaire (trichargé), ce qui peut être un avantage pour son utilisation en tant qu'agent de contraste.

La série $[\text{Ln.D}_2]^{3+}$ semblait un peu plus toxique, cependant aucune pénétration cellulaire n'a pu être observée en utilisant la même méthodologie.

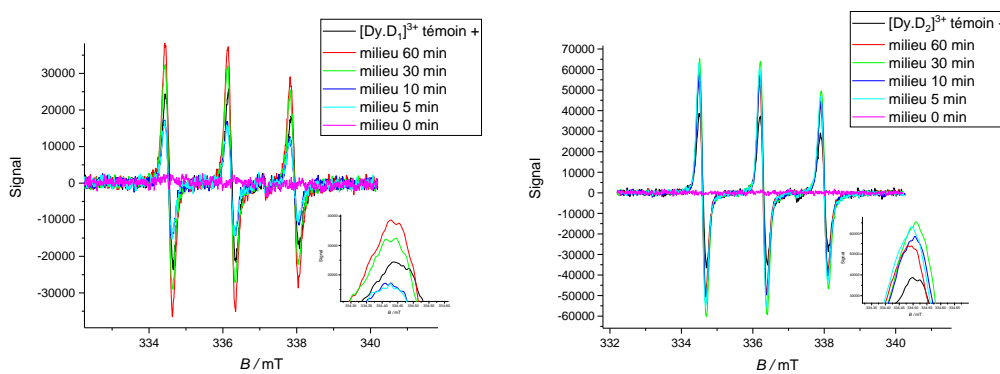


Figure II-66 : Résultats des tests de pénétration cellulaire, milieu cellulaire. Gauche : $[\text{Dy.D}_1]^{3+}$. Droite : $[\text{Dy.D}_2]^{3+}$.

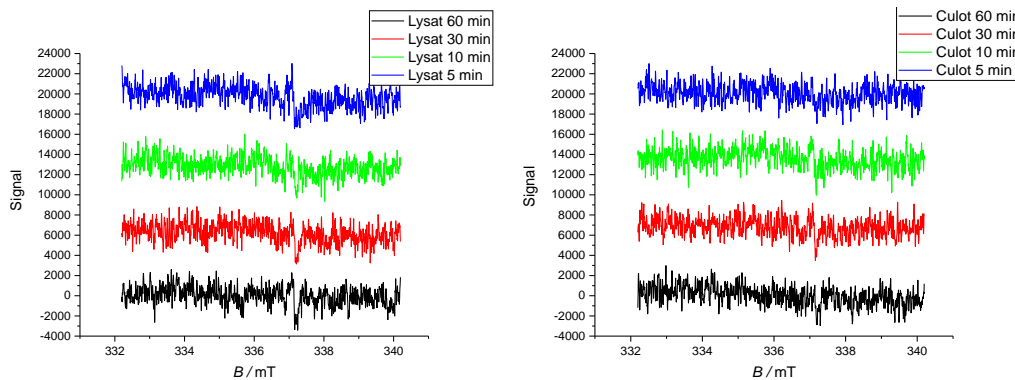


Figure II-67 : Résultats des tests de pénétration cellulaire, $[\text{Dy.D}_1]^{3+}$. Gauche : lysat cellulaire. Droite : culot cellulaire.

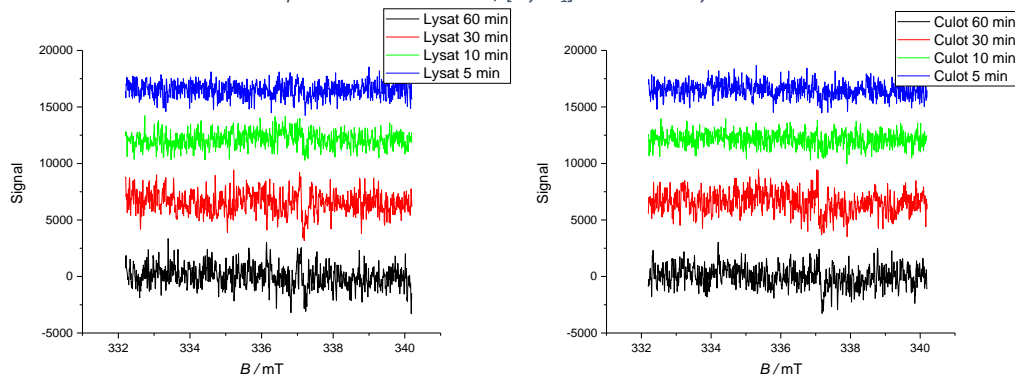


Figure II-68 : Résultats des tests de pénétration cellulaire, $[\text{Dy.D}_2]^{3+}$. Gauche : lysat cellulaire. Droite : culot cellulaire.

II.4 BILAN ET PERSPECTIVES

Dans ce deuxième chapitre, nous avons pu concevoir et caractériser de nouveaux ligands et complexes de lanthanides intégrant une unité rédox active stable. Les caractérisations en luminescence ont pu montrer qu'une molécule d'eau était présente dans nos deux séries de complexes et ont pu montrer une sphère de coordination différente. Cette différence de symétrie autour du lanthanide altère les propriétés magnétiques des complexes. Le design des sondes est donc primordial dans l'obtention d'un signal CEST et dans l'acquisition d'un contraste en imagerie médicale.

Une activité CEST a pu être détectée pour un complexe grâce à l'échange d'une molécule d'eau située en première sphère de coordination. L'influence du nitroxyde a aussi pu être mesurée et démontre l'importance de l'état d'oxydation de notre ligand sur son environnement. Ainsi une différence d'état d'oxydation de notre ligand pourrait être détectée par imagerie CEST et permettrait une potentielle détection du stress oxydant. Nos complexes ont pu montrer une réversibilité vis-à-vis de l'oxydation et de la réduction en utilisant des réducteurs biologiques tels que l'ascorbate.

Enfin, nos complexes présentent une cytotoxicité négligeable et ne sont pas capables de pénétrer au sein des cellules. Pour une potentielle utilisation en milieu biologique, il est nécessaire d'aller plus loin dans l'étude de la stabilité de nos composés.

La fonction alcyne de la deuxième série devait permettre une fonctionnalisation ultérieure par chimie « click » et notamment l'incorporation d'une antenne. Cependant tous nos essais de fonctionnalisation en utilisant cette chimie n'ont pas fonctionné (résultats non présentés ici). Bon chélateur du cuivre, le DOTAM a sans doute empêché la réaction de chimie « click » de se produire par transmétallation. Afin de se passer de la chimie « click », nous avons décidé de fonctionnaliser directement une antenne sur notre ligand pour obtenir une sonde bimodale donnant un potentiel signal en CEST et en luminescence. Ce travail est décrit dans la suite de ces travaux.

III. CHAPITRE 3 : COMPLEXES INTEGRANT UNE ANTENNE : D₃ ET D₄

| | | |
|-------------|--|-----|
| III.1 | DESIGN DES COMPLEXES [Ln.D ₃] ³⁺ ET [Ln.D ₄] ³⁺ | 117 |
| III.1.1 | <i>Intérêt de la fonction phénylacétamide en CEST</i> | 117 |
| III.1.2 | <i>Intérêt de la fonction CF₃ en RMN du ¹⁹F</i> | 120 |
| III.1.3 | <i>Choix du lanthanide et de l'antenne</i> | 120 |
| III.1.4 | <i>Design des ligands D₃ et D₄</i> | 121 |
| III.2 | SYNTHESE DES LIGAND ET DES COMPLEXES PRECURSEURS..... | 122 |
| III.2.1 | <i>Synthèse des précurseurs</i> | 122 |
| III.2.1.1 | Synthèse de l'antenne..... | 122 |
| III.2.1.1.1 | Voie « amination réductrice »..... | 123 |
| III.2.1.1.2 | Voie « substitution »..... | 123 |
| III.2.1.1.3 | Amélioration de la solubilité en milieu aqueux..... | 124 |
| III.2.1.2 | Synthèse des bras CEST actifs..... | 126 |
| III.2.2 | <i>Synthèse des ligands D₃ et D₄</i> | 126 |
| III.2.2.1 | Adaptation de la voie « glyoxal »..... | 126 |
| III.2.2.2 | Incorporation des fonctions hydroxyquinoléine et TEMPO..... | 127 |
| III.2.3 | <i>Formation des complexes</i> | 129 |
| III.2.3.1 | Formation des complexes [Ln.D ₃] ³⁺ et [Ln.D ₄] ³⁺ | 129 |
| III.2.3.2 | Caractérisation des complexes [Ln.D ₃] ³⁺ et [Ln.D ₄] ³⁺ | 130 |
| III.3 | ETUDES DES LIGANDS ET COMPLEXES PAR ELECTROCHIMIE..... | 130 |
| III.3.1 | <i>Etude électrochimique des espèces organiques</i> | 130 |
| III.3.1.1 | Etude des unités redox seules..... | 131 |
| III.3.1.1.1 | Comportement rédox de l'hydroxyquinoléine issu de la littérature..... | 131 |
| III.3.1.1.2 | Etude du précurseur..... | 132 |
| III.3.1.2 | Etude électrochimique des ligands..... | 133 |
| III.3.1.3 | Etude électrochimique des complexes..... | 134 |
| III.4 | ETUDES DES COMPLEXES PAR SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION ET LUMINESCENCE..... | 135 |
| III.4.1 | <i>Spectroscopie d'absorption UV-Vis</i> | 135 |
| III.4.1.1 | Spectroscopie d'absorption UV des précurseurs..... | 135 |
| III.4.1.2 | Spectroscopie d'absorption UV des ligands D ₃ et D ₄ | 136 |
| III.4.1.3 | Spectroscopie d'absorption UV des complexes [Ln.D ₃] ³⁺ et [Ln.D ₄] ³⁺ | 136 |
| III.4.2 | <i>Spectroscopie de luminescence</i> | 137 |
| III.4.2.1 | Photoluminescence des complexes d'euporium..... | 137 |
| III.4.2.2 | Détermination du nombre de molécules de solvant coordonnées..... | 139 |
| III.4.2.2.1 | Mesure dans le méthanol..... | 139 |
| III.4.2.2.2 | Mesures dans un mélange de solvants..... | 140 |
| III.4.2.3 | Photoluminescence des complexes d'ytterbium..... | 142 |
| III.4.2.4 | Influence de l'état rédox sur la luminescence..... | 143 |
| III.5 | ETUDES PAR RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE..... | 144 |
| III.5.1 | <i>Spectroscopie RPE des ligands</i> | 144 |
| III.5.2 | <i>Spectroscopie RPE des complexes de lanthanides</i> | 146 |
| III.5.2.1 | Complexes d'ytterbium..... | 146 |
| III.5.2.2 | Complexes d'euporium..... | 146 |
| III.6 | SPECTROSCOPIE CEST DES COMPLEXES..... | 147 |
| III.6.1 | <i>Spectres CEST de la série D₃</i> | 148 |
| III.6.2 | <i>Spectres CEST de la série D₄</i> | 149 |
| III.6.3 | <i>Influence de l'état rédox sur l'activité CEST</i> | 149 |
| III.7 | BILAN ET PERSPECTIVES..... | 150 |

III.1 DESIGN DES COMPLEXES [LN.D₃]³⁺ ET [LN.D₄]³⁺

L'objectif de cette série de complexes est de concevoir des sondes bimodales CEST / luminescence par incorporation d'une antenne sur notre ligand. Dans le chapitre précédent, nous avons décrit des ligands comportant un bras propargyle ; des tentatives de chimie "click" en utilisant du cuivre et de l'ascorbate ont été menées mais ces essais sont restés infructueux. Une probable explication est la transmétallation du complexe avec le cuivre qui s'insérerait à la place du lanthanide bloquant le cycle catalytique. Afin de contourner cette difficulté, nous allons ici fonctionnaliser directement le cyclène avec un chromophore par substitution nucléophile.

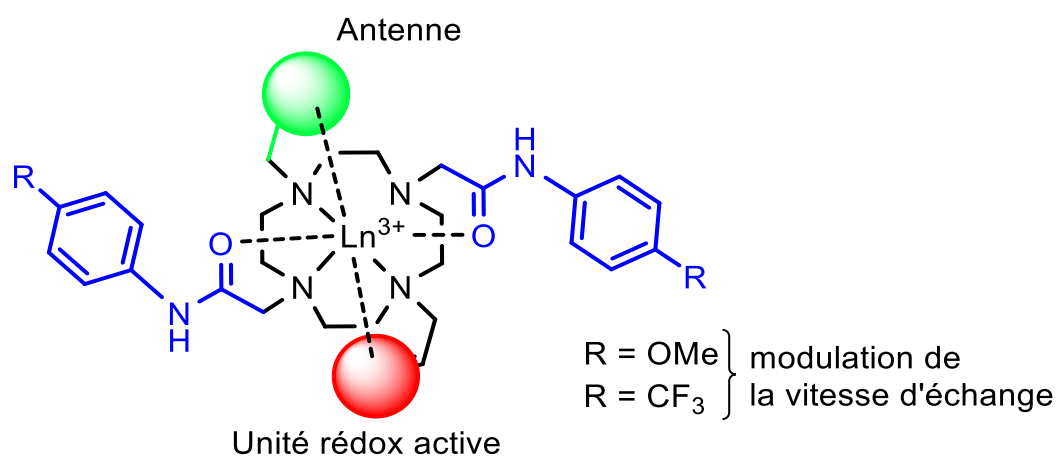


Figure III-1 : Design général de la deuxième série de composés.

III.1.1 Intérêt de la fonction phénylacétamide en CEST

Dans les premières séries de complexes, les protons des fonctions acétamides n'ont pas pu être détectés sur le spectre Z. Seuls les protons de la molécule d'eau coordonnée à l'euporium se sont avérés détectables dans le complexe [Eu.D₁]³⁺. Afin de moduler la vitesse d'échange des protons provenant de la molécule d'eau coordonnée, une approche consiste à fonctionnaliser les amides avec des groupements phényles substitués par des groupements électro-donneurs ou accepteurs.

De manière générale, la densité électronique autour de l'atome d'oxygène de la fonction amide va augmenter lorsque les substituants sont électrodonneurs (EDG) (Figure III-2). La liaison métal-eau sera affaiblie et la vitesse d'échange augmentera. A l'inverse, les substituants électroattracteurs (EWG) vont affaiblir les liaisons carbonyles-métal et par voie de conséquence renforcer la liaison métal-eau et ralentir cette vitesse d'échange.

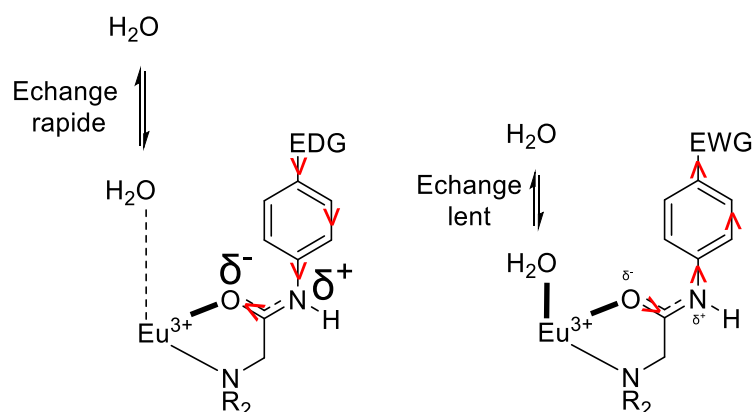


Figure III-2 : Influence des propriétés électroniques sur la molécule d'eau coordonnée au métal.

En 2008^[53], D. Sherry *et al.* ont mis au point le complexe d'euprium [EuDOTAM-PhX]³⁺ dont un atome d'azote du cyclène est fonctionnalisé par un groupement phénylacétamide diversement substitué (Figure III-3).

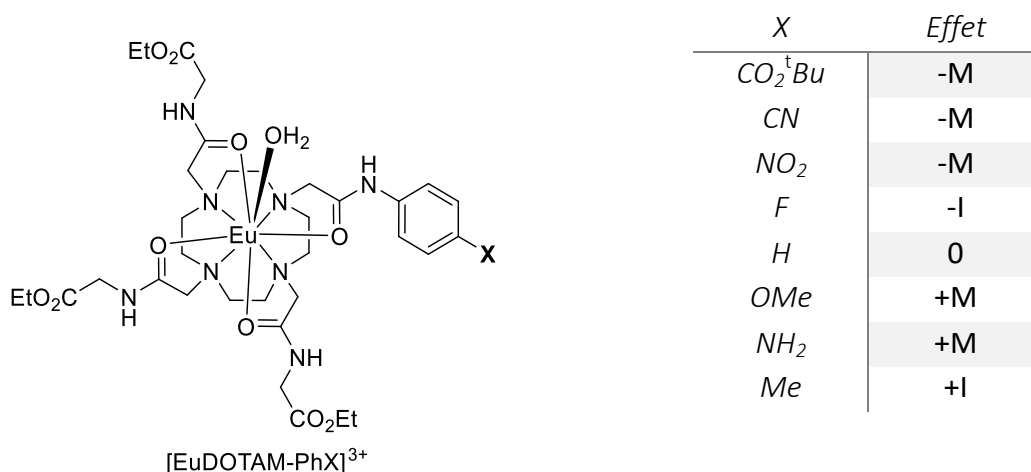


Figure III-3 : Complexes d'euprium [EuDOTAM-PhX]³⁺^[53]. -M : substituants aux effets mésomères attracteurs, -I : substituants aux effets inductifs attracteurs, 0 : pas de substituant, +M : substituants aux effets mésomères donneurs, +I : substituants aux effets inductifs donneurs.

Les complexes [EuDOTAM-PhX]³⁺ montrent tous un signal CEST aux alentours de 45 ppm, attribué à la molécule d'eau coordonnée à l'euprium. L'intensité du signal varie avec la nature du substituant X. Le proton de la fonction acétamide n'est cependant pas visible. L'activité CEST est globalement moins importante pour les complexes possédant des substituants électrodonneurs que pour les complexes possédant des substituants électroattracteurs. Le maximum d'activité est atteint pour le complexe non-substitué (Figure III-4). On peut également observer des tendances en termes de temps de résidence de la molécule d'eau (τ_M).

- Les substituants mésomères attracteurs (-M) induisent des temps de résidence de la molécule d'eau (τ_M) relativement long (environ 350 μ s) ; au contraire les substituants mésomères donneurs (+M) conduisent à des τ_M de l'ordre de 200 μ s (Figure III-4).

- Les substituants inductifs attracteurs (-I) induisent des τ_M de l'ordre de 144 μ s contrairement aux substituants inductifs donneurs (+I) qui conduisent à des τ_M de l'ordre de 310 μ s.

L'activité observée en CEST est donc importante lorsque les substituants sont attracteurs, bien que le τ_M soit différent. La relation entre les propriétés électroniques des substituants et le temps de résidence de la molécule d'eau est donc plus subtile qu'une simple valeur de temps de résidence.

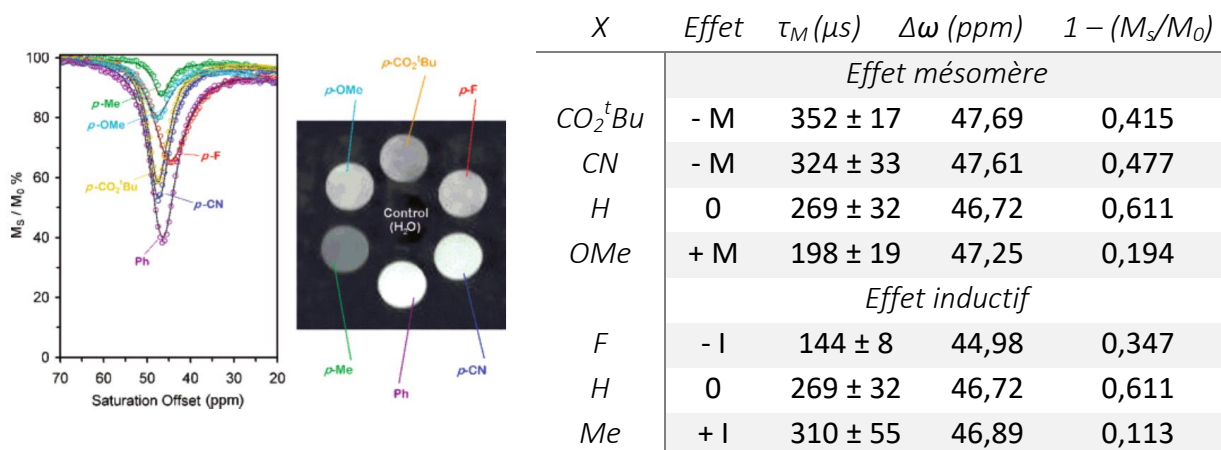


Figure III-4 : Influence des modulations électroniques sur le temps de résidence de la molécule d'eau et sur l'effet CEST. Schéma issu de la référence^[53].

Un autre intérêt des groupements phénylacétamides est la possibilité de détecter le proton de la fonction amide. En effet, Hudson *et al.* ont montré en 2014 que ce proton était observable dans le complexe de thulium $[Tm-DOTAM-PhOMe]^{3+}$ (Figure III-5)^[41]. Ils ont également montré que l'effet CEST est maximum aux gammes de pH physiologiques entre 7 et 7,5 (Figure III-5).

Les fonctions phénylacétamides ont donc un double avantage et semblent particulièrement appropriées pour être détectées en CEST. Comme nous le verrons par la suite les complexes comportant cette fonction sont malheureusement peu solubles en solvant aqueux. C'est pourquoi l'étude de ce type de composés sera réalisée dans un mélange d'eau et d'acétonitrile.

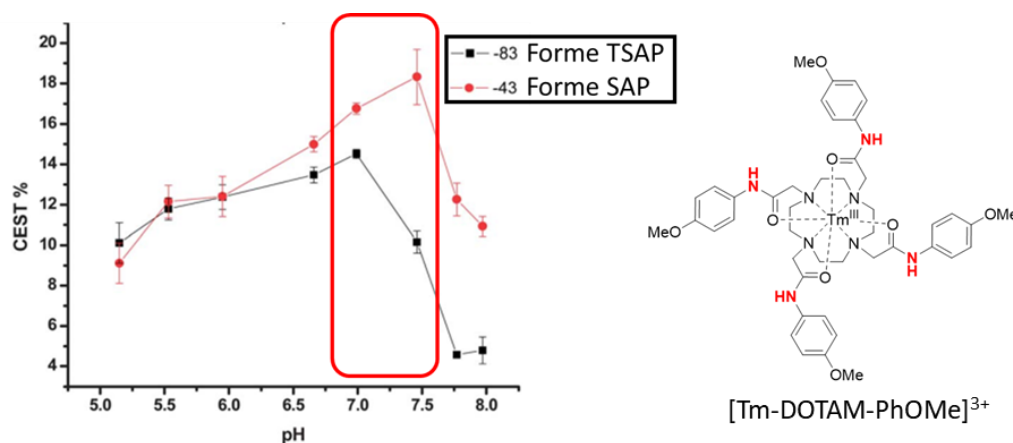


Figure III-5 : Effet CEST provenant des protons des fonctions acétamides du complexe $[Tm-DOTAM-PhOMe]^{3+}$. Image issue de la référence^[41].

III.1.2 Intérêt de la fonction CF₃ en RMN du ¹⁹F

L'introduction d'un groupement trifluorométhyle procure aux complexes la particularité d'être détectables en RMN ¹⁹F. Or le signal du ¹⁹F peut être influencé par l'état rédox environnant dans certains complexes. Ce phénomène est utilisé dans la littérature pour diverses applications (sondes rédox ou thermométrique)^[49,133]. Des agents responsifs pour l'imagerie médicale ont d'ailleurs été mis au point et utilisent l'influence du paramagnétisme sur le signal du fluor pour détecter des ROS. C'est ainsi que l'oxydation du complexe paramagnétique [Co(II)-NODA-CF₃] (Figure III-6) par le peroxyde d'hydrogène mène au complexe [Co(III)-NODA-CF₃]⁺ diamagnétique dont le signal en RMN du fluor ¹⁹F se décale de 3,6 ppm et les temps de relaxation T₁ et T₂ augmente de 60 et 120 fois, respectivement^[134].

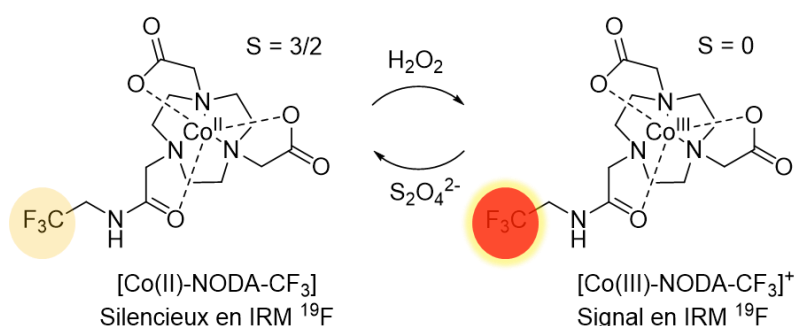


Figure III-6 : Agent réagissant avec le peroxyde d'hydrogène donnant un signal en IRM du fluor. Redessinée de la référence^[134].

III.1.3 Choix du lanthanide et de l'antenne

Comme introduit dans le chapitre 1, l'imagerie optique dans le proche infrarouge permet une vision en profondeur des tissus. Pour cela des lanthanides comme l'ytterbium ou le néodyme permettent de combiner les techniques de luminescence NIR et de CEST. J.-C. Bünzli *et al.* ont mis au point des complexes d'ytterbium et de néodyme à partir d'un ligand 1,2-diamino-éthane fonctionnalisé par 4 bras chromophores chélatants de type 8-hydroxyquinoléine (8-HQ). Ces complexes sont destinés à être utilisés comme sondes luminescentes dans le proche infrarouge^[135]. Le chromophore 8-HQ permet une sensibilisation optimale des ions lanthanides émettant dans le NIR (la transition ³ππ* 0-phonon se trouvant aux alentours de 19 000 cm⁻¹). Nous avons voulu intégrer ce même type de chromophore au sein des nouvelles séries de ligand D₃ et D₄.

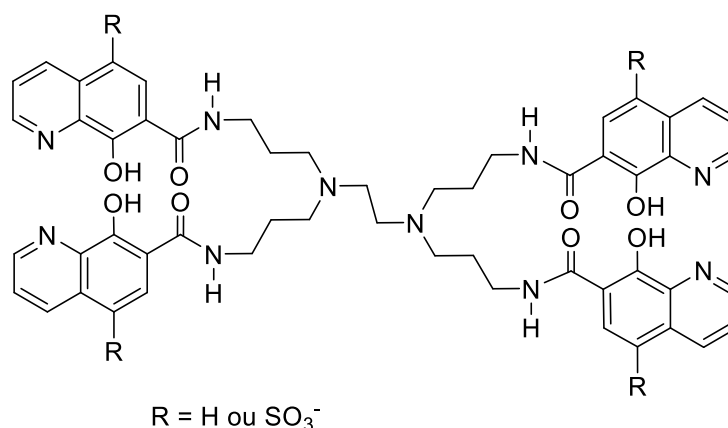


Figure III-7 : Ligand basé sur la 8-hydroxyquinoléine pour une émission dans le NIR des complexes d'Yb³⁺ et de Nd³⁺.

Les complexes d'euporium [Eu-CH₂-OBn] et [Eu-amide-OBn-H₂O] ont été synthétisés par J. Williams *et al.*^[136] Lorsque l'atome d'azote coordine le métal, l'encombrement stérique du chromophore ne permet pas la coordination d'une molécule d'eau supplémentaire (Figure III-8). Les groupements quinoléines proche du métal semblent donc être des chromophores adaptés pour exclure les molécules d'eau de la première sphère de coordination.

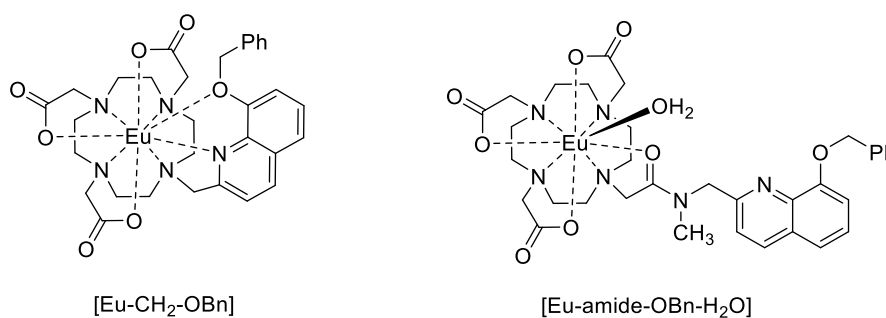


Figure III-8 : Complexes d'euporium synthétisés par J. Williams^[136].

III.1.4 Design des ligands D₃ et D₄

Le design de cette famille de ligand se concentre sur l'incorporation d'une antenne, d'une fonction rédox-active et de 2 bras phénylacétamides substitués. Le substituant sera soit mésomère donneur (OMe) soit inductif attracteur (CF₃) (Figure III-9). On notera que le substituant CF₃ offre la possibilité d'observer un signal en RMN ¹⁹F.

Un chromophore du type 8-hydroxyquinoléine (8-HQ) a été sélectionné pour sensibiliser l'ytterbium^[137] (en vert, Figure III-9). Enfin, l'aminoTEMPO jouera à nouveau le rôle d'unité rédox (en rouge, Figure III-9).

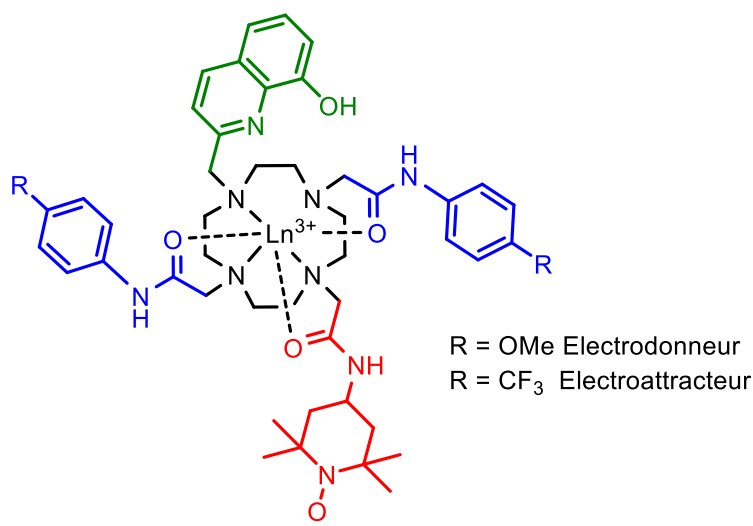


Figure III-9 : Structure des complexes $[Ln.D_3]^{3+}$ ($R = OMe$) et $[Ln.D_4]^{3+}$ ($R = CF_3$).

III.2 SYNTHÈSE DES LIGAND ET DES COMPLEXES PRECURSEURS

III.2.1 Synthèse des précurseurs

III.2.1.1 Synthèse de l'antenne

Pour introduire le groupement hydroxyquinoléine sur un cyclène, deux voies sont possibles : il s'agit soit de l'amination réductrice de la 8-hydroxyquinoléine-2-carbaldéhyde (Figure III-10, a) soit la substitution nucléophile avec la 2-chlorométhyl-8-hydroxyquinoléine (Figure III-10, b) comme nous l'avons fait dans le chapitre précédent.

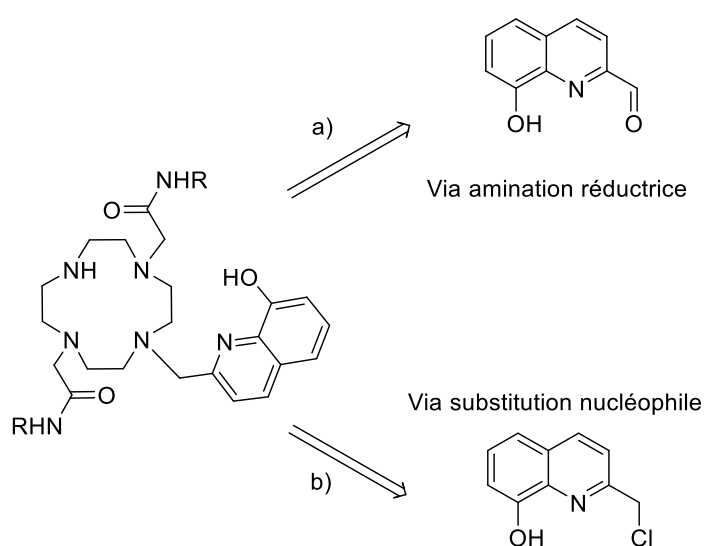


Figure III-10 : Voies permettant de substituer le cyclène.

III.2.1.1.1 Voie « amination réductrice »

Une seule étape de synthèse est nécessaire pour obtenir l'intermédiaire nécessaire à l'amination réductrice, c'est pourquoi cette voie a été choisie initialement. Afin de pouvoir fonctionnaliser la 2-méthyl-8-quinolinol (22), une étape d'oxydation du méthyle est nécessaire. En utilisant 1,1 équivalent de dioxyde de sélénium comme oxydant dans du 1,4-dioxane à 80°C pendant 24h, l'aldéhyde (23) est obtenu avec un très bon rendement de 92% (Figure III-11).

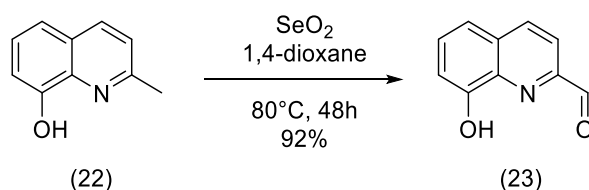


Figure III-11 : Oxydation de la 2-méthyl-8-quinolinol.

L'étape suivante consiste à réaliser l'amination réductrice^[138]. En ajoutant un réducteur « doux » comme le NaBH(OAc)₃, il est en théorie possible de réduire l'imine formée sans réduire l'aldéhyde. En appliquant ces conditions de synthèse sur nos composés (38) et (23), nous n'avons pas obtenu le produit attendu (38') (Figure III-12). Les produits de départ restent présents en solution pendant plus de 48h sans que le produit désiré n'apparaisse. La fonctionnalisation du 3^{ème} azote du composé (38) s'avère relativement compliquée, sans doute dû à l'encombrement des groupements phénylacétamides déjà présents.

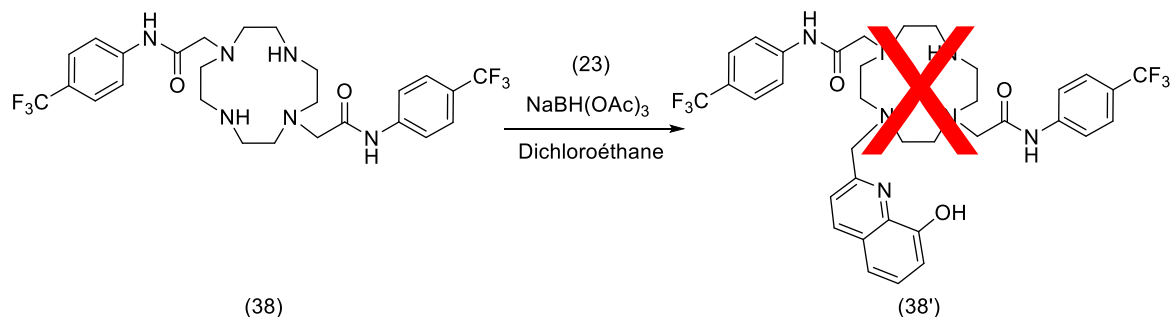


Figure III-12 : Tentative d'amination réductrice.

III.2.1.1.2 Voie « substitution »

La réduction de la fonction aldéhyde de (23) en fonction alcool de (24) est réalisée en suivant le protocole établi par F. Rizzo *et al.*^[139] En additionnant du tétrahydroborate de sodium sur notre composé (23) en solution dans du méthanol, après une nuit la fonction alcool sur (24) est obtenu avec un rendement de 92% (Figure III-13). La fonction alcool primaire formée étant réactive, sa chloration peut être réalisée de manière sélective. En réaction avec du chlorure de thionyle dans du méthanol pendant 30h, le composé (25) est obtenu avec un rendement de 81% (Figure III-13). Cette synthèse nous permet d'obtenir un groupement hydroxyquinoléine chloré comme rapporté dans les travaux de A. Papagni *et al.*^[139].

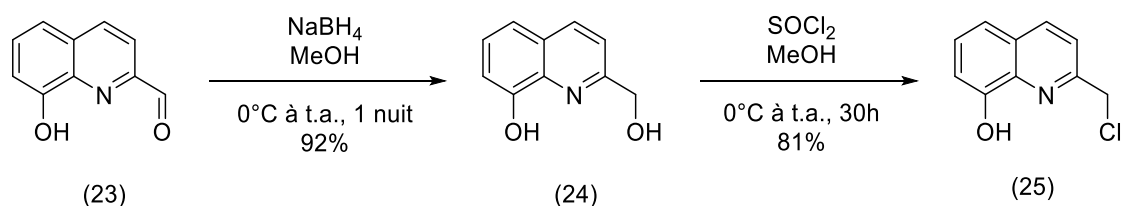


Figure III-13 : Voie de synthèse du précurseur (25).

III.2.1.1.3 Amélioration de la solubilité en milieu aqueux

Pour une utilisation en milieu biologique, les complexes doivent être solubles dans l'eau. Pour que le complexe gagne en solubilité, un groupement chargé tel qu'un acide sulfonique peut être introduit sur le groupement quinoléine. En suivant les protocoles établis par D. Pearce *et al.*^[140] en 2001 et J. Hickey *et al.*^[141] en 2011, le composé (27) peut être obtenu en deux étapes (Figure III-14). En faisant réagir la 2-méthyl-8-quinolinol (22) directement dans l'acide chlorosulfonique pur, le composé (26) est obtenu avec un rendement de 43%. Ce composé qui reste soluble dans les solvants organiques est dissout dans le 1,4-dioxane et mis en réaction avec de l'oxyde de sélénium à reflux pendant 18 heures. En ajoutant le produit (26) après oxydation dans un mélange d'eau et d'acétone, la fonction acide chlorosulfonique se convertit en acide sulfonique et le composé (27) devient soluble dans l'eau (Figure III-14).

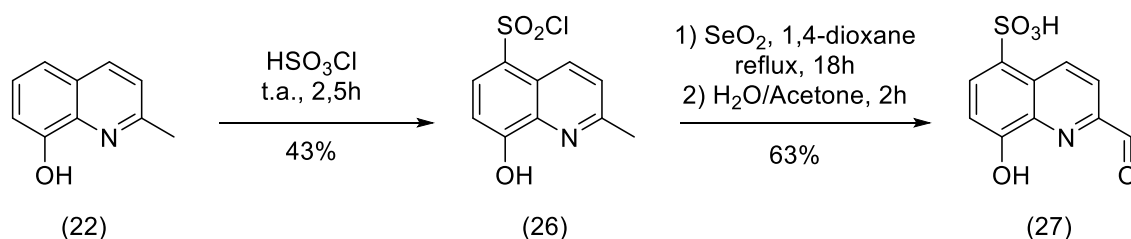


Figure III-14 : Synthèse de la carboxyquinoléine sulfonée (27).

Les étapes suivantes n'étant pas décrites, nous avons décidé de suivre un schéma de synthèse similaire à celui permettant l'obtention du composé (25) (Figure III-13). L'étape suivante a donc débuté par la réduction de la fonction aldéhyde de (27) dans le méthanol par le tétrahydruroborate de sodium. Après 24 heures, la disparition quasi complète du signal de la fonction aldéhyde en RMN confirme sa réduction en fonction alcool. Cependant l'extraction permettant de retirer les sels de bore s'est avérée très compliquée et n'a pas permis d'isoler le composé (28). L'introduction de l'acide sulfonique rend les synthèses et les purifications suivantes difficiles (Figure III-15) et n'a pas permis d'obtenir le composé (29).

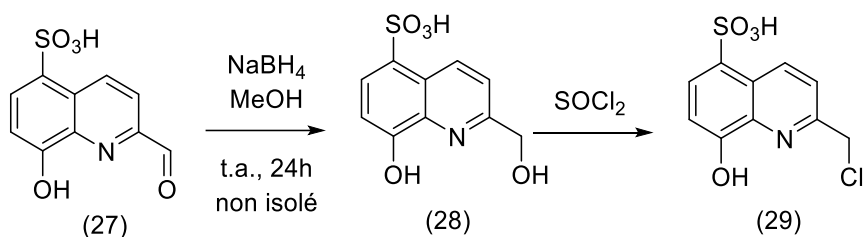


Figure III-15 : Voie de synthèse pour obtenir le dérivé chloré (29).

Nous avons décidé d'introduire le groupement sulfonate à la dernière étape de notre synthèse (Figure III-16) en suivant un protocole publié par Salaam *et al.*^[142].

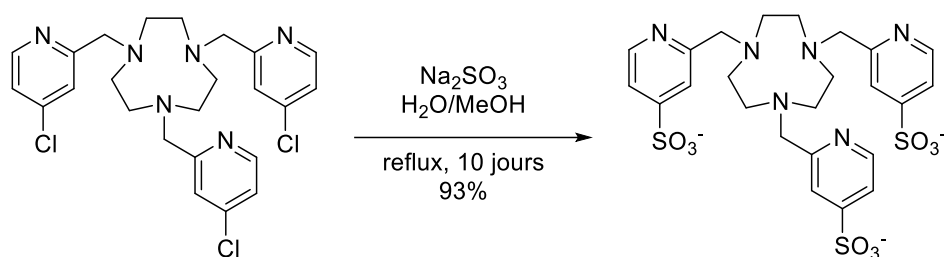


Figure III-16 : Exemple de sulfonation douce tiré de la littérature^[142].

Pour suivre cette voie, l'introduction d'un groupement chloré sur la 2-méthyl-8-quinolinol (22) est nécessaire. En suivant un protocole établi par C. Bakewell *et al.*^[143] en 2012, il est possible d'introduire des halogènes sur le composé (22) en le faisant réagir avec du trichlorure d'iode dans de l'acide chlorhydrique concentré (Figure III-17). L'intermédiaire iodé (30') obtenu est ensuite agité en présence de triéthylamine afin de retirer l'atome d'iode en position 7 et obtenir le composé (30).

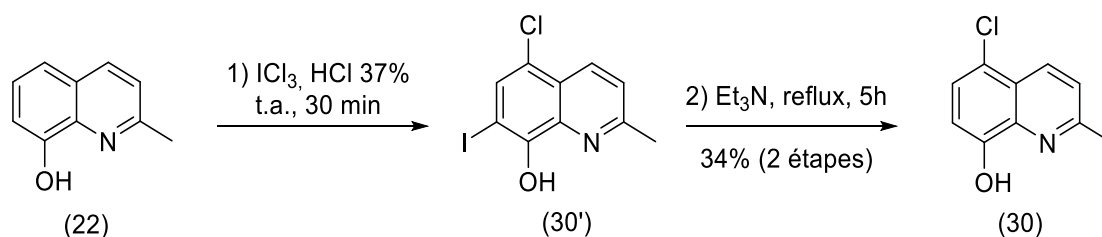


Figure III-17 : Synthèse du dérivé chloré (30).

L'étape suivante consiste à oxyder le groupement méthyle en fonction aldéhyde en suivant le même protocole qu'avec les dérivés précédents. Cependant après 48h à 60°C dans du dioxane, le composé (31) est isolé en faible quantité (<30%) sous la forme d'un mélange de sels et dont l'extraction mène à une émulsion insoluble (Figure III-18).

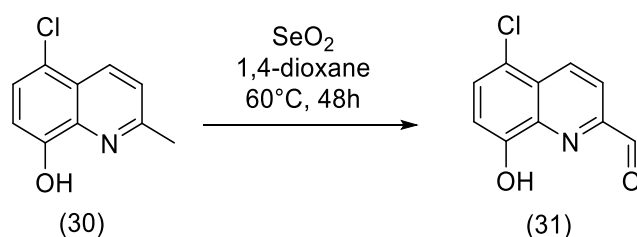


Figure III-18 : Tentative d'oxydation n'ayant pas permis d'isoler (31).

Face à ces difficultés, il aurait été intéressant de protéger la fonction alcool et de continuer cette synthèse. Nous verrons dans la suite de ces travaux que l'étape la plus limitante dans la synthèse est le greffage du bras 8-HQ. Pour des raisons de temps, et afin de vérifier que la sensibilisation par la 8-HQ était efficace avant de lancer des synthèses chronophages, nous avons continué cette étude avec le chromophore (25) uniquement.

III.2.1.2 Synthèse des bras CEST actifs

Dans des conditions analogues à celles utilisées pour former le bras aminoTEMPO (2), la N-(4-méthoxyaniline) (32) est mis en solution avec le chlorure de chloroacétyle en présence de carbonate de potassium dans l'acétonitrile. Après une nuit, le composé (33) est obtenu avec un rendement de 69%^[41] (Figure III-19).

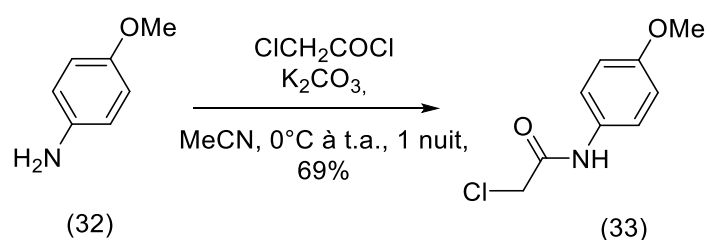


Figure III-19 : Synthèse du bras méthoxy (33).

De la même manière, en faisant réagir la N-(4-trifluorométhylaniline) (34) en solution avec le chlorure de chloroacétyle en présence d'hydrogénocarbonate de sodium dans le dichlorométhane, le composé (35) est obtenu après 4 heures de réaction avec un rendement de 90% (Figure III-20)^[144].

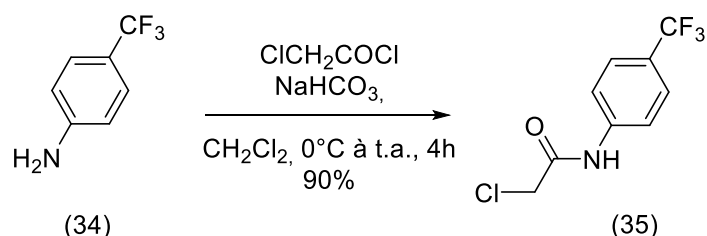


Figure III-20 : Synthèse du bras trifluorométhyle (35).

III.2.2 Synthèse des ligands D₃ et D₄

III.2.2.1 Adaptation de la voie « glyoxal »

La voie de synthèse choisie pour obtenir les composés bisubstitués (36) et (38) s'inspire des travaux réalisés dans le chapitre précédent et des travaux de R. Tripier *et al.*^[107]. Le cyclène glyoxal (5) a été fonctionnalisé par deux équivalents des synthons (33) ou (35) dans de l'acétonitrile pendant 6 à 9 jours. Après une déprotection en utilisant de l'*ortho*-phénylènediamine, les produits désirés (36) et (38) sont obtenus (Figure III-21).

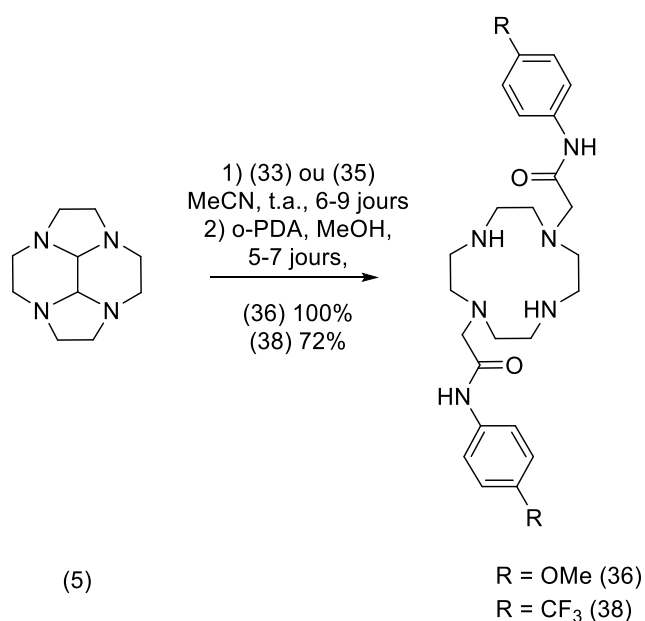


Figure III-21 : Synthèse des intermédiaires bisubstitués (36) et (38)

III.2.2.2 Incorporation des fonctions hydroxyquinoléine et TEMPO

Les fonctions hydroxyquinoléine et TEMPO sont introduites de façon séquentielle : le groupement hydroxyquinoléine est incorporé en premier et le groupement TEMPO est ajouté en dernier lieu pour faciliter les caractérisations. En effet le paramagnétisme résultant de l'incorporation du radical nitroxyde complique l'analyse des spectres RMN. La monosubstitution par l'hydroxyquinoléine chlorée (25) se fait dans des conditions assez douces pour éviter une double substitution. Les réactifs (25) et l'intermédiaire bisubstitué (36 ou 38) sont solubilisés dans l'éthanol avec de l'acétate de sodium comme base. La réaction a été chauffée à 50°C pendant 4 jours pour obtenir les composés (37) et (39) avec un faible rendement de 14% (Figure III-22). En augmentant le temps de réaction à 21 jours ou en ajoutant du KI au milieu, les rendements restent similaires.

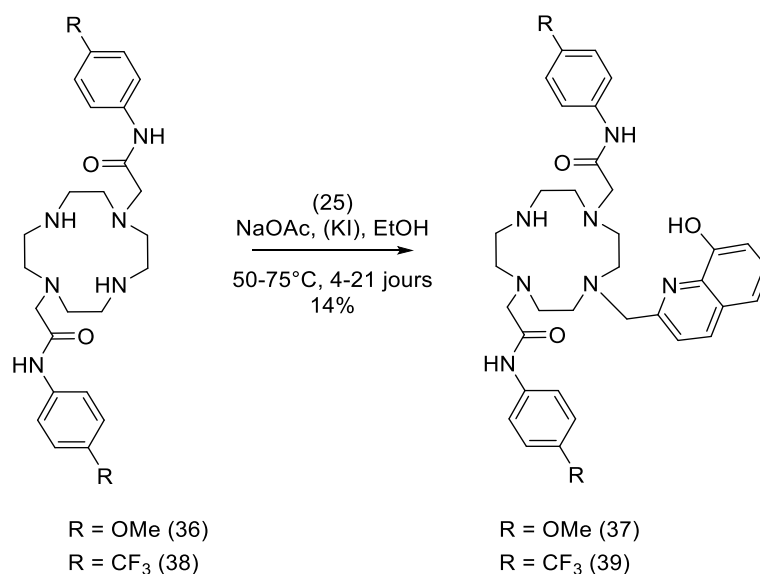


Figure III-22 : Synthèse des intermédiaires trisubstitués (37) et (39).

L'étape suivante consiste à ajouter la fonction TEMPO sur les synthons (37) ou (39). Le bras (2) est mis en réaction dans de l'éthanol en présence de bicarbonate de potassium comme base et d'iodure de potassium (pour favoriser la substitution nucléophile) pendant 4 jours à 60°C. Les ligands D₃ et D₄ sont obtenus avec des rendements de 36% et 76%, respectivement (Figure III-23).

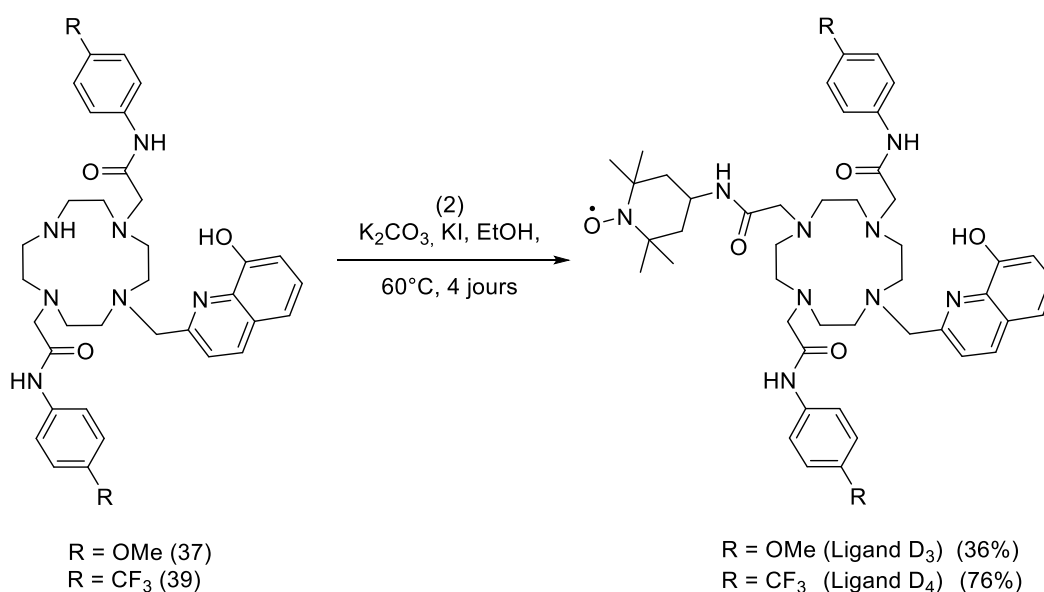


Figure III-23 : Synthèse des ligands D₃ et D₄.

Les ligands présentent un caractère paramagnétique en RMN comme en témoigne l'élargissement des signaux. Le ligand D₄ a été analysé en RMN du ¹⁹F. Il présente deux signaux à $\delta = -62,1$ et $-63,2$ ppm ce qui tend à prouver qu'il n'est pas symétrique ou que deux conformations différentes existent en solution. Ces deux ligands présentent aussi un signal RPE caractéristique de la fonctionnalisation du radical TEMPO qui sera décrit dans la suite de ce travail.

III.2.3 Formation des complexes

Les deux séries de ligand n'étant pas solubles dans l'eau pure, les complexes de lanthanides sont formés dans un mélange d'eau et de 1,4-dioxane (40/60, v/v) en suivant le protocole établi par R. Hudson *et al.*^[41]

III.2.3.1 Formation des complexes [Ln.D₃]³⁺ et [Ln.D₄]³⁺

Le ligand D₃ est mis en réaction avec les sels métalliques de triflates dans un mélange d'eau et de 1,4-dioxane. Après 4 jours à 60°C, les complexes de la série [Ln.D₃]³⁺ ont été obtenus avec un rendement d'environ 60% par précipitation dans l'éther (Figure III-24). Les complexes sont trichargés et sont donc associés à trois contre-ions. Les complexes du ligand D₄ sont synthétisés de la même façon. Ces complexes ne sont pas solubles dans l'eau pure, ce qui nous a conduit à les étudier dans des solvants organiques ou des mélanges de solvants (aqueux-organiques). Les structures ciblées des complexes sont représentées sur la Figure III-24 ; les données ayant permis de proposer ces structures seront discutées dans les sections suivantes.

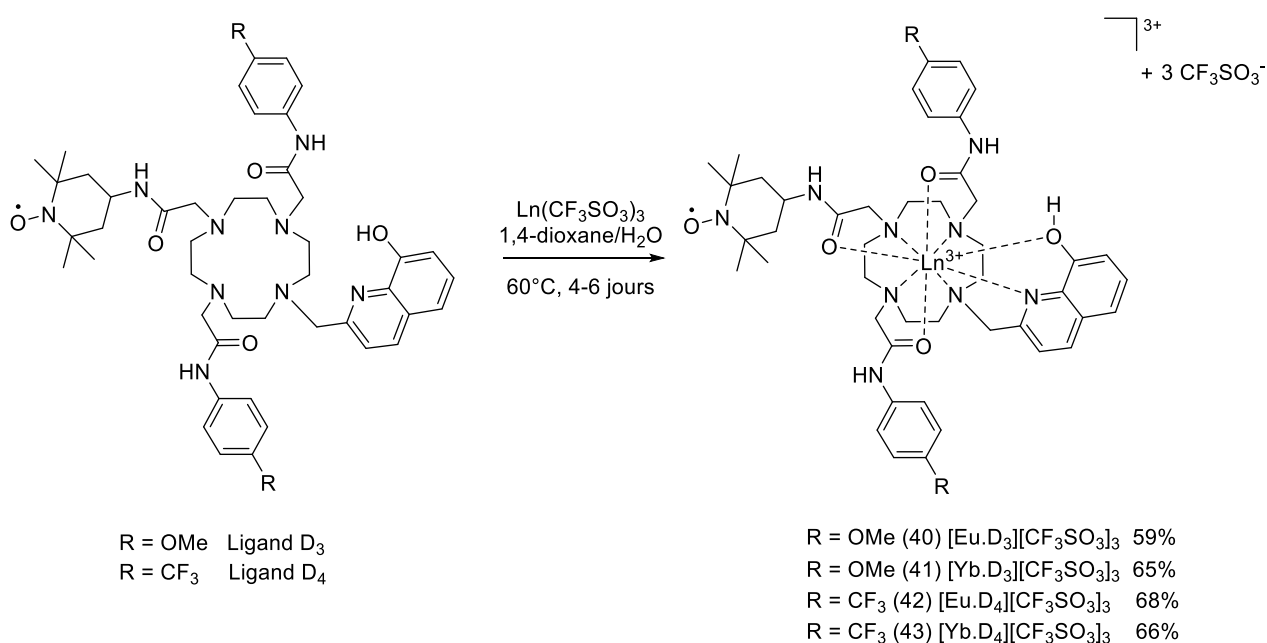


Figure III-24 : Complexation des ligands D₃ et D₄.

Les complexes isolés ont une sphère de coordination de 9 éléments et ne devraient pas inclure de molécule d'eau. Cette sphère de coordination est intéressante pour la suite car elle suggère que les protons des fonctions amides ainsi que le proton du groupement hydroxyquinoléine pourront être visibles en CEST.

III.2.3.2 Caractérisation des complexes $[Ln.D_3]^{3+}$ et $[Ln.D_4]^{3+}$

Les complexes de ces deux séries ont été étudiés par RMN du proton et du fluor et montrent que les signaux sont élargis par le paramagnétisme résultant des complexes. Les ligands et les complexes semblent être particulièrement sensibles à la puissance d'ionisation puisqu'aucun profil n'a pu être obtenu en spectroscopie de masse (MS-ESI). En revanche ils possèdent de nombreuses fonctions azotés et carbonyles qui donnent lieu à des vibrations informatives en spectroscopie infrarouge (Figure III-25). Une bande large est présente vers 3400 cm^{-1} (ν_{OH} et ν_{NH}) dans le ligand et les complexes associés. Par exemple dans le ligand D_4 et ses deux complexes les bandes correspondant aux vibrations SO et CF des ions triflates (ν_{SO_3} et ν_{CF_3} respectivement^[145]) sont observées à 1247 et 1029 cm^{-1} . Le profil infrarouge des deux complexes de lanthanides est quasiment superposable avec celui du ligand D_4 . De plus, les complexes présentent des signaux RPE et électrochimique caractéristiques du radical TEMPO qui sera décrit dans la suite de ce travail.

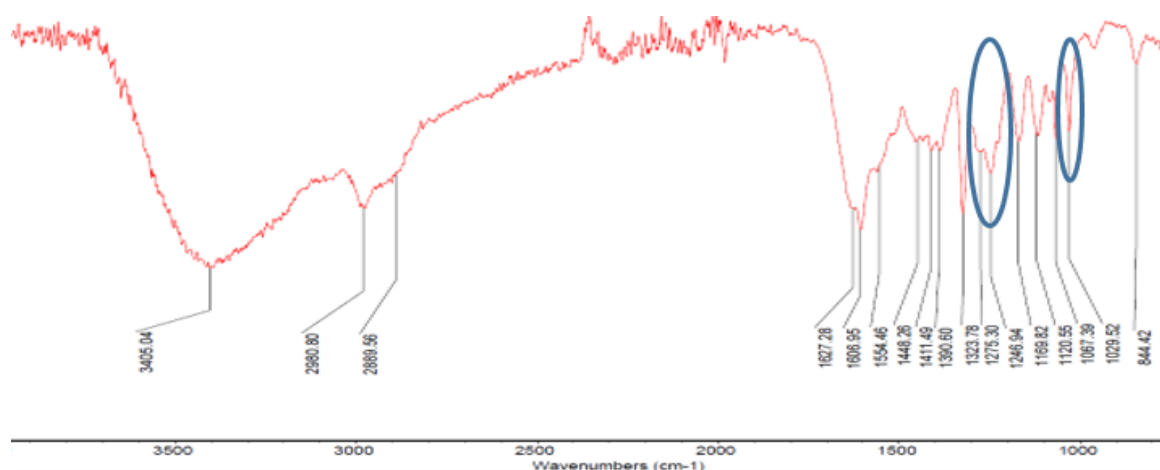


Figure III-25 : Spectres Infrarouge du complexe $[Yb.D_4]^{3+}$ (43). En bleu sont entourés les bandes associées aux ions triflates.

III.3 ETUDES DES LIGANDS ET COMPLEXES PAR ELECTROCHIMIE

III.3.1 Etude électrochimique des espèces organiques

Les ligands D_3 et D_4 contiennent des unités aromatiques et rédox actives. Afin de faciliter l'attribution des couples rédox nous avons étudiés indépendamment les unités puis les ligands et enfin les complexes.

III.3.1.1 Etude des unités redox seules

III.3.1.1.1 Comportement rédox de l'hydroxyquinoléine issu de la littérature

L'hydroxyquinoléine, aussi appelée « oxine » est une unité rédox dont le potentiel d'oxydation varie en fonction du pH. Le potentiel d'oxydation (E_p^a) varie linéairement sur 3 pentes en fonction du pH^[146] et permet d'isoler des valeurs de pKa de 4,85 pour l'équilibre acido-basique entre oxinium et l'oxine et 9,95 entre l'oxine et l'oxinate (Figure III-26). L'oxydation de l'oxinate est relativement aisée (faible potentiel de 0,4 V vs AgCl/Ag, soit environ 0,5 V vs Fc⁺/Fc) et quasiment indépendante du pH.

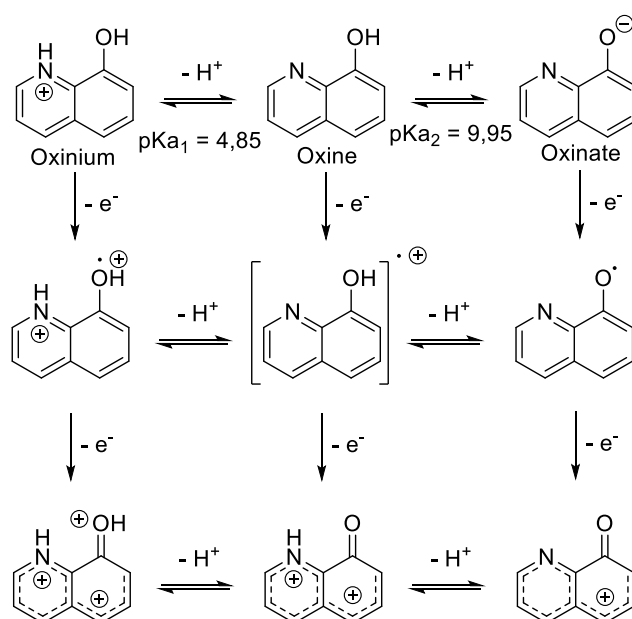


Figure III-26 : Equilibres acido-basiques et rédox de l'oxine (8HQ) issus de la référence^[146].

M. Stević *et al.* ont montré que les substituants de l'hydroxyquinoléine influencent son potentiel d'oxydation. Un groupement hydroxyle en position 8 ainsi qu'un atome d'azote libre sur un cycle quinoléine facilite l'oxydation de l'oxine avec un potentiel d'oxydation de 0,59 V (Tableau III-A). L'oxydation de l'oxine en radical phénoxy a lieu à un potentiel assez bas grâce à la possible liaison hydrogène avec l'atome d'azote. Un second électron peut alors être arraché pour former la quinone. Enfin l'introduction d'un substituant sulfonate (EWG) rend l'oxydation plus difficile^[147]. Quelques valeurs de potentiels sont rappelées dans le Tableau III-A.

Tableau III-A : Potentiel pour la 1^{ère} oxydation de l'oxine (0,5 mM) et ses dérivés (0,5 mM en solution aqueuse tamponnée d'acétate à 0,1 M à pH 6). Vitesse de balayage = 50 mV/s. Potentiel E_p en V vs AgCl/Ag sur électrode de carbone vitreux^[147]. ^a E_p^a enregistré dans le MeOH vs AgCl/Ag.

| Composé | 8-hydroxy-quinoléine | 2-hydroxy-quinoléine | 8-hydroxy-quinoléine N-oxyle | Acide 8-hydroxy-quinoléine 5-sulfonique | 8-HQ-CH ₂ Cl (25) |
|----------------------|----------------------|----------------------|------------------------------|---|------------------------------|
| E_p (V vs AgCl/Ag) | + 0,59 | + 1,31 | + 0,88 | + 0,71 | + 0,79 ^a |

Chapitre 3

III.3.1.1.2 Etude du précurseur

Les ligands (D_3 et D_4) et leurs complexes associés ($[Ln.D_3]^{3+}$ et $[Ln.D_4]^{3+}$) possèdent deux unités rédox. Afin de comprendre les processus électrochimiques qui ont lieu indépendamment, la 2-chlorométhyl-8-hydroxyquinoléine (25) a été étudiée dans le méthanol, comme pour les complexes $[Ln.D_3]^{3+}$ et $[Ln.D_4]^{3+}$.

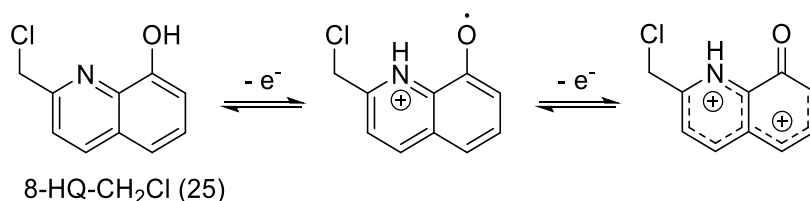


Figure III-27 : Processus rédox de la 8-HQ-CH₂Cl (25). Milieu : radical phénoxyyle, droite : quinone.

L'oxydation de la 8-HQ-CH₂Cl (25) s'observe sous la forme d'une vague peu réversible à $E_p^a = 0,63$ V, avec un potentiel cathodique associé à $E_p^c = 0,16$ V. La valeur ΔE_p est importante (0,47 V) suggérant qu'une réaction chimique est couplée au transfert d'électron. On peut supposer qu'il s'agit d'un transfert de proton sur l'unité pyridine (Figure III-27). La courbe de RDE montre que ce système est monoélectronique (formation du phénoxyyle et non de la quinone).

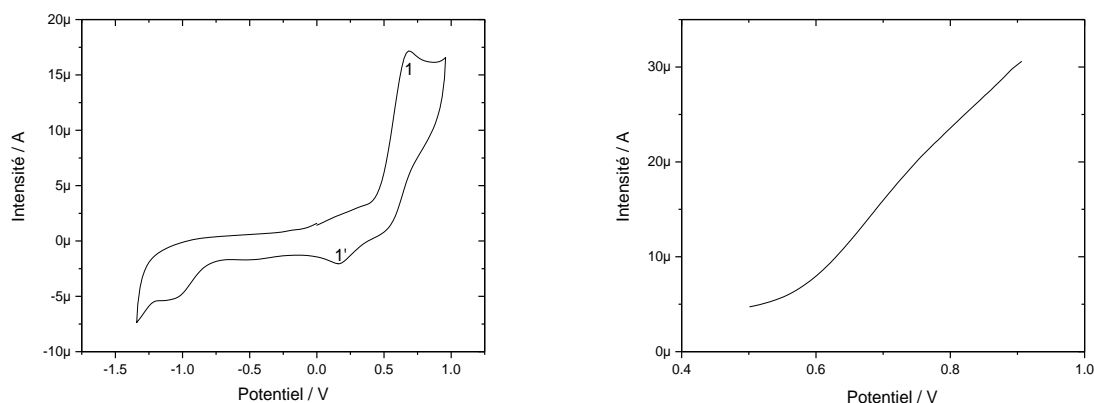


Figure III-28 : (Gauche) CV de 8-HQ-CH₂Cl (25) (droite) RDE de 8-HQ-CH₂Cl (25) à 0,5 mM dans le méthanol avec du TBAPF₆ à 0,1 M comme électrolyte. Potentiel donné vs Fc⁺/Fc.

III.3.1.2 Etude électrochimique des ligands

Les ligands de cette série ont été étudiés par voltampérométrie cyclique (CV), voltampérométrie à impulsion différentielle (DPV) et par voltampérométrie par électrode tournante (RDE). Les ligands ont été étudiés en solution dans l'acétonitrile contenant 0,1 M de TBAP en tant qu'électrolyte support pour pouvoir comparer les courbes de voltampérométrie avec celles de la première série.

Les ligands D_3 et D_4 présentent des courbes de voltampérométrie cyclique assez similaires avec deux vagues en oxydation à $E_p^{a1} = -0,02$ et $E_{1/2} = 0,26$ V (Figure III-29). La première vague d'oxydation est associée à un système en réduction à $E_p^c \approx -0,45$ V vs Fc⁺/Fc et semble venir

de l'unité hydroxyquinoléine. Comme pour la première série, la seconde vague d'oxydation est associée au couple oxo-ammonium/nitroxyde.

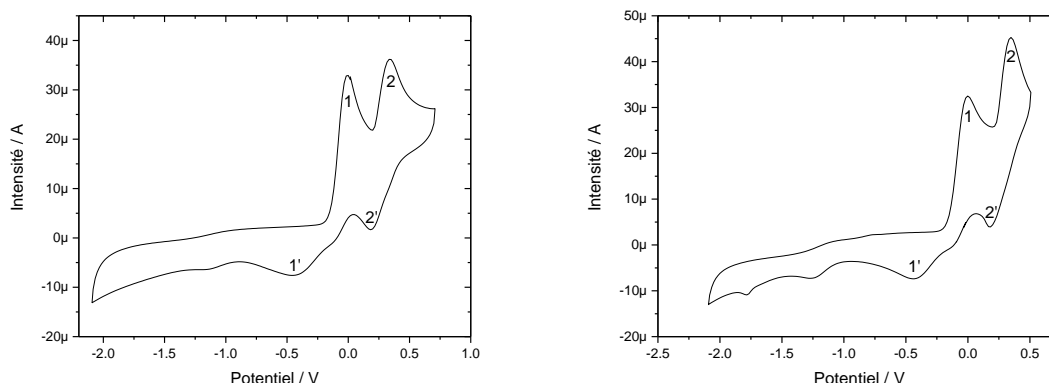


Figure III-29 : (Gauche) CV du ligand D₃, (droite) CV du ligand D₄ à 0,5 mM dans MeCN avec du TBAP à 0,1 M comme électrolyte de support. Toutes les valeurs de potentiels sont données en V par rapport au couple rédox Fc⁺/Fc. T = 298 K ; vitesse de balayage : 0,1 V/s. Les paramètres pour le ferrocène par rapport à la référence utilisée (AgNO₃ à 0,01 M) : E_{1/2} = 0,16 V.

Le système 1/1' semble présent à la fois dans le précurseur 8-HQ-CH₂Cl (25) et dans le ligand D₃ (Figure III-29). Au sein du ligand D₃, le système 1/1' se situe à un potentiel nettement inférieur avec un couple rédox à E_p^a = 0,0 V et E_p^c = -0,45 V. La RDE nous confirme que le système 1/1' est un processus à deux électrons (intensité I_p = 70 μA) qui pourrait donc être attribué au couple rédox hydroxyquinone/hydroxyquinoléine. Le système 2/2' est un processus à un électron (I_p = 35 μA) et attribué au couple oxo-ammonium/nitroxyde.

Tableau III-B : Potentiels d'oxydation E_p^a des différents complexes obtenus par électrochimie. ^aPour 0,5 mM de complexes dans une solution de CH₃CN contenant 0,1 M de TBAP comme électrolyte de support. ^bPour 0,5 mM de complexes dans une solution de CH₃OH contenant 0,1 M de TBAPF₆ comme électrolyte de support. Toutes les valeurs de potentiels sont données en V par rapport au couple rédox Fc⁺/Fc. T = 298 K ; vitesse de balayage : 0,1 V/s. Les paramètres pour le ferrocène par rapport à la référence utilisée (AgNO₃ à 0,01 M) : E_{1/2} = 0,16 V.

| Composé | E _p ^{a1} | E _{1/2} | E _p ^c | Composé | E _p ^{a1} | E _{1/2} | E _p ^c |
|------------------------------------|------------------------------|-------------------|-----------------------------|------------------------------------|------------------------------|-------------------|-----------------------------|
| Ligand D ₃ | -0,02 ^a | 0,26 ^a | -0,45 ^a | Ligand D ₄ | -0,02 ^a | 0,26 ^a | -0,45 ^a |
| [Eu.D ₃] ³⁺ | 0,23 ^b | 0,35 ^b | -0,33 ^b | [Eu.D ₄] ³⁺ | 0,34 ^b | 0,35 ^b | -0,29 ^b |
| [Yb.D ₃] ³⁺ | 0,15 ^b | 0,32 ^b | -0,25 ^b | [Yb.D ₄] ³⁺ | 0,23 ^b | 0,35 ^b | -0,40 ^b |

III.3.1.3 Etude électrochimique des complexes

Les complexes ne sont pas solubles dans l'acétonitrile c'est pourquoi ils ont été étudiés dans le méthanol contenant 0,1 M de TBAPF₆ en tant qu'électrolyte support. Les complexes [Ln.D₃]³⁺ et [Ln.D₄]³⁺ présentent un profil en électrochimie différent (Tableau II-B).

Les complexes d'euprium présentent une vague d'oxydation réversible (système 2/2') à E_{1/2} = 0,35 V correspondant à l'oxydation du nitroxyde (TEMPO) en oxo-ammonium (TEMPO⁺)^[118]. Un deuxième système (1/1') (dont l'intensité varie lorsque le balayage en réduction passe de -0,5 à -0,3 V) est présent (Figure III-30). Dans le complexe d'euprium

Chapitre 3

$[\text{Eu.D}_3]^{3+}$, une vague réversible est présente vers $-1,1$ V et semble associée au couple $\text{Eu}^{3+}/\text{Eu}^{2+}$. Cette vague n'est cependant pas présente dans le complexe $[\text{Eu.D}_4]^{3+}$ qui présente cependant une vague irréversible en réduction vers $E_p^c \approx -1,25$ V.

Les complexes d'ytterbium présentent une vague d'oxydation réversible (système 2/2') à $E_p^a = 0,35$ V correspondant à l'oxydation du nitroxyde (TEMPO) en oxo-ammonium (TEMPO^+)^[118]. Un deuxième système (1/1'), plus intense que le système 2/2' est présent.

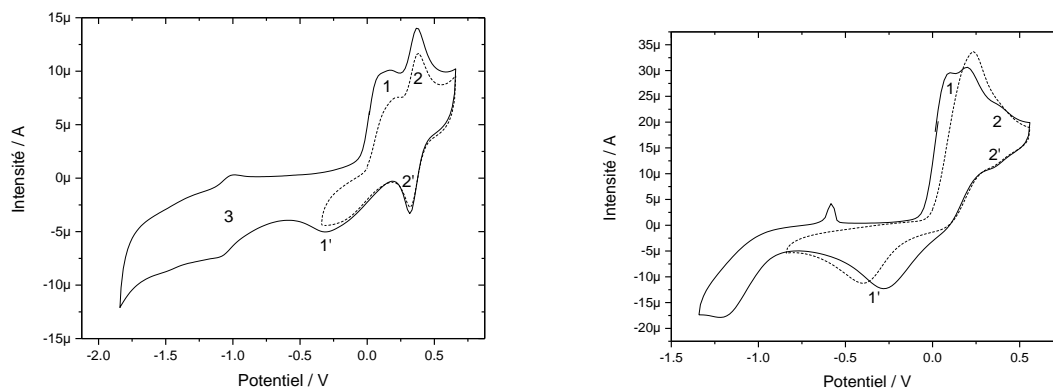


Figure III-30 : (Gauche) CV du complexe $[\text{Eu.D}_3]^{3+}$, (droite) CV du complexe $[\text{Yb.D}_4]^{3+}$ à 0,5 mM dans MeOH avec du TBAPF₆ à 0,1 M comme électrolyte de support. Toutes les valeurs de potentiels sont données en V par rapport au couple rédox Fc^+/Fc . $T = 298$ K ; vitesse de balayage : 0,1 V/s. Les paramètres pour le ferrocène par rapport à la référence utilisée (AgNO_3 à 0,01 M) : $E_{1/2} = 0,16$ V. En pointillé : CV des complexes dans des gammes de potentiels moins larges permettant d'isoler un signal.

Les ligands et complexes de ces deux séries $[\text{Ln.D}_3]^{3+}$ et $[\text{Ln.D}_4]^{3+}$ sont donc composés de deux groupements rédox actifs. Alors que le groupement nitroxyde possède un potentiel d'oxydation $E_{1/2}$ d'environ 0,35 V, assez proche des séries précédentes, $[\text{Ln.D}_1]^{3+}$ et $[\text{Ln.D}_2]^{3+}$. Le groupement 8-hydroxyquinoléine s'oxyderait à plus bas potentiel et à deux électrons dans le ligand.

III.4 ETUDES DES COMPLEXES PAR SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION ET LUMINESCENCE

III.4.1 Spectroscopie d'absorption UV-Vis

III.4.1.1 Spectroscopie d'absorption UV des précurseurs

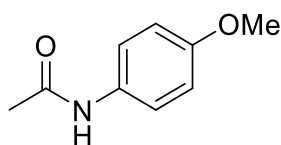
L'introduction de différents groupements tels que les phénylacétamides substitués et l'hydroxyquinoléine vont avoir une influence sur le spectre d'absorption UV-Visible de nos ligands et complexes. Les spectres d'absorptions de différents précurseurs ont été enregistrés dans l'acétonitrile et le méthanol à des concentrations de 0,5 mM (Tableau III-C).

Tableau III-C: Valeurs des longueurs d'onde λ_{max} et coefficients d'extinction molaire ϵ obtenus par spectroscopie d'absorption UV-Vis des précurseurs (25) et (2) (en solution à 0,5 mM à T = 298 K) et des composés proches issus de la littérature (source BIORAD en solution à 0,1 g/L dans le méthanol).

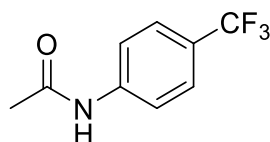
| Complexes | Précurseur (25) λ (nm) / ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$) | Précurseur (2) λ (nm) / ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$) | N-(4-Methoxyphenyl)- acetamide λ (nm) / ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$) | N-[4-(Trifluoromethyl)- phenyl]acetamide λ (nm) / ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$) |
|-----------|---|--|---|---|
| MeCN | 247 (47000), 317 (2600) | 246 (800) | - | - |
| MeOH | 247 (47000), 317 (2600) | 245 (1200) | 250 (15 000), 285 (2 000) | 250 nm (17 500) |

Le spectre d'absorption de l'hydroxyquinoléine (25) possède deux bandes à 247 nm ($\epsilon = 47\,000 M^{-1}.cm^{-1}$) et 317 nm ($\epsilon = 2\,600 M^{-1}.cm^{-1}$) qui ne sont pas influencées par le solvant. Ce chromophore pourra servir d'antenne lors de l'excitation de nos complexes.

Les spectres d'absorption dans le méthanol des composés N-(4-Methoxyphenyl)acetamide et N-[4-(Trifluoromethyl)-phenyl]acetamide (Figure III-31) ont été récupérés sur les bases de données de BIORAD et montrent une bande principale à 250 nm ($\epsilon = 15\,000 M^{-1} cm^{-1}$ et $\epsilon = 17\,500 M^{-1} cm^{-1}$ respectivement). Une seconde bande à 285 nm ($\epsilon = 2\,000 M^{-1} cm^{-1}$) est observable pour le composé méthoxylé. Il semble que cette bande soit présente sous la forme d'un épaulement autour de 260 nm pour le composé trifluorométhylé.



N-(4-Methoxyphenyl)acetamide
CAS : 51-66-1



N-[4-(Trifluoromethyl)-phenyl]acetamide
CAS : 349-97-3

Figure III-31 : Composés utilisés à titre de comparaison pour les spectres d'absorption. Spectre issu des bases de données de BIORAD.

Enfin le précurseur (2) comportant l'unité TEMPO absorbe à 245 nm ($\epsilon = 800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)^[148].

III.4.1.2 Spectroscopie d'absorption UV des ligands D_3 et D_4

Les spectres d'absorption des ligands ont été enregistrés dans l'acétonitrile (Figure III-32) suite à leur étude en électrochimie. Les ligands possèdent une bande principale à 247 nm ($\epsilon \approx 60\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) qui correspond aux longueurs d'ondes observées pour l'unité hydroxyquinoléine et pour les unités phénylacétamides. Deux bandes à 291 nm et 360 nm ($\epsilon < 4\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) sont aussi présentes et sont très proches de celles observées dans la première série D_1/D_2 dans l'acétonitrile. Celles-ci semblent associées à l'unité nitroxyde.

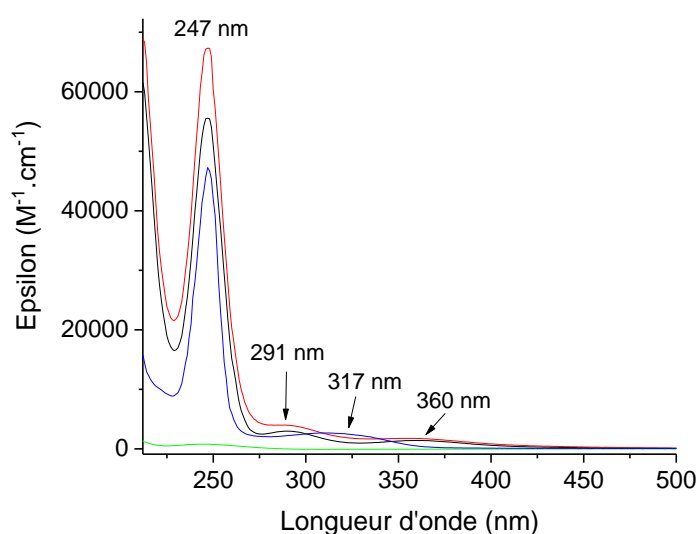


Figure III-32 : Spectre d'absorption UV du ligand D_3 (noir), du ligand D_4 (rouge), de l'hydroxyquinoléine (25) (bleu) et du précurseur TEMPO (2) (vert) en solution à 0,5 mM dans l'acétonitrile.

III.4.1.3 Spectroscopie d'absorption UV des complexes $[\text{Ln}.D_3]^{3+}$ et $[\text{Ln}.D_4]^{3+}$

Pour des raisons de solubilité, les spectres d'absorption des complexes ont été réalisés en solution dans le méthanol. Les valeurs des longueurs d'ondes des bandes principales ainsi que leur coefficient d'extinction molaire sont décrits dans le Tableau III-D. Ces spectres présentent une bande principale aux alentours de 225 nm et associée aux transitions $\pi\pi^*$ des fonctions acétamides^[120]. La bande à 247 nm est associée aux groupements hydroxyquinoléine et phénylacétamides conformément aux observations faites pour les précurseurs. Les bandes situées à 290 et 358 nm augmentent en intensité par rapport au ligand seul. Ces bandes associées au nitroxyde^[148] s'éteignent après addition d'ascorbate.

Tableau III-D : Valeurs des longueurs d'onde λ_{max} et coefficients d'extinction molaire ϵ obtenus par spectroscopie d'absorption UV-Vis des ligands et complexes [Ln.D₃]³⁺ et [Ln.D₄]³⁺ en solution ^a dans MeCN, ^b dans MeOH, à 0,5 mM, T = 298 K.

| Complexes | λ (nm) / ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹) | Complexes | λ (nm) / ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹) |
|--------------------------------------|---|--------------------------------------|---|
| Précurseur (25) ^{a,b} | 247 (47000), 317 (2600) | Précurseur (2) | 246 (800) ^a / 245 (1200) ^b |
| Ligand D ₃ ^a | 247 (56000), 291 (3000), 360 (1500) | Ligand D ₄ ^a | 247 (67000), 291 (4000), 360 (1500) |
| [Eu.D ₃] ^{3+ b} | 243 (25000), 282 (9000), 351 (3000) | [Eu.D ₄] ^{3+ b} | 251 (13000), 290 (14000), 358 (7500) |
| [Yb.D ₃] ^{3+ b} | 286 (16500), 355 (7500) | [Yb.D ₄] ^{3+ b} | 251 (12500), 291 (15000), 361 (8000) |

III.4.2 Spectroscopie de luminescence

III.4.2.1 Photoluminescence des complexes d'euporium

Les mesures de photoluminescence des complexes [Eu.D₃]³⁺ et [Eu.D₄]³⁺ ont été effectuées dans le méthanol et montrent les bandes d'émission fines typiques dans le rouge entre 570 et 720 nm qui correspondent aux transitions ⁵D₀ → ⁷F_J (J = 0, 1, 2, 3, 4) lorsque l'excitation se fait dans la bande d'excitation principale du ligand à 310 nm et 314 nm pour les complexes [Eu.D₃]³⁺ et [Eu.D₄]³⁺ respectivement (Figure III-33).

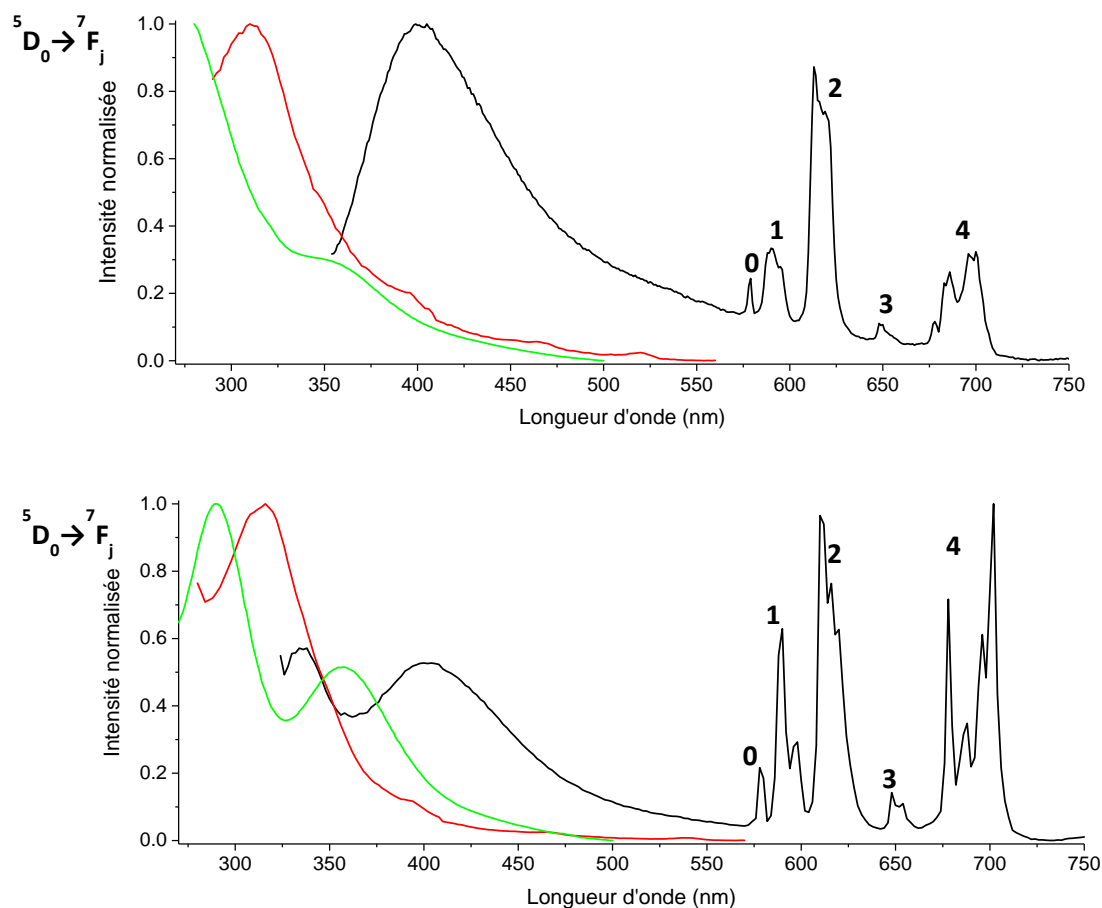


Figure III-33 : Spectres de luminescence des complexes $[Eu.D_3]^{3+}$ (haut) et $[Eu.D_4]^{3+}$ (bas) dans le méthanol à 298K. Haut : spectre d'émission avec excitation à 310 nm. Bas : spectre d'émission avec excitation à 314 nm. En vert : spectre d'absorption UV-Vis ; en rouge : spectre d'excitation avec $\lambda_{max} = 614$ nm.

La bande associée à la transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_0$ est clairement visible pour les deux complexes, ce qui suggère une symétrie C cohérente avec la structure du ligand de type DOTAM. La forme de la bande associée à la transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ est différente pour les deux complexes. Pour le complexe $[Eu.D_3]^{3+}$ et comme dans le complexe $[Eu.D_2]^{3+}$, la transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ se compose de trois bandes. Dans le complexe $[Eu.D_4]^{3+}$ et comme dans le complexe $[Eu.D_1]^{3+}$, on distingue principalement 2 bandes. On peut donc proposer que l'environnement autour du métal (arrangement des bras dans l'espace) soit différent dans les deux complexes (Figure III-34).

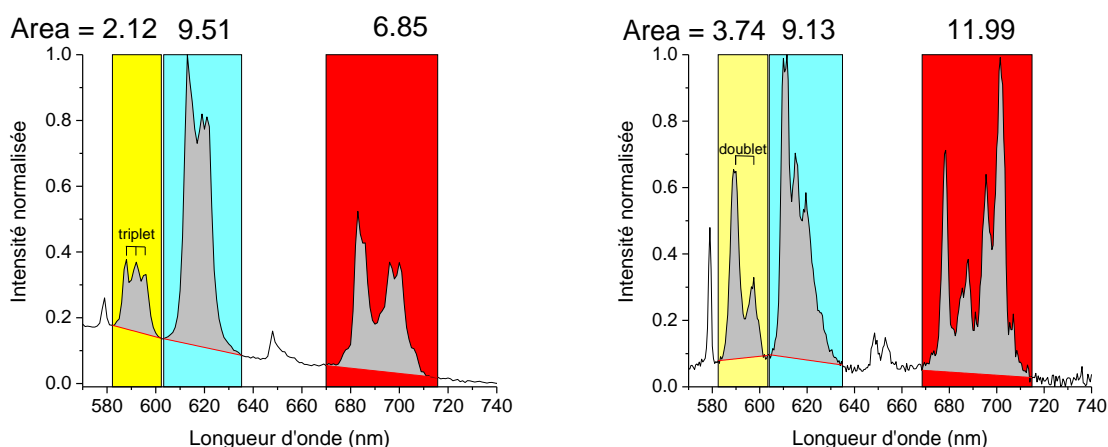


Figure III-34 : Intégration des bandes associées aux transitions $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$, $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ et $^5D_0 \rightarrow ^7F_4$. Gauche : $[Eu.D_3]^{3+}$, droite : $[Eu.D_4]^{3+}$. Spectres obtenus après réduction des nitroxydes pour obtenir un signal plus important.

L'intégration des bandes associées aux transitions $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$, $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ et $^5D_0 \rightarrow ^7F_4$ et les rapports entre valeurs d'intégration permettent en général d'obtenir des informations relatives à la symétrie présente autour de l'euprimum (voir chapitre 2). Le rapport de l'intégration des bandes correspondant aux transitions $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ sur $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ est plus important dans le complexe $[Eu.D_3]^{3+}$ que $[Eu.D_4]^{3+}$ avec des ratios R = 4,5 et R = 2,5 respectivement. Toutefois le rapport R des transitions $^5D_0 \rightarrow ^7F_4$ sur $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ est équivalent pour les deux complexes et égal à 3,2 (Tableau III-E). L'environnement autour de l'euprimum dans $[Eu.D_3]^{3+}$ est globalement moins symétrique par rapport à $[Eu.D_4]^{3+}$.

Tableau III-E : Intégration des bandes de luminescence du complexe $[Eu.D_3]^{3+}$ et $[Eu.D_4]^{3+}$.

| Rapport R | $I(^5D_0 \rightarrow ^7F_2) / I(^5D_0 \rightarrow ^7F_1)$ | $I(^5D_0 \rightarrow ^7F_4) / I(^5D_0 \rightarrow ^7F_1)$ |
|-----------------|---|---|
| $[Eu.D_3]^{3+}$ | 4,5 | 3,2 |
| $[Eu.D_4]^{3+}$ | 2,4 | 3,2 |

Il est donc difficile de conclure sur l'influence du substituant sur la base des intégrations, mais nous garderons à l'esprit que les structures fines des bandes étant différentes, l'environnement de l' Eu^{3+} n'est sensiblement pas le même.

III.4.2.2 Détermination du nombre de molécules de solvant coordonnées

Dans le chapitre précédent, nous avons utilisé les équations publiées par W. Horrocks et D. Parker pour déterminer q dans des complexes hydrosolubles. Dans le cas présent, les complexes ne sont pas solubles dans l'eau pure. Deux alternatives ont été explorées pour calculer le nombre de molécules d'eau coordonnées au centre métallique.

III.4.2.2.1 Mesure dans le méthanol

Dans le méthanol pur, on considèrera qu'une molécule de méthanol coordonnée équivaut à une demi molécule d'eau et ne participe aux désactivations de l'état excité que par un seul

Chapitre 3

oscillateur O-H. Le nombre de molécule de méthanol « m » a été déterminé à partir de la différence de temps de vie des états excités de l'euporium dans le méthanol et dans le méthanol deutéré (Tableau III-F). Une seule équation a été proposée dans le méthanol par W. Horrocks *et al.*^[149] en 1991.

$$m = 2,1 \times \Delta k_{\text{obs}} \quad \text{Eq. 3.1}$$

$$\text{où } \Delta k_{\text{obs}} = k_{\text{MeOH}} - k_{\text{MeOD}} = 1/\tau_{\text{MeOH}} - 1/\tau_{\text{MeOD}}$$

Pour les complexes $[\text{Eu.D}_3]^{3+}$ et $[\text{Eu.D}_4]^{3+}$ les données expérimentales montrent une valeur de m comprise entre 1,3 et 1,8 molécules de solvant. Ceci suggère qu'une molécule de méthanol est coordonnée dans les complexes. On remarque que la valeur de m dépasse 1, ce qui pourrait s'expliquer par le fait que le proton de la fonction hydroxyquinoléine soit aussi présent dans la première sphère de coordination.

Tableau III-F : Mesure de temps de vie des complexes $[\text{Eu.D}_3]^{3+}$ et $[\text{Eu.D}_4]^{3+}$, $\Delta k_{\text{obs}} = k_{\text{MeOH}} - k_{\text{MeOD}} = 1/\tau_{\text{MeOH}} - 1/\tau_{\text{MeOD}}$, $m =$ nombre de molécules de méthanol coordonnées $\pm 0,5$.^a en présence d'ascorbate de sodium.

| complexe | τ_{MeOH} (ms) | τ_{MeOD} (ms) | Δk_{obs} | m |
|--|---------------------------|---------------------------|-------------------------|-----|
| $[\text{Eu.D}_3]^{3+}$ (TEMPO \bullet) | 0,58 | 1,12 | 0,83 | 1,7 |
| $[\text{Eu.D}_3]^{3+}$ (TEMPOH) ^a | 0,57 | 1,10 | 0,85 | 1,8 |
| $[\text{Eu.D}_4]^{3+}$ (TEMPO \bullet) | 0,56 | 0,87 | 0,64 | 1,3 |
| $[\text{Eu.D}_4]^{3+}$ (TEMPOH) ^a | 0,63 | 1,05 | 0,64 | 1,3 |

Ces données sont toutefois biaisées par le fait que les oscillateurs –NH des fonctions amides ne sont pas considérés dans le calcul et l'incertitude annoncée par les auteurs est importante.

III.4.2.2.2 Mesures dans un mélange de solvants

Nous avons solubilisé les complexes dans un mélange eau:acétonitrile, en cherchant à travailler avec le maximum d'eau. Les complexes se sont avérés être solubles dans un mélange contenant 90% d'eau et 10% d'acétonitrile. L'acétonitrile est moins coordinant que l'eau donc nous ferons l'hypothèse que seul H₂O peut se lier au centre métallique. De plus nous négligerons l'effet de concentration en eau (moins importante) et de changement de constante diélectrique du solvant. Les équations mises au point par W. Horrocks *et al.* et D. Parker *et al.* ont été testées pour calculer le nombre de molécules d'eau « q » à partir de la différence de temps de vie des états excités de l'euporium dans l'eau et dans l'eau deutéré (Tableau III-G). Les protons des fonctions amides et du groupement hydroxyquinoléine à proximité de l'euporium sont pris en compte dans l'équation générale publiée par W. Horrocks *et al.*^[123] en 2002 :

$$q = 1,11 [\Delta k_{\text{obs}} - 0,31 - 0,45q^{\text{OH}} - 0,99q^{\text{NH}} - 0,075q^{\text{CONH}}] \quad \text{Eq. 3.2}$$

où $\Delta k_{\text{obs}} = k_{\text{H}_2\text{O}} - k_{\text{D}_2\text{O}} = 1/\tau_{\text{H}_2\text{O}} - 1/\tau_{\text{D}_2\text{O}}$, où q^{OH} désigne le nombre d'oscillateurs -OH dans la première sphère de coordination, q^{NH} désigne le nombre d'oscillateurs amine -NH dans la première sphère de coordination, q^{CONH} désigne le nombre d'oscillateurs amide -CONH dans la première sphère de coordination.

En considérant les contributions des 3 fonctions amides et de l'unité hydroxyquinoléine l'équation 3.2 devient :

$$q = 1,11 [\Delta k_{\text{obs}} - 0,31 - 0,45 - 0,225] \quad \text{Eq. 3.3}$$

soit $q = 1,11 [\Delta k_{\text{obs}} - 0,985]$

En s'intéressant à de nombreux complexes d'euporium différents et en tenant compte des différents oscillateurs OH, NH et CH qui viennent atténuer la luminescence dans la première sphère de coordination, une seconde équation a été proposée par D. Parker *et al.*^[124]:

$$q = 1,2 [\Delta k_{\text{obs}} - 0,25 - 0,075q^{\text{CONHR}}] \quad \text{Eq. 3.4}$$

où q^{CONHR} désigne le nombre de fonction amide présente dans le complexe.

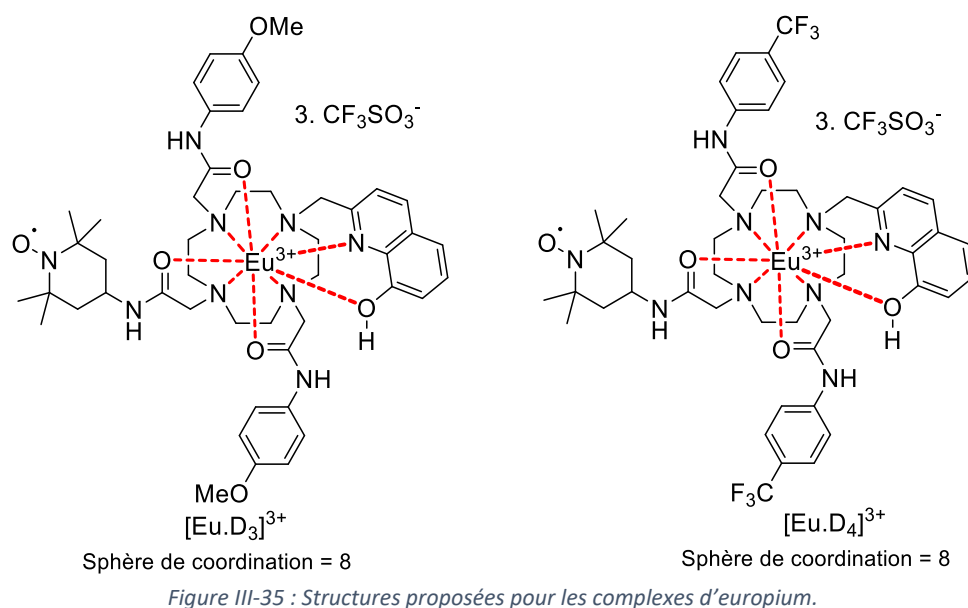
En considérant la contribution du proton de l'unité hydroxyquinoléine, pour des complexes contenant 3 fonctions amides comme nos complexes des séries [Ln.D₃]³⁺ et [Ln.D₄]³⁺ on obtient donc l'équation ci-dessous :

$$q = 1,2 [\Delta k_{\text{obs}} - 0,475] \quad \text{Eq. 3.5}$$

La différence entre ces deux équations vient du fait que l'oscillateur -OH de l'unité hydroxyquinoléine n'est prise en compte que dans les équations 3.4 et 3.5. L'utilisation de l'équation 3.3, permet d'obtenir une valeur de $q = 0$ qui exclut une molécule d'eau coordonnée sur l'euporium. L'utilisation de l'équation 3.5 permet d'obtenir un $q \approx 0,5$ qui correspond à un seul oscillateur O-H (Tableau III-G). Cet oscillateur semble donc provenir du proton de la fonction hydroxyle de l'unité hydroxyquinoléine. Les complexes [Eu.D₃]³⁺ et [Eu.D₄]³⁺ ne possèdent vraisemblablement pas de molécule d'eau coordonnée à l'euporium. Des mesures conductimétriques sont donc à mener afin de confirmer la structure proposée (Figure III-35).

Tableau III-G : Mesure de temps de vie des complexes [Eu.D₃]³⁺ et [Eu.D₄]³⁺, $\Delta k_{\text{obs}} = k_{\text{H}_2\text{O}} - k_{\text{D}_2\text{O}} = 1/\tau_{\text{H}_2\text{O}} - 1/\tau_{\text{D}_2\text{O}}$.

| Complexe | T _{H2O} (ms) | T _{D2O} (ms) | Δk _{obs} | q (Eq. 3.3/ Eq. 3.5) |
|--|-----------------------|-----------------------|-------------------|----------------------|
| [Eu.D ₃] ³⁺ (TEMPO [•]) | 0,56 | 1,2 | 1,01 | 0/0,6 |
| [Eu.D ₄] ³⁺ (TEMPO [•]) | 0,53 | 1,22 | 1,07 | 0,1/0,7 |



III.4.2.3 Photoluminescence des complexes d'ytterbium

Selon notre hypothèse de départ, les niveaux d'énergie des états excités de l'unité hydroxyquinoléine sont normalement parfaitement adaptés pour sensibiliser l'ytterbium. Les mesures de photoluminescence des complexes $[\text{Yb.D}_3]^{3+}$ et $[\text{Yb.D}_4]^{3+}$ (Figure III-36) ont été effectuées dans le méthanol et montrent une bande d'émission typique dans l'infrarouge à 980 nm qui correspond à la transition ${}^2\text{F}_{5/2} \rightarrow {}^2\text{F}_{7/2}$ lorsque l'excitation se fait à 330 nm, qui correspond à la longueur d'onde permettant d'accumuler le plus de signal. La bande correspondant à l'autofluorescence du ligand est environ 3 fois plus importante en intensité dans le complexe $[\text{Yb.D}_3]^{3+}$ avec un maximum à 470 nm contre 435 nm pour le complexe $[\text{Yb.D}_4]^{3+}$. L'antenne hydroxyquinoléine semble donc bien capable de sensibiliser l'euporium et l'ytterbium. On notera que l'intensité est moindre dans le domaine de l'IR du fait d'une désexcitation non radiative par les oscillateurs OH plus efficace dans cette gamme de longueurs d'onde.

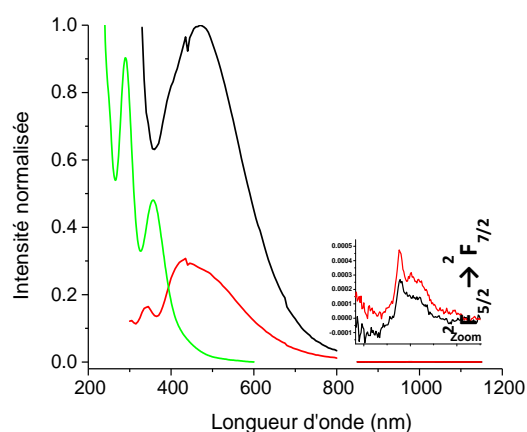


Figure III-36 : Spectre de luminescence des complexes $[\text{Yb.D}_3]^{3+}$ (noir) et $[\text{Yb.D}_4]^{3+}$ (rouge) dans le méthanol obtenu avec une excitation à 280 nm dans la fenêtre 310-900nm et excitation à 330 nm dans la fenêtre 850-1150nm. En vert : spectre d'absorption du complexe $[\text{Yb.D}_4]^{3+}$.

III.4.2.4 Influence de l'état rédox sur la luminescence

La photoluminescence des complexes d'euprium et d'ytterbium a été étudiée en fonction de l'état rédox de l'unité nitroxyde. Après réduction du radical nitroxyde en hydroxylamine, l'intensité du spectre de luminescence augmente de 95% pour le complexe [Eu.D₃]³⁺ (Figure III-37, gauche) et de 146% pour le complexe [Eu.D₄]³⁺ (Figure III-37, droite). La forme du spectre d'émission ainsi que le temps de vie des états excités de l'euprium n'évoluent pas, indiquant que le complexe ne subit pas de modification majeure durant la réduction de l'unité TEMPO. L'augmentation de luminescence après réduction suggère qu'un phénomène tend à limiter la luminescence à l'état radicalaire. Il est possible qu'un transfert d'électron photo induit conduisant à une unité oxoammonium soit à l'origine de cette limitation^[150,151].

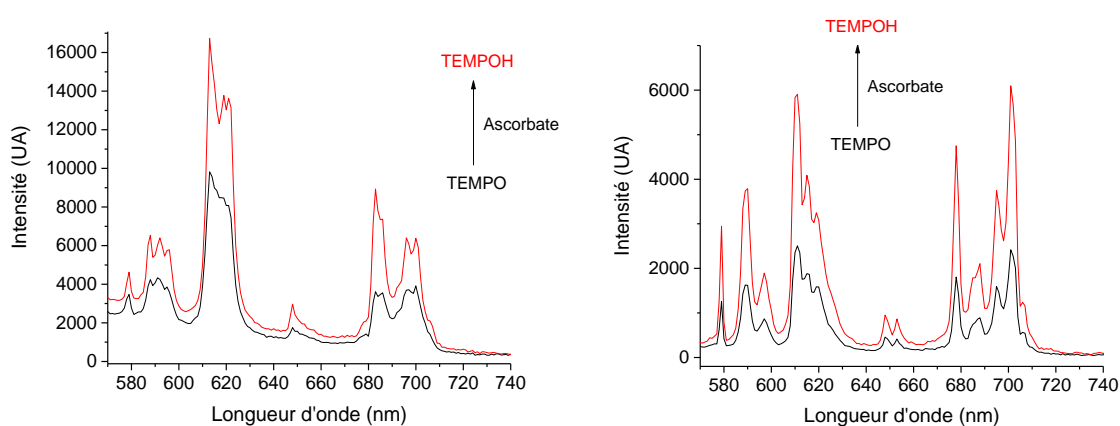


Figure III-37 : Spectres d'émission du complexe [Eu.D₃]³⁺ (gauche) et [Eu.D₄]³⁺ (droite) en solution dans le MeOH avec $\lambda_{exc} = 310$ nm. Réduction an ajoutant de l'ascorbate de sodium.

Pour le complexe [Yb.D₄]³⁺, l'intensité de la bande d'émission à 980 nm qui correspond à la transition $^2F_{5/2} \rightarrow ^2F_{7/2}$ augmente d'environ 90% après réduction (Figure III-38).

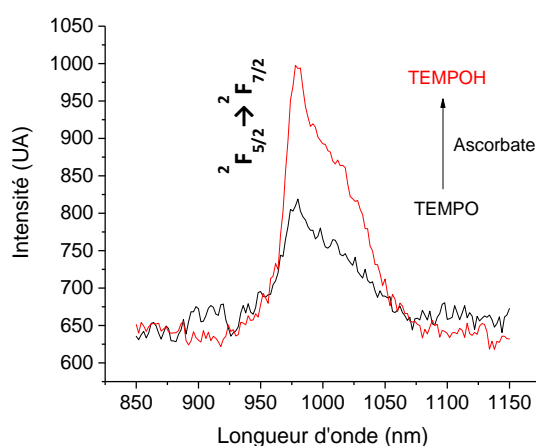


Figure III-38 : Spectre d'émission du complexe [Yb.D₄]³⁺ avec $\lambda_{exc} = 300$ nm en solution dans le MeOH. Réduction an ajoutant de l'ascorbate de sodium.

L'intensité des spectres de luminescence des complexes de lanthanides est donc affectée par l'état rédox de l'unité nitroxyde. Le radical nitroxyde a un effet délétère sur la luminescence

ce qui peut être un avantage pour des applications biologiques. En effet le milieu cellulaire étant réducteur, on aura une sonde rédox « ON », c'est à dire plus aisée à détecter.

III.5 ETUDES PAR RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE

L'ensemble des ligands et des complexes a été étudié par RPE du fait de la présence d'un groupement nitroxyde et/ou d'un métal paramagnétique. Dans nos complexes, les électrons non appariés peuvent provenir de deux sources différentes : le radical nitroxyde ou le cation lanthanide et ils peuvent être couplés magnétiquement. Comme c'était le cas dans le chapitre précédent, le nitroxyde peut être observé à température ambiante en solution fluide et les spectres résultants vont nous renseigner sur sa mobilité. Il peut également être caractérisé à basse température (spectre anisotrope), toutefois l'interprétation est dans ce cas moins évidente. Le temps de relaxation électronique des lanthanides étant très courts, leur observation ne se fera pas à température ambiante (à l'exception du gadolinium dans certains cas particuliers). Leur contribution sera donc absente des spectres enregistrés à température ambiante. Leurs composantes deviendront visibles à $T < 40$ K (spectres en solution gelée).

III.5.1 Spectroscopie RPE des ligands

Les spectres RPE des ligands D_3 et D_4 ont été enregistrés à 293 K dans l'acétonitrile. Le spectre se caractérise par un signal isotrope composé de 3 raies, espacées de 1,6 mT (Figure III-39). Le signal est centré à $g_{iso} = 2,006$, valeur typique des radicaux nitroxydes^[125]. Le temps de corrélation rotationnel τ_c a été calculé en utilisant la formule de Kivelson (voir chapitre 2). Les valeurs obtenues sont $1,1 \cdot 10^{-10}$ s et $1,0 \cdot 10^{-10}$ s pour D_3 et D_4 respectivement. Ces valeurs similaires sont cohérentes avec un rayon hydrodynamique des deux ligands très proche. Les substituants présents sur les fonctions acétamides font que les deux molécules D_3 et D_4 possèdent des masses moléculaires plus élevées et un rayon hydrodynamique plus important que pour les ligands D_1 et D_2 . Le temps de corrélation rotationnel est donc étonnamment plus faible dans la présente série.

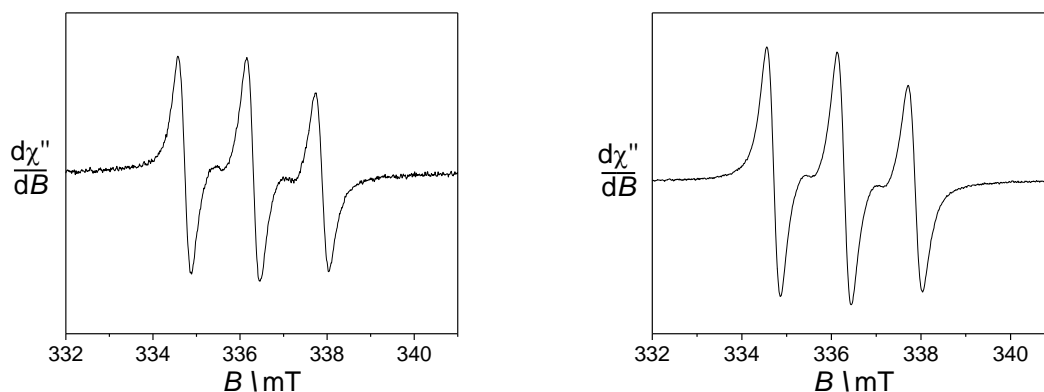


Figure III-39 : Spectres RPE en bande X du ligand D₃ (gauche) et du ligand D₄ (droite) en solution dans MeCN à 0,5 mM à T = 293K. Fréquence micro-onde : 9,42 GHz ; puissance : 3,5 mW ; modulation d'amplitude : 0,2 mT, modulation de fréquence : 100 KHz.

L'intensité du signal obtenue pour le ligand D₃ est environ 3 fois moins importante que celle du ligand D₄. Elle pourrait résulter d'une dismutation du radical nitroxyde en oxo-ammonium et hydroxylamine et donc une quantité de radical nitroxyde moins importante en solution. Les ligands D₃ et D₄ ont été électrolysés afin de s'affranchir d'une dismutation dépendante de l'environnement. Pour le ligand D₃, l'intensité du signal ne change pas après une électrolyse à 0,2 V (Figure III-40, gauche) alors que l'intensité du signal du ligand D₄ diminue (Figure III-40, droite) pour aboutir à une intégration similaire à celle de D₃. Lorsque que le potentiel est imposé l'intensité est donc similaire, ce qui confirme le fait que le ligand puisse exister sous deux états rédox après simple dissolution dans l'acétonitrile. Enfin les spectres RPE mesurés après électrolyse ne montrent pas de signaux de radical 8HQ[•].

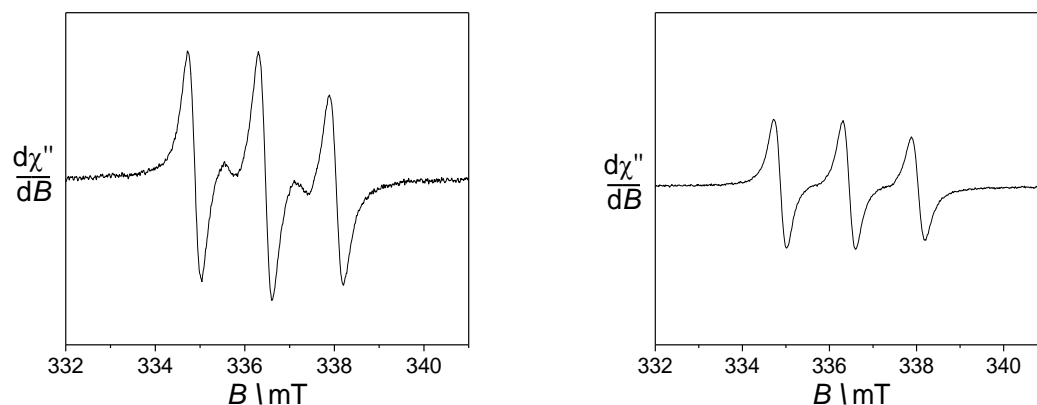


Figure III-40 : Spectres RPE en bande X du ligand D₃ (gauche) et du ligand D₄ (droite) en solution dans MeCN à 0,5 mM à T = 293K après électrolyse à 0,2V. Fréquence micro-onde : 9,42 GHz ; puissance : 3,5 mW ; modulation d'amplitude : 0,2 mT, modulation de fréquence : 100 KHz.

III.5.2 Spectroscopie RPE des complexes de lanthanides

III.5.2.1 Complexes d'ytterbium

Les spectres RPE des complexes $[\text{Yb.D}_3]^{3+}$ et $[\text{Yb.D}_4]^{3+}$ enregistrés dans le méthanol à 293 K se caractérisent par un signal isotrope composé de 3 raies espacées de 1,6 mT (cf annexe RPE) et centrées à $g_{\text{iso}} = 2,006$ (345 mT). Ces spectres ressemblent à ceux obtenus pour les ligands. Lorsque la température est abaissée à 6K, le spectre de $[\text{Yb.D}_3]^{3+}$ montre deux signaux distincts à des champs très différentes. Les 3 raies centrées autour de $g = 2$ sont typiques d'un radical nitroxyde immobilisé (Figure III-41). Dans la région à bas champ (0 à 250 mT), une résonance large est visible à $g \approx 5,3$ (120 mT) et 3,7 (180 mT). Ces signaux sont attribués à l'ytterbium, présent sous la forme de plusieurs isotopes à l'abondance naturelle (^{170}Yb , ^{173}Yb et ^{171}Yb)^[126].

Le spectre de $[\text{Yb.D}_4]^{3+}$ mesuré à 6 K montre un signal plus large que celui d'un radical nitroxyde libre dans la fenêtre 320-370 mT. Il s'étend sur environ 50 mT (Figure III-41), ce qui traduit une interaction magnétique entre l'ytterbium et le nitroxyde spécifiquement dans ce complexe. Le fait qu'elle ne se manifeste que par des épaulements suggère cependant qu'elle est faible. Les résonances de l'ytterbium sont quant à elle visibles dans la région de 0 à 250 mT à $g \approx 5,4$ (120 mT) et 3,7 (180 mT).

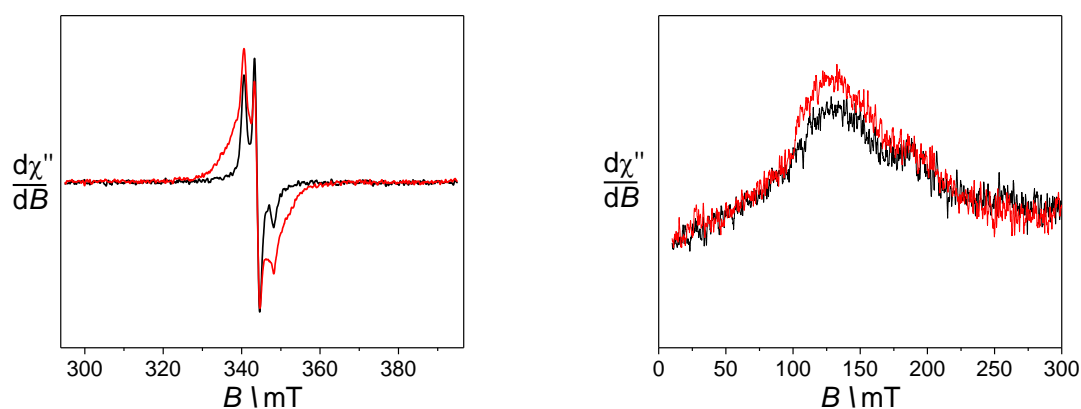


Figure III-41 : Spectres RPE en bande X du complexe $[\text{Yb.D}_3]^{3+}$ (noir) et $[\text{Yb.D}_4]^{3+}$ (rouge) en solution dans MeOH à 0,5 mM à $T = 6\text{K}$. Fréquence micro-onde : 9,42 GHz ; puissance : 0,008 mW (gauche) et 20 mW (droite) ; modulation d'amplitude : 0,2 mT (droite) et 0,4 mT (gauche), modulation de fréquence : 100 KHz.

III.5.2.2 Complexes d'euporium

Les complexes d'euporium $[\text{Eu.D}_3]^{3+}$ et $[\text{Eu.D}_4]^{3+}$ présentent le même signal que les ligands libres à 293 K (cf annexe RPE). Lorsque la température diminue et atteint 6 K, les spectres RPE des complexes d'euporium $[\text{Eu.D}_3]^{3+}$ et $[\text{Eu.D}_4]^{3+}$ (Figure III-42) ne présentent qu'un signal anisotrope d'un radical nitroxyde, ce qui s'explique par le faible moment magnétique de l'euporium qui se comporte comme un métal diamagnétique dans ces conditions.

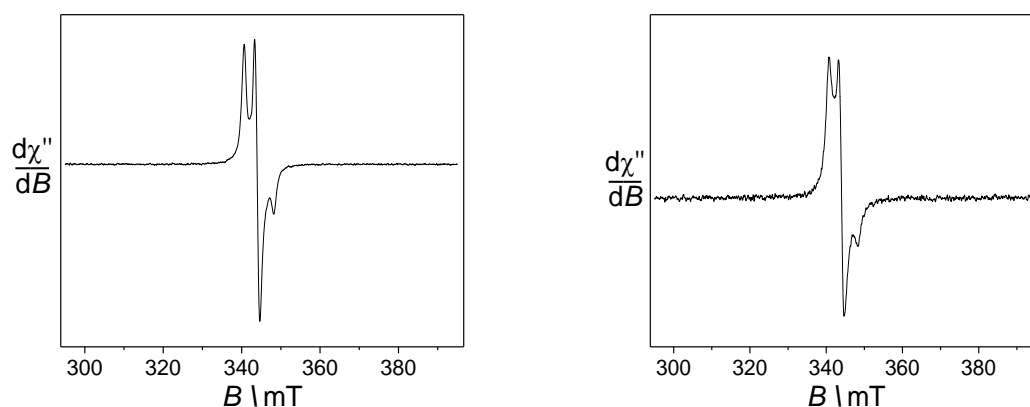


Figure III-42 : Spectres RPE en bande X du complexe $[Eu.D_3]^{3+}$ (gauche) et $[Eu.D_4]^{3+}$ (droite) en solution dans MeOH à 0,5 mM à $T = 6K$. Fréquence micro-onde : 9,42 GHz ; puissance : 0,008 mW ; modulation d'amplitude : 0,4 mT, modulation de fréquence : 100 KHz.

III.6 SPECTROSCOPIE CEST DES COMPLEXES

Les complexes de la famille $[Ln.D_3]^{3+}$ et $[Ln.D_4]^{3+}$ comportent 4 types de protons échangeables pouvant être à priori observés (s'ils possèdent des vitesses d'échanges dans la gamme « visible » du CEST) (Figure II-53) :

- les protons des fonctions **acétamides substituées**,
- le proton de la fonction **acétamide** portant l'unité TEMPO,
- le proton de la fonction **hydroxyle** de l'hydroxyquinoléine,
- après réduction, le **proton de la fonction hydroxylamine** pourrait aussi être détecté.

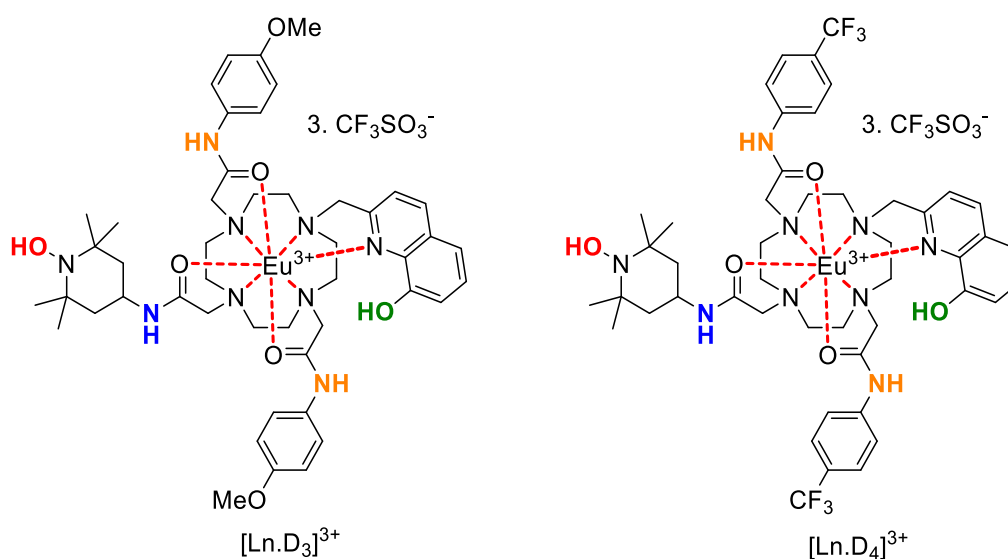


Figure III-43 : Protons échangeables potentiellement visibles en CEST.

III.6.1 Spectres CEST de la série D₃

Le spectre CEST du complexe [Eu.D₃]³⁺ est présenté dans la Figure III-44. Sous sa forme oxydée, il présente un pic d'eau symétrique. Aucun signal CEST n'est clairement visible sur la gamme -100 à +100 ppm. Après réduction de la fonction nitroxyde en hydroxylamine par l'ascorbate, une asymétrie du pic de l'eau liée à la présence d'un épaulement aux alentours de 25 ppm est observée. Nous sommes malheureusement ici dans des conditions où $\Delta\omega$ et la largeur de raie sont du même ordre de grandeur. Il est donc difficile de quantifier précisément l'effet CEST. Nous retiendrons seulement que le paramagnétisme du ligand sous forme oxydée tend à éteindre l'effet CEST.

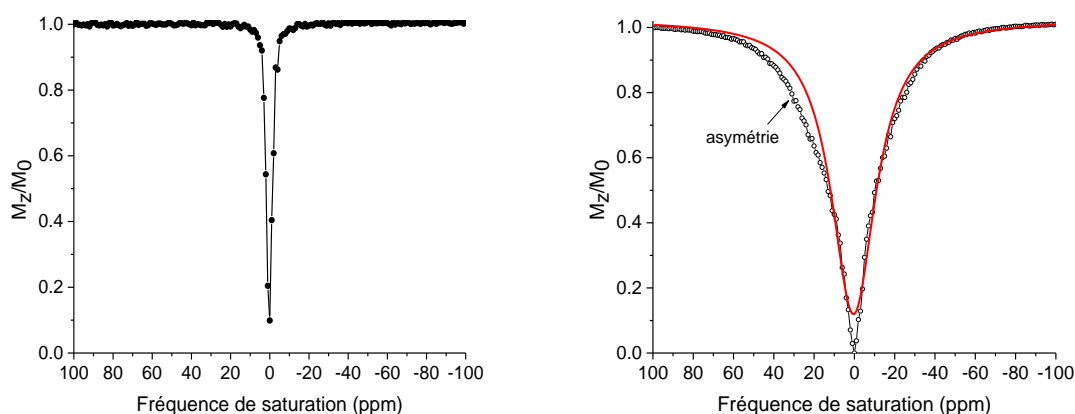


Figure III-44 : Spectres CEST d'une solution à 20 mM de [Eu.D₃]³⁺ sous formes oxydée (gauche) et réduite (droite) en utilisant 2 équivalents d'ascorbate de sodium. Spectres enregistrés à 11,7 T, T = 298 K, dans un mélange H₂O:CD₃CN (2:1), [HEPES] = 0,07M à pH 7,5, B₁ = 19 μT et un temps d'irradiation de 4 s.

Le complexe [Yb.D₃]³⁺ ne présente pas de signal CEST, ni sous sa forme oxydée (Figure III-45, gauche) ni sous sa forme réduite (Figure III-45, droite) bien que des protons échangeables des fonctions acétamides soient présents. On peut supposer que leur vitesse d'échange ne permet leur observation et cet effet est directement imputable au métal.

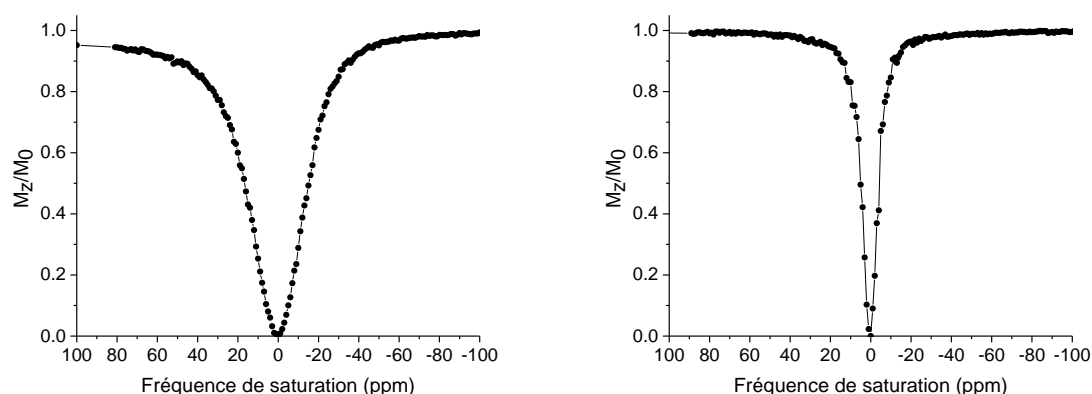


Figure III-45 : Spectres CEST d'une solution à 20 mM de [Yb.D₃]³⁺ sous ses formes oxydée (gauche) et réduite (droite) en utilisant 2 équivalents d'ascorbate de sodium. Spectres enregistrés à 11,7 T, T = 298 K, dans un mélange H₂O:CD₃CN (2:1), [HEPES] = 0,07M à pH 7,5, B₁ = 19 μT et un temps d'irradiation de 4 s.

III.6.2 Spectres CEST de la série D₄

Sous sa forme oxydée, le complexe [Eu.D₄]³⁺ présente un signal d'eau très large (qui s'étend de 40 à -40 ppm) et symétrique sans aucun signal CEST évident (Figure III-46, gauche). Après réduction du radical nitroxyde en hydroxylamine, le signal de l'eau s'affine considérablement, mais le spectre ne laisse pas apparaître de signal CEST clair comme c'était le cas pour [Eu.D₃]³⁺.

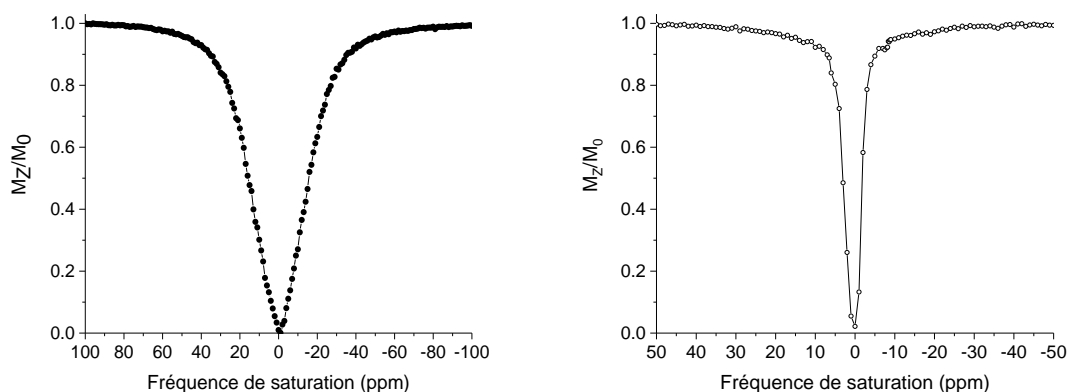


Figure III-46 : Spectres CEST d'une solution à 17 mM de [Eu.D₄]³⁺ sous ses formes oxydée (gauche) et réduite (droite) en utilisant 2 équivalents d'ascorbate de sodium. Spectres enregistrés à 11,7 T, T = 298 K, dans un mélange H₂O:CD₃CN (2:1), [HEPES] = 0,07M à pH 7,5, B₁ = 19 μT, et un temps d'irradiation de 4 s.

Enfin le complexe [Yb.D₄]³⁺ sous ses formes oxydée et réduite ne présente aucune activité CEST (Cf Annexe CEST) comme c'était déjà le cas dans le complexe [Yb.D₃]³⁺. Les résultats, bien que très peu intense, montrent qu'il est possible de modifier l'effet CEST dans les complexes d'euprémium en jouant sur l'effet électronique des bras phénylacétamides. En revanche le cation Yb³⁺ ne s'avère pas adapté pour obtenir un effet CEST, tout du moins dans cette série.

III.6.3 Influence de l'état rédox sur l'activité CEST

Les mesures de temps de relaxation T₁ montrent des temps courts provoqués par la présence de l'électron non apparié du nitroxyde appartenant au ligand (Tableau III-H). Après réduction de la fonction nitroxyde en hydroxylamine, le T₁ augmente, confirmant l'effet du paramagnétisme induit par le nitroxyde. Ces valeurs sont d'ailleurs comparables à celles des complexes [Ln.D₁]³⁺ et [Ln.D₂]³⁺ (cf Annexe CEST).

Tableau III-H : Résumé de l'activité CEST en fonction du temps de relaxation T₁ des différents complexes enregistré à 11,7 T à 298K dans un mélange H₂O:CD₃CN (2:1), [HEPES] = 0,07M à pH 7,5.

| Complexe | T ₁ ^{OX} (s) | T ₁ ^{RED} (s) | Activité CEST |
|--|----------------------------------|-----------------------------------|---------------|
| [Eu.D ₃] ³⁺ (20 mM) | 0,21 ± 0,01 | 2,10 ± 0,18 | ≈ 25 ppm |
| [Yb.D ₃] ³⁺ (20 mM) | 0,78 ± 0,02 | 2,42 ± 0,34 | - |
| [Eu.D ₄] ³⁺ (17 mM) | 0,59 ± 0,03 | 3,0 ± 0,21 | - |
| [Yb.D ₄] ³⁺ (20 mM) | 0,83 ± 0,04 | 2,93 ± 0,04 | - |

III.7 BILAN ET PERSPECTIVES

L'objectif de cette série de complexe était de concevoir une sonde bimodale CEST / luminescence par incorporation d'une part d'une antenne sur le ligand et d'autre part de bras phénylacétamides comportant des protons échangeables. L'incorporation de l'antenne sur le cyclène s'est avérée compliquée, sans doute dû à l'encombrement apporté par les deux bras phénylacétanilides qui ont été incorporés en 1^{er} lieu.

Les complexes se sont avérés peu efficaces en CEST malgré la présence des fonctions acétamides fonctionnalisées. Par contre les ligands semblent capables de sensibiliser l'euporium et l'ytterbium. Les propriétés magnétiques et photophysiques des lanthanides sont influencées par l'état rédox du nitroxyde puisque l'intensité de la luminescence augmente d'environ 90% après réduction du radical nitroxyde en hydroxylamine.

Il sera nécessaire d'améliorer l'effet CEST des complexes et également leur solubilité en milieu aqueux.

Dans la suite de ces travaux nous évoluerons vers des complexes plus symétriques possédant deux unités nitroxydes et étudierons l'influence de deux radicaux sur la luminescence et le CEST.

IV. CHAPITRE 4 : COMPLEXES SYMETRIQUES

INTEGRANT DEUX UNITES REDOX : D₅ ET D₆

| | |
|---|-----|
| IV.1 DESIGN DES COMPLEXES [Ln.D ₅] ³⁺ ET [Ln.D ₆] ³⁺ | 153 |
| IV.2 SYNTHÈSE DES LIGANDS ET DES COMPLEXES | 153 |
| IV.2.1 Synthèse du ligand D ₅ | 153 |
| IV.2.2 Synthèse du ligand D ₆ | 154 |
| IV.2.3 Formation des complexes..... | 157 |
| IV.2.3.1 Formation des complexes [Ln.D ₅] ³⁺ et [Ln.D ₆] ³⁺ | 157 |
| IV.2.3.2 Caractérisation des complexes [Ln.D ₅] ³⁺ et [Ln.D ₆] ³⁺ | 157 |
| IV.3 ETUDE ELECTROCHIMIQUE DES LIGANDS ET COMPLEXES..... | 158 |
| IV.3.1 Etude électrochimique des ligands..... | 158 |
| IV.4 ETUDES DES COMPLEXES PAR SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION ET LUMINESCENCE | 159 |
| IV.4.1 Spectroscopie d'absorption UV-Vis..... | 159 |
| IV.4.2 Spectroscopie de luminescence | 161 |
| IV.4.2.1 Photoluminescence des complexes d'euprium | 161 |
| IV.4.2.2 Détermination du nombre de molécules de solvant coordonnées | 163 |
| IV.4.2.2.1 Mesure dans le méthanol..... | 163 |
| IV.4.2.2.2 Mesure dans un mélange de solvants..... | 164 |
| IV.4.2.3 Complexes d'ytterbium | 165 |
| IV.5 ETUDES DES COMPLEXES PAR RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE | 166 |
| IV.5.1 Spectres des ligands D ₅ et D ₆ | 166 |
| IV.5.2 Complexes de lanthanides..... | 166 |
| IV.5.2.1 Complexes d'ytterbium | 166 |
| IV.5.2.2 Complexe de gadolinium | 168 |
| IV.5.2.3 Complexe de dysprosium | 169 |
| IV.5.2.4 Complexes d'euprium..... | 170 |
| IV.6 SPECTROSCOPIE CEST DES COMPLEXES..... | 171 |
| IV.6.1 Spectroscopie CEST des complexes d'euprium | 171 |
| IV.6.2 Spectroscopie CEST des complexes d'ytterbium | 176 |
| IV.7 CYTOTOXICITE DES COMPLEXES..... | 178 |
| IV.8 BILAN ET PERSPECTIVES | 179 |

IV.1 DESIGN DES COMPLEXES [Ln.D₅]³⁺ ET [Ln.D₆]³⁺

Nous avons vu dans le chapitre précédent qu'il était possible d'obtenir des sondes rédox bimodales CEST / luminescence. L'objectif de ce chapitre est d'augmenter l'activité CEST, augmenter la contribution paramagnétique du nitroxyde et d'évaluer l'impact de la symétrie du ligand sur son intensité. Deux nouvelles séries de complexes ont ainsi été préparées. Les ligands sont constitués d'un cyclène substitué par deux fonctions phénylacétamides et de deux unités TEMPO. Nous avons inclus dans le design de nos sondes deux unités phénylacétamides diversement substituées (substituants « OMe » et « CF₃ » pour moduler l'effet électronique) pour améliorer l'effet CEST (voir chapitre III) et deux unités dérivées de l'aminoTEMPO comme sonde rédox (Figure III-9). On notera que la présence des fluors dans le complexe [Ln.D₆]³⁺ pourrait conférer une troisième possibilité de détection.

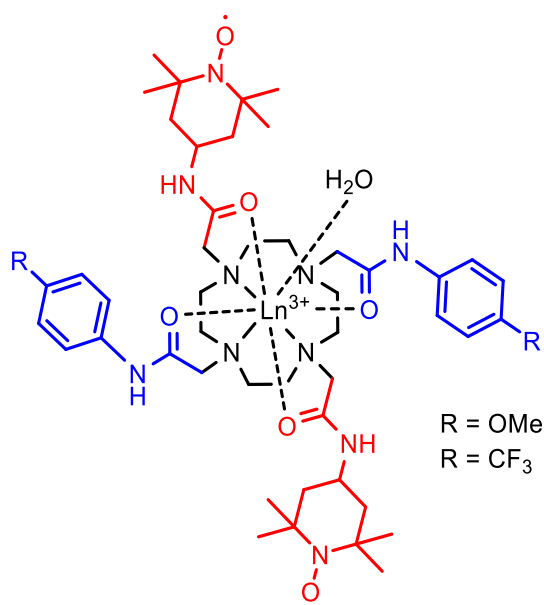
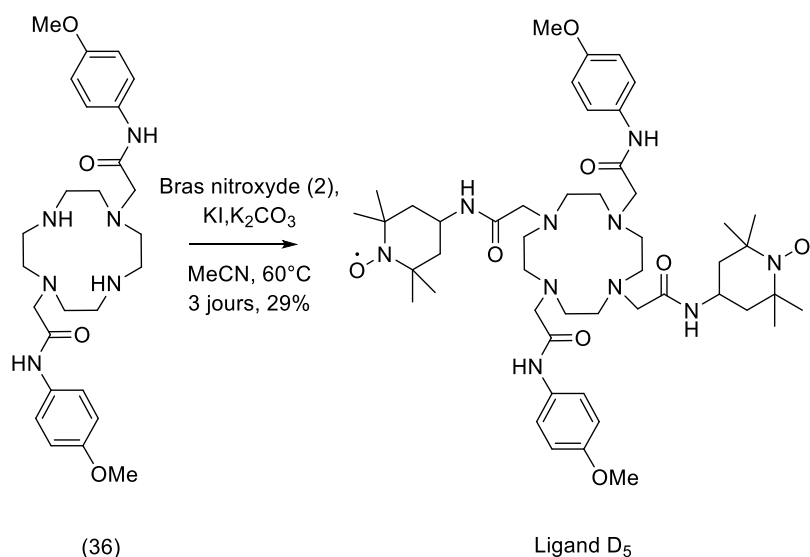


Figure IV-1 : Design de nos deux séries de complexes intégrant deux unités rédox [Ln.D₅]³⁺ et [Ln.D₆]³⁺.

IV.2 SYNTHÈSE DES LIGANDS ET DES COMPLEXES

IV.2.1 Synthèse du ligand D₅

Cette série de complexe est, en théorie, bien plus simple à synthétiser de par sa nature symétrique. Comme pour le chapitre précédent, le point de départ de cette synthèse est le cyclène bisubstitué (36). Pour obtenir le ligand D₅, une substitution nucléophile de l'intermédiaire (36) sur l'unité aminoTEMPO (2) en présence de carbonate de potassium et d'iodure de potassium est réalisée. Après trois jours à 60°C, le ligand D₅ est obtenu avec un rendement modeste de 29% (Figure IV-2).

Figure IV-2 : Synthèse du ligand D₅.

Le ligand D₅ a été caractérisé par les techniques classiques de chimie organique telles que la RMN, l'infrarouge ou la spectrométrie de masse haute résolution (HRMS). Le spectre RMN enregistré en présence d'ascorbate montre des résonances caractéristiques telles que les résonances des protons aromatiques à $\delta = 7,53$ et $6,84$ ppm, celles du cyclène et des méthyles qui substituent chaque azote dans la région $\delta = 3,2$ - $2,0$ ppm et enfin celles des méthyles de l'unité TEMPO (ici réduite en hydroxylamine par l'ascorbate) autour de $\delta = 1,2$ - $0,9$ ppm. Le spectre de masse haute résolution confirme la structure attendue, avec un pic à $m/z = 921.59137$ correspondant à la valeur calculée pour C₄₈H₇₇O₈N₁₀ [M]⁺ = 921,59204.

IV.2.2 Synthèse du ligand D₆

Le ligand D₆ a été obtenu selon la même méthodologie que D₅, à savoir par substitution nucléophile d'un cyclène bisubstitué par l'unité aminoTEMPO (2). Le cyclène est dans ce cas (38) et la substitution s'opère également en présence de carbonate de potassium et d'iodure de potassium dans l'acétonitrile. Après 13 jours à 70°C, le ligand D₆ est obtenu avec un modeste rendement de 38% (Figure IV-3).

Complexe symétrique intégrant deux unités redox : D₅ et D₆

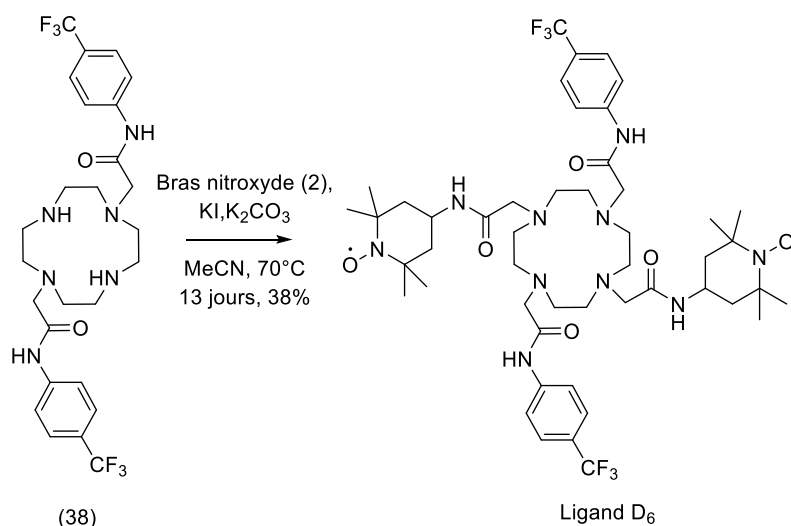


Figure IV-3 : Synthèse du ligand D₆.

La caractérisation par RMN montre des résonances attribuées aux protons des fonctions phénylacétamides qui sont élargies à cause du paramagnétisme des unités aminoTEMPO (Figure IV-4, A). La réduction des fonctions nitroxydes en hydroxylamines par l'ajout d'ascorbate avant enregistrement du spectre RMN permet d'affiner les résonances. Les signaux des protons aromatiques des fonctions phénylacétamides sont observés à $\delta = 7,83$ et $7,56$ ppm (Figure IV-4, g). On peut donc noter un déblindage significatif de ces résonances par rapport à D₅ qui s'explique par un effet de substituant, le groupement CF₃ étant fortement électroaccepteur. Les résonances des protons des unités TEMPO sont caractérisées par un doublet intégrant pour 24 protons à environ 1,2 ppm (Figure IV-4, a) comme pour D₅ et les séries D₁/D₂ (confère chapitre 2). Les signaux RMN obtenus laissent penser que la réduction n'est pas totale. De plus, l'ascorbate en solution est caractérisé par des signaux RMN entre 4,8 et 3,5 ppm.

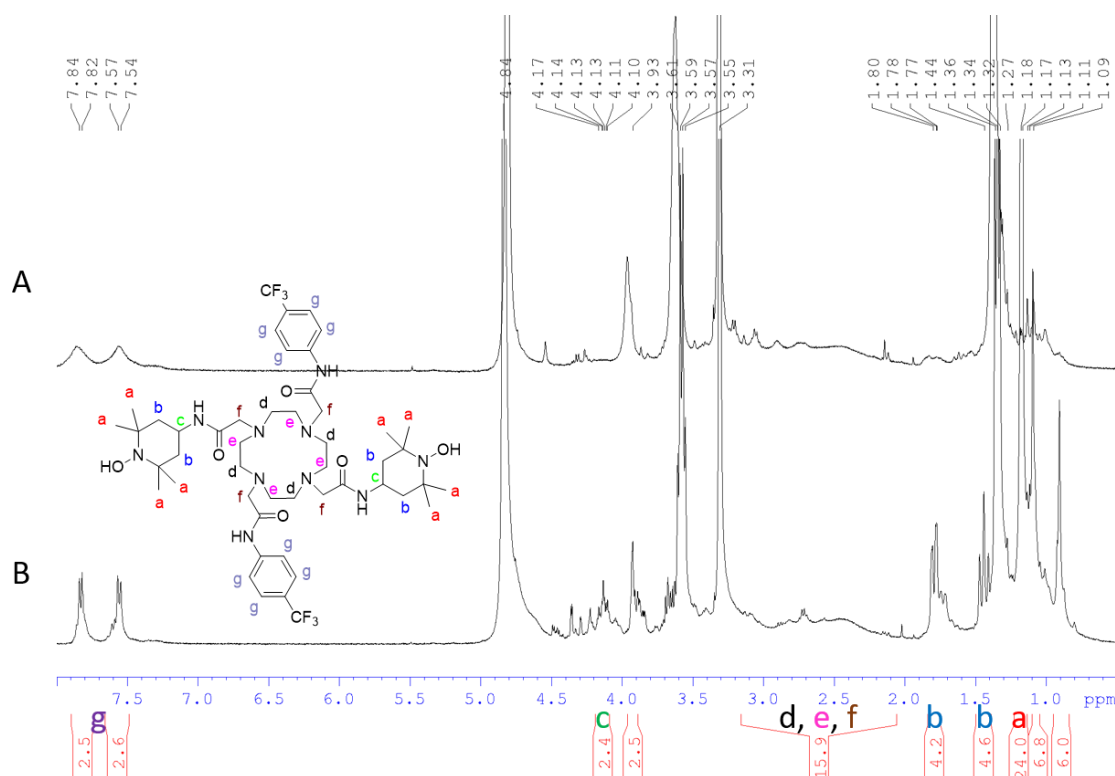


Figure IV-4 : RMN dans MeOD du ligand D_6 sous forme oxydée (A) et sous forme réduite (B) contenant de l'ascorbate.

Le ligand D_6 est composé de deux groupements trifluorométhyles (CF_3) qui peuvent être détectés par RMN ^{19}F et donnent des informations supplémentaires. Sous forme oxydée, le signal du fluor à -63 ppm est large et proche du bruit de fond (Figure IV-5, a). Après réduction des fonctions nitroxydes en hydroxylamines par l'ascorbate le signal s'affine et se déplace vers $-63,6$ ppm (Figure IV-5, c). Ceci confirme que la résonance des groupements trifluorométhyles est influencée par le paramagnétisme des unités nitroxydes malgré la distance entre les deux sites.

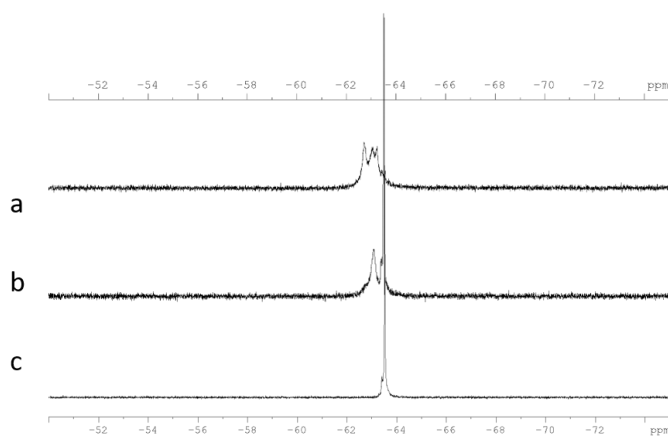


Figure IV-5 : Spectre du RMN ^{19}F du ligand D_6 dans le MeOD à différents de temps après la réduction : 1 min (a), 1h (b), 4h (c).

IV.2.3 Formation des complexes

IV.2.3.1 Formation des complexes [Ln.D₅]³⁺ et [Ln.D₆]³⁺

Les deux ligands ne sont pas solubles dans l'eau pure. C'est pourquoi les complexes de lanthanides sont formés dans un mélange d'eau et de 1,4-dioxane (40/60, v/v) en suivant le protocole établi par M. Milne *et al.*^[41] Après une nuit à 50°C/60°C en présence du triflate de lanthanides adéquat les complexes [Ln.D₅]³⁺ et [Ln.D₆]³⁺ sont obtenus et isolés par précipitation dans l'éther avec des rendements allant de 54 à 97% (Figure IV-6). Les complexes ne sont pas solubles dans l'eau pure, ce qui nous a conduit à les étudier dans des solvants purement organiques ou des mélanges de solvants.

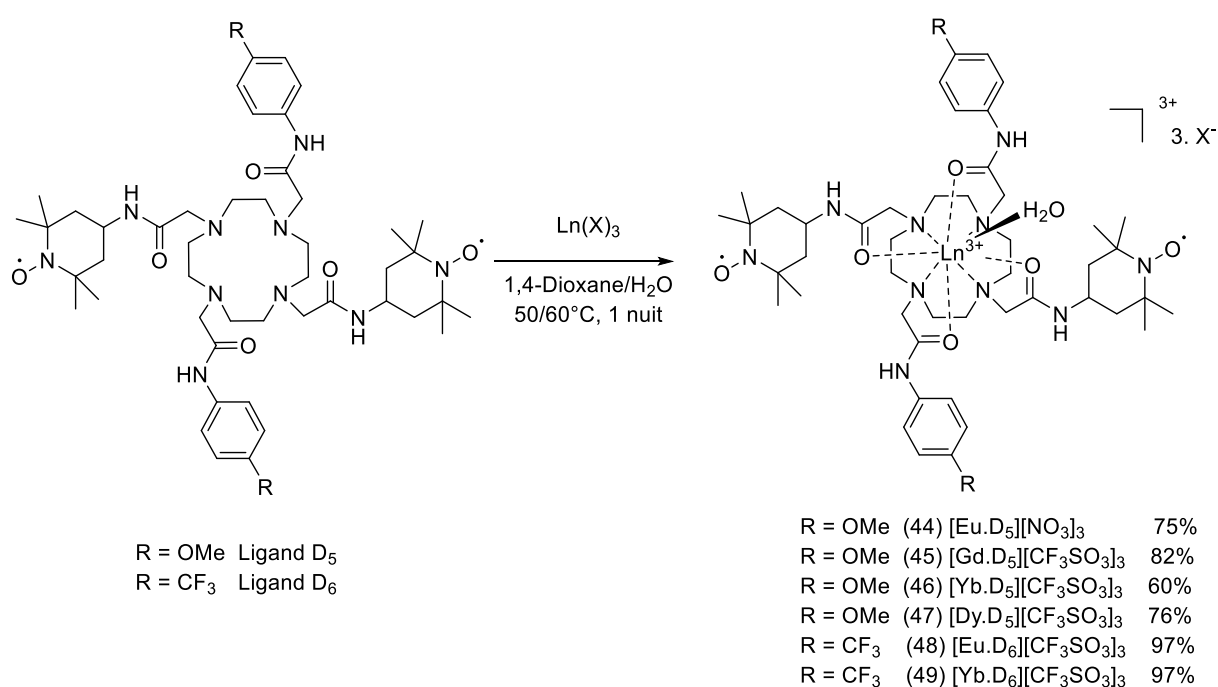


Figure IV-6 : Complexation des ligands D₅ et D₆.

IV.2.3.2 Caractérisation des complexes [Ln.D₅]³⁺ et [Ln.D₆]³⁺

Les complexes des deux séries sont tricationiques et la plupart ont été isolés sous forme de sels de triflate qui donnent un signal en fluor autour de -78 ppm. Les complexes de la série D₆ possèdent quant à eux deux signaux en RMN du ¹⁹F à -61.5 ppm (substituant CF₃) et -78 ppm (triflates). Les complexes de ces deux séries possèdent aussi des signaux visibles en RMN du proton sur une gamme dépendante du lanthanide utilisé. Les complexes des séries D₅ et D₆ possèdent un caractère paramagnétique très important qui rend extrêmement difficile leur caractérisation par RMN. En spectroscopie infrarouge on observe un élargissement de la bande à 3444 cm⁻¹ (ν_{OH} et ν_{NH}) après complexation. De plus des bandes à

1238, 1162 (Ln.D₅), 1157 (Ln.D₆) et 1027 cm⁻¹ correspondant aux vibrations SO et CF des ions triflates (ν_{SO_3} et ν_{CF_3} respectivement^[145]) s'observent après complexation. Le profil infrarouge est quasiment superposable pour les complexes de lanthanides par rapport à leur ligand respectif. Enfin, la spectrométrie de masse electrospray (ESI-MS) permet d'observer les profils attendus pour les complexes, avec par exemple un pic moléculaire à $m/z = 357,83 ; 359,63 ; 361,51 ; 364,84$ pour [Ln.D₅]³⁺ (avec Ln = Eu, Gd, Dy et Yb, respectivement) correspondant à [M]³⁺. Les complexes se sont avérés être sensibles à l'ionisation lors des analyses de spectroscopie de masse electrospray (ESI-MS) et ne donnent pas de profils de masse en haute résolution.

IV.3 ETUDE ELECTROCHIMIQUE DES LIGANDS ET COMPLEXES

IV.3.1 Etude électrochimique des ligands

Les ligands D₅ et D₆ ont été étudiés par voltampérométrie cyclique (CV), voltampérométrie à impulsion différentielle (DPV) et par voltampérométrie par électrode tournante (RDE) dans une solution d'acétonitrile contenant 0,1 M de TBAP en tant qu'électrolyte support. Les ligands D₅ et D₆ présentent des courbes de voltampérométrie cyclique relativement proches avec une vague irréversible en oxydation à $E_p^a = 0,01$ et $-0,04$ V respectivement, une vague irréversible en réduction à $E_p^c = -1,3$ et $-1,4$ V. Une deuxième vague réversible est observée en oxydation à $E_{1/2} = 0,33$ V (Figure IV-7). Ce système peut être attribué au couple oxo-ammonium (TEMPO⁺)/nitroxyde (TEMPO). Nous n'observons qu'une seule vague réversible, ce qui signifie que l'oxydation des deux unités TEMPO s'effectue au même potentiel. En d'autres termes ces groupements sont équivalents électrochimiquement.

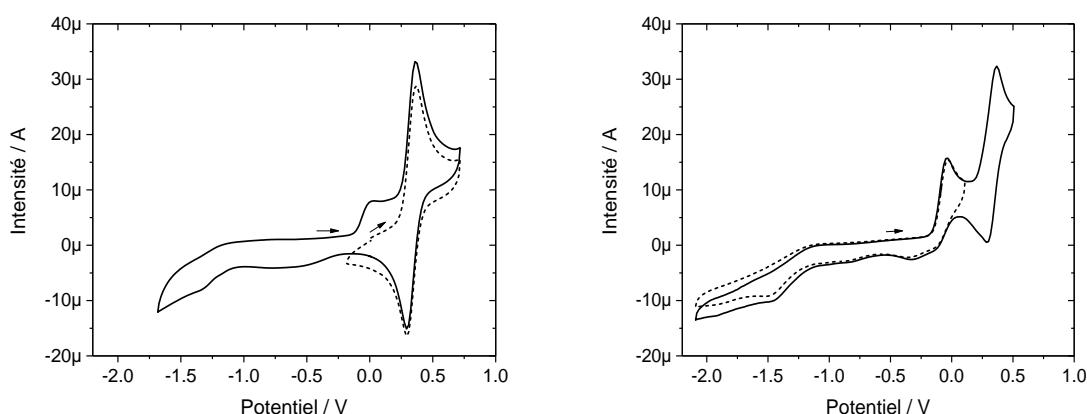


Figure IV-7 : CV des ligands D₅ (gauche) et D₆ (droite) à 0,5 mM dans une solution de CH₃CN contenant 0,1 M de TBAP comme électrolyte de support. Toutes les valeurs de potentiels sont données en V par rapport au couple rédox Fc⁺/Fc. T = 298 K ; vitesse de balayage : 0,1 V/sec. Les paramètres pour le ferrocène par rapport à la référence utilisée (AgNO₃ à 0,01 M) : $E_{1/2} = 0,090$ V. En pointillé : CV des complexes dans des gammes de potentiels moins larges.

La vague irréversible observée à un potentiel $E_p^a \approx 0$ V vs Fc⁺/Fc a déjà été observée dans nos premières séries de complexes [Ln.D₁]³⁺ et [Ln.D₂]³⁺ et semble être associée à un équilibre

acido-basique au niveau des unités TEMPO (chapitre II). Les complexes des différents cations lanthanides présentent des profils très proches de ceux des ligands en électrochimie. Les complexes d'euporium, par exemple (Figure IV-8), présentent une vague d'oxydation réversible (système 1/1') à $E_{1/2} = 0,36$ et $0,33$ V (pour $[\text{Eu.D}_5]^{3+}$ et $[\text{Eu.D}_6]^{3+}$, respectivement) associée au couple $\text{TEMPO}^+/\text{TEMPO}^{[118]}$ (Tableau IV-A). Le deuxième système (2/2'), également décrit dans le chapitre II est observé aux potentiels $E_p^{a2} = 0,01$ V et $-0,05$ V (pour $[\text{Eu.D}_5]^{3+}$ et $[\text{Eu.D}_6]^{3+}$, respectivement).

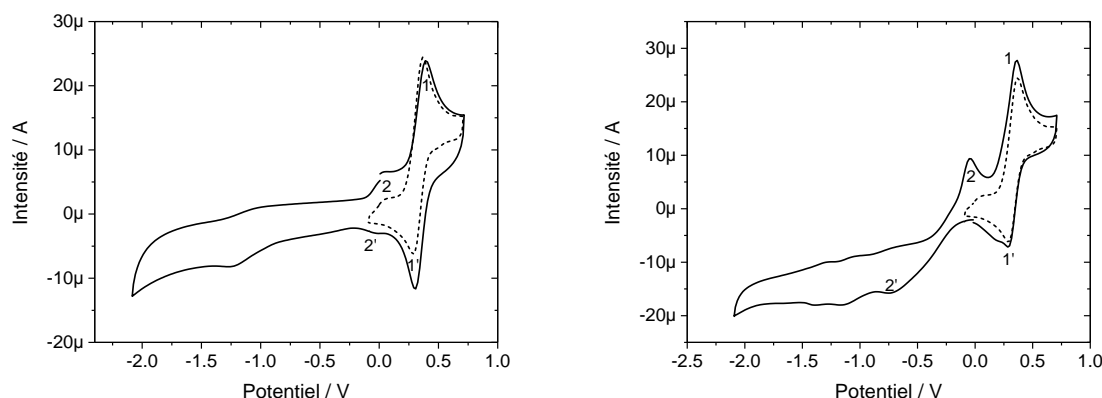


Figure IV-8 : CV des complexes $[\text{Eu.D}_5]^{3+}$ (gauche) et $[\text{Eu.D}_6]^{3+}$ (droite) à 0,5 mM dans une solution de CH_3CN contenant 0,1 M de TBAP comme électrolyte de support. Toutes les valeurs de potentiels sont données en V par rapport au couple redox Fc^+/Fc . $T = 298$ K ; vitesse de balayage : 0,1 V/sec. Les paramètres pour le ferrocène par rapport à la référence utilisée (AgNO_3 à 0,01 M) : $E_{1/2} = 0,090$ V. En pointillé : CV des complexes dans des gammes de potentiels moins larges.

Tableau IV-A : Valeurs des potentiels d'oxydation $E_{1/2}$ des séries D₅ et D₆.

| Complexes | E_p^{a2} | $E_{1/2}^1$ | Complexes | E_p^{a2} | $E_{1/2}^1$ |
|------------------------|------------|-------------|------------------------|------------|-------------|
| D_5 | 0,01 | 0,33 | D_6 | -0,01 | 0,33 |
| $[\text{Eu.D}_5]^{3+}$ | 0,04 | 0,36 | $[\text{Eu.D}_6]^{3+}$ | -0,05 | 0,33 |
| $[\text{Yb.D}_5]^{3+}$ | 0,01 | 0,36 | $[\text{Yb.D}_6]^{3+}$ | 0,03 | 0,33 |
| $[\text{Dy.D}_5]^{3+}$ | -0,01 | 0,36 | | | |
| $[\text{Gd.D}_5]^{3+}$ | 0,01 | 0,36 | | | |

Le comportement électrochimique observé est semblable à celui des complexes des séries D₁ et D₂. Cela suggère que les groupements TEMPO sont en équilibre acido-basique en solution. Ainsi les fonctions hydroxylamines peuvent s'oxyder directement en oxo-ammonium à un potentiel inférieur au couple $\text{TEMPO}/\text{TEMPO}^+$ (Cf. Paragraphe II.3.1.1, Figure II-31).

IV.4 ETUDES DES COMPLEXES PAR SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION ET LUMINESCENCE

IV.4.1 Spectroscopie d'absorption UV-Vis

L'étude par spectroscopie d'absorption des ligands et complexes $[\text{Ln.D}_5]^{3+}$ et $[\text{Ln.D}_6]^{3+}$ a été effectuée dans l'acétonitrile pour être cohérent avec l'étude électrochimique (Figure IV-9).

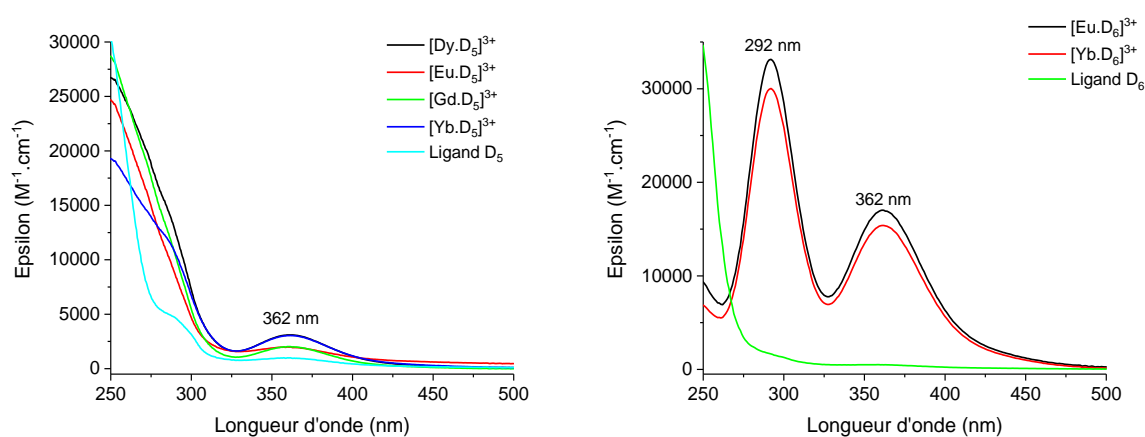


Figure IV-9 : Spectres d'absorption UV-Vis du ligand et des complexes $[\text{Ln.D}_5]^{3+}$ (gauche) et du ligand et des complexes $[\text{Ln.D}_6]^{3+}$ (droite) dans MeCN à 0,5 mM contenant du TBAP comme électrolyte support (0,1 M). $T = 298 \text{ K}$.

Les longueurs d'ondes des principales bandes du ligand et des complexes ainsi que leur coefficient d'extinction molaire sont listés dans le Tableau IV-B. Le spectre d'absorption du ligand D_5 montre une bande principale aux environs de 247 nm ($\epsilon \approx 30\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, Tableau IV-B) et une bande à 290 nm ($\epsilon = 5\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) qui sont associées aux deux groupements phénylacétamides. Le composé N-(4-méthoxyphényl)acetamide absorbe en effet à 250 nm ($\epsilon = 15\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et 285 nm ($\epsilon = 2\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (données dans le méthanol issues des bases de BIORAD).

Le spectre d'absorption du ligand D_6 montre une bande principale vers 250 nm ($\epsilon \approx 37\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, Tableau IV-B) et associée aux groupements phénylacétamides. De la même manière, le composé N-[4-(trifluorométhyl)-phényl]acetamide absorbe à 250 nm ($\epsilon = 17\,500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (bases de données de BIORAD). Bien que le solvant d'analyse soit différent, les positions des bandes sont très similaires et les coefficients d'extinction molaire sont deux fois plus importants dans le cas de nos ligands, comme on pouvait s'y attendre car ils comportent deux chromophores.

Le spectre d'absorption des complexes $[\text{Ln.D}_5]^{3+}$ montre une bande principale à 250 nm moins intense que pour le ligand D_5 . A l'inverse, les bandes d'absorption à 290 et 361 nm présentent des coefficients d'extinction molaire 2 à 3 fois plus intense dans les complexes $[\text{Ln.D}_5]^{3+}$ que dans le ligand D_5 . Ces données sont cohérentes avec une complexation des lanthanides par le ligand D_5 .

Le spectre d'absorption des complexes [Ln.D₆]³⁺ comporte des bandes à 290 et 361 nm. De manière surprenante les coefficients d'extinction molaire associés atteignent des valeurs de 30 000 à 15 000 M⁻¹.cm⁻¹ respectivement pour la série [Ln.D₆]³⁺ (Figure IV-9). Ce comportement semble suggérer une proportion plus importante de forme protonnée pour la série [Ln.D₆]³⁺ par rapport à [Ln.D₅]³⁺ [148].

Tableau IV-B : Valeurs des longueurs d'onde λ_{max} et coefficients d'extinction molaire ϵ obtenus par spectroscopie d'absorption UV-Vis des ligands et complexes [Ln.D₅]³⁺ et [Ln.D₆]³⁺ en solution à 0,5 mM dans MeCN contenant du TBAP comme électrolyte support (0,1 M). T = 298 K.

| Complexe | λ_{max} (nm) / ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹) | Complexe | λ_{max} (nm) / ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹) |
|------------------------------------|---|------------------------------------|---|
| Ligand D ₅ | 250 (30000), 290 (5000), 364 (1000) | Ligand D ₆ | 247 (37000) |
| [Yb.D ₅] ³⁺ | 250 (19000), 290 (11000), 362 (3000) | [Yb.D ₆] ³⁺ | 243 (10000), 292 (33000), 361 (17000) |
| [Eu.D ₅] ³⁺ | 250 (25000), 290 (9000), 362 (2000) | [Eu.D ₆] ³⁺ | 245 (7500), 292 (30000), 361 (15500) |
| [Dy.D ₅] ³⁺ | 250 (27000), 290 (13000), 361 (3000) | Précurseur (2) | 245 (1200) |
| [Gd.D ₅] ³⁺ | 250 (29000), 290 (10500), 362 (2000) | | |

IV.4.2 Spectroscopie de luminescence

IV.4.2.1 Photoluminescence des complexes d'euprium

La photoluminescence des complexes [Eu.D₅]³⁺ et [Eu.D₆]³⁺ a été mesurée dans le méthanol afin de rester cohérent avec les mesures de luminescence réalisées dans le chapitre précédent. L'excitation des complexes [Eu.D₅]³⁺ et [Eu.D₆]³⁺ a été effectuée à 280 nm dans la bande d'absorption du ligand (Figure IV-10). Il en résulte les bandes d'émission fines typiques dans le rouge entre 570 et 720 nm qui correspondent aux transitions ⁵D₀ → ⁷F_J (J = 0, 1, 2, 3, 4). Les spectres d'émission des deux complexes sont très proches suggérant une coordination du ligand similaire.

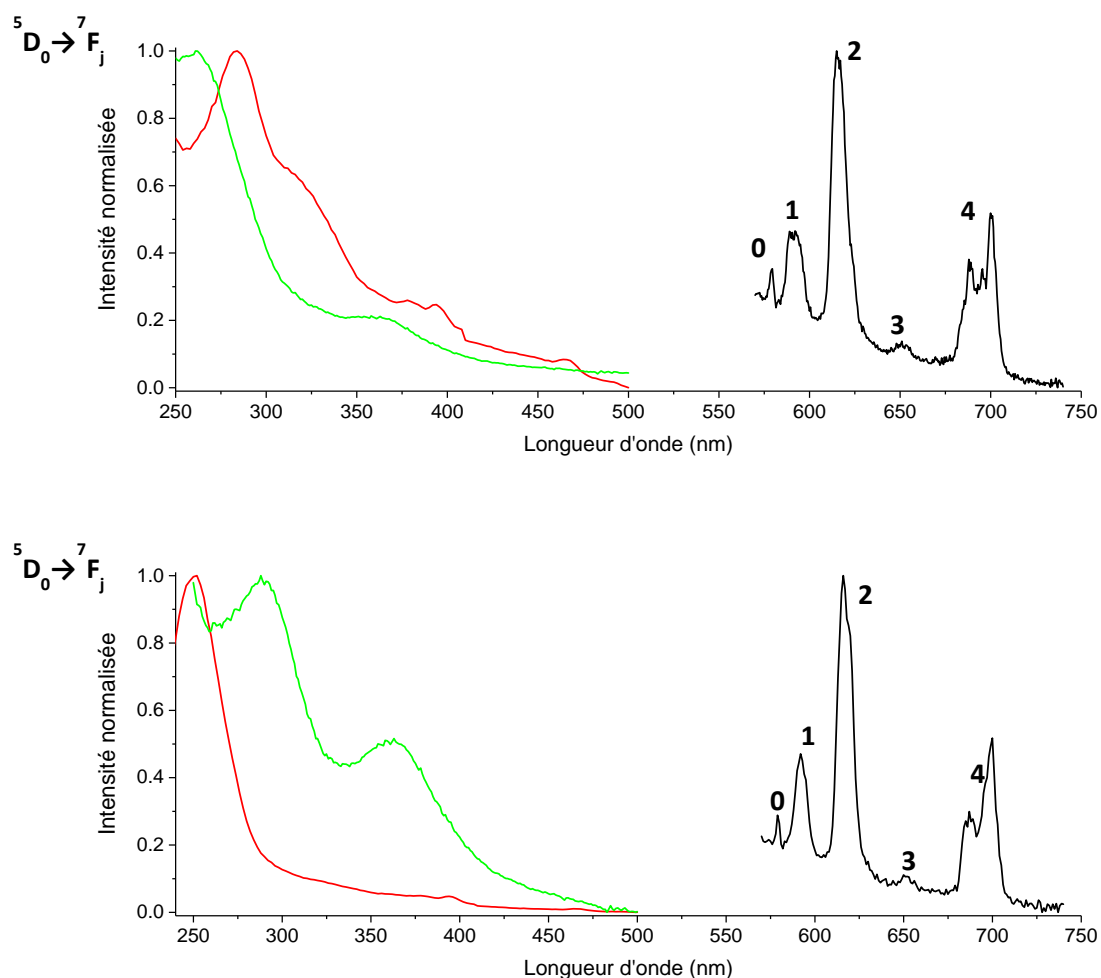


Figure IV-10 : Spectres d'émission (noir) du complexe $[Eu.D_5]^{3+}$ (haut) et $[Eu.D_6]^{3+}$ (bas) avec excitation à 280 nm dans le méthanol à une concentration de 0,05 mM à 298 K. En vert : spectre d'absorption UV-Vis ; en rouge : spectre d'excitation avec $\lambda_{max} = 614$ nm.

La bande associée à la transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ est visible pour les deux complexes suggérant une symétrie C en accord avec la structure du ligand de type DOTAM. Le manque de résolution ne permet toutefois pas de commenter la forme de la transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$. Enfin, les similarités de profil laissent supposer que l'arrangement autour de l'euprimum est semblable dans les deux complexes.

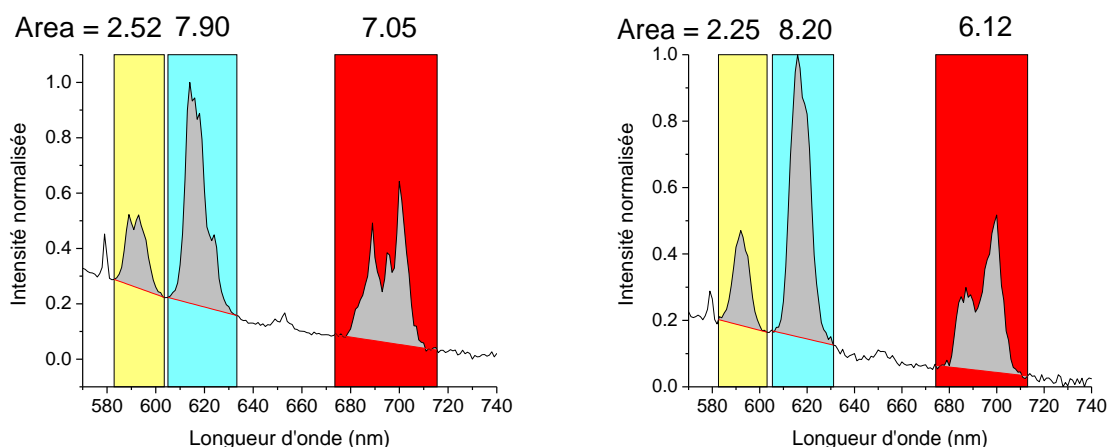


Figure IV-11 : Intégration des bandes correspondant aux transitions $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$, $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ et $^5D_0 \rightarrow ^7F_4$. Gauche : $[Eu.D_5]^{3+}$, droite : $[Eu.D_6]^{3+}$.

L'intégration des bandes correspondant aux transitions $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$, $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ et $^5D_0 \rightarrow ^7F_4$ et les rapports associés sont listés dans le tableau IV-C. Ces rapports sont très similaires pour les complexes $[Eu.D_5]^{3+}$ et $[Eu.D_6]^{3+}$ (Figure IV-11), renforçant l'hypothèse d'une coordination similaire.

Tableau IV-C : Intégration des bandes de luminescence du complexe $[Eu.D_5]^{3+}$ et $[Eu.D_6]^{3+}$.

| Rapport R | $I(^5D_0 \rightarrow ^7F_2) / I(^5D_0 \rightarrow ^7F_1)$ | $I(^5D_0 \rightarrow ^7F_4) / I(^5D_0 \rightarrow ^7F_1)$ |
|-----------------|---|---|
| $[Eu.D_5]^{3+}$ | 3,1 | 2,8 |
| $[Eu.D_6]^{3+}$ | 3,6 | 2,7 |

IV.4.2.2 Détermination du nombre de molécules de solvant coordonnées

Comme dans le chapitre 3, les complexes $[Ln.D_5]^{3+}$ et $[Ln.D_6]^{3+}$ sont insolubles dans l'eau pure. Pour déterminer le nombre de molécules de solvant coordonnées, nous avons décidé de réutiliser les deux alternatives décrites précédemment, à savoir une mesure dans le méthanol et une mesure dans un mélange de solvants. Sur des complexes de lanthanides similaires, J.-C. Bünzli *et al.* ont remarqué qu'à l'état solide, une seule molécule de solvant (H₂O ou MeOH) était présente dans ce type de structure^[152].

IV.4.2.2.1 Mesure dans le méthanol

Dans le méthanol pur, on considèrera qu'une molécule de méthanol coordonnée équivaut à une demi molécule d'eau et ne participe aux désactivations de l'état excité que par un seul oscillateur O-H. Le nombre de molécule de méthanol « *m* » a été déterminé à partir de la différence de temps de vie des états excités de l'euporium dans le méthanol et dans le méthanol deutéré (Tableau III-C). Une seule équation a été proposée dans le méthanol par W. Horrocks *et al.*^[149] en 1991 :

$$m = 2,1 \times \Delta k_{obs} \quad \text{Eq. 3.1}$$

où $\Delta k_{obs} = k_{MeOH} - k_{MeOD} = 1/\tau_{MeOH} - 1/\tau_{MeOD}$

Pour les complexes $[Eu.D_5]^{3+}$ et $[Eu.D_6]^{3+}$ les données expérimentales montrent une valeur m de 2 molécules de solvant. Ceci suggérerait que deux molécules de méthanol sont coordonnées dans les complexes. Ces résultats sont différents de ce qui est attendu pour ce type de complexe. Les oscillateurs n'étant pas considérés dans cette équation la valeur de m pourrait être largement surestimée.

Tableau IV-C : Temps de vie des complexes $[Eu.D_5]^{3+}$ et $[Eu.D_6]^{3+}$, $\Delta k_{obs} = k_{MeOH} - k_{MeOD} = 1/\tau_{MeOH} - 1/\tau_{MeOD}$, $m =$ nombre de molécule de méthanol coordonnée $\pm 0,5$.

| Complexe Eu | τ_{MeOH} (ms) | τ_{MeOD} (ms) | Δk_{obs} | m |
|-----------------|--------------------|--------------------|------------------|-----|
| $[Eu.D_5]^{3+}$ | 0,65 | 1,77 | 0,97 | 2 |
| $[Eu.D_6]^{3+}$ | 0,71 | 2,13 | 0,94 | 2 |

IV.4.2.2.2 Mesure dans un mélange de solvants

Les complexes ont été solubilisés dans un mélange contenant 90% d'eau et 10% d'acétonitrile. L'acétonitrile est moins coordinant que l'eau donc nous ferons l'hypothèse que seul H₂O (ou D₂O) peut se lier au centre métallique. De plus nous négligerons l'effet de concentration en eau (moins importante) et de changement de constante diélectrique du solvant. Les équations mises au point par W. Horrocks *et al.* et D. Parker *et al.* ont été testées pour calculer le nombre de molécule d'eau « q » à partir de la différence de temps de vie des états excités de l'euporium dans l'eau et dans l'eau deutéré (Tableau IV-D). Les protons des fonctions amides à proximité de l'euporium sont pris en compte dans l'équation générale publiée par W. Horrocks *et al.*^[123]:

$$q = 1,11 [\Delta k_{obs} - 0,31 - 0,45q^{OH} - 0,99q^{NH} - 0,075q^{CONH}] \quad \text{Eq. 4.2}$$

où $\Delta k_{obs} = k_{H_2O} - k_{D_2O} = 1/\tau_{H_2O} - 1/\tau_{D_2O}$, où q^{OH} désigne le nombre d'oscillateur -OH dans la première sphère de coordination, q^{NH} désigne le nombre d'oscillateur amine -NH dans la première sphère de coordination, q^{CONH} désigne le nombre d'oscillateur amide -CONH dans la première sphère de coordination.

En considérant les contributions des 4 fonctions amides l'équation 4.2 devient :

$$q = 1,11 [\Delta k_{obs} - 0,31 - 0,3] \quad \text{Eq. 4.3}$$

soit $q = 1,11 [\Delta k_{obs} - 0,61]$

Une étude menée par D. Parker *et al.*^[124] sur un grand nombre de complexes d'euporium se focalise sur l'importance des oscillateurs NH. La formule ci-dessous a été proposée :

$$q = 1,2 [\Delta k_{obs} - 0,25 - 0,075q^{CONHR}] \quad \text{Eq. 4.4}$$

où q^{CONHR} désigne le nombre de fonction amide présente dans le complexe.

En considérant les contributions des 4 fonctions amides l'équation 4.4 devient :

$$q = 1,2 [\Delta k_{\text{obs}} - 0,55] \quad \text{Eq. 4.5}$$

Tableau IV-D : Mesure de temps de vie des complexes [Eu.D₃]³⁺ et [Eu.D₄]³⁺, $\Delta k_{\text{obs}} = k_{\text{H}_2\text{O}} - k_{\text{D}_2\text{O}} = 1/\tau_{\text{H}_2\text{O}} - 1/\tau_{\text{D}_2\text{O}}$.

| Complexe | T _{H₂O} (ms) | T _{D₂O} (ms) | Δk _{obs} | q (Eq. 4.3 / Eq. 4.5) |
|---|----------------------------------|----------------------------------|-------------------|-----------------------|
| [Eu.D ₅] ³⁺ (TEMPO•) | 0,48 | 1,43 | 1,38 | 1,1/0,9 |
| [Eu.D ₆] ³⁺ (TEMPO•) | 0,25 | 0,32 | 0,88 | 0,5/0,4 |

Ces équations aboutissent à une seule molécule d'eau coordonnée pour le complexe [Eu.D₅]³⁺ et à une demie molécule d'eau pour le complexe [Eu.D₆]³⁺ (Tableau IV-D). Pour ce dernier complexe, le signal a été difficile à accumuler (plus grande incertitude) et donc la valeur de 0,5 pourrait être sous-estimée. Les mesures dans les solvants différents divergent.

La mesure dans le méthanol ne tient pas compte des oscillateurs atténuant la luminescence. Comme nous le verrons dans le chapitre V avec des complexes solubles à la fois dans le méthanol et l'eau pure la formule permettant de calculer le nombre de molécules *m* de méthanol coordonnées tend à fortement surestimer *m* pour nos séries de composés en solution dans le méthanol. Dans le mélange eau:acétonitrile, le résultat est cohérent avec ce qui est attendu par rapport à la littérature. Nous pouvons donc supposer qu'une molécule d'eau est présente dans la sphère de coordination des complexes [Eu.D₅]³⁺ et [Eu.D₆]³⁺ et que les incohérences dans le méthanol (qui devrait être moins coordinant) sont liées au caractère empirique des relations utilisées et au manque de paramétrisation dans ce solvant.

IV.4.2.3 Complexes d'ytterbium

Les mesures de photoluminescence des complexes [Yb.D₅]³⁺ (Figure IV-12) et [Yb.D₆]³⁺ ont été enregistrées dans le méthanol. Le spectre d'émission du complexe [Yb.D₅]³⁺ présente une bande peu intense à 980 nm. Elle correspond à la transition ²F_{5/2} → ²F_{7/2} du cation Yb(III) (Figure IV-12). Le spectre d'excitation du complexe [Yb.D₅]³⁺ a été obtenu en considérant une émission à 980 nm (Figure IV-12). Une bande d'excitation intense s'observe à 280 nm, c'est-à-dire à une longueur d'onde comparable à celle observée pour le complexe d'euporium. Le ligand D₅ est donc capable de sensibiliser l'ytterbium.

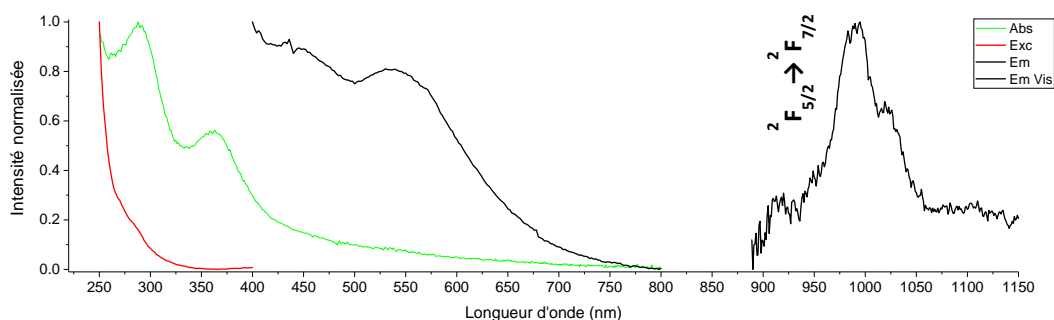


Figure IV-12 : Spectre de luminescence des complexes [Yb.D₅]³⁺ obtenu dans le méthanol avec une excitation à 280 nm (rouge), 10 scans. En vert : spectre d'absorption UV-Vis ; en rouge : spectre d'excitation avec $\lambda_{\text{max}} = 980$ nm.

De manière surprenante, le complexe $[\text{Yb.D}_6]^{3+}$ n'émet pas à 980 nm. Le ligand D_6 ne semble donc pas sensibiliser efficacement l'ytterbium ce qui signifie que les niveaux énergétiques associés au ligand sont différents dans les deux séries D_5 et D_6 ou que les processus de désactivation sont plus favorisés dans le complexe $[\text{Yb.D}_6]^{3+}$. Les propriétés électroniques des substituants « OMe » et « CF_3 » jouent donc un rôle important dans le processus de sensibilisation ou de désexcitation des lanthanides.

IV.5 ETUDES DES COMPLEXES PAR RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE

Les ligands et leurs complexes ont été analysés par spectroscopie RPE. Pour cette série en particulier, la technique s'avère intéressante due à la présence de deux unités rédox et la possibilité que ces radicaux soient couplés magnétiquement à la fois entre eux et/ou avec le cation Ln^{3+} .

IV.5.1 Spectres des ligands D_5 et D_6

Les spectres RPE des ligands D_5 et D_6 ont été enregistrés en solution à 0,5 mM dans l'acétonitrile. Les spectres se caractérisent par un signal isotrope composé de 3 raies, espacées de 1,6 mT (Figure IV-13). Le signal est centré à $g_{\text{iso}} = 2,006$, valeur typique des radicaux nitroxydes. Le temps de corrélation rotationnel τ_c ne peut pas être mesuré de manière fiable dans cette série dû à une possible interaction magnétique entre les nitroxydes. En effet les interactions magnétiques entre centres paramagnétiques peuvent contribuer à un élargissement des raies concurrentes avec l'élargissement anisotrope. L'existence d'interactions magnétiques se manifeste d'ailleurs de façon claire sur le spectre du ligand D_5 au travers l'apparition de résonances supplémentaires entre les 3 raies principales^[154] (Figure IV-13, gauche).

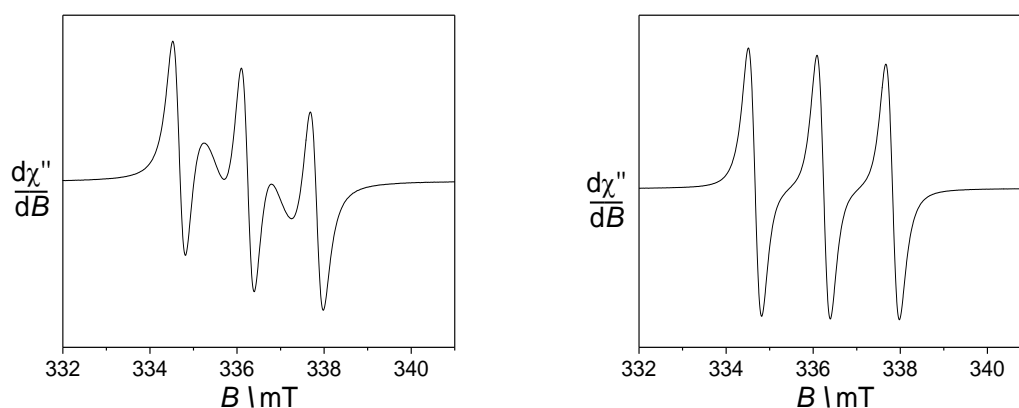


Figure IV-13 : Spectres RPE en bande X des ligands D_5 (Gauche) et D_6 (Droite) dans l'acétonitrile à une concentration de 0,5 mM à $T = 293\text{K}$. Fréquence micro-onde : 9,42 GHz ; puissance : 3,5 mW ; modulation d'amplitude : 0,2 mT, modulation de fréquence : 100 KHz.

IV.5.2 Complexes de lanthanides

IV.5.2.1 Complexes d'ytterbium

Les spectres RPE des complexes [Yb.D₅]³⁺ et [Yb.D₆]³⁺ ont tout d'abord été mesurés en solution isotrope à 298 K. Les spectres se caractérisent par un signal isotrope composé de 3 raies espacées de 1,6 mT (Figure II-46) centrées à $g_{iso} = 2,006$. L'intensité est quasiment similaire à celle mesurée pour les ligands seuls. Comme pour les ligands libres, la composante supplémentaire (les deux raies centrales) est présente dans la série D₅ mais pas dans la série D₆.

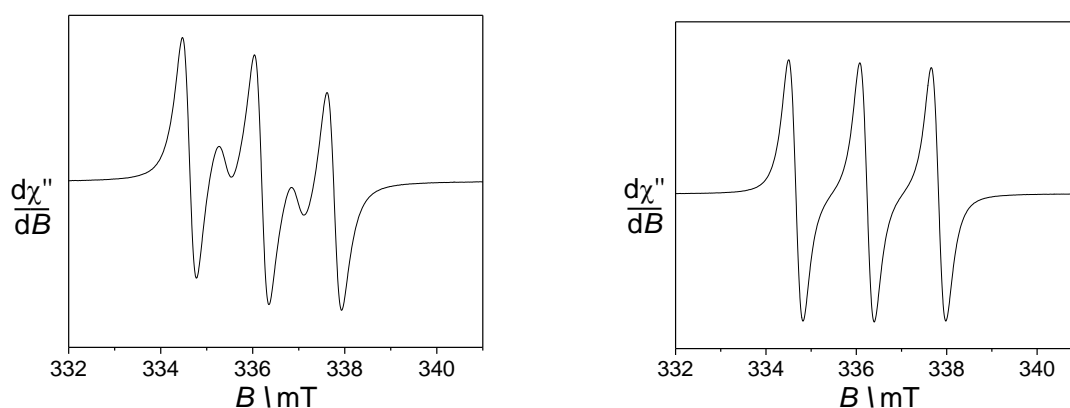


Figure IV-14 : Spectres RPE en bande X du complexe [Yb.D₅]³⁺ (gauche) et du complexe [Yb.D₆]³⁺ (droite) en solution dans MeCN à 0,5 mM à T = 293K. Fréquence micro-onde : 9,42 GHz ; puissance : 3,5 mW ; modulation d'amplitude : 0,2 mT, modulation de fréquence : 100 KHz.

Les spectres RPE des complexes ont ensuite été enregistrés à des températures comprises entre 7 et 21 K. A 20 K, le complexe [Yb.D₅]³⁺ présente trois raies fines et anisotropes centrées à $g_{iso} = 2,00$ (340-348 mT) qui correspondent à la signature du radical nitroxyde (Figure IV-15). A 10 K, (Figure IV-15, gauche) des épaulements apparaissent (élargissement) à la fois à haut champ (350-355 mT) et bas champ (330-335 mT). L'explication la plus probable pour la présence de ce signal est un couplage magnétique entre les nitroxydes et le métal. Le fait qu'il n'apparaisse qu'à très basse température suggère que l'état de spin associé est l'état fondamental et que le couplage est très faible. La faible résolution combinée au faible écart d'énergie ne permet pas d'aller plus loin dans l'interprétation du spectre. Le spectre RPE du complexe [Yb.D₆]³⁺ présente quant à lui un signal du nitroxyde seul très bien défini sur la même gamme de température, laissant penser que l'interaction entre les nitroxydes ou avec le métal est encore plus faible et non influencé par une quelconque dynamique.

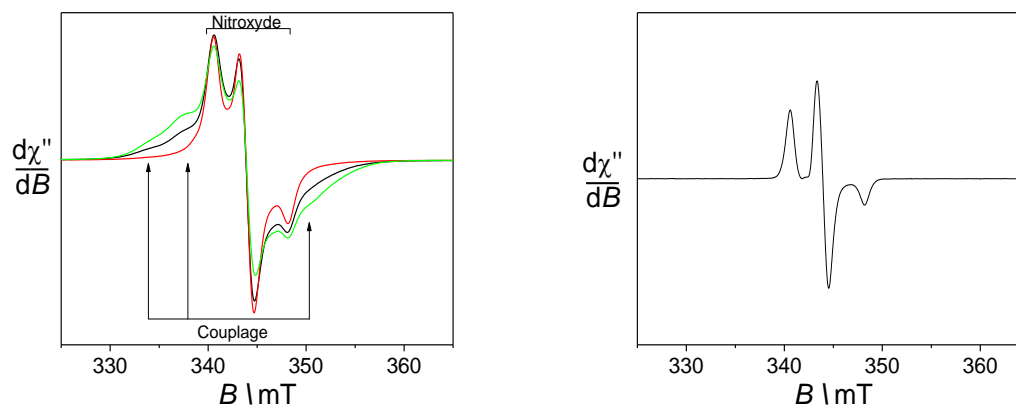


Figure IV-15 : Spectres RPE en bande X du complexe $[Yb.D_5]^{3+}$ (gauche) et $[Yb.D_6]^{3+}$ (droite) en solution aqueuse à 0,45 mM contenant 10% de glycérol à 10K (pour toutes les courbes). Fréquence micro-onde : 9,63 GHz ; puissance : 0,8 mW ; modulation d'amplitude : 0,4 mT, modulation de fréquence : 100 KHz.

Après addition d'ascorbate de sodium, les fonctions nitroxydes sont réduites en hydroxylamines et une extinction des bandes est observée dans la région 310-380 mT. On observe l'apparition de résonances à $g = 5,47$ (128 mT), $4,35$ (160 mT) et $3,60$ (185 mT) pour le complexe $[Yb.D_5]^{3+}$. Ces 3 signaux sont corrélés à l'abondance naturelle des isotopes paramagnétiques de l' Yb^{3+} (^{170}Yb , ^{173}Yb et ^{171}Yb) confirmant cette attribution^[126] (Figure IV-16). Le complexe $[Yb.D_6]^{3+}$ montre un signal moins défini à $g = 5,41$ (126 mT) mais toujours dans la gamme attendue pour l'ion $Yb(III)$.

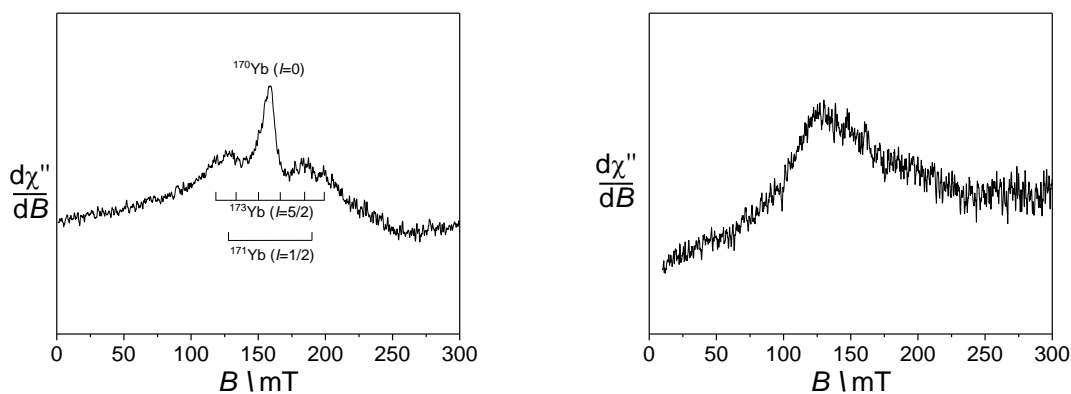


Figure IV-16 : Spectres RPE en bande X du complexe $[Yb.D_5]^{3+}$ à 8K (gauche) et $[Yb.D_6]^{3+}$ à 6K (droite) dans une solution aqueuse à 0,45 mM contenant 10% de glycérol. Fréquence micro-onde : 9,63 GHz ; puissance : 20 mW (gauche) 0,2 mW (droite); modulation d'amplitude : 0,4 mT, modulation de fréquence : 100 KHz.

IV.5.2.2 Complexe de gadolinium

Le spectre du complexe de gadolinium $[Gd.D_5]^{3+}$ en solution isotrope présente les 3 bandes caractéristiques du radical nitroxyde à $g_{iso} = 2,006$ ($A_N = 0,31$ mT) avec une intensité plus faible que le signal du ligand seul. Une résonance large se superpose au signal du nitroxyde (largeur de pic à pic de 12,3 mT, $g_{iso} = 1,98$) qui est attribué au cation Gd^{3+} . La valeur de g est identique à celle obtenu pour le complexe $[Gd.D_1]^{3+}$ mais avec une résonance 4 fois plus

importante. Elle est observable à température ambiante, ce qui suggère une relaxation moins rapide du métal.

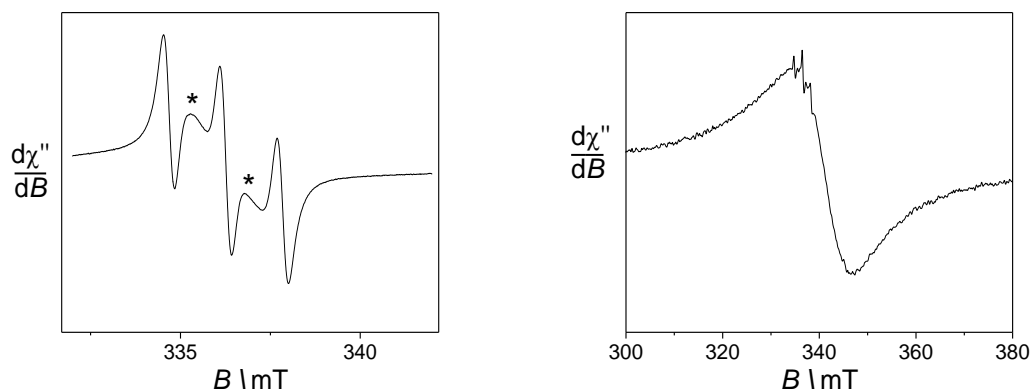


Figure IV-17 : Spectres RPE en bande X en solution aqueuse du complexe $[Gd.D_5]^{3+}$ à $T = 293K$ à 0,5 mM (gauche) et après réduction à 5 mM (droite). Fréquence micro-onde : 9,42 GHz ; puissance : 3,5 mW (gauche), 17 mW (droite) ; modulation d'amplitude : 0,2 mT (gauche), 0,4 mT (droite) ; modulation de fréquence : 100 KHz. * = composante associée à une interaction magnétique.

IV.5.2.3 Complexe de dysprosium

Le spectre RPE du complexe $[Dy.D_5]^{3+}$ à 8K montre un signal distinct de celui d'un radical nitroxyde libre dans la fenêtre 300-400 mT. Outre le signal à trois raies caractéristique dans la gamme 340-348 mT, des raies satellites sont clairement visibles sur un domaine qui s'étend sur environ 90 mT. Elles sont l'indication d'un couplage radical/ Ln^{3+} . Cette fenêtre est plus large que dans le cas de $[Yb.D_5]^{3+}$, nous indiquant une influence différente du lanthanide sur le radical nitroxyde. Même à 8 K le spectre contient une composante nitroxyde et de l'espèce couplée, ce qui signifie que le couplage magnétique est faible. Après réduction, le signal dans la fenêtre 300-400 mT disparaît presque entièrement, signe que le radical se réduit. Une résonance plus intense est alors observée à $g_{eff} \approx 11,3$, valeur caractéristique d'un complexe isolé de Dy^{3+} (Figure IV-18, droite)^[153].

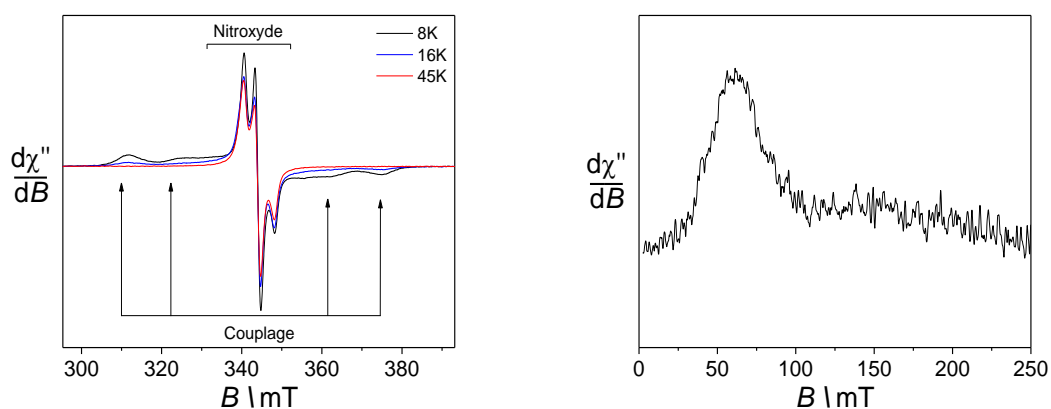


Figure IV-18 : Spectres RPE en bande X du complexe $[Dy.D_5]^{3+}$ en solution dans une solution aqueuse à 0,45 mM contenant 10% de glycérol. Evolution de la température de 8K à 45K. Avant addition d'ascorbate (gauche) et après addition de deux équivalents d'ascorbate à 8K (droite). Fréquence micro-onde : 9,63 GHz ; puissance : 0,2 mW (gauche), 2 mW (droite) ; modulation d'amplitude : 0,4 mT, modulation de fréquence : 100 KHz.

IV.5.2.4 Complexes d'euporium

Le spectre RPE des complexes d'euporium $[\text{Eu.D}_5]^{3+}$ et $[\text{Eu.D}_6]^{3+}$ présente un signal typique d'un radical nitroxyde isolé à 6K. L'absence d'interaction magnétique entre l'euporium et le nitroxyde n'est pas surprenante compte tenu du moment magnétique très faible de l'euporium (III) et des résultats obtenus pour les autres séries (cf annexe RPE). Comme pour les autres complexes de lanthanides de cette série, les deux raies centrales sont présentes et peu intenses dans le complexe $[\text{Eu.D}_5]^{3+}$ et sont absentes dans le cas du complexe $[\text{Eu.D}_6]^{3+}$. Une étude de saturation en puissance a été réalisée sur le complexe de gadolinium $[\text{Gd.D}_5]^{3+}$ et le ligand D_5 qui a été utilisé comme composé de référence. L'analyse de l'intensité du signal en fonction de la racine de la puissance appliquée fait apparaître un régime linéaire, signifiant que les mesures sont réalisées en conditions non saturantes (Figure IV-19).

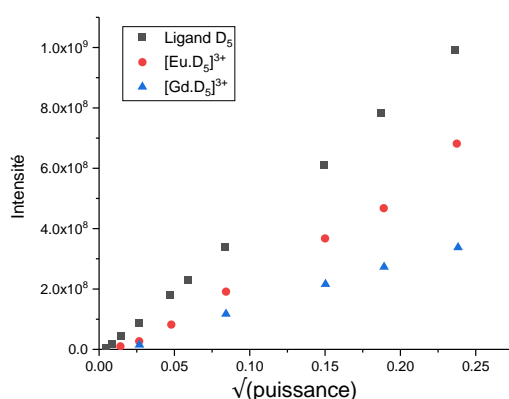


Figure IV-19 : Test de saturation pour vérifier la condition de non saturation. En noir : ligand D_5 , en rouge : $[\text{Eu.D}_5]^{3+}$, en bleu : $[\text{Gd.D}_5]^{3+}$.

L'analyse des spectres RPE indique donc qu'une interaction entre les nitroxydes est bien présente dans les complexes de la série $[\text{Ln.D}_5]^{3+}$ qui se manifeste par l'apparition de résonances centrales. Les spectres RPE de la série $[\text{Ln.D}_6]^{3+}$ ne montrent pas un tel effet (absence des résonances centrales). Une hypothèse est l'éloignement des fonctions nitroxydes dans l'espace^[154]. L'interaction entre les groupements fluorés et le π -stacking pourraient être à l'origine d'un blocage éloignant les nitroxydes (Figure IV-20) et contribuant à affaiblir considérablement le couplage magnétique.

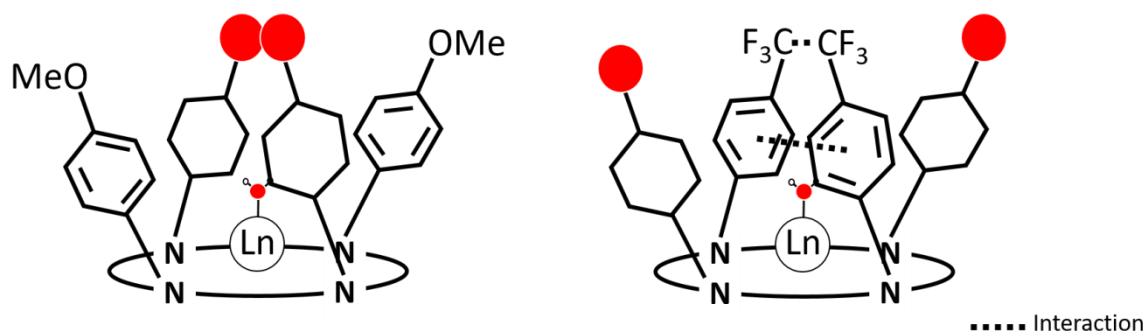


Figure IV-20 : Représentation schématique des deux séries de complexes $[\text{Ln.D}_5]^{3+}$ (gauche) et $[\text{Ln.D}_6]^{3+}$ (droite). Les points rouges représentent les nitroxydes. $\text{Ln} = \text{Yb}^{3+}, \text{Eu}^{3+}$ (pour les D_5 et D_6) et $\text{Gd}^{3+}, \text{Dy}^{3+}$ (uniquement pour D_5).

IV.6 SPECTROSCOPIE CEST DES COMPLEXES

Les complexes de la famille [Ln.D₅]³⁺ et [Ln.D₆]³⁺ comportent 4 types de protons échangeables pouvant être à priori observés (Figure II-53) :

- les protons des fonctions **acétamides**,
- le proton de la fonction **acétamide** portant l'unité TEMPO,
- de la **molécule d'eau** coordonnée au métal,
- après réduction, le **proton de la fonction hydroxylamine** peut être détecté.

L'étude de l'activité CEST a été réalisée dans un mélange H₂O:CD₃CN afin d'assurer une solubilité suffisante de nos complexes et de pouvoir comparer les effets avec les complexes des séries précédentes.

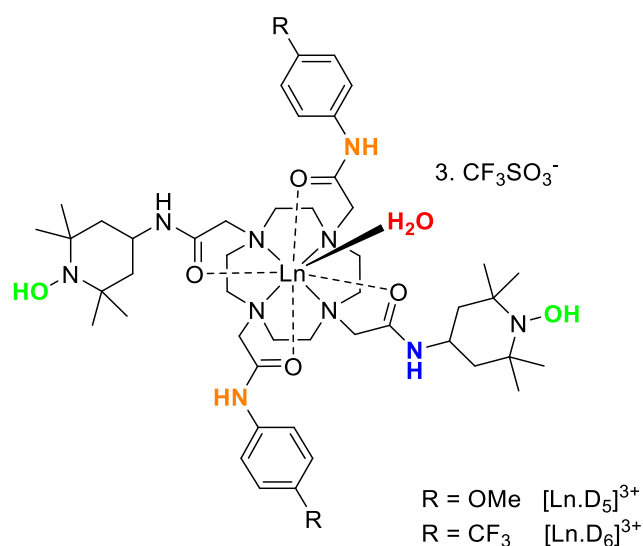


Figure IV-21 : Protons échangeables potentiellement visibles en CEST.

IV.6.1 Spectroscopie CEST des complexes d'euprium

Le spectre CEST du complexe [Eu.D₅]³⁺ est présenté dans la Figure IV-22. Sous sa forme isolée radicalaire, il présente un pic d'eau symétrique ainsi qu'un signal CEST à 46 ppm avec une intensité de l'ordre de 4%. Après réduction des fonctions nitroxydes en hydroxylamines par l'ascorbate, le signal à 46 ppm gagne en intensité et atteint une intensité de 30%. Cette valeur est plus de deux fois supérieure aux séries [Ln.D₁]³⁺ et [Ln.D₂]³⁺. Le déplacement chimique de 46 ppm suggère que le signal provient de l'échange des protons de la molécule d'eau coordonnée à l'euprium. A nouveau, le paramagnétisme du ligand sous forme oxydée tend à éteindre l'effet CEST.

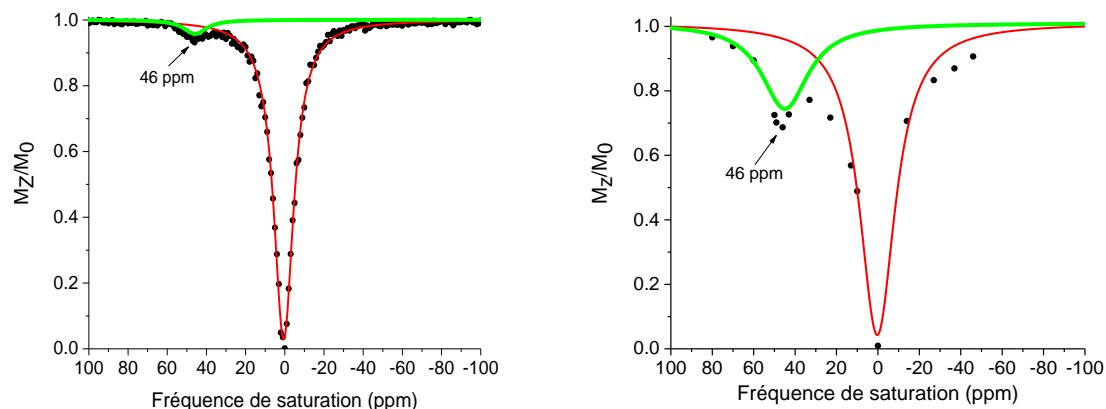


Figure IV-22 : Spectres CEST d'une solution à 20 mM de $[\text{Eu.D}_5]^{3+}$ sous ses formes oxydée (gauche) et réduite (droite) en utilisant 2 équivalents d'ascorbate de sodium. Spectres enregistrés à 11,7 T, 298 K, dans un mélange $\text{H}_2\text{O}:\text{CD}_3\text{CN}$ (2:1), $[\text{HEPES}] = 0,07\text{M}$ à pH 7,4, $B_1 = 25 \mu\text{T}$ et un temps d'irradiation de 4 s.

Le complexe $[\text{Eu.D}_5]^{3+}$ possède donc un effet CEST important après réduction et la différence entre le signal du complexe sous forme radicalaire et réduite est appropriée pour envisager son utilisation en tant que sonde rédox. La vitesse d'échange de la molécule d'eau coordonnée au métal peut être sensible à la température, c'est pourquoi une étude de l'activité CEST à différentes températures a été effectuée. L'augmentation de la température de 15°C à 25°C montre une augmentation de l'effet CEST de 10% à environ 30%. L'augmentation de la température de 25°C à 37 °C puis 45°C montre une diminution de l'effet CEST d'environ 30% à environ 18%. Pour les températures les plus élevées, un élargissement du signal est observé (Figure IV-23).

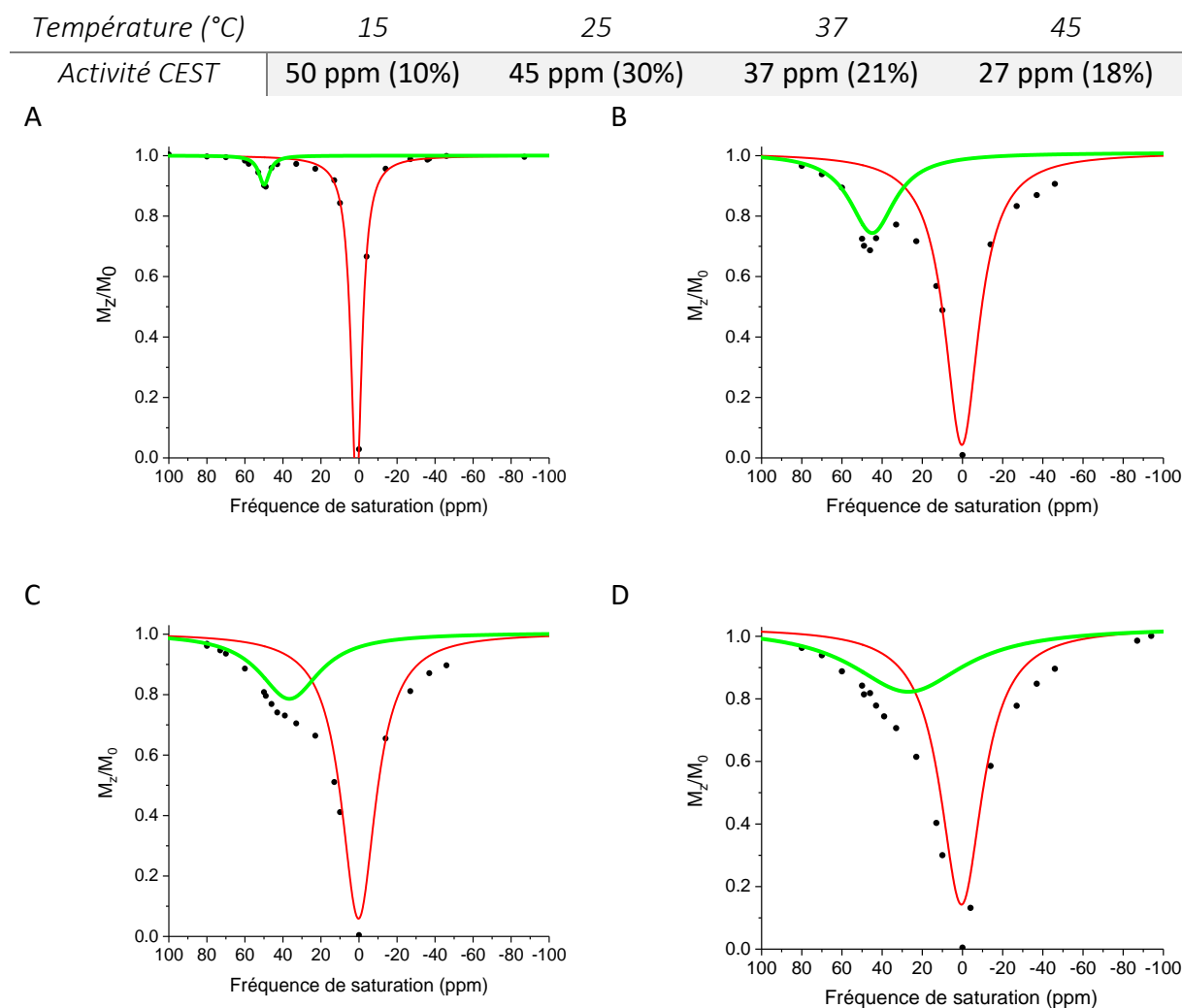


Figure IV-23 : Spectres CEST du complexe $[Eu.D_5]^{3+}$ sous sa forme réduite à 20 mM avec 2 équivalents d'ascorbate de sodium. Spectres enregistrés à 11,7 T, 298 K, dans un mélange $H_2O:CD_3CN$ (2:1), $[HEPES] = 0,07M$ à pH 7,4, $B_1 = 19 \mu T$, et un temps d'irradiation de 4 s en fonction de la température, A=15°C, B=25°C, C=37°C, D=45°C.

Cette variation de l'effet CEST peut venir d'une différence de vitesse d'échange de la molécule d'eau en fonction de la température. La vitesse d'échange peut être estimée en utilisant une technique appelée « oméga-plot » et qui analyse l'intensité du signal CEST en fonction de la puissance de l'irradiation appliquée^[130]. Les résultats obtenus (Tableau IV-E) montrent que la vitesse d'échange augmente lorsque la température augmente. Le maximum d'effet CEST de 30% est obtenu lorsque le taux de résidence de la molécule d'eau est d'environ 380 μs . Cette valeur est environ deux fois plus importante que la valeur obtenue par D. Sherry *et al.*^[105] pour des complexes d'euporium comportant des unités nitroxydes.

Chapitre 4

Tableau IV-E : Mesure des vitesses d'échange de la molécule d'eau coordonnée au complexe $[\text{Eu.D}_6]^{3+}$ en fonction de la température.

| Température (°C) | Vitesse d'échange (s^{-1}) | Temps de résidence τ_M (μs) | $1 - (M_z/M_0)$ Activité CEST |
|------------------|---------------------------------------|---|----------------------------------|
| 15 | 2450 | 410 | 10 % |
| 25 | 2650 | 380 | 30 % |
| 37 | 3270 | 310 | 21 % |

Le spectre CEST du complexe $[\text{Eu.D}_6]^{3+}$ est présenté dans la Figure IV-24. Sous sa forme radicalaire, il présente un pic d'eau symétrique. Aucun signal CEST n'est clairement visible sur la gamme -100 à +100 ppm. Après réduction des fonctions nitroxydes en hydroxylamines par l'ascorbate, le pic de l'eau devient asymétrique, avec un épaulement aux alentours de 40 ppm. Le déplacement chimique de 40 ppm suggère que ce signal provient de l'échange des protons des molécules d'eau coordonnées à l'euprium mais il est difficile de quantifier précisément l'effet CEST.

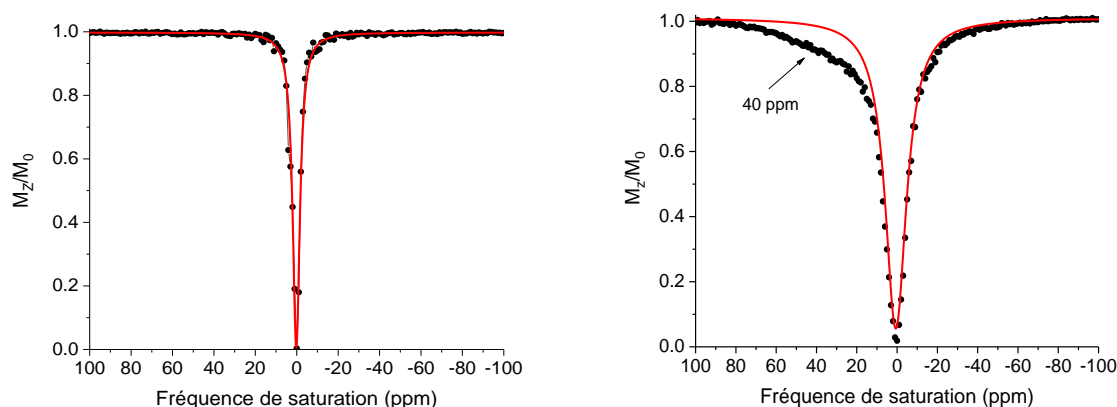


Figure IV-24 : Spectres CEST d'une solution à 20 mM de $[\text{Eu.D}_6]^{3+}$ sous ses formes oxydée (gauche) et réduite (droite) en utilisant 2 équivalents d'ascorbate de sodium. Spectres enregistrés à 11,7 T, 298 K, dans un mélange $\text{H}_2\text{O}:\text{CD}_3\text{CN}$ (2:1), $[\text{HEPES}] = 0,07\text{M}$ à pH 7,4, temps d'irradiation = 4 s. Spectres enregistrés à différentes puissances B_1 (A = forme oxydée à 25 μT , B = forme réduite à 19 μT).

Nous avons également réalisé une étude à température variable sur le complexe $[\text{Eu.D}_6]^{3+}$ (Figure IV-25). Le maximum d'effet CEST a été observé lorsque la température atteint 37°C avec un signal à 40 ppm et une activité de 12%. Ce signal bien défini à 37°C suggère qu'à cette température la vitesse d'échange est optimale. L'analyse par « oméga-plot » à 37°C donne une valeur de vitesse d'échange d'environ 4000 s^{-1} soit un temps de résidence de la molécule d'eau de 250 μs . Ce temps de résidence est inférieur à celui obtenu pour le précédent complexe d'euprium mais cohérent avec ce qui est attendu pour un complexe possédant des groupements inductifs attracteurs^[53].

Une telle dépendance de l'effet CEST a déjà été observée et utilisée dans la littérature pour créer des sondes de température^[49,155,156]. Il est probable que le caractère fluorophile du groupement CF_3 et le π -stacking des cycles benzènes contribuent à former une cage autour du métal^[49]. La molécule d'eau coordonnée est alors retenue dans cette cage, modifiant sa vitesse d'échange avec l'eau environnante externe. Lorsque la température augmente,

l'énergie thermique surpasse les interactions fluorées et le π -stacking et permet à nouveau à la molécule d'eau coordonnée de s'échanger avec l'eau environnante (Figure IV-26).

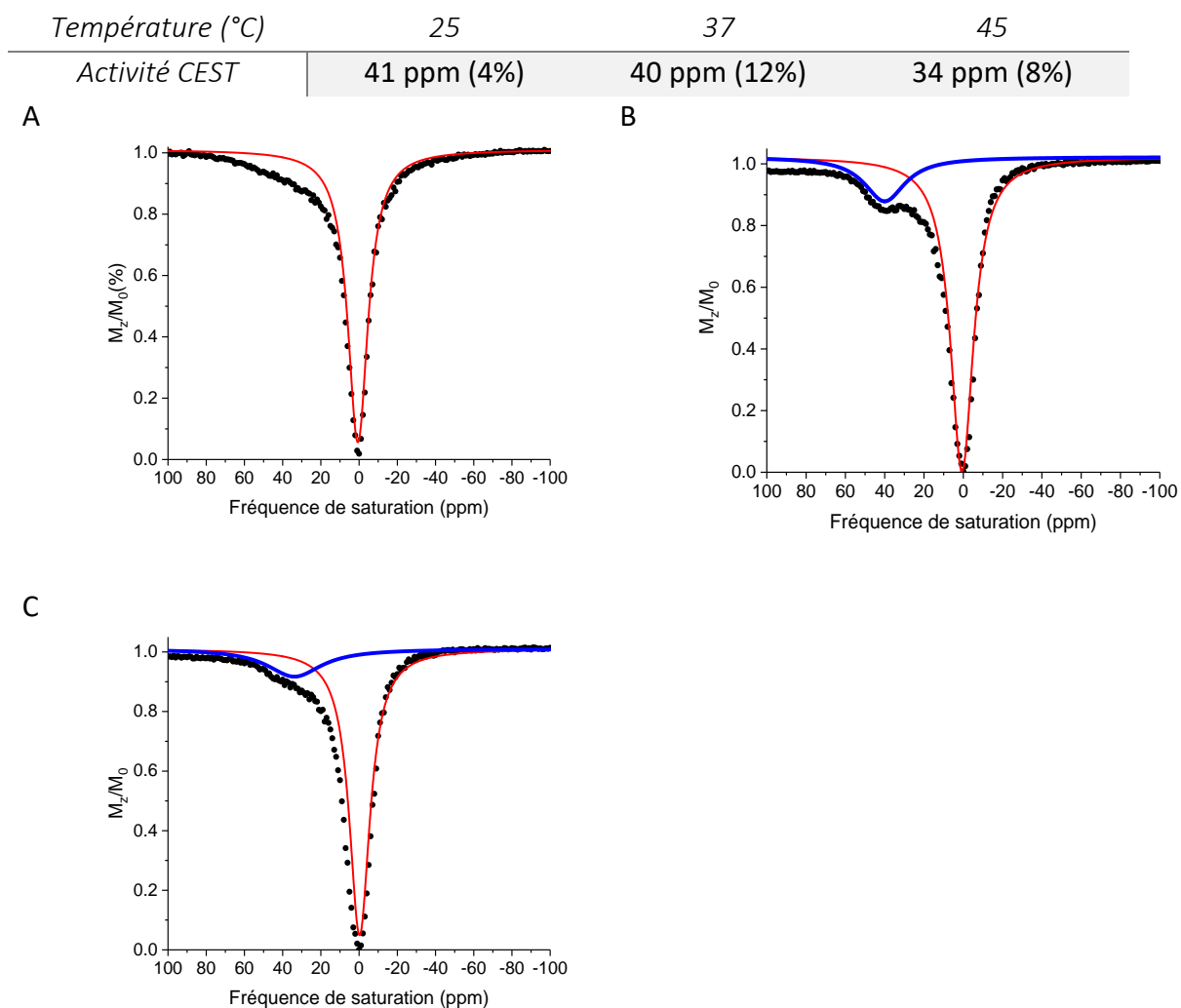


Figure IV-25 : Spectres CEST d'une solution à 20 mM de $[Eu.D_6]^{3+}$ sous forme réduite en utilisant 2 équivalents d'ascorbate de sodium. Spectres enregistrés à 11,7 T dans un mélange $H_2O:CD_3CN$ (2:1), $[HEPES] = 0,07M$ à pH 7,4, $B_1 = 19 \mu T$, et un temps d'irradiation de 4 s. Spectres enregistrés à différentes températures (A = 25°C, B = 37°C, C = 45°C).

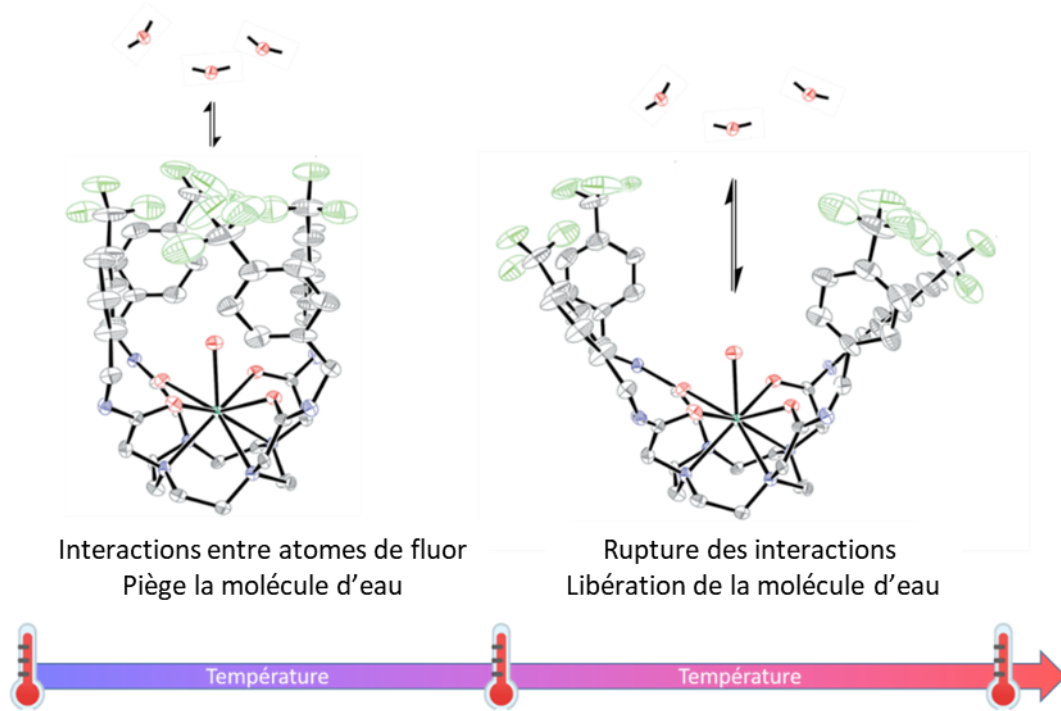


Figure IV-26 : Image adaptée du complexe d'europium issu de la référence^[49]. En vert : atome de fluor, en gris : atome de carbone, en rouge : atome d'oxygène, en bleu : atome d'azote.

IV.6.2 Spectroscopie CEST des complexes d'ytterbium

Le spectre CEST du complexe $[Yb.D_5]^{3+}$ est présenté dans la figure IV-30. Sous sa forme réduite, le spectre CEST montre deux signaux à -10 et -20 ppm. L'intensité du premier signal situé aux alentours de -10 ppm évolue de 4% à 5 μT (gauche, Figure IV-27) à près de 12% à 19 μT (droite, Figure IV-27). L'intensité du deuxième signal situé aux alentours de -20 ppm augmente d'environ 2% à 5 μT à près de 5% à 19 μT . Lorsque la puissance de l'onde B_1 augmente, les signaux sont élargis par phénomène « d'off-résonance » et sont ainsi englobés par le signal de l'eau.

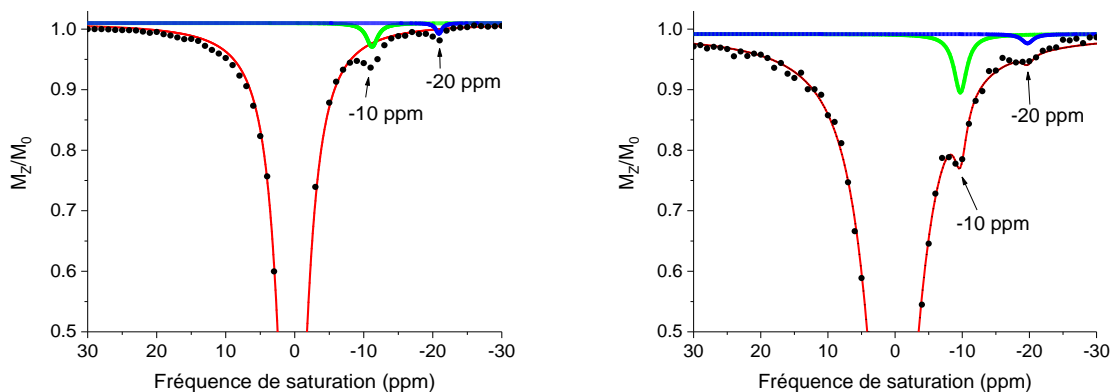


Figure IV-27 : Spectres CEST d'une solution à 20 mM de $[Yb.D_5]^{3+}$ sous forme réduite en utilisant 2 équivalents d'ascorbate de sodium. Spectres enregistrés à 11,7 T dans un mélange $H_2O:CD_3CN$ (2:1), $[HEPES] = 0,07M$ à pH 7,4, temps d'irradiation = 4 s, à différentes puissances $B_1 = 5 \mu T$ (gauche) et 19 μT (droite).

Dans la littérature, des déplacements chimiques très proches ont été observés pour des fonctions acétamides portées par des complexes d'ytterbium tétraamides (Figure IV-28)^[111]. On peut donc proposer que les signaux à -10 et -20 ppm proviennent des protons des fonctions acétamides du complexe [Yb.D₅]³⁺.

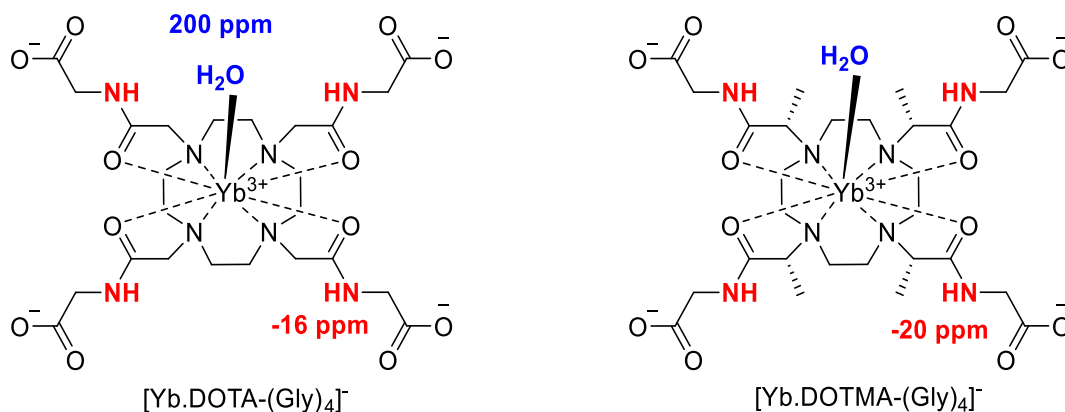


Figure IV-28 : Complexes [Yb(DOTA-(Gly)₄)]⁻ et [Yb(DOTMA-(Gly)₄)]⁻ montrant une activité CEST à -16 et -20 ppm respectivement provenant des protons des fonctions acétamides^[111].

Le spectre CEST du complexe [Yb.D₆]³⁺ est présenté dans la Figure IV-29. Sous sa forme radicalaire, il présente un pic d'eau symétrique. Aucun signal CEST n'est clairement visible sur la gamme -100 à +100 ppm. Après réduction des fonctions nitroxydes en hydroxylamines par l'ascorbate, une asymétrie du pic de l'eau est observée. La faible dissymétrie et sa superposition sous le signal de l'eau ne permet pas d'affirmer qu'il s'agit bien d'un signal CEST et pas un artéfact expérimental.

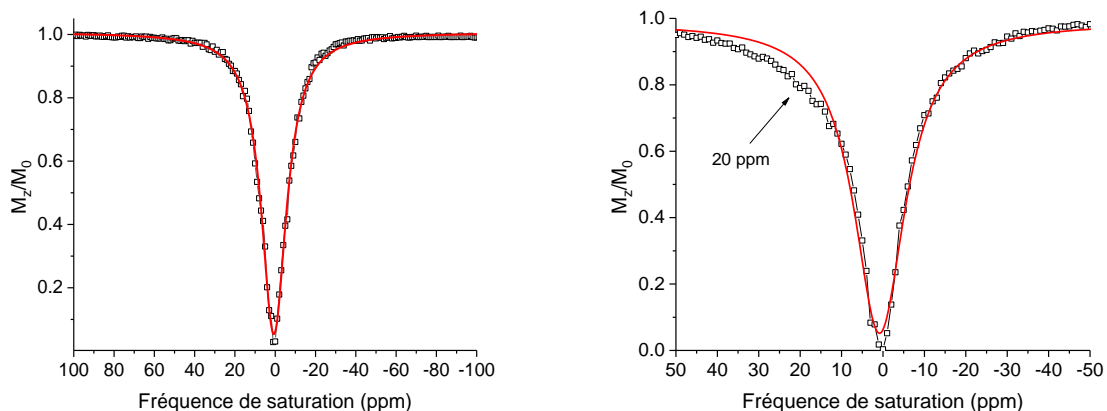


Figure IV-29 : Spectres CEST d'une solution à 20 mM de [Yb.D₆]³⁺ sous ses formes oxydée (gauche) et réduite (droite) en utilisant 2 équivalents d'ascorbate de sodium. Spectres enregistrés à 11,7 T dans un mélange H₂O:CD₃CN (2:1), [HEPES] = 0,07M à pH 7,4, B₁ = 25 μT (gauche) et 19 μT (droite), temps d'irradiation = 4 s.

On peut donc dire que certains complexes ces deux séries présentent des signaux CEST provenant de la molécule d'eau coordonnée au centre métallique ou des protons des fonctions acétamides, avec des intensités atteignant 30%. Ces complexes présentent l'activité CEST la plus importante après réduction des fonctions nitroxydes en hydroxylamines. L'effet CEST peut donc être modulé par l'état rédox du complexe.

Il nous a enfin paru intéressant de mesurer le temps de relaxation longitudinal T_1 de nos complexes. En effet, le paramagnétisme induit par les électrons non appariés des nitroxydes portés par le ligand influence le temps de relaxation du complexe. Le temps de relaxation longitudinal T_1 peut être mesuré par une méthode de récupération d'inversion standard et les valeurs sont regroupées dans le Tableau IV-F. Les tendances sont les suivantes :

- La forme radicalaire des différents complexes montre des T_1 courts, inférieurs à 0,26s.
- La forme réduite des différents complexes montre des T_1 élevés qui atteignent des valeurs jusqu'à 2,24 s.

Qualitativement on remarque que les composés le plus actifs en CEST sont ceux qui, sous la forme hydroxylamine, présentent le T_1 le plus élevé (relaxation la plus lente après l'impulsion de la radiofréquence).

Tableau IV-F : Résumé de l'activité CEST et des temps de relaxation T_1 des différents complexes à 11,7 T (500 MHz) à 298K^a et à 310K^b dans un mélange H₂O:CD₃CN (2:1), [HEPES] = 0,07M à pH 7,4.

| Complexe | T_1^{OX} (s) | T_1^{RED} (s) | Activité CEST |
|--|----------------|-----------------|--|
| [Eu.D ₅] ³⁺ (20 mM) | 0,07 ± 0,01 | 1,94 ± 0,12 | 46 ppm (30%) ^a |
| [Yb.D ₅] ³⁺ (20 mM) | 0,13 ± 0,01 | 1,71 ± 0,02 | -10 ppm (12%), -20 ppm (5%) ^a |
| [Dy.D ₅] ³⁺ (20 mM) | 0,26 ± 0,02 | 0,74 ± 0,04 | - |
| [Eu.D ₆] ³⁺ (20 mM) | 0,16 ± 0,01 | 2,24 ± 0,06 | 40 ppm (12%) ^b |
| [Yb.D ₆] ³⁺ (20 mM) | 0,12 ± 0,01 | 1,80 ± 0,04 | Epaulement ^a |

IV.7 CYTOTOXICITE DES COMPLEXES

La toxicité des composés issus des séries D₅ et D₆ a été évaluée uniquement pour les complexes d'euporium qui sont les plus intéressants d'un point de vue CEST. Elle a été évaluée sur des lignées cellulaires M21. Afin de pallier aux problèmes de solubilité, un mélange d'eau et de 2% de DMSO a été utilisé. Les cations lanthanides étant chimiquement proches, nous supposons que les résultats obtenus sont extrapolables aux autres complexes des ligands D₅ et D₆. Les cellules ont été incubées avec des solutions de complexes à différentes concentrations (1-40 μ M) avec des temps d'incubations de 24h, 48h et 72h. La viabilité des cellules en présence des complexes est présentée dans la Figure II-64 ci-dessous. Les complexes [Eu.D₅]³⁺ et [Eu.D₆]³⁺ ne présentent qu'une cytotoxicité négligeable, même après 72h d'incubation et avec une concentration en complexe de 40 μ M (Figure II-64).

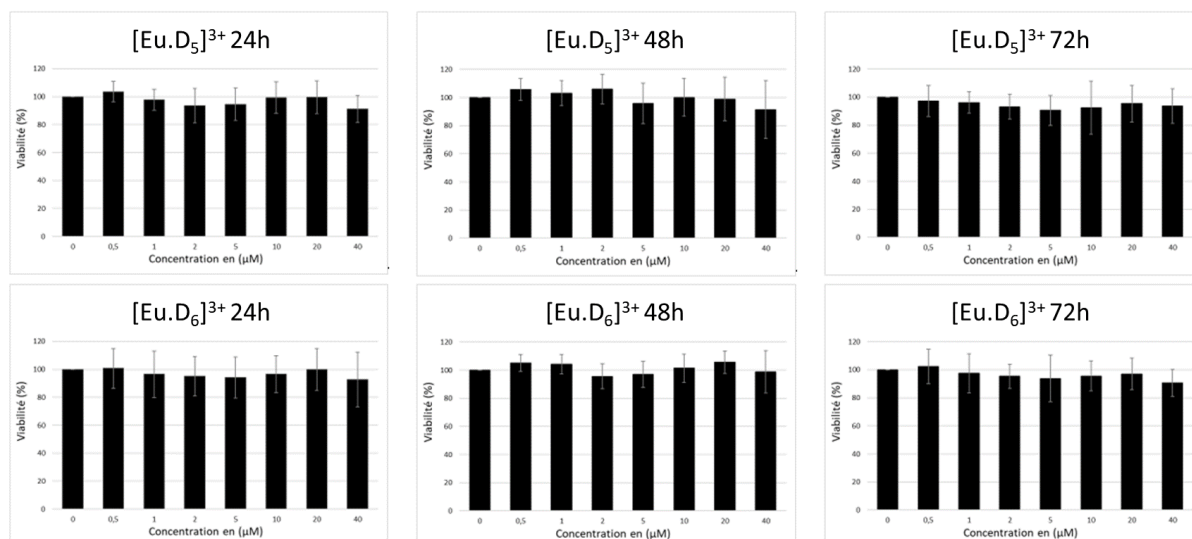


Figure IV-30 : Résultats des tests MTT sur les complexes d'europium représentatifs des séries de complexes [Ln.D₅]³⁺ et [Ln.D₆]³⁺.

IV.8 BILAN ET PERSPECTIVES

Dans ce quatrième chapitre nous avons synthétisé et caractérisé des ligands et des complexes basés sur une structure cyclène symétrique fonctionnalisée avec deux fonctions phénylacétamides et deux fonctions rédox actives. L'objectif étant d'évaluer l'impact de la symétrie du ligand et d'augmenter l'activité en CEST.

La luminescence des complexes d'europium a montré qu'une molécule d'eau était vraisemblablement coordonnée au métal dans les deux séries de complexes et que la symétrie autour du métal est semblable.

De nombreux signaux en CEST ont pu être identifiés dans ces deux séries de complexes sous leur forme réduite. Les complexes d'europium montrent une activité provenant de la molécule d'eau coordonnée au métal ou des protons des fonctions acétamides. Le complexe [Eu.D₅]³⁺ montre une activité importante à 25°C tandis que le complexe [Eu.D₆]³⁺ montre une activité importante à 37°C. Cette différence semble provenir d'interactions fluorées et de π -stacking qui piègent la molécule d'eau à 25°C. Lorsque la température augmente, ces interactions se rompent et la molécule d'eau se trouve libérée. Cette dépendance pourrait donc être utilisée comme sonde thermométrique.

Nous avons donc montré que les complexes symétriques portant deux fonctions phénylacétamides et deux unités rédox présentent une activité CEST relativement importante. Cependant la faible solubilité des complexes dans les solvants aqueux reste un frein à leur utilisation en tant que sondes biologiques.

Complexe symétrique intégrant une antenne redox-active : D₇

V. CHAPITRE 5 : COMPLEXES SYMETRIQUES

INTEGRANT UNE ANTENNE REDOX-ACTIVE : D₇

| | | |
|-----------|---|-----|
| V.1 | DESIGN DES COMPLEXES [Ln.D ₇] ³⁺ | 183 |
| V.2 | SYNTHESE DES LIGANDS ET DES COMPLEXES | 184 |
| V.2.1 | <i>Synthèse des précurseurs</i> | 185 |
| V.2.1.1 | Synthèse de la pyridine fonctionnalisée | 185 |
| V.2.1.2 | Synthèse du sel de la bishydroxylamine (55)..... | 186 |
| V.2.2 | <i>Synthèse du ligand D₇</i> | 187 |
| V.2.2.1 | Analyse RPE du ligand D ₇ et de ses produits d'oxydation..... | 187 |
| V.2.2.1.1 | Oxydation en milieu aqueux..... | 188 |
| V.2.2.1.2 | Oxydation dans le méthanol | 189 |
| V.2.3 | <i>Formation des complexes</i> | 190 |
| V.2.3.1 | Signal RPE dans les complexes de lanthanides | 190 |
| V.2.3.2 | Etudes des ligands et complexes par électrochimie..... | 192 |
| V.3 | ETUDES DU LIGAND ET DES COMPLEXES PAR SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION ET LUMINESCENCE..... | 192 |
| V.3.1 | <i>Spectroscopie d'absorption UV-Vis</i> | 192 |
| V.3.2 | <i>Spectroscopie de luminescence</i> | 194 |
| V.3.2.1 | Photoluminescence du complexe d'euprium | 194 |
| V.3.2.2 | Détermination du nombre de molécules de solvant coordonnées | 195 |
| V.3.2.2.1 | Luminescence dans l'eau..... | 195 |
| V.3.2.2.2 | Luminescence dans le méthanol | 196 |
| V.3.2.3 | Photoluminescence du complexe d'ytterbium..... | 197 |
| V.4 | ETUDE DE L'ACTIVITE CEST DES COMPLEXES | 198 |
| V.4.1 | <i>Temps de relaxation</i> | 198 |
| V.4.2 | <i>Spectres CEST sur la série Ln.D₇³⁺</i> | 198 |
| V.5 | BILAN ET PERSPECTIVES | 200 |

V.1 DESIGN DES COMPLEXES [Ln.D₇]³⁺

Nous nous sommes intéressés dans les chapitres précédents au radical nitroxyde : le TEMPO. Dans la littérature, il existe de nombreux exemples de dérivés de nitroxydes. Les nitronyl nitroxydes, par exemple, ont été très utilisés dans le domaine du magnétisme et sont habituellement stables. Cette fonction peut être très intéressante car elle est paramagnétique et connue pour réagir avec certains ROS et RNS (superoxyde par exemple) pour aboutir à un produit diamagnétique^[157].

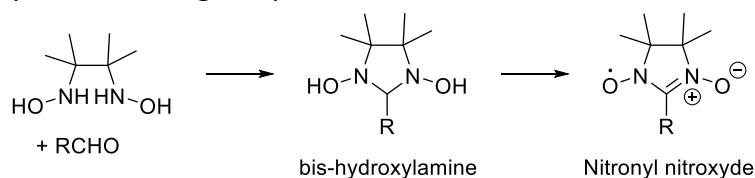


Figure V-1 : Voie de synthèse générale des nitronyl nitroxydes proposée par E. Ullman et al.^[158]

Les nitronyl nitroxydes peuvent également se décomposer en un produit diamagnétique l'iminohydroxylamine en milieu acide (Figure V-2).

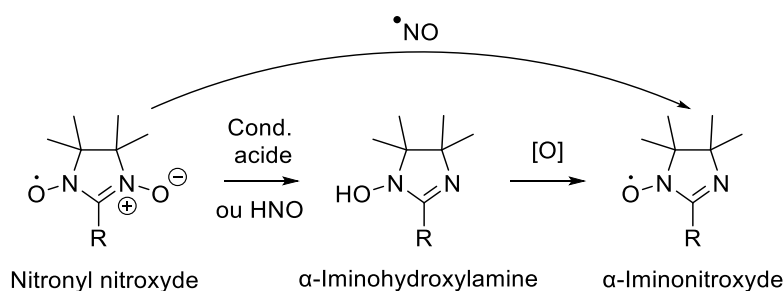


Figure V-2 : Dégradation du nitronyl nitroxyde en α -Imino hydroxylamine.

Des travaux précédemment réalisés au laboratoire ont de plus montré qu'il était possible d'introduire le groupement nitronyl nitroxyde porté par une unité pyridine sur une plateforme DO3A. Un précurseur clé dans la synthèse des nitronyl nitroxydes est la fonction bis-hydroxylamine or cette fonction peut évoluer vers des produits distincts en fonction des conditions expérimentales (Figure V-3). La fonction nitronyl nitroxyde, à la couleur violette caractéristique, est obtenu en oxydant la fonction bis-hydroxylamine avec du périodate de sodium. La fonction iminohydroxylamine peut être obtenue après élimination d'une molécule d'eau de la fonction bis-hydroxylamine. Celle-ci peut dans un second temps être réoxydée en une fonction radicalaire distincte du nitronyl nitroxyde, la fonction iminonitroxyde à la couleur jaune caractéristique. La pyridine qui peut à la fois jouer le rôle d'**antenne** pour sensibiliser le lanthanide et se coordonner pour **rapprocher** le radical du métal et avoir un effet plus important sur ses propriétés.

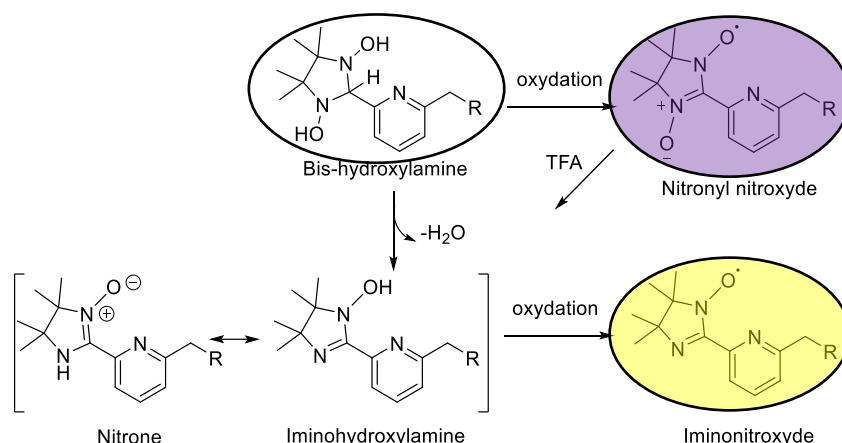


Figure V-3 : Evolution de la fonction bis-hydroxylamine (blanc) en fonction nitronyl nitroxyde (violet) et en fonction iminonitroxyde (jaune).

Le design du ligand D₇ est basé sur la fonctionnalisation d'une plateforme DO2AM par deux fonctions nitronyl nitroxydes ou leur précurseur réduit bis-hydroxylamine (Figure V-1) incorporant chacune une unité pyridine. Le ligand sera alors symétrique et comportera à la fois une antenne et une fonction rédox. Deux fonctions acétamides c'est-à-dire comportant des protons échangeables seront introduites de façon à utiliser cette sonde pour réaliser des mesures CEST (Figure V-4).

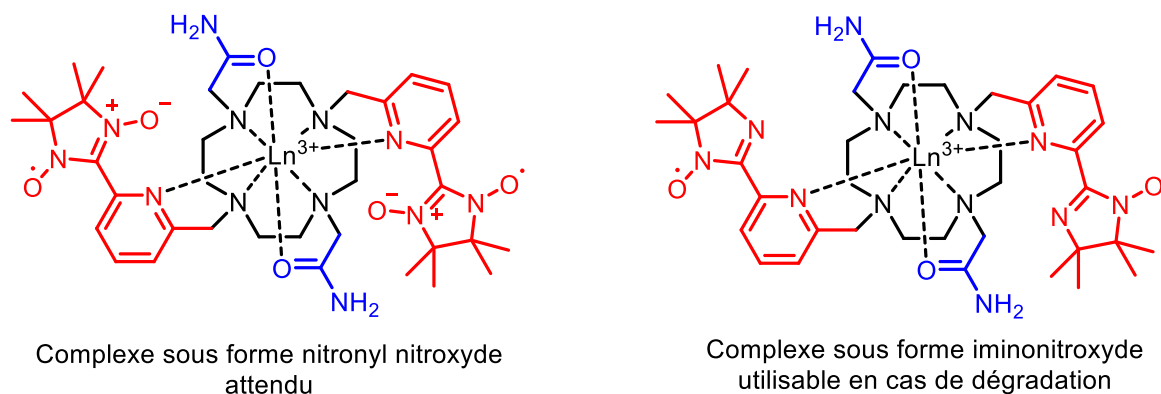


Figure V-4 : Design de cette série de composé symétrique.

V.2 SYNTHÈSE DES LIGANDS ET DES COMPLEXES

La synthèse est basée sur la fonctionnalisation de fonctions portées par des bras pyridines précurseurs de radicaux. Elle est réalisée à partir de la charpente DO2AM dont la fonctionnalisation est plus aisée que celle des cyclènes substitués par des fonctions phénylacétamides (36 et 38). De plus, la solubilité attendue par le ligand D₇ est supérieure à celle des composés D₃ et D₄ du fait de l'absence de fonctions phénylacétamides. Nous allons décrire ci-dessous la synthèse de chacun des précurseurs.

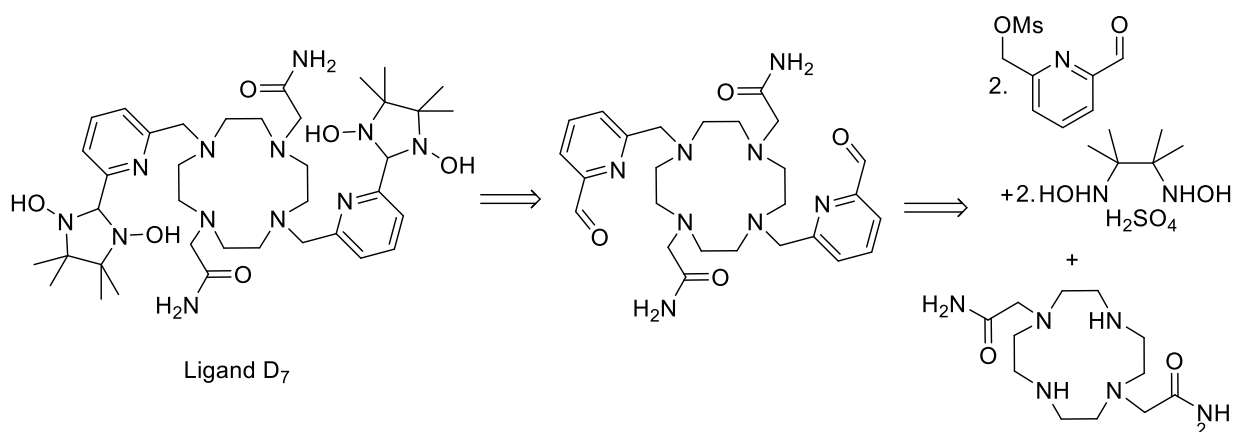


Figure V-5 : Rétrosynthèse menant au ligand D₇.

V.2.1 Synthèse des précurseurs

V.2.1.1 Synthèse de la pyridine fonctionnalisée

La voie de synthèse développée pour accéder à la pyridine fonctionnalisée comporte une étape initiale d'oxydation de la 2,6-bis(hydroxyméthyl)pyridine (50) (Figure V-6). En utilisant 0,5 équivalent de dioxyde de sélénium dans le dioxane, le 6-(hydroxyméthyl)-2-pyridinecarboxaldehyde (51) est obtenu et le brut est engagé sans purification supplémentaire pour l'étape suivante.

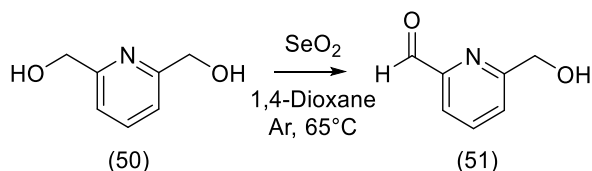


Figure V-6 : Voie de synthèse optimisée.

Deux types de groupements partants peuvent être introduits sur la pyridine : un atome de chlore ou un groupement mésyle (Figure V-7). L'étape de chloration est réalisée en utilisant du chlorure de thionyle et mène au produit (52) avec un rendement de 40% sur les deux étapes. L'étape de mésylation est réalisée en utilisant le chlorure de mésyle et mène au produit (53) avec un rendement de 39% sur deux étapes. Les étapes de substitution sur le cyclène (étapes suivantes) se sont avérées plus rapides et plus efficaces avec (53) qu'avec (52). Ces résultats s'expliquent par le fait que le mésyle est un meilleur groupe partant. Au final seul le composé mésylé (53) sera utilisé comme synthon pour aboutir au ligand D₇.

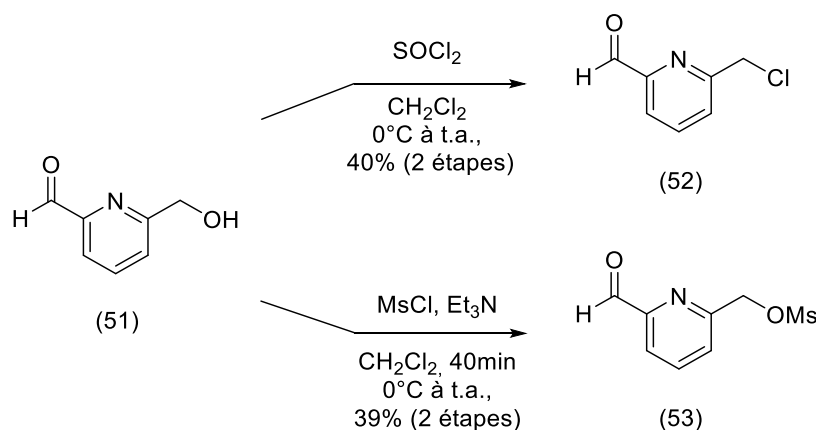


Figure V-7 : Introduction d'un groupe partant sur le synthon (51).

V.2.1.2 Synthèse du sel de la bishydroxylamine (55)

Le second précurseur clé dans la voie de synthèse proposée (Figure V-6) est le sel de bishydroxylammonium (55). La bishydroxylamine est synthétisée sous la forme d'un sel d'ammonium et de sulfate car ce dérivé est plus stable à l'air et dans le temps (Figure V-8) que la bishydroxylamine précurseur. Le sel (55) est obtenu par réduction du composé dinitro (54) selon deux voies de synthèse différentes^[159].

La première méthode passe par l'utilisation de zinc métallique et d'ammoniaque^[160] (Figure V-8). Cette réaction est peu reproductible et conduit à de faibles rendements.

La deuxième méthode passe par l'utilisation d'une feuille de papier d'aluminium et de chlorure de mercure^[161] (Figure V-8). La réduction des fonctions nitro en fonctions hydroxylamines permet d'obtenir le sel d'hydroxylammonium (55) avec un rendement de 65% et de manière très reproductible.

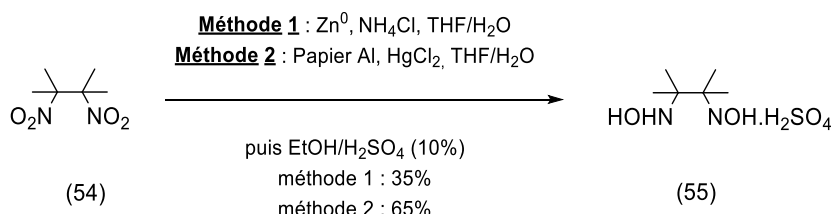


Figure V-8 : Première voie de réduction.

Cette deuxième méthode a permis de synthétiser le composé (55) à l'échelle de plusieurs grammes afin de disposer d'un stock important de cet intermédiaire.

V.2.2 Synthèse du ligand D₇

Le ligand macrocyclique D₇ est obtenu en deux étapes à partir du DO2AM (9). Ainsi, le DO2AM (9) est tout d'abord fonctionnalisé par le synthon (53) (deux équivalents) en présence de carbonate de potassium pour faciliter la substitution nucléophile. La réaction se déroule dans l'acétonitrile à 60°C pendant une nuit pour former le composé tétrasubstitué (56) avec un rendement de 43%.

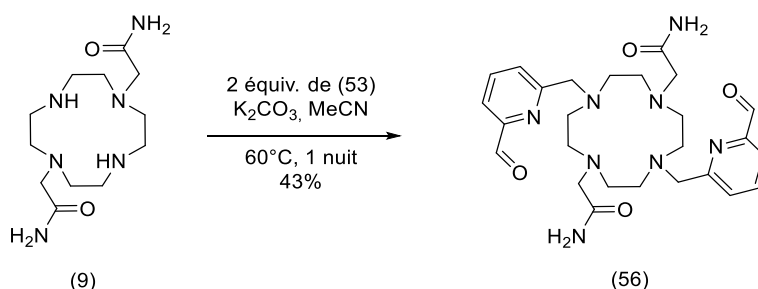


Figure V-9 : Fonctionnalisation du DO2AM pour obtenir l'intermédiaire (56).

Les fonctions aldéhydes présentes dans le composé (56) sont ensuite fonctionnalisées par deux équivalents de bishydroxylamines. Le sel de bishydroxylammonium (55) est donc déprotonné au préalable par de l'acétate de sodium en milieu méthanolique pour obtenir la bishydroxylamine. Le macrocycle (56) est alors ajouté à la solution résultante. Le ligand D₇ est formé quantitativement après 48h à 60°C sous argon (Figure V-10). Il a été caractérisé par spectroscopie RMN ¹H (Annexe), HRMS et spectroscopie IR.

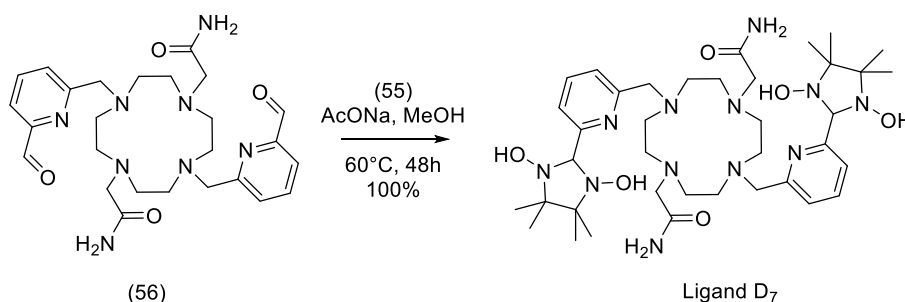


Figure V-10 : Formation du Ligand D₇.

Afin de mettre au point les conditions d'oxydation du ligand D₇ en espèce radicalaire nous avons réalisé une étude RPE dans l'eau et dans le méthanol (paragraphe V.2.2.1).

V.2.2.1 Analyse RPE du ligand D₇ et de ses produits d'oxydation

Nous avons cherché à identifier par spectroscopie RPE les produits d'oxydation de D₇, dont la nature est radicalaire. Cette analyse RPE a pour but de mettre en place un protocole d'oxydation. Deux solvants ont été utilisés : l'eau et le méthanol. Comme nous le verrons par la suite, les résultats diffèrent entre ces deux solvants.

Chapitre 5

V.2.2.1.1 Oxydation en milieu aqueux

Le ligand D_7 est diamagnétique et devrait donc être silencieux en RPE. Or son spectre RPE en solution aqueuse tamponnée avec de l'HEPES à pH 7,4 présente un signal à 6 bandes d'intensité 1:1:1:1:1:1 centré à $g_{iso} = 2,006$. Le signal est peu intense, ce qui signifie qu'il s'agit d'un produit mineur qui s'est vraisemblablement formé par oxydation à l'air. L'éclatement hyperfin observé provient du couplage avec un azote ^{14}N ($I = 1$; $A_N = 2,3$ mT) et un hydrogène 1H ($I = 1/2$; $A_H = 1,5$ mT). Les constantes de couplages hyperfines pourraient indiquer la présence d'un radical hydroxylamine-nitroxyde (Figure V-11).

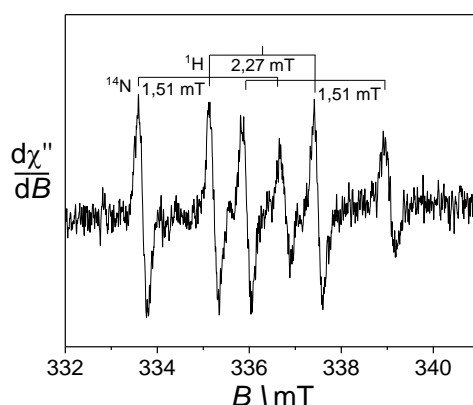


Figure V-11 : Spectre RPE en bande X du ligand D_7 à $T = 298K$ dans H_2O , $[HEPES] = 0,1$ M, pH 7,1 à 0,5 mM. Fréquence micro-onde : 9,43 GHz ; puissance : 1,7 mW ; modulation d'amplitude : 0,2 mT, modulation de fréquence : 100 KHz.

Immédiatement après l'ajout de $NaIO_4$ (oxydant chimique), nous observons l'apparition de résonances supplémentaires identifiées par des points verts dans la Figure V-12. Ceci suggère qu'un autre radical se forme et que la solution est un mélange de deux radicaux. L'intensité du signal de l'hydroxylamine-nitroxyde (en bleu sur la Figure V-12) déjà présente avant l'oxydation augmente d'un facteur deux environ. Le nouveau signal se présente sous la forme de 5 bandes d'intensité 1:2:3:2:1 (points verts sur la Figure V-12, b). Cette signature est caractéristique de radicaux nitronyl nitroxydes^[101]. Toutefois, en moins de 3 minutes, ce signal disparaît, montrant que le radical nitronyl nitroxyde n'est pas stable dans ces conditions (Figure V-14). Le signal observé après ce temps est alors exclusivement celui du radical hydroxylamine-nitroxyde, et il est superposable à celui décrit en Figure V-12, a.

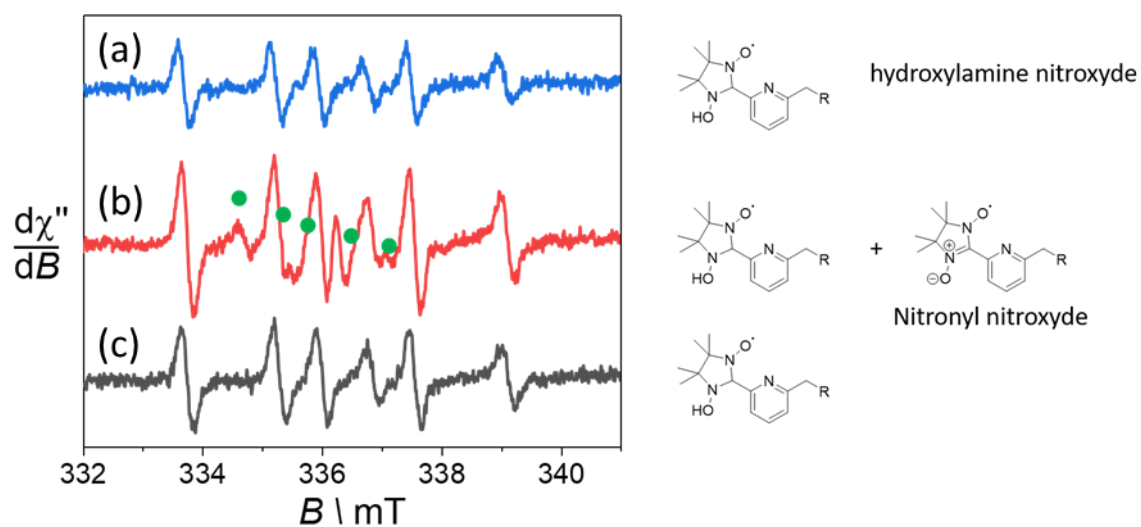


Figure V-12 : Oxydation du ligand D₇ dans l'eau par le périodate de sodium. En bleu (a) : avant oxydation ; en rouge (b) : après l'ajout de NaIO₄; en noir (c) : 5 minutes après l'ajout de NaIO₄.

V.2.2.1.2 Oxydation dans le méthanol

Le spectre RPE du ligand D₇ en solution dans le méthanol ne présente aucun signal caractéristique, démontrant l'absence de radical. L'oxydation de la bis-hydroxylamine a été réalisée en phase hétérogène dans le méthanol par le périodate de sodium (insoluble). Après l'ajout de NaIO₄, un signal intense est observé. Il est constitué de 5 résonances d'intensité 1:2:3:2:1 et centré à $g_{iso} = 2,006$ (Figure V-13). L'éclatement hyperfin provient du couplage ($A_N = 0,8$ mT) avec deux azotes équivalents ($I = 1$).

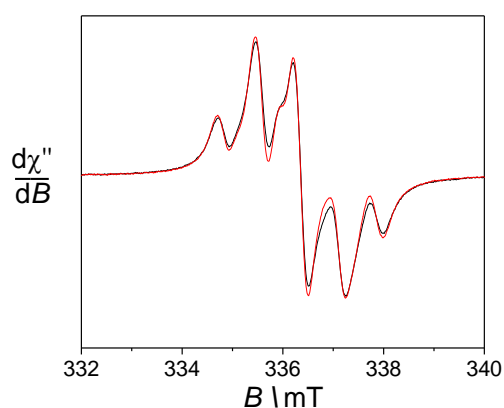


Figure V-13 : Spectre RPE en bande X du ligand D₇ à T = 298K en solution dans MeOH à 0,5 mM, après ajout de NaIO₄. Fréquence micro-onde : 9,43 GHz ; puissance : 1,7 mW ; modulation d'amplitude : 0,2 mT, modulation de fréquence : 100 KHz.

Ce spectre est classique d'un radical nitronyl nitroxyde magnétiquement dilué (Figure V-13) et montre donc que l'oxydation au périodate permet d'obtenir le radical ciblé. Il démontre aussi que les sous unités nitronyl nitroxydes n'interagissent que très peu entre elles dans le ligand D₇. L'interaction ne se manifeste en effet que par un élargissement de raies et une dissymétrie de la raie centrale (un couplage important aurait donné un spectre à 9 raies voir

une extinction du signal)^[162]. Ces données montrent enfin que le radical nitronyl nitroxyde est stable en solution dans le méthanol (Tableau V-A). Ce solvant sera donc privilégié dans les études ultérieures.

Tableau V-A : Radicaux formés sur le ligand D₇ en fonction du solvant.

| Solvants | Radical formé | Stabilité |
|----------|-------------------------|------------------------------|
| Eau | Nitronyl nitroxyde | Instable ≈ quelques secondes |
| | Hydroxylamine nitroxyde | Stable |
| Méthanol | Nitronyl nitroxyde | Stable ≈ plusieurs heures |

V.2.3 Formation des complexes

Les complexes peuvent être formés à partir du ligand D₇ sous forme bis-hydroxylamine ou sous forme nitronyl nitroxyde c'est-à-dire après oxydation du ligand par le périodate dans le méthanol. Pour faciliter l'analyse des complexes, nous avons choisi de complexer le métal au ligand sous forme bis-hydroxylamine. La complexation de ce ligand avec les sels triflates de lanthanide a lieu dans le méthanol, à température ambiante pendant 4 jours (Figure V-14). Les complexes [Eu.D₇]³⁺ et [Yb.D₇]³⁺ sont précipités par ajout d'éther diéthylique et obtenus avec des rendements de 62% et 73% respectivement (Figure V-14). La spectroscopie RPE confirme que le ligand est diamagnétique dans le produit isolé (Cf. paragraphe V.2.4.1). Les spectres RMN des complexes ont été enregistrés dans le méthanol et montrent des signaux entre 20 et -25 ppm pour l'euporium et entre 80 et -60 ppm pour l'ytterbium. Le signal RMN du ¹⁹F montre une résonance à -79,4 ppm associée à la présence des groupements CF₃ des triflates. La présence de triflate est confirmée par les bandes en infrarouge à 1245 cm⁻¹ et 1027 cm⁻¹^[145] associées aux vibrations CF et CO.

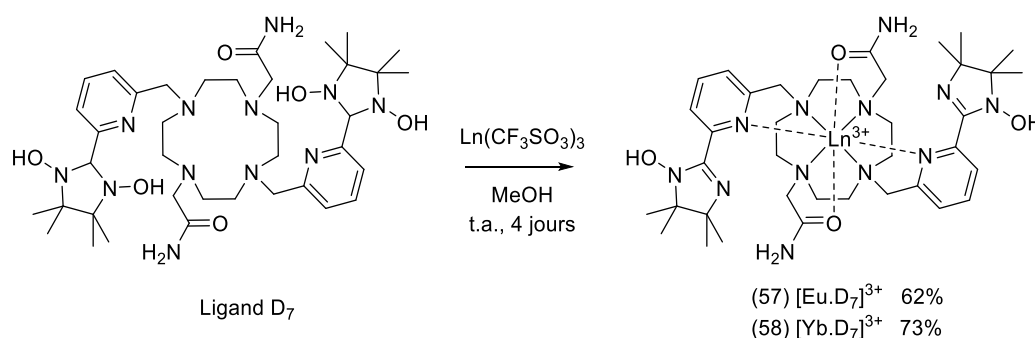


Figure V-14 : Complexation des lanthanides de la série D₇.

V.2.3.1 Signal RPE dans les complexes de lanthanides

Les spectres RPE des complexes [Eu.D₇]³⁺ et [Yb.D₇]³⁺ ont été enregistrés en solution à 0,5 mM dans le méthanol. Avant oxydation, aucun signal n'est détecté ce qui signifie qu'aucun radical n'est présent en solution. Après ajout de NaIO₄ dans le méthanol, un signal à 7 raies

d'intensité 1:1:2:1:2:1:1 et centré à $g_{\text{iso}} = 2,006$ est observé (Figure V-15). Ce signal est différent de celui du radical nitronyl nitroxyde (Figure V-13) obtenu dans les mêmes conditions d'oxydation, mais à partir du ligand libre. Le lanthanide a donc une influence importante sur le devenir de l'unité pro-radicalaire. Le spectre RPE montre sans ambiguïté que l'espèce formée est un radical iminonitroxyde, avec un éclatement hyperfin correspondant à l'interaction du spin électronique avec 2 atomes d'azote non équivalents : celui portant l'atome d'oxygène est le plus fortement couplé ($A_{N1} = 0,90$ mT) et l'atome d'azote iminique est le moins fortement couplé ($A_{N2} = 0,46$ mT)^[101].

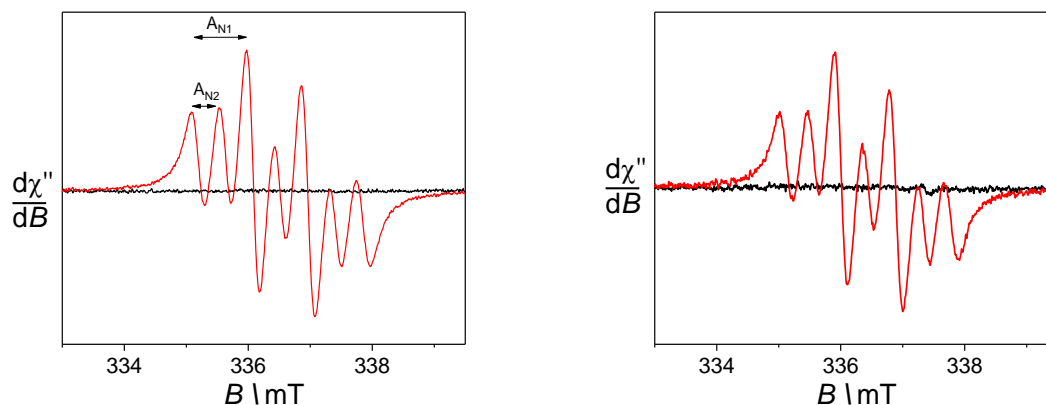


Figure V-15 : Spectres RPE en bande X des complexes $[\text{Eu.D}_7]^{3+}$ (gauche) et $[\text{Yb.D}_7]^{3+}$ (droite) à $T = 298\text{K}$, en solution dans MeOH à 0,5 mM. En noir : avant oxydation, en rouge : après ajout de NaIO_4 . Fréquence micro-onde : 9,43 GHz ; puissance : 3,5 mW (gauche), 0,008 mW (droite) ; modulation d'amplitude : 0,2 mT ; modulation de fréquence : 100 KHz.

La nature différente des radicaux obtenus à partir du ligand libre D₇ et de ses complexes de lanthanides $[\text{Ln.D}_7]^{3+}$ pourrait s'expliquer de la manière suivante : la complexation par un lanthanide qui est un acide de Lewis favoriserait l'élimination du proton situé entre les deux atomes d'azote de l'imidazolidine pour former l'espèce iminohydroxylamine dans les complexes $[\text{Ln.D}_7]^{3+}$ (Figure V-14).

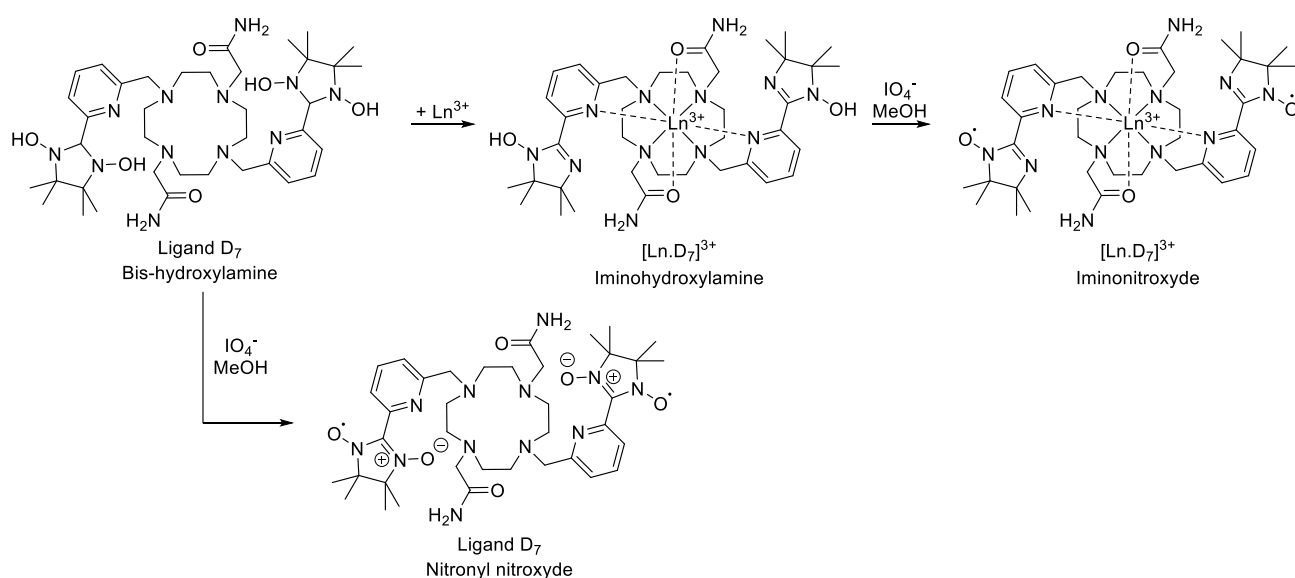


Figure V-16 : Oxydation de D₇ et $[\text{Ln.D}_7]^{3+}$ par l'ion périodate dans le méthanol.

V.2.3.2 Etudes des ligands et complexes par électrochimie

Les courbes de voltampérométrie cyclique du ligand D₇ et des deux complexes de cette série sont donc isolés sous forme de bis-hydroxylamine et d'iminohydroxylamine respectivement et sont assez similaires, avec une vague d'oxydation irréversible à E_p^a = 0,78 V. Ce potentiel E_p^a est largement supérieur à celui des ligands et complexes issues des familles comportant un radical TEMPO. On retient qu'il est supérieur à la fois au potentiel associé au couple nitroxyde/hydroxylamine et oxoammonium/nitroxyde de ces dernières séries mais reste accessible par un oxydant tel que le périodate (Figure V-17)^[101].

Tableau V-B : Valeurs des potentiels d'oxydation de la série D₇.

| Espèces | Potentiel E _p ^a |
|------------------------------------|---------------------------------------|
| Ligand D ₇ | 0,78 |
| [Eu.D ₇] ³⁺ | 0,79 |
| [Yb.D ₇] ³⁺ | 0,78 |

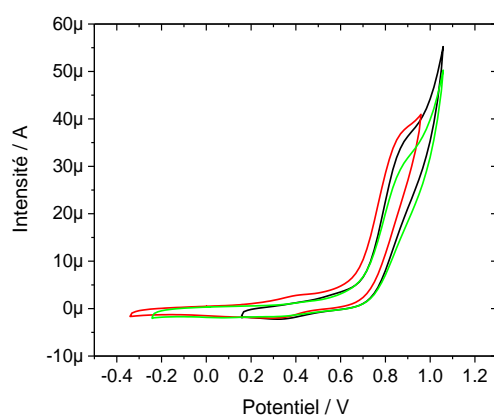


Figure V-17 : Courbes de voltampérométrie cyclique du Ligand D₇ (en noir) et des complexes [Eu.D₇]³⁺ (rouge) et [Yb.D₇]³⁺ (vert) à 0,5 mM dans une solution de CH₃OH contenant 0,1 M de TBAPF₆ comme électrolyte de support. Toutes les valeurs de potentiels sont données en V par rapport au couple rédox Fc⁺/Fc. T = 298 K ; vitesse de balayage : 0,1 V/s. Les paramètres pour le ferrocène par rapport à la référence utilisée (AgNO₃ à 0,01 M) : E_{1/2} = 0,16 V.

V.3 ÉTUDES DU LIGAND ET DES COMPLEXES PAR SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION ET LUMINESCENCE

V.3.1 Spectroscopie d'absorption UV-Vis

Le spectre d'absorption du ligand D₇ est composé d'une bande à 264 nm ($\epsilon \approx 6\,500\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) et d'une bande à 312 nm ($\epsilon \approx 2\,500\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) associées aux unités pyridines et imidazolinidines respectivement^[163]. Après oxydation par le périodate de sodium, deux bandes apparaissent à 366 nm ($\epsilon \approx 8\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) et 558 nm ($\epsilon \approx 200\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)(Figure V-20,

gauche). La seconde bande peu intense^[164] est caractéristique du chromophore nitronyl nitroxyde qui est responsable de la couleur violette de cette espèce^[162].

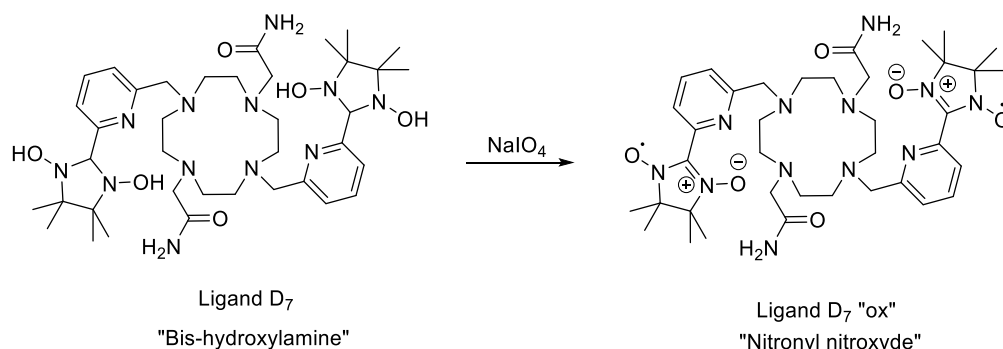


Figure V-18 : Oxydation du ligand D₇ « bis-hydroxylamine » en composé (58) « nitronyl nitroxyde ».

Le spectre des complexes [Ln.D₇]³⁺ présentent deux bandes dans la région 260 et 320 nm avec des coefficients d'extinction molaire allant de 1000 à 2000 M⁻¹.cm⁻¹ (Figure V-20, droite). Ces bandes sont associées à la pyridine et l'iminohydroxylamine et leur déplacement ainsi que leur changement d'intensité suggèrent que la pyridine se coordine au métal. Après oxydation, le spectre évolue et 2 bandes intenses apparaissent à 285 nm ($\epsilon \approx 4\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) et 362 nm ($\epsilon \approx 2\,500\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) (Tableau V-C). Ces bandes sont associées au chromophore iminonitroxyde^[165] (Figure V-20). On notera l'absence de bande à 558 nm qui confirme que le radical nitronyl nitroxyde ne se forme pas après oxydation.

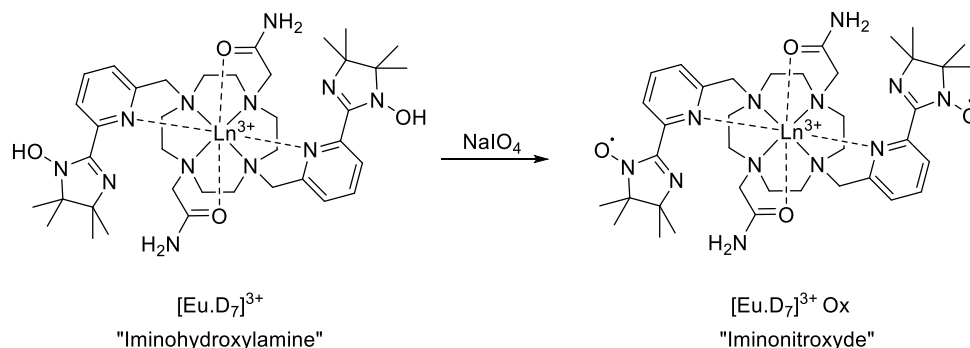


Figure V-19 : Oxydation du complexe [Eu.D₇]³⁺ sous forme « imino-hydroxylamine » en forme oxydée « iminonitroxyde ».

Tableau V-C : Valeurs des longueurs d'onde λ_{max} et coefficients d'extinction molaire ϵ du ligand et des complexes de la série D₇. L'oxydation se fait en ajoutant un excès de NaIO₄ dans le méthanol à T = 298K. ^a pour une solution à 0,5 mM et ^b pour une solution à 0,05 mM dans MeOH.

| | Avant oxydation (ϵ en M ⁻¹ .cm ⁻¹) | Après oxydation (ϵ en M ⁻¹ .cm ⁻¹) |
|--------------------------------------|---|---|
| Ligand D ₇ ^a | 264 nm (6500), 312 nm (2500) | 366 nm (8000), 558 nm (500) |
| [Eu.D ₇] ^{3+ a} | 266 nm (2000), 316 nm (1000), 359 (700), 533 (200) | 285 (4000), 362 nm (2500) |
| [Yb.D ₇] ^{3+ b} | 271 nm (2000), 312 nm (1000), 364 (400) | 365 (500) |

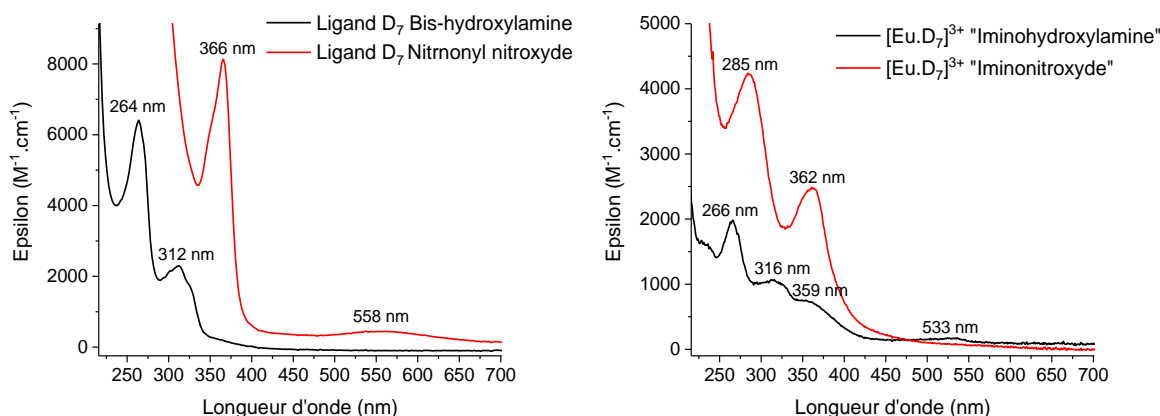


Figure V-20 : Spectres d'absorption du ligand D₇ (gauche) et du complexe [Eu.D₇]³⁺ en solution dans le méthanol à 0,5 mM. Noir : avant oxydation ; rouge : après oxydation.

V.3.2 Spectroscopie de luminescence

V.3.2.1 Photoluminescence du complexe d'europium

Les mesures de photoluminescence du complexe [Eu.D₇]³⁺ ont été effectuées dans le méthanol en excitant la complexe à 326 nm c'est-à-dire dans une bande d'absorption du ligand (Figure IV-10). Nous pouvons observer des bandes d'émission fines typiques de l'émission de l'Eu(III) entre 570 et 720 nm. Elles correspondent aux transitions ⁵D₀ → ⁷F_J (J = 0, 1, 2, 3, 4).

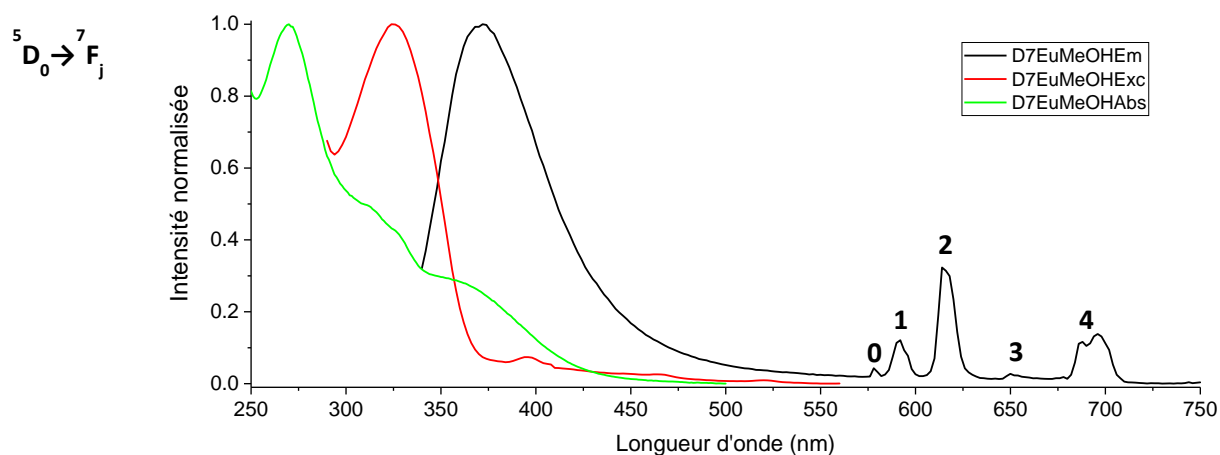


Figure V-21 : Spectre d'émission (noir) du complexe [Eu.D₇]³⁺ en solution dans le méthanol à 0,05 mM après excitation à 326 nm. En vert : spectre d'absorption UV-Vis ; en rouge : spectre d'excitation avec $\lambda_{max} = 614$ nm.

La bande associée à la transition ⁵D₀ → ⁷F₀ est visible pour ce complexe, ce qui suggère une symétrie C, cohérente avec la structure du ligand de type DO2AM. Le spectre d'émission de l'europium est dominé par la transition ⁵D₀ → ⁷F₂. La bande associée à la transition ⁵D₀ → ⁷F₁ n'est pas assez définie pour en tirer des informations structurales. Toutefois il est possible de mesurer le rapport des intensités des bandes associées aux transitions ⁵D₀ → ⁷F₂ et

$^5D_0 \rightarrow ^7F_1$. La valeur calculée de 3,6 suggère une basse symétrie autour de l'euprium (III) comme pour le complexe $[Eu.D_6]^{3+}$ (Figure V-22).

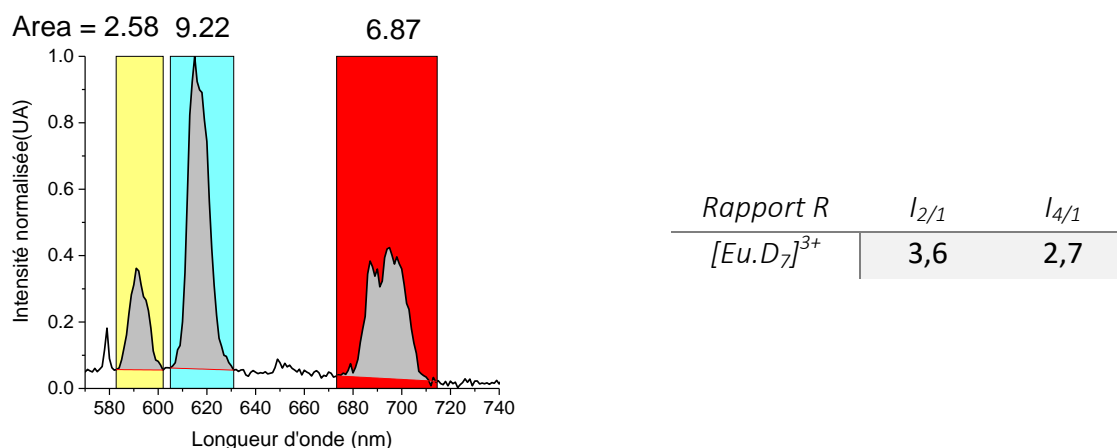


Figure V-22 : Intégration des bandes de luminescence du complexe $[Eu.D_7]^{3+}$ en solution dans le méthanol. Rapport des intégrations: $I_{2/1} = I(^5D_0 \rightarrow ^7F_2) / I(^5D_0 \rightarrow ^7F_1)$, $I_{4/1} = I(^5D_0 \rightarrow ^7F_4) / I(^5D_0 \rightarrow ^7F_1)$.

La luminescence du complexe d'euprium est dépendante de l'état rédox du ligand. Après oxydation par l'ion périodate IO_4^- , l'intensité de la luminescence centrée sur l'euprium diminue d'environ 43% dans le complexe $[Eu.D_7]^{3+}$. Le temps de vie de l'état excité reste toutefois identique (environ 0,75 ms) suggérant que la structure du complexe n'est pas significativement altérée après oxydation.

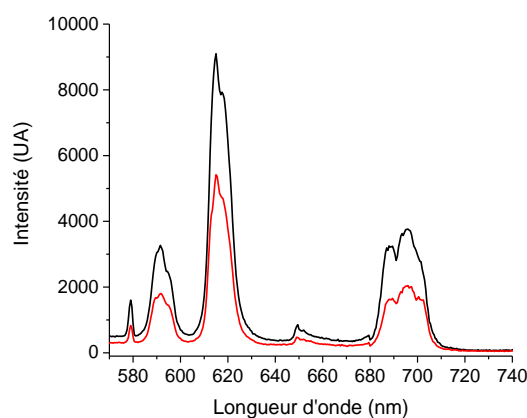


Figure V-23 : Spectre d'émission du complexe $[Eu.D_7]^{3+}$ (noir) en solution dans le méthanol à 0,05 mM. (Rouge) : après oxydation par le périodate. $T = 298\text{ K}$; excitation à 326 nm.

V.3.2.2 Détermination du nombre de molécules de solvant coordonnées

V.3.2.2.1 Luminescence dans l'eau

La luminescence de l'ion Eu^{3+} a été utilisée pour estimer le nombre de molécules de solvant coordonnées au métal. Le temps de vie de l'état excité de l'euprium dans le complexe $[Eu.D_7]^{3+}$ a été mesuré dans l'eau et dans l'eau lourde (Tableau V-D). Les valeurs obtenues sont 0,75 ms et 1,73 ms, respectivement. Nous utiliserons la formule d'Horrocks^[123] pour calculer le nombre de molécules d'eau coordonnées (Eq. 5.2) en tenant compte des

oscillateurs présents : les protons des fonctions acétamides à proximité de l'euporium sont en effet des oscillateurs atténuant la luminescence.

$$q = 1,11 [\Delta k_{\text{obs}} - 0,31 - 0,45q^{\text{OH}} - 0,99q^{\text{NH}} - 0,075q^{\text{CONH}}] \quad \text{Eq. 5.2}$$

où $\Delta k_{\text{obs}} = k_{\text{H}_2\text{O}} - k_{\text{D}_2\text{O}} = 1/\tau_{\text{H}_2\text{O}} - 1/\tau_{\text{D}_2\text{O}}$, où q^{OH} désigne le nombre d'oscillateur -OH dans la première sphère de coordination, q^{NH} désigne le nombre d'oscillateur amine -NH dans la première sphère de coordination, q^{CONH} désigne le nombre d'oscillateur amide -CONH dans la première sphère de coordination, les oscillateurs de type NH des fonctions amides primaires sont diastéréoscopiques et atténuent la luminescence de manière différente. Une réduction arbitraire de 50% sur le second lot de fonctions NH a été appliquée conformément à la littérature^[124].

L'Eq 5.2 se simplifie en Eq 5.3 lorsque les protons des deux fonctions acétamides sont considérés :

$$q = 1,11 [\Delta k_{\text{obs}} - 0,31 - 0,15 - 0,075] \\ \text{soit } q = 1,11 [\Delta k_{\text{obs}} - 0,54] \quad \text{Eq. 5.3}$$

En considérant $\Delta k_{\text{obs}} = 0,76$ on détermine un nombre de molécules d'eau coordonnées $q = 0,2$ (Tableau V-D). Cette valeur est très faible, on peut en déduire qu'il n'y a certainement pas de molécule d'eau coordonnée dans le complexe $[\text{Eu.D}_7]^{3+}$.

Tableau V-D : Mesure de temps de vie des complexes $[\text{Eu.D}_7]^{3+}$, $\Delta k_{\text{obs}} = k_{\text{H}_2\text{O}} - k_{\text{D}_2\text{O}} = 1/\tau_{\text{H}_2\text{O}} - 1/\tau_{\text{D}_2\text{O}}$.

| Complexe | $\tau_{\text{H}_2\text{O}}$ (ms) | $\tau_{\text{D}_2\text{O}}$ (ms) | Δk_{obs} | q (Eq 5.3) |
|------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------------------|--------------|
| $[\text{Eu.D}_7]^{3+}$ | 0,75 | 1,73 | 0,76 | 0,2 |

V.3.2.2.2 Luminescence dans le méthanol

Nous avons ensuite cherché à déterminer si un changement d'état d'oxydation du ligand affectait le nombre de molécules d'eau coordonnées dans le complexe $[\text{Eu.D}_7]^{3+}$. Compte tenu de la faible stabilité générale des radicaux dans l'eau pour cette série, les mesures comparatives entre forme oxydée (au périodate) et non oxydée ont été effectuées dans le méthanol. Dès lors que la valeur de q a été déterminée dans l'eau (voici ci-dessus) cette étude dans le méthanol nous permettra également d'évaluer l'applicabilité à nos composés de l'équation générale proposée par W. Horrocks *et al.*^[149] pour déterminer le nombre de molécules de méthanol coordonnées m :

$$m = 2,1 \times \Delta k_{\text{obs}} \quad \text{Eq. 4.1}$$

où $\Delta k_{\text{obs}} = k_{\text{MeOH}} - k_{\text{MeOD}} = 1/\tau_{\text{MeOH}} - 1/\tau_{\text{MeOD}}$

Les valeurs de τ mesurées dans le méthanol sont de 0,75 et 0,76 ms en absence et présence de périodate respectivement (Annexe). Elles sont 2,05 et 1,96 ms dans le méthanol deutéré. La différence Δk_{obs} est sensiblement la même que le périodate soit présent ou non, ce qui suggère que le nombre de molécules de solvant coordonnées est identique dans les formes radicalaires et hydroxylamines.

A partir des valeurs de Δk_{obs} on peut calculer $m = 1,7$ et $1,8$ pour les formes radicalaire et réduite, respectivement, dans le méthanol. Ces valeurs sont incohérentes car le méthanol est moins coordinant que l'eau et le nombre de molécules d'eau coordonnées (dans l'eau) est nul. Nous retiendrons de ce calcul que la paramétrisation de la formule proposée par W. Horrocks *et al.*^[149] n'est pas adaptée à nos complexes et tend à largement surestimer le nombre de molécules de solvant coordonnées. Nous ne pourrions donc pas déterminer le nombre de molécules de méthanol coordonnées en l'utilisant.

V.3.2.3 Photoluminescence du complexe d'ytterbium

Les mesures de photoluminescence du complexe $[\text{Yb.D}_7]^{3+}$ ont été effectuées dans le méthanol. L'excitation du complexe $[\text{Yb.D}_7]^{3+}$ à 326 nm (Figure V-24) induit une bande d'émission typique du cation Yb^{3+} à 980 nm. Elle correspond à la transition ${}^2\text{F}_{5/2} \rightarrow {}^2\text{F}_{7/2}$, qui subit un éclatement dû au champ de ligand^[166]. L'oxydation du complexe $[\text{Yb.D}_7]^{3+}$ par l'ion périodate induit une diminution de l'intensité de la luminescence provenant de l'ytterbium. La diminution est d'environ 41%, valeur semblable à celle observée dans le cas du complexe $[\text{Eu.D}_7]^{3+}$.

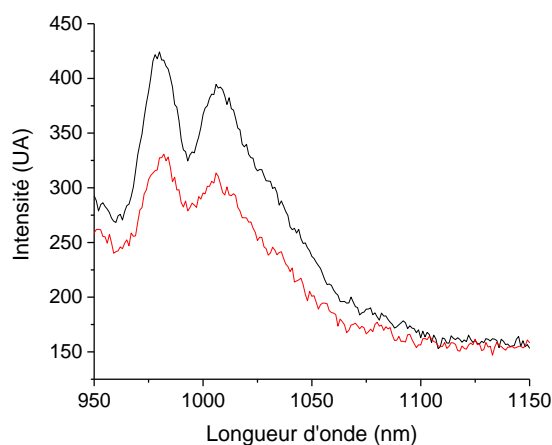


Figure V-24 : Spectres d'émission du complexe $[\text{Yb.D}_7]^{3+}$ dans le méthanol (noir) et après oxydation par le périodate (rouge) après excitation à 326 nm.

A la fois les complexes d'euprimum et d'ytterbium peuvent agir comme sondes rédox luminescentes en milieu méthanolique, mais la stabilité des espèces radicalaires en milieu aqueux reste à améliorer pour pouvoir les utiliser comme sondes biologiques. A présent nous allons voir l'influence de l'état d'oxydation des unités rédox sur l'activité CEST.

V.4 ETUDE DE L'ACTIVITE CEST DES COMPLEXES

V.4.1 Temps de relaxation

Le temps de relaxation T_1 des protons des molécules d'eau environnantes a été déterminé pour les complexes de la série $[\text{Ln.D}_7]^{3+}$ (Tableau V-E).

Tableau V-E : Résumé du temps de relaxation T_1 des différents complexes à 25°C pour des solutions à 21 mM dans un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$ (2/1) pour pouvoir comparer avec les autres séries. Enregistré à 11,7 T ; $T = 298$ K dans un mélange $\text{H}_2\text{O}:\text{CD}_3\text{CN}$ (2:1), $[\text{HEPES}] = 0,07\text{M}$ à pH 7,5.

| Complexe | T_1^{RED} (s) | T_1^{OX} (s) |
|------------------------|------------------------|-----------------------|
| $[\text{Eu.D}_7]^{3+}$ | $1,17 \pm 0,21$ | $0,12 \pm 0,01$ |
| $[\text{Yb.D}_7]^{3+}$ | $0,30 \pm 0,03$ | $0,12 \pm 0,02$ |

Le complexe d'euprium $[\text{Eu.D}_7]^{3+}$ présente un T_1 de 1,17 s. Cette valeur est relativement faible par rapport au T_1 des complexes d'euprium des autres séries. Après oxydation par le périodate, le T_1 atteint une valeur de 0,12 s. Cette valeur est proche de celle obtenue pour la forme radicalaire des complexes d'euprium des séries précédentes. La différence de T_1 entre les formes oxydée et non oxydée est donc inférieure dans le cas d' $[\text{Eu.D}_7]^{3+}$. Ce complexe possède tout de même des caractéristiques pouvant permettre l'observation d'un signal CEST sous la forme non oxydée.

Le complexe d'ytterbium $[\text{Yb.D}_7]^{3+}$ se caractérise par un T_1 de 0,30 s. Cette valeur très faible suggère une contribution paramagnétique affectant le temps de relaxation T_1 . Dans l'eau nous avons remarqué qu'une petite quantité de radical hydroxylamine-nitroxyde était présent en solution, ce qui pourrait expliquer cette tendance. Après oxydation, le T_1 atteint 0,12 s, cohérente avec les valeurs de temps de relaxation T_1 observées pour les séries $[\text{Yb.D}_5]^{3+}$ et $[\text{Yb.D}_6]^{3+}$. Le paramagnétisme dans la solution augmente et diminue donc le temps de relaxation T_1 .

V.4.2 Spectres CEST sur la série Ln.D_7^{3+}

Des mesures CEST des complexes $[\text{Eu.D}_7]^{3+}$ et $[\text{Yb.D}_7]^{3+}$ ont été réalisées à 21 mM dans un mélange d'eau et d'acétonitrile deutéré (67/33). Ces conditions ont été utilisées pour comparer les différentes séries entre elles.

Le complexe $[\text{Eu.D}_7]^{3+}$ ne présente pas d'effet CEST ni avant, ni après oxydation (Figure V-25). Comme dans les premières séries $[\text{Ln.D}_1]^{3+}$ et $[\text{Ln.D}_2]^{3+}$, les protons des fonctions acétamides ne sont pas détectables, leur vitesse d'échange étant en dehors de la gamme de vitesses optimales.

Complexe symétrique intégrant une antenne redox-active : D₇

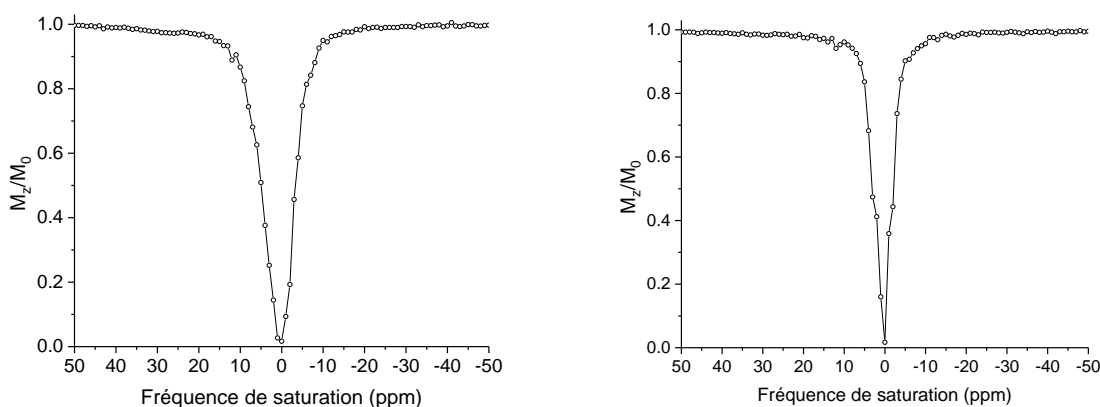


Figure V-25 : Spectres CEST d'une solution à 21 mM de $[\text{Eu.D}_7]^{3+}$ sous ses formes réduite iminohydroxylamine (gauche) et oxydée (droite) en utilisant 2 équivalents de périodate de sodium. Spectres enregistrés à 11,7 T dans un mélange $\text{H}_2\text{O}:\text{CD}_3\text{CN}$ (2:1), $[\text{HEPES}] = 0,07\text{M}$ à pH 7,5, $B_1 = 19 \mu\text{T}$, et un temps d'irradiation de 4 s. $T = 298 \text{ K}$.

Comme on pouvait s'y attendre à la vue des T_1 très courts, le spectre CEST du complexe $[\text{Yb.D}_7]^{3+}$ ne présente pas de signal CEST que le périodate soit présent ou non en solution (Figure V-26).

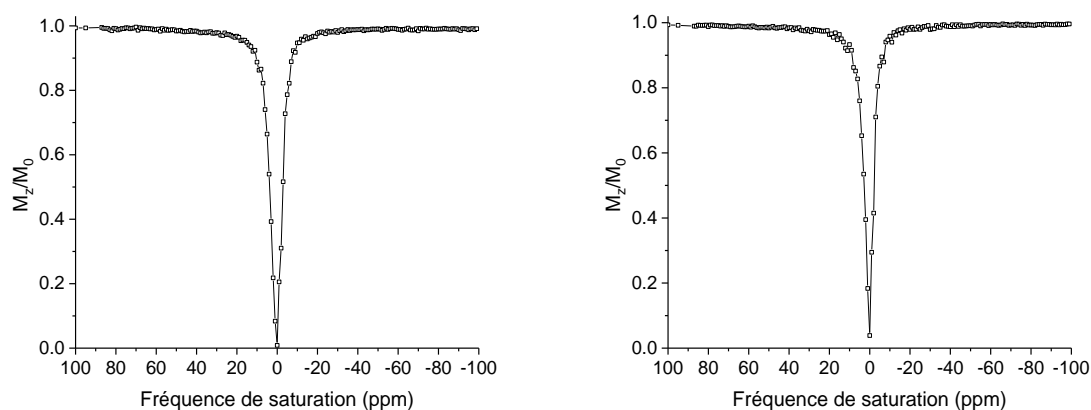


Figure V-26 : Spectres CEST d'une solution à 21 mM de $[\text{Yb.D}_7]^{3+}$ sous ses formes réduite iminohydroxylamine (gauche) et oxydé (droite) en utilisant 2 équivalents de périodate de sodium. Spectres enregistrés à 11,7 T dans un mélange $\text{H}_2\text{O}:\text{CD}_3\text{CN}$ (2:1), $[\text{HEPES}] = 0,07\text{M}$ à pH 7,5, $B_1 = 19 \mu\text{T}$, et un temps d'irradiation de 4 s. $T = 298 \text{ K}$.

En conclusion, les fonctions amides non-substituées ne semblent pas idéales dans ces complexes pour l'obtention d'un signal en CEST. Les temps de relaxation T_1 observés sont très courts, ce qui limite potentiellement l'observation d'un signal CEST provenant des protons des fonctions acétamides. De plus, l'absence de molécule d'eau en première sphère de coordination ne permet pas d'obtenir un signal comme pour le complexe $[\text{Eu.D}_1]^{3+}$.

V.5 BILAN ET PERSPECTIVES

L'objectif de cette dernière partie était de mettre au point un complexe symétrique possédant deux unités rédox-actives capables de sensibiliser les lanthanides. Nous avons donc mis au point une synthèse efficace d'un ligand possédant deux unités bis-hydroxylamines portées par des pyridines. Après complexation, les unités rédox subissent une élimination et deviennent des α -iminohydroxylamines.

Le ligand D₇ est capable de sensibiliser l'euprium et l'ytterbium puisque la luminescence des lanthanides a été obtenue. L'état rédox des complexes de cette série a une influence sur les propriétés photophysiques des lanthanides avec une luminescence de l'euprium qui diminue d'environ 43% lors de l'oxydation et une luminescence de l'ytterbium qui diminue d'environ 8%. Ce comportement montre que nos composés sont bien des sondes rédox luminescentes.

L'instabilité du radical formé observée par RPE dans les milieux aqueux (de l'ordre de quelques minutes) limite son utilisation comme sonde rédox. Il n'a d'ailleurs pas été possible d'effectuer des tests de pénétration cellulaire à cause de cette décomposition.

Ces complexes nécessitent donc encore quelques améliorations. En suivant les voies de synthèse empruntées dans cette partie, il serait possible de fonctionnaliser les pyridines en position 4 pour obtenir de meilleurs antennes ou encore de meilleur bras actif en CEST (Figure V-27).

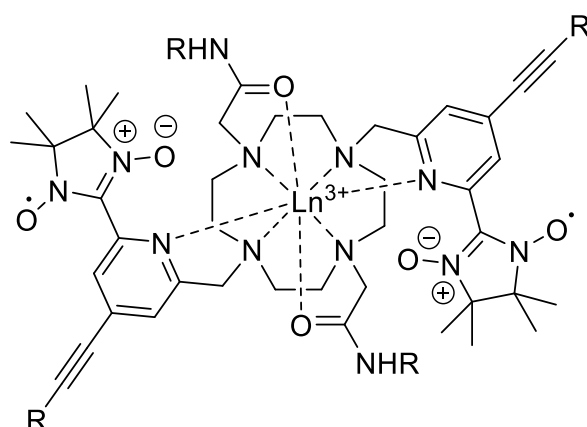


Figure V-27 : Complexe pouvant apporter une meilleure sensibilisation du lanthanide et un meilleur effet CEST.

Complexe symétrique intégrant une antenne redox-active : D₇

VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette thèse a pour objectif de concevoir, synthétiser et étudier des sondes rédox contenant des lanthanides (III) pour une détection par ParaCEST et par luminescence. Le design des ligands est primordial pour une détection par luminescence et/ou ParaCEST. Un bon agent de contraste en IRM nécessite une à deux molécules d'eau dans sa sphère de coordination. A l'inverse, des molécules d'eau dans la sphère de coordination atténuent la luminescence. Un équilibre doit être trouvé pour obtenir des sondes bimodales. En s'appuyant sur la forte expérience de l'équipe CIRE sur les ligands rédox actifs et la chimie des dérivés de DOTA, nous avons synthétisé 7 nouvelles séries de complexes de lanthanides dont les propriétés magnétiques et photophysiques sont modulées par l'état rédox du ligand. Notre approche exploite l'activité rédox du ligand qui peut transiter entre des formes radicalaires et pro-radicalaires.

Les deux premières séries de complexes intègrent une unité rédox active de type nitroxyde et des fonctions acétamides pour favoriser un effet CEST. Les caractérisations en luminescence ont montré qu'une molécule d'eau était présente dans la sphère de coordination du métal. Le nombre de coordination ainsi que la symétrie diffère entre $[\text{Ln.D}_1]^{3+}$ et $[\text{Ln.D}_2]^{3+}$. Une activité CEST a été détectée pour $[\text{Eu.D}_1]^{3+}$, qui s'explique par l'échange d'une molécule d'eau située en première sphère de coordination. Les protons des fonctions acétamides n'ont cependant pas permis d'obtenir un signal. L'influence du nitroxyde sur l'amplitude de l'effet CEST a été démontrée, en modulant le temps de relaxation longitudinal T_1 du complexe. Ainsi une différence d'état d'oxydation (passage du radical nitroxyde à la fonction hydroxylamine) induit une exaltation de l'effet d'un facteur 2. Ces complexes ont par ailleurs montré une réversibilité vis-à-vis de l'oxydation et de la réduction en utilisant des réducteurs biologiques tels que l'ascorbate.

L'objectif de la série suivante est de concevoir une sonde bimodale CEST / luminescence par incorporation directe d'une antenne : l'hydroxyquinoléine sur le ligand en plus de l'unité rédox-active. L'intensité de la luminescence émise par ces complexes augmente d'environ 90% après réduction de la fonction nitroxyde en hydroxylamine. Cependant ces complexes se sont avérés inefficaces avec l'absence d'effet CEST bien défini.

Les deux séries de complexes suivantes ont permis d'augmenter l'activité en CEST en optimisant la symétrie du ligand. Une molécule d'eau présente dans la première sphère de coordination et la symétrie autour du métal est semblable. Des signaux en CEST ont pu être identifiés sous la forme réduite hydroxylamine des complexes. Pour les complexes d'euprimum, le signal provient d'une molécule d'eau coordonnée sur le métal. Pour le complexe d'ytterbium, les signaux proviennent sans doute des protons des fonctions acétamides. Le temps de relaxation longitudinal T_1 peut être modulé par la présence

d'électron non apparié comme celui présent sur les nitroxydes. Ceux-ci jouent un rôle majeur dans l'activité CEST et dans l'obtention d'une réponse de type ON/OFF. Un complexe d'euprium a montré une activité particulière à 37°C qui semble s'expliquer par la présence d'interactions fluorées et de π -stacking qui piègent la molécule d'eau.

Enfin nous avons mis au point un complexe symétrique possédant deux unités rédox actives capable de sensibiliser les lanthanides (dernière série). L'unité rédox active peut se présenter sous de multiples formes (hydroxylamine-nitroxyde, α -iminonitroxyde, nitronyl nitroxyde, bis-hydroxylamine...) en fonction des conditions expérimentales. Nous avons confirmé que l'état rédox du ligand influence les propriétés magnétiques et photophysiques de nos complexes. Bien que ce radical soit plus instable, les complexes de type nitronyl nitroxyde nécessitent quelques améliorations et des études plus poussées qui pourraient en faire d'excellentes sondes rédox.

Dans la suite de ce projet, différentes voies peuvent être suivies afin d'obtenir des agents bimodaux efficaces pour la détection du stress oxydant. Tout d'abord, l'intégration d'antenne qui sensibilise l'euprium et l'ytterbium peuvent être greffé sur le cyclène. Un premier aperçu a pu être donné avec nos séries de complexes $[\text{Ln.D}_3]^{3+}$ et $[\text{Ln.D}_4]^{3+}$. Ces antennes peuvent aussi être fonctionnalisées afin d'inclure des groupements permettant une meilleure solubilité en milieu aqueux.

Les complexes symétriques donnent des signaux plus importants, c'est pourquoi une fonctionnalisation de deux bras actif en CEST et de deux antennes semblent être la bonne direction à suivre. Les dernières antennes rédox synthétisées nécessitent un travail plus approfondi afin d'isoler un complexe de type nitronyl nitroxyde. Sa réactivité en fonction des différents ROS et du stress oxydant de manière général pourra alors être explorée.

VII. CHAPITRE 7 : PARTIE EXPÉRIMENTALE

| | |
|-------------------------------------|-----|
| VII.1 MOLECULES DU CHAPITRE 2 | 209 |
| VII.2 MOLECULES DU CHAPITRE 3 | 217 |
| VII.3 MOLECULES DU CHAPITRE 4 | 226 |
| VII.4 MOLECULES DU CHAPITRE 5 | 230 |

Ce chapitre rassemble les méthodes, le matériel utilisé et les procédures expérimentales qui ont permis de mener aux résultats présentés dans ce manuscrit. Ce chapitre a été rédigé en anglais afin de faciliter l'accès et la reproduction pour le plus grand nombre.

This chapter is written in English to provide a larger access of the presented materials and methods used to carry out the experiments presented in this work.

Synthesis

All chemicals were of reagent grade and were used without purification. The solvents were evaporated under reduced pressure and organic phases were dried on MgSO₄ and Na₂SO₄.

Chromatography: reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) using commercial TLC sheet Merck 60 F254. TLC spots were viewed under ultraviolet light (254 nm) or revealed by KMnO₄ solution. Products were purified by silica gel from Merck (0.040-0.063 nm) using flash column chromatography and by silica gel from Merck (0.015-0.040 nm) using DCVC chromatography^[167] with a regular solvent gradient. Products were purified by alumina gel Merck (0.040-0.063 nm) for flash column chromatography.

Nuclear magnetic resonance (NMR)

NMR spectra were recorded on Brüker Avance 400 (¹H at 400MHz, ¹³C at 100 MHz) or 500 (¹H at 500 MHz, ¹³C at 125 MHz) spectrometers. Chemical shifts are given relative to solvent residual peaks. ¹⁹F NMR is calibrated using hexafluorobenzene as internal reference (-164.9 ppm). Abbreviations used to describe the multiplicity of the signals are: s (singlet), d (doublet), dd (doublet of doublet), t (triplet), m (multiplet), br (broad).

Mass spectrometry

Mass spectra were recorded on a Brüker Esquire 3000 (ESI/Ion Trap) equipment. Infrared spectra were recorded on a Thermo Scientific Nicolet iS10 FT-IR spectrometer equipped with an ATR sampling accessory. High resolution mass spectra were recorded on a Waters Xevo G2-S QT of apparatus.

EPR spectroscopy

X-band EPR spectra were recorded on a Bruker EMX Plus spectrometer controlled with the Xenon software and equipped with a high sensitivity resonator connected to a nitrogen flow cryostat (100K-298K). For measurements at lower temperatures (4-50K) the resonator was a dual mode cavity connected to a helium flow cryostat (oxford instruments). The samples were analysed either in capillaries (298K) or in quartz tubes of 4 mm diameter (frozen solutions). The spectra were simulated by using the Easyspin^[168] software.

Optical spectroscopy

The luminescence spectra of the lanthanide complexes were recorded using either a Fluorolog FL3-22 Horiba-Jobin Yvon-Spex or a FLS-1000 spectrometer. The first is equipped with a double grating excitation monochromator and an iHR320 imaging spectrometer. Hamamatsu R928P and Hamamatsu R5509 photomultipliers were used for visible and NIR measurements, respectively. All spectra were corrected for the detection and optical spectral responses (instrumental functions) of the spectrofluorimeters. Quartz capillaries of diameter 4 mm were used. For the acquisition of the excitation and emission spectra in the NIR, a long pass coloured filter was always used at 870 nm to block the signals of the 2nd harmonics. Lifetimes are averages of 3 independent determinations with a calculated Chi-square < 2.^[131] The FLS-1000® (Edinburgh Instruments) was equipped with automatic filters to remove the harmonic bands. Quartz cuvette with 1 cm optical path were used. RP928 cooled at -20 °C and NIR: InGAs cooled using pelletier were used for visible and NIR measurement respectively. The signals were analyzed with the OriginLab Origin Pro software. Lifetimes are averages of 3 independent determinations. The UV/Vis spectra were recorded on a Cary Varian 50 spectrophotometer equipped with a pelletier temperature controller or a Perkin Elmer Lambda 1050 spectrophotometer.

Electrochemistry

Cyclic voltammetry curves as well as differential pulse voltammetry curves were recorded using a Biologic SP 300 potentiostat. The measurements were performed in 0.5 mM MeCN solution containing 0.1 M tetra-n-butyl ammonium perchlorate (TBAP) as supporting electrolyte. Experiments were performed in a standard three-electrode cell. A glassy carbon disc electrode (3 mm diameter), which was polished with 1 mm diamond paste, was used as the working electrode. The auxiliary electrode is a compartmentalized platinum wire, while an Ag/AgNO₃ 0.01 M electrode was used as reference. Electrolysis was performed by using the same apparatus with a carbon felt working electrode.

Spin-lattice relaxation time (T_1) measurement

The spin-lattice relaxation time of the solutions containing the Ln complexes was determined by using the standard inversion recovery pulse sequence. The experiment involves a 180° pulse to invert the magnetization followed by a recovery delay (τ) and a final 90° pulse before acquisition which is preceded by a recycle delay (τ_r) that should be

sufficiently long ($5 \times T_1$) to ensure that all magnetization returns to equilibrium. The T_1 is determined by varying the recovery delay (τ) values and processing the results by plotting the peak intensity with respect to recovery delay time. The resulting curve is an exponential plot from which the T_1 could be extracted using exponential fitting from OriginLab Origin Pro 8 software ($y = A1 \cdot \exp(-x/T_1) + y0$).

Chemical Exchange Saturation Transfer (CEST) Spectroscopy

Z-spectra of Eu(III) complexes were recorded at 11.7 T (corresponding to 500 MHz proton Larmor frequency) by using a Bruker Avance 500 NMR spectrometer. The paramagnetic complexes were dissolved (13–21 mM) in a H₂O:CD₃CN (66:33, v:v) solution. **The complex in solution is under the “oxidized form”**. Spin-lattice relaxation time (T_1) measurement is then done to adjust the relaxation time D1 ($>5 \cdot T_1$) between 4 and 15 s. Z-spectra were acquired with an irradiation time of 4 s at 19–25 μ T and between 2.4 and 19 μ T for saturation power study. The water signal was placed at the centre of the spectrum and the irradiation offset covered the range between +100 and -100 ppm relative to the water resonance for Eu complexes, between +100 and -600 for Dy complexes and between +250 and -100 for Yb complexes. Typically, 200 data points were collected to obtain a Z-spectrum. The saturation transfer experiments were carried out at 25 or 37°C by irradiating the Eu complexes samples at increments of 1 ppm in the frequency range ± 100 ppm. The Yb complexes samples at increments of 1 ppm in the frequency range ± 100 ppm, then at increments of 5–10 ppm in the frequency range +100 and +250 ppm. The Dy complexes samples at increments of 1 ppm in the frequency range ± 100 ppm, then at increments of 5 ppm in the frequency range -100 and -600 ppm. Data were processed manually by integrating the area below the water signal. The percent saturation transfer (ST%) was calculated by the following formula: $ST = (1 - I/I_0)$ where I is the intensity of the water signal at a given irradiation frequency and I_0 is the maximum intensity of the water signal (off-resonance pre-saturation). After completion of all this sequence, 2 equivalents of sodium ascorbate were added in the solution. **The complex is then under the “reduced form”**. Spin-lattice relaxation time (T_1) measurement is done to adjust the relaxation time D1 ($>5 \cdot T_1$) between 4 and 15 s. The sequence is then reapplied following the same protocol.

Relaxometry measurement

For Gd complexes of chapter 2, the T_1 values were measured from 20 kHz to 30 MHz using a commercial Spinmaster FFC 2000 Stelar relaxometer (Stelar s.r.l., Mede PV, Italy). The prepolarized (PP) and non-polarized (NP) sequences were used below and above about 12 MHz, respectively. A high polarization field B_{pol} corresponding to a proton resonance frequency of 28 MHz was employed in the PP experiments. For each magnetic field, r_1 was calculated according to the formula $r_1 = (R_1 - R_{10}) / [\text{complex}]$, where R_1 is the relaxation rate measured in the presence of the complex, R_{10} the relaxation rate measured in the absence of complex (typically 0.4 s^{-1}).

DFT calculations

Full geometric optimizations were performed with the Gaussian 9.0 program^[169]. The B3LYP functional^[170,171] was used together with the 6-31g* basis set for the C, H, and N atoms^[172] and a pseudopotential (LanL2DZ)^[173] was used for the central metal ion. Frequency calculations were systematically performed on the optimized structures in order to ensure that they correspond to a real energy minimum and not a saddle point. The relaxed potential energy surface scans were performed by varying dihedral angles.

Cell culture

Human melanoma cell line M21 was purchased from ATCC (Molsheim, France). Cells were cultured in a DMEM medium supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS) and 2 mM glutamine (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). The cells were maintained at 37 °C in a 5% CO₂ – humidified atmosphere and tested to ensure freedom from mycoplasma contamination. All cell lines were used within 5–50 passages of thawing the original stocks.

MTT assay

M21 cells were seeded into 96-well plates (1.5×10^3 cells per well) with 100 µl of culture medium. After 24 hours, the cells were treated with the lanthanide(III) complexes at various concentrations. Following incubation for 24 hours, 48 hours or 72 hours, 10 µl of an MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) stock solution (Euromedex, Mundolsheim, France) in PBS at 5 mg.ml⁻¹ was added to each well and the plates were incubated at 37 °C for 2 h. To solubilize water-insoluble purple formazan crystals, SDS 10%/HCl 0.1% solution was used. After 24 hours, absorbance was measured using an ELISA reader (Tecan, Männedorf, Switzerland) at a test wavelength of 570 nm and a reference wavelength of 650 nm.

Cellular penetration by EPR spectroscopy

M21 cells were seeded in 4-well plates (1×10^5 cells per well) in 1 mL of culture medium. After 24 hours, the cells were treated with the complexes of concentration 200 µM for 5 min, 10 min, 30 min, and 1 hour. The cell culture medium was recovered and the M21 cells were harvested. A fraction of M21 pellets was then washed twice in cold PBS and incubated in lysis buffer (10 mmol.L⁻¹ Tris-HCl pH 7.5, 120 mmol.L⁻¹ NaCl, 1 mmol.L⁻¹ EDTA, mmol.L⁻¹ dithiothreitol, 0.5% Nonidet P-40, 0.05% sodium dodecyl sulfate, and supplementation with protease inhibitors (Na₃VO₄ and NaF). After 10 min on ice, the lysates were centrifuged at 20 000 g for 15 minutes and the soluble fraction was recovered. The cell culture medium, pellets of intact M21 cells and M21 cell lysates were then transferred into capillary (40 µL) and analyzed by EPR spectroscopy at 298 K.

X-ray diffraction

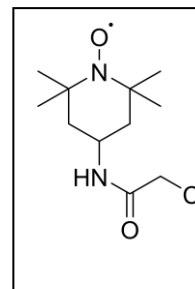
Crystals of Ligand D₂ and compound 57 were selected damped in a paraffin mixture, mounted on a nylon cryo-loop then centered on a Bruker-AXS-enraf-nonius KappaAPEXII goniometer equipped with a high brilliance micro-source at Mo K α radiation ($\lambda = 0.71073$ Å) at 200 K. The data was collected with an APEXII 2D detector, then integrated and corrected

for Lorentz and polarization effects using the EVAL14^[174] software. Final cell parameters were obtained post-refining the whole data. The data was then reintegrated and corrected for absorption using the SADABS^[175] program and finally merged with the software XPREP^[176]. Crystal and data collection details are given in Table 1 (Cf. annexe X-Ray Structure determination). The structure was solved by direct methods and refined by full-matrix least square methods with respectively, the SHELXT-2016 and SHELXL-2013 programs^[177] implemented in Olex2 software.^[178] C, Cl, Br, Na, N, O atoms were refined with anisotropic thermal parameters. H atoms were set geometrically, riding on the carrier atoms, with isotropic thermal parameters.

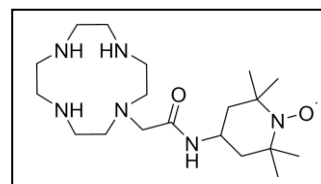
VII.1 MOLECULES DU CHAPITRE 2

4-(2-chloroacetamido)-2',2',6',6',-tetramethylpiperidine-1'-oxyl, free radical (2)^[131,179]

4-(2-chloroacetamido)-2',2',6',6',-tetramethylpiperidine-1'-oxyl is commercially available from TCI. It was synthesized using literature procedure. The analytical data were consistent with published ones^[178].

**1-(2',2',6',6',-tetramethyl-1'-oxyl-4'-piperidyl)-amide-1,4,7,10-Tetraazacyclododecane (4)**

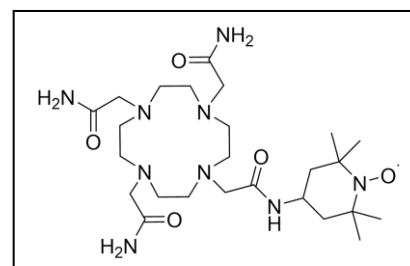
Under argon atmosphere, to a solution of cyclen glyoxal (5) (0.536 g, 2.8 mmol) in THF (10 mL) was added the aminoTEMPO arm (2) (0,750 g, 3.0 mmol, 1.1 eq) in THF (5 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 hours. A precipitate was formed, isolated by filtration and washed with diethyl ether. The resulting solid was dissolved in THF (20 mL) and o-phenylenediamine (0.108 g, 1.0 mmol, 1.1 eq) was added. The mixture was stirred at room temperature for 7 days. The residue was then filtrated and rined with diethyl ether and the desired product was obtained in 33% yield.



¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ = 3.10-2.80 (m br, 16H), 1.80 (d br, J = 12.5 Hz, 2H), 1.46 (t, J = 13.3 Hz, 2H), 1.17 (d, J = 5.6 Hz, 12H); ¹³C NMR (100 MHz, MeOD) δ = 78.5, 62.7, 58.9, 50.3, 44.7, 31.0, 19.2; IR: 3275, 3038, 2975, 2930, 2822, 1653, 1534, 1458, 1362, 1243, 1179, 1112, 929, 731; HRMS (m/z): [M+H]⁺ calcd for C₁₉H₄₀N₆O₂, 384.3207; found, 384.3209.

1-(2',2',6',6',-tetramethyl-1'-oxyl-4'-piperidyl)-amide-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-4,7,10-bisacetamide (Ligand D₁)

The monosubstituted cyclen (4) (0,334 g, 0.87 mmol, 1eq) was dissolved in 20 mL of MeCN. 2-bromoacetamide (0.419 g, 3.0 mmol, 3.5 eq), potassium carbonate (0.420 g, 3,0 mmol, 3.5 eq) and potassium iodide (0.540 g, 3.3 mmol, 3.8 eq) was added. The reaction was stirred at 50°C for 5 days. The solution was filtrated and the filtrate was evaporated under reduced pressure. The product was purified by an alumina column chromatography (EtOH/NH₄OH) to afford the title compound as an orange solid (0.587 g, 99%).



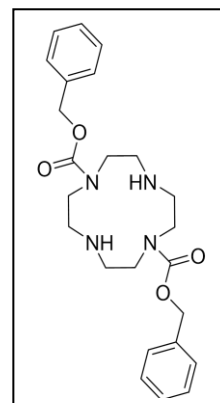
¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ = 4.18 (t, 1H), 3.30-2.10 (br, 24H), 1.94 (d, J = 11.4 Hz, 2H), 1.55 (t, J = 11.6 Hz, 2H), 1.25 (d, J = 13.0 Hz, 12H); ¹³C NMR (125 MHz, D₂O) δ = 177.0, 174.8, 174.7, 145.2, 130.3, 69.8, 69.1, 61.0, 57.6, 56.9, 55.9, 55.7, 17.0; IR: 3375, 3175, 2966, 2836, 1661, 1549, 1457, 1384, 1328, 1284, 1110; HRMS (m/z): [M]⁺ calcd for C₂₅H₄₉N₉O₅, 555.3848; found, 555.3851.

1,7-bis(benzyloxycarbonyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (7)^[109,110].

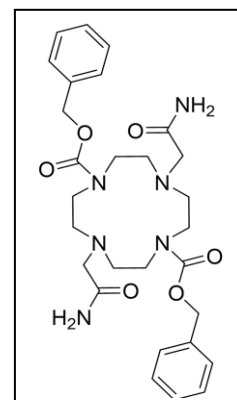
1,7-bis(benzyloxycarbonyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane was synthesized following literature procedure^[109,110]. Under argon atmosphere, diluted benzyl chloroformate (8.2 mL, 56.3 mmol, 1.94 eq) was added dropwise to a solution of cyclen (5.0 g, 29.0 mmol, 1 eq) in CHCl₃ (250 mL) at 0°C. The solution was stirred for 100 min at 60 °C and resulted in the formation of a white precipitate. Solvents were removed under reduced pressure and the solid was washed with diethyl ether. The white solid was dissolved in NaOH (1M, 40 mL), extracted 4 times by 70 mL of dichloromethane and dried over Na₂SO₄. Solvent was removed under reduced pressure to obtain a pale yellow oil without further purification (11.4 g, 89%).

The analytical data were consistent with published ones^[109,110].

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.37–7.28 (m, 10H), 5.15 (s, 4H), 3.48–3.41 (m, 8H), 2.95 (t, J = 4.3 Hz, 2H), 2.86 (dt, J = 4.8 and 13.8 Hz, 4H), 2.76 (t, J = 4.2 Hz, 2H).

**1,7-Bisbenzyloxycarbonyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-4,10-bisacetamide (8)**^[109,110]

1,7-Bisbenzyloxycarbonyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-4,10-bisacetamide was synthesized following literature procedure^[109,110]. The diprotected cyclen (7) (1,914 g, 4.34 mmol, 1 eq) was dissolved in 60 mL of MeCN. 2-bromoacetamide (1.283 g, 9.11 mmol, 2.1 eq), potassium carbonate (2.4 g, 17.4 mmol, 4 eq) and potassium iodide (1.513 g, 9.11 mmol, 2.1 eq) was added. The solution was stirred at 60°C for 20 hours. The reaction was filtered and the filter cake was washed with hot acetonitrile. The solvents were removed in vacuo, and the residue was taken up into dichloromethane and washed with water. The organic layer was dried with Na₂SO₄, and the solvents were removed in vacuo. The solid residue was recrystallized from hot acetonitrile to afford the title compound as a white solid (1,686 g, 70%). The analytical data were consistent with published ones^[109,110].

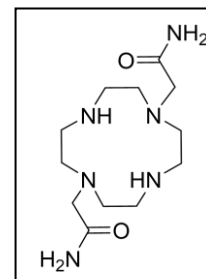


¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.38–7.32 (m, 10H), 5.11 (s, 4H), 3.42 (br, 8H), 3.12 (br, 4H), 2.78 (br, 8H).

1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,7-bisacetamide (9)^[107]

1,7-Bisbenzyloxycarbonyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-4,10-bisacetamide was synthesized following literature procedure^[107].

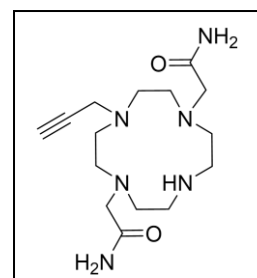
Under argon atmosphere, to a solution of cyclen glyoxal (1.0 g, 5.2 mmol) in MeCN (20 mL) was added bromoacetamide (1.43 g, 10.4 mmol, 1.1 eq). The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 hours. A white precipitate was formed, isolated by filtration and washed with ether. The resulting white solid was dissolved in MeOH (25 mL) and *o*-phenylenediamine (0.620 g, 5.7 mmol, 1.1 eq) was added. The mixture was stirred at room temperature for 18 hours. The solvent was then evaporated and THF was added (25 mL). The solution was stirred for 2 hours and the precipitate was filtrated. Cesium carbonate (2.2 eq) was added in methanol solution and stirred overnight. After filtration the desired product was obtained in 98% yield. The analytical data were consistent with published ones^[107].



¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ = 3.20 (s, 4H), 2.4 (16H).

4-propargyl-1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,7-bisacetamide (12)

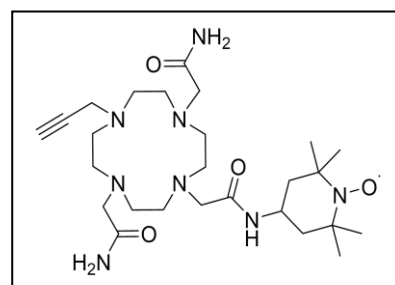
To a solution of (9) (1.31 g, 4.6 mmol) and NaOAc (0.804 g, 9.9 mmol, 1.2 eq) in EtOH (200 mL) was cooling at 0°C. Propargyl bromide (580 μ L, 5.2 mmol, 1.2 eq) in EtOH (100 mL) was added dropwise at 0°C. After the addition was complete, the reaction mixture was allowed to stir for 4 days at 50°C. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was taken up in MeCN and filtered. The solvent was removed under reduced pressure to obtain the title compound as a brown oil (93%).



¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ = 3.45 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 3.38-3.36 (m, 2H), 3.30 (s, 2H), 3.19 (s, 2H), 2.76-2.56 (m, 16H); ¹³C NMR (100 MHz, MeOD) δ = 176.4, 168.2, 77.9, 75.6, 59.2, 53.4, 53.0, 51.3, 46.8, 39.7, 30.7; IR: 3283, 2962, 2842, 2689, 2464, 2062, 1654, 1586, 1457, 1372, 1341, 1118, 973, 758; HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₁₅H₂₉N₆O₂, 325.2347; found, 325.2349.

1-(2',2',6',6'-tetramethyl-1'-oxyl-4'-piperidyl)-amide-4-propargyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,7-bisacetamide (Ligand D₂)

To a solution of (12) (1.39 g, 4.3 mmol, 1 eq), K₂CO₃ (1.18 g, 8.6 mmol, 2 eq) and KI (1.46 g, 8.8 mmol, 2.1 eq) in EtOH (100 mL) was added. Then the aminoTEMPO arm (2) (1.18 g, 4.8 mmol, 1.1 eq). The reaction mixture was stirred for 5 days at 60°C. The solution was filtered on celite, rinsed EtOH and the solvent was removed under reduced pressure.

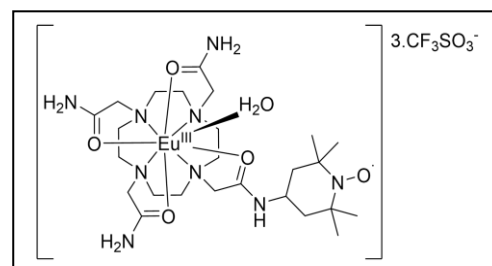


The product was purified by an alumina column chromatography (AcOEt then EtOH/NH₄OH). The solvent was removed under reduced pressure to obtain the title compound as a brown solid (88 %). Slow evaporation of water led to orange crystals which were determined by X-ray crystallography. Reduction with sodium ascorbate was used to characterize the ligand.

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ = 4.63 (s, 1H), 4.53 (s, 2H), 4.22 (t, J = 10.5 Hz, 1H), 3.56 (br s, 8H), 3.02 (s, 16H), 1.94 (d, J = 13.0 Hz, 2H), 1.60 (t, J = 13.0 Hz, 2H), 1.28 (d, J = 16.4 Hz, 12H); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ = 78.4, 69.6, 62.5, 43.1, 29.9, 19.6; IR: 3360, 3283, 3194, 3123, 2977, 2941, 2825, 1653, 1568, 1456, 1363, 1320, 1108, 647; HRMS (m/z): [M+H]⁺ calcd for C₂₆H₄₈N₈O₄, 536.3793; found, 536.3788.

[Eu.D₁][CF₃SO₃]₃ (13)

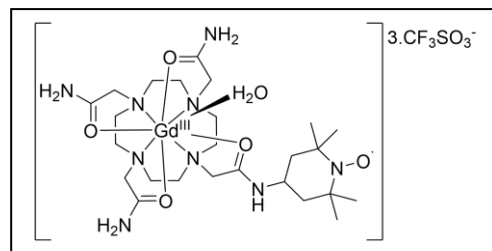
Europium triflate (164 mg, 0.27 mmol, 1eq) was added to a solution of free ligand D₁ (187 mg, 0.27 mmol, 1eq) in water (10 mL) and the pH was adjusted to 7 with 1M aqueous NaOH. The solution was agitated at 50°C for 1 day. The solvents were removed under reduced pressure and the solid was dissolved in a minimum amount of methanol precipitated with ether. The yellow solid was then dissolved in acetonitrile, filtrated and solvent was evaporated to obtain an orange powder in 49% yield.



IR: 3354, 3197, 2987, 1658, 1628, 1590, 1459, 1391, 1242, 1225, 1173, 1079, 1027, 639; MS-ESI (m/z): calcd for C₂₅H₄₈N₉O₅Eu + C₂F₆S₂O₆ [M+2 CF₃SO₃]⁺: 1005,20 ; found, 1005,18.

[Gd.D₁][CF₃SO₃]₃ (14)

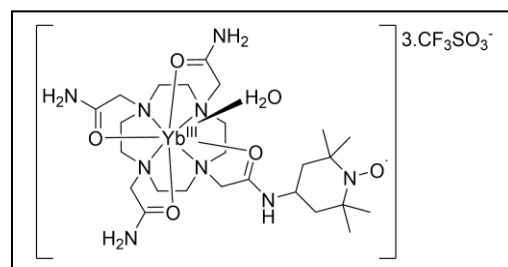
Gadolinium triflate (34 mg, 0.06 mmol, 1 eq) was added to a solution of free ligand D₁ (30 mg, 0.06 mmol, 1eq) in water (10 mL) and the pH was adjusted to 7.7 with 1M aqueous NaOH. The solution was agitated at 50°C for 24h. The solvents were removed under reduced pressure and the solid was dissolved in a minimum amount of methanol and precipitated with ether. The yellow solid was then dissolved in acetonitrile, filtrated and solvent was evaporated to obtain an orange powder in 37% yield.



IR: 3367, 3291, 3208, 2984, 2939, 2876, 1661, 1627, 1458, 1245, 1169, 1027, 634; **HRMS** (m/z): [M+H]⁺ calcd for C₂₅H₄₉N₉O₅Gd+ CF₃SO₃ [M+CF₃SO₃]²⁺ 431.1303; found, 431.1309.

[Yb.D₁][CF₃SO₃]₃ (15)

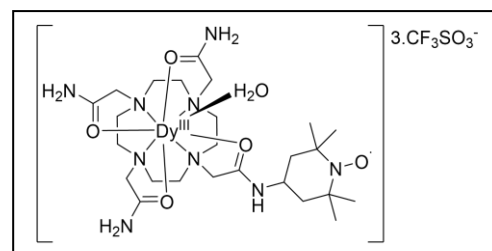
Ytterbium triflate (93 mg, 0.15 mmol, 1eq) was added to a solution of free ligand D₁ (100 mg, 0.15 mmol, 1eq) in water (10 mL) and the pH was adjusted to 7 with 1M aqueous NaOH. The solution was agitated at 50°C for 1 day. Water was evaporated under reduced pressure. The yellow solid was dissolved in a minimum amount of methanol and precipitated in diethyl ether. The yellow solid was then dissolved in acetonitrile, filtrated and solvent was evaporated to obtain an orange powder in 100% yield.



¹H NMR (400 MHz, D₂O) Due to the paramagnetism induced by the lanthanide only few resonances (broad) can be observed: δ = 97.71, 94.42, 92.95, 19.51, 18.21, 16.86, 16.65, 15.97, 15.80, 15.24, 14.86, 12.31, 8.56, 4.12, 3.73, 1.57, 1.48, 0.13, -1.71, -24.16, -25.80, -26.42, -29.00, -31.27, -34.80, -53.92, -57.43, -58.00; **IR:** 3361, 2981, 2927, 2867, 1667, 1626, 1458, 1323, 1246, 1161, 1083, 1030, 924, 668, 639; **MS-ESI** (m/z): calcd for C₂₅H₄₉N₉O₅Yb + CF₃SO₃ [M+CF₃SO₃]²⁺: 439.14; found, 440.77.

[Dy.D₁][CF₃SO₃]₃ (16)

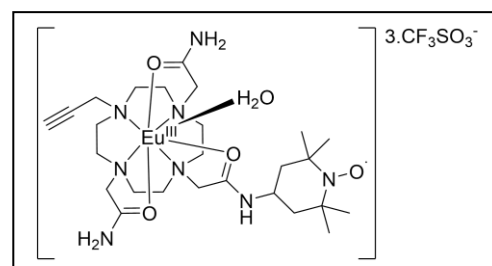
Dysprosium triflate (92 mg, 0.15 mmol, 1 eq) was added to a solution of free ligand D₁ (100 mg, 0.15 mmol, 1eq) in water (10 mL) and the pH was adjusted to 7 with 1M HCl solution. The solution was agitated at 50°C for 1 day. The solvents were removed under reduced pressure and the solid was dissolved in a minimum amount of methanol and precipitated with ether. The yellow solid was then dissolved in acetonitrile, filtrated and solvent was evaporated to obtain an orange powder in 27% yield.



¹H NMR (400 MHz, D₂O) Due to the paramagnetism induced by the lanthanide only few resonances (broad) can be observed: $\delta = 18.1, -2.6, -18.3$; **IR**: 3331, 3172, 2982, 1655, 1621, 1588, 1454, 1403, 1322, 1272, 1244, 1080, 632. **ESI-MS** (m/z): calcd for C₂₅H₄₈N₉O₅Dy; [M]⁺: 718.31; found, 718.31.

[Eu.D₂][CF₃SO₃]₃ (17)

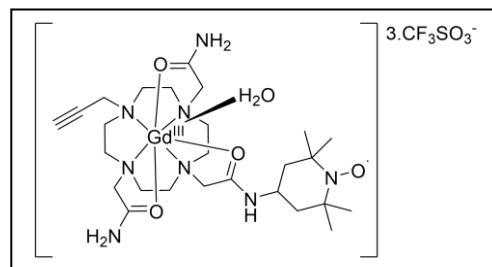
Europium triflate (272 mg, 0.45 mmol, 1eq) was added to a solution of free ligand D₂ (300 mg, 0.45 mmol, 1eq) in water (20 mL) and the pH was adjusted to 6.5 with 1M aqueous NaOH. The solution was agitated at 50°C for 2 days. Water was evaporated under reduced pressure and the residue was solubilized in a minimum amount of methanol, precipitated in ether and centrifuged. Orange powder was obtained in 83% yield.



¹H NMR (400 MHz, MeOD) Due to the paramagnetism induced by the lanthanide only few resonances (broad) can be observed: $\delta = 18.3, -2.5, -6.4, -7.5, -9.4, -11.2, -12.8, -15.6, -17.0$; **¹⁹F NMR** (375 MHz, MeOD) $\delta = -78.9$; **IR**: 3369, 3244, 2958, 1667, 1606, 1454, 1233, 1172, 1029, 647; **ESI-MS** (m/z): calcd for C₂₆H₄₇N₈O₄Eu; [M]³⁺: 229.43; found, 229.39.

[Gd.D₂][CF₃SO₃]₃ (18)

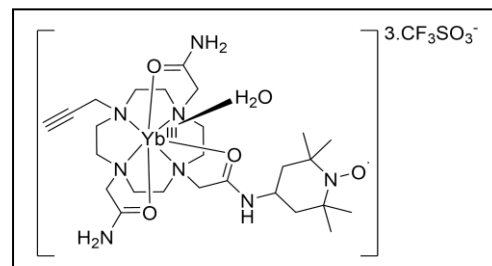
Gadolinium triflate (274 mg, 0.45 mmol, 1eq) was added to a solution of free ligand D₂ (300 mg, 0.45 mmol, 1eq) in water (20 mL) and the pH was adjusted to 6.5 with 1M aqueous NaOH. The solution was agitated at 50°C for 2 days. Water was evaporated under reduced pressure and the residue was solubilized in a minimum amount of methanol, precipitated in ether and centrifuged to obtain an orange powder (84%).



IR (cm⁻¹): 3379, 3257, 2972, 2868, 1664, 1615, 1455, 1167, 1080, 1019, 632; Effective magnetic moment (μB), calculated: 7.94; found = 7.52 (See annexe "Méthode d'Evans").

[Yb.D₂][CF₃SO₃]₃ (19)

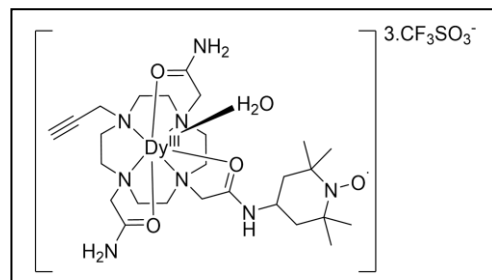
Ytterbium triflate (281 mg, 0.45 mmol, 1eq) was added to a solution of free ligand D₂ (300 mg, 0.45 mmol, 1eq) in water (20 mL) and the pH was adjusted to 6.5 with 1M aqueous NaOH. The solution was agitated at 50°C for 2 days. Water was evaporated under reduced pressure and the residue was solubilized in a minimum amount of methanol, precipitated in ether and centrifuged to obtain an orange powder (96%).



¹H NMR (500 MHz, MeOD) Due to the paramagnetism induced by the lanthanide only few resonances (broad) can be observed: δ = 77.8, 65.8, 57.9, 46.5, 36.9, 22.4, -5.3, -15.7, -17.4, -32.5, -53.2, -83.1; **¹⁹F NMR** (375 MHz, D₂O) δ = -78.6; **IR**: 3376, 3270, 2975, 2945, 2876, 1670, 1627, 1463, 1243, 1150, 1081, 1028; **ESI-MS** (m/z): calcd for C₂₆H₄₇N₈O₄Yb + C₄F₁₂S₄O₁₂; [M+4 CF₃SO₃]⁻: 1305.12; found [M+4 CF₃SO₃]⁺: 1304.89.

[Dy.D₂][CF₃SO₃]₃ (20)

Dysprosium triflate (274 mg, 0.45 mmol, 1eq) was added to a solution of free ligand D₂ (300 mg, 0.45 mmol, 1eq) in water (20 mL) and the pH was adjusted to 6.5 with 1M aqueous NaOH. The solution was agitated at 50°C for 2 days. Water was evaporated under reduced pressure and the residue was solubilized in a minimum amount of methanol, precipitated in ether and centrifuged to obtain an orange powder (87%).

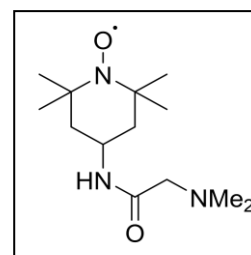


IR (cm⁻¹): 3364, 3274, 2969, 2874, 1667, 1618, 1459, 1246, 1174, 1079, 1024, 635; **¹⁹F NMR** (375 MHz, D₂O) $\delta = -77.9$; **¹H NMR** (500 MHz, D₂O) Due to the paramagnetism induced by the lanthanide only few resonances (broad) can be observed: $\delta =$ no signal.

4-(2-N-dimethylamine)-2',2',6',6',-tetramethylpiperidine-1'-oxyl, free radical (21)^[180]

4-(2-N-dimethylamine)-2',2',6',6',-tetramethylpiperidine-1'-oxyl, free radical was synthesized using literature procedure^[180].

To a solution of 2 (0.076 g, 0.31 mmol) in MeOH (8 mL) was added NHMe₂ (160 μ L, 0.32 mmol, 1 eq), 2M in MeOH. The solution was then stirred for 5 days at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure. The product was purified by DCVC (dichloromethane /cyclohexane; from 50/50 to 100% and then dichloromethane/MeOH 5%). The solvent was removed under reduced pressure to obtain the title compound as a red solid (38%).

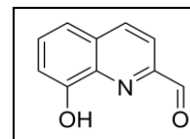


The analytical data were consistent with published ones^[180].

VII.2 MOLECULES DU CHAPITRE 3

8-Hydroxyquinoline-2-carboxaldehyde^[181] (23)

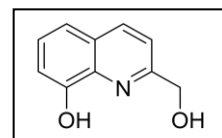
Hydroxyl-2-methylquinoline (5 g, 31 mmol, 1eq) and selenium dioxide (3.9 g, 35 mmol, 1.1 eq) was added in 1,4-dioxane (220 mL). The mixture was stirred and heated at 80°C for 48 hours. After consumption of the starting material and controlled by CCM (Eluent: cyclohexane/AcOEt, 80/20, v/v), the mixture was filtered on celite and the solvents were removed under reduced pressure. The red solid was used without further purification, afforded compound 23 (5.079 g, 92%). The analytical data were consistent with published ones^[181].



¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) = 10.22 (CHO, s, 1H), 8.32 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 8.05 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.62 (dd, J = 8.05 Hz, J = 8.02 Hz, 1H), 7.43 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.28 (d, J = 7.9 Hz, 1H).

2-Hydroxymethyl-8-hydroxyquinoline^[139] (24)

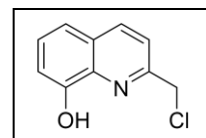
2-formyl-8-hydroxyquinoline (5 g, 0.029 mol) was dissolved in methanol (150 mL) and added to a solution of NaBH₄ in MeOH (150 mL) at 0°C. After 1 hour, 0.5 equivalent (0.820 g) of NaBH₄ was added and the solution was stirred overnight. The total reduction was checked by TLC (Eluent: AcOEt/Cyclohexane, 1:1). The solvent was removed under vacuum and water was added. Neutralization of the basic solution was performed with 1M HCl solution. The solution was extracted with ethyl acetate, dried over MgSO₄ and the solvent evaporated. The desired product was obtained in 92% yield. The analytical data were consistent with published ones^[139].



¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) = 8.15 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.45 (dd, J = 8.02 Hz, J = 7.86 Hz, 1H), 7.38 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.34 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.21 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.97 (s, 2H).

2-Chloromethyl-8-hydroxyquinoline (25)^[139]

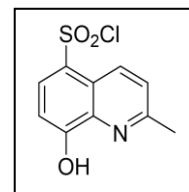
Thionyl chloride (8.3ml) was added slowly under stirring at (24) (525 mg, 3.0 mmol) cooled at 0°C with an ice bath. The solution was stirred for 30h at room temperature and then dropped in an erlenmeyer with water and ice under vigorous magnetic stirring, thus neutralized with aqueous solution of sodium hydroxide. The aqueous phase was extracted with dichloromethane. The organic phase was collected, dried over sodium sulphate and the solvent removed under vacuum. After evaporation of the solvents, the desired product was obtained in 81% yield (470 mg, 2.43 mmol). The analytical data were consistent with published ones^[139].



¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ (ppm) = 8.19 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 8.07 (s, 1H, OH), 7.61 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.47 (dd, J = 8.07 Hz, J = 7.83 Hz, 1H), 7.34 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.19 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 4.83 (s, 2H).

8-Hydroxy-2-methyl-quinoline-5-sulfonyl chloride^[140] (26)

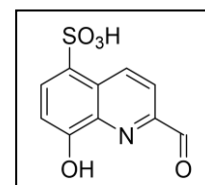
8-Hydroxy-2-methyl-quinoline (2,0 g, 12.6 mmol, 1eq) was dissolved in neat chlorosulfonic acid (10 mL). The solution was stirred at 25°C for 2.5 hours. 40 mL of dichloromethane was added to the reaction and the mixture was added in a separatory funnel containing ice in brine (100 mL) and 250 mL of dichloromethane. The layers are shaken briefly and the organic layer runs into a flask containing K₂CO₃. The solution was filtered and solvent was removed under reduced pressure. A yellow powder was obtained (1.38 g, 43%) and used without further purification. The analytical data were consistent with published ones^[140].



¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) = 8.97 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 8.30 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.19 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 2.81 (s, 3H).

2-Formyl-8-hydroxyquinoline-5-sulfonic acid^[141] (27)

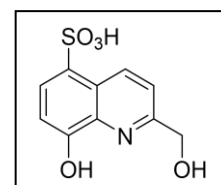
8-Hydroxy-2-methyl-quinoline-5-sulfonyl chloride (1,38 g, 5.4 mmol, 1eq) was dissolved in 1,4-dioxane (70 mL). Selenium dioxide (0.659 g, 5.9 mmol, 1.1 eq) was added to the solution and stirred at reflux for 18 hours. After cooling, the selenium precipitate was filtered through a pad of celite and the solvent was evaporated to dryness. The residue was suspended in a mixture of acetone and water (50/50, 20 mL) and stirred for 2 hours. The solution was then filtrated through celite, rinsed with acetone and water and the solvent was removed under reduced pressure. The desired product was obtained in 63% yield. The analytical data were consistent with published ones^[141].



¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) = 10.14 (s, 1H, CHO), 9.30 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 8.02 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.99 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.11 (d, J = 8.0 Hz, 1H).

2-hydroxymethyl-8-hydroxyquinoline-5-sulfonic acid (28)

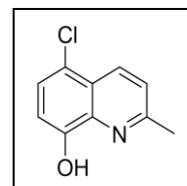
NaBH₄ was added to a solution of 2-Formyl-8-hydroxyquinoline-5-sulfonic acid (0,101 g, 0.4 mmol, 1eq) in methanol (20 mL) at 0°C. The solution was stirred overnight at room temperature. Water was added to neutralize the basic solution but compound was only soluble in aqueous medium. Mixture of compounds was obtained.



¹H NMR (D₂O, 400 MHz): δ (ppm) = 8.99 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.04 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.99 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.09 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.91 (s, 2H).

5-Chloro-8-hydroxy-2-methylquinoline^[143] (30)

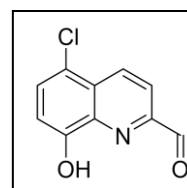
Iodine trichloride (5g, 21.4mmol) in HCl 37% (40 mL) was added dropwise to a solution of 8-hydroxy-2-methylquinoline (3.28g, 20mmol) in HCl 37% (5mL) with stirring. The reaction was stirred for 30 minutes and the yellow solid filtered and dried. The product was then stirred in H₂O (70 mL) for 45 min. The mixture was purified using DCVC chromatography (Eluent from cyclohexane and increasing gradually AcOEt; 5% steps and then acetone). After evaporation of the solvents, the 5-chloro-7-iodo-8-hydroxy-2-methylquinoline was heated to reflux for 5 hours in a solution of triethylamine (15 mL). The solvent was removed in vacuo, and the product was purified via DC-VC column chromatography (Eluent: cyclohexane/AcOEt, 5% steps) to obtained mixture of compound in 34% yields (2 steps). The analytical data were consistent with published ones^[143].



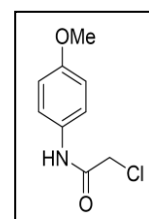
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.36 (d, 1H, J = 8.6 Hz), 7.39 (d, 1H, J = 8.6 Hz), 7.04 (d, 1H, J = 8.4 Hz), 2.73 (s, 3H).

2-Formyl-5-chloro-8-hydroxyquinoline (31)^[143]

5-Chloro-8-hydroxy-2-methylquinoline (0.38 g, 2.0 mmol, 1eq) was dissolved in 1,4-dioxane (22 mL). Selenium dioxide (0.252 g, 2.3 mmol, 1.2 eq) was added to the solution and stirred at 60°C for 48 hours. After cooling, the solvent was evaporated to dryness and redissolved in dichloromethane, the selenium precipitate and was filtered through a pad of celite. The solvent was removed under reduced pressure. Compound (31) was isolated a yellow salt (130 mg). The analytical data were consistent with published ones^[143] but present some paramagnetic impurities.

**2-Chloro-N-(4-methoxyphenyl)acetamide^[41] (33)**

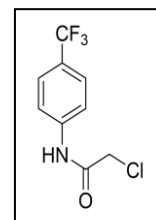
2-chloroacetyl chloride (5 mL, 63 mmol) was dissolved in acetonitrile (50 mL), then added dropwise to a cooled, stirred solution of *p*.anisidine (5,05 g, 63 mmol) in acetonitrile (150 mL) containing K₂CO₃ (11.05 g, 80 mmol). The mixture was stirred at room temperature overnight. The solvents were removed in vacuo, and the residue was recrystallized in methanol to obtain blue/violet crystals of compound (33) in 69% yield (5.6 g). The analytical data were consistent with published ones^[41].



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8.14 (NH), 7.44 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.88 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 4.18 (s, 2H), 3.80 (s, 3H).

2-Chloro-N-(4-trifluoromethylphenyl)acetamide^[182] (35)

2-chloroacetyl chloride (2.4 mL, 30 mmol, 1.2 eq) was dissolved in dichloromethane (40 mL), then added dropwise to a cooled, stirred solution of paratrifluoromethyl aniline (3.2 mL, 26 mmol, 1 eq) in dichloromethane (75 mL) containing NaHCO₃ (5,25g, 62,5 mmol, 2,4 eq). The mixture was stirred at room temperature for 4 hours. Water was added and the product was extracted with dichloromethane, dried on Na₂SO₄ and solvents were removed to obtain (35) as a white/pink powder in 90% yield (5.4 g). The analytical data were consistent with published ones^[182].

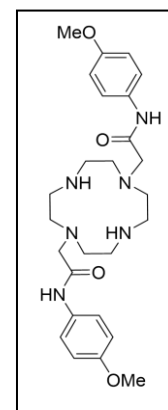


¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8.40 (NH), 7.69 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.61 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 4.21 (s, 2H); ¹⁹F NMR (375 MHz, CDCl₃) δ = -62.3.

1,7-(N-(4-methoxyphenyl)acetamide)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (36)

To a solution of (33) (1.020 g, 0.52 mmol) in MeCN (10 mL) was added slowly a solution of glyoxal cyclen (5) in 6 mL of MeCN (0.500 g, 0.26 mmol). KI (1.71 g, 10.3 mmol, 4 eq) was next added. The mixture was stirred at room temperature for 6 days. The precipitate salt was removed by filtration and a white powder of the bisaminal ammonium salt was obtained in quantitative yield.

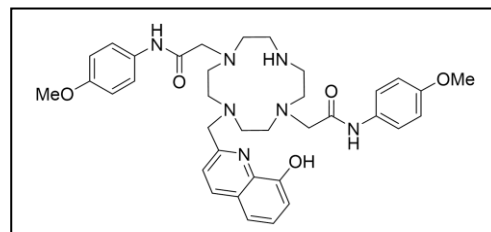
A solution of PDA (1.1 equiv) and the bisaminal ammonium salt (1 equiv), in MeOH was stirred for 1 week under argon. The reaction was filtered and the solvents were removed in vacuo. The red oil was purified using DCVC chromatography. (Eluent from cyclohexane 100%, cyclohexane/dichloromethane; 50/50; v/v, to MeOH 100%). Compound (36) is obtained after evaporation of solvents in 100% yield (1.303 g) as a pale yellow solid.



¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ = 7.40 (d, J = 8.7 Hz, 4H), 6.67 (d, J = 8.7 Hz, 4H), 3.70 (s, 6H), 3.62 (s, 4H), 3.35-3.28 (cyclen); ¹³C NMR (100 MHz, MeOD) δ = 210.1, 170.7, 157.9, 132.3, 122.9, 114.9, 56.2, 55.9, 51.3, 44.4, 24.2; IR: 3419, 3246, 3046, 2935, 2834, 2766, 1652, 1601, 1537, 1508, 1442, 1414, 1300, 1236, 1025, 830; HRMS (m/z): calcd for C₂₆H₃₈O₄N₆ [M+H]⁺: 499.30273; found, 499.30200.

1,7-(N-(4-methoxyphenyl)acetamide)-4-(N-(2-methyl-8-hydroxyquinoline)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (37)

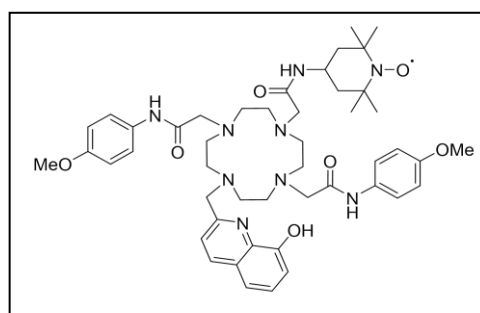
To a solution of (36) (0.504 g, 0.8 mmol) in EtOH (50 mL) containing NaOAc (0.261 g, 3.2 mmol, 4 eq) was added 2-chloromethyl-8-hydroxyquinoline (0.185 g, 0.95 mmol). The mixture was then flushed with argon and stirred at 50°C for 4 days. The solvents were removed in vacuo and the mixture was purified using alumina column chromatography. (Eluent from dichloromethane 100%, dichloromethane/MeOH; 50/50; v/v). After evaporation of the solvents, the mixture was dissolved in MeCN and HCl was added. Compound (37) is obtained after filtration in 14% yield as a brown solid.



$^1\text{H NMR}$ (MeOD, 400 MHz): δ (ppm): 8.10 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.50 (dd, $J = 7.85$ Hz, $J = 7.94$ Hz, 1H), 7.36 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.22 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.07 (d, $J = 9.0$ Hz, 4H), 6.43 (d, $J = 9.0$ Hz, 4H), 3.70 (s, 2H), 3.64 (s, 6H), 3.63-3.58 (m, 4H), 3.30-2.87 (br, 16H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, MeOD) $\delta = 170.4, 157.6, 153.8, 151.0, 139.5, 139.4, 132.1, 130.4, 129.5, 123.4, 122.4, 120.2, 120.1, 114.7, 114.4, 59.3, 58.3, 55.7, 55.6, 51.2, 50.6, 44.0, 18.4$; IR: 3478, 3408, 3211, 2924, 2853, 1655, 1605, 1545, 1510, 1457, 1374, 1239, 1172, 1090; HRMS (m/z): calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{46}\text{O}_5\text{N}_7$ [M+H] $^+$: 656.35549; found, 656.35441.

1,7-(N-(4-methoxyphenyl)acetamide)-4-(N-(2-methyl-8-hydroxyquinoline)-10-(N-(2',2',6',6'-tetramethyl-1'-oxyl-4'-piperidyl)-amide)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (Ligand D₃)

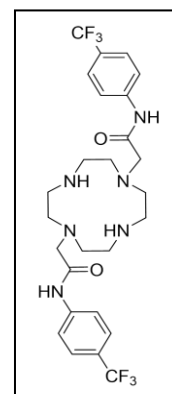
To a solution of (37) (0.200 g, 0.8 mmol) in EtOH (25 mL) containing K_2CO_3 (0.168 g, 1.2 mmol, 4 eq) and KI (0.099 g, 0.6 mmol, 2 eq) was added the aminoTEMPO arm (2) (0.152 g, 0.62 mmol, 2 eq). The mixture was stirred at 60°C for 4 days. After filtration through celite, the solvents were removed in vacuo and the mixture was purified using DCVC column chromatography. (Eluent from dichloromethane 100% to dichloromethane/MeOH; 50/50; v/v, by 5% steps). Ligand D₃ is obtained after evaporation of solvents in 36% yield as an orange solid.



$^1\text{H NMR}$ (MeOD, 400 MHz) = Even after reduction, due to the paramagnetism induced by the nitroxide only few resonances (broad) can be observed; EPR (MeOH): $g_{\text{iso}} = 2,006$, $A_{\text{N}} = 1,6$ mT; IR: 3404, 3211, 2977, 2920, 2852, 2538, 1642, 1618, 1561, 1511, 1460, 1430, 1372, 1245, 1172, 1084, 1032.

1,7-(N-(4-trifluoromethyl)acetamide)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (38)

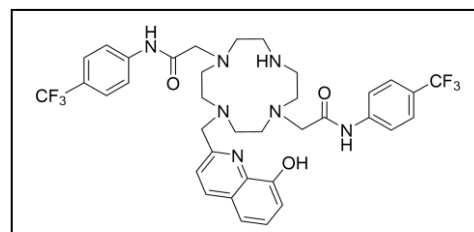
To a solution of glyoxal (0.700 g, 3.6 mmol) in MeCN (50 mL) was added (35) (1.71 g, 7.2 mmol) and KI (1.20 g, 7.2 mmol, 2 eq). The mixture was stirred at room temperature for 9 days. The precipitate was removed by filtration rinsed with diethyl ether and dissolved in MeOH (40 mL). *o*-PDA (1.3 equiv) was added in the previous solution and stirred for 5 days. Upon completion, the solvents were removed and the red oil was dissolved in THF (40 mL) and stirred overnight. The precipitate was filtrated to afford compound (38) in 72% yield.



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ = 7.69 (d, J = 8.5 Hz, 4H), 7.30 (d, J = 8.7 Hz, 4H), 3.71 (s, 4H), 3.31-2.89 (m br, 16H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, MeOD) δ = 171.8, 142.8, 126.9, 120.7, 68.9, 56.4, 51.4, 44.4, 26.5, 24.2; $^{19}\text{F NMR}$ (375 MHz, MeOD) δ = -63.8; **IR**: 3690, 3443, 3342, 3166, 3024, 2920, 2831, 2771, 1686, 1644, 1617, 1583, 1528, 1412, 1322, 1254, 1164, 1104, 1065, 1015, 938, 841; **HRMS** (m/z): calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{F}_6\text{N}_6\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 575.25637; found, 575.25446.

1,7-(N-(4-trifluoromethylphenyl)acetamide)-4-(N-(2-methyl-8-hydroxyquinoline)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (39)

To a solution of (38) (1.031 g, 1.9 mmol) in EtOH (150 mL) containing NaOAc (0.610 g, 7.5 mmol, 4 eq) and KI (0.315 g, 1.9 mmol, 1 eq) was added 25 (0.405 g, 2.1 mmol, 1.1 eq). The mixture was then flushed with argon and stirred at 75°C for 21 days. The solvents were removed in vacuo, solubilized in MeCN and filtrated through celite.

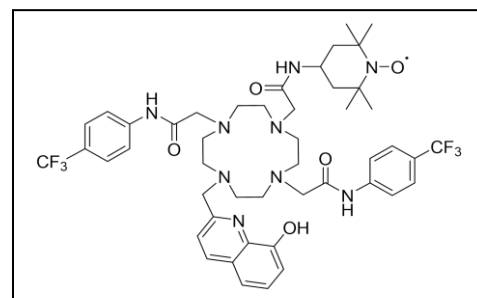


The mixture was purified using DCVC column chromatography. (Eluent from dichloromethane 100%, dichloromethane/MeOH; 85/15; v/v) by 1% steps. Compound (39) is obtained after evaporation of the solvents in 14% yield as a brown solid.

$^1\text{H NMR}$ (MeOD, 500 MHz): δ (ppm): 8.39 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 8.5 Hz, 4H), 7.55 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.46 (dd, J = 9.5 Hz, J = 8.5 Hz, 4H), 7.29 (dd, J = 8.05 Hz, J = 7.98 Hz, 1H), 7.03 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 3.99 (s, 2H), 3.53 (s, 4H), 3.13-2.5 (m cyclen, 16H). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, MeOD): not enough signal; $^{19}\text{F NMR}$ (100 MHz, MeOD) δ = -63.4; **IR**: 3486, 3414, 3237, 2988, 2857, 2359, 1670, 1606, 1543, 1414, 1320, 1163, 1112, 1088, 1066, 1014, 966, 838; **HRMS** (m/z): calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{O}_3\text{N}_7\text{F}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 732.30913; found, 732.30877.

1,7-(N-(4-trifluoromethylphenyl)acetamide-4-(N-(2-methyl-8-hydroxyquinoline)-10-(N-(2',2',6',6'-tetramethyl-1'-oxyl-4'-piperidyl)-amide-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (Ligand D₄))

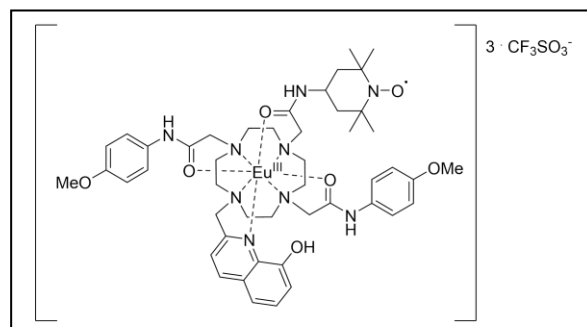
The aminoTEMPO arm (2) (0.148 g, 0.57 mmol, 2eq) was added to a solution of 39 (0.210 g, 0.29 mmol) in EtOH (25 mL) containing K₂CO₃ (0.162 g, 1.2 mmol, 4 eq) and KI (0.098 g, 0.57 mmol, 2 eq). The mixture was stirred at 60°C for 4 days. After filtration through celite, the solvents were removed in vacuo and the mixture was purified using DCVC column chromatography. (Eluent from dichloromethane 100% to dichloromethane/MeOH; 50/50; v/v, by 5% steps). Ligand D₄ is obtained after evaporation of solvents in 76% yield as a brown solid.



¹H NMR (MeOD, 400 MHz) = Even after reduction, due to the paramagnetism induced by the nitroxide only few resonances (broad) can be observed; ¹⁹F NMR (100 MHz, MeOD) δ = -62.1, -63.2; EPR (MeOH): g_{iso} = 2,006, A_N = 1,6 mT; IR: 3484, 3422, 3214, 2974, 2933, 2853, 1649, 1606, 1548, 1454, 1323, 1163, 1114, 1067.

[Eu.D₃][CF₃SO₃]₃ (40)

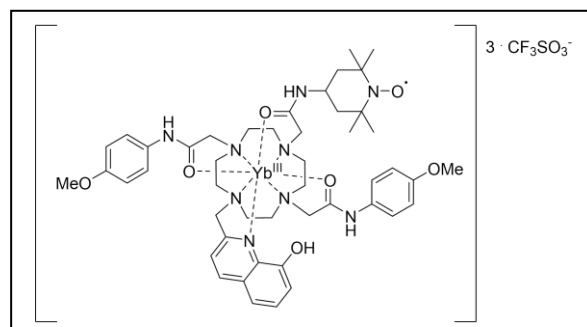
Europium triflate (0.029 g, 0.048 mmol, 1.05 eq) was added to a solution of ligand D₃ (0.040 g, 0.047 mmol) in a mixture of 1,4-dioxane and water 7/5 (13 mL). The solution was stirred and heated at 60°C for 6 days. The solvents were evaporated under reduced pressure, dissolved in minimum of MeOH, precipitated using diethyl ether and centrifuged to obtain (40) as an orange powder in 59% yield.



¹H NMR (400 MHz, MeOD) Due to the paramagnetism induced by the lanthanide only few resonances (broad) can be observed: δ = 8.51, 7.67, 7.48, 6.90, 6.50, 3.78, 1.47, 1.17; ¹⁹F NMR (375 MHz, D₂O) δ = -79.6; IR: 3393, 3257, 3078, 2972, 2850, 2322, 1616, 1511, 1451, 1275, 1243, 1224, 1172, 1029, 838, 638.

[Yb.D₃][CF₃SO₃]₃ (41)

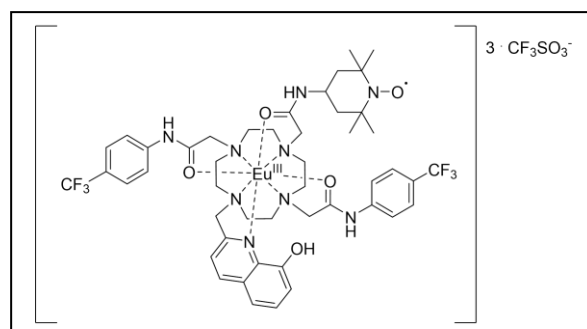
Ytterbium triflate (0.030 g, 0.048 mmol, 1.05 eq) was added to a solution of ligand D₃ (0.040 g, 0.046 mmol) in a mixture of 1,4-dioxane and water 7/5 (13 mL). The solution was stirred and heated at 60°C for 4 days. The solvents were evaporated under reduced pressure, dissolved in minimum of MeOH, precipitated using diethyl ether and centrifuged to obtain (41) as a grey powder in 65% yield.



¹H NMR (500 MHz, MeOD) Due to the paramagnetism induced by the lanthanide only few resonances (broad) can be observed: $\delta = 8.55, 7.74, 7.63, 7.54, 6.89, 2.19, 2.02, 1.89, 1.29, 1.17, 1.02, 0.90, 0.10$; **¹⁹F NMR** (375 MHz, D₂O) $\delta = -79.7$; **IR**: 3468, 3232, 1604, 1555, 1512, 1448, 1414, 1258, 1233, 1172, 1035, 633.

[Eu.D₄][CF₃SO₃]₃ (42)

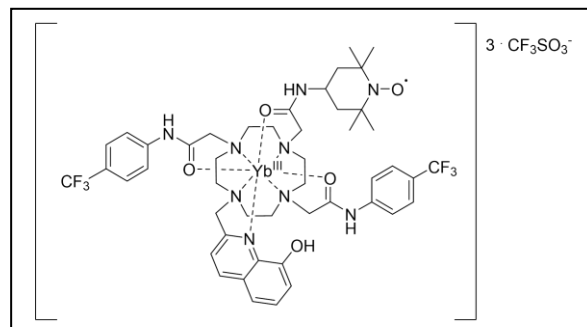
Europium triflate (0.040 g, 0.066 mmol, 1.05 eq) was added to a solution of ligand D₄ (0.060 g, 0.064 mmol) in a mixture of 1,4-dioxane and water 7/5 (13 mL). The solution was stirred and heated at 60°C for 5 days. The solvents were evaporated under reduced pressure, dissolved in minimum of MeOH, precipitated using diethyl ether and centrifuged to obtain (42) as a grey powder in 68% yield.



¹H NMR (400 MHz, MeOD) Due to the paramagnetism induced by the lanthanide only few resonances (broad) can be observed: $\delta = 8.91, 8.50, 8.10, 7.62, 7.39, 2.47, 2.01, 1.52, 1.46, 1.29, 1.17, 0.90, 0.09$; **¹⁹F NMR** (375 MHz, D₂O) $\delta = -62.1, -63.2, -64.3, -79.7$; **IR**: 3396, 2977, 2877, 1630, 1606, 1518, 1412, 1324, 1291, 1247, 1168, 1118, 1072, 1030, 847, 635.

[Yb.D₄][CF₃SO₃]₃ (43)

Ytterbium triflate (0.041 g, 0.066 mmol, 1.05 eq) was added to a solution of ligand D₄ (0.060 g, 0.064 mmol) in a mixture of 1,4-dioxane and water 7/5 (13 mL). The solution was stirred and heated at 60°C for 5 days. The solvents were evaporated under reduced pressure, dissolved in minimum of MeOH, precipitated using diethyl ether and centrifuged to obtain (43) as a grey powder in 66% yield.

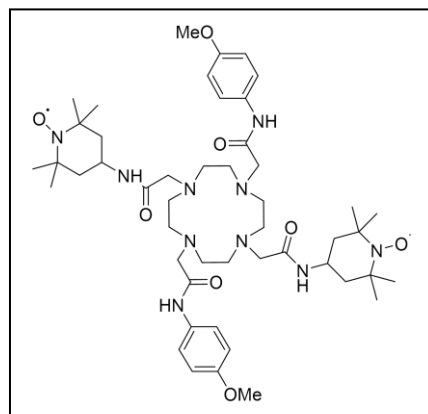


¹H NMR (400 MHz, MeOD) Due to the paramagnetism induced by the lanthanide only few resonances (broad) can be observed: $\delta = 8.90, 8.48, 8.11, 7.88, 7.67, 2.04, 1.54, 1.47, 1.30, 0.90, 0.10$; **¹⁹F NMR** (375 MHz, D₂O) $\delta = -63.2, -79.6$; **IR**: 3405, 2981, 2890, 1627, 1607, 1555, 1448, 1412, 1391, 1324, 1275, 1247, 1170, 1121, 1067, 1030, 844, 641.

VII.3 MOLECULES DU CHAPITRE 4

1,7-(N-(4-methoxyphenyl)acetamide)-4,10-(N-(2',2',6',6'-tetramethyl-1'-oxyl-4'-piperidyl)-amide-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (Ligand D₅)

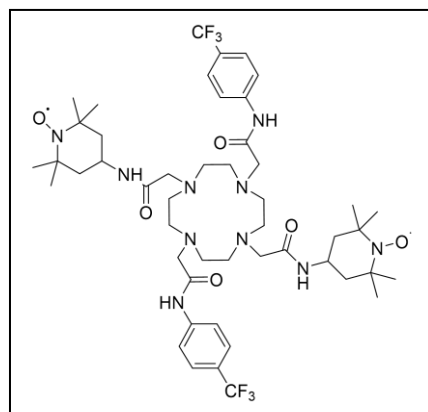
The aminoTEMPO arm (2) (0.525 g, 2.1 mmol) was added to a solution of 36 (0.637 g, 1 mmol) in MeCN (50 mL) containing K₂CO₃ (0.552 g, 4 mmol, 4 eq) and KI (0.664 g, 4 mmol, 4 eq). The mixture was then stirred at 60°C for 3 days. The solvents were removed in vacuo and the mixture was purified using DCVC chromatography. (Eluent from dichloromethane 100%, dichloromethane/MeOH; 50/50; v/v). Ligand D₅ is obtained after evaporation of solvents in 29% yield as an orange solid. Reduction with sodium ascorbate was used to characterize the ligand by NMR spectroscopy (the NMR spectrum of D₅ was too broad to identified clearly the resonances).



¹H NMR (400 MHz, MeOH) δ = 7.53 (s, 4H), 6.84 (s, 4H), 4.12 (br, 2H), 3.75 (s, 6H), 3.2-2.0 (br, 24H), 1.74 (s, 4H), 1.34 (s, 4H), 1.2-0.9 (br, 17H instead of 24H, presumably due to a poor integration of the broad nitroxide resonances); **¹³C NMR** (125 MHz, CDCl₃) δ = 206.5, 157.4, 70.1, 62.7, 58.0, 53.2, 31.4, 30.5, 29.2, 22.2, 18.1, 13.6, 13.4, 0.47; **IR**: 3406, 3229, 3085, 2974, 2927, 2861, 1615, 1574, 1504, 1462, 1363, 1323, 1239, 1177, 1084, 1025, 959, 833; **HRMS** (m/z): calcd for C₄₈H₇₇O₈N₁₀ [M]⁺: 921.59204; found, 921.59137; **Elemental analysis** calculated for C₄₈H₈₅N₁₀O₁₂I (protonated ligand, I⁻ + 4H₂O) C: 51.41, H: 7.66 N: 12.49, observed C: 51.34 H: 7.59. N: 12.42. (I⁻ come from KI which was added in the reaction mixture).

1,7-(N-(4-trifluoromethylphenyl)acetamide)-4,10-(N-(2',2',6',6'-tetramethyl-1'-oxyl-4'-piperidyl)-amide-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (Ligand D₆)

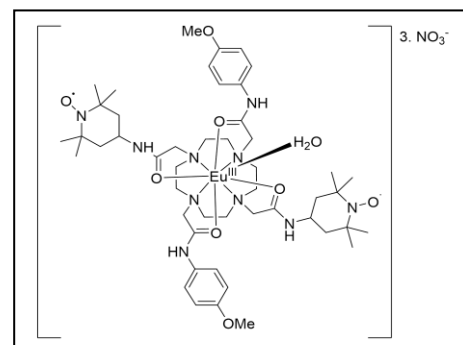
The aminoTEMPO arm (2) (0.275 g, 1.1 mmol, 2 eq) was added to a solution of 38 (0.306 g, 0.56 mmol) in MeCN (30 mL) containing K₂CO₃ (0.309 g, 2.2 mmol, 4 eq) and KI (0.186 g, 1.1 mmol, 2 eq) was added. The mixture was then stirred at 70°C for 13 days, filtered on celite and the solvents were removed in vacuo. The mixture was purified using DCVC chromatography. (Eluent from dichloromethane 100% to dichloromethane /MeOH; 50/50; v/v, to EtOH/NH₄OH; 50/50; v/v). Ligand D₆ is obtained after evaporation of solvents in 38% yield as an orange solid. Reduction with sodium ascorbate was used to characterize the ligand.



^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ = 7.83 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 7.56 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 4.14 (tt, J = 12.3 Hz, J = 3.7 Hz, 2H), 3.2-2.0 (m, 16H), 1.79 (d, J = 12.5 Hz, 4H), 1.44 (t, J = 12.2 Hz, 4H), 1.17 (d, J = 4.0 Hz, 24H); **^{13}C NMR** (100 MHz, CDCl_3) δ = 179.3, 163.8, 126.9, 120.7, 74.3, 73.5, 64.9, 59.9, 55.6, 46.1, 45.7, 42.7, 32.8, 8.0; **^{19}F NMR** (375 MHz, MeOD) δ = -63.6; **IR**: 3435, 3211, 3049, 2981, 2941, 2358, 1684, 1602, 1539, 1452, 1322, 1234, 1165, 1112, 1067, 848; **HRMS** (m/z): calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{71}\text{O}_6\text{N}_{10}\text{F}_6$ [M] $^+$: 997.54568; found, 997.54512.

[Eu.D₅][NO₃]₃ (44)

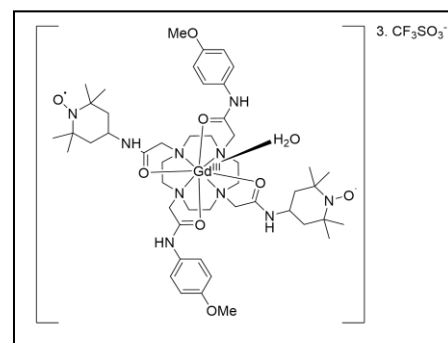
Europium nitrate (0.029 g, 0.07 mmol, 1 eq) was added to a solution of ligand D₅ (0.062 g, 0.07 mmol) in a mixture of 1,4-dioxane and water 1/1 (10 mL). The solution was stirred and heated at 50°C for 4 days. The solvents were evaporated in reduced pressure and the residue was solubilized in minimum of methanol and precipitated in ether to obtain an orange powder in 75% yield.



^1H NMR (400 MHz, MeOD) Due to the paramagnetism induced by the lanthanide only few resonances (broad) can be observed: δ = 17.46, 7.76, 7.09, 6.75, 4.21, 3.91, 3.53, 3.48, 1.17, -1.89, -5.49, -7.26, -9.17; **IR**: 3402, 3251, 3080, 2976, 2936, 1620, 1569, 1511, 1462, 1301, 1240, 1178, 1082, 1029, 961, 834; **MS-ESI** (m/z): calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{76}\text{O}_8\text{N}_{10}\text{Eu}$ [M] $^{3+}$: 357.83; found, 357.85.

[Gd.D₅][CF₃SO₃]₃ (45)

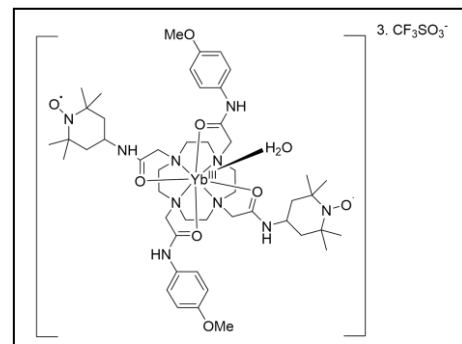
Gadolinium triflate (0.035 g, 0.06 mmol, 1 eq) was added to a solution of ligand D₅ (0.060 g, 0.06 mmol) in a mixture of 1,4-dioxane and water 1/1 (10 mL). The solution was stirred and heated at 50°C for 1 day. The solvents were evaporated in reduced pressure and the residue was solubilized in minimum of methanol, precipitated in ether and centrifuged to obtain an orange powder in 82% yield.



IR: 3476, 3264, 3096, 2984, 2939, 1622, 1569, 1510, 1457, 1276, 1235, 1161, 1028; **MS-ESI** (m/z): calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{76}\text{O}_8\text{N}_{10}\text{Gd}$ [M] $^{3+}$: 359.50; found, 359.41.

[Yb.D₅][CF₃SO₃]₃ (46)

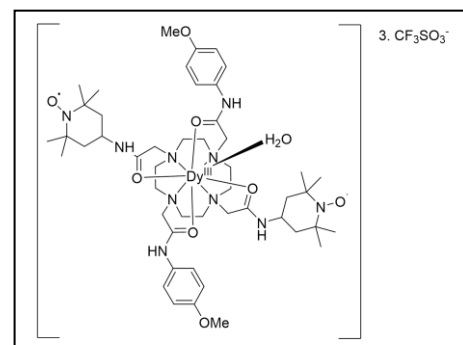
Ytterbium triflate (0.042 g, 0.07 mmol, 1 eq) was added to a solution of ligand D₅ (0.062 g, 0.07 mmol) in a mixture of 1,4-dioxane and water 1/1 (10 mL). The solution was stirred and heated at 50°C for 1 day. The solvents were evaporated in reduced pressure and the residue was solubilized in minimum of methanol and precipitated in ether to obtain an orange powder in 60% yield.



¹H NMR (400 MHz, MeOD) Due to the paramagnetism induced by the lanthanide only few resonances (broad) can be observed: δ = 108.9, 102.8, 99.8, 69.9, 21.1, 20.4, 17.8, 16.4, 15.4, 7.4, -24.8, -28.3, -30.0, -34.4, -57.3, -58.8; IR: 3444, 3255, 3094, 2980, 2942, 2873, 1622, 1572, 1513, 1463, 1276, 1239, 1163, 1082, 1027, 962, 833, 636; MS-ESI (m/z): calcd for C₄₈H₇₆O₈N₁₀Yb [M]³⁺: 364.84; found, 364.95.

[Dy.D₅][CF₃SO₃]₃ (47)

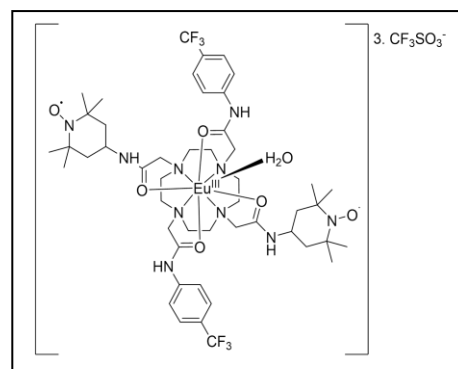
Dysprosium triflate (0.034 g, 0.06 mmol, 1 eq) was added to a solution of ligand D₅ (0.060 g, 0.06 mmol) in a mixture of 1,4-dioxane and water 1/1 (10 mL). The solution was stirred and heated at 50°C for 1 day. The solvents were evaporated in reduced pressure and the residue was solubilized in minimum of methanol, precipitated in ether and centrifugated to obtain an orange powder in 76% yield.



¹H NMR (400 MHz, MeOD) Due to the paramagnetism induced by the lanthanide only few resonances (broad) can be observed: δ = 49.0, 15.6, 1.27, -81; IR: 3406, 3229, 3085, 2974, 2927, 2861, 1615, 1574, 1504, 1462, 1363, 1323, 1239, 1177, 1084, 1025, 959, 834; MS-ESI (m/z): calcd for C₄₈H₇₆O₈N₁₀Dy [M]³⁺: 361.51; found, 361.51.

[Eu.D₆][CF₃SO₃]₃ (48)

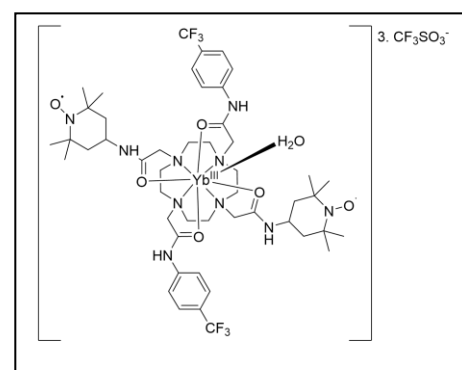
Europium triflate (0.054 g, 0.09 mmol, 1 eq) was added to a solution of ligand D₆ (0.090 g, 0.09 mmol) in a mixture of 1,4-dioxane and water 1/1 (10 mL). The solution was stirred and heated at 50°C for 1 day. The solvents were evaporated in reduced pressure and rinsed with diethyl ether to obtain an orange oil in 97% yield.



¹H NMR (400 MHz, MeOD) Due to the paramagnetism induced by the lanthanide no resonance can be observed: δ = no signal; ¹⁹F NMR (375 MHz, MeOD) δ = -61.5, -77.6; IR: 3450, 3296, 2989, 2926, 2355, 1682, 1557, 1460, 1393, 1276, 1240, 1224, 1158, 1028, 637; MS-ESI (m/z): calcd for C₄₈H₇₀O₆N₁₀F₆Eu + H₂O + Cl₂ [M + H₂O + 2Cl]³⁺: 1237.41; found, 1237.67.

[Yb.D₆][CF₃SO₃]₃ (49)

Ytterbium triflate (0.056 g, 0.09 mmol, 1 eq) was added to a solution of ligand D₆ (0.090 g, 0.09 mmol) in a mixture of 1,4-dioxane and water 1/1 (10 mL). The solution was stirred and heated at 50°C for 1 day. The solvents were evaporated in reduced pressure and rinsed with diethyl ether to obtain an orange powder in 97% yield.

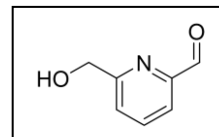


¹H NMR (400 MHz, MeOD) Due to the paramagnetism induced by the lanthanide no resonance can be observed: δ = no signal; ¹⁹F NMR (375 MHz, D₂O) δ = -62.0, -78.7; IR: 3296, 2982, 2949, 2341, 1682, 1549, 1460, 1396, 1278, 1238, 1223, 1157, 1028, 636.

VII.4 MOLECULES DU CHAPITRE 5

6-(Hydroxymethyl)-2-pyridinecarboxaldehyde (51)^[183]

Under argon atmosphere, a solution of 2,6-bis(hydroxymethyl)pyridine (50) (3.0 g, 21.6 mmol, 1 eq) and SeO₂ (1.2g, 10.8 mmol, 0.5 eq) in 60 mL of 1,4-dioxane was stirred at 50°C for 23h. 100 mL of CH₂Cl₂ was then added to the solution and filtrated on celite.

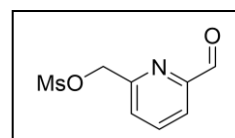


Compound (51) is obtained after evaporation of solvents and directly engaged in the next step. The analytical data were consistent with published ones^[183].

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 10.07 (s, 1H), 7.88 (s, 2H), 7.53 (s, 1H), 4.87 (s, 2H), 4.63 (s, 1H).

6-(Formylpyridin-2-yl)methylmethanesulfonate (53)^[183]

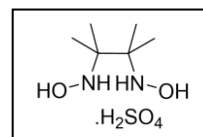
Under argon atmosphere, to a solution of (51) (2.96 g, 21.6 mmol) in CH₂Cl₂ (150 mL) was added Et₃N (9.2 mL, 65 mmol, 3 eq). Then, the MsCl (1.35 mL, 2.6 mmol, 1.2 eq) was added slowly, drop by drop. The brown solution was stirred at room temperature for 40 minutes. Then, 50 mL of NaHCO₃ sat was added and the solution was extracted with CH₂Cl₂, dried over Na₂SO₄ and the solvents were evaporated. The compound was purified using DCVC chromatography. (Eluent toluene/diethyl ether by 5% increment). Compound (53) is obtained after evaporation of solvents in 39% yield. The analytical data were consistent with published ones^[183].



¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ = 10.05 (s, 1H aldehyde), 7.97-7.94 (m, 2H), 7.74-7.71 (m, 1H), 5.43 (s, 1H), 3.14 (s, 3H).

2,3-dimethylbutane-2,3-diamine hydrosulfate (55)^[159]

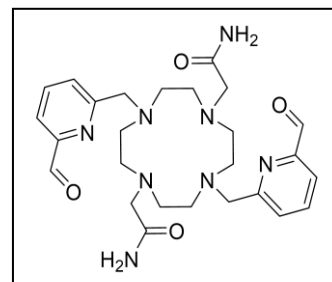
Aluminium foil was cut and placed in an Erlenmeyer. HgCl₂ (0.907 g, 0.33 mmol, 0.23 eq) solution in 40 mL of THF was added on aluminium foil (1.5 g, 56 mmol, 3.8 eq) and the solution was stirred manually at 0°C. After 6 minutes, the solution was extracted and the amalgam was rinsed with 10 mL of MeOH and 10 mL of THF. Then, 40 ml of THF and 10 ml of water was added to the amalgam and the solution became black and heat by itself. The dinitro (69) (2.62 g, 14.7 mmol, 1 eq) compound was added in 40 ml of THF at 0°C and stirred for 2.5 hours (Warning H₂ production and heating temperature). The mixture was filtrated on celite, rinsed with THF and the solvents were evaporated. The compound was solubilized in EtOH and precipitated using H₂SO₄ to obtain the salt in 55% yield. The analytical data were consistent with published ones^[159].



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) $\delta = 1.19$ (s, 12H).

1,7-(6-(Formylpyridin-2-yl))-4,10-tetraazacyclododecane-1,7-bisacetamide (56)

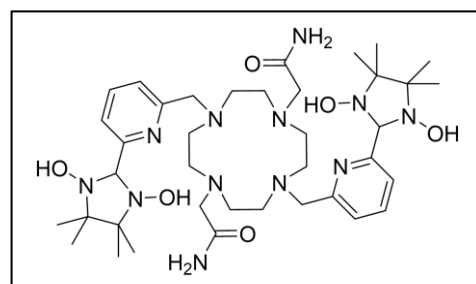
Under argon atmosphere, to a solution of (9) (0.768 g, 2.7 mmol) in MeCN (100 mL) was added K_2CO_3 (1.78 g, 12.9 mmol, 4.8 eq). Then, 53 (1.08 g, 5.4 mmol, 2 eq) was added and the solution was stirred at 60°C overnight (followed by TLC, dichloromethane/MeOH 10%). The solution was filtrated throught celite and the solvents were evaporated. The minimum amount of methanol was added and the product was precipitated with diethyl ether. The compound was purified using DCVC chromatography. (Eluent dichloromethane/MeOH by 5% increment). Compound (56) is obtained after evaporation of solvents in 43% yield. Characterization by NMR spectroscopy gave very broad resonances.



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD) $\delta = 10.16$ (br, 2H, CHO), 8.3-7.11 (br, 6H), 3.38-3.36 (m, 2H), 3.30 (s, 2H), 3.19 (s, 2H), 2.76-2.56 (m, 16H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, MeOD) $\delta = 195.2, 194.7, 175.8, 160.7, 139.5, 139.1, 130.3, 125.7, 121.5, 120.6, 98.7, 66.9, 60.6, 58.1, 57.4, 53.6, 51.6, 49.8, 15.4$; IR: 3280, 2947, 2826, 1705, 1663, 1592, 1455, 1367, 1300, 1157, 1100, 992, 826; HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{N}_8\text{O}_4$, 525.29323; found, 525.29179.

1,7-(6-(1,3-hydroxy-4,4,5,5-tetramethylimidazolidin)pyridine)-4,10-Tetraazacyclododecane-1,7-bisacetamide (Ligand D₇)

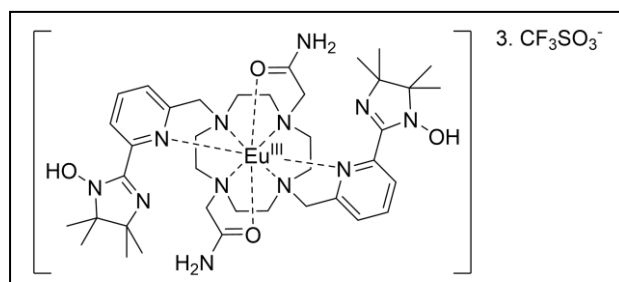
Under argon atmosphere, to a solution of (55) (0.208 g, 0.85 mmol, 2.2 eq) in H_2O (10 mL) was added AcONa (0.75 g, 0.92 mmol, 2.4 eq). Then, compound (56) (0.200 g, 0.38 mmol, 1 eq) in MeOH (10 mL) was added and the solution was stirred at 60°C for 48h. The solvents were evaporated, the solid was then redissolved in EtOH and filtrated throught celite. After evaporation, the solid was redissolved in minimum amount of methanol and was precipitated with diethyl ether to obtain ligand D₇ in 100% yield.



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD) $\delta = 8.00-7.24$ (br, 6H), 4.61-2.91 (br, 16H), 1.35-1.07 (br, 24H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, MeOD) $\delta = 161.3, 138.5, 125.6, 123.2, 91.5, 68.3, 66.4, 65.1, 61.0, 58.9, 56.2, 23.8, 19.7, 17.5, 14.9$; IR: 3274, 2988, 2913, 1668, 1588, 1576, 1456, 1388, 1137, 1089, 999, 956; HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{65}\text{N}_{12}\text{O}_6$, 785.51445; found, 785.51302.

[Eu.D₇][CF₃SO₃]₃ (57)

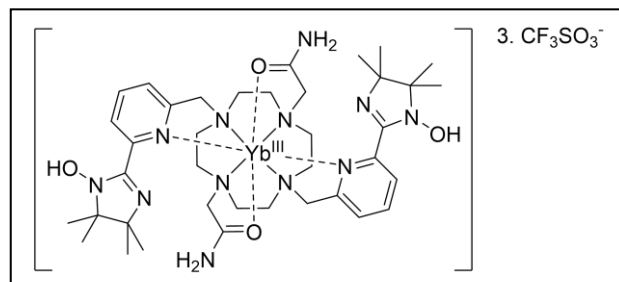
To a solution of ligand D₇ (0,03 g, 0.04 mmol) in MeOH (10 mL) was added europium triflate (0,023 g, 0.04 mmol, 1 eq). The solution was stirred and heated at room temperature for 4 days. The solvents were evaporated under reduced pressure, dissolved in minimum of MeOH, precipitated using diethyl ether and centrifuged to obtain a white powder of (59) in 62% yield.



¹H NMR (500 MHz, MeOD) Due to the paramagnetism induced by the lanthanide only few resonances (broad) can be observed: $\delta = 18.9, 11.4, 9.8, 8.4, 8.1, 8.0, 7.7, 7.4, 1.5, 0.1, 0.0, -1.3, -1.98, -2.4, -3.2, -4.8, -5.4, -7.4, -8.7, -11.2$; **¹⁹F NMR** (469 MHz, MeOD) $\delta = -79.5$; **IR**: 3545, 3339, 3184, 2999, 1667, 1606, 1456, 1397, 1272, 1245, 1224, 1157, 1087, 1027, 637; **MS-ESI** (m/z): calcd for C₃₈H₅₉O₄N₁₂Eu + CF₃SO₃ [M+CF₃SO₃]⁺: 1049.35; found, 1049.43.

[Yb.D₇][CF₃SO₃]₃ (58)

To a solution of ligand D₇ (0,03 g, 0.04 mmol) in MeOH (10 mL) was added ytterbium triflate (0,025 g, 0.04 mmol, 1 eq). The solution was stirred and heated at room temperature for 4 days. The solvents were evaporated under reduced pressure, dissolved in minimum of MeOH, precipitated using diethyl ether and centrifuged to obtain a white powder of (60) in 73% yield.



¹H NMR (500 MHz, MeOD) Due to the paramagnetism induced by the lanthanide only few resonances (broad) can be observed: $\delta = 29.4, 27.0, 18.3, 11.9, 8.43, 8.35, 8.18, 7.97, 7.86, 7.56, 1.47, -11.5, -13.4, -17.9, -19.8, -24.2, -26.6, -35.0, -38.8$; **¹⁹F NMR** (469 MHz, MeOD) $\delta = -79.4$; **IR**: 3348, 3190, 2992, 2871, 1670, 1606, 1561, 1457, 1397, 1372, 1278, 1242, 1224, 1157, 1027, 636.

VIII. BIBLIOGRAPHIE

- [1] T. Geva, *J. Cardiovasc. Magn. Reson.* **2006**, *8*, 573–580.
- [2] R. Damadian, *Science* **1971**, *171*, 1151–1153.
- [3] C. K. Gupta, N. Krishnamurthy, *Extractive Metallurgy of Rare Earths*, CRC Press, Boca Raton, Fla., **2005**.
- [4] S. Cotton, *Lanthanide and Actinide Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, **2006**, *280*, 1–263.
- [5] J.-M. Idée, M. Port, I. Raynal, M. Schaefer, S. Le Greneur, C. Corot, *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2006**, *20*, 563–576.
- [6] Web, Rapport CHMP, European Medicines Agency, **2017**.
https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/gadolinium-article-31-referral-annex-ii_fr.pdf
- [7] Web, Evaluation of FDA, **2017**, <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-drug-safety-communication-fda-evaluating-risk-brain-deposits-repeated-use-gadolinium-based>.
- [8] J. D. Rinehart, J. R. Long, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 2078–2085.
- [9] Julie Jung. Étude ab initio de molécules aimants à base d'ions lanthanides. Autre. Université Rennes, 1, **2015**. Français, HAL Id: tel-01231132.
- [10] R. E. Hendrick, E. Mark Haacke, *J. Magn. Reson. Imaging* **1993**, *3*, 137–148.
- [11] J.-C. G. Bünzli, C. Piguet, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 1048–1077.
- [12] K. Kuriki, Y. Koike, Y. Okamoto, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 2347–2356.
- [13] M. Tokurakawa, K. Takaichi, A. Shirakawa, K. Ueda, H. Yagi, T. Yanagitani, A. A. Kaminskii, *Appl. Phys. Lett.* **2007**, *90*, 071101.
- [14] A. D'Aléo, A. Bourdolle, S. Brustlein, T. Fauquier, A. Grichine, A. Duperray, P. L. Baldeck, C. Andraud, S. Brasselet, O. Maury, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6622–6625.
- [15] S. V. Eliseeva, I. Martinić, S. Petoud, *J. Lumin.* **2017**, *189*, 19–43.
- [16] R. W. Brown, Y.-C. N. Cheng, E. M. Haacke, M. R. Thompson, R. Venkatesan, Eds., *Magnetic Resonance Imaging: Physical Principles and Sequence Design*, Wiley Blackwell, Hoboken, New Jersey, **2014**.
- [17] P. Caravan, J. J. Ellison, T. J. McMurry, R. B. Lauffer, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2293–2352.
- [18] P. Hermann, J. Kotek, V. Kubíček, I. Lukeš, *Dalton Trans.* **2008**, 3027–3047.
- [19] V.-M. Mikkala, C. Sund, M. Kwiatkowski, P. Pasanen, M. Högberg, J. Kankare, H. Takalo, *Helv. Chim. Acta* **1992**, *75*, 1621–1632.
- [20] V.-M. Mikkala, M. Helenius, I. Hemmilä, J. Kankare, H. Takalo, *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 1361–1378.
- [21] H. Takalo, I. Hemmilä, T. Sutela, M. Latva, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 789–802.
- [22] P. R. Selvin, J. Jancarik, M. Li, L.-W. Hung, *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 700–705.
- [23] M. Li, P. R. Selvin, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8132–8138.
- [24] J. K. Molloy, C. Philouze, L. Fedele, D. Imbert, O. Jarjayes, F. Thomas, *Dalton Trans.* **2018**, *47*, 10742–10751.
- [25] R. D. Hancock, *J. Chem. Educ.* **1992**, *69*, 615–621.
- [26] J. Byegård, G. Skarnemark, M. Skålberg, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **1999**, *241*, 281–290.
- [27] S. L. Wu, W. DeW. Horrocks, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 394–401.

- [28] A. Merbach, L. Helm, É. Tóth, Eds., *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*: John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2013.
- [29] J. Bárta, P. Hermann, J. Kotek, *Molecules* **2019**, *24*, 3324–3342.
- [30] C. A. Chang, Y.-H. Chen, H.-Y. Chen, F.-K. Shieh, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1998**, 3243–3248.
- [31] S. Aime, A. Barge, J. I. Bruce, M. Botta, J. A. K. Howard, J. M. Moloney, D. Parker, A. S. de Sousa, M. Woods, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5762–5771.
- [32] A. Pasha, G. Tircsó, E. T. Benyó, E. Brücher, A. D. Sherry, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, *2007*, 4340–4349.
- [33] K. L. Peterson, M. J. Margherio, P. Doan, K. T. Wilke, V. C. Pierre, *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 9390–9398.
- [34] P. Caravan, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 851–862.
- [35] K. M. Ward, A. H. Aletras, R. S. Balaban, *J. Magn. Reson.* **2000**, *143*, 79–87.
- [36] A. D. Sherry, M. Woods, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2008**, *10*, 391–411.
- [37] A. E. Thorarinsdottir, K. Du, J. H. P. Collins, T. D. Harris, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 15836–15847.
- [38] B. Bleaney, *J. Magn. Reson.* **1972**, *8*, 91–100.
- [39] I. Hancu, W. T. Dixon, M. Woods, E. Vinogradov, A. D. Sherry, R. E. Lenkinski, *Acta Radiol.* **2010**, *51*, 910–923.
- [40] S. Aime, D. Delli Castelli, E. Terreno, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1798–1800.
- [41] M. Milne, M. Lewis, N. McVicar, M. Suchy, R. Bartha, R. H. E. Hudson, *RSC Adv* **2014**, *4*, 1666–1674.
- [42] A. E. Thorarinsdottir, T. D. Harris, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 794–797.
- [43] A. O. Olatunde, C. J. Bond, S. J. Dorazio, J. M. Cox, J. B. Benedict, M. D. Daddario, J. A. Spornyak, J. R. Morrow, *Chem. - Eur. J.* **2015**, *21*, 18290–18300.
- [44] M. Pagel, I. Daryaie, *Res. Rep. Nucl. Med.* **2015**, 19–32.
- [45] J. Ren, R. Trokowski, S. Zhang, C. R. Malloy, A. D. Sherry, *Magn. Reson. Med.* **2008**, *60*, 1047–1055.
- [46] S. Aime, D. Delli Castelli, F. Fedeli, E. Terreno, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9364–9365.
- [47] P. B. Tsitovich, P. J. Burns, A. M. McKay, J. R. Morrow, *J. Inorg. Biochem.* **2014**, *133*, 143–154.
- [48] C. F. G. C. Geraldes, S. M. Pinto, V. Tomé, M. J. F. Calvete, M. M. C. A. Castro, É. Tóth, *Coord. Chem. Rev.* **2019**, *390*, 1–31.
- [49] L. A. Basal, M. D. Bailey, J. Romero, M. M. Ali, L. Kurenbekova, J. Yustein, R. G. Pautler, M. J. Allen, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 8345–8350.
- [50] S. Aime, M. Botta, E. Gianolio, E. Terreno, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 747–750.
- [51] G. S. Loving, S. Mukherjee, P. Caravan, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 4620–4623.
- [52] P. B. Tsitovich, J. A. Spornyak, J. R. Morrow, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 13997–14000.
- [53] S. J. Ratnakar, M. Woods, A. J. M. Lubag, Z. Kovács, A. D. Sherry, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6–7.
- [54] S. J. Ratnakar, S. Viswanathan, Z. Kovacs, A. K. Jindal, K. N. Green, A. D. Sherry, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5798–5800.
- [55] A. D. Sherry, S. J. Ratnakar, T. C. Soesbe, L. L. Lumata, Q. N. Do, S. Viswanathan, C.-Y. Lin, Z. Kovacs, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 14904–14907.
- [56] M. L. James, S. S. Gambhir, *Physiol. Rev.* **2012**, *92*, 897–965.
- [57] J. R. Lakowicz, B. R. Masters, *J. Biomed. Opt.* **2008**, *13*, 029901.
- [58] M.-H. Ha-Thi, J. A. Delaire, V. Michelet, I. Leray, *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 3264–3269.

Bibliographie

- [59] J.-C. Bünzli, *Light Conversion: Lanthanide-Containing Systems*, Reference Module in Materials Science and Materials Engineering, **2015**, 1-26.
- [60] P. Hänninen, H. Härmä, Eds., *Lanthanide Luminescence: Photophysical, Analytical and Biological Aspects*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2011**.
- [61] A. T. Bui, A. Roux, A. Grichine, A. Duperray, C. Andraud, O. Maury, *Chem. - Eur. J.* **2018**, *24*, 3408–3412.
- [62] J. W. Walton, A. Bourdolle, S. J. Butler, M. Soulie, M. Delbianco, B. K. McMahon, R. Pal, H. Puschmann, J. M. Zwier, L. Lamarque, O. Maury, C. Andraud, D. Parker, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 1600-1602.
- [63] A. Picot, A. D'Aléo, P. L. Baldeck, A. Grichine, A. Duperray, C. Andraud, O. Maury, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1532–1533.
- [64] A. T. Bui, M. Beyler, Y.-Y. Liao, A. Grichine, A. Duperray, J.-C. Mulatier, B. L. Guennic, C. Andraud, O. Maury, R. Tripiet, *Inorg. Chem.* **2016**, *55*, 7020–7025.
- [65] S. Comby, S. A. Tuck, L. K. Truman, O. Kotova, T. Gunnlaugsson, *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 10158–10168.
- [66] C. Breen, R. Pal, M. R. J. Elsegood, S. Teat, F. Iza, K. Wende, B. Buckley, S. J. Butler, *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 3164-3170.
- [67] J. F. Turrens, *J. Physiol.* **2003**, *552*, 335–344.
- [68] P. Storz, *Sci. Signal.* **2006**, *332*, 1-7.
- [69] I. I. C. Chio, D. A. Tuveson, *Trends Mol. Med.* **2017**, *23*, 411–429.
- [70] N. Houstis, E. D. Rosen, E. S. Lander, *Nature* **2006**, *440*, 944–948.
- [71] F. Collin, *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2407-2424.
- [72] N. Panth, K. R. Paudel, K. Parajuli, *Adv. Med.* **2016**, *2016*, 1–12.
- [73] T. Finkel, N. J. Holbrook, *Nature* **2000**, *408*, 239–247.
- [74] K. Krumova, G. Cosa, in *Compr. Ser. Photochem. Photobiol. Sci.* (Eds.: S. Nonell, C. Flors), Royal Society Of Chemistry, Cambridge, **2016**, 1–21.
- [75] D. Mouchel Dit Leguerrier, R. Barré, J. K. Molloy, F. Thomas, *Coord. Chem. Rev.* **2021**, *446*, 214133.
- [76] H. Dancygier, P. Schirmacher, in *Clin. Hepatol.*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2010**, 173–180.
- [77] R. Figueroa-Méndez, S. Rivas-Arancibia, *Front. Physiol.* **2015**, *6*, 1-11.
- [78] A. R. Lippert, T. Gschneidner, C. J. Chang, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7510-7512.
- [79] E. Pershagen, K. E. Borbas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 1787–1790.
- [80] E. Pershagen, J. Nordholm, K. E. Borbas, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9832–9835.
- [81] Z. Ye, J. Chen, G. Wang, J. Yuan, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 4163–4169.
- [82] X. Liu, L. Guo, B. Song, Z. Tang, J. Yuan, *Methods Appl. Fluoresc.* **2017**, *5*, 1-8.
- [83] Y. Xiao, R. Zhang, Z. Ye, Z. Dai, H. An, J. Yuan, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 10785–10792.
- [84] L. Tian, H. Ma, B. Song, Z. Dai, X. Zheng, R. Zhang, K. Chen, J. Yuan, *Talanta* **2020**, *212*, 1-19.
- [85] S. E. Page, K. T. Wilke, V. C. Pierre, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 2423-2425.
- [86] Y. Wang, B. Li, X. Song, R. Shen, D. Wang, Y. Yang, Y. Feng, C. Cao, G. Zhang, W. Liu, *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 12422–12427.
- [87] J. Wu, H. Liu, Y. Yang, H. Wang, M. Yang, *Opt. Mater.* **2018**, *77*, 170–177.
- [88] J. Wu, Y. Yang, L. Zhang, H. Wang, M. Yang, J. Yuan, *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 2322–2329.
- [89] C. Song, Z. Ye, G. Wang, J. Yuan, Y. Guan, *Chem. - Eur. J.* **2010**, *16*, 6464–6472.
- [90] B. Song, Y. Wu, M. Yu, P. Zhao, C. Zhou, G. E. Kiefer, A. D. Sherry, *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 8066-8069.
- [91] A. M. Funk, V. Clavijo Jordan, A. D. Sherry, S. J. Ratnakar, Z. Kovacs, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 5024–5027.

- [92] M. Tropiano, N. L. Kilah, M. Morten, H. Rahman, J. J. Davis, P. D. Beer, S. Faulkner, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 11847–11849.
- [93] C. Tu, E. A. Osborne, A. Y. Louie, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 1241–1246.
- [94] C. Tu, R. Nagao, A. Y. Louie, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6547–6551.
- [95] Z. Zhelev, V. Gadjeva, I. Aoki, R. Bakalova, T. Saga, *Mol. Biosyst.* **2012**, *8*, 2733–2740.
- [96] Z. Zhelev, R. Bakalova, I. Aoki, V. Gadjeva, I. Kanno, *Mol. Biosyst.* **2010**, *6*, 2386–2388.
- [97] H. V.-T. Nguyen, Q. Chen, J. T. Paletta, P. Harvey, Y. Jiang, H. Zhang, M. D. Boska, M. F. Ottaviani, A. Jasanoff, A. Rajca, J. A. Johnson, *ACS Cent. Sci.* **2017**, *3*, 800–811.
- [98] C. S. Winalski, S. Shortkroff, R. V. Mulkern, E. Schneider, G. M. Rosen, *Magn. Reson. Med.* **2002**, *48*, 965–972.
- [99] J. Hong, Y. Zhuang, X. Ji, X. Guo, *The Analyst* **2011**, *136*, 2464–2470.
- [100] J. K. Molloy, O. Jarjays, C. Philouze, L. Fedele, D. Imbert, F. Thomas, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 605–608.
- [101] R. Barré, D. Mouchel dit Leguerrier, L. Fedele, D. Imbert, J. K. Molloy, F. Thomas, *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 435–438.
- [102] Éva Tóth, L. Helm, A. Merbach, in *Chem. Contrast Agents Med. Magn. Reson. Imaging* (Eds.: A. Merbach, L. Helm, É. Tóth), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, **2013**, 25–81.
- [103] D. H. Powell, O. M. N. Dhubhghaill, D. Pubanz, L. Helm, Y. S. Lebedev, W. Schlaepfer, A. E. Merbach, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9333–9346.
- [104] S. Shinoda, *Chem Soc Rev* **2013**, *42*, 1825–1835.
- [105] S. J. Ratnakar, T. C. Soesbe, L. L. Lumata, Q. N. Do, S. Viswanathan, C.-Y. Lin, A. D. Sherry, Z. Kovacs, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 14904–14907.
- [106] M. Suchý, R. H. E. Hudson, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2008*, 4847–4865.
- [107] F. Oukhatar, M. Beyler, R. Tripiet, *Tetrahedron* **2015**, *71*, 3857–3862.
- [108] J. M. Bobbitt, N. A. Eddy, C. X. Cady, J. Jin, J. A. Gascon, S. Gelpí-Dominguez, J. Zakrzewski, M. D. Morton, *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 9279–9290.
- [109] J. Vipond, M. Woods, P. Zhao, G. Tircso, J. Ren, S. G. Bott, D. Ogrin, G. E. Kiefer, Z. Kovacs, A. D. Sherry, *Inorg Chem.* **2007**, *28*, 1648–1655.
- [110] L. E. Hopper, M. J. Allen, *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 5560–5561.
- [111] A. D. Sherry, C. Kumas, W. S. Fernando, P. Zhao, M. Regueiro-Figueroa, G. E. Kiefer, A. F. Martins, C. Platas-Iglesias, *Inorg. Chem.* **2016**, *55*, 9297–9305.
- [112] Y. Wu, T. C. Soesbe, G. E. Kiefer, P. Zhao, A. D. Sherry, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14002–14003.
- [113] T. Mani, G. Tircsó, O. Togao, P. Zhao, T. C. Soesbe, M. Takahashi, A. D. Sherry, *Contrast Media Mol. Imaging* **2009**, *4*, 183–191.
- [114] C. Platas-Iglesias, T. Gambino, V. Laura, P. Pérez-Lourido, D. Esteban-Gómez, M. Zaiss, G. Angelovski, *Inorg. Chem. Front.* **2020**, *7*, 2274–2286.
- [115] S. Baroni, I. M. Carnovale, Carla Carrera, M. Boccalon, N. Guidolin, N. Demitri, L. Lattuada, F. Tedoldi, Z. Baranyai, S. Aime, *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 3287–3290.
- [116] J. E. Nutting, M. Rafiee, S. S. Stahl, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 4834–4885.
- [117] J. B. Gerken, Y. Q. Pang, M. B. Lauber, S. S. Stahl, *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 7323–7330.
- [118] M. Shibuya, F. Pichierri, M. Tomizawa, S. Nagasawa, I. Suzuki, Y. Iwabuchi, *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 2070–2073.
- [119] A. Israeli, M. Patt, M. Oron, A. Samuni, R. Kohen, S. Goldstein, *Free Radic. Biol. Med.* **2005**, *38*, 317–324.
- [120] E. B. Nielsen, J. A. Schellman, *J. Phys. Chem.* **1967**, *71*, 2297–2304.

Bibliographie

- [121] J. R. Fish, S. G. Swarts, M. D. Sevilla, T. Malinski, *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 3745–3751.
- [122] K. Binnemans, *Coord. Chem. Rev.* **2015**, *295*, 1–45.
- [123] R. M. Supkowski, W. DeW. Horrocks, *Inorganica Chim. Acta* **2002**, *340*, 44–48.
- [124] A. Beeby, I. M. Clarkson, R. S. Dickins, S. Faulkner, D. Parker, L. Royle, A. S. de Sousa, J. A. G. Williams, M. Woods, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1999**, 493–504.
- [125] F. Thomas, J. Michon, J. Lhomme, *Biochemistry* **1999**, *38*, 1930–1937.
- [126] O. A. Blackburn, N. F. Chilton, K. Keller, C. E. Tait, W. K. Myers, E. J. L. McInnes, A. M. Kenwright, P. D. Beer, C. R. Timmel, S. Faulkner, *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 10933–10936.
- [127] X. Yang, X. Song, Y. Li, G. Liu, S. Ray Banerjee, M. G. Pomper, M. T. McMahon, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 8116–8119.
- [128] Sophie Laine. Complexes de lanthanide pour la détection d'activité enzymatique par IRM. Autre, Université d'Orléans, **2016**. Français. NNT: 2016ORLE2088. tel-01713103.
- [129] F. A. Dunand, S. Aime, A. E. Merbach, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1506–1512.
- [130] W. T. Dixon, J. Ren, A. J. M. Lubag, J. Ratnakar, E. Vinogradov, I. Hancu, R. E. Lenkinski, A. D. Sherry, *Magn. Reson. Med.* **2010**, *63*, 625–632.
- [131] D. Mouchel Dit Leguerrier, R. Barré, Q. Ruet, D. Imbert, C. Philouze, P. H. Fries, V. Martel-Frchet, J. K. Molloy, F. Thomas, *Dalton Trans.* **2021**, *50*, 10826–10837.
- [132] J. Wahsner, E. M. Gale, A. Rodríguez-Rodríguez, P. Caravan, *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 957–1057.
- [133] K. L. Peterson, K. Srivastava, V. C. Pierre, *Front. Chem.* **2018**, *6*, 160-182.
- [134] M. Yu, D. Xie, K. P. Phan, J. S. Enriquez, J. J. Luci, E. L. Que, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 13885–13888.
- [135] D. Imbert, S. Comby, A.-S. Chauvin, J.-C. G. Bünzli, *Chem Commun* **2005**, 1432–1434.
- [136] D. Maffeo, J. A. G. Williams, *Inorganica Chim. Acta* **2003**, *355*, 127–136.
- [137] G. Bozoklu, C. Marchal, J. Pécaut, D. Imbert, M. Mazzanti, *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 9112-9122.
- [138] A. F. Abdel-Magid, K. G. Carson, B. D. Harris, C. A. Maryanoff, R. D. Shah, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 3849–3862.
- [139] F. Rizzo, F. Meinardi, R. Tubino, R. Pagliarin, G. Dellepiane, A. Papagni, *Synth. Met.* **2009**, *159*, 356–360.
- [140] D. A. Pearce, N. Jotterand, I. S. Carrico, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5160–5161.
- [141] J. L. Hickey, P. J. Crouch, S. Mey, A. Caragounis, J. M. White, A. R. White, P. S. Donnelly, *Dalton Trans* **2011**, *40*, 1338–1347.
- [142] J. Salaam, G. Pilet, J. Hasserodt, *Inorg. Chem.* **2020**, *59*, 13812–13816.
- [143] C. Bakewell, R. H. Platel, S. K. Cary, S. M. Hubbard, J. M. Roaf, A. C. Levine, A. J. P. White, N. J. Long, M. Haaf, C. K. Williams, *Organometallics* **2012**, *31*, 4729–4736.
- [144] R. Pujales-Paradela, T. Savić, D. Esteban-Gómez, G. Angelovski, F. Carniato, M. Botta, C. Platas-Iglesias, *Chem. – Eur. J.* **2019**, *25*, 4782–4792.
- [145] P.-Å. Bergström, J. Lindgren, *J. Mol. Struct.* **1990**, *239*, 103–111.
- [146] M. C. Stević, L. M. Ignjatović, G. Ćirić-Marjanović, S. M. Stanišić, M. Stanković, J. Zima, *Int J Electrochem Sci* **2011**, *6*, 2509-2525.
- [147] Z. P. Yang, M. Alafandy, K. Boutakhrit, J.-M. Kauffmann, J. Arcos, *Electroanalysis* **1996**, *8*, 25–29.
- [148] T. P. P. Le, P. Opaprakasit, *Appl. Spectrosc.* **2021**, *75*, 325–335.
- [149] R. C. Holz, C. A. Chang, W. DeW. Horrocks, *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 3270–3275.
- [150] S. Green, M. A. Fox, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 14752–14757.

- [151] J. C. Morris, L. A. Walsh, B. A. Gomes, D. Gimes, K. E. Fairfull-Smith, S. E. Bottle, J. P. Blinco, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 95598–95603.
- [152] G. Zucchi, R. Scopelliti, J.-C. G. Bünzli, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2001**, 1975–1985.
- [153] E. Moreno Pineda, N. F. Chilton, R. Marx, M. Dörfel, D. O. Sells, P. Neugebauer, S.-D. Jiang, D. Collison, J. van Slageren, E. J. L. McInnes, R. E. P. Winpenny, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 1-7.
- [154] S. S. Eaton, L. B. Woodcock, G. R. Eaton, *Concepts Magn. Reson. Part A* **2018**, *47A*, e21426.
- [155] S. A. A. S. Subasinghe, J. Romero, C. L. Ward, M. D. Bailey, D. R. Zehner, P. J. Mehta, F. Carniato, M. Botta, J. T. Yustein, R. G. Pautler, M. J. Allen, *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 1770-1773.
- [156] K. Chalmers, E. DeLuca, N. H. M. Hogg, A. Kenwright, I. Kuprov, D. Parker, M. Botta, J. I. Wilson, A. Blamire, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 134–148.
- [157] A. A. Bobko, V. V. Khramtsov, *Free Radic. Res.* **2015**, *49*, 919–926.
- [158] E. F. Ullman, J. H. Osiecki, D. G. B. Boocock, R. Darcy, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 7049–7059.
- [159] Anthony Lannes. Chimie de coordination de radicaux nitronyl-nitroxyde pontants pour l'élaboration de matériaux magnétiques moléculaires : synthèse, structures cristallines, propriétés magnétiques et spectroscopie électronique. Chimie de coordination. Université Claude Bernard - Lyon I, 2014. Français. NNT: 2014LYO10173. tel-01128167.
- [160] C. Hirel, K. E. Vostrikova, J. Pécaut, V. I. Ovcharenko, P. Rey, *Chemistry* **2001**, *7*, 2007–2014.
- [161] A. Rajca, M. Pink, S. Mukherjee, S. Rajca, K. Das, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 10731–10742.
- [162] D. Wang, Y. Ma, B. Wolf, A. I. Kokorin, M. Baumgarten, *J. Phys. Chem. A* **2018**, *122*, 574–581.
- [163] S. Goldstein, A. Russo, A. Samuni, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 50949–50955.
- [164] M. Anghel, F. Magnan, S. D. Catingan, M. A. McCready, E. Aawani, V. Wong, D. Singh, G. Fanchini, J. B. Gilroy, *J. Polym. Sci.* **2020**, *58*, 309–319.
- [165] Y. Wang, H. Wang, Y. Liu, C. Di, Y. Sun, W. Wu, G. Yu, D. Zhang, D. Zhu, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13058–13059.
- [166] P.-F. Yan, S. Chen, P. Chen, J.-W. Zhang, G.-M. Li, *CrystEngComm* **2011**, *13*, 36–39.
- [167] D. Pedersen, C. Rosenbohm, *Synthesis* **2001**, *16*, 2431-2434.
- [168] S. Stoll, A. Schweiger, *J. Magn. Reson.* **2006**, *178*, 42–55.
- [169] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. J. A. Montgomery, J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski and D. J. Fox, Gaussian 09, Revision D.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2009**.
- [170] C. Lee, W. Yang, R. G. Parr, *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785–789.

Bibliographie

- [171] A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648–5652.
- [172] G. A. Petersson, M. A. Al-Laham, *J. Chem. Phys.* **1991**, *94*, 6081–6090.
- [173] P. J. Hay, W. R. Wadt, *J. Chem. Phys.* **1985**, *82*, 299–310.
- [174] A. J. M. Duisenberg, L. M. J. Kroon-Batenburg, A. M. M. Schreurs, *J. Appl. Crystallogr.* **2003**, *36*, 220–229.
- [175] SADABS v2.10, Program for empirical absorption correction of area detector data, G. M. Sheldrick, University of Göttingen, Germany, **2003**.
- [176] XPREP v2005/3 ©Bruker AXS.
- [177] G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. A* **2008**, *64*, 112–122.
- [178] O. V. Dolomanov, L. J. Bourhis, R. J. Gildea, J. A. K. Howard, H. Puschmann, *J. Appl. Crystallogr.* **2009**, *42*, 339–341.
- [179] S. Dudley, G. Georg, S. Jakkraj, N. Cheryala, *Therapeutic Compounds and Methods of Use Thereof*, **2021**, wo 2021/178690 al.
- [180] S. K. Surmiak, C. Doerenkamp, P. Selter, M. Peterlechner, A. H. Schäfer, H. Eckert, A. Studer, *Chem. - Eur. J.* **2017**, *23*, 6019–6028.
- [181] X. Wang, M. de G. Jaraquemada-Peláez, Y. Cao, J. Pan, K.-S. Lin, B. O. Patrick, C. Orvig, *Inorg. Chem.* **2019**, *58*, 2275–2285.
- [182] L. Ma, C. Xie, Y. Ma, J. Liu, M. Xiang, X. Ye, H. Zheng, Z. Chen, Q. Xu, T. Chen, J. Chen, J. Yang, N. Qiu, G. Wang, X. Liang, A. Peng, S. Yang, Y. Wei, L. Chen, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 2060–2068.
- [183] J. I. MacDonald, H. K. Munch, T. Moore, M. B. Francis, *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 326–331.
- [184] M. T. McMahon, A. A. Gilad, J. Zhou, P. Z. Sun, J. W. M. Bulte, P. C. M. van Zijl, *Magn. Reson. Med.* **2006**, *55*, 836–847.
- [185] D. S. Pedersen, C. Rosenbohm, *Synthesis* **2001**, 2431–2434.

IX. ANNEXES

| | |
|--|-----|
| IX.1 RMN | 241 |
| IX.2 INFRA ROUGE | 245 |
| IX.3 LUMINESCENCE | 247 |
| IX.4 CEST | 250 |
| IX.5 RPE | 256 |
| IX.6 MAGNETISME | 259 |
| IX.7 CHROMATOGRAPHY | 260 |
| IX.8 X-RAY STRUCTURE DETERMINATION | 261 |

IX.1 RMN

Ligand D₂:

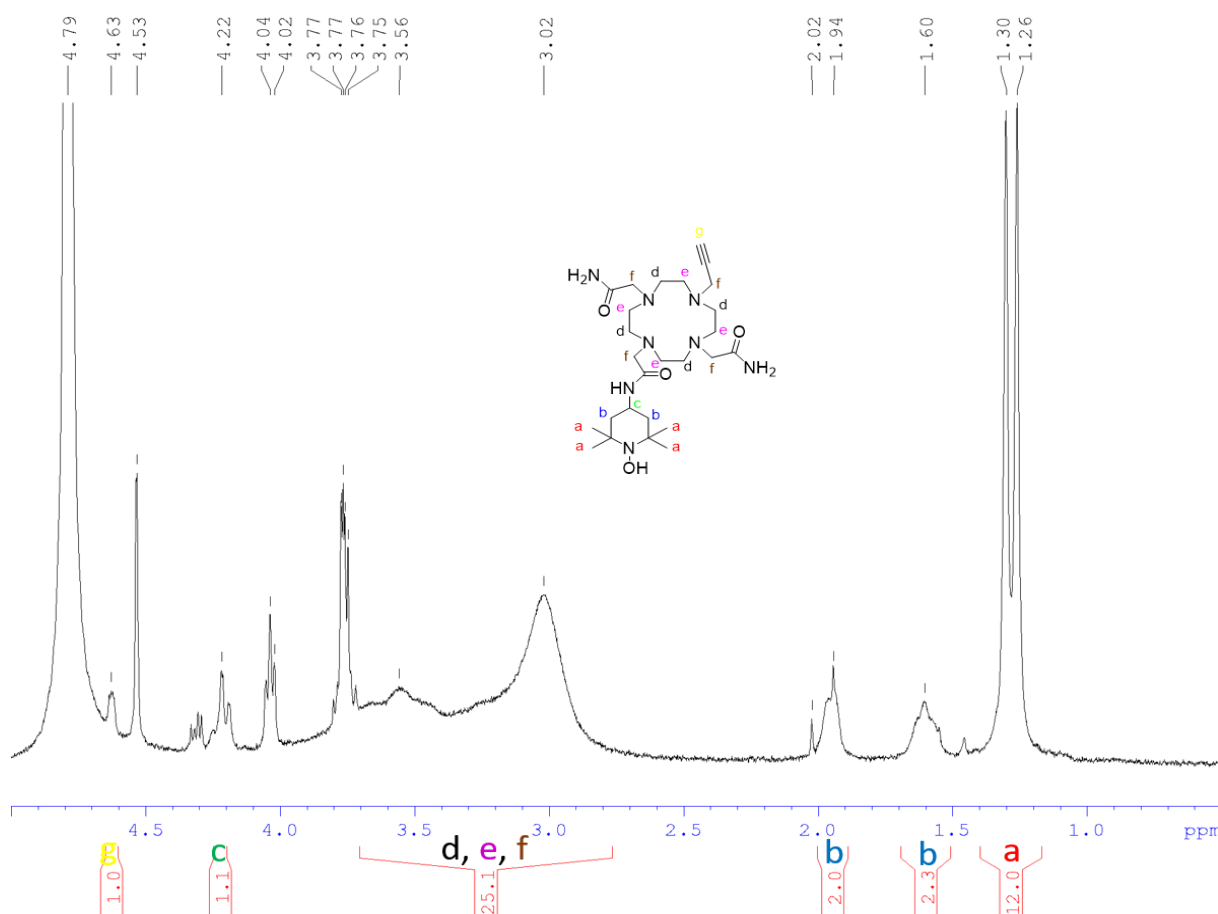


Figure IX-1 : RMN ligand D₂ dans D₂O après réduction à l'ascorbate.

Molécule (37):

ht_PROTON MeOD /opt/topspin circ 2

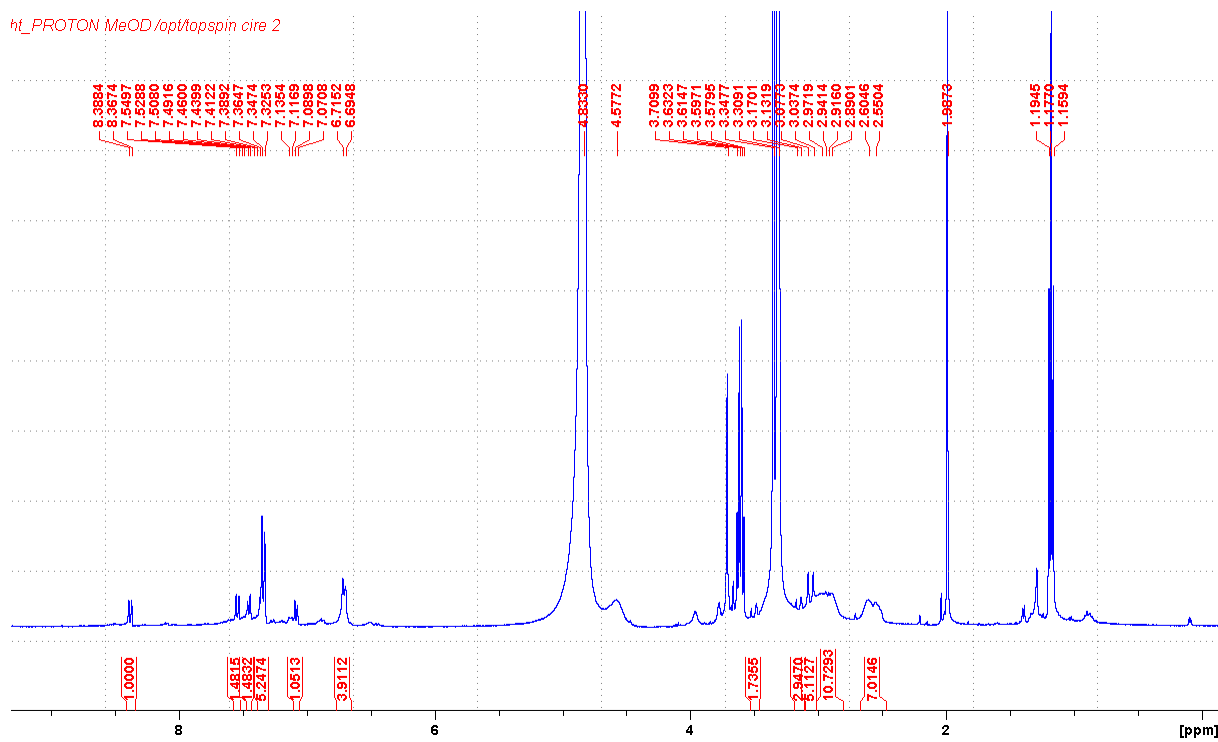
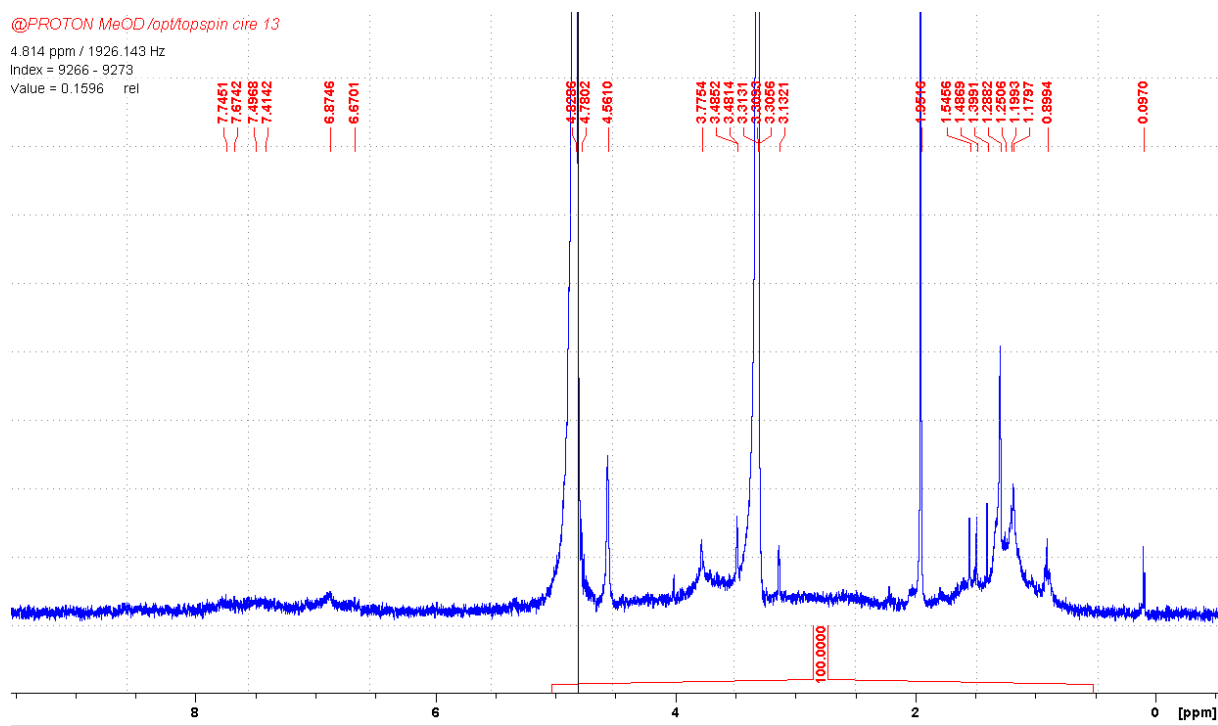


Figure IX-2 : RMN de (37) dans MeOD.

Ligand D₃:

@PROTON MeOD /opt/topspin circ 13

4.814 ppm / 1926.143 Hz
Index = 9266 - 9273
value = 0.1596 relFigure IX-3 : RMN ligand D₃ dans MeOD.

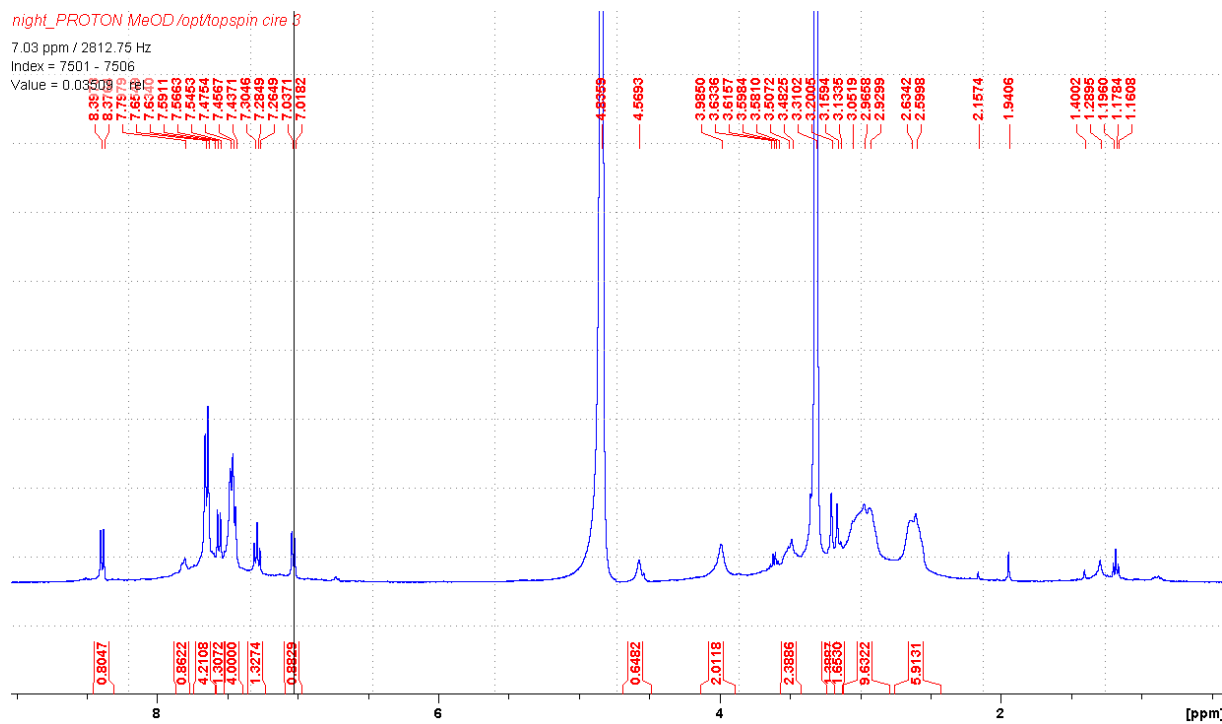
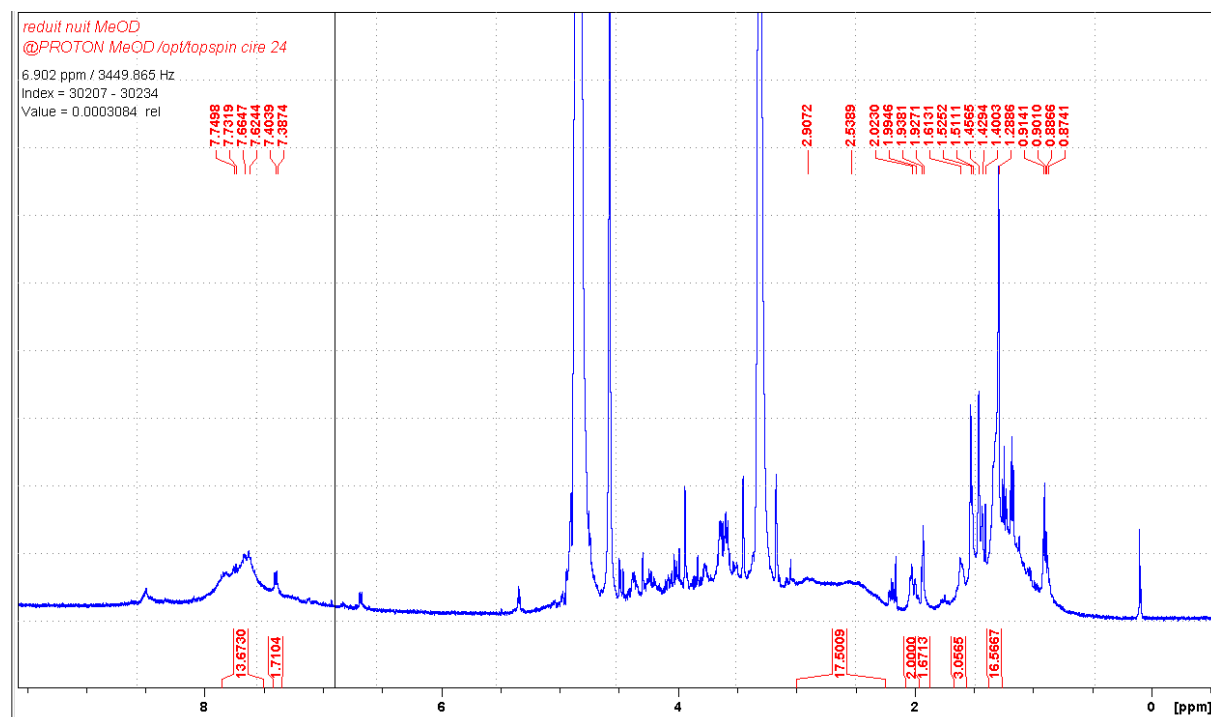
Molécule (39):

Figure IX-4 : RMN de (39) dans MeOD.

Ligand D₄:Figure IX-5 : RMN ligand D₄ dans MeOD après réduction à l'ascorbate.

Ligand D₅:

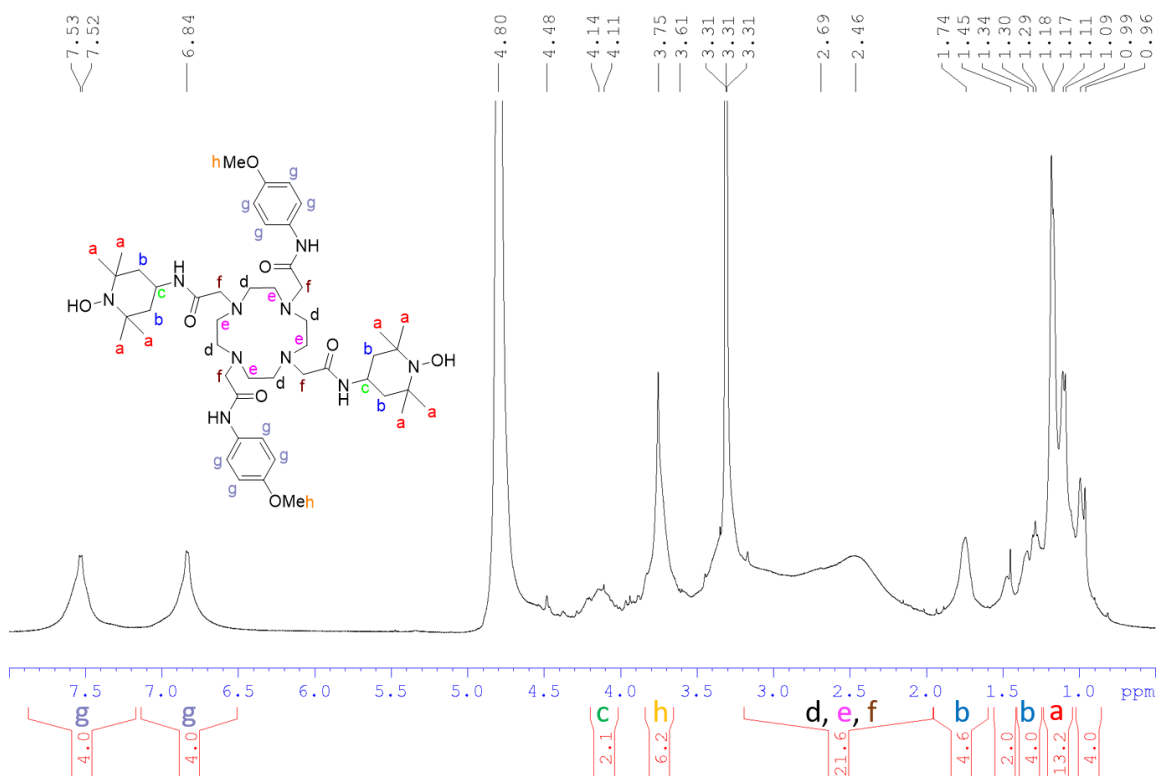


Figure IX-6 : RMN ligand D₅ dans MeOD après réduction à l'ascorbate.

Ligand D₇:

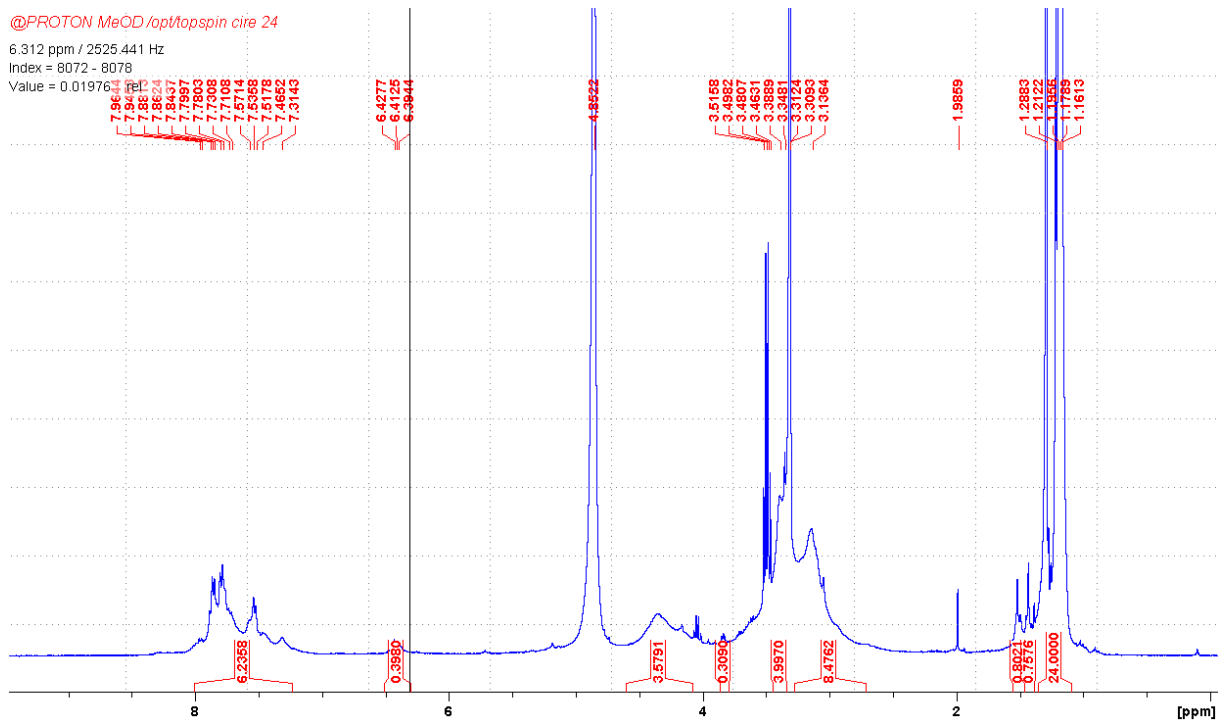
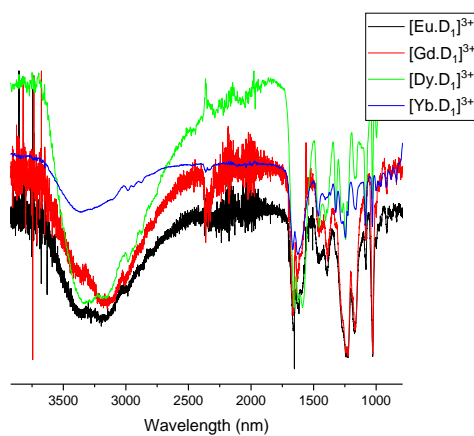
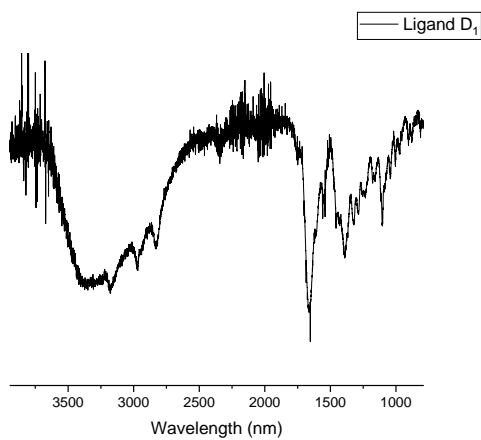
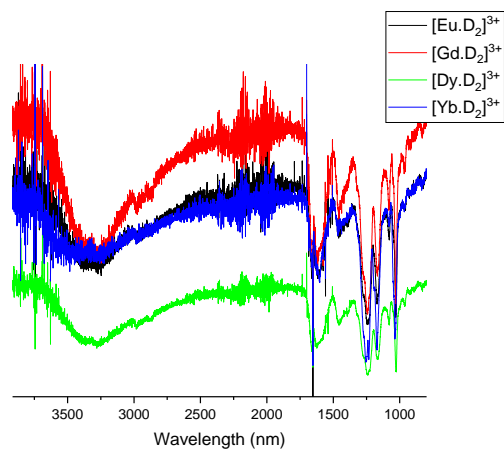
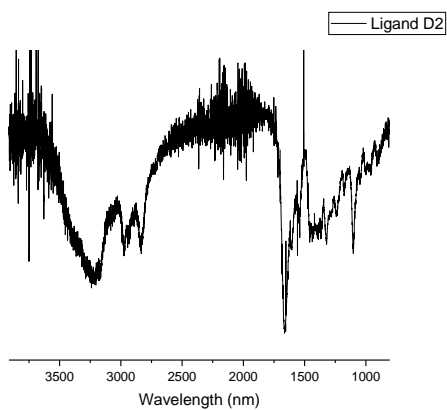
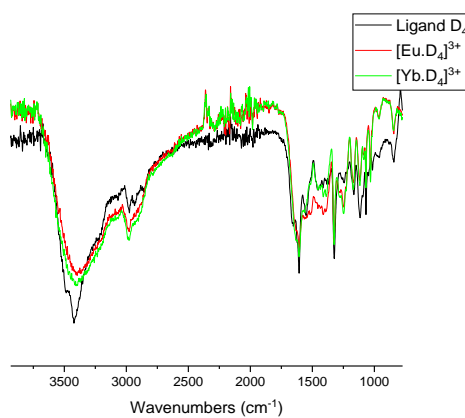
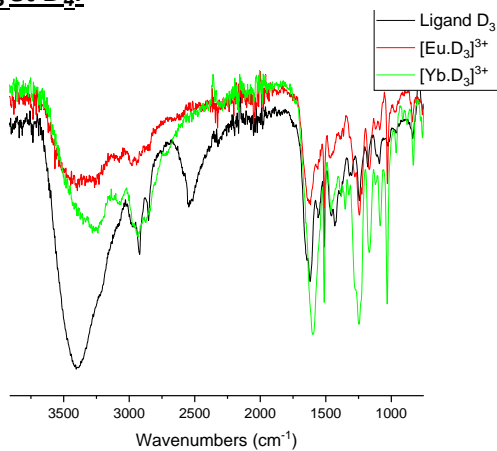
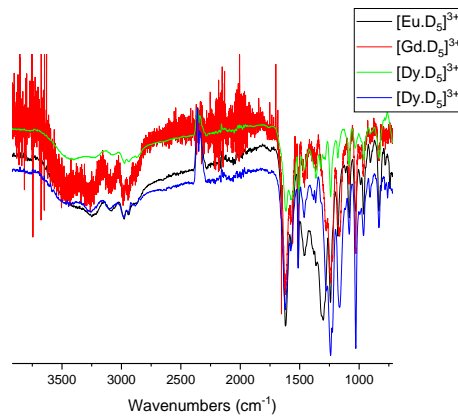
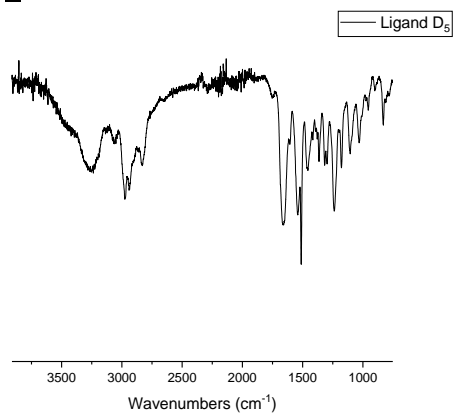


Figure IX-7 : RMN du ligand D₇ dans MeOD.

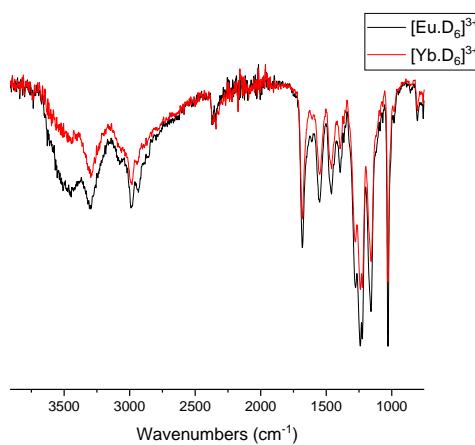
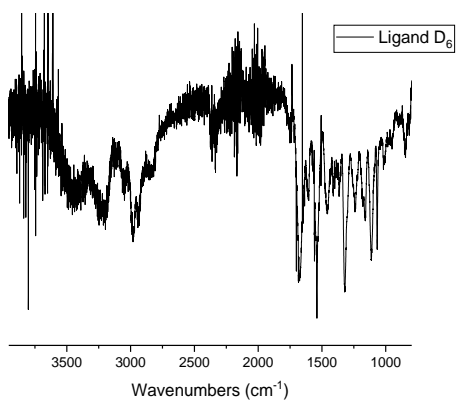
IX.2 INFRA ROUGE

Série D₁:Série D₂:Série D₃ et D₄:

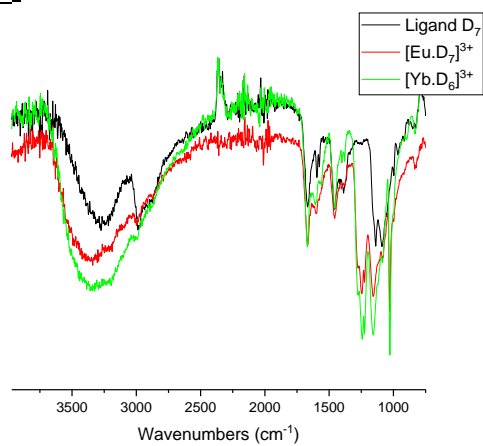
Série D₅:



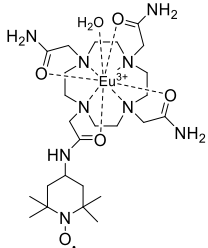
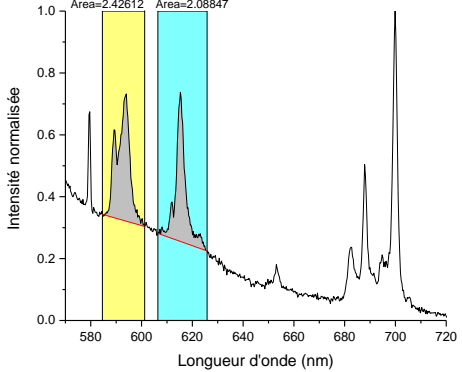
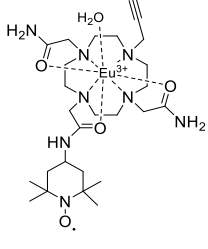
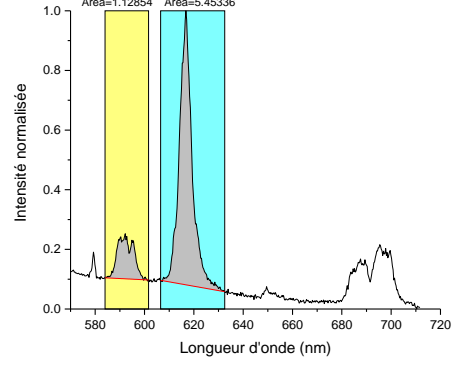
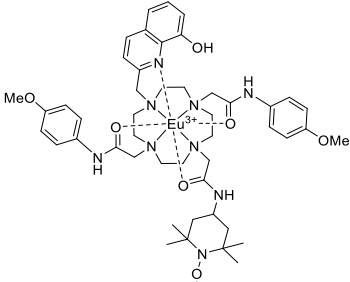
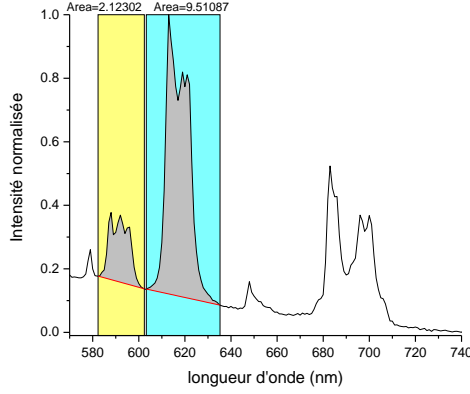
Série D₆:

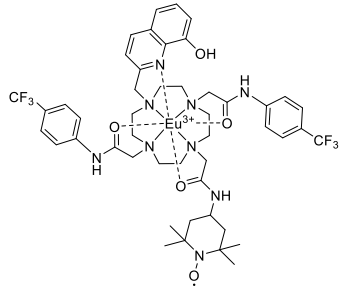
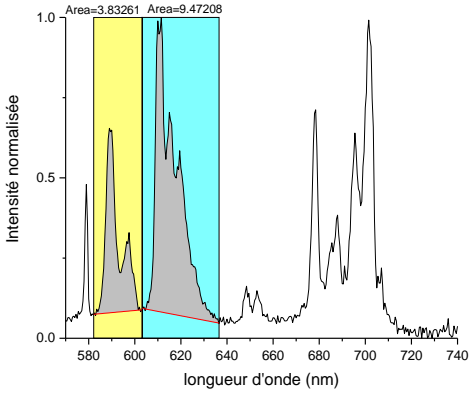
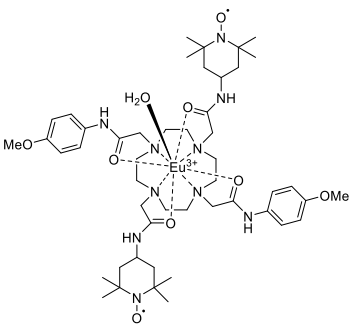
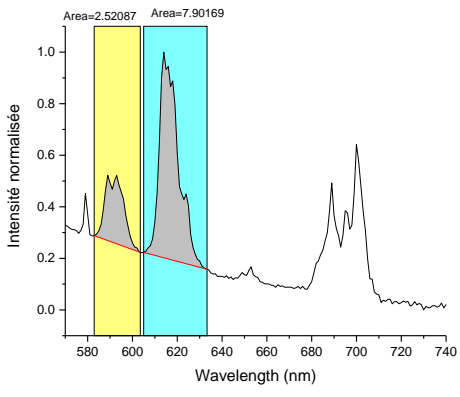
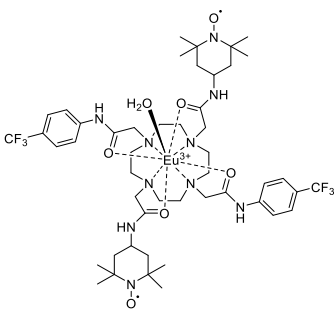
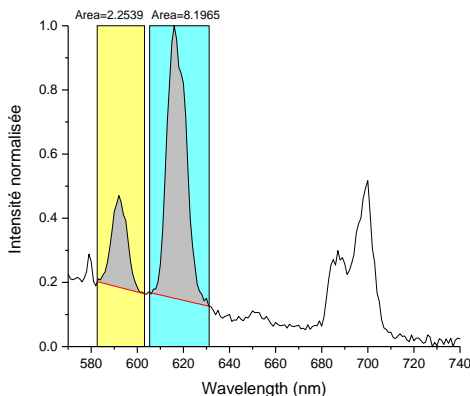


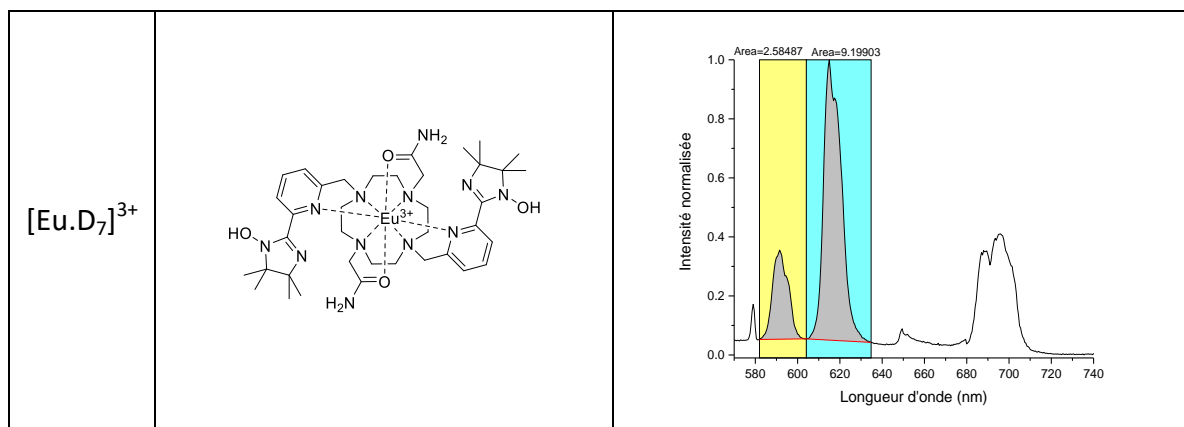
Série D₇:



IX.3 LUMINESCENCE

| Complexe | | Spectres Europium |
|------------------------|---|--|
| $[\text{Eu.D}_1]^{3+}$ |  |  |
| $[\text{Eu.D}_2]^{3+}$ |  |  |
| $[\text{Eu.D}_3]^{3+}$ |  |  |

| | | |
|------------------------|---|--|
| $[\text{Eu.D}_4]^{3+}$ |  <p>The structure shows a central Eu³⁺ ion coordinated by a macrocyclic ligand with four nitrogen atoms and four oxygen atoms. The ligand is substituted with two 4-(trifluoromethyl)phenylamino groups and a 2-hydroxyphenyl group. A 1,3,5-trimethylimidazolidinium cation is also present.</p> |  <p>Normalized fluorescence spectrum of $[\text{Eu.D}_4]^{3+}$. The x-axis is labeled "longueur d'onde (nm)" and ranges from 580 to 740. The y-axis is labeled "Intensité normalisée" and ranges from 0.0 to 1.0. Two peaks are highlighted with shaded areas: a yellow peak at approximately 595 nm (Area=3.83261) and a cyan peak at approximately 615 nm (Area=9.47208).</p> |
| $[\text{Eu.D}_5]^{3+}$ |  <p>The structure shows a central Eu³⁺ ion coordinated by a macrocyclic ligand with four nitrogen atoms and four oxygen atoms. The ligand is substituted with two 4-methoxyphenylamino groups and a 2-hydroxyphenyl group. A 1,3,5-trimethylimidazolidinium cation is also present.</p> |  <p>Normalized fluorescence spectrum of $[\text{Eu.D}_5]^{3+}$. The x-axis is labeled "Wavelength (nm)" and ranges from 580 to 740. The y-axis is labeled "Intensité normalisée" and ranges from 0.0 to 1.0. Two peaks are highlighted with shaded areas: a yellow peak at approximately 595 nm (Area=2.52087) and a cyan peak at approximately 615 nm (Area=7.90169).</p> |
| $[\text{Eu.D}_6]^{3+}$ |  <p>The structure shows a central Eu³⁺ ion coordinated by a macrocyclic ligand with four nitrogen atoms and four oxygen atoms. The ligand is substituted with two 4-(trifluoromethyl)phenylamino groups and a 2-hydroxyphenyl group. A 1,3,5-trimethylimidazolidinium cation is also present.</p> |  <p>Normalized fluorescence spectrum of $[\text{Eu.D}_6]^{3+}$. The x-axis is labeled "Wavelength (nm)" and ranges from 580 to 740. The y-axis is labeled "Intensité normalisée" and ranges from 0.0 to 1.0. Two peaks are highlighted with shaded areas: a yellow peak at approximately 595 nm (Area=2.2539) and a cyan peak at approximately 615 nm (Area=8.1965).</p> |



Nombre de molécule de solvant coordonnées pour le complexe [Eu.D₇]³⁺

$$m = 2,1 \times \Delta k_{\text{obs}}$$

Eq. A.1

$$\text{où } \Delta k_{\text{obs}} = k_{\text{MeOH}} - k_{\text{MeOD}} = 1/\tau_{\text{MeOH}} - 1/\tau_{\text{MeOD}}$$

Tableau IX-A : Temps de vie des états excités du complexe [Eu.D₇]³⁺, *m* = nombre de molécule de méthanol coordonnée ± 0,5.

| Complexe d'euporium | τ_{MeOH} (ms) | τ_{MeOD} (ms) | Δk_{obs} | <i>m</i> (Eq. A.1) |
|--|---------------------------|---------------------------|-------------------------|--------------------|
| [D ₇ .Eu] ³⁺ red | 0,75 | 2,05 | 0,85 | 1,8 |
| [D ₇ .Eu] ³⁺ ox | 0,76 | 1,96 | 0,81 | 1,7 |

IX.4 CEST

Série D_1/D_2

Influence du pH sur l'effet CEST :

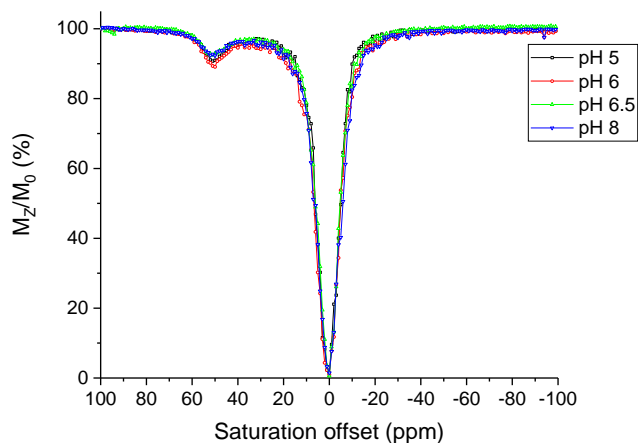


Figure IX-8 : Spectre CEST d'une solution à 12mM du complexe $[EuD_1]^{3+}$ en fonction du pH. Le signal CEST à +51 ppm provient d'une molécule d'eau coordonnée à l'euporium sur le complexe sous sa forme d'hydroxylamine. Enregistré à 11,7 T, 298 K, $B_1 = 1064$ Hz (25 μ T), (66% H_2O - tampon HEPES 0,1M dans CD_3CN) et temps d'irradiation de 3 s.

Spectres CEST du complexe DyD_2^{3+} :

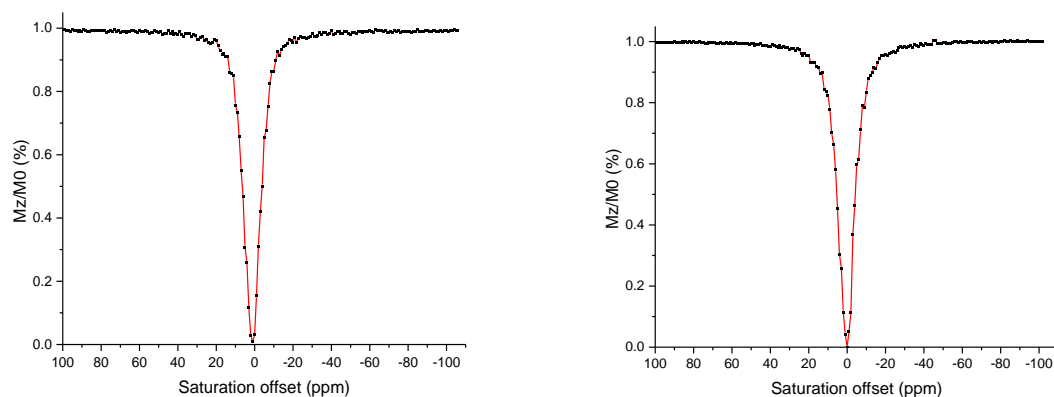


Figure IX-9 : Spectres CEST d'une solution à 20 mM de DyD_2^{3+} sous sa forme oxydée (gauche) et réduite (droite) en utilisant 2 équivalents d'ascorbate de sodium. Enregistré à 11.7 T, 298 K, dans un mélange d'une solution tampon à 0.07M d'HEPES à pH 7.4 et de CD_3CN (2/1), $B_1 = 25$ μ T, et un temps d'irradiation de 3 s.

Mesure de la vitesse d'échange :

Grace à une méthode développée par P. van Zijl *et al.* en 2006^[184], le QUEST (« Quantifying Exchange using Saturation Time ») et le QUESP (« Quantifying Exchange Exchange using Saturation Power ») permettent de remonter aux vitesses d'échanges des protons. Le QUEST apparaissant comme la méthode la plus appropriée pour mesurer les hautes vitesses d'échanges contrairement au QUESP. Les vitesses d'échanges de nos composés étant relativement faible. Nous nous sommes alors concentrés sur des mesures de l'effet CEST à

différentes puissances en fonction de la température. Différentes méthodes permettant d'obtenir la vitesse d'échange des protons nécessitent de connaître la concentration en agent de contraste. Cependant, plusieurs isomères peuvent être présents en solution et la proportion de chacun des isomères ne peut pas être déterminée simplement. Il existe d'autres méthodes permettant de déterminer les vitesses d'échange des protons qui ne dépendent pas de la concentration du complexe.

La méthode appelée « oméga-plot » que nous allons utiliser provient d'une modification de l'analyse des expériences QUESP ^[130]. Le tracé de $M_S/(M_0-M_S)$ en fonction de $1/\omega^2$ donne une droite linéaire dont l'intersection avec l'axe des abscisses permet d'obtenir une valeur directe de la vitesse d'échange $1/k_{ex}^2$ (équation 1).

$$-\frac{1}{k_{ex}^2} = \frac{1}{\omega^2}$$

Donc expérimentalement on détermine la vitesse d'échange de cette manière :

$$y = ax + b \Rightarrow x = \frac{(y - b)}{a}$$

$$x = \frac{-1}{k_{ex}^2} \Rightarrow k_{ex}^2 = \frac{-1}{x}$$

$$k_{ex} = \sqrt{\frac{-1}{x}}$$

En appliquant la méthode de « l'omega plot », c'est en traçant $M_S/(M_0-M_S)$ en fonction de $1/\omega^2$ qu'il devient possible de déterminer la vitesse d'échange de la molécule d'eau. Grâce à l'équation décrite ci-dessus, des vitesses d'échange de 3057 et 4200 s^{-1} à 25°C peuvent être déterminés pour le complexe $[Eu.D_1]^{3+}$ sous forme oxydée et réduite.

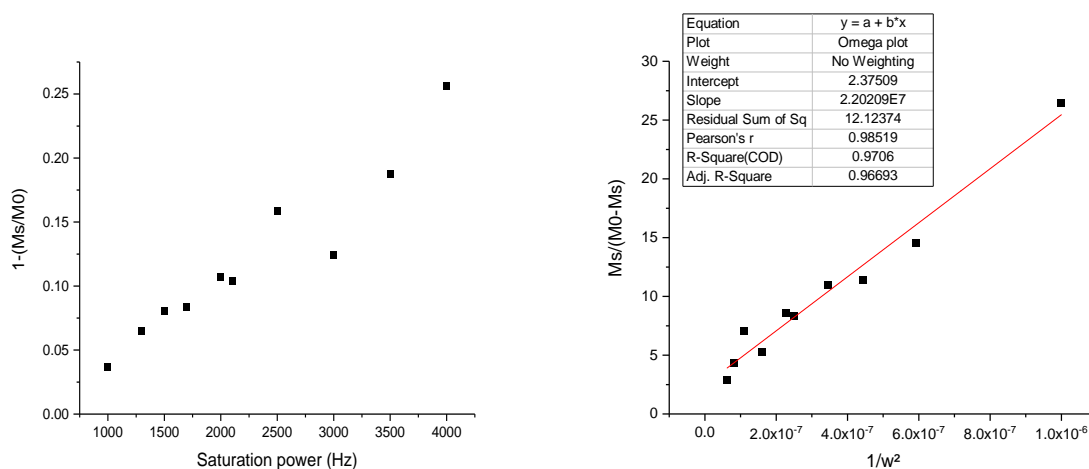


Figure IX-10 : Mesure QUESP pour $[Eu.D_1]^{3+}$ ox (quantification of exchange rate by using saturation power) (gauche) et détermination de la vitesse d'échange (droite).

Annexe

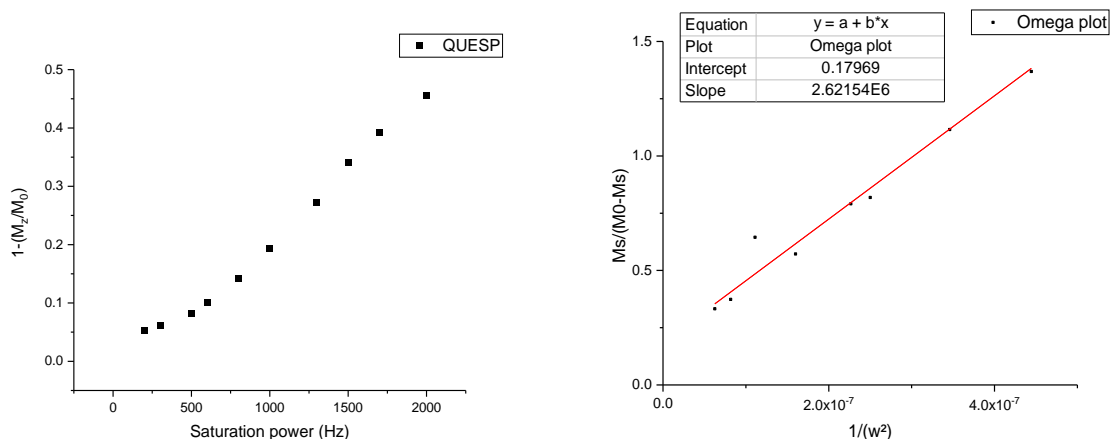


Figure IX-11 : Mesure QUESP pour $[Eu.D_1]^{3+}$ réduit (quantification of exchange rate by using saturation power) (gauche) et détermination de la vitesse d'échange (droite).

| $[Eu.D_1]^{3+}$ Omega plot | Ox à pH 7,4 | Red à pH 7,4 |
|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Vitesse d'échange | 3057 s^{-1} | 4200 s^{-1} |
| τ_M : temps de résidence | $327 \mu\text{s}$ | $238 \mu\text{s}$ |

Série D₃/D₄

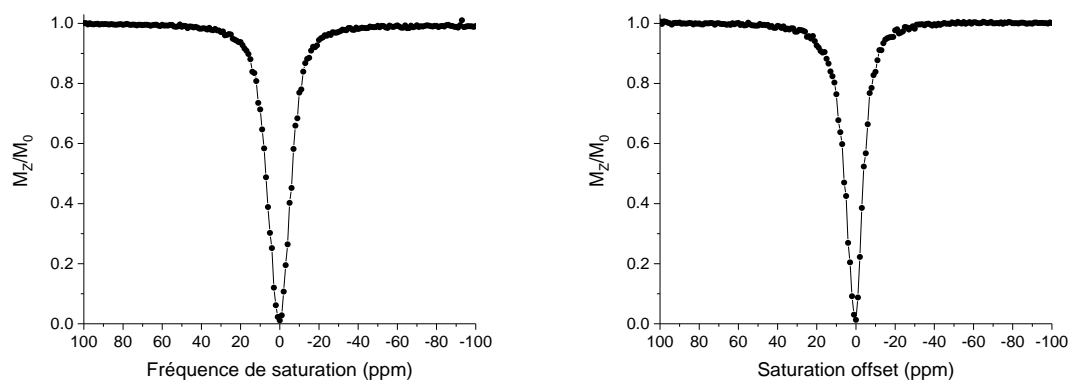


Figure IX-12 : Spectres CEST d'une solution à 20 mM de $[Yb.D_4]^{3+}$ sous sa forme oxydée (gauche) et réduite (droite) en utilisant 2 équivalents d'ascorbate de sodium. Enregistré à 11,7 T, 298 K, dans un mélange d'une solution tampon à 0,07M d'HEPES à pH 7,5 et de CD_3CN (2/1), $B_1 = 19 \mu\text{T}$, et un temps d'irradiation de 4 s.

Série D₅/D₆

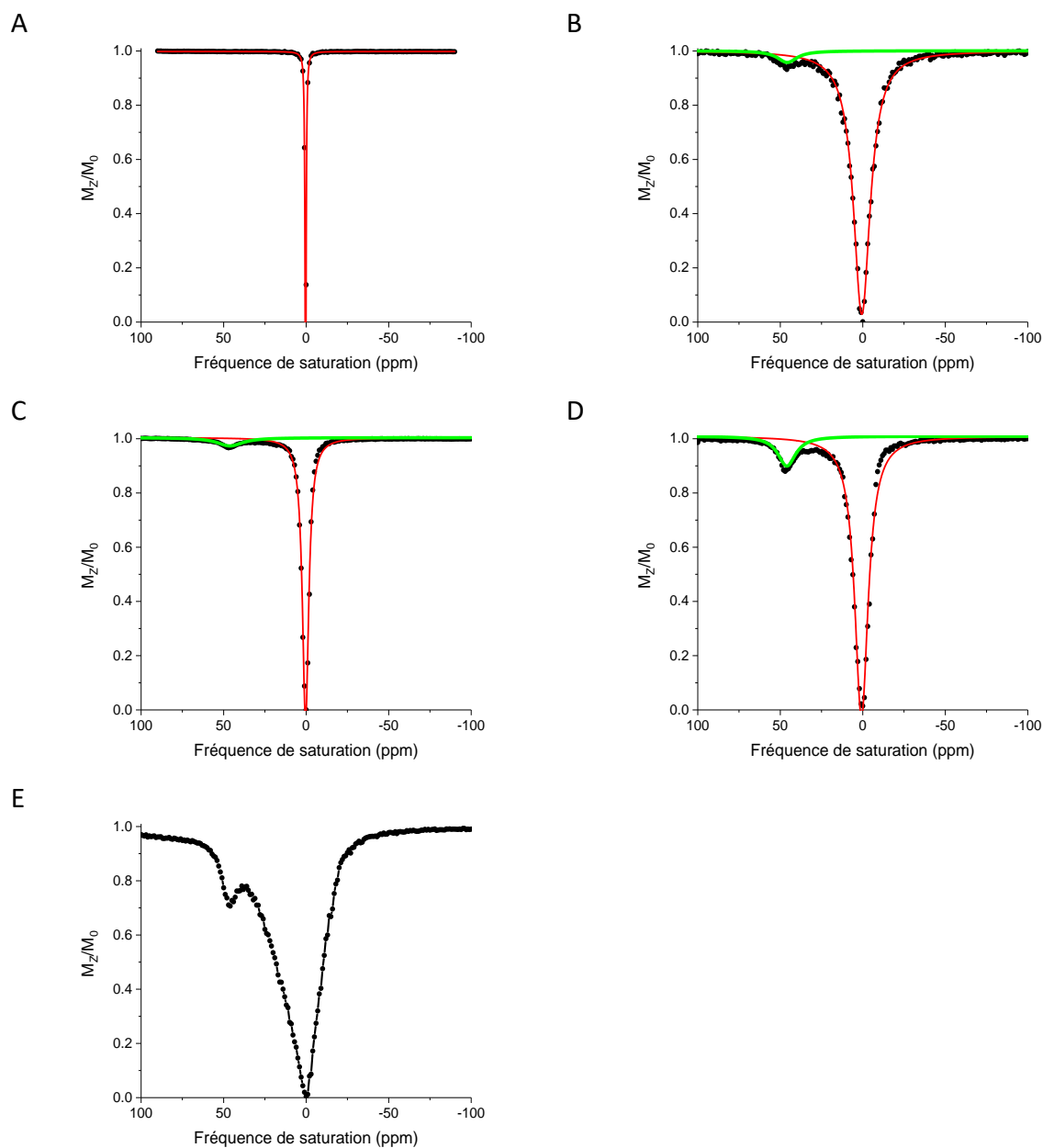


Figure IX-13 : Spectres CEST d'une solution à 20 mM de complexe $[Eu.D_5]^{3+}$. Réduction en utilisant 2 équivalents d'ascorbate de sodium. Enregistré à 11,7 T, 298 K, dans un mélange d'une solution tampon à 0,07M d'HEPES à pH 7,4 et de CD_3CN (2/1) à différentes puissances B_1 (A = forme oxydée à 2,4 μT , B = forme oxydée à 25 μT , C = forme réduite à 2,4 μT , D = forme réduite à 19 μT , E = forme réduite à 25 μT) et un temps d'irradiation de 4 s.

Mesure de la vitesse d'échange du complexe $[Eu.D_5]^{3+}$

Expérimentalement, l'intensité du signal CEST est mesurée en fonction de la puissance de l'onde B_1 appliquée. A 15°C, l'intensité du signal évolue de 0% à près de 40% lorsque la puissance passe de 0 Hz à 3500 Hz. A 25°C et 37°C, l'intensité est proche pour de faibles puissances appliquées mais atteint près de 19% et 22% à 3500 Hz, respectivement (Figure IX-14).

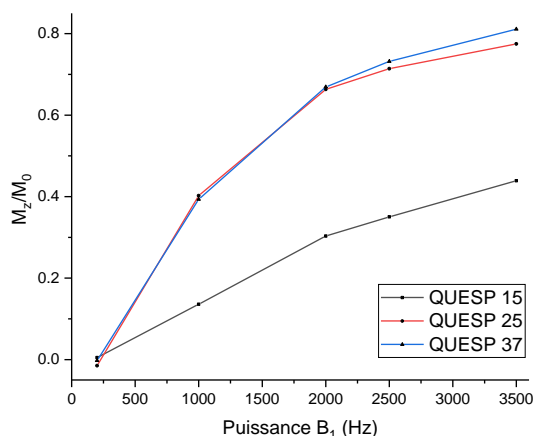


Figure IX-14: Mesure expérimentale du signal CEST obtenu sur le complexe $[Eu.D_5]^{3+}$ en fonction de de la puissance de saturation appliquée.

En appliquant la méthode de « l'oméga plot », les vitesses d'échange mesurées sont de 2450 s^{-1} à 15°C , 2640 s^{-1} à 25°C et 3270 s^{-1} à 37°C .

Mesure de la vitesse d'échange du complexe $[Eu.D_6]^{3+}$

Ainsi à 37°C , la vitesse d'échange obtenue est de 4000 s^{-1} ce qui équivaut à un temps de résidence de la molécule d'eau de $250 \mu\text{s}$ (Figure IX-15, A et B). Cette valeur est plus élevée que celle obtenue pour le complexe $[Eu.D_5]^{3+}$ qui était de 3270 s^{-1} .

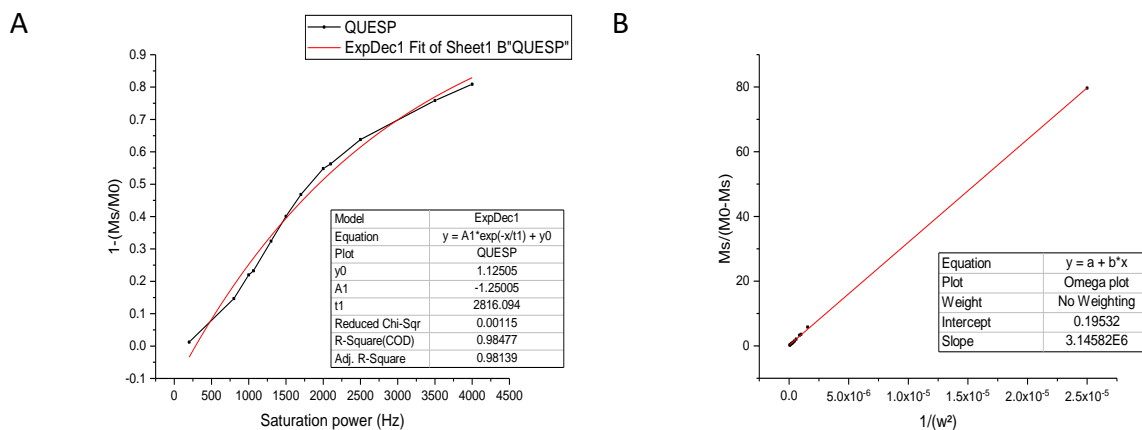


Figure IX-15: Mesure de la vitesse d'échange du complexe $[Eu.D_6]^{3+}$. A = Mesure QUESP, B = « oméga plot ».

| <i>Omega plot</i> | $[Eu.D_5]^{3+}$ | $[Eu.D_6]^{3+}$ |
|-----------------------------|----------------------|----------------------|
| Vitesse d'échange à 15°C | 2450 s ⁻¹ | |
| τ : temps de résidence | 410 μ s | |
| Vitesse d'échange à 25°C | 2650 s ⁻¹ | |
| τ : temps de résidence | 380 μ s | |
| Vitesse d'échange à 37°C | 3300 s ⁻¹ | 4000 s ⁻¹ |
| τ : temps de résidence | 300 μ s | 250 μ s |

Mesure du temps de relaxation et de la relaxivité de l'ensemble des complexes synthétisés :

Tableau IX-B : Mesure du temps de relaxation de l'ensemble des complexes synthétisés. Spectres enregistrés à 11,7 T, 298 K, dans un mélange H₂O:CD₃CN (2:1), [HEPES] = 0,07M à pH 7,4.

| Complexe | T_1^{OX} (s) | T_1^{RED} (s) | Activité CEST |
|-----------------|----------------|-----------------|-----------------------------|
| $[Eu.D_1]^{3+}$ | 0,89 | 2,73 | 51 ppm (6%/12%) |
| $[Eu.D_2]^{3+}$ | 0,24 | 2,2 | - |
| $[Eu.D_3]^{3+}$ | 0,21 | 2,10 | 25 ppm (épaulement) |
| $[Eu.D_4]^{3+}$ | 0,59 | 3,0 | - |
| $[Eu.D_5]^{3+}$ | 0,15 | 1,94 | 46 ppm (30%) ^a |
| $[Eu.D_6]^{3+}$ | 0,16 | 2,24 | 40 ppm (12%) ^b |
| $[Eu.D_7]^{3+}$ | 0,12 | 1,17 | - |
| $[Yb.D_1]^{3+}$ | 0,67 | 1,77 | - |
| $[Yb.D_2]^{3+}$ | 0,44 | 1,06 | - |
| $[Yb.D_3]^{3+}$ | 0,78 | | - |
| $[Yb.D_4]^{3+}$ | 0,83 | 2,93 | - |
| $[Yb.D_5]^{3+}$ | 0,13 | 1,18 | -10 ppm (12%), -20 ppm (5%) |
| $[Yb.D_6]^{3+}$ | 0,12 | 1,80 | 20 ppm (épaulement) |
| $[Yb.D_7]^{3+}$ | 0,12 | 0,30 | - |
| $[Dy.D_1]^{3+}$ | 0,13 | 0,33 | - |
| $[Dy.D_2]^{3+}$ | 0,06 | 0,11 | - |
| $[Dy.D_5]^{3+}$ | 0,26 | 0,74 | - |

IX.5 RPE

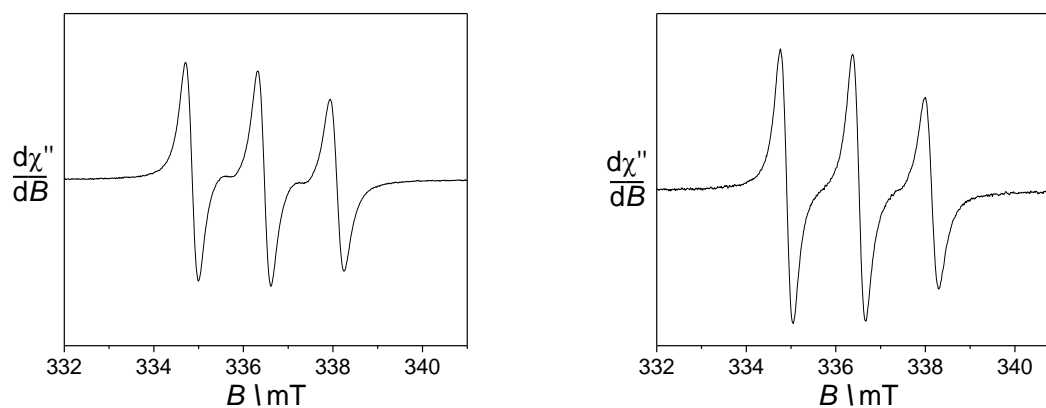
Spectres RPE des complexes $[Eu.D_3]^{3+}$ et $[Eu.D_4]^{3+}$:

Figure IX-16 : Spectres RPE en bande X du complexe $[Eu.D_3]^{3+}$ (gauche) et $[Eu.D_4]^{3+}$ (droite) à 0,5 mM dans MeCN à température ambiante. Fréquence micro-onde : 9,42 GHz ; puissance : 1,7 mW (gauche), 0,008 mW (droite) ; modulation d'amplitude : 0,2 mT, modulation de fréquence : 100 KHz.

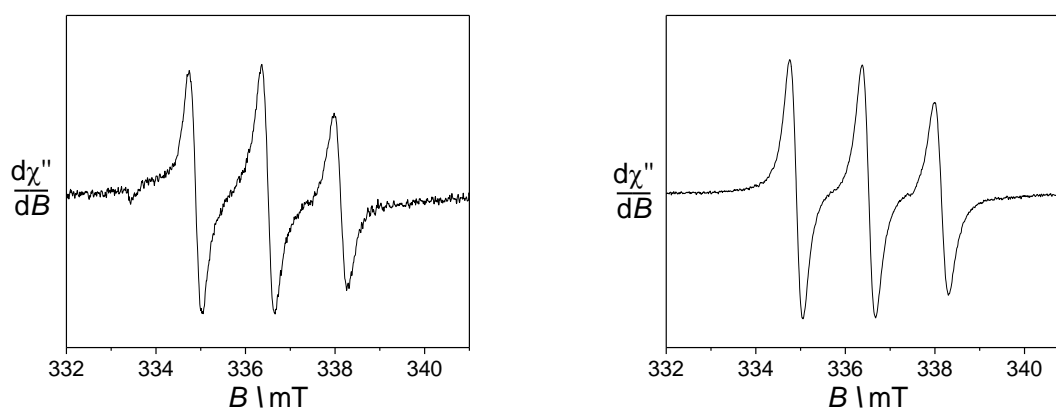
Spectres RPE des complexes $[Yb.D_4]^{3+}$:

Figure IX-17 : Spectres RPE en bande X du complexe $[Yb.D_3]^{3+}$ (gauche) et du complexe $[Yb.D_4]^{3+}$ (droite) en solution dans MeOH à 0,5 mM à $T = 293K$. Fréquence micro-onde : 9,42 GHz ; puissance : 3,5 mW ; modulation d'amplitude : 0,2 mT, modulation de fréquence : 100 KHz.

Spectres RPE des complexes $[Dy.D_5]^{3+}$:

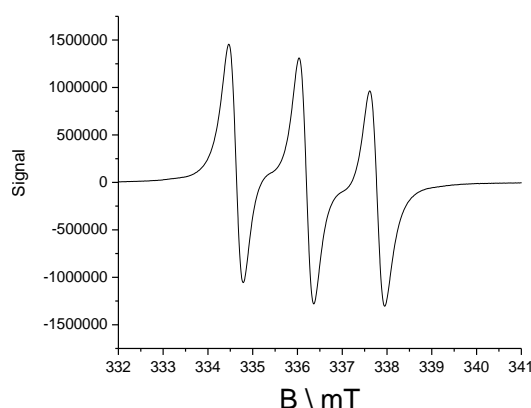


Figure IX-18 : Spectre RPE en bande X du complexe $[Dy.D_5]^{3+}$ en solution dans MeCN à 0,5 mM à $T = 293K$. Fréquence micro-onde : 9,42 GHz ; puissance : 3,5 mW ; modulation d'amplitude : 0,2 mT, modulation de fréquence : 100 KHz.

Spectres RPE des complexes $[Eu.D_5]^{3+}$ et $[Eu.D_6]^{3+}$:

Les spectres RPE des complexes d'euporium $[Eu.D_5]^{3+}$ et $[Eu.D_6]^{3+}$ présentent le même signal que celui des ligands libres à 40K, avec une intensité comparable (Figure IX-19).

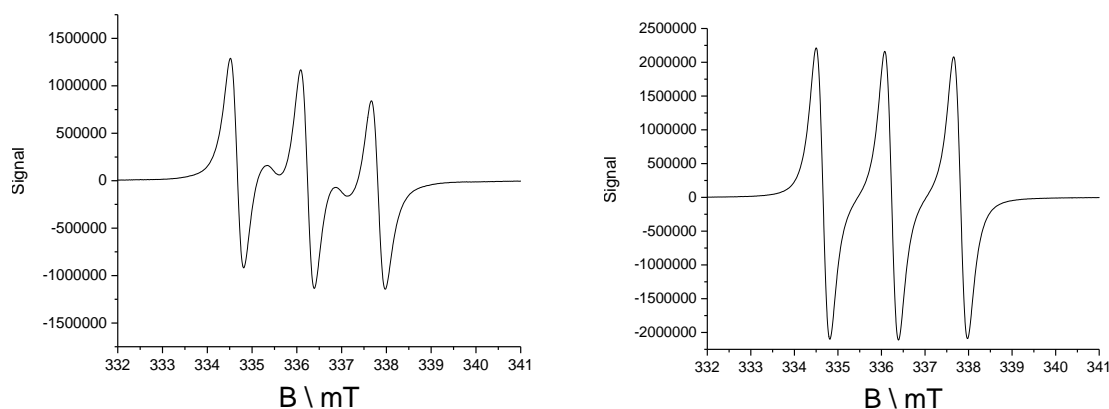


Figure IX-19 : Spectres RPE en bande X du complexe $[Eu.D_5]^{3+}$ (gauche) et du complexe $[Eu.D_6]^{3+}$ (droite) en solution dans MeCN à 0,5 mM à $T = 293K$. Fréquence micro-onde : 9,42 GHz ; puissance : 3,5 mW ; modulation d'amplitude : 0,2 mT, modulation de fréquence : 100 KHz.

Le spectre RPE des complexes d'euporium $[Eu.D_5]^{3+}$ et $[Eu.D_6]^{3+}$ (Figure IX-20) présentent un signal typique d'un radical nitroxyde isolé à 6K. L'absence d'interaction magnétique entre l'euporium et le nitroxyde n'est pas surprenante compte tenu du moment magnétique très faible de l'euporium (III).

Annexe

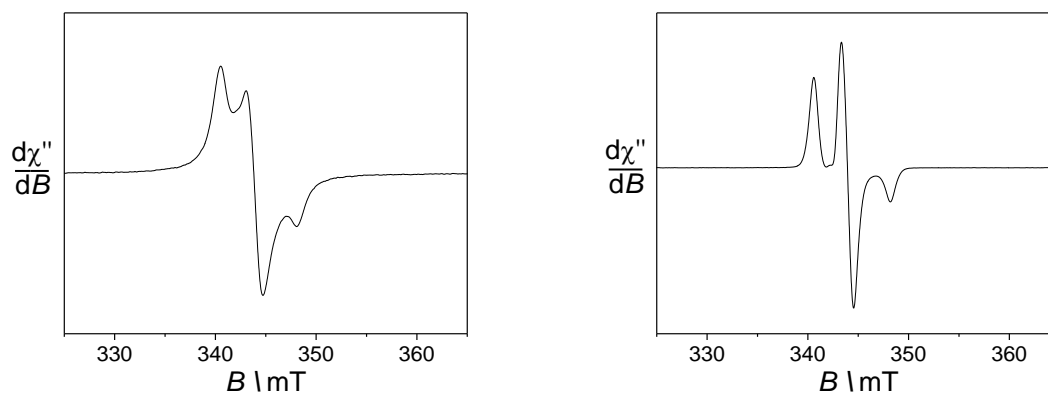


Figure IX-20 : Spectres RPE en bande X du complexe $[\text{Eu.D}_5]^{3+}$ à 8K (gauche) et $[\text{Eu.D}_6]^{3+}$ à 6K (droite) dans une solution aqueuse à 0,45 mM contenant 10% de glycérol. Fréquence micro-onde : 9,63 GHz ; puissance : 0,8 mW (gauche) et 0,08 mW (droite) ; modulation d'amplitude : 0,2 mT, modulation de fréquence : 100 KHz.

IX.6 MAGNETISME

La méthode d'Evans est une technique utilisée permettant de connaître le moment magnétique effectif μ_B d'un composé en solution en mesurant sa susceptibilité magnétique et ainsi de connaître sa concentration. La susceptibilité magnétique χ est la mesure de l'aimantation d'un composé lorsque celui-ci est placé dans un champ magnétique. En pratique, un insert contenant un solvant deutéré est placé au sein d'un tube RMN contenant le composant en solution dans le même type de solvant. Deux signaux correspondant de résidu de solvant sont alors observés sur le spectre RMN, le décalage de fréquence en Hz obtenu est linéairement dépendant du champ magnétique appliqué et donne une mesure de cette susceptibilité magnétique selon l'équation X qui suit :

$$\chi_{mass} = \frac{3\Delta f}{4\pi f m} + \chi_0 + \frac{\chi_0(d_0 - d_s)}{m} \quad \text{Eq 9-1}$$

Avec χ_{mass} = susceptibilité massique en $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, Δf = décalage de fréquence en Hertz, f = fréquence du spectromètre (400×10^6 Hz), m = concentration massique du composé paramagnétique en $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$, χ_0 = susceptibilité massique du solvant en $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, d_0 = densité du solvant en $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$, d_s = densité de la solution en $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$.

Le complexe $[\text{Gd.D}_2]^{3+}$ a été étudié par la méthode d'Evans sous sa forme réduite hydroxylamine. Ce complexe possède 7 électrons célibataires et possède en théorie un moment magnétique effectif de $7,94 \mu_B$. En solution à une concentration attendue de 1,8 mM dans du D_2O , le déplacement chimique induit par le Gd sur le solvant est donc de 69,85 Hz sur un spectromètre de 400 Mz. En appliquant les facteurs de correction adéquat comme la susceptibilité diamagnétique, la concentration réelle de notre composé s'élève à 1,6 mM (Tableau IX-C).

Tableau IX-C : Moment magnétique effectif du $[\text{Gd.D}_2]^{3+}$.

| | Mesuré | attendu |
|--|--------------------|-------------------|
| Température | 297 | 297 |
| Décalage de fréquence en Hz | 69.85 | 69.85 |
| Fréquence du spectromètre en Hz | 400000000 | 400000000 |
| Concentration en moles/L | 0.0018 | 0.00161 |
| Poids moléculaire en g/mol | 1158.2 | 1158.2 |
| Susceptibilité diamagnétique | -0.000432 | -0.000432 |
| Susceptibilité massique mesurée | 0.000019997 | 0.000022357 |
| Susceptibilité molaire mesurée | 0.02316036 | 0.02589357 |
| Susceptibilité molaire paramagnétique corrigée | 0.02359236 | 0.02632557 |
| Moment magnétique effectif en magnéton de Bohr μ_B | 7.517652686 | 7.94118763 |

IX.7 CHROMATOGRAPHY

DCVC : Dry Column Vacuum Chromatography ^[185]



Figure IX-21 : Images obtenues par le Plateau Synthèse Organique du DCM.

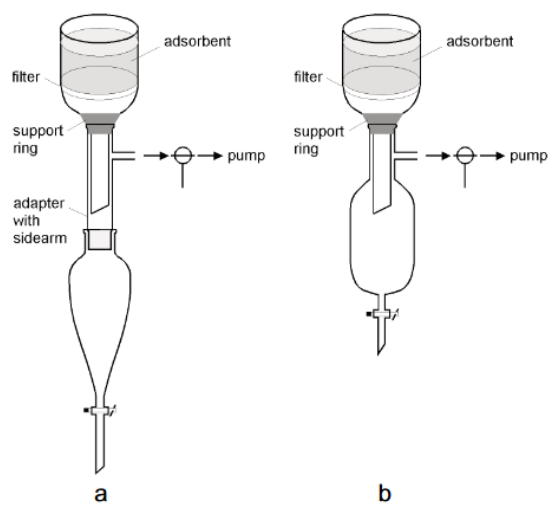


Figure IX-22 : Schéma du matériel utilisé pour réaliser une DCVC.

IX.8 X-RAY STRUCTURE DETERMINATION

X-Ray Structure determination of Ligand D₂. Crystals of Ligand D₂ were obtained by slow evaporation of water. Crystals of Ligand D₂ were selected damped in a paraffin mixture, mounted on a nylon cryo-loop then centered on a Bruker-AXS-enraf-nonius KappaAPEXII goniometer equipped with a high brilliance micro-source at Mo K α radiation ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) at 200 K. The data was collected with an APEXII 2D detector, then integrated and corrected for Lorentz and polarization effects using the EVAL14^[174] software. Final cell parameters were obtained post-refining the whole data. The data was then reintegrated and corrected for absorption using the SADABS^[175] program and finally merged with the software XPREP^[176]. Crystal and data collection details are given in Table 1. The structure was solved by direct methods and refined by full-matrix least square methods with respectively, the SHELXT-2016 and SHELXL-2013 programs^[177] implemented in Olex2 software.^[178] C, Cl, Br, Na, N, O atoms were refined with anisotropic thermal parameters. H atoms were set geometrically, riding on the carrier atoms, with isotropic thermal parameters.

Table 1 : Crystal data and structure refinement for Ligand D₂.

| Compound | Ligand D ₂ |
|---|--|
| Formula | C ₂₆ H ₄₇ N ₈ NaO ₄ · (H ₂ O) · Br _{0.5} · Cl _{0.5} |
| F _w [g.mol ⁻¹] | 634.40 |
| T [K] | 200 |
| Morphology | block |
| Color | orange |
| Crystal size mm | 0.22 x 0.23 x 0.28 |
| Crystal system | Triclinic |
| Space group | P-1 |
| a [Å] | 10.316(2) |
| b [Å] | 13.339(3) |
| c [Å] | 13.358(3) |
| α [°] | 108.37(3) |
| β [°] | 95.20(3) |
| γ [°] | 97.87(3) |
| Unit-cell volume [Å ³] | 1710.4(7) |
| Z | 2 |
| D _x [g.cm ⁻³] | 1.232 |
| μ [mm ⁻¹] | 0.714 |
| F(000) | 676 |
| Radiation | MoKα (λ = 0.71073) |
| Θ range for data collection/° | 1.623 to 25.000 |
| Index ranges | -12 ≤ h ≤ 12, -15 ≤ k ≤ 15, -15 ≤ l ≤ 15 |
| Total reflections | 26201 |
| Unique reflections | 5952 |
| Used reflections (I > 2σ(I)) | 4646 |
| Refined parameters | 635 |
| R _{int} . | 0.0744 |
| R1 | 0.0741 |
| R(w) ^a | 0.1995 |
| Goodness of fit S | 1.006 |
| Δρ _{min} /Δρ _{max} (e·Å ⁻³) | -0.328/0643 |

^a Refinement based on F² where $w = 1/[\sigma^2(Fo^2) + (0.115P)^2 + 1.6066P]$ where $P = (Fo^2 + 2Fc^2)/3$ for Ligand D₂

Résumé de la thèse

Mots clés : Imagerie médicale – Complexes de coordination – Radicaux organiques – Lanthanides - Spectroscopie

La naissance de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) marque un progrès majeur dans l'histoire de la radiologie. Depuis bientôt 50 ans, l'IRM est devenu un outil d'imagerie et de diagnostic indispensable. Un des principaux objectifs actuels est d'obtenir un meilleur contraste et une meilleure sensibilité afin de comprendre les phénomènes biochimiques et biologiques pour de meilleurs diagnostics des patients, on parle alors d'imagerie moléculaire. Le principe de cette discipline est de détecter les molécules spécifiques d'une cible à étudier telles que des séquences d'ADN, des marqueurs cellulaires, des enzymes, des espèces réactives... Il sera alors possible par exemple, de détecter des cancers naissant. Les espèces à étudier sont souvent présentes en très faibles quantités dans les tissus et nécessitent des techniques d'imageries ayant une très bonne sensibilité. L'IRM dispose d'une très bonne résolution mais souffre d'un manque de sensibilité. C'est pourquoi des agents de contraste sont ajoutés afin de gagner en sensibilité. A contrario, l'imagerie optique bénéficie d'une sensibilité accrue mais ne permet pas une étude en profondeur. En couplant ces deux techniques, il serait alors possible d'étudier avec précision les mécanismes moléculaires au plus profond des tissus.

C'est dans cette optique que ces travaux de thèse sont nés, afin de mettre au point des agents de contraste à base de lanthanides et de ligands non innocents répondant spécifiquement au stress oxydant. La détection de ce stress oxydant par plusieurs techniques différentes pourrait être réalisé à l'aide de sonde bimodale qui allierait les bénéfices de l'IRM et de l'imagerie optique, à savoir une bonne résolution et une haute sensibilité. Afin de gagner encore plus en sensibilité, une nouvelle technique dérivée de l'IRM, appelée « CEST » pour transfert de saturation par échange chimique est née. L'objet de cette thèse est d'apporter la preuve de concept de sondes bimodales pour la détection d'espèces réactive de l'oxygène par des techniques d'imagerie magnétique et d'imagerie optique.

Pour cela, des nouvelles familles de complexes de lanthanides portant un ligand radicalaire ou pro-radicalaire ont été synthétisés chimiquement et ont été étudiés par différentes techniques spectroscopiques, électrochimiques. Ces analyses ont permis de valider la preuve de concept par la création de sonde montrant une altération du signal en fonction de l'état rédox du ligand.

Abstract

Key words: Medical imaging– Coordination complexes – Organic radicals – Lanthanides - Spectroscopy

The birth of magnetic resonance imaging (MRI) marks a major advance in the history of radiology. For almost 50 years, MRI has become an indispensable imaging and diagnostic tool. One of the main objectives is now to obtain better contrast and sensitivity in order to understand the biochemical and biological phenomena for better patient diagnostics, this is called molecular imaging. The principle of this discipline is to detect specific molecules, such as DNA sequences, cell markers, enzymes, reactive species ... It will then be possible, for example, to detect nascent cancers. The specific molecules are often present in very small quantities in the tissues and require imaging techniques with very good sensitivity. MRI has very good resolution but suffers from a lack of sensitivity. This is why contrast agents are added in order to gain in sensitivity. Conversely, optical imaging benefits from increased sensitivity but does not allow in-depth study. By coupling these two techniques, it would then be possible to study with precision the molecular mechanisms deep within the tissues.

This thesis project was born in order to develop contrast agents based on lanthanides and non-innocent ligands that specifically respond to oxidative stress. The detection of this oxidative stress by several different techniques could be achieved using a bimodal probe which would combine the benefits of MRI and optical imaging, as good resolution and high sensitivity. In order to gain even more sensitivity, a new technique derived from MRI, called "CEST" for Chemical Exchange Saturation Transfer was born.

The aim of this thesis is to provide the proof of concept of bimodal probes for the detection of reactive oxygen species by magnetic imaging and optical imaging techniques. For this, new families of lanthanide complexes with a radical or pro-radical ligand have been chemically synthesized and have been studied by different spectroscopic and electrochemical techniques. These analyzes validated the proof of concept by creating a probe showing an alteration of the signal depending on the redox state of the ligand.