



Nano-sondes hybrides luminescentes pour la détection du cancer de la prostate

Pierre Adumeau

► **To cite this version:**

Pierre Adumeau. Nano-sondes hybrides luminescentes pour la détection du cancer de la prostate. Autre. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2014. Français. <NNT : 2014CLF22442>. <tel-01020604>

HAL Id: tel-01020604

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01020604>

Submitted on 8 Jul 2014

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

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

Numero d'Ordre : D.U. 2442

Université Blaise Pascal – Clermont-Ferrand
(U.F.R. Sciences et Technologies)

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES
N° 784

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Chimie

Par

Pierre ADUMEAU

Ingénieur de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier

**Nano-sondes hybrides luminescentes pour
la détection du cancer de la prostate**

Soutenue publiquement le 26 février 2014, devant la commission d'examen.

Président :

Rachid MAHIOU

Directeur de Recherche CNRS – Institut de Chimie de Clermont-Ferrand,
UBP

Rapporteurs :

Chantal ANDRAUD

Directeur de Recherche CNRS– Ecole Normale Supérieure de Lyon

Michel WONG CHI MAN

Directeur de Recherche CNRS– Institut Charles Gerhardt, Université de
Montpellier 2

Examineurs :

Samir MESSAOUDI

Chargé de Recherche – BioCIS, Faculté de Pharmacie, Université de Paris
Sud

Directeurs de thèse :

Damien BOYER

Maître de Conférences – Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, ENSCCF

Jean-Louis CANET

Maître de Conférences – Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, ENSCCF

Invités :

Thierry GEFFLAUT

Professeur – Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, UBP

Laurent MOREL

Professeur – Laboratoire Génétique Reproduction et Développement, UBP

"En science, la bonne question, ce n'est pas POURQUOI ; c'est POURQUOI PAS!"

Cave Johnson, fondateur d'Aperture Science

Remerciements

Ce travail a été réalisé à l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF, UMR CNRS 6296), dans le cadre d'une collaboration entre les équipes Synthèse et Etudes de Systèmes à Intérêt Biologique (SEESIB) et Matériaux Inorganiques (MI). Je remercie le Dr. Anne-Marie Delort, Directrice de l'ICCF, de m'avoir accueillie au sein de l'institut.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance envers mes deux directeurs de thèse, messieurs Damien Boyer et Jean-Louis Canet, Maîtres de Conférences à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Clermont-Ferrand, pour leur disponibilité et leur patience à mon égard. Je les remercie de la confiance qu'ils ont su placer en moi, et qui m'a permis de prendre rapidement de nombreuses initiatives dans mes recherches.

Je remercie également l'Agence Nationale de la Recherche pour le financement de cette thèse dans le cadre du projet 'Hybiotag' (programme ANR P2N).

Mes vifs remerciements sont adressés à madame Chantal Andraud, Directrice de Recherche CNRS à l'Ecole Normale Supérieure de Lyon, et monsieur Michel Wong Chi Man, Directeur de Recherche CNRS à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier, pour avoir bien voulu prendre connaissance de ce travail au titre de rapporteurs. Je remercie monsieur Samir Messaoudi, Chargé de Recherche CNRS à l'Université de Paris Sud, d'avoir accepté d'examiner ce travail. Mes remerciements vont également à monsieur Rachid Mahiou, directeur de recherche CNRS à l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, pour l'honneur qu'il m'a fait de bien vouloir présider le jury, ainsi que pour les nombreuses réponses qu'il m'a apportées au cours de ces trois années, sur la luminescence des lanthanides à l'état solide.

J'adresse mes plus chaleureux remerciements à monsieur Thierry Gefflaut, Professeur à l'Université Blaise Pascal, pour m'avoir accueilli au sein du groupe BioMeta lors de la synthèse des analogues du glutamate, et pour avoir accepté de prendre place dans ce jury. Sa patience, sa disponibilité ainsi que ses nombreux conseils m'ont été d'un grand secours lors de la dernière, et tardive, étape du projet.

Je remercie monsieur Laurent Morel, Professeur à l'Université Blaise Pascal, d'avoir participé à ce jury. Je remercie également les membres de son équipe, plus particulièrement le Dr. Lia Leccia et le Dr. Cédric Hesling, pour avoir mené les études de cytotoxicité ainsi que les études sur petit animal.

J'adresse mes remerciements à monsieur Arnaud Gautier, Directeur de Recherche, pour les conseils pertinents qu'il m'a prodigués en synthèse organique au cours de ces trois années ainsi que pour m'en avoir appris beaucoup sur la droiture. Mes remerciements vont également à monsieur Federico Cisnetti, Maître de Conférences, pour avoir toujours suivi avec intérêt mon travail.

Je remercie les post-docs qui ont participé à ce projet, me faisant gagner un temps précieux: le Dr. Claire Gaillard, pour la réalisation des premiers essais d'encapsulation de complexes de lanthanide et pour sa constante bonne humeur, ainsi que le Dr. Nicolas Candelon pour la mise au point de la synthèse du DCL.

Merci également à Lionel et Vincent pour la modélisation et le docking, à Régis pour la RMN, à Rodolphe pour l'ATG, et à Christelle et Laurène pour les clichés MET et pour leur accueil.

J'adresse un grand merci à toutes les autres personnes que j'ai côtoyées de près au cours de ces trois années et qui ont largement participé à les rendre inoubliables: Martine, Cécile, Flora, Anthony, Polo, Johan, Carlos, Mickaël, Skipy, Clem, Nadia, Muriel, Pierre J., Michela, Magalie, Delphine, Houssein, Garry, Nathalie, Thomas, Dessie, Jeremy, Pierre V., Egon, Edith, Francis, Nolwenn et bien d'autres. Une mention spéciale à ceux qui m'ont supporté quotidiennement: Stéphane, et surtout Marion, pour son soutien lors de la rédaction et à qui je ne saurais rendre la pareille.

Je remercie enfin ma famille, et tout particulièrement mes parents pour leur soutien indéfectible tout au long de mon cursus, même lorsqu'ils n'étaient pas en accord avec mes choix. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir toujours donné les moyens de mes ambitions. Cette thèse, et bientôt celle du petit frère, n'aurait pas été possible sans vous !

Table des matières

Introduction générale	1
Chapitre I. Etude bibliographique	5
1. Les complexes de lanthanide	7
1.1. Les lanthanides.....	7
1.2. Configuration électronique	8
1.3. Propriétés de luminescence	9
1.3.1. Généralités	9
1.3.2. Phénomène de quenching.....	11
1.4. Les complexes de lanthanide luminescents	12
1.4.1. Coordinence de l'ion Ln(III)	12
1.4.2. Luminescence des complexes de Ln : l'effet d'antenne.....	13
1.4.3. Exemples de complexes de lanthanide luminescents.....	17
1.4.4. Le ligand dipicolinate.....	18
1.4.5. Les complexes de lanthanide en bio-imagerie	21
1.5. Conclusion	25
2. Les nanohybrides luminescents pour l'imagerie médicale	26
2.1. Nanoparticules luminescentes en bio-imagerie.....	27
2.2. Les matériaux hybrides.....	28
2.3. Les nanohybrides luminescents à base de silice	31
2.3.1. Les nanoparticules de silice.....	32
2.3.2. Nanohybrides silice/chromophores organiques	37
2.3.3. Nanohybrides silice/complexes de lanthanide	39
2.4. Fonctionnalisation de surface des nanohybrides.....	42
2.5. Conclusion	44
3. Détection du cancer de la prostate	45
3.1. Le cancer de la prostate	45
3.2. Vectorisation et ciblage: principes	46
3.2.1. Ciblage passif	46
3.2.2. Ciblage actif	47
3.3. La PSMA, une cible de choix.....	49
3.4. Ciblage de la PSMA.....	50
3.5. Conclusion	55

Description du projet	56
1. Travaux précédents.....	56
2. Présentation du projet.....	57
Chapitre II. Synthèse de ligands dérivés de l'acide dipicolinique, étude des propriétés de luminescence des complexes d'Eu(III) et Tb(III) correspondants	60
1. Synthèse des ligands.....	62
1.1. Plateforme azoture et choix des substituants.....	64
1.1.1. Synthèse de la plateforme azoture.....	64
1.1.2. Choix des substituants.....	66
1.2. Cycloaddition alcyne-azoture.....	67
1.2.1. CuAAC.....	67
1.2.2. Cycloaddition thermique de Huisgen.....	70
1.3. Méthylation du dérivé diméthylaniline et du dérivé méthylimidazole.....	71
1.4. Saponification des diesters 8-27.....	72
1.5. Conclusion.....	75
2. Complexes de lanthanides.....	75
2.1. Synthèse des complexes.....	75
2.1. Conclusion.....	77
3. Etude des propriétés de luminescence des complexes.....	78
3.1. Etude des propriétés optiques des complexes en solution.....	79
3.1.1. Spectres d'excitation.....	79
3.1.2. Durées de vie de luminescence.....	81
3.1.3. Rendements quantiques de luminescence.....	83
3.1.4. Conclusion.....	84
3.2. Etude des propriétés optiques des complexes à l'état solide.....	85
3.2.1. Spectres d'excitation.....	85
3.2.2. Rendements quantiques de luminescence.....	90
3.3. Conclusion.....	91
4. Conclusion.....	92
Chapitre III. Nanohybrides luminescents à base de complexes de lanthanide	94
1. Nanohybrides luminescents synthétisés par microémulsion inverse.....	96
1.1. Synthèse de nanoparticules de silice.....	96
1.2. Synthèse de nanohybrides luminescents.....	97
1.3. Propriétés de luminescence des nanohybrides en optique linéaire.....	101

1.3.1.	En suspension	101
1.3.2.	A l'état solide	103
1.4.	Propriétés de luminescence des nanohybrides en optique non-linéaire	105
1.5.	Influence de la concentration en complexe sur le rendement quantique.....	108
1.6.	Conclusion	109
2.	Modification d'un « candidat » complexe pour son incorporation dans des nanoparticules	110
3.	Fonctionnalisation des nanohybrides	112
3.1.	Fonctionnalisation de surface par des fonctions amine	113
3.1.1.	Synthèse	113
3.1.2.	Caractérisations.....	114
3.1.3.	Propriétés de luminescence	115
3.2.	PEGylation des nanoparticules.....	116
3.2.1.	Synthèse	116
3.2.2.	Caractérisations.....	117
3.3.	Conclusion	118
4.	Stabilité des nanohybrides en suspension	118
5.	Conclusion	119
Chapitre IV. Synthèse de nouveaux inhibiteurs de la PSMA et vectorisation des nanohybrides luminescents		122
1.	Nouveaux inhibiteur de la PSMA.....	124
1.1.	Sélection des candidats vecteurs	125
1.2.	Synthèse des candidats vecteurs	128
1.2.1.	Analyses rétro-synthétiques des composés (S)-D et (R)-J.....	128
1.2.2.	Synthèse d'analogues de l'acide glutamique	128
1.2.3.	Synthèse du candidat (S)-D	132
1.2.4.	Synthèse du candidat (R)-J	135
1.3.	Conclusion	141
2.	Nano-sondes vectorisées	141
3.	Conclusion	143
Chapitre V. Résultats biologiques préliminaires		144
1.	Résultats <i>in vitro</i>	146
1.1.	Evaluation de la cytotoxicité des nano-sondes	146
1.2.	Pénétration cellulaire	148
2.	Résultats <i>in vivo</i>	148

2.1.	Etude de la toxicité <i>in vivo</i>	148
2.2.	Biodistribution des nano-sondes.....	149
2.2.1.	Biodistribution et cinétique d'élimination	149
2.2.2.	Ciblage tumoral	151
3.	Conclusion	152
	Conclusion et perspectives	154
1.	Conclusion générale	156
2.	Perspectives.....	159
	Experimental section	166
1.	General	166
2.	Synthesis of organic compounds.....	168
2.1.	DPA derivatives.....	168
2.2.	Lanthanide complexes.....	195
2.3.	NAAG analogues synthesis	211
3.	Nanoparticles related procedures.....	221
3.1.	Nanoparticles synthesis.....	221
3.2.	PEGylation procedure.....	222
3.3.	Vector grafting.....	222
	Références bibliographiques	226

Introduction générale

Le cancer est souvent surnommé la ‘maladie du 21^{ème} siècle’. En effet, 12,4 millions de nouveaux cas de cancer ont été déclarés dans le monde en 2008, et cette maladie a causé la mort de 7,6 millions de personnes cette même année.¹ Ces chiffres sont en constante progression, en raison de l’augmentation de la fréquence des cancers et de l’espérance de vie, et devraient atteindre à l’horizon 2030 plus de 26 millions de nouveaux cas et 17 millions de décès dus au cancer par an, selon les estimations.

Ce problème majeur de santé publique occupera donc une place de plus en plus importante à l’avenir, de par les coûts sociétaux et économiques qu’il engendre.

Il est essentiel, pour limiter cet impact, de détecter les cancers le plus tôt possible. En effet, dans le cas de cancers peu développés, la lourdeur des traitements subis par le patient (principalement la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie) est significativement réduite par rapport à un cancer en stade avancé. Le taux de rémission complète augmente également avec la précocité du diagnostic, tandis que le risque de récurrence et de rechute demeure très élevé dans le cas de cancers métastasés.

Il existe pour certains types de cancer des méthodes de dépistage permettant cette détection précoce. C’est le cas par exemple du cancer du sein et de celui du col de l’utérus. Cependant, la plupart des types de tumeurs malignes ne peuvent, à l’heure actuelle, être dépistés à un stade suffisamment anticipé pour une amélioration significative de leur pronostic.

Dans ce contexte, il est nécessaire de mettre au point de nouveaux outils permettant une détection précoce du cancer.

Les nanomatériaux, par exemple, offrent de nouvelles possibilités pour le diagnostic et le traitement de cancers. En effet, les nanoparticules multifonctionnelles, trouvant des applications telles que le ciblage spécifique, l’imagerie ou la thérapie, ont été activement étudiées ces dernières années, dans le but de dépasser les limitations associées aux méthodes de diagnostic et de thérapie conventionnelles.²

C’est dans ce contexte général que le projet ‘Hybiotag’, financé par l’Agence Nationale de la Recherche (ANR P2N), a pu être mis en place. L’objectif initial de ce projet était la conception et la réalisation de nano-sondes hybrides luminescentes permettant la détection précoce du cancer, et plus précisément de celui de la prostate.

Les propriétés de luminescence particulières des ions lanthanides, dont les nombreux avantages seront développés ultérieurement, nous ont conduits à utiliser ces derniers comme luminophores.

Nous présenterons dans un premier temps une étude bibliographique portant sur les différents aspects de ce projet pluridisciplinaire. Après avoir traité des propriétés de luminescence spécifiques aux complexes de lanthanide, nous développerons divers exemples de nanohybrides luminescents, avant d'aborder la détection du cancer de la prostate. Nous concluons cette partie introductive par une présentation précise et complète du projet.

Le deuxième chapitre sera consacré à la synthèse de nouveaux complexes de terbium(III) et d'euprium(III) à partir de ligands organiques obtenus par une voie dite de chimie click. L'étude des propriétés optiques de ces chélates mènera à la sélection de plusieurs candidats pour la synthèse de nanohybrides luminescents.

Dans un troisième chapitre, nous traiterons de la synthèse de ces nanohybrides luminescents et de l'étude de leurs propriétés optiques, ainsi que de leur fonctionnalisation de surface.

Le chapitre quatre sera axé sur la synthèse de nouveaux vecteurs pour le ciblage de cellules prostatiques tumorales, ainsi que sur le greffage de l'un d'entre eux sur les nanohybrides précédemment synthétisés.

Nous présenterons dans un cinquième chapitre les résultats biologiques préliminaires obtenus avec ces nano-sondes hybrides luminescentes.

Enfin, nous résumerons en conclusion l'ensemble des résultats obtenus et nous exposerons les perspectives offertes par ce travail de thèse de doctorat.

Chapitre I. Etude bibliographique

Cette introduction bibliographique, loin d’être exhaustive (un mémoire de thèse d’un format raisonnable n’y suffirait pas), vise surtout à fournir au lecteur les tenants et aboutissants du travail pluridisciplinaire qui leur sera présenté par la suite.

1. Les complexes de lanthanide

1.1. Les lanthanides

Les lanthanides (Ln) correspondent aux quinze éléments du bloc f de la classification périodique, compris entre le lanthane ($_{57}\text{La}$) et le lutécium ($_{71}\text{Lu}$) (**Figure 1**).

Le scandium ($_{21}\text{Sc}$) et l’yttrium ($_{39}\text{Y}$) sont souvent assimilés à cette famille en raison de leurs propriétés chimiques proches. Ces deux éléments sont regroupés avec les lanthanides sous le terme de « terres rares ».

hydrogen 1 H 1.00794																	helium 2 He 4.002602						
lithium 3 Li 6.941	beryllium 4 Be 9.0122																	boron 5 B 10.811	carbon 6 C 12.011	nitrogen 7 N 14.007	oxygen 8 O 15.999	fluorine 9 F 18.998	neon 10 Ne 20.180
sodium 11 Na 22.990	magnesium 12 Mg 24.305																	aluminum 13 Al 26.982	silicon 14 Si 28.086	phosphorus 15 P 30.974	sulfur 16 S 32.065	chlorine 17 Cl 35.453	argon 18 Ar 39.948
potassium 19 K 39.098	calcium 20 Ca 40.078	scandium 21 Sc 44.956	titanium 22 Ti 47.867	vanadium 23 V 50.942	chromium 24 Cr 51.996	manganese 25 Mn 54.938	iron 26 Fe 55.845	cobalt 27 Co 58.933	nickel 28 Ni 58.693	copper 29 Cu 63.546	zinc 30 Zn 65.39	gallium 31 Ga 69.723	germanium 32 Ge 72.61	arsenic 33 As 74.922	selenium 34 Se 78.96	bromine 35 Br 79.904	krypton 36 Kr 83.80						
rubidium 37 Rb 85.468	strontium 38 Sr 87.62	yttrium 39 Y 88.906	zirconium 40 Zr 91.224	niobium 41 Nb 92.906	molybdenum 42 Mo 95.94	technetium 43 Tc 98	ruthenium 44 Ru 101.07	rhodium 45 Rh 102.91	paladium 46 Pd 106.37	silver 47 Ag 107.87	cadmium 48 Cd 112.41	indium 49 In 114.82	tin 50 Sn 118.71	antimony 51 Sb 121.76	tellurium 52 Te 127.6	iodine 53 I 126.90	xenon 54 Xe 131.29						
cesium 55 Cs 132.91	barium 56 Ba 137.33	lanthanum 57-70 Lu 174.97	hafnium 72 Hf 178.49	tantalum 73 Ta 180.95	tungsten 74 W 183.84	rhenium 75 Re 186.21	osmium 76 Os 190.23	iridium 77 Ir 192.22	platinum 78 Pt 195.08	gold 79 Au 196.97	mercury 80 Hg 200.59	thallium 81 Tl 204.38	lead 82 Pb 207.2	bismuth 83 Bi 208.98	polonium 84 Po [209]	astatine 85 At [210]	radon 86 Rn [222]						
francium 87 Fr [223]	radium 88 Ra [226]	actinium 89-102 Lr [262]	thorium 90 Th [232]	protactinium 91 Pa [231]	uranium 92 U [238]	neptunium 93 Np [237]	plutonium 94 Pu [244]	americium 95 Am [243]	curium 96 Cm [247]	berkelium 97 Bk [247]	californium 98 Cf [251]	einsteinium 99 Es [252]	fermium 100 Fm [257]	mendelevium 101 Md [258]	nobelium 102 No [259]								
		* Série des lanthanides																					
		** Série des actinides																					

Figure 1 : Tableau périodique des éléments, avec en vert les lanthanides et en jaune le scandium et l’yttrium.

Cette appellation de terres rares s’explique par la faible abondance présumée des minerais de lanthanides à l’époque de leur découverte, vers la fin du 19^{ème} siècle. Toutefois, cela ne correspond pas à une réelle rareté des lanthanides puisque ces éléments, en dehors du prométhium, se rencontrent à des taux relativement élevés dans la croûte terrestre. Par exemple, le cérium (le plus abondant des lanthanides) est présent dans l’écorce terrestre à des concentrations comparables à celles du cuivre, et le thulium (le lanthanide le plus rare,

exception faite du prométhium) est plus abondant que l'iode.³ Le prométhium, principalement issu de la fission de l'uranium, est une exception concernant l'abondance des lanthanides. En effet, cet élément est extrêmement rare en raison des faibles demi-vies de l'ensemble de ses isotopes, toutes inférieures à 40 ans.

Les principaux minerais de lanthanides sont la bastnaésite (LnFCO_3) et la monazite (LnPO_4). Ces deux minerais contiennent plusieurs lanthanides dans des proportions variant suivant le minerai et son origine.

On estime également que 70% des réserves mondiales connues de lanthanides seraient situées en Chine, sous forme de silicates d'aluminium à la surface desquels les lanthanides sont adsorbés.

1.2. Configuration électronique

La structure électronique des lanthanides correspond généralement à $[\text{Xe}]6s^2 4f^n$ (**Tableau 1**). Le lanthane, le cérium, le gadolinium et le lutécium, qui possèdent une configuration électronique de type $[\text{Xe}]6s^2 4f^n 5d^1$, sont des exceptions. Dans le cas du lanthane, la sous-couche $5d$ est plus stable que la $4f$, conduisant au remplissage de cette couche avant celui de la $4f$. Puis à mesure que le numéro atomique augmente, le nombre croissant de protons dans le noyau provoque la contraction des orbitales $4f$, qui deviennent alors plus stables que les $5d$. Cette inversion d'énergie limite le remplissage de la sous-couche $5d$ au profit de la sous-couche $4f$, menant à la configuration du cérium $[\text{Xe}]6s^2 4f^1 5d^1$ puis à la configuration électronique $[\text{Xe}]6s^2 4f^n$ de la majorité des lanthanides. La configuration $[\text{Xe}]6s^2 4f^7 5d^1$ du gadolinium est due à la stabilité particulière de la configuration $4f^7$, avec une sous-couche à moitié pleine. Enfin, dans le cas du lutécium la couche $4f$ étant saturée, un électron est placé dans la sous-couche $5d$.

Pour les ions, la configuration électronique la plus stable est obtenue par la perte des électrons $6s^2$ puis $5d$, menant aux tri-cations Ln^{3+} de configuration électronique $[\text{Xe}]4f^n$ ($n=0-14$). Ce degré d'oxydation (III) est partagé par tous les lanthanides, et constitue de loin la forme majoritaire des ions de ces éléments. Cependant, on note également l'existence d'autres degrés d'oxydation stables pour certains éléments, comme le cérium (IV) possédant la configuration électronique stable du xénon (perte de l'électron f), ainsi que l'euprécium(II) et le terbium(IV) qui sont stabilisés par leurs orbitales $4f$ à moitié remplies.

La contraction des orbitales $4f$ a également une conséquence importante. Étant donné que les orbitales f masquent moins efficacement la charge nucléaire que les orbitales s , p ou d , cette charge affecte fortement les orbitales $6s$ et $5d$. Il en résulte une diminution du rayon ionique lorsque le numéro atomique augmente, phénomène connu sous le nom de contraction lanthanidique (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Configuration électronique des lanthanides et de leur tri-cation, ainsi que leurs rayons ioniques (pour une coordinence de 6).⁴

Eléments Ln		Configuration électronique	Configuration électronique de Ln ³⁺	Rayon ionique de Ln ³⁺ (pm)
La	Lanthane	[Xe]6s ² 5d ¹	[Xe]	103,2
Ce	Cérium	[Xe]6s ² 4f ¹ 5d ¹	[Xe]4f ¹	101,0
Pr	Praséodyme	[Xe]6s ² 4f ³	[Xe]4f ²	99,0
Nd	Néodyme	[Xe]6s ² 4f ⁴	[Xe]4f ³	98,3
Pm	Prométhium	[Xe]6s ² 4f ⁵	[Xe]4f ⁴	97,0
Sm	Samarium	[Xe]6s ² 4f ⁶	[Xe]4f ⁵	95,8
Eu	Europium	[Xe]6s ² 4f ⁷	[Xe]4f ⁶	94,7
Gd	Gadolinium	[Xe]6s ² 4f ⁷ 5d ¹	[Xe]4f ⁷	93,8
Tb	Terbium	[Xe]6s ² 4f ⁹	[Xe]4f ⁸	92,3
Dy	Dysprosium	[Xe]6s ² 4f ¹⁰	[Xe]4f ⁹	91,2
Ho	Holmium	[Xe]6s ² 4f ¹¹	[Xe]4f ¹⁰	90,1
Er	Erbium	[Xe]6s ² 4f ¹²	[Xe]4f ¹¹	89,0
Tm	Thulium	[Xe]6s ² 4f ¹³	[Xe]4f ¹²	88,0
Yb	Ytterbium	[Xe]6s ² 4f ¹⁴	[Xe]4f ¹³	86,8
Lu	Lutécium	[Xe]6s ² 4f ¹⁴ 5d ¹	[Xe]4f ¹⁴	86,1

1.3. Propriétés de luminescence

1.3.1. Généralités

Sous l'effet d'une excitation lumineuse de longueur d'onde adaptée, les ions Ln³⁺ émettent des photons. Cette émission, caractéristique de chaque ion, couvre une large gamme spectrale allant de l'ultraviolet au proche infrarouge (300-3000 nm). Par exemple, les ions Gd³⁺, Tb³⁺, Sm³⁺ et Eu³⁺ émettent respectivement une luminescence ultraviolette, verte,

orange et rouge. Les ions Nd^{3+} , Ho^{3+} , Er^{3+} et Yb^{3+} émettent quant à eux dans le proche infrarouge.⁵

Cette luminescence est caractérisée, entre autres, par des temps de vie longs allant de la μs à la ms , et des bandes d'absorption et d'émission étroites.

Ces propriétés si particulières ont été largement étudiées et sont dues à la nature unique des orbitales $4f$ des lanthanides.^{6,7} En effet, la luminescence des ions Ln^{3+} implique des transitions $f-f$. Ces transitions sont interdites par la règle de sélection de Laporte, qui n'autorise pas les transitions d'électrons entre deux états de même parité (et pour la même raison sont interdites les transitions $p-p$ et $d-d$). L'interdiction de ces transitions implique une faible probabilité que celles-ci surviennent, ce qui engendre les longs temps de vie de la luminescence des lanthanides ainsi que leur très faible absorptivité molaire (le plus souvent inférieure à $1 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

De plus, les orbitales $4f$ pénètrent de façon notable le cœur xénon et sont fortement masquées par les sous-couches $5p^6$ et $5s^2$, qui les isolent efficacement des influences extérieures. Ce comportement d'électron de cœur adopté par les électrons $4f$ se traduit par des effets de champ cristallin très faibles par rapport au couplage spin-orbite et à la répulsion inter-électronique. Ceci a pour conséquence l'étroitesse des bandes d'excitation et d'émission, caractéristiques des lanthanides, ces dernières étant largement indépendantes de l'environnement de l'ion.

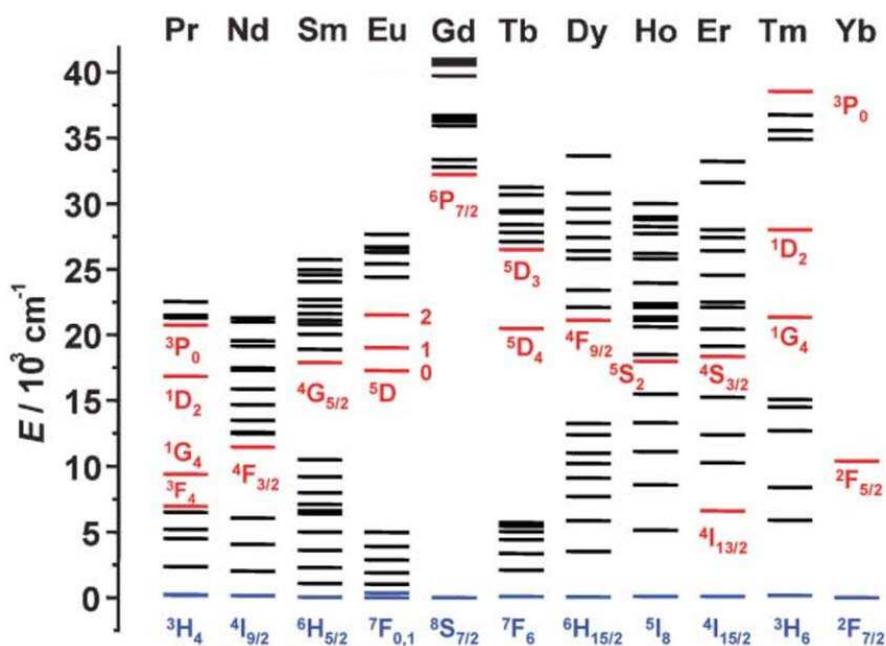


Figure 2 : Diagramme d'énergie d'ions Ln^{3+} en solution aqueuse. En rouge sont représentés les principaux niveaux luminescents. Les niveaux fondamentaux sont indiqués en bleu.⁸

La configuration électronique des lanthanides engendre de nombreux termes issus des subdivisions provoquées par la répulsion inter-électronique, le couplage spin-orbite et, dans une moindre mesure, par le champ cristallin. Ces niveaux d'énergie ont été déterminés dans les années 60, puis complétés dans les années 80 (**Figure 2**).⁹⁻¹⁴

Les ions La^{3+} et Lu^{3+} , comportant des sous-couches $4f$ respectivement vides et pleines, ne possèdent pas de niveaux excités f et ne sont donc pas concernés par cette luminescence particulière due aux transitions f - f .

1.3.2. Phénomène de quenching

Dans le cas où la différence d'énergie d'une transition f - f coïncide avec un ou plusieurs quanta d'énergie vibrationnelle d'un oscillateur moléculaire proche de l'ion excité, on peut assister à un transfert d'énergie vers ces oscillateurs, menant à une désexcitation non-radiative (**Figure 3**).

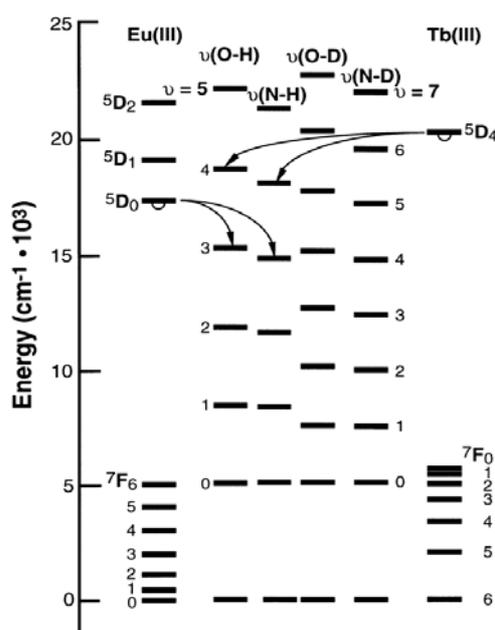


Figure 3 : Niveaux d'énergie vibrationnelle des oscillateurs O-H, O-D, N-H et N-D, et des ions Eu^{3+} et Tb^{3+} . Les demi-cercles indiquent les principaux niveaux luminescents des ions. Les flèches représentent les processus de désexcitation non-radiative par transfert d'énergie vers les oscillateurs.¹⁵

Ceci a pour conséquence une baisse de l'intensité de luminescence, mais également une diminution de la durée de vie de l'état excité et par conséquent une diminution du temps de vie de luminescence.

En solution aqueuse, le plus courant de ces oscillateurs est la liaison O-H des molécules d'eau. La désactivation étant directement proportionnelle au nombre d'oscillateurs à

proximité de l'ion, il convient pour limiter ce phénomène d'utiliser des ligands polydents qui vont exclure totalement ou partiellement les molécules d'eau de la première sphère de coordination du métal, ou des ligands qui vont avoir tendance à encapsuler l'ion lanthanide.¹⁶

1.4. Les complexes de lanthanide luminescents

La luminescence des ions lanthanides est par définition faible, puisque les transitions $f-f$ générant cette luminescence sont interdites et mènent à des coefficients d'absorption très faibles. Cette luminescence peut être considérablement augmentée par la formation de complexes de lanthanide avec des ligands (L) adaptés, appelés ligands photo-sensibilisateurs.

1.4.1. Coordinence de l'ion Ln(III)

Les ions lanthanides sont des acides de Lewis durs, qui présentent de fortes affinités pour les atomes d'oxygène et dans une moindre mesure pour les atomes d'azote. Cette affinité est par ailleurs plus forte dans le cas de ligands anioniques, qui seront préférés aux ligands neutres.

Les orbitales $4f$ pénétrant de manière notable le cœur xénon, elles ne peuvent pas interagir avec les orbitales des ligands et ne participent pas aux liaisons. Les lanthanides sont donc incapables de participer à des liaisons π , contrairement aux métaux de transition.

En conséquence, la chimie de coordination de ces éléments n'est dépendante que de leur rayon. Ainsi, en l'absence d'autres ligands, les ions les plus gros forment en solution aqueuse des hydrates de coordinence 9 comme $[\text{Nd}(\text{H}_2\text{O})_9]^{3+}$ alors que les ions lanthanides plus petits forment des hydrates de coordinence 8 (par exemple $[\text{Lu}(\text{H}_2\text{O})_8]^{3+}$).¹⁷

Les ions lanthanides étant incapables de former des liaisons covalentes avec leurs ligands, les interactions ligand-métal sont de type électrostatique. De ce fait, les complexes de lanthanide en solution aqueuse sont labiles, sujets à des échanges rapides de ligands et à des dissociations dans les milieux dilués.

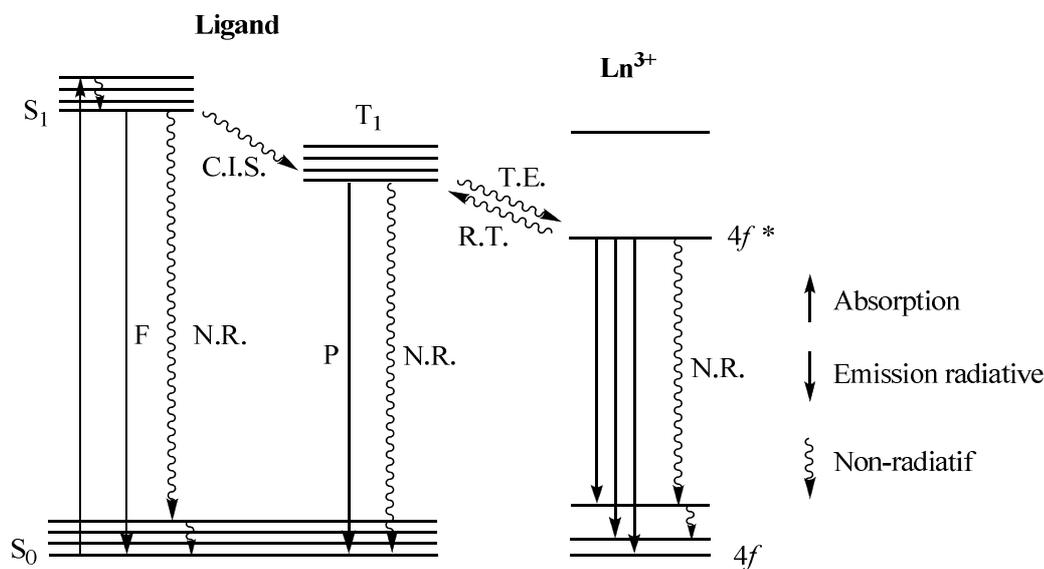
Les complexes formés à partir de ligands monodents seront donc facilement dissociés en solution aqueuse au profit de la formation d'hydrates, plus stables, et la stabilité des complexes sera augmentée avec la denticité des ligands¹⁸ (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Stabilité de complexes de gadolinium, en fonction de la denticité du ligand.

Ligand		Denticité	log K ¹⁸
	$Gd^{3+} + L^{2-} \rightleftharpoons [GdL]^+$	3	6,8
	$Gd^{3+} + L^{3-} \rightleftharpoons [GdL]$	4	11,5
	$Gd^{3+} + L^{4-} \rightleftharpoons [GdL]^-$	6	17,1
	$Gd^{3+} + L^{4-} \rightleftharpoons [GdL]^-$	8	28,0

1.4.2. Luminescence des complexes de Ln : l'effet d'antenne

Le mécanisme de la luminescence des complexes de lanthanide, appelé « effet d'antenne », fait intervenir un transfert d'énergie depuis le ligand vers le lanthanide (**Figure 4**).⁸

**Figure 4 :** Luminescence des complexes lanthanide par effet d'antenne.

(F : fluorescence du ligand, S₀ : état fondamental, S₁ : état singulet excité du ligand, C.I.S. : croisement inter-système, T₁ : état triplet du ligand, P : phosphorescence du ligand, T.E. : transfert d'énergie vers l'ion lanthanide, R.T. : rétro-transfert, f* : état excité du lanthanide, N.R. : désexcitation non-radiative).

Le déroulement le plus courant de ce transfert est le suivant : dans un premier temps, un photon est absorbé par le chromophore organique, conduisant au passage d'un électron π de

l'état fondamental S_0 à l'état excité singulet S_1 . La molécule peut alors soit revenir à son état fondamental par émission d'un photon (correspondant à la fluorescence du ligand) ou par désexcitation non-radiative impliquant divers mécanismes, soit, par le biais d'un croisement inter-système, venir peupler l'état triplet T_1 . Depuis cet état triplet, le ligand peut perdre son énergie soit par désexcitation non-radiative soit en émettant un photon (correspondant à la phosphorescence du ligand), ou bien en la transférant à l'ion lanthanide en l'excitant à un de ses niveaux émetteurs. L'ion Ln^{3+} excité peut ensuite retourner à l'état fondamental par des désexcitations non-radiatives ou par l'émission d'un photon en impliquant une transition $f-f$. Pour que ce transfert d'énergie puisse se faire avec efficacité, le chromophore n'est pas nécessairement lié directement au métal, mais doit se trouver à une faible distance de celui-ci.

Les passages successifs par des niveaux ayant des énergies de plus en plus faibles impliquent également une forte différence d'énergie entre le rayonnement émis par le lanthanide et celui absorbé par le ligand. Ceci se traduit par des déplacements de Stokes (ecart de longueur d'onde entre le rayonnement émis et le rayonnement absorbé, **Figure 5**) de l'ordre de la centaine de nanomètres.

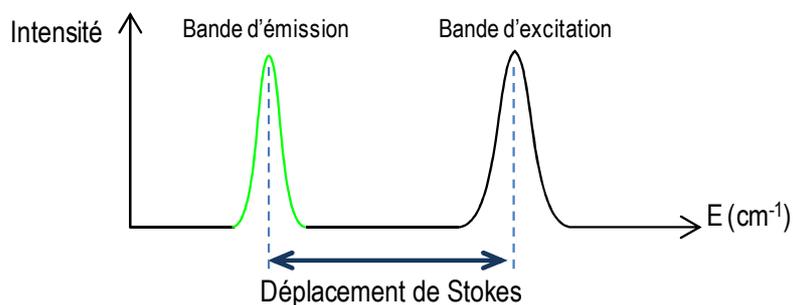


Figure 5 : Représentation du déplacement de Stokes.

Cependant tous les ions Ln^{3+} ne possèdent pas des états excités à des énergies compatibles avec celles des états triplets des chromophores classiques. C'est néanmoins le cas des ions Eu^{3+} et Tb^{3+} , et dans une moindre mesure de Sm^{3+} et de Dy^{3+} . Concernant les autres lanthanides, La^{3+} et Lu^{3+} ne possèdent pas d'état excité f^n , les états excités du gadolinium(III) sont eux situés à des énergies supérieures à celles des états triplet des ligands standards. Les lanthanides restants possèdent de nombreux états intermédiaires qui facilitent les désexcitations non-radiatives et conduisent à d'importantes pertes d'énergie (**Figure 2**).

Les complexes de Tb^{3+} et d' Eu^{3+} , qui émettent respectivement dans le vert et dans le rouge, sont par conséquent ceux qui ont été les plus étudiés en luminescence au cours de ces dernières années. Dans le cas du terbium(III), cette luminescence est due aux transitions $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_n$ ($n=6-0$), la plus intense étant la transition $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_5$ qui se traduit par l'émission

d'un photon ayant une longueur d'onde de 545 nm. Pour l'euprimum(III), les transitions principalement observées sont les transitions $^5D_0 \rightarrow ^7F_n$ ($n=4-0$), la plus intense étant la transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ qui génère une émission à 616 nm (**Figure 6**).

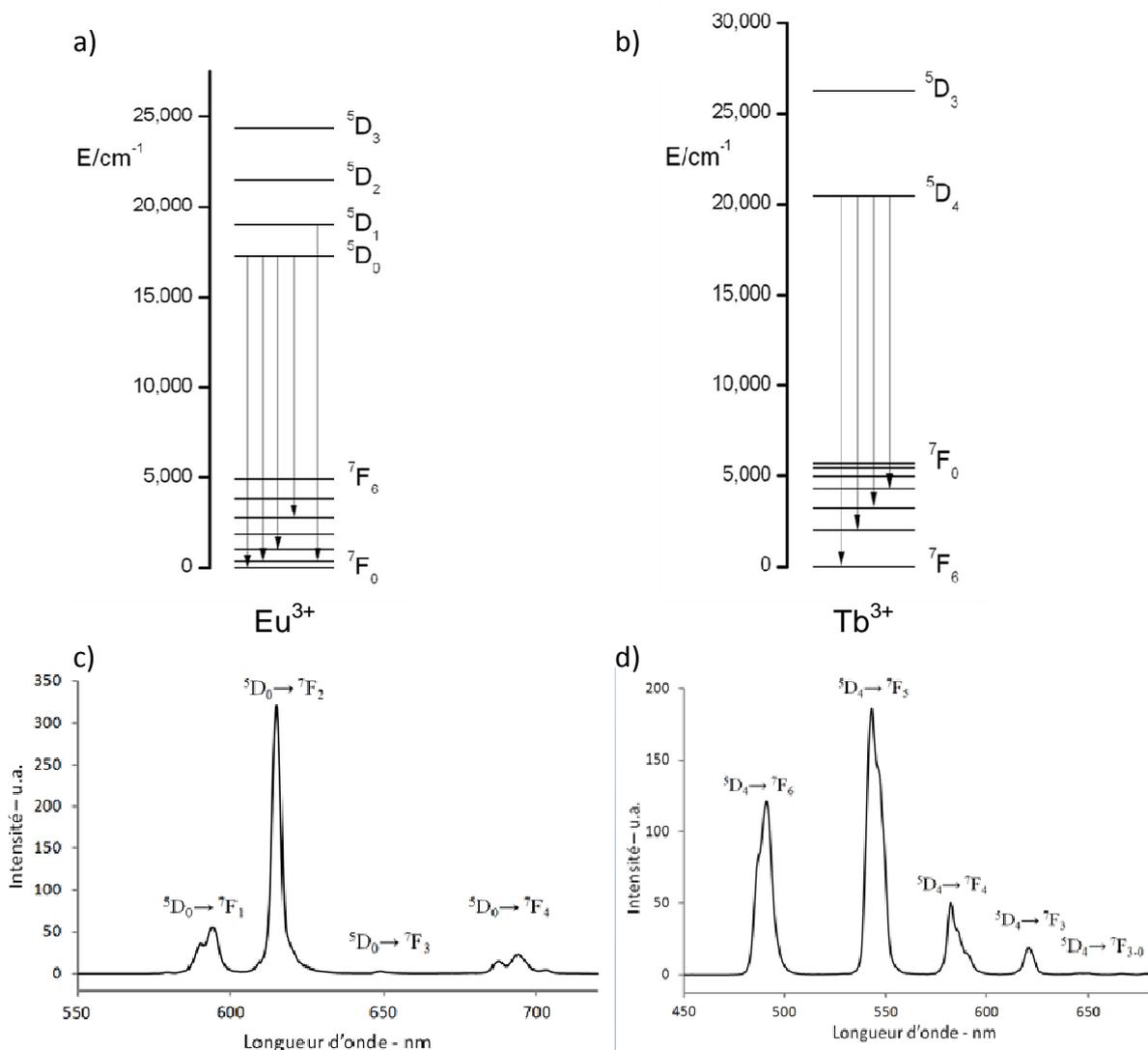


Figure 6 : a) et b) Transitions *f-f* responsables de la luminescence des ions Eu³⁺ et Tb³⁺, c) et d) spectres d'émission correspondants.

Les meilleurs niveaux accepteurs de l'Eu³⁺ et du Tb³⁺ sont respectivement le niveau 5D_0 situé à 17 200 cm⁻¹ et le niveau 5D_4 situé à 20 400 cm⁻¹. Pour que le transfert d'énergie entre le ligand et l'ion se fasse efficacement, l'état triplet du ligand doit se trouver légèrement au dessus des niveaux accepteurs de l'ion. Toutefois, si les niveaux excités de l'ion sont trop proches de l'état triplet, on peut assister à un rétro-transfert, phénomène activé par la température, menant au repeuplement de l'état triplet du ligand et au retour de l'ion Ln³⁺ à

l'état fondamental (**Figure 4**). Ce rétro-transfert se caractérise par un temps de demi-vie fortement réduit pour l'émission de l'ion lanthanide.

Des études ont déterminé que le transfert vers le métal était optimal lorsque l'état triplet du ligand se situait entre 22 000 et 26 000 cm^{-1} dans le cas du terbium, et entre 20 000 et 23 000 cm^{-1} dans le cas de l'euporium.¹⁹

L'efficacité de ce transfert d'énergie, ainsi que la présence de désexcitation non-radiative au niveau du ligand ou de l'ion, affectent significativement la valeur du rendement quantique de luminescence Φ . Ce rendement se définit comme le rapport du nombre de photons émis par le lanthanide sur le nombre de photons absorbés par le ligand.

$$\Phi = \frac{\text{Nombre de photons émis}}{\text{Nombre de photons absorbés}}$$

En l'absence de toute désexcitation non-radiative et avec un transfert d'énergie total depuis le ligand vers le métal, le rendement quantique sera égal à 1.

Dans la pratique, le rendement quantique est souvent fortement diminué par de nombreux facteurs, comme notamment la présence de molécules d'eau dans la première sphère de coordination de l'ion lanthanide, qui vont désactiver la luminescence par désexcitation non-radiative vers ces oscillateurs.

Il convient donc, pour obtenir des complexes de lanthanide à haut rendement quantique de luminescence, de concevoir des ligands fortement complexants, afin d'éviter la présence d'une trop grande quantité de molécules d'eau à proximité de l'ion, et ayant des états triplet énergétiquement compatibles avec les niveaux accepteurs du Tb^{3+} et de l' Eu^{3+} .

Ce rendement quantique est utilisé pour le calcul de la brillance, caractéristique d'une grande importance pour de nombreux domaines d'application des complexes de lanthanide.

La brillance se définit comme le produit du rendement quantique par le coefficient d'absorption molaire du composé à une longueur d'onde donnée.

$$B = \Phi \times \varepsilon$$

L'introduction du coefficient d'absorption molaire permet de tenir compte du nombre de photons incidents absorbés par le complexe. La brillance relie ainsi directement l'intensité de la luminescence à l'intensité de l'excitation, indépendamment du nombre de photons absorbés par le chélate de lanthanide.

1.4.3. Exemples de complexes de lanthanide luminescents

De très nombreux ligands organiques remplissent les conditions évoquées précédemment, et forment avec les ions Tb^{3+} et Eu^{3+} des complexes possédant une luminescence intense. Il est donc difficile de dresser une liste exhaustive de ces complexes. Nous tâcherons simplement ici de traiter des grandes familles de ligands photosensibilisateurs.

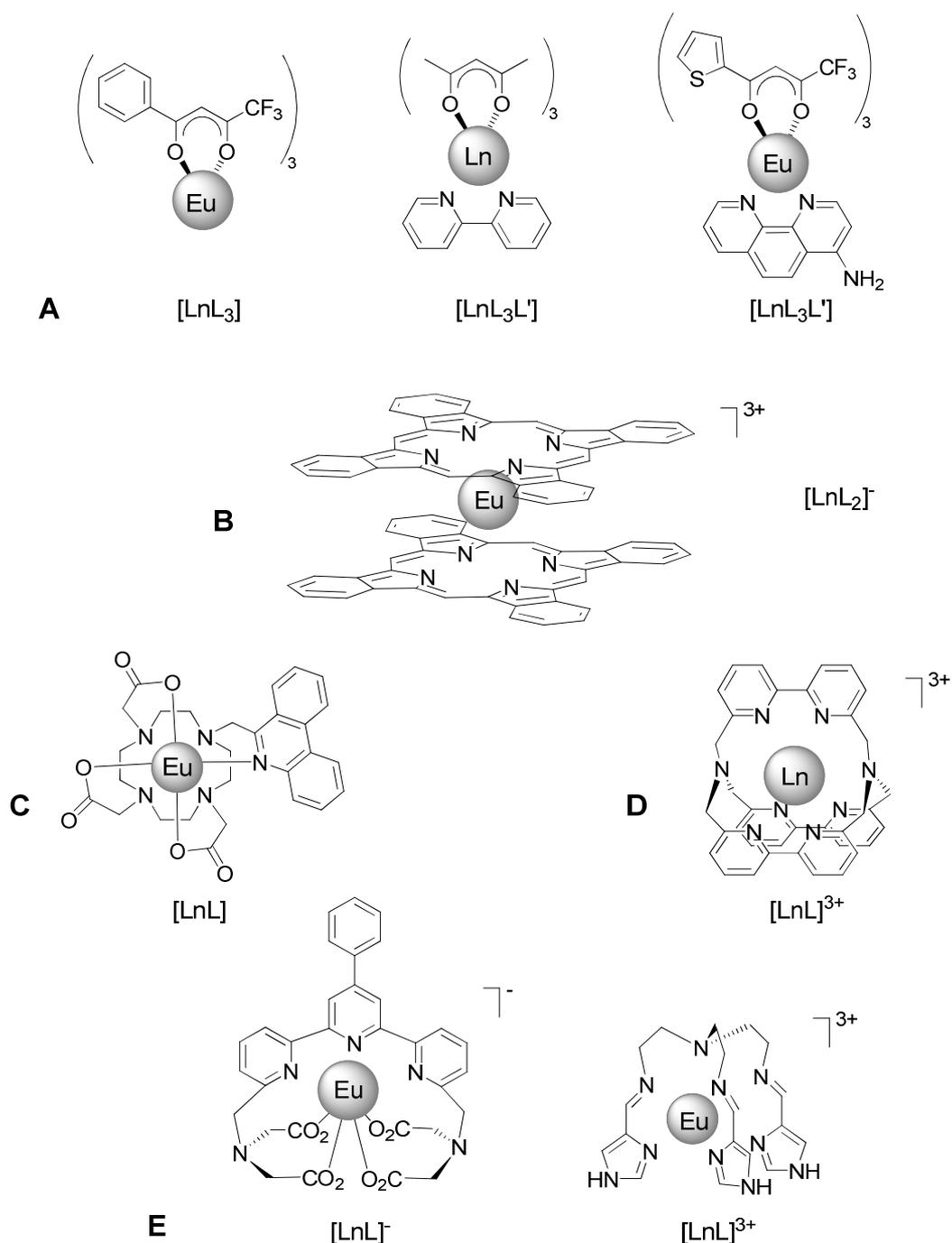


Figure 7 : Exemples de complexes luminescents de lanthanide (**A** : dicétonates²⁰ ; **B** : complexe de phthalocyanine²¹ ; **C** : cyclène²² ; **D** : cryptate²³ ; **E** : podates^{24,25}).

On distingue plusieurs types de complexes selon la stœchiométrie du complexe LnL_x . Des complexes de stœchiométrie LnL_2 et LnL_3 sont obtenus avec des ligands de faible denticité (2 à 4). C'est le cas par exemple des ligands β -dicétonates, qui forment avec les lanthanides des complexes hexacoordinés. L'adjonction d'un chromophore supplémentaire tel qu'une bipyridine ou une phénantroline permet de compléter la sphère de coordination de l'ion et d'améliorer les propriétés optiques des complexes (**Figure 7A**).²⁰

L'utilisation de ligands macrocycliques permet d'améliorer la stabilité des complexes. On peut citer comme exemples de ligands macrocycliques les porphyrines²⁶ et les phthalocyanines^{21,26}, ainsi que des dérivés du cyclène substitués par un ou plusieurs chromophores²² (**Figure 7B, C**). Les cryptands constituent une classe particulière de ces ligands macrocycliques. Ils se caractérisent par une structure cyclique rigide tridimensionnelle dans laquelle se trouve une cavité pourvue de sites donneurs dans laquelle vient se loger l'ion lanthanide (**Figure 7D**). Du fait de la rigidité de l'ensemble, les cryptates – complexes formés à partir d'un cryptand et d'un ion Ln^{3+} – sont extrêmement stables et la complexation est souvent considérée comme irréversible. L'ion lanthanide ainsi encagé est protégé des interactions extérieures, ce qui permet d'obtenir des durées de vie de luminescence extrêmement longues.^{23,27}

Enfin, de nombreux ligands appartiennent à la classe des podants. Dans le cas des podants, les fonctions complexantes ne sont plus liées à un macrocycle, mais se présentent sous la forme de bras reliés à un atome unique ou à un cycle aromatique (**Figure 7E**). Ceci autorise les atomes donneurs à se positionner librement autour de l'ion lanthanide de façon à maximiser les interactions, augmentant ainsi l'affinité entre l'ion et le ligand.^{24,25}

Se retrouve parmi les ligands de faible denticité la base conjuguée de l'acide dipicolinique, qui a fait l'objet de nombreuses études en raison des propriétés optiques des complexes qu'elle forme avec l'euprium (III) et le terbium (III).

1.4.4. Le ligand dipicolinate

L'acide pyridine-2,6-dicarboxylique, connu sous le nom d'acide dipicolinique (DPAH_2), se révèle être un excellent ligand photo-sensibilisateur. Les complexes de stœchiométrie LnL_3 qu'il forme avec les ions Tb^{3+} et Eu^{3+} présentent de très bonnes propriétés optiques.^{28,29} Ces complexes $[\text{Ln}(\text{DPA})_3]^{3-}$ sont de coordinence 9 (**Schéma 1**). L'absence de molécules d'eau à proximité immédiate de l'ion explique les longues durées de vie de fluorescence de ces complexes (**Tableau 3**).

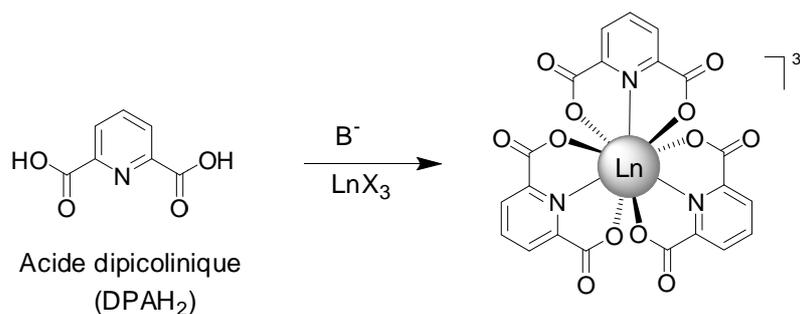


Schéma 1 : Complexe tris-dipicolinate de lanthanide [Ln(DPA)₃]³⁻.

Tableau 3 : Rendement quantique Φ et demi-vie de fluorescence τ de complexes à l'état solide.²⁹

Complexe	Φ (%)	τ (ms)
Cs ₃ [Eu(DPA) ₃]	58 ± 3	1,8 ± 0,1
Cs ₃ [Tb(DPA) ₃]	30 ± 1	1,36 ± 0,02

Afin d'étendre la gamme de longueurs d'onde d'excitation de ces complexes, située entre 210 et 280 nm avec des maxima autour de 225 et 270 nm, diverses modifications structurales ont été apportées à l'acide dipicolinique.

En substituant en position 4 le cycle pyridine par différents groupements tels que des fonctions halogène, hydroxyle, amino ou amido, plusieurs chélates ayant des propriétés optiques légèrement différentes de celles de l'acide dipicolinique ont été synthétisés (**Figure 8**).³⁰

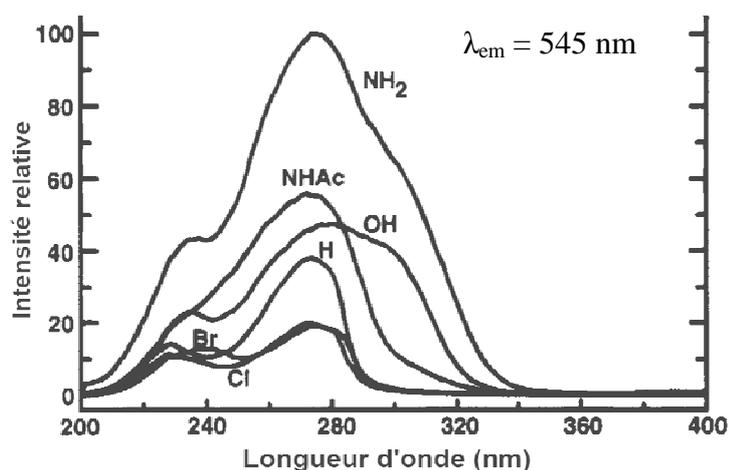
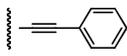
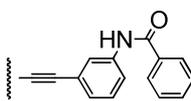
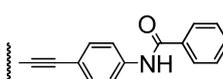
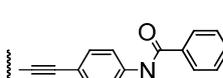
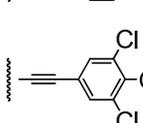
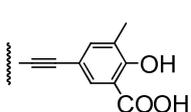
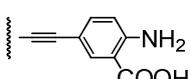


Figure 8 : Spectres d'excitation de complexes [TbL₃]³⁻, formés à partir de dérivés de l'acide dipicolinique substitué en position 4 (pH 8,0 ; [TbL₃] = 2,33 10⁻⁵ M). Les substituants sont indiqués sur les courbes correspondantes.³⁰

Tableau 4 : Sélection de chélates d'euporium(III) formés à partir de ligands synthétisés par couplage palladié. Longueur d'onde des maxima d'excitation et demi-vie de fluorescence τ des complexes.³¹

 -R	$\lambda_{\text{exc max}}$ (nm)	τ (ms)
	314	0,89
	305	0,96
	335	0,88
	320	0,94
	335	0,52
	285	0,27
	332	0,28
	356	0,24

Par la suite, le système π conjugué a pu être étendu et modifié par le biais de couplages palladiés entre un dérivé halogéné de l'acide dipicolinique et divers alcynes. Ces fonctionnalisations ont largement modifié les propriétés optiques des ligands, permettant pour certains d'obtenir des complexes d'euporium ayant des maxima d'excitation supérieurs à 350 nm (**Tableau 4**).³¹

Bien que ces complexes soient relativement peu stables en solution aqueuse (**Tableau 5**), ce qui peut limiter leurs applications, leurs propriétés optiques excellentes et ajustables font des dérivés de l'acide dipicolinique des ligands d'un intérêt majeur pour la photosensibilisation du terbium et de l'euporium.

Tableau 5 : Constante de formation des complexes $[\text{Eu}(\text{DPA})_3]^{3-}$ et $[\text{Tb}(\text{DPA})_3]^{3-}$.³²

	$\log K_1$	$\log K_2$	$\log K_3$
Eu^{3+}	8,84	7,14	5,51
Tb^{3+}	8,68	7,43	5,92

1.4.5. Les complexes de lanthanide en bio-imagerie

De nombreux chromophores organiques sont actuellement utilisés en bio-imagerie.³³ Ces molécules sont diverses et appartiennent à de nombreuses familles comme la fluorescéine, les rhodamines ou les cyanines, et possèdent d'excellentes propriétés de luminescence. Certains de ces fluorophores organiques sont également sensibles aux conditions environnementales telles que le pH, faisant d'eux d'excellentes sondes pour la mesure locale. Cependant, ces chromophores souffrent également de nombreux défauts. Tout d'abord, leurs déplacements de Stokes (décalage entre bande d'excitation et bande d'émission) sont, pour la plupart d'entre eux, faibles. Ce recouvrement entre domaines d'excitation et d'émission complique la mesure de fluorescence, puisque il n'est pas possible de mesurer l'émission du chromophore à des longueurs d'ondes trop proche de la longueur d'onde d'excitation, sous peine d'une importante perte de sensibilité. Ces fluorophores organiques sont également sensibles au photo-blanchiment. Ce phénomène de photo-blanchiment, dû à la dégradation photochimique du fluorophore, se rencontre fréquemment lors de l'exposition prolongée d'un chromophore à un rayonnement intense et entraîne une perte progressive de luminescence, signifiant dans le cas de la bio-imagerie une diminution graduelle du signal recherché.³³

De ce fait, les propriétés optiques uniques des complexes de lanthanide ont suscité de nombreux intérêts quant à leur utilisation dans de nombreux domaines, et en particulier dans les domaines de la médecine et de la biologie.

En effet, leurs larges déplacements de Stokes, leurs durées de luminescence extrêmement longues ainsi que leurs bandes d'émission étroites répondent aux exigences de la bio-imagerie et de la détection en milieu biologique.^{5,7,34} De plus, leur relative résistance au photo-blanchiment, comparativement aux chromophores organiques classiques, constitue un avantage supplémentaire. Leurs applications dans les domaines biomédicaux s'étendent de l'imagerie cellulaire au dosage de protéines et d'hormones, en passant par l'étude des flux ioniques cellulaires. Nous nous intéresserons ici à la bio-imagerie, et plus précisément à l'apport des lanthanides dans ce domaine.

1.4.5.1. Spectrofluorimétrie résolue dans le temps

Un des avantages de l'utilisation des lanthanides en bio-imagerie résulte de leur durée de vie de fluorescence exceptionnellement longue. Ces temps de vie permettent de

s'affranchir de deux difficultés majeures rencontrées avec les marqueurs fluorescents organiques, que sont la diffusion de la source d'excitation et l'autofluorescence des tissus biologiques.

En effet, les tissus contiennent naturellement de nombreux chromophores organiques tels le NADH (nicotinamide adénine dinucléotide, sous forme réduite) ou les acides aminés aromatiques (libres ou inclus dans une protéine), qui émettent une luminescence sous excitation UV-visible.³⁵ Cette autofluorescence des tissus crée un bruit de fond important qui couvre le signal des marqueurs fluorescents. La seconde difficulté est due à la présence de la source d'excitation, dont la lumière diffuse à travers les tissus et provoque un bruit de fond important dans l'échantillon observé.

Les chromophores organiques ont des demi-vies de fluorescence très faibles, le plus souvent comprises entre 1 et 10 ns. Ces marqueurs fluorescents ayant des temps de vie comparables à ceux de l'autofluorescence, aucune discrimination n'est envisageable. Comparativement, les lanthanides engendrent des émissions avec des temps de vie extrêmement longs. En effet, les principales bandes d'émission de l'ion Eu^{3+} ont des demi-vies variant de 0,1 à 2,0 ms en solution aqueuse. Dans le cas du terbium(III), les demi-vies de luminescence des bandes principales sont comprises entre 0,4 et 5,0 ms en solution aqueuse.³⁶

Ce facteur de l'ordre de 10^5 entre les durées de vie de l'autofluorescence des tissus et de la luminescence des lanthanides a permis le développement de la détection résolue dans le temps.³⁷ L'application d'un délai d'une durée adéquate entre l'excitation et la mesure de la lumière émise permet d'obtenir l'extinction de l'autofluorescence des tissus tout en conservant une intense luminescence des lanthanides (**Figure 9**). De plus, la source d'excitation étant absente lors de la détection de la luminescence, les phénomènes de diffusion de celle-ci sont également absents.

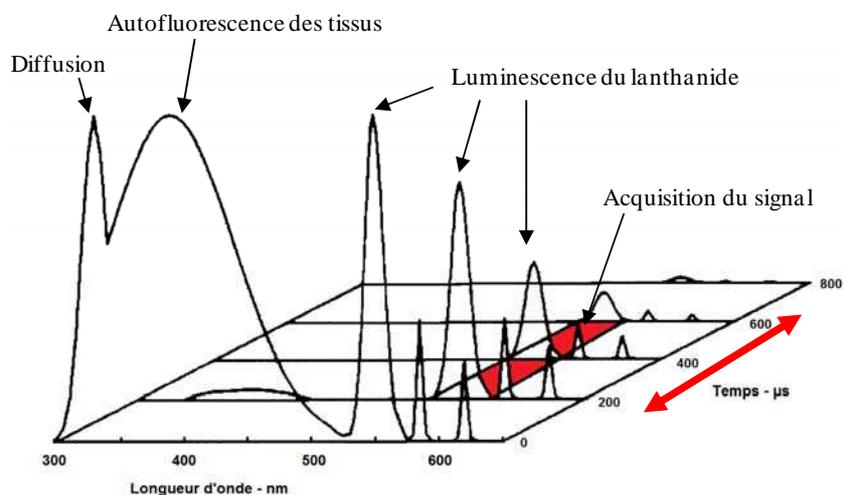


Figure 9 : Principe de la détection en temps résolu d'un complexe de lanthanide.³⁷

1.4.5.2. Absorption multiphotonique

L'optique non-linéaire regroupe les phénomènes présentant une réponse non-linéaire à l'action d'une onde électromagnétique du domaine optique. Ces phénomènes résultent de la polarisabilité de la matière sous l'effet du fort champ électrique associé à un faisceau laser.

De nombreux processus physiques génèrent des réponses non-linéaires :

- transfert d'énergie entre deux ions initialement dans un état excité
- absorption dans l'état excité
- génération de seconde ou de troisième harmonique
- absorption multi-photonique

Nous nous intéresserons ici uniquement à l'absorption multi-photonique.

En effet, sous l'action d'une source laser intense, l'absorption simultanée par un matériau de plusieurs photons devient possible, à la condition que l'énergie du niveau excité à atteindre soit un multiple entier de l'énergie des photons (**Figure 10**).

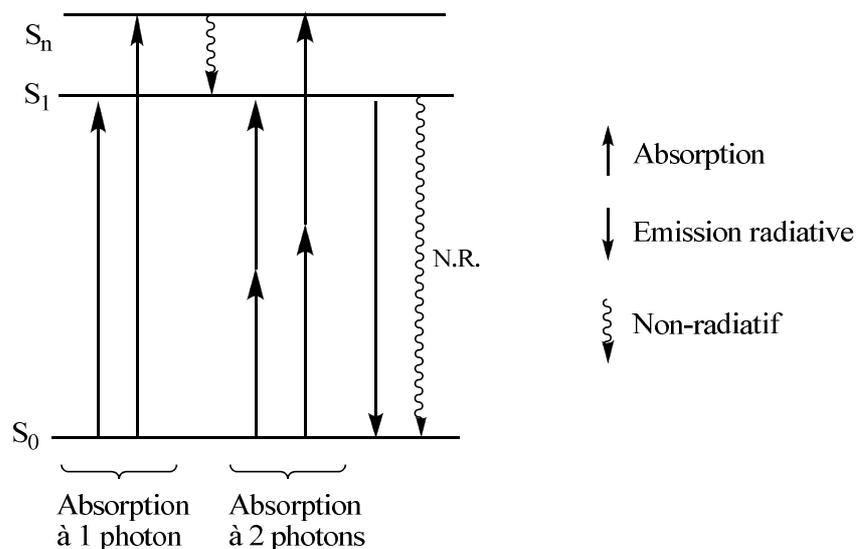


Figure 10 : Diagramme de Jablonski représentant l'absorption à un photon et l'absorption bi-photonique d'un matériau.

L'état intermédiaire, appelé état non stationnaire ou état virtuel, correspond à un état où la probabilité de présence des électrons est faible comparativement à celle de l'état stationnaire. En conséquence, la probabilité qu'un atome ou une molécule absorbe 2 photons d'énergie $\hbar\omega$ pour accéder à un état excité d'énergie $2\hbar\omega$ augmente si cet atome ou molécule possède des états excités d'énergie voisine de $\hbar\omega$. Le matériau excité peut ensuite revenir à son état fondamental par les mêmes voies qu'en optique linéaire, à savoir par l'émission d'un

photon ou par une désexcitation non-radiative. L'absorption de plusieurs photons de faible énergie (le plus souvent dans l'infrarouge) mène donc à l'émission d'un seul photon de plus haute énergie.

L'avènement de sources lumineuses de plus en plus performantes (lasers à impulsion, diodes laser pulsées ou continues) et l'augmentation considérable de l'intensité lumineuse disponible qui en a découlé, a permis d'étendre l'utilisation de ces phénomènes d'optique non-linéaire à un grand nombre de domaines, et notamment la biologie. Ainsi, l'absorption biphotonique est maintenant largement utilisée en bio-imagerie, en raison des importants avantages qu'elle apporte.^{38,39}

Tout d'abord, l'utilisation de rayonnements moins énergétiques que ceux utilisés en imagerie classique permet d'une part de réduire les dommages causés aux tissus exposés, mais également de limiter le phénomène de photo-blanchiment des marqueurs luminescents. Les grandes longueurs d'onde utilisées, situées dans le proche infrarouge, permettent également une pénétration profonde des tissus. En effet, il existe une gamme de longueurs d'onde située entre 700 et 1100 nm, appelée "fenêtre de transparence biologique", pour laquelle les rayonnements ne sont pas diffusés et peu absorbés par les tissus (**Figure 11**). Ainsi, l'utilisation de ces longueurs d'onde permet l'observation d'échantillons d'épaisseur supérieure à 500 μm , et autorise même l'imagerie *in vivo* sur petit animal.

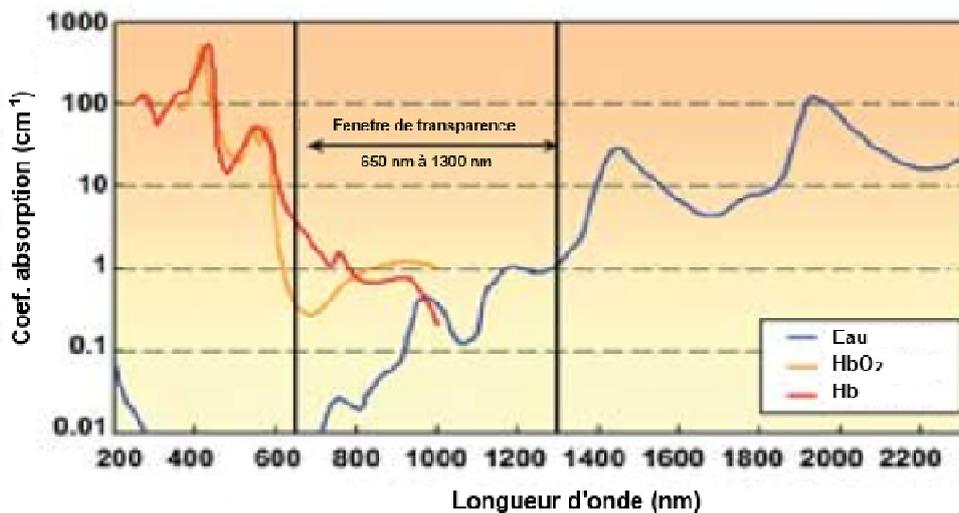


Figure 11 : Spectre d'absorption de différents composants des tissus dans le visible et l'infrarouge (Hb : hémoglobine ; HbO₂ : hémoglobine oxygénée) ; d'après Photonics.com.

Enfin, la nécessité d'une forte densité de photons pour observer les phénomènes d'optique non-linéaire limite l'absorption multiphotonique au point focal du laser. La luminescence est donc essentiellement localisée dans un petit volume de l'échantillon (**Figure**

12). A l'inverse, en imagerie classique, cette luminescence est produite sur tout le trajet du faisceau d'excitation au travers de l'échantillon, réduisant la résolution de l'image. En déplaçant le point focal du laser dans l'échantillon, il devient ainsi possible de reconstruire une image en 3 dimensions de l'échantillon.

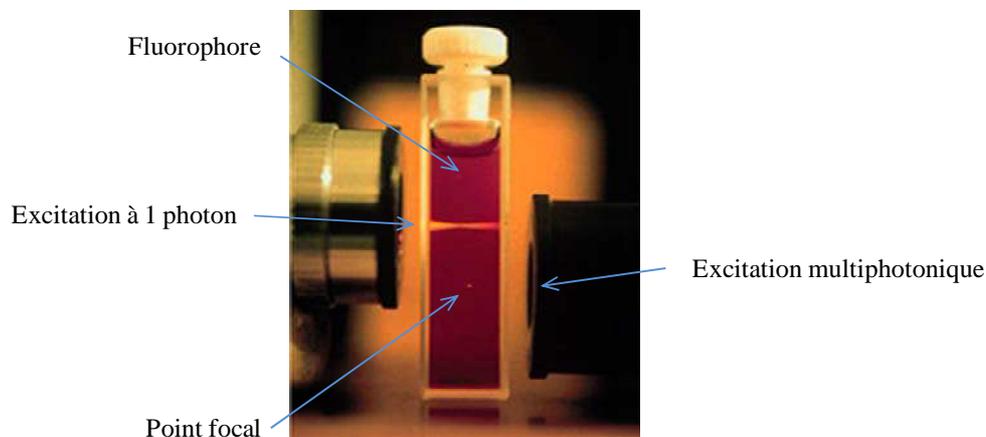


Figure 12 : Solution de fluorophore sous excitation à un photon (en haut) et sous excitation multiphotonique (en bas) ; d'après Brad Amos MRC, Cambridge.

L'application de l'absorption multiphotonique aux lanthanides est actuellement le sujet de plusieurs études.⁴⁰ Les transitions *f-f* des lanthanides, décrites comme interdites en optique linéaire, deviennent permises dans le cas d'une absorption multi-photonique. Cette excitation directe peut être utilisée par exemple pour obtenir la fluorescence des ions Eu^{3+} et Tb^{3+} en solution.⁴¹

De même que dans le cas de l'absorption à un photon, la luminescence des lanthanides peut être exaltée par la présence de ligands photo-sensibilisateurs, par un effet d'antenne multi-photons similaire à l'effet d'antenne classique. Dans ce cas, le ligand absorbe simultanément deux photons et passe à un état excité. Le principe est ensuite le même que pour l'effet d'antenne précédemment décrit, l'énergie étant transférée du ligand vers l'ion lanthanide, qui se désexcite en émettant un photon. Les acides aminés tryptophane et tyrosine, ainsi que la coumarine sont apparus comme de bons photo-sensibilisateurs pour l'excitation biphotonique de Tb^{3+} et de Eu^{3+} .⁴² L'acide dipicolinique et certains de ses dérivés se révèlent être également de très bons ligands pour l'absorption biphotonique.⁴³⁻⁴⁵ Certains ont d'ailleurs été utilisés avec succès en imagerie cellulaire biphotonique.^{43,46}

1.5. Conclusion

Les complexes de lanthanide luminescents possèdent un grand nombre d'atouts qui ont amené leur utilisation dans de nombreux domaines, et tout particulièrement en imagerie biomédicale. Leurs propriétés particulières ont permis des avancées majeures dans ce domaine.

Néanmoins, bien que supérieurs aux chromophores organiques classiques, les complexes de lanthanides présentent encore d'importants inconvénients pour de nombreuses applications en bio-imagerie. Leur dissociation en solution aqueuse, leur dégradation photochimique impliquant photo-blanchiment et réactions chimiques photo-induites, ainsi que leur faible stabilité thermique limitent leurs utilisations.

Pour pallier ces défauts, de nombreuses recherches portent actuellement sur la confection de nanoparticules hybrides incorporant des complexes de lanthanides.

2. Les nano-hybrides luminescents pour l'imagerie médicale

On désigne par nano-objet tout objet ayant au moins une de ses dimensions inférieure à 100 nm (10^{-7} m), comme par exemple les nanotubes de carbones ou les nanoparticules d'or (Figure 13).⁴⁷

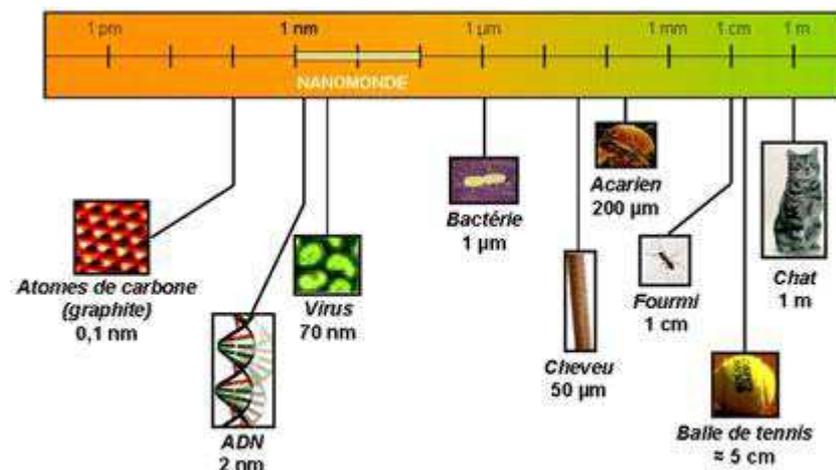


Figure 13 : Echelle logarithmique indiquant les limites du domaine nanométrique.⁴⁷

Les nanotechnologies, terme regroupant les secteurs spécialisés dans la synthèse, l'étude et les applications de ces nano-objets, sont actuellement en plein essor. Les récents progrès techniques effectués dans ces domaines permettent maintenant un contrôle précis de la

morphologie et de la taille d'une grande variété de nanoparticules, dont certaines possèdent des applications dans le domaine biomédical.

Les apports des nanoparticules (NPs) dans ce domaine, traités dans plusieurs revues,^{48,49} sont considérables et s'étendent du diagnostic précoce de maladies (tout particulièrement les cancers) à la thérapie. Par exemple, les nanoparticules magnétiques⁵⁰ peuvent être utilisées pour la bio-imagerie *in-vivo* en tant qu'agents de contraste pour l'IRM (imagerie par résonance magnétique) mais également en tant qu'agents thérapeutiques. En effet, leurs propriétés magnétiques autorisent leur guidage dans le corps par l'action d'un champ magnétique. Il devient alors possible de concentrer des nanoparticules porteuses de principes actifs dans les zones cibles ou encore de réaliser une thérapie par hyperthermie, c'est à dire par élévation de la température de la particule magnétique sous l'effet d'un fort champ magnétique, provoquant la mort des cellules avoisinantes. Des nanoparticules sur lesquelles ont été greffées des molécules comportant des isotopes radioactifs sont également utilisées pour la radiothérapie.⁵¹

Enfin, les nanoparticules luminescentes permettent de réaliser de l'imagerie par fluorescence ainsi que de la photothérapie. Nous nous intéresserons plus précisément ici aux nano-sondes luminescentes.

2.1. Nanoparticules luminescentes en bio-imagerie

Une grande partie de ces nanoparticules luminescentes est inorganique, comme par exemple les quantum dots ou les nanocristaux dopés. Les quantum dots sont des nanocristaux de semi-conducteurs (CdSe, CdTe, CdS, PbSe, ZnS, etc) dont la fluorescence repose sur un effet de confinement quantique dû au nombre réduit d'atomes dans le nanocristal. Ainsi, les longueurs d'onde d'émission sont dépendantes de leur taille, qui peut être parfaitement contrôlée (**Figure 14**).⁵² Ces quantum dots présentent des intensités de luminescence et des absorbances élevées, et sont insensibles au photo-blanchiment.⁵³

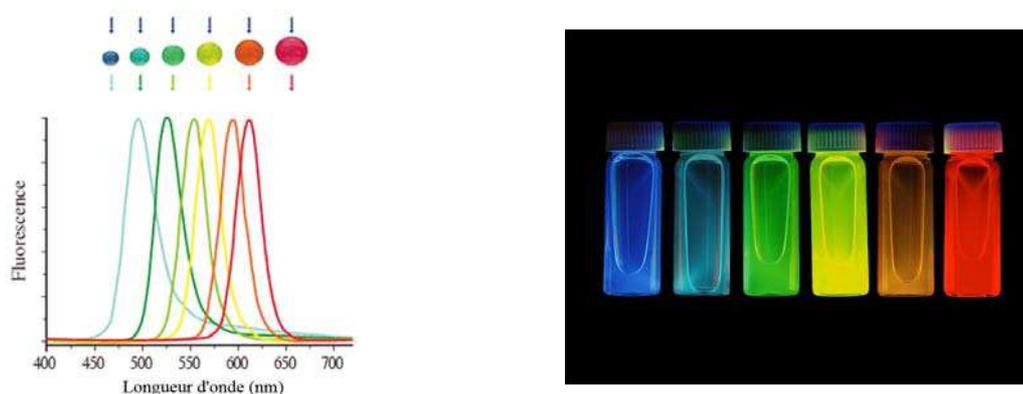


Figure 14 : Emission de quantum dots en fonction de leur taille, sous excitation à 365 nm.⁵²

Les nanocristaux dopés forment un autre type de nanoparticules luminescentes. Ils sont constitués d'une matrice minérale de fluorures ou d'oxydes (NaYF_4 , Y_2O_3 ou NaLnF_4 , Ln_2O_3) dopée par des ions lanthanides luminescents.⁵⁴ Certains de ces matériaux possèdent d'intéressantes propriétés optiques, puisqu'ils peuvent être utilisés pour effectuer de l'up-conversion, c'est à dire émettre des photons à des fréquences supérieures à celles des photons absorbés (c'est tout particulièrement le cas de ceux basés sur le système Er/Yb permettant la conversion d'un rayonnement infrarouge en lumière visible, ou le système Er/Tm absorbant dans l'infrarouge pour réémettre dans l'infrarouge).⁵⁵

Les longueurs d'onde d'excitation de ces nanocristaux inorganiques sont cependant difficilement modulables et peuvent de ce fait ne pas se prêter à toutes les applications, tandis que l'utilisation des quantum dots est limitée par la toxicité des métaux qui les composent, ainsi que par un effet de clignotement de leur luminescence.

Les chromophores organiques quant à eux possèdent d'excellentes propriétés optiques, mais sont sensibles au photo-blanchiment, possèdent une faible stabilité thermique et sont parfois sujet à des dégradations chimiques dans les environnements biologiques. La solution idéale consisterait alors à associer à la résistance mécanique, thermique et chimique des nanoparticules minérales, les propriétés de luminescence de luminophores organiques ou organométalliques. Cette association des propriétés est rendue possible grâce aux matériaux hybrides.

2.2. Les matériaux hybrides

Les matériaux hybrides se définissent comme la combinaison à l'échelle nanométrique ou moléculaire de composants organiques et inorganiques. Ce concept de matériau hybride fait son apparition il y a moins d'une quarantaine d'années, aidé par le développement en

chimie inorganique de la chimie douce, en particulier des procédés de synthèse par voie sol-gel, permettant l'élaboration de matériaux vitreux sans employer de fusion. Ces matériaux hybrides peuvent être repartis en deux catégories distinctes, en fonction du type d'interactions établies entre la composante organique et la composante inorganique.⁵⁶ Pour les hybrides de classe I, les molécules organiques sont maintenues dans la matrice inorganique par des interactions faibles (liaisons de Van der Waals, liaisons hydrogène), alors que les composants organiques et minéraux sont liés de façon covalente dans le cas des hybrides de classe II (**Figure 15**).

La synergie des propriétés du réseau minéral et des molécules organiques confère aux matériaux hybrides des propriétés remarquables. Outre l'amélioration de la résilience du réseau inorganique, la composante organique apporte des propriétés qui lui sont intrinsèques comme par exemple des modifications de la conductivité ou des propriétés optiques par l'incorporation de polymères π -conjugués ou de colorants organiques. D'autre part, la présence du composant minéral améliore la stabilité thermique et mécanique ainsi que la photo-stabilité de la partie organique.^{57,58}

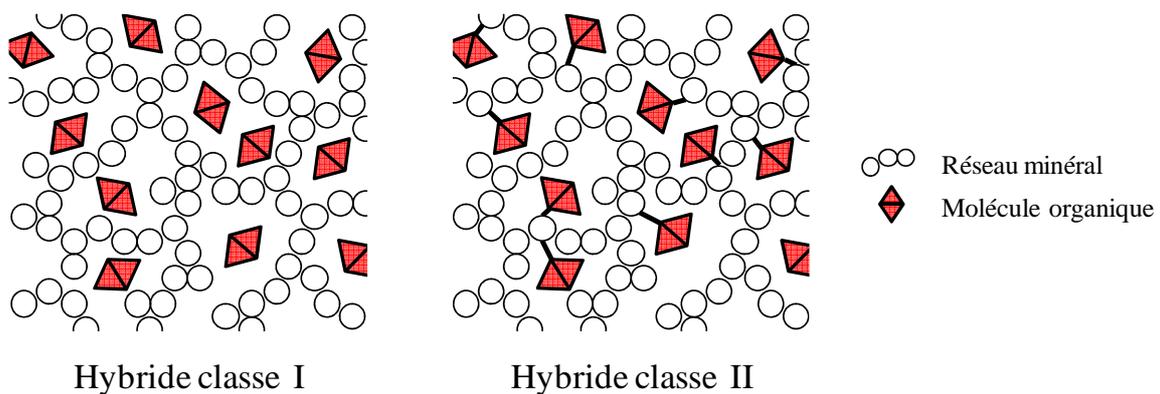


Figure 15 : Représentation schématique d'hybrides de classe I et de classe II.

Ces matériaux hybrides sont synthétisés suivant de nombreux procédés, principalement issus de voies sol-gel qui permettent la synthèse de réseaux minéraux à température ambiante à partir de précurseurs moléculaires. Typiquement, ces voies sol-gel reposent sur l'hydrolyse et la polycondensation d'alcoxydes métalliques pour former un réseau minéral. La maîtrise des conditions opératoires, telles que l'ajout d'agents complexants ou les paramètres de séchage, permet d'obtenir avec un contrôle précis, diverses morphologies allant de la nanoparticule sphérique au monolithe, en passant par l'aérogel (**Schéma 2**).

Les procédés les plus couramment utilisés pour la synthèse de matériaux hybrides sont les suivants :⁵⁹

- Synthèse par polycondensation d'organosilanes (alcoxysilanes comportant une ou plusieurs liaisons silicium-carbone, non hydrolysables).
- Co-condensation d'un polymère et d'un oxyde métallique.
- Formation *in situ* de particules inorganiques au sein d'un polymère.
- Formation *in situ* d'un polymère par infiltration de monomères dans un gel d'oxydes métalliques.
- Formation simultanée et interpénétrée d'un polymère organique et d'un réseau minéral.
- Incorporation de composants organiques par encapsulation ou imprégnation dans une matrice minérale.

Ce dernier procédé a été largement utilisé pour l'incorporation de luminophores organiques dans des matrices minérales, pour l'obtention de matériaux hybrides luminescents.^{57,60,61}

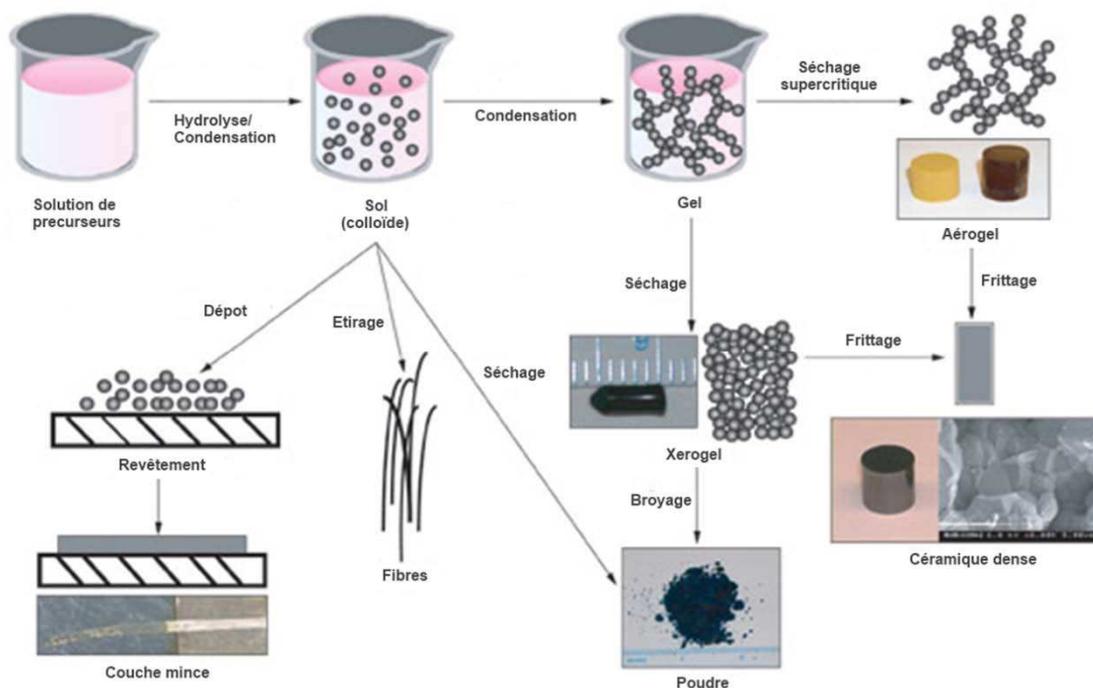


Schéma 2 : Principe du procédé sol-gel, et exemples de morphologies accessibles (d'après un schéma du Lawrence Livermore National Laboratory - LLNL).

Issus de ces matériaux hybrides, les nanohybrides ont des dimensions comprises entre 1 et 100 nm.

De nombreuses architectures sont possibles pour ces nanomatériaux (**Figure 16**). La composante organique peut être répartie de façon uniforme dans la matrice minérale, donnant

une structure dite homogène. Elle peut également constituer le cœur de la nanoparticule, ou à l'inverse former une couche autour de celle-ci, donnant une structure de type cœur-coquille. Il est également possible d'obtenir des édifices multicouches, par exemple en enrobant une nanoparticule cœur-coquille d'une couche de silice pour isoler la partie organique du milieu extérieur. Toutefois, toutes ces architectures ne peuvent pas être élaborées quels que soient les composants. Une architecture homogène ne peut être obtenue que si le composé organique à incorporer est de petite taille (inférieure à quelques nanomètres). Si la partie organique est de taille supérieure (comprise entre quelques nanomètres et quelques dizaines de nanomètres), il faudra alors opter pour une architecture cœur-coquille, le cœur étant constitué par la partie organique.

Il est également possible de combiner ces architectures pour conférer plusieurs propriétés à une même particule. Cette stratégie est particulièrement utilisée pour l'obtention de nanoparticules multifonctionnelles.⁶²⁻⁶⁴

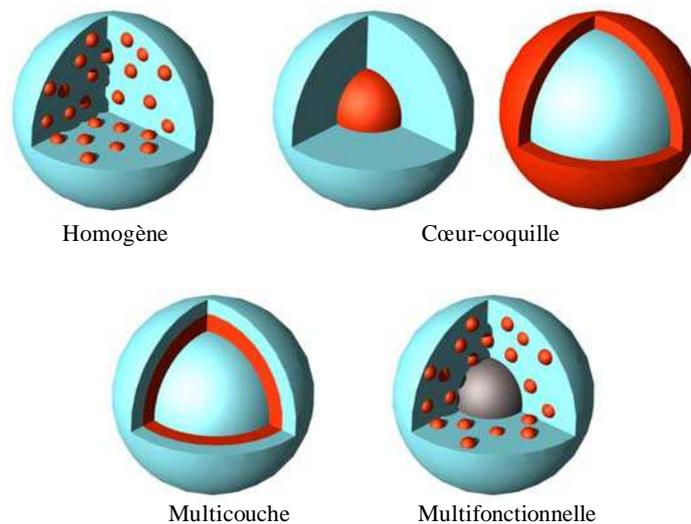


Figure 16 : Exemples de différentes architectures de nanohybrides. En bleu la partie minérale, en rouge la partie organique.

2.3. Les nanohybrides luminescents à base de silice

La silice est certainement la matrice minérale de choix pour les nano-sondes luminescentes. En effet, ce matériau est biocompatible et transparent sur une gamme de longueurs d'onde allant de l'ultraviolet au proche infrarouge.⁶⁵ De plus, la silice bénéficie d'une grande stabilité physique et chimique, lui conférant une inertie certaine vis-à-vis de son environnement.

La synthèse de nanoparticules de silice est maintenant largement décrite dans la littérature, et comme nous le verrons par la suite, leur fonctionnalisation est aisée.

2.3.1. Les nanoparticules de silice

La synthèse de matériaux à base de silice a connu une grande avancée du fait de l'introduction des procédés sol-gel.

Dans le cas de la silice, les précurseurs utilisés pour ces procédés sol-gel sont principalement l'orthosilicate de tétraéthyle (TEOS) et dans une moindre mesure l'orthosilicate de tétraméthyle (TMOS) (**Figure 17**). A l'aide d'une catalyse acide ou basique, l'alcoxy silane est hydrolysé pour former des groupements silanols Si-OH. Ces silanols peuvent ensuite se condenser entre eux ou réagir avec une fonction alcoxy silane pour former une liaison siloxane Si-O-Si (**Schéma 3**).



Figure 17 : Structure des alcoxy silanes TMOS et TEOS.

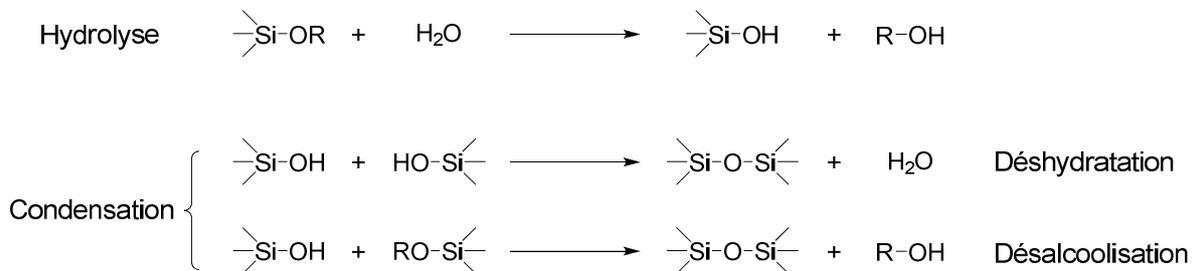


Schéma 3 : Hydrolyse des alcoxy silanes, puis condensation des silanols menant à la formation du réseau de silice.

La synthèse des nanoparticules de silice est majoritairement réalisée selon deux méthodes dérivées des procédés sol-gel, qui sont la méthode de Stöber d'une part et la microémulsion inverse d'autre part.

2.3.1.1. Méthode de Stöber

Mise au point en 1968 par Werner Stöber, cette méthode consiste à synthétiser des nanoparticules de silice par l'hydrolyse et la condensation de TEOS dans l'éthanol, en présence d'eau et d'ammoniaque qui joue le rôle de catalyseur.⁶⁶ En faisant varier les rapports de concentrations des différents constituants de ce système ainsi que la température, il est possible de contrôler le diamètre moyen des nanoparticules (**Tableau 6**).^{67,68}

Cette méthode permet d'accéder à des nanoparticules de diamètre compris entre 30 nm et 1 μm , et a l'avantage d'être simple à mettre en œuvre. Cependant, bien que le diamètre moyen puisse être contrôlé, le diamètre des nanoparticules obtenues par cette méthode de synthèse présentent une grande dispersité.

Tableau 6 : Diamètre moyen des particules en fonction des conditions utilisées.⁶⁸

Experiment no.	Name of the sample	Experimental conditions				Results	
		Ethanol (molL ⁻¹)	TEOS (molL ⁻¹)	[H ₂ O]/[TEOS]	NH ₄ OH (molL ⁻¹)	Average particle size (nm)	SD (\pm nm)
1	Sample-1	8	0.045	66.7	14	224.2	4.2
2	Sample-TEM1	6	0.045	184	14	251	1.0
3	Sample-2	4	0.045	311	14	20.5	0.7
4	Sample-3	8	0.012	250	14	60.1	12.1
5	Sample-4	8	0.067	45	14	243.03	60.3
6	Sample-TEM2	8	0.11	27	14	417	1.3
7	Sample-5	4	0.012	1167	14	251.9	19.5
8	Sample-6	4	0.067	209	14	80.5	18.9
9	Sample-7	8	0.045	66.7	2.8	242.8	42.9
10	Sample-8	8	0.045	66.7	28	30.6	3.9
Temperature effect							
11	T1	8	0.045	66.7	14	372	4.24
12	T2	8	0.045	66.7	14	345	21.2
13	T3	8	0.045	66.7	14	324.1	15.7
14	T4	6	0.045	184	14	228.13	36.05
15	T5	6	0.045	184	14	347.96	21.84
16	T6	6	0.045	184	14	462.03	25.51
17	T7	4	0.045	311	14	116	13.75
18	T8	4	0.045	311	14	128.5	20.51
19	T9	4	0.045	311	14	150.5	23.33

Note. T1, T4, and T7 are at 30 °C; T2, T5, and T8 are at 50 °C; T3, T6, and T9 are at 70 °C.

2.3.1.2. Méthode de microémulsion inverse

La synthèse par microémulsion inverse, dérivée de la méthode de Stöber, consiste à réaliser l'hydrolyse et la condensation du TEOS dans un milieu confiné et de petite dimension, permettant un meilleur contrôle du diamètre de la nanoparticule.

Ce confinement est réalisé grâce à l'utilisation de tensioactifs, molécules amphiphiles comportant une partie hydrophile et une partie hydrophobe, et permettant de former des micelles en présence d'une phase organique et d'une phase aqueuse non-miscibles.

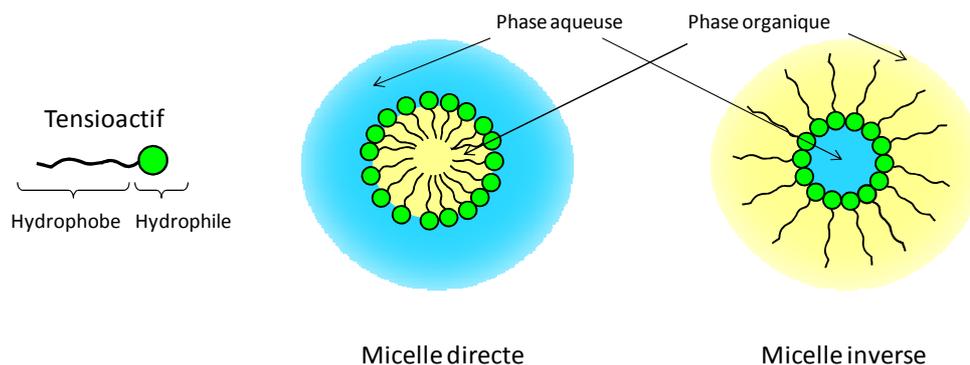


Figure 18 : Représentation d'une micelle directe et d'une micelle inverse.

En fonction des proportions des deux phases dans l'émulsion, il existe deux types de micelles : les micelles directes et les micelles inverses (**Figure 18**). Les micelles directes sont formées par le regroupement de la partie hydrophobe des molécules de tensioactifs dans une gouttelette de solvant organique, tandis que celles-ci exposent leur partie hydrophile à la phase aqueuse (huile dans eau, O/W). Cependant, si la phase aqueuse est minoritaire par rapport à la phase organique (eau dans huile, W/O), le phénomène s'inverse : les parties hydrophiles enrobent une petite gouttelette de phase aqueuse tandis que les queues hydrophobes des tensioactifs sont exposées dans le solvant organique, donnant des micelles inverses.

En ajustant les proportions des différents constituants de l'émulsion, il est possible d'obtenir des gouttelettes d'eau stables de taille submicronique.

C'est au sein de ces « nano-réacteurs » que constituent les micelles inverses que va se dérouler l'hydrolyse et la condensation du TEOS. La taille des nanogouttelettes étant homogène et dépendante des proportions de chaque constituant, le diamètre des nanoparticules obtenues grâce à cette méthode est extrêmement reproductible et d'une faible dispersion.

La phase aqueuse est constituée d'ammoniaque à des concentrations variables, l'ammoniaque jouant le rôle de catalyseur basique nécessaire à l'hydrolyse rapide du TEOS. La concentration va avoir une influence sur la taille des nanoparticules (**Figure 19**).⁶⁹

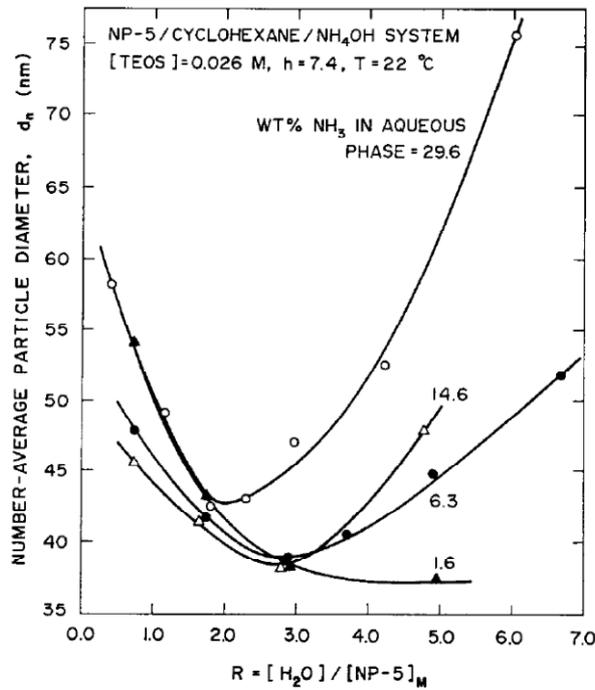


Figure 19 : Diamètre moyen des nanoparticules en fonction du rapport $[H_2O]/[NP-5]$ pour différentes concentrations en ammoniac (allant de 1,6 à 29,6 wt%).⁶⁹

Concernant les tensioactifs, ils peuvent être ioniques ou non-ioniques. Les principaux composés utilisés sont le sulfosuccinate de bis(2-éthylhexyle) (AOT) pour les tensioactifs ioniques, le nonylphényléther de polyoxyéthylène (NP-5) et le *t*-octylphényléther de polyéthylène glycol (Triton X-100) pour les tensioactifs non-ioniques (**Figure 20**). Au même titre que sa proportion dans l'émulsion, la nature du tensioactif peut avoir une influence sur la taille des nanoparticules (**Tableau 7**).^{69,70}

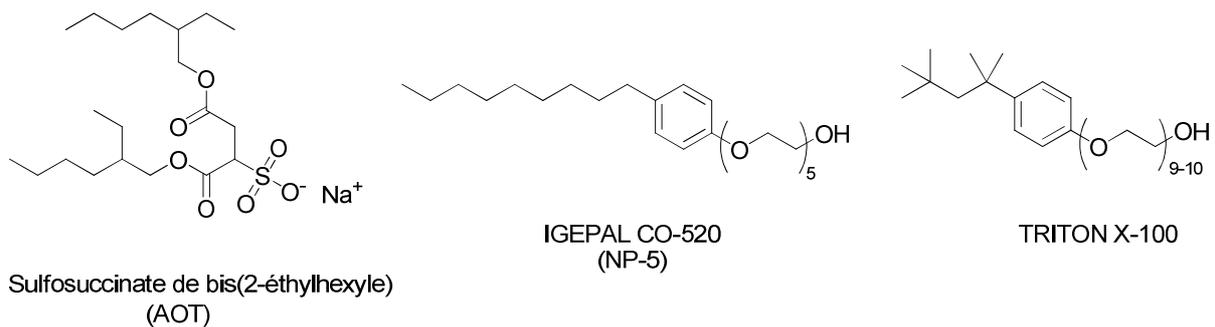


Figure 20 : Principaux tensioactifs utilisés pour la microémulsion inverse.

Tableau 7 : Influence de la nature du tensioactif, et du rapport de concentrations $[H_2O]/[tensioactif]$ sur le diamètre moyen des nanoparticules.

Systeme	NP-5/Cyclohexane/NH ₄ OH ⁶⁹	AOT/Décane/NH ₄ OH ⁷⁰
$\frac{[H_2O]}{[tensioactif]}$	3	8

Diamètre moyen des NP	39 nm	48 nm	13 nm	25 nm
-----------------------	-------	-------	-------	-------

Avec $[\text{NH}_3]= 14 \text{ wt\%}$; $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{TEOS}]=7,4$.

Bien qu'une mise au point des conditions expérimentales soit souvent nécessaire (concernant principalement l'ajustement des différentes proportions des constituants de la microémulsion), la méthode de synthèse par microémulsion inverse est un outil puissant pour l'obtention de nanoparticules sphériques, avec un diamètre parfaitement contrôlé et une distribution de taille étroite (**Figure 21**).

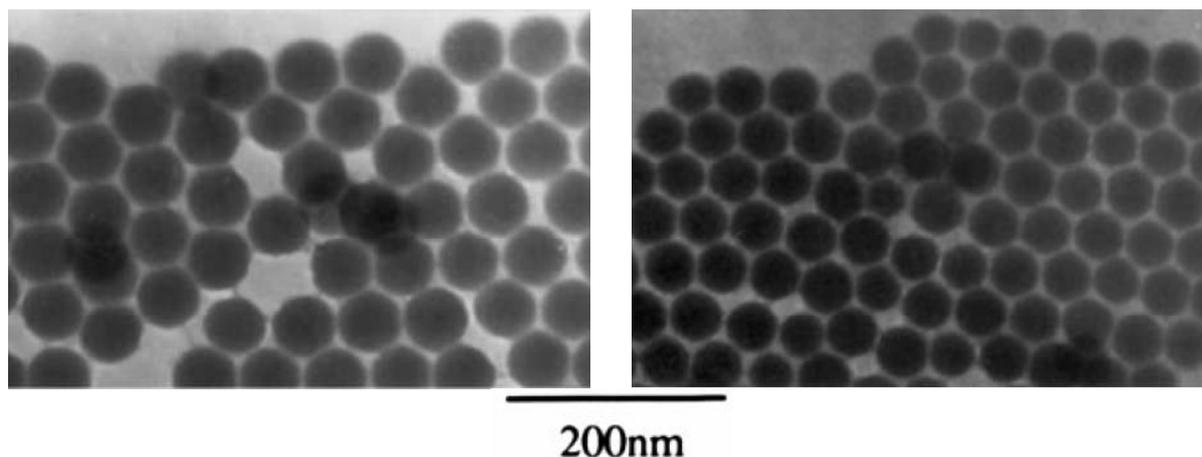


Figure 21 : Exemples de nanoparticules de silice de tailles homogènes synthétisées par la méthode de microémulsion inverse.⁶⁹

Toutefois, cette méthode comporte un inconvénient. En effet, la microémulsion doit être déstabilisée en fin de synthèse afin que les nanoparticules produites puissent être récupérées. Cette déstabilisation provoque l'adsorption d'une quantité importante de tensioactif à la surface des nanoparticules. De nombreux lavages par centrifugation sont alors nécessaires pour éliminer totalement le tensioactif.

2.3.1.3. Conclusion

La méthode de Stöber et la microémulsion inverse présentent des caractéristiques différentes et complémentaires. D'un côté, la méthode de Stöber est facile à mettre en œuvre, mais ne permet qu'un contrôle limité de la taille des nanoparticules, avec une forte dispersion diamétrale. La microémulsion, en revanche, permet d'obtenir des nanoparticules de taille parfaitement contrôlée et de distribution de taille étroite, mais nécessite de nombreux lavages pour l'élimination du tensioactif. La méthode de microémulsion inverse sera donc privilégiée pour la synthèse de nanoparticules ayant un diamètre inférieur à 100 nm, tandis que la

méthode de Stöber sera principalement utilisée pour la synthèse de particules d'une taille supérieure à 100 nm.

La complémentarité de ces deux méthodes permet d'accéder à une large gamme de diamètres, point particulièrement important puisque ce paramètre peut avoir une influence sur la répartition des nano-sondes dans l'organisme.⁷¹ Il est estimé que pour des applications *in vivo*, la taille idéale pour ces nano-sondes est similaire à celle des biomolécules usuelles, à savoir inférieure à 50 nm.⁷²

2.3.2. Nanohybrides silice/chromophores organiques

Comme il a été souligné précédemment, les fluorophores organiques sont intéressants par leurs longueurs d'onde d'excitation et d'émission couvrant une large gamme spectrale, ainsi que pour leur rendement quantique de luminescence élevé, proche de 100% pour certains fluorophores. Cependant, ces luminophores sont, entre autres, extrêmement sensibles au photo-blanchiment. Afin d'améliorer ces caractéristiques, de nombreuses études ont porté sur la confection de nano-sondes hybrides associant les chromophores organiques et la silice.⁷³⁻⁷⁵

Les chromophores encapsulés sont pour la plupart du même type que ceux utilisés en bio-imagerie pour le marquage fluorescent, comme par exemple la fluorescéine, les rhodamines et les cyanines.

A partir de ces chromophores peuvent être obtenus des hybrides de classe I ou II. Les hybrides de classe II, dans lesquels une liaison covalente lie le chromophore à la matrice de silice, sont les plus largement étudiés, et nécessitent la modification du colorant organique par greffage d'un groupement tri-alcoxysilane (**Schéma 4**), formant ainsi un composé appartenant à la famille des organosilanes.

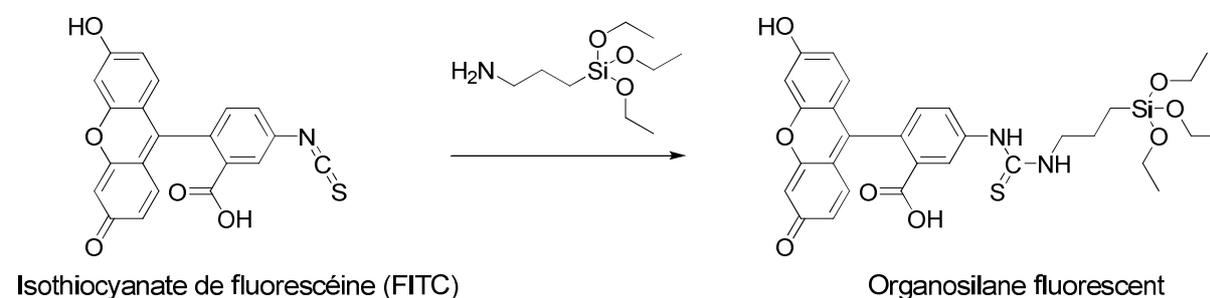


Schéma 4 : Exemple de synthèse d'un organosilane fluorescent pour la préparation de nanohybrides luminescents de classe II.⁷⁶

Les nanoparticules luminescentes sont ensuite synthétisées par la méthode de Stöber^{77,78} ou par microémulsion inverse⁷⁶, en ajoutant au milieu réactionnel l'organosilane fluorescent. A partir de ces molécules, il a également été possible d'obtenir des nanoparticules fluorescentes de type cœur-coquille, avec une coquille formée de fluorophores.⁷⁹ Sur ces mêmes nanoparticules, une couche supplémentaire de silice, donnant un édifice multicouche, permet de protéger les fluorophores et d'améliorer les propriétés de fluorescence (**Schéma 5**).

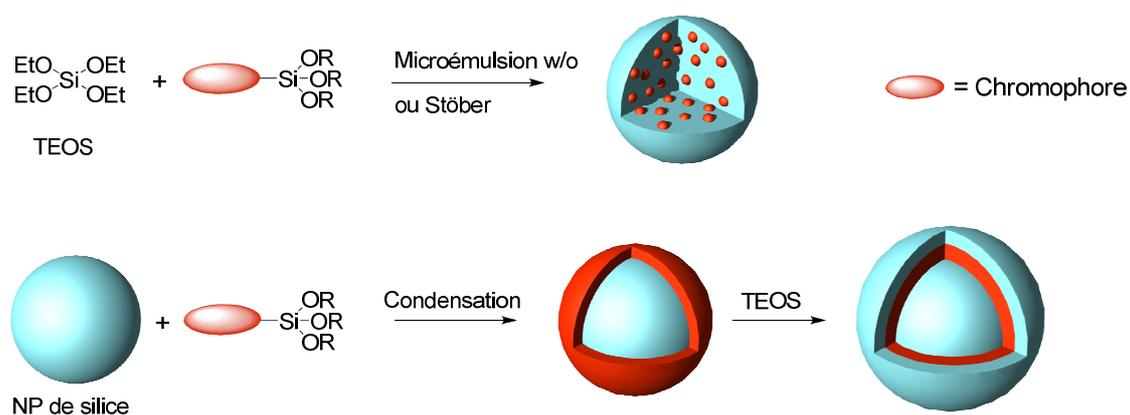


Schéma 5 : Procédés utilisés pour la synthèse de nanohybrides luminescents silice-chromophores organiques de classe II.

Les hybrides de classe I peuvent être préparés grâce à la méthode de microémulsion, à la condition que le chromophore à incorporer soit hydrosoluble. En effet, les composés hydrophobes ne seront pas présents dans les nanogouttelettes d'eau formées par les micelles inverses, et ne pourront par conséquent pas être incorporés dans la matrice de silice. Dans ce cas, il convient de modifier le chromophore en lui adjoignant des groupements hydrophiles, afin d'augmenter sa solubilité en phase aqueuse. En suivant cette stratégie, des nanoparticules contenant de la rhodamine préalablement rendue hydrosoluble par le greffage de dextrane ont pu être synthétisées.⁸⁰ Dans le cas des chromophores hydrophobes, il est également possible d'obtenir des nanohybrides de classe I en utilisant une méthode de Stöber modifiée. L'ajout d'un alcoxy silane portant un groupement hydrophobe non hydrolysable, tel que le phényltriéthoxysilane, permet de former des interactions entre ces chaînes organiques et le chromophore hydrophobe, suffisantes pour retenir le composé fluorescent dans la matrice hybride. Des nanoparticules luminescentes incorporant une rhodamine ont été synthétisées avec succès par cette méthode⁸¹ (**Schéma 6**).

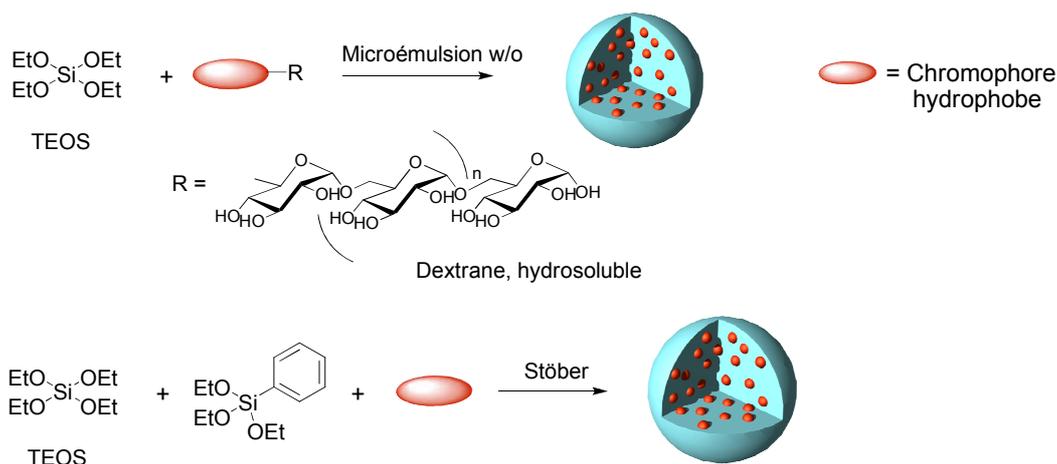


Schéma 6 : Procédés utilisés pour la synthèse de nanohybrides luminescents silice-chromophores organiques de classe I.

Cependant, ces hybrides luminescents souffrent toujours de certaines limitations inhérentes aux chromophores organiques, comme des déplacements de Stokes faibles et des durées de vie de luminescence de l'ordre de la nanoseconde. De plus, bien que le photoblanchiment soit atténué par la matrice de silice, ses effets restent notables pour de longues durées d'exposition. Enfin, une auto-extinction de la luminescence par désexcitation des molécules entre elles est observée lorsque la concentration en fluorophores devient trop importante dans la matrice de silice.⁸²

2.3.3. Nanohybrides silice/complexes de lanthanide

Les complexes de coordination luminescents obtenus à partir de ligands organiques présentent de nombreux avantages sur les chromophores organiques, en particulier leurs forts déplacements de Stokes. Ainsi, de nombreux nanohybrides luminescents sont basés sur l'encapsulation de complexes luminescents de ruthénium, d'iridium ou d'osmium dans une matrice de silice.⁸³⁻⁸⁶ Cependant, étant données les propriétés optiques uniques des complexes de lanthanides présentées dans la partie précédente, nous nous limiterons à une présentation des nanohybrides luminescents à base de complexes de lanthanide.

De nombreux matériaux hybrides contenant des complexes de lanthanide sont décrits dans la littérature.⁸⁷⁻⁸⁹ Bien que la majeure partie d'entre eux concerne des matériaux massifs ou des couches minces, on trouve de nombreux exemples de synthèse de nanohybrides associant silice et complexes de lanthanide. Ces nanohybrides luminescents sont pour la plupart des hybrides de classe II, synthétisés à partir de complexes dont les ligands sont

porteurs de groupements alcoxy-silanes leur permettant de s'associer de manière covalente au réseau de silice (**Figure 22**).

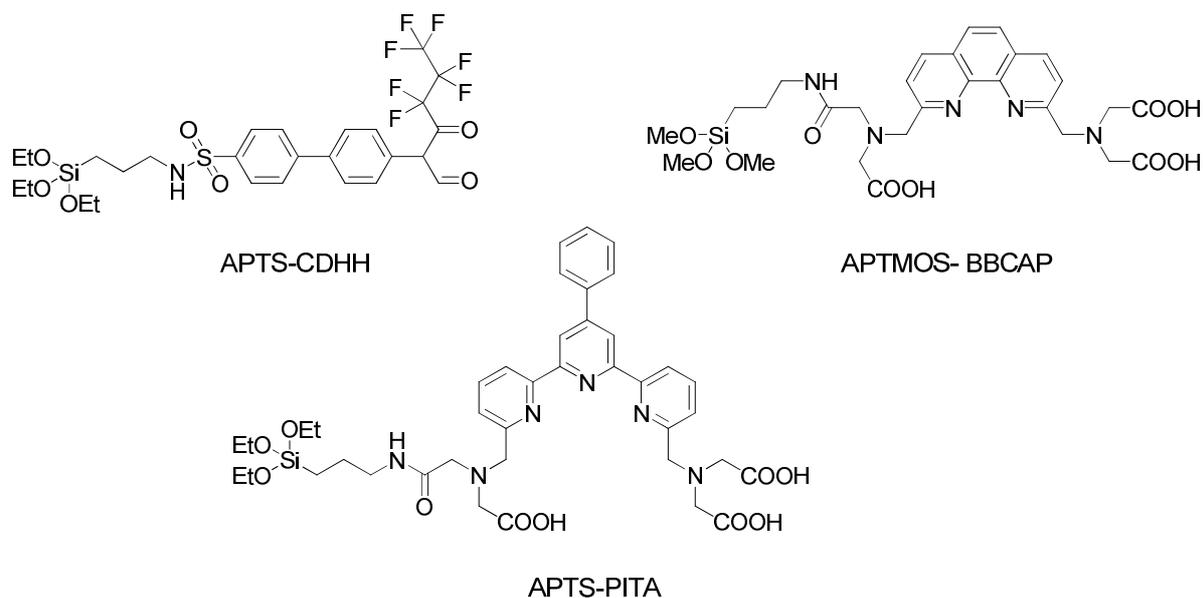


Figure 22 : Exemples de ligands siliciés.⁹⁰⁻⁹²

De même que pour les chromophores organiques, ces complexes siliciés peuvent être utilisés pour la synthèse de nanoparticules d'architectures homogènes, grâce aux méthodes de Stöber ou de microémulsion inverse,⁹⁰⁻⁹² ou encore pour l'obtention de nanoparticules ayant une architecture de type cœur-coquille, par greffage des complexes à la surface de nanoparticules de silice déjà formées⁹³ (**Schéma 7**).

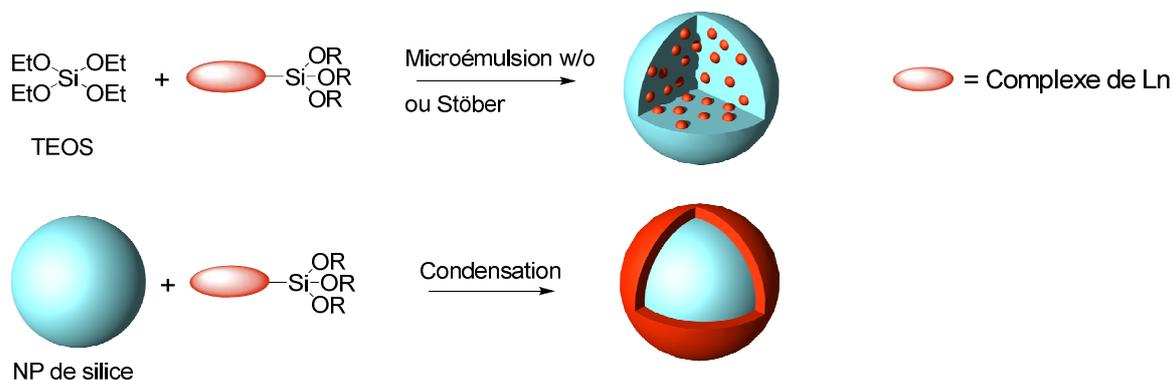


Schéma 7 : Procédés utilisés pour la synthèse de nanohybrides à partir de complexes de lanthanide siliciés.

Une autre stratégie consiste à greffer covalamment des complexes non-siliciés. En partant de nanoparticules de silice portant des fonctions amines en surface, il a été possible de leur associer ainsi des complexes d'euprimum par réaction avec ces fonctions amine. Après avoir recouvert les nanoparticules résultantes d'une couche de silice, il est possible de réitérer

ce cycle pour augmenter le taux de charge des nanoparticules en complexes de lanthanide⁹⁴ (**Schéma 8**).

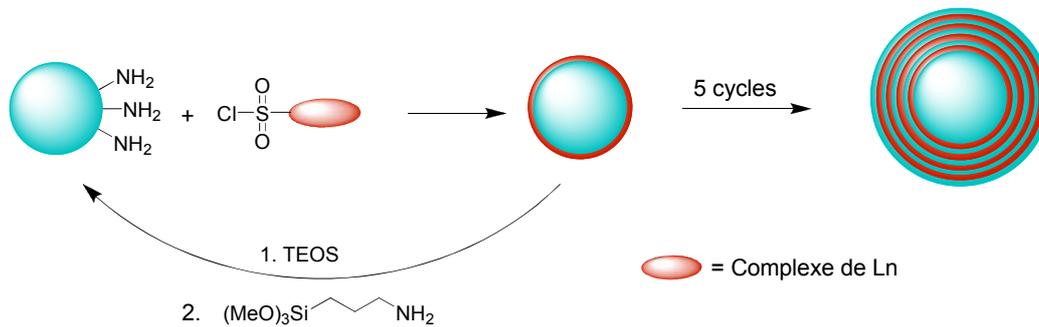


Schéma 8 : Synthèse de nanohybrides décrite par Xu *et al.*⁹⁴

Il existe peu de cas de nanohybrides de classe I associant silice et complexes de lanthanide. On peut citer comme exemple le complexe hydrophobe [Eu(tfc)₃], qui a été incorporé avec succès dans des nanoparticules en utilisant la méthode de Stöber, avant que ne soit effectué le revêtement des nanoparticules par une couche d'argent.⁹⁵ L'incorporation de complexes hydrophiles est quant à elle préférentiellement réalisée par la méthode de microémulsion inverse. Ainsi, cette méthode a permis l'obtention de nanoparticules luminescentes à partir de plusieurs complexes de lanthanides hydrosolubles.⁹⁶⁻⁹⁸ Ces études montrent d'ailleurs qu'il existe un fort lien entre la facilité d'encapsulation des complexes et leur hydrophilie. Enfin, des nanoparticules luminescentes ont été obtenues plus récemment par microémulsion en incorporant le dicétonate hydrophobe Eu(TTA)₃(5-NH₂-phen), après le greffage d'une biomolécule (l'immunoglobuline G – IgG) dans le but d'accroître son hydrophilie⁹⁹ (**Schéma 9**).

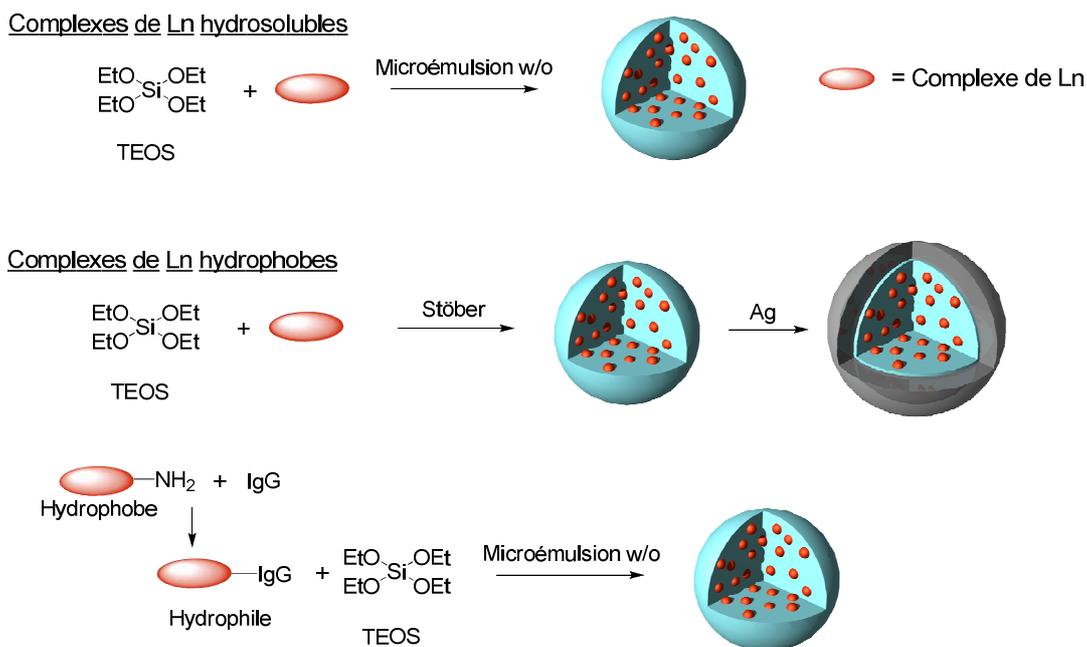


Schéma 9 : Procédés utilisés pour la synthèse des nanohybrides de classe I incorporant des complexes de lanthanides.

Comme attendu, l'association de la matrice minérale avec les complexes de lanthanides permet d'améliorer la stabilité thermique de ces complexes⁹², ainsi que leur résistance au photo-blanchiment.^{91,98} Les propriétés optiques des complexes de lanthanide sont par ailleurs conservées.

2.4. Fonctionnalisation de surface des nanohybrides

L'utilisation des nanoparticules dans les secteurs biomédicaux nécessite le plus souvent une fonctionnalisation de leur surface. Cette fonctionnalisation peut avoir différents objectifs, comme par exemple l'augmentation de la biocompatibilité, le ciblage de cellules ou de signaux cellulaires, mais encore la stabilisation de suspensions de nanoparticules.

Dans le cas de la silice, cette fonctionnalisation est généralement réalisée au moyen d'organosilanes, portant une liaison Si-C non hydrolysable. En effet, les nanoparticules de silice se prêtent particulièrement bien à ce type de fonctionnalisation de par la présence de nombreux groupements silanols à leur surface. La condensation des groupements alcoxy-silanes avec les silanols de surface permet un greffage covalent et permanent de nombreuses fonctions (**Schéma 10**).

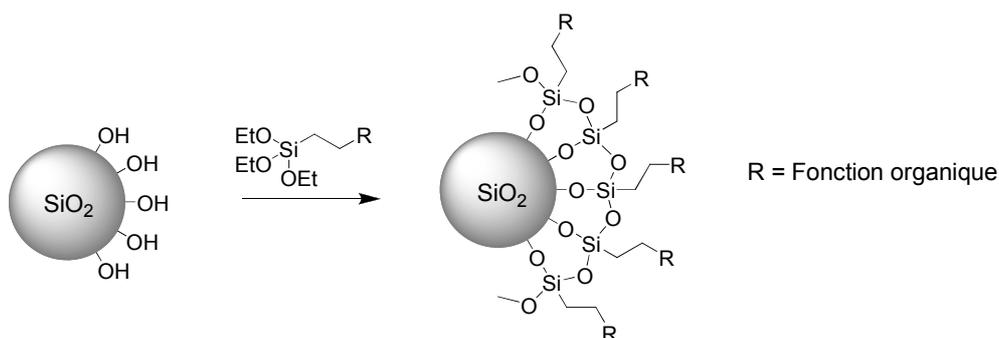


Schéma 10 : Fonctionnalisation de la surface d'une NP de silice par un organosilane.

En effet, une grande diversité d'organosilanes est maintenant commercialisée, permettant l'ajout de fonctions R telles que des amines primaires, des acides carboxyliques, des thiols ou des alcynes.

Ces fonctions peuvent avoir pour but de modifier la charge de surface afin d'augmenter la répulsion électrostatique entre les particules, limitant leur agrégation et augmentant la stabilité des suspensions de nanoparticules. Cependant, ces fonctions sont principalement utilisées pour le greffage de nouvelles molécules sur les nanoparticules. Ce greffage peut être réalisé par différentes réactions chimiques simples, selon les fonctions ajoutées en surface, et vise à conjuguer les nanoparticules avec diverses molécules telles que des peptides ou des anticorps, dans le but de cibler une protéine ou un type de cellule déterminé (**Schéma 11**).

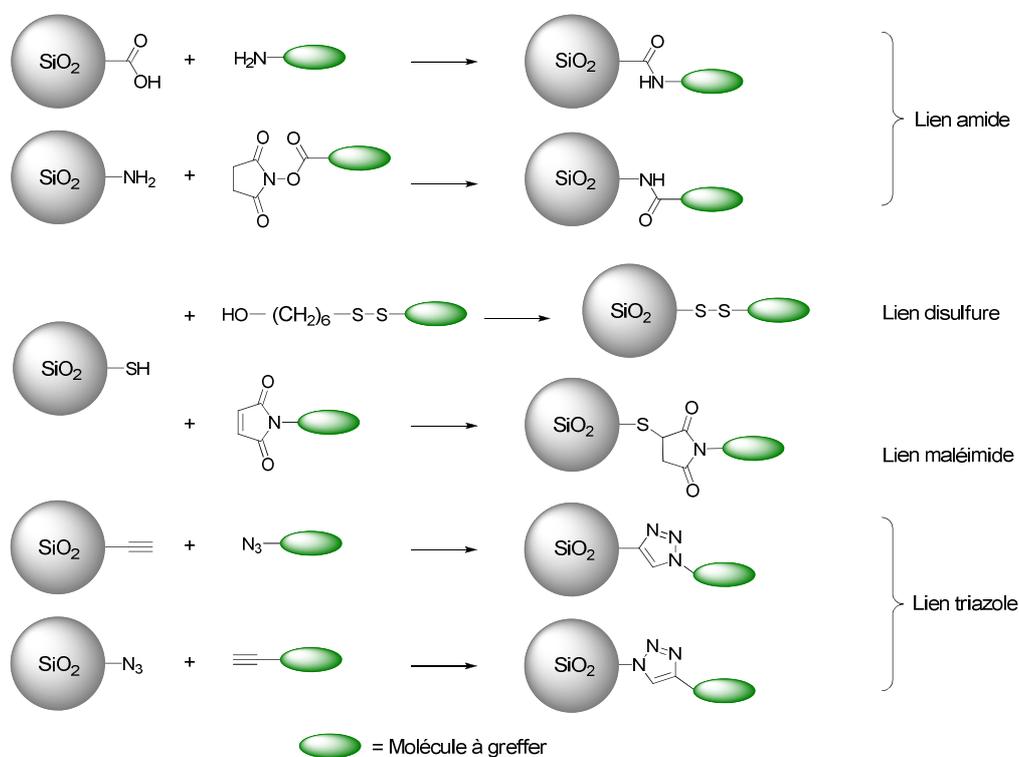


Schéma 11 : Exemples de réactions utilisables pour la conjugaison des nanoparticules fonctionnalisées.

La fonctionnalisation de surface est également utilisée pour le greffage de molécules visant à accroître la biocompatibilité des nano-objets. En effet, les nanoparticules de silice non-fonctionnalisées ont tendance à se lier spontanément aux protéines du sang et à engendrer une réponse immunitaire et une inflammation, ce qui entraîne leur phagocytose par les macrophages.^{100,101} Cette phagocytose des nanoparticules diminue leur durée de circulation dans le sang, et ainsi limite la durée de leur action. Il a été montré que le greffage de polyéthylène glycol (PEG) à la surface des nanoparticules augmentait grandement leur biocompatibilité.¹⁰¹⁻¹⁰³ Les nanoparticules (**Figure 23**), rendues « furtives » par cette PEGylation « anti fouling », ne sont plus phagocytées et leur durée de circulation dans le sang est augmentée, permettant par exemple le relargage lent d'un principe actif ou la concentration de nano-sondes dans une zone ciblée.

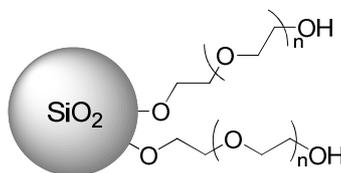


Figure 23 : Nanoparticule de silice rendue biocompatible par le greffage de PEG.

2.5. Conclusion

Nous avons vu que l'association des complexes de lanthanide avec la silice permettait d'augmenter la stabilité thermique et photochimique des complexes, tout en conservant leurs propriétés de luminescence uniques. Il est ainsi possible de façonner des nano-sondes plus robustes et plus à même d'être utilisées en bio-imagerie. De plus, la biocompatibilité et la facilité de fonctionnalisation de la silice ouvrent un large éventail de perspectives pour l'utilisation de ces nanoparticules luminescentes.

Ainsi, pour élargir les applications de ces marqueurs luminescents, il apparaît nécessaire de pouvoir différencier certains types de tissus ou organes, comme par exemple des tumeurs cancéreuses. Cette détection spécifique peut être obtenue par le greffage de marqueurs antigéniques spécifiques des tissus ciblés, en utilisant la fonctionnalisation de surface.

3. Détection du cancer de la prostate

Le cancer est une des maladies les plus meurtrières dans le monde. Cette maladie est provoquée par la prolifération anarchique et incontrôlée de cellules au sein d'un tissu ou d'un organe. Ces cellules cancéreuses sont issues d'une mutation leur permettant de se diviser indéfiniment, et sur lesquelles l'organisme n'a plus aucun contrôle. Elles forment des amas appelés tumeur, mais peuvent également migrer dans d'autres zones de l'organisme lorsque la maladie a atteint un stade avancé, formant des métastases difficiles à traiter. C'est pourquoi le diagnostic du cancer doit être le plus précoce possible.

3.1. Le cancer de la prostate

Le cancer de la prostate, apparaissant majoritairement chez l'homme de plus de cinquante ans, est le cancer le plus fréquent de l'individu masculin. En 2005, le nombre de nouveau cas en France était estimé à plus de 62 000, soit 34% de l'ensemble des cancers. Ce cancer est également l'un des plus meurtriers en nombre, puisqu'il était en 2005 la cause de 9 202 décès. Ce nombre le classe au deuxième rang des décès des hommes par cancer, et au quatrième rang pour l'ensemble de la population.¹⁰⁴ Ce cancer représente donc un problème majeur de santé publique.

Un cancer de la prostate peut être suspecté en raison d'un taux anormalement élevé de PSA (Prostate Specific Antigen) dans le sérum d'un patient, ou après un toucher rectal révélant une anomalie. Actuellement, l'unique moyen de confirmer ce diagnostic et de distinguer les tumeurs bénignes des cancers agressifs consiste en une biopsie de la prostate. Cependant cet acte est invasif, et sa fiabilité est limitée par l'erreur d'échantillonnage. De plus, ces méthodes de diagnostic révèlent souvent la tumeur maligne à un stade avancé, après que celle-ci ait formé des métastases.

Dans ce contexte, il est important de rechercher de nouveaux outils de diagnostic permettant de détecter à la fois les tumeurs primaires et les métastases à des stades précoces d'évolution.

Les nano-sondes multifonctionnelles sont des outils prometteurs pour la détection précoce du cancer, en fournissant par imagerie une vue globale de l'étendue de la tumeur, et en dévoilant les lésions métastatiques. Cependant, il faut pour cela pouvoir contrôler la

répartition de ces outils dans le corps. En effet, la détection spécifique d'un organe ou d'un type de tissu particulier, comme une tumeur par exemple, requiert une augmentation locale de la concentration en marqueurs, afin de différencier la zone d'intérêt des autres tissus. Cet enrichissement local est possible grâce au ciblage, qui peut être passif ou actif.

3.2. Vectorisation et ciblage: principes

Que ce soit dans le cas du ciblage passif ou du ciblage actif, les deux mécanismes nécessitent un temps de circulation des marqueurs dans le corps suffisant pour qu'un enrichissement puisse se faire avant que les nanoparticules ne soient éliminées de l'organisme. En effet, la probabilité qu'une particule soit amenée à la zone d'intérêt et y réside augmente avec la durée de circulation. On constate ici l'importance de la fonctionnalisation de surface apportant de la furtivité, abordée précédemment, qui permet justement d'augmenter le temps de circulation des nano-sondes dans le compartiment sanguin.

3.2.1. Ciblage passif

Les tumeurs ont la capacité de susciter une angiogenèse anormalement élevée, c'est-à-dire une croissance anarchique de vaisseaux sanguins, ce qui permet d'alimenter les cellules tumorales en nutriments et oxygène au cours de leurs multiplications. La genèse rapide et imparfaite de ces nouveaux vaisseaux provoque de nombreux défauts, apparaissant sous forme de trous allant de 100 nm à 2 µm selon le type de tumeur. Par ces défauts peuvent fuir les objets de grande taille, comme les macromolécules, les lysosomes et les nanoparticules.¹⁰⁵ En l'absence d'un système lymphatique pleinement fonctionnel au niveau de la tumeur, l'évacuation de ces objets est lente. La combinaison de ces deux phénomènes engendre un effet de concentration des gros objets au niveau des tumeurs, appelé effet EPR (Enhanced Permeability and Retention). De cet effet EPR découle directement le ciblage passif des nanoparticules, leur permettant de se concentrer spontanément et de manière passive dans les zones tumorales (**Figure 24**).

Cependant, ce ciblage passif s'avère parfois insuffisant pour obtenir un effet de concentration suffisant dans les tumeurs. En effet, le degré de vascularisation des tumeurs varie selon le type et le stade de développement.¹⁰⁶ Le recours à un ciblage actif devient alors

nécessaire, en opérant une fonctionnalisation de la surface des nanoparticules à l'aide de vecteurs spécifiques des cellules cibles.

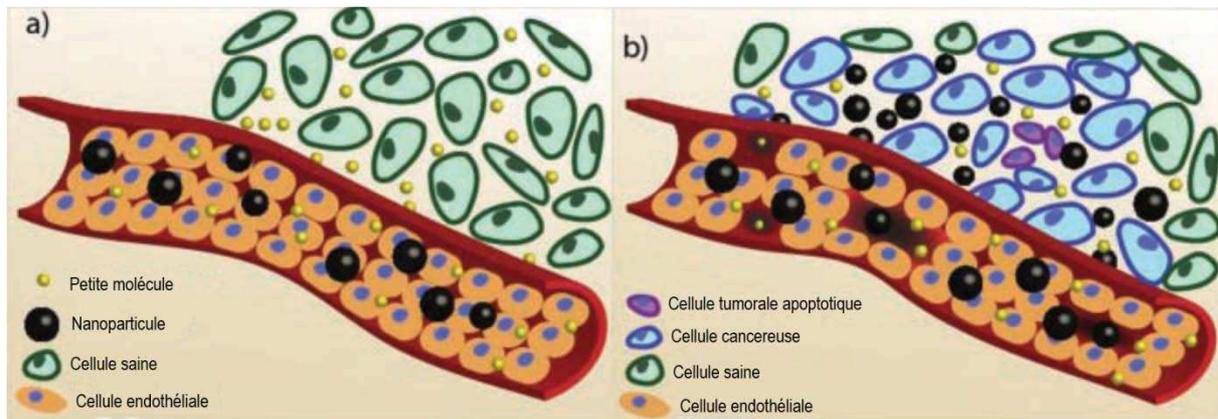


Figure 24 : Illustration de l'effet EPR. a) Dans les tissus sains, seules les petites molécules traversent la paroi des vaisseaux. b) Dans les tumeurs, les nanoparticules peuvent diffuser et se concentrer à l'intérieur des tissus grâce aux fuites dans les vaisseaux sanguins.¹⁰⁵

3.2.2. Ciblage actif

Ce ciblage actif repose sur des interactions entre ligand et récepteur, le ligand étant fixé à la surface de la nanoparticule et le récepteur un marqueur spécifique situé à la surface des cellules tumorales, conduisant souvent à l'internalisation de la nanoparticule. Pour que cette interaction soit suffisante pour conduire à une reconnaissance spécifique et une internalisation efficace, ce marqueur spécifique doit être largement surexprimé sur les cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines (10^4 à 10^5 par cellule).²

La littérature mentionne une large diversité de ces ligands, également désignés sous le nom de vecteurs. Ceux-ci peuvent être des protéines (principalement des anticorps), des peptides, des courtes chaînes d'acides nucléiques (aptamères), des petites molécules telles que l'acide folique ou encore des sucres ou des vitamines.²

Le choix du vecteur est dicté par sa spécificité et son affinité avec le récepteur cible. En effet, un manque de spécificité envers la cible induira le marquage de cellules non-ciblées, via des interactions entre le vecteur et des récepteurs semblables au récepteur ciblé. Dans le cas d'une affinité insuffisante avec le marqueur ciblé, le vecteur n'aura pas un effet suffisant pour que le ciblage se ressente au niveau de la répartition des nanoparticules dans l'organisme.

Les vecteurs sont greffés à la surface des nanoparticules, afin de modifier la répartition des nanoparticules dans les tissus. Cependant, ce greffage a plusieurs conséquences sur le comportement de la nano-sonde. D'une part, l'ajout de ces ligands à la surface des nanoparticules favorise leur phagocytose par les macrophages, diminuant leur durée de circulation dans l'organisme.¹⁰⁷ Il est donc important d'ajouter à la surface de ces nanoparticules des agents permettant d'augmenter leur furtivité, comme il a été décrit précédemment. D'autre part, le greffage du vecteur directement à la surface de la nanoparticule induit une diminution importante de l'affinité entre le ligand et sa cible. Cette perte d'affinité, due à la faible liberté de mouvement du ligand en raison de l'inertie de la nanoparticule, diminue énormément la probabilité d'une bonne interaction entre le ligand et sa cible. Ce phénomène peut cependant être compensé par l'introduction d'un bras espaceur de longueur suffisante entre la nanoparticule et le ligand. La flexibilité du bras espaceur permet alors d'apporter au ligand une liberté de mouvement suffisante pour lui permettre d'interagir avec la cible dans une conformation adéquate, maximisant les interactions. Un espaceur particulièrement utilisé est le polyéthylène glycol (PEG), qui permet également d'accroître la biocompatibilité des nanoparticules.

Les ligands ainsi placés aux extrémités des chaînes PEG évoluent à la surface de la couche de furtivité et sont pleinement à même d'interagir avec les marqueurs spécifiques des cellules tumorales ciblées (**Figure 25**).

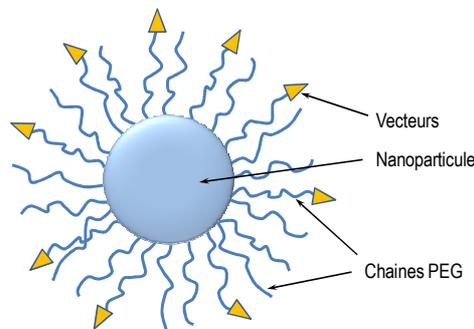


Figure 25 : Représentation d'une nanoparticule vectorisée pour le ciblage actif.

Une différenciation va alors s'opérer, par le biais de ces ligands, entre les cellules ne portant pas le marqueur cible et celles munies du récepteur visé, sur lesquelles les nanoparticules vont se concentrer et permettre leur détection spécifique (**Figure 26**).

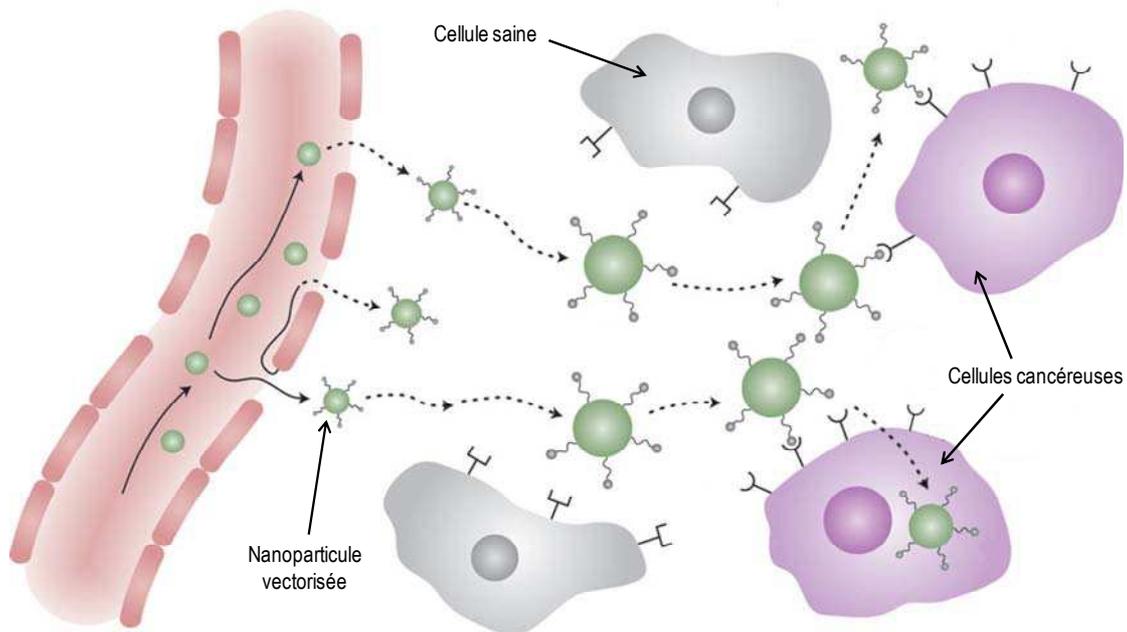


Figure 26 : Représentation du ciblage spécifique de cellules cancéreuses : les nanoparticules quittent le compartiment sanguin par les fuites des vaisseaux, puis diffusent dans les tissus, en ignorant les cellules non-ciblées, jusqu'à se lier à un récepteur ciblé. Cette interaction entre ligand vecteur et récepteur cible peut ensuite conduire à l'internalisation de la nanoparticule par la cellule porteuse du récepteur spécifique.¹⁰⁸

3.3. La PSMA, une cible de choix

Dans le cas du cancer de la prostate, il a été montré qu'une protéine membranaire, la PSMA (Prostate Specific Membrane Antigen), était surexprimée de façon significative chez les cellules tumorales prostatiques. Cette surexpression est importante en comparaison des tissus normaux dans lesquelles résident ces tumeurs et leurs métastases, puisqu'elle peut atteindre un facteur 1000.¹⁰⁹ De plus, en dehors de certaines zones du cerveau, cette protéine est rencontrée dans les organes à des taux toujours inférieurs à 10% de ceux d'une prostate normale.¹¹⁰ Enfin, la PSMA est sujette à l'internalisation, et cette capacité d'endocytose est fortement renforcée par la formation de complexe ligand-PSMA.¹¹¹ Ceci représente un avantage conséquent, puisque cette endocytose peut conduire à l'internalisation des nano-sondes dans les cellules ciblées.

Cette protéine est également surexprimée dans les vaisseaux sanguins de la néo-vascularisation de la plupart des tumeurs solides, ce qui n'est pas le cas pour les vaisseaux situés dans les tissus normaux.¹¹²

Ainsi la surexpression de cette protéine, sa localisation membranaire facilement accessible et sa capacité à l'internalisation en font une cible de choix pour la détection spécifique du cancer de la prostate et des tumeurs solides non-prostatiques.

La PSMA, également appelée GCPII (Glutamate carboxypeptidase II), est une protéine membranaire d'environ 100 000 Dalton, constituée de 750 acides aminés. La plus grande partie de cette protéine est extracellulaire (des acides aminés 44 à 750).

L'appellation « glutamate carboxypeptidase » GCPII provient de l'activité enzymatique que la PSMA manifeste lorsqu'elle se trouve sous forme dimérique. En effet, cette métalloprotéine à zinc possède deux activités enzymatiques. La première est l'hydrolyse du NAAG (N-acétyl aspartylglutamate), la seconde est l'hydrolyse du folate poly- γ -glutamate. Ces deux activités aboutissent au clivage du glutamate terminal (**Schéma 12**).

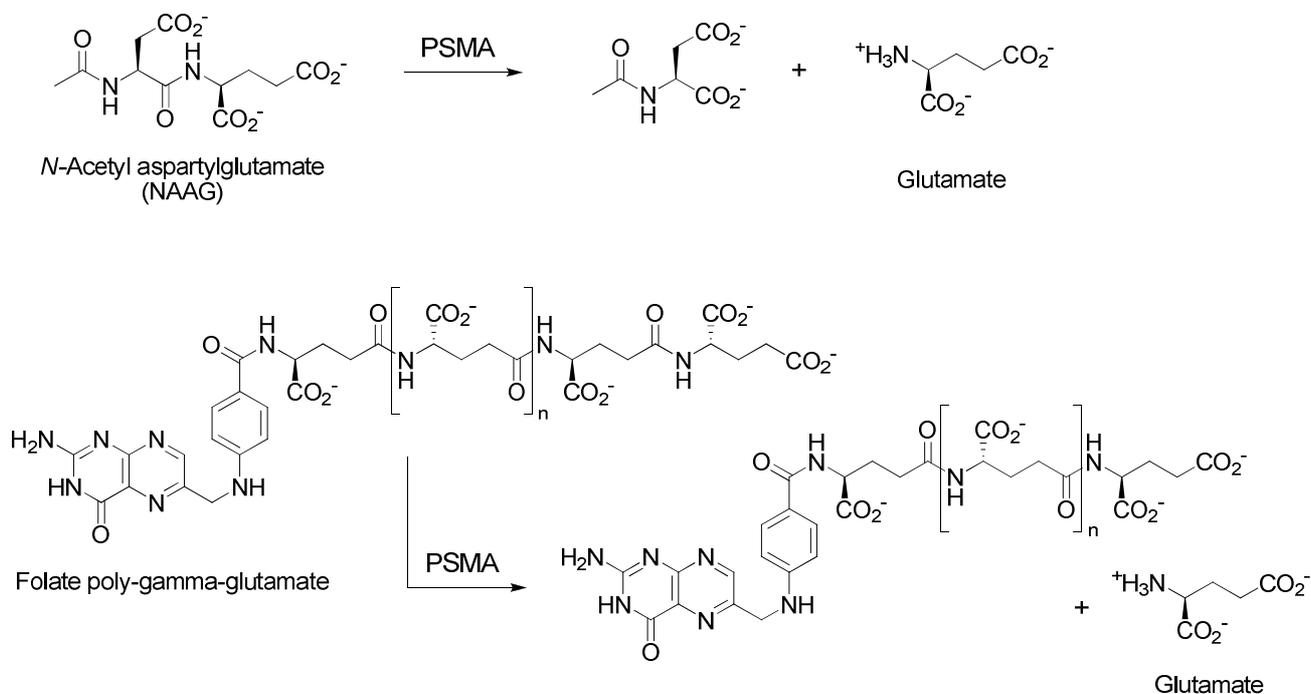


Schéma 12 : Activités enzymatiques de la PSMA.

3.4. Ciblage de la PSMA

Le ciblage de la PSMA requiert des ligands ayant une forte affinité pour cette protéine.

Une des approches possibles consiste à utiliser des anticorps, protéines possédant une forte affinité pour un antigène spécifique, avec lequel elles forment un complexe. Des

anticorps anti-PSMA ont été largement utilisés pour étudier sa localisation dans différents tissus ainsi que pour quantifier la surexpression de cette protéine.¹¹²

Le Capromab, anticorps anti-PSMA issu de la souris, a été utilisé pour le marquage de cellules tumorales de la prostate, après greffage d'un complexe d'indium-111 radioactif.¹¹³ Ce composé est actuellement commercialisé sous le nom de Prostascint[®] et est employé pour la détection *in vivo* du cancer de la prostate par scintigraphie.

En suivant la même stratégie, un complexe d'indium-111 a été greffé à un autre anticorps anti-PSMA, le J591 (**Figure 27**). Ce composé ¹¹¹In-J591 s'est révélé particulièrement efficace dans la détection des tumeurs solides non-prostatiques, dont le système vasculaire surexprime la PSMA.¹¹⁴

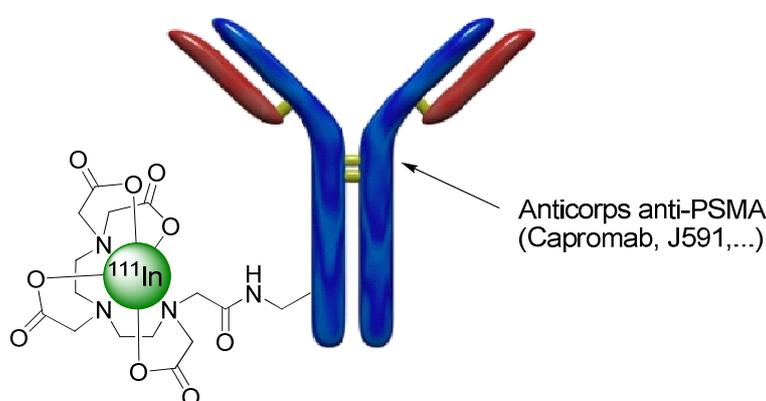


Figure 27 : Complexe d'indium-111 vectorisé par un anticorps anti-PSMA, pour la détection de cancer par scintigraphie.

Outre l'utilisation d'anticorps anti-PSMA, une stratégie couramment utilisée pour le ciblage consiste à utiliser des analogues du substrat naturel de la protéine ciblée, qui par définition possède une forte affinité pour celle-ci.

En appliquant cette stratégie, plusieurs analogues du NAAG ont été synthétisés pour le ciblage spécifique de la PSMA (**Figure 28**). On remarquera qu'un lien urée est utilisé en lieu et place de la liaison amide, afin d'empêcher l'hydrolyse de l'analogue par la PSMA. Ainsi, l'analogue interagit avec le site actif de la protéine sans subir l'hydrolyse qui aurait conduit à sa dégradation et à son expulsion du site actif. Ces molécules sont dites inhibitrices, puisqu'elles occupent le site actif de la protéine sans en être substrat, bloquant ainsi son activité catalytique.

Ces inhibiteurs possèdent une partie commune avec le substrat naturel. Cette partie (signalée en vert et bleu sur la figure) correspond à celle interagissant avec le site actif de la protéine et est par conséquent à l'origine de l'affinité entre le NAAG et la PSMA.

La vectorisation vers la PSMA a également été utilisée à des fins thérapeutiques. A titre d'exemple, ce même vecteur DUPA a permis l'acheminement vers les cellules tumorales de principes actifs ayant un effet cytotoxique, dans le but de les concentrer dans la zone cancéreuse et de limiter leurs effets secondaires. Cette concentration locale en principe actif est induite par le greffage covalent de l'inhibiteur avec ce dernier.¹¹⁷ L'inhibiteur DUPA a également été utilisé pour le transport de fragments d'ARN interférent, qui ont pour but d'inhiber la production de certaines protéines, pouvant ainsi induire la mort cellulaire. Le greffage d'un fluorophore à l'extrémité de la chaîne d'ARN a permis de suivre la répartition de ces molécules dans l'organisme, confirmant un important effet de concentration dans les tissus tumoraux prostatiques.¹¹⁸

Cette vectorisation vers la PSMA a également été appliquée à des nanoparticules pour augmenter leur effet thérapeutique.

Un aptamère, courte chaîne d'acides nucléiques, spécifique de la PSMA, peut ainsi être greffé à la surface de nanoparticules polymères incorporant des principes actifs. Sur ce principe, des nanoparticules incorporant du cis-platine, un composé cytotoxique, ont montré une cytotoxicité sur des lignées cellulaires de cancers de la prostate.¹¹⁹ Des nanoparticules vectorisées par le même aptamère et incorporant du docetaxel, composé aux propriétés antimitotiques, ont abouti à des résultats remarquables dans le traitement de tumeurs de la prostate développées chez la souris (**Figure 30**).¹²⁰

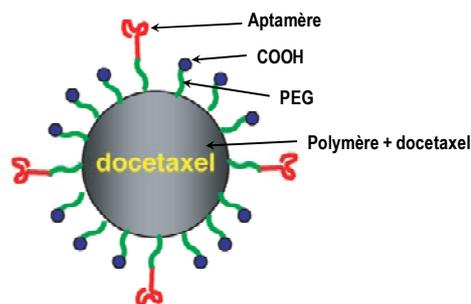


Figure 30 : Nanoparticule de polymère incorporant du docetaxel et modifiées en surface par des aptamères spécifiques de la PSMA.¹²⁰

Ces résultats mettent en avant d'une part le bénéfice important de l'utilisation de nanoparticules par rapport au docetaxel seul, et soulignent d'autre part l'apport important de la vectorisation, doublant la probabilité de guérison (**Figure 31**).

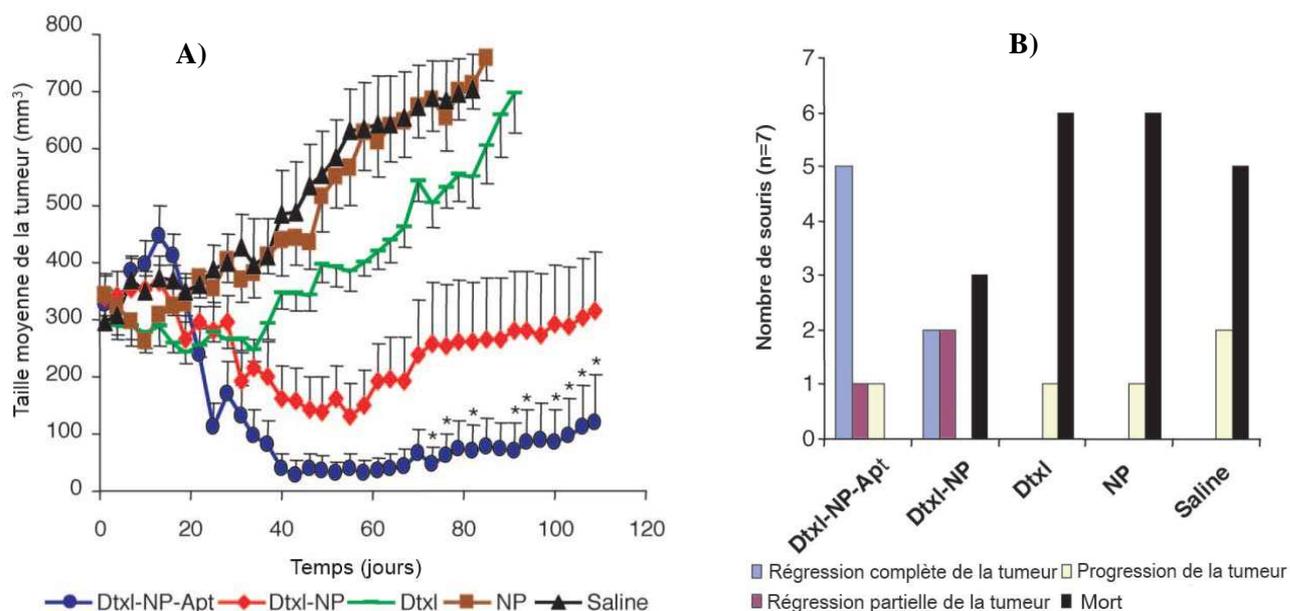


Figure 31 : **A)** Evolution de la taille des tumeurs après une injection intratumorale : de solution saline (Saline), de nanoparticules polymères sans principe actif (NP), d’une émulsion de docetaxel (Dtxl), de nanoparticules incorporant du docetaxel (Dtxl-NP) ou de nanoparticules incorporant du docetaxel et vectorisées par les aptamères (Dtxl-NP-Apt). **B)** Répartition des souris à la fin de l’étude (109 jours après l’injection), en fonction de l’évolution de la tumeur.¹²⁰

Des nanoparticules contenant de l’epigallocatechine gallate (EGCG), aux propriétés anti cancéreuses, ont également montré un comportement différent après le greffage à leur surface d’un analogue du NAAG, inhibiteur de la PSMA (**Figure 32**).¹²¹ En effet, la présence de ce vecteur (DCL) exacerbe la cytotoxicité des nanoparticules vis-à-vis des cellules tumorales de la prostate, alors que cette cytotoxicité demeure faible sur une lignée cellulaire saine (**Figure 33**). Ce vecteur DCL semble favoriser l’endocytose des nanoparticules dans les cellules surexprimant la PSMA. Le principe actif est alors relargué directement dans le cytoplasme, augmentant la dose reçue par la cellule et ainsi l’effet cytotoxique.

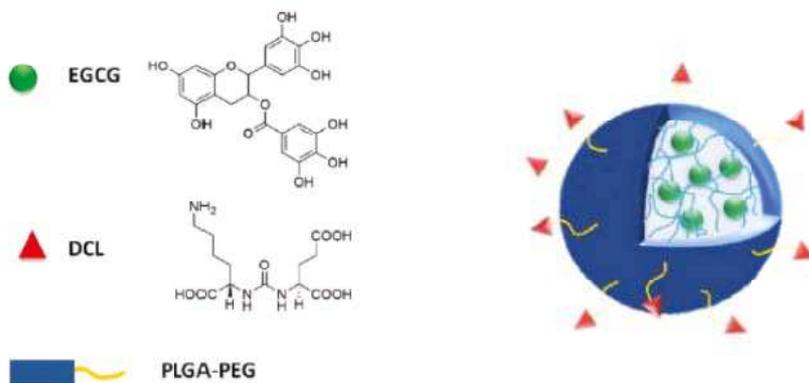


Figure 32 : Nanoparticules de polymère incorporant de l’EGCG, et vectorisées par un analogue du NAAG.¹²¹

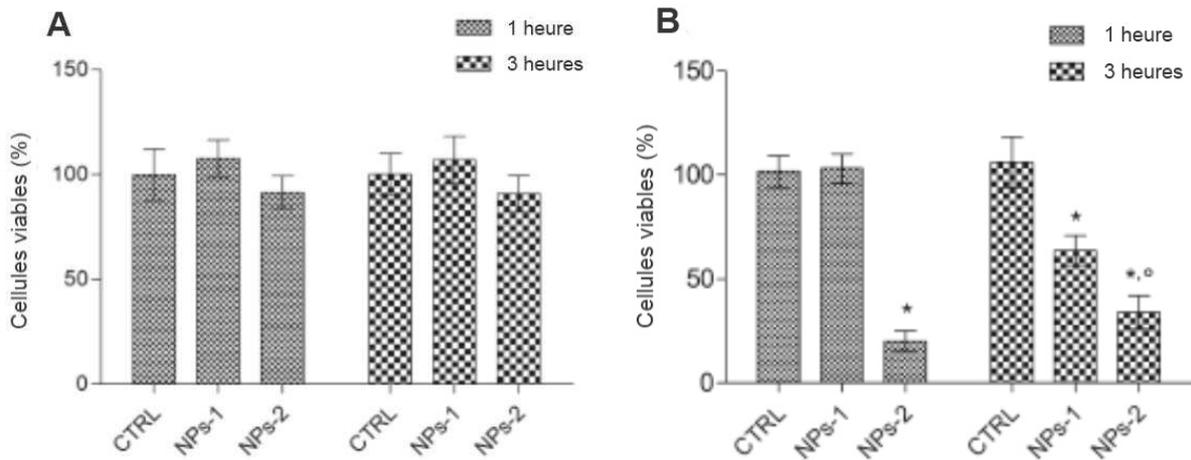


Figure 33 : Fractions de cellules survivantes, 48h après une exposition à des nanoparticules durant 1h et 3h (CTRL : contrôle, pas de nanoparticule ; NPs-1 : nanoparticules incorporant de l'EGCG ; NPs-2 : nanoparticules incorporant de l'EGCG et vectorisées DCL). A) Cellules endothéliales normales. B) Cellules cancéreuses prostatiques.¹²¹

3.5. Conclusion

Le ciblage de la PSMA pour la détection précoce et le traitement du cancer de la prostate, ainsi que des tumeurs solides non-prostatiques, apparaît comme étant une stratégie prometteuse. En effet, les résultats encourageants obtenus avec divers vecteurs confirment l'influence du ciblage sur la répartition des objets (traceurs radioactifs, molécules actives, nanoparticules...) dans l'organisme, et de nombreux cas démontrent un accroissement de l'internalisation de ces objets au sein des cellules visées.

De plus, comme l'ont montré Farokhzad *et al.*¹²⁰ ainsi que Sanna *et al.*¹²¹, la combinaison de l'utilisation de nanoparticules et du ciblage permet d'augmenter considérablement l'effet thérapeutique d'un principe actif.

Description du projet

Considérant les éléments présentés dans l'étude bibliographique, il apparaît clairement que la détection et la thérapie de cancers à l'aide de nanoparticules vectorisées représentent un champ d'étude prometteur. Les nanohybrides incorporant des complexes de lanthanide constituent des objets à fort potentiel pour la détection *in vivo* par fluorescence de signaux caractéristiques de ces pathologies. Comme nous l'avons vu, ces hybrides combinent la réponse lumineuse caractéristique des complexes de lanthanide, la stabilité thermique et mécanique de la silice, ainsi que sa résistance en milieu biologique.

1. Travaux précédents

Le groupe d'Arnaud Gautier (groupe 'Chélates' de l'ICCF) au sein de laquelle a été effectuée une partie du travail présenté dans ce mémoire, a mis au point une voie de synthèse de nouveaux ligands dérivés de l'acide dipicolinique.¹²² Cette voie de synthèse par chimie click a permis l'obtention de plusieurs acides 4-triazolyl dipicoliniques (**Schéma 13**).

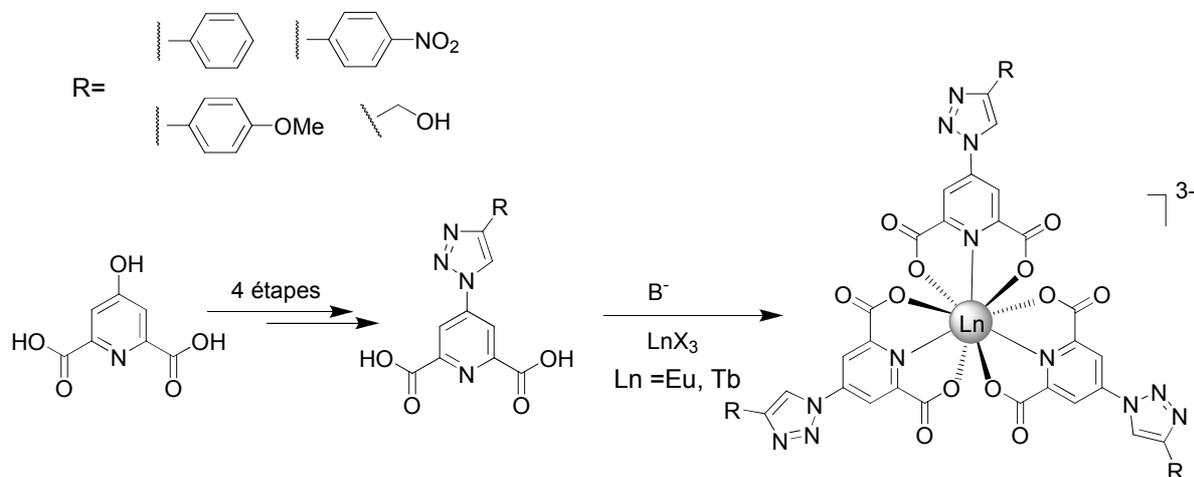


Schéma 13 : Acides 4-triazolyl dipicoliniques obtenus par chimie click, et complexes de lanthanide correspondants.

La synthèse de ces diacides a été réalisée très efficacement pour différents groupements R. Les complexes d'euprimum(III) et de terbium(III) obtenus à partir de ces diacides ont montré d'excellentes propriétés de luminescence, ainsi que des résultats très prometteurs en

absorption bi- et tri-photonique. De plus, ces propriétés photophysiques se sont révélées être modulées selon la nature du groupement R greffé en position 4 du triazole.

L'un de ces complexes a été modifié par l'ajout de groupements alcoxysilanes, et greffé à la surface de nanoparticules de silice.¹²³ Les nanohybrides cœur-coquille obtenus ont présenté de très bonnes propriétés de luminescence, aussi bien en optique linéaire qu'en absorption biphotonique. Néanmoins, ces complexes ne sont pas stables en milieux aqueux.

Par ailleurs, plusieurs études ont montré que le ciblage des cellules tumorales de la prostate pouvait être assuré par le greffage de ligands à la surface de ces dernières.^{120,121} Certains analogues du NAAG possèdent une forte affinité pour la PSMA, et se sont révélés efficaces pour le ciblage de tumeurs prostatiques.^{115,121,124}

2. Présentation du projet

Nous basant sur ces travaux, nous avons envisagé la synthèse d'une nano-sonde hybride luminescente permettant la détection de cellules tumorales prostatiques. Cette nano-sonde sera constituée d'une nanoparticule hybride incorporant des complexes de lanthanide luminescents, et portera à sa surface des vecteurs permettant le ciblage spécifique de ces cellules. Les vecteurs seront séparés de la nanoparticule au moyen d'un bras espaceur de type polyéthylène glycol permettant d'augmenter la biocompatibilité de la nano-sonde et de maximiser son efficacité (**Figure 34**).

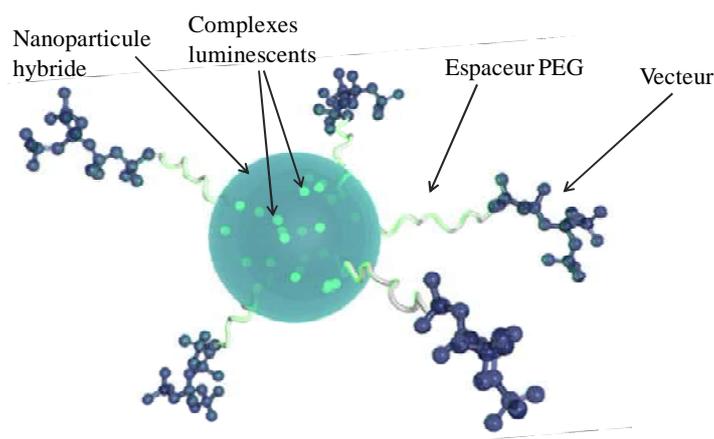


Figure 34 : Représentation de la nano-sonde envisagée.

Ce projet se décompose en trois parties. Nous nous intéresserons dans un premier temps à la synthèse par chimie click d'une bibliothèque de ligands dérivés de l'acide dipicolinique,

permettant l'introduction d'une large gamme de groupements R en position 4 du triazole. Les propriétés optiques des complexes d'euprium(III) et de terbium(III) formés à partir de ces diacides seront ensuite évaluées afin d'étudier l'influence du groupement R. L'étude de ces caractéristiques optiques permettra également de sélectionner les complexes possédant les meilleures propriétés de luminescence, en prenant en compte les rendements quantiques, les durées des déclins de luminescence et les longueurs d'onde d'excitation utilisables.

La seconde étape de ce projet consistera en la mise au point de la synthèse de nanohybrides silice-complexes de lanthanide par voie sol-gel, ainsi qu'en celle des procédés permettant leur fonctionnalisation de surface. Les propriétés optiques de ces nanohybrides seront ensuite étudiées, afin de s'assurer que celles des complexes de lanthanide sont conservées après incorporation dans la matrice de silice. La cytotoxicité de ces nanohybrides sera également évaluée, en vue de leur potentielle utilisation *in-vivo*.

Une sélection de candidats vecteurs pour le ciblage de la PSMA sera effectuée parmi plusieurs structures analogues du NAAG en fonction de leur affinité, déterminées par modélisation moléculaire (**Figure 35**). Les candidats vecteurs sélectionnés seront synthétisés et leur activité comparée à celle d'un vecteur de référence, le DCL, dont l'efficacité dans le ciblage de la PSMA est avérée.¹²¹ Les vecteurs seront ensuite greffés à la surface des nanoparticules, de façon à aboutir aux nano-sondes désirées.

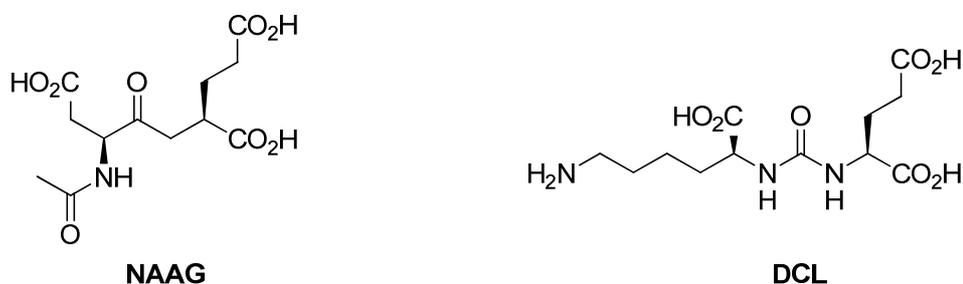


Figure 35 : Structure du NAAG et du DCL, vecteur de référence.

Enfin, l'innocuité ainsi que la biodistribution de ces nano-sondes dans les différents organes seront examinées chez le petit animal, avant que ne soit étudiés le ciblage et la détection de tumeurs prostatiques.

**Chapitre II. Synthèse de ligands dérivés de
l'acide dipicolinique, étude des propriétés
de luminescence des complexes d'Eu(III) et
Tb(III) correspondants**

La première partie de ce travail a été consacrée à l'élaboration de complexes d'euprium(III) et de terbium(III) synthétisés au départ de ligands de type acide 4-triazolyl dipicolinique, et à l'étude de leurs propriétés de luminescence.

Pour ce faire, nous avons dans un premier temps réalisé la synthèse d'une large gamme de ces ligands par une voie dite de chimie click.

Cette bibliothèque de ligands permettra d'une part l'étude de l'influence du ligand sur les propriétés optiques du complexe de lanthanide correspondant, mais également la sélection, parmi un large choix de complexes, du candidat possédant les meilleures propriétés de luminescence afin de l'incorporer dans les nanoparticules.

1. Synthèse des ligands

La stratégie générale adoptée pour la synthèse de ces ligands a été développée précédemment par l'équipe SEESIB de l'ICCF et permet d'accéder rapidement à une large gamme d'acides 4-triazolyl-dipicoliniques.¹²² Cette synthèse est réalisée en accord avec les principes de chimie click, et implique notamment une réaction de CuAAC – *Copper (I) catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition* (**Schéma 14**).

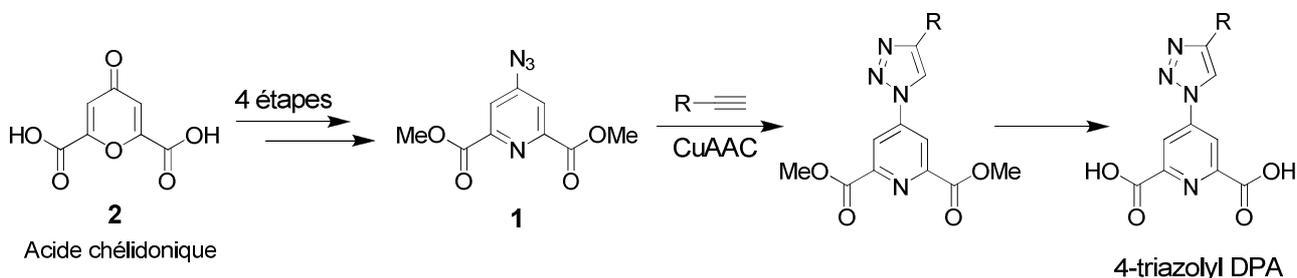


Schéma 14 : Voie de synthèse pour l'obtention d'acides 4-triazolyl-dipicoliniques (4-triazolyl DPA).

La chimie click vise à obtenir des molécules faciles à obtenir ("All searches must be restricted to molecules that are easy to make").¹²⁵ Barry Sharpless définit la chimie click en 2001 comme un ensemble de réactions répondant à des critères précis. Ainsi, les réactions « click » sont basées sur l'économie d'atome et sur l'assemblage sélectif de blocs pré-synthétisés. Ces réactions sont fortement exergoniques, menant de façon irréversible à la formation d'un seul produit. Elles doivent être applicables à une large gamme de composés et ne générer qu'un seul composé ou régioisomère (l'obtention d'un mélange d'énantiomères étant accepté), et ceci avec un rendement élevé. Les conditions réactionnelles doivent également être simples à mettre en œuvre, et les produits de départ facilement accessibles.

Dans le but de limiter l'impact environnemental de cette chimie, les réactions répondant aux caractéristiques de la chimie click doivent pouvoir être réalisées sans solvant, ou dans des solvants bénins, renouvelables et faciles à éliminer.

Enfin, le produit final doit être isolable par des méthodes ne nécessitant pas de purifications chromatographiques (extrêmement coûteuses en solvant et en phase stationnaire) telles que la recristallisation ou la distillation.

Parmi les réactions répondant aux exigences de la chimie click, une des plus connues et des plus utilisées est certainement la réaction CuAAC, qui est la variante catalysée de la cycloaddition thermique décrite par Huisgen entre un alcyne et un azoture conduisant à des 1,2,3-triazoles.¹²⁶ La cycloaddition de Huisgen n'est cependant pas régiosélective, et nécessite l'utilisation d'alcynes appauvris en électrons de façon à augmenter leur réactivité.

Les propriétés catalytiques du cuivre(I) permettent la synthèse à température ambiante de 1,2,3-triazoles disubstitués en position 1 et 4, à partir d'alcynes vrais et d'azotures (**Schéma 15**).

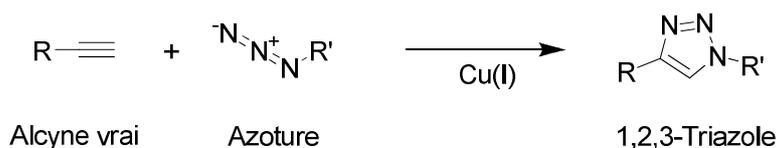


Schéma 15 : Schéma général de la réaction CuAAC

Le mécanisme de cette réaction a récemment été élucidé par Fokin *et al.*¹²⁷ Il fait intervenir deux centres cuivreux (**Schéma 16**). L'acétylénique forme tout d'abord un complexe à deux cuivres, l'un étant lié par une liaison σ , l'autre par une liaison π . Le cuivre lié par une liaison π forme ensuite un complexe avec l'azoture organique, activant l'attaque nucléophile de l'azote en position 3 de l'azoture par le carbone β de l'acétylénique pour former une première liaison C-N. L'attaque nucléophile de l'azote 1 sur le carbone α de l'acétylénique permet par la suite de fermer le cycle, avec libération d'un cuivre. Le complexe résultant subit ensuite une élimination réductrice libérant le catalyseur et le 1,2,3-triazole désiré.

Cette réaction de CuAAC est sélective et permet d'obtenir les composés souhaités avec des rendements élevés.

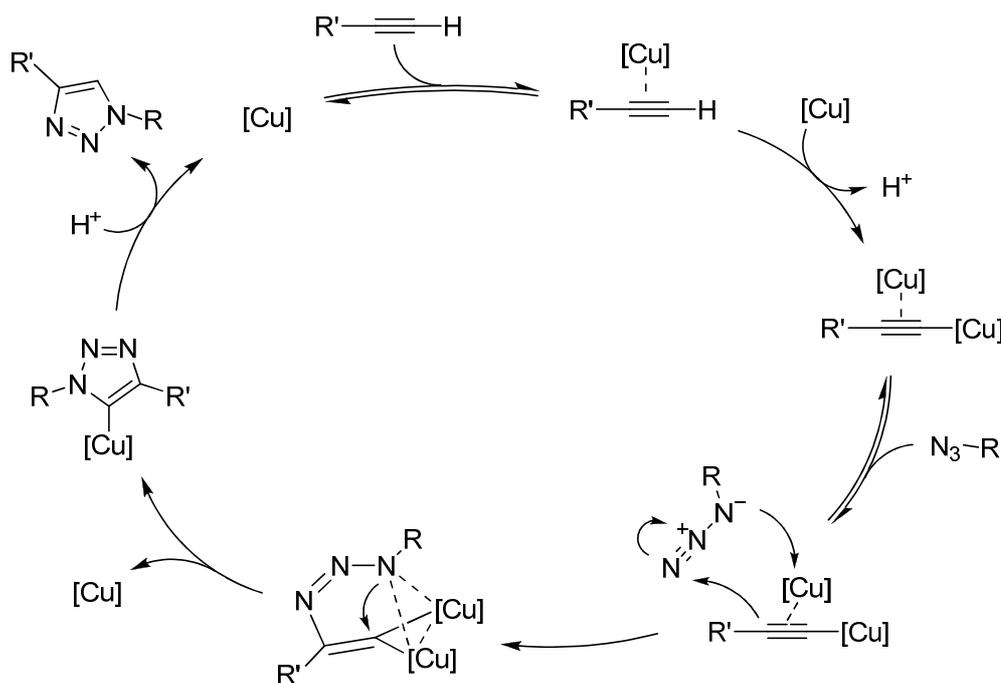


Schéma 16 : Mécanisme de la réaction CuAAC.

1.1. Plateforme azoture et choix des substituants

1.1.1. Synthèse de la plateforme azoture

La voie de synthèse présentée précédemment nécessite tout d'abord l'élaboration d'une plateforme azoture, le 4-azidopyridine-2,6-dicarboxylate de diméthyle **1**, à partir de laquelle la synthèse diverge vers les différents ligands.

Cette plateforme azoture **1** est synthétisée à partir d'acide chélidonique, suivant un schéma réactionnel nécessitant trois étapes (Schéma 17). L'acide chélidonique **2** est tout d'abord converti en acide chélidamique **3** par réaction avec l'ammoniaque, d'après le protocole décrit par Yin *et al.*¹²⁸ Le composé **3** précipite après acidification du milieu réactionnel, et est isolé pur par filtration. Dans le chlorure de thionyle au reflux, en présence de diméthylformamide comme catalyseur, l'acide chélidamique permet d'accéder au dichlorure de 4-chloropyridine-2,6-dicarbonyle, qui réagit vivement avec le méthanol pour donner le 4-chloropyridine-2,6-dicarboxylate de diméthyle **4**. Le diester chloré **4** est purifié par recristallisation dans le méthanol. L'azoture **1** est ensuite obtenu en utilisant le protocole décrit dans la littérature.¹²⁹ La substitution nucléophile aromatique sur le composé chloré **4** est effectuée à l'aide d'un excès d'azoture de sodium dans le diméthylformamide, à 50°C. Le 4-

azidopyridine-2,6-dicarboxylate de diméthyle **1** est ensuite précipité par addition d'eau, puis est obtenu pur par filtration.

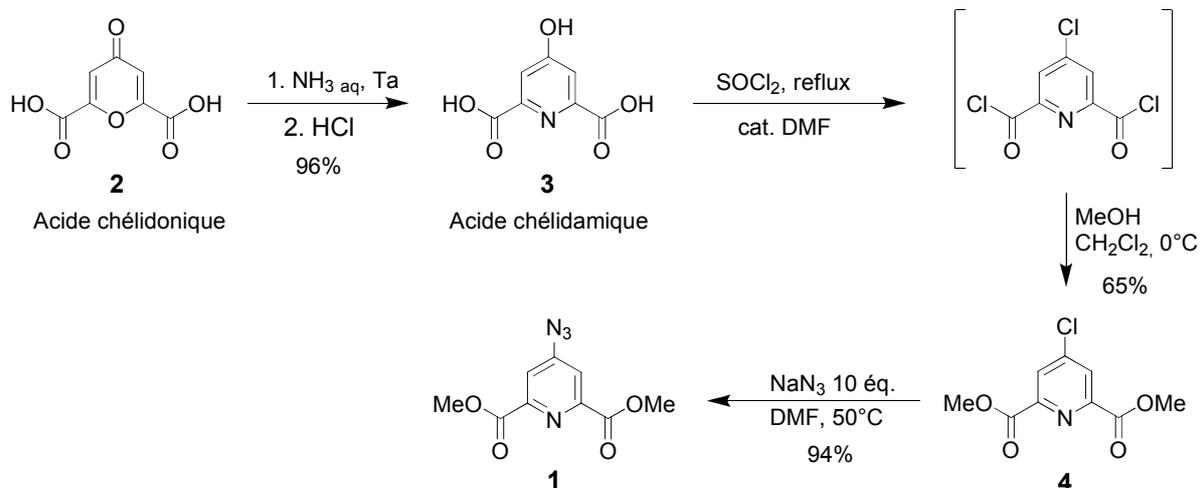


Schéma 17 : Synthèse du 4-azidopyridine-2,6-dicarboxylate de diméthyle **1** (réalisée sur 12 grammes au laboratoire).

Il est important de noter que la recrystallisation du diester chloré **4** constitue la seule étape de purification nécessaire, puisque tous les autres composés sont isolés purs par simple filtration. L'azoture **1** peut-être synthétisé à l'échelle multigrammes sans difficulté.¹²⁹ De plus, ce composé présente une stabilité remarquable en comparaison de celle d'azotures aromatiques.¹²⁶

L'acide chélidonique **2**, point de départ de cette voie de synthèse, est un composé commercial mais est malheureusement assez coûteux. Il peut cependant être aisément synthétisé à bas prix et en grande quantité au laboratoire, à partir d'acétone et d'oxalate de diéthyle, selon le protocole décrit par Howáth *et al.*¹³⁰ (**Schéma 18**).

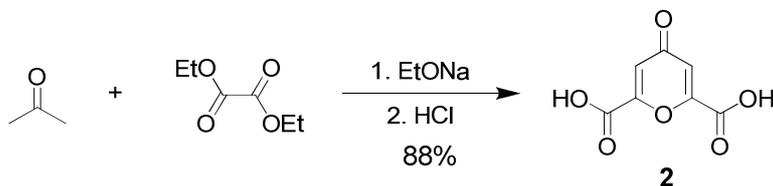


Schéma 18 : Synthèse de l'acide chélidonique **2** (réalisée sur 70 grammes au laboratoire).

Ainsi, l'ensemble de la synthèse permettant d'accéder à l'azoture **1** peut être réalisé à l'échelle multigrammes, sans aucune purification chromatographique, et à partir de composés facilement accessibles et bon marché. De plus, les rendements des différentes étapes sont

excellents, excepté pour la synthèse de la chloropyridine **4** (65%), en raison de la purification par recristallisation.

1.1.2. Choix des substituants

Le but de ces synthèses est d'aboutir à une bibliothèque de ligands possédant des systèmes π -conjugués différents, afin d'en étudier l'impact sur les propriétés optiques des ligands et des complexes de lanthanide correspondants. Pour cela, il est important d'opérer une sélection des substituants qui seront greffés sur l'acide dipicolinique par le biais du lien triazole formé par CuAAC. Ce choix se doit de comporter des substituants qui influenceront sur l'étendue du système π -conjugué, mais également sur sa densité électronique.

A cette fin, une large variété d'alcynes a été envisagée (**Figure 36**). Nous avons notamment sélectionné des composés aromatiques, qui permettront d'étendre la conjugaison au delà du triazole. Les noyaux aromatiques peuvent être substitués par des groupements donneurs ou attracteurs d'électrons, permettant de moduler la densité électronique du ligand. Des alcynes aromatiques polycycliques (naphtalène, biphenyle) ainsi que des alcynes hétéroaromatiques (thiophène, pyridine, imidazole) ont également été sélectionnés. Enfin, dans le but de former des complexes suffisamment solubles en milieu aqueux, des alcynes porteurs de groupements hydrophiles tels que des ammoniums et des hydroxyles ont également été inclus dans cette sélection.

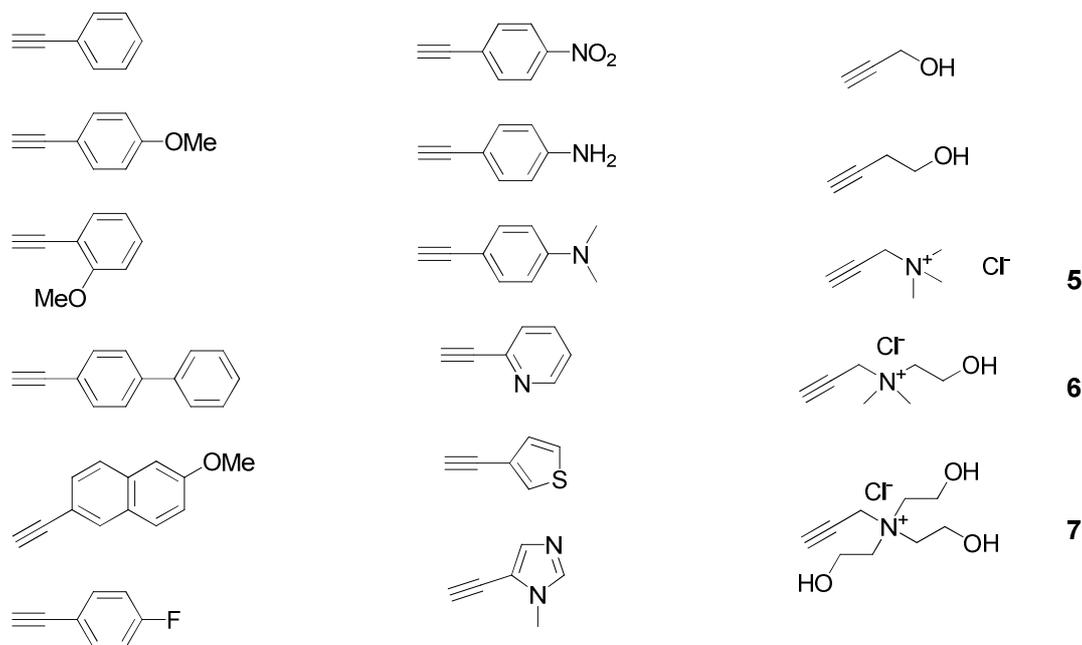


Figure 36 : Alcynes sélectionnés pour la synthèse de ligands de type acide 4-triazolyl dipicolinique.

Les alcynes **5**, **6** et **7**, non commerciaux, ont été synthétisés au départ du chlorure de propargyle, par substitution nucléophile au moyen de diverses amines tertiaires dans le toluène (**Schéma 19**).¹³¹ Le choix de ce solvant permet la précipitation des sels d'ammonium attendus au fur et à mesure de leur formation. Ces derniers sont isolés purs avec de bon rendement par filtration.

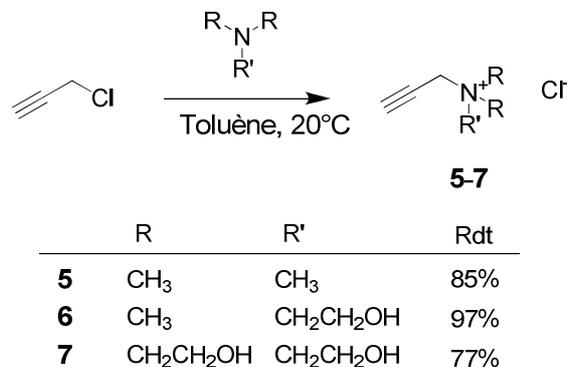


Schéma 19 : Synthèse des alcynes **5-7** à partir du chlorure de propargyle.

1.2. Cycloaddition alcyne-azoture

1.2.1. CuAAC

La cycloaddition alcyne-azoture catalysée par le cuivre(I) (CuAAC) permet la synthèse régiosélective de 1,2,3-triazoles disubstitués en position 1,4. Dans notre cas, cette cycloaddition sera effectuée entre la plateforme 4-azidopyridine-2,6-dicarboxylate de diméthyle **1** et les alcynes précédemment sélectionnés pour cette étude (**Schéma 20**).

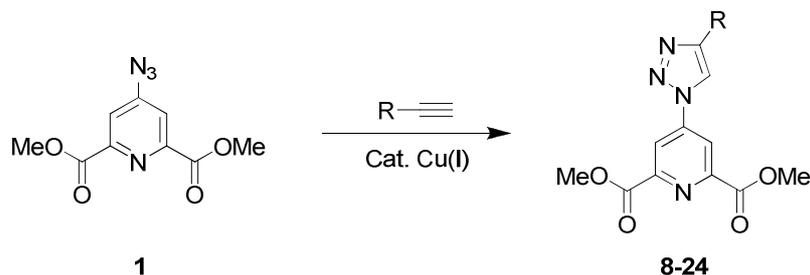


Schéma 20 : Réaction de CuAAC entre la plateforme azoture et les alcynes sélectionnés.

Cette réaction est, comme son nom l'indique, catalysée par le cuivre au degré d'oxydation +1. Le cuivre(I) est cependant instable et s'oxyde généralement de façon spontanée à l'air libre pour former du cuivre(II), dépourvu des propriétés catalytiques recherchées.

Une des stratégies pour obtenir le cuivre au degré d'oxydation souhaité consiste à ajouter à une solution de cuivre(II) un agent réducteur, tel que l'acide ascorbique, qui va permettre de réduire le cuivre(II) en cuivre(I) au cours de la réaction. Cette stratégie est très certainement la plus couramment utilisée.

Une autre stratégie consiste à utiliser pour catalyser la réaction CuAAC des composés organométalliques dans lesquels le cuivre se trouve au degré d'oxydation +1 de façon stable. C'est par exemple le cas des carbènes N-hétérocycliques (NHC) de cuivre(I). Un carbène, espèce comportant un carbone divalent, est généralement fortement réactif. Ce carbone divalent peut cependant être stabilisé par la présence d'hétéroatomes (principalement azote et soufre), comme c'est le cas pour les NHC. Le doublet libre de ces carbones divalent stables permet alors de former une liaison dative avec le cuivre I, stabilisant ce degré d'oxydation. La présence de groupement encombrant autour du carbène limite également l'oxydation du centre métallique.

Plusieurs exemples de Cu(I)-NHC sont connus pour catalyser la cycloaddition alcyne-azoture.^{129,132,133} Le cuivre(I) étant stabilisé dans ces composés, l'usage d'un réducteur sacrificiel devient alors inutile. Un de ces métallocarbènes, le [CuCl(SiMes)(4,7-dichloro-1,10-phénanthroline)] (**Figure 37**), mis au point et étudié au laboratoire, a montré une excellente efficacité pour cette catalyse.¹²⁹ L'ajout de la dichlorophénanthroline sur le carbène CuCl(SiMes), décrit par Nolan *et al.*,¹³³ permet d'une part d'augmenter la solubilité du NHC, notamment dans le méthanol, et affaiblit d'autre part la liaison Cu-Cl, augmentant ainsi l'activité catalytique de ce Cu(I)-NHC.

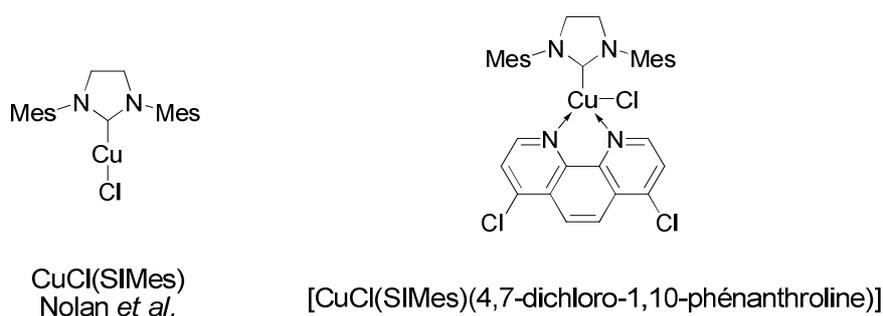


Figure 37 : Structure du métallocarbène utilisé pour la réaction de CuAAC, basé sur le métallocarbène CuCl(SiMes) de Nolan.

Ce Cu(I)-NHC a donc été utilisé pour réaliser la cycloaddition entre la plateforme azoture **1** et les alcynes sélectionnés, dans le méthanol à température ambiante et en condition 'open flask', permettant l'obtention efficace des triazoles correspondants qui précipitent

spontanément. Ces derniers sont isolés purs par filtration avec de bons rendements (66-98%) (**Tableau 8**).

Cependant, ce catalyseur s'est révélé inefficace pour catalyser la cycloaddition en présence d'alcynes dérivés de l'aniline, menant alors à la formation de nombreux produits non-identifiés. Un second système catalytique a donc été utilisé. Ce système est constitué de cuivre(II) complexé par de la tris(4-(3-hydroxypropyl)-1H-1,2,3-triazol-1-ylméthyl)amine (THPTA, **Figure 38**).¹³⁴ L'ajout d'acide ascorbique permet de réduire le cuivre(II) en cuivre(I) possédant les propriétés catalytiques requises. Ce système, utilisé dans le méthanol, nous a permis d'obtenir les diesters **15** et **16**, portant respectivement les groupements anilyle et diméthylanilyle, avec de très bons rendements (**Tableau 8**).

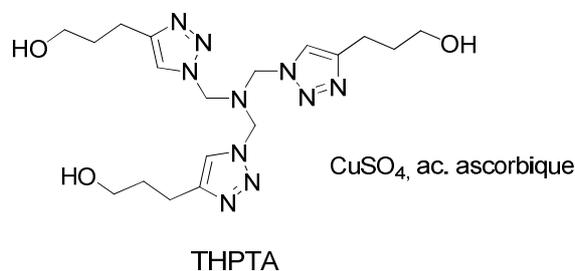
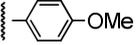
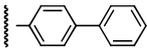
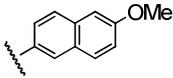
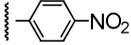
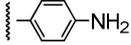
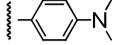
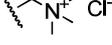
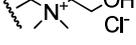
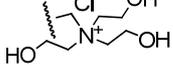


Figure 38 : Second système catalytique utilisé pour la CuAAC.

A titre comparatif, ce système THPTA/Cu⁺/acide ascorbique a également été utilisé pour reproduire des synthèses précédemment effectuées à l'aide du catalyseur Cu(I)-NHC, montrant des rendements tout à fait similaires (**Tableau 8**).

On notera également que dans le cas des diesters **17** et **19**, le cuivre issu du catalyseur, ou encore le catalyseur lui-même, est vraisemblablement complexé par la pyridine et par l'imidazole. Ceci se traduit en RMN ¹H par un net élargissement des pics correspondant aux protons de l'imidazole pour le composé **19**, et aux protons de la pyridine et du triazole pour le composé **17**. Un lavage avec une solution basique d'EDTA est alors nécessaire pour éliminer le cuivre complexé, et obtenir le diester pur.

Tableau 8 : Rendement de la CuAAC, selon le système catalytique utilisé.

Composés	-R	Rendement	
		Cu(I)-NHC 1 mol%	THPTA/Cu ⁺ 2.5 mol%
8		86%	89%
9		87%	82%
10		87%	91%
11		94%	90%
12		96%	
13		92%	
14		93%	95%
15		Dégradation	95%
16		Dégradation	91%
17		85%	
18		91%	
19		92%	
20		94%	95%
21		86%	
22		98%	
23		80%	
24		66%	

1.2.2. Cycloaddition thermique de Huisgen

Afin d'ajouter à la bibliothèque un ligand autre que les triazoles substitués uniquement en position 4 obtenus par CuAAC, nous nous sommes intéressés à la cycloaddition thermique de Huisgen, permettant la cycloaddition entre un alcyne non terminal et un azoture. Cette

réaction thermique ne nécessite pas de catalyseur, et conduit à des triazoles disubstitués en 4,5.

Cette cycloaddition n'étant pas régiosélective, nous avons opté pour l'emploi d'un alcyne symétrique. Cet alcyne se devait également d'être électrophile afin d'augmenter sa réactivité vis-à-vis de l'azoture. Notre choix s'est donc naturellement porté sur l'acétylènedicarboxylate de diméthyle, précurseur du triazole **25**. La réaction est conduite en utilisant l'alcyne comme solvant. Le composé **25** cristallise à froid après ajout de méthanol et est obtenu pur par filtration, avec un excellent rendement (**Schéma 21**).

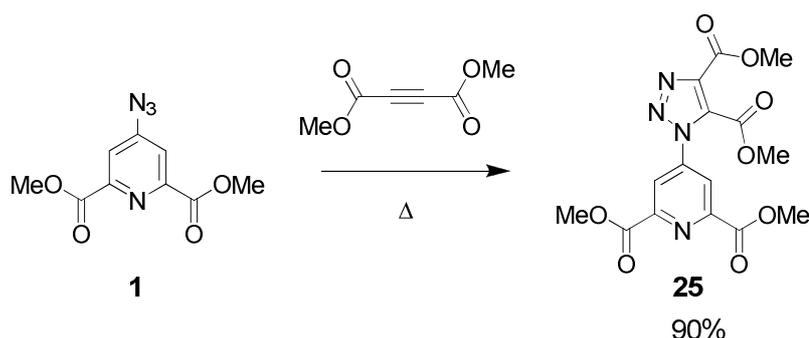
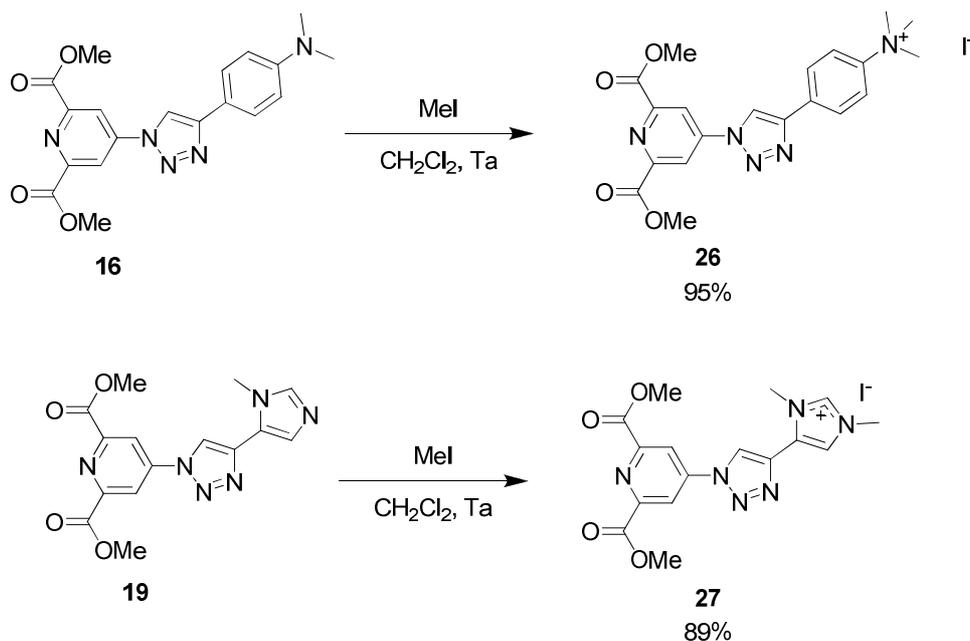


Schéma 21 : Synthèse du tétraester **25** par cycloaddition thermique.

1.3. Méthylation du dérivé diméthylaniline et du dérivé méthylimidazole

Dans le but de faciliter l'étude de l'influence de la substitution du ligand sur les propriétés optiques du complexe, et afin d'étendre notre bibliothèque de ligands, nous avons procédé à la *N*-méthylation des diesters **16** et **19**, respectivement substitués en position 4 du triazole par un groupement diméthylanilyle et par un groupement méthylimidazole, afin d'accéder aux diesters triméthylanilinium **26** et diméthylimidazolium **27**. Ces alkylations ont été effectuées grâce à de l'iodure de méthyle, à température ambiante dans le dichlorométhane. Après évaporation des volatils, les sels d'ammonium sont obtenus purs avec de bons rendements (**Schéma 22**).

Schéma 22 : Synthèse des diesters **26** et **27**.

1.4. Saponification des diesters 8-27

Les diesters précédemment synthétisés ont ensuite été saponifiés afin d'obtenir les diacides, précurseurs directs des ligands dicarboxylates utilisés pour la formation des complexes de lanthanide.

Cette saponification est réalisée par l'action de 2 équivalents de soude en milieu aqueux. Après deux heures de chauffage au reflux, les diesters sont entièrement saponifiés. Les dicarboxylates de sodium, solubles, sont ensuite traités par un excès d'acide chlorhydrique. Les diacides sont ainsi obtenus purs par simple filtration et après lavage à l'eau (**Schéma 23**).

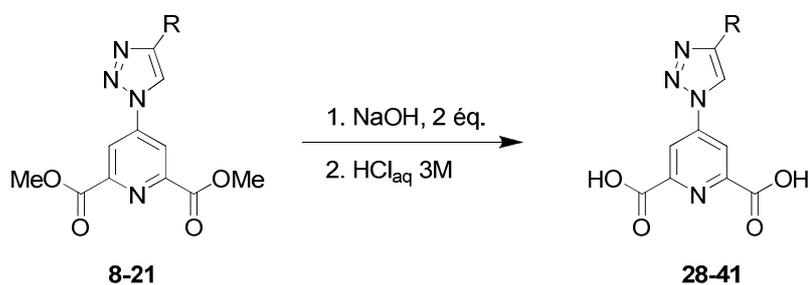


Schéma 23 : Saponification des diesters par la soude.

Cependant, ce mode opératoire s'est révélé inadéquat pour certains des ligands portant des fonctions hydrophiles. En effet, la solubilité en milieu aqueux des diacides résultants est telle qu'ils ne précipitent après acidification du milieu. Les diacides peuvent être précipités

par ajout d'acétone, mais cette précipitation s'accompagne de celle du chlorure de sodium, également insoluble dans l'acétone. Afin de résoudre ce problème, une autre base a été utilisée pour effectuer la saponification : la lithine. Le chlorure de lithium étant soluble dans l'acétone à hauteur de 40 g.L^{-1} environ, l'ajout d'acétone permet de précipiter les diacides, qui sont obtenus purs par simple filtration après lavage à l'acétone (**Schéma 24**).

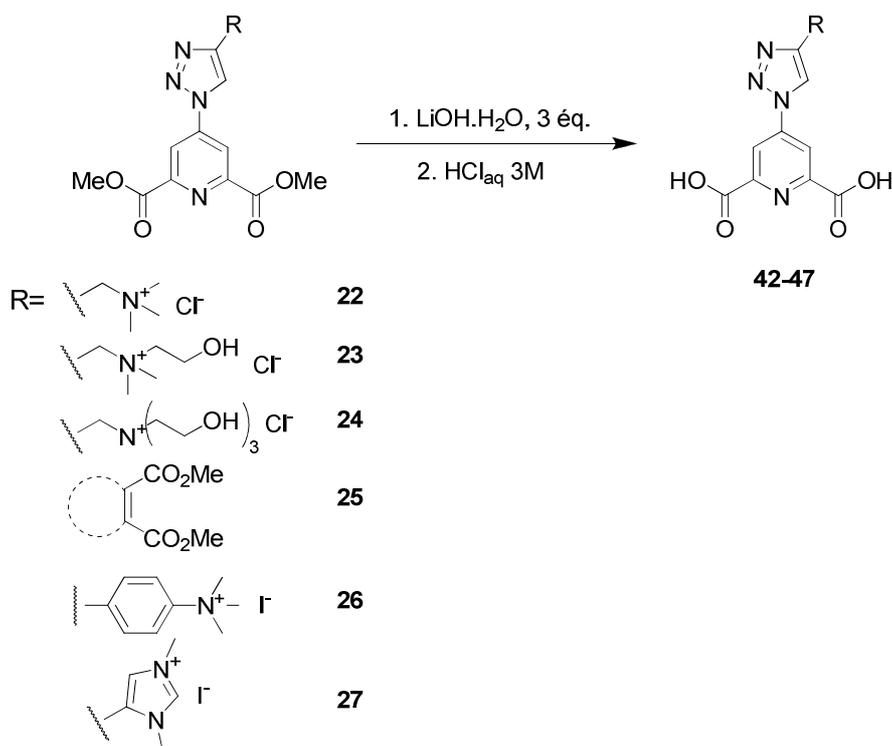
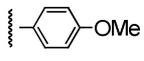
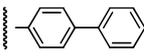
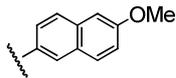
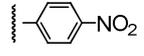
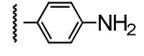
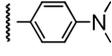
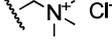
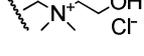
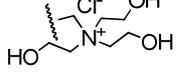
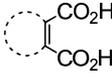
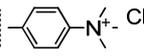
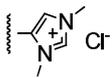


Schéma 24 : Saponification des diesters par la lithine.

Dans le cas des iodures d'ammonium **26** et **27**, l'excès d'acide chlorhydrique ajouté pour la neutralisation du dicarboxylate est suffisant pour procéder à un échange d'anion au niveau de l'ammonium, comme le montrent les analyses élémentaires. Ainsi, les deux diacides **46** et **47** sont des chlorures d'ammonium et non plus des iodures.

Ces deux modes opératoires ont permis l'obtention des diacides désirés, avec d'excellentes puretés, et des rendements quasi-quantitatifs pour une grande partie d'entre eux (**Tableau 9**).

Tableau 9 : Rendements de saponification des diesters 8-27

Composés	-R	Base	Rendement
28		NaOH	100%
29		NaOH	95%
30		NaOH	96%
31		NaOH	93%
32		NaOH	83%
33		NaOH	95%
34		NaOH	100%
35		NaOH	91%
36		NaOH	95%
37		NaOH	85%
38		NaOH	100%
39		NaOH	94%
40		NaOH	95%
41		NaOH	90%
42		LiOH	98%
43		LiOH	88%
44		LiOH	98%
45		LiOH	81%
46		LiOH	90%
47		LiOH	99%

1.5. Conclusion

La voie de synthèse décrite dans cette première partie, comptant 6 étapes au départ de l'acide chélidonique et ne comportant qu'une seule purification, a permis l'obtention rapide de 20 acides 4-triazolyl dipicoliniques substitués par une grande variété de groupements. La synthèse du composé **1**, plateforme permettant d'accéder à la totalité des diacides décrits, peut être réalisée sur de grandes quantités et à moindre coût. Enfin, la synthèse des différents acides 4-triazolyl dipicoliniques s'effectue avec d'excellents rendements, et peut également être conduite à une échelle multigrammes.

2. Complexes de lanthanides

A partir des diacides **28-47**, ont été synthétisés les complexes d'euprium(III) et de terbium (III) correspondants. Les propriétés de fluorescence de ces complexes de lanthanides ont ensuite été étudiées.

2.1. Synthèse des complexes

Pour obtenir ces complexes d'euprium et de terbium, le diacide est tout d'abord déprotoné par une base en solution aqueuse. A la solution de dicarboxylate obtenue est ajoutée une solution de chlorure de lanthanide en quantité nécessaire pour la formation de complexes de stœchiométrie ligand:Ln 3:1. Les dicarboxylates forment alors spontanément un chélate avec l'ion Ln^{3+} (Schéma 25).

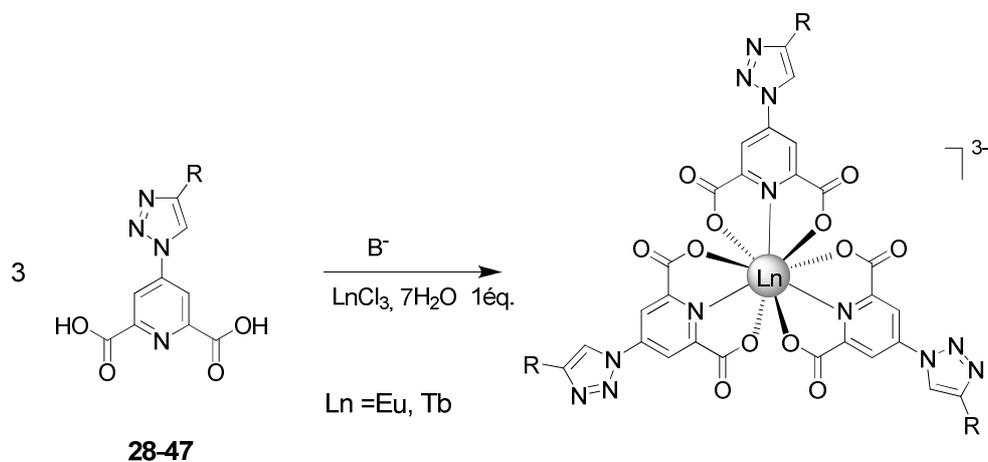


Schéma 25 : Synthèse des complexes de lanthanide à partir des diacides.

La base utilisée pour la déprotonation peut avoir son importance puisque, les complexes étant chargés pour leur grande majorité, un contre-ion est nécessaire pour assurer la neutralité de l'ensemble. Pour ce travail, la base principalement utilisée est le carbonate de sodium, permettant d'obtenir les chélates de formule $[\text{LnL}_3]\text{Na}_3$ (**Schéma 26**).

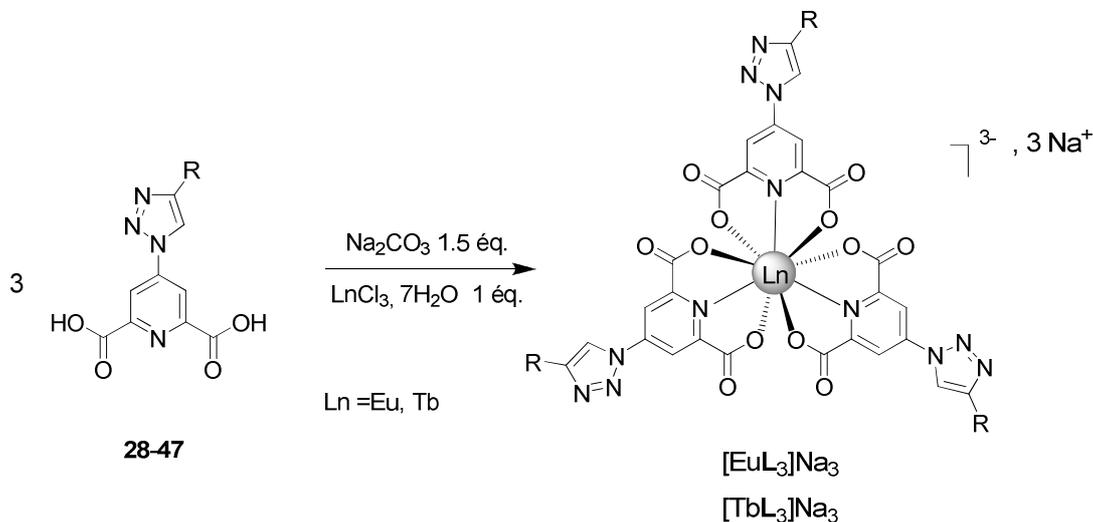


Schéma 26 : Synthèse des complexes $[\text{LnL}_3]\text{Na}_3$.

Cependant, il a été montré que la substitution du sodium par l'ion guanidinium dans des complexes de $\text{Ln}(\text{DPA})_3^{3-}$ permettait entre autres d'améliorer la cristallisation de ces complexes.¹³⁵

Des complexes $[\text{LnL}_3]\text{Gua}_3$ ont donc été synthétisés en utilisant comme base le carbonate de guanidinium (**Schéma 27**), dans le but si possible de déterminer par diffraction des rayons X la structure tridimensionnelle des complexes.

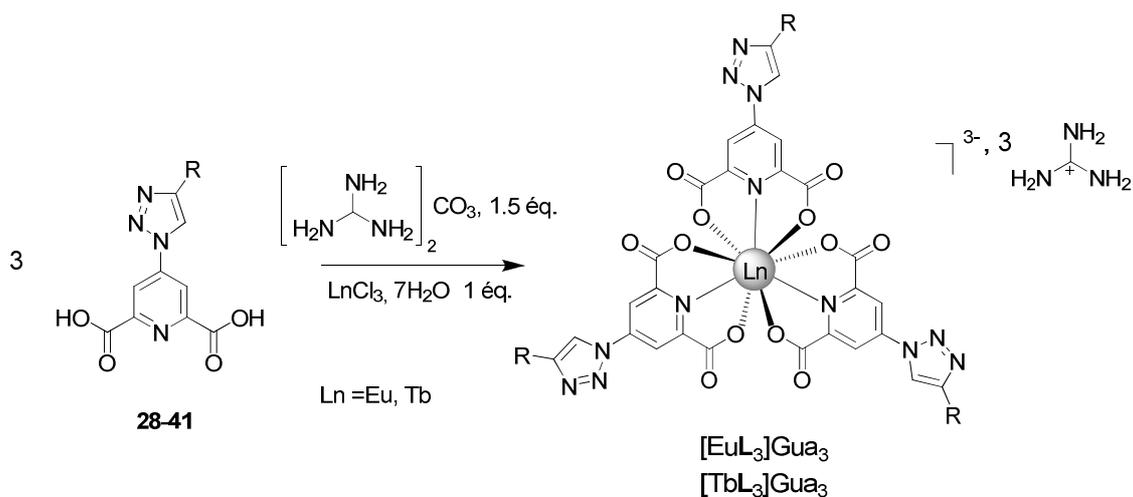


Schéma 27 : Synthèse des complexes $[\text{LnL}_3]\text{Gua}_3$.

Comme attendu, ces complexes $[\text{LnL}_3]\text{Gua}_3$ se sont révélés bien moins soluble dans l'eau que leurs homologues trisodiques. Malheureusement, le changement de contre-ion n'a pas permis l'obtention de cristaux de qualité suffisante pour la détermination de leur structure par diffraction des rayons X.

Enfin, notons que dans le cas des ligands portant des fonctions ammonium (**42-44**, **46-47**) la base utilisée n'a pas d'influence sur la formule finale du complexe, puisque les groupements ammonium assurent dans ce cas la neutralité du complexe (**Figure 39**).

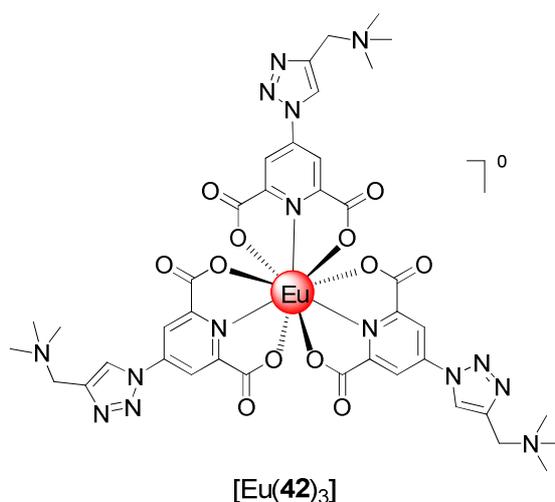


Figure 39 : Exemple de complexe électriquement neutre, synthétisé à partir d'un ligand portant une fonction ammonium.

Dans tout les cas, les complexes, qui précipitent spontanément, sont obtenus par filtration avec des rendements allant principalement de 80 à 100%, en fonction du diacide et de la base utilisés (**Tableau 10**).

2.1. Conclusion

Les diacides **28-47** ont mené avec succès à la synthèse de nombreux complexes d'euprimum et de terbium, obtenus avec de très bons rendements. L'utilisation du contre-ion guanidinium n'a cependant pas permis de déterminer la structure tridimensionnelle des complexes.

Tableau 10 : Rendements d'obtention des complexes synthétisés à partir des diacide **28-47**.

Complexe	Contre-ion			Complexe	Contre-ion		
	Na ⁺	Gua ⁺	Néant		Na ⁺	Gua ⁺	Néant
[Eu(DPA) ₃] ³⁻	72%	/		[Tb(DPA) ₃] ³⁻	72%	/	
[Eu(28) ₃] ³⁻	64%	87%		[Tb(28) ₃] ³⁻	90%	87%	
[Eu(29) ₃] ³⁻	88%	74%		[Tb(29) ₃] ³⁻	96%	77%	
[Eu(30) ₃] ³⁻	97%	79%		[Tb(30) ₃] ³⁻	94%	81%	
[Eu(31) ₃] ³⁻	92%	96%		[Tb(31) ₃] ³⁻	95%	/	
[Eu(32) ₃] ³⁻	93%	/		[Tb(32) ₃] ³⁻	98%	/	
[Eu(33) ₃] ³⁻	91%	92%		[Tb(33) ₃] ³⁻	87%	95%	
[Eu(34) ₃] ³⁻	75%	91%		[Tb(34) ₃] ³⁻	91%	/	
[Eu(35) ₃] ³⁻	95%	79%		[Tb(35) ₃] ³⁻	97%	89%	
[Eu(36) ₃] ³⁻	/	79%		[Tb(36) ₃] ³⁻	/	69%	
[Eu(37) ₃] ³⁻	84%	85%		[Tb(37) ₃] ³⁻	84%	77%	
[Eu(38) ₃] ³⁻	62%	85%		[Tb(38) ₃] ³⁻	92%	93%	
[Eu(39) ₃] ³⁻	86%	88%		[Tb(39) ₃] ³⁻	91%	83%	
[Eu(40) ₃] ³⁻	75%	72%		[Tb(40) ₃] ³⁻	83%	63%	
[Eu(41) ₃] ³⁻	97%	82%		[Tb(41) ₃] ³⁻	92%	83%	
[Eu(42) ₃]			90%	[Tb(42) ₃]			56%
[Eu(43) ₃]			72%	[Tb(43) ₃]			92%
[Eu(44) ₃]			52%	[Tb(44) ₃]			52%
[Eu(45) ₃]	91%	/		[Tb(45) ₃]	88%	/	
[Eu(46) ₃]			92%	[Tb(46) ₃]			81%
[Eu(47) ₃] ⁹⁻			95%	[Tb(47) ₃] ⁹⁻			95%

3. Etude des propriétés de luminescence des complexes

Les propriétés photophysiques des complexes de lanthanide synthétisés ont ensuite été étudiées et comparées à celles des complexes formés à partir de l'acide dipicolinique, qui ont servi de référence. Ces propriétés optiques ont été étudiées avec les complexes en solution, mais également à l'état solide.

3.1. Etude des propriétés optiques des complexes en solution

L'étude des propriétés optiques des complexes en solution a été réalisée à partir de solutions de complexe à 10^{-5} mol.L⁻¹ dans du tampon Tris.HCl 0,1 mol.L⁻¹ pH 7,45.

Les complexes issus des diacides **31**, **32**, **46** et **47** se sont toutefois révélés peu solubles en milieu aqueux, en conséquence leurs propriétés optiques n'ont pu être étudiées en solution.

En dehors des complexes [Tb(**36**)₃]Na₃ et [Eu(**36**)₃]Na₃, les complexes de terbium(III) et d'euporium(III) obtenus à partir des diacides **28-30** et **33-45** présentent tous une fluorescence plus ou moins intense, respectivement verte et rouge. Les spectres d'émissions obtenus sont caractéristiques de ces deux ions (**Figure 40**).

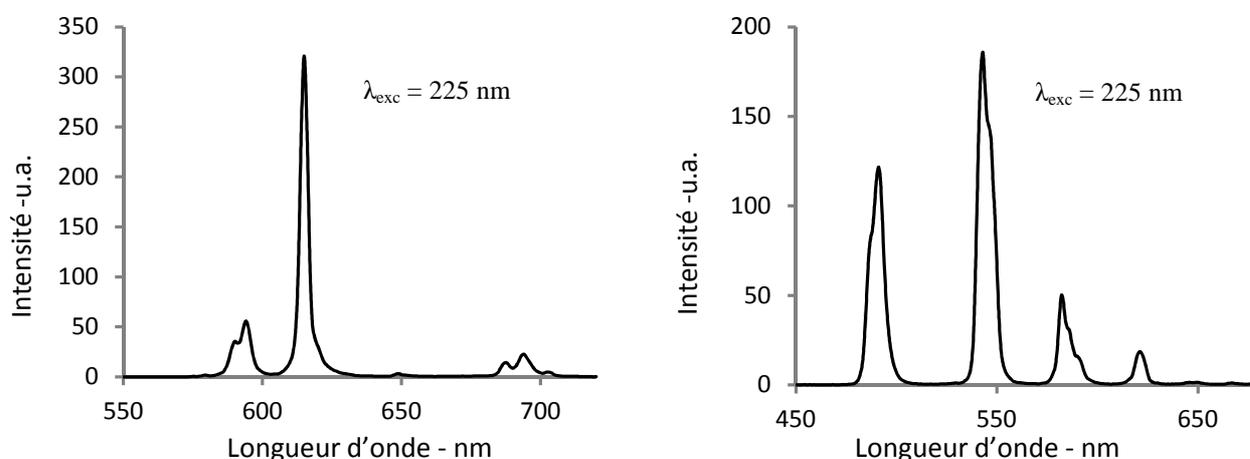


Figure 40 : Exemples représentatifs de spectres d'émission des complexes d'euporium(III) (à gauche) et de terbium(III) (à droite) issus des diacides **28-30** et **33-45**.

3.1.1. Spectres d'excitation

Les spectres d'excitation sont obtenus en fixant la longueur d'onde d'émission à 545 nm dans le cas des complexes de Tb³⁺, et à 616 nm dans le cas des complexes de Eu³⁺, ces deux longueurs d'onde correspondant respectivement aux maxima d'émission de chacun de ces deux ions (transitions $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$ pour Tb³⁺, et $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ pour Eu³⁺). Pour plus de clarté dans la lecture et la comparaison de ces spectres, ceux-ci sont normalisés.

À l'exception des complexes dérivés des diacides **34** et **35** (**Figure 41**), les spectres d'excitation se révèlent quasi identiques pour les complexes d'euporium et de terbium issus d'un même ligand. Cette différence de spectre d'excitation entre les complexes de terbium et d'euporium issus des diacides **34** et **35** pourrait trouver sa source dans deux mécanismes de transfert distincts, variant en fonction de l'ion terre rare complexé, dont l'un au moins ne ferait pas intervenir l'état triplet. En effet, les niveaux accepteurs de ces deux ions étant situé

à des énergies différentes, il est possible que le transfert d'énergie du ligand vers le métal ne fasse pas intervenir les mêmes niveaux énergétiques du ligand.

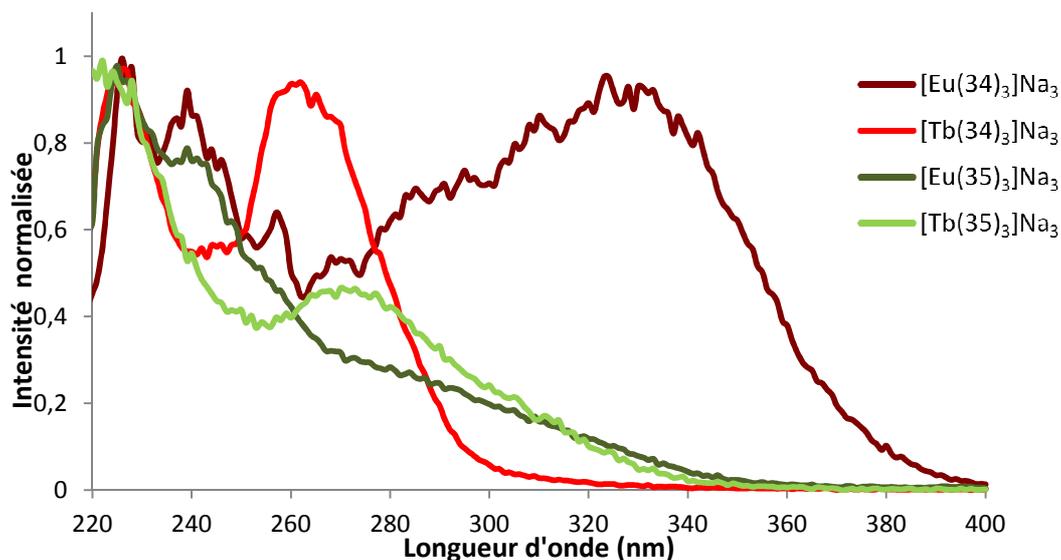


Figure 41 : Spectres d'excitation des complexes $[\text{Eu}(34)_3]\text{Na}_3$ et $[\text{Eu}(35)_3]\text{Na}_3$ mesurés à $\lambda_{\text{exc}} = 616 \text{ nm}$, et des complexes $[\text{Tb}(34)_3]\text{Na}_3$ et $[\text{Tb}(35)_3]\text{Na}_3$ mesurés à $\lambda_{\text{exc}} = 545 \text{ nm}$.

Les spectres d'excitation peuvent être classés en deux catégories, en fonction des longueurs d'onde maximales d'excitation des complexes. La première catégorie rassemble les complexes pour lesquels plus aucune émission n'est observée à des longueurs d'onde d'excitation supérieures à 300 nm (**Figure 42**).

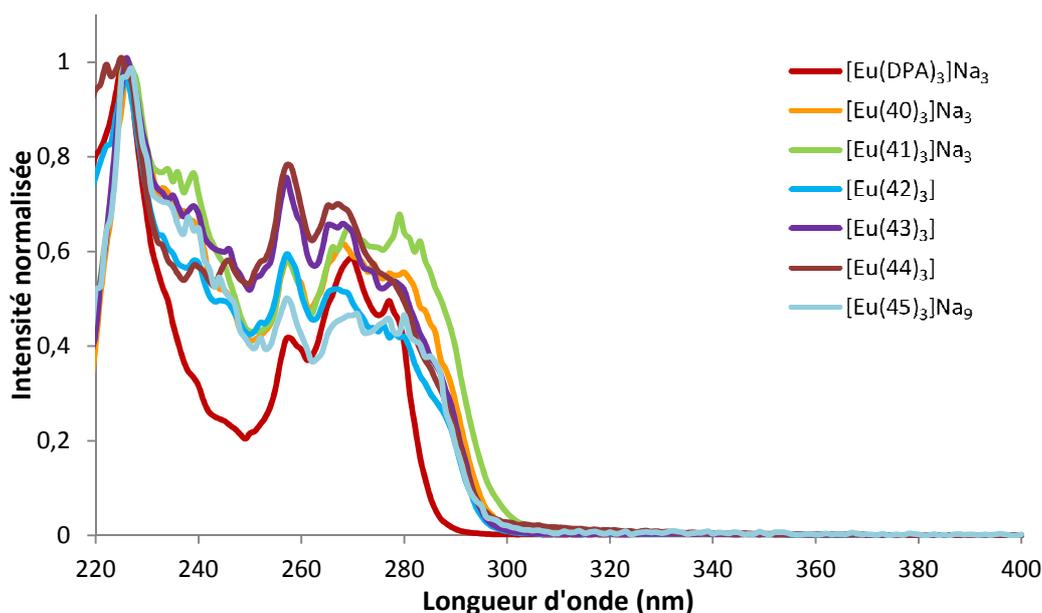


Figure 42 : Spectres d'excitation des complexes d'euprémium issus du DPA et des diacides 40-45.

Ces complexes sont issus des diacides DPA, **40-45**, qui sont substitués en position 4 du triazole par des chaînes alkyles dans le cas des diacides **40-44**, et par deux carboxylates en position 4 et 5 dans le cas du diacide **45**. Une légère augmentation de la longueur d'onde maximale d'excitation, d'une dizaine de nanomètres, peut être observée entre le complexe $[\text{Eu}(\text{DPA})_3]\text{Na}_3$ et ceux issus des diacides **40-45**.

On trouve dans la deuxième catégorie les complexes pour lesquels l'émission cesse pour des longueurs d'onde d'excitation allant de 330 à 400 nm, selon le complexe (**Figure 43**). Ces complexes sont issus des diacides **28-30**, **33**, **37-39**, qui portent tous un groupement aromatique en position 4 du triazole.

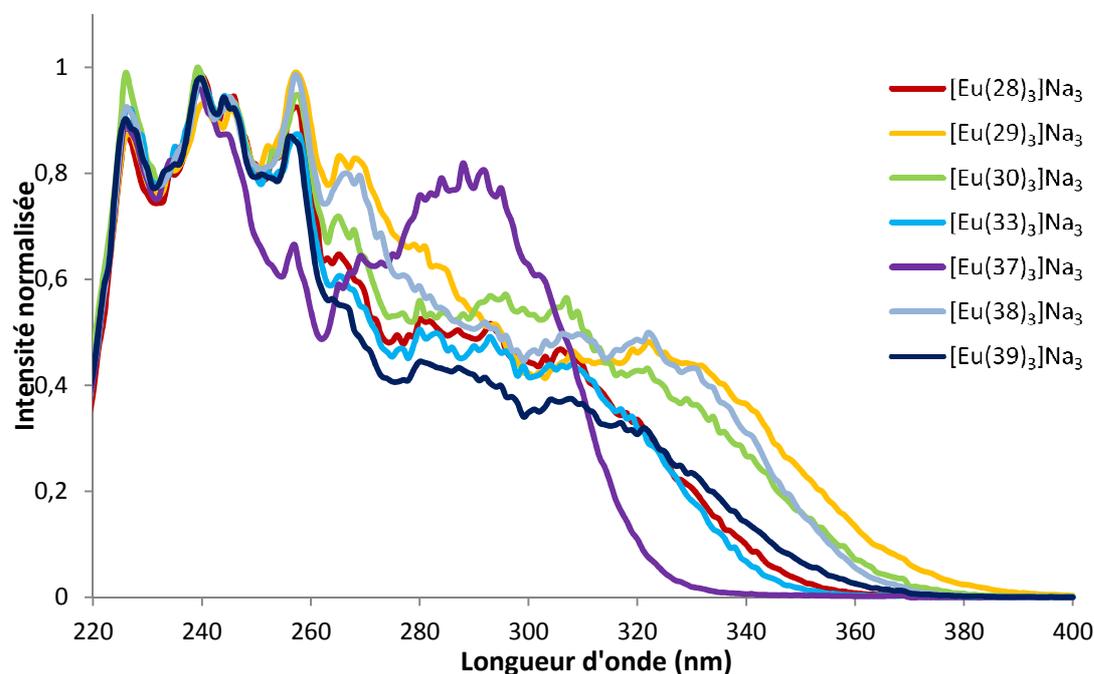


Figure 43 : Spectres d'excitation des complexes d'euprium issus des diacides **28-30**, **33**, **37-39**.

La présence de groupements aromatiques en position 4 du triazole, permettant d'étendre le système π conjugué, entraîne donc une augmentation du domaine d'excitation des complexes de terbium et d'euprium correspondants vers les grandes longueurs d'onde.

3.1.2. Durées de vie de luminescence

Les durées de vie de luminescence ont également été mesurées à partir de solutions de complexe à 10^{-5} mol.L⁻¹.

Tableau 11 : Temps de demi-vie de luminescence des complexes d'euporium et de terbium, mesurés aux longueurs d'onde indiquées, ainsi que les contributions relatives de chaque temps de demi-vie dans les cas de décroissance bi-exponentielle.

Complexe	Longueur d'onde (nm)	τ_1 (ms)	Contribution de τ_1	τ_2 (ms)	Contribution de τ_2
[Eu(DPA) ₃]Na ₃	225	1,50	75%	0,30	25%
[Tb(DPA) ₃]Na ₃	225	1,54	100%	/	/
[Eu(28) ₃]Na ₃	240	1,02	41%	0,38	59%
[Tb(28) ₃]Na ₃	240	0,84	100%	/	/
[Eu(29) ₃]Na ₃	257	0,50	100%	/	/
[Tb(29) ₃]Na ₃	257	0,29	68%	0,09	32%
[Eu(30) ₃]Na ₃	239	1,07	12%	0,47	88%
[Tb(30) ₃]Na ₃	240	0,75	100%	/	/
[Eu(33) ₃]Na ₃	240	0,96	31%	0,40	69%
[Tb(33) ₃]Na ₃	240	0,94	100%	/	/
[Eu(34) ₃]Na ₃	332	0,89	67%	0,33	33%
[Tb(34) ₃]Na ₃	261	0,77	100%	/	/
[Eu(35) ₃]Na ₃	225	0,71	100%	/	/
[Tb(35) ₃]Na ₃	224	0,92	100%	/	/
[Eu(36) ₃]Na ₃	/	/	/	/	/
[Tb(36) ₃]Na ₃	/	/	/	/	/
[Eu(37) ₃]Na ₃	239	1,12	79%	0,32	21%
[Tb(37) ₃]Na ₃	241	0,86	100%	/	/
[Eu(38) ₃]Na ₃	257	1,05	86%	0,30	14%
[Tb(38) ₃]Na ₃	240	0,38	53%	0,15	47%
[Eu(39) ₃]Na ₃	240	1,13	100%	/	/
[Tb(39) ₃]Na ₃	240	0,15	100%	/	/
[Eu(40) ₃]Na ₃	226	1,19	71%	0,27	29%
[Tb(40) ₃]Na ₃	226	1,04	100%	/	/
[Eu(41) ₃]Na ₃	226	1,19	80%	0,27	20%
[Tb(41) ₃]Na ₃	226	1,11	100%	/	/
[Eu(42) ₃]	226	1,25	77%	0,30	23%
[Tb(42) ₃]	226	0,89	100%	/	/
[Eu(43) ₃]	226	1,22	79%	0,29	21%
[Tb(43) ₃]	226	0,87	100%	/	/
[Eu(44) ₃]	226	1,29	62%	0,31	38%
[Tb(44) ₃]	226	0,28	100%	/	/
[Eu(45) ₃]Na ₉	227	1,02	43%	0,24	57%
[Tb(45) ₃]Na ₉	227	0,93	100%	/	/

Dans la plupart des cas, une distinction peut être opérée entre complexes d'euporium et de terbium. En effet, la décroissance de la luminescence des complexes d'euporium est le plus souvent bi-exponentielle, alors que cette décroissance est mono-exponentielle pour la grande majorité des complexes de terbium (**Tableau 11**).

Les décroissances bi-exponentielles sont associées à la présence de deux espèces différentes dans le milieu. Dans notre cas, il s'agit de l'espèce $[\text{LnL}_3]$ et de l'espèce $[\text{LnL}_2]$, complexe partiellement dissocié (**Schéma 28**). La sphère de coordination du lanthanide est complétée par des molécules d'eau dans le cas du complexe partiellement dissocié $[\text{LnL}_2]$, ce qui provoque la désexcitation non radiative du métal et engendre une diminution du temps de demi-vie.

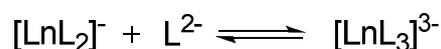


Schéma 28 : Equilibre dissociatif du complexe $[\text{LnL}_3]$

A partir des constantes de stabilité des complexes $[\text{LnDPA}_3]$, il est possible de calculer le pourcentage de chaque espèce.³² Dans notre cas (concentration globale de 10^{-5} M), la répartition suivante est obtenue : $[\text{EuL}_3]^{3-}/[\text{EuL}_2]^-$ 58%/41%, et $[\text{TbL}_3]^{3-}/[\text{TbL}_2]^-$ 70%/29%, le 1% manquant correspondant à des espèces plus dissociées que nous négligerons ($[\text{LnL}]^+$ et Ln^{3+}). Cette dissociation partielle explique donc la présence d'un second temps de demi-vie pour le complexe d'euporium.

Il est cependant atypique de ne pas rencontrer ce second temps de demi-vie pour les complexes de terbium. En effet, bien que les complexes de terbium soient moins dissociés à 10^{-5} M que leurs homologues à l'euporium, cela semble insuffisant pour expliquer les décroissances mono-exponentielles observées (environ 30% de complexe dissocié en $[\text{TbL}_2]^-$ à 10^{-5} M).

Les temps de vie observés se situent majoritairement entre 0,77 et 1,30 ms. La décroissance de la luminescence du complexe $[\text{Tb}(\mathbf{39})_3]\text{Na}_3$ est cependant très rapide, avec un temps de demi-vie de 0,15 ms. Ce déclin rapide de la luminescence laisse deviner un effet de rétro-transfert du lanthanide vers le ligand, impliquant une forte proximité entre l'état triplet du ligand **39** et le niveau $^5\text{D}_4$ du terbium (III).

3.1.3. Rendements quantiques de luminescence

Les rendements quantiques de luminescence ont été déterminés en solution à partir de solutions de complexes à 10^{-3} M (**Tableau 12**). Les rendements des complexes de plus faible solubilité n'ont pas été étudiés. Ces mesures ont été effectuées au moyen d'une sphère

d'intégration, permettant d'accéder simultanément au nombre de photons absorbés par un échantillon à la longueur d'onde d'excitation et au nombre de photons émis par ce dernier.

Tableau 12 : Rendements quantiques de luminescence, complexes en solution à 10^{-3} M.

Complexe	Longueur d'onde (nm)	Φ (%)	Complexe	Longueur d'onde (nm)	Φ (%)
[Eu(DPA) ₃]Na ₃	284	25 ¹³⁶	[Tb(DPA) ₃]Na ₃	304	22 ¹³⁶
[Eu(39) ₃]Na ₃	310	34	[Tb(39) ₃]Na ₃	310	8
[Eu(40) ₃]Na ₃	292	44	[Tb(40) ₃]Na ₃	290	13
[Eu(41) ₃]Na ₃	292	40	[Tb(41) ₃]Na ₃	289	15
[Eu(42) ₃]	292	52	[Tb(42) ₃]	289	12
[Eu(43) ₃]	294	47	[Tb(43) ₃]	289	11
[Eu(44) ₃]	292	46	[Tb(44) ₃]	290	10
[Eu(45) ₃]Na ₉	288	2	[Tb(45) ₃]Na ₉	290	12

Les rendements quantiques des complexes d'euporium s'avèrent supérieurs à ceux des complexes de terbium, exception faite des complexes issus du diacide **45**.

Ainsi, les valeurs obtenues pour les complexes d'euporium varient de 12 à 52%. Certains de ces complexes présentent de meilleurs rendements quantiques que ceux décrits dans la littérature pour les complexes de références.¹³⁶ Les rendements quantiques des complexes de terbium se situent quant à eux tous en deçà de celui du complexe de référence [Tb(DPA)₃]Na₃, et sont compris dans une gamme allant de 2 à 15%. Cette différence de comportement peut être expliquée par la position des états triplet des ligands **39-45**, qui sont probablement situés trop bas en énergie pour transférer efficacement vers le niveau accepteur ⁵D₄ du terbium (situé à 20 400 cm⁻¹). Le niveau accepteur ⁵D₀ de l'euporium étant situé plus bas en énergie que celui du terbium (17 200 cm⁻¹), le transfert d'énergie est facilité et permet d'obtenir de meilleurs rendements de luminescence.

3.1.4. Conclusion

L'étude, en solution, des propriétés optiques des complexes d'euporium et de terbium précédemment synthétisés a permis de mettre en évidence l'influence de la substitution du ligand. En effet, tandis que la présence d'une chaîne alkyle en position 4 du triazole ne modifie que peu la longueur d'onde maximale d'excitation, proche de 300 nm, l'adjonction d'un groupement aromatique permettant d'étendre le système π du ligand étend ce domaine d'excitation, jusqu'à 390 nm dans le cas du complexe [Eu(**29**)₃]Na₃.

L'étude des complexes de lanthanide en solution aqueuse révèle leurs bonnes propriétés optiques. D'une part, les temps de demi-vie observés sont longs, variant de 0,77 à 1,30 ms. D'autre part, les rendements quantiques de luminescence de certains complexes d'euporium se révèlent supérieurs à celui du complexe $[\text{Eu}(\text{DPA})_3]\text{Na}_3$, référence de cette étude. Les rendements quantiques des complexes de terbium sont par contre plus faibles, variant de 2 à 15%.

3.2. Etude des propriétés optiques des complexes à l'état solide

Les propriétés optiques des complexes d'euporium et de terbium ont également été étudiées à l'état solide.

3.2.1. Spectres d'excitation

En dehors de quelques exceptions, les complexes ont montré à l'état solide une fluorescence caractéristique des ions terbium(III) et euporium(III). Ainsi, les complexes de terbium issus des diacides **31**, **32** et **34** n'émettent aucune luminescence à l'état solide, alors que ces mêmes complexes présentent de bonnes propriétés optiques en solution. La luminescence est cependant conservée dans le cas des complexes d'euporium correspondants. De même, les complexes issus du diacide **35** ne montrent aucune fluorescence des ions terre-rare à l'état solide, alors que cette luminescence est observée en solution.

Les spectres d'excitation des complexes d'euporium et de terbium synthétisés à partir d'un même ligand différent dans de nombreux cas. Ils seront donc présentés séparément.

3.2.1.1. Complexes d'euporium(III)

Afin de simplifier la lecture, les spectres d'excitation des différents complexes ont été normalisés et répartis sur plusieurs graphiques, en fonction de la nature des groupements greffés en position 4 du triazole. Le premier groupe rassemble les complexes du DPA et des ligands portant des chaînes alkyles (diacides **40-45**). Le second est constitué des complexes substitués par des groupements hétéroaromatiques (diacides **37-39**, **47**). Enfin, le dernier groupe rassemble les complexes incorporant des noyaux aromatiques benzéniques (diacides **28-34**, **46**).

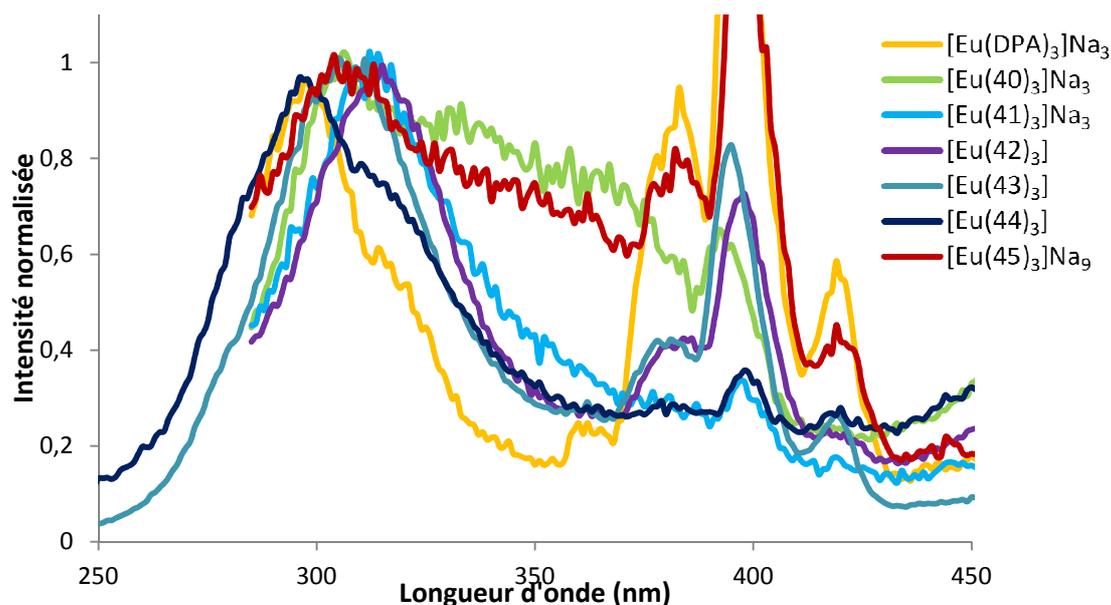


Figure 44 : Spectres d'excitation des complexes d'euprium issus des diacides DPA et **40-45**.

Les complexes d'euprium synthétisés à partir des diacides DPA et **40-45** présentent tous un maximum d'excitation proche de 300 nm (**Figure 44**). Les bandes étroites observées entre 360 et 420 nm correspondent aux bandes d'excitation directes de l'euprium,¹³⁷ c'est-à-dire sans transfert d'énergie *via* le ligand organique (**Tableau 13**).

Tableau 13 : Transitions de l'euprium(III) observées sur le spectre d'excitation d'un complexe d' Eu^{3+} obtenu à $\lambda_{\text{em}} = 616 \text{ nm}$.¹³⁷

Transition optique	Longueur d'onde (nm)
${}^7\text{F}_0 \rightarrow {}^5\text{D}_4$	362
${}^7\text{F}_1 \rightarrow {}^5\text{D}_4$	367
${}^7\text{F}_0 \rightarrow {}^5\text{G}_1$	375-381
${}^7\text{F}_1 \rightarrow {}^5\text{L}_7$	386
${}^7\text{F}_0 \rightarrow {}^5\text{L}_6$	395
${}^7\text{F}_1 \rightarrow {}^5\text{L}_6$	400
${}^7\text{F}_0 \rightarrow {}^5\text{D}_3$	417

Les complexes d'euprium synthétisés à partir des diacides fonctionnalisés par un groupement hétéroaromatique (**37-39** et **47**) présentent des maxima d'excitation variant entre 335 nm et 390 nm (**Figure 45**). La méthylation du groupement méthylimidazole du diacide **39** en diméthylimidazolium (diacide **47**) entraîne le déplacement du maximum d'excitation du complexe d'euprium correspondant de 50 nm vers les hautes énergies.

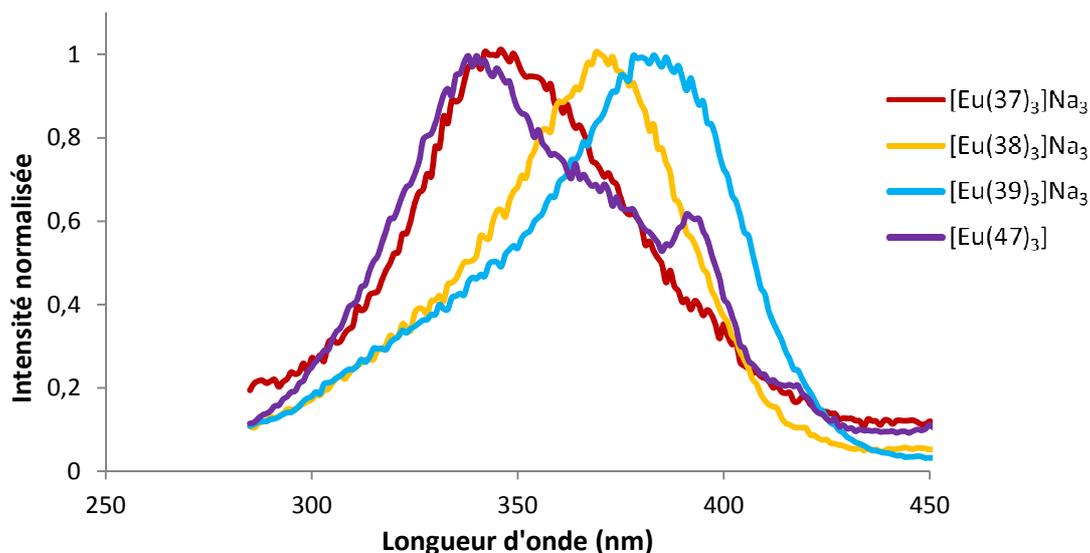


Figure 45 : Spectres d'excitation des complexes d'euprimum issus des diacides **37-39** et **47**.

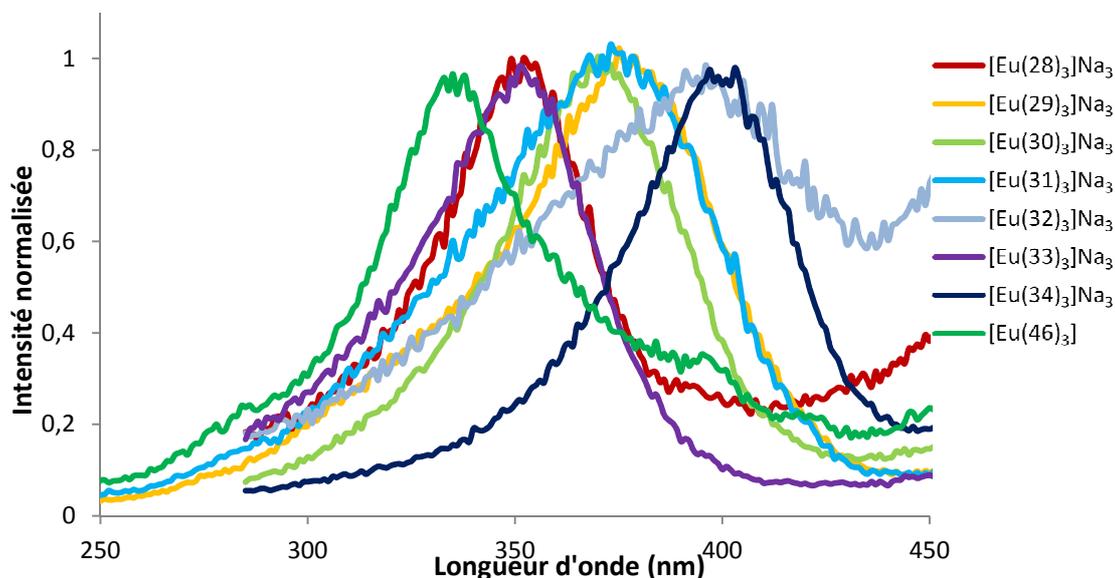


Figure 46 : Spectres d'excitation des complexes d'euprimum issus des diacides **28-34** et **46**.

Les complexes d'euprimum issus des diacides fonctionnalisés par un groupement aromatique benzénique (**28-34** et **46**) montrent des maxima d'excitation allant de 330 nm à 405 nm (**Figure 46**). Il est à remarquer qu'aucune luminescence n'est observée pour le complexe d'euprimum issu du diacide **36** (diméthylaniline), le complexe d'euprimum formé à partir du diacide **46** (obtenu par méthylation de la diméthylaniline en triméthylanilinium) présente, lui, la fluorescence caractéristique de l'euprimum attendue. La méthylation du ligand a permis de modifier la position de l'état triplet, probablement vers des énergies plus élevées, rendant ainsi le transfert d'énergie du ligand vers l'euprimum possible.

3.2.1.2. Complexes de terbium(III)

Les spectres d'excitation des complexes de terbium ont été répartis de façon similaire, en fonction des groupements greffés en position 4 du triazole.

Les complexes de terbium synthétisés à partir du DPA et des diacides **40-45** présentent tous un maximum d'excitation proche de 335 nm, avec de légères variations de longueurs d'onde (**Figure 47**).

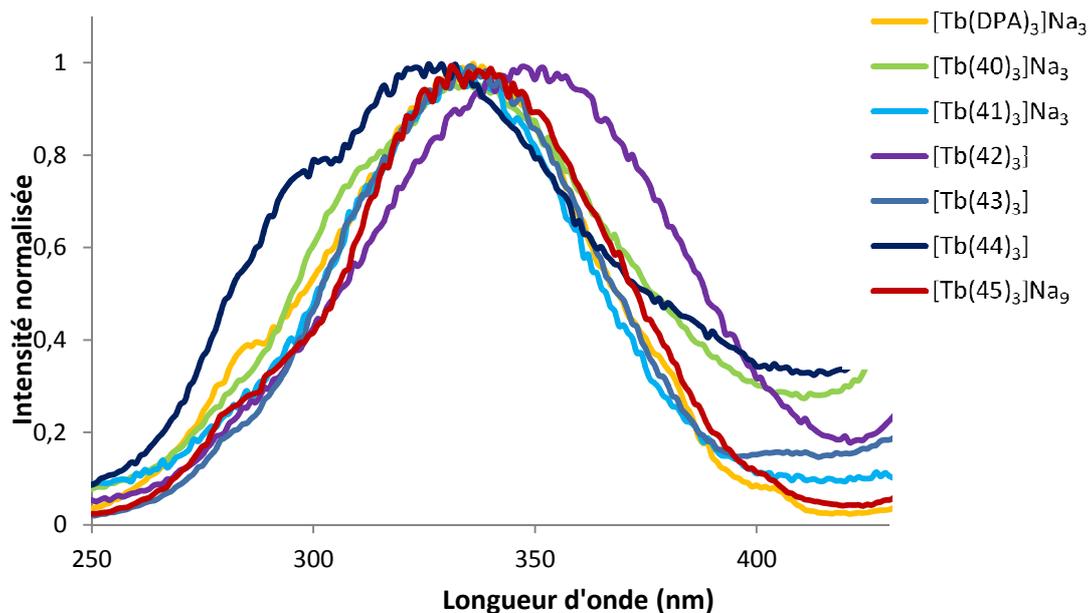


Figure 47 : Spectres d'excitation des complexes de terbium issus des diacides DPA et **40-45**.

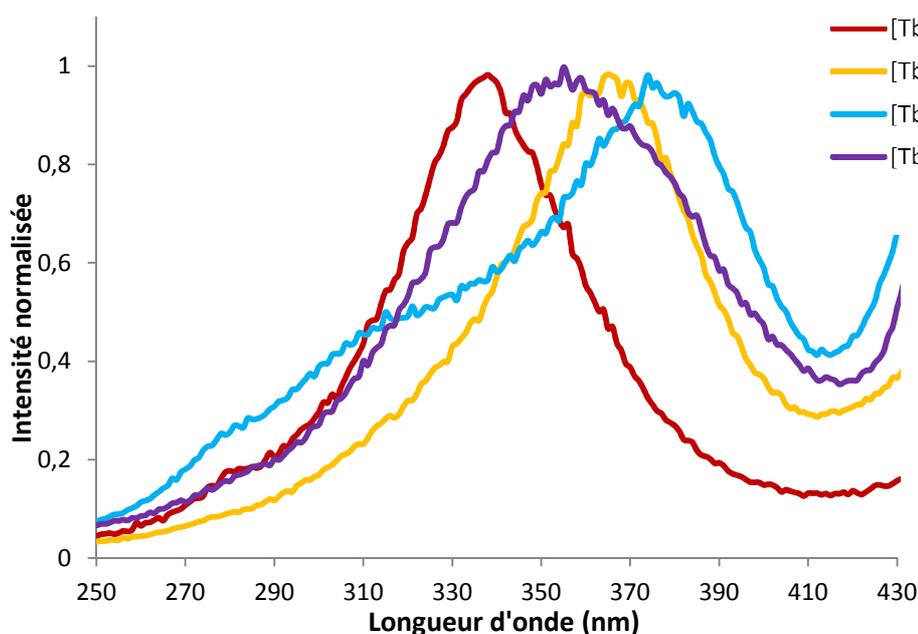


Figure 48 : Spectres d'excitation des complexes de terbium issus des diacides **37-39** et **47**.

Les complexes de terbium synthétisés à partir des diacides fonctionnalisés par un groupement hétéroaromatique (**37-39** et **47**) présentent des maxima d'excitation situés entre 335 nm et 380 nm (**Figure 48**).

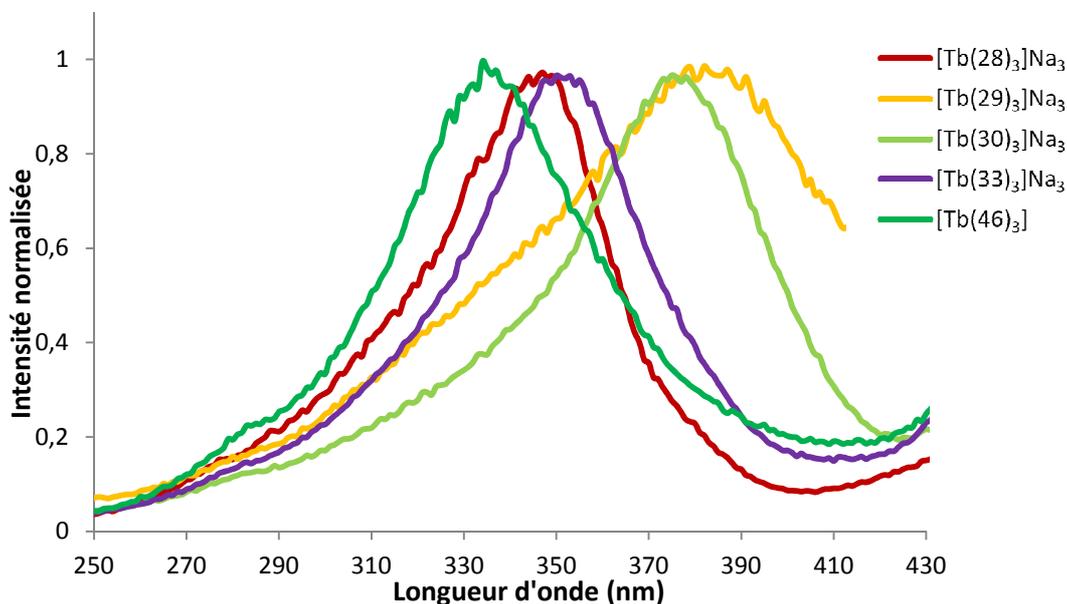


Figure 49 : Spectres d'excitation des complexes de terbium issus des diacides **28-30**, **33** et **46**.

Les complexes de terbium issus des ligands substitués par des groupements aromatiques phényliques (**28-30**, **33** et **46**) montrent des maxima d'excitation allant de 330 nm à 405 nm (**Figure 49**). De même que pour le complexe d'euporium, le complexe de terbium synthétisé à partir du diacide **46** montre la fluorescence caractéristique du terbium, alors que celui dérivant du diacide **36** ne présente pas cette luminescence.

3.2.1.3. Conclusion

Les spectres d'excitation à l'état solide se révèlent très différents de ceux enregistrés en solution. La position des niveaux énergétiques étant sensible à l'environnement (et tout particulièrement à sa polarité), ces différences de comportement en solution et à l'état solide pourraient être liées à la disparition du solvant (modification de la polarité extérieure), ou encore à l'agrégation des complexes à l'état solide (apparition de nouvelles interactions entre complexes).

Ces phénomènes, en modifiant les positions des niveaux énergétiques, modifient les énergies de transition entre les différents états du ligand, et par conséquent l'allure générale des spectres d'excitation. Les maxima d'excitation étant situés à des longueurs d'onde plus élevées à l'état solide qu'en solution, on peut en conclure que les états S_0 et S_1 du ligand sont

plus proche en énergie à l'état solide que lorsque le complexe est en solution. Ce phénomène explique également la perte de luminescence de certains complexes à l'état solide, un déplacement important des états excités pouvant conduire à une incompatibilité vis à vis du transfert vers les niveaux accepteurs des lanthanides.

3.2.2. Rendements quantiques de luminescence

Les rendements quantiques de luminescence ont été déterminés à l'état solide (**Tableau 14**). De même que lors de l'étude de luminescence des complexes en solution, ces rendements ont été déterminés en utilisant une sphère d'intégration.

Tableau 14 : Rendements quantiques des complexes, déterminés à l'état solide.

Complexe	Longueur d'onde (nm)	Φ (%)	Complexe	Longueur d'onde (nm)	Φ (%)
[Eu(DPA) ₃]Na ₃	320	58 ¹³⁶	[Tb(DPA) ₃]Na ₃	310	30 ¹³⁶
[Eu(28) ₃]Na ₃	335	28	[Tb(28) ₃]Na ₃	320	12
[Eu(29) ₃]Na ₃	340	23	[Tb(29) ₃]Na ₃	305	2
[Eu(30) ₃]Na ₃	340	39	[Tb(30) ₃]Na ₃	305	14
[Eu(31) ₃]Na ₃	340	8	[Tb(31) ₃]Na ₃	/	/
[Eu(32) ₃]Na ₃	330	1	[Tb(32) ₃]Na ₃	/	/
[Eu(33) ₃]Na ₃	330	21	[Tb(33) ₃]Na ₃	340	10
[Eu(34) ₃]Na ₃	395	12	[Tb(34) ₃]Na ₃	/	/
[Eu(35) ₃]Na ₃	/	/	[Tb(35) ₃]Na ₃	/	/
[Eu(36) ₃]Na ₃	/	/	[Tb(36) ₃]Na ₃	/	/
[Eu(37) ₃]Na ₃	335	33	[Tb(37) ₃]Na ₃	330	16
[Eu(38) ₃]Na ₃	340	22	[Tb(38) ₃]Na ₃	310	4
[Eu(39) ₃]Na ₃	305	59	[Tb(39) ₃]Na ₃	300	2
[Eu(40) ₃]Na ₃	300	45	[Tb(40) ₃]Na ₃	300	16
[Eu(41) ₃]Na ₃	300	42	[Tb(41) ₃]Na ₃	304	36
[Eu(42) ₃]	296	58	[Tb(42) ₃]	298	6
[Eu(43) ₃]	298	60	[Tb(43) ₃]	294	3
[Eu(44) ₃]	296	54	[Tb(44) ₃]	296	5
[Eu(45) ₃]Na ₉	325	17	[Tb(45) ₃]Na ₉	325	28
[Eu(46) ₃]	330	11	[Tb(46) ₃]	330	1
[Eu(47) ₃]	340	45	[Tb(47) ₃]	324	2

Tout comme nous l'avions observé en solution, les rendements quantiques des complexes d'euporium(III) sont supérieurs à ceux des complexes de terbium(III) correspondants, à l'exception des complexes formés à partir du diacide **45**. Les complexes de terbium issus des diacides **28-47** ont des rendements quantiques globalement plus faibles que ceux des complexes de références. En effet, seuls deux complexes de terbium ont des rendements quantiques se rapprochant de ceux décrits pour $[\text{Tb}(\text{DPA})_3]\text{Na}_3$, tandis que les autres complexes présentent des rendements n'excédant pas 15%. Une constatation similaire peut être faite concernant les complexes d'euporium, pour lesquelles les rendements sont majoritairement compris entre 1 et 35%. Les complexes d'euporium issus des diacides **39-44** et **47** possèdent toutefois des rendements comparables à celui du complexe $[\text{Eu}(\text{DPA})_3]\text{Na}_3$.

Ces différences de comportement entre complexes en solution et complexes à l'état solide peuvent également être expliquées par la polarité de l'environnement. En effet, de même que cette polarité modifie la position relative de S_1 par rapport à S_0 , les différences observées sur les rendements quantiques montrent que la position relative de l'état triplet par rapport à l'état fondamental est également modifiée par l'environnement du complexe. Cette modification de la position s'accompagne alors d'une modification du rendement quantique, en influant sur l'efficacité du transfert d'énergie du ligand vers le métal.

3.3. Conclusion

Les propriétés optiques des complexes à l'état solide s'avèrent différentes de celles des complexes en solution, les principales variations observées étant la perte totale de luminescence pour certains complexes. On assiste dans les autres cas à des déplacements du maximum d'excitation, pouvant aller jusqu'à 130 nm pour le complexe $[\text{Tb}(\mathbf{29})_3]\text{Na}_3$, et à d'importantes modifications de l'allure générale des spectres d'excitation.

Ces différences peuvent être expliquées par les déplacements des niveaux énergétiques des ligands en raison de la solvataion.

La substitution en position 4 du triazole a une influence importante sur les propriétés optiques des complexes. En effet, une large gamme de longueur d'onde d'excitation est observée, les maxima d'excitation pouvant aller de 290 nm pour le complexe $[\text{Eu}(\mathbf{44})_3]$ jusqu'à 400 nm pour $[\text{Eu}(\mathbf{34})_3]\text{Na}_3$.

Enfin, les rendements quantiques s'avèrent pour certains complexes excellents, dépassant les rendements des complexes de référence.

4. Conclusion

La voie de synthèse mise en place, comptant 7 étapes au départ de l'acide chélidonique, a permis l'obtention rapide et avec d'excellents rendements de 20 acides 4-triazolyl dipicoliniques originaux, substitués par une grande variété de groupements. Ces diacides ont été utilisés avec succès pour la synthèse des complexes d'euporium et de terbium correspondants.

L'étude de la luminescence des complexes d'euporium(III) et de terbium(III) a révélé d'excellentes propriétés optiques pour certains de ces complexes. En effet, ces derniers montrent des temps de vie de luminescence longs, de l'ordre de la milliseconde, parfaitement compatibles avec une future utilisation en imagerie résolue dans le temps.

Les groupements présents sur les ligands 4-triazolyl dipicolinates montrent une grande influence sur les propriétés optiques des complexes correspondants, tout particulièrement à l'état solide. Ainsi, la nature du groupement permet de faire varier le maximum d'excitation des complexes sur une plage de 140 nm.

Enfin, les rendements quantiques obtenus en solution et à l'état solide s'avèrent, pour certains complexes, supérieurs à ceux des complexes issus de l'acide dipicolinique, notre référence.

En tenant compte des résultats obtenus par la présente étude, nous avons opéré une sélection de complexes nous paraissant les plus intéressants, pour une incorporation ultérieure dans une nano-sonde hybride. Les complexes $[\text{Eu}(\mathbf{39})_3]\text{Na}_3$, $[\text{Eu}(\mathbf{40-41})_3]\text{Na}_3$, $[\text{Tb}(\mathbf{40-41})_3]\text{Na}_3$, $[\text{Eu}(\mathbf{42-44})_3]$, $[\text{Tb}(\mathbf{42-44})_3]$ et $[\text{Tb}(\mathbf{45})_3]\text{Na}_9$ ont ainsi été sélectionnés comme étant les meilleurs candidats pour l'élaboration des nano-traceurs envisagés (**Figure 50**).

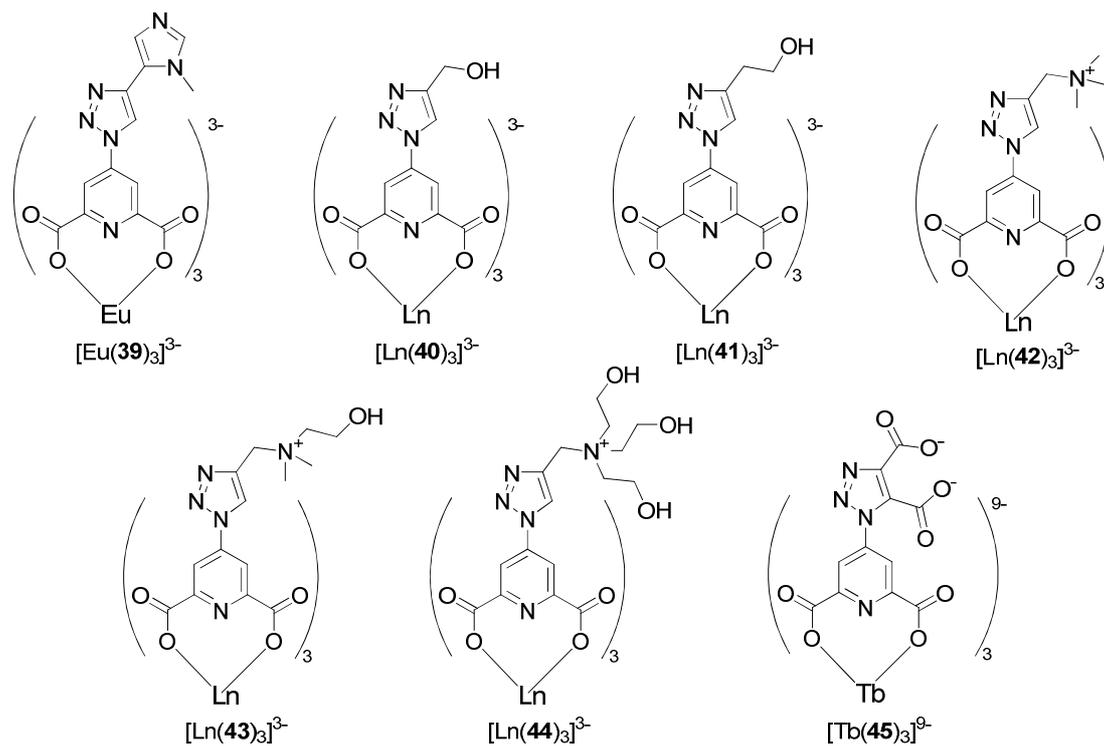


Figure 50 : Complexes sélectionnés pour l'élaboration de nanohybrides luminescents.

Chapitre III. Nanohybrides luminescents à base de complexes de lanthanide

Comme il a été décrit dans la première partie de ce mémoire, il existe de nombreuses stratégies permettant l'incorporation de molécules organiques ou complexes organométalliques au sein de nanoparticules de silice. Les hybrides de classe II, possédant des liaisons covalentes entre la partie minérale et la partie organique, nécessitent le plus souvent la présence de fonctions alcoxysilanes fixées sur la partie organique.

La manipulation de ces composés silylés est cependant délicate, puisque ces fonctions alcoxysilanes sont sensibles à l'humidité. Les complexes de lanthanides décrits et étudiés dans la partie précédente étant synthétisés dans l'eau, l'utilisation de groupements alcoxysilane semble à première vue incompatible avec la stratégie développée.

Notre attention s'est portée sur les nanohybrides de classe I. En effet, il a été précédemment montré qu'il était possible d'incorporer directement des molécules organiques dans des nanoparticules de silice par microémulsion inverse, à la condition que ces molécules soient hydrophiles.⁹⁶⁻⁹⁹ Or les complexes sélectionnés à l'issue de la partie précédente se sont tous révélés relativement très hydrophiles, avec des solubilités supérieures à 10^{-2} M dans l'eau.

Cette méthode de synthèse a donc été choisie pour effectuer l'encapsulation directe des complexes de lanthanide sélectionnés.

1. Nanohybrides luminescents synthétisés par microémulsion inverse

1.1. Synthèse de nanoparticules de silice

Nous avons dans un premier temps réalisé la synthèse de nanoparticules de silice, afin de posséder un « témoin négatif » pour l'étude de l'incorporation de complexes de lanthanide.

Ces nanoparticules de silice sont obtenues par une procédure classique de microémulsion inverse (w/o), impliquant du TEOS comme précurseur de silice, le cyclohexane comme phase organique, du tensioactif NP-5 et de l'ammoniaque à 20% massique comme phase aqueuse (**Tableau 15**).⁶⁹

Tableau 15 : Concentrations utilisées pour la synthèse de NPs de silice par microémulsion w/o.

Composés intervenant dans la synthèse	TEOS	NP-5	H ₂ O	NH ₃
Concentrations (mMol.L ⁻¹)	103	92	170	42

Ce système nous a permis de produire des nanoparticules d'un diamètre moyen proche de 20 nm et avec une excellente distribution de tailles (écart-type de 3 nm), comme l'attestent les clichés de microscopie électronique à transmission (MET) réalisés avec ces nanoparticules (**Figure 51**).

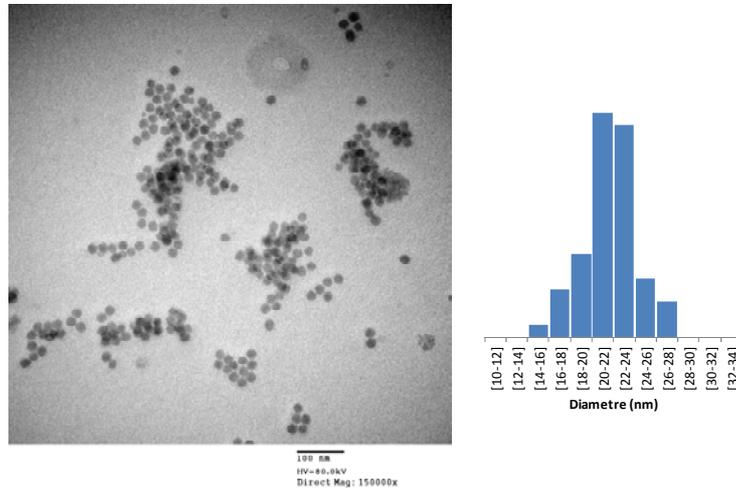


Figure 51 : Cliché MET des nanoparticules de silice synthétisées par microémulsion w/o, et distribution des diamètres.

1.2. Synthèse de nanohybrides luminescents

Des essais d'incorporation ont ensuite été réalisés sur les complexes sélectionnés dans la partie précédente. Pour rappel, les complexes choisis pour leur incorporation sont ceux synthétisés à partir des diacides **39-43** et **45**, ainsi que ceux formés à partir du DPA, notre référence (**Figure 52**).

A partir des conditions mises au point pour la synthèse de nanoparticules de silice, les essais d'encapsulation ont été conduits en ajoutant les complexes de lanthanide à la phase aqueuse, à des concentrations variant de 0,01 à 0,075 mol.L⁻¹ selon la solubilité du complexe (**Tableau 16**).

La morphologie ainsi que la distribution du diamètre des nanoparticules ont ensuite été déterminées par MET (**Figure 53**). Les nanoparticules obtenues possèdent une forme sphérique, un diamètre moyen proche de 20 nm avec une distribution étroite de leur diamètre (**Tableau 17**). La présence de complexes de lanthanide dans la phase aqueuse n'affecte donc ni la taille ni la morphologie des nanoparticules résultantes.

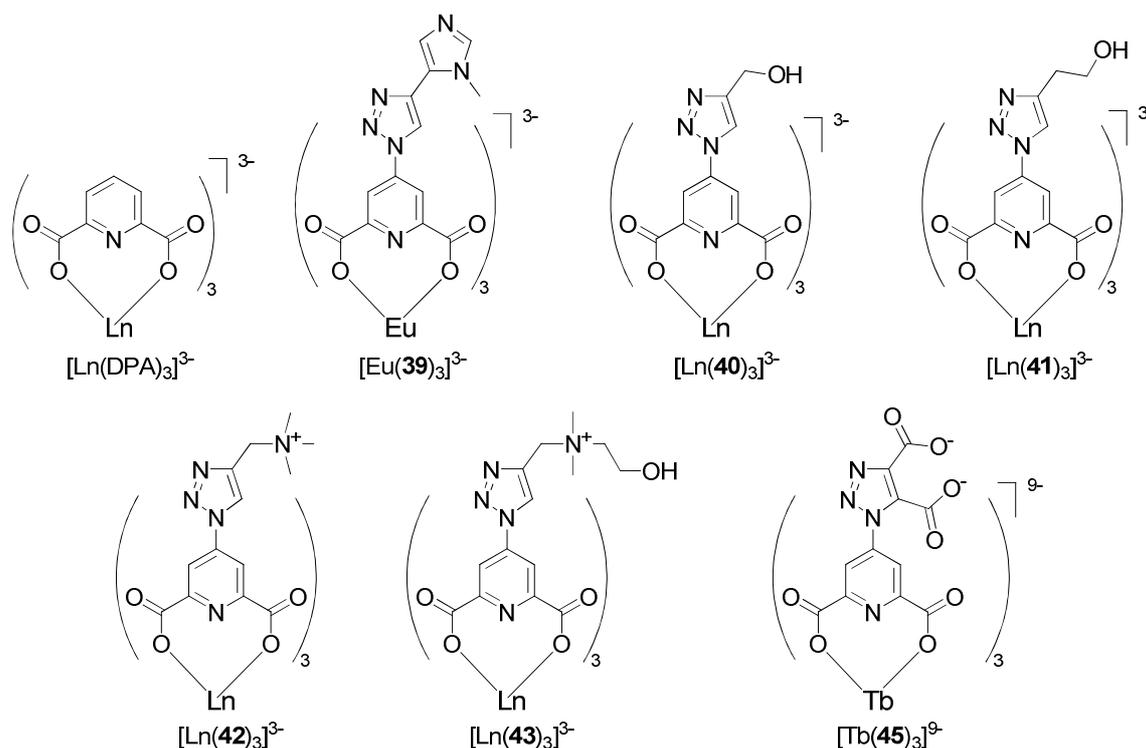


Figure 52 : Complexes sélectionnés pour la réalisation de nanohybrides.

Tableau 16 : Concentrations utilisées pour la synthèse de nanohybrides par microémulsion w/o.

Complexes	Particules	Concentrations (mMol.L ⁻¹)					Temps de réaction (heures)
		[TEOS]	[NP ₅]	[LnL ₃]	[H ₂ O]	[NH ₃]	
/	NP-Silice pure	103	92	/	170	42	24
[Eu(DPA) ₃]Na ₃	NP-Eu(DPA) ₃	103	92	0,075	182	35	24
[Tb(DPA) ₃]Na ₃	NP-Tb(DPA) ₃	103	92	0,075	182	35	24
[Eu(39) ₃] Na ₃	NP-Eu(39) ₃	103	92	0,010	182	35	24
[Eu(40) ₃] Na ₃	NP-Eu(40) ₃	103	92	0,019	182	35	24
[Tb(40) ₃] Na ₃	NP-Tb(40) ₃	103	92	0,019	182	35	24
[Eu(41) ₃] Na ₃	NP-Eu(41) ₃	103	92	0,019	182	35	24
[Eu(42) ₃]	NP-Eu(42) ₃	103	92	0,075	182	35	24
[Tb(42) ₃]	NP-Tb(42) ₃	103	92	0,075	182	35	24
[Eu(43) ₃]	NP-Eu(43) ₃	103	92	0,075	182	35	24
[Tb(43) ₃]	NP-Tb(43) ₃	103	92	0,075	182	35	24
[Tb(45) ₃]Na ₉	NP-Tb(45) ₃	103	92	0,050	182	35	24

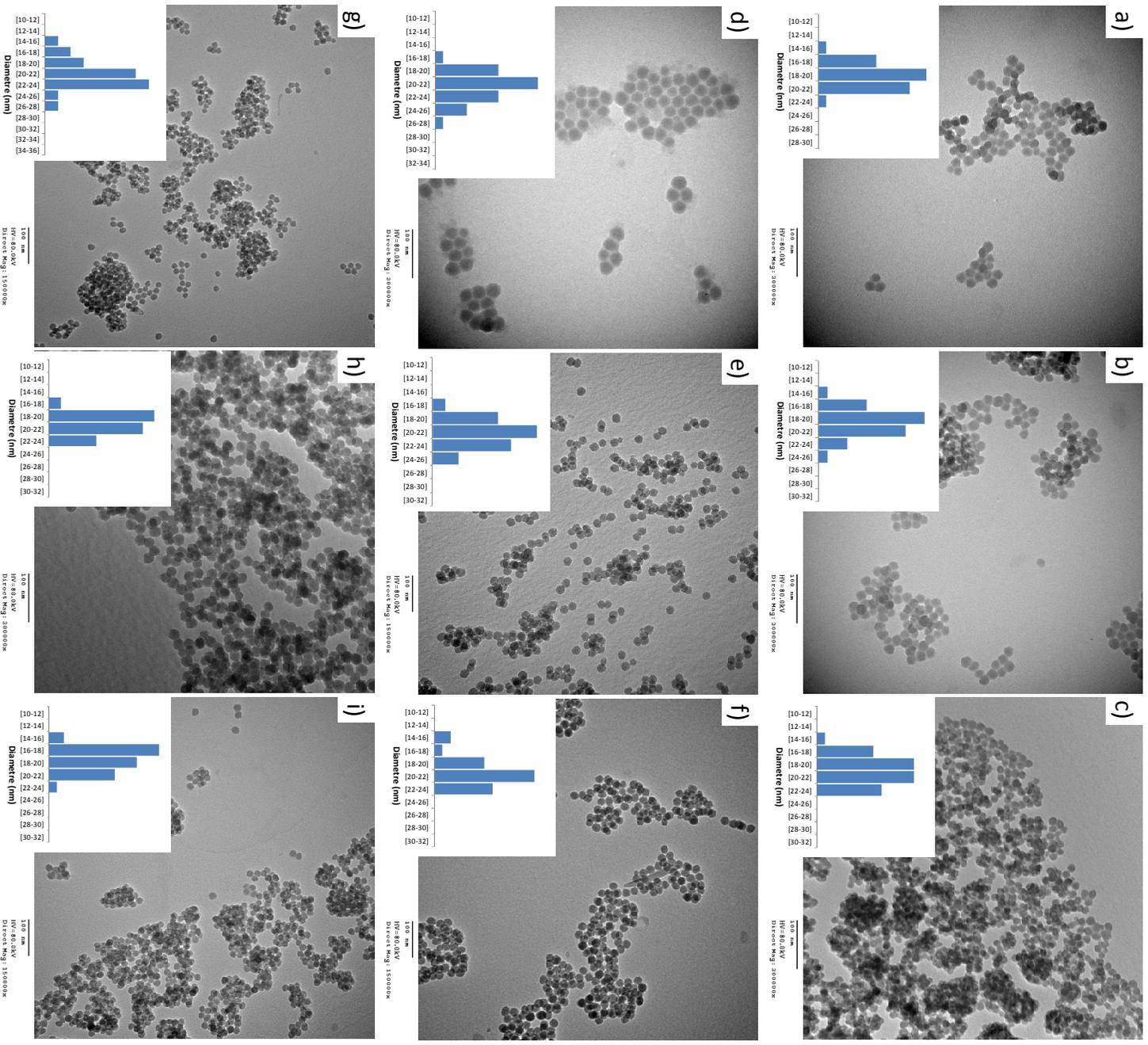


Figure 53 : Clichés MET des nanoparticules synthétisées en présence de complexes de lanthanides, et distribution de diamètres des NPs. a) NP-Eu(DPA)₃ ; b) NP-Tb(DPA)₃ ; c) NP-Eu(39)₃ ; d) NP-Eu(40)₃ ; e) NP-Eu(41)₃ ; f) NP-Eu(42)₃ ; g) NP-Eu(43)₃ ; h) NP-Eu(43)₃.

Tableau 17 : Diamètre moyen des NPs synthétisées en présence des complexes de lanthanide.

Particules	Diamètres moyens (nm)	Ecart-type (nm)
NP-Silice pure	21,8	± 3
NP-Eu(DPA) ₃	19,7	± 3
NP-Tb(DPA) ₃	19,6	± 3
NP-Eu(39) ₃	20,0	± 3
NP-Eu(40) ₃	21,6	± 3
NP-Tb(40) ₃	21,3	± 3
NP-Eu(41) ₃	20,9	± 2
NP-Eu(42) ₃	22,0	± 3
NP-Tb(42) ₃	21,1	± 3
NP-Eu(43) ₃	20,2	± 2
NP-Tb(43) ₃	18,9	± 2
NP-Tb(45) ₃	19,5	± 3

Le potentiel zêta ζ fournit des informations sur la charge électrique à la surface des nanoparticules en suspension. La valeur absolue de ce potentiel dépend de l'intensité de la charge électrostatique à la surface des nanoparticules. Le signe du potentiel ζ dépend de celui de la charge de la nanoparticule. Par convention, un potentiel ζ négatif correspond à des particules négativement chargées, et un potentiel positif correspond à des nanoparticules de charge positive.

Cet outil permet donc de suivre les modifications pouvant apparaître à la surface des nanoparticules. Il permet également d'évaluer la stabilité de suspensions colloïdales, puisqu'un fort potentiel implique une forte charge électrique sur les particules, entraînant une forte répulsion entre ces dernières et augmentant alors la stabilité des suspensions.

La mesure du potentiel ζ de suspensions de nanoparticules à pH 7,4 n'a pas montré de différence significative entre les nanoparticules synthétisées en absence ou en présence de complexes. En effet, ce potentiel est toujours proche de -21 mV, indiquant que les surfaces des nanoparticules sont très similaires.

1.3. Propriétés de luminescence des nanohybrides en optique linéaire

Les propriétés de luminescence de ces nanoparticules ont ensuite été étudiées afin de déterminer si les complexes de lanthanides ont bien été incorporés dans les nanoparticules au cours de la synthèse de celles-ci. Cette étude a été réalisée à l'état solide et en suspension dans l'eau à une concentration de 1 mg.mL^{-1} .

Les nanoparticules ne se sont toutefois pas toutes révélées fluorescentes. En effet, que ce soit en suspension ou à l'état solide, seules les nanoparticules synthétisées en présence des complexes issus des diacides **42** et **43** présentent la fluorescence caractéristique des complexes de lanthanide. Les nanoparticules synthétisées en présence des complexes issus du DPA ou des diacides **39-41** et **45** ne montrent quant à elles aucune fluorescence sous excitation UV.

1.3.1. En suspension

Les nanoparticules luminescentes présentent des spectres d'émission caractéristiques des ions lanthanide incorporés.

Les spectres d'excitation des nanoparticules, enregistrés à 616 nm pour l'euporium et 545 nm pour le terbium, sont caractérisés par un maximum à 280 nm et diffèrent largement de ceux des complexes correspondants en solution (**Figure 54**) qui eux présentent un maximum situé aux alentours de 228 nm (**Figure 55**).

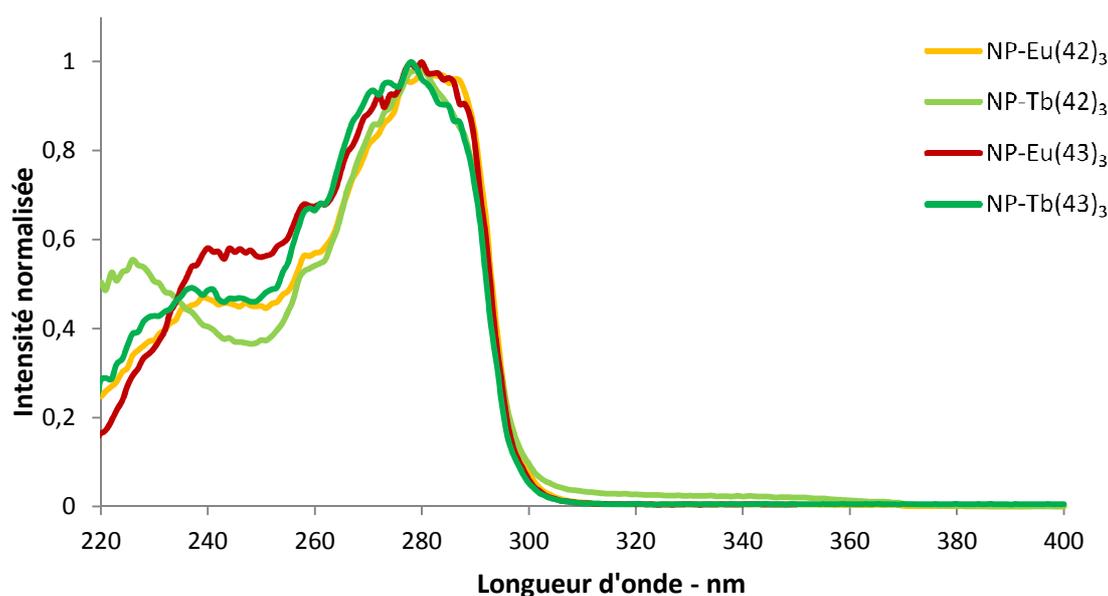


Figure 54 : Spectres d'excitation des nanoparticules NP-Ln(**42**)₃ et NP-Ln(**43**)₃ en suspension.

Cette différence dans l'allure générale ainsi que dans le maximum d'excitation, que l'on pourrait rapprocher des différences déjà observées entre les spectres d'excitation des complexes en solution et à l'état solide, s'explique par le changement d'environnement subi par le complexe après encapsulation. Le fait que le spectre d'excitation des nanohybrides en suspension dans l'eau soit différent de celui du complexe en solution permet par ailleurs de confirmer l'encapsulation de ce dernier dans la matrice de silice.

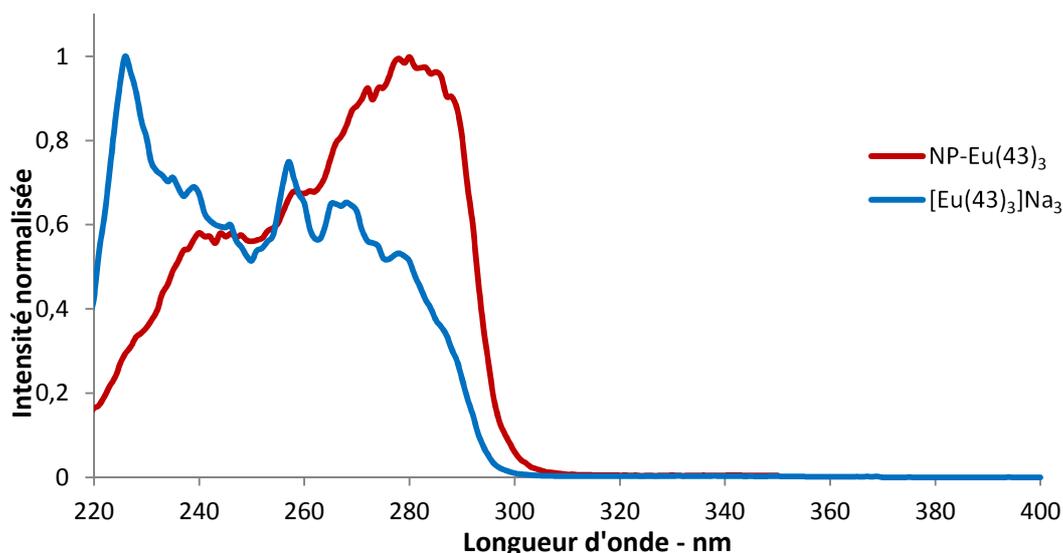


Figure 55 : Spectres d'excitation du complexe $[\text{Eu}(\mathbf{43})_3]\text{Na}_3$ en solution et des nanoparticules $\text{NP-Eu}(\mathbf{43})_3$ en suspension.

Les durées de vie de la fluorescence des nanoparticules ont ensuite été mesurées (**Tableau 18**). Les temps de demi-vie obtenus sont sensiblement identiques à ceux des complexes en solution, tout comme les contributions relatives dans les cas de décroissance de luminescence bi-exponentielle.

Tableau 18 : Temps de demi-vie de luminescence des nanoparticules luminescentes et des complexes de lanthanides correspondants, mesurés aux longueurs d'onde d'excitation indiquées.

Particules/complexes	Longueur d'onde (nm)	τ_1 (ms)	Contribution de τ_1	τ_2 (ms)	Contribution de τ_2
$\text{NP-Eu}(\mathbf{42})_3$	280	1,38	75%	0,23	25%
$[\text{Eu}(\mathbf{42})_3]$	226	1,25	77%	0,30	23%
$\text{NP-Tb}(\mathbf{42})_3$	279	0,74	100%		
$[\text{Tb}(\mathbf{42})_3]$	226	0,89	100%		
$\text{NP-Eu}(\mathbf{43})_3$	280	1,34	87%	0,35	13%
$[\text{Eu}(\mathbf{43})_3]$	226	1,22	79%	0,29	21%
$\text{NP-Tb}(\mathbf{43})_3$	278	0,77	100%		
$[\text{Tb}(\mathbf{43})_3]$	226	0,87	100%		

Les rendements quantiques de luminescence de nanoparticules en suspension ont également été mesurés (**Tableau 19**). Ces rendements quantiques se révèlent plus faibles que ceux des complexes correspondants, accusant dans la plupart des cas une diminution de moitié.

Tableau 19 : Rendements quantiques de luminescence des NPs et des complexes correspondants, mesurés à la longueur d'onde d'excitation indiquée.

Particules/complexes	Longueur d'onde (nm)	Φ (%)
NP-Eu(42) ₃	286	23
[Eu(42) ₃]	292	52
NP-Tb(42) ₃	289	6
[Tb(42) ₃]	289	12
NP-Eu(43) ₃	289	30
[Eu(43) ₃]	294	47
NP-Tb(43) ₃	290	6
[Tb(43) ₃]	289	11

Cette diminution du rendement quantique peut être expliquée par plusieurs hypothèses. Une partie de l'énergie incidente pourrait être absorbée par la matrice de silice, diminuant ainsi le rendement quantique par augmentation du nombre de photons absorbés. Il pourrait également s'agir d'une désexcitation non-radiative du lanthanide par la silice. Cette dernière hypothèse est cependant peu probable, au vu des temps de vie de luminescence des hybrides, proches de ceux des complexes correspondants.

1.3.2. A l'état solide

Les propriétés optiques de ces nanoparticules ont ensuite été étudiées à l'état solide.

L'analyse des spectres d'excitation, enregistrés à 616 nm pour l'euporium et 545 nm pour le terbium, met en évidence une fluorescence maximale des nanoparticules pour une excitation à 287 nm (**Figure 56**). Contrairement aux complexes, étudiés dans le chapitre précédent, ce maximum d'excitation à l'état solide est très proche de celui observé en suspension (280 nm). Cette proximité indique la faible dépendance des propriétés optiques par rapport à l'environnement de la nanoparticule, confirmant que les centres fluorophores (les complexes de lanthanides) sont isolés du milieu extérieur et situés au cœur des nanoparticules.

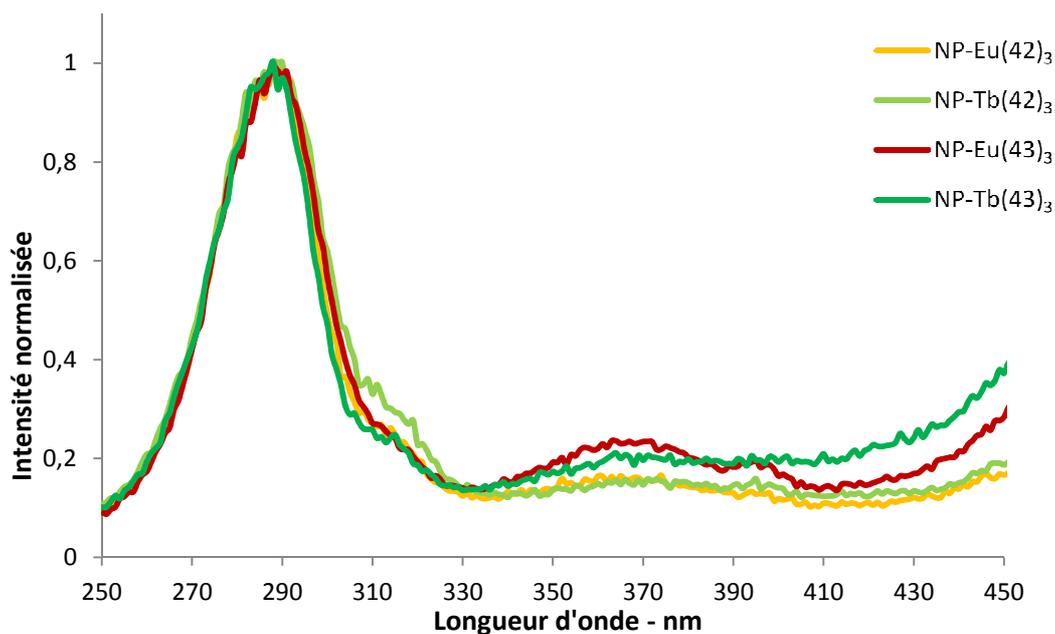


Figure 56 : Spectres d'excitation des nanoparticules NP-Ln(42)₃ et NP-Ln(43)₃ à l'état solide.

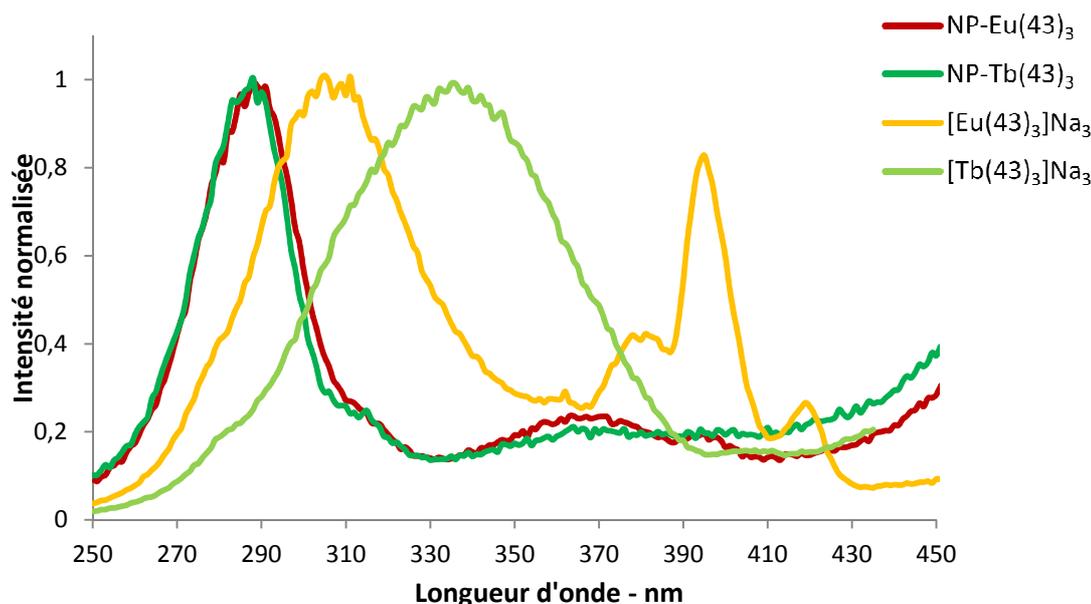


Figure 57 : Comparaison des spectres d'excitation des nanoparticules NP-Ln(43)₃ et des complexes [Ln(43)₃]Na₃ à l'état solide.

Un déplacement du maximum d'excitation est observé entre les nanoparticules luminescentes et les complexes de lanthanide correspondants, à l'état solide. Ce déplacement varie de 20 nm dans le cas des complexes d'euporium, à plus de 45 nm pour les complexes de terbium (**Figure 57**).

Les rendements quantiques observés à l'état solide sont quant à eux comparables à ceux obtenus en suspension, confirmant l'encapsulation des fluorophores au cœur des nanoparticules de silice.

1.4. Propriétés de luminescence des nanohybrides en optique non-linéaire

Des études antérieures réalisées sur des complexes d'euprium et de terbium obtenus à partir de 4-triazolyl dipicolinates avaient démontré la possibilité de générer facilement la fluorescence des lanthanides par absorption biphotonique et triphotonique.¹²²

Forts de ces résultats, nous nous sommes intéressés aux propriétés de luminescence des nanohybrides incorporant ce type de complexes en régime non-linéaire. Cette étude a été axée sur le nanohybride NP-Eu(**43**)₃, les propriétés photophysiques ne variant que très peu d'un hybride à l'autre.

La fluorescence de l'euprium (III) a pu être facilement générée sous irradiation laser impulsionnelle à 573 nm, longueur d'onde correspondant pour moitié à l'énergie de la transition $S_0 \rightarrow S_1$ déterminée précédemment (287 nm). Cette longueur d'onde se trouve également en dehors des transitions principales d'absorption de l'euprium(III), excluant toute excitation directe du lanthanide. La dépendance de l'intensité de fluorescence par rapport à l'intensité laser a également été déterminée et se révèle clairement quadratique, caractérisant un processus biphotonique (**Figure 58**).

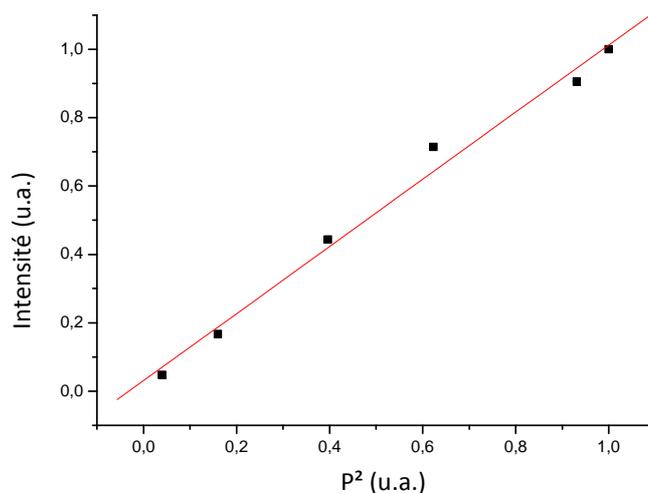


Figure 58 : Dépendance quadratique de la fluorescence de Eu^{3+} dans NP- $\text{Eu}(\mathbf{43})_3$, à $\lambda_{\text{em}} = 616$ nm et $\lambda_{\text{exc}} = 573$ nm.

Contrairement aux complexes, la fluorescence générée par absorption triphotonique à 860 nm est faible, et n'a pas permis l'analyse de sa dépendance en fonction de la puissance laser.

Un autre phénomène a cependant pu être observé au cours de cette étude, correspondant à l'apparition vers 730 nm de bandes dans le spectre d'excitation (**Figure 59**).

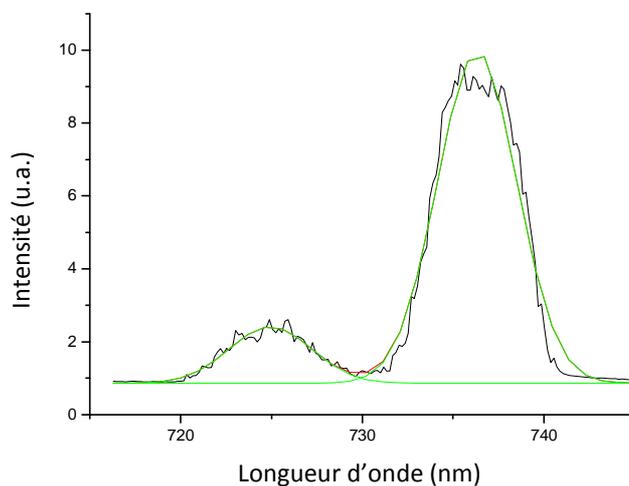


Figure 59 : Spectre d'excitation du nanohybride NP-Eu(**43**)₃ enregistré à $\lambda_{em} = 616$ nm.

Ces deux bandes, centrées à 725 nm et 736 nm, ont été attribuées à l'absorption biphotonique de la transition $S_0 \rightarrow T_1$. En effet, alors que cette transition est interdite en optique linéaire, elle devient possible dans le cas d'une absorption multiphotonique, du fait de la levée des règles de sélection. Il est alors possible d'exciter directement l'état triplet à partir de l'état singulet S_0 en se plaçant à la longueur d'onde correspondant pour moitié à l'énergie de cette transition.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons réalisé la synthèse du nanohybride NP-Gd(**43**)₃, à partir du complexe de gadolinium [Gd(**43**)₃]. Les états excités du gadolinium étant situés à des énergies bien plus élevées que les états excités des ligands couramment utilisés, tout transfert d'énergie du ligand vers le métal est impossible. La phosphorescence du ligand est par conséquent exacerbée par rapport à celle observée pour un complexe d'euporium. Cette phosphorescence permet généralement d'estimer la position de la transition $T_1(0) \rightarrow S_0(0)$, la désignation 0 concernant ici l'état purement électronique, sans couplage avec les vibrations moléculaires.

Le spectre de la phosphorescence du ligand a ensuite été obtenu en enregistrant le spectre d'émission du nanohybride NP-Gd(**43**)₃ sous excitation à 287 nm (**Figure 60**).

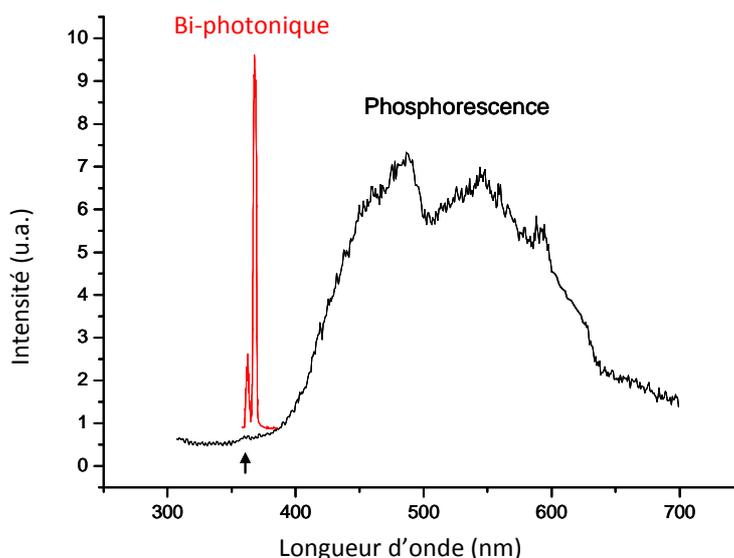


Figure 60 : Spectre d'émission du nanohybride NP-Gd(**43**)₃ obtenu à $\lambda_{exc} = 287$ nm, correspondant à la phosphorescence du ligand (en noir). En rouge, bande d'excitation attribuée à la transition $S_0 \rightarrow T_1$ (avec $\lambda/2$).

Le pied de la bande de phosphorescence, situé entre 360 et 370 nm, ainsi que la présence d'un léger épaulement vers 362 nm correspondant très probablement à la transition $T_1(0) \rightarrow S_0(0)$, permettent de placer approximativement l'état triplet vers 365 nm (27500 cm^{-1}).

En superposant à ce spectre de phosphorescence les bandes d'excitation biphotonique attribuée à la transition $S_0 \rightarrow T_1$ (en réduisant au préalable les longueurs d'onde de moitié), une concordance quasi parfaite peut être observée (**Figure 60**).

Cependant, cette transition $S_0 \rightarrow T_1$ devrait se traduire par l'apparition de 3 bandes, caractéristiques de la dégénérescence de l'état $T_1(0,1,2)$, alors que seulement deux bandes sont observées sur le spectre d'excitation. La gaussienne associée à la bande située à 736 nm semblant légèrement plus large que la seconde, il est possible que cette bande corresponde en réalité à deux transitions, trop proches pour être distinguées. La bande à 725 nm correspondrait donc à la transition $S_0(0) \rightarrow T_1(2)$, tandis que celle à 736 nm correspondrait aux transitions $S_0(0) \rightarrow T_1(1,0)$.

Nous avons dans un second temps étudié la dépendance de l'intensité de la fluorescence $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ de l'ion Eu^{3+} (émission à 616 nm) dans les NP-Eu(**43**)₃ en fonction de la puissance du faisceau laser à 736 nm (**Figure 61**).

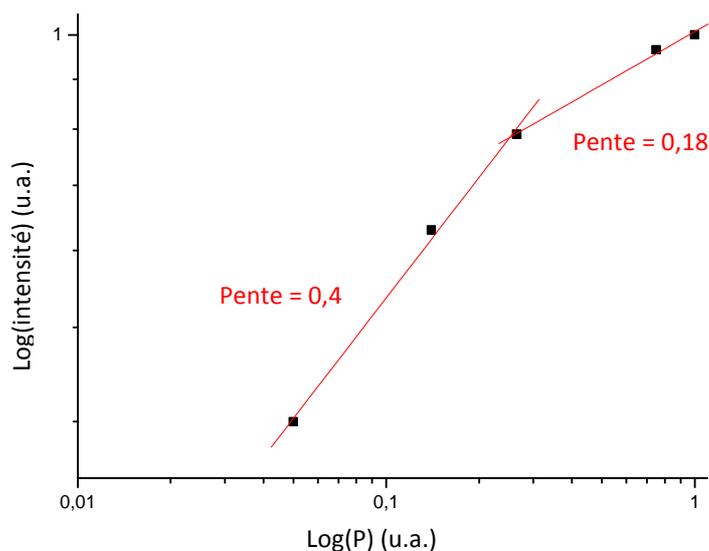


Figure 61: Dépendance de la fluorescence de Eu^{3+} dans NP-Eu(43)_3 , à $\lambda_{\text{em}} = 616 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{exc}} = 736 \text{ nm}$.

Cette dépendance n'est ni quadratique ni linéaire. En effet, deux régimes sont observés en fonction de la puissance laser. Le premier régime, d'une pente de 0,4, correspond aux faibles puissances. Le second, d'une pente de 0,18, apparait à fortes puissances. Ces observations semblent indiquer l'existence de divers canaux de désexcitation de l'état triplet autres que le simple transfert vers les états excités de l'ion Eu^{3+} .

1.5. Influence de la concentration en complexe sur le rendement quantique

Une courte étude a également été menée afin d'étudier l'influence de la concentration de complexe introduit dans la phase aqueuse lors de la synthèse des nanoparticules sur le rendement quantique de luminescence de celles-ci.

En diminuant la concentration de complexe dans la phase aqueuse, une baisse du rendement quantique est observée (**Tableau 20**). Cette diminution peut être expliquée par la plus grande proportion de complexes dissociés lors de la formation des nanoparticules et de l'incorporation de ces derniers. Cette dissociation partielle des complexes conduit à une plus grande désactivation de la luminescence par les oscillateurs O-H environnant le complexe encapsulé (molécules d'eau ou résidus silanol).

Tableau 20 : Rendements quantiques des nanoparticules pour différentes concentrations en complexe, mesurés à 280 nm en suspension.

Nanoparticules	[Eu(43) ₃] (mMol.L ⁻¹)	Φ (%)
NP-Eu(43) ₃	0,075	30
	0,050	24
	0,025	22

1.6. Conclusion

Il apparaît clairement d'après les résultats de l'étude optique que sur l'ensemble des complexes testés, seuls les complexes dérivés des diacides **42** et **43** sont incorporés dans les nanoparticules de silice lors de la synthèse par microémulsion, permettant l'obtention de nanohybrides luminescent de classe I. Un dosage des lanthanides dans ces nanohybrides par ICP-AES a permis d'établir un taux massique de 0,13% d'euporium, correspondant à l'incorporation d'environ 40 complexes par nanoparticules.

Cette encapsulation sélective peut être expliquée par une plus grande capacité de ces complexes à s'intégrer au réseau de silice, grâce à des interactions entre les groupements ammonium portés par les complexes et les groupements silanols déprotonés de la silice. En effet, les silanols sont acides (pKa = 5,5 pour un silanol isolé ¹³⁸) et sont rapidement déprotonés par l'ammoniaque formant la phase aqueuse.

Cette hypothèse explique également l'absence d'encapsulation des complexes [Ln(DPA)₃]³⁻, [Ln(**39**)₃]³⁻, [Ln(**40**)₃]³⁻, [Ln(**41**)₃]³⁻ et [Ln(**45**)₃]⁹⁻ également testés, puisque ces derniers sont chargés négativement et sont par conséquent incapables d'interagir avec le réseau de silice en formation.

L'incorporation des complexes au sein du réseau de silice affecte les propriétés de luminescence des fluorophores. Les spectres d'excitation sont modifiés, et les rendements quantiques chutent. La méthode mise au point reste cependant une méthode simple et efficace permettant d'obtenir des nanohybrides présentant la luminescence caractéristique des lanthanides.

De plus, l'étude des propriétés de luminescence des nanohybrides en optique non-linéaire confirme la possibilité de générer la fluorescence des lanthanides par excitation biphotonique du ligand.

Cette étude a également permis de mettre en évidence la transition $S_0 \rightarrow T_1$ en régime biphotonique. Cette transition pourrait par la suite permettre de positionner avec précision l'état triplet des ligands sans nécessiter la synthèse d'un complexe de gadolinium, le positionnement par phosphorescence pouvant par ailleurs s'avérer approximatif lorsque la transition $T_1(0) \rightarrow S_0(0)$ est de faible intensité.

2. Modification d'un « candidat » complexe pour son incorporation dans des nanoparticules

Le complexe $[\text{Eu}(\mathbf{39})_3]^{3-}$, évalué dans la partie précédente comme l'un des meilleurs candidats pour les nano-sondes, n'a pu être incorporé par cette méthode dans la matrice de silice des nanoparticules.

La présence d'un groupement ammonium semblant essentielle à l'incorporation du complexe, des modifications chimiques doivent être apportées au diacide **39**, sans toutefois altérer ses propriétés photophysiques. Nous nous sommes donc tournés vers la synthèse du diacide **48** (**Figure 62**). Le groupement ammonium étant éloigné du système π -conjugué par une chaîne alkyle, celui-ci ne devrait pas avoir d'influence sur les propriétés optiques.

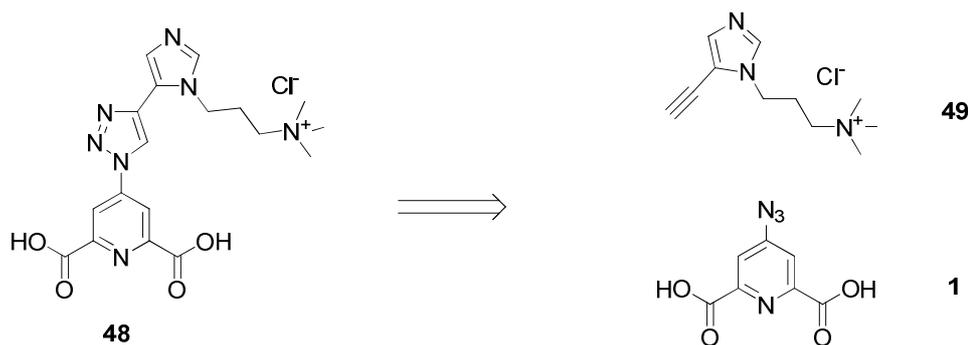


Figure 62 : Diacide **48**, et alcyne correspondant.

Ce diacide peut être aisément synthétisé par la méthode précédemment décrite, à partir de la plateforme triazole **1** et de l'imidazole disubstitué **49**. La véritable difficulté dans la synthèse de ce type de composés réside dans le manque de régiosélectivité des réactions permettant l'introduction de ces différents groupements sur un noyau imidazole. Cette

régiosélectivité peut cependant être atteinte par l'utilisation de groupements protecteurs apportant un fort encombrement stérique.

Van Leusen décrivait en 1977 la synthèse d'imidazoles 1,5-disubstitués par simple cycloaddition d'une imine avec l'isocyanure de tosylméthyle (**Schéma 29**).¹³⁹ Une analyse rétro-synthétique du composé **49** a pu être réalisée en se basant sur cette approche (**Schéma 30**).

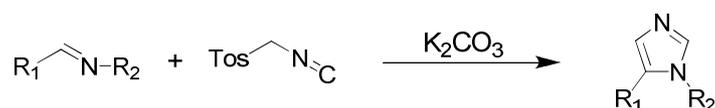


Schéma 29 : Cycloaddition de Van Leusen.

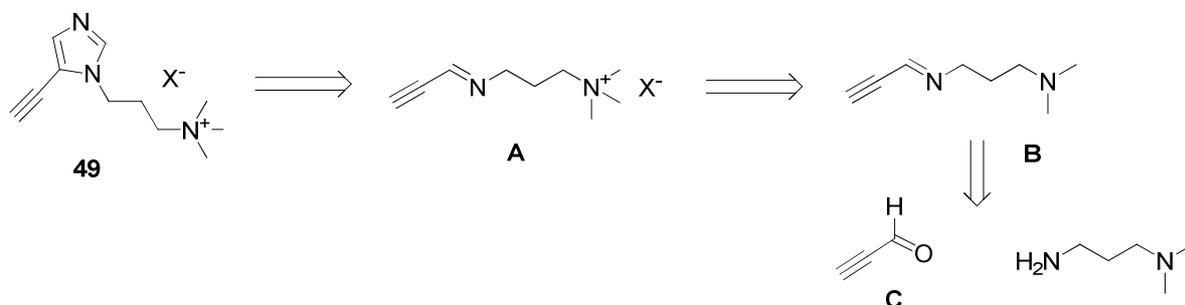


Schéma 30 : Analyse rétro-synthétique du composé **49**.

Nous nous sommes dans un premier temps intéressés à la synthèse de l'imine **B**, en procédant à l'oxydation de l'alcool propargylique par l'oxyde de manganèse, et à sa condensation *in-situ* avec la *N,N*-diméthyl-1,3-propanediamine en présence de tamis moléculaire (**Schéma 31**). Ces conditions n'ont pas permis d'isoler l'imine **B**, le produit final isolé étant le résultat de l'addition 1,4 de l'amine sur le propynal formé *in situ*.

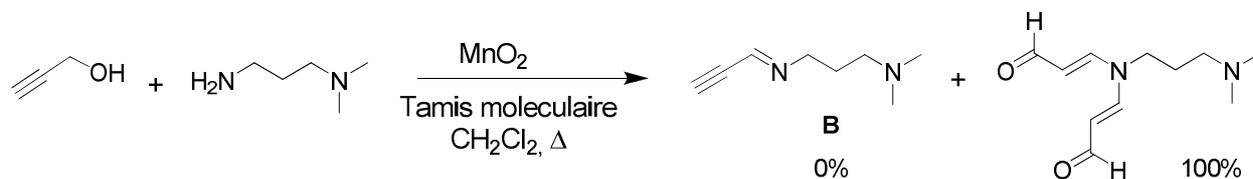


Schéma 31 : Essai de synthèse de l'imine **B**.

Cette synthèse a été reproduite après protection de la fonction alcyne de l'alcool propargylique par un groupement triméthylsilyle. L'imine **50** est ainsi obtenue avec un rendement de 78% (**Schéma 32**).

3.1. Fonctionnalisation de surface par des fonctions amine

3.1.1. Synthèse

Les fonctions amines sont introduites grâce à l'APTES (aminopropyltriéthoxysilane), qui est ajouté au milieu réactif lors de la seconde partie de la synthèse des nanoparticules. Cet ajout ultérieur permet la synthèse de nanoparticules de type cœur-coquille, avec un cœur de silice et une coquille externe riche en fonctions amines primaires (**Schéma 35**).

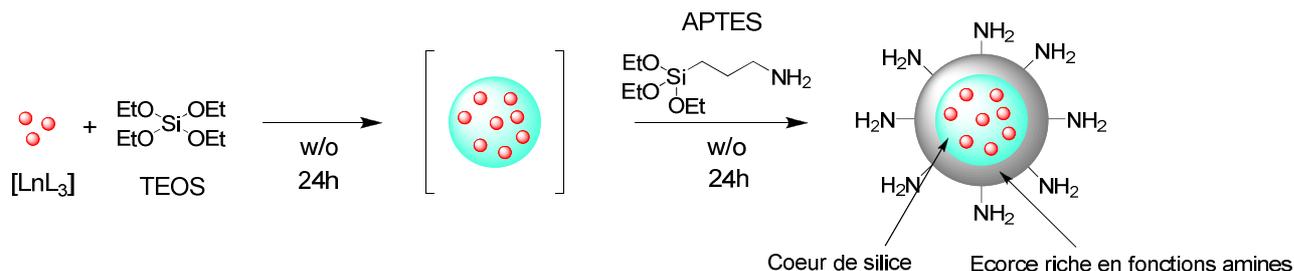


Schéma 35 : Synthèse de nanoparticules de silice fonctionnalisées en surface par des amines.

Cette stratégie de fonctionnalisation a été utilisée pour la synthèse de nanoparticules luminescentes fonctionnalisées en surface, en l'appliquant à la procédure mise au point dans la partie précédente.

Les nanoparticules obtenues par cette méthode sont de forme sphérique et d'un diamètre sensiblement plus élevé que celui des nanoparticules non fonctionnalisées, passant de 20 nm à 31 nm (**Figure 63**).

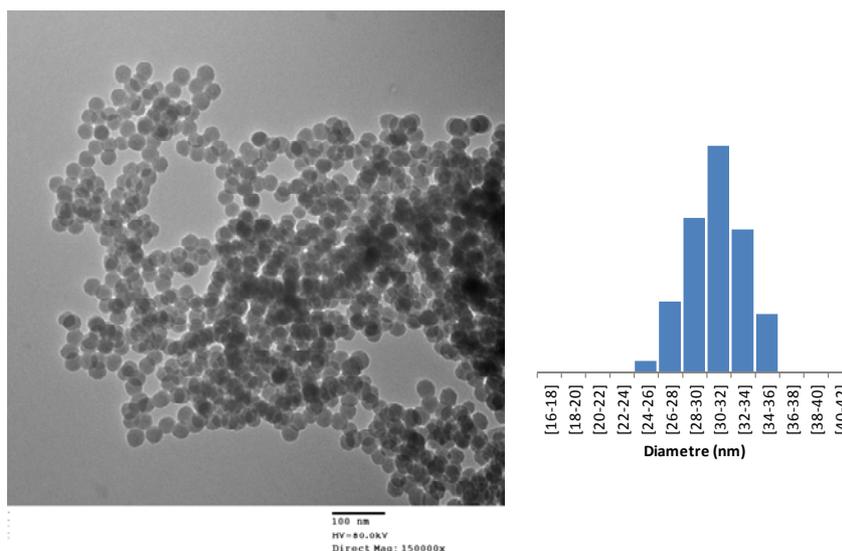


Figure 63 : Cliché MET des nanoparticules luminescentes fonctionnalisées en surface par des fonctions amines, NP-Eu(**43**)₃-NH₂.

3.1.2. Caractérisations

La présence de fonctions amines est ensuite confirmée par la mesure du potentiel ζ . En effet, une nette différence est observée entre le potentiel ζ des nanoparticules non fonctionnalisées et celui des NPs recouvertes de fonctions amines, qui passe de -21 mV à +26 mV. Ce changement de signe implique la disparition des groupements silanols en surface, qui sont remplacés par les fonctions amines partiellement protonées en NH_3^+ au pH de la mesure (pH 7,4).

La fonctionnalisation est également confirmée par l'analyse thermogravimétrique (ATG), grâce à la perte de masse importante observée au cours de l'élévation de température (**Figure 64**). Cette perte de masse, due à la pyrolyse des fonctions organiques au cours de l'analyse, permet d'évaluer la quantité de fonctions amines présentes dans les nanoparticules à $1,4 \text{ mmol.g}^{-1}$.

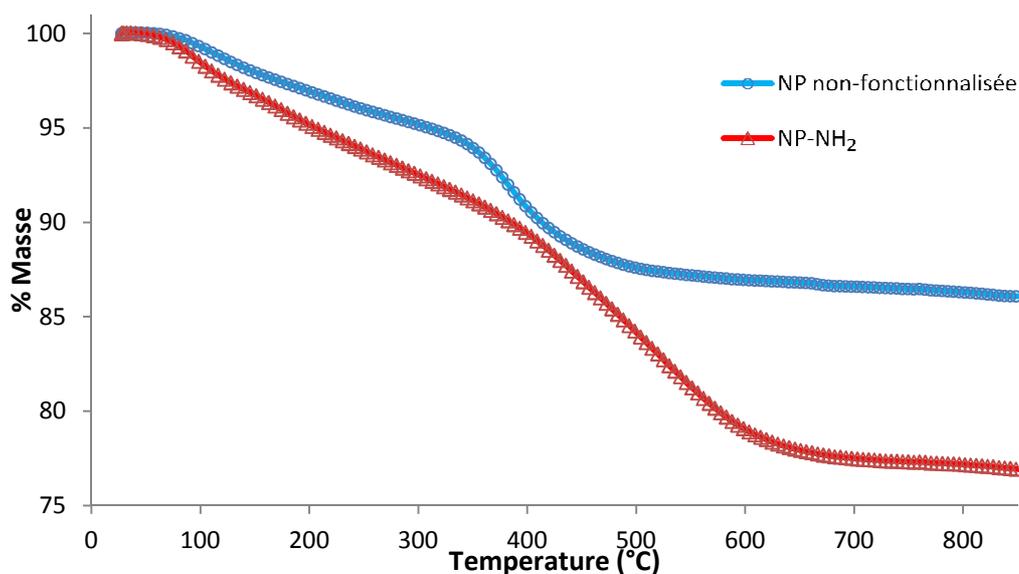


Figure 64 : Analyses thermogravimétriques de nanoparticules non-fonctionnalisées et de nanoparticules enrobées de fonctions amine (NP-NH₂).

Cependant, le résultat de l'ATG nous donne le taux de fonctions amine réparties sur l'ensemble des 5 nm d'épaisseur de la coquille fonctionnalisée. Il est essentiel de connaître le taux précis de fonctions réellement disponible en surface des nanoparticules, puisque ce seront ces fonctions de surface qui vont permettre le greffage de nouvelles molécules sur les nanoparticules.

Le taux de fonctionnalisation de surface a été déterminé grâce à l'utilisation de la technique du Fmoc-Cl (chlorure de fluorénylméthylloxycarbonyle).¹⁴⁰ La méthode de dosage

est basée dans un premier temps sur la réactivité du Fmoc-Cl vis-à-vis des amines (**Schéma 36**). Le carbamate formé quantitativement par cette réaction est ensuite décomposé quantitativement par l'ajout de DBU (diazabicycloundécène), libérant du 9-méthylène-fluorène qui peut être dosé par spectrophotométrie d'absorption. La concentration en 9-méthylène-fluorène libéré est égale à la concentration initiale en amines à la surface des nanoparticules.

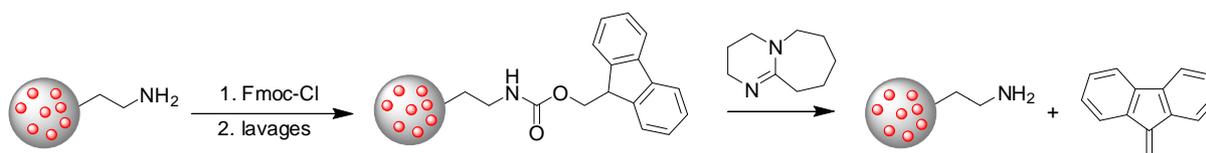


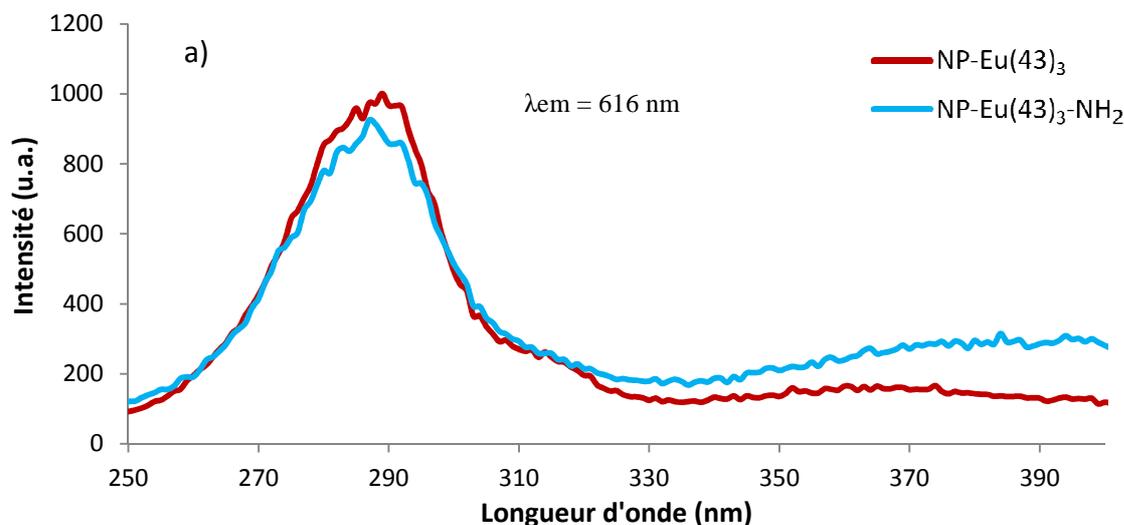
Schéma 36 : Principe du dosage des amines en surface par la méthode Fmoc.

Cette méthode nous a permis d'évaluer le taux de fonctions amines à la surface des nanoparticules à $0,2 \text{ mmol.g}^{-1}$, correspondant à une densité d'environ 1,2 fonctions par nm^2 .

3.1.3. Propriétés de luminescence

Une courte étude de luminescence a été menée sur ces nanoparticules fonctionnalisées, afin de vérifier que les propriétés de luminescence des nanohybrides n'étaient pas altérées par cette étape de fonctionnalisation.

Que ce soit en suspension ou à l'état solide, les nanohybrides fonctionnalisés NP-Eu(43)₃-NH₂ possèdent des propriétés optiques quasi identiques à celles des nanohybrides non-fonctionnalisés NP-Eu(43)₃ (**Figure 65**).



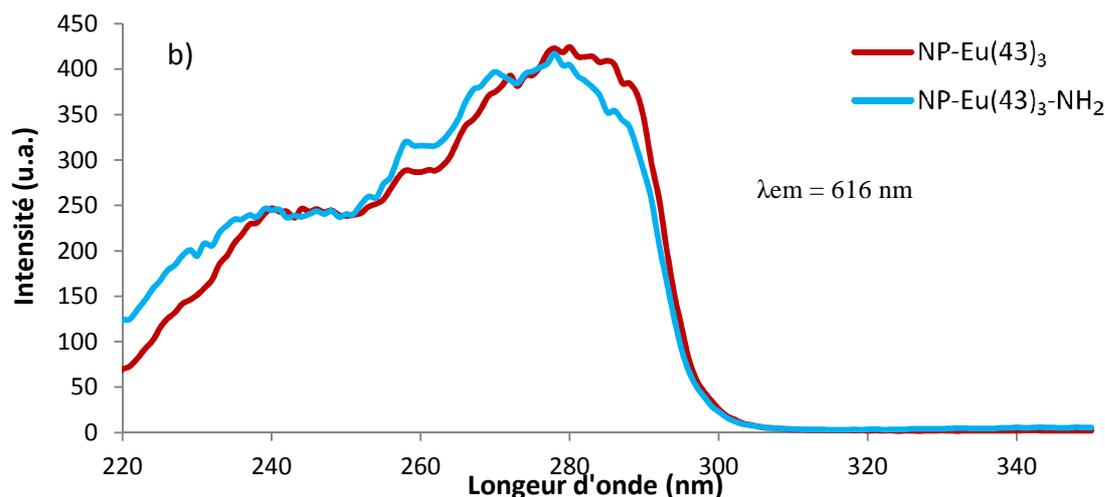


Figure 65 : Spectres d'excitation de NP-Eu(43)₃ et de NP-Eu(43)₃-NH₂, a) à l'état solide, b) en suspension.

3.2. PEGylation des nanoparticules

Comme nous l'avons vu précédemment, la vectorisation de nanoparticules requiert l'utilisation de bras espaceurs et d'agents de furtivité, permettant d'augmenter respectivement l'affinité du vecteur pour sa cible et le temps de circulation des nanoparticules dans l'organisme. Le polyéthylène glycol (PEG) est couramment utilisé pour ce rôle, puisqu'il peut remplir à la fois la fonction d'espaceur et d'agent de furtivité.

Pour que ce bras espaceur soit efficace, il doit avoir une longueur suffisante pour permettre au vecteur d'interagir avec le site ciblé. Dans le cas de la PSMA, cible envisagée pour la vectorisation des nano-sondes luminescentes vers les cellules tumorales prostatiques, le site actif dans lequel vient se loger un analogue du NAAG se situe au bout d'un tunnel de 20 Å de profondeur et d'une largeur de 9 Å.¹⁴¹⁻¹⁴³

Le bras espaceur reliant l'analogue du NAAG à la nano-sonde doit par conséquent avoir une longueur supérieure à 20 Å, afin de permettre à ce dernier de se lier dans la poche du site actif. Notre choix s'est donc porté sur une chaîne PEG comportant 11 unités éthylène glycol, correspondant à une longueur d'environ 40 Å.¹⁴⁴

3.2.1. Synthèse

Le greffage des chaînes PEG a été réalisé par couplage peptique. Pour ce faire, le PEG homobifonctionnel portant à ses extrémités deux esters de N-hydroxysuccinimide (NHS-PEG-NHS, **52**) a été synthétisé à partir du diacide commercial correspondant (HOOC-PEG-COOH,

$m = 600 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) (**Schéma 37**). Ces esters de NHS permettent d'activer les fonctions acides, qui réagissent alors avec les amines pour former des liens amides.

Des nanoparticules luminescentes fonctionnalisées par des amines, en suspension dans le dichlorométhane, ont été traitées avec le composé **52** et ont permis d'obtenir des nanoparticules PEGylées (**Schéma 37**). Afin d'éviter la réticulation des nanoparticules, un large excès de PEG **52** est utilisé pour ce couplage (40 éq.).

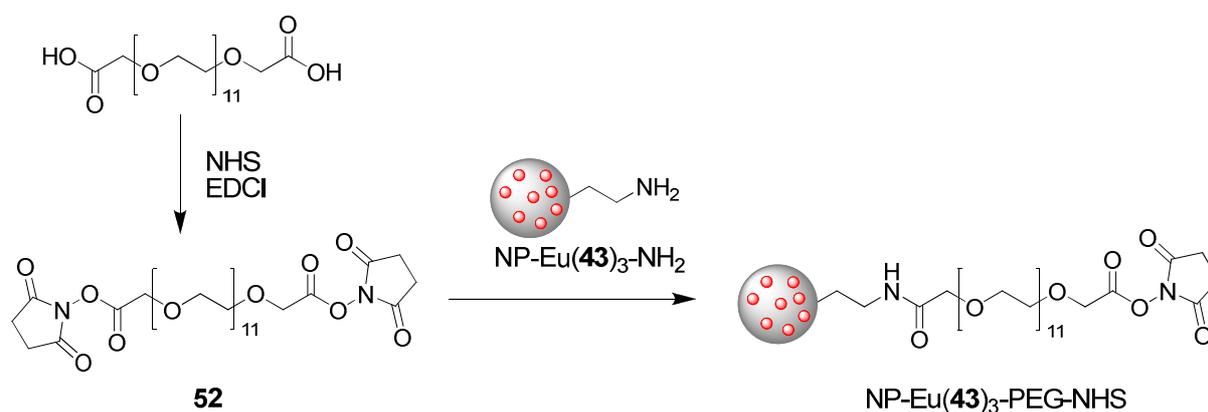


Schéma 37 : PEGylation de nanoparticules fonctionnalisées par des amines.

3.2.2. Caractérisations

Les images MET des nanoparticules NP-Eu(43)₃-PEG-NHS ne montrent aucune altération de la morphologie ou de la taille des nanoparticules après PEGylation (**Figure 66**). De plus, l'excès de PEG **52** utilisé pour la fonctionnalisation semble limiter efficacement la réticulation des nanoparticules.

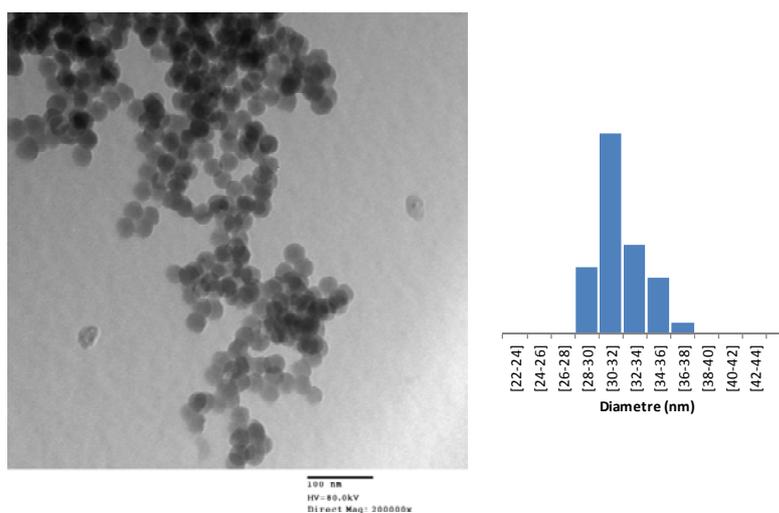


Figure 66 : Clichés MET de nanoparticules luminescentes PEGylées, NP-Eu(43)₃-PEG-NHS.

La PEGylation des nanoparticules est confirmée par zétamétrie. Pour ce faire, les nanoparticules sont placées en suspension dans un tampon Tris.HCl 0,1 M à pH 7,5 pendant 24 heures, afin d'hydrolyser les groupements esters de NHS situés en bout de chaîne (**Schéma 38**). Une inversion du potentiel ζ est alors observée, passant de +26 mV pour les NP-NH₂ à -24,5 mV après PEGylation et hydrolyse des esters terminaux.

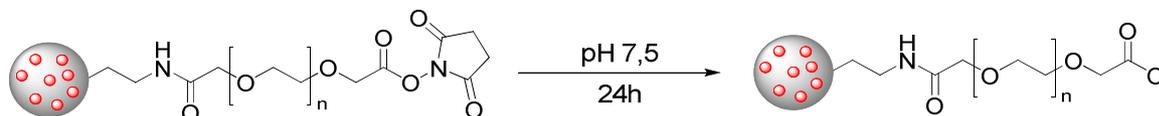


Schéma 38 : Hydrolyse des extrémités ester de NHS en milieu basique.

3.3. Conclusion

La synthèse de nanohybrides luminescents fonctionnalisés en surface par des amines a été conduite avec succès, sans modification des propriétés optiques de l'hybride. Cette fonctionnalisation de surface a ensuite été utilisée pour le greffage de chaînes PEG par le biais d'un couplage peptidique.

La présence d'un ester de NHS à l'extrémité de ces chaînes PEG autorise maintenant la conjugaison de ces nanohybrides luminescents avec de nouvelles molécules possédant une fonction amine primaire, grâce à un nouveau couplage peptidique.

4. Stabilité des nanohybrides en suspension

La durabilité de l'encapsulation des luminophores dans les nanohybrides a ensuite été étudiée. Pour cela, des nanoparticules NP-Eu(43)₃ et NP-Eu(43)₃-NH₂ ont été placées dans des tampons citrate-phosphate couvrant une gamme de pH allant de 5 à 8. L'avantage de ce dernier tampon réside dans la présence d'ions phosphates, qui sont connus pour capturer les ions lanthanides en solution, empêchant ainsi toute fluorescence de leur part en cas de relargage de complexes.

Après 14 jours en suspension dans les différents tampons, les nanoparticules ont été isolées par centrifugation. Leur luminescence a été mesurée en suspension dans l'eau, et l'intensité d'émission normalisée par rapport à celle de suspensions de NP-Eu(43)₃ et NP-Eu(43)₃-NH₂ (**Figure 67**).

Aucune variation de luminescence n'a été observée après 14 jours en suspension à pH 5-6 pour les deux types de nanoparticules. Leur comportement diverge cependant à pH plus

élevé. En effet, alors que les nanoparticules fonctionnalisées NP-Eu(43)₃-NH₂ montrent une remarquable stabilité, la luminescence des nanoparticules non-fonctionnalisées NP-Eu(43)₃ décroît de plus de 40% à pH 8. Cette différence de comportement entre les deux types de nanoparticules est très probablement due à la protection apportée par la couche supplémentaire de silice fonctionnalisée présente sur les NP-Eu(43)₃-NH₂.

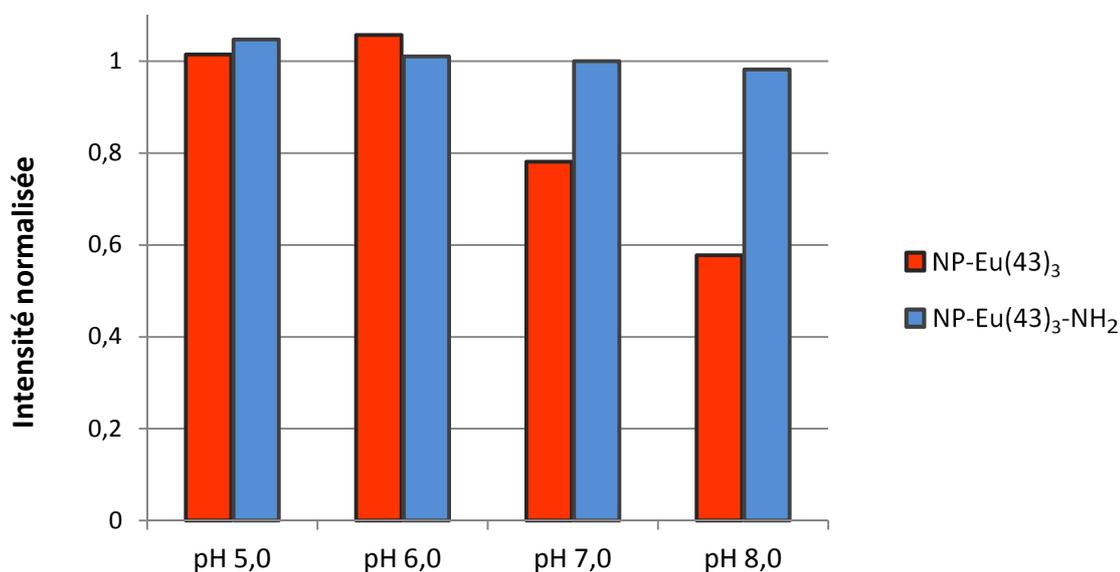


Figure 67 : Luminescence des nanoparticules après 14 jours en suspension dans des tampons citrate-phosphate (pH 5-8).

5. Conclusion

Dans ce chapitre, l'élaboration de nanohybrides luminescents de classe I a été décrite par encapsulation directe de complexes de lanthanide au sein de nanoparticules de silice. Cette encapsulation n'est cependant observée que dans le cas de complexes formés à partir de ligands portant un groupement ammonium.

La synthèse « one-pot » de nanohybrides luminescents fonctionnalisés en surface à ensuite été mise au point. Cette fonctionnalisation a pu être utilisée pour greffer des chaînes PEG à la surface des nanoparticules. La présence d'ester de NHS à l'extrémité de ces chaînes PEG pourra être utilisée pour le greffage ultérieur de molécules vectrices.

Enfin, l'étape de fonctionnalisation semble améliorer la stabilité des nanoparticules à pH élevé, leur permettant de conserver leurs propriétés optiques après plus de 14 jours à pH 8.

Les propriétés photophysiques des nanohybrides ont également été étudiées en régime linéaire et non-linéaire. Ce dernier a notamment permis de mettre en évidence la transition

$S_0 \rightarrow T_1$, qui pourrait permettre de positionner rapidement et avec précision les états triplets de ce type de complexes.

**Chapitre IV. Synthèse de nouveaux
inhibiteurs de la PSMA et vectorisation des
nanohybrides luminescents**

Afin d'obtenir la nano-sonde vectorisée envisagée au début de ce projet, il est maintenant nécessaire de fixer à la surface des nanoparticules luminescentes précédemment obtenues un ligand spécifique des cellules tumorales prostatiques. Comme souligné en introduction de ce travail, la PSMA constitue une cible prometteuse, de par sa localisation membranaire et sa forte surexpression dans le cas du cancer de la prostate, et de nombreuses tumeurs solides non-prostatiques.

Il convient donc d'utiliser des ligands de la PSMA en tant que vecteurs des nanoparticules.

1. Nouveaux inhibiteur de la PSMA

La PSMA a pour substrat naturel le *N*-acétyl-aspartyl-glutamate (NAAG) (**Figure 68**).

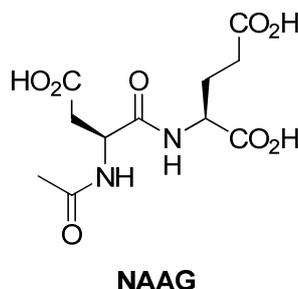


Figure 68 : *N*-acétyl-aspartyl-glutamate, substrat naturel de la PSMA.

Il est évidemment impossible d'utiliser directement le NAAG pour le ciblage de la PSMA puisque cette protéine catalyse sa dégradation.

Comme nous l'avons noté précédemment, plusieurs analogues du NAAG se sont révélés être des inhibiteurs de la PSMA et ont été utilisés pour la vectorisation de complexes radioactifs ou de nanoparticules vers des cellules tumorales.¹¹⁵⁻¹¹⁷

Un de ces inhibiteurs, le DCL (*N*-[*N*-[(*S*)-1,3-dicarboxypropyl]carbamoyl]-(*S*)-lysine), est connu pour permettre la vectorisation de nanoparticules polymères vers la PSMA (**Figure 69**).¹⁴⁵ Etant donné les résultats remarquables obtenus avec ce vecteur, nous avons choisi de l'utiliser en tant que référence pour le ciblage de cellules tumorales prostatiques.

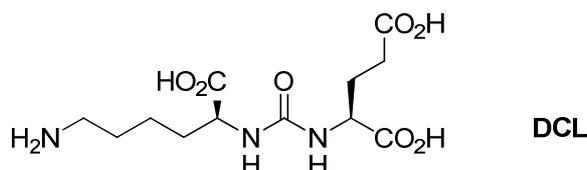


Figure 69 : Le DCL, inhibiteur de la PSMA permettant la vectorisation de nanoparticules.

Un autre aspect du projet initial était la synthèse de nouveaux inhibiteurs de la PSMA possédant une forte affinité pour cette dernière, afin d'améliorer le ciblage des cellules cancéreuses. A cette fin, une sélection de plusieurs candidats a été effectuée parmi plusieurs structures dérivées du NAAG, en fonction des affinités théoriques obtenues par modélisation moléculaire.

1.1. Sélection des candidats vecteurs

Klusak *et al.* ont déterminé par diffraction des rayons X la structure d'un complexe associant la PSMA et le NAAG, la protéine ayant été rendue inactive par le biais d'une mutation au niveau de son site actif.¹⁴⁶ La structure de ce complexe a permis de préciser la nature des interactions entre la PSMA et son substrat.

Les sites de fixation principaux sont au nombre de quatre (**Figure 70**). Le premier donne lieu à l'ancrage du carboxylate en position γ du résidu glutamique du NAAG sur la lysine 699 et l'asparagine 257 de la PSMA. Le deuxième site correspond à l'interaction entre le carboxylate en position α du résidu glutamique et l'arginine 210. Le carbonyle du résidu aspartique interagit avec l'un des deux centres zinciques du site actif et la tyrosine 552. Enfin, le quatrième site correspond à l'interaction du carboxylate de la chaîne latérale du résidu aspartique avec l'arginine 536.

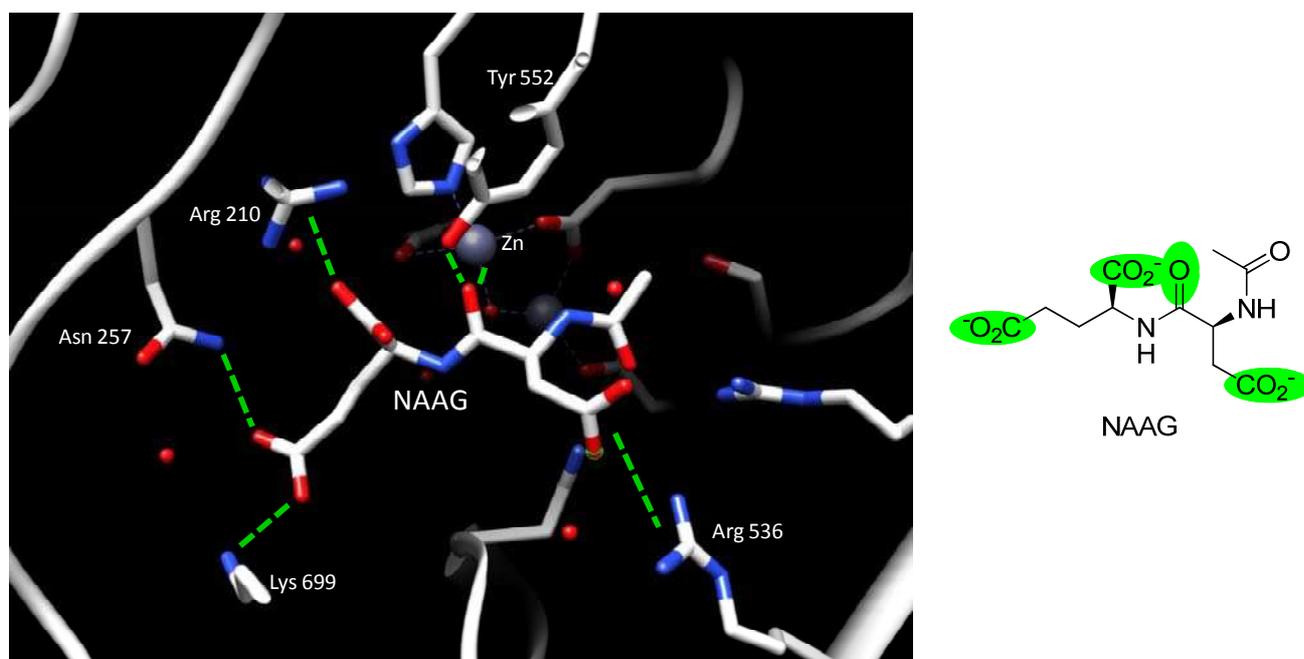


Figure 70 : Position du NAAG dans le site actif de la PSMA.

Afin d'obtenir des inhibiteurs performants possédant une forte affinité pour la PSMA, il convient de conserver ces sites d'interactions. Les structures proposées pour l'étude par modélisation moléculaire sont par conséquent dérivées de la structure générale suivante, qui conserve la majorité de ces points d'interaction (**Figure 71**).

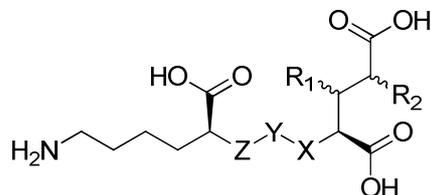


Figure 71 : Structure type des candidats vecteurs vers la PSMA.

La présence d'une amine primaire terminale permettra par la suite d'associer de manière covalente ces composés, par couplage peptidiques, aux nanoparticules préparées.

Les interactions entre le site actif de la PSMA et une sélection de 20 composés **D-N**, issus de la structure type proposée ci-dessus ont ensuite été calculées au service de Modélisation Moléculaire de l'ICCF, par Lionel Nauton et Vincent Théry. A cette sélection de 20 structures, ont été ajoutés le NAAG ainsi que le DCL en tant que références.

La préparation du fichier de la PSMA a été réalisée à partir de la PDB disponible 2XEG,¹⁴⁷ qui a été reprise à l'aide du programme Phenix afin de retravailler le site actif et de vérifier les positions alternatives des résidus. Les atomes d'hydrogène ont ensuite été ajoutés à l'aide du logiciel Chimera. Le docking a été réalisé grâce au logiciel de modélisation Sybyl-X, *via* le module Surflex-Dock, en utilisant le mode GeomX.

Le calcul des interactions a permis d'attribuer un score d'affinité théorique à chaque structure, un score élevé signifiant une forte affinité théorique (**Tableau 21**). Deux structures, (*S*)-**D** et (*R*)-**J**, présentent des scores d'affinité particulièrement élevés (respectivement 19,45 et 19,06), bien supérieurs aux scores d'affinité du DCL (17,60) et du NAAG (15,03). Ces scores élevés laissent supposer une forte affinité de ces composés pour la PSMA. Ces composés (*S*)-**D** et (*R*)-**J** ont par conséquent été considérés comme des candidats prometteurs pour la vectorisation de nanoparticules vers les cellules tumorales prostatiques, et leur synthèse a été entreprise (**Figure 72**).

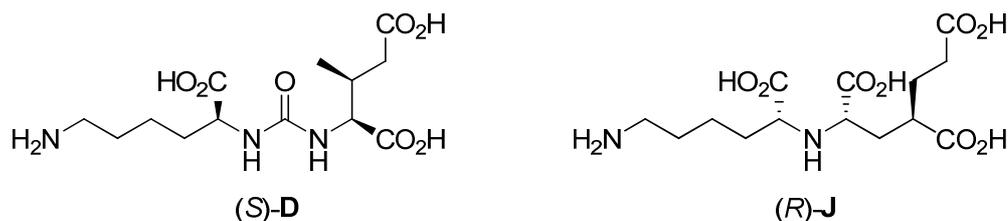
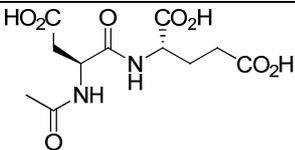
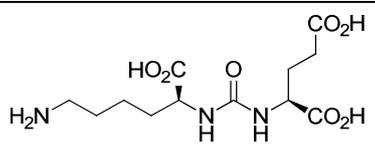
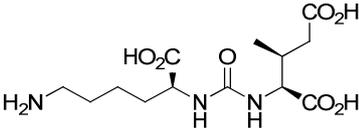
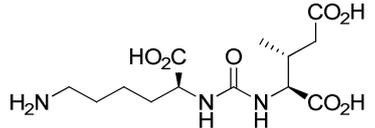
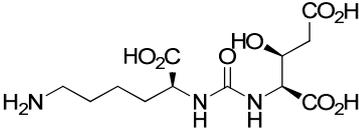
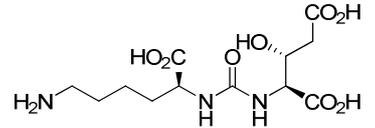
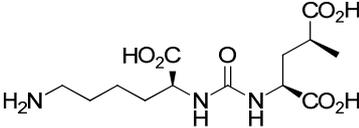
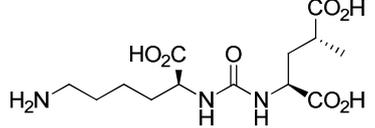
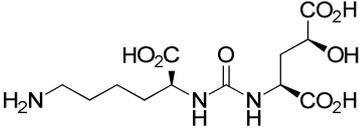
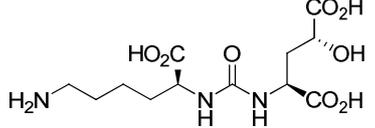
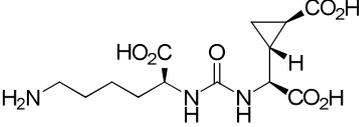
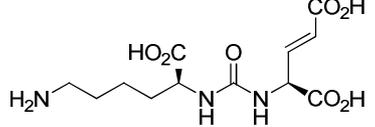
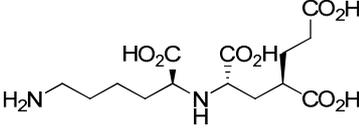
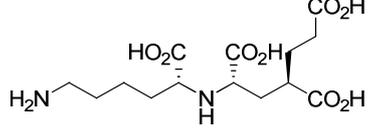
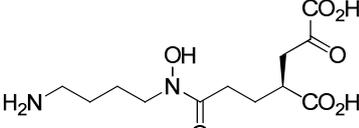
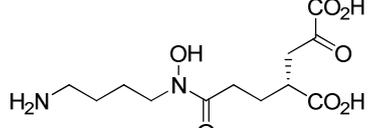
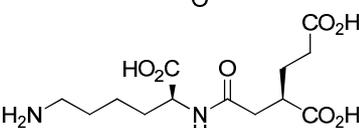
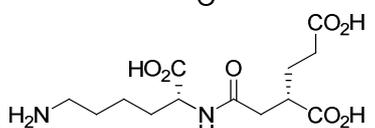
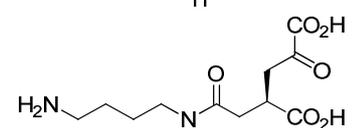
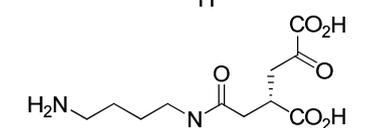
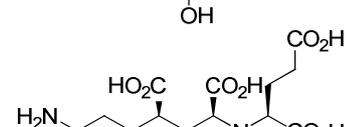
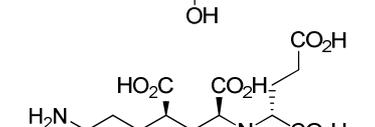


Figure 72 : Candidats vecteurs à haut score d'affinité théorique sélectionnés par modélisation moléculaire.

Tableau 21 : Structures de vecteurs potentiels, et scores d'affinité théoriques de ces structures pour la PSMA.

	Composés	Score d'affinité	Composés	Score d'affinité	
NAAG		15,03	DCL		17,60
(S)-D		19,45	(R)-D		18,10
(S)-E		17,69	(R)-E		17,64
(S)-F		17,37	(R)-F		17,82
(S)-G		17,60	(R)-G		17,46
H		17,85	I		17,50
(S)-J		16,09	(R)-J		19,06
(S)-K		16,68	(R)-K		15,77
(1S,2R)-L		14,78	(1R,2S)-L		18,03
(S)-M		14,20	(R)-M		15,11
(S)-N		16,90	(R)-N		17,01

1.2. Synthèse des candidats vecteurs

1.2.1. Analyses rétro-synthétiques des composés (S)-D et (R)-J

Le composé (S)-D peut être synthétisé par couplage de l'isocyanate **I** et d'une lysine dont la fonction amine terminale aura été préalablement protégée (**Schéma 39**). L'isocyanate **I** peut être obtenu facilement à partir de l'acide (3S)-méthylglutamique **53**, par traitement avec du phosgène. La synthèse de l'acide aminé **53** est discutée ci-après dans ce mémoire.

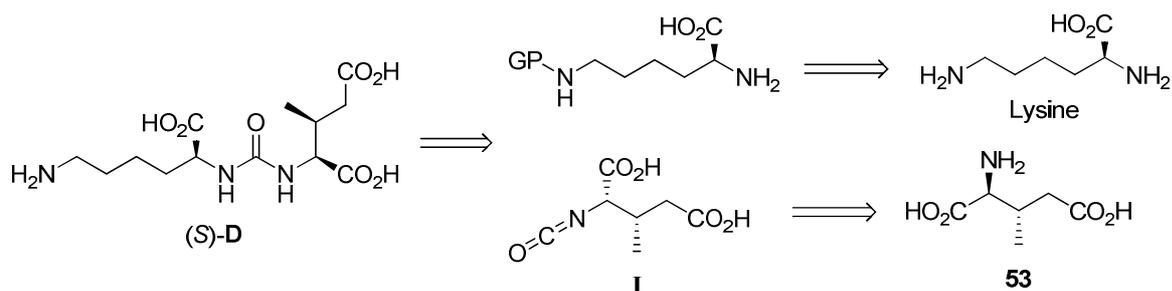


Schéma 39 : Rétrosynthèse du composé (S)-D.

Le composé (R)-J peut être obtenu par amination réductrice de la cétone **II** en utilisant l'acide aminé **54** (**Schéma 40**). L'amination réductrice n'étant vraisemblablement pas stéréosélective, le produit obtenu sera un mélange des composés (R)-J et (S)-J. Ces deux épimères pourraient être séparés par la suite. Le composé **II** peut être obtenu par oxydation de la lysine, après protection de la fonction amine de la chaîne latérale. La synthèse de l'acide aminé **54**, un analogue de l'acide glutamique, sera discutée ultérieurement.

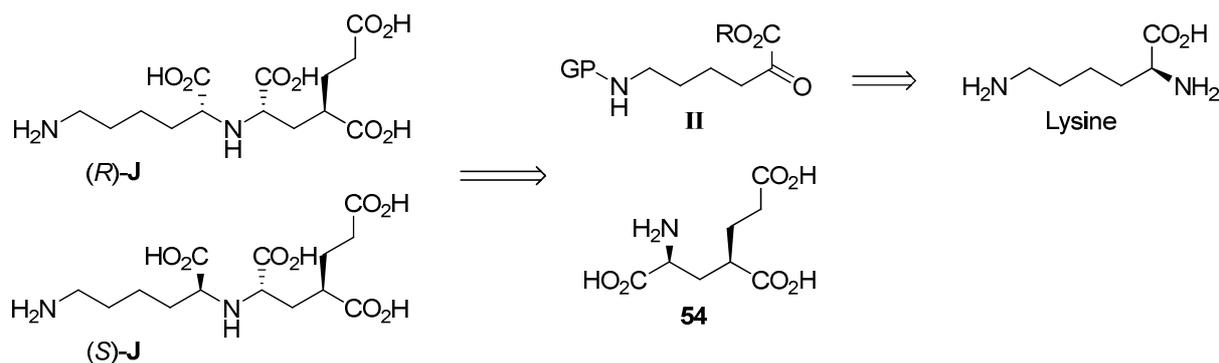


Schéma 40 : Rétrosynthèse des composés (R)-J et (S)-J.

1.2.2. Synthèse d'analogues de l'acide glutamique

Les stratégies de synthèse des composés (S)-D et (R)-J envisagées impliquent la synthèse des précurseurs **53** et **54**, deux acides aminés non-naturels analogues de l'acide L-glutamique (**Figure 73**).

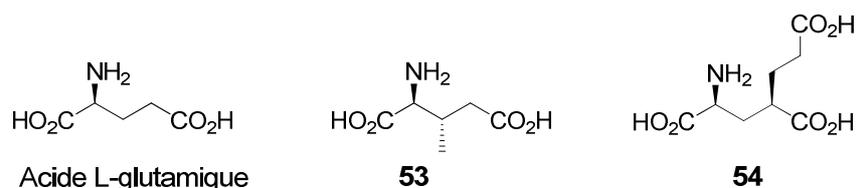


Figure 73 : Acide L-glutamique, analogues **53** et **54**.

La principale difficulté de synthèse de ce type de composé réside dans le contrôle de la stéréochimie, qui peut parfois s'avérer délicat. L'utilisation d'enzymes permet parfois d'apporter ce contrôle grâce à l'asymétrie intrinsèque du site actif de ces biocatalyseurs.

Ainsi, des acides aminés non naturels de la série L peuvent être synthétisés par biocatalyse à partir des α -cétoacides correspondants, grâce à une réaction de transamination. Cette réaction enzymatique réversible, catalysée par les aminotransférases (AT), permet le transfert d'un groupement amino entre un acide α -aminé et un α -cétoacide (**Schéma 41**).¹⁴⁸



Schéma 41 : Transamination entre α -cétoacides et acides aminés.

Comme l'ont montré des travaux antérieurs menés au laboratoire, cette stratégie de synthèse est applicable aux analogues du glutamate substitués en position 3 ou 4,¹⁴⁹⁻¹⁵² et a déjà été utilisée pour préparer les composés **53** et **54**.

Deux enzymes ont été utilisées pour effectuer les transaminations présentées dans ce mémoire. Elles présentent des spécificités, chaque enzyme pouvant accepter des substrats différents. La BCAT (branched chain aminotransférase) issue d'*E. coli*, accepte l'acide α -cétoglutarique ainsi qu'une large gamme d' α -cétoacides substitués en position 3 ou 4 par des groupements hydrophobes (**Schéma 42**).¹⁵¹

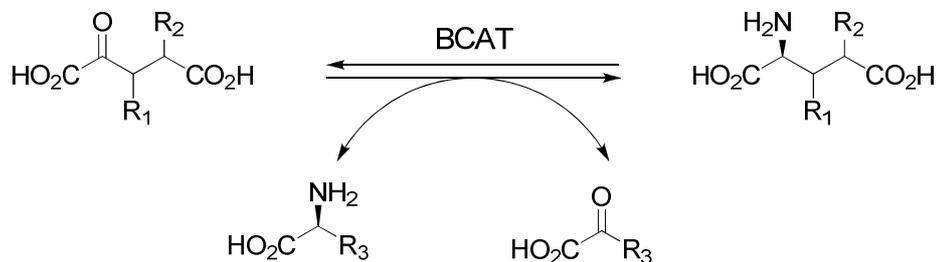


Schéma 42 : Transamination des cétoacides substitués en position 3 ou 4 par la BCAT, conduisant à des analogues du glutamate.

La seconde enzyme, l'AspAT (Aspartate aminotransférase) d'*E. coli*, accepte l'acide α -cétoglutarique ainsi qu'une large gamme de cétoglutarates substitués en position 4 par des

chaînes hydrophobes ou peu polaires. Elle montre également une activité modeste pour le dérivé substitué en position 3 par un groupement méthyle. Dans tout les cas, l'AspAT montre une forte différence d'activité selon la chiralité du substrat.

Cette enzyme permet ainsi de réaliser un dédoublement cinétique et d'accéder de façon stéréosélective aux analogues du glutamate de configuration L-2,4-*syn* (**Schéma 43**).¹⁵² En ce qui concerne l'analogue 3-méthylglutamique, l'AspAT permet d'accéder sélectivement au dérivé de configuration (2*S*,3*R*) qui n'est malheureusement pas le composé souhaité pour cette étude.

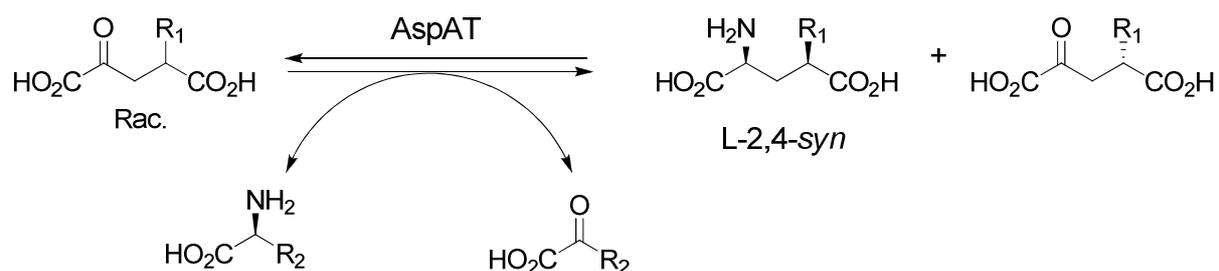


Schéma 43 : Transamination sélective de cétoacides substitués en position 4 par l'AspAT, conduisant aux analogues du glutamate de configuration L-2,4-*syn*.

L'AspAT constitue donc un outil approprié pour préparer l'analogue **54** de façon stéréosélective. La BCAT permet quant à elle d'accéder au dérivé **53**.

L'activité de ces deux enzymes est optimale dans l'eau à un pH proche de 7,6.

Le substrat donneur d'amine utilisé pour effectuer les transaminations catalysées par l'AspAT est l'acide cystéine-sulfinique (ACS). Cet aminoacide, dérivé de la cystéine, est un analogue structural de l'acide aspartique, un des substrats naturels de l'AspAT. L'utilisation de l'ACS en tant que donneur d'amine permet de s'affranchir du problème posé par la réversibilité de la réaction de transamination.¹⁵³ En effet, au cours de la réaction de transamination, l'ACS libère de l'acide 3-sulfinylpyruvique, qui se dégrade spontanément en acide pyruvique et en dioxyde de soufre (**Schéma 44**). Le pyruvate n'étant pas substrat de l'AspAT, la réaction inverse ne peut avoir lieu. L'utilisation de l'ACS permet donc de déplacer totalement l'équilibre vers la formation de l'acide aminé désiré.

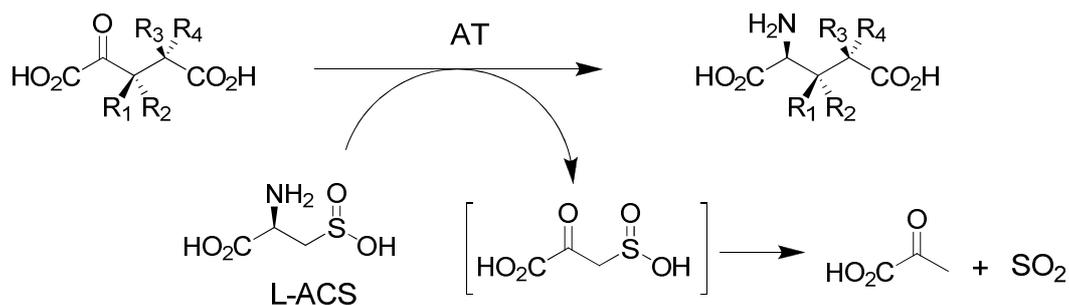


Schéma 44 : Transamination irréversible catalysée par l'AspAT entre un α -cétoacide et l'ACS.

Lorsque la réaction de transamination est terminée, la purification de l'acide aminé formé est effectuée par chromatographie sur résine échangeuse d'ions. Le milieu réactionnel est dans un premier temps déposé sur une colonne de résine fortement acide, fonctionnalisée en surface par des groupements acide sulfonique (Dowex 50X8) (**Figure 74**). Un lavage à l'eau permet d'éliminer toutes les espèces électriquement neutres, telles que le cétoacide n'ayant pas réagi, le pyruvate, mais aussi l'excès d'ACS, qui présente un point isoélectrique bas. L'acide aminé est ensuite élué avec une solution d'ammoniaque 1M.

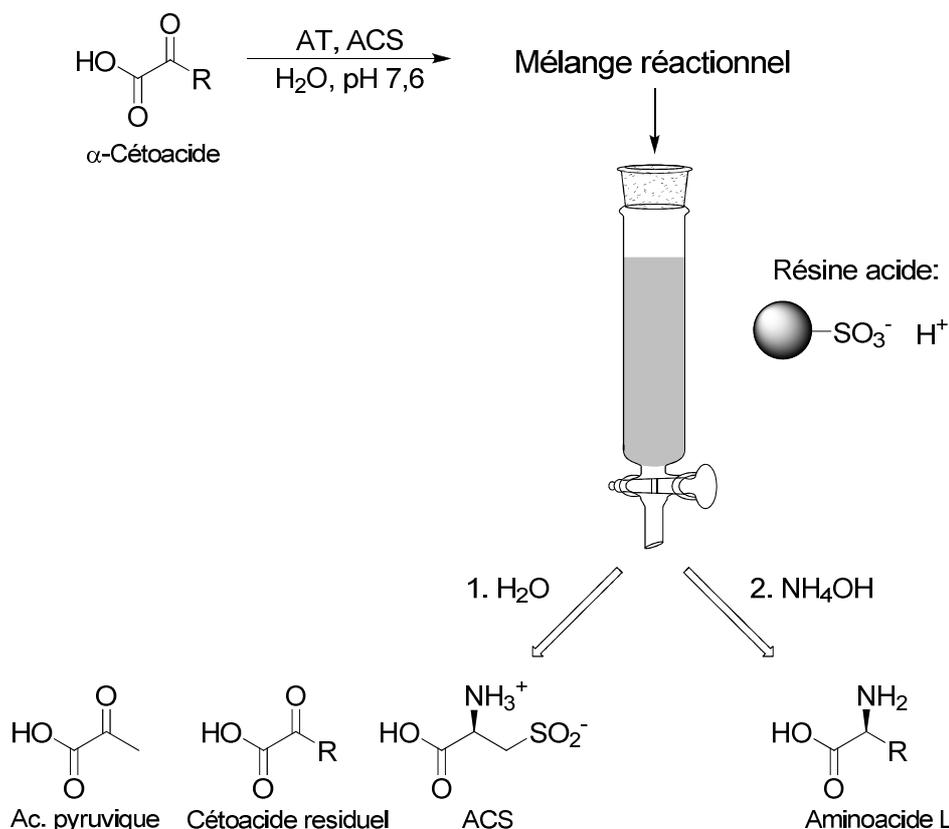


Figure 74 : Purification de l'acide aminé désiré sur colonne de résine acide après réaction de transamination.

Une seconde purification sur colonne de résine basique (Dowex 1X8) est ensuite réalisée. L'acide, préalablement déprotoné ($\text{pH} > 7$) est tout d'abord adsorbé sur la résine cationique, avant d'être élué sélectivement par un gradient d'acide acétique. Cette seconde purification permet d'obtenir l'acide aminé avec une grande pureté.

1.2.3. Synthèse du candidat (S)-D

1.2.3.1. Synthèse de l'acide (3S)-3-méthylglutamique (S)-53

La synthèse de cet aminoacide a déjà été réalisée au laboratoire.¹⁵¹

Dans un premier temps, une addition de Michael de l'acétoacétate de méthyle sur le crotonate de méthyle permet d'accéder à la cétone **55** (Schéma 45). Ce composé est purifié par chromatographie sur silice et est obtenu avec un rendement de 60%. La cétone **55** est ensuite convertie en acétate d'énol par traitement avec du chlorure d'acétyl dans la pyridine. Le produit **56** est ensuite purifié par chromatographie sur silice (rendement 66%). L'acétate d'énol **56** subit une ozonolyse suivie d'une réduction par le sulfure de diméthyle. Le cétoester **57** résultant est purifié par colonne chromatographique et obtenu avec un rendement de 57%. Le cétoester **57** est ensuite saponifié quantitativement par la lithine, pour donner le carboxylate de lithium **58**.

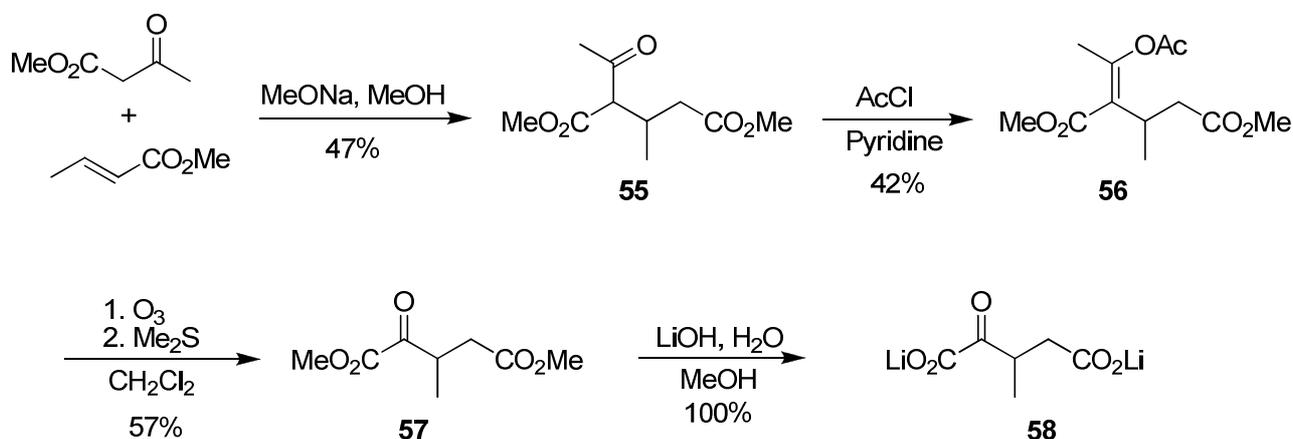


Schéma 45 : Synthèse du céto-glutarate **58**.

Le carboxylate **58** est alors engagé dans une réaction de transamination. La BCAT, acceptant pour substrat les deux énantiomères (*R*)-**58** et (*S*)-**58**, est utilisée pour la conversion du racémique en mélange de diastéréoisomères L-*syn* et L-*anti*-3-méthyl Glu. L'ACS n'est pas substrat de la BCAT, et il ne peut donc pas être utilisé directement comme donneur d'aminoacide primaire. Pour contourner cette difficulté et profiter de l'apport de l'ACS sur le déplacement

de l'équilibre de la réaction, une solution consiste à utiliser l'ACS pour régénérer un aminoacide qui sera utilisé par la BCAT comme donneur d'amine. Cette régénération s'effectue grâce à l'AspAT, pour laquelle l'ACS est un bon substrat. L'acide aminé choisi comme donneur d'amine primaire est présent en quantité catalytique et doit être substrat à la fois de la BCAT pour permettre la transamination du céto-glutarate **58**, mais également de l'AspAT afin d'assurer sa régénération (**Schéma 46**).

Pour des raisons pratiques, notre choix s'est tourné vers l'acide L-2,4-*syn*-isopentyl glutamique **59**. En effet, cet aminoacide a été synthétisé précédemment et était disponible au laboratoire. Il constitue un très bon substrat de l'AspAT et de la BCAT. De plus, la présence du groupement isopentyle, fortement hydrophobe, permet de séparer aisément ce composé des acides aminés (*R*)-**53** et (*S*)-**53** formés.

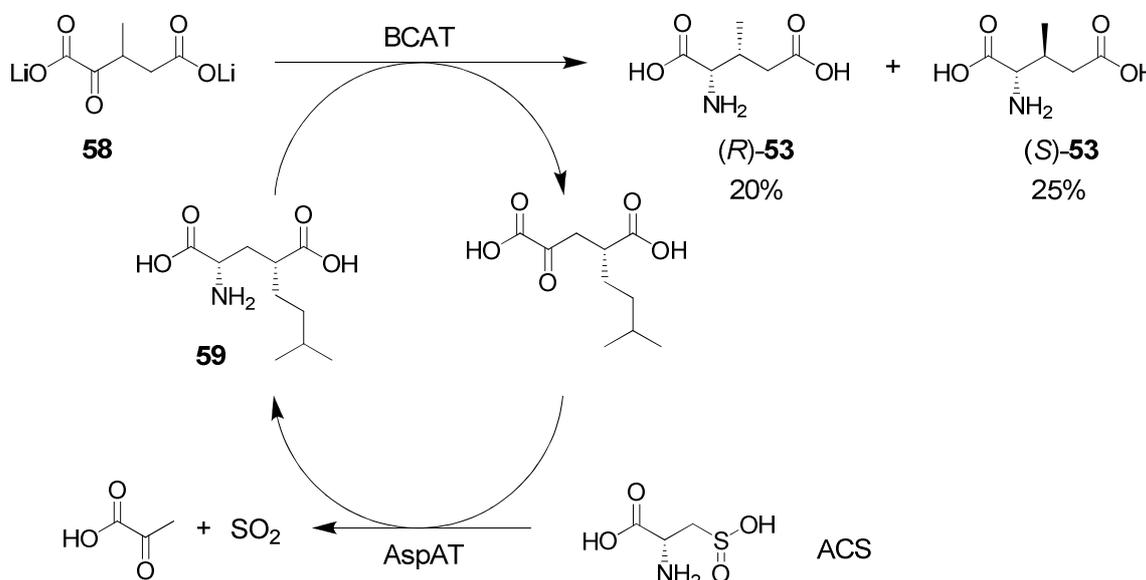


Schéma 46 : Déplacement d'équilibre de la transamination par la BCAT en utilisant l'AspAT et l'ACS.

Les acides aminés (*R*)-**53**, (*S*)-**53** et **59** sont alors séparés des autres composés présents dans le milieu réactionnel par élution sur une colonne de résine sulfonique.

Ces acides aminés sont élués avec une solution d'ammoniaque, puis déposés sur une colonne de résine basique. Un gradient d'acide acétique permet d'éluer sélectivement les deux diastéréoisomères, qui sont obtenus avec une pureté diastéréoisomérique supérieure à 95%.

L'obtention du composé (*R*)-**53** en tant que produit de cette voie de synthèse nous offre l'opportunité d'accéder à l'analogue du NAAG (*R*)-**D**, qui présente également un score d'affinité intéressant, comparable à celui du DCL (respectivement 18,10 et 17,60). La

synthèse de cet analogue est menée en parallèle de celle du composé prioritairement ciblé (*S*)-**D**.

Les composés **53** sont séparément convertis en esters de méthyle préalablement à la formation du lien urée. La présence du groupement méthyle en position 3, ralentissant considérablement l'estérification de la fonction acide en α , impose de conduire cette réaction sur 7 jours à température ambiante afin d'obtenir de façon quantitative les diesters **60** (Schéma 47).

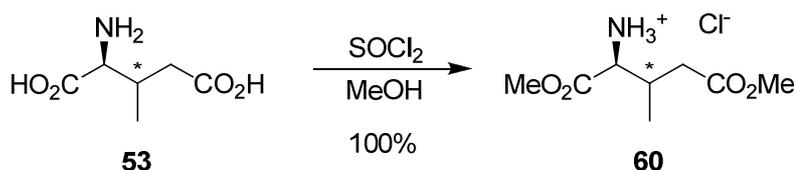


Schéma 47 : Estérification des acides (*S*)-**53** et (*R*)-**53**.

1.2.3.2. Synthèse de l'isocyanate **61** et condensation

Le composé **62** est obtenu à partir du dérivé de la lysine **63**, dont la chaîne latérale est protégée sous forme d'un carbamate de benzyle (Cbz).

Ce composé commercial est tout d'abord estérifié par le méthanol en présence de chlorure de thionyle. L'ester méthylique **62** résultant est isolé pur par simple évaporation des composés volatils, et ce quantitativement (Schéma 48).

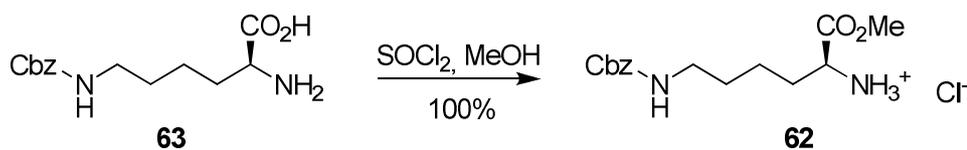


Schéma 48 : Estérification de la lysine-Cbz **62**.

Un essai préliminaire a ensuite été conduit à partir de l'aminoester (*R*)-**60**, visant à obtenir l'urée (*R*)-**64** (Schéma 49). L'amine (*R*)-**60** est tout d'abord neutralisée par une solution de bicarbonate de sodium avant d'être convertie en isocyanate **61** par action du triphosgène. L'isocyanate est isolé par une extraction avant d'être ajouté directement sur une solution de l'amine **62**, préalablement neutralisée par de la triéthylamine.

Cet essai préliminaire n'a cependant pas permis d'obtenir le composé **64** pur. L'ajustement des conditions opératoires devrait nous permettre d'obtenir les urées **64** dans un avenir proche.

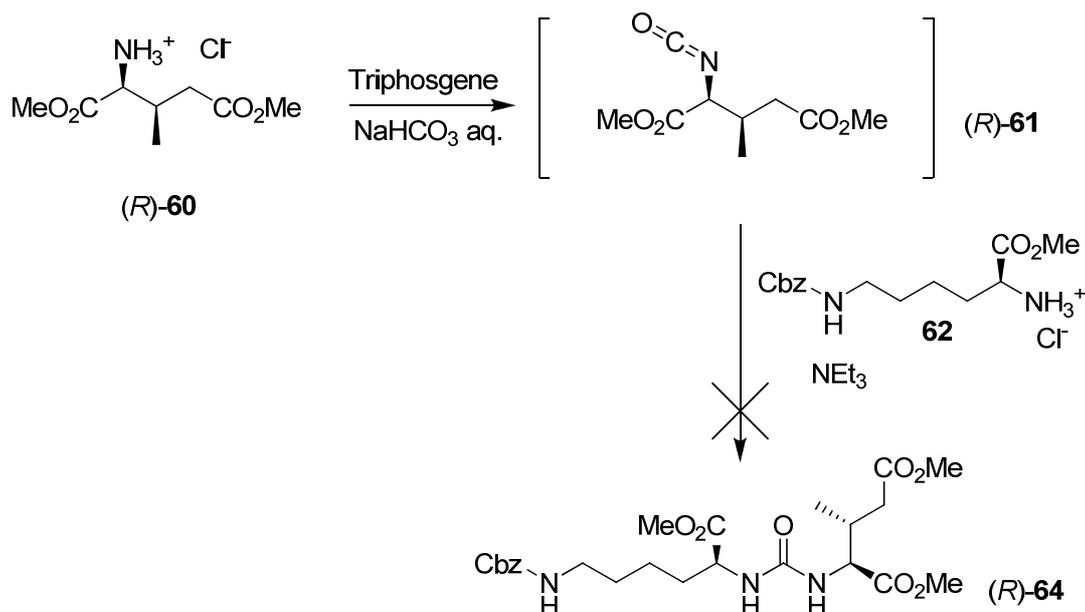


Schéma 49 : Essai de formation de l'urée **64** à partir des aminoesters **60** et **62**.

1.2.3.3. Conclusion

Bien que nous n'ayons pu obtenir l'inhibiteur potentiel (*S*)-**D** faute de temps, la voie de synthèse mise en place a d'ores et déjà permis d'obtenir les composés clefs qui devraient permettre, dans un avenir proche, de synthétiser le composé recherché. De plus, l'obtention du composé (*R*)-**53** comme produit secondaire de la réaction de transamination nous permettra d'accéder à l'inhibiteur potentiel (*R*)-**D**, qui possède un score d'affinité théorique supérieur à celui du DCL.

1.2.4. Synthèse du candidat (*R*)-**J**

1.2.4.1. Synthèse de l'analogue de l'acide glutamique **54**

La synthèse du composé **54** est dérivée de la stratégie mise en place par Zeinab Assaf au cours de sa thèse réalisée au laboratoire, permettant d'obtenir des analogues de l'acide glutamique de configuration L-2,4-*syn*.¹⁵⁴

Au départ de cette voie de synthèse se trouve la cyclohexanone **65**, qui est élaborée en 4 étapes à partir du malonate de diéthyle et de l'acrylate d'éthyle, selon le protocole élaboré par Chakraborty *et al.*¹⁵⁵ (**Schéma 50**).

faut cependant conserver une possibilité de clivage sélectif des esters méthyliques, afin d'obtenir un bon substrat pour les transaminases.

Nous avons dans un premier temps envisagé la transformation de l'anhydride mixte en ester *tert*-butylique, autorisant la saponification sélective des esters méthyliques. A cette fin, l'anhydride mixte **67** a été traité par du *tert*-butanol en présence de DMAP (Schéma 53). Cependant, le manque de nucléophilie du *tert*-butanol ne nous a pas permis d'obtenir l'ester désiré.

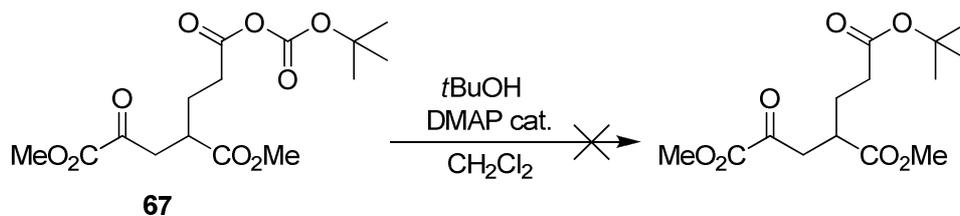


Schéma 53 : Echec de l'attaque du *t*BuOH sur l'anhydride **67**.

Nous nous sommes alors tournés vers la synthèse de l'amide **68**, qui permet également le clivage sélectif des esters méthyliques. Le composé **68** est obtenu par addition de benzylamine sur l'anhydride **67**. L'amide **68** est purifié par chromatographie sur silice, et obtenu pur avec un rendement global pour les deux étapes de 80% (Schéma 54).

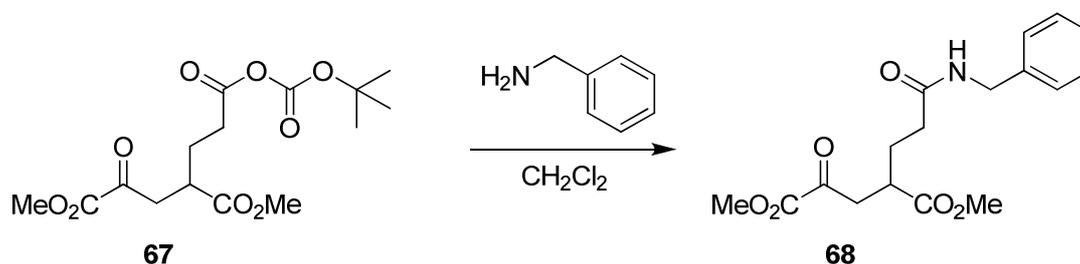


Schéma 54 : Formation de l'amide **68**.

Enfin, le composé **68** est saponifié par addition d'une solution de lithine (Schéma 55).

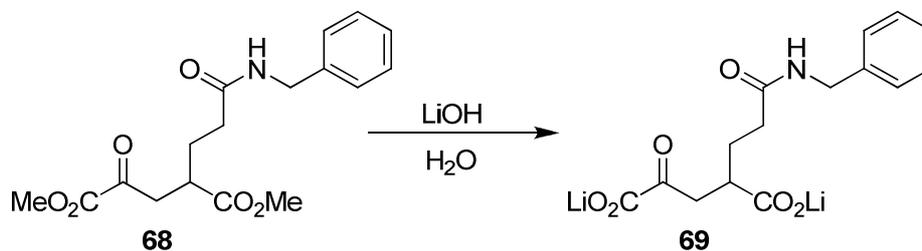


Schéma 55 : Saponification du diester **68**.

L' α -cétocarboxylate **69**, qui constitue un bon substrat de l'AspAT, a ensuite été engagé dans une réaction de transamination afin de former sélectivement l'acide aminé *syn* **70** (Schéma 56).

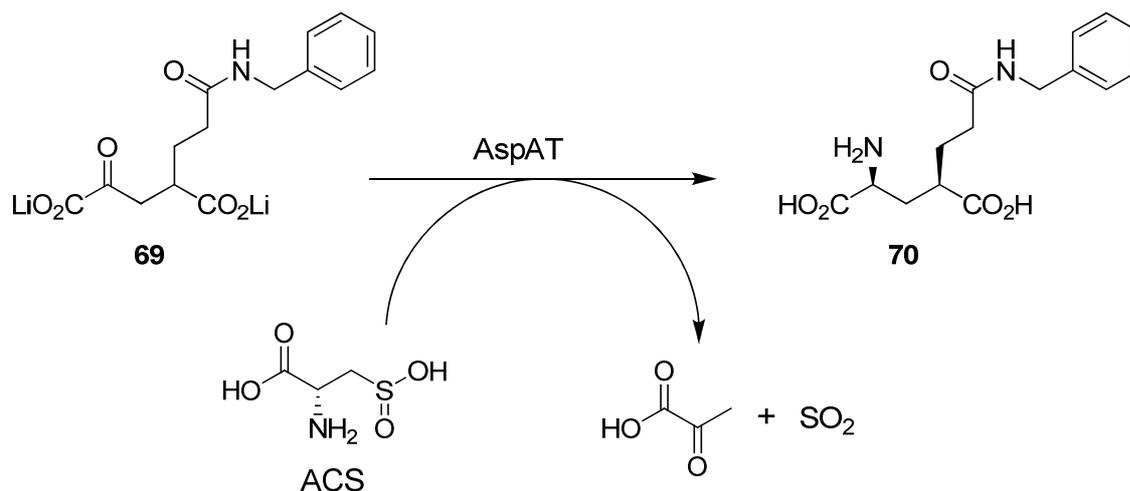


Schéma 56 : Transamination par l'AspAT du composé cétoacide **69**.

Cet aminoacide est purifié sur colonne de résine acide Dowex 50X8 avant d'être chauffé à reflux dans une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 6N, afin d'hydrolyser la fonction amide (**Schéma 57**).

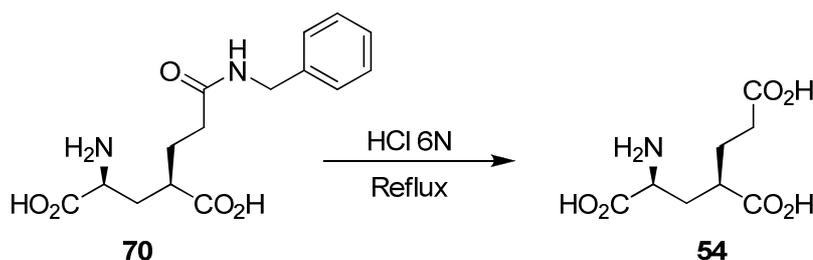


Schéma 57 : Hydrolyse de l'amide **70**.

Le triacide **54** résultant est isolé après passage sur résine échangeuse d'ions. La transamination suivie de l'hydrolyse de l'amide en milieu acide permettent d'accéder au composé **54** avec un rendement global de 30%.

1.2.4.2. Synthèse du fragment **II**

En parallèle de la synthèse de l'acide aminé **54**, nous sommes intéressés à celle du composé **II**, cétoester dérivé de la lysine, qui devrait permettre par amination réductrice d'accéder aux composés (*R*)-**J** et (*S*)-**J**.

Cependant, étant donné la structure de ce composé, il existe un risque important de cyclisation. En effet, ce phénomène a déjà été constaté au laboratoire avec des structures similaires à celle de notre composé d'intérêt. Même en présence d'un groupement protecteur de type carbamate, l'équilibre est très fortement déplacé vers la formation du cycle. (**Schéma 58**).

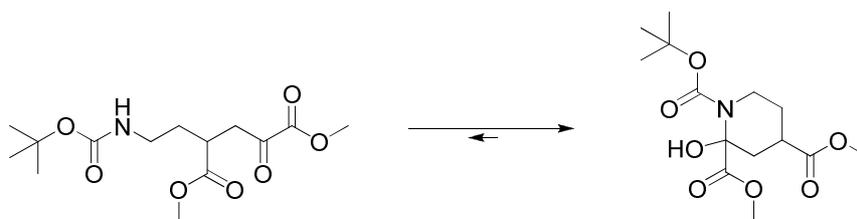


Schéma 58 : Cyclisation observée d'un composé proche du cétoester **II**.

Afin de contourner cette difficulté, nous nous sommes tournés vers la synthèse de l'homologue **III** (**Figure 75**) pour lequel le problème de cyclisation n'apparaît pas, la formation de cycle à 7 étant défavorisée. L'amine en bout de chaîne n'intervenant pas dans les interactions entre le ligand et le site actif de la PSMA, cette modification de la structure du candidat vecteur ne devrait pas affecter son affinité pour la protéine.

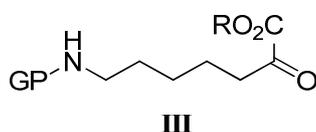


Figure 75 : Structure du composé **III**.

Ce composé peut être synthétisé en suivant une stratégie similaire à celle envisagée pour accéder à l'acide aminé **54** (**Schéma 59**). En effet, la cyclohexanone **71** peut être convertie en carbonate d'énol **72**, qui subira une ozonolyse afin d'accéder à l'anhydride **73**. Cet anhydride sera converti en amide **74** par attaque nucléophile de l'ammoniac. L'amide **74** sera ensuite déshydraté de façon à obtenir le nitrile **75**, précurseur direct de l'amine **III**.

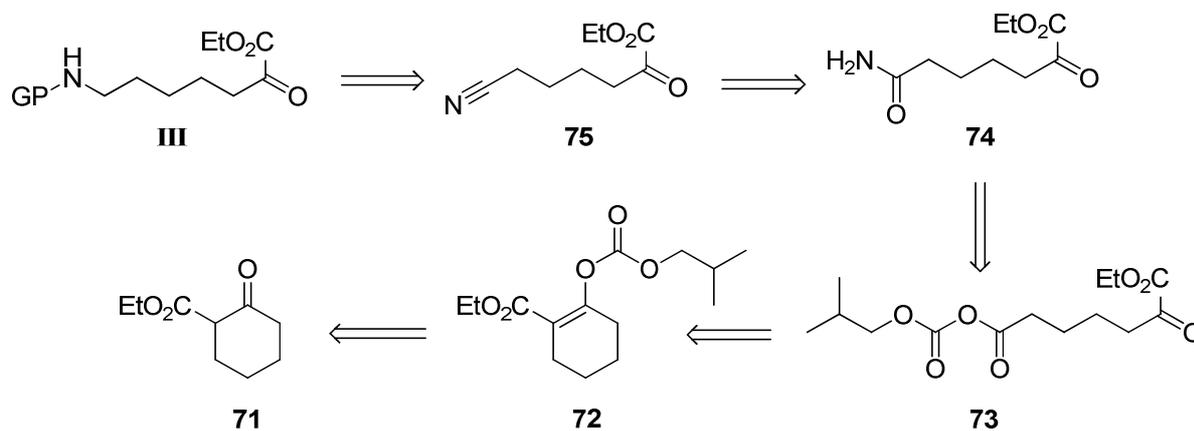


Schéma 59 : Rétrosynthèse du cétoester **III**.

La cyclohexanone **71**, commerciale, est tout d'abord convertie en carbonate d'énol **72** par réaction avec le chloroformate d'isobutyle (IBCF) en présence de triéthylamine. Le carbonate d'énol **72** est purifié par chromatographie sur silice (**Schéma 60**).

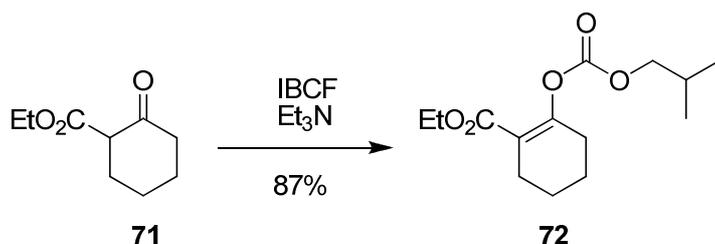


Schéma 60 : Formation du carbonate d'énol **72**.

Le carbonate d'énol **72** subit ensuite une ozonolyse, suivie d'une réduction pour mener à l'anhydride mixte carbonate **73** (**Schéma 61**).

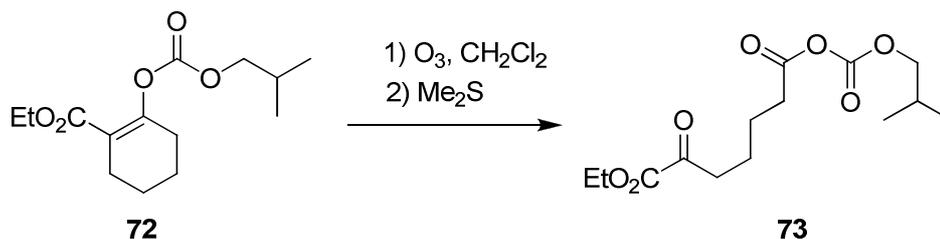


Schéma 61 : Ozonolyse du carbonate d'énol **72**.

De même que pour le composé **67**, l'anhydride mixte **73** n'a pas pu être purifié en raison de sa faible stabilité, et a été engagé directement dans l'étape suivante.

Traité à l'ammoniac en solution dans le THF, l'anhydride **73** conduit à l'amide **74** (**Schéma 62**).

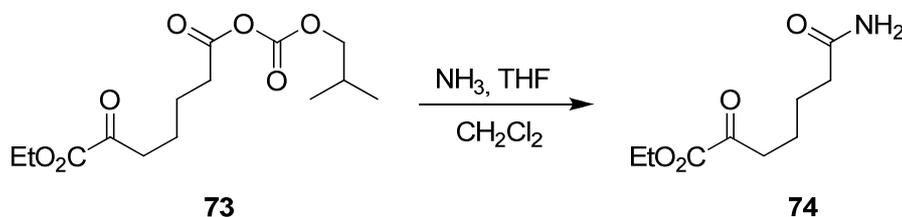


Schéma 62 : Formation de l'amide **74** à partir de l'anhydride **73**.

Plusieurs essais de purification ont été menés sur l'amide **74**, mais ce composé s'est révélé trop instable pour être isolé par chromatographie sur silice. Cet amide a donc subi une déshydratation sans purification préalable, par traitement avec de l'anhydride trifluoroacétique en présence de pyridine dans le THF (**Schéma 63**). Le nitrile **75** ainsi obtenu est purifié par chromatographie sur silice.

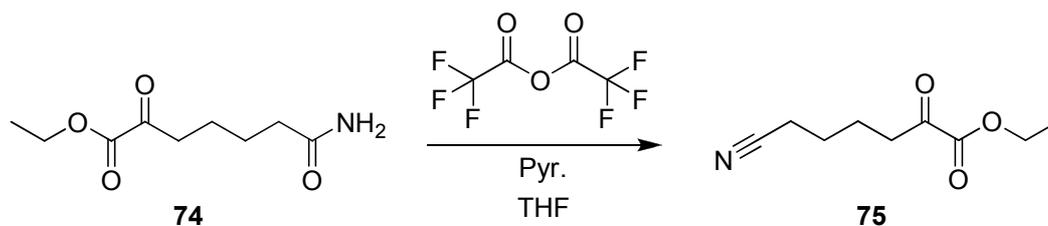
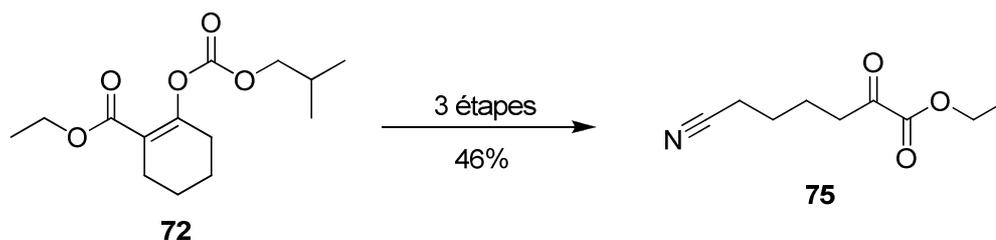


Schéma 63 : Déshydratation de l'amide **74**.

Le rendement global de ces trois dernières étapes est de 46%.



1.2.4.3. Conclusion

Par manque de temps, nous n'avons pas pu réaliser l'amination réductrice permettant d'accéder au composé (*R*)-**J** et (*S*)-**J** désirés. Nous avons cependant obtenu les deux composés clefs nécessaires à cette synthèse, qui pourra donc être achevée dans un avenir proche.

1.3. Conclusion

L'étude de modélisation moléculaire réalisée sur 20 structures dérivées du NAAG a permis la sélection de deux candidats présentant des scores d'affinité théorique pour la PSMA particulièrement prometteurs. La synthèse de ces deux candidats, nécessitant l'élaboration préalable d'acides aminés non naturels, a été engagée. Malheureusement, par manque de temps, il ne nous a pas été possible d'aboutir aux deux composés cibles. La stratégie de synthèse mise en place devrait cependant permettre l'obtention de ces composés à court terme.

2. Nano-sondes vectorisées

Bien que nous n'ayons pu terminer la synthèse des candidats vecteurs envisagés, nous avons procédé au greffage du DCL, vecteur de référence, sur les nanoparticules luminescentes

précédemment synthétisées, avec pour finalité l'obtention des nano-sondes lumineuses faisant l'objet de ce projet.

La synthèse du DCL a été accomplie par Nicolas Candelon, stagiaire post-doctoral au laboratoire.

La fonctionnalisation des nanoparticules lumineuses par le vecteur DCL est réalisée par un couplage peptidique entre l'amine terminale du vecteur et les esters de NHS situés aux extrémités des chaînes PEG recouvrant les nanoparticules.

Pour ce faire, des nanoparticules NP-Eu(43)₃-PEG-NHS ont été placées en présence d'un large excès de DCL sous forme de chlorhydrate (20 éq.). L'ajout de diisopropyléthylamine permet de libérer l'amine qui peut alors se coupler avec l'ester de NHS (**Schéma 64**).

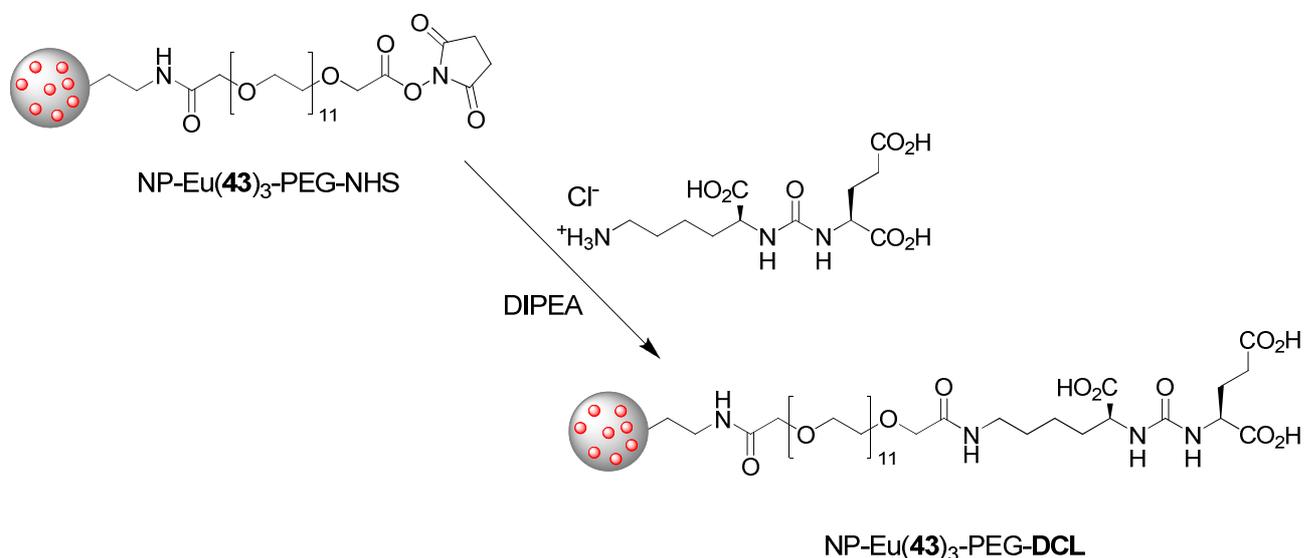


Schéma 64 : Greffage du vecteur **DCL** sur les nanoparticules lumineuses par couplage peptidique.

La présence de DCL sur les nanoparticules a pu être confirmée par zétamétrie. En effet, une suspension de nanoparticules traitées par du DCL montre à pH 7,5 un potentiel ζ de -29,2 mV, supérieur à celui observé après hydrolyse des ester de NHS (-24,5 mV). Cette augmentation de la valeur absolue de potentiel ζ ne peut être expliquée que par l'augmentation du nombre de charges négatives à la surface des nanoparticules grâce à l'apport des groupements carboxylates du DCL.

Les objets obtenus, les NP-Eu(43)₃-PEG-DCL, sont ceux attendus au lancement de ce projet, à savoir des nanoparticules ayant des propriétés de luminescence caractéristiques des

complexes de lanthanide, munies à leur surface de molécules vectrices spécifiques des cellules cibles et pourvues d'espaceurs permettant d'augmenter à la fois l'affinité des vecteurs avec leur cible et la biocompatibilité de ces nano-objets.

Cette stratégie de fonctionnalisation est également applicable à toute molécule pourvue à une extrémité d'une fonction amine primaire, et nous permettra de greffer les nouveaux vecteurs actuellement en cours de synthèse.

3. Conclusion

Une étude d'affinité *in silico* a été réalisée sur 20 structures dérivées de celle du NAAG, dans le but de découvrir de nouveaux inhibiteurs de la PSMA. Cette étude a permis la sélection de deux candidats vecteurs particulièrement prometteurs, dont la synthèse a été engagée. Ces deux composés devraient être obtenus très prochainement.

Nous avons également montré que les fonctions ester de NHS présente à l'extrémité des chaînes PEG permettait le greffage d'un vecteur de référence à la surface des nanohybrides, nous permettant ainsi d'obtenir la première nano-sonde recherchée.

Chapitre V. Résultats biologiques préliminaires

Les nano-sondes luminescentes précédemment obtenues ont fait l'objet de plusieurs évaluations *in vitro* puis *in vivo*. Ces résultats sont présentés dans cette dernière partie. La plus grande partie de ces études a été réalisée au laboratoire GReD (Génétique, Reproduction et Développement, UMR6293), partenaire du projet ANR, par l'équipe de Laurent Morel.

1. Résultats *in vitro*

1.1. Evaluation de la cytotoxicité des nano-sondes

Cette étude de cytotoxicité a été réalisée en exposant des cellules PC3 et LNCaP, deux lignées cellulaires de cancers prostatiques, à des concentrations croissantes en nanoparticules. Trois types de nanoparticules luminescentes ont été utilisés pour cette étude, les NP-Eu(43)₃, les NP-Eu(43)₃-PEG-CO₂H et les NP-Eu(43)₃-PEG-DCL, correspondant respectivement à des nanoparticules sans fonctionnalisation de surface, des nanoparticules PEGylées et enfin des nanoparticules PEGylées et vectorisées (**Figure 76**).

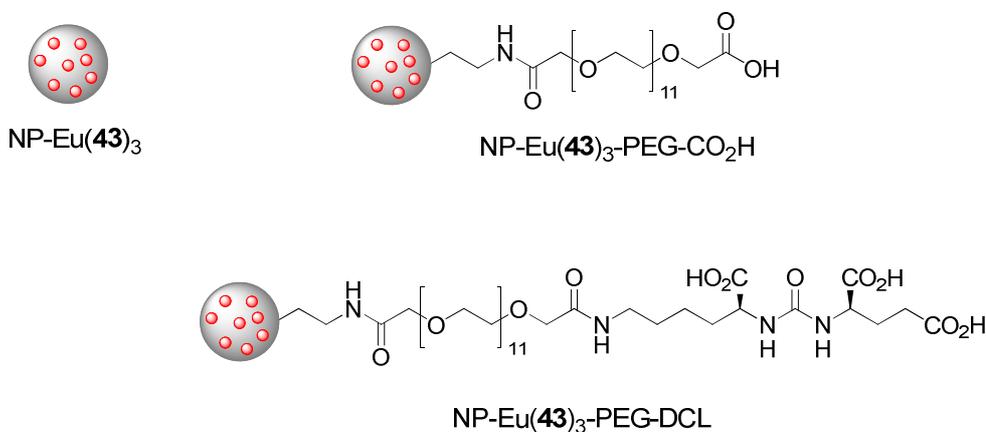


Figure 76 : Nanoparticules utilisées pour les études de cytotoxicité.

Le taux de cellules survivantes, mesurés 24h après exposition aux nanoparticules, montre globalement une faible cytotoxicité des nanoparticules, dépendante de leur concentration dans le milieu de culture, de leur type et de la lignée cellulaire (**Figure 77**).

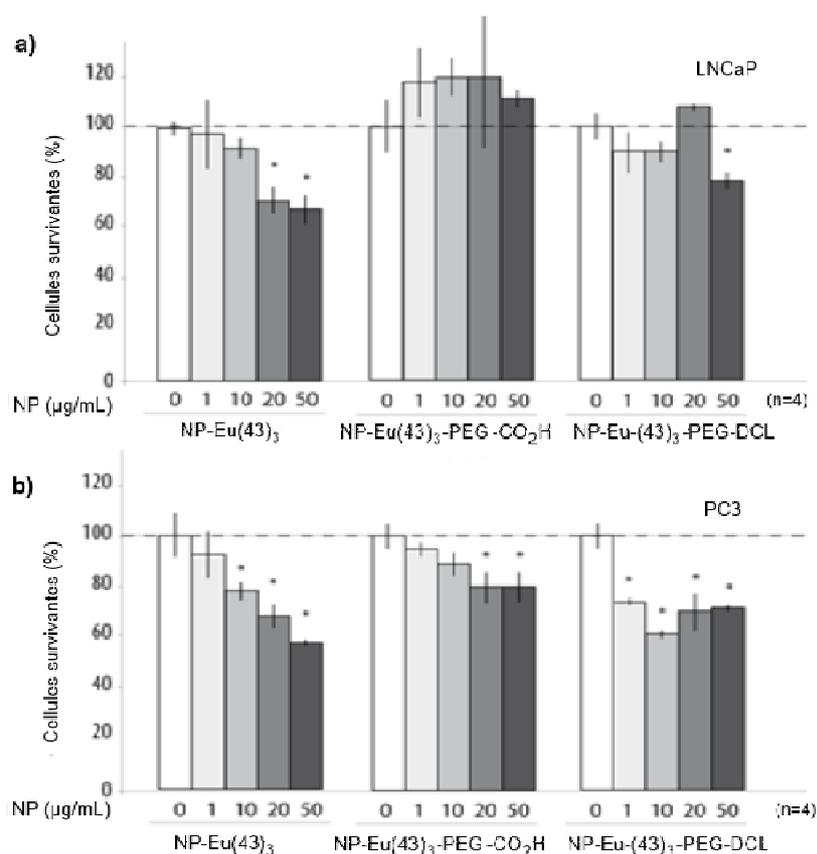


Figure 77 : Fractions de cellules survivantes après une exposition de 24h à trois types de nanoparticules. a) lignée LNCaP, b) lignée PC3.

En effet, tandis que les nanoparticules sans fonctionnalisation de surface se révèlent toxiques pour les deux lignées cellulaires, avec un effet dose-dépendant clair, les NP-Eu(43)₃-PEG s'avèrent beaucoup moins toxiques que les précédentes, n'ayant aucun impact sur les cellules LNCaP et une très faible toxicité sur les PC3 pour des concentrations supérieures à 25µg/mL. Enfin, les NP-Eu(43)₃-PEG-DCL se révèlent légèrement plus toxiques que les nanoparticules PEGylées non-vectorisées, avec une faible cytotoxicité sur les LNCaP à 50µg/mL, et une toxicité plus élevée sur les PC3, qui semble indépendante de la concentration en nanoparticules.

Nous pouvons également constater l'apport de la PEGylation sur la biocompatibilité des nanoparticules puisque une différence sensible de toxicité est observée entre celles ne présentant pas de fonctionnalisation de surface et celles munies de chaînes PEG. Cette différence de toxicité est tout particulièrement nette sur les cellules LNCaP.

1.2. Pénétration cellulaire

Afin d'évaluer la capacité des nanoparticules à pénétrer les cellules, des cultures de cellules LNCaP ont été mises en présence de suspensions de nanohybride NP-Eu(43)₃-PEG-CO₂H et NP-Eu(43)₃-PEG-DCL. Ces cultures cellulaires ont ensuite été fixées dans une résine, puis coupées au microtome. Les coupes ont ensuite été observées en microscopie électronique à transmission (**Figure 78**).

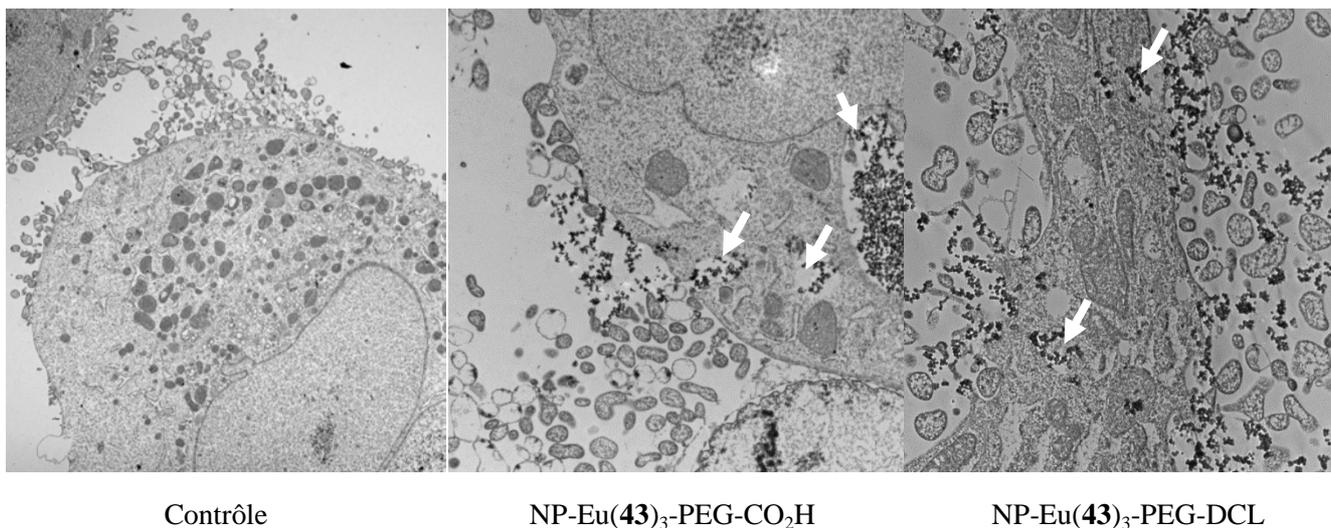


Figure 78: Clichés MET de coupe cellulaire de LNCaP, après exposition à des suspensions de NP-Eu(43)₃-PEG-CO₂H et de NP-Eu(43)₃-PEG-DCL.

Indépendamment de la présence de molécules vectrices à leur surface, les nanoparticules sont internalisées par endocytose, comme le montrent les invaginations observées sur les clichés MET (flèches blanches). Cette internalisation des nanoparticules, non spécifique de la présence de vecteur, ne semble donc pas liée à une quelconque interaction entre ce dernier et la PSMA.

Ces résultats restent cependant encourageants, puisque l'internalisation des nanoparticules dans les cellules est une condition importante pour leur concentration dans les tissus.

2. Résultats *in vivo*

2.1. Etude de la toxicité *in vivo*

Les effets sur l'organisme de l'exposition à ces nano-sondes ont ensuite été étudiés *in vivo*. A cette fin, des suspensions de nanoparticules NP-Eu(43)₃-PEG-CO₂H et NP-Eu(43)₃-

PEG-DCL ont été administrées par injection intraveineuse à des souris, à des doses de 25 mg/kg.

Des coupes histologiques réalisées sur les organes de souris, 24h après injection de nanoparticules, n'ont pas révélé de désorganisation ou d'inflammation des tissus (**Figure 79**).

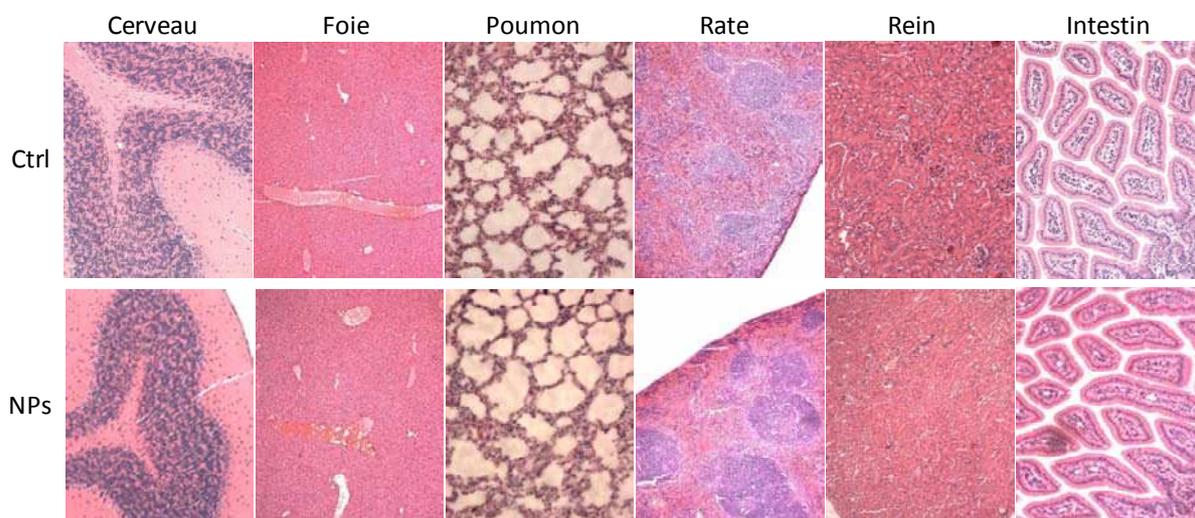


Figure 79 : Histologie des organes d'une souris 24h après injection de nanoparticules NP-Eu(43)₃-PEG-CO₂H (NPs), et comparaison avec une souris n'ayant pas été exposée aux nanoparticules (Ctrl).

Enfin, aucune létalité n'est observée sur une période de 5 jours suivant l'injection, que ce soit pour les NP-Eu(43)₃-PEG-CO₂H ou les NP-Eu(43)₃-PEG-DCL.

2.2. Biodistribution des nano-sondes

Les nanoparticules fonctionnalisées ayant montré leur innocuité *in-vivo*, il nous a été possible de procéder à l'étude de la biodistribution de ces nano-sondes dans l'organisme.

2.2.1. Biodistribution et cinétique d'élimination

Avant d'étudier le ciblage de tumeur grâce à ces nano-sondes, il est important de connaître au préalable la biodistribution de ces dernières dans l'organisme. A cette fin, nous avons étudié la répartition des nanoparticules ainsi que leur élimination au cours du temps dans les différents organes et fluides biologiques de souris saines. Cette étude a été menée avec les nanoparticules NP-Eu(43)₃-PEG-CO₂H et NP-Eu(43)₃-PEG-DCL, respectivement des nanoparticules PEGylées et des nanoparticules PEGylées et vectorisées.

Les sujets ont été euthanasiés après une durée variant de 30 minutes à 5 jours après l'injection intraveineuse d'une suspension de nanoparticules dans du sérum physiologique, à la dose de 25 mg/kg. Les organes ont ensuite été prélevés et l'intensité d'émission de l'euporium mesurée par spectrofluorimétrie. Pour ce faire, nous avons mesuré l'intensité de la fluorescence à 616 nm, bande d'émission principale de l'euporium (III), sous excitation UV (**Figure 80**).

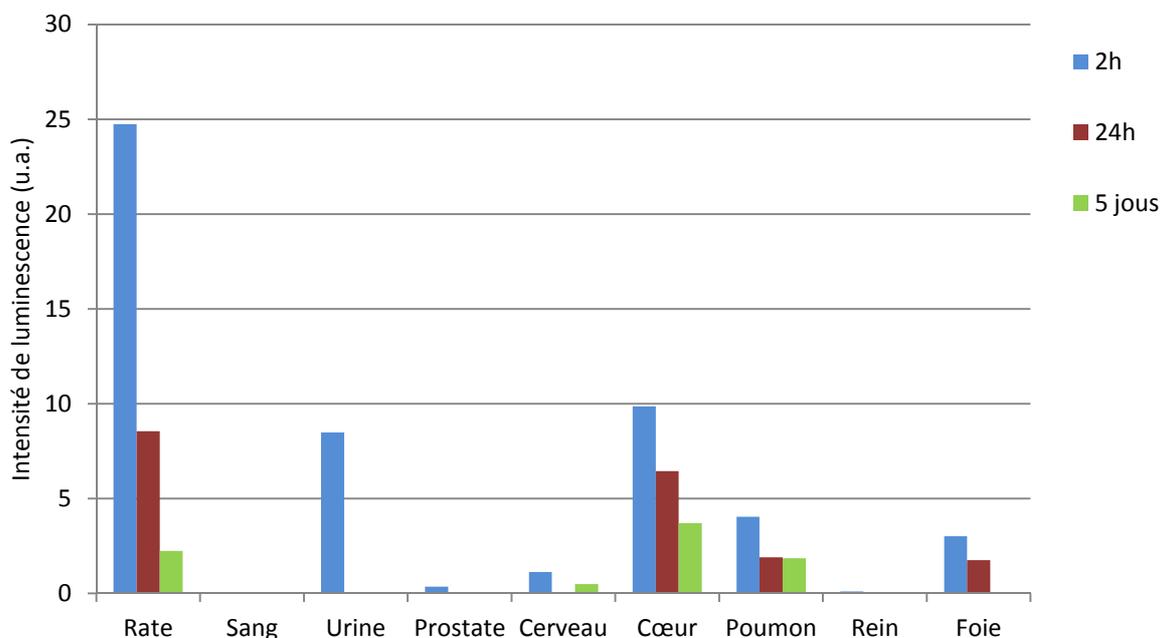


Figure 80 : Intensité de luminescence émise à 616 nm, sous excitation UV, par les organes et fluides de souris après injection de nanoparticules luminescentes (NP-Eu(43)₃-PEG-CO₂H).

Aucune différence de biodistribution n'a été constatée entre les nanoparticules PEGylées et les nanoparticules vectorisées.

Nous constatons tout d'abord une absence totale de nanoparticules dans le sang deux heures après l'administration de la suspension, signifiant que celles-ci ont déjà quitté le compartiment sanguin en se répandant dans les organes ou en étant évacuées par les reins dans le système urinaire, comme le montre la luminescence observée dans les urines deux heures après injection.

Au sein des différents organes, la biodistribution des nanoparticules se révèle extrêmement hétérogène. La plus forte concentration est observée dans la rate. Des nanoparticules sont également présentes dans le cœur, les poumons et le foie à des concentrations significatives. Enfin, des quantités extrêmement faibles de nano-sondes sont observées dans le cerveau, la prostate et les reins.

L'étude de la biodistribution au cours du temps nous permet également de conclure à l'élimination rapide des nano-sondes par l'organisme. En effet, la quantité de nanoparticules présente dans les différents organes est réduite au moins de moitié après 5 jours, allant jusqu'à une diminution d'un facteur 10 pour la rate.

2.2.2. Ciblage tumoral

Après avoir étudié le comportement de ces nano-sondes chez des souris saines, l'étude a été réitérée sur des souris porteuses d'une tumeur prostatique.

Ces tumeurs ont été développées sur des souris immunodéficientes, par injection sous cutanée de cellules tumorales prostatiques de lignée LNCaP, qui surexprime la PSMA.

De même que dans l'étude de biodistribution précédemment réalisée, les organes ainsi que les tumeurs ont été prélevés 2 heures et 48 heures après injection intraveineuse d'une suspension de nanoparticules NP-Eu(43)₃-PEG ou NP-Eu(43)₃-PEG-DCL.

Les résultats obtenus sont tout à fait semblables à ceux obtenus chez la souris sans tumeur, avec des cinétiques d'élimination et des doses stockées dans les organes similaires (**Figure 81**). Aucune luminescence caractéristique des nano-sondes n'est cependant observée dans les tumeurs.

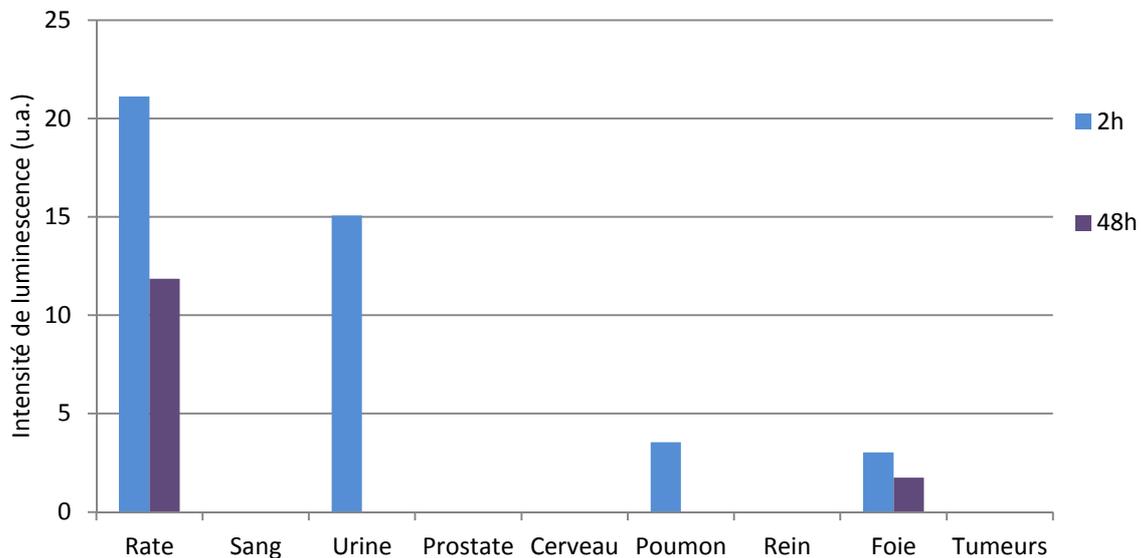


Figure 81 : Intensité de luminescence émise à 616 nm sous excitation UV par les organes et fluides de souris porteuses de tumeurs, après injection de nanoparticules luminescentes (NP-Eu(43)₃-PEG-DCL).

Par ailleurs, la présence du vecteur DCL à la surface des nanoparticules n'influe pas sur la présence de nano-sondes dans les tumeurs.

Ce résultat étonnant semble montrer une incapacité de ces nano-sondes à se concentrer dans les zones tumorales, que se soit par ciblage passif grâce à l'effet EPR, ou par ciblage actif grâce à la présence du DCL, attesté comme permettant le ciblage de la PSMA.

Un doute subsiste cependant sur la surexpression effective de la PSMA par la lignée utilisée. En effet, il s'agit d'une lignée de LNCaP vieille de plusieurs dizaines d'année, et il est possible que cette dernière est évoluée au cours du temps. Nous devrions donc vérifier la surexpression de la protéine par la lignée utilisée, ce qui fera l'objet de prochains travaux.

3. Conclusion

L'évaluation de la cytotoxicité a permis de mettre en évidence l'apport de la PEGylation, permettant de diminuer la cytotoxicité des nanoparticules. L'étude sur le petit animal a quant à elle montrée l'absence d'inflammation ou de désorganisation des tissus après une exposition aux nano-sondes. De plus, aucune létalité n'est observée aux doses utilisées.

La distribution des nano-objets dans l'organisme s'est révélée extrêmement hétérogène et indépendante de la présence de molécules vectrices à la surface des nanoparticules. De plus, les nanoparticules sont éliminées de l'organisme au cours du temps et ne s'accumulent pas sur le long terme.

Cependant, malgré le greffage d'un vecteur à leur surface, les résultats concernant le marquage de tumeurs grâce à ces nanoparticules s'avèrent pour l'instant décevants.

Conclusion et perspectives

1. Conclusion générale

Ce travail de thèse a été consacré au développement d'une nano-sonde luminescente qui pourrait permettre la détection précoce du cancer de la prostate. Le projet s'est articulé autour de trois aspects principaux, qui sont la synthèse de ligands 4-triazolyl dipicolinates et l'étude des complexes d'euporium(III) et de terbium(III) correspondants, la mise au point d'une voie de synthèse permettant d'obtenir des nanohybrides luminescents à partir de ces complexes, enfin le greffage de molécules vectrices à la surface de ces nano-objets.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la synthèse d'une bibliothèque de ligands dérivés de l'acide dipicolinique, connu pour les excellentes propriétés de luminescence des complexes qu'il forme avec les ions europium (III) et terbium (III).

La voie de synthèse mise en place, basée sur une réaction de CuAAC, a permis l'obtention rapide de 20 acides 4-triazolyl dipicoliniques substitués par une large variété de groupements. Cette voie de synthèse implique 5 étapes au départ de l'acide chélidamique et nécessite une unique purification (recristallisation), les autres produits étant isolés purs par simple filtration.

Ces 20 diacides ont permis l'obtention des complexes de terbium(III) et d'euporium(III) dérivés, avec d'excellents rendements. Il aurait été intéressant de pouvoir déterminer les structures tridimensionnelles de ces complexes par diffraction de rayons X. Il nous a malheureusement été impossible d'obtenir des cristaux de qualité suffisante pour effectuer ces analyses, même après avoir opéré un changement de contre-ion pour améliorer la recristallisation des complexes.

Les propriétés photo-physiques de ces complexes de lanthanide ont ensuite été étudiées en solution et à l'état solide. Nous avons démontré que les groupements fixés en position 4 du triazole avaient une influence importante sur les longueurs d'onde d'excitation des complexes ainsi que sur leurs rendements quantiques de luminescence. Cette influence est tout particulièrement sensible à l'état solide, où l'on peut observer des déplacements du maximum d'excitation de 290 nm à 400 nm, respectivement pour les complexes [Eu(**44**)₃] et [Eu(**34**)₃]Na₃. En solution, bien que cette influence soit moins marquée, la présence de groupements aromatiques en position 4 du triazole repousse la limite d'excitabilité de 300 nm à 390 nm.

Les temps de demi-vie de luminescence de ces complexes varient de 0,77 à 1,30 ms. Ces déclinés longs permettront en imagerie résolue dans le temps de s'affranchir totalement du signal de l'autofluorescence des tissus, tout en conservant un intense signal du fluorophore.

Enfin, les rendements quantiques de luminescence s'avèrent très variables. De manière générale, les complexes d'euporium présentent de meilleurs rendements que leurs homologues au terbium. Certains de ces complexes possèdent également des rendements quantiques de luminescence supérieurs à ceux des complexes issus de l'acide dipicolinique, que nous avons choisi comme référence pour ce travail.

Les résultats de l'étude des propriétés de luminescence de ces complexes nous ont enfin conduits à sélectionner les plus prometteurs, afin de les incorporer dans des nanoparticules.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la synthèse de nanohybrides luminescents à base de silice. En effet, sa transparence sur une large gamme de longueurs d'onde et sa résistance en milieu biologique font de la silice un matériau attrayant pour les applications visées.

Les complexes sélectionnés pour leur incorporation dans les nanoparticules de silice étant tous hydrosolubles, nous nous sommes orientés vers les méthodes d'encapsulation directe par microémulsion inverse permettant l'obtention de nanohybrides de classe I. Cette méthode évite notamment l'utilisation de ligands porteurs de groupements alcoxysilanes sensible à l'humidité et de manipulation délicate.

L'incorporation des complexes de lanthanides dans les nanoparticules de silice s'est cependant avérée être dépendante de paramètres autres que l'hydrophilie des complexes. La présence de groupements ammonium sur les ligands, permettant d'assurer la neutralité de l'espèce, semble essentielle à l'encapsulation directe de ces luminophores. Cette incorporation de complexes de lanthanide s'effectue avec un taux d'environ 0,13%, correspondant à une quarantaine de complexes par nanoparticule.

L'hypothèse que nous avons formulée afin d'expliquer ces résultats repose sur la déprotonation des groupements silanols en milieu basique. Ces groupements Si-O⁻ peuvent alors interagir avec les fonctions ammonium des complexes, aidant à l'encapsulation de ces derniers. A l'inverse, les complexes dépourvus de groupements ammonium, négativement chargés, ne peuvent bénéficier de ce type d'interaction. Cette méthode simple a permis d'obtenir des nanohybrides possédant les propriétés optiques caractéristiques des complexes de lanthanides.

Les propriétés photophysiques des nanohybrides ont également été étudiées en régime linéaire et non-linéaire. Cette étude a entre autres permise la mise en évidence de la transition

$S_0 \rightarrow T_1$ en régime biphotonique, qui pourrait permettre de positionner avec précision l'état triplet des ligands. En effet, ce positionnement est le plus souvent effectué grâce à l'observation de la phosphorescence de complexes de gadolinium, observation qui peut s'avérer approximative et fortement dépendante de l'appréciation de l'expérimentateur lorsque la transition $T_1(0) \rightarrow S_0(0)$ est de faible intensité.

La synthèse « one-pot » de nanohybrides luminescents fonctionnalisés en surface par des groupements amino a ensuite été mise au point, sans que les propriétés de luminescence de l'hybride n'en soient affectées. Nous avons démontré que les nanoparticules ainsi fonctionnalisées étaient particulièrement stables, aucune perte de luminescence n'étant décelée après deux semaines en suspension à des pH allant de 5 à 8. La présence de résidus amine primaire a été utilisée pour le greffage de chaînes polyéthylène glycol à la surface des nanoparticules par le biais d'un couplage peptidique.

La présence d'esters de *N*-hydroxysuccinimide à l'extrémité de ces chaînes PEG permet également d'envisager, par un nouveau couplage peptidique, le greffage de toute molécule pourvue d'une fonction amine primaire, sans autre modification chimique.

C'est ainsi qu'un inhibiteur de la PSMA a pu être conjugué aux nanoparticules luminescentes, fournissant un modèle des nano-sondes recherchées.

L'étude de cytotoxicité menée *in vitro* sur des lignées PC3 et LNCaP a permis de conclure à la faible cytotoxicité des nano-sondes et a confirmé l'importance de la PEGylation sur la biocompatibilité de ces dernières. Les tests *in vivo* ont également montré l'innocuité des nano-sondes, aucune inflammation, désorganisation tissulaire ou létalité n'étant détectée après exposition prolongée.

La biodistribution des nanoparticules a été évaluée et s'est révélée extrêmement hétérogène, les concentrations variant énormément d'un organe à l'autre. Les nanoparticules quittent le compartiment sanguin rapidement, en moins de deux heures, et se répartissent dans les organes ou bien sont éliminées par le système urinaire. Cette étude menée sur une durée de 5 jours a révélé que les nano-sondes étaient rapidement éliminées de l'organisme.

L'administration de ces nanoparticules à des souris porteuses de tumeurs prostatiques n'a pas mis en évidence d'effet de concentration dans les tumeurs. En effet, nous n'avons pas détecté la présence de nano-sondes dans ces tumeurs, en dépit de la présence d'un vecteur spécifique à la surface de celles-ci. Ces nanoparticules semblent donc, à ce stade, incapables de se concentrer dans les zones d'intérêt, que ce soit par effet EPR (ciblage passif) ou par

ciblage actif. La lignée de LNCaP utilisée est cependant ancienne et pourrait ne plus surexprimer la PSMA. Cette absence pourrait expliquer les résultats décevants observés.

En parallèle de cette dernière partie, nous nous sommes consacrés à la conception d'inhibiteurs inédits de la PSMA, afin de les utiliser comme vecteurs originaux pour nos nano-sondes. Une étude de docking a permis dans un premier temps de déterminer les affinités théoriques entre la PSMA et 20 structures dérivées du substrat naturel de cette protéine, le NAAG. Deux structures particulièrement prometteuses ont été sélectionnées grâce à cette étude. L'élaboration de ces deux candidats, impliquant la synthèse chimio-enzymatique d'acides aminés non naturels, a été engagée.

Par manque de temps, nous n'avons pas pu mener ces deux synthèses à leur terme. Néanmoins, les composés clés des voies de synthèse choisies ont été obtenus avec succès, et devraient permettre dans un avenir proche d'aboutir aux deux analogues du NAAG recherchés.

2. Perspectives

Ce projet, bien que prometteur, est encore incomplet et certains aspects méritent d'être approfondis.

Il est dans un premier temps essentiel de comprendre pourquoi les nano-sondes s'avèrent actuellement inefficaces pour la détection de tumeurs prostatiques. En effet, la littérature contient de nombreux exemples de nanoparticules de taille similaire pour lesquelles un ciblage passif par effet EPR est constaté.² De plus, le vecteur utilisé avait précédemment permis le ciblage de cellules tumorales prostatiques par des nanoparticules polymères.¹⁴⁵

La surexpression de la PSMA par la lignée cellulaire utilisée dans cette étude doit donc être vérifiée.

La synthèse des inhibiteurs potentiels de la PSMA doit également être achevée. Les candidats vecteur (*S*)-**D** et (*R*)-**D** devraient être accessibles rapidement, à partir du composé **62** et des composés (*S*)-**60** et (*R*)-**60** (Schéma 65). La formation d'un isocyanate **61** permettra, par réaction avec l'amine **62**, de former les urées (*S*)-**64** et (*R*)-**64**. Le groupement carboxybenzyle pourra ensuite être clivé par hydrogénation catalytique. Une saponification permettrait alors d'obtenir les composés (*S*)-**D** et (*R*)-**D** sous forme de carboxylates.

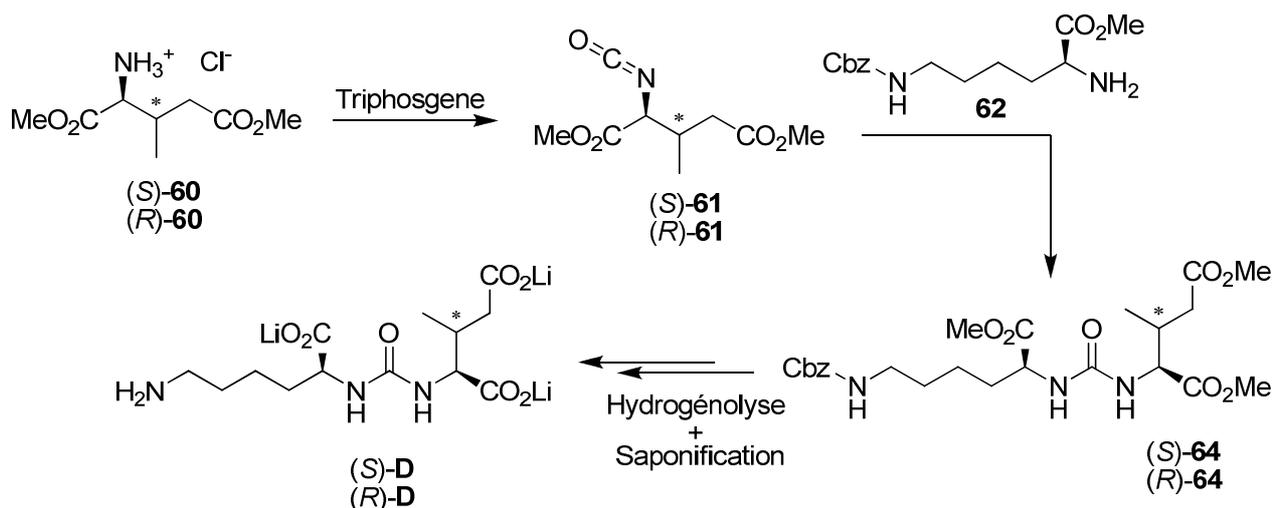


Schéma 65 : Achèvement de la synthèse des composés (S)-D et (R)-D.

Le tétra-acide (R)-J est également à notre portée. L'acide aminé **54** et le cétoacide dérivé du composé **75** devraient, par le biais d'une amination réductrice suivie de la réduction du nitrile résultant, nous donner accès aux produits attendus (R)-J et (S)-J (**Schéma 66**).

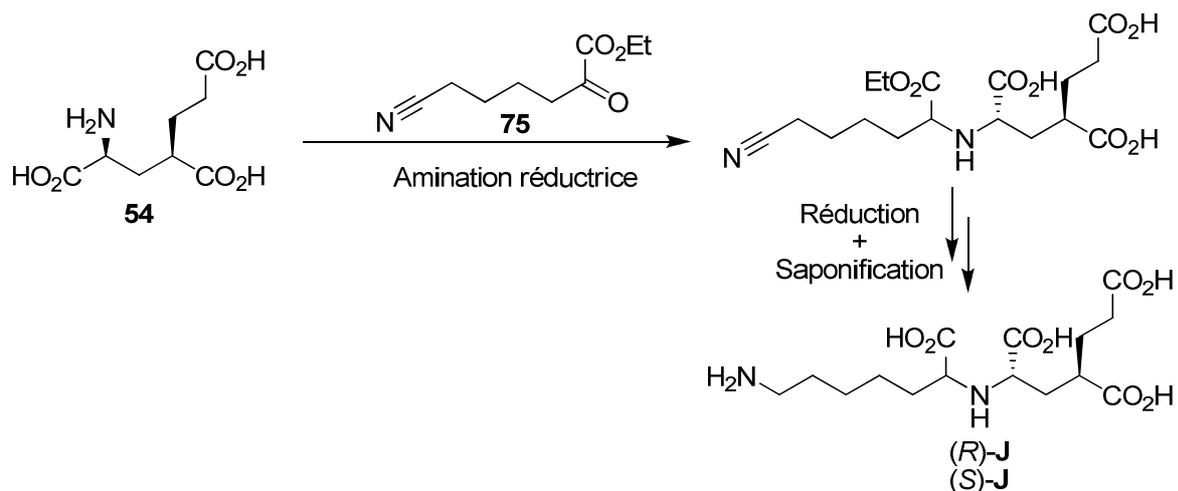


Schéma 66 : Achèvement de la synthèse du candidat J.

Une autre voie de synthèse pourrait nous permettre d'obtenir le composé (R)-J sous forme énantiomériquement pure (**Schéma 67**). En effet, la synthèse de l'alcool dérivé de la lysine est décrite dans la littérature, avec rétention complète de configuration.¹⁵⁷ Cet alcool pourrait ensuite subir une réaction de Mitsunobu avec le composé **54**, ou bien être converti en groupement partant avant de subir une substitution nucléophile par l'amine **54**. Ces deux voies se traduiraient par une inversion de configuration conduisant au composé de configuration R uniquement. Le composé (R)-J serait obtenu après clivage du groupement Cbz par hydrogénation catalytique.

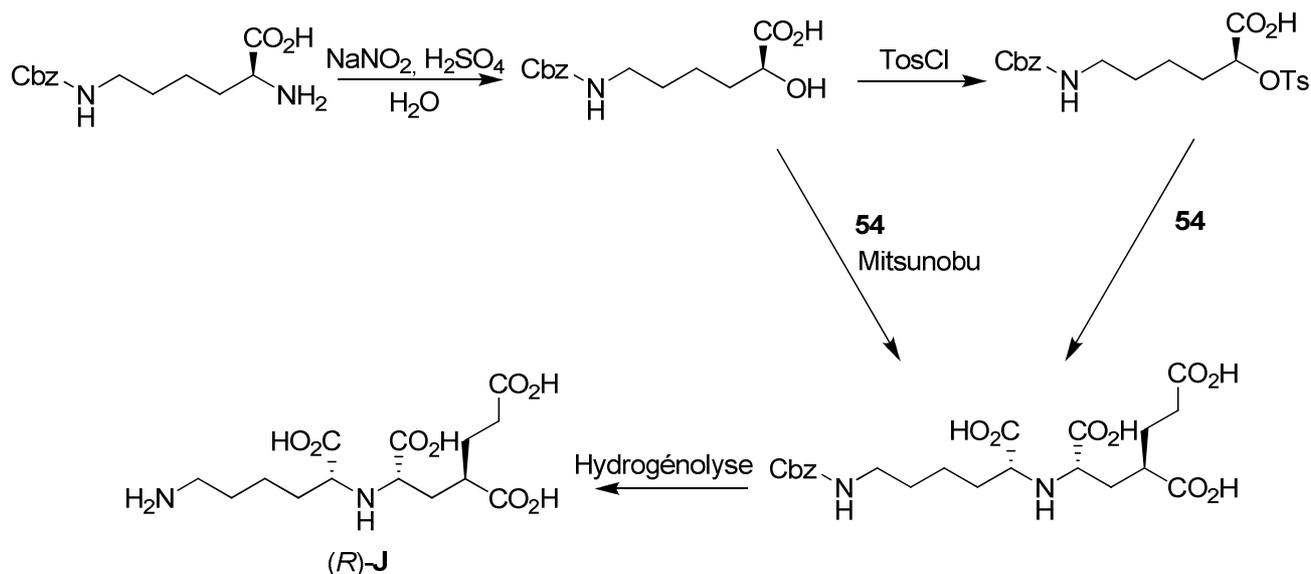


Schéma 67 : Voie de synthèse permettant d'obtenir spécifiquement le composé (R)-J.

Après avoir synthétisé ces inhibiteurs potentiels de la PSMA, nous pourrions évaluer leur activité biologique et la comparer avec celle du substrat naturel NAAG et à celle du DCL, inhibiteur de référence.

Un autre aspect important qui n'a pu être finalisé est la modification de certains complexes présentant d'excellentes propriétés de luminescence, afin de permettre leur encapsulation dans les nanoparticules de silice. La voie choisie pour la modification du ligand **39** s'est révélée inadaptée. Une nouvelle voie de synthèse devrait cependant permettre l'obtention de ce ligand (**Schéma 68**). Le 4-iodoimidazole donne avec le chlorure de trityle le composé **O**, substitué en position 1.¹⁵⁸ Ce composé, en subissant un couplage de Sonogashira donnerait l'alcyne **P**, qui pourrait ensuite être utilisé pour réaliser une substitution nucléophile sur un dérivé halogéné tel que le composé **Q**, porteur d'un groupement triméthylammonium. L'imidazolium **R** serait ensuite complètement déprotégé pour conduire à l'alcyne **S**, précurseur direct du ligand **T** par la voie de chimie click précédemment décrite.

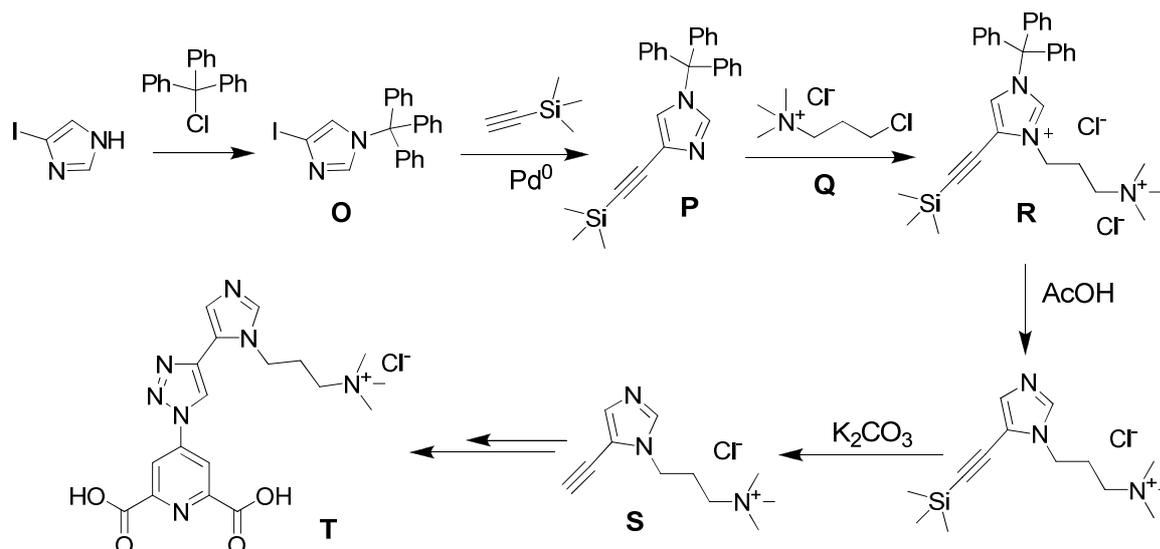


Schéma 68 : Proposition d'une synthèse permettant l'obtention d'un analogue du ligand **39**, muni d'un groupement triméthylammonium.

Outre les aspects directement liés au projet de départ et qui n'ont pu être complétés dans le temps imparti, ces travaux ouvrent également de nouvelles perspectives.

Le positionnement des états triplets des ligands grâce à des complexes de gadolinium pourrait ainsi se révéler très enrichissant. En effet, ce positionnement nous permettrait très certainement d'expliquer les variations observées sur les rendements quantiques de luminescence, ainsi que certains temps de demi-vie de luminescence particulièrement courts.

Etant donné la gamme de ligands synthétisés, tous basés sur une structure de type 4-triazolyl dipicolinate, le positionnement des états triplet de ces ligands pourrait également permettre de concevoir un modèle informatique visant à prévoir avec précision la position de l'état triplet de structures virtuelles, proches des 4-triazolyl dipicolinate. Ce modèle permettrait dès lors de concevoir des ligands adaptés à diverses utilisations grâce à un design intelligent, sans avoir à effectuer de 'tâtonnements' en synthétisant de nombreux complexes.

L'émission sous excitation multiphotonique des complexes de lanthanide et des nanohybrides synthétisés n'a été que très peu explorée au cours de ce travail. Des études précédentes¹²² ainsi que certains des résultats présentés dans ce mémoire laissent penser que ces complexes pourraient se révéler d'excellents luminophores sous excitation biphotonique et triphotonique. Il serait donc intéressant d'investiguer de façon systématique les propriétés de ces luminophores dans les domaines de l'optique non-linéaire.

Les résultats obtenus par excitation biphotonique de l'état triplet dans le nanohybride sont également très prometteurs, et pourraient s'avérer être une méthode rapide pour le

positionnement de ce dernier. Il serait maintenant intéressant d'étendre cette étude à l'intégralité des complexes synthétisés, et de comparer les résultats ainsi obtenus à ceux des méthodes 'classiques' de positionnement de l'état triplet, afin de vérifier la validité de cette approche.

Enfin, une limitation évidente du système que nous avons mis en place réside dans les longueurs d'onde d'excitation et d'émission des luminophores utilisées, se situant respectivement dans les domaines de l'ultraviolet et du visible. Or, nous savons que ces longueurs d'onde sont en dehors de la fenêtre de transparence des tissus, et sont par conséquent rapidement absorbées. L'excitation multiphotonique permet de s'affranchir d'une de ces limitations, en permettant d'exciter les nano-sondes dans le domaine du proche infrarouge (en multiphotonique). Le remplacement de ces complexes par un luminophore émettant dans le domaine de l'infrarouge, tel que des complexes à base de néodyme ou d'ytterbium,^{159,160} permettrait une détection de la luminescence sur de grandes profondeurs de tissus.¹⁶¹

D'autres fluorophores sont eux capables d'effectuer de l'up-conversion, c'est à dire d'absorber un rayonnement de faible énergie pour émettre un rayonnement de plus forte énergie. C'est par exemple le cas de certains nanocristaux de type NaYF₄ dopés avec des ions lanthanides, qui émettent un rayonnement ultraviolet sous excitation visible ou infrarouge. Ainsi, placés dans des nanoparticules vectorisées, ces luminophores émettraient des rayonnements UV directement dans l'organisme. Ce rayonnement nocif serait rapidement absorbé par les tissus et permettrait alors la destruction sélective des cellules proches des nanoparticules.¹⁶²

Partie expérimentale

Experimental section

1. General

Commercial products are used without purification. Anhydrous solvents were distilled and dried using classical procedures.

Thin layer chromatographies (TLC) were performed on silica gel (Merk, aluminium sheet, 60F254). TLCs were revealed under a UV light (254 nm), then using a 10% alcoholic solution of sulphuric acid containing 1% of vanillin followed by heating. A ninhydrin solution (2% in EtOH) was used to reveal amino acids.

Silica gel column chromatographies were performed using silica MN Kielselgel 60 M (0.04-0.063 mm/230-400 mesh, Macherey-Nagel)

Purifications on resin were carried out using open columns filled with Dowex 50 or Dowex 1 ion-exchange resin.

Dowex 1 resin (initially in Cl⁻ form) was conditioned in AcO⁻ form as follow: one volume of resin was soaked with 10 volumes of 1M NaOH, and then washed with water until neutral. The resin was then soaked with 1M AcOH until acidic pH and then washed with water to neutrality.

Ozonolysis were performed using a Fisher 502 ozone generator, using anhydrous oxygen.

NMR spectra were recorded in Fourier Transform mode with a Bruker AVANCE 400 spectrometer (¹H at 400 MHz, ¹³C at 100 MHz), at 298 K. Residual solvent signals were used as internal references (¹H and ¹³C). Data are reported as chemical shifts (δ) in ppm.

Emission and excitation spectra (in solution and suspension) were measured using an Agilent Cary Eclipse Fluorescence Spectrometer. The luminescence was excited by unpolarized light and detected at an angle of 90° (10 mm quartz cell), at a concentration of 10⁻⁵ M in Tris.HCl buffer (0.1 M, pH = 7.45) for lanthanide complexes, and in suspension in water (3 mg.mL⁻¹) for nanoparticles.

Phosphorescence lifetimes were obtained by pulsed excitation, at 616 nm in the case of europium complexes, and at 545 nm in the case of terbium complexes. Luminescence decay curves were fitted by least-squares analysis using the Gnuplot software.

The photoluminescence spectra at the solid state were collected using, as excitation source, a 450 W Xenon lamp continuous wave monochromatized (TRIAX 180 from Jobin-Yvon/Horriba) and analyzed by a TRIAX 550 Jobin-Yvon/Horriba monochromator equipped with either a R928 Hamamatsu photomultiplier or a nitrogen cooled CCD camera as detector. Excitation and emission spectra were obtained by monitoring the detector response while scanning the appropriate monochromator.

Photoluminescence quantum yields were measured using a Hamamatsu C9920 absolute photoluminescence quantum yield measurement system, at a concentration of 10^{-3} M in Tris.HCl buffer (0.1 M, pH = 7.45) for lanthanide complexes, and in suspension in water (3 mg.mL⁻¹) for nanoparticles. The emission spectra were integrated from 576 nm to 728 nm for europium complexes and from 476 nm to 634 nm for terbium complexes.

Transmission electron micrographs were obtained from nanoparticles suspended in water at a concentration of 1.5 mg/mL followed by deposition and air evaporation of a 10 μ L droplet on a collodion coated copper grid. The samples were analysed on a Hitachi H-7650 equipment at the CICS - Centre Imagerie Cellulaire Santé - of Clermont-Ferrand.

Electrospray (positive mode) high-resolution mass spectra were recorded on a Q-TOF micro spectrometer (Waters), using an internal lock mass (H_3PO_4) and an external lock mass (leucine enkephalin $[\text{M} + \text{H}]^+$: $m/z = 556.2766$).

Elemental analyses were performed at the SRSMC - Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes - of Nancy, France, on a Thermo Finnigan EA 1112 elemental analyzer.

IR spectra were recorded on a Shimadzu Fourier Transform Infrared Spectrophotometer FTIR-8400S.

The zeta potentials of nanoparticles were measured using a Malvern Zetasizer Nano Zs. Samples were prepared by suspending 3 mg of nanoparticles in 1mL of Tris.HCl buffer (pH 7.5). Zeta potential values were calculated from measured velocities using Smoluchowski equation, and results are expressed as the mean of 3 runs.

2. Synthesis of organic compounds

2.1. DPA derivatives

General procedures for CuAAC reactions

Method A (Catalyst: [CuCl(SiMes)(4,7-dichloro-1,10-phenanthroline)])

Dimethyl 4-azidopyridine-2,6-dicarboxylate (1.0 eq.) was dissolved into hot methanol (0.1 mol.L⁻¹) and the appropriate alkyne (1.2 eq.) was added. Then, copper complex (1 mol %) was added in one portion [CuCl(SiMes)(4,7-dichloro-1,10-phenanthroline)]. The resulting mixture was stirred at room temperature overnight.

The product precipitated during the reaction and was usually obtained pure after a simple filtration followed by washing with cold methanol.

Method B (Catalytic system: Cu(I)/THPTA/ascorbic acid)

Dimethyl 4-azidopyridine-2,6-dicarboxylate (1.0 eq.) was dissolved into hot methanol (0.1 mol.L⁻¹) and the appropriate alkyne (1.2 eq.) was added. Then, pre-catalyst solution (0.1 M aqueous stock solution, 2.5 mol %) followed by ascorbic acid solution (0.1 M aqueous stock solution, 7.5 mol %) were added. The solution turned from green to orange-yellow. After 10–20 minutes the solution returned to green and, if necessary, a portion of ascorbic acid 0.1 M solution was added.

The product precipitated during the reaction and was obtained pure after a simple filtration followed by washing with cold methanol.

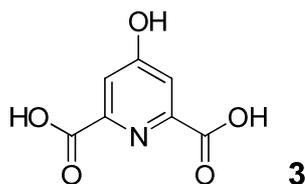
General procedures for saponification reactions

Method C (NaOH)

To a suspension of diester in water (0.2 mol.L⁻¹) was added a solution of aqueous 1 M NaOH (2 eq.). The reaction mixture was refluxed until total disappearance of the solid starting material (about 2 hours). After cooling to room temperature, 3 M aqueous hydrochloric acid was added dropwise until pH = 1. The desired diacid precipitated, and was isolated by filtration followed by washing with water, then was dried under vacuum.

Method D (LiOH)

To a suspension of diester in water (0.2 mol.L⁻¹) was added a solution of aqueous 1.5 M lithium hydroxide monohydrate (3 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 hours. Aqueous hydrochloric acid (3 M) was then added dropwise until pH = 1. The desired diacid precipitated after addition of acetone, and was isolated by filtration followed by washing with acetone and drying under vacuum.

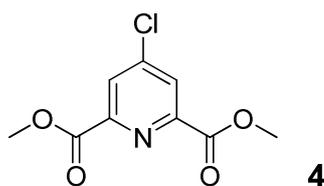
4-Hydroxypyridine-2,6-dicarboxylic acid 3 (Chelidamic acid, C₇H₅NO₅, 183.12 g.mol⁻¹)

Chelidonic acid **2** (10.21 g ; 50.5 mmol) was dissolved into 200 mL of concentrated aqueous ammonia at 0°C. The resulting orange solution was stirred at room temperature for five days. After concentrated under reduced pressure, the oily residue was dissolved in water (50 mL), and 1 g of charcoal was added. The mixture was heated to reflux for 10 minutes, filtered then cooled down to room temperature. Concentrated hydrochloric acid was then added the filtrate until pH = 1. The product precipitated and was recovered by filtration, as a white solid (8.91 g, yield: 96%).

Mp 245-250°C decomp.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 7.47 (2H, s, H_{pyr})

Analytical data were identical with those reported.¹²⁸

Dimethyl 4-chloropyridine-2,6-dicarboxylate 4 (C₉H₈ClNO₄, 229.62 g.mol⁻¹)

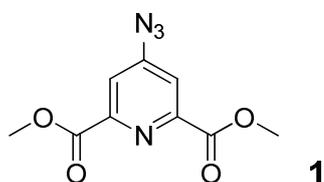
DMF (0.6 mL) was added at 0°C to a suspension of chelidamic acid **3** (6.05 g; 30.1 mmol) in SOCl₂ (100 mL). The resulting mixture was refluxed for 4 hours. Thionyl chloride was then removed under reduced pressure, and the resulting white solid was dissolved in 100 mL of CH₂Cl₂. The solution was cooled to 0°C and 20 mL of methanol were slowly added. After one hour of stirring, 50 mL of water were added before cautious addition of solid sodium carbonate (until pH > 8). The solution was extracted with dichloromethane (3x50mL). The organic layers were combined and dried over MgSO₄ and the solvent was removed under vacuum. The resulting white solid (5.51 g) was recrystallized from methanol, to afford **4** as white needles (3.63 g, yield: 53%).

Mp 142-143 °C (litt. 142.2 - 142.4°C)

TLC: R_f = 0.57 (cyclohexane/AcOEt 50/50)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 8.32 (2H, s, H_{pyr}), 3.93 (6H, s, CH₃)

Other analytical data were identical with those reported.¹⁶³

Dimethyl 4-azidopyridine-2,6-dicarboxylate 1 (C₉H₈N₄O₄, 236.18 g.mol⁻¹)

A suspension of dimethyl 4-chloropyridine-2,6-dicarboxylate **4** (3.03 g ; 13.2 mmol ; 1 eq.) and sodium azide (8.52 g ; 131 mmol ; 10 eq.) in DMF (50 mL) was heated at 50°C overnight. The resulting yellow mixture was cooled to room temperature then poured under vigorous stirring into 120 mL of ice-cold water. The product precipitated immediately and was isolated by filtration to give the azidodiester as an off-white solid (2.93 g; yield: 94%).

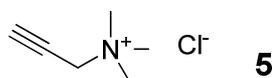
IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3075, 2960, 2122, 1753, 1718, 1594, 1445, 1351, 1273, 1250, 1190, 1158.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 7.87 (2H, s, H_{pyr}), 3.92 (6H, s, COOCH_3)

Anal. (%) Calcd for $\text{C}_9\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_4$: C, 45.77; H, 3.41; N, 23.72. Found: C, 45.19; H, 3.41; N, 23.75.

Other analytical data were identical with those reported.¹²³

***N,N,N*-Trimethylprop-2-yn-1-ammonium chloride **5** ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{ClN}$, 133.62 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)**



Aqueous trimethylamine solution (26.27 g of 45% wt. aqueous solution, 200 mmol, 2 eq.) was diluted into 30 mL of acetone. The mixture was slowly added to a solution of propargyl chloride (70% wt in toluene, 10.64 g of solution, 100 mmol, 1 eq.) previously diluted into 30 mL of acetone. After 1 hour, the solution was evaporated. The residue was co-evaporated with ethanol and toluene, then triturated in Et_2O , filtered and dried under vacuum to give an off-white powder (11.37 g, yield : 85%).

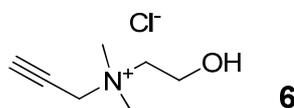
IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3141, 3015, 2945, 2114, 1475, 1399, 962, 894, 772, 727.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 4.39 (2H, d, $J = 2.5$ Hz, CH_2), 3.57 (1H, t, $J = 2.5$ Hz, CH), 3.26 (9H, s, CH_3)

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 83.0 (C, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 72.6 (CH, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 57.1 (CH_2 , CH_2N^+), 53.4 (CH_3 , $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$).

Other analytical data were identical with those reported.¹⁶⁴

***N*-(2-Hydroxyethyl)-*N,N*-dimethylprop-2-yn-1-ammonium chloride **6** ($\text{C}_7\text{H}_{14}\text{ClNO}$, 163.65 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)**



N,N-Dimethylethanolamine (1 g, 11.2 mmol, 1.0 eq) was suspended in 5 mL of toluene. A solution of propargyl chloride (70 % wt in toluene, 1.46 mL, 1.2 eq.) in toluene was slowly added under stirring. After 4 days of vigorous stirring, the resulting suspension was filtered to obtain a hygroscopic off-white solid which was washed with pentane and dried under vacuum to afford a white solid (1.79g, yield : 97 %).

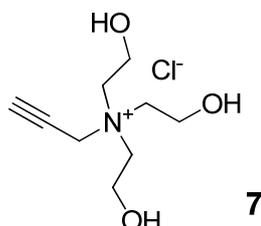
IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3254, 3216, 2124, 1458, 1441, 1376, 1149, 1085, 1026, 1002, 995, 917, 874.

^1H NMR (400 MHz, $\text{MeOD-}d_4$) δ (ppm) 4.46 (2H, s, CCH_2N^+), 4.03 (2H, t, $J = 5$ Hz, CH_2OH), 3.61 (2H, t, $J = 5$ Hz, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.55 (1H, s, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 3.28 (6H, s, CH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 84.0 (C, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 73.8 (CH, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 67.7 (CH₂, CH_2OH), 58.0 (CH₂, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 57.5 (CH₂, CH_2N^+), 53.1 (CH₃, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$).

HRMS-ESI m/z Calcd for $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{NO}$ $[\text{M}-\text{Cl}]^+$: 128.1075; found: 128.1078.

***N,N,N*-Tris(2-hydroxyethyl)prop-2-yn-1-ammonium chloride 7** ($\text{C}_9\text{H}_{18}\text{ClNO}_3$, 223.70 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)



Into 5 mL of toluene was diluted triethanolamine (2.22 g, 14.9 mmol, 1.0 eq.) and 2 mL of ethanol. A solution of propargyl chloride (70 % wt in toluene, 1.94 mL, 1.2 eq.) diluted into 5 mL of toluene was slowly added under stirring. After 12 days of vigorous stirring, the resulting suspension was filtered to obtain an off-white solid, which was washed with pentane then dried under vacuum to give a white solid (2.58 g, yield : 77 %).

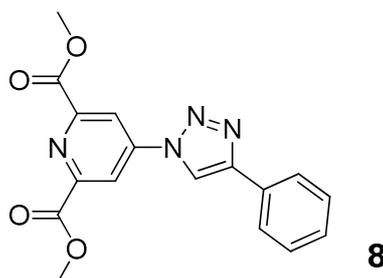
IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3280, 3246, 2978, 2127, 1454, 1363, 1072, 1040, 918, 684.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 5.36 (3H, t, $J = 4.5$ Hz, OH), 4.54 (2H, d, $J = 2$ Hz, CCH_2N^+), 4.05 (1H, t, $J = 2$ Hz, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 3.86 (6H, q, $J = 5$ Hz, CH_2OH), 3.59 (6H, t, $J = 5$ Hz, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$)

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 83.3 (C, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 72.4 (CH, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 62.8 (3 CH₂, 3x CH_2OH), 56.5 (3 CH₂, 3x $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 53.4 (CH₂, CH_2N^+).

HRMS-ESI m/z Calcd for $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{NO}_3$ $[\text{M}-\text{Cl}]^+$: 188.1287; found: 188.1276.

Dimethyl 4-(4-phenyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate 8 ($\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_4$, 338.32 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)



Synthesised according to method A, using 500 mg of azide **1** (2.1 mmol, 1 eq.) and ethynylbenzene (350 μL , 3.18 mmol, 1.5 eq.) as alkyne, giving a yellow solid (610 mg, yield: 86%).

Synthesised according to method B, using 250 mg of azide **1** (1.05 mmol, 1 eq.) and ethynylbenzene (175 μL , 1.59 mmol, 1.5 eq.) as alkyne, giving a yellow solid (315 mg, yield: 89%).

Mp 240°C

TLC : $R_f = 0.35$ (Cyclohexane/AcOEt, 50/50)

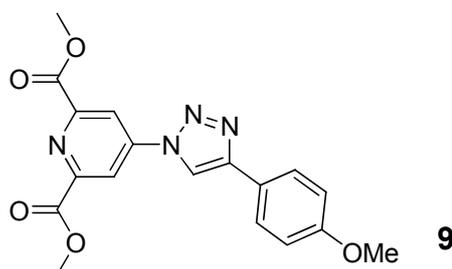
IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3136, 2953, 1755, 1720, 1597, 1446, 1253, 1222, 1157, 1014, 760.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 9.85 (1H, s, H_{triazole}), 8.82 (2H, s, H_{pyr}), 7.99 (2H, d, $J = 7.5$ Hz, $H_{\text{ar o}}$), 7.53 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, $H_{\text{ar m}}$), 7.43 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, $H_{\text{ar p}}$), 3.99 (6H, s, COOCH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 163.8 (2 C, 2x COOCH_3), 149.6 (2 C, 2x $\text{C}_{\text{pyr}}\text{COOCH}_3$), 148.0 (C, $\text{C}_{\text{triazole}}$), 144.7 (C, C_{pyr}), 129.4 (C, $\text{C}_{\text{ar-triazole}}$), 129.0 (2 CH, 2x C_{arH}), 128.6 (CH, C_{arH}), 125.3 (2 CH, 2x C_{arH}), 119.9 (CH, $\text{CH}_{\text{triazole}}$), 116.8 (2 CH, 2x C_{pyrH}), 52.9 (2 CH_3 , 2x COOCH_3).

HRMS-ESI m/z Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_4\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 361.0913; found: 361.0904.

Dimethyl 4-(4-(4-methoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate 9
($\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_5$, 368.34 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)



Synthesised according to method A, using 100 mg of azide **1** (0.42 mmol, 1 eq.) and 1-ethynyl-4-methoxybenzene (67 μL , 0.51 mmol, 1.2 eq.) as alkyne, giving a yellow solid (135 mg, yield: 87%).

Synthesised according to method B, using 236 mg of azide **1** (1.0 mmol, 1 eq.) and 1-ethynyl-4-methoxybenzene (130 μL , 1.0 mmol, 1 eq.) as alkyne, giving a white solid (300 mg, yield: 82%).

Mp: 260.4°C

TLC : $R_f = 0.21$ (Cyclohexane/AcOEt, 50/50)

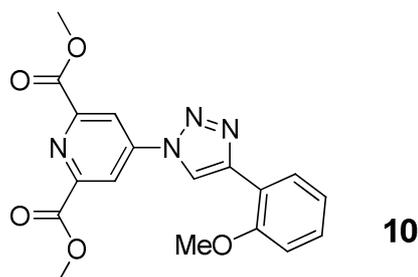
IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3143, 2954, 1748, 1716, 1597, 1479, 1438, 1360, 1323, 1249, 1186, 1156, 1124, 1050, 1030, 956, 846, 752.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 9.73 (1H, s, H_{triazole}), 8.80 (2H, s, H_{pyr}), 7.91 (2H, d, $J = 9$ Hz, H_{ar}), 7.10 (2H, d, $J = 9$ Hz, H_{ar}), 3.99 (6H, s, COOCH_3), 3.82 (3H, s, OCH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 163.8 (2 C, 2x COOCH_3), 159.5 (C, $\text{C}_{\text{arOCH}_3}$), 147.9 (2 C, 2x $\text{C}_{\text{pyr}}\text{COOCH}_3$), 144.7 (C, C_{pyr}), 126.8 (C, $\text{C}_{\text{ar-triazole}}$), 121.9 (CH, $\text{CH}_{\text{triazole}}$), 118.9 (2 CH, 2x C_{arH}), 116.8 (2 CH, 2x C_{pyrH}), 114.4 (2 CH, 2x C_{arH}), 55.1 (CH_3 , PhOCH_3), 52.9 (2 CH_3 , 2x COOCH_3).

HRMS-ESI m/z Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_5\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 391.1018, found: 391.1000.

Dimethyl 4-(4-(2-methoxyphenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate 10
(C₁₈H₁₆N₄O₅, 368.34 g.mol⁻¹)



Synthesised according to method A, using 600 mg of azide **1** (2.54 mmol, 1 eq.) and 1-ethynyl-2-methoxybenzene (400 μ L, 3.05 mmol, 1.2 eq.) as alkyne, giving an orange solid (813 mg, yield: 87%).

Synthesised according to method B, using 600 mg of azide **1** (2.54 mmol, 1 eq.) and 1-ethynyl-2-methoxybenzene (330 μ L, 2.54 mmol, 1 eq.) as alkyne, giving a white solid (855 mg, yield: 91%).

IR (KBr) $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹: 3195, 3109, 2955, 2843, 1728, 1600, 1481, 1442, 1327, 1249, 1014, 756.

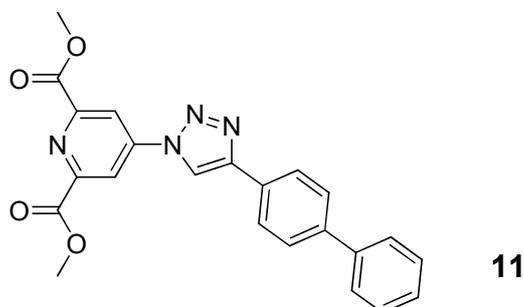
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 9.43 (1H, s, *H*_{triazole}), 8.88 (2H, s, *H*_{pyr}), 8.21 (1H, dd, *J*₁ = 8 Hz, *J*₂ = 1.5 Hz, *H*_{ar}), 7.42 (1H, dt, *J*₁ = 8 Hz, *J*₂ = 1.5 Hz, *H*_{ar}), 7.20 (1H, d, *J* = 8 Hz, *H*_{ar}), 7.11 (1H, t, *J* = 8 Hz, *H*_{ar}), 4.00 (3H, s, OCH₃), 3.99 (6H, s, COOCH₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 164.4 (2 C, 2x COOCH₃), 156.0 (C, C_{ar}OCH₃), 150.4 (2 C, 2x C_{pyr}COOCH₃), 145.5 (C, C_{triazole}), 145.1 (C, C_{pyr}), 130.0 (CH, C_{ar}H), 128.1 (CH, C_{ar}H), 121.2 (CH, C_{ar}H), 119.9 (CH, CH_{triazole}), 118.0 (C, C_{ar}-triazole), 110.9 (CH, C_{ar}H), 117.5 (2 CH, 2x C_{pyr}H), 55.7 (CH₃, PhOCH₃), 53.7 (2 CH₃, 2x COOCH₃).

HRMS-ESI *m/z* Calcd for C₁₈H₁₆N₄O₅Na [M+Na]⁺: 391.1018; found: 391.1036.

Anal. (%) Calcd for C₁₈H₁₆N₄O₅: C 58.69, H 4.38, N 15.21; found: C 58.34, H 4.30, N 15.35.

Dimethyl 4-(4-(biphenyl-4-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate 11
(C₂₃H₁₈N₄O₄, 414.41 g.mol⁻¹)



Synthesised according to method A, using 500 mg of azide **1** (2.12 mmol, 1 eq.) and 4-ethynylbiphenyl (453 mg, 2.54 mmol, 1.2 eq.) as alkyne, giving a yellow solid (831 mg, yield: 94%).

Synthesised according to method B, using 236 mg of azide **1** (1.0 mmol, 1 eq.) and 4-ethynylbiphenyl (179 mg, 1.0 mmol, 1 eq.) as alkyne, giving a white solid (372 mg, yield: 90%).

IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3117, 2955, 1751, 1716, 1597, 1446, 1253, 1045, 1010, 768.

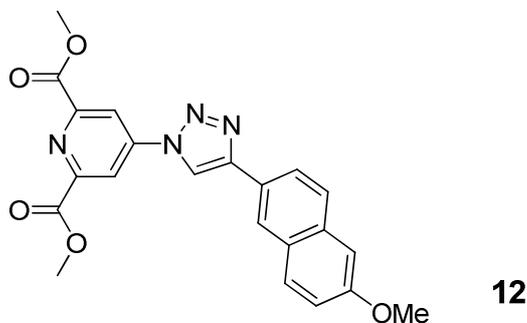
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 9.90 (1H, s, H_{triazole}), 8.83 (2H, s, H_{pyr}), 8.08 (2H, d, $J = 8$ Hz, H_{ar}), 7.87 (2H, d, $J = 8$ Hz, H_{ar}), 7.76 (2H, d, $J = 8$ Hz, H_{ar}), 7.50 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H_{ar}), 7.40 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H_{ar}), 4.00 (6H, s, COOCH_3).

^{13}C NMR: compound not enough soluble in common NMR solvents.

HRMS-ESI m/z Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_4\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 437.1226; found: 437.1240.

Anal. (%) Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_4 \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$: C 65.24, H 4.52, N 13.23; found: C 65.52, H 4.39, N 13.45.

Dimethyl 4-(4-(6-methoxynaphthalen-2-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate 12 ($\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_5$, 418.40 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)



Synthesised according to method A, using 500 mg of azide **1** (2.12 mmol, 1 eq.) and 2-ethynyl-6-methoxynaphthalene (473 mg, 2.54 mmol, 1.2 eq.) as alkyne, giving an orange solid (849 mg, yield: 96%).

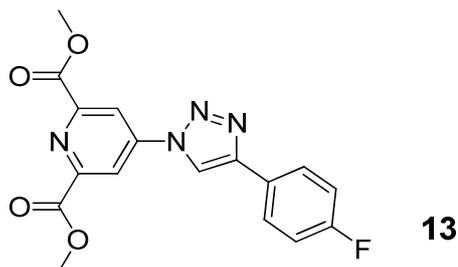
IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3147, 2958, 2839, 1747, 1716, 1597, 1485, 1442, 1246, 1118, 1014, 883, 752.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 9.87 (1H, s, H_{triazole}), 8.81 (2H, s, H_{pyr}), 8.45 (1H, s, H_{ar}), 8.03 (1H, dd, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 1.5$ Hz, H_{ar}), 7.95 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H_{ar}), 7.91 (1H, d, $J = 9$ Hz, H_{ar}), 7.36 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H_{ar}), 7.22 (1H, dd, $J_1 = 9$ Hz, $J_2 = 2.5$ Hz, H_{ar}), 4.00 (6H, s, COOCH_3), 3.90 (3H, s, OCH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 163.8 (2 C, 2x COOCH_3), 157.7 (C, $\text{C}_{\text{ar}}\text{OCH}_3$), 149.6 (2 C, 2x $\text{C}_{\text{pyr}}\text{COOCH}_3$), 148.2 (C, $\text{C}_{\text{triazole}}$), 144.7 (C, C_{pyr}), 134.2 (C, C_{ar}), 129.5 (CH, $\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 128.3 (C, C_{ar}), 127.5 (CH, $\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 124.6 (C, C_{ar}), 124.0 (CH, $\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 123.9 (CH, $\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 119.8 (CH, $\text{CH}_{\text{triazole}}$), 119.3 (CH, $\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 116.8 (2 CH, 2x $\text{C}_{\text{pyr}}\text{H}$), 106.0 (CH, $\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 55.2 (CH_3 , $\text{C}_{\text{ar}}\text{OCH}_3$), 53.0 (2 CH_3 , 2x COOCH_3).

HRMS-ESI m/z Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_5\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 441.1175; found: 441.1196.

Anal. (%) Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_5 \cdot \frac{1}{3} \text{H}_2\text{O}$: C 62.26, H 4.43, N 13.20; found: C 62.31, H 4.36, N 13.34.

Dimethyl 4-(4-(4-fluorophenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate 13**(C₁₇H₁₃FN₄O₄, 356.31 g.mol⁻¹)**

Synthesised according to method A, using 100 mg of azide **1** (0.42 mmol, 1 eq.) and 1-ethynyl-4-fluorobenzene (59 μ L, 0.51 mmol, 1.2 eq.) as alkyne, giving a yellow solid (139 mg, yield: 92%).

IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3140, 3113, 2958, 1747, 1720, 1597, 1481, 1253, 1161, 1053, 810, 752.

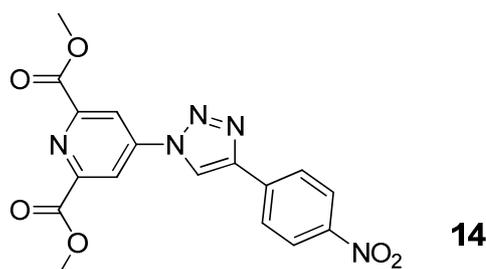
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 9.83 (1H, s, H_{triazole}), 8.80 (2H, s, H_{pyr}), 8.02 (2H, dd, $J_1 = 9$ Hz, $J_2 = 6$ Hz, H_{ar}), 7.39 (2H, t, $J = 9$ Hz, H_{ar}), 4.00 (6H, s, COOCH₃).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 166.2 (C, d, $J_{\text{CF}} = 246$ Hz, C_{arF}), 163.8 (2 C, 2x COOCH₃), 149.6 (2 C, 2x $C_{\text{pyr}}\text{COOCH}_3$), 147.1 (C, C_{triazole}), 144.7 (C, C_{pyr}), 127.5 (2 CH, d, $J_{\text{CF}} = 9$ Hz, 2x C_{arH}), 126.0 (C, C_{ar}), 119.9 (CH, $\text{CH}_{\text{triazole}}$), 116.8 (2 CH, 2x C_{pyrH}), 116.1 (2 CH, d, $J_{\text{CF}} = 22$ Hz, 2x C_{arH}), 53.0 (2 CH₃, 2x COOCH₃).

¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-d₆ / internal ref. C₆F₆) δ (ppm) -115.1.

HRMS-ESI m/z Calcd for C₁₇H₁₃FN₄O₄Na [M+Na]⁺: 379.0819; found: 379.0806.

Anal. (%) Calcd for C₁₇H₁₃FN₄O₄: C 57.30, H 3.68, N 15.72; found: C 56.75, H 3.73, N 15.77.

Dimethyl 4-(4-(4-nitrophenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate 14**(C₁₇H₁₃N₅O₆, 383.32 g.mol⁻¹)**

Synthesised according to method A, using 300 mg of azide **1** (1.27 mmol, 1 eq.) and 1-ethynyl-4-nitrobenzene (197 mg, 1.33 mmol, 1.05 eq.) as alkyne, giving an orange solid (453 mg, yield: 93%).

Synthesised according to method B, using 600 mg of azide **1** (2.54 mmol, 1 eq.) and 1-ethynyl-4-nitrobenzene (393 mg, 2.67 mmol, 1.05 eq.) as alkyne, giving an orange solid (926 mg, yield: 95%).

TLC : $R_f = 0.19$ (Cyclohexane/AcOEt, 50/50)

Mp: 263.7°C

IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3144, 3105, 3063, 2959, 1747, 1712, 1597, 1519, 1342, 1257, 1006, 756.

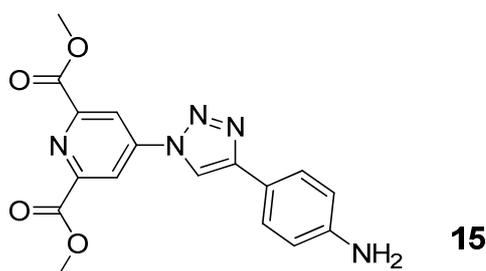
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 10.10 (1H, s, H_{triazole}), 8.83 (2H, s, H_{pyr}), 8.42 (2H, d, $J = 9$ Hz, H_{ar}), 8.25 (2H, d, $J = 9$ Hz, H_{ar}), 4.00 (6H, s, COOCH_3).

^{13}C NMR: compound not enough soluble in common NMR solvents.

HRMS-ESI m/z Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 406.0764; found: 406.0780.

Anal. (%) Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_6$: C 53.27, H 3.42, N 18.27; found: C 52.76, H 3.30, N 18.05.

Dimethyl 4-(4-(4-aminophenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate 15
($\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_4$, 353.33 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)



Synthesised according to method B, using 570 mg of azide **1** (2.41 mmol, 1 eq.) and 4-ethynylaniline (297 mg, 2.54 mmol, 1.05 eq.) as alkyne, giving a beige solid (812 mg, yield: 95%).

IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3421, 3309, 3128, 2955, 1732, 1597, 1446, 1257, 1049, 752.

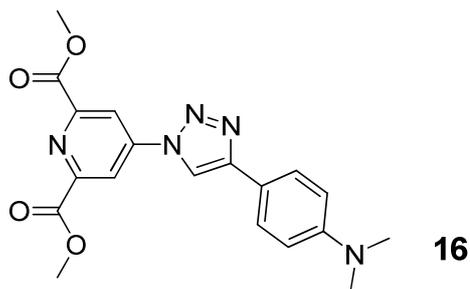
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 9.51 (1H, s, H_{triazole}), 8.78 (2H, s, H_{pyr}), 7.63 (2H, d, $J = 8$ Hz, H_{ar}), 6.67 (2H, d, $J = 8$ Hz, H_{ar}), 5.38 (2H, s, NH_2), 3.99 (6H, s, COOCH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 163.9 (2 C, 2x $\text{C}_{\text{pyr}}\text{COOCH}_3$), 149.6 (2 C, 2x $\text{C}_{\text{pyr}}\text{COOCH}_3$), 149.3 (C, $\text{C}_{\text{ar}}\text{-NH}_2$), 149.1 (C, $\text{C}_{\text{triazole}}$), 144.8 (C, C_{pyr}), 126.5 (2 CH, 2x $\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 117.2 (CH, $\text{CH}_{\text{triazole}}$), 116.7 (C, $\text{C}_{\text{ar}}\text{-triazole}$), 116.6 (2 CH, 2x $\text{C}_{\text{pyr}}\text{H}$), 113.9 (2 CH, 2x $\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 53.0 (2 CH_3 , 2x COOCH_3).

HRMS-ESI m/z Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 354.1202; found: 354.1183.

Anal. (%) Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_4 \cdot 3/2 \text{H}_2\text{O}$: C 53.98, H 4.25, N 18.33; found: C 53.87, H 4.23, N 18.32.

Dimethyl 4-(4-(4-(*N,N*-dimethylamino)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate 16
($\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_4$, 381.39 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)



Method A: presence of byproducts.

Synthesised according to method B, using 300 mg of azide **1** (1.27 mmol, 1 eq.) and 4-ethynyl-*N,N*-dimethylaniline (137 mg, 1.33 mmol, 1.05 eq.) as alkyne.

After filtration, the orange solid was suspended into 5 mL of water, and concentrated aqueous HCl was added dropwise until the solution was clear. After a few seconds, the hydrochloride precipitated and was isolated by filtration and washed with water. The resulting off-white solid was resuspended in water, and Na₂CO₃ was added until pH 8. The product **16** was then recovered by filtration as an off-white solid (440 mg, yield: 91%).

IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 2951, 2889, 2804, 1724, 1616, 1597, 1473, 1400, 1357, 1330, 1246, 1122, 1041, 779, 744.

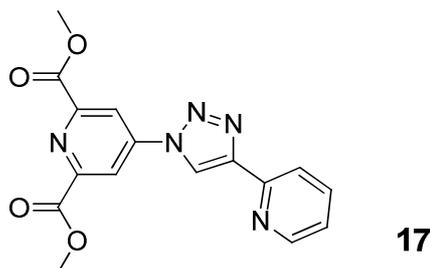
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 9.60 (1H, s, *H*_{triazole}), 8.79 (2H, s, *H*_{pyr}), 7.79 (2H, d, *J* = 9 Hz, *H*_{ar}), 6.84 (2H, d, *J* = 9 Hz, *H*_{ar}), 4.00 (6H, s, COOCH₃), 2.98 (6H, s, N(CH₃)₂).

¹³C NMR: compound not enough soluble in common NMR solvents.

HRMS-ESI *m/z* Calcd for C₁₉H₁₉N₅O₄Na [M+Na]⁺: 404.1335; found: 404.1344.

Anal. (%) Calcd for C₁₉H₁₉N₅O₄: C 59.84, H 5.02, N 18.36; found: C 59.22, H 4.98, N 18.21.

Dimethyl 4-(4-(pyridin-2-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate 17
(C₁₆H₁₃N₅O₄, 339.31 g.mol⁻¹)



Synthesised according to method A, using 650 mg of azide **1** (2.75 mmol, 1 eq.) and 2-ethynylpyridine (470 μ L, 3.30 mmol, 1.2 eq.) as alkyne.

After filtration, the beige obtained solid was dissolved into CH₂Cl₂ and this organic layer was washed two times with a 0.1 M aqueous EDTA solution (*cf.* general procedure) in order to remove any copper. Organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated under vacuum, leading to diester **17** as a white solid (890 mg, yield: 85%).

IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3140, 3082, 2955, 1748, 1716, 1597, 1446, 1323, 1249, 1230, 1018, 790, 756.

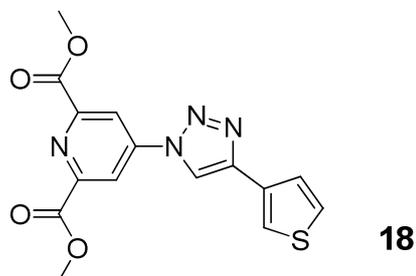
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 9.88 (1H, s, *H*_{triazole}), 8.91 (2H, s, *H*_{pyr}), 8.69 (1H, ddd, *J*₁ = 5 Hz, *J*₂ = 2 Hz, *J*₃ = 1 Hz, *H*_{ar5}), 8.15 (1H, dt, *J*₁ = 8 Hz, *J*₂ = 1.0 Hz, *H*_{ar2}), 7.98 (1H, dt, *J*₁ = 8 Hz, *J*₂ = 2.0 Hz, *H*_{ar3}), 7.44 (1H, ddd, *J*₁ = 8 Hz, *J*₂ = 5 Hz, *J*₃ = 1 Hz, *H*_{ar4}), 3.99 (6H, s, COOCH₃).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 163.8 (2 C, 2x *r*-COOCH₃), 149.8 (CH, *C*_{arH}), 149.6 (2 C, 2x *C*_{pyr}COOCH₃), 148.8 (C, *C*_{triazole}), 148.7 (C, *C*_{ar}), 144.8 (C, *C*_{pyr}), 137.4 (CH, *C*_{arH}), 123.6 (CH, *C*_{arH}), 122.1 (CH, *CH*_{triazole}), 120.0 (CH, *C*_{arH}), 117.3 (2 CH, 2x *C*_{pyrH}), 52.9 (2 CH₃, 2x COOCH₃).

HRMS-ESI *m/z* Calcd for C₁₆H₁₃N₅O₄Na [M+Na]⁺: 362.0865; found: 362.0883.

Anal. (%) Calcd for C₁₆H₁₃N₅O₄. H₂O: C 53.78, H 4.23, N 19.60; found: C 54.23, H 3.89, N 19.76.

Dimethyl 4-(4-(thiophen-3-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate 18
(C₁₅H₁₂N₄O₄S, 344.35 g.mol⁻¹)



Synthesised according to method A, using 100 mg of azide **1** (0.42 mmol, 1 eq.) and 3-ethynyl-thiophene (50 μL, 0.51 mmol, 1.2 eq.) as alkyne, giving a beige solid (131 mg, yield: 91%).

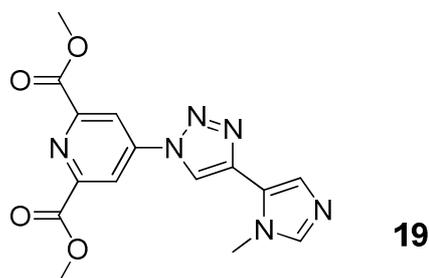
IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3132, 3067, 2955, 1755, 1716, 1600, 1446, 1253, 1045, 987, 783.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 9.68 (1H, s, *H*_{triazole}), 8.77 (2H, s, *H*_{pyr}), 8.02 (1H, dd, *J*₁ = 3 Hz, *J*₂ = 1 Hz, C=CHS), 7.74 (1H, dd, *J*₁ = 5 Hz, *J*₂ = 3 Hz, CCH=CHS), 7.61 (1H, dd, *J*₁ = 5 Hz, *J*₂ = 1 Hz, CCH=CHS), 3.99 (6H, s, COOCH₃).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 163.8 (2 C, 2x COOCH₃), 149.6 (2 C, 2x C_{pyr}COOCH₃), 144.7 (C, C_{pyr}), 144.5 (C, C_{triazole}), 130.6 (C, C_{thiophene}), 127.6 (CH, CH=CHS), 125.6 (CH, CH=CHS), 122.1 (CH, C=CHS), 119.5 (CH, CH_{triazole}), 116.8 (2 CH, 2x C_{pyr}H), 53.0 (2 CH₃, 2x COOCH₃).

HRMS-ESI *m/z* Calcd for C₁₅H₁₂N₄O₄SNa [M+Na]⁺: 367.0477; found: 367.0474.

Dimethyl 4-(4-(1-methyl-1H-imidazol-5-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate 19 (C₁₅H₁₄N₆O₄, 342.31 g.mol⁻¹)



Method A: procedure was slightly modified as follows:

Synthesised according to method A, using 850 mg of azide **1** (3.60 mmol, 1 eq.) and 5-ethynyl-1-methyl-1H-imidazole (440 μL, 4.32 mmol, 1.2 eq.) as alkyne.

After filtration, the solid was dissolved into CH₂Cl₂ and the resulting organic layer was washed two times with a 0.1 M aqueous EDTA solution (*cf.* general procedure) in order to remove any copper. Organic layer was dried on MgSO₄ and concentrated under reduced pressure, to give the expected diester as a beige solid (1.13 g, yield: 92%).

TLC : R_f : 0.67 (CH₂Cl₂/MeOH 80/20)

IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3106, 3043, 2955, 1755, 1716, 1597, 1447, 1253, 1126, 1049, 1018, 752.

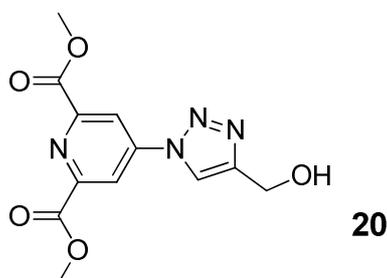
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 9.59 (1H, s, H_{triazole}), 8.85 (2H, s, H_{pyr}), 7.80 (1H, s, NCHN), 7.39 (1H, s, C=CHN), 3.99 (6H, s, COOCH₃), 3.90 (3H, s, NCH₃).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 163.8 (2 C, 2x COOCH₃), 149.6 (2 C, 2x C_{pyr}COOCH₃), 144.6 (C, C_{pyr}), 140.2 (CH, NCHN), 139.2 (C, C_{triazole}), 128.7 (CH, C=CHN_{imidazole}), 122.4 (C, C_{imidazole}), 119.6 (CH, CH_{triazole}), 117.0 (2 CH, 2x C_{pyr}H), 53.0 (2 CH₃, 2x COOCH₃), 33.0 (CH₃, NCH₃).

HRMS-ESI m/z Calcd for C₁₅H₁₅N₆O₄ [M+H]⁺: 343.1155; found: 343.1155.

Anal. (%) Calcd for C₁₅H₁₄N₆O₄: C 52.63, H 4.12, N 24.55; found: C 52.33, H 4.08, N 24.53.

Dimethyl 4-(4-(hydroxymethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate 20
(C₁₂H₁₂N₄O₅, 292.25 g.mol⁻¹)



Synthesised according to method A, using 603 mg of azide **1** (2.56 mmol, 1 eq.) and propargylic alcohol (181 μL , 3.07 mmol, 1.2 eq.) as alkyne, giving an off-white solid (699 mg, yield: 94%).

Synthesised according to method B, using 300 mg of azide **1** (1.28 mmol, 1 eq.) and propargylic alcohol (83 μL , 1.4 mmol, 1.1 eq.) as alkyne, giving an off-white solid (354 mg, yield: 95%).

The last procedure was slightly modified as follows: to precipitate the final product, the solution was concentrated to 1/3 of the volume before cooling to 0°C. The product was obtained pure after a simple filtration and washing with cold methanol.

Mp: 188°C

TLC : R_f = 0.22 (Cyclohexane/AcOEt, 50/50)

IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3310, 3080, 1720, 1599, 1437, 1317, 1250, 1151, 1064, 1024, 1010, 785, 744.

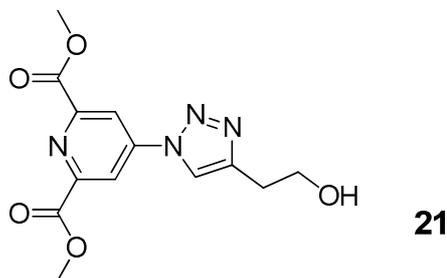
^1H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.73 (2H, s, H_{pyr}), 8.22 (1H, s, H_{triazole}), 4.96 (2H, s, CH₂OH), 4.08 (6H, s, COOCH₃), 1.77 (1H, br s, CH₂OH).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 9.23 (1H, s, H_{triazole}), 8.79 (2H, s, H_{pyr}), 5.44 (1H, t, J = 5.5 Hz, CH₂OH), 4.65 (2H, d, J = 5.5 Hz, CH₂OH), 3.98 (6H, s, COOCH₃).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 163.9 (2 C, 2x COOCH₃), 151.0 (C, C_{triazole}), 149.7 (2 C, 2x C_{pyr}COOCH₃), 144.9 (C, C_{pyr}), 121.6 (CH, CH_{triazole}), 117.0 (2 CH, 2x C_{pyr}H), 54.8 (CH₂, CH₂OH), 53.0 (2 CH₃, 2x COOCH₃).

HRMS-ESI m/z Calcd for C₁₂H₁₂N₄O₅Na [M+Na]⁺: 315.0705, found: 315.0696.

Dimethyl 4-(4-(2-hydroxyethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate 21
(C₁₃H₁₄N₄O₅, 306.27 g.mol⁻¹)



Synthesised according to method A, using 250 mg of azide **1** (1.06 mmol, 1 eq.) and but-3-yn-1-ol (96 μL, 1.27 mmol, 1.2 eq.) as alkyne, giving a white solid (278 mg, yield: 86%).

IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3333, 3086, 1759, 1724, 1597, 1442, 1253, 1057, 756, 574.

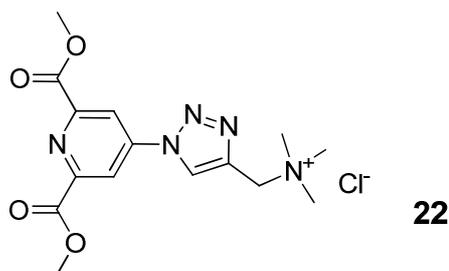
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 9.11 (1H, s, *H*_{triazole}), 8.75 (2H, s, *H*_{pyr}), 4.79 (1H, t, *J* = 6 Hz, CH₂CH₂OH), 3.98 (s, 6H, COOCH₃), 3.73 (2H, q, *J* = 6 Hz, CH₂OH), 2.89 (2H, t, *J* = 6 Hz, CH₂CH₂OH).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 163.8 (2 C, 2x COOCH₃), 149.6 (2 C, 2x C_{pyr}COOCH₃), 146.7 (C, C_{triazole}), 144.8 (C, C_{pyr}), 121.2 (CH, CH_{triazole}), 116.7 (2 CH, 2x C_{pyr}H), 59.8 (CH₂, CH₂OH), 52.9 (2 CH₃, 2x COOCH₃), 29.1 (CH₂, CH₂CH₂OH).

HRMS-ESI *m/z* Calcd for C₁₃H₁₄N₄O₅Na [M+Na]⁺: 329.0862; found: 329.0865.

Anal. (%) Calcd for C₁₃H₁₄N₄O₅: C 50.98, H 4.61, N 18.29; found: C 50.66, H 4.44, N 18.08.

Dimethyl 4-(4-(*N,N,N*-trimethylammoniomethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate chloride 22 (C₁₅H₂₀ClN₅O₄, 369.80 g.mol⁻¹)



Synthesised according to method A, using 280 mg of azide **4** (1.18 mmol, 1 eq.) compound **5** (174 mg, 1.31 mmol, 1.1 eq.) as alkyne, giving a white solid (430 mg, 1.16 mmol, yield: 98%).

Mp: 205-207°C decomp.

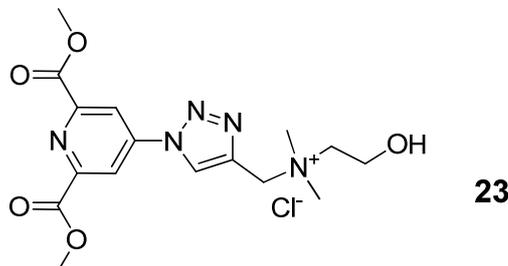
IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3483, 3424, 3041, 1754, 1596, 1260, 997, 908, 785.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 9.60 (1H, s, *H*_{triazole}), 8.82 (2H, s, *H*_{pyr}), 4.80 (2H, s, CH₂N), 3.99 (6H, s, COOCH₃), 3.13 (9H, s, N⁺(CH₃)₃).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 163.8 (2 C, 2x COOCH₃), 149.6 (2 C, 2x C_{pyr}COOCH₃), 144.7 (C, C_{pyr}), 137.1 (C, C_{triazole}), 127.4 (CH, CH_{triazole}), 117.6 (2 CH, 2x C_{pyr}H), 58.8 (CH₂, CH₂N⁺), 53.0 (2 CH₃, 2x COOCH₃), 51.9 (3 CH₃, N⁺(CH₃)₃).

HRMS-ESI m/z Calcd for $C_{15}H_{20}N_5O_4$ $[M-Cl]^+$: 334.1515; found: 334.1529.

Dimethyl 4-(4-(*N*-2-hydroxyethyl-*N,N*-dimethylammoniomethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate chloride **23** ($C_{16}H_{22}ClN_5O_5$, 399.83 $g \cdot mol^{-1}$)



Synthesised according to method A, using 1.0 g of azide **1** (4.24 mmol, 1 eq.) and compound **6** (728 mg, 4.45 mmol, 1.05 eq.) as alkyne, giving a white solid (1.63 g, 4.08 mmol, yield: 96%).

Synthesised according to method B, using 350 mg of azide **1** (1.48 mmol, 1 eq.) and compound **6** (254 g, 1.55 mmol, 1.05 eq.) as alkyne, giving a white solid (471 mg, 1.17 mmol, yield: 80%).

Mp: 203-207°C decomp.

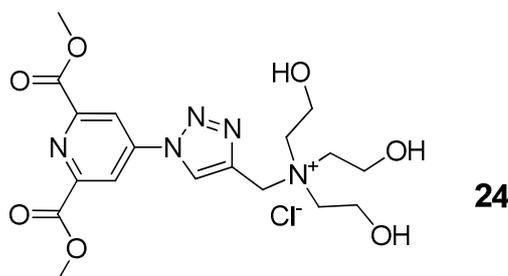
IR (KBr) $\tilde{\nu}/cm^{-1}$: 3426, 3155, 3043, 2955, 2874, 1751, 1597, 1481, 1261, 1049, 995, 786.

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 9.60 (1H, s, $H_{triazole}$), 8.82 (2H, s, H_{pyr}), 5.50 (1H, t, $J = 5$ Hz, OH), 4.88 (2H, s, CH_2N), 3.99 (6H, s, $COOCH_3$), 3.96 (2H, q, $J = 5$ Hz, CH_2OH), 3.45 (2H, t, $J = 5$ Hz, NCH_2CH_2), 3.14 (6H, s, $N(CH_3)_2$).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 163.8 (2 C, 2x $COOCH_3$), 149.6 (2 C, 2x $C_{pyr}COOCH_3$), 144.7 (C, C_{pyr}), 137.0 (C, $C_{triazole}$), 127.7 (CH, $CH_{triazole}$), 117.6 (2 CH, 2x $C_{pyr}H$), 64.5 (CH_2 , CH_2OH), 58.1 (CH_2 , CH_2N^+), 54.9 (CH_2 , $N^+CH_2CH_2$), 53.0 (2 CH_3 , 2x $COOCH_3$), 50.4 (2 CH_3 , $N^+(CH_3)_2$).

HRMS-ESI m/z Calcd for $C_{16}H_{22}N_5O_5$ $[M-Cl]^+$: 364.1621; found: 364.1636.

Dimethyl 4-(4-(*N,N,N*-tris(2-hydroxyethyl)ammoniomethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate chloride **24** ($C_{18}H_{26}ClN_5O_7$, 459.88 $g \cdot mol^{-1}$)



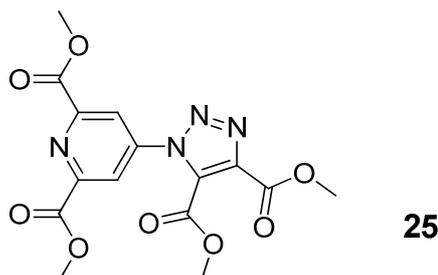
Synthesised according to method A, using 200 mg of azide **4** (0.85 mmol, 1 eq.) and compound **7** (208 mg, 0.93 mmol, 1.1 eq.) as alkyne, giving a off-white solid (253 mg, yield: 66%).

IR (KBr) $\tilde{\nu}/cm^{-1}$: 3424, 3043, 1753, 1597, 1480, 1291, 1054, 997, 785.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 9.52 (1H, s, H_{triazole}), 8.81 (2H, s, H_{pyr}), 5.44 (3H, br s, OH), 5.03 (2H, s, CH_2N^+), 4.01 (6H, t, $J = 5$ Hz, CH_2OH), 3.99 (6H, s, COOCH_3), 3.54 (6H, t, $J = 5$ Hz, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 163.8 (2 C, 2x COOCH_3), 149.7 (2 C, 2x $\text{C}_{\text{pyr}}\text{COOCH}_3$), 144.6 (C, C_{pyr}), 137.1 (C, $\text{C}_{\text{triazole}}$), 127.5 (CH, $\text{CH}_{\text{triazole}}$), 117.4 (2 CH, 2x $\text{C}_{\text{pyr}}\text{H}$), 60.9 (CH_2 , CH_2OH), 57.4 (CH_2 , CH_2N^+), 54.8 (CH_2 , $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$), 52.9 (2 CH_3 , 2x COOCH_3).

Dimethyl 4-(4,5-bis(methoxycarbonyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate
25 ($\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_8$, 378.29 g.mol⁻¹)



A mixture of azide **1** (1.0 g, 4.2 mmol, 1 eq.) and dimethyl acetylenedicarboxylate (2.6 mL, 21.1 mmol, 5 eq.) was heated at 75°C overnight. After cooling to room temperature, 10 mL of methanol were added and the mixture was let in the fridge for 2 hours. The product crystallized and was collected by simple filtration and washed with cold methanol, to afford pure tetraester **27** as white crystals (1.43 g; yield: 90%).

IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3309, 1719, 1599, 1440, 1240, 1043, 1003, 735.

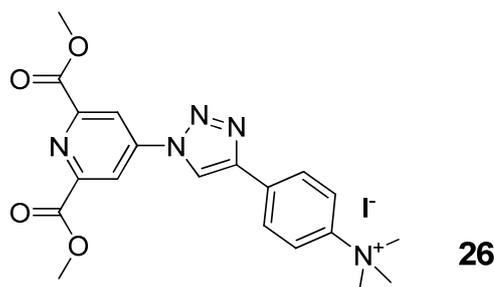
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 8.57 (2H, s, H_{pyr}), 3.97 (6H, s, $\text{C}_{\text{pyr}}\text{OOCH}_3$), 3.94 (3H, s, $\text{C}_{\text{triazole}}\text{OOCH}_3$), 3.88 (3H, s, $\text{C}_{\text{triazole}}\text{OOCH}_3$).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 163.4 (2 C, 2x $\text{C}_{\text{pyr}}\text{COOCH}_3$), 159.7 (C, $\text{C}_{\text{triazole}}\text{COOCH}_3$), 157.7 (C, $\text{C}_{\text{triazole}}\text{COOCH}_3$), 149.2 (2 C, 2x $\text{C}_{\text{pyr}}\text{COOCH}_3$), 144.4 (C, C_{pyr}), 139.4 (C, $\text{C}_{\text{triazole}}\text{COOCH}_3$), 131.1 (C, $\text{C}_{\text{triazole}}\text{COOCH}_3$), 123.1 (2 CH, 2x $\text{C}_{\text{pyr}}\text{H}$), 53.9 (C, $\text{C}_{\text{triazole}}\text{COOCH}_3$), 53.1 (2 CH_3 , 2x $\text{C}_{\text{pyr}}\text{COOCH}_3$), 52.9 (C, $\text{C}_{\text{triazole}}\text{COOCH}_3$).

HRMS-ESI m/z Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_8\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 401.0709; found: 401.0723.

Anal. (%) Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_8$: C 47.62, H 3.73, N 14.81; found: C 47.01, H 3.60, N 13.80.

4-(1-(2,6-bis(Methoxycarbonyl)pyridin-4-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-N,N,N-trimethylbenzenaminium iodide **26** ($\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{IN}_5\text{O}_4$, 523.32 g.mol⁻¹)



Diester **16** (100 mg, 0.27 mmol, 1 eq.) was suspended in 10 mL of dry acetone, then MeI (250 μ L, 4.00 mmol, 15 eq.) was added and the mixture was heated at 50°C for 5 hours. The solvent was evaporated *in vacuo* to give the pure product as a beige solid (408 mg, yield: 95%).

IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3016, 2950, 1721, 1598, 1438, 1334, 1198, 1048, 785, 757.

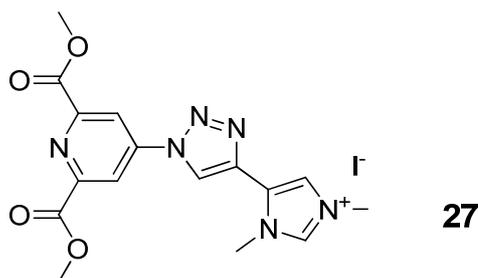
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 9.99 (1H, s, H_{triazole}), 8.81 (2H, s, H_{pyr}), 8.21 (2H, d, $J = 9$ Hz, H_{ar}), 8.16 (2H, d, $J = 9$ Hz, H_{ar}), 4.00 (6H, s, COOCH_3), 3.66 (9H, s, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 163.8 (2 C, 2x COOCH_3), 149.6 (2 C, 2x $\text{C}_{\text{pyr}}\text{COOCH}_3$), 146.9 (C, $\text{C}_{\text{triazole}}$), 146.1 (C, $\text{C}_{\text{ar}}\text{N}^+$), 144.6 (C, C_{pyr}), 131.0 (C, $\text{C}_{\text{ar-triazole}}$), 126.5 (CH, 2x $\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 121.5 (CH, 2x $\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$), 121.3 (CH, $\text{CH}_{\text{triazole}}$), 117.0 (2 CH, 2x $\text{C}_{\text{pyr}}\text{H}$), 56.3 (3 CH_3 , $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$), 53.0 (2 CH_3 , 2x COOCH_3).

HRMS-ESI m/z . Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_5\text{O}_4$ $[\text{M-I}]^+$: 396.1672; found: 396.1669

Anal. (%) Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{IN}_5\text{O}_4$: C 45.90, H 4.24, N 13.30; found: C 46.19, H 4.17, N 13.14.

5-(1-(2,6-bis(Methoxycarbonyl)pyridin-4-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-1,3-dimethyl-1H-imidazolium iodide **27 ($\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{IN}_6\text{O}_4$, 484.25 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)**



Methyl iodide (3.3 mL, 53.6 mmol, 30 eq.) was added to a suspension of diester **19** (610 mg, 1.78 mmol, 1 eq.) in 20 mL of CH_2Cl_2 . After 4 days under stirring at room temperature, 15 eq of MeI were added in order to complete the reaction, and the mixture was let under stirring for one additional day. The pure product was recovered by evaporation of the volatils under reduced pressure (yellow solid, 765 mg, yield: 89%).

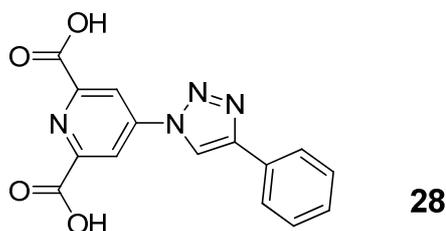
IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3059, 3029, 1744, 1725, 1590, 1268, 1018, 998, 756.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 9.85 (1H, s, H_{triazole}), 9.27 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, $^+\text{NCHN}$), 8.87 (2H, s, H_{pyr}), 8.25 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, $\text{C}=\text{CHN}^+$), 4.08 (3H, s, N^+CH_3), 4.00 (6H, s, COOCH_3), 3.95 (3H, s, NCH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 163.6 (2 C, 2x COOCH_3), 149.5 (2 C, 2x $\text{C}_{\text{pyr}}\text{COOCH}_3$), 144.3 (C, C_{pyr}), 138.5 (C, NCHN^+), 135.2 (C, $\text{C}_{\text{triazole}}$), 124.6 (C, $\text{C}_{\text{imidazole}}$), 122.6 (CH, $\text{C}=\text{CHN}^+$), 121.9 (CH, $\text{CH}_{\text{triazole}}$), 117.2 (2 CH, 2x $\text{C}_{\text{pyr}}\text{H}$), 53.1 (2 CH_3 , 2x $\text{C}_{\text{pyr}}\text{COOCH}_3$), 36.2 (CH_3 , $^+\text{NCH}_3$), 35.5 (CH_3 , NCH_3).

HRMS-ESI m/z . Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_6\text{O}_4$ $[\text{M-I}]^+$: 357.1311; found: 357.1319.

Anal. (%) Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{IN}_6\text{O}_4$: C 39.68, H 3.54, N 17.35; found: C 39.30, H 3.42, N 17.05.

4-(4-Phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylic acid 28 (C₁₅H₁₀N₄O₄, 310.26 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method C, using diester **8** (880 mg, 2.6 mmol), giving a yellow solid (805 mg, yield: 100%).

Mp: >290°C

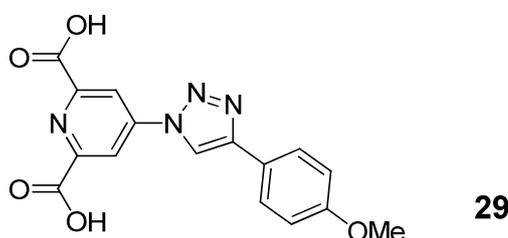
IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3433, 3144, 3070, 1728, 1651, 1604, 1481, 1219, 1049, 1010, 763, 690.

¹H NMR (400 MHz, D₂O/NaOD) δ (ppm) 7.65 (2H, s, *H*_{pyr}), 7.03 (2H, s, *H*_{ar}), 6.77-6.75 (3H, m, *H*_{ar}). *H*_{triazole} not visible due to proton exchange in NaOD, D₂O.

¹³C NMR: compound not enough soluble in common NMR solvents.

HRMS-ESI *m/z* Calcd for C₁₄H₉N₄O₂ [M-CO₂H]⁺: 265.0726, found: 265.0717.

Anal. (%) Calcd for C₁₅H₁₀N₄O₄·½ H₂O·½ HCl: C 53.38, H 3.43, N 16.60; found: C 53.61, H 3.44, N 16.35.

4-(4-(4-Methoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylic acid 29 (C₁₆H₁₂N₄O₅, 340.29 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method C, using diester **9** (1.0 g, 2.72 mmol), giving a yellow solid (878 mg, yield: 95%).

Mp: 286°C

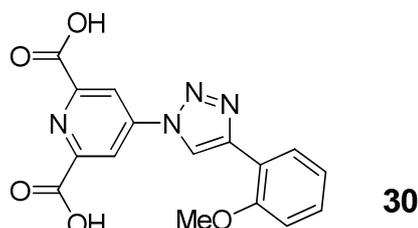
IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3495, 3140, 3090, 1732, 1608, 1485, 1211, 1014, 806, 686.

¹H NMR (400 MHz, D₂O/NaOD) δ (ppm) 7.56 (2H, s, *H*_{pyr}), 6.81 (2H, s, *H*_{ar}), 6.03 (2H, s, *H*_{ar}), 3.20 (3H, s, OCH₃). *H*_{triazole} not visible due to proton exchange in NaOD, D₂O.

¹³C NMR: compound not enough soluble in common NMR solvents.

HRMS-ESI *m/z* Calcd for C₁₅H₁₁N₄O₃ [M-CO₂H]⁺: 295.0831, found: 295.0842.

Anal. (%) Calcd for C₁₆H₁₂N₄O₅·½ HCl: C 53.60, H 3.51, N 15.63; found: C 53.70, H 3.42, N 15.65.

4-(4-(2-Methoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylic acid 30**(C₁₆H₁₂N₄O₅, 340.29 g.mol⁻¹)**

Synthesised according to method C, using diester **10** (800 mg, 2.17 mmol), giving an off-white solid (710 mg, yield: 96%).

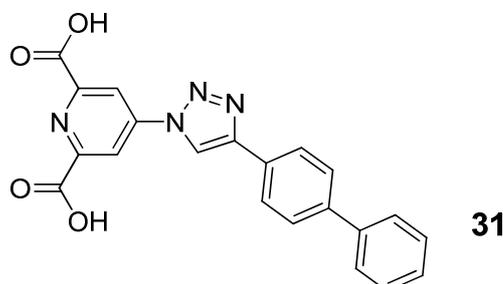
IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3475, 3255, 3105, 1755, 1724, 1485, 1411, 1373, 1253, 1014, 771.

¹H NMR (400 MHz, D₂O/NaOD) δ (ppm) 7.86 (1H, s, *H*_{triazole}), 7.66 (2H, s, *H*_{pyr}), 7.37 (1H, d, *J* = 7 Hz, *H*_{ar}), 6.69 (1H, t, *J* = 7 Hz, *H*_{ar}), 6.44 (1H, t, *J* = 7 Hz, *H*_{ar}), 6.25 (1H, d, *J* = 7 Hz, *H*_{ar}), 3.56 (3H, s, OCH₃).

¹³C NMR: compound not enough soluble in common NMR solvents.

HRMS-ESI *m/z*. Calcd for C₁₆H₁₃N₄O₅ [M+H]⁺: 341.0886; found 341.0875

Anal. (%) Calcd for C₁₆H₁₂N₄O₅·½ HCl·½ H₂O: C 52.29, H 3.70, N 15.24; found: C 52.97, H 3.77, N 15.65.

4-(4-(Biphenyl-4-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylic acid 31 (C₂₁H₁₄N₄O₄, 386.36 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method C, using diester **11** (372 mg, 0.90 mmol), giving an off-white solid (322 mg, yield: 93%).

IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3487, 3117, 1735, 1716, 1601, 1477, 1238, 1010, 771, 690.

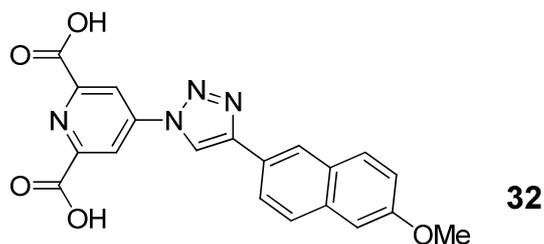
¹H NMR (400 MHz, D₂O/NaOD) δ (ppm) 7.93 (2H, s, *H*_{pyr}), 7.53 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, *H*_{ar}), 7.41 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, *H*_{ar}), 7.23 (2H, d, *J* = 7 Hz, *H*_{ar}), 7.03 (3H, m, *H*_{ar}). *H*_{triazole} not visible due to proton exchange in NaOD, D₂O.

¹³C NMR: compound not enough soluble in common NMR solvents.

HRMS-ESI *m/z*. Calcd for C₂₁H₁₃N₄O₄ [M-H]⁻: 385.0937; found: 385.0953

Anal. (%) Calcd for C₂₁H₁₄N₄O₄·½ HCl·½ H₂O: C 60.98, H 3.78, N 13.55; found: C 60.65, H 3.78, N 13.29.

4-(4-(6-Methoxynaphthalen-2-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylic acid 32
(C₂₀H₁₄N₄O₅, 390.35 g.mol⁻¹)



Synthesised according to method C, using diester **12** (900 mg, 2.15 mmol), giving an orange solid (698 mg, yield: 83%).

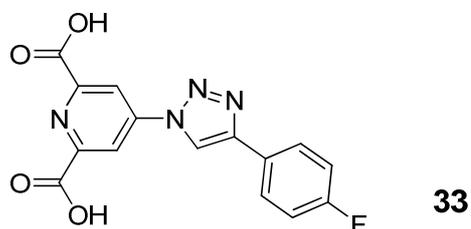
IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3240, 3144, 2939, 1751, 1601, 1489, 1373, 1207, 1018, 898, 813, 671.

¹H NMR (400 MHz, D₂O/NaOD) δ (ppm) 7.18 (2H, br s, *H*_{pyr}), 7.07 (1H, br s, *H*_{ar}), 6.95 (2H, br s, *H*_{ar}), 6.85 (1H, br s, *H*_{ar}), 6.18 (1H, br s, *H*_{ar}), 5.98 (1H, br s, *H*_{ar}), 3.22 (3H, s, OCH₃). *H*_{triazole} not visible due to proton exchange in NaOD, D₂O.

¹³C NMR: compound not enough soluble in common NMR solvents.

Anal. (%) Calcd for C₂₀H₁₄N₄O₅.½ HCl: C 58.79, H 3.58, N 13.71; found: C 58.84, H 3.48, N 13.80.

4-(4-(4-Fluorophenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylic acid 33
(C₁₅H₉FN₄O₄, 328.25 g.mol⁻¹)



Synthesised according to method C, using diester **13** (942 mg, 2.64 mmol), giving an off-white solid (828 mg, yield: 95%).

IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3433, 3144, 3074, 1728, 1604, 1485, 1419, 1369, 1226, 1049, 106, 813, 698.

¹H NMR (400 MHz, D₂O/NaOD) δ (ppm) 8.47 (1H, s, *H*_{triazole}), 7.99 (2H, s, *H*_{pyr}), 7.36 (2H, br s, *H*_{ar}), 6.78 (2H, t, *J* = 8 Hz, *H*_{ar}).

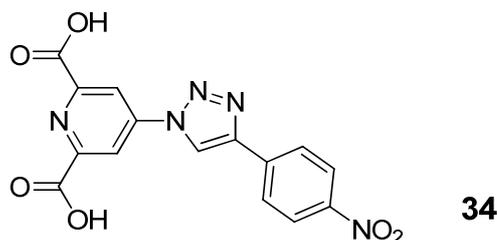
¹³C NMR: compound not enough soluble in common NMR solvents.

¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-d₆ / internal ref. C₆F₆) δ (ppm) -113.2.

HRMS-ESI *m/z* Calcd for C₁₅H₈FN₄O₄ [M-H]⁻: 327.0530; found: 327.0519.

Anal. (%) Calcd for C₁₅H₉FN₄O₄.¾ HCl: C 51.10, H 2.76, N 15.89; found: C 50.82, H 2.65, N 15.78.

4-(4-(4-Nitrophenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylic acid 34 (C₁₅H₉N₅O₆, 355.26 g.mol⁻¹)



Synthesised according to method C, using diester **14** (1.0 g, 2.63 mmol), giving an off-white solid (935 mg, yield: 100%).

Mp: 272°C (decomposition)

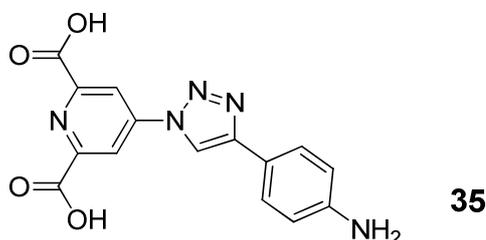
IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3580, 3506, 3101, 2847, 1709, 1597, 1504, 1435, 1338, 1049, 1007, 848, 709.

¹H NMR (400 MHz, D₂O/NaOD) δ (ppm) 9.04 (1H, s, *H*_{triazole}), 8.30 (2H, s, *H*_{pyr}), 8.18 (2H, d, *J* = 9 Hz, *H*_{ar}), 7.92 (2H, d, *J* = 9 Hz, *H*_{ar}).

¹³C NMR: compound not enough soluble in common NMR solvents.

Anal. (%) Calcd for C₁₅H₉N₅O₆.H₂O: C 48.26, H 2.97, N 18.76; found: C 48.01, H 2.87, N 18.56.

4-(4-(4-Aminophenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylic acid 35 (C₁₅H₁₁N₅O₄, 325.28 g.mol⁻¹)



Synthesised according to method C, using diester **15** (380 mg, 1.07 mmol), giving an off-white solid (317 mg, yield: 91%).

IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3387, 3117, 2854, 2619, 1936, 1705, 1589, 1473, 1408, 1365, 1060, 1014, 740, 698.

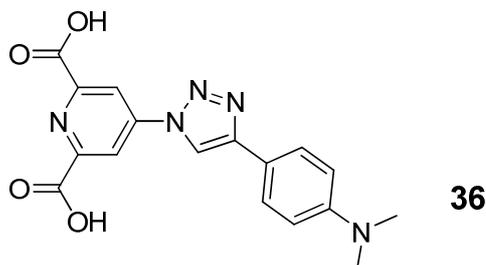
¹H NMR (400 MHz, D₂O/NaOD) δ (ppm) 8.52 (1H, s, *H*_{triazole}), 8.15 (2H, s, *H*_{pyr}), 7.35 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, *H*_{ar}), 6.57 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, *H*_{ar}).

¹³C NMR: compound not enough soluble in common NMR solvents.

HRMS-ESI *m/z* Calcd for C₁₅H₁₂N₅O₄ [M+H]⁺: 326.0889; found 326.0894

Anal. (%) Calcd for C₁₅H₁₁N₅O₄.HCl: C 49.80, H 3.34, N 19.38; found: C 49.32, H 3.52, N 19.04.

4-(4-(4-(*N,N*-Dimethylamino)phenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylic acid 36 (C₁₇H₁₅N₅O₄, 353.33 g.mol⁻¹)



Synthesised according to method C, using diester **16** (940 mg, 2.77 mmol), giving a beige solid (820 mg, yield: 95%).

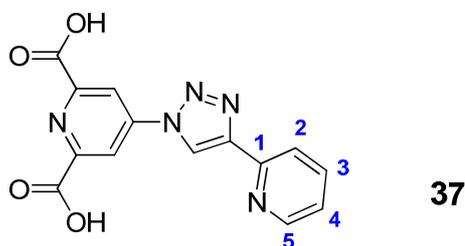
Anal. (%) Calcd for C₁₇H₁₅N₅O₄ · ¼ HCl: C 56.33, H 4.24, N 19.32; found: C 56.82, H 4.22, N 19.45.

IR (KBr) $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹: 3433, 3124, 3078, 2955, 2808, 1697, 1581, 1558, 1481, 1431, 1357, 1222, 1053, 744, 698.

¹H NMR (400 MHz, D₂O/NaOD) δ (ppm) 7.72 (2H, s, *H*_{pyr}), 6.88 (2H, br s, *H*_{ar}), 5.92 (2H, br s, *H*_{ar}), 2.29 (6H, s, N(CH₃)₂). *H*_{triazole} not visible due to proton exchange in NaOD, D₂O.

¹³C NMR: compound not enough soluble in common NMR solvents.

4-(4-(Pyridin-2-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylic acid 37 (C₁₄H₉N₅O₄, 311.25 g.mol⁻¹)



Synthesised according to method C, using diester **17** (930 mg, 2.44 mmol), giving a off-white solid (746 mg, yield: 85%).

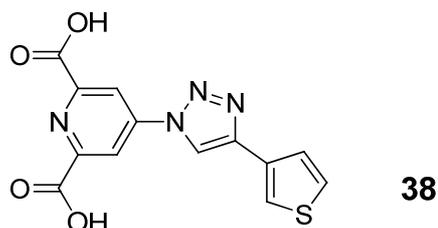
IR (KBr) $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹: 3433, 3113, 1728, 1597, 1477, 1423, 1385, 1242, 1045, 1026, 783.

¹H NMR (400 MHz, D₂O/NaOD) δ (ppm) 8.37 (1H, s, *H*_{triazole}), 8.01 (1H, s, *H*_{ar5}), 7.87 (2H, s, *H*_{pyr}), 7.40 (1H, q, *J* = 6 Hz, *H*_{ar2}), 7.34 (1H, q, *J* = 6 Hz, *H*_{ar3}), 6.95 (1H, br s, *H*_{ar4}).

¹³C NMR (100 MHz, D₂O/NaOD) δ (ppm) 170.9 (2 C, 2x C_{pyr}COO⁻), 155.2 (2 C, 2x C_{pyr}COO⁻), 149.3 (CH, C_{ar5}H), 147.7 (C, C_{pyr}), 146.7 (C, C_{triazole}), 143.9 (C, C_{ar1}), 138.5 (CH, C_{ar3}H), 124.7 (CH, C_{ar2}H), 120.9 (CH, C_{ar4}H), 120.1 (CH, CH_{triazole}), 114.6 (2 CH, 2x C_{pyr}H).

HRMS-ESI *m/z* Calcd for C₁₄H₈N₅O₄ [M-H]⁻: 310.0576; found: 310.0565.

Anal. (%) Calcd for C₁₄H₉N₅O₄·HCl: C 48.36, H 2.90, N 20.14; found: C 48.93, H 3.04, N 20.21.

4-(4-(Thiophen-3-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylic acid 38**(C₁₃H₈N₄O₄S, 316.29 g.mol⁻¹)**

Synthesised according to method C, using diester **18** (900 mg, 2.61 mmol), giving a yellow solid (823 mg, yield: 100%).

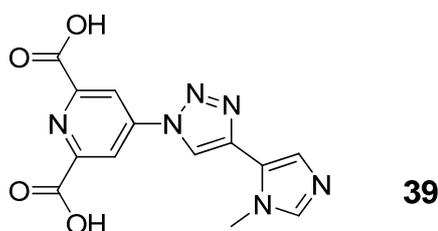
IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3464, 3144, 3101, 2916, 1716, 1604, 1481, 1427, 1211, 1057, 794, 725, 690.

¹H NMR (400 MHz, D₂O/NaOD) δ (ppm) 7.80 (2H, s, *H*_{pyr}), 7.13 (1H, s, C=CHS), 6.94 (1H, s, CH=CHS), 6.76 (1H, s, CH=CHS). *H*_{triazole} not visible due to proton exchange in NaOD, D₂O.

¹³C NMR (100 MHz, D₂O/NaOD) δ (ppm) 171.4 (2 C, 2x *C*_{pyr}COO⁻), 155.3 (2 C, 2x *C*_{pyr}COO⁻), 144.5 (C, *C*_{triazole}), 144.2 (C, *C*_{pyr}), 129.3 (C, C=CHS), 127.9 (CH, CH=CHS), 125.2 (CH, CH=CHS), 122.7 (CH, C=CHS), 121.4 (CH, CH_{triazole}), 114.7 2 (CH, 2x *C*_{pyr}H).

HRMS-ESI *m/z* Calcd for C₁₃H₇N₄O₄S [M-H]⁻: 315.0188; found: 315.0181.

Anal. (%) Calcd for C₁₃H₈N₄O₄S.½ HCl.½ H₂O: C 45.45, H 2.79, N 16.31; found: C 45.93, H 2.92, N 16.64.

4-(4-(1-Methyl-1H-imidazol-5-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylic acid 39**(C₁₃H₁₀N₆O₄, 314.26 g.mol⁻¹)**

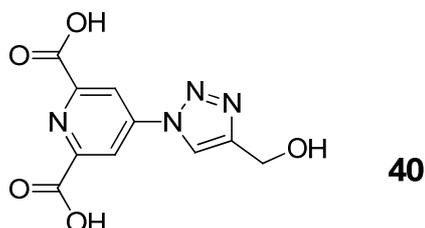
Synthesised according to method C, using diester **19** (1.06 g, 3.09 mmol), giving a white solid (1.03 g, yield: 94%).

IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3464, 3248, 3132, 1728, 1597, 1419, 1388, 1222, 1049, 864, 744.

¹H NMR (400 MHz, D₂O/NaOD) δ (ppm) 8.49 (1H, s, *H*_{triazole}), 8.14 (2H, s, *H*_{pyr}), 7.39 (1H, s, NCHN), 6.99 (1H, s, C=CHN), 3.63 (3H, s, NCH₃).

¹³C NMR (100 MHz, D₂O/NaOD) δ (ppm) 171.2 (2 C, 2x COOH), 155.2 (2 C, 2x *C*_{pyr}COOH), 144.4 (C, *C*_{pyr}), 141.4 (CH, NCHN), 139.5 (C, *C*_{triazole}), 128.7 (CH, C=CHN_{imidazole}), 122.4 (C, *C*_{imidazole}), 120.0 (CH, CH_{triazole}), 115.3 (2 CH, 2x *C*_{pyr}H), 33.5 (CH₃, NCH₃).

Anal. (%) Calcd for C₁₃H₁₀N₆O₄.HCl: C 44.52, H 3.16, N 23.96; found: C 43.95, H 3.76, N 23.73.

4-(4-(Hydroxymethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylic acid 40**(C₁₀H₈N₄O₅, 264.19 g.mol⁻¹)**

Synthesised according to method C, using diester **20** (1.22 g, 4.18 mmol), giving a white solid (1.05 g, yield: 95%).

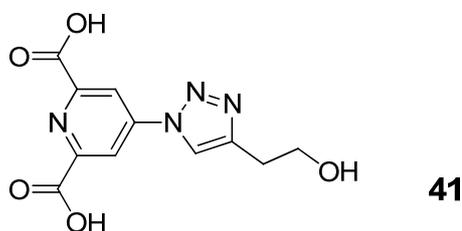
Mp 225°C

IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3387, 3144, 1732, 1601, 1477, 1377, 1288, 1049, 1018, 759, 702, 570.

¹H NMR (400 MHz, D₂O/NaOD) δ (ppm) 8.64 (1H, s, *H*_{triazole}), 8.35 (2H, s, *H*_{pyr}), 4.84 (2H, s, CH₂OH).

¹³C NMR (100 MHz, D₂O/NaOD) δ (ppm) 171.2 (2 C, 2x C_{pyr}COO⁻), 155.1 (2 C, 2x C_{pyr}COO⁻), 150.7 (C, C_{triazole}), 144.8 (C, C_{pyr}), 121.4 (CH, CH_{triazole}), 115.3 (2 CH, 2x C_{pyr}H), 54.9 (CH₂, CH₂OH).

HRMS-ESI m/z Calcd for C₉H₇N₄O₃ [M-CO₂H]⁺: 219.0518, found: 219.0524.

4-(4-(2-Hydroxyethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylic acid 41**(C₁₁H₁₀N₄O₅, 278.22 g.mol⁻¹)**

Synthesised according to method C, using diester **21** (986 mg, 3.22 mmol), giving a white solid (806 mg, yield: 90%).

IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3456, 3090, 1751, 1597, 1412, 1381, 1242, 1057, 1057, 752, 702.

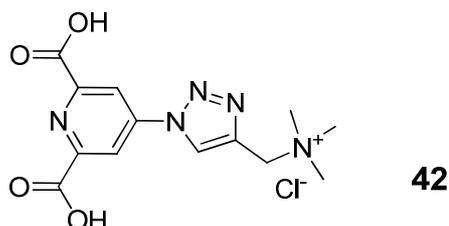
¹H NMR (400 MHz, D₂O/NaOD) δ (ppm) 8.40 (1H, s, *H*_{triazole}), 8.27 (2H, s, *H*_{pyr}), 3.86 (2H, br s, CH₂OH), 2.95 (2H, t, *J* = 6.5 Hz, CH₂CH₂OH).

¹³C NMR (100 MHz, D₂O/NaOD) δ (ppm) 171.6 (2 C, 2x C_{pyr}COO⁻), 155.6 (2 C, 2x C_{pyr}COO⁻), 147.1 (C, C_{pyr}), 145.1 (C, C_{triazole}), 122.2 (CH, CH_{triazole}), 115.6 (2 CH, 2x C_{pyr}H), 61.0 (CH₂, CH₂OH), 28.5 (CH₂, CH₂CH₂OH).

HRMS-ESI m/z Calcd for C₁₁H₉N₄O₅ [M-H]⁻: 277.0573; found: 277.0579.

Anal. (%) Calcd for C₁₁H₁₀N₄O₅.HCl.½ H₂O: C 40.82, H 3.74, N 17.31; found: C 40.59, H 3.52, N 17.23.

1-(1-(2,6-Dicarboxypyridin-4-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-N,N,N-trimethylmethanaminium chloride 42 (C₁₃H₁₆ClN₅O₄, 341.75 g.mol⁻¹)



Synthesised according to method D, using diester **22** (470 mg, 1.27 mmol), giving a white solid (425 mg, yield: 98%).

Mp 260-265°C decomp.

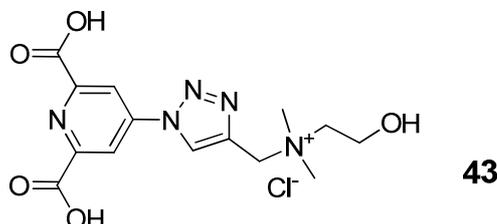
IR (KBr) $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹: 3361, 3038, 1730, 1604, 1483, 1375, 1246, 1050, 1008, 689.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 13.87 (2H, br s, COOH), 9.60 (1H, s, *H*_{triazole}), 8.78 (2H, s, *H*_{pyr}), 4.81 (2H, s, CH₂N⁺), 3.12 (9H, s, N⁺(CH₃)₃)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 164.7 (2 C, 2x C_{pyr}COOH), 150.6 (2 C, 2x C_{pyr}COOH), 144.6 (C, C_{pyr}), 137.1 (C, C_{triazole}), 127.4 (CH, CH_{triazole}), 117.1 (2 CH, 2x C_{pyr}H), 58.8 (CH₂, CH₂N⁺), 51.8 (3 CH₃, N⁺(CH₃)₃).

HRMS-ESI *m/z* Calcd for C₁₃H₁₆N₅O₄ [M-Cl]⁺: 306.1202; found 306.1201.

N-((1-(2,6-Dicarboxypyridin-4-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-2-hydroxy-N,N-dimethylethanaminium chloride 43 (C₁₄H₁₈ClN₅O₅, 371.78 g.mol⁻¹)



Synthesised according to method D, using diester **23** (800 mg, 2.0 mmol), giving a white solid (660 mg, yield: 88%).

Mp: 230-233°C decomp.

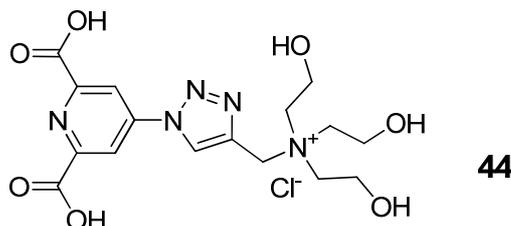
IR (KBr) $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹: 3426, 3093, 1736, 1601, 1481, 1385, 1246, 1087, 1049, 914, 794, 706, 570.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 9.55 (1H, s, *H*_{triazole}), 8.63 (2H, s, *H*_{pyr}), 4.86 (2H, s, CH₂N⁺), 4.2-3.9 (3H, br s, COOH, CH₂OH), 3.96 (2H, t, *J* = 5 Hz, CH₂OH), 3.46 (2H, t, *J* = 5 Hz, N⁺CH₂CH₂OH), 3.15 (6H, s, N⁺(CH₃)₂).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 164.7 (2 C, 2x C_{pyr}COOH), 150.6 (2 C, 2x C_{pyr}COOH), 144.6 (C, C_{pyr}), 137.0 (C, C_{triazole}), 127.6 (CH, CH_{triazole}), 117.1 (2 CH, 2x C_{pyr}H), 64.5 (CH₂, CH₂OH), 58.2 (CH₂, CH₂N⁺), 54.9 (CH₂, N⁺CH₂CH₂), 50.4 (2 CH₃, N⁺(CH₃)₂).

Anal. (%) Calcd for C₁₄H₁₈ClN₅O₅·½ HCl: C 43.11, H 4.78, N 17.96; found: C 43.26, H 4.86, N 17.94.

1-(1-(2,6-Dicarboxypyridin-4-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)-*N,N,N*-tris(2-hydroxyethyl)methanaminium chloride 44 (C₁₆H₂₂ClN₅O₇, 431.83 g.mol⁻¹)



Synthesised according to method D, using diester **24** (250 mg, 0.54 mmol).

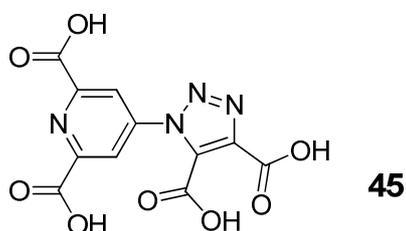
In this case, the diacid did not precipitate by addition of acetone. The solution was dried under vacuum, and the resulting oil was triturated three times into acetone. The resulting solid was filtered and washed with acetone, to give a white solid (230 mg, yield: 98%)

IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3360, 1718, 1601, 1445, 1242, 1042, 1004, 919, 728

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 9.46 (1H, s, H_{triazole}), 8.63 (2H, s, H_{pyr}), 5.02 (2H, s, CH_2N^+), 4.8-3.2 (5H, br s, CH_2OH , COOH), 4.01 (6H, t, $J = 5$ Hz, CH_2OH), 3.55 (6H, t, $J = 5$ Hz, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 164.6 (2 C, 2x $\text{C}_{\text{pyrCOOH}}$), 150.5 (2 C, 2x $\text{C}_{\text{pyrCOOH}}$), 144.6 (C, C_{pyr}), 137.0 (C, $\text{C}_{\text{triazole}}$), 127.5 (CH, $\text{CH}_{\text{triazole}}$), 117.2 (2 CH, 2x C_{pyrH}), 60.8 (3 CH_2 , 3x CH_2OH), 57.4 (CH_2 , CH_2N^+), 54.8 (3 CH_2 , $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_2)_3$).

4-(4,5-Dicarboxy-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylic acid 45 (C₁₁H₆N₄O₈, 322.19 g.mol⁻¹)



Synthesised according to method D, using diester **25** (1.43 g, 3.78 mmol) and lithium hydroxide monohydrate (6 eq.), giving a white solid (982 mg, yield: 81%).

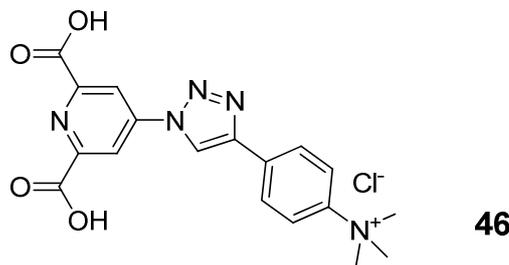
IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3453, 2886, 1729, 1590, 1536, 1456, 1243, 1209, 900, 773.

¹H NMR (400 MHz, D₂O/NaOD) δ (ppm) 8.24 (2H, s, H_{pyr}).

¹³C NMR (100 MHz, D₂O/NaOD) δ (ppm) 171.6 (2 C, 2x $\text{C}_{\text{pyrCOO}^-}$), 167.2 (C, $\text{C}_{\text{triazoleCOO}^-}$), 165.9 (C, $\text{C}_{\text{triazoleCOO}^-}$), 155.6 (2 C, 2x $\text{C}_{\text{pyrCOO}^-}$), 145.5 (C, C_{pyr}), 142.2 (C, $\text{C}_{\text{triazoleCOO}^-}$), 137.8 (C, $\text{C}_{\text{triazoleCOO}^-}$), 118.9 (2 CH, 2x C_{pyrH}).

Anal. (%) Calcd for C₁₁H₆N₄O₈.HCl.H₂O: C 35.08, H 2.41, N 14.87; found: C 35.54, H 2.83, N 14.02.

4-(1-(2,6-Dicarboxypyridin-4-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-N,N,N-trimethylbenzenaminium chloride 46 (C₁₈H₁₈ClN₅O₄, 403.82 g.mol⁻¹)



Synthesised according to method D, using diester **26** (403 mg, 0.84 mmol), giving a white solid (273 mg, yield: 90%).

IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3203, 3135, 1698, 1590, 1481, 1415, 1220, 1205, 1055, 688, 560.

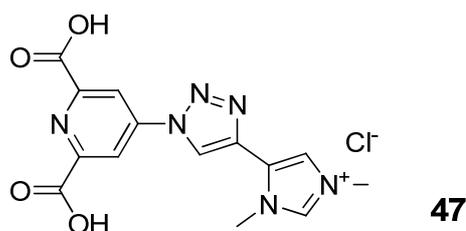
¹H NMR (400 MHz, D₂O/NaOD) δ (ppm) 7.85 (2H, s, *H*_{pyr}), 7.44 (2H, d, *J* = 9 Hz, *H*_{ar}), 7.36 (2H, d, *J* = 9 Hz, *H*_{ar}), 3.56 (9H, s, N⁺(CH₃)₃). *H*_{triazole} not visible due to proton exchange in NaOD, D₂O.

¹³C NMR (100 MHz, D₂O/NaOD) δ (ppm) 172.0 (2 C, 2x COOH), 156.1 (2 C, 2x C_{pyr}COOH), 146.3 (C, C_{triazole}), 146.1 (C, C_{ar}-N⁺), 144.5 (C, C_{pyr}), 131.3 (C, C_{ar}-triazole), 126.5 (CH, 2x C_{ar}H), 121.6 (CH, 2x C_{ar}H), 121.3 (CH, CH_{triazole}), 115.3 (2 CH, 2x C_{pyr}H), 56.4 (3 CH₃, N⁺(CH₃)₃).

HRMS-ESI *m/z*. Calcd for C₁₈H₁₆N₅O₄ [M-2H-Cl]⁻: 366.1202; found: 366.1200

Anal. (%) Calcd for C₁₈H₁₈ClN₅O₄·½ HCl: C 51.22, H 4.42, N 16.59; found: C 51.45, H 4.63, N 16.55.

5-(1-(2,6-Dicarboxypyridin-4-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-1,3-dimethyl-1H-imidazolium chloride 47 (C₁₄H₁₃ClN₆O₄, 364.74 g.mol⁻¹)



Synthesised according to method D, using diester **27** (1.05 g, 2.17 mmol), giving a white solid (780 mg, yield: 99%).

IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3491, 3085, 2419, 1687, 1659, 1594, 1435, 1343, 1224, 1019, 620.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 13.87 (2h, br s, COOH), 9.86 (1H, s, *H*_{triazole}), 9.31 (1H, d, *J* = 2 Hz, ⁺NCHN), 8.83 (2H, s, *H*_{pyr}), 8.25 (1H, d, *J* = 2 Hz, C=CHN⁺), 4.08 (3H, s, N⁺CH₃), 3.95 (3H, s, NCH₃)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 164.7 (2 C, 2x C_{pyr}COOH), 150.7 (2 C, 2x C_{pyr}COOH), 144.4 (C, C_{pyr}), 138.6 (CH, ⁺NCHN), 135.2 (C, C_{triazole}), 124.8 (C, C_{imidazole}), 122.8 (CH, C=CHN⁺), 122.0 (CH, CH_{triazole}), 116.9 (2 CH, 2x C_{pyr}H), 36.0 (CH₃, N⁺CH₃), 35.4 (CH₃, N⁺CH₃)

HRMS-ESI *m/z*. Calcd for C₁₄H₁₃N₆O₄⁺ [M-Cl]⁺: 329.0998; found 329.0983

Anal. (%) Calcd for $C_{14}H_{13}ClN_6O_4 \cdot 3/2 H_2O$: C 42.92, H 4.12, N 21.45; found: C 43.07, H 4.08, N 21.41

2.2. Lanthanide complexes

General procedures

Method E (Sodium salt)

The appropriate diacid (3 eq.) and Na₂CO₃ (5 eq.) were dissolved into the minimum amount of water. A solution of lanthanide chloride hexahydrate (1 eq. into 0.5 mL of de-ionized water) was added. The complex precipitated and was purified by recrystallisation from de-ionized water. The complex was isolated by filtration, washed with de-ionized water and methanol then dried under vacuum.

Method F (Guanidinium salt)

The appropriate diacid (3 eq.) and Gua₂CO₃ (5 eq.) were dissolved into the minimum amount of water. A solution of lanthanide chloride hexahydrate (1 eq. into 0.5 mL of de-ionized water) was added. The complex precipitated and was purified by crystallisation from de-ionized water. The complex was isolated by filtration, washed with de-ionized water and methanol then dried under vacuum.

Tris(pyridine-2,6-dicarboxylate)europate(III) [Eu(DPA)₃]³⁻

[Eu(DPA)₃]₃Na₃ (C₂₁H₉N₃O₁₂Na₃Eu, 716.24 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method E, using dipicolinic acid (100 mg, 0.6 mmol, 3 eq) and europium salt (73.3 mg, 0.2 mmol, 1 eq.), giving a white crystalline powder (103 mg, yield: 72%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3356, 3085, 1615, 1427, 1387, 1368, 1277, 1193, 1018, 917, 761, 734, 654, 516.

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm) 4.81 (2H, br s, H_{pyr}), 3.70 (1H, br s, H_{pyr}).

Tris(pyridine-2,6-dicarboxylate)terbate(III) [Tb(DPA)₃]³⁻

[Tb(DPA)₃]₃Na₃ (C₂₁H₉N₃O₁₂Na₃Tb, 723.30 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method E, using dipicolinic acid (100 mg, 0.6 mmol, 3 eq) and terbium salt (73.6 mg, 0.2 mmol, 1 eq.), giving a white crystalline powder (104 mg, yield: 72%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3348, 3085, 1619, 1586, 1429, 1385, 1366, 1279, 1022, 822, 763, 727, 519.

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm) 39.85 (2H, br s, H_{pyr}), 35.72 (1H, br s, H_{pyr}).

Tris[4-(4-phenyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]europate(III) [Eu(28)₃]³⁻**[Eu(28)₃]₃Na₃ (C₄₅H₂₄N₁₂O₁₂Na₃Eu, 1145.68 g.mol⁻¹)**

Synthesised according to method E, using diacid **28** (100 mg, 0.288 mmol, 3 eq) and europium salt (35.1 mg, 0.096 mmol, 1 eq), giving an off-white powder (70 mg, yield: 64%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3361, 3100, 1619, 1590, 1416, 1379, 1237, 1049, 1011, 805, 759, 736, 690.

¹H NMR compound not enough soluble in common NMR solvents.

[Eu(28)₃]₃Gua₃ (C₄₈H₄₂N₂₁O₁₂Eu, 1256.94 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method F, using diacid **28** (100 mg, 0.288 mmol, 3 eq) and europium salt (35.2 mg, 0.096 mmol, 1 eq), giving light-yellow crystals (105 mg, yield: 87%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3350, 3100, 1617, 1590, 1416, 1377, 1045, 1011, 809, 757, 734, 498, 431.

¹H NMR compound not enough soluble in common NMR solvents.

Tris[4-(4-phenyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]terbate(III) [Tb(28)₃]³⁻**[Tb(28)₃]₃Na₃ (C₄₅H₂₄N₁₂O₁₂Na₃Tb, 1152.64 g.mol⁻¹)**

Synthesised according to method E, using diacid **28** (100 mg, 0.288 mmol, 3 eq) and terbium salt (35.9 mg, 0.096 mmol, 1 eq), giving an off-white powder (100 mg, yield: 90%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3373, 3104, 1617, 1592, 1416, 1375, 1045, 1013, 805, 759, 738, 496.

¹H NMR compound not enough soluble in common NMR solvents.

[Tb(28)₃]₃Gua₃ (C₄₈H₄₂N₂₁O₁₂Tb, 1263.90 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method F, using diacid **28** (100 mg, 0.288 mmol, 3 eq) and terbium salt (35.9 mg, 0.096 mmol, 1 eq), giving a yellow crystalline powder (106 mg, yield: 87%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3348, 3102, 1617, 1592, 1414, 1379, 1045, 1007, 807, 755, 734, 491.

¹H NMR compound not enough soluble in common NMR solvents.

Tris[4-(4-(4-methoxyphenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]europate(III) [Eu(29)₃]³⁻**[Eu(29)₃]₃Na₃ (C₄₈H₃₀N₁₂O₁₅Na₃Eu, 1235.75 g.mol⁻¹)**

Synthesised according to method E, using diacid **29** (100 mg, 0.265 mmol, 3 eq) and europium salt (32.3 mg, 0.088 mmol, 1 eq), giving an off-white crystalline powder (96 mg, yield: 88%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3358, 3104, 2836, 1621, 1590, 1412, 1377, 1237, 1174, 1045, 1005, 803, 736.

^1H NMR compound not enough soluble in common NMR solvents.

[Eu(29)₃]Gua₃ (C₅₁H₄₈N₂₁O₁₅Eu, 1347.02 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method F, using diacid **29** (100 mg, 0.279 mmol, 3 eq) and europium salt (34.0 mg, 0.093 mmol, 1 eq), giving a yellow powder (93 mg, yield: 74%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3348, 3137, 2834, 1617, 1590, 1412, 1373, 1241, 1174, 1045, 1013, 807, 754, 736, 527.

^1H NMR compound not enough soluble in common NMR solvents.

Tris[4-(4-(4-methoxyphenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]terbate(III) [Tb(29)₃]³⁻

[Tb(29)₃]Na₃ (C₄₈H₃₀N₁₂O₁₅Na₃Tb, 1242.71 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method E, using diacid **29** (100 mg, 0.279 mmol, 3 eq) and terbium salt (34.7 mg, 0.093 mmol, 1 eq), giving a yellow powder (111 mg, yield: 96%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3365, 3104, 2834, 1621, 1592, 1412, 1377, 1241, 1174, 1045, 1011, 807, 757, 738.

^1H NMR compound not enough soluble in common NMR solvents.

[Tb(29)₃]Gua₃ (C₅₁H₄₈N₂₁O₁₅Tb, 1353.98 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method F, using diacid **29** (100 mg, 0.279 mmol, 3 eq) and terbium salt (34.7 mg, 0.093 mmol, 1 eq), giving an off-white powder (97 mg, yield: 77%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3346, 3141, 2836, 1592, 1414, 1377, 1329, 1241, 1045, 1009, 805, 752, 738.

^1H NMR compound not enough soluble in common NMR solvents.

Tris[4-(4-(2-methoxyphenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]europate(III) [Eu(30)₃]³⁻

[Eu(30)₃]Na₃ (C₄₈H₃₀N₁₂O₁₅Na₃Eu, 1235.75 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method E, using diacid **30** (100 mg, 0.275 mmol, 3 eq) and europium salt (33.2 mg, 0.091 mmol, 1 eq), giving an off-white powder (109 mg, yield: 97%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3363, 2976, 2836, 1590, 1414, 1379, 1356, 1243, 1049, 1011, 805, 752, 567.

^1H NMR compound not enough soluble in common NMR solvents.

[Eu(30)₃]Gua₃ (C₅₁H₄₈N₂₁O₁₅Eu, 1347.02 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method F, using diacid **30** (100 mg, 0.275 mmol, 3 eq) and europium salt (33.2 mg, 0.091 mmol, 1 eq), giving an off-white powder (97 mg, yield: 79%).

Anal. (%) Calcd for $C_{51}H_{48}N_{21}O_{15}Eu \cdot 6 H_2O$: C 42.10, H 4.16, N 20.21; found: C 42.39, H 3.56, N 19.30.

IR (ATR) $\tilde{\nu}/cm^{-1}$: 3350, 3135, 2836, 1592, 1410, 1375, 1331, 1245, 1045, 1011, 805, 752, 736.

1H NMR compound not enough soluble in common NMR solvents.

Tris[4-(4-(2-methoxyphenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]terbate(III) [Tb(30)₃]³⁻

[Tb(30)₃]Na₃ ($C_{48}H_{30}N_{12}O_{15}Na_3Tb$, 1242.71 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method E, using diacid **30** (100 mg, 0.275 mmol, 3 eq) and terbium salt (34.0 mg, 0.091 mmol, 1 eq), giving an off-white powder (107 mg, yield: 94%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/cm^{-1}$: 3367, 2943, 2836, 1590, 1410, 1373, 1333, 1245, 1047, 1007, 805, 752, 740.

1H NMR compound not enough soluble in common NMR solvents.

[Tb(30)₃]Gua₃ ($C_{51}H_{48}N_{21}O_{15}Tb$, 1353.98 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method F, using diacid **30** (100 mg, 0.275 mmol, 3 eq) and terbium salt (34.0 mg, 0.091 mmol, 1 eq), giving an off-white powder (101 mg, yield: 81%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/cm^{-1}$: 3350, 3108, 2832, 1617, 1590, 1410, 1379, 1243, 1045, 1011, 807, 752, 732, 525.

1H NMR compound not enough soluble in common NMR solvents.

Tris[4-(4-(biphenyl-4-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]europate(III) [Eu(31)₃]³⁻

[Eu(31)₃]Na₃ ($C_{63}H_{36}N_{12}O_{12}Na_3Eu$, 1373.96 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method E, using diacid **31** (100 mg, 0.241 mmol, 3 eq) and europium salt (29.6 mg, 0.081 mmol, 1 eq), giving an orange powder (102 mg, yield: 92%)

IR (ATR) $\tilde{\nu}/cm^{-1}$: 3358, 3104, 1619, 1590, 1412, 1356, 1233, 1043, 1005, 805, 761, 729, 692.

1H NMR compound not enough soluble in common NMR solvents.

[Eu(31)₃]Gua₃ ($C_{66}H_{54}N_{21}O_{12}Eu$, 1485.23 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method F, using diacid **31** (100 mg, 0.241 mmol, 3 eq) and europium salt (29.7 mg, 0.081 mmol, 1 eq), giving a yellow powder (115 mg, yield: 96%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/cm^{-1}$: 3346, 3137, 3102, 1623, 1590, 1412, 1371, 1331, 1045, 1007, 803, 763, 734, 694.

1H NMR compound not enough soluble in common NMR solvents.

Tris[4-(4-(biphenyl-4-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]terbate(III) [Tb(31)₃]³⁻

[Tb(31)₃]₃Na₃ (C₆₃H₃₆N₁₂O₁₂Na₃Tb, 1380.92 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method E, using diacid **31** (100 mg, 0.241 mmol, 3 eq) and terbium salt (30.3 mg, 0.081 mmol, 1 eq), giving an orange powder (106 mg, yield: 95%)

IR (ATR) $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹: 3367, 3031, 1617, 1592, 1416, 1373, 1043, 1005, 807, 763, 740, 690, 441.

¹H NMR compound not enough soluble in common NMR solvents.

Tris[4-(4-(6-methoxynaphthalen-2-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]europate(III) [Eu(32)₃]³⁻

[Eu(32)₃]₃Na₃ (C₆₀H₃₆N₁₂O₁₅Na₃Eu, 1385.93 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method E, using diacid **32** (100 mg, 0.245 mmol, 3 eq) and europium salt (29.9 mg, 0.082 mmol, 1 eq), giving an orange powder (105 mg, yield: 93%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹: 3354, 3095, 2834, 1626, 1593, 1413, 1369, 1267, 1204, 1014, 803, 724, 539.

¹H NMR compound not enough soluble in common NMR solvents.

Tris[4-(4-(6-methoxynaphthalen-2-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]terbate(III) [Tb(32)₃]³⁻

[Tb(32)₃]₃Na₃ (C₆₀H₃₆N₁₂O₁₅Na₃Tb, 1392.89 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method E, using diacid **32** (100 mg, 0.245 mmol, 3 eq) and terbium salt (30.6 mg, 0.082 mmol, 1 eq), giving an orange powder (111 mg, yield: 98%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹: 3358, 3097, 2838, 1625, 1594, 1412, 1373, 1266, 1203, 1045, 1016, 807, 725.

¹H NMR compound not enough soluble in common NMR solvents.

Tris[4-(4-(4-fluorophenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]europate(III) [Eu(33)₃]³⁻

[Eu(33)₃]₃Na₃ (C₄₅H₂₁F₃N₁₂O₁₂Na₃Eu, 1199.65 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method E, using diacid **33** (100 mg, 0.284 mmol, 3 eq) and europium salt (34.7 mg, 0.103 mmol, 1 eq), giving a yellow crystalline powder (103 mg, yield: 91%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹: 3373, 3104, 1624, 1592, 1411, 1371, 1217, 1046, 1010, 806, 755, 741, 520.

¹H NMR compound not enough soluble in common NMR solvents.

[Eu(33)₃]Gua₃ (C₄₈H₃₉F₃N₂₁O₁₂Eu, 1310.91 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method F, using diacid **33** (100 mg, 0.284 mmol, 3 eq) and europium salt (34.7 mg, 0.103 mmol, 1 eq), giving an off-white crystalline powder (114 mg, yield: 92%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3352, 3106, 1623, 1590, 1410, 1375, 1224, 1047, 1009, 807, 752, 734, 519.

¹H NMR compound not enough soluble in common NMR solvents.

Tris[4-(4-(4-fluorophenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]terbate(III)**[Tb(33)₃]³⁻****[Tb(33)₃]Na₃ (C₄₅H₂₁F₃N₁₂O₁₂Na₃Tb, 1206.61 g.mol⁻¹)**

Synthesised according to method E, using diacid **33** (100 mg, 0.284 mmol, 3 eq) and terbium salt (35.5 mg, 0.103 mmol, 1 eq), giving an off-white crystalline powder (99 mg, yield: 87%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3367, 3104, 1623, 1592, 1412, 1373, 1233, 1047, 1011, 803, 757, 738, 519.

¹H NMR compound not enough soluble in common NMR solvents.

[Tb(33)₃]Gua₃ (C₄₈H₃₉F₃N₂₁O₁₂Tb, 1317.87 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method E, using diacid **33** (100 mg, 0.284 mmol, 3 eq) and terbium salt (35.5 mg, 0.103 mmol, 1 eq), giving an off-white crystalline powder (119 mg, yield: 95%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3346, 3100, 1623, 1592, 1412, 1373, 1226, 1047, 1009, 805, 755, 734, 521.

¹H NMR compound not enough soluble in common NMR solvents.

Tris[4-(4-(4-nitrophenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]europate(III)**[Eu(34)₃]³⁻****[Eu(34)₃]Na₃ (C₄₅H₂₁N₁₅O₁₈Na₃Eu, 1280.67 g.mol⁻¹)**

Synthesised according to method E, using diacid **34** (100 mg, 0.255 mmol, 3 eq) and europium salt (31.2 mg, 0.085 mmol, 1 eq), giving an orange crystalline powder (82 mg, yield: 75%).

Anal. (%) Calcd for C₄₅H₂₁N₁₅O₁₈Na₃Eu. 8 H₂O: C 37.93, H 2.62, N 14.75; found: C 37.72, H 2.14, N 14.58.

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3361, 3100, 1619, 1588, 1510, 1412, 1333, 1045, 1009, 851, 805, 757, 734.

¹H NMR compound not enough soluble in common NMR solvents.

Tris[4-(4-(4-nitrophenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]terbate(III)
[Tb(34)₃]³⁻

[Tb(34)₃]Na₃ (C₄₅H₂₁N₁₅O₁₈Na₃Tb, 1287.63 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method E, using diacid **34** (100 mg, 0.255 mmol, 3 eq) and terbium salt (31.2 mg, 0.085 mmol, 1 eq), giving an orange powder (100 mg, yield: 91%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹: 3367, 3100, 1621, 1590, 1506, 1410, 1333, 1045, 1009, 851, 805, 755, 738.

¹H NMR compound not enough soluble in common NMR solvents.

Tris[4-(4-(4-aminophenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]europate(III)
[Eu(35)₃]³⁻

[Eu(35)₃]Na₃ (C₄₅H₂₇N₁₅O₁₂Na₃Eu, 1190.72 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method E, using diacid **35** (100 mg, 0.277 mmol, 3 eq) and europium salt (33.8 mg, 0.092 mmol, 1 eq), giving an orange powder (104 mg, yield: 95%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹: 3327, 3106, 1621, 1588, 1410, 1373, 1051, 1007, 803, 736, 519.

¹H NMR compound not enough soluble in common NMR solvents.

[Eu(35)₃]Gua₃ (C₄₈H₄₅N₂₄O₁₂Eu, 1301.99 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method F, using diacid **35** (100 mg, 0.277 mmol, 3 eq) and europium salt (33.8 mg, 0.092 mmol, 1 eq), giving a brown powder (95 mg, yield: 79%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹: 3333, 3104, 1623, 1594, 1412, 1373, 1045, 1005, 805, 736, 516.

¹H NMR compound not enough soluble in common NMR solvents.

Tris[4-(4-(4-aminophenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]terbate(III)
[Tb(35)₃]³⁻

[Tb(35)₃]Na₃ (C₄₅H₂₇N₁₅O₁₂Na₃Tb, 1197.68 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method E, using diacid **35** (100 mg, 0.277 mmol, 3 eq) and terbium salt (34.4 mg, 0.092 mmol, 1 eq), giving an orange powder (107 mg, yield: 97%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹: 3329, 3225, 3108, 1619, 1590, 1414, 1375, 1266, 1047, 1011, 805, 738, 521.

¹H NMR compound not enough soluble in common NMR solvents.

[Tb(35)₃]Gua₃ (C₄₈H₄₅N₂₄O₁₂Tb, 1308.95 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method F, using diacid **35** (100 mg, 0.277 mmol, 3 eq) and terbium salt (34.4 mg, 0.092 mmol, 1 eq), giving a brown powder (107 mg, yield: 89%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹: 3338, 3216, 3106, 1621, 1592, 1412, 1373, 1266, 1047, 1005, 805, 755, 736.

¹H NMR compound not enough soluble in common NMR solvents.

Tris[4-(4-(4-(*N,N*-dimethylamino)phenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]europate(III) [Eu(36)₃]³⁻**[Eu(36)₃Gua₃** (C₅₄H₅₇N₂₄O₁₂Eu, 1386.15 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method F, using diacid **36** (110 mg, 0.286 mmol, 3 eq) and europium salt (34.9 mg, 0.095 mmol, 1 eq), giving an orange powder (104 mg, yield: 79%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3346, 3125, 2805, 1615, 1590, 1412, 1354, 1049, 1013, 734, 525.¹H NMR compound not enough soluble in common NMR solvents.**Tris[4-(4-(4-(*N,N*-dimethylamino)phenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]terbate(III) [Tb(36)₃]³⁻****[Tb(36)₃Gua₃** (C₅₄H₅₇N₂₄O₁₂Tb, 1393.11 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method F, using diacid **36** (100 mg, 0.260 mmol, 3 eq) and terbium salt (32.4 mg, 0.087 mmol, 1 eq), giving an orange powder (83 mg, yield: 69%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3356, 3141, 2807, 1613, 1592, 1416, 1354, 1193, 1047, 1013, 805, 765, 738, 523.¹H NMR compound not enough soluble in common NMR solvents.**Tris[4-(4-(pyridin-2-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]europate(III) [Eu(37)₃]³⁻****[Eu(37)₃Na₃** (C₄₂H₂₁N₁₅O₁₂Na₃Eu, 1148.64 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method E, using diacid **37** (100 mg, 0.288 mmol, 3 eq) and europium salt (35.1 mg, 0.096 mmol, 1 eq), giving off-white crystals (93 mg, yield: 84%).

Anal. (%) Calcd for C₄₂H₂₁N₁₅O₁₂Na₃Eu. 9 H₂O: C 38.48, H 3.00, N 15.99; found: C 38.72, H 2.67, N 15.98.**IR (ATR)** $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3361, 3100, 1619, 1586, 1410, 1375, 1045, 1013, 757, 736, 571, 498.¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm) 8.23 (1H, br s, *H*_{ar5}), 7.90 (1H, br s, *H*_{triazole}), 7.63 (1H, br s, *H*_{ar2}), 7.54 (1H, br s, *H*_{ar3}), 7.12 (1H, br s, *H*_{ar4}), 4.99 (2H, br s, *H*_{pyr}).**[Eu(37)₃Gua₃** (C₄₅H₃₆N₂₄O₁₂Eu, 1256.88 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method F, using diacid **37** (110 mg, 0.316 mmol, 3 eq) and europium salt (38.6 mg, 0.105 mmol, 1 eq), giving off-white crystalline powder (113 mg, yield: 85%).

Anal. (%) Calcd for C₄₅H₃₆N₂₄O₁₂Eu. 6 H₂O: C 39.51, H 3.76, N 24.57; found: C 39.86, H 3.29, N 24.55.

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3342, 3131, 3095, 1619, 1588, 1410, 1377, 1331, 1045, 1013, 754, 732.

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 8.23 (1H, br s, $H_{\text{ar}5}$), 7.90 (1H, br s, H_{triazole}), 7.63 (1H, br s, $H_{\text{ar}2}$), 7.54 (1H, br s, $H_{\text{ar}3}$), 7.12 (1H, br s, $H_{\text{ar}4}$), 4.99 (2H, br s, H_{pyr}).

Tris[4-(4-(pyridin-2-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]terbate(III)
[Tb(37) $_3$] $^{3-}$

[Tb(37) $_3$]Na $_3$ ($\text{C}_{42}\text{H}_{21}\text{N}_{15}\text{O}_{12}\text{Na}_3\text{Tb}$, 1155.60 g.mol $^{-1}$)

Synthesised according to method E, using diacid **37** (100 mg, 0.288 mmol, 3 eq) and terbium salt (35.9 mg, 0.096 mmol, 1 eq), giving off-white crystals (94 mg, yield: 84%).

Anal. (%) Calcd for $\text{C}_{42}\text{H}_{21}\text{N}_{15}\text{O}_{12}\text{Na}_3\text{Tb}$. 6 H_2O : C 39.92, H 2.63, N 16.63; found: C 39.97, H 2.66, N 16.22.

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3369, 3095, 1615, 1590, 1410, 1377, 1333, 1049, 1013, 782, 759, 736, 573, 435.

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 40.39 (2H, br s, H_{pyr}), 25.06 (1H, br s, H_{triazole}), 15.23 (1H, br s, H_{ar}), 13.91 (1H, br s, H_{ar}), 13.14 (1H, br s, H_{ar}), 12.87 (1H, br s, H_{ar}).

[Tb(37) $_3$]Gua $_3$ ($\text{C}_{45}\text{H}_{36}\text{N}_{24}\text{O}_{12}\text{Tb}$, 1263.84 g.mol $^{-1}$)

Synthesised according to method E, using diacid **37** (110 mg, 0.316 mmol, 3 eq) and terbium salt (39.4 mg, 0.105 mmol, 1 eq), giving off-white crystalline powder (103 mg, yield: 77%).

Anal. (%) Calcd for $\text{C}_{45}\text{H}_{36}\text{N}_{24}\text{O}_{12}\text{Tb}$. 5 H_2O : C 39.83, H 3.64, N 24.77; found: C 39.83, H 3.40, N 24.41.

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3340, 3104, 1621, 1586, 1412, 1377, 1335, 1043, 1016, 780, 759, 732, 493.

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 40.39 (2H, br s, H_{pyr}), 25.06 (1H, br s, H_{triazole}), 15.23 (1H, br s, H_{ar}), 13.91 (1H, br s, H_{ar}), 13.14 (1H, br s, H_{ar}), 12.87 (1H, br s, H_{ar}).

Tris[4-(4-(thiophen-3-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]europate(III)
[Eu(38) $_3$] $^{3-}$

[Eu(38) $_3$]Na $_3$ ($\text{C}_{39}\text{H}_{18}\text{N}_{12}\text{O}_{12}\text{S}_3\text{Na}_3\text{Eu}$, 1163.76 g.mol $^{-1}$)

Synthesised according to method E, using diacid **38** (100 mg, 0.291 mmol, 3 eq) and europium salt (35.6 mg, 0.097 mmol, 1 eq), giving an off-white powder (70 mg, yield: 62%)

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3361, 3097, 1621, 1588, 1421, 1366, 1339, 1047, 1013, 784, 736, 567.

^1H NMR compound not enough soluble in common NMR solvents.

[Eu(38) $_3$]Gua $_3$ ($\text{C}_{42}\text{H}_{36}\text{N}_{21}\text{O}_{12}\text{S}_3\text{Eu}$, 1275.03 g.mol $^{-1}$)

Synthesised according to method F, using diacid **38** (100 mg, 0.29 mmol, 3 eq) and europium salt (35.4 mg, 0.097 mmol, 1 eq), giving a white powder (105 mg, yield: 85%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3354, 3104, 1657, 1592, 1416, 1383, 1341, 1047, 1016, 807, 734, 529.

^1H NMR compound not enough soluble in common NMR solvents.

Tris[4-(4-(thiophen-3-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]terbate(III)
[Tb(38)₃]³⁻

[Tb(38)₃]Na₃ (C₃₉H₁₈N₁₂O₁₂S₃Na₃Tb, 1170.72 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method E, using diacid **38** (100 mg, 0.291 mmol, 3 eq) and terbium salt (36.2 mg, 0.097 mmol, 1 eq), giving an off-white powder (105 mg, yield: 92%)

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3350, 3102, 1619, 1590, 1416, 1373, 1339, 1047, 1016, 807, 736.

^1H NMR compound not enough soluble in common NMR solvents.

[Tb(38)₃]Gua₃ (C₄₂H₃₆N₂₁O₁₂S₃Tb, 1281.99 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method F, using diacid **38** (100 mg, 0.29 mmol, 3 eq) and europium salt (36.2 mg, 0.097 mmol, 1 eq), giving an off-white powder (125 mg, yield: 93%).

Anal. (%) Calcd for C₄₂H₃₆N₂₁O₁₂S₃Tb. 6 H₂O: C 36.29, H 3.48, N 21.16, S 6.92; found: C 36.06, H 2.94, N 20.76, S 6.79

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3348, 3097, 1613, 1588, 1417, 1342, 1046, 1016, 803, 735, 507, 430.

^1H NMR compound not enough soluble in common NMR solvents.

Tris[4-(4-(1-methyl-1*H*-imidazol-5-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]europate(III) [Eu(39)₃]³⁻

[Eu(39)₃]Na₃ (C₃₉H₂₄N₁₈O₁₂Na₃Eu, 1157.65 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method E, using diacid **39** (100 mg, 0.285 mmol, 3 eq) and europium salt (34.8 mg, 0.095 mmol, 1 eq), giving yellow needles (95 mg, yield: 86%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3369, 3102, 1615, 1588, 1419, 1373, 1343, 1118, 1049, 1013, 919, 807, 736.

^1H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm) 7.76 (1H, s, *H*_{triazole}), 7.56 (1H, s, NCHN), 7.04 (1H, s, C=CHN), 4.95 (2H, s, *H*_{pyr}), 3.50 (3H, s, NCH₃).

[Eu(39)₃]Gua₃ (C₄₂H₄₂N₂₇O₁₂Eu, 1268.92 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method F, using diacid **39** (110 mg, 0.314 mmol, 3 eq) and europium salt (38.4 mg, 0.104 mmol, 1 eq), giving yellow needles (117 mg, yield: 88%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3346, 3095, 1613, 1588, 1412, 1373, 1339, 1114, 1047, 1009, 919, 805, 734.

^1H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm) 7.76 (1H, s, *H*_{triazole}), 7.56 (1H, s, NCHN), 7.04 (1H, s, C=CHN), 4.95 (2H, s, *H*_{pyr}), 3.50 (3H, s, NCH₃).

Tris[4-(4-(1-methyl-1*H*-imidazol-5-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]terbate(III) [Tb(39)₃]³⁻

[Tb(39)₃]Na₃ (C₃₉H₂₄N₁₈O₁₂Na₃Tb, 1164.61 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method E, using diacid **39** (100 mg, 0.29 mmol, 3 eq) and terbium salt (35.5 mg, 0.095 mmol, 1 eq), giving yellow needles (102 mg, yield: 91%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3344, 3097, 1613, 1590, 1416, 1375, 1337, 1116, 1049, 1009, 805, 734, 571.

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm) 41.02 (2H, br s, *H*_{pyr}), 24.58 (1H, br s, *H*_{triazole}), 12.71 (1H, br s, NCHN), 10.88 (1H, br s, C=CHN), 8.77 (3H, s, NCH₃).

[Tb(39)₃]Gua₃ (C₄₂H₄₂N₂₇O₁₂Tb, 1275.88 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method F, using diacid **39** (110 mg, 0.314 mmol, 3 eq) and terbium salt (39.1 mg, 0.105 mmol, 1 eq), giving yellow needles (111 mg, yield: 83%)

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3344, 3098, 1611, 1588, 1414, 1371, 1339, 1112, 1049, 1011, 922, 805, 734.

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm) 41.02 (2H, br s, *H*_{pyr}), 24.58 (1H, br s, *H*_{triazole}), 12.71 (1H, br s, NCHN), 10.88 (1H, br s, C=CHN), 8.77 (3H, s, NCH₃).

Tris[4-(4-(hydroxymethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]europate(III) [Eu(40)₃]³⁻

[Eu(40)₃]Na₃ (C₃₀H₁₈N₁₂O₁₅Na₃Eu, 1007.47 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method E, using diacid **40** (163 mg, 0.543 mmol, 3 eq) and europium salt (66 mg, 0.180 mmol, 1 eq).

The procedure was slightly modified as follows: after addition of the lanthanide salt, the water soluble complex precipitated by addition of methanol and was isolated by filtration, washed with methanol and dried under vacuum to give an off-white powder (137 mg, yield: 75%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3267, 3125, 1728, 1590, 1427, 1354, 1024, 805, 694, 564.

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm) 7.41 (1H, s, *H*_{triazole}), 4.79 (2H, s, *H*_{pyr}), 4.33 (2H, s, CH₂OH).

[Eu(40)₃]Gua₃ (C₃₃H₃₆N₂₁O₁₅Eu, 1118.73 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method F, using diacid **40** (100 mg, 0.333 mmol, 3 eq) and europium salt (40.7 mg, 0.111 mmol, 1 eq), giving yellow needles (90 mg, yield: 72%).

Anal. (%) Calcd for C₃₃H₃₆N₂₁O₁₅Eu. 3 H₂O: C 33.80, H 3.61, N 25.08; found: C 33.88, H 3.20, N 24.86.

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3338, 3137, 3100, 1657, 1615, 1581, 1414, 1381, 1341, 1239, 1047, 1011, 734.

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm) 7.41 (1H, s, *H*_{triazole}), 4.79 (2H, s, *H*_{pyr}), 4.33 (2H, s, CH₂OH).

Tris[4-(4-(hydroxymethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]terbate(III)
[Tb(40)₃]³⁻

[Tb(40)₃]Na₃ (C₃₀H₁₈N₁₂O₁₅Na₃Tb, 1014.43 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method E, using diacid **40** (162 mg, 0.543 mmol, 3 eq) and terbium salt (67.2 mg, 0.180 mmol, 1 eq).

The procedure was slightly modified as follows: after addition of the lanthanide salt, the water soluble complex precipitated by addition of methanol and was isolated by filtration, washed with methanol and dried under vacuum to give an off-white powder (153 mg, yield: 83%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3262, 3129, 1730, 1588, 1419, 1356, 1047, 1024, 805, 769, 738, 564.

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm) 40.67 (2H, br s, H_{pyr}), 24.02 (1H, br s, H_{triazole}), 10.81 (2H, br s, CH_2OH).

[Tb(40)₃]Gua₃ (C₃₃H₃₆N₂₁O₁₅Tb, 1125.69 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method F, using diacid **40** (100 mg, 0.333 mmol, 3 eq) and terbium salt (41.5 mg, 0.111 mmol, 1 eq), giving yellow crystals (79 mg, yield: 63%).

Anal. (%) Calcd for C₃₃H₃₆N₂₁O₁₅Tb. 3 H₂O: C 33.60, H 3.59, N 24.41; found: C 33.25, H 3.35, N 24.66.

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3340, 3135, 1615, 1588, 1414, 1377, 1339, 1047, 1013, 809, 767, 734, 569.

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm) 40.67 (2H, br s, H_{pyr}), 24.02 (1H, br s, H_{triazole}), 10.81 (2H, br s, CH_2OH).

Tris[4-(4-(hydroxyethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]europate(III)
[Eu(41)₃]³⁻

[Eu(41)₃]Na₃ (C₃₃H₂₄N₁₂O₁₅Na₃Eu, 1049.55 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method E, using diacid **41** (100 mg, 0.309 mmol, 3 eq) and europium salt (37.7 mg, 0.103 mmol, 1 eq), giving an off-white powder (105 mg, yield: 97%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3239, 3139, 2949, 2882, 1613, 1588, 1421, 1358, 1237, 1047, 1007, 807, 571.

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm) 7.30 (1H, s, H_{triazole}), 4.70 (2H, s, H_{pyr}), 3.50 (2H, t, $J = 6.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 2.54 (2H, t, $J = 6.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$).

[Eu(41)₃]Gua₃ (C₃₆H₄₂N₂₁O₁₅Eu, 1160.81 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method E, using diacid **41** (100 mg, 0.309 mmol, 3 eq) and europium salt (37.7 mg, 0.103 mmol, 1 eq), giving yellow crystals (98 mg, yield: 82%).

Anal. (%) Calcd for C₃₆H₄₂N₂₁O₁₅Eu. 3 H₂O: C 35.59, H 3.98, N 24.21; found: C 35.75, H 3.65, N 24.51.

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3346, 3137, 2882, 1617, 1590, 1414, 1379, 1335, 1233, 1041, 999, 807, 734, 516.

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 7.30 (1H, s, H_{triazole}), 4.70 (2H, s, H_{pyr}), 3.50 (2H, t, $J = 6.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 2.54 (2H, t, $J = 6.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$).

Tris[4-(4-(hydroxyethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]terbate(III)
[Tb(41) $_3$] $^{3-}$

[Tb(41) $_3$]Na $_3$ ($\text{C}_{33}\text{H}_{24}\text{N}_{12}\text{O}_{15}\text{Na}_3\text{Tb}$, 1056.51 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

Synthesised according to method E, using diacid **41** (100 mg, 0.309 mmol, 3 eq) and terbium salt (38.4 mg, 0.103 mmol, 1 eq), giving an off-white powder (100 mg, yield: 92%).

Anal. (%) Calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{24}\text{N}_{12}\text{O}_{15}\text{Na}_3\text{Tb}$. 7 H_2O : C 33.51, H 3.24, N 14.21; found: C 33.47, H 2.72, N 13.97.

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3317, 3091, 2951, 1620, 1590, 1415, 1380, 1344, 1231, 1048, 1002, 808, 735, 568, 467.

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 40.82 (2H, br s, H_{pyr}), 24.03 (1H, br s, H_{triazole}), 9.19 (2H, br s, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 9.06 (2H, br s, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$).

[Tb(41) $_3$]Gua $_3$ ($\text{C}_{36}\text{H}_{42}\text{N}_{21}\text{O}_{15}\text{Tb}$, 1167.77 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

Synthesised according to method F, using diacid **41** (100 mg, 0.309 mmol, 3 eq) and terbium salt (38.4 mg, 0.103 mmol, 1 eq), giving yellow crystals (100 mg, yield: 83%).

Anal. (%) Calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{42}\text{N}_{21}\text{O}_{15}\text{Tb}$. 3 H_2O : C 35.39, H 3.96, N 24.07; found: C 35.59, H 3.62, N 24.33.

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3346, 3135, 2958, 1617, 1592, 1419, 1383, 1341, 1233, 1045, 1001, 761, 736, 531.

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 40.82 (2H, br s, H_{pyr}), 24.03 (1H, br s, H_{triazole}), 9.19 (2H, br s, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 9.06 (2H, br s, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$).

Tris[4-(4-(*N,N,N*-trimethylamminiomethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]europium(III) **[Eu(42) $_3$]**

[Eu(42) $_3$] ($\text{C}_{39}\text{H}_{42}\text{N}_{15}\text{O}_{12}\text{Eu}$, 1064.81 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

Synthesised according to method E, using diacid **42** (100 mg, 264 μmol , 3 eq) and europium salt (32.3 mg, 0.088 mmol, 1 eq), giving off-white powder (85 mg, yield: 90%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3377, 3096, 1619, 1586, 1415, 1375, 1340, 1248, 1043, 862, 738, 569.

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 8.51 (1H, br s, H_{triazole}), 5.01 (2H, br s, CH_2N^+), 4.77 (2H, br s, H_{pyr}), 3.43 (9H, br s, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$).

Tris[4-(4-(*N,N,N*-trimethylamminiomethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]terbium(III) **[Tb(42) $_3$]**

[Tb(42)₃] (C₃₉H₄₂N₁₅O₁₂Tb, 1071.77 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method E, using diacid **42** (60 mg, 0.160 mmol, 3 eq) and terbium salt (19.8 mg, 0.053 mmol, 1 eq), giving off-white powder (32 mg, yield: 56%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3378, 3096, 1617, 1586, 1417, 1373, 1337, 1248, 1041, 900, 735, 570.

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm) 43.21 (2H, br s, H_{pyr}), 19.61 (1H, br s, H_{triazole}), 5.50 (2H, br s, CH_2N^+), 1.34 (9H, br s, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$).

Tris[4-(4-(*N*-2-hydroxyethyl-*N,N*-dimethylamminiomethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]europium(III) [Eu(43)₃]**[Eu(43)₃] (C₄₂H₄₈N₁₅O₁₅Eu, 1154.89 g.mol⁻¹)**

Synthesised according to method E, using diacid **43** (100 mg, 0.245 mmol, 3 eq) and europium salt (29.9 mg, 0.082 mmol, 1 eq), giving a white powder (68 mg, yield: 72%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3363, 3102, 1617, 1588, 1417, 1375, 1340, 1043, 805, 736, 573.

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm) 8.29 (1H, br s, H_{triazole}), 4.92 (2H, br s, CH_2N^+), 4.74 (2H, br s, H_{pyr}), 4.19 (2H, br s, CH_2OH), 3.57 (2H, br s, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 3.20 (6H, br s, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$).

Tris[4-(4-(*N*-2-hydroxyethyl-*N,N*-dimethylamminiomethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]terbium(III) [Tb(43)₃]**[Tb(43)₃] (C₄₂H₄₈N₁₅O₁₅Tb, 1161.85 g.mol⁻¹)**

Synthesised according to method E, using diacid **43** (100 mg, 0.245 mmol, 3 eq) and terbium salt (30.6 mg, 0.082 mmol, 1 eq), giving a white powder (87 mg, yield: 92%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3367, 3095, 2964, 1615, 1590, 1421, 1375, 1341, 1045, 807, 738, 571, 468.

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm) 42.06 (2H, br s, H_{pyr}), 20.78 (1H, br s, H_{triazole}), 7.26 (2H, s, CH_2N^+), 5.76 (2H, br s, CH_2OH), 4.8-2.3 (8H, br s, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} + \text{N}^+(\text{CH}_3)_2$).

Tris[4-(4-(*N,N,N*-tris(2-hydroxyethyl)amminiomethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]europium(III) [Eu(44)₃]**[Eu(44)₃] (C₄₈H₆₀N₁₅O₂₁Eu, 1335.04 g.mol⁻¹)**

Synthesised according to method E, using diacid **44** (100 mg, 0.232 mmol, 3 eq) and europium salt (28.3 mg, 0.077 mmol, 1 eq), giving a yellow powder (53 mg, yield: 52%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3273, 2872, 1621, 1590, 1479, 1419, 1379, 1348, 1043, 859, 738, 475.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 5.18 (2H, br s, CH_2N^+), 4.74 (2H, br s, H_{pyr}), 4.54 (6H, br s, CH_2OH), 4.14 (6H, br s, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$). H_{triazole} not visible due to proton exchange.

Tris[4-(4-(*N,N,N*-tris(2-hydroxyethyl)amminiomethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]terbium(III) [Tb(44)₃]

[Tb(44)₃] ($\text{C}_{48}\text{H}_{60}\text{N}_{15}\text{O}_{21}\text{Tb}$, 1342.00 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

Synthesised according to method E, using diacid **44** (100 mg, 0.232 mmol, 3 eq) and terbium salt (28.8 mg, 0.077 mmol, 1 eq), giving a white powder (53 mg, yield: 52%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3346, 2889, 1619, 1592, 1416, 1383, 1043, 859, 807, 738, 569, 479.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 43.20 (2H, br s, H_{pyr}), 8.88 (2H, s, CH_2N^+), 3.20 (6H, br s, CH_2OH), 2.55 (6H, br s, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$). H_{triazole} not visible due to proton exchange.

Tris[4(4,5-dicarboxy-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]europate(III) [Eu(45)₃]⁹⁻

[Eu(45)₃Na₉] ($\text{C}_{33}\text{H}_6\text{N}_{12}\text{O}_{24}\text{Na}_9\text{Eu}$, 1313.33 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

Synthesised according to method E, using diacid **47** (100 mg, 0.31 mmol, 3 eq) and europium salt (37.9 mg, 0.103 mmol, 1 eq), giving a white powder (124 mg, yield: 91%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3340, 3085, 1615, 1590, 1531, 1423, 1354, 867, 805, 573, 506.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 4.92 (2H, s, H_{pyr}).

Tris[4(4,5-dicarboxy-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]terbate(III) [Tb(45)₃]⁹⁻

[Tb(45)₃Na₉] ($\text{C}_{33}\text{H}_6\text{N}_{12}\text{O}_{24}\text{Na}_9\text{Tb}$, 1320.30 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

Synthesised according to method E, using diacid **47** (100 mg, 0.31 mmol, 3 eq) and terbium salt (38.5 mg, 0.103 mmol, 1 eq), giving a white powder (120 mg, yield: 88%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3356, 3091, 1604, 1529, 1419, 1377, 1352, 871, 807, 746, 571.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 38.98 (2H, br s, H_{pyr}).

Tris[4-(4-(4-(*N,N,N*-trimethylaminio)phenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]europium(III) [Eu(46)₃]

[Eu(46)₃] ($\text{C}_{54}\text{H}_{48}\text{N}_{15}\text{O}_{12}\text{Eu}$, 1251.02 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

Synthesised according to method E, using diacid **45** (60 mg, 0.166 mmol, 3 eq) and europium salt (20.2 mg, 0.055 mmol, 1 eq), giving a yellow powder (64 mg, yield: 92%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3359, 3100, 1617, 1588, 1412, 1371, 1354, 1266, 1043, 1007, 805, 759, 734, 560.

^1H NMR compound not enough soluble in common NMR solvents.

Tris[4-(4-(4-(*N,N,N*-trimethylaminio)phenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]terbium(III) [Tb(46)**₃]**

[Tb(46)₃] (C₅₄H₄₈N₁₅O₁₂Tb, 1257.98 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method E, using diacid **45** (60 mg, 0.166 mmol, 3 eq) and terbium salt (20.7 mg, 0.055 mmol, 1 eq), giving a yellow powder (56 mg, yield: 81%).

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3369, 3074, 1617, 1586, 1412, 1375, 1045, 1009, 807, 757, 734, 556.

^1H NMR compound not enough soluble in common NMR solvents.

Tris[4-(4-(1,3-dimethyl-1*H*-imidazolio-5-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]europium(III) [Eu(47)**₃]**

[Eu(47)₃] (C₄₂H₃₃N₁₈O₁₂Eu, 1133.79 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method E, using diacid **46** (100 mg, 0.274 mmol, 3 eq) and europium salt (33.4 mg, 0.091 mmol, 1 eq), giving a white powder (110 mg, yield: 95%).

Anal. (%) Calcd for C₄₂H₃₃N₁₈O₁₂Eu. 8 H₂O: C 39.47, H 3.86, N 19.73; found: C 39.16, H 3.16, N 19.33.

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3367, 3093, 1617, 1586, 1412, 1369, 1335, 1251, 1153, 1047, 1011, 805, 738, 613, 564.

^1H NMR compound not enough soluble in common NMR solvents.

Tris[4-(4-(1,3-dimethyl-1*H*-imidazolio-5-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)pyridine-2,6-dicarboxylate]terbium(III) [Tb(47)**₃]**

[Tb(47)₃] (C₄₂H₃₃N₁₈O₁₂Tb, 1140.75 g.mol⁻¹)

Synthesised according to method E, using diacid **46** (100 mg, 0.274 mmol, 3 eq) and terbium salt (34.1 mg, 0.091 mmol, 1 eq), giving a white powder (108 mg, yield: 95%)

IR (ATR) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3371, 3091, 1588, 1412, 1371, 1049, 1013, 738, 621, 567.

^1H NMR compound not enough soluble in common NMR solvents.

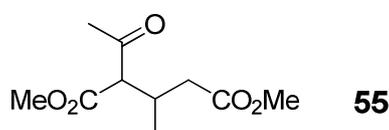
2.3. NAAG analogues synthesis

Pyruvate titration for the transamination reaction

In a spectrophotometer cuvette were introduced 12 μ L NADH (10mg/mL), 10 μ L of an LDH solution (200 IU/mL, 1 IU) and 958 μ L of KPi buffer (100 mM, pH 7.6). After measuring the initial DO at 340 nm (DO_i), 20 μ L of the reaction mixture were added in the cuvette. After 5min, the final DO (DO_f) was measured. Concentration of pyruvate produced during transamination is given by the following formula:

$$[Pyr] = \frac{DO_f - DO_i}{6220} * 50$$

Dimethyl 2-acetyl-3-methylpentanedioate **55** (C₁₀H₁₆O₅, 216.23 g.mol⁻¹)

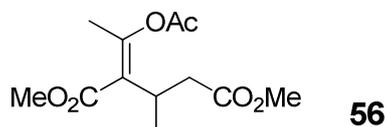


To a solution of methyl acetoacetate (17.42 g, 150 mmol, 1.5 eq.) and methyl crotonate (10 g, 100 mmol, 1eq.) un MeOH (100 mL) was added a 1M solution of MeONa in MeOH (30 mL). The mixture was heated to reflux for one day before the addition of the MeONa solution was repeated (30mL). After one more day of refluxing, methyl crotonate was added again ((10 g, 100 mmol) and heating was continued for one day. After cooling, the mixture was diluted with brine (250 mL) and extracted with EtOAc (3*150 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (eluent: cyclohexane/EtOAc, 70/30 v/v) afforded the ketone **55** as a diastereomeric mixture (15.2 g, yield: 47%), isolated as a colourless liquid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3.72 (3H, s, OCH₃), 3.71 (3H, s, OCH₃), 3.66 (2 x 3H, s, OCH₃), 3.56 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, CHCO), 3.48 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, CHCO), 2.74 (2 x 1H, m, CHCH₃), 2.50-2.20 (2 x 2H, m, CH₂), 2.23 (2 x 3H, s, CH₃), 0.99 (2 x 3H, d, $J = 7.0$ Hz, CHCH₃).

Other analytical data were identical with those reported.¹⁵¹

Dimethyl 2-(1-acetoxyethylidene)-3-methylpentanedioate **56** (C₁₂H₁₈O₆, 258.27 g.mol⁻¹)

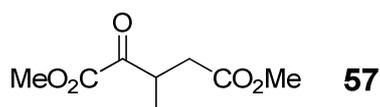


To a solution of **55** (4.4 g, 20.37 mmol, 1 eq.) in anhydrous pyridine (50 mL) was added acetyl chloride (4.35 mL, 61.11 mmol, 3 eq.). The mixture was stirred at 45°C for 3 days, before the addition of acetyl chloride (10.3 mL, 1eq) was repeated. After one more day of heating, the mixture was cooled to room temperature and diluted with Et₂O (150mL), washed with water (100 mL) and with an aqueous saturated solution of CuSO₄ (300 mL). The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (eluent: cyclohexane/EtOAc, 80/20 v/v) afforded **56** as a colourless liquid (2.2 g, yield: 42%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 3.77 (3H, s, OCH_3), 3.65 (3H, s, OCH_3), 3.24 (1H, hex, $J = 7.0$ Hz, CH), 2.54 (1H, dd, $J_1 = 6.0$ Hz, $J_2 = 15.0$ Hz, CH_{2a}), 2.48 (1H, dd, $J_1 = 7.0$ Hz, $J_2 = 15.0$ Hz, CH_{2b}), 2.21 (3H, s, CH_3), 2.11 (3H, s, CH_3CO), 1.09 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, CHCH_3)

Other analytical data were identical with those reported.¹⁵¹

Dimethyl 3-methyl-2-oxopentanedioate **57** ($\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_5$, $188.18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

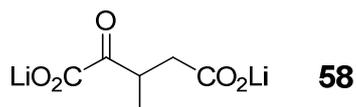


A solution of **56** (1.7g, 6.6 mmol) in CH_2Cl_2 (20 mL) was treated at -78°C with a mixture of O_2 and O_3 bubbling until saturation (blue coloration of the solution). After 30 min, the excess of ozone was removed by oxygen bubbling. Dimethylsulfide (614 μL , 9.88 mmol, 1.5 eq.) was added, and the reaction mixture was allowed to warm to room temperature. Volatile compounds were removed under reduced pressure, and the residue was diluted with 40 mL of EtOAc. This solution was washed with water (40 mL) and brine (40 mL). The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (eluent: cyclohexane/EtOAc, 75/25 v/v) afford the ketoester **57** as a colourless liquid (710 mg, yield: 57%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 3.89 (3H, s, OCH_3), 3.69 (1H, m, CH), 3.66 (3H, s, OCH_3), 2.83 (1H, dd, $J_1 = 9.0$ Hz, $J_2 = 17.0$ Hz, CH_{2a}), 2.51 (1H, dd, $J_1 = 5.0$ Hz, $J_2 = 17.0$ Hz, CH_{2b}), 1.20 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, CHCH_3).

Other analytical data were identical with those reported.¹⁵¹

Lithium 3-methyl-2-oxopentanedioate **58** ($\text{C}_6\text{H}_6\text{Li}_2\text{O}_5$, $171.99 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)



To a solution of **57** (670 mg, 3.56 mmol, 1eq.) in methanol (18 mL) was added dropwise a 0.4M aqueous lithium hydroxide solution (18.7 mL, 7.48 mmol, 2.1 eq.). The mixture was stirred at room temperature for 4 hours until complete hydrolysis. After evaporation of MeOH, the pH of the aqueous solution was adjusted to 7.6 by the addition of Dowex 50X8 resin (H^+ form). The resin was removed by filtration before evaporation of the water under reduced pressure. The lithium salt **58** was obtained as a white solid (611 mg, yield: 100%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 3.32 (1H, m, CH), 2.57 (1H, dd, $J_1 = 5.5$ Hz, $J_2 = 15.0$ Hz, CH_{2a}), 2.13 (1H, dd, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 23.0$ Hz, CH_{2b}), 1.12 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, CHCH_3).

Other analytical data were identical with those reported.¹⁵¹

(2*S*,3*R*) and (2*S*,3*S*)-2-Amino-3-methylpentanedioic acid (*R*)-53** and (*S*)-**53** (C₆H₁₁NO₄, 161.16 g.mol⁻¹)**



To a mixture of **58** (950 mg, 5.55 mmol), cysteine sulfonic acid (950 mg, 6.1 mmol, 1.1 eq.), and L-2,4-*syn*-isopentyl glutamic acid (127 mg, 0.56 mmol, 0.1 eq.) in water (250 mL) at pH 7.6 was added AspAT (50 IU) and BCAT (30 IU). The reaction mixture was stirred at room temperature and monitored by titration of pyruvate as previously described. When the reaction was complete (20 h), the mixture was passed through a column of Dowex 50X8 resin (H⁺ form). The column was washed with water (70 mL) and then eluted with 1M NH₄OH. The ninhydrin positives fractions were combined and concentrated to dryness under reduced pressure. The resulting mixture of (*R*)-**53**, (*S*)-**53** and L-2,4-*syn*-isopentyl glutamic acid was diluted with water (20 mL), and the pH was adjusted to 7.0 with NaOH before adsorption of the products on a column of Dowex 1X8 (AcO⁻ form). The column was washed with water (25 mL) and eluted with 0.15M AcOH. (*R*)-**53**, (*S*)-**53** were isolated separately as white solid.

(*R*)-53 (180 mg, yield : 20%)

¹H NMR (400 MHz, D₂O/NaOD) δ (ppm) 3.78 (1H, d, *J* = 3.5 Hz, CHNH₂), 2.58 (2H, m, CHCH₃ + CHCH_{2a}), 2.42 (1H, m, CHCH_{2b}), 1.04 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, CHCH₃).

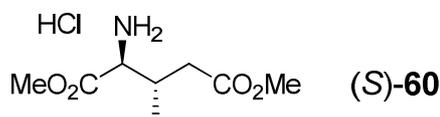
Other analytical data were identical with those reported.¹⁵¹

(*S*)-53 (220 mg, yield : 25%)

¹H NMR (400 MHz, D₂O/NaOD) δ (ppm) 3.80 (1H, d, *J* = 3.5 Hz, CHNH₂), 2.63 (2H, dd, *J*₁ = 5.5 Hz, *J*₂ = 15.5 Hz, CHCH_{2a}), 2.51 (1H, m, CHCH₃), 2.43 (1H, dd, *J*₁ = 8.0 Hz, *J*₂ = 15.5 Hz, CHCH_{2b}), 1.04 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, CHCH₃).

Other analytical data were identical with those reported.¹⁵¹

(2*S*,3*S*)-Dimethyl 2-amino-3-methylpentanedioate hydrochloride (*S*)-60** (C₈H₁₆ClNO₄, 225.67 g.mol⁻¹)**



To a solution of (*S*)-**53** (100 mg, 0.62 mmol, 1 eq.) in methanol (3 mL) was added thionyl chloride (180 μL, 2.48 mmol, 4 eq.). After 7 days of stirring at room temperature, volatile compounds were removed under reduced pressure, to afford (*S*)-**60** as a white solid (140 mg, yield : 100%).

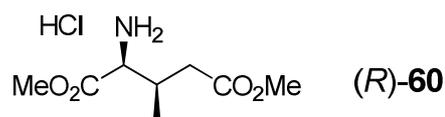
Mp: 145-150°C

IR (KBr) $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹: 2956, 1749, 1722, 1508, 1440, 1284, 1232, 1095, 1003, 933, 846, 756.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 4.19 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, CHNH_2), 3.86 (3H, s, OCH_3), 3.71 (3H, s, OCH_3), 2.64 (2H, dd, $J_1 = 6.0$ Hz, $J_2 = 16.0$ Hz, CHCH_{2a}), 2.58 (1H, m, CHCH_3), 2.47 (1H, dd, $J_1 = 7.0$ Hz, $J_2 = 16.0$ Hz, CHCH_{2b}), 1.05 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, CHCH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, D_2O) δ (ppm) 173.5 (C, CO_2Me), 169.8 (C, CO_2Me), 57.4 (CH, CHNH_2), 53.7 (CH_3 , OCH_3), 52.4 (CH_3 , OCH_3), 38.1 (CH_2 , CH_2), 32.7 (CH, CHCH_3), 15.1 (CH_3 , CH_3).

(2*S*,3*R*)-Dimethyl 2-amino-3-methylpentanedioate hydrochloride (*R*)-60** ($\text{C}_8\text{H}_{16}\text{ClNO}_4$, 225.67 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)**



To a solution of (*R*)-**53** (100 mg, 0.62 mmol, 1 eq.) in methanol (3 mL) was added thionyl chloride (180 μL , 2.48 mmol, 4 eq.). After 7 days of stirring at room temperature, volatile compounds were removed under reduced pressure, to afford (*R*)-**60** as a white solid (140 mg, yield : 100%).

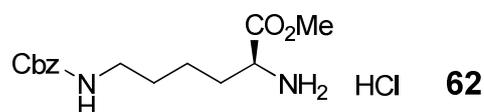
Mp: 145-150°C

IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 2956, 1749, 1722, 1508, 1440, 1284, 1232, 1095, 1003, 933, 846, 756.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 4.18 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, CHNH_2), 3.86 (3H, s, OCH_3), 3.70 (3H, s, OCH_3), 2.67 (2H, m, $\text{CHCH}_3 + \text{CHCH}_{2a}$), 2.41 (1H, m, CHCH_{2b}), 1.09 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, CHCH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, D_2O) δ (ppm) 173.5 (C, CO_2Me), 170.2 (C, CO_2Me), 57.8 (CH, CHNH_2), 53.9 (CH_3 , OCH_3), 52.5 (CH_3 , OCH_3), 37.6 (CH_2 , CH_2), 32.4 (CH, CHCH_3), 15.9 (CH_3 , CH_3).

(*S*)-Methyl 2-amino-6-(benzyloxycarbonylamino) hexanoate hydrochloride **62**
($\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{ClN}_2\text{O}_4$, 330.81 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)



To a solution of (*S*)-2-amino-6-(benzyloxycarbonylamino)hexanoic acid (1 g, 3.57 mmol, 1 eq.) in dry methanol (20 mL) cooled in an ice-bath was added dropwise thionyl chloride (780 μL , 10.71 mmol, 3 eq.). After the addition, the mixture was stirred at room temperature for 18 hours. The solvent was then removed under reduced pressure, to afford **62** as a white solid (1.18 g, yield : 100%).

Mp: 114–115°C

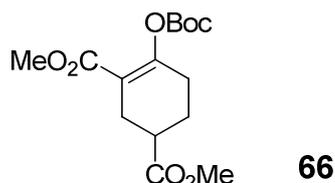
IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 2954-2840, 1734, 1248, 1049.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ (ppm) 7.42–7.38 (5H, m, H_{ar}), 5.08 (2H, s, CH_2Bz), 4.09 (1H, t, $J = 6.0$ Hz, CH), 3.80 (3H, s, OCH_3), 3.10 (2H, t, $J = 6.5$ Hz, NHCH_2), 1.95-1.89 (2H, m, CHCH_2), 1.5 (2H, m, NHCH_2CH_2), 1.38–1.36 (2H, m, CHCH_2CH_2)

^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ (ppm) 170.7 (C, COOCH_3), 158.4 (C, $\text{C}_{\text{carbamate}}$), 136.6 (C, C_{ar}), 128.8 (CH, CH_{ar}), 128.3 (CH, CH_{ar}), 127.6 (CH, CH_{ar}), 66.8 (CH_2 , CH_2Bz), 53.4 (CH, CH), 52.7 (CH_3 , OCH_3), 39.7 (CH_2 , NHCH_2), 29.3 (CH_2 , CHCH_2), 28.2 (CH_2 , NHCH_2CH_2), 21.3 (CH_2 , CHCH_2CH_2).

HRMS-ESI m/z . Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M}-\text{Cl}]^+$: 295.1658; found: 295.1663.

Dimethyl 4-(*tert*-butoxycarbonyloxy)cyclohex-3-ene-1,3-dicarboxylate 66 ($\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_7$, 314.33 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)



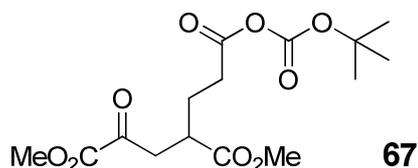
To a solution of dimethyl 4-oxocyclohexane-1,3-dicarboxylate¹⁵⁵ (2.05 g, 9.57 mmol, 1 eq.) in anhydrous toluene (30 mL) was added di-*tert*-butyl dicarbonate (2.29 g, 10.5 mmol, 1.1 eq.) and dimethylaminopyridine (175 mg, 0.15 eq.). The mixture was stirred at room temperature for 18 hours, then washed with 0.5M aqueous solution of KHSO_4 (50 mL). The aqueous layer was extracted with EtOAc (2*60 mL). The combined organic layers were dried over MgSO_4 and concentrated under reduced pressure to give a white solid (2.90g, yield: 95%).

IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 2940, 1760, 1720, 1710, 1664, 1471, 1263, 1234, 1190, 1082, 1054, 1036, 962, 768.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 3.73 (3H, s, OCH_3), 3.71 (3H, s, OCH_3), 2.77 (1H, m, $\text{CH}_{2\text{a}}\text{CH}$), 2.59 (2H, m, $\text{CH} + \text{CH}_{2\text{b}}\text{CH}$), 2.39 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 2.10 (1H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_{2\text{a}}\text{CH}$), 1.85 (1H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_{2\text{b}}\text{CH}$), 1.53 (9H, s, $(\text{CH}_3)_3$).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 174.5 (C, CO_2CH_3), 165.3 (C, $=\text{CCO}_2\text{CH}_3$), 154.9 (C, $\text{C}=\text{CO}$), 152.3 (C, $\text{C}_{\text{carbonate}}$), 116.3 (C, $=\text{CCO}_2\text{CH}_3$), 83.7 (C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 66.7 (CH_3 , OCH_3), 38.3 (CH, CHCO_2CH_3), 28.1 (CH_2 , CHCH_2CH_2), 27.4 (CH_2 , CHCH_2C), 24.4 (CH_2 , CHCH_2CH_2).

(*tert*-Butyl carbonic) 7-methoxy-4-(methoxycarbonyl)-6,7-dioxoheptanoic anhydride 67 ($\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_9$, 346.33 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

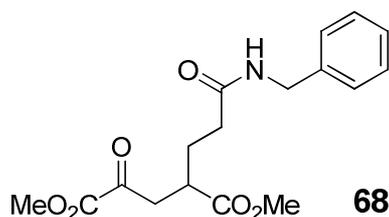


A solution of **66** (500 mg, 1.59 mmol) in CH_2Cl_2 (10 mL) was treated at -78°C with a mixture of O_2 and O_3 bubbling until saturation (blue coloration of the solution). After 30 min, the excess of ozone was removed by oxygen bubbling. Dimethylsulfide (176 μL , 2.39 mmol, 1.5 eq.) was added, and the reaction mixture was allowed to warm to room temperature. The compound **68** was used in the next step without purification.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 3.86 (3H, s, OCH_3), 3.68 (3H, s, OCH_3), 3.31 (1H, dd, $J_1 = 7.5$ Hz, $J_2 = 17.5$ Hz, CH_{2a}CH), 2.96 (2H, m, $\text{CH} + \text{CH}_{2b}\text{CH}$), 2.51 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 2.00-1.93 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 1.51 (9H, s, $(\text{CH}_3)_3$).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 191.6 (C, COCO_2), 173.9 (C, $\text{CO}_{2\text{anhydride}}$), 167.2 (C, COCO_2CH_3), 160.8 (C, CHCO_2CH_3), 148.0 (C, $\text{C}_{\text{carbonate}}$), 83.4 (C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 53.2 (CH_3 , OCH_3), 52.2 (CH_3 , OCH_3), 40.9 (CH_2 , CHCH_2), 38.9 (CH , CH), 31.3 (CH_2 , CHCH_2CH_2), 27.7 (CH_3), 25.9 (CH_2 , CHCH_2CH_2).

Dimethyl 2-(3-(benzylamino)-3-oxopropyl)-4-oxopentanedioate 68 ($\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_6$, 335.35 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)



To a solution of **67** (7.51 mmol) in CH_2Cl_2 was added benzylamine (821 μL , 7.51 mL, 1 eq.). After 15 min, no CO_2 formation was detected anymore. The mixture was washed with a 0.5 M aqueous solution of KHSO_4 (40 mL) and water (30mL). The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (eluent: cyclohexane/EtOAc, 40/60 v/v) afforded the amide **69** as a slightly yellow oil (2.01 g, yield: 80%).

IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3338, 3303, 3064, 3025, 2944, 1733, 1654, 1541, 1437, 1387, 1263, 1171, 740, 701.

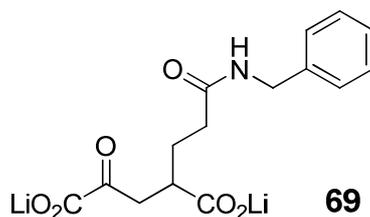
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7.32 (5H, m, H_{ar}), 5.83 (1H, br t, $J = 5$ Hz, NH), 4.43 (2H, d, $J = 5$ Hz, CH_2NH), 3.87 (3H, s, OCH_3), 3.67 (3H, s, OCH_3), 3.33 (1H, dd, $J_1 = 10$ Hz, $J_2 = 20$ Hz, CH_{2a}CH), 3.00 (2H, m, $\text{CH} + \text{CH}_{2b}\text{CH}$), 2.27 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 1.99 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 191.9 (C, COCO_2), 174.4 (C, CONH), 171.5 (C, COCO_2CH_3), 160.7 (C, CHCO_2CH_3), 138.2 (C, C_{ar}), 128.7 (CH, CH_{ar}), 127.5 (CH, CH_{ar}), 126.8 (CH, CH_{ar}), 52.9 (CH_3 , OCH_3), 52.1 (CH_3 , OCH_3), 43.6 (CH_2 , NHCH_2Ph), 40.8 (CH_2 , CHCH_2), 39.2 (CH, CH), 33.56 (CH_2 , CHCH_2CH_2), 27.25 (CH_2 , CHCH_2CH_2).

HRMS-ESI m/z . Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_6\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$: 358.1267; found: 358.1267.

Anal. (%) Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_6$: C 60.89, H 6.31, N 4.18; found: C 61.07, H 6.60, N 4.22.

Lithium 2-(3-(benzylamino)-3-oxopropyl)-4-oxopentanedioate 69 (C₁₅H₁₅Li₂NO₆, 319.16 g.mol⁻¹)



To a solution of **69** (2.38 g, 7.10 mmol, 1 eq.) in methanol (60 mL) was added dropwise a 0.4M aqueous lithium hydroxide solution (37.3 ml, 14.9 mmol, 2.1 eq.). The mixture was stirred at room temperature for 4 hours until complete hydrolysis. After evaporation of MeOH, the pH of the aqueous solution was adjusted to 7.6 by the addition of Dowex 50X8 resin (H⁺ form). The resin was removed by filtration before evaporation of the water under reduced pressure. The lithium salt **69** was obtained as a white solid (2.26 g, yield : 100%).

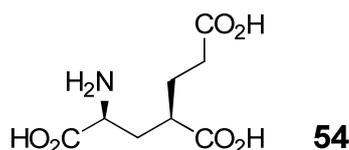
IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3414, 3067, 2932, 1714, 1636, 1579, 1420, 1356, 1257, 1112, 744, 700.

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm) 7.35 (5H, m, *H*_{ar}), 4.36 (2H, s, CH₂NH), 3.02 (1H, dd, *J*₁ = 8.0 Hz, *J*₂ = 17.5 Hz, CH_{2a}CH), 2.83 (1H, dd, *J*₁ = 6.0 Hz, *J*₂ = 17.5 Hz, CH_{2b}CH), 2.63 (1H, m, CH), 2.29 (2H, m, CH₂CH₂CH), 1.78 (2H, m, CH₂CH₂CH).

¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ (ppm) 204.3 (C, COCO₂), 182.3 (C, COCO₂⁻), 175.8 (C, CONH), 170.0 (C, CHCO₂⁻), 137.9 (C, *C*_{ar}), 128.7 (CH, CH_{ar}), 127.4 (CH, CH_{ar}), 127.2 (CH, CH_{ar}), 42.9 (CH₂, NHCH₂Ph), 42.2 (CH, CH), 41.6 (CH₂, CHCH₂), 33.7 (CH₂, CHCH₂CH₂), 28.2 (CH₂, CHCH₂CH₂).

HRMS-ESI *m/z*. Calcd for C₁₅H₁₆NO₆ [M-2Li+H]: 306.0978; found: 306.0991.

(1S,3R)-1-Aminopentane-1,3,5-tricarboxylic acid 54 (C₈H₁₃NO₆, 219.19 g.mol⁻¹)



To a mixture of **69** (2.5 g, 7.84 mmol), cysteine sulfonic acid (1.2 g, 7.84 mmol, 1.0 eq) in water (170 mL) at pH 7.6 was added AspAT (200 IU). The reaction mixture was stirred at room temperature and monitored by titration of pyruvate as previously described. When the conversion rate reached 40%, the mixture was passed through a column of Dowex 50X8 resin (H⁺ form). The column was washed with water (50 mL) and then eluted with 1M NH₄OH. The ninyhydrin positive fractions were combined and concentrated to dryness under reduced pressure. The resulting solid was suspended in 6M hydrochloric acid (40 mL), and heated to reflux for 6 hours. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was dissolved into water (20 mL). The pH was adjusted to 7.0 with NaOH before the mixture was passed through a column of Dowex 50X8 resin (H⁺ form). The column was washed with water (70 mL) and then eluted with 1M NH₄OH. The ninyhydrin positives fractions were combined and concentrated to dryness under reduced pressure.

The residue was diluted with water (20 mL), and the pH was adjusted to 7.0 with NaOH before adsorption of the products on a column of Dowex 1X8 (AcO⁻ form). The column was washed with water (25 mL) and eluted with a gradient of AcOH. Compound **54** were isolated as white solid (515 mg, yield : 30%).

Mp: 95-100°C

IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3550, 3480, 3416, 3238, 1637, 1620, 1520, 1404, 1111.

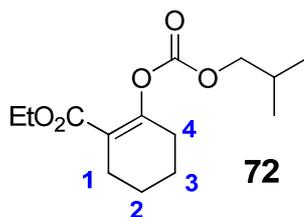
¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm) 3.78 (1H, dd, $J_1 = 5.5$ Hz, $J_2 = 8.0$ Hz, CHNH₂), 2.62 (1H, m, CH₂CHCH₂), 2.43 (2H, td, $J_1 = 3.0$ Hz, $J_2 = 7.5$ Hz, CH₂CH₂CH), 2.26 (1H, ddd, $J_1 = 5.5$ Hz, $J_2 = 9.5$ Hz, $J_3 = 15.0$ Hz, CH_{2a}CH), 1.92 (1H, m, CH_{2b}CH), 1.88 (2H, m, CH₂CH₂CH).

¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ (ppm) 178.5 (C, CO₂H), 177.6 (C, CO₂H), 173.4 (C, CO₂H), 52.8 (CH, CHNH₂), 41.2 (CH, CH₂CHCH₂), 32.2 (CH₂, CHCH₂CH), 31.1 (CH₂, CHCH₂CH₂), 26.9 (CH₂, CHCH₂CH₂).

HRMS-ESI m/z Calcd for C₈H₁₄NO₆ [M+H]⁺: 220.0821; found: 220.0815.

Anal. (%) Calcd for C₈H₁₃NO₆.1.2 H₂O: C 39.90, H 6.44, N 5.81; found: C 40.04, H 6.23, N 5.68.

Ethyl 2-(isobutoxycarbonyloxy)cyclohex-1-enecarboxylate **72** (C₁₄H₂₂O₅, 270.32 g.mol⁻¹)

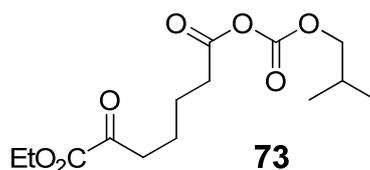


To a solution of ethyl 2-oxocyclohexanecarboxylate (5.0 g, 29.4 mmol, 1 eq.) and triethylamine (6.2 mL, 44.1 mmol, 1.5 eq.) in anhydrous THF (80 mL) was added dropwise isobutyl chloroformate (4.2 mL, 32.3 mmol, 1.1 eq.). The mixture was stirred at room temperature for two hours, and then filtered. The filtrate was concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (eluent: cyclohexane/EtOAc, 90/10 v/v) afforded **75** as a colourless liquid (6.90 g, yield: 87%).

IR (KBr) $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 2941, 1759, 1718, 1708, 1666, 1471, 1371, 1261, 1232, 1190, 1141, 1082, 1055, 1035, 962, 954, 767.

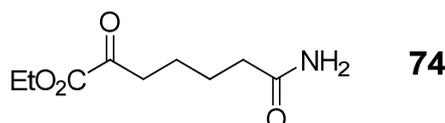
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.17 (2H, q, $J = 7.0$ Hz, CH₂CH₃), 3.98 (2H, d, $J = 7.0$ Hz, CH₂CH), 2.40 (2H, m, CH₂CH₂), 2.30 (2H, m, CH₂CH₂), 2.02 (1H, m, CH(CH₃)₂), 1.74 (2H, m, CH₂CH₂), 1.66 (2H, m, CH₂CH₂), 1.26 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, CH₂CH₃), 0.98 (6H, d, $J = 7.0$ Hz, CH(CH₃)₂).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 165.61 (C, CO₂Et), 154.8 (C, C=CO), 152.4 (C, C_{carbonate}), 118.1 (C, =CCO₂Et), 74.6 (CH₂, CH_{2isobutyl}), 60.4 (CH₂, CH_{2ethyl}), 28.7 (CH₂, C²H₂), 27.7 (CH₂, C¹H₂), 25.1 (CH₂, C³H₂), 22.0 (CH₂, C⁴H₂), 21.5 (CH, CH_{isobutyl}), 18.8 (CH₃, CH_{3isobutyl}), 14.0 (CH₃, CH_{3ethyl}).

7-Ethoxy-6,7-dioxoheptanoic (isobutyl carbonic) anhydride 73 (C₁₄H₂₂O₇, 302.32 g.mol⁻¹)

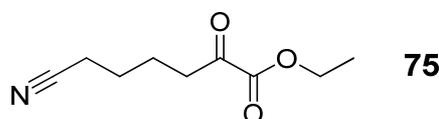
A solution of **72** (3.7 g, 3.7 mmol) in CH₂Cl₂ (50 mL) was treated at -78°C with a mixture of O₂ and O₃ bubbling until saturation (blue coloration of the solution). After 30 min, the excess of ozone was eliminated by oxygen bubbling. Dimethylsulfide (345 μL, 5.55 mmol, 1.5 eq.) was added, and the reaction mixture was allowed to warm to room temperature. The compound **74** was used in the next step without purification.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.31 (2H, q, *J* = 7.0 Hz, CH₂CH₃), 4.04 (2H, d, *J* = 7.0 Hz, CH₂CH), 2.88 (2H, m, CH₂CH₂CO), 2.50 (2H, m, CH₂CH₂CO), 2.02 (1H, m, CH(CH₃)₂), 1.71 (4H, m, 2 CH₂), 1.36 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, CH₂CH₃), 0.96 (6H, d, *J* = 7.0 Hz, CH(CH₃)₂).

Ethyl 7-amino-2,7-dioxoheptanoate 74 (C₉H₁₅NO₄, 201.22 g.mol⁻¹)

To a solution of **73** (3.7 mmol) in CH₂Cl₂ was added a 0.32M solution of ammonia in THF (11.56 mL, 3.7 mmol, 1.0 eq.). The mixture was stirred at room temperature for 30 min, before being concentrated under reduced pressure. The resulting oil could not be purified by chromatography and was used in the next step without purification.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 5.68 (2H, br m, NH₂), 4.32 (2H, q, *J* = 7.0 Hz, CH₂CH₃), 2.88 (2H, m, CH₂CO), 2.26 (2H, m, CH₂CONH₂), 1.69 (4H, m, 2 CH₂), 1.37 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, CH₂CH₃).

Ethyl 6-cyano-2-oxohexanoate 75 (C₉H₁₃NO₃, 183.20 g.mol⁻¹)

To a solution of **74** (744 mg, 3.7 mmol, 1 eq.) and pyridine (600 μL, 7.4 mmol, 2 eq.) in anhydrous THF (25 mL) cooled in an ice bath was added dropwise trifluoroacetic anhydride (580 μL, 4.1 mmol, 1.1 eq.). After 30 min of stirring at 0°C, the mixture was allowed to warm to room temperature. After stirring for two hours more, the mixture was diluted with EtOAc (100 mL) and washed with water (30 mL) and brine (30 mL). The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. Flash chromatography (eluent: cyclohexane/EtOAc, 60/40 v/v) afforded **72** as a colourless liquid (280 mg, yield: 46%)

IR (KBr) $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹: 2987, 2247, 1728, 1456, 1427, 1402, 1369, 1298, 1255, 1176, 1086, 1043, 858.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.33 (2H, q, $J = 7$ Hz, CH₂CH₃), 2.91 (2H, t, $J = 7$ Hz, CH₂CN), 2.37 (2H, t, $J = 7$ Hz, CH₂CO), 1.85 (2H, m, CH₂), 1.70 (2H, m, CH₂), 1.37 (23H, t, $J = 7$ Hz, CH₂CH₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 193.5(C, CO₂Et), 160.8(C, C=O), 119.1(C, C \equiv N), 62.6(CH₂, CH₂CH₃), 38.1(CH₂, CH₂CO), 24.1(CH₂, CH₂CH₂), 21.9(CH₂, CH₂CH₂), 17.0 (CH₂, CH₂CN), 13.9(CH₃, CH₂CH₃).

3. Nanoparticles related procedures

3.1. Nanoparticles synthesis

Synthesis of nanoparticles

Ammonia solution (350 μL , 19 % w/w in water) and 75 μL of an aqueous solution of the lanthanide complex (concentration range: $2.5 \cdot 10^{-2}$ to $1 \cdot 10^{-1}$ Mol.L^{-1} , depending on complex solubility) were added to a mixture of NP₅ - nonylphenol pentaglycol ether (4.05 g, 9.02 mmol) and cyclohexane (93.3 mL). After 45 min of stirring at room temperature, 2.3 mL of tetraethyl orthosilicate (TEOS, 10.3 mmol) were added. After 24 hours under stirring, a large excess of acetone was added to the solution. The resulting mixture was left without stirring for 24h and centrifuged (14000 rpm, 15min, 4°C). The nanoparticles were washed by centrifugation with acetone (x2), water (x1), and ethanol (x2). Nanoparticles were dried at 85°C in an oven for 24 h. (~100-200 mg).

Synthesis of functionalised nanoparticles

The previous procedure was slightly modified as follows:

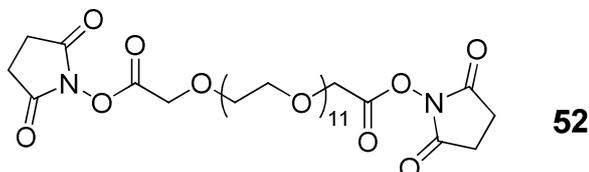
24 hours after the first addition of TEOS, 230 μL of TEOS (1.03 mmol) and 1.03 mmol of APTES (240 μL) were added to the mixture, and let under stirring for 24h before addition of a large excess of acetone to the solution. The resulting mixture was left without stirring for 24h and centrifuged (14000 rpm, 15min, 4°C). The nanoparticles were washed by centrifugation with acetone (x2), water (x1), and ethanol (x2). Nanoparticles were dried at 85°C in an oven for 24 h. (~150-200 mg).

Stability study

Nanohybrides NP-Eu(**43**)₃ and NP-Eu(**43**)₃-NH₂ were suspended (10 mg/mL) into phosphate-citrate buffer at pH 5.0, 6.0, 7.0 and 8.0, and sonicated for 10 min. After 14 days, the suspensions were centrifuged and the supernatants were removed. The nanoparticles were resuspended into Tris.HCl buffer at pH 7.0. The luminescence of the suspensions (10 mg/mL) was recorded and compared with freshly prepared suspensions of NP-Eu(**43**)₃ and NP-Eu(**43**)₃-NH₂, used as references.

3.2. PEGylation procedure

Disuccinimidyl polyethylene glycol₆₀₀ dicarboxylate 52 (C₃₄H₅₆N₂O₂₀, 812.81 g.mol⁻¹)



Polyethylene glycol 600 bis(carboxymethyl) ether (500 mg, 0.83 mmol, 1.0 eq.) was dissolved into 10 mL of dichloromethane. *N*-Hydroxysuccinimide (240 mg, 2.08 mmol, 2.5 eq.) and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride EDCI-HCl (400 mg, 2.08 mmol, 2.5 eq.) were added to the solution. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature, then filtered through a short column of silica gel (CH₂Cl₂), and the filtrate was concentrated under reduced pressure to obtain the pure product as a colourless oil (509 mg, yield 77%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 4.61 (4H, s, OCH₂COO), 3.67 (4H, m, OCH₂CH₂), 3.57 (4H, m, OCH₂CH₂), 3.51 (36H, m, OCH₂CH₂O) 2.83 (8H, s, CH₂NHS).

Grafting of PEG chains on nanoparticles (NP-Eu(**43**)₃-PEG-NHS)

NP-Eu(**43**)₃-NH₂ (50 mg) were sonicated into 10 mL of dichloromethane until the suspension was homogeneous (about 10min). Then succinimidyl ester **52** (220 mg, 0.28 mmol) was added to the suspension. The resulting mixture was stirred overnight at room temperature. The nanoparticles were then washed by centrifugation with dichloromethane (x4), methanol (x2) and resuspended into dichloromethane. The nanoparticles NP-Eu(**43**)₃-PEG-NHS were dried at 25°C (49 mg).

3.3. Vector grafting

NP-Eu(**43**)₃-PEG-NHS (10 mg) were sonicated into 2 mL of dichloromethane until the suspension was homogeneous (about 10min). Then diisopropylethylamine (134 μL) and DCL (hydrochloride form, 20 mg, 0.056 mmol, 40 eq.) were added to the suspension, and the mixture was stirred overnight a room temperature. The nanoparticules were then washed by centrifugation with dichloromethane (x3), methanol (x2) , water (x3), methanol (x1) and resuspended into dichloromethane. The nanoparticles NP-Eu(**43**)₃-PEG-DCL were dried at 25°C (10 mg).

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. International Agency for Research on Cancer, *World Cancer Report 2008*.
2. M. K. Yu, *Theranostics*, 2012, **2**, 3–44.
3. P. A. Cox, *The elements: their origin, abundance, and distribution*, Oxford University Press, Oxford [England]; New York, 1989.
4. S. Cotton, *Lanthanide and actinide chemistry*, Wiley, Chichester, England; Hoboken, NJ, 2006.
5. J.-C. G. Bünzli, S. Comby, A.-S. Chauvin, and C. D. B. Vandevyver, *J. Rare Earths*, 2007, **25**, 257–274.
6. J.-C. G. Bünzli and C. Piguet, *Chem. Rev.*, 2002, **102**, 1897–1928.
7. S. V. Eliseeva and J.-C. G. Bünzli, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **39**, 189–227.
8. J.-C. G. Bünzli and C. Piguet, *Chem. Soc. Rev.*, 2005, **34**, 1048–1077.
9. G. H. Dieke, *Spectra and Energy Levels of Rare Earth Ions in Crystals*, John Wiley & Sons, USA, 1968.
10. W. T. Carnall, P. R. Fields, and K. Rajnak, *J. Chem. Phys.*, 1968, **49**, 4424–4442.
11. W. T. Carnall, P. R. Fields, and K. Rajnak, *J. Chem. Phys.*, 1968, **49**, 4443–4446.
12. W. T. Carnall, P. R. Fields, and K. Rajnak, *J. Chem. Phys.*, 1968, **49**, 4447–4449.
13. W. T. Carnall, P. R. Fields, and K. Rajnak, *J. Chem. Phys.*, 1968, **49**, 4450–4455.
14. W. T. Carnall, G. L. Goodman, K. Rajnak, and R. S. Rana, *J. Chem. Phys.*, 1989, **90**, 3443–3457.
15. G. R. Choppin and D. R. Peterman, *Coord. Chem. Rev.*, 1998, **174**, 283–299.
16. A. Beeby, I. M. Clarkson, R. S. Dickins, S. Faulkner, D. Parker, L. Royle, A. S. de Sousa, J. A. G. Williams, and M. Woods, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1999, 493–504.
17. D. T. Richens, *The chemistry of aqua ions: synthesis, structure, and reactivity : a tour through the periodic table of the elements*, J. Wiley, Chichester; New York, 1997.
18. A. Bianchi, L. Calabi, F. Corana, S. Fontana, P. Losi, A. Maiocchi, L. Paleari, and B. Valtancoli, *Coord. Chem. Rev.*, 2000, **204**, 309–393.
19. M. Latva, H. Takalo, V.-M. Mikkala, C. Matachescu, J. C. Rodríguez-Ubis, and J. Kankare, *J. Lumin.*, 1997, **75**, 149–169.
20. K. Binnemans, in *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths*, ed. J.-C. B. and V. K. P. K.A. Gschneidner, Elsevier, 2005, vol. 35, pp. 107–272.
21. V. E. Pushkarev, E. V. Shulishov, Y. V. Tomilov, and L. G. Tomilova, *Tetrahedron Lett.*, 2007, **48**, 5269–5273.
22. I. M. Clarkson, A. Beeby, J. I. Bruce, L. J. Govenlock, M. P. Lowe, C. E. Mathieu, D. Parker, and K. Senanayake, *New J. Chem.*, 2000, **24**, 377–386.
23. B. Alpha, V. Balzani, J.-M. Lehn, S. Perathoner, and N. Sabbatini, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1987, **26**, 1266–1267.
24. V.-M. Mikkala, M. Helenius, I. Hemmilä, J. Kankare, and H. Takalo, *Helv. Chim. Acta*, 1993, **76**, 1361–1378.
25. S. Takahashi, S. Hashimoto, Y. Shimogori, N. Matsumoto, T. Nakashima, and M. Tsuchimoto, *Polyhedron*, 2011, **30**, 2026–2031.

26. K. P. N. Dennis, J. Jianzhuang, K. Kuninobu, and M. Kenichi, in *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths*, ed. J. Karl A. Gschneidner, Elsevier, 2001, vol. 32, pp. 611–653.
27. J.-M. Lehn and J.-B. R. De Vains, *Helv. Chim. Acta*, 1992, **75**, 1221–1236.
28. A. Chauvin, F. Gumy, D. Imbert, and J. G. Bünzli, *Spectrosc. Lett.*, 2004, **37**, 517–532.
29. A. Aebischer, F. Gumy, and J.-C. G. Bünzli, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2009, **11**, 1346–1353.
30. J. B. Lamture, Z. H. Zhou, A. S. Kumar, and T. G. Wensel, *Inorg. Chem.*, 1995, **34**, 864–869.
31. H. Takalo, E. Hänninen, and J. Kankare, *Helv. Chim. Acta*, 1993, **76**, 877–883.
32. I. Grenthe, *J. Am. Chem. Soc.*, 1961, **83**, 360–364.
33. I. Johnson, *Histochem. J.*, 1998, **30**, 123–140.
34. S. Faulkner, S. J. A. Pope, and B. P. Burton-Pye, *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2005, **40**, 1–31.
35. M. Monici, in *Biotechnology Annual Review*, ed. M.R. El-Gewely, Elsevier, 2005, vol. 11, pp. 227–256.
36. J.-C. G. Bünzli and G. R. Choppin, *Lanthanide probes in life, chemical, and earth sciences: theory and practice*, Elsevier, Amsterdam; New York, 1989.
37. E. F. Gudgin Dickson, A. Pollak, and E. P. Diamandis, *J. Photochem. Photobiol. B*, 1995, **27**, 3–19.
38. J. Mertz, *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2004, **14**, 610–616.
39. H. M. Kim and B. R. Cho, *Acc. Chem. Res.*, 2009, **42**, 863–872.
40. C. Andraud and O. Maury, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2009, **2009**, 4357–4371.
41. J. R. Lakowicz, G. Piszczek, B. P. Maliwal, and I. Gryczynski, *ChemPhysChem*, 2001, **2**, 247–252.
42. G. Piszczek, B. P. Maliwal, I. Gryczynski, J. Dattelbaum, and J. R. Lakowicz, *J. Fluoresc.*, 2001, **11**, 101–107.
43. A. Picot, A. D’Aléo, P. L. Baldeck, A. Grichine, A. Duperray, C. Andraud, and O. Maury, *J Am Chem Soc*, 2008, **130**, 1532–1533.
44. A. Bourdolle, M. Allali, J.-C. Mulatier, B. Le Guennic, J. M. Zwier, P. L. Baldeck, J.-C. G. Bünzli, C. Andraud, L. Lamarque, and O. Maury, *Inorg Chem*, 2011, **50**, 4987–4999.
45. A. Picot, C. Feuvrie, C. Barsu, F. Malvolti, B. Le Guennic, H. Le Bozec, C. Andraud, L. Toupet, and O. Maury, *Tetrahedron*, 2008, **64**, 399–411.
46. 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, and D. Parker, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 1600–1602.
47. <http://les-nanotechnologies.e-monsite.com>.
48. I. Brigger, C. Dubernet, and P. Couvreur, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2012, **64**, Supplement, 24–36.
49. S. K. Sahoo and V. Labhasetwar, *Drug Discov. Today*, 2003, **8**, 1112–1120.
50. C. Sun, J. S. H. Lee, and M. Zhang, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2008, **60**, 1252–1265.
51. M. Hamoudeh, M. A. Kamleh, R. Diab, and H. Fessi, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2008, **60**, 1329–1346.
52. H. Ooba, *AIST today*, 2006, **6**, 26–27.
53. M. A. Walling, J. A. Novak, and J. R. E. Shepard, *Int. J. Mol. Sci.*, 2009, **10**, 441–491.

54. G. Wang, Q. Peng, and Y. Li, *Acc. Chem. Res.*, 2011, **44**, 322–332.
55. J. Zhou, Z. Liu, and F. Li, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 1323–1349.
56. G. Kickelbick, *Hybrid Materials: Synthesis, Characterization, and Applications*, John Wiley & Sons, 2007.
57. D. Avnir, D. Levy, and R. Reisfeld, *J. Phys. Chem.*, 1984, **88**, 5956–5959.
58. M. Fernandes, V. de Zea Bermudez, R. A. Sá Ferreira, L. D. Carlos, A. Charas, J. Morgado, M. M. Silva, and M. J. Smith, *Chem. Mater.*, 2007, **19**, 3892–3901.
59. J. Wen and G. L. Wilkes, *Chem. Mater.*, 1996, **8**, 1667–1681.
60. Y. Kobayashi, Y. Kurokawa, Y. Imai, and S. Muto, *J. Non-Cryst. Solids*, 1988, **105**, 198–200.
61. D. Avnir, V. R. Kaufman, and R. Reisfeld, *J. Non-Cryst. Solids*, 1985, **74**, 395–406.
62. K. Li, D. Ding, D. Huo, K.-Y. Pu, N. N. P. Thao, Y. Hu, Z. Li, and B. Liu, *Adv. Funct. Mater.*, 2012, **22**, 3107–3115.
63. J.-H. Park, G. von Maltzahn, E. Ruoslahti, S. N. Bhatia, and M. J. Sailor, *Angew. Chem.*, 2008, **120**, 7394–7398.
64. C.-W. Lu, Y. Hung, J.-K. Hsiao, M. Yao, T.-H. Chung, Y.-S. Lin, S.-H. Wu, S.-C. Hsu, H.-M. Liu, C.-Y. Mou, C.-S. Yang, D.-M. Huang, and Y.-C. Chen, *Nano Lett.*, 2007, **7**, 149–154.
65. J. E. Smith, L. Wang, and W. Tan, *TrAC Trends Anal. Chem.*, 2006, **25**, 848–855.
66. W. Stöber, A. Fink, and E. Bohn, *J. Colloid Interface Sci.*, 1968, **26**, 62–69.
67. D. Green, J. Lin, Y.-F. Lam, M. Z.-C. Hu, D. W. Schaefer, and M. . Harris, *J. Colloid Interface Sci.*, 2003, **266**, 346–358.
68. K. S. Rao, K. El-Hami, T. Kodaki, K. Matsushige, and K. Makino, *J. Colloid Interface Sci.*, 2005, **289**, 125–131.
69. F. J. Arriagada and K. Osseo-Asare, *J. Colloid Interface Sci.*, 1999, **211**, 210–220.
70. F. J. Arriagada and K. Osseo-Asare, *J. Colloid Interface Sci.*, 1995, **170**, 8–17.
71. W. H. De Jong, W. I. Hagens, P. Krystek, M. C. Burger, A. J. A. M. Sips, and R. E. Geertsma, *Biomaterials*, 2008, **29**, 1912–1919.
72. D. Knopp, D. Tang, and R. Niessner, *Anal. Chim. Acta*, 2009, **647**, 14–30.
73. A. Burns, H. Ow, and U. Wiesner, *Chem. Soc. Rev.*, 2006, **35**, 1028–1042.
74. L. Wang, K. Wang, S. Santra, X. Zhao, L. R. Hilliard, J. E. Smith, Y. Wu, and W. Tan, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 646–654.
75. J. Yan, M. C. Estévez, J. E. Smith, K. Wang, X. He, L. Wang, and W. Tan, *Nano Today*, 2007, **2**, 44–50.
76. S. Santra, D. Dutta, and B. M. Moudgil, *Food Bioprod. Process.*, 2005, **83**, 136–140.
77. H. Ow, D. R. Larson, M. Srivastava, B. A. Baird, W. W. Webb, and U. Wiesner, *Nano Lett.*, 2005, **5**, 113–117.
78. M. Nakamura, M. Shono, and K. Ishimura, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 6507–6514.
79. A. Van Blaaderen and A. Vrij, *Langmuir*, 1992, **8**, 2921–2931.
80. X. Zhao, R. P. Bagwe, and W. Tan, *Adv. Mater.*, 2004, **16**, 173–176.
81. R. Tapeç, X. J. Zhao, and W. Tan, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2002, **2**, 405–409.
82. A. Imhof, M. Megens, J. J. Engelberts, D. T. N. de Lang, R. Sprik, and W. L. Vos, *J. Phys. Chem. B*, 1999, **103**, 1408–1415.
83. P. Innocenzi, H. Kozuka, and T. Yoko, *J. Phys. Chem. B*, 1997, **101**, 2285–2291.

84. M. Ogawa, T. Nakamura, J. Mori, and K. Kuroda, *J. Phys. Chem. B*, 2000, **104**, 8554–8556.
85. P. Zhang, J. Guo, Y. Wang, and W. Pang, *Mater. Lett.*, 2002, **53**, 400–405.
86. C.-W. Lai, Y.-H. Wang, C.-H. Lai, M.-J. Yang, C.-Y. Chen, P.-T. Chou, C.-S. Chan, Y. Chi, Y.-C. Chen, and J.-K. Hsiao, *Small*, 2008, **4**, 218–224.
87. P. Escribano, B. Julián-López, J. Planelles-Aragó, E. Cordoncillo, B. Viana, and C. Sanchez, *J. Mater. Chem.*, 2008, **18**, 23.
88. L. D. Carlos, R. A. S. Ferreira, V. de Z. Bermudez, and S. J. L. Ribeiro, *Adv. Mater.*, 2009, **21**, 509–534.
89. K. Binnemans, *Chem. Rev.*, 2009, **109**, 4283–4374.
90. J. Wu, G. Wang, D. Jin, J. Yuan, Y. Guan, and J. Piper, *Chem. Commun.*, 2008, 365–367.
91. H. Jiang, G. Wang, W. Zhang, X. Liu, Z. Ye, D. Jin, J. Yuan, and Z. Liu, *J. Fluoresc.*, 2010, **20**, 321–328.
92. H. Zhang, Y. Xu, W. Yang, and Q. Li, *Chem. Mater.*, 2007, **19**, 5875–5881.
93. S. Cousinié, M. Gressier, C. Reber, J. Dexpert-Ghys, and M.-J. Menu, *Langmuir*, 2008, **24**, 6208–6214.
94. Y. Xu and Q. Li, *Clin. Chem.*, 2007, **53**, 1503–1510.
95. J. Zhang, Y. Fu, and J. R. Lakowicz, *J. Phys. Chem. C*, 2009, **113**, 19404–19410.
96. J. Samuel, G. Tallec, P. Cherns, W. L. Ling, O. Raccurt, O. Poncelet, D. Imbert, and M. Mazzanti, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 2647.
97. Y. Chen, Y. Chi, H. Wen, and Z. Lu, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 960–965.
98. M. Tan, Z. Ye, G. Wang, and J. Yuan, *Chem. Mater.*, 2004, **16**, 2494–2498.
99. P.-Z. Qin, C.-G. Niu, G.-M. Zeng, M. Ruan, L. Tang, and J.-L. Gong, *Talanta*, 2009, **80**, 991–995.
100. K. M. Waters, L. M. Masiello, R. C. Zangar, B. J. Tarasevich, N. J. Karin, R. D. Quesenberry, S. Bandyopadhyay, J. G. Teeguarden, J. G. Pounds, and B. D. Thrall, *Toxicol. Sci.*, 2009, **107**, 553–569.
101. Q. He, J. Zhang, J. Shi, Z. Zhu, L. Zhang, W. Bu, L. Guo, and Y. Chen, *Biomaterials*, 2010, **31**, 1085–1092.
102. M. Zhang and M. Ferrari, *Biomed. Microdevices*, 1998, **1**, 81–89.
103. Y.-P. Li, Y.-Y. Pei, X.-Y. Zhang, Z.-H. Gu, Z.-H. Zhou, W.-F. Yuan, J.-J. Zhou, J.-H. Zhu, and X.-J. Gao, *J. Controlled Release*, 2001, **71**, 203–211.
104. Haute Autorité de Santé, *Dépistage du cancer de la prostate Analyse critique des articles issus des études ERSPC et PLCO publiés en mars 2009*, 2010.
105. J. A. Barreto, W. O'Malley, M. Kubeil, B. Graham, H. Stephan, and L. Spiccia, *Adv. Mater.*, 2011, **23**, H18–H40.
106. S. K. Hobbs, W. L. Monsky, F. Yuan, W. G. Roberts, L. Griffith, V. P. Torchilin, and R. K. Jain, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1998, **95**, 4607–4612.
107. K. M. McNeeley, A. Annapragada, and R. V. Bellamkonda, *Nanotechnology*, 2007, **18**, 385101.
108. D. J. Irvine, *Nat. Mater.*, 2011, **10**, 342–343.
109. A. Ghosh and W. D. W. Heston, *J. Cell. Biochem.*, 2004, **91**, 528–539.
110. D. S. O'Keefe, D. J. Bacich, and W. D. W. Heston, *The Prostate*, 2004, **58**, 200–210.

111. H. Liu, A. K. Rajasekaran, P. Moy, Y. Xia, S. Kim, V. Navarro, R. Rahmati, and N. H. Bander, *Cancer Res.*, 1998, **58**, 4055–4060.
112. S. S. Chang, V. E. Reuter, W. D. W. Heston, N. H. Bander, L. S. Grauer, and P. B. Gaudin, *Cancer Res.*, 1999, **59**, 3192–3198.
113. M. J. Manyak, G. H. Hinkle, J. O. Olsen, R. P. Chiaccherini, A. W. Partin, S. Piantadosi, J. K. Burgers, J. H. Texter, C. E. Neal, J. A. Libertino, G. L. Wright Jr, and R. T. Maguire, *Urology*, 1999, **54**, 1058–1063.
114. M. I. Milowsky, D. M. Nanus, L. Kostakoglu, C. E. Sheehan, S. Vallabhajosula, S. J. Goldsmith, J. S. Ross, and N. H. Bander, *J. Clin. Oncol.*, 2007, **25**, 540–547.
115. C. A. Foss, R. C. Mease, H. Fan, Y. Wang, H. T. Ravert, R. F. Dannals, R. T. Olszewski, W. D. Heston, A. P. Kozikowski, and M. G. Pomper, *Clin. Cancer Res.*, 2005, **11**, 4022–4028.
116. S. A. Kularatne, K. Wang, H.-K. R. Santhapuram, and P. S. Low, *Mol. Pharm.*, 2009, **6**, 780–789.
117. S. A. Kularatne, C. Venkatesh, H.-K. R. Santhapuram, K. Wang, B. Vaitilingam, W. A. Henne, and P. S. Low, *J. Med. Chem.*, 2010, **53**, 7767–7777.
118. M. Thomas, S. A. Kularatne, L. Qi, P. Kleindl, C. P. Leamon, M. J. Hansen, and P. S. Low, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2009, **1175**, 32–39.
119. S. Dhar, F. X. Gu, R. Langer, O. C. Farokhzad, and S. J. Lippard, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2008, **105**, 17356–17361.
120. O. C. Farokhzad, J. Cheng, B. A. Teply, I. Sherifi, S. Jon, P. W. Kantoff, J. P. Richie, and R. Langer, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2006, **103**, 6315–6320.
121. V. Sanna, G. Pintus, A. M. Roggio, S. Punzoni, A. M. Posadino, A. Arca, S. Marceddu, P. Bandiera, S. Uzzau, and M. Sechi, *J. Med. Chem.*, 2011, **54**, 1321–1332.
122. Z. E. A. Chamas, X. Guo, J.-L. Canet, A. Gautier, D. Boyer, and R. Mahiou, *Dalton Trans*, 2010, **39**, 7091–7097.
123. X. Guo, J.-L. Canet, D. Boyer, A. Gautier, and R. Mahiou, *J. Mater. Chem.*, 2012, **22**, 6117–6122.
124. S. A. Kularatne, Z. Zhou, J. Yang, C. B. Post, and P. S. Low, *Mol. Pharm.*, 2009, **6**, 790–800.
125. H. C. Kolb, M. G. Finn, and K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, **40**, 2004–2021.
126. S. Bräse, C. Gil, K. Knepper, and V. Zimmermann, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, **44**, 5188–5240.
127. B. T. Worrell, J. A. Malik, and V. V. Fokin, *Science*, 2013, **340**, 457–460.
128. X.-H. Yin and M.-Y. Tan, *Synth. Commun.*, 2003, **33**, 1113–1119.
129. M.-L. Teyssot, L. Nauton, J.-L. Canet, F. Cisnetti, A. Chevry, and A. Gautier, *Eur. J. Org. Chem.*, 2010, **2010**, 3507–03515.
130. G. Howáth, C. Rusa, Z. Köntös, J. Gerencsér, and P. Huszthy, *Synth. Commun.*, 1999, **29**, 3719–3731.
131. C. Gaulier, A. Hospital, B. Legeret, A. F. Delmas, V. Aucagne, F. Cisnetti, and A. Gautier, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 4005–4007.
132. S. Díez-González, A. Correa, L. Cavallo, and S. P. Nolan, *Chem. – Eur. J.*, 2006, **12**, 7558–7564.

133. S. Díez-González and S. P. Nolan, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, **47**, 8881–8884.
134. A. Maisonial, P. Serafin, M. Traïkia, E. Debiton, V. Théry, D. J. Aitken, P. Lemoine, B. Viossat, and A. Gautier, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2008, **2008**, 298–305.
135. A. D'Aléo, L. Toupet, S. Rigaut, C. Andraud, and O. Maury, *Opt. Mater.*, 2008, **30**, 1682–1688.
136. A. Aebischer, F. Gumy, and J.-C. G. Bünzli, *Phys Chem Chem Phys*, 2009, **11**, 1346–1353.
137. M. Enculescu, N. Preda, E. Matei, and I. Enculescu, *Mater. Chem. Phys.*, 2012, **136**, 51–58.
138. L. H. Allen, E. Matijević, and L. Meites, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 1971, **33**, 1293–1299.
139. A. M. Van Leusen, J. Wildeman, and O. H. Oldenzien, *J. Org. Chem.*, 1977, **42**, 1153–1159.
140. M. Gude, J. Ryf, and P. D. White, *Lett. Pept. Sci.*, 2002, **9**, 203–206.
141. M. I. Davis, M. J. Bennett, L. M. Thomas, and P. J. Bjorkman, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2005, **102**, 5981–5986.
142. C. Bařinka, M. Rovenská, P. Mlčochová, K. Hlouchová, A. Plechanovová, P. Majer, T. Tsukamoto, B. S. Slusher, J. Konvalinka, and J. Lubkowski, *J. Med. Chem.*, 2007, **50**, 3267–3273.
143. C. Barinka, Y. Byun, C. L. Dusich, S. R. Banerjee, Y. Chen, M. Castanares, A. P. Kozikowski, R. C. Mease, M. G. Pomper, and J. Lubkowski, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 7737–7743.
144. <http://www.piercenet.com/product/carboxy-peg-amine-compounds>.
145. V. Sanna, G. Pintus, A. M. Roggio, S. Punzoni, A. M. Posadino, A. Arca, S. Marceddu, P. Bandiera, S. Uzzau, and M. Sechi, *J. Med. Chem.*, 2011, **54**, 1321–1332.
146. V. Klusák, C. Bařinka, A. Plechanovová, P. Mlčochová, J. Konvalinka, L. Rulíšek, and J. Lubkowski, *Biochemistry (Mosc.)*, 2009, **48**, 4126–4138.
147. A. X. Zhang, R. P. Murelli, C. Barinka, J. Michel, A. Cocleaza, W. L. Jorgensen, J. Lubkowski, and D. A. Spiegel, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 12711–12716.
148. B.-Y. Hwang, B.-K. Cho, H. Yun, K. Koteswar, and B.-G. Kim, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 2005, **37**, 47–55.
149. N. Passerat and J. Bolte, *Tetrahedron Lett.*, 1987, **28**, 1277–1280.
150. V. Hélaïne, J. Rossi, T. Gefflaut, S. Alaux, and J. Bolte, *Adv. Synth. Catal.*, 2001, **343**, 692–697.
151. M. Xian, S. Alaux, E. Sagot, and T. Gefflaut, *J. Org. Chem.*, 2007, **72**, 7560–7566.
152. S. Alaux, M. Kusk, E. Sagot, J. Bolte, A. A. Jensen, H. Bräuner-Osborne, T. Gefflaut, and L. Bunch, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 7980–7992.
153. W. T. Jenkins and L. D'Ari, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1966, **22**, 376–382.
154. Z. Assaf, A. P. Larsen, R. Venskutonytė, L. Han, B. Abrahamsen, B. Nielsen, M. Gajhede, J. S. Kastrup, A. A. Jensen, D. S. Pickering, K. Frydenvang, T. Gefflaut, and L. Bunch, *J. Med. Chem.*, 2013, **56**, 1614–1628.
155. P. N. Chakraborty, R. Dasgupta, S. K. Dasgupta, S. R. Ghosh, and U. R. Ghatak, *Tetrahedron*, 1972, **28**, 4653–4665.
156. E. Sagot, D. S. Pickering, X. Pu, M. Umberti, T. B. Stensbøl, B. Nielsen, M. Chapelet, J. Bolte, T. Gefflaut, and L. Bunch, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 4093–4103.

157. I. Shin, M. Lee, J. Lee, M. Jung, W. Lee, and J. Yoon, *J. Org. Chem.*, 2000, **65**, 7667–7675.
158. K. L. Kirk, *J. Heterocycl. Chem.*, 1985, **22**, 57–59.
159. N. M. Shavaleev, L. P. Moorcraft, S. J. A. Pope, Z. R. Bell, S. Faulkner, and M. D. Ward, *Chem. – Eur. J.*, 2003, **9**, 5283–5291.
160. N. M. Shavaleev, G. Accorsi, D. Virgili, Z. R. Bell, T. Lazarides, G. Calogero, N. Armaroli, and M. D. Ward, *Inorg. Chem.*, 2005, **44**, 61–72.
161. M. Nyk, R. Kumar, T. Y. Ohulchanskyy, E. J. Bergey, and P. N. Prasad, *Nano Lett.*, 2008, **8**, 3834–3838.
162. H. S. Qian, H. C. Guo, P. C.-L. Ho, R. Mahendran, and Y. Zhang, *Small*, 2009, **5**, 2285–2290.
163. S. Müller, D. A. Sanders, M. D. Antonio, S. Matsis, J.-F. Riou, R. Rodriguez, and S. Balasubramanian, *Org. Biomol. Chem.*, 2012, **10**, 6537–6546.
164. E.-H. Ryu and Y. Zhao, *Org. Lett.*, 2005, **7**, 1035–1037.

Résumé :

Ce travail de thèse a consisté en la conception et la réalisation d'une nano-sonde hybride luminescente visant à permettre la détection précoce du cancer de la prostate.

La première partie de ce projet a été consacré à la synthèse, par une voie de chimie click, d'une bibliothèque d'acides 4-triazolyl dipicoliniques substitués en position 4 du triazole par une large gamme de substituants. Ces diacides ont permis d'obtenir les complexes d'euporium(III) et de terbium(III) correspondant, qui ont montré d'excellentes propriétés optiques, avec des rendements quantiques de luminescence sous excitation UV pouvant atteindre 60% et 36%, pour les complexes d'euporium(III) et de terbium(III) respectivement. D'autre-part, ces fluorophores ont pu être excités efficacement en régime biphotonique, à la fois au travers des transitions $S_0 \rightarrow S_1$ et $S_0 \rightarrow T_1$. Sur la base de ces résultats, certains de ces chélates ont été sélectionnés afin de les incorporer dans des nanoparticules de silice. Le procédé d'élaboration par microémulsion inverse s'est révélé efficace pour l'incorporation des complexes électriquement neutres, mais n'a pas permis celle de nano-hybrides incorporant des complexes chargés négativement. Ces nano-hybrides présentent des propriétés optiques caractéristiques des lanthanides, avec des rendements quantiques allant jusqu'à 30%. La surface de ces nano-objets a ensuite été fonctionnalisée par des groupements amino, qui ont permis le greffage de bras espaceur et d'un vecteur ciblant la PSMA, l'un des signaux du cancer de la prostate, nous donnant ainsi accès à un modèle de nano-sonde luminescente.

Un autre volet de ce travail a été dédié à l'étude de nouveaux analogues du NAAG, substrat naturel de la PSMA. Bien que la synthèse des deux composés cibles, sélectionnés parmi une vingtaine de structures par modélisation moléculaire, n'ait pu aboutir, elle a été largement avancée.

Enfin, la dernière partie de ce travail décrit les premiers résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* avec les nanosondes. Ces études ont porté sur l'évaluation de la cytotoxicité des nanoparticules ainsi que sur leur biodistribution chez la souris saine et chez la souris porteuse d'une tumeur prostatique. Cette étude a révélé une élimination rapide des nanoparticules par l'organisme, mais n'a malheureusement pas pu mettre en évidence un marquage des zones tumorales par les nanosondes.

Mot-clefs : *CuAAC, acide 4-triazolyl dipicolinique, complexes de lanthanide, luminescence, biphotonique, nano-hybrides, sol-gel, fonctionnalisation de surface, cancer de la prostate, analogues du NAAG.*

Abstract :

The aim of this project was the design of a luminescent nanoprobe allowing the early prostate cancer detection.

The first part of this project was the synthesis, through a click chemistry approach, of a library of 4-triazolyl dipicolinic acid substituted in position 4 of the triazole by a wide range of substitutive groups. These diacids were used to synthesise the corresponding europium(III) and terbium(III) complexes, which showed excellent optical properties, with photoluminescence quantum yield under UV excitation reaching 60% for europium(III) complexes and 36% for terbium(III) complexes. Moreover, these phosphores have been efficiently excited in biphotonic regime through the transitions $S_0 \rightarrow S_1$ and $S_0 \rightarrow T_1$. The more interesting chelates were selected for their further embedding into silica nanoparticles. The water-in-oil emulsion process showed a great efficiency for the incorporation of electrically neutral complexes, but did not allow the embedding of negatively charged ones. The resulting nano-hybrids showed optical properties typical of lanthanides, presenting photoluminescence quantum yields up to 30%. The nanoparticles surface was then functionalised by amino groups, which were used to graft a spacer then a prostate tumour cells vector, giving us a luminescent nanoprobe model.

The third section of this work was devoted to the study of new analogues of NAAG, the natural substrate of the PSMA, one of the prostatic cancer signals. Although the synthesis of the two target compounds, selected from more than 20 structures by molecular modelling, was uncompleted, they are now within easy reach.

The last part describes the preliminary results obtained *in vitro* and *in vivo* with the nanoprobes. These studies were focused on the nanoparticles cytotoxicity assessment, depending on the surface functionalisation, and on their distribution, in healthy and in prostatic tumour bearing mice. This study revealed the fast elimination of the nanoparticles by the organism, but did not show any concentration of nanoprobes in tumoral area.

Keywords : *CuAAC, 4-triazolyl dipicolinic acid, lanthanide complexes, luminescence, biphotonic, nano-hybrids, sol-gel, surface functionalisation, prostate cancer, NAAG analogues.*