



HAL
open science

Complexes de BODIPY - phosphine - or : application à la conception de théranostiques optiques

Pierre-Emmanuel Doulain

► **To cite this version:**

Pierre-Emmanuel Doulain. Complexes de BODIPY - phosphine - or : application à la conception de théranostiques optiques. Autre. Université de Bourgogne, 2015. Français. NNT : 2015DIJOS036 . tel-01628179

HAL Id: tel-01628179

<https://theses.hal.science/tel-01628179v1>

Submitted on 3 Nov 2017

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

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



THÈSE

Présentée

à l'UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE

Mention : Chimie

Par

Pierre-Emmanuel DOULAIN

Maître ès Sciences

Complexes de BODIPY – phosphine – or : Application à la conception de théranostiques optiques

Soutenue le 2 novembre 2015 devant la commission d'examen

C. POLICAR	Professeur à l'ENS	Rapporteur
P. MAILLARD	Directeur de Recherche au CNRS à Curie	Rapporteur
M. HISSLER	Professeur à l'Université de Rennes 1	Examineur
A. TESSIER	Chargé de Recherche au CNRS à Nantes	Examineur
A. ROMIEU	Professeur à l'Université de Bourgogne	Examineur
C. GOZE	Maître de Conférences à l'Université de Bourgogne	Examineur
E. BODIO	Maître de Conférences à l'Université de Bourgogne	Co-Encadrant de thèse
R. DECREÁU	Maître de Conférences à l'Université de Bourgogne	Directeur de thèse



REMERCIEMENTS	5
LISTE DES ABREVIATIONS	7
PRESENTATION GENERALE	13
PARTIE 1 : INTRODUCTION	15
<i>I. Généralités sur le cancer</i>	<i>17</i>
I.1. Situation actuelle	17
I.2. Biologie du cancer	18
I.2.1. Généralités sur la cancérogénèse	18
I.2.2. Généralités sur les cellules tumorales	18
I.3. Diagnostic et traitement des cancers	19
I.3.1. Diagnostic des cancers	19
I.3.2. Traitement des cancers.....	19
<i>II. Les métaux en chimiothérapie anticancéreuse</i>	<i>21</i>
II.1. Le cisplatine et ses dérivés.....	21
II.2. Les dérivés du ruthénium.....	22
II.3. Les dérivés de l'or	24
II.4. Agents chimiothérapeutiques utilisant d'autres métaux.....	26
<i>III. L'imagerie médicale</i>	<i>27</i>
III.1. La radiographie et la tomodensitométrie	28
III.2. L'imagerie par résonance magnétique	29
III.3. Les imageries radioisotopiques ou scintigraphies.....	29
III.3.1. L'imagerie TEP.....	30
III.3.2. L'imagerie TEMP.....	30
III.4. L'échographie	30
III.5. L'imagerie optique	31
III.5.1. Principe de la fluorescence	31
III.5.2. Caractéristiques de la fluorescence.....	33
III.5.3. Limites de la fluorescence	34
III.5.4. Les techniques d'imagerie de fluorescence.....	36
III.5.5. Les fluorophores en imagerie optique	37
III.5.5.1. Les fluorophores organiques	37
III.5.5.1.1 Les dérivés du xanthène	38
III.5.5.1.2 Les dérivés de cyanines.....	39
III.5.5.1.3 Les BODIPYs	40
<i>IV. Les théranostiques optiques utilisant des métaux</i>	<i>42</i>
IV.1. Exemples de théranostiques optiques utilisant des métaux.....	43
IV.1.1. Dérivés métalliques en tant qu'agent thérapeutique.....	43
IV.1.2. Dérivés métalliques intrinsèquement agent thérapeutique et d'imagerie.....	46

V. Contexte du projet et voies d'optimisation.....	48
V.1. Contexte : présentation des travaux antérieurs	48
V.2. Conclusion : choix d'un « hit » et voies d'optimisation	53
PARTIE 2 : SYNTHÈSE ET ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS DE NOUVEAUX THERANOSTIQUES	
BODIPY-AU(I)	55
CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE DES NOUVEAUX THERANOSTIQUES BODIPY-AU(I)	57
I. Différentes stratégies de synthèse du BODIPY	57
I.1. Synthèse à partir d'un aldéhyde aromatique	57
I.2. Synthèse à partir d'un dérivé d'acide carboxylique	58
I.3. Synthèse par auto-condensation du 2-formylpyrrole	59
I.4. Synthèse à partir de carbonyle - pyrrole	59
II. Synthèse du théranostique BODI-Au-1	60
II.1. Synthèse du synthon BODIPY	61
II.2. Synthèse du complexe phosphine-or précurseur	62
II.3. Couplage entre le complexe d'or et le BODIPY acide.....	64
III. Vectorisation du théranostique BODI-Au-1.....	67
III.1. Choix des vecteurs	68
III.1.1. Dérivés du glucose.....	68
III.1.2. Dérivé de la bombésine	69
III.1.3. Dérivé de l'acide folique	70
III.2. Choix d'une méthode de bioconjugaison	71
III.2.1. Réactions de bioconjugaison basées sur la fonction amine.....	72
III.2.2. Réactions de bioconjugaison basées sur la fonction thiol	72
III.2.3. Réactions de bioconjugaison basées sur la fonction azoture.....	73
III.2.4. Réactions de bioconjugaison basées sur la fonction tétrazine	74
III.2.5. Notre stratégie.....	74
III.3. Synthèse des vecteurs et bioconjugaison	75
III.3.1. Introduction du thioglucose peracétylé : synthèse de BODI-Au-2	75
III.3.2. Introduction du thioglucose : synthèse de BODI-Au-3	76
III.3.3. Introduction du dérivé de la bombésine : synthèse de BODI-Au-4.....	76
III.3.3.1. Synthèse du dérivé de la bombésine BBN-SH	76
III.3.3.2. Couplage entre BODI-Au-1 et BBN-SH.....	77
III.3.4. Synthèse du dérivé de l'acide folique FA-SH	79
IV. Conclusion	81
CHAPITRE 2 : ÉVALUATION DES THERANOSTIQUES BODIPY-OR	83
I. Critères pour l'élaboration d'un théranostique optique.....	83
II. Étude photophysique des théranostiques synthétisés.....	84
III. Évaluation biologique des théranostiques.....	89

III.1.	Évaluation de la stabilité des composés	89
III.2.	Évaluation de la cytotoxicité des théranostiques	91
III.2.1.	Évaluation de l'affinité BODI-Au-4 pour les récepteurs à la bombésine	91
III.2.2.	Évaluation de l'activité antiproliférative des théranostiques	92
III.2.3.	Évaluation de l'accumulation des théranostiques dans les cellules	96
III.3.	Évaluation de la fluorescence <i>in vitro</i>	98
III.3.1.	Évaluation de la fluorescence par microscopie confocale	98
III.3.2.	Étude de fluorescence <i>in vitro</i> à 4 °C et 37 °C	100
IV.	Conclusion	103
PARTIE 3 : ÉVOLUTION DES COMPOSES POUR UNE APPLICATION <i>IN VIVO</i>		105
CHAPITRE 1 : ABSORPTION DANS LA « FENETRE THERAPEUTIQUE » : LES NIR-BODIPYS.....		107
I. <i>Stratégies de synthèse pour l'élaboration de NIR-BODIPYS</i>		108
I.1.	Méthode 1 : substitution sur les positions α -pyrroliques.....	108
I.1.1.	Substitutions nucléophiles et réactions de couplage des 3,5-dihalogéno-BODIPYS	108
I.1.2.	Condensation des 3,5-diméthyl-BODIPYS avec les aldéhydes aromatiques.....	110
I.2.	Méthode 2 : synthèse de BODIPYS avec systèmes π étendus rigides	111
I.3.	Méthode 3 : substitution aza sur la position <i>meso</i> : les aza-BODIPYS	113
II. <i>Élaboration d'un théranostique à partir d'une nouvelle sonde NIR-BODIPY pour une imagerie in vivo</i>		115
II.1.	Synthèse du NIR-BODIPY.....	116
II.2.	Couplage du NIR BODIPY avec le complexe d'or	117
II.2.1.	Activation de la fonction acide du NIR-BODIPY 14	117
II.2.2.	Couplage de NIR-BODIPY ester activé 15 avec le complexe d'or 7	118
III. <i>Étude photophysique de NIR-BODI-Au-1 et NIR-BODI-Au-2</i>		120
IV. <i>Évaluation biologique de NIR-BODI-Au-1 et NIR-BODI-Au-2</i>		124
CHAPITRE 2 : CONTRER LE PHENOMENE D'AGREGATION DES BODIPYS.....		129
I. <i>Introduction</i>		129
I.1.	Phénomènes d'agrégation des BODIPYS.....	130
I.2.	Solution pour empêcher l'agrégation des BODIPYS.....	130
II. <i>Les BODIPYS–Piquets pour prévenir l'agrégation</i>		132
II.1.	BODIPYS–Piquets : design d'une architecture moléculaire superstructurée.....	132
II.2.	Validation de la méthodologie de synthèse : composés modèles.....	137
II.3.	Synthèse du synthon <i>meso-ortho</i> -nitrophényle BODIPY	138
II.4.	Introduction des dérivés catéchols sur le synthon BODIPY	140
II.4.1.	Synthèse des deux couples d'atropoisomères.....	140
II.4.2.	Expérience pour confirmer que les deux isomères correspondent à des atropoisomères	144
II.5.	Réduction du BODIPY nitro	145
II.6.	Introduction d'un dérivé catéchol sur le BODIPY amino	146

II.7.	Synthèse des piquets dérivés de la diméthylaniline.....	147
II.7.1.	Synthèse de la diméthylaniline activée.....	147
II.7.2.	Synthèse du catéchol fonctionnalisé par la 4-diméthylaminoaniline.....	148
II.8.	Introduction des piquets.....	149
II.8.1.	Couplage entre le BODIPY amino et le chlorure d'acide.....	149
II.8.2.	Introduction du dérivé catéchol sur le bore.....	149
II.9.	Étude préliminaire d'évaluation de l'agrégation.....	151
<i>III.</i>	<i>Conclusion et perspectives.....</i>	<i>152</i>
III.1.	Séparation et identification des atropoisomères.....	152
III.2.	Hydrosolubilisation et études de spectrofluorimétrie.....	154
III.3.	Bloquer la rotation : stratégie des méthyles α , β' -pyrroliques.....	154
III.4.	Stratégie des phénols versus stratégie des catéchols.....	155
III.5.	Autres superstructures et complexation avec des métaux (perspectives).....	155
PARTIE EXPERIMENTALE	161
BIBLIOGRAPHIE	201
COMMUNICATION DES RESULTATS	209

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé à l'Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne (ICMUB) dans les équipes de recherche Organométallique et Catalyse pour une Chimie Bio- et éco-Compatible (OMBC³) et de Polyamines, Porphyrines, Développements et Applications (P2DA), Unité Mixte de Recherche 6302 entre l'Université de Bourgogne Franche-Comté et le Centre National de la Recherche Scientifique. J'ai également eu la chance de passer 4 mois au sein du laboratoire d'Immunologie et d'Immunothérapie des Cancers de l'EPHE.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde reconnaissance à Madame Clotilde POLICAR, Professeur à l'École Normale Supérieure et à Monsieur Philippe MAILLARD, Directeur de Recherche CNRS à l'Institut Curie, d'avoir accepté d'évaluer ces travaux de thèse. Je remercie également très sincèrement Madame Muriel HISSLER, Professeur de l'Université de Rennes, Monsieur Anthony ROMIEU, Professeur de l'Université de Bourgogne Franche-Comté et Monsieur Arnaud TESSIER, Chargé de Recherche CNRS à l'Université de Nantes d'avoir accepté d'examiner ce travail. Je remercie l'ensemble du jury pour la discussion lors de ma soutenance de thèse.

Je remercie Fluoptics®, et plus particulièrement Pierre-Alix DANCER, d'avoir accepté de parrainé cette thèse.

Je remercie Professeur Franck DENAT de m'avoir donné l'opportunité de travailler au sein de l'ICMUB et de son équipe. Je remercie également Professeur Pierre LE GENDRE de m'avoir accueilli au sein de son groupe et pour nos discussions scientifiques.

J'exprime ma profonde gratitude à Richard DECRÉAU d'avoir pris la direction de ma thèse pendant ces trois années. Je le remercie de m'avoir guidé dans mes recherches, pour son enthousiasme et son soutien tout au long de ma thèse. Ce fut un plaisir pour moi de travailler avec toi Richard.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Christine GOZE d'avoir co-encadré ces travaux de thèse. Merci à toi Christine pour ton aide précieuse en photophysique et pour tes encouragements continus.

Je remercie très chaleureusement Ewen BODIO d'avoir co-encadré mes travaux de thèse. Ewen merci pour ton accueil, ta disponibilité à tout moment, tes conseils, ton soutien...Ce fut pour moi un vrai plaisir de travailler avec toi. J'espère que j'ai été à la hauteur en tant que ton premier doctorant officiel.

Je souhaiterais également remercier vivement Catherine PAUL, d'une part pour son accueil chaleureux qu'elle m'a réservé au sein de son laboratoire durant 4 mois, et d'autre part pour sa disponibilité au cours de mon séjour. Je remercie également tous les collaborateurs du laboratoire pour leur accueil et tout particulièrement Cindy qui m'a formé aux différentes expériences de biologie. Un grand merci à vous 2, j'ai passé un excellent séjour en votre compagnie.

Je tiens à remercier vivement Marie-José PENOUILH, Fanny PICQUET et Myriam HEYDEL pour les analyses concernant la RMN, la spectrométrie de masse et l'ICP ainsi que pour leur aide et leurs conseils.

Au cours de cette trois années passées à l'ICMUB, j'ai eu l'opportunité de faire partie du bureau du club des jeunes de la SCF Bourgogne Franche-Comté à ce titre je remercie vivement les collègues doctorants que j'ai pu côtoyés et qui se sont impliqués dans le club.

J'ai eu la chance de travailler au sein de deux équipes. Cela m'a permis de côtoyer de nombreuses personnes qui m'ont apporté de nombreux conseils et qui a amené de nombreuses discussions. Je vous remercie pour votre accueil et vos conseils.

Je tiens à remercier vivement mes collègues de l'ICMUB avec qui il a été très agréable de travailler au cours de ces trois années et avec qui j'ai passé de bons moments. Un merci tout particulier à Semra qui m'a formé sur la chimie des BODIPYs. Un grand merci à Florian avec qui j'ai partagé bien plus qu'un laboratoire durant ces années. Merci Johnny !

Mes derniers remerciements vont bien sûr à mes parents, mes frères et sœur de m'avoir toujours soutenu et encouragé dans mes choix.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACN	Acétonitrile
ADN	Acide désoxyribonucléique
AEEAc	Acide 2-(2-(2-aminoéthoxy)éthoxy) acétique
Ala	Alanine
Arg	Arginine
Asn	Asparagine
B	Brillance
BBN-SH	Dérivé de bombésine
BLI	Imagerie optique par bioluminescence
Boc	<i>tert</i> -butyloxycarbonyle
BODIPY	4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene
BRS-3	Sous-type de récepteur à la bombésine
CCD	Charged coupled device
CCM	Chromatographie sur couche mince
Chloranil	Tétrachloro-1,4-benzoquinone
CI	Conversion interne
CIS	Croisement intersystème
COSY	Correlation spectroscopy
CT	Computed tomography
CuAAC	Copper-catalysed azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition
Cys	Cystéine
DAPI	2-(4-amidinophenyl)-1H -indole-6-carboxamide
DCC	N,N'-dicyclohexylcarbodiimide

DCM	Dichlorométhane
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DIEA	N,N-diisopropyléthylamine
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMF	N,N-diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DODT	2,2'-(éthylènedioxy)diéthanethiol
DOT	Tomographie optique diffuse
DOTA	1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid
DRX	Diffraction des rayons X
EtOAc	Acétate d'éthyle
EtOH	Éthanol
ESI	Electrospray ionization
ϵ	Coefficient d'absorption molaire
FA	Formic acid
FA-SH	Dérivé de l'acide folique
FBS	Fetal bovine serum
FDA	Food and drug administration
FDG	2-[¹⁸ F]fluoro-2-deoxy-glucose
FI	Imagerie optique par fluorescence
FIR	Infrarouge lointain
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
Fmoc	9-fluorénylméthoxycarbonyle
FMT	Fluorescence moléculaire
FR	Récepteurs à l'acide folique
FRI	Fluorescence par réflexion

FTIR	Fourier transformer infrared
Φ_F	Rendement quantique de fluorescence
Gln	Glutamine
Glu	Acide Glutamique
Glut	Transporteurs au glucose
Gly	Glycine
GRP	Gastrin releasing peptide
GRPR	Sous-type de récepteur à la bombésine
His	Histidine
HR-MS	High resolution-mass spectrometry
HuMEC	Medium for the culture of human mammary epithelial cells
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration
ICG	Indocyanine green
ICP-MS	Inductively coupled plasma-mass spectrometry
IRM	Imagerie par résonance magnétique
kCal	Kilocalorie
keV	Kiloélectronvolt
K _i	Constante d'inhibition
Leu	Leucine
λ_{abs}	Longueur d'onde d'absorption
λ_{em}	Longueur d'onde d'émission
λ_{exc}	Longueur d'onde d'excitation
MAP	Mitogen activated protein
MeOH	Méthanol
Met	Méthionine
min	Minute

MMTr	Monométhoxytrityle
MS	Mass spectrometry
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
NIR	Near infrared
NMBR	Sous-type de récepteur à la bombésine
NMR	Nuclear magnetic resonance
NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy
PAI	Imagerie photoacoustique
PBS	Phosphate buffered saline
PDT	Thérapie photodynamique
PEG	Polyéthylène glycol
pH	Potentiel hydrogène
PyBrOP	Hexafluorophosphate de bromo-tris-pyrrolidino phosphonium
R _f	Rapport frontal déterminé par CCM
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RP-HPLC	Reverse phase-high performance liquid chromatography
R _t	Temps de rétention déterminé par RP-HPLC
rt	Room temperature
SPAAC	Strain promoted azide-alkyne cycloaddition
t.a.	Température ambiante
TDM	Tomodensitométrie
TEA	Triéthylamine
TEP	Tomographie par émission de positron
TEMP	Tomographie d'émission monophotonique

TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TIS	Triisopropylsilane
TLC	Thin layer chromatography
TMS	Tétraméthylsilane
Tr	Trityl
Trp	Tryptophane
Tyr	Tyrosine
u.a.	Unité arbitraire
US	Ultrasons
UV	Ultraviolet
Val	Valine

PRÉSENTATION GÉNÉRALE

Avant de commencer la description des travaux de mon doctorat, il paraît opportun de décrire le contexte du projet qui m'a été confié. Cette thèse a été financée par le Conseil Régional de Bourgogne au travers du dispositif Jeunes Chercheurs Entrepreneurs (JCE). Ce type de financement a pour vocation de former de futurs entrepreneurs. En effet, ce dispositif permet au doctorant bénéficiaire de suivre le master administration des entreprises ainsi qu'une formation à l'incubateur régional technologique PREMICE. Le projet de thèse doit donc posséder une certaine dimension industrielle cautionnée par une entreprise « marraine ». Dans mon cas, l'entreprise partenaire est Fluoptics®. Cette PME créée en 2010 émane du CEA Grenoble. Elle est spécialisée dans le domaine de l'imagerie optique. Plus précisément, Fluoptics® développe des dispositifs médicaux d'imagerie proche infrarouge destiné à aider le chirurgien pendant son acte médical. Cette imagerie en temps réel permet notamment, grâce à un marqueur d'imagerie moléculaire fluorescent ciblant la néo-angiogenèse tumorale, de déterminer les marges de tissu à prélever pour limiter les rechutes.

L'intérêt de Fluoptics® pour notre sujet se porte sur notre objectif de créer une plateforme de type théranostique qui pourrait être vendue sous forme de kit avec leur dispositif d'imagerie. Plus concrètement, ils trouvent intéressant de disposer d'une stratégie donnant un accès rapide à un agent thérapeutique traçable adaptable au besoin d'un client : choix de la sonde fluorescente, variation de l'agent thérapeutique et possibilité de greffage à la demande de vecteur biologique.

Ce projet de thèse pluridisciplinaire repose sur de solides résultats préliminaires obtenus en partie grâce aux travaux du Docteur Semra Tasan. Il fait de plus appel aux savoir-faire de deux groupes de l'Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne (ICMUB). D'un côté, l'équipe OMBC³ (OrganoMétallique et Catalyse pour une Chimie Bio- et éco-Compatible), spécialisée dans la synthèse de complexes métalliques appliqués à la catalyse et à la médecine (notamment dans le domaine de la théranostique (Ewen Bodio)) et l'équipe P2DA (Polyamines, Porphyrines, Développement et Applications), experte dans la synthèse de sondes pour l'imagerie médicale mono et multimodale (en particulier la synthèse de BODIPYs (Christine Goze) et de systèmes

(porphyrines) superstructurés (Richard Decréau) en imagerie optique). Par ailleurs, j'ai bénéficié d'une collaboration forte avec le laboratoire d'Immunologie et d'Immunothérapie des Cancers de l'EPHE (Catherine Paul) localisé également sur le campus dijonnais. Cette collaboration m'a permis d'être formé et de réaliser l'évaluation biologique de mes composés.

Le principal but de cette thèse a ainsi consisté en l'optimisation d'un théranostique précédemment synthétisé, d'une part de la partie thérapeutique (synthèse / sélectivité) et d'une autre part de la sonde (propriétés photophysiques / solubilité).

Ce manuscrit est composé de trois parties. Après une brève introduction sur le cancer, la première partie présente un aperçu des différents métaux utilisés en chimiothérapie anticancéreuse, des différentes modalités d'imagerie, introduit le domaine de la théranostique et en particuliers celui des théranostiques optiques. Cette première partie se termine par une présentation des résultats préliminaires obtenus.

La deuxième partie traite de l'optimisation du théranostique à base d'or (I) et plus particulièrement de la partie thérapeutique. Elle est composée de deux chapitres. Dans le premier chapitre, la synthèse de nouveaux agents théranostiques composés d'un BODIPY en tant que traceur optique, d'un complexe d'or exerçant l'activité thérapeutique et de différents vecteurs est présentée. Le deuxième chapitre est consacré à l'évaluation photophysique et biologique *in vitro* de ses nouveaux agents thérapeutiques traçables.

La troisième et dernière partie est axée, plus particulièrement, sur l'optimisation de la sonde BODIPY en vue d'une imagerie *in vivo* et est également divisée en deux chapitres. Le premier chapitre présente la synthèse et l'évaluation photophysique et biologique de deux nouveaux théranostiques avec un BODIPY ayant des propriétés photophysiques permettant une imagerie *in vivo*. Le deuxième chapitre, plus exploratoire, présente la synthèse de nouveaux BODIPYs superstructurés afin de limiter le phénomène d'agrégation rencontré fréquemment chez les fluorophores organiques.

PARTIE 1 :
INTRODUCTION

I. Généralités sur le cancer

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, un cancer est un groupe de maladies pouvant toucher une partie quelconque de l'organisme. Les termes de tumeur maligne et de néoplasme sont également employés pour décrire ce groupe de maladies. La principale caractéristique du cancer est une prolifération rapide et anarchique de cellules anormales qui peuvent alors envahir des parties adjacentes de l'organisme puis se propager à d'autres organes formant ainsi des métastases. Le développement de la tumeur et des métastases vont provoquer des dysfonctionnements de l'organisme qui sont à l'origine du décès du patient.¹

I.1. Situation actuelle

Les cancers figurent parmi les principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde. En 2012, on comptait environ 14 millions de nouveaux cas et 8,2 millions de décès liés à cette maladie par rapport à 12,7 millions et 7,6 millions en 2008 respectivement.¹ Plus de la moitié de tous les cancers (56,8%) et des décès par cancer (64,9%) en 2012 ont été enregistrés dans les régions les moins développées du monde et ces proportions augmenteront encore d'ici à 2025.

En 2012, les cancers les plus fréquemment diagnostiqués dans le monde étaient ceux du poumon (13%), du sein (11,9%) et colorectal (9,7%). Les causes les plus fréquentes de décès par cancer étaient les cancers du poumon (19,4%), du foie (9,1%) et de l'estomac (8,8%).

Les principaux facteurs de risque du cancer sont comportementaux et environnementaux ; en effet moins de 10% des cancers seraient de nature héréditaire alors que 40% résulteraient de l'exposition à des facteurs de risque liés à nos modes de vie et à nos comportements. Ainsi le tabagisme, l'alcool, une mauvaise alimentation, les facteurs environnementaux, la sédentarité sont les principaux facteurs de risque. Certaines infections chroniques sont également des facteurs de risque en particulier dans les régions les moins développées. Le vieillissement est un autre facteur fondamental dans l'apparition des cancers. Il faut cependant mettre un bémol à ce discours alarmiste, en effet, une majorité des nouveaux cas de cancer est due à l'augmentation de la population, son vieillissement ainsi qu'à la fréquence et la performance du dépistage. Grâce aux progrès

des traitements et du dépistage précoce, les chances de voir un patient atteint d'un cancer entrer en rémission ont nettement progressées.

I.2. Biologie du cancer

I.2.1. Généralités sur la cancérogénèse

Le cancer apparaît à partir de la transformation d'une cellule normale en cellule tumorale. Le développement d'une tumeur maligne à partir d'une cellule normale s'étale sur de nombreuses années et différentes étapes ont été identifiées dans le développement d'un cancer : l'initiation, la promotion et la progression (Figure 1). Dans un premier temps, la cellule se transforme suite à une modification majeure de son matériel génétique. Dans un deuxième temps, la cellule mutée se développe et prolifère formant une lésion précancéreuse. Enfin, dans un troisième temps, la cellule acquiert les caractéristiques d'une cellule tumorale à savoir une prolifération anarchique, perd son caractère différencié et devient immortelle aboutissant à une tumeur qui peut ensuite s'étendre à d'autres organes formant alors des métastases.

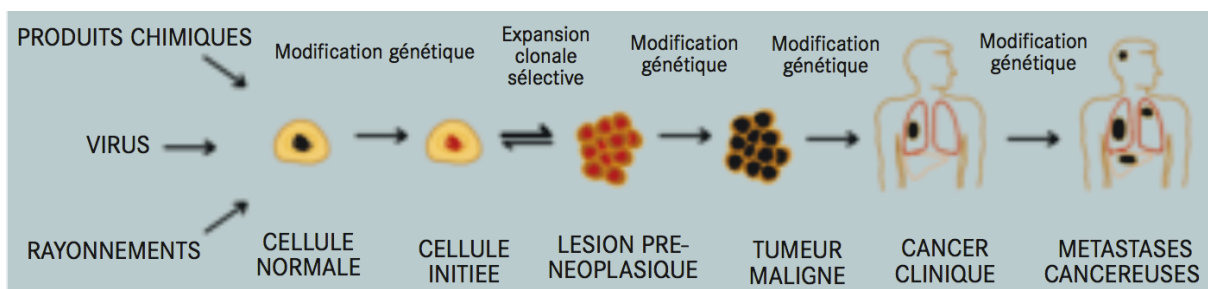


Figure 1 : Les différentes étapes de la cancérogénèse extrait du rapport « Le cancer dans le monde ».1

I.2.2. Généralités sur les cellules tumorales

Une cellule tumorale est issue de la transformation d'une cellule normale ayant subi une lésion de son ADN. À la suite de cette transformation, la cellule tumorale possède les caractéristiques suivantes :

- capacité à se diviser indéfiniment
- capacité à échapper au processus de mort cellulaire programmée : l'apoptose
- échappement aux signaux qui la régulent.

Suite à l'acquisition de ces caractéristiques, les cellules tumorales développent un nouveau réseau sanguin qui alimentera la tumeur en oxygène et en nutriments, phénomène appelé angiogenèse. En effet de par son métabolisme accru, cette

vascularisation est essentielle pour la survie et la croissance de la tumeur et possède des propriétés qui lui sont propres. De plus, la cellule tumorale présente à sa surface un grand nombre de récepteurs qui vont être capables de capter les nutriments nécessaires à sa croissance. Ainsi, pour le chercheur développant un nouvel agent spécifique de la cellule tumorale vis à vis de la cellule saine ce sont autant de cibles potentielles.

I.3. Diagnostic et traitement des cancers

I.3.1. Diagnostic des cancers

Il existe de nombreux moyens de diagnostic des cancers qui peuvent être invasifs ou non. Le premier, incontournable, consiste en un examen clinique approfondi. Le patient peut également subir un examen anatomopathologique qui consiste à un prélèvement de tissu suspect par frottis, biopsie ou ponction. Un dosage de marqueurs tumoraux présents dans le sang peut être effectué après prélèvement sanguin. Une fibroscopie peut également être réalisée en particulier dans le cadre de tumeurs respiratoires, du tube digestif et de l'utérus. Les techniques d'imagerie, scintigraphies (TEP (Tomographie par Émission de Positron) et TEMP (Tomographie d'Émission MonoPhotonique)), radiographies (scanner et mammographies), IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) et échographie, sont également couramment utilisées pour le diagnostic.

Le praticien a donc à sa disposition tout un arsenal de techniques qui vont lui permettre de poser un diagnostic sur le type et le stade de cancer.

I.3.2. Traitement des cancers

Une fois le diagnostic de cancer posé, l'état du patient peut nécessiter un traitement médical et des soins spécialisés pendant des mois voire des années. On distingue les traitements curatifs permettant une guérison complète, des traitements palliatifs qui vont ralentir ou stopper l'évolution du cancer. De plus, le traitement du cancer est adapté en fonction de chaque patient. Les principales modalités de traitement sont la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie et peuvent être utilisées seules ou en association.

La chirurgie consiste en l'ablation d'une tumeur localisée ainsi que d'une marge de tissu sain autour de la tumeur (marge de résection) et éventuellement des ganglions voisins afin de ne laisser localement aucune cellule tumorale qui pourrait entraîner une rechute. Grâce à l'imagerie, des progrès considérables ont été réalisés notamment dans la

détermination de la zone tumorale à enlever. Elle est souvent associée à une chimiothérapie ou une radiothérapie afin d'éliminer les éventuelles cellules tumorales résiduelles.

La radiothérapie est basée sur l'action des rayonnements ionisants (X , α , β^- ou γ) et permet de détruire localement les cellules tumorales. Elle vient souvent en complément d'une chirurgie en pré-, post- ou per-opératoire. La radiothérapie présente des effets secondaires au niveau des tissus sains de par l'utilisation de rayonnements ionisants.

La chimiothérapie anticancéreuse contrairement à la chirurgie et la radiothérapie qui sont des traitements essentiellement locorégionaux est un traitement qui peut être systémique. L'intérêt est que ce type de traitement permet de s'attaquer aux cellules tumorales disséminées dans tout l'organisme. Au sein de la chimiothérapie anti-tumorale, il existe plus d'une cinquantaine de médicaments qui diffèrent de par leur mode de fonctionnement, leurs indications et leurs effets secondaires. Dans la majorité des cas, le traitement consiste à administrer un cocktail de plusieurs médicaments on parle alors de polychimiothérapie. La chimiothérapie peut être utilisée seule ou en association avec d'autres traitements.

En parallèle de ces trois grandes classes de traitement, il existe différentes autres stratégies comme par exemple l'hormonothérapie utilisée dans le traitement de cancers hormonodépendants (cancer du sein et de la prostate essentiellement) ou encore l'immunothérapie qui va stimuler le système immunitaire contre les cellules cancéreuses. Cette dernière technique connaît actuellement un très fort intérêt de la part des chercheurs.

Le principal défi aujourd'hui est d'élaborer des traitements spécifiques de la tumeur afin de maximiser leur efficacité et de limiter au maximum leurs effets secondaires.

II. Les métaux en chimiothérapie anticancéreuse

Actuellement, les métaux sont très utilisés en médecine et notamment en oncologie aussi bien à des fins thérapeutiques que diagnostiques. Dans le domaine thérapeutique, c'est la découverte de l'activité anti-tumorale du cisplatine en 1969 par Rosenberg² qui a fait exploser le développement de composés à base de métaux. Un bref aperçu des résultats va être présenté dans ce manuscrit.

II.1. Le cisplatine et ses dérivés

Le *cis*-diaminedichloroplatine (II), cisplatine, est un complexe plan carré de platine (II) comprenant deux ligands X et deux ligands L (Figure 3) et a été un des premiers composés métalliques thérapeutiques à être approuvé par la FDA en 1978 pour le traitement du cancer. Le mécanisme communément admis est le suivant : dans la cellule, la première étape est une aquation du complexe, *i.e.* échange d'un ligand chlorure par une molécule d'eau. Puis l'espèce active du cisplatine $[Pt(NH_3)_2]^{2+}$ va se fixer de manière covalente notamment à l'acide désoxyribonucléique *via* la position N⁷ des bases puriques. Les adduits peuvent se former soit entre deux purines adjacentes ou séparées par une autre base d'un même brin d'ADN soit par pontage entre deux purines des deux brins opposés (Figure 2).

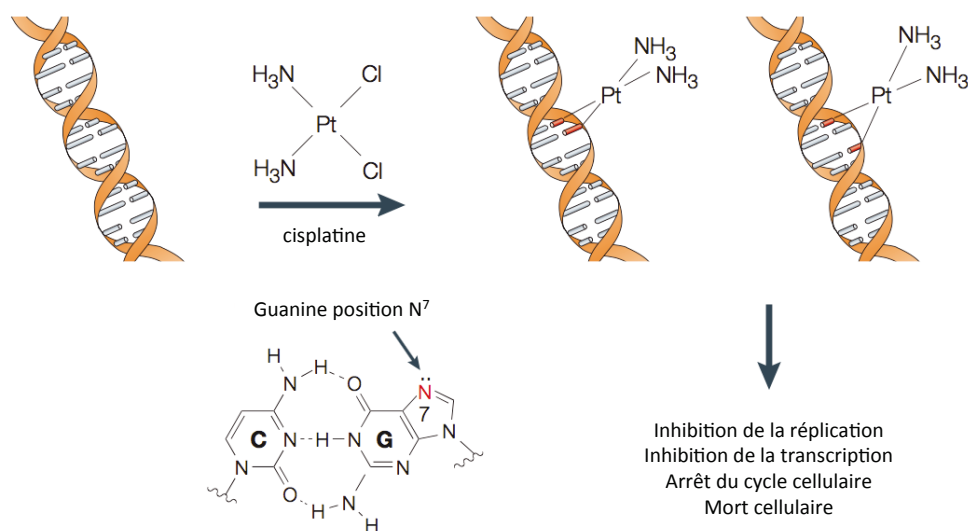
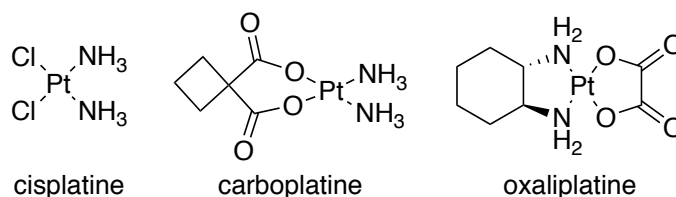


Figure 2 : Mécanisme d'interaction du cisplatine avec l'ADN adapté de Lippard et coll.³

Ces adduits entraînent un arrêt du cycle cellulaire et une inhibition de la transcription conduisant à l'apoptose de la cellule.³⁻⁵ Le cisplatine de par sa forte toxicité et son manque de sélectivité présente de nombreux effets secondaires. Ainsi des dérivés de

seconde génération, commercialisés (carboplatine et oxaliplatine) ou en essais cliniques (nedaplatine, satraplatine...) ont été développés afin de diminuer la toxicité (Figure 3). De plus, des formulations liposomales de cisplatine et d'oxaliplatine sont actuellement en phase de développement. De nos jours, le cisplatine et ses dérivés (carboplatine et oxaliplatine) sont encore utilisés dans plus de 50% des cocktails chimiothérapeutiques antitumoraux.⁶

Commercialisés



En essais cliniques

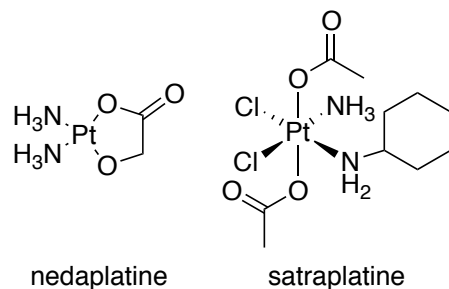


Figure 3 : Structures des complexes de platine sur le marché et en essais cliniques.

II.2. Les dérivés du ruthénium

En parallèle des dérivés du platine, les dérivés organométalliques à base de ruthénium ont montré des résultats prometteurs dans le traitement des cancers.⁷ Ces composés possèdent des degrés d'oxydation variés (Ru(II), Ru(III) et Ru(IV)) et sont sujets à l'échange de ligand avec des molécules oxygénées et azotées.

Deux principales raisons permettent d'expliquer la tolérance *in vivo* des complexes de ruthénium. La première, proposée par Clarke, est l'activation par réduction. À savoir que la majorité de ces composés se trouvent initialement à l'état d'oxydation +III et sont considérés inactifs biologiquement. *In vivo*, le ruthénium (III) est réduit en ruthénium (II) qui est l'espèce active. Cette réduction a lieu préférentiellement dans les tumeurs hypoxiques, tumeurs ayant un environnement réducteur de par leur surproduction d'énergie par glycolyse.^{8,9} La deuxième raison est que le ruthénium appartenant à la même colonne des métaux de transition que le fer peut miner ce dernier dans les interactions

avec les protéines telles que l'albumine et la transferrine, facilitant ainsi son transport à travers l'organisme.⁷

Parmi les nombreux dérivés de ruthénium, seuls les complexes de ruthénium (III) ont atteint le stade des essais cliniques. Le NAMI-A, développé par Sava *et al.* a été le premier composé à base de ruthénium à entrer en phase clinique en 1999¹⁰ suivi des composés KP1019 et NKP1339¹¹, développés par Keppler *et coll.* (Figure 4).

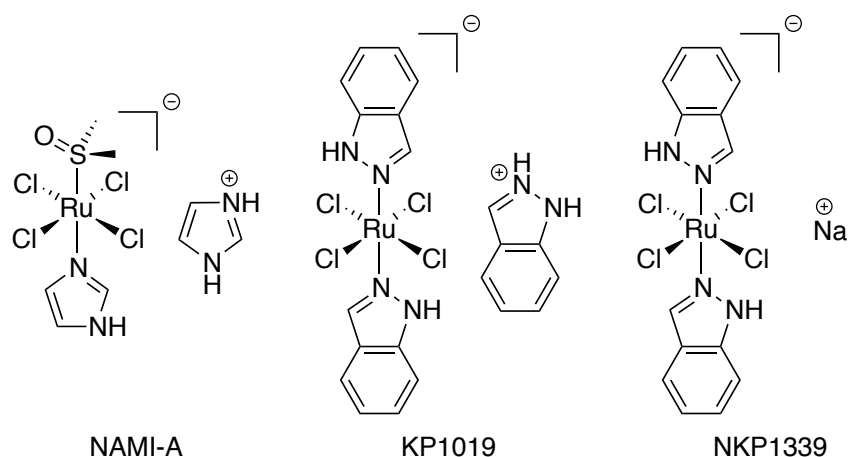


Figure 4 : Structures des complexes de ruthénium (III) entrés en essais cliniques.

Malgré leur forte similarité, les deux complexes NAMI-A et KP1019 se comportent différemment *in vitro* et *in vivo*. Le NAMI-A ne présente pas de cytotoxicité *in vitro* mais *in vivo* une inhibition du développement et de la prolifération des métastases est observée. À l'inverse, KP1019 possède une bonne activité antiproliférative des lignées cellulaires du cancer colorectal et du colon *in vitro*. *In vivo*, KP1019 présente une activité sur les tumeurs primaires uniquement.¹² Ces différences d'activité biologique peuvent s'expliquer entre autre par la cinétique très différente du processus d'aquation et de réduction en ruthénium (II). Au niveau du mécanisme d'action, il a été montré que leur activité biologique *in vivo* n'était pas due à des interactions avec l'ADN mais avec des protéines. Plus précisément, l'activité anti-métastatique du NAMI-A serait due à son interaction avec le collagène de la matrice extracellulaire ainsi qu'avec des cathepsines.¹³ En ce qui concerne KP1019, ses cibles protéiques seraient entre autre l'albumine et la transferrine ; de plus ce composé induirait l'apoptose *via* un processus mitochondrial par activation de la caspase 3.¹¹

En parallèle des complexes de ruthénium (III) en essais cliniques, de nombreux composés à base de ruthénium ont été développés pour leur activité biologique. Notamment, des complexes arène-ruthénium (II) développés par les groupes de Sadler,

$[(\eta^6\text{-arène})\text{Ru}(\text{N,N})\text{Cl}]^+$,¹⁴ et Dyson, RAPTA,¹⁵ ont montré des résultats intéressants *in vitro* et / ou *in vivo* et là encore avec des mécanismes d'action différents (Figure 5).

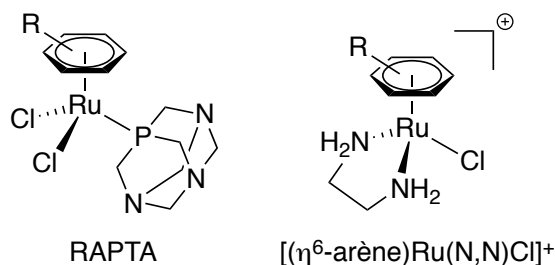


Figure 5 : Complexes arène ruthénium (II) développés par les groupes de Dyson et Sadler.

II.3. Les dérivés de l'or

L'utilisation de l'or en médecine est décrite dans l'histoire de toutes les cultures et de nombreuses découvertes archéologiques indiquent qu'elle remonte tôt dans la préhistoire.¹⁶ En médecine moderne, les composés à base d'or ont été utilisés dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde dès les années 30. Cependant, le rapport bénéfices/risques de ces « sels d'or » dans le traitement de cette inflammation s'est avéré limité et certains pays comme la France ont même retiré l'agrément à certains médicaments (cas de l'auranofine ou ridaura®).

Récemment, la politique du NIH (« National Institute of Health ») d'évaluer le potentiel d'anciennes molécules approuvées par la FDA (« US Food and Drug Administration ») pour le traitement de nouvelles maladies a donné une seconde vie à certains complexes d'or. En effet, l'auranofine est actuellement entré en essais cliniques pour le traitement de certaines leucémies. Cela combiné aux récents développements dans la chimie de l'or (I) et de l'or (III), fait de ce métal un des plus prometteurs dans le cadre du développement de nouveaux agents métalliques chimiothérapeutiques. Ils possèdent une bonne activité antiproliférative ainsi qu'un mécanisme d'action différent des dérivés de platine. En effet, la cible moléculaire de ces composés ne paraît plus être l'ADN mais se localiserait principalement dans les mitochondries. Le mécanisme exact n'est pas encore bien établi mais il est admis que la forte thiophilie de l'or lui permettrait d'interagir fortement avec des protéines contenant du soufre ou du sélénium. Ainsi l'inhibition de la thiorédoxine réductase, une séléno-enzyme, paraît être un mécanisme expliquant la cytotoxicité des complexes d'or. La thiorédoxine réductase est une enzyme contrôlant l'état redox de la thiorédoxine, son inhibition entraîne un stress oxydant conduisant à la mort cellulaire.¹⁷ En parallèle de la thiorédoxine réductase d'autres cibles protéiques ont été

mises en évidence dépendant du composé étudié (protéases à cystéine : cathepsines entre autres).¹⁸

Il existe de nombreux complexes d'or qui diffèrent de par la nature des ligands, principalement des dérivés phosphines et azotés, l'état d'oxydation du centre métallique (+I ou +III), la géométrie et la charge (neutre ou cationique). Ainsi un certain nombre de complexes d'or (III) ont été développés et ont montré des résultats prometteurs (Figure 6).¹⁹⁻²¹

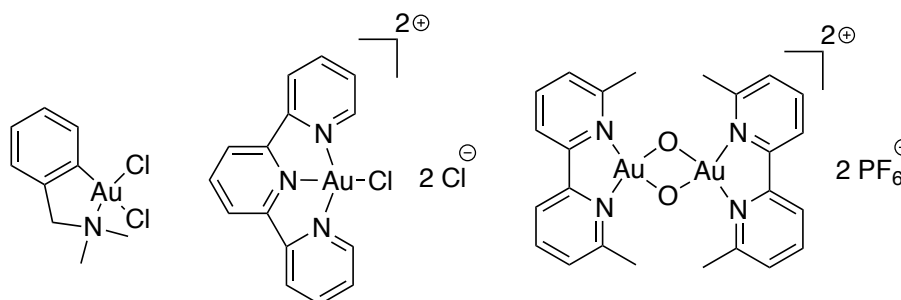


Figure 6 : Structure de complexes d'or (III) neutre et cationiques.

Les dérivés d'or (I) sont principalement de la forme L-Au-X, avec un ligand neutre L (exemple : phosphine, carbène *N*-hétérocyclique, hétérocycle azoté) et un ligand anionique X (exemple : halogénure, thiolate). L'auranofine est le chef de file des composés d'or (I) et a reçu son autorisation de mise sur le marché en 1985 pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde (Figure 7). Il est constitué d'un ligand triéthylphosphine et d'un ligand tétraacétylthiogluucose. Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré qu'il possède une activité anti-tumorale intéressante.²²⁻²⁴ D'après ses résultats prometteurs, de nombreux composés d'or (I) comportant un ligand phosphine ou carbène *N*-hétérocyclique ont été développés.^{18,25,26}

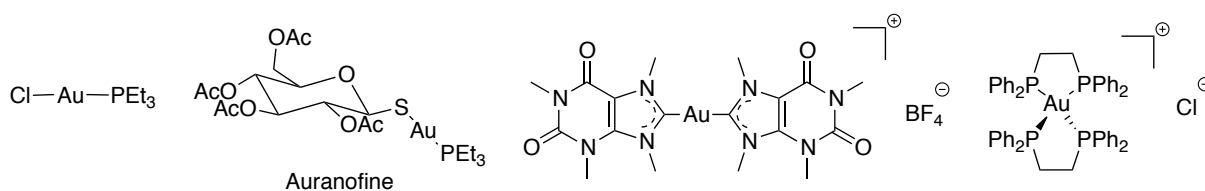


Figure 7 : Structure de dérivés d'or (I) linéaires et tétraédrique, neutres et cationiques.

II.4. Agents chimiothérapeutiques utilisant d'autres métaux

En parallèle des dérivés métalliques développés ci-dessus, d'autres métaux et métalloïdes ont été étudiés dans le cadre d'une chimiothérapie anticancéreuse. Le dichlorure de titanocène est un des premiers complexes à être entré en phase clinique pour le traitement du cancer.^{7,27} Nous pouvons également citer l'arsenic avec le trioxyde d'arsenic (nom commercial, Trisenox[®]) utilisé dans le traitement de la leucémie promyélocytaire aiguë en cas de rechute, la darinaparsine dérivé arsénié approuvé aux États-Unis dans le traitement du lymphome T périphérique.²⁸ Les complexes de gallium présentent également des résultats prometteurs,²⁹ ainsi IT-235 (anciennement KP46), un complexe de gallium (III), devrait prochainement entrer en essais cliniques (Figure 8).³⁰

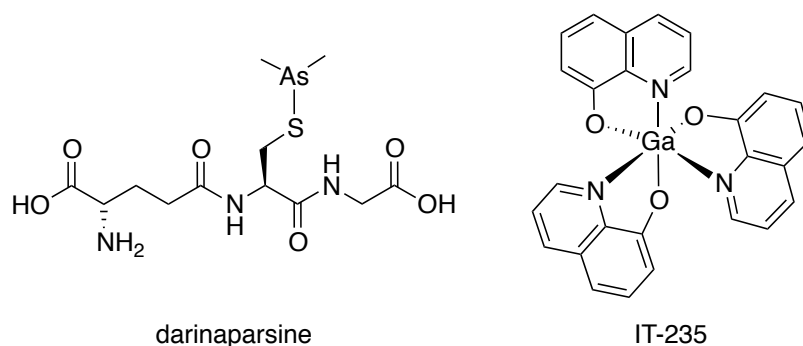


Figure 8 : Autres dérivés métalliques utilisés en chimiothérapie anticancéreuse ou en développement.

En parallèle du développement des composés métalliques en tant qu'agents chimiothérapeutiques, les métaux sont très utilisés en médecine pour l'imagerie, tomographie d'émission de positrons ou tomographie d'émission monophotonique, et la radiothérapie. Ces composés sont regroupés sous le terme de radiopharmaceutiques. A ce titre, nous pouvons citer le cuivre-64 et -67, le gallium-67, l'indium-111... Une revue récente recense les principaux radiométaux utilisés pour l'imagerie et la thérapie.³¹

III. L'imagerie médicale

L'imagerie médicale permet d'apporter des informations précises sur les organismes vivants de manière non invasive. Elle a connue son essor au cours du 20^{ème} siècle grâce aux progrès de la physique, de l'informatique, de la chimie et de la médecine. L'imagerie médicale apporte des informations d'ordre structurel (anatomie des organes), on parle alors d'imagerie anatomique, et fonctionnel (physiologie et métabolisme des organes). L'imagerie médicale est ainsi devenue un outil quotidien du praticien dans l'aide au diagnostic de nombreuses maladies (cancers, maladie d'Alzheimer, sclérose en plaques...) mais également dans le suivi thérapeutique. De plus, elle est devenue essentielle en recherche clinique pour l'étude des maladies et en innovation thérapeutique. Au sein de l'imagerie médicale, l'imagerie moléculaire permet de visualiser plus particulièrement des phénomènes physiologiques et / ou pathologiques à l'échelle sub-cellulaire voire moléculaire. L'imagerie moléculaire présente ainsi un énorme potentiel concernant le diagnostic, la découverte de nouveaux agents thérapeutiques en oncologie, ou encore le suivi de nouveaux traitements.

De nombreuses techniques d'imagerie existent aujourd'hui et peuvent être classées en fonction de l'énergie des ondes électromagnétiques (rayonnements gamma, rayons X, rayonnements UV-visible, ondes radio) ou mécaniques (ultrasons) utilisées, la résolution spatiale atteinte (macroscopique, mésoscopique ou microscopique) ou le type d'informations obtenues (anatomiques, physiologiques, cellulaires ou moléculaires).³² Ainsi nous pouvons citer, la tomodensitométrie (CT) et radiographie, l'imagerie par résonance magnétique (IRM), les imageries radioisotopiques (TEP et TEMP), l'échographie et les imageries optiques (fluorescence, bioluminescence). Chacune de ces techniques présente des avantages et des inconvénients et elles sont utilisées pour l'imagerie préclinique et / ou clinique (Tableau 1). Récemment, afin de combiner leurs avantages, le développement de la multimodalité qui consiste en l'association de différentes techniques d'imagerie, est apparu.^{33,34} A titre d'exemple nous pouvons citer le couplage de la tomodensitométrie à la tomographie par émission de positrons (TEP-CT).

Le principe de ces différentes techniques d'imagerie va être décrit avec une attention plus particulière pour l'imagerie optique.

Technique	Résolution spatiale	Profondeur	Résolution temporelle	Sensibilité (mol.L ⁻¹)	Coût	Toxicité
Tomodensitométrie (CT)	50 – 200 µm (préclinique) 0,5 – 1 mm (clinique)	sans limite	min	ND	€€	rayons ionisants
Imagerie par résonance magnétique (IRM)	25 – 100 µm (préclinique) 1 mm (clinique)	sans limite	min – h	10 ⁻³ – 10 ⁻⁵	€€€	agents de contraste
Tomographie par émission de positrons (TEP)	1 – 2 mm (préclinique) 5 – 7 mm (clinique)	sans limite	sec – min	10 ⁻¹¹ – 10 ⁻¹²	€€€	rayons ionisants
Tomographie d'émission monophotonique (TEMP)	1 – 2 mm (préclinique) 8 – 10 mm (clinique)	sans limite	min	10 ⁻¹⁰ – 10 ⁻¹¹	€€	rayons ionisants
Ultrasons (US)	10 – 100 µm (surface) 1 – 2 mm (quelques cm de profondeur)	mm – cm	sec – min	10 ⁻¹²	€	Faible
Imagerie optique par fluorescence (FI)	2 – 3 mm	< 1cm	sec – min	10 ⁻⁹ – 10 ⁻¹²	€	agents de contraste
Imagerie optique par bioluminescence (BLI)	3 – 5 mm	1 – 2 cm	sec – min	10 ⁻¹⁵ – 10 ⁻¹⁷	€	agents de contraste
Imagerie photoacoustique (PAI)	0,01 – 1 mm	0,6 – 5 cm	sec – min	ND	€	agents de contraste

Tableau 1 : Caractéristiques des principales modalités disponibles et émergentes adapté de M.L James et S.S. Gambhir.³⁵

III.1. La radiographie et la tomodensitométrie

La radiographie est la plus ancienne des techniques d'imagerie médicale et repose sur l'utilisation des rayons X. Ces rayons ont la capacité de traverser les tissus de manière plus ou moins prononcée selon leur densité. Une source émettrice de rayons X est placée devant le corps ou l'organe et un détecteur va récupérer les rayons résiduels après absorption plus ou moins importante par les tissus traversés, aboutissant à une image de contraste. L'absorption des rayons X est fonction de la densité des tissus ; ainsi les poumons paraîtront noirs et à l'inverse les os paraîtront blancs. Des agents de contraste peuvent éventuellement être utilisés tels que l'iode ou le baryum afin d'opacifier les tissus mous (appareil digestif, articulations...). La radiographie est aussi bien utilisée dans un but préventif (mammographie) que diagnostique ou encore thérapeutique.

La tomodensitométrie ou scanner (CT) repose sur le même principe à l'exception qu'elle permet d'obtenir des images en trois dimensions après reconstruction informatique d'images de la zone étudiée sous différents plans.

La tomodensitométrie et la radiographie sont des techniques d'imagerie anatomique et sont les plus utilisées en routine. La tomodensitométrie peut être couplée à une autre technique d'imagerie fonctionnelle.

III.2. L'imagerie par résonance magnétique

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) repose sur les propriétés magnétiques des atomes d'hydrogène des molécules d'eau qui composent à plus de 80% l'organisme humain. En effet, les atomes d'hydrogène possèdent un moment magnétique ou spin qui peut occuper deux états. L'appareil IRM consiste à créer un champ magnétique puissant qui va entraîner une orientation des spins des molécules d'eau suivant ce champ puis l'application d'une radiofréquence permet de modifier l'état de spin des protons qui, après extinction de cette radiofréquence, vont relaxer en restituant l'énergie absorbée. L'analyse de l'évolution de ces temps de relaxation permet de reconstituer l'image finale. Ces temps de relaxation vont dépendre de différents paramètres comme la concentration en eau des tissus et ainsi une distinction entre différents tissus même mous pourra être faite. Des agents de contraste (complexes de gadolinium, oxydes de fer) peuvent être utilisés afin d'améliorer la différence de réponse des tissus en modifiant les temps de relaxation des molécules d'eau à leur proximité.

On distingue l'IRM anatomique, permettant de détecter une tumeur par exemple, de l'IRM fonctionnelle permettant par exemple de visualiser les zones du cerveau activées suite à un stimulus.

III.3. Les imageries radioisotopiques ou scintigraphies

Les imageries radioisotopiques ou scintigraphies (TEP et TEMP) reposent sur l'utilisation d'un traceur radioactif et sur la détection de rayonnement gamma issu de la désintégration radioactive du radionucléide employé. La différence entre la tomographie d'émission de positrons (TEP) et la tomographie d'émission monophotonique (TEMP) réside dans l'utilisation de radionucléides émettant un rayonnement différent lors de leur dégradation. Nous pouvons noter également que les détecteurs (caméra TEP et γ caméras) ne sont pas exactement les mêmes.

III.3.1. L'imagerie TEP

Comme son nom l'indique, l'imagerie TEP utilise des traceurs radioactifs émetteurs d'un positron. Cette particule β^+ s'annihile avec un électron à proximité, il va en résulter une émission diamétralement opposée de deux photons γ d'énergie fixe (511 keV). L'élément radioactif peut être du fluor-18, du carbone-11, de l'oxygène-15 lié covalamment au reste de la molécule traceur ou un métal radioactif tel que le cuivre-64, le gallium-68 ou le zirconium-89 chélaté dans un complexe adapté, dans le but d'éviter le relargage du radiométal *in vivo* par des phénomènes de transmétallation ou transchélation.³⁶

La tomographie par émission de positrons est une technique d'imagerie fonctionnelle qui donne des informations sur le métabolisme. Cliniquement, l'imagerie TEP est très utilisée en cancérologie et le 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxy-glucose (FDG) est le traceur le plus utilisé. Mais la nécessité d'avoir un cyclotron à proximité ainsi que l'utilisation de rayonnements ionisant limite son utilisation.

III.3.2. L'imagerie TEMP

La tomographie d'émission monophotonique utilise des isotopes radioactifs qui, par un réarrangement énergétique d'un noyau excité vers un état d'énergie inférieure, émettent des photons γ . Ainsi, le technétium-99 métastable, élément le plus couramment utilisé, l'indium-111, l'iode-123 et le gallium-67 sont les isotopes rencontrés en imagerie TEMP.

La tomographie d'émission monophotonique est une technique d'imagerie fonctionnelle moins sensible que l'imagerie PET. Cependant, le coût inférieur et la plus simple utilisation font de la TEMP une modalité d'imagerie de choix en clinique.

III.4. L'échographie

L'échographie est une modalité d'imagerie reposant sur l'exposition de tissus à des ondes mécaniques, les ultrasons, et sur la réception de leur écho. L'échographe est constitué d'un écran et d'une sonde émettrice et réceptrice des ondes. Le courant électrique appliqué au niveau de la sonde engendre par effet piézoélectrique l'émission d'ultrasons. Le faisceau ultrasonore est plus ou moins réfléchi selon la nature des tissus qu'il traverse. Les ondes échos reviennent à la sonde qui sert alors de détecteur et produisent un courant électrique qui est ensuite traité par informatique. L'échographie

permet ainsi d'étudier de nombreux organes situés au niveau de l'abdomen, du petit bassin et du cou, les vaisseaux sanguins et le cœur et ainsi de détecter des anomalies (tumeurs, infections, malformations). L'échographie est très utilisée en obstétrique (échographies pour évaluer le développement du fœtus). En outre de par son innocuité et son faible coût, elle est également utilisée dans le diagnostic de première intention de nombreuses pathologies abdominales, urinaires et génitales, vasculaires (écho-Doppler), musculo-tendineuses et cervicales.

III.5. L'imagerie optique

L'imagerie optique repose sur le principe de la propagation de la lumière (visible ou proche du visible) dans les tissus. Ainsi la détection de photons émis suite à l'excitation d'un traceur permet après traitement informatique de reconstruire une image. Cette émission de photons lumineux fait suite à une excitation qui peut être d'origine physique (photoluminescence, thermoluminescence, électroluminescence) ou chimique (chimiluminescence, bioluminescence). De par les progrès réalisés, l'imagerie optique permet un suivi spatio-temporel en temps réel de processus biologiques de manière non invasive. De plus, l'imagerie optique permet également la détection en temps réel de biomolécules et d'ions d'intérêt.³⁷

Les différentes techniques d'imagerie optique présentent l'avantage de ne pas utiliser de rayonnements ionisants. De plus le dispositif expérimental, constitué classiquement d'une source de lumière visible (laser) et d'un détecteur photonique (caméra CCD « Charged Coupled Device »), est souvent très simple à mettre en œuvre et peu onéreux. En revanche, ces techniques présentent des inconvénients intrinsèques à l'utilisation de la lumière visible et seront développées par la suite.

Dans ce manuscrit, seules les techniques d'imagerie optique basées sur la fluorescence seront exposées. Après avoir présenté le principe, les caractéristiques et les limites de la fluorescence, les différentes modalités d'imagerie par fluorescence et les fluorophores seront présentés.

III.5.1. Principe de la fluorescence

La fluorescence est l'émission de lumière ultraviolette, visible ou infrarouge d'une molécule, un fluorophore, suite à l'excitation de celle-ci. La fluorescence au même titre que

la phosphorescence résulte de l'absorption de lumière. Ainsi l'absorption de photons par un fluorophore entraîne le passage de celui-ci dans différents états excités vibrationnels ($S_1, S_2\dots$). Il va ensuite revenir très rapidement à son état excité de plus basse énergie (S_1) puis à son état fondamental par dissipation de son énergie selon des voies diverses : par désexcitations radiatives (fluorescence ou phosphorescence) ou non radiatives (pas d'émission de lumière).³⁸ Le diagramme de Jablonski permet de visualiser les différents processus mis en jeu (Figure 9).^{39,40}

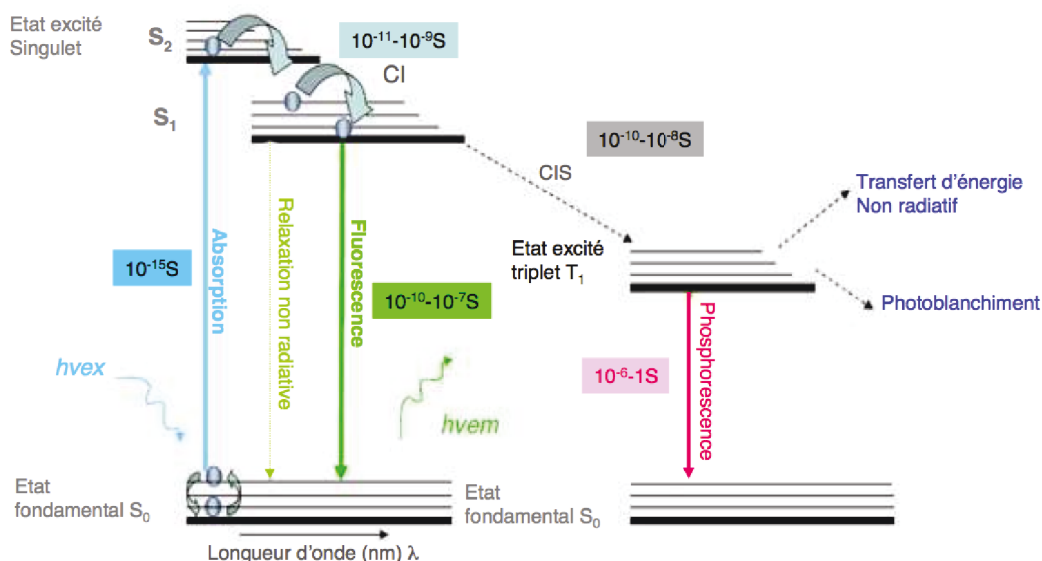


Figure 9 : Diagramme de Perrin-Jablonski simplifié.

L'absorption d'un photon de longueur d'onde λ_1 et d'énergie E_1 entraîne le passage de l'état fondamental S_0 à plusieurs états excités singulets proches ($S_1, S_2\dots$) du chromophore. L'absorption de la lumière par un chromophore est un phénomène très rapide qui se traduit en solution par une décroissance exponentielle du faisceau incident, suivant la loi de Beer-Lambert (Équation 1). Dans cette équation, $A(\lambda)$ est l'absorbance à la longueur d'onde λ , I_0 l'intensité du faisceau incident, I_t l'intensité du faisceau transmis, l le chemin optique, $\varepsilon(\lambda)$ le coefficient d'absorption molaire à la longueur d'onde λ et C la concentration en chromophore.

$$A(\lambda) = \log \frac{I_0}{I_t} = \varepsilon(\lambda) \times l \times C$$

Équation 1 : Loi de Beer-Lambert.

L'émission d'un photon de longueur d'onde λ_2 et d'énergie E_2 (avec $\lambda_2 > \lambda_1$ et $E_2 < E_1$) accompagnant la relaxation d'un état excité singulet (le plus souvent S_1) à l'état fondamental S_0 est la fluorescence, transition radiative. La différence d'énergie entre

l'absorption et l'émission par fluorescence est due à la perte d'énergie par relaxation vibrationnelle dans les états excités.

La conversion interne (CI) est une transition non radiative entre deux états électroniques de même spin.

Le croisement inter-système (CIS) est une transition non radiative entre deux niveaux vibrationnels de multiplicité différente (un état singulet et un état triplet). Cette transition est favorisée par la présence d'atomes lourds au sein de la molécule. Après le croisement inter-système, la molécule excitée peut revenir à son état fondamental par transition radiative avec émission d'un photon, on parle alors de phosphorescence. Ce processus de désexcitation a le plus souvent une durée de vie plus longue. La molécule excitée dans son état triplet peut également revenir à son état fondamental par désexcitation non radiative.

III.5.2. Caractéristiques de la fluorescence

Plusieurs paramètres caractéristiques définissent un fluorophore : la longueur d'onde d'absorption λ_{abs} , le coefficient d'absorption molaire ϵ , la longueur d'onde d'émission de fluorescence λ_{em} , le déplacement de Stokes $\Delta\nu$, le rendement quantique Φ_{F} , la brillance et le temps de vie de fluorescence.

La longueur d'onde d'absorption λ_{abs} correspond au maximum d'absorption du fluorophore. Le coefficient d'absorption molaire ϵ (généralement en $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) permet de quantifier la capacité d'un fluorophore à absorber un photon à une longueur d'onde donnée. À une intensité lumineuse incidente égale, plus ce coefficient sera élevé, plus l'absorbance sera intense.

La longueur d'onde d'émission de fluorescence λ_{em} correspond à la longueur d'onde pour laquelle l'intensité d'émission est maximale. La longueur d'onde d'émission d'un fluorophore est indépendante de la longueur d'onde d'excitation de celui-ci mais son intensité est proportionnelle à l'intensité de l'excitation (Figure 10).

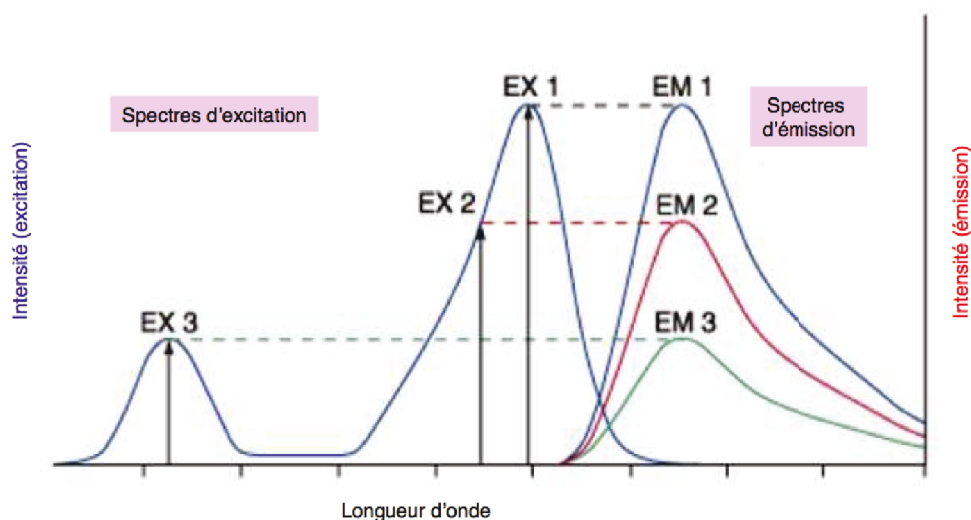


Figure 10 : Spectres d'émission à différentes longueurs d'onde et intensités d'excitation.

La différence entre les maxima d'émission et d'absorption de la même transition électronique est appelée déplacement de Stokes (exprimé en nombre d'ondes). Afin d'éviter une réabsorption par le fluorophore des photons émis lors de sa désexcitation, il est important que ce déplacement ne soit pas trop faible.

L'efficacité de la molécule à revenir à son état fondamental *via* l'émission de photons de fluorescence est déterminée par le rendement quantique de fluorescence Φ_F . En d'autre terme, le rendement quantique de fluorescence Φ_F est le rapport du nombre de photons émis par fluorescence sur le nombre de photons absorbés par la molécule, et est compris entre 0 et 100%. Le rendement quantique peut varier en fonction de l'environnement du fluorophore (concentration du fluorophore, polarité, pH...). Un autre paramètre utilisé pour traduire l'efficacité d'un fluorophore est la brillance qui est le produit du coefficient d'absorption molaire et du rendement quantique.

Le temps de vie de fluorescence est la durée pendant laquelle un fluorophore demeure dans son état excité avant de revenir à son état fondamental et varie en fonction de l'environnement (milieu, pH...). Cette durée de vie varie de la nanoseconde jusqu'à la milliseconde pour certains fluorophores.⁴¹

III.5.3. Limites de la fluorescence

La fluorescence est avant tout une modalité idéale pour faire de l'imagerie *in vitro* où sa sensibilité et sa résolution en font une technique d'investigation de choix. Pour une imagerie *in vivo*, les limites intrinsèques à l'utilisation de rayons lumineux sont un point essentiel à considérer. Les phénomènes physiques liés à l'utilisation de lumière et les

difficultés supplémentaires dans le cadre d'une imagerie *in vivo* vont être brièvement présentés.

Le premier phénomène associé au trajet de la lumière est la diffusion. La diffusion est la propriété de la matière à disperser la lumière dans toutes les directions. Elle dépend fortement de la taille des molécules traversées. Ainsi lors de l'irradiation d'un tissu biologique, la diffusion entraîne rapidement une perte d'intensité de la lumière et de résolution du signal, résultant en une perte de la qualité de l'image obtenue.⁴²

Le deuxième phénomène lié à l'utilisation de la lumière est la réfraction et la réflexion. En effet, lorsqu'un rayon lumineux incident arrive à une interface de milieux d'indice de réfraction différents, elle est réfléchi et réfractée. Ainsi lors d'une imagerie *in vivo*, de par la complexité du milieu et le nombre d'interfaces, une perte partielle des rayonnements incidents et émis entraîne une perte de résolution de l'image obtenue.

Dans le cadre d'une imagerie *in vivo*, l'absorption des tissus est une limite supplémentaire. En effet, les chromophores présents dans les tissus peuvent absorber des photons incidents et émis et entraîner une perte du signal aboutissant à une réduction du signal de fluorescence détecté. L'hémoglobine, l'oxyhémoglobine ainsi que d'autres molécules (mélanine, cytochromes, protéines) vont absorber les photons entre 400 et 600 nm. L'eau va également absorber des photons de longueur d'onde élevée ($\lambda > 900$ nm). Ainsi on définit une gamme spectrale entre 650 et 900 nm, appelée communément « fenêtre thérapeutique », où l'absorption des différents constituants des tissus est moindre (Figure 11).⁴³

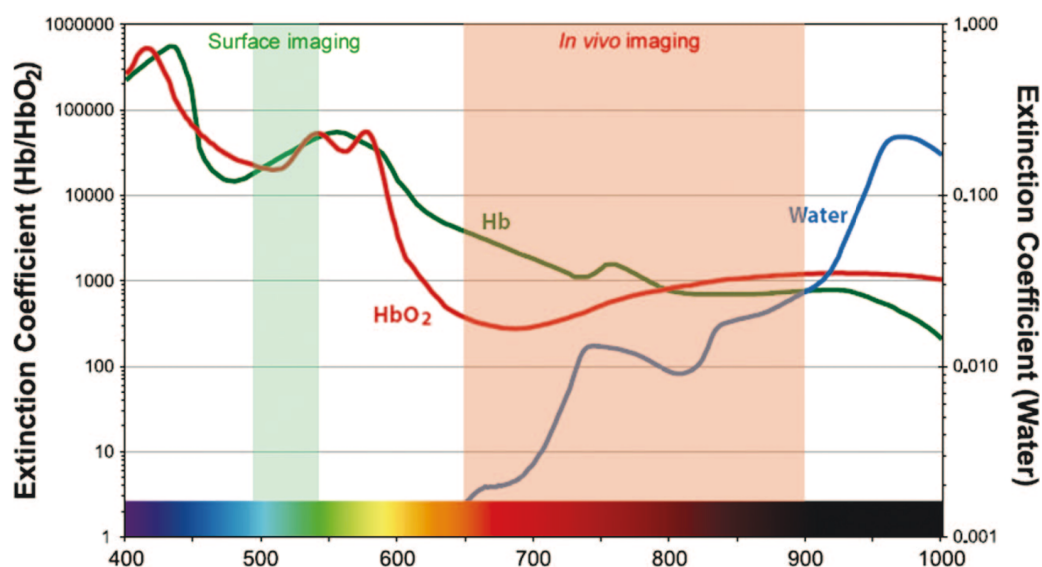


Figure 11 : Spectres d'absorption des principaux composants des tissus extrait de Kobayashi et al.⁴⁴

Enfin, lors d'une imagerie *in vivo* le phénomène d'auto-fluorescence des tissus s'ajoute. En effet de nombreux fluorophores endogènes peuvent être excités puis vont fluorescer dans le visible entraînant une augmentation du bruit de fond.⁴⁵ En travaillant, dans la « fenêtre thérapeutique », l'auto-fluorescence des tissus est moindre (Figure 12).

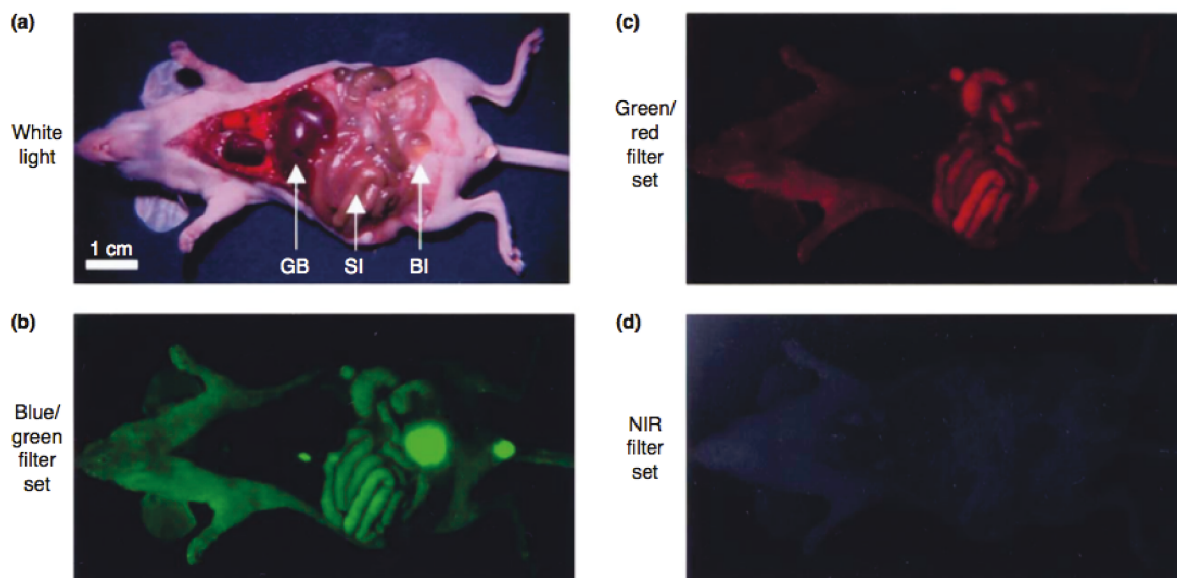


Figure 12 : Mise en évidence de l'auto-fluorescence des organes de la souris extrait des travaux de Frangioni.⁴⁶

Ainsi, l'élaboration de sondes absorbant et émettant dans cette gamme spectrale 650 – 900 nm sera nécessaire pour une utilisation en imagerie *in vivo*.⁴⁷

III.5.4. Les techniques d'imagerie de fluorescence

Différentes techniques d'imagerie par fluorescence existent et sont utilisées en fonction du type d'imagerie à réaliser. Parmi les techniques utilisées aujourd'hui en routine dans le domaine de la biologie nous pouvons citer la microscopie de fluorescence : microscopie en épifluorescence, confocale ou biphotonique. Ces techniques permettent une analyse de faible profondeur (jusqu'à quelques centaines de micromètres) avec une haute résolution spatiale (quelques micromètres). Elles sont idéales pour l'imagerie *in vitro* et ne nécessitent pas l'utilisation de sondes absorbant et émettant dans le proche infrarouge. En complément de ces techniques d'imagerie microscopique, des modalités d'imagerie de fluorescence *in vivo* permettant une imagerie en profondeur (jusqu'à quelques cm) avec une résolution millimétrique se sont développées. Nous pouvons citer l'imagerie de fluorescence par réflexion (FRI), la tomographie optique diffuse (DOT) et la tomographie de fluorescence moléculaire (FMT) et l'endoscopie. Ces techniques nécessitent alors l'utilisation de sondes absorbant et émettant dans la « fenêtre thérapeutique ».⁴⁸⁻⁵⁰

III.5.5. Les fluorophores en imagerie optique

Lors de l'élaboration d'une sonde pour l'imagerie médicale, plusieurs conditions doivent être remplies. Tout d'abord, certaines propriétés photophysiques spécifiques sont nécessaires : une sonde absorbant et émettant dans la « fenêtre thérapeutique » (650-900 nm) dans le cas d'une imagerie *in vivo* afin d'éviter au maximum les problèmes d'absorption et d'auto-fluorescence des tissus, un déplacement de Stokes suffisant et une intensité de fluorescence élevée, appelée brillance. De plus, une stabilité en milieu physiologique dans le temps est nécessaire ainsi qu'une stabilité vis à vis du photoblanchiment. Enfin, la sonde doit être non toxique et posséder des propriétés pharmacocinétiques compatibles avec les milieux biologiques.^{44,46,51}

Trois grandes classes de molécules fluorescentes sont utilisées en imagerie optique de fluorescence : les nanocristaux semi-conducteurs (quantum dots),⁵²⁻⁵⁴ les protéines fluorescentes^{55,56} et les fluorophores organiques. Nous allons nous concentrer sur les fluorophores organiques.

III.5.5.1. Les fluorophores organiques

Les molécules organiques fluorescentes utilisées en imagerie optique sont principalement d'origine synthétique et possèdent, généralement, un système aromatique fortement conjugué. Une liste exhaustive des différents fluorophores existants est répertoriée dans le « Handbook of Fluorescence ». Les principaux fluorophores intéressants pour l'imagerie optique émettant dans le visible et dans le proche infrarouge ont été regroupés sur un graphique en fonction de leur longueur d'onde d'émission et de leur brillance (Figure 13).⁵⁷ Nous nous contenterons ici de donner un aperçu des différentes familles de fluorophores existantes.^{47,58,59}

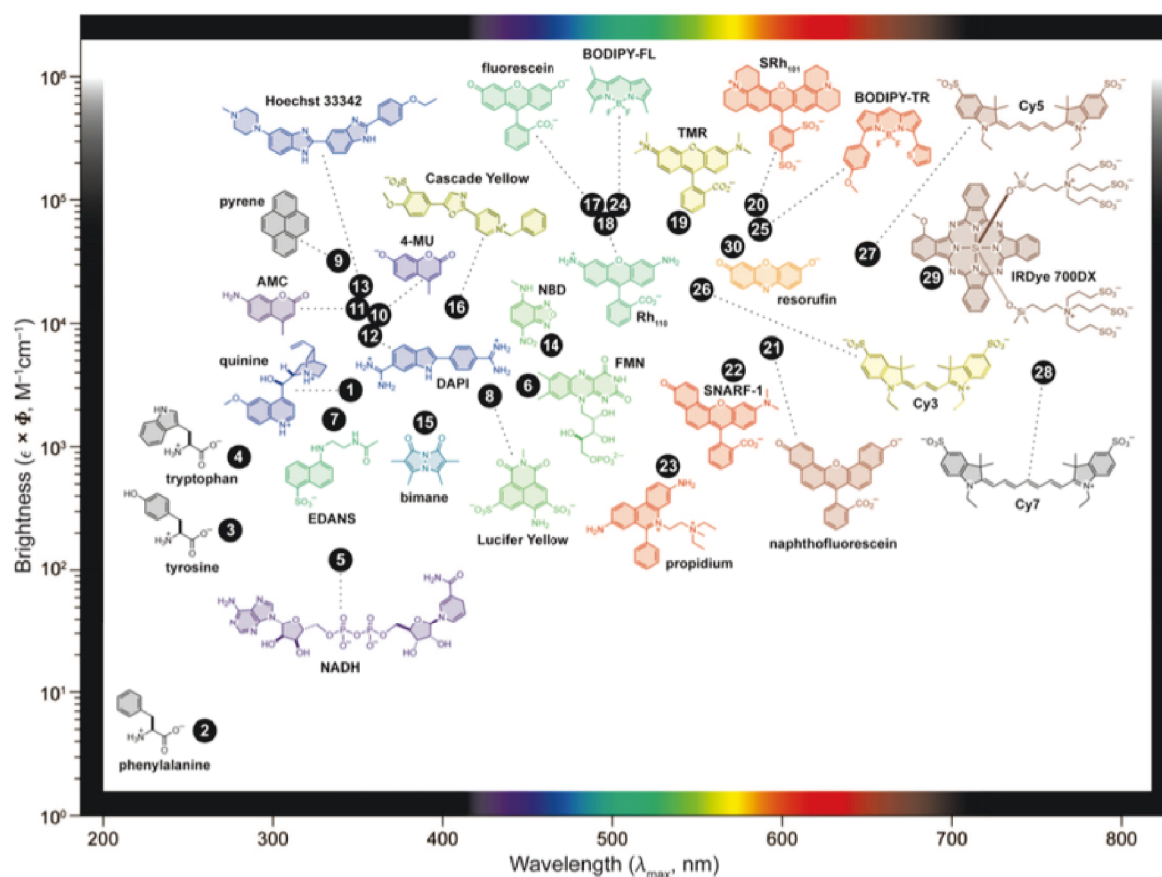


Figure 13 : Brillance des principales classes de fluorophores en fonction de la longueur d'onde maximale d'absorption extrait de Lavis et al.⁵⁷

III.5.5.1.1 Les dérivés du xanthène

Le cœur xanthène est composé de deux cycles aromatiques reliés par une unité pyrane. Le tricycle ainsi formé est conjugué et favorise le phénomène de fluorescence.

Parmi les xanthènes, on distingue les fluorescéines, les rhodamines et les rhodols, hybrides « fluorescéine – rhodamine ». La fluorescéine isothiocyanate (FITC) (Figure 14) a été l'un des premiers fluorophores à être utilisé en biologie pour le marquage de biomolécules.⁶⁰ Cette molécule présente une hydrosolubilité suffisante et dépendante du pH. Cependant, elle présente certains inconvénients comme une sensibilité vis à vis du photoblanchiment et des longueurs d'onde d'absorption et d'émission dans le visible ce qui limite son application. De nombreux dérivés de fluorescéine ont été synthétisés afin de moduler les propriétés de fluorescence, de photostabilité et de sensibilité au pH. Les rhodamines (Figure 14) diffèrent des fluorescéines par la présence de deux groupements anilines. Un grand nombre de rhodamines ont également été synthétisées en modulant légèrement la structure afin d'optimiser les propriétés photophysiques.⁶¹ Elles sont plus stables vis à vis du photoblanchiment.

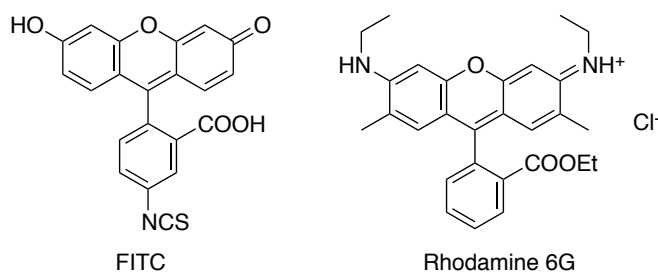


Figure 14 : Structures de la FITC et de la rhodamine 6G.

Cette famille de fluorophores présente de bons coefficients d'absorption molaire, de bonnes brillances et une bonne solubilité aqueuse mais se limite à une utilisation en microscopie et est sujette au photoblanchiment. Elles peuvent être utilisées en sonde pH,⁶² pour la détection sélective d'ions,⁶³ pour la détection d'une activité enzymatique⁶⁴, en marquage biologique.⁶⁵ Une gamme de fluorophores avec un cœur xanthène est commercialisée par Molecular Probes® sous le nom d'Alexa Fluor® (Figure 15).

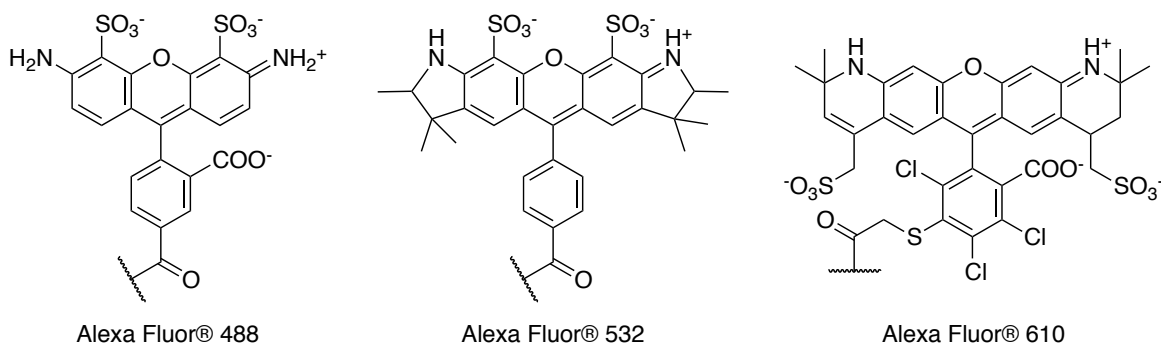


Figure 15 : Exemples de sondes émettant dans le visible développées par Molecular Probes®.

Actuellement, un effort est réalisé sur la synthèse de rhodamines absorbant et émettant dans la zone du proche infrarouge.⁶⁶⁻⁶⁸ De plus, récemment, de nouveaux dérivés de xanthène où l'atome d'oxygène est remplacé par un atome de silicium, de germanium ou d'étain ont été développés par Nagano *et coll.*^{69,70} Cette substitution permet un décalage des spectres d'absorption et d'émission vers le rouge.

III.5.5.1.2 Les dérivés de cyanines

Les cyanines sont des molécules fluorescentes constituées de deux hétérocycles azotés reliés par un pont méthine de sorte que l'ensemble forme un système entièrement conjugué. Le chef de file de cette famille est l'indocyanine verte (ICG) (Figure 16). En effet, ses propriétés d'absorption (longueur d'onde et coefficient d'absorption molaire) et d'émission (longueur d'onde et intensité de fluorescence) permettent une imagerie de fluorescence *in vivo*. De plus, l'ICG est hydrosoluble.⁷¹

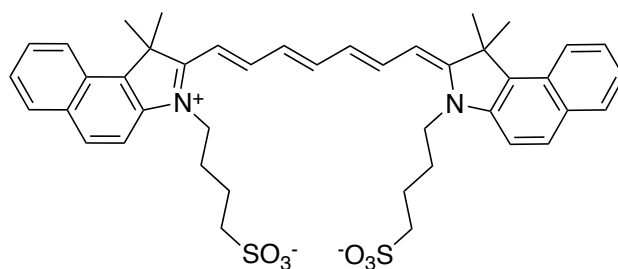


Figure 16 : Structure de l'indocyanine verte (ICG).

De nombreux dérivés de cyanines ont été synthétisés en modulant les propriétés photophysiques notamment en modulant la longueur du pont méthine. Ainsi plusieurs dérivés de cyanines ont été développés par le groupe de Waggoner^{72,73} et sont commercialisés par GE Healthcare (CyDye : Cy 5.0, Cy 5.5 et Cy 7.0).

Mais malgré les bonnes propriétés photophysiques des cyanines, elles souffrent de plusieurs limites. Tout d'abord, l'accès à des dérivés possédant une fonction de greffage s'avère délicat. De plus, une augmentation de la longueur du pont méthine entraîne une diminution du rendement quantique pouvant s'expliquer par une isomérisation *cis / trans* et par une augmentation des processus de désexcitation non radiative qui trouvent leur origine dans les mouvements de vibration et rotation des hétérocycles autour de la chaîne polyméthine.^{74,75} Dernièrement, des dérivés de cyanines possédant une structure stabilisée⁷⁶ ou rigidifiée⁷⁷ ont été synthétisés afin d'augmenter la photostabilité.

III.5.5.1.3 Les BODIPYs

Les BODIPYs, marque déposée par Molecular Probes® ou 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacènes sont des molécules fluorescentes ayant la même structure de base qu'une cyanine avec deux unités pyrroliques reliées par un pont méthine et un bore pontant les deux azotes (Figure 17). Les BODIPYs sont connus depuis la première synthèse réalisée par Treibs et Kreuzer en 1968⁷⁸ mais leur développement en tant qu'agent fluorophore est bien plus récent.

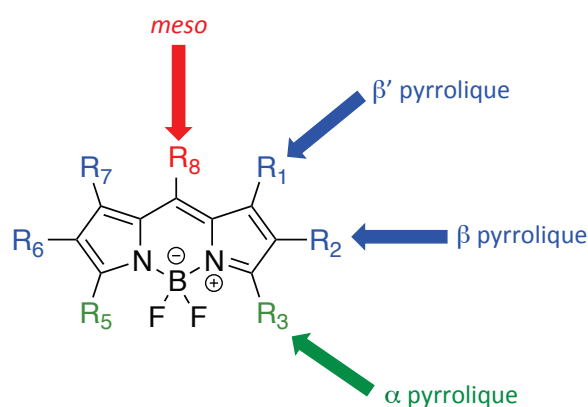


Figure 17 : Structure générale du BODIPY.

Les BODIPYs présentent de bonnes propriétés photophysiques : des coefficients d'absorption molaire élevés et de bonnes brillances. Ces intensités de fluorescence sont supérieures à celles des cyanines de par la structure rigide apportée par le motif « BF₂ » limitant les désexcitations non radiatives. De plus, ces composés sont très stables chimiquement et photochimiquement. La facilité d'introduction de substituants *via* les positions α , β , β' pyrroliques et *meso* sur le cœur BODIPY permet de moduler leurs propriétés photophysiques et ainsi d'accéder à de nouveaux fluorophores de manière rapide et efficace. Enfin leurs potentiels redox accessibles les rendent particulièrement intéressants dans la construction de systèmes basés sur le transfert d'électron ou d'énergie. Cependant les BODIPYs présentent des limites en particulier pour une imagerie *in vivo*. En effet, les BODIPYs possèdent des longueurs d'onde d'absorption et d'émission dans le visible pour la plupart, l'introduction de substituants permet dans certains cas de déplacer suffisamment l'absorption et l'émission dans la « fenêtre thérapeutique » (650-900 nm).^{79,80} En outre, mis à part quelques exceptions, leur faible solubilité dans l'eau peut être handicapante pour une application en biologie. L'introduction de groupements hydrosolubilisants^{81,82} ou l'incorporation dans des nanoobjets⁸³ permet au moins en partie de contrecarrer cette limitation.

Les propriétés photophysiques des BODIPYs étant facilement modulables, ils sont utilisés dans de nombreuses applications. Ainsi, des BODIPYs ont été développés pour le marquage biologique, la détection d'analytes, les sondes pH, les sondes redox ou encore comme agents dopants dans les cristaux liquides et comme constituants dans les dispositifs opto-électroniques.^{84,85}

IV. Les théranostiques optiques utilisant des métaux

Comme nous avons pu le voir précédemment, les métaux sont très utilisés en chimiothérapie notamment anticancéreuse. Le cisplatine est encore aujourd'hui un des médicaments les plus utilisés dans le traitement des tumeurs solides malgré ses nombreux effets secondaires et le développement de résistance. Les alternatives au cisplatine peinent à passer avec succès les différentes phases d'essais cliniques, notamment à cause du manque de connaissance de leur mécanisme d'action. En plus de faciliter l'obtention d'autorisation de mise sur le marché, la compréhension du mécanisme d'action et des propriétés pharmacocinétiques de ces différents composés pourrait apporter des éléments clés pour améliorer leur efficacité et limiter leurs effets secondaires. C'est pour cela que le développement d'agents thérapeutiques traçables ou théranostiques a explosé ces dernières années. Le terme théranostique, contraction des deux termes thérapie et diagnostique a été introduit par John Funkhouser au cours d'une conférence au début des années 2000. À l'origine, il s'agissait d'utiliser une sonde greffée sur un vecteur spécifique d'un marqueur d'une maladie ou d'une infection. Par imagerie, cela permettait de déterminer le type de maladie, établir un diagnostic, pour que le traitement adapté, la thérapie, soit prescrit au patient. La théranostique s'approchait à cette époque de la médecine personnalisée. En quelques années, ce terme « à la mode » a vu sa définition s'élargir au point que régulièrement l'aspect diagnostique est remplacé par le côté « traçable » et qu'est considéré comme théranostique tout composé qui combine les caractéristiques d'un agent thérapeutique et d'un agent d'imagerie. Ainsi, aujourd'hui, il est difficile de voir tout ce que les chercheurs entendent par le terme théranostique. Dans notre cas et tout au long de ce manuscrit, nous parlerons indifféremment de théranostique ou d'agent thérapeutique traçable même si nous garderons en tête que les informations obtenues *via* la sonde devront à terme permettre l'établissement d'un diagnostic (nous nous rapprochons par là de la définition donnée par Reineke).⁸⁶

Une première revue sur ce type de théranostiques optiques a très récemment été publiée par Kim *et coll.*⁸⁷ Elle permet d'avoir un premier aperçu des avancées faites dans le domaine. Malheureusement, la partie concernant les agents thérapeutiques à base de métaux n'a été traitée que superficiellement. Pour cette raison et comme il s'agit du cœur du sujet de ce manuscrit, l'état de l'art de ces théranostiques sera exposé (Figure 18).

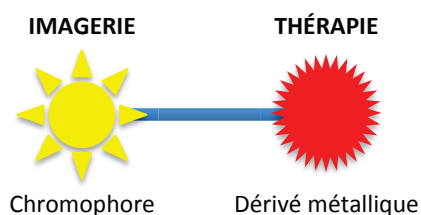


Figure 18 : Représentation des théranostiques optiques utilisant des métaux.

IV.1. Exemples de théranostiques optiques utilisant des métaux

Bien que le concept d'agents thérapeutiques traçables soit récent, un réel engouement sur l'élaboration de tels objets a permis le développement de nouveaux théranostiques présentant des propriétés intéressantes. Ainsi dans le cadre de l'élaboration de théranostiques optiques comportant un ou plusieurs métaux, plusieurs approches peuvent être envisagées : le centre métallique peut être utilisé pour la thérapie ou à la fois en tant qu'agent thérapeutique et agent d'imagerie optique. Nous allons présenter des exemples de la littérature utilisant ces différentes approches.

IV.1.1. Dérivés métalliques en tant qu'agent thérapeutique

L'introduction d'un fluorophore organique afin d'élaborer un agent thérapeutique traçable est la méthode la plus utilisée. De nombreux fluorophores possédant une fonction de greffage ou non sont commercialement disponibles et sont peu réactifs vis à vis des métaux. De plus, ces molécules peuvent, dans la plupart des cas, être modifiées chimiquement afin de permettre l'introduction sur le dérivé métallique. Ainsi des fluorophores ont pu être introduits sur différents dérivés métalliques présentant des propriétés cytotoxiques.

L'anthracène a été introduit sur différents dérivés métalliques (Figure 19). Par exemple, Reedijk *et coll.* ont introduit un ligand *N,N'*-bis(anthracène-9-ylméthyl)propane-1,3-diamine sur des complexes de platine (II).⁸⁸ Dyson *et coll.* ont quant à eux introduit un anthracène sur des complexes arène ruthénium.⁸⁹ Enfin Casini *et coll.* ont synthétisé des complexes d'argent (I) et d'or (I) portant un ligand carbène *N*-hétérocyclique sur lequel se trouve un anthracène et ont montré que les composés pénètrent mieux dans les cellules cancéreuses que dans les cellules saines (Figure 19).⁹⁰ Ces molécules fluorescentes ne sont pas optimales car elles diminuent l'hydrosolubilité du complexe métallique et ne sont pas faciles à modifier chimiquement. De plus, l'anthracène émettant dans les UV-A (entre 320 et 400 nm) est peu compatible avec une utilisation *in vitro* et *in vivo*.

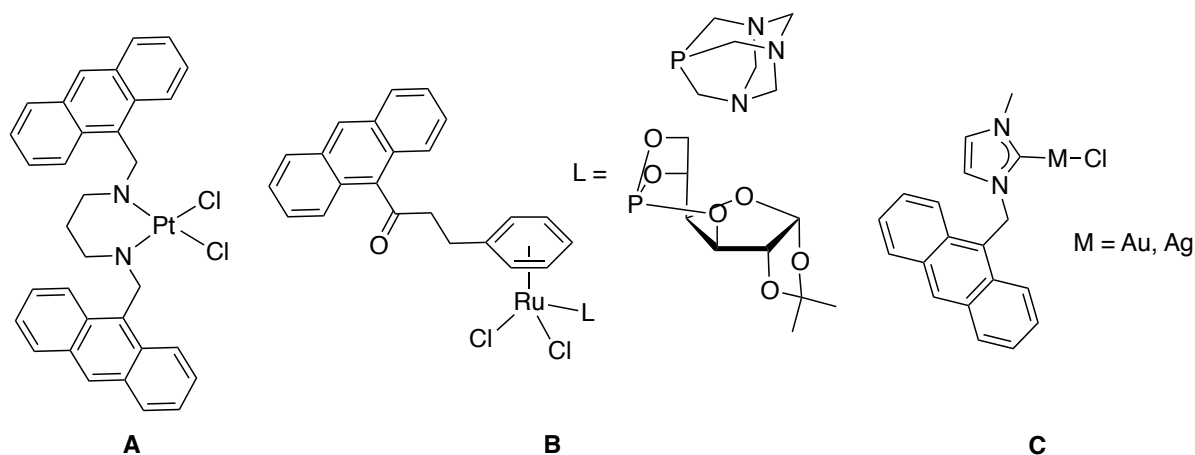


Figure 19 : Exemples de complexes de Pt (A), de Ru (B), d' Au et Ag (C) avec un anthracène.

Les fluorophores compatibles biologiquement ont également été utilisés. Le premier exemple d'un complexe de platine (II) marqué par un dérivé de fluorescéine (la carboxyfluorescéine diacétate) a été rapporté par Reedijk *et coll.*⁹¹ Des dérivés de coumarines ont également été utilisés pour marquer des complexes d'or (I),⁹² cobalt (II), nickel (II), cuivre (II) et zinc (II) (Figure 20).⁹³

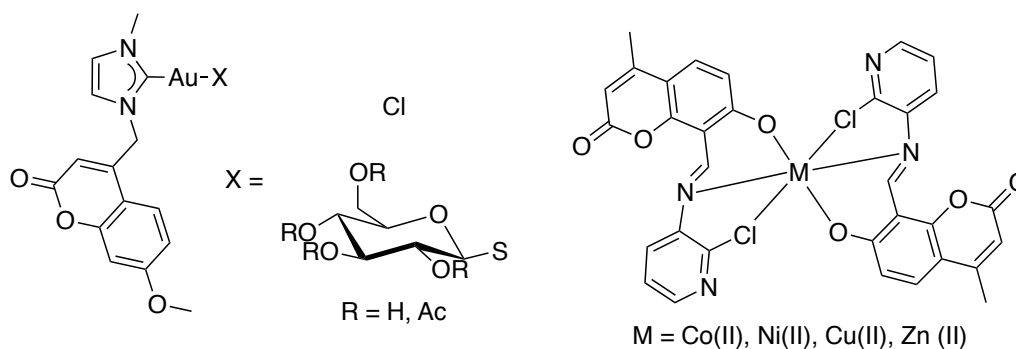


Figure 20 : Exemples de complexes avec une 7-méthoxy/7-hydroxycoumarine.

Des complexes de platine (II)⁹⁴⁻⁹⁶ d'arène-ruthénium (II)^{97,98} et d'or (I)⁹⁹ contenant des porphyrines ont été décrits, la porphyrine agissant comme traceur et agent phototoxique (Figure 21).

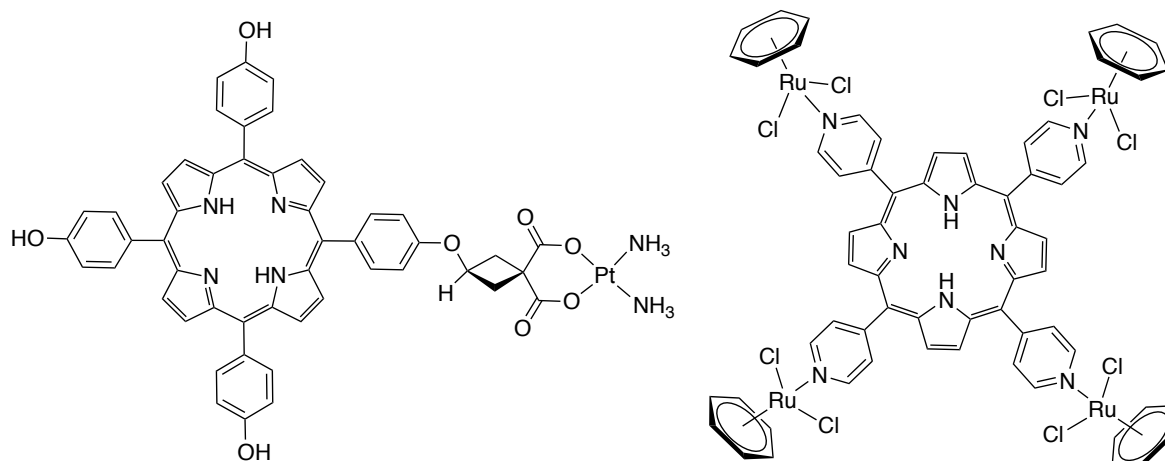


Figure 21 : Exemples de complexes de Pt(II) et d'arène - Ru(II) avec une porphyrine.

Enfin des BODIPYs ont été introduits sur des complexes de platine,¹⁰⁰ de ruthénium (II) (Figure 22),^{101,102} d'osmium et d'or.¹⁰³

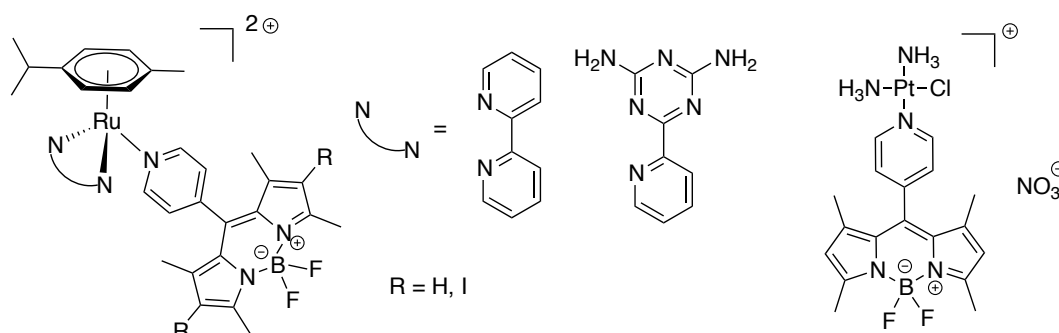


Figure 22 : Structures des complexes de Ru(II) et de Pt(II) portant un BODIPY.

Des fluorophores possédant des propriétés biologiques intéressantes ont également été introduits. L'intérêt réside dans le fait que ces molécules fluorescentes sont connues pour exercer des propriétés cytotoxiques d'où un potentiel effet synergique entre le dérivé métallique et la sonde qui joue à la fois le rôle de traceur et d'agent thérapeutique. Reedijk *et coll.* ont ainsi introduit un ligand *N,N'*-bis(aminoalkyl)-1,4-diaminoanthraquinone sur des complexes de platine (II) (Figure 23) et ont pu suivre les composés *in vitro* et la distribution intracellulaire sur une lignée cellulaire sensible ou non au cisplatine.¹⁰⁴ Pope *et coll.* ont pour leur part synthétisé des complexes d'or (I) comprenant un ligand dialkynyloxyanthraquinone (Figure 23) et ont évalué la cytotoxicité ainsi que les propriétés photophysiques des dérivés.¹⁰⁵ L'intérêt de l'utilisation des anthraquinones réside dans le fait qu'elles sont connues pour être cytotoxiques.

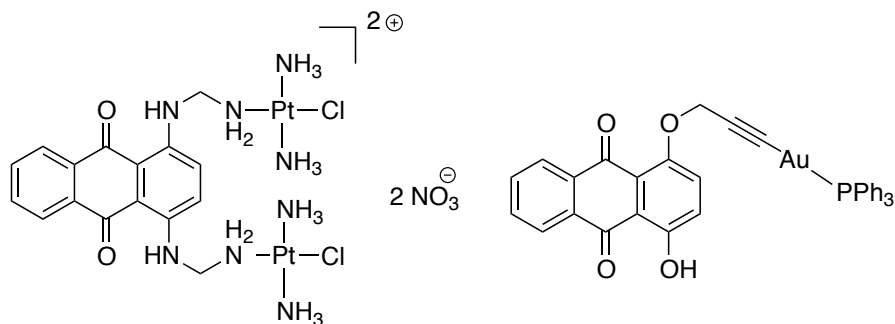


Figure 23 : Exemples de complexes de Pt(II) et d' Au(I) avec un dérivé anthraquinone.

De la même manière, des complexes d'or (I) utilisant les dérivés phtalimides, connus pour être des agents intercalants de l'ADN et fluorescents ont été synthétisés par les équipes de Ott^{106,107} et de Pope (Figure 24).¹⁰⁸

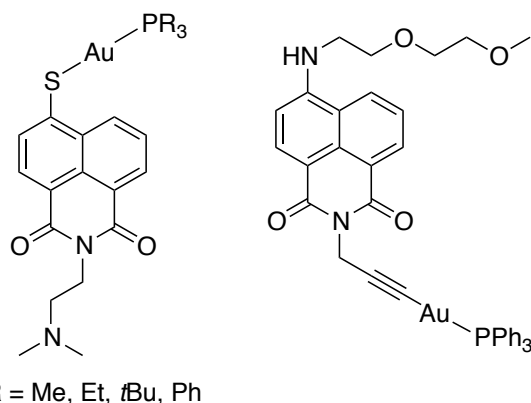


Figure 24 : Complexes d' Au(I) avec des phtalimides.

IV.1.2. Dérivés métalliques intrinsèquement agent thérapeutique et d'imagerie

Des complexes présentant des propriétés biologiques intéressantes et étant luminescents ont été décrits dans la littérature. Ainsi, Che *et coll.* ont synthétisé des complexes luminescents de platine (II)^{109,110} et d'or (III) (Figure 25).¹¹¹

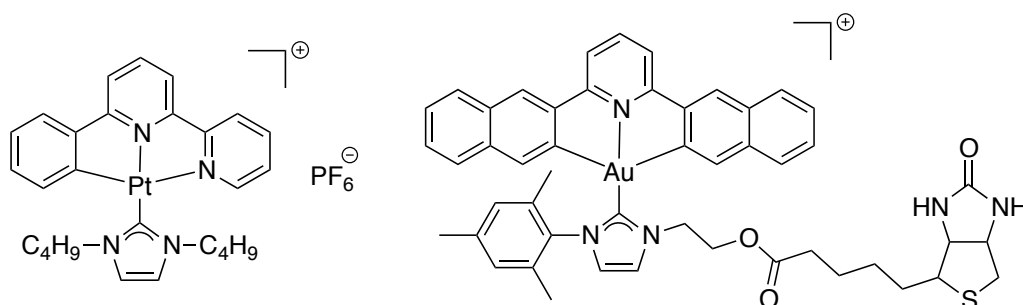


Figure 25 : Structures des complexes de Pt(II) et d' Au(III) luminescents développés par Che *et coll.*

Contel *et coll.* ont décrit des complexes luminescents d'or (III), de platine (II) et de palladium (II) comportant des iminophosphoranes (Figure 26).¹¹²

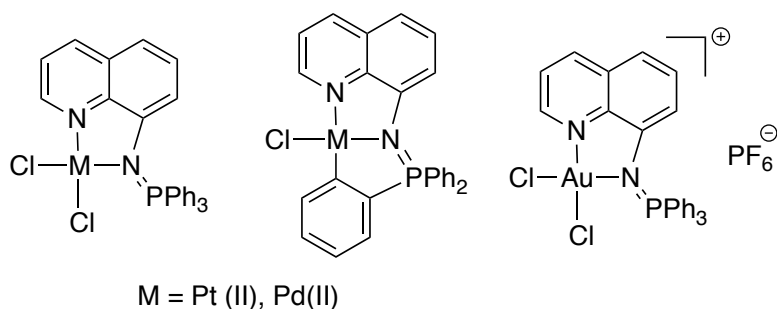


Figure 26 : Complexes iminophosphoranes luminescents de Pt(II), Pd(II) et d'Au(III) développés par Contel et coll.

L'ensemble de ces agents thérapeutiques traçables présente des propriétés intéressantes mais de par la nature du fluorophore / luminophore utilisé ces objets sont limités à une application en imagerie optique *in vitro*.

Dans notre équipe nous nous intéressons plus particulièrement aux coumarines, BODIPYs et porphyrines. Ainsi des complexes d'or (I) – coumarines (Figure 27),^{92,113} ruthénium (II), osmium (II) et or (I) – BODIPY / porphyrine^{98,99,103} ont été préparés et étudiés.

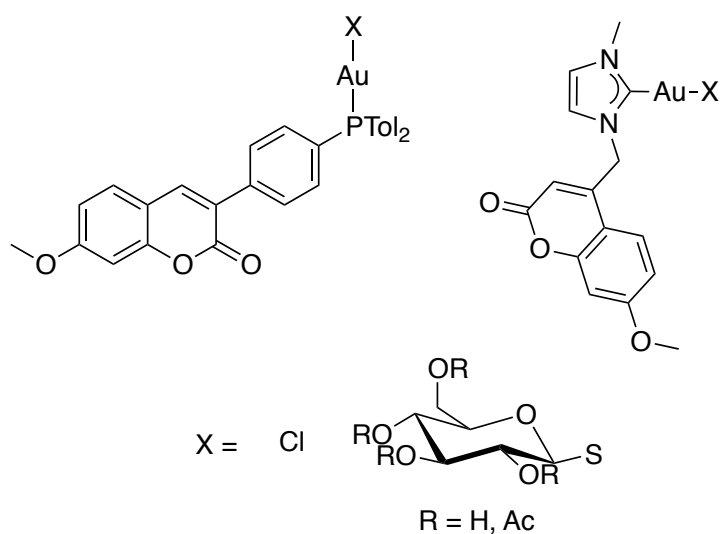


Figure 27 : Structures des complexes d'Au(I) – coumarine développés dans notre équipe.

V. Contexte du projet et voies d'optimisation

V.1. Contexte : présentation des travaux antérieurs

Notre laboratoire s'est lancé dans le domaine de la théranostique dès 2010, en tirant avantage de la collaboration entre l'équipe OMBC³, dont une des spécialités est la bio-inorganique à visée thérapeutique, et l'équipe P2DA qui dispose d'une longue expérience en imagerie optique. Cette collaboration s'est construite au cours de la thèse du Dr Semra Tasan qui a synthétisé plusieurs familles d'agents théranostiques optiques. L'une d'entre elles a été conçue de la manière suivante : un BODIPY jouant le rôle de marqueur optique est associé à un métal possédant une activité biologique (Ru(II), Os(II) ou Au(I)) *via* un espaceur phosphine. L'objectif premier était de concevoir une sonde fluorescente très brillante qui pourrait se coordonner de façon simple et rapide à de nombreux métaux. Le choix d'un bras phosphine comme lien s'est très vite imposé à nous. En effet, la chimie de coordination des phosphines est une des plus riches qui soit. De plus, nous souhaitons une liaison relativement forte entre la sonde et la partie à visée thérapeutique pour limiter un relargage du métal avant que la cible biologique ne soit atteinte. Les phosphines permettent d'obtenir ce type de liaison sans nécessiter la conception d'un chélate comme dans le cas des ligands azotés.

Au cours de cette étude, les propriétés photophysiques de ces trois théranostiques ont été étudiées ainsi que leur activité cytotoxique et leur capacité à être visualisée *in vitro* (Figure 28).¹⁰³

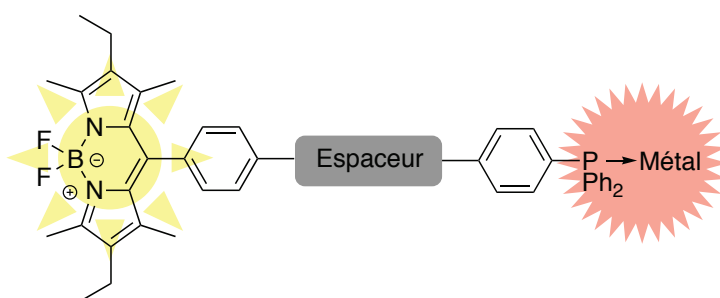


Figure 28 : Structure des théranostiques BODIPY - Métal.

Trois théranostiques ont été obtenus à partir du ligand BODIPY phosphine **BODI-P-0**. Ce ligand a été obtenu par couplage peptidique entre le BODIPY éthylène diamine **2** et l'ester activé de l'aryldiphénylphosphine **1**. La métallation de **BODI-P-0** permet d'obtenir rapidement et avec de bons rendements les trois complexes cibles :

BODI-Ru-0, **BODI-Os-0** et **BODI-Au-0** (Schéma 1). Au cours de mes six premiers mois de thèse, j'ai pu participer à l'optimisation des conditions de cette synthèse et au passage à l'échelle du gramme voire de la dizaine de grammes.

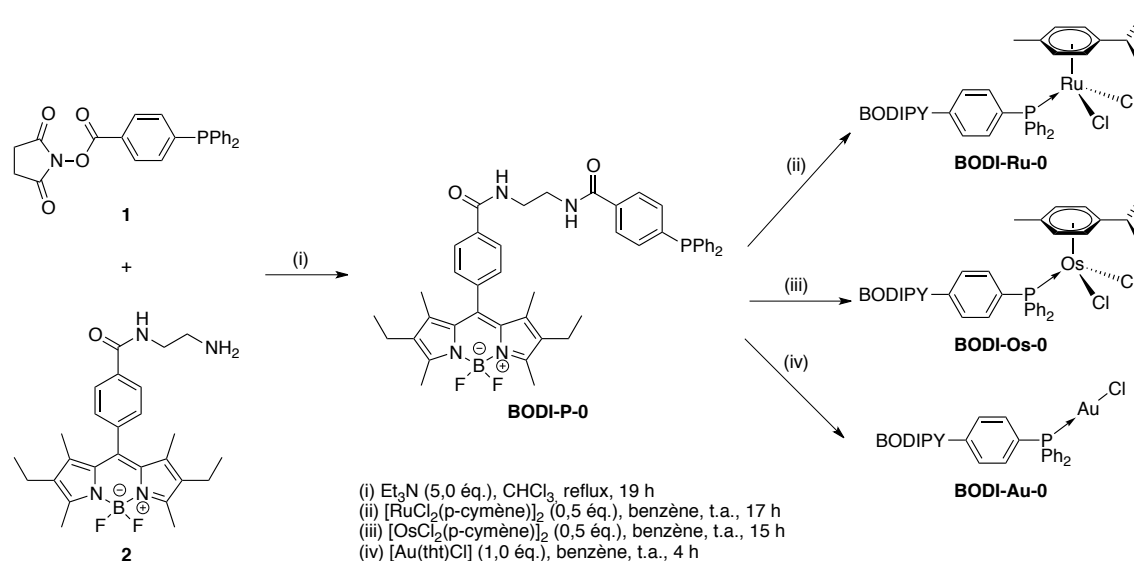


Schéma 1 : Voie de synthèse des théranostiques BODI-Ru-0, BODI-Os-0 et BODI-Au-0 adapté de Tasan et al.¹⁰³

Un des points critiques lors de la conception d'un théranostique optique à base de complexe métallique est la conservation des propriétés photophysiques de la sonde. En effet, il est courant que l'introduction du métal puisse engendrer une désexcitation non radiative que ce soit par effet d'atome lourd, passage par l'état triplet, ou alors par des possibles phénomènes de transfert d'électrons ou d'énergie à l'état excité.^{114,115}

Dans le cas particulier de l'étude de Semra Tasan, il faudra aussi se pencher sur l'influence de la présence de la phosphine. Il a été décrit qu'une phosphine conjuguée ou non à un fluorophore comme une coumarine ou un BODIPY pouvait inhiber leur fluorescence *via* un phénomène de transfert d'électron photoinduit ou d'autres phénomènes de désexcitation non radiatif.¹¹⁶ Notre équipe en a même tiré avantage pour synthétiser des sondes « ON/OFF ».¹¹³

Pour valider cette première génération de théranostiques, il a donc fallu évaluer les propriétés photophysiques du ligand et des complexes.

Le spectre d'absorption UV-visible du ligand **BODI-P-0** et des complexes correspondants **BODI-Ru-0**, **BODI-Os-0** et **BODI-Au-0** met en évidence un maximum d'absorption à 526 nm, correspondant à la transition S_0-S_1 , une seconde bande d'absorption aux alentours de 380 nm correspond à la transition S_0-S_2 , ces deux bandes

correspondent à une transition $\pi-\pi^*$. Le maximum d'émission se situe aux alentours de 540 nm et le spectre d'émission présente une image miroir avec le spectre d'absorption indiquant que la perturbation structurale à l'état excité est minimale (Figure 29). Il est à noter, par rapport au BODIPY-acide, un très faible déplacement bathochromique de 3 nm du maximum d'absorption (Tableau 2). De plus, un léger effet hypochrome du spectre d'absorption est observé pour **BODI-P-0** et **BODI-Au-0** (Figure 29).

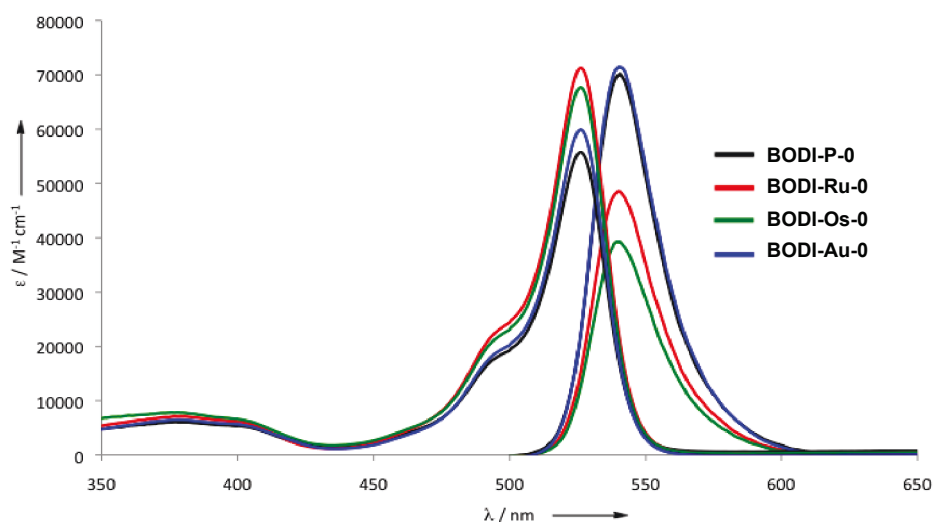


Figure 29 : Spectres d'absorption et d'émission de BODI-P-0 et des différents complexes dans le DMSO à 298 K ($\lambda_{exc} = 488$ nm).

Les propriétés de fluorescence du ligand **BODI-P-0** sont caractéristiques des BODIPYs avec une bande de fluorescence intense à 539 nm ainsi qu'un rendement quantique élevé ($\Phi_F = 95\%$) et montrent que l'introduction de la phosphine n'affecte pas la fluorescence (si l'on excepte à nouveau le même faible effet bathochromique). L'introduction de l'or sur ce ligand pour obtenir **BODI-Au-0** n'affecte pas ou peu la fluorescence ($\Phi_F = 85\%$). À l'inverse, l'introduction du ruthénium, **BODI-Ru-0**, et de l'osmium, **BODI-Os-0**, induisent une inhibition partielle de la fluorescence du composé ($\Phi_F = 57$ et 52% respectivement). Cette extinction peut s'expliquer par un phénomène de transfert d'électron photoinduit de type réductif, *i.e.* un transfert d'un électron du BODIPY sur le métal ou la possibilité d'atteindre un état triplet. Néanmoins, les propriétés de fluorescence de **BODI-Ru-0** et **BODI-Os-0** et en particulier la brillance restent tout à fait satisfaisantes pour l'imagerie (Tableau 2).

Composé	λ_{abs} nm	ϵ $\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$	λ_{em} nm	Φ_{F} % ^{a,b}	B $\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ^c
BODIPY-acide	523	83400	536	100	83400
BODI-P-0	526	55300	539	95	52550
BODI-Ru-0	526	70500	539	57	40200
BODI-Os-0	526	66900	539	52	34800
BODI-Au-0	526	59200	539	85	50300

a) $\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm. b) rhodamine 6G utilisée comme référence, $\Phi_{\text{F}} = 0,78$ dans l'eau, $\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm, tous les rendements quantiques Φ_{F} sont corrigés de l'indice de réfraction des solvants. c) Brillance $B = \epsilon \times \Phi_{\text{F}}$.

Tableau 2 : Données spectroscopiques de BODI-P-0 et des différents complexes dans le DMSO à 298 K.

Une étude préliminaire de stabilité en milieu biologique a été réalisée pour **BODI-Ru-0** et a montré que le composé semblait stable pendant plus de 10 jours à 37 °C. Cependant, cette étude a aussi révélé que les composés étaient peu solubles en milieu aqueux. Cette information est importante car une faible solubilité aqueuse pourrait limiter l'emploi des composés pour des applications biologiques et pourraient révéler une tendance des composés à l'agrégation.

L'activité cytotoxique *in vitro* des trois théranostiques **BODI-Ru-0**, **BODI-Os-0** et **BODI-Au-0**, ainsi que celle du ligand **BODI-P-0** a été étudiée sur deux lignées cellulaires de carcinome ovarien humain sensible (A2780S) et résistante (A2780cisR) au cisplatine. Cette étude a permis de montrer que la partie « métal » est bien responsable de l'activité cytotoxique du composé, et que le BODIPY-phosphine n'est pas cytotoxique. De plus, il a été mis en évidence que tous les complexes présentent une activité antiproliférative significative même si elle est moindre que celle du cisplatine. Le complexe le plus actif est le dérivé d'or **BODI-Au-0** (Tableau 3).

Composé	IC_{50} (A2780S) μM	IC_{50} (A2780cisR) μM
BODI-P-0	> 150	> 150
BODI-Ru-0	50 ± 12	49 ± 15
BODI-Os-0	141 ± 11	67 ± 12
BODI-Au-0	32 ± 16	37 ± 10
cisplatine	2,5 ± 0,9	40 ± 7,0

Tableau 3 : Comparatif des valeurs d' IC_{50} de BODI-P-0 et des différents complexes avec celles du cisplatine après 72 h d'incubation sur des lignées cellulaires de carcinome ovarien humain sensible (A2780S) et résistante au cisplatine (A2780cisR).

L'évaluation de la fluorescence *in vitro* des trois théranostiques **BODI-Ru-0**, **BODI-Os-0** et **BODI-Au-0**, ainsi que celle du ligand **BODI-P-0** par microscopie confocale a permis de montrer que les différents composés pénétraient dans les cellules, en s'accumulant préférentiellement au niveau des membranes (plasmique et nucléaire) et ne rentraient pas dans le noyau. Aucune différence notable de localisation n'a été remarquée entre le ligand et les complexes métalliques. Cela semble indiquer que la biodistribution dans la cellule est gouvernée majoritairement par la partie BODIPY. Enfin une étude à 4 °C – température à laquelle il est communément admis que les mécanismes de transport actif sont inhibés – a donné les mêmes résultats qu'à 37 °C mettant en évidence que les composés ne pénètrent pas de manière significative dans les cellules par un transport actif (Figure 30).

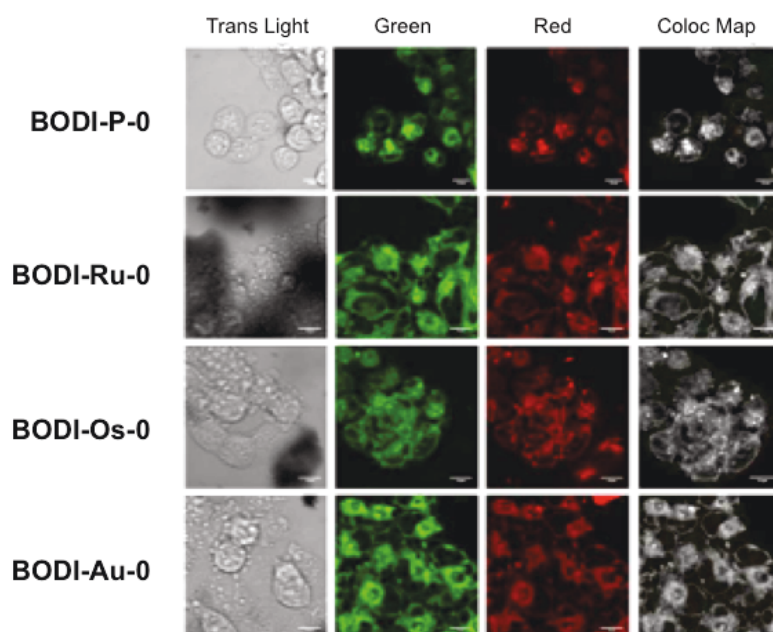


Figure 30 : Images par microscopie confocale des cellules A2780S incubées 2 h à 37 °C de BODI-P-0 et des différents complexes. Les images montrent des cellules en lumière transmise (Trans light), avec un filtre vert ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$), avec un filtre rouge ($\lambda_{exc} = 515 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 550 \text{ nm}$) et par superposition des deux images (Coloc map).

V.2. Conclusion : choix d'un « hit » et voies d'optimisation

S'il l'on veut définir un « hit », le composé le plus prometteur, il faut comparer la facilité de synthèse, la stabilité en milieu biologique, les propriétés d'imagerie et thérapeutiques des différents agents thérapeutiques traçables.

- Synthèse : les trois théranostiques **BODI-Ru-0**, **BODI-Os-0** et **BODI-Au-0** sont synthétisables avec des rendements équivalents même si la manipulation de complexes arène-métal est plus délicate.
- Stabilité : les études préliminaires semblent indiquer que même le complexe arène-ruthénium, réputé pour être peu stable ne présente pas de dégradation significative sur la période utile de l'agent thérapeutique.
- Imagerie : la brillance la plus élevée est obtenue pour **BODI-Au-0**.
- Thérapie : tous les produits semblent se localiser aux mêmes endroits et les premières informations obtenues ont tendance à indiquer un transport semblable. Quant à l'activité antiproliférative, elle est plus prononcée pour le complexe d'or.

Ces considérations indiquent que **BODI-Au-0** semble le théranostique le plus prometteur. Pour ces raisons, au cours de mon doctorat, nous nous sommes focalisés sur ce métal et avons voulu optimiser ce premier « hit ».

Comme précisé en introduction générale, mon financement de thèse implique une dimension industrielle au projet. L'objectif premier de mon doctorat était de développer des sondes pour un kit que pourrait commercialiser la société Fluoptics®. Cela implique certaines contraintes comme celles déjà citées d'une voie de synthèse à rendement élevé et ne se limitant pas à une échelle de quelques milligrammes. À celles-ci s'ajoutent différentes optimisations qui peuvent être résumées par la Figure 31 :

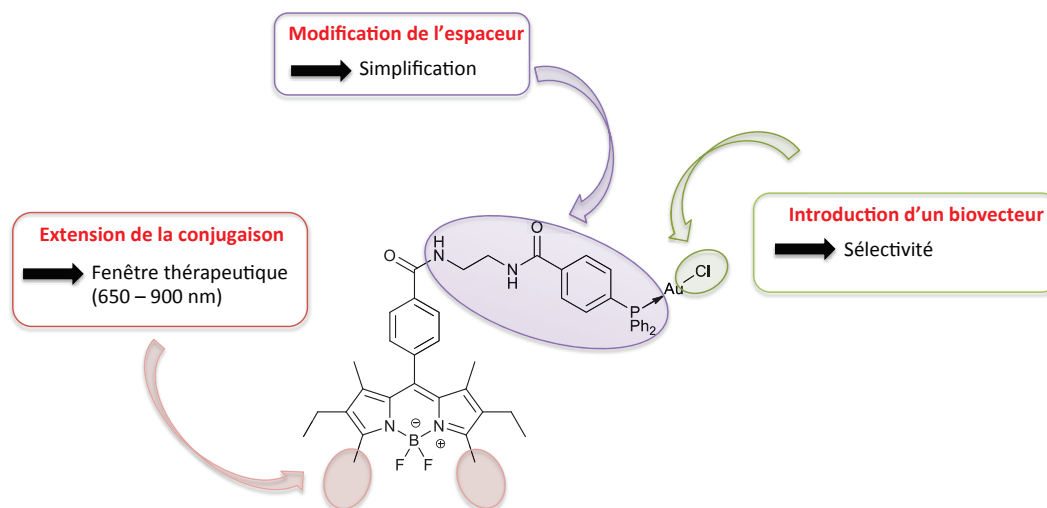


Figure 31 : Les différents axes d'optimisation du théranostique BODI-Au-0.

Ce sont ces différents axes d'optimisation qui vont structurer mon manuscrit :

- **Dans une première partie**, je traiterai l'optimisation de la partie à visée thérapeutique (espaceur compris). La première optimisation vise la simplification de la synthèse. En effet, d'un point de vue industriel, il est souhaitable d'avoir des synthèses courtes (3-4 étapes maximum), alors qu'ici il faut 7 étapes de synthèse à partir du BODIPY acide (en comptant les deux branches de la synthèse convergente). De plus, il pourrait être intéressant de profiter de cette nouvelle synthèse pour supprimer l'aromatique de l'espaceur qui doit contribuer à la faible solubilité aqueuse des composés. Le deuxième axe de travail consiste à développer une méthode simple et efficace pour greffer en dernière étape un vecteur sur le composé. Dans le concept de « kit », ce travail est essentiel car il permettrait de répondre rapidement au besoin des clients et ce à partir d'un précurseur commun synthétisable en quantité importante.
- **Dans une deuxième partie**, je me focaliserai sur l'optimisation de la sonde fluorescente de façon à maximiser sa biocompatibilité : augmentation de la longueur d'onde d'émission, limitation de l'agrégation et ouvertures de pistes pour la conception d'objets plus complexes. Cette deuxième partie a plus une vocation de recherche exploratoire que d'optimisation de l'outil industriel.

PARTIE 2 :
SYNTHÈSE ET ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS
DE NOUVEAUX THÉRANOSTIQUES
BODIPY-Au(I)

Chapitre 1 : Synthèse des nouveaux théranostiques

BODIPY-Au(I)

Doulain P.-E., Goncalves V., Decréau R., Goze C., Bodio E.**

Dans ce premier chapitre, la synthèse de nouveaux théranostiques dans le but d'optimiser le théranostique à base d'or (I) précédemment présenté est traitée. L'optimisation réside en deux points : (i) optimisation du procédé de synthèse afin de pouvoir transférer le procédé à une plus grosse échelle ; (ii) développement d'une nouvelle méthode de bioconjugaison permettant l'introduction de vecteurs et ce dans le but d'améliorer la partie thérapeutique du théranostique. Après un bref descriptif des méthodes de synthèse des BODIPYs, la synthèse du nouveau théranostique sera présentée. La bioconjugaison avec différents vecteurs sera ensuite décrite après avoir justifié le choix des vecteurs et présenté notre stratégie.

I. Différentes stratégies de synthèse du BODIPY

La première synthèse de BODIPY a été réalisée par Treibs et Kreuzer en 1968 en faisant réagir du 2,4-diméthylpyrrole en présence de trifluorure de bore étherate et d'anhydride acétique.⁷⁸ Les BODIPYs peuvent résulter de la condensation de deux molécules de pyrrole avec une fonction aldéhyde ou avec une fonction dérivé d'un acide carboxylique : chlorure d'acyle ou anhydride d'acide ou par auto-condensation du 2-formylpyrrole ou encore par réaction de carbonyle – pyrrole. Ces différentes méthodes de synthèse ainsi que leurs avantages et inconvénients vont être brièvement présentées.^{117,118}

I.1. Synthèse à partir d'un aldéhyde aromatique

Cette voie de synthèse est la plus couramment utilisée.¹¹⁹ Elle consiste, dans une première étape, à condenser deux molécules de pyrrole sur une molécule d'aldéhyde aromatique en catalyse acide aboutissant au dipyrrométhane qui peut être isolé ou engagé directement dans la suite de la synthèse. La deuxième étape consiste en une oxydation en présence d'un dérivé de quinone (2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ) ou

tétrachloro-1,4-benzoquinone (Chloranil)) pour conduire au dipyrrométhène. Enfin la dernière étape consiste en l'introduction du motif « BF₂ », tout d'abord par ajout de base (amine tertiaire : triéthylamine ou diisopropyléthylamine) afin de déprotoner l'un des azotes de la dipyrroline puis par ajout de complexe de trifluorure de bore étherate pour donner le BODIPY (Schéma 2).

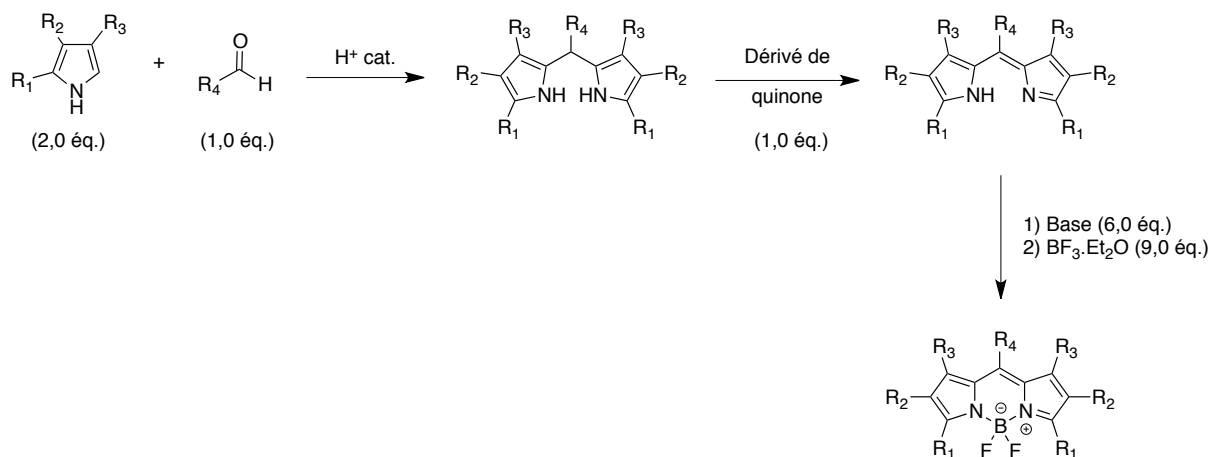


Schéma 2 : Synthèse de BODIPYs à partir d'aldéhydes aromatiques.

Il est important de noter que la condensation pyrrolique avec l'aldéhyde est réalisée dans des conditions diluées afin d'éviter les réactions secondaires d'oligomérisation des pyrroles. Cette voie de synthèse permet d'obtenir des BODIPYs symétriques substitués en position *meso* (R₄) avec des rendements variables et donc permet d'accéder à toute une variété de BODIPYs. De plus, un choix judicieux de l'aldéhyde aromatique permettra une post-fonctionnalisation du BODIPY.

I.2. Synthèse à partir d'un dérivé d'acide carboxylique

Cette méthode de synthèse débute par la condensation de deux molécules de pyrrole avec une molécule d'un dérivé d'acide carboxylique : chlorure d'acyle^{120,121} qui ne nécessite alors pas de catalyse acide ou anhydride d'acide^{122,123} nécessitant parfois une catalyse acide en fonction de l'anhydride mis en réaction (acide de Lewis : trifluorure de bore étherate dans le cas de l'anhydride glutarique). Cette réaction ne nécessite pas d'étape d'oxydation et aboutit au sel de dipyrrométhène qui est généralement engagé directement dans la seconde étape. La dernière étape permettant l'introduction du motif « BF₂ » est la même que précédemment (Schéma 3).

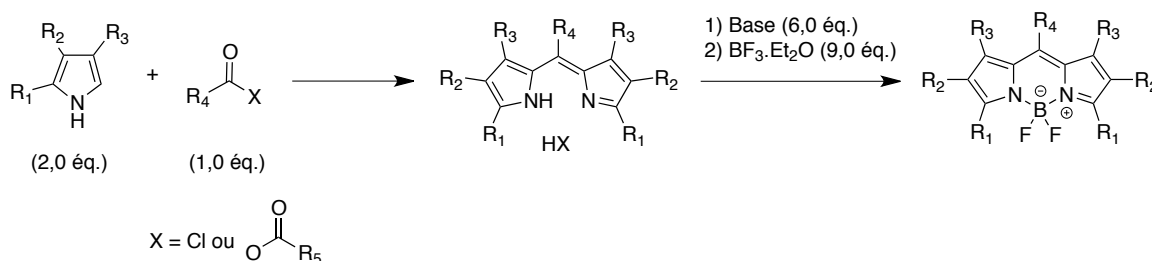


Schéma 3 : Synthèse de BODIPYs à partir de dérivés d'acide carboxylique.

Cette voie de synthèse alternative conduit à des BODIPYs symétriques substitués en *meso* (R_4). Cette méthode a été utilisée pour synthétiser un BODIPY portant une chaîne alkyle se terminant par une fonction acide en faisant réagir le 2,4-diméthylpyrrole avec l'anhydride glutarique. Cette fonction acide permet dans un deuxième temps de greffer le BODIPY sur une protéine par exemple.¹²³

I.3. Synthèse par auto-condensation du 2-formylpyrrole

Cette méthode de synthèse mise au point par Burgess *et coll.* consiste à condenser le 2-formylpyrrole sur lui-même en présence de trichlorure de phosphore.¹²⁴ Cette voie de synthèse aboutit à des BODIPYs symétriques non substitués en position *meso* (Schéma 4).

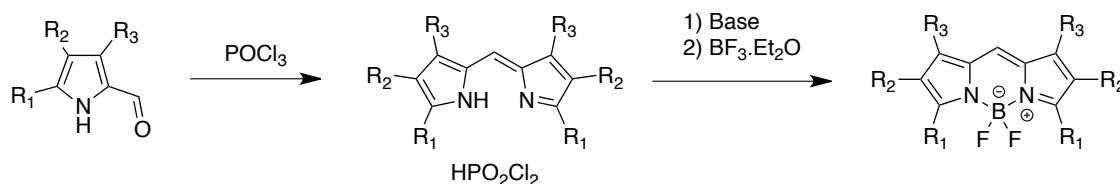


Schéma 4 : Synthèse de BODIPYs par auto-condensation du 2-formylpyrrole.

Toute une série de BODIPYs a ainsi été synthétisée à partir de pyrroles substitués par des groupements alkyles, cycloalkyles ou phényles (R_1 , R_2 et R_3) avec des rendements très variables allant de traces à 92%.

I.4. Synthèse à partir de carbonyle – pyrrole

Jusqu'à maintenant nous avons vu des méthodes de synthèse permettant d'accéder à des BODIPYs substitués en *meso* et sur les pyrroles mais uniquement symétriques. Une voie de synthèse utilisant les céto-pyrroles permet d'accéder à des BODIPYs non symétriques. La synthèse consiste dans un premier temps à préparer l'intermédiaire céto-pyrrole en faisant réagir un pyrrole sous forme de sels de magnésium avec un dérivé d'acide carboxylique (chlorure d'acyle par exemple) qui dans un deuxième temps est mis

en réaction avec un autre pyrrole pour aboutir au BODIPY correspondant non symétrique (Schéma 5).¹²⁵

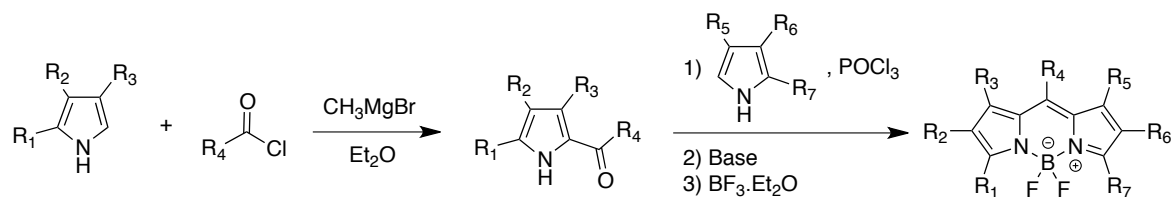


Schéma 5 : Synthèse de BODIPYs non symétriques via des céto-pyrroles.

Il est possible également d'obtenir des BODIPYs non symétriques par condensation d'un 2-formylpyrrole sur un autre pyrrole (Schéma 6). Mais dans ce cas, le BODIPY correspondant bien que non symétrique n'est pas substitué en *meso*.

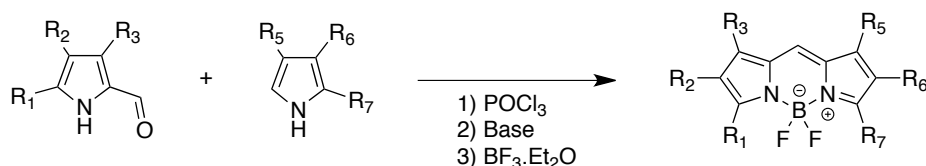


Schéma 6 : Synthèse de BODIPYs non symétriques par condensation de 2-formylpyrrole.

II. Synthèse du théranostique BODI-Au-1

Afin d'optimiser la synthèse de **BODI-Au-0** et de le rendre plus biocompatible, nous avons travaillé sur l'introduction d'un nouvel espaceur. La stratégie de synthèse envisagée se décompose en trois étapes majeures (Figure 32) :

- Synthèse du synthon BODIPY
- Synthèse du complexe d'or
- Couplage final

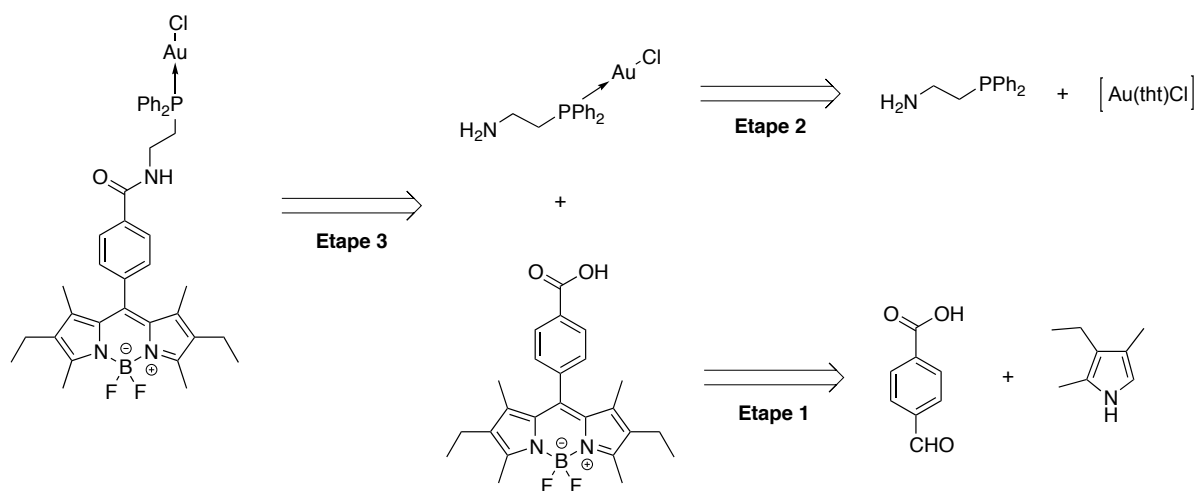


Figure 32 : Stratégie de synthèse du théranostique BODI-Au-1.

II.1. Synthèse du synthon BODIPY

Pour la synthèse du précurseur BODIPY **5**, la voie de synthèse partant de l'aldéhyde a été privilégiée (cf. I.1). La synthèse de ce composé est décrite dans la littérature par Tomasulo *et al.*¹²⁶ et a été précédemment optimisée dans notre laboratoire à l'échelle de la dizaine de gramme. Cette synthèse se compose de trois étapes réalisées « one pot ». La première étape consiste à faire réagir un équivalent de 4-carboxybenzaldehyde avec deux équivalents de 2,4-diméthyl-3-éthylpyrrole (préalablement distillé) dans le dichlorométhane, en présence d'acide trifluoroacétique (TFA) pendant 24 h et à température ambiante. Le dipyrrométhane **3** obtenu est ensuite oxydé par la DDQ pour conduire au dipyrrométhène correspondant **4**. La troisième et dernière étape permettant l'introduction du motif « BF₂ » se fait en présence de triéthylamine et de complexe de trifluorure de bore étherate (BF₃.Et₂O) aboutissant après étapes de lavage et purification sur colonne de silice au composé **5** avec un rendement global de 56% (Schéma 7).

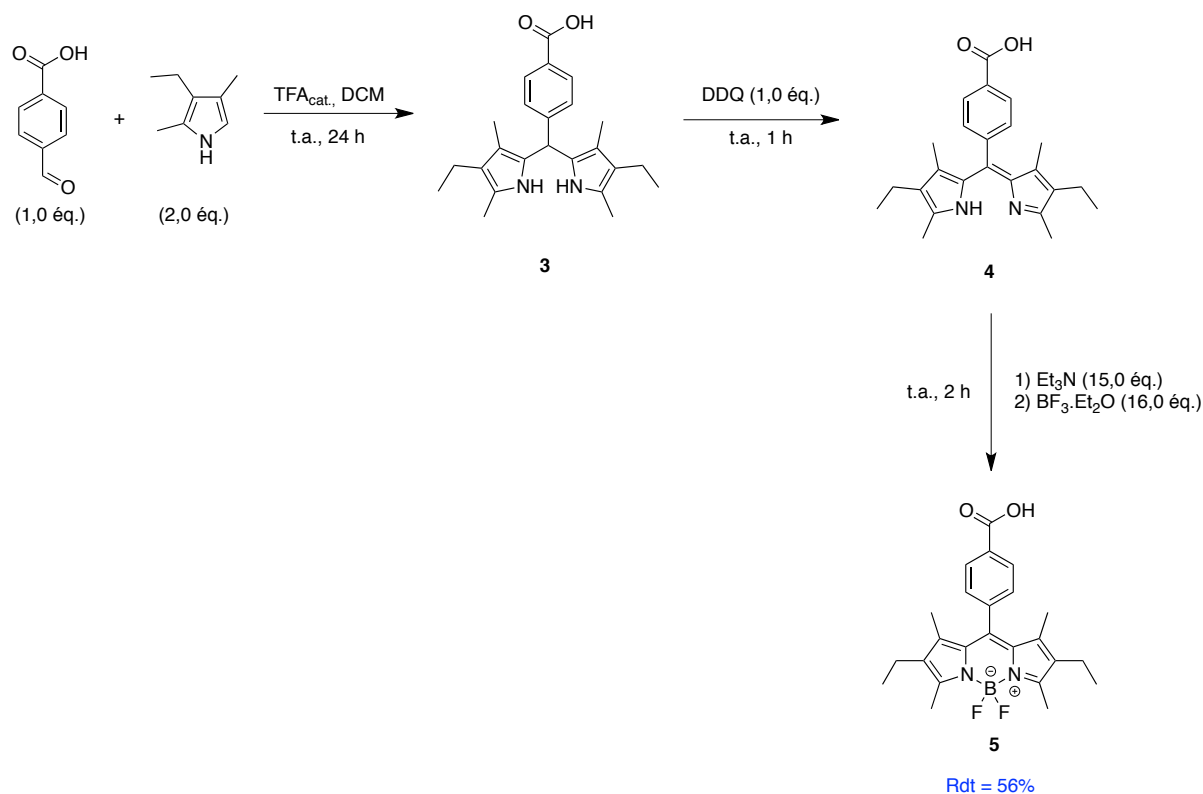


Schéma 7 : Synthèse du précurseur BODIPY acide 5.

II.2. Synthèse du complexe phosphine-or précurseur

Contrairement à la stratégie précédemment développée par le Docteur Tasan,¹⁰³ la complexation de l'or par la phosphine n'est pas réalisée en dernière étape. En effet, nous avons souhaité travailler sur une stratégie plus convergente. Cela est rendu possible par la stabilité relativement importante du complexe d'or. De plus, la phosphine utilisée pour cette deuxième génération de théranostiques est plus sensible à l'oxygène et il est ainsi plus aisé de la « protéger » en la coordonnant sur le centre métallique dès le début de la synthèse. Un dernier avantage à cette stratégie est que le produit potentiellement sensible à l'air est commercial et donc avec une valeur ajoutée bien moindre.

Le complexe phosphine-or précurseur est obtenu en une étape par réaction entre la 2-aminoéthyl-diphénylphosphine commerciale et le complexe d'or [Au(tht)Cl] préalablement synthétisé.

Le complexe [Au(tht)Cl] **6** est préparé en faisant réagir de l'acide tétrachloroaurique $\text{HAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ avec un peu plus de deux équivalents de tétrahydrothiophène (tht) dans un mélange éthanol absolu / eau distillée (5 : 1). Le deuxième équivalent de tht permet la réduction de l'or ($\text{Au(III)} \rightarrow \text{Au(I)}$). Ce mélange est agité pendant 30 min à température

ambiante. Le précipité formé est filtré sur fritté puis lavé abondamment avec de l'éthanol absolu pour obtenir le complexe $[\text{Au}(\text{tht})\text{Cl}]$ **6** avec un rendement de 72% (Schéma 8).

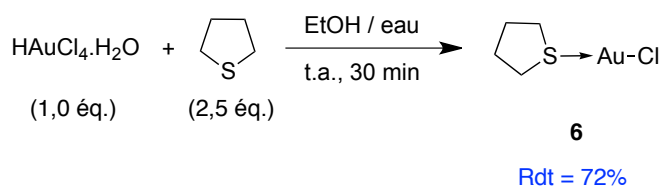


Schéma 8 : Synthèse du complexe $[\text{Au}(\text{tht})\text{Cl}]$ **6.**

Le complexe phosphine-or **7** est préparé en boîte à gants afin d'éviter l'oxydation de la phosphine. Le complexe $[\text{Au}(\text{tht})\text{Cl}]$ **6** est mis en réaction avec la 2-aminoéthyl-diphénylphosphine en respectant une stœchiométrie parfaite dans du dichlorométhane sec pendant une nuit à température ambiante. Une analyse RMN ^{31}P découplée du proton est effectuée afin de vérifier que la conversion soit totale. En effet, il est observé un changement significatif de déplacement chimique entre la phosphine libre (singulet à $\delta = -21,8$ ppm) et la phosphine complexée (singulet à $\delta = 24,0$ ppm). Le brut réactionnel est lavé plusieurs fois au pentane pour obtenir le composé **7** pur avec un rendement de 87% sans autre purification (Schéma 9).

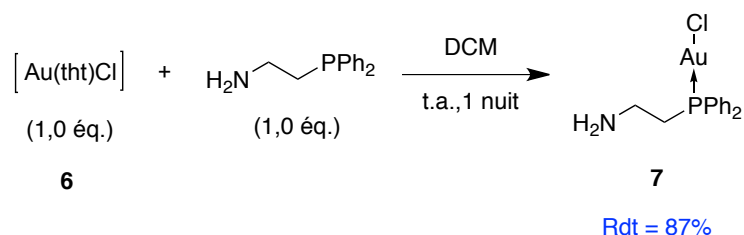


Schéma 9 : Synthèse du complexe phosphine-or précurseur **7.**

Les spectres RMN du phosphore ^{31}P découplé du proton (déblindage du signal de $\delta = -21,8$ ppm à $\delta = 24,0$ ppm) et du proton ^1H (disparition des signaux caractéristiques du tétrahydrothiophène complexé à l'or) montrent bien une conversion totale (Figure 33 & Figure 34). Il est à noter que des tests en fin de thèse ont montré que les mêmes résultats pouvaient être obtenus après 3 h de réaction.

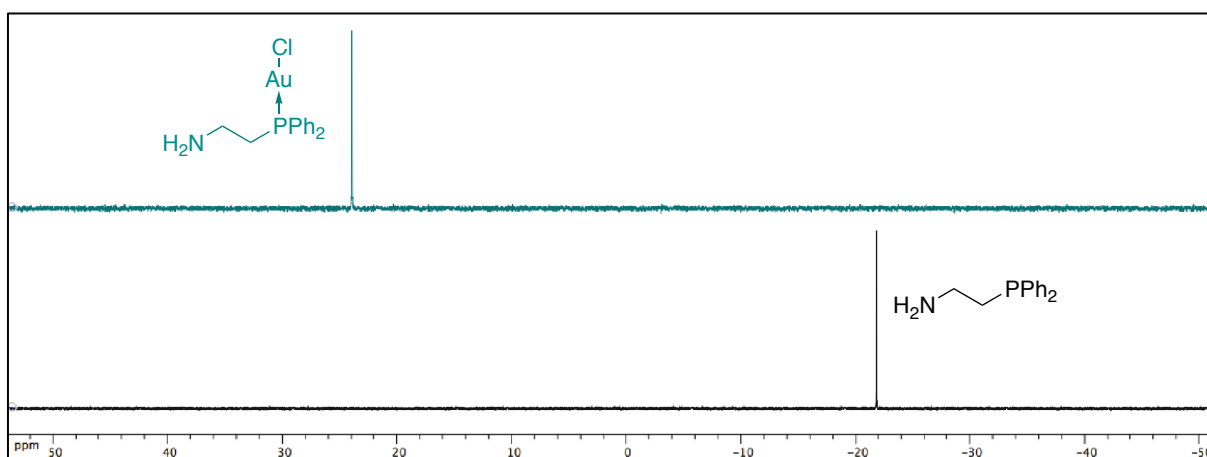


Figure 33 : Spectres RMN ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ du ligand phosphine libre et complexé à l'or **7** (121,49 MHz, CDCl_3 , 300 K).

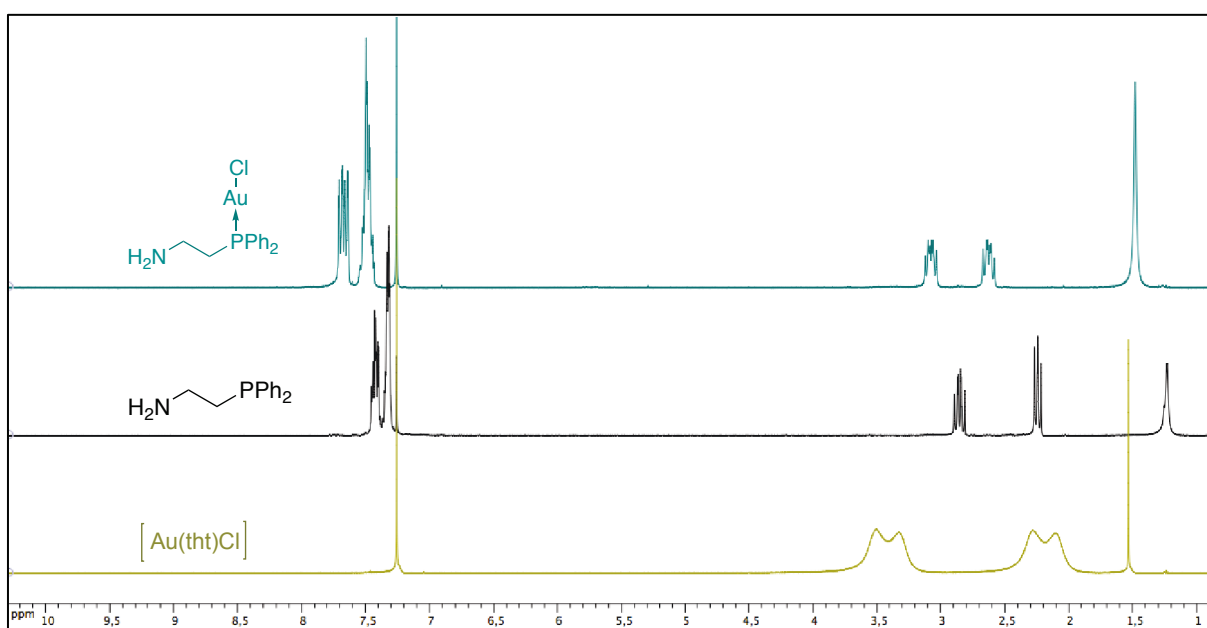


Figure 34 : Spectres RMN ^1H des réactifs et du produit **7** (300,13 MHz, CDCl_3 , 300 K).

II.3. Couplage entre le complexe d'or et le BODIPY acide

L'introduction du complexe d'or sur le BODIPY se fait par un couplage de type peptidique entre le BODIPY acide et la fonction amine du complexe phosphine-or **7**. La fonction acide carboxylique n'étant pas assez réactive, il est nécessaire de procéder à son activation préalable en la faisant réagir avec la *N*-hydroxysuccinimide. Pour des raisons de facilité de purification, cet ester activé **8** est isolé avec un rendement de 74%. Il est ensuite mis en réaction avec un léger excès de complexe phosphine-or **7** au reflux du chloroforme pendant 23 h en présence de triéthylamine sous atmosphère inerte (Schéma 10). L'excès de complexe d'or est nécessaire afin de s'assurer qu'il ne reste plus de BODIPY **8** dans le milieu. En effet, il est très compliqué de séparer **BODI-Au-1** de **8** lors de la purification et

nous souhaitons nous affranchir d'une purification sur colonne. À nouveau, une analyse RMN ^{31}P « No Lock » à 23 h permet de confirmer que la conversion est totale (Figure 35). Cette fois, la purification est plus délicate. Après avoir essayé de nombreux protocoles, celui qui a donné les meilleurs résultats en termes de pureté et de rendement est le suivant : lavage avec de l'acide chlorhydrique 0,1 M pour protoner l'amine pendante du complexe phosphine-or **7** puis lavages à l'eau distillée pour finir d'éliminer l'excès de complexe de départ, et enfin séchage sur sulfate de magnésium et concentration sous vide. Le solide obtenu est lavé plusieurs fois au pentane et séché sous vide pour donner **BODI-Au-1** avec un rendement de 77%.

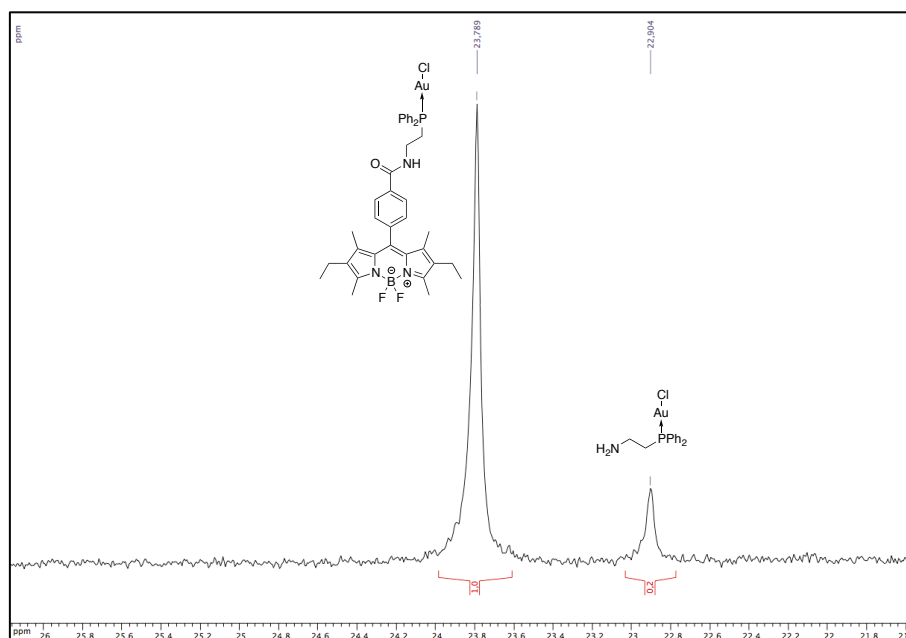
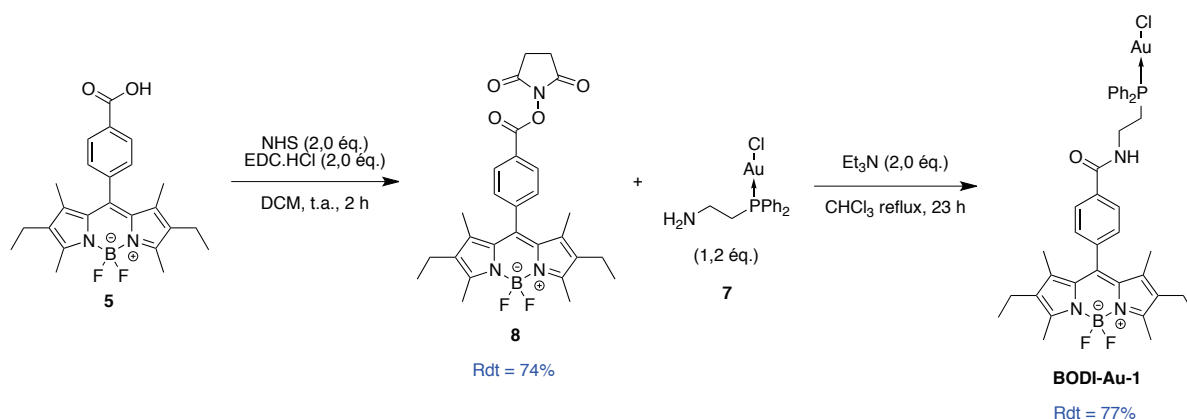


Figure 35 : RMN ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ « No Lock » du milieu réactionnel à 23 h (202,44 MHz, 300 K).

L'analyse RMN ^{31}P après lavage a permis de confirmer l'élimination de l'excès de complexe **7** (Figure 36).

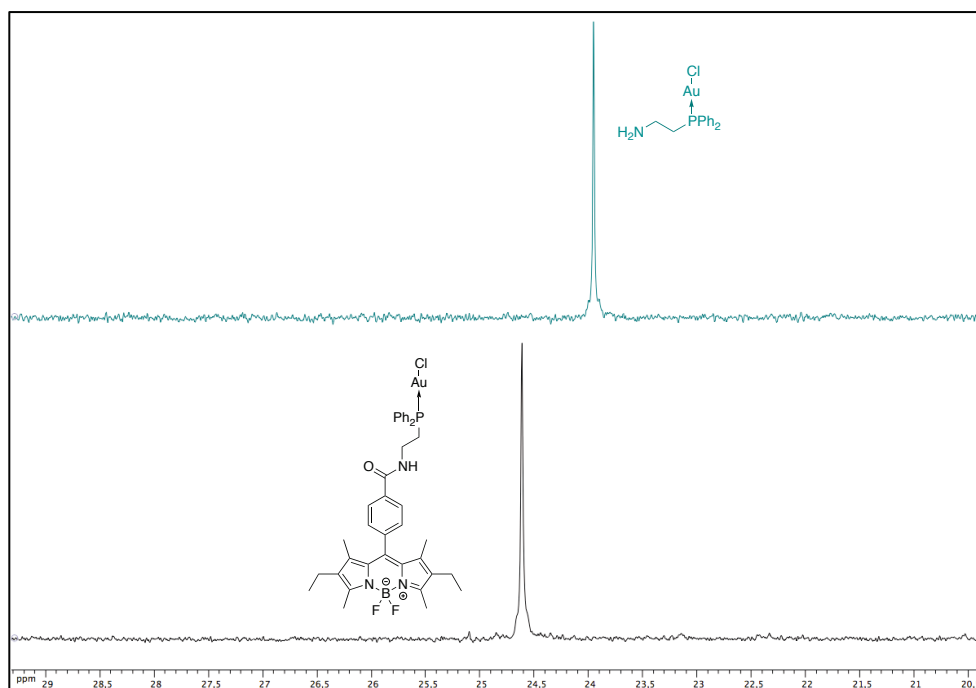


Figure 36 : Spectres RMN ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ du complexe formé BODI-Au-1 et du complexe 7 (121,49 MHz, CDCl_3 , 300 K).

Afin de voir les améliorations réalisées pour la synthèse du théranostique **BODI-Au-1** par rapport à la précédente synthèse de **BODI-Au-0**, certaines caractéristiques des voies de synthèse des deux complexes d'or sont rassemblées (celles-ci sont données à partir du BODIPY acide **5**) (Tableau 4).

Synthèse	Rendement	Étapes ^a	Temps de réaction	Nb de colonnes chromatographique	Excès de réactifs
BODI-Au-0	48%	7 (4) ^b	> 100 h	4	40 éq. Max
BODI-Au-1	48%	4 (2) ^b	< 30 h	1	2,5 éq. Max

^a correspond au nombre d'étapes total

^b correspond au nombre d'étapes de la séquence linéaire la plus longue

Tableau 4 : Comparatif des voies de synthèse des deux complexes d'or BODI-Au-0 et BODI-Au-1.

Au regard de ce tableau, mis à part le rendement global de synthèse qui est équivalent pour les deux voies, il est évident que la deuxième stratégie est plus intéressante pour obtenir le complexe d'or. Elle nécessite moins d'étapes, un temps de réaction beaucoup plus court et la différence serait encore plus nette si l'on intégrait les temps de manipulation. De plus, pour la deuxième voie de synthèse, seule la synthèse de l'ester activé nécessite une purification par colonne, les autres étapes n'impliquant

généralement qu'une filtration. Si l'on souhaite passer à plus grande échelle, ce sera un avantage significatif. Une comparaison un peu plus poussée des deux synthèses montre également la différence au niveau économie d'atomes en faveur de la deuxième synthèse. Bien sûr, il n'est pas encore question de passer à une synthèse selon les exigences industrielles où il faudrait notamment changer certains solvants, mais nous avons souhaité garder en tête cet objectif. Le point le plus critique de cette deuxième voie est l'utilisation d'une phosphine sensible à l'air sur une des étapes. Cette difficulté est également présente pour la première voie de synthèse où l'on utilise de la diphénylphosphine sur une étape et où la triarylphosphine, même s'il elle est moins facilement oxydable, est présente sur quatre étapes.

Pour conclure, si l'on souhaite synthétiser le complexe d'or, la deuxième voie de synthèse est préférable, mais si l'on veut disposer d'un BODIPY-phosphine pour le coordonner à divers métaux, la première stratégie sera à privilégier.

III. Vectorisation du théranostique BODI-Au-1

Le deuxième objectif de cette partie est de mettre au point une méthode pour greffer rapidement en dernière étape toute une gamme de vecteurs. C'est cette partie qui intéressait plus particulièrement l'entreprise (Fluoptics®). En effet, son souhait était de pouvoir fournir à ses clients un « kit » : imageur / agent thérapeutique traçable spécifique qui puisse s'adapter facilement aux désirs des clients qui peuvent souhaiter cibler différents récepteurs. De plus, cet ajout d'un vecteur sur notre agent thérapeutique traçable permet de nous rapprocher du concept de théranostique originel puisque des informations aidant au diagnostic pourraient être obtenues.

D'un point de vue recherche, greffer un vecteur sur notre théranostique devrait permettre d'améliorer ses propriétés biologiques que ce soit en termes d'efficacité ou de sélectivité.

Dans un premier temps, le choix des vecteurs sera justifié puis après la description de plusieurs méthodes de bioconjugaison, notre stratégie sera présentée puis appliquée à la synthèse des différents composés.

III.1. Choix des vecteurs

Les vecteurs peuvent être classés en plusieurs catégories.¹²⁷ On peut citer par exemple les petites biomolécules (dérivés de sucres, hormones, vitamines...), les peptides et les biomacromolécules comme les anticorps. Nous avons choisi des vecteurs dans trois catégories : deux dérivés du glucose, un dérivé peptidique analogue de la bombésine et un dérivé de l'acide folique.

III.1.1. Dérivés du glucose

Comme précisé en introduction, un des complexes d'or les plus connus est sans nul doute l'auranofine (Figure 37). Quand on y regarde de plus près, ce composé est relativement simple : une trialkylphosphine comme ligand L et un thioglucose peracétylé comme ligand X. C'est ce deuxième élément qui a retenu notre attention. En effet, si l'utilisation d'un squelette thioglucose à la place du glucose se justifie simplement par la forte thiophilie de l'or, il est beaucoup plus délicat de rationaliser l'emploi d'une version protégée du sucre (Figure 37). Ce choix paraît d'autant plus étonnant que le composé résultant est moins hydrophile et moins affiné pour les récepteurs au glucose. De nombreuses études ont porté sur le développement de complexes d'or portant ce ligand. La plupart du temps une amélioration significative d'activité est observée quand on substitue le ligand chlorure d'un complexe « P-Au-Cl » par la version thiolate du tetraacétate de thioglucose, amélioration souvent plus modérée dans le cas du thiosucre déprotégé. Aujourd'hui, aucune étude n'explique clairement pourquoi la version peracétylée donne de meilleurs résultats. Il semble qu'*in vitro* le composé tetraacétate pénètre plus efficacement dans les cellules. Certains travaux indiquent que les complexes correspondants pénètrent dans la cellule *via* les transporteurs au glucose alors que d'autres mettent en évidence un transport essentiellement passif. Une explication possible serait que ce ligand procure au complexe un bon rapport hydrophilie / lipophilie pour passer la membrane cellulaire et que le métabolisme et / ou la biodistribution au sein de la cellule soit différente pour un complexe portant un thioglucose ou un thioglucose peracétylé. Nous avons donc choisi d'introduire ces deux « ligands-vecteurs » d'une part pour voir si, à l'aide de notre sonde optique, nous pouvions obtenir des informations supplémentaires sur le pourquoi de ces différences et pour essayer d'obtenir *via* ces vecteurs une certaine sélectivité cellules tumorales / cellules saines. En effet, les cellules tumorales se divisant rapidement ont un métabolisme accru et donc un besoin important de nutriments, notamment de sucres. Pour

ce faire, les cellules cancéreuses surexpriment entre autres les transporteurs au glucose (Glut) une famille de récepteurs transmembranaires jouant un rôle clé dans le métabolisme cellulaire du glucose.^{128,129}

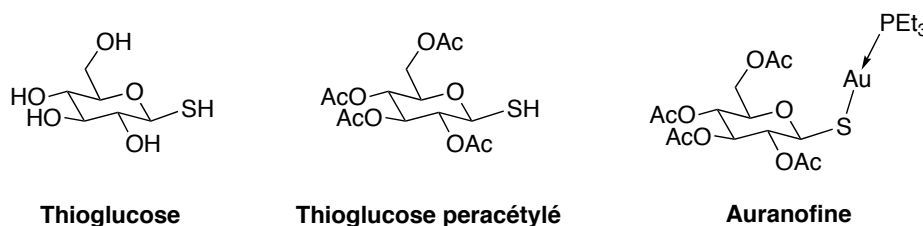


Figure 37 : Structures du thioglucose, du thioglucose peracétylé et de l'auranofine.

III.1.2. Dérivé de la bombésine

Nous avons également travaillé sur l'introduction d'un vecteur peptidique dérivé de la bombésine **BBN-SH**, ciblant les récepteurs GRP (« gastrin-releasing peptide »). Les récepteurs GRP sont en effet surexprimés dans de nombreux cancers, tels que les cancers du poumon à petites cellules, cancers du sein, prostate ou encore pancréas.^{130,131} La bombésine est un peptide composé de 14 acides aminés. Ce peptide agoniste active trois différents récepteurs couplés aux protéines G : GRPR, NMBR et BRS-3. L'affinité de liaison entre la bombésine et son récepteur est élevée (de l'ordre de 0,1 nM), et conduit à l'activation de multiples voies de signalisation intracellulaires *in vitro* : activation des phospholipases C β , D et A2, augmentation de la concentration de Ca²⁺ intracellulaire, activation de la protéine kinase C, phosphorylation de diverses protéines dont les MAP (« Mitogen Activated Protein »), kinases ERK2 et ERK1 et plusieurs protéines d'adhérence focale.¹³²

Dans notre cas, nous avons choisi de travailler avec un analogue de la bombésine, la bombésine₍₇₋₁₄₎ (Figure 38, séquence en rouge), présentant la séquence peptidique minimale permettant d'avoir une très bonne affinité pour les récepteurs GRP.¹³³ De plus, nous voulons exploiter le caractère agoniste de ce peptide dans le but de favoriser l'internalisation de nos composés théranostiques sélectivement *via* les récepteurs GRP. Enfin, un espaceur hydrophile, l'acide 2-(2-(2-aminoéthoxy)éthoxy) acétique (AEEAc), se terminant par un résidu cystéine est ajouté à l'extrémité de la séquence, afin d'augmenter la solubilité aqueuse, d'empêcher la partie BODIPY-or de diminuer l'affinité du peptide pour son récepteur et de minimiser l'impact de la bombésine sur la fluorescence du BODIPY.

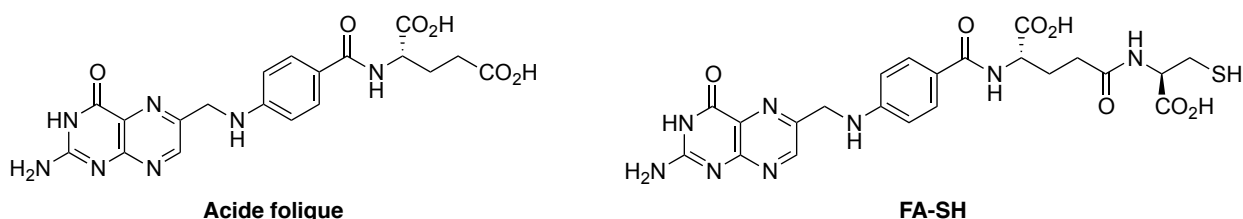
Glu-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂**Bombésine**Cys-AEEAc-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂**BBN-SH**

AEEAc = acide 2-(2-(2-aminoéthoxy)éthoxy) acétique

Figure 38 : Séquence de la bombésine avec la séquence 7-14 en rouge & de BBN-SH.

III.1.3. Dérivé de l'acide folique

Nous avons également travaillé à l'introduction d'un dérivé de l'acide folique **FA-SH** qui est composé de l'acide folique auquel est ajouté un résidu cystéine (Figure 39). L'acide folique ou vitamine B9 est essentiel pour la synthèse des acides nucléiques et donc pour la prolifération cellulaire. Les récepteurs à l'acide folique (FR) sont surexprimés dans de nombreux cancers avec une expression limitée dans les tissus sains.¹³⁴ Cette vitamine est une molécule vectrice très étudiée et qui a donné des résultats prometteurs en tant qu'agent de ciblage permettant de délivrer des agents thérapeutiques¹³⁵⁻¹³⁸ ou d'imagerie¹³⁹⁻¹⁴² sélectivement dans les cellules tumorales *via* une internalisation par endocytose. Des essais cliniques sont en cours pour plusieurs d'entre eux.¹⁴³ L'acide folique se lie à ses récepteurs (FR) exprimés à la surface des cellules avec une très bonne affinité (de l'ordre de 0,1 nM) ainsi qu'une très bonne sélectivité, les récepteurs sont ensuite internalisés par endocytose. L'endosome formé subit une acidification vers un pH situé entre 6 et 5 entraînant un changement conformationnel du récepteur et permettant ainsi le relargage de l'acide folique et le recyclage des récepteurs à la surface des cellules.¹⁴⁴ Les récepteurs à l'acide folique sont surexprimés dans un grand nombre de cancers humains et tout particulièrement dans les cancers des ovaires, de l'utérus et du cerveau.¹⁴⁵

**Figure 39 : Structure de l'acide folique et de FA-SH.**

III.2. Choix d'une méthode de bioconjugaison

Avec l'accélération du développement des vecteurs biologiques et leur importance dans la recherche médicale que ce soit pour la compréhension des phénomènes biologiques ou l'obtention d'un traitement toujours plus ciblé, la mise au point de nouvelles méthodes de bioconjugaison toujours plus performantes et sélectives a explosé. Plusieurs revues ont été publiées notamment par Bertozzi^{146,147} et Mc Kay.¹⁴⁸ Elles permettent d'avoir une idée assez complète des stratégies que l'on peut employer pour greffer un vecteur sur un principe actif, une sonde ou dans notre cas, un agent thérapeutique traçable. Il existe des méthodes de bioconjugaison par création d'interactions non covalentes, comme l'interaction biotine – streptavidine ou encore la chélation du nickel nitriloacétate par le peptide hexahistidine.¹⁴⁶ Ces stratégies sont particulièrement intéressantes pour des vecteurs de taille assez importante de type anticorps ou autres protéines. Dans notre cas, nous avons choisi de travailler avec des vecteurs de taille relativement limitée et ce type de bioconjugaison implique généralement des liens assez volumineux. Nous avons donc opté pour une bioconjugaison par création de liaison(s) covalente(s).

L'étape de bioconjugaison fait intervenir deux partenaires :

- la molécule (agent d'imagerie, thérapeutique ou théranostique) à amener sur le site souhaité
- le vecteur (petite biomolécule, peptide, anticorps...) qui va diriger l'autre partenaire sur la cible souhaitée.

Le couplage entre ces deux partenaires conduit à la création d'une liaison covalente et toute la difficulté réside dans la spécificité de cette réaction entre la fonction de greffage de la molécule à cibler et la fonction du vecteur qui doit donc être bioorthogonale. Le choix de la fonction de greffage est donc primordial dans la spécificité et l'efficacité de la bioconjugaison et est régi par la « fonction d'accroche » du vecteur mis en réaction. Un aperçu des différentes fonctions et stratégies couramment employées est présenté dans les paragraphes suivants.

III.2.1. Réactions de bioconjugaison basées sur la fonction amine

La fonction amine primaire est très souvent présente dans les molécules vectrices, en particulier dans les peptides et les anticorps qui possèdent des résidus lysine et une position *N*-terminale. Dans ce cas, l'agent à vectoriser doit posséder une fonction acide activée qui peut être :

- un ester activé (*N*-hydroxysuccinimide NHS, sulfo-NHS ou pentafluorophényl),
- un anhydride cyclique,
- un isothiocyanate...

Cette réaction conduit à la formation d'une liaison amide, ou thiourée dans le cas de l'isothiocyanate, stable en milieu physiologique (Tableau 5).

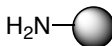
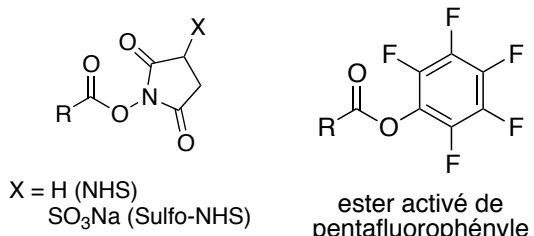
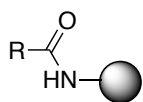
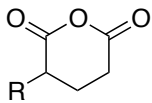
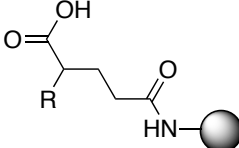
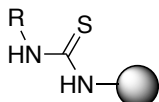
	Fonction de greffage	Produit
 Ester activé	 X = H (NHS) SO ₃ Na (Sulfo-NHS) ester activé de pentafluorophényle	
Anhydride cyclique	 anhydride cyclique à 6 atomes	
Isothiocyanate	R-N=C=S isothiocyanate	

Tableau 5 : Principales méthodes de bioconjugaison des amines primaires.

III.2.2. Réactions de bioconjugaison basées sur la fonction thiol

La fonction thiol est retrouvée dans la cystéine, acide aminé présent dans de nombreuses biomolécules, cette fonction est donc une cible efficace pour la bioconjugaison. La fonction de greffage la plus couramment rencontrée dans ce cas est le maléimide aboutissant après réaction de bioconjugaison à un thioéther (Tableau 6). Cette réaction est particulièrement appréciée des biologistes parce qu'elle met en jeu des fonctions stables en milieu biologique, qu'elle nécessite des conditions douces et que le maléimide est relativement spécifique de la fonction thiol. Cependant certains chercheurs ont montré que le thioéther formé peut subir des réactions d'échange de thiols *in vivo*.^{149,150}

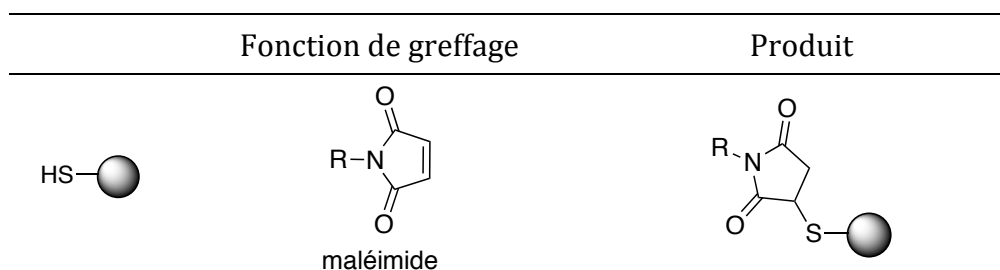


Tableau 6 : Méthode principale de bioconjugaison des thiols.

Cependant, il existe de nombreuses autres méthodes de bioconjugaison des résidus cystéine.¹⁴⁸

III.2.3. Réactions de bioconjugaison basées sur la fonction azoture

La fonction azoture est absente des biomolécules naturelles et n'est pas réactive vis à vis de la très grande majorité des fonctions présentes sur ces dernières. Il est donc nécessaire dans ce cas d'introduire la fonction azoture soit par insertion d'un acide aminé non naturel, soit par couplage du vecteur avec un intermédiaire possédant la fonction réactive. L'utilisation de cette fonction azoture est donc une méthode de choix pour l'introduction bioorthogonale d'un partenaire. La méthode de bioconjugaison la plus utilisée est une réaction de chimie clic (« click chemistry ») entre l'azoture et un alcyne, cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par du cuivre (I) (Tableau 7) couramment nommée CuAAC (« copper-catalysed azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition ») développée par Sharpless *et coll.*^{151,152} et par Meldal *et coll.*¹⁵³ Mais la toxicité du cuivre (I) a limité le développement de cette réaction dans une stratégie de conjugaison bioorthogonale pour des application *in vivo*.^{146,154} Afin de s'affranchir de ce catalyseur, une nouvelle réaction de bioconjugaison a émergé impliquant un alcyne contraint, dérivés du cyclooctyne, cette réaction est nommée SPAAC (« strain promoted azide-alkyne cycloaddition »).^{147,155,156}

En parallèle de la cycloaddition 1,3-dipolaire, une méthode de bioconjugaison impliquant la fonction azoture et une triarylphosphine et s'inspirant de la réaction de Staudinger a été développée par Bertozzi *et al.*^{157,158} (Tableau 7).

	Fonction de greffage	Produit
	CuAAC $R-C\equiv C$ Cu(I)	
	SPAAC dérivé cyclooctyne	
	Ligation Staudinger	

Tableau 7 : Méthodes de bioconjugaison des azotures.

III.2.4. Réactions de bioconjugaison basées sur la fonction tétrazine

Récemment une nouvelle stratégie « click » est apparue faisant intervenir deux partenaires : une 1,2,4,5-tétrazine et un alcène contraint (classiquement le *trans*-cyclooctène) qui par réaction d'hétéro-Diels-Alder à demande inverse aboutit à la ligation des deux partenaires^{159,160}(Tableau 8).

Fonction de greffage	Produit

Tableau 8 : Méthode de bioconjugaison des tétrazines.

III.2.5. Notre stratégie

Nous avons opté pour une stratégie peu employée en bioconjugaison mais régulièrement utilisée en chimie de l'or. Il s'agit de réaliser une réaction d'échange de ligands X par substitution du chlorure présent sur notre complexe d'or initial par un vecteur possédant une fonction thiolate générée *in situ* ou non. Cette méthode repose sur la forte thiophilie de l'or.¹⁶¹⁻¹⁶³

Cette stratégie à l'avantage de pouvoir accrocher tout composé comportant une fonction thiol de manière sélective et quantitative en une seule étape. Bien sûr son inconvénient principal est qu'elle nécessite la présence d'un complexe d'or qui peut impliquer plusieurs étapes de synthèse et surtout modifier profondément les propriétés

biologiques du composé. Dans notre cas, comme le complexe fait partie intégrante du composé, cette méthode ne semble avoir que des avantages.

III.3. Synthèse des vecteurs et bioconjugaison

Comme cela vient d'être présenté, l'introduction des différents vecteurs s'est faite *via* l'atome d'or par une réaction d'échange de ligand entre l'atome de chlore et un dérivé thiolate. Le thioglucose peracétylé et le thioglucose sont commercialement disponibles sous leur forme thiol ou thiolate. Le dérivé de bombésine **BBN-SH** a quant à lui dû être synthétisé. De même, il n'existe pas de dérivé d'acide folique portant un groupe « -SH ».

III.3.1. Introduction du thioglucose peracétylé : synthèse de BODI-Au-2

Afin de procéder à l'échange de ligand, le thioglucose peracétylé est dans un premier temps déprotonné avec de la soude à 0 °C formant le thiolate correspondant puis ajouté lentement au complexe BODIPY – or (I) **BODI-Au-1**.¹⁶¹ Un suivi réactionnel par RMN ³¹P est réalisé. En effet, le singulet à 25,7 ppm pour **BODI-Au-1** devient un large singulet, caractéristique des composés phosphine-or-soufre,¹⁶⁴ à 31,0 ppm (Figure 40). Après filtration, lavages et séchage, le complexe **BODI-Au-2** est obtenu avec un rendement de 82% (Schéma 11). Il est à noter que la réaction se fait sous atmosphère inerte et avec des solvants désoxygénés afin d'éviter l'oxydation du thiol en pont disulfure.

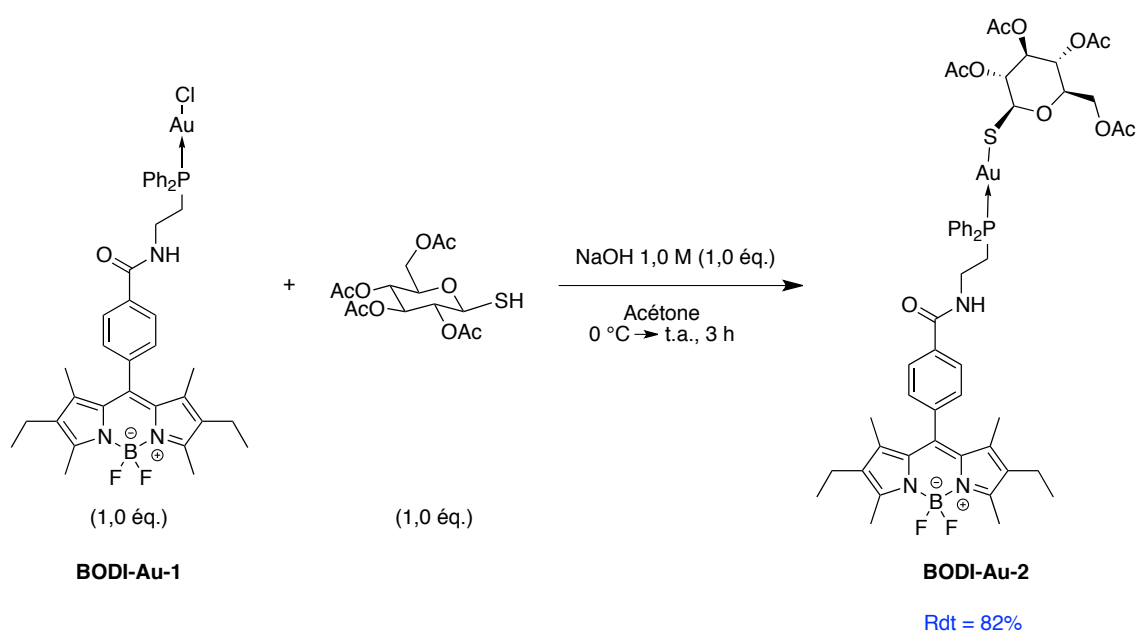


Schéma 11 : Synthèse de BODI-Au-2.

III.3.2. Introduction du thioglucose : synthèse de BODI-Au-3

Le même protocole est utilisé pour introduire le thioglucose à l'exception que celui-ci est commercial sous forme thiolate. Ainsi, le sel de sodium de thioglucose en solution est ajouté à **BODI-Au-1**. Pour des raisons de solubilité du dérivé de glucose la réaction est réalisée dans un mélange méthanol / dichlorométhane en lieu et place de l'acétone. Un suivi réactionnel par RMN ^{31}P est réalisé. Après filtration, lavages et séchage, le complexe **BODI-Au-2** est obtenu avec un rendement de 74% (Schéma 12).

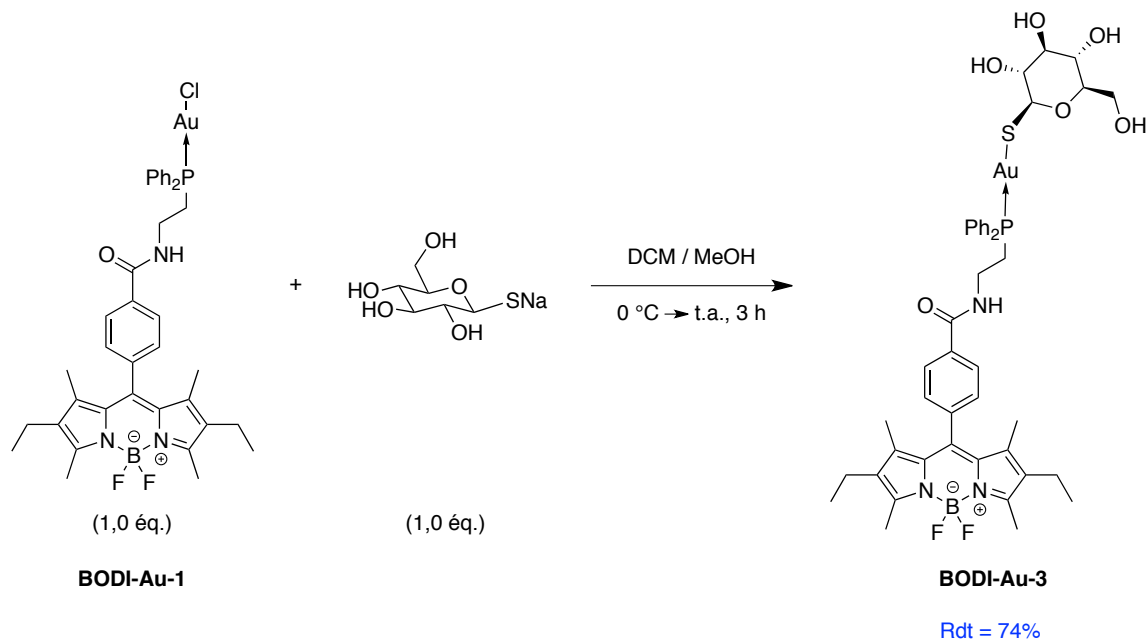


Schéma 12 : Synthèse de BODI-Au-3.

III.3.3. Introduction du dérivé de la bombésine : synthèse de BODI-Au-4

III.3.3.1. Synthèse du dérivé de la bombésine BBN-SH

La synthèse du peptide **BBN-SH** a été réalisée par le Docteur Victor Goncalves. Le peptide **BBN-SH** (Cys–AEEAc–bombésine₍₇₋₁₄₎) est synthétisé sur phase solide dans un synthétiseur micro-ondes en utilisant une résine Rink amide AM acidolabile. Cette résine permet l'obtention d'un peptide C_{ter} amide. En effet, la méthionine de la bombésine est sous forme amide, la forme acide entraînant une perte d'affinité pour les GRPR.¹⁶⁵ Une stratégie Fmoc (9-fluorénylméthoxycarbone) est utilisée à savoir que tous les acides aminés ainsi que l'espaceur acide 2-(2-(2-aminoéthoxy)éthoxy) acétique (AEEAc) sont *N*-protégés par un groupement Fmoc, basolabile. Les chaînes latérales des acides aminés (His, Trp, Gln et Cys) sont protégées de manière orthogonale avec des groupements acidolabiles (monométhoxytrityle (MMTr), *tert*-butyloxycarbone (Boc)), trityle (Trt)). L'espaceur

AEEAc est choisi car il possède les fonctions nécessaires pour un couplage peptidique (acide et amine) et il est hydrosoluble. De plus il est synthétisé au laboratoire à l'échelle du gramme.

La synthèse s'est effectuée de C_{ter} à N_{ter} . Dans un premier temps, la méthionine N-protégée (Fmoc-Met-OH) est fixée sur la résine Rink amide par couplage peptidique suivi d'une déprotection du groupement Fmoc à l'aide de pipéridine puis l'acide aminé suivant (Fmoc-Leu-OH) est couplé. Cette séquence déprotection / couplage est répétée jusqu'à élongation complète du peptide. En fin de synthèse, un traitement acide permet de cliver le peptide de la résine et les groupements protecteurs des chaînes latérales des acides aminés concernés. Ce traitement est réalisé avec un mélange TFA / TIS / DODT / eau (acide trifluoroacétique / triisopropylsilane / 2,2'-(éthylènedioxy)diéthanethiol). L'ajout de TIS et de DODT permet de piéger les carbocations formés lors du clivage acide, de plus ce milieu réducteur évite l'oxydation de la cystéine. Le solide obtenu est ensuite solubilisé dans un mélange eau / acétonitrile et purifié par RP-HPLC semi-préparative. La fraction collectée est lyophilisée pour donner **BBN-SH** sous forme de sels de TFA avec un rendement de 18% (60 mg) (Schéma 13).

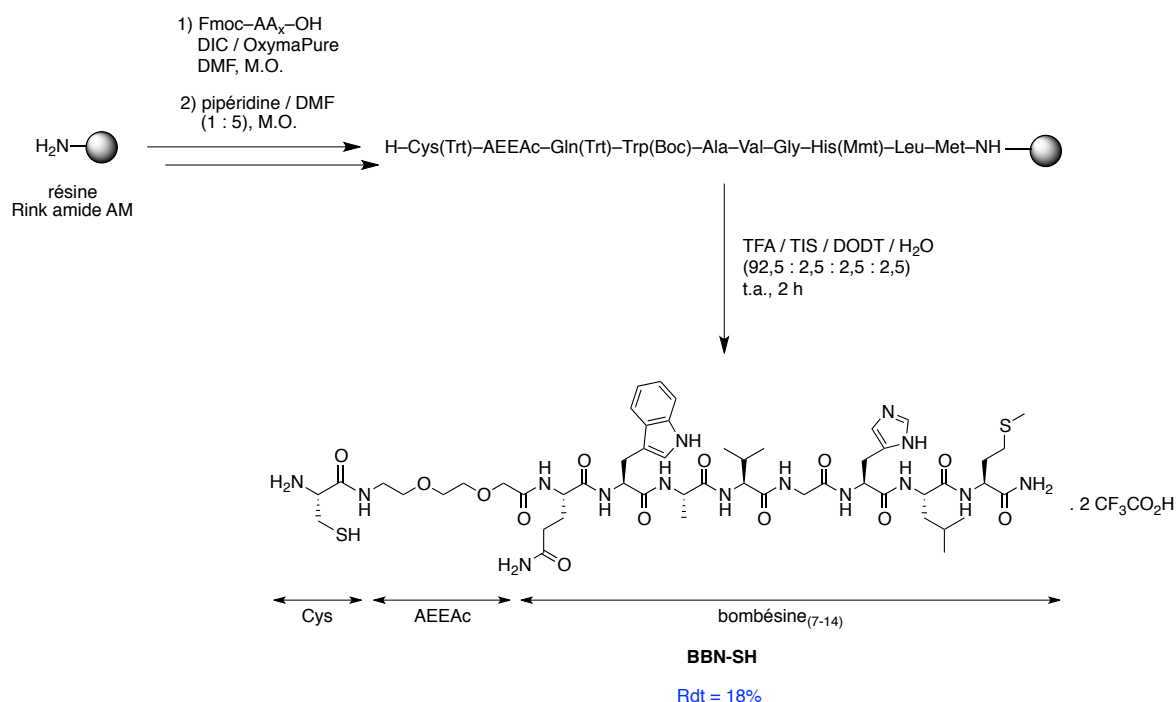
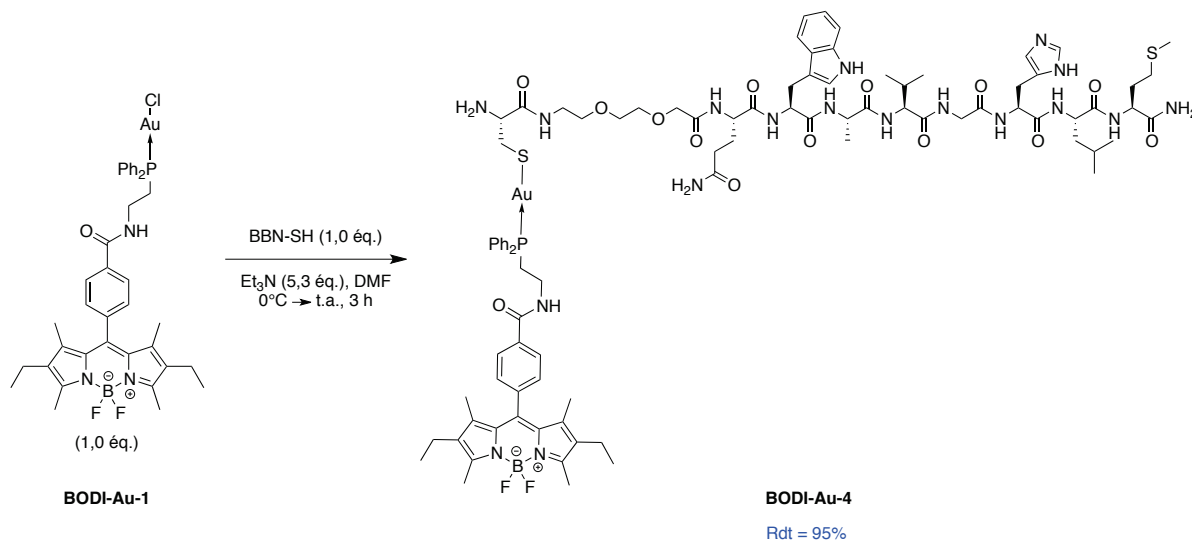


Schéma 13 : Synthèse du dérivé bombésine BBN-SH.

III.3.3.2. Couplage entre BODI-Au-1 et BBN-SH

La même stratégie que celle décrite pour l'introduction des dérivés de glucose est utilisée. Dans une première étape, le dérivé bombésine **BBN-SH** est mis en réaction avec de

la triéthylamine dans du diméthylformamide. La triéthylamine est utilisée à la place de la soude afin d'éviter une racémisation des acides aminés qui est observée à des pH très basiques. Ce mélange est ensuite ajouté goutte à goutte à **BODI-Au-1** et agité pendant 3 h. Après lavages, **BODI-Au-4** est obtenu avec un rendement de 95% (Schéma 14).



Les théranostiques **BODI-Au-2**, **BODI-Au-3** et **BODI-Au-4** ont été caractérisés par spectroscopie RMN ^1H , ^{13}C , ^{19}F et ^{31}P ainsi que par spectrométrie de masse haute résolution (HR-MS), infrarouge (IR) et analyse élémentaire quand cela était possible. La RMN du ^{31}P a en outre permis de suivre l'avancement des réactions ; en effet un déblindage significatif du signal est observé lors de l'échange de ligand sur l'atome d'or (singulets à 31,0 ppm pour **BODI-Au-2**, 30,2 ppm pour **BODI-Au-3** et 29,4 ppm pour **BODI-Au-4** contre 25,7 ppm pour **BODI-Au-1**). De plus, la forme du signal est caractéristique des composés phosphine-or-soufre (Figure 40).

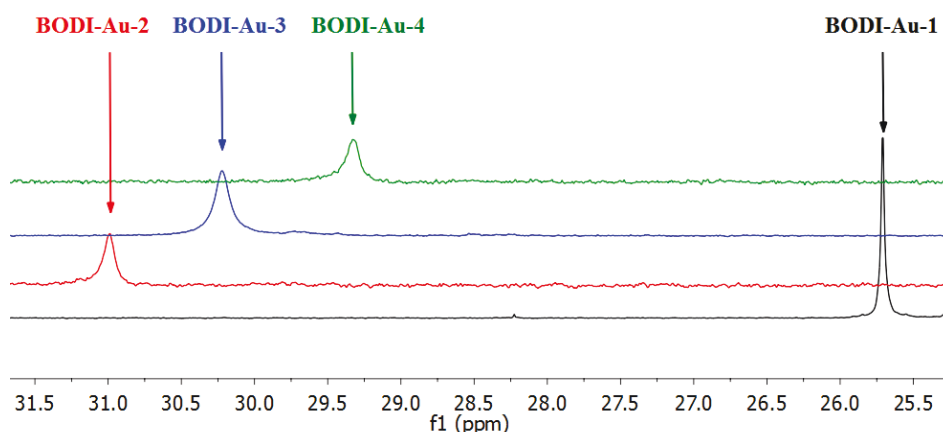


Figure 40 : Spectres RMN ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ des théranostiques BODI-Au-1, BODI-Au-2, BODI-Au-3 et BODI-Au-4 (202,45 MHz, DMSO- d_6 pour BODI-Au-1, -2 et -3, CD_3OD pour BODI-Au-4, 300 K).

Une analyse infrarouge lointain (FIR) a permis de confirmer l'échange de ligand X chlore – dérivé soufré. En effet, une bande de vibration intense est observée à 319 cm^{-1} pour **BODI-Au-1** correspondant à la liaison « Au-Cl » qui disparaît après échange de ligand. Deux bandes apparaissent à 311 et 373 cm^{-1} pour **BODI-Au-2** et une bande à 307 cm^{-1} pour **BODI-Au-3** qui sont attribuées toutes les trois à la liaison « Au-S ». Ces bandes sont caractéristiques de ces composés.¹⁶⁶

III.3.4. Synthèse du dérivé de l'acide folique FA-SH

Comme pour les précédents vecteurs, l'objectif était d'obtenir un dérivé de l'acide folique avec un thiol afin de l'introduire sur l'atome d'or. La stratégie envisagée était d'introduire un résidu cystéine sur l'acide folique commercial et bon marché ($\approx 15\text{ € / gramme}$) par un couplage peptidique entre une fonction acide de l'acide folique et la fonction amine de la cystéine pour aboutir au dérivé **FA-SH** (Figure 41).

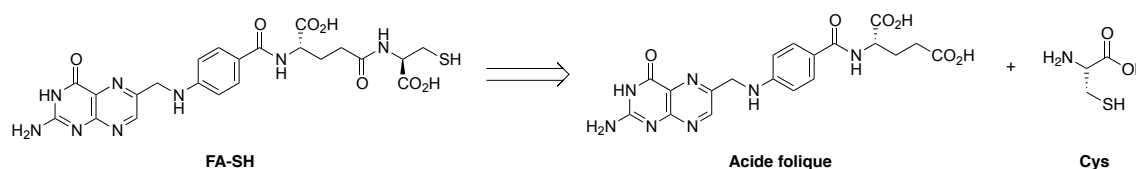


Figure 41 : Stratégie de synthèse de FA-SH.

La première étape consiste à activer la fonction acide de l'acide folique puis dans une deuxième étape l'ester activé résultant est couplé avec la fonction amine de la cystéine. Du fait de la faible solubilité de l'acide folique dans les solvants organiques classiques les réactions sont réalisées dans le diméthylsulfoxyde ou le diméthylformamide.

Différents agents d'activation et de conditions de réaction ont été testés et sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau 9). Nous avons dans un premier temps utilisé le dicyclohexylcarbodiimide (DCC) en tant qu'agent d'activation de la fonction acide en présence de base^{137,138} (entrées 1 et 4) ou de N-hydroxysuccinimide (NHS)^{139,142} (entrées 2 et 3) avant ajout. Sur chacun de ces essais, nous n'avons pas réussi à savoir si le produit **FA-SH** était formé et propre, et ce malgré les nombreuses analyses. En effet nous souhaitons nous assurer qu'il ne restait plus de cystéine voulant éviter une compétition lors de l'étape d'échange de ligand sur l'atome d'or. La faible solubilité des produits a compliqué grandement les analyses RMN et RP-HPLC qui ne nous ont pas permises de conclure sur la pureté du produit. De plus, nous n'avons pas observé de pic moléculaire en

analyse de masse (ionisation ESI). Nous avons alors essayé en utilisant le chlorure de thionyle comme agent d'activation. Mais les résultats n'ont également pas été concluants.

Entrée	Agents d'activation	Conditions
1	DCC (2,0 éq.), TEA (2,0 éq.)	DMSO, t.a., 1 h
2	DCC (2,0 éq.), NHS (1,0 éq.)	DMSO, t.a., 6 h
3	DCC (2,0 éq.), NHS (2,0 éq.)	DMSO, 50 °C, 6 h
4	DCC (6,0 éq.)	DMF / pyridine (5 : 1), US, t.a., 30 min
5	SOCl ₂ (1,1 éq.)	DMF, 0 °C puis t.a., 2 h
6	SOCl ₂ (120 éq.)	reflux, 2 h

Tableau 9 : Conditions testées pour l'activation de l'acide folique.

Pour résumer, aucun de ces tests n'a été concluant. Un des problèmes récurrents est la différence de solubilité entre les différents réactifs. Cela limite l'efficacité de la réaction et a compliqué l'analyse des résultats. De plus, l'acide folique de par son résidu acide glutamique possède deux fonctions acide qui peuvent réagir avec la cystéine entraînant la formation de deux régioisomères. Ceci pose d'autant plus problème sachant que le produit de couplage sur la fonction acide α entraîne une perte d'affinité pour de l'acide folique pour ses récepteurs.¹⁶⁷

Une solution serait de procéder à une hydrolyse de l'acide folique pour conduire à l'acide pteroiïque et à l'acide glutamique libre.¹⁶⁸ En parallèle, le dipeptide acide glutamique–cystéine **Glu-Cys** serait synthétisé en utilisant une stratégie et des groupements protecteurs sur les chaînes latérales de la cystéine et de l'acide glutamique adéquats. Enfin une étape de couplage entre la fonction acide de l'acide pteroiïque et la fonction amine du résidu acide glutamique du dipeptide aboutirait au dérivé **FA-SH** désiré (Figure 42).

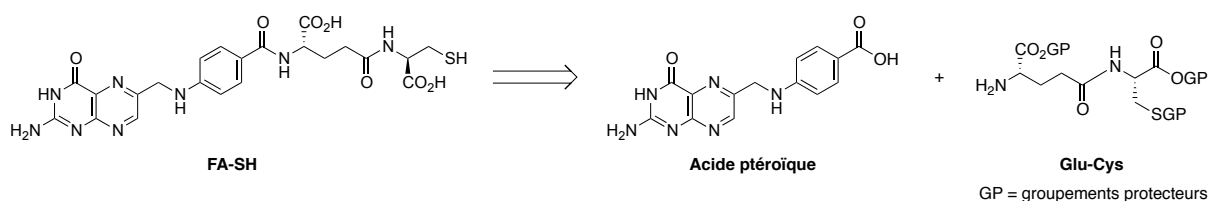


Figure 42 : Nouvelle stratégie de synthèse proposée de FA-SH.

IV. Conclusion

Quatre nouveaux théranostiques optiques portant un vecteur (dérivés de glucose **BODI-Au-2** et **BODI-Au-3** ou dérivé de bombésine **BODI-Au-4**) ou non (**BODI-Au-1**) ont été synthétisés en associant un fluorophore organique, le BODIPY, avec un complexe phosphine-or. Par rapport aux travaux précédents, la synthèse a été grandement optimisée en diminuant le nombre d'étapes (trois étapes en moins), avec des intermédiaires moins sensibles et des purifications plus simples. De plus une stratégie de bioconjugaison innovante a été mise au point permettant ainsi d'introduire tout composé possédant une fonction thiol sur l'atome d'or qui sert alors d'agrafe.

Il reste maintenant à vérifier que nos composés possèdent bien des propriétés de fluorescence et antiproliférative. L'évaluation photophysique et biologique des différents théranostiques fait l'objet du chapitre suivant.

Chapitre 2 : Évaluation des théranostiques BODIPY-or

Doulain P.-E., Racœur C., Decréau R., Paul C., Goze C.,* Bodio E.**

I. Critères pour l'élaboration d'un théranostique optique

Afin d'élaborer un agent théranostique optique, composé d'un fluorophore organique qui va permettre de suivre le composé *in vitro* et d'un principe actif qui va exercer l'activité thérapeutique, un certain nombre de critères doivent être respectés.

Tout d'abord, le théranostique doit être compatible avec les milieux biologiques. À savoir qu'il doit être stable et suffisamment soluble en milieux aqueux et stable au pH physiologique.

Le principe actif doit conserver une activité thérapeutique satisfaisante lorsqu'il est associé au traceur. De la même manière, le traceur, ici un BODIPY, doit conserver ses propriétés de fluorescence lorsqu'il est associé au principe actif.

Une compatibilité entre la sensibilité du traceur et l'activité thérapeutique du principe actif est également nécessaire. C'est à dire que le traceur doit pouvoir être détecté à une concentration de l'ordre de grandeur de l'IC₅₀ du principe actif.

L'ensemble de ces critères permet d'établir un premier cahier des charges pour l'élaboration d'un agent théranostique optique.

II. Étude photophysique des théranostiques synthétisés

Comme précisé dans le paragraphe précédent, dans notre cas, l'agent traceur fluorescent est un BODIPY. Des études photophysiques ont ainsi été réalisées dans le but d'étudier notamment l'influence du vecteur sur la fluorescence du BODIPY. Nous pouvons rappeler qu'il a été montré dans les précédents systèmes, que l'or n'avait aucune influence significative sur la fluorescence du BODIPY, ce qui est un point crucial pour nos théranostiques.

Les spectres d'absorption (en bleu) et d'émission (en rouge) sont présentés pour le composé **BODI-Au-1** (Figure 43) ainsi que pour les dérivés de glucose, **BODI-Au-2** (Figure 44) et **BODI-Au-3** (Figure 45), et par le dérivé de bombésine **BODI-Au-4** (Figure 46). Ces spectres ont été réalisés dans le DMSO à une concentration de 10 μM en composé, à température ambiante et à une longueur d'excitation de 488 nm.

Concernant les spectres d'absorption, comme présenté plus haut pour les quatre composés, nous pouvons retrouver une bande intense à 525 nm correspondant à la transition S_0-S_1 , transition de type $\pi-\pi^*$. Une seconde bande d'intensité beaucoup plus faible se situant aux alentours de 380 nm correspond à une transition S_0-S_2 . Ces deux bandes d'absorption sont caractéristiques des BODIPYs.⁸⁵ L'introduction des dérivés de glucose (thiogluucose et thiogluucose peracétylé) et du dérivé de bombésine (Cys-AEEAc-bombésine₍₇₋₁₄₎) n'ont que peu d'influence sur le spectre d'absorption si ce n'est une variation du coefficient d'absorption molaire (Tableau 10).

Le spectre d'émission des différents composés excités dans la bande d'absorption S_0-S_1 à 488 nm présente un seul maximum à 543 nm pour **BODI-Au-1** et 542 nm pour **BODI-Au-2**, **BODI-Au-3** et **BODI-Au-4**. Cette bande d'émission est parfaitement symétrique (image miroir) de celle du spectre d'absorption. L'introduction des dérivés de glucose (thiogluucose et thiogluucose peracétylé) et du dérivé de bombésine (Cys-AEEAc-bombésine₍₇₋₁₄₎) sur l'atome d'or n'influe que très légèrement le maximum d'émission (déplacement hypsochromique de 1 nm).

Le faible déplacement de Stokes observé, 630 cm^{-1} pour **BODI-Au-1** et 600 cm^{-1} pour **BODI-Au-2**, **BODI-Au-3** et **BODI-Au-4**, signifie qu'aucune réorganisation profonde de la molécule n'a lieu à l'état excité. Ce déplacement de Stokes est caractéristique des BODIPYs ayant des maxima d'absorption et d'émission dans le visible et substitués en *meso* par un aryle.^{169,170}

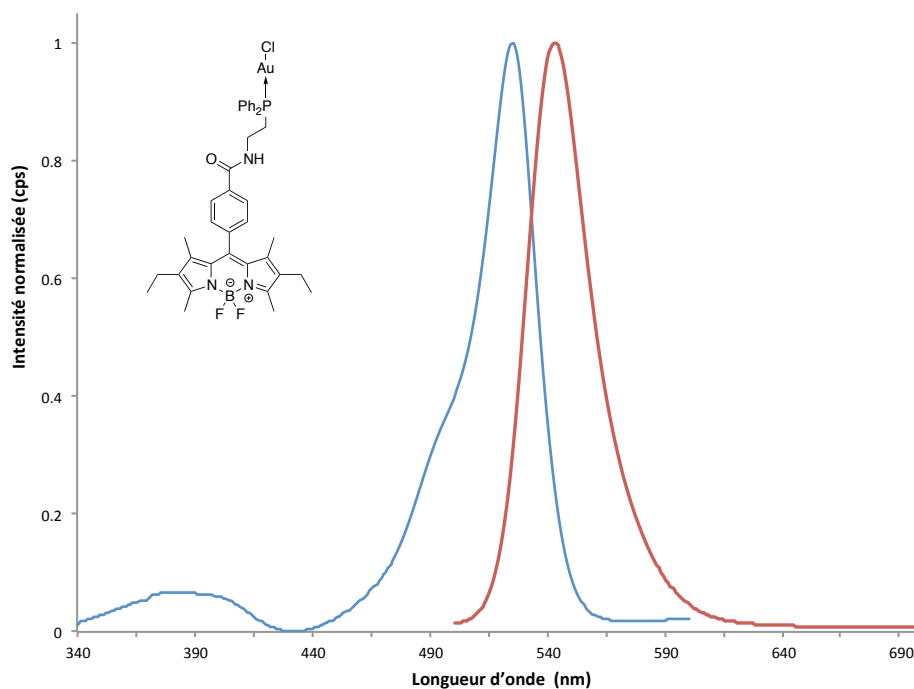


Figure 43 : Spectres d'absorption et d'émission de BODI-Au-1 dans le DMSO à 298 K ($\lambda_{exc} = 488$ nm).

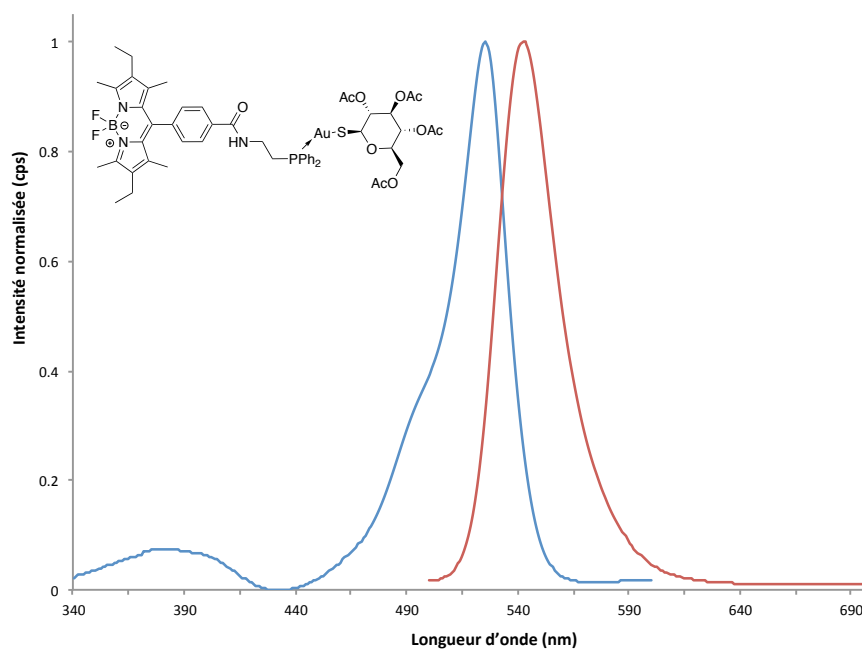


Figure 44 : Spectres d'absorption et d'émission de BODI-Au-2 dans le DMSO à 298 K ($\lambda_{exc} = 488$ nm).

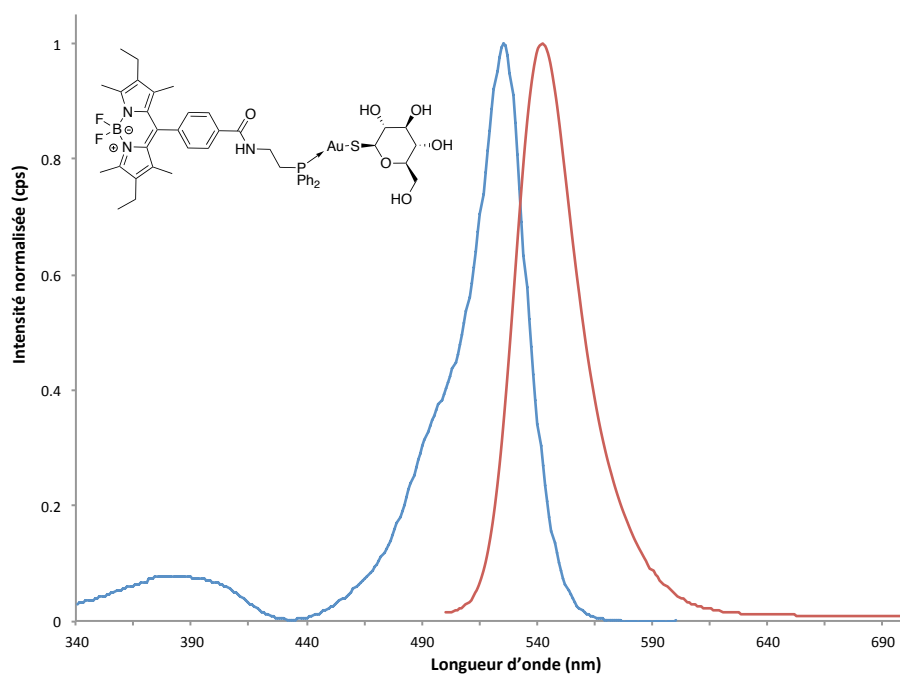


Figure 45 : Spectres d'absorption et d'émission de BODI-Au-3 dans le DMSO à 298 K ($\lambda_{exc} = 488$ nm).

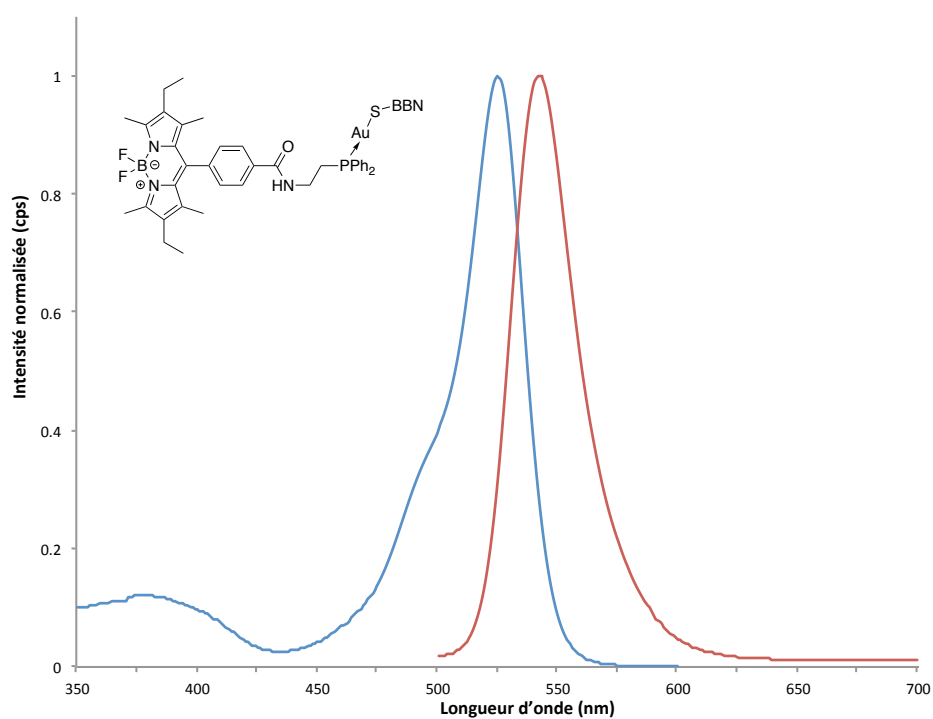


Figure 46 : Spectres d'absorption et d'émission de BODI-Au-4 dans le DMSO à 298 K ($\lambda_{exc} = 488$ nm).

Les rendements quantiques de fluorescence, notés Φ_F , ainsi que la brillance, notée B (produit du rendement quantique et du coefficient d'absorption molaire) des différents composés ont été déterminés dans le DMSO à température ambiante en utilisant la rhodamine 6G comme référence ($\Phi_F = 0,94$ dans l'éthanol) (Tableau 10).

Composé	λ_{abs} nm	ϵ $\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$	λ_{em} nm	Φ_F % ^{a,b}	B $\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ^c
BODI-Au-0	526	59200	539	85	50300
BODI-Au-1	525	33530	543	98	32850
BODI-Au-2	525	59650	542	97	57860
BODI-Au-3	525	46900	542	86	40330
BODI-Au-4	525	39300	542	21	8250

a) $\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm. b) rhodamine 6G utilisée comme référence, $\Phi_F = 0,94$ dans l'éthanol, $\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm, tous les rendements quantiques Φ_F sont corrigés de l'indice de réfraction des solvants. c) Brillance $B = \epsilon \times \Phi_F$.

Tableau 10 : Données spectroscopiques de BODI-Au-1, BODI-Au-2, BODI-Au-3 et BODI-Au-4 dans le DMSO à 298 K.

Le complexe **BODI-Au-1** présente un rendement quantique de fluorescence très élevé ($\Phi_F = 98\%$) confirmant ainsi que l'introduction de l'atome d'or n'influe pas sur la fluorescence du composé.¹⁰³ Une comparaison entre **BODI-Au-0** (propriétés rappelées dans le Tableau 10) et le nouveau composé **BODI-Au-1**, montre également que la modification de l'espaceur entre la sonde fluorescente et la partie métallique n'a eu qu'une incidence mineure sur les propriétés de fluorescence du BODIPY. L'introduction des dérivés de glucose (thiogluucose et thiogluucose peracétylé) sur l'atome d'or n'influe pas ou peu sur le rendement quantique de fluorescence ($\Phi_F = 97$ & 86% pour **BODI-Au-2** & **BODI-Au-3** respectivement). En revanche, l'introduction du dérivé de bombésine, Cys-AEEAc-bombésine₍₇₋₁₄₎, affecte la fluorescence de **BODI-Au-4** traduit par un rendement quantique de fluorescence plus faible ($\Phi_F = 21\%$). Cette extinction partielle n'est probablement pas due au peptide, car des systèmes BODIPY-BBN déjà étudiés ne montraient pas d'influence du peptide sur la fluorescence du BODIPY.¹⁷¹ Nous pouvons par contre expliquer cette baisse de la fluorescence par la présence du bras espaceur PEG, flexible, qui peut être responsable de ce qu'on appelle un « loose bolt effect » en anglais, induisant une baisse de la fluorescence (Figure 47).¹⁷² Néanmoins la brillance de ce composé ($B = 8250 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) reste tout à fait satisfaisante pour des applications biologiques, et en particulier de l'imagerie *in vitro*.

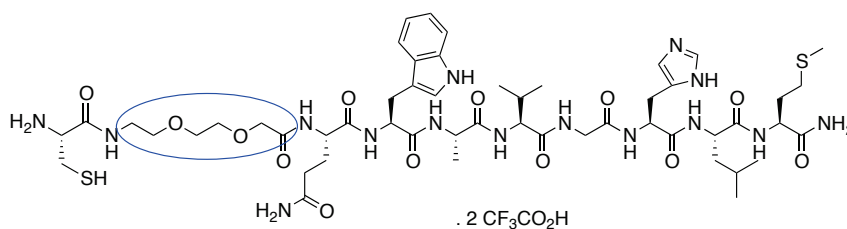


Figure 47 : Rappel de la structure du peptide **BBN-SH** avec le bras espaceur **PEG**.

Les mesures photophysiques pour **BODI-Au-4** ont été réalisées également dans un mélange PBS / DMSO (4 : 1) (Figure 48).

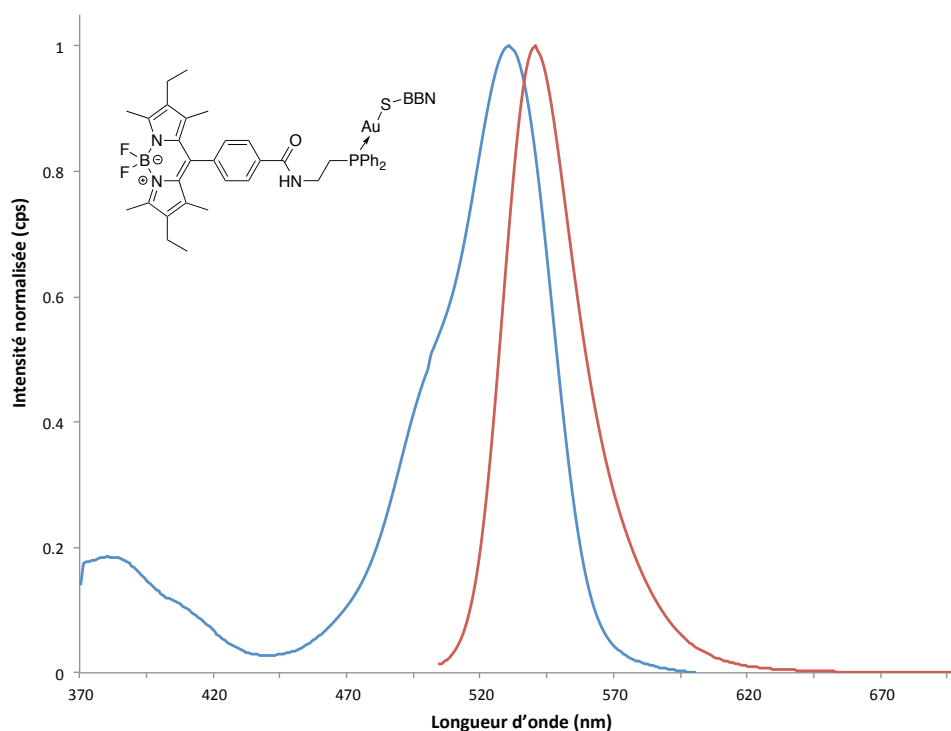


Figure 48 : Spectres d'absorption et d'émission de **BODI-Au-4** dans un mélange PBS / DMSO (4 : 1) à 298 K ($\lambda_{exc} = 488$ nm).

L'évaluation photophysique des composés a permis de montrer que tous les composés synthétisés **BODI-Au-1** à **4** présentaient des bonnes propriétés photophysiques pour des applications biologiques. Cependant, seules les expériences en milieu biologique valideront ou non le système BODIPY-phosphine en tant qu'agent traceur.

III. Évaluation biologique des théranostiques

III.1. Évaluation de la stabilité des composés

Lorsqu'un composé est étudié *in vitro* et / ou *in vivo*, il est essentiel de connaître sa solubilité en milieu aqueux, ainsi que sa stabilité en milieu biologique.

Pour l'ensemble des études biologiques, nous avons travaillé avec des solutions finales en composé de 10 à 200 μM dans le milieu de culture cellulaire en partant de solutions stocks à 50 μM dans le diméthylsulfoxyde. Nos différents théranostiques sont assez solubles et ne s'agrègent pas dans les conditions d'une évaluation *in vitro*.

Concernant la stabilité des composés *in vitro* / *vivo*, il faut savoir si le composé arrive intact jusqu'à la cellule. Sans cela, le travail de compréhension des mécanismes d'action ou la comparaison rationnelle d'analogues sont peu fiables. Ce travail est notamment nécessaire pour des complexes métalliques puisque certaines liaisons faisant intervenir un métal sont faibles et peuvent être rompues par simple hydrolyse. De même, la stabilité intrinsèque du métal vis à vis du milieu biologique doit être étudiée (changement du degré d'oxydation par exemple). Dans notre cas, un point crucial est de savoir si la sonde reste liée avec la partie à visée thérapeutique. En effet, ce lien rompu, le suivi par imagerie ne permettrait que la localisation de la sonde et pas du principe actif, rendant ce suivi totalement inutile.

Ainsi la stabilité des liaisons phosphine-or et or-chlore / or-soufre a été étudiée afin d'évaluer la stabilité des théranostiques **BODI-Au-1**, **BODI-Au-2**, **BODI-Au-3** et **BODI-Au-4** en milieu biologique. Il est à noter que le BODIPY est reconnu stable en milieu biologique. Cette étude de stabilité a pu être réalisée par un suivi dans le temps par RMN ^{31}P . En effet, si le BODIPY-phosphine se décoordine de l'atome d'or un signal supplémentaire apparaîtra, il en est de même pour l'atome de chlore et de soufre. Une étude RMN ^{31}P a donc été réalisée sur **BODI-Au-1** et **BODI-Au-2** afin d'étudier la stabilité des liaisons phosphine-or, or-chlore, et or-soufre. **BODI-Au-1** et **BODI-Au-2** n'étant pas assez solubles dans les milieux utilisés en culture cellulaire (DMEM) au seuil de détection de la RMN, l'étude a été réalisée dans un mélange DMEM / DMSO (1 : 4). Les échantillons ont été maintenus à 37 °C pendant 72 h et des analyses RMN ^{31}P ont été effectuées au cours du temps. Les spectres à 7 h et 72 h sont présentés ci-dessous et nous pouvons remarquer qu'il n'y a aucune évolution dans le temps du spectre montrant ainsi la stabilité des liaisons

BODIPY phosphine-or, or-chlore / or-soufre (Figure 49 & Figure 50). La stabilité des liaisons phosphine-or a déjà été démontrée pour d'autres systèmes par notre groupe à l'aide de « smart probe » *in vitro* et chez le poisson zèbre.¹¹³

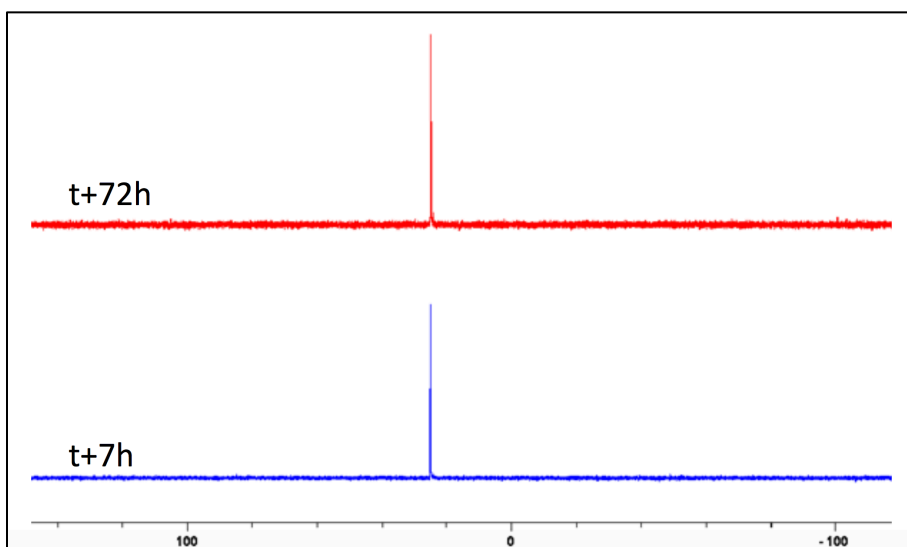


Figure 49 : Spectres RMN ³¹P {¹H} de BODI-Au-1 à 7 et 72 h (121,45 MHz, DMEM / DMSO (1 : 4), 300 K).

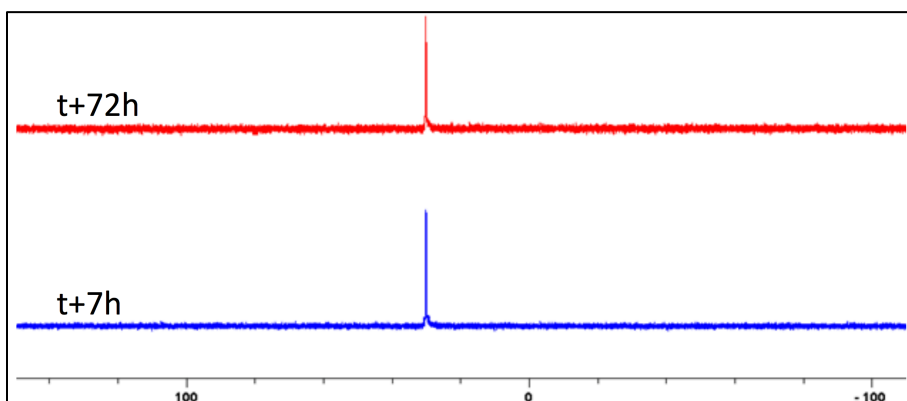


Figure 50 : Spectres RMN ³¹P {¹H} de BODI-Au-2 à 7 et 72 h (121,45 MHz, DMEM / DMSO (1 : 4), 300 K).

Cette étude de stabilité a permis de montrer que les théranostiques **BODI-Au-1**, **BODI-Au-2** et par extrapolation **BODI-Au-3** et **BODI-Au-4** sont stables dans un milieu mimant le milieu de culture cellulaire.

Remarque : certains chercheurs s'interrogent sur les phénomènes d'échange ou de dismutation qui pourraient intervenir lors de la conservation de complexes phosphine-or sous forme de solutions stocks dans le DMSO (formation d'espèces de type [P-Au(Cl)-P], [P-Au-P]⁺...). Pour cela ils se basent sur les travaux de Shaw III qui concernent essentiellement des complexes de type P-Au-CN.^{173,174} Une série d'études RMN a été réalisée par Florian Chotard, doctorant dans l'équipe, et a montré sans ambiguïté que nos produits ne sont pas sujets à ces phénomènes. La formation d'espèces [P-Au(Cl)-P] peut se

produire pour les complexes phosphine-or-chlore s'ils sont mis en présence de phosphine libre. C'est pourquoi il est essentiel lors de la synthèse des complexes d'observer une parfaite stœchiométrie entre le ligand phosphine et le précurseur d'or.

III.2. Évaluation de la cytotoxicité des théranostiques

III.2.1. Évaluation de l'affinité BODI-Au-4 pour les récepteurs à la bombésine

L'affinité d'un vecteur pour son récepteur peut-être très sensible aux modifications opérées sur cette molécule vectrice. Ainsi, afin de déterminer l'influence de l'introduction du BODIPY-phosphine-or, l'affinité de **BODI-Au-4** pour les récepteurs à la bombésine a été évaluée par une expérience radioactive de compétition de liaison sur des membranes de cortex de rat.¹⁷⁵ Cette étude a été réalisée par le CEREP (<http://www.cerep.fr>). Cette expérience consiste dans un premier temps à saturer les récepteurs avec de la bombésine radiomarquée à l'iode-125 [¹²⁵I]-[Tyr⁴]bombésine, puis dans un second temps à ajouter des concentrations croissantes de **BODI-Au-4** afin de déplacer la bombésine radiomarquée et ainsi obtenir une courbe de déplacement (Figure 51). De cette courbe est tirée une IC₅₀ correspondant à la concentration nécessaire de composé **BODI-Au-4** pour déplacer 50% de la bombésine radiomarquée.

De manière succincte, les membranes de cortex de rat, exprimant les différents sous-types de récepteurs à la bombésine (GRPR, NMBR et BRS-3), ont été incubées en présence d'une solution à 0,01 nM de [¹²⁵I]-[Tyr⁴]bombésine et une gamme de concentration de **BODI-Au-4** pendant 60 min à température ambiante. La liaison non spécifique a été déterminée en présence d'un large excès (1 μM) de bombésine₍₁₋₁₄₎ non radiomarquée. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la liaison spécifique contrôle. Les valeurs d'IC₅₀ (concentration inhibant de moitié la liaison spécifique contrôle) ont été déterminées par une analyse par régression non linéaire des courbes de déplacement. Les constantes d'inhibition correspondantes (K_i) ont été calculées à partir de l'équation de Cheng-Prusoff.¹⁷⁶ La bombésine₍₁₋₁₄₎ a été utilisée comme référence (K_i = 0.28 nM).

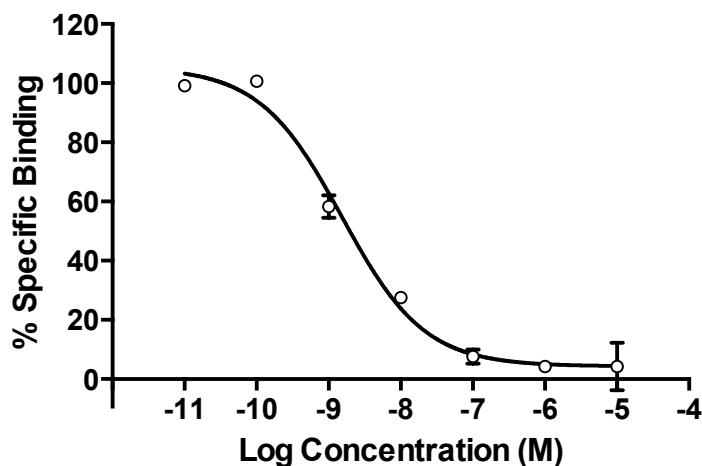


Figure 51 : Courbe de déplacement de la bombésine radiomarquée par BODI-Au-4 sur des membranes de cortex de rat.

BODI-Au-4 est capable de déplacer la bombésine radiomarquée avec une IC_{50} de déplacement de 1,53 nM et une constante K_i de 0,71 nM, concentration cinq fois supérieure à celle de la bombésine₍₁₋₁₄₎ ($IC_{50} = 0,28$ nM). Pour autant, cette valeur reste dans la gamme basse du nanomolaire et est similaire à celle de dérivés utilisés avec succès dans des études d'imagerie.^{130,171,177}

III.2.2. Évaluation de l'activité antiproliférative des théranostiques

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du professeur Ali Bettaeib et du Docteur Catherine Paul à l'EPHE de Dijon, j'ai pu être formé à différentes techniques de biologie. Cela m'a permis de tester l'activité antiproliférative des nouveaux composés sur différentes lignées cellulaires et de réaliser le suivi des molécules par microscopie confocale.

Tout d'abord, l'activité antiproliférative des théranostiques **BODI-Au-1**, **BODI-Au-2**, **BODI-Au-3** et **BODI-Au-4** a été évaluée par un test colorimétrique au MTS de viabilité cellulaire sur deux lignées cellulaires cancéreuses humaines, une lignée cellulaire du cancer de la prostate PC3 et une lignée cellulaire du cancer du sein MDA-MB-231. Ces deux lignées sont connues pour surexprimer le transporteur au glucose de type 1 (Glut1)¹²⁹ et le récepteur à la bombésine (GRPR).^{130,131} Les composés ont également été testés sur un modèle de lignée cellulaire humaine non cancéreuse HEK 293T et une lignée cellulaire humaine saine de sein HMEC afin de comparer l'activité antiproliférative relative de chaque composé. L'activité antiproliférative du complexe phosphine-or **7** ainsi que celle de l'auranofine a été également testée afin de comparer les valeurs obtenues.

Les cellules ont étéensemencées à 10.000 cellules / puits dans du DMEM supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal. Le lendemain, les cellules ont été traitées avec différentes concentrations de **BODI-Au-1**, **BODI-Au-2**, **BODI-Au-3** et **BODI-Au-4**, de complexe **7** et d'auranofine en triplicat pendant 48 h à 37 °C. Puis, une solution de MTS (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium) dans du milieu de culture cellulaire a été ajoutée à chaque puits (20 µL) et l'absorbance à 490 nm des puits est mesurée après 3 h d'incubation à 37 °C.

Le test au MTS est un test colorimétrique permettant d'évaluer la viabilité cellulaire et basé sur la réduction du sel de tétrazolium en formazan dont l'absorbance est lue à 490 nm (Figure 52). Cette transformation biochimique est réalisée par les déshydrogénases des cellules métaboliquement actives.^{178,179} La quantité de formazan et donc l'absorbance à 490 nm sont proportionnelles à la quantité de cellules viables.

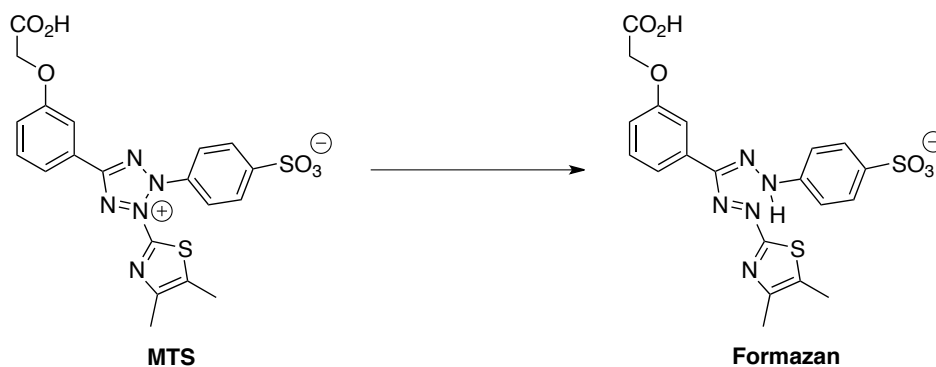


Figure 52 : Structures du MTS et du produit de réduction formazan.

Remarque : Nos composés comportant un BODIPY qui absorbe également à 490 nm, les mesures de densité optique sont biaisées. Pour y remédier, nous avons mesuré la densité optique juste après ajout du MTS qui est retranchée de la densité optique mesurée à 3 h pour donner uniquement l'absorbance due aux cristaux de formazan.

Les résultats sont présentés en pourcentage du contrôle : (densité optique moyenne cellules traitées / densité optique moyenne cellules non traitées) x 100 ± écart type, et après soustraction de la densité optique basale afin d'éliminer l'absorbance des cellules, du milieu de culture et des composés. À partir des résultats de densité optique, l'IC₅₀ du composé est déterminée à l'aide du logiciel GraphPad Prism. L'IC₅₀ représente ici la concentration de composé nécessaire pour inhiber 50% de la prolifération cellulaire. L'IC₅₀ présentée est la moyenne de trois expériences indépendantes. L'ensemble des IC₅₀ est répertorié dans le tableau ci-dessous (Tableau 11).

Composé	MDA-MB-231	PC3	HEK 293T	HMEC
BODI-Au-1	85 ± 11	75 ± 25	66 ± 14	25,1 ± 0,4
BODI-Au-2	23 ± 13	40 ± 16	20 ± 6	9,8 ± 0,2
BODI-Au-3	30 ± 6	29 ± 10	16 ± 6	24,5 ± 0,2
BODI-Au-4	58 ± 20	116 ± 31	34 ± 48	10,9 ± 0,3
7	25 ± 11	27 ± 6	17 ± 6	n.d.
Auranofine	5 ± 1	11 ± 5	4 ± 1	< 4

Tableau 11 : Détermination des IC_{50} (μM) des théranostiques **BODI-Au-1, **BODI-Au-2**, **BODI-Au-3** et **BODI-Au-4**, du complexe phosphine-or **7** et de l'auranofine après 48 h d'incubation sur les lignées cellulaires PC3, MDA-MB-231, HEK 293T et HMEC.**

En premier lieu il est à noter que le BODIPY n'est pas cytotoxique (cf. Tableau 3). L'introduction de la partie BODIPY a un impact sur la cytotoxicité du composé, en effet **BODI-Au-1** est moins cytotoxique d'un facteur trois à quatre que le complexe phosphine-or **7** ($IC_{50} = 85 \mu M$ vs $25 \mu M$ pour MDA-MB-231, $75 \mu M$ vs $27 \mu M$ pour PC3 et $66 \mu M$ vs $17 \mu M$ pour HEK 293T).

L'introduction du vecteur a également un impact important sur la cytotoxicité du composé. Ainsi l'introduction des dérivés de glucose entraîne une augmentation de la cytotoxicité d'un facteur deux à trois, *i.e.* une IC_{50} inférieure ($IC_{50} = 23 \mu M$ & $30 \mu M$ vs $85 \mu M$ pour MDA-MB-231, $40 \mu M$ & $29 \mu M$ vs $75 \mu M$ pour PC3, $20 \mu M$ & $16 \mu M$ vs $66 \mu M$ pour HEK 293T, **BODI-Au-2** & **BODI-Au-3** vs **BODI-Au-1** respectivement). **BODI-Au-2**, **BODI-Au-3** et **7** possèdent des cytotoxicités similaires sur les trois lignées cellulaires (autour de $30 \mu M$ pour MDA-MB-231 et PC3 et $20 \mu M$ pour HEK 293T) et sont moins cytotoxiques que l'auranofine (entre $4 \mu M$ pour HEK 293T et $11 \mu M$ pour PC3).

Les résultats de cytotoxicité pour **BODI-Au-4** sont un peu plus compliqués à interpréter, avec une cytotoxicité de $58 \mu M$ pour MDA-MB-231, $116 \mu M$ pour PC3 et $34 \mu M$ pour HEK 293T. Ces résultats ne peuvent pas s'expliquer par une éventuelle perte d'affinité pour les récepteurs à la bombésine puisque celle-ci a été évaluée sur des membranes de cortex de rat (cf. III.2.1). La faible cytotoxicité de **BODI-Au-4** pourrait être expliquée par une faible internalisation dans les cellules, limitant ainsi l'accumulation de l'or dans le cytoplasme. En effet, le pourcentage d'internalisation du dérivé peptidique est dépendant du type de lignée cellulaire, mais également de la fonctionnalisation du peptide, et il est très difficile de prévoir le pourcentage d'internalisation. Ainsi, dans notre cas, il est probable que ce pourcentage soit faible lors de notre étude, ce qui induit des valeurs d' IC_{50}

plus élevées que pour les autres composés. Cependant, ce peptide présente une forte affinité et sélectivité pour les cellules cancéreuses surexprimant les récepteurs à la bombésine. Des études *in vivo* seront nécessaires pour évaluer le réel potentiel de notre composé **BODI-Au-4**.

Les valeurs d'IC₅₀ ont également été déterminées sur la lignée cellulaire humaine saine de sein HMEC et peuvent être comparées à celles déterminées sur la lignée cellulaire humaine du cancer du sein MDA-MB-231 (Tableau 12).

Composé	MDA-MB-231	HMEC	IC ₅₀ (MDA)/ IC ₅₀ (HMEC)
BODI-Au-1	85 ± 11	25,1 ± 0,4	3,4
BODI-Au-2	23 ± 13	9,8 ± 0,2	2,4
BODI-Au-3	30 ± 6	24,5 ± 0,2	1,2
BODI-Au-4	58 ± 20	10,9 ± 0,3	5,3
Auranofine	5 ± 1	< 4	> 1,2

Tableau 12 : Comparatif des IC₅₀ de BODI-Au-1, BODI-Au-2, BODI-Au-3, BODI-Au-4 et de l'auranofine sur une lignée cellulaire mammaire humaine tumorale (MDA-MB-231) et saine (HMEC).

Les résultats obtenus sont délicats à interpréter. En effet, il faut bien noter que les cellules saines HMEC sont très sensibles, une solution contenant 1% de DMSO tue 50% des cellules alors qu'une solution contenant jusqu'à 2% de DMSO entraîne moins de 10% de toxicité des cellules MDA-MB-231. Il n'est donc pas surprenant d'obtenir des IC₅₀ inférieures pour cette lignée cellulaire. Le point intéressant est la comparaison du rapport IC₅₀ (MDA) / IC₅₀ (HMEC) qui varie de 1 à 5 en fonction du composé. Le théranostique non vectorisé **BODI-Au-1** présente un rapport supérieur par rapport au complexe vectorisé avec le thioglucose peracétylé **BODI-Au-2** et le thioglucose **BODI-Au-3** (3,4 vs 2,4 & 1,2 respectivement). L'introduction des vecteurs dérivés de glucose améliore donc la cytotoxicité relative des systèmes résultants.

Ces études de cytotoxicité sur différentes lignées cellulaires cancéreuses et saines nous apportent des informations mais seules des études *in vivo* nous permettront d'évaluer la sélectivité pour le tissu tumoral par rapport aux tissus sains des différents théranostiques **BODI-Au-1**, **BODI-Au-2**, **BODI-Au-3** et **BODI-Au-4**.

III.2.3. Évaluation de l'accumulation des théranostiques dans les cellules

Une des premières hypothèses pour expliquer les différences d'activité antiproliférative entre les composés testés est la quantité d'or accumulée par la cellule. Afin d'évaluer cette accumulation et de voir s'il y a une corrélation entre quantité d'or dans les cellules et cytotoxicité, des lysats cellulaires des deux lignées cellulaires humaines cancéreuses MDA-MB-231 et PC3 (traitées avec les différents composés) ont été analysés par ICP-MS (couplage plasma induit par haute fréquence – spectrométrie de masse). Cependant il est important de noter que ces mesures permettent uniquement de doser la quantité d'or et non celle du composé. D'après les tests de stabilité et notre expérience dans ce type de composés, ces deux valeurs devraient être très proches pour une mesure faite sur l'intégralité de la cellule.

Les cellules ont étéensemencées à 500.000 cellules / puits puis ont été incubées à 37 °C pendant une heure avec 50 µM de **BODI-Au-1**, **BODI-Au-2**, **BODI-Au-3**, **BODI-Au-4** ou d'auranofine, en triplicat. Ensuite, les cellules ont été rincées deux fois avec du tampon phosphate salin (PBS) et lysées dans l'eau. Un dosage de protéines a été réalisé afin de déterminer la quantité de protéines dans les lysats cellulaires. Tous les échantillons ont été minéralisés dans l'acide chlorhydrique concentré de qualité ICP-MS pendant 3 h à température ambiante puis complétés à un volume total de 10 mL. L'indium a été ajouté à une concentration de 1 ppb en tant qu'étalon interne.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous et exprimés en picomoles d'or par milligramme de protéines (Tableau 13).

Composé	MDA-MB-231	PC3
BODI-Au-1	1277 ± 150	1251 ± 95
BODI-Au-2	5828 ± 170	5467 ± 240
BODI-Au-3	1702 ± 30	2139 ± 160
BODI-Au-4	1529 ± 120	1086 ± 45
Auranofine	24752 ± 3850	30565 ± 3750

Tableau 13 : Dosage de l'or de BODI-Au-1, BODI-Au-2, BODI-Au-3, BODI-Au-4 et de l'auranofine dans les cellules humaines de cancer de sein (MDA-MB-231) et de prostate (PC3) après 1 h d'incubation et analysé par ICP-MS (en pmole / mg de protéine).

Ces résultats permettent tout d'abord de montrer que pour tous les composés testés les quantités d'or dosées dans les deux lignées cellulaires MDA-MB-231 et PC3 sont comparables.

La quantité d'or accumulée dans les cellules pour les théranostiques vectorisés avec les dérivés de glucose **BODI-Au-2** et dans une moindre mesure **BODI-Au-3** est supérieure (jusqu'à un facteur 5) à celle pour le théranostique non vectorisé **BODI-Au-1** et ce dans les deux lignées cellulaires cancéreuses. De plus ces résultats vont plutôt dans le même sens que les résultats de cytotoxicité bien qu'aucune corrélation linéaire ne puisse être mise en évidence et que les conditions soient différentes (quantité de composé, temps d'incubation) (cf. III.2.2 Tableau 11). Ceci montre bien l'utilité de l'introduction d'un vecteur dérivé de glucose sur l'accumulation du composé. En particulier, l'intérêt de l'introduction du thioglucose protégé est ici clairement mis en évidence.

Les résultats pour le théranostique vectorisé avec le dérivé de la bombésine **BODI-Au-4** sont plus mitigés, et une accumulation légèrement supérieure (MDA-MB-231) ou inférieure (PC3) est observée entre **BODI-Au-4** et **BODI-Au-1**. Ces résultats semblent aller dans le même sens que les résultats de cytotoxicité (cf. III.2.2 Tableau 11).

La comparaison des résultats d'accumulation de l'or entre l'auranofine et **BODI-Au-2** (deux composés portant le thioglucose peracétylé) montre l'effet néfaste du ligand BODIPY phosphine sur l'accumulation dans les cellules. Ces résultats vont dans le même sens que les résultats de cytotoxicité. Vu les résultats prometteurs de nos composés, cela montre également tout l'intérêt de travailler sur le BODIPY ou son espaceur phosphoré pour favoriser cette accumulation.

Comme évoqué précédemment, il semble y avoir une corrélation entre accumulation des composés et cytotoxicité, **BODI-Au-3** mis à part, à savoir que l'accumulation des composés augmente avec la cytotoxicité, l'auranofine est le composé le plus cytotoxique (cf. III.2.2 Tableau 11) et est le composé qui s'est le plus accumulé dans les deux lignées cellulaires. Cependant, cette interprétation doit être prise avec précaution de par la différence de temps d'incubation entre le dosage de l'or (1 h) et les études de cytotoxicité (48 h).

L'ensemble de ces études montre que tous les théranostiques **BODI-Au-1**, **BODI-Au-2**, **BODI-Au-3** et **BODI-Au-4** présentent une cytotoxicité intéressantes sur deux lignées cellulaires humaines du cancer du sein (MDA-MB-231) et du cancer de la prostate (PC3) et que l'introduction d'un vecteur a un effet très significatif sur l'accumulation et donc sur la cytotoxicité du théranostique. Cependant seulement des études *in vivo* nous

permettront d'évaluer la sélectivité pour le tissu tumoral par rapport aux tissus sains des différents théranostiques.

III.3. Évaluation de la fluorescence *in vitro*

La fluorescence des théranostiques **BODI-Au-1**, **BODI-Au-2**, **BODI-Au-3** et **BODI-Au-4** a été évaluée *in vitro* afin de vérifier que les composés pouvaient être suivis dans le temps et de valider ainsi le BODIPY en tant qu'agent traceur dans nos systèmes.

III.3.1. Évaluation de la fluorescence par microscopie confocale

Des expériences de microscopie confocale ont été réalisées afin de vérifier que les théranostiques pouvaient être suivis par fluorescence, de confirmer que les composés pénètrent dans les cellules et enfin de déterminer leur localisation intracellulaire. Ces études ont été réalisées sur les deux lignées cellulaires humaines de cancer du sein (MDA-MB-231) et de cancer de la prostate (PC3) avec un co-marquage au DAPI. Le DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) est un marqueur fluorescent spécifique de l'ADN en se liant aux bases adénine et thymine permettant ainsi de visualiser le noyau de la cellule.

Les cellules ont étéensemencées à 200.000 cellules / puits et ont été incubées à 37 °C pendant une heure avec 50 µM de composé **BODI-Au-1**, **BODI-Au-2**, **BODI-Au-3** ou **BODI-Au-4** ou non traitées. Ensuite, les cellules ont été rincées deux fois avec du PBS avant fixation au paraformaldéhyde et visualisation en microscopie confocale (Figure 53 & Figure 54).

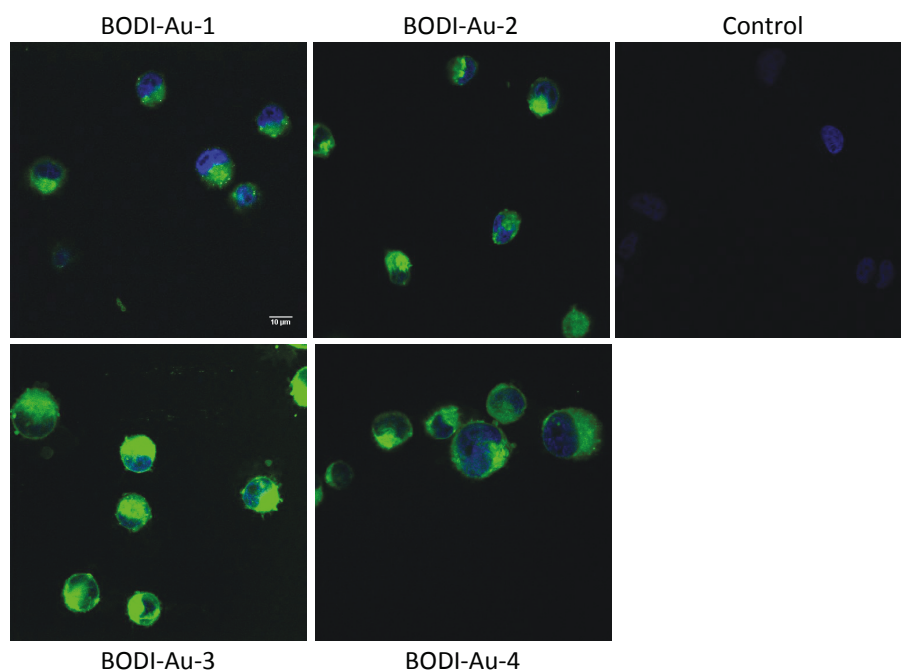


Figure 53 : Images de microscopie confocale des cellules MDA-MB-231 incubées 1 h à 37 °C avec 50 µM de BODI-Au-1, BODI-Au-2, BODI-Au-3 ou BODI-Au-4 ou non traitées (contrôle) (exc. 405 nm, détection 503 – 568 nm pour les complexes BODIPY et 408 – 488 nm pour le DAPI).

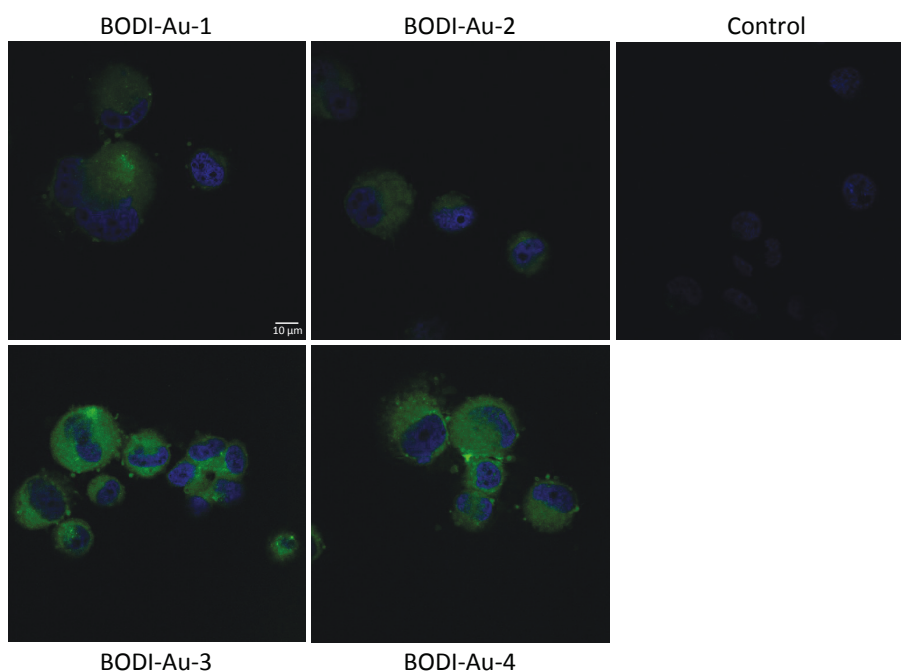


Figure 54 : Images de microscopie confocale des cellules PC3 incubées 1 h à 37 °C avec 50 µM de BODI-Au-1, BODI-Au-2, BODI-Au-3 ou BODI-Au-4 ou non traitées (contrôle) (exc. 405 nm, détection 503 – 568 nm pour les complexes BODIPY et 408 – 488 nm pour le DAPI).

Les images de microscopie confocale confirment que les théranostiques **BODI-Au-1**, **BODI-Au-2**, **BODI-Au-3** et **BODI-Au-4** pénètrent dans les cellules pour les deux lignées cellulaires étudiées.

De plus, la colocalisation avec le DAPI montre que les complexes sont présents dans le cytoplasme et absents du noyau. Il est intéressant de noter que contrairement aux systèmes précédents¹⁰³, les théranostiques **BODI-Au-1**, **BODI-Au-2**, **BODI-Au-3** et **BODI-Au-4** ne s'accumulent pas au niveau des membranes.

Enfin il faut noter que les théranostiques peuvent être suivis *in vitro* par microscopie confocale de fluorescence à une concentration de l'ordre de grandeur de leur IC₅₀ validant l'utilisation du BODIPY comme traceur et notre concept d'agents thérapeutiques traçables.

III.3.2. Étude de fluorescence *in vitro* à 4 °C et 37 °C

LE TRANSPORT ACTIF VS PASSIF

La membrane cytoplasmique présente une perméabilité variable en fonction du type cellulaire et de la nature de la molécule à internaliser. Ainsi, on distingue la diffusion passive, la diffusion facilitée et le transport actif. La diffusion passive ne concerne que les gaz, l'eau (en partie) et les molécules lipophiles, elle se fait dans le sens du gradient de concentration et ne consomme pas d'énergie. Les molécules polaires et les ions ne passent pas à travers cette bicouche lipidique. La diffusion facilitée implique des transporteurs membranaires saturables, canaux, ioniques pour les ions (sodium, potassium, chlorure...) et pour l'eau (aquaporines) ou transporteurs pour les molécules polaires (transporteurs Glut pour le glucose...). Ce transport se fait dans le sens du gradient de concentration et ne consomme pas d'énergie. Enfin le transport actif implique des transporteurs membranaires saturables, se fait contre le gradient de concentration et consomme donc de l'énergie (pompe à proton...).

Des études de fluorescence *in vitro* ont été réalisées à 4 °C et 37 °C dans le temps sur les deux lignées cellulaires MDA-MB-231 et PC3 afin d'étudier le transport mis en jeu dans l'internalisation des composés et d'évaluer la stabilité des composés dans le temps. En effet il est admis que le transport actif ainsi que la diffusion facilitée à travers les membranes sont inhibés à 4 °C.

Les cellules ont étéensemencées à 100.000 cellules / puits et ont été incubées à 4 °C ou 37 °C pendant une heure avec 50 µM de théranostique **BODI-Au-1**, **BODI-Au-2**, **BODI-Au-3** ou **BODI-Au-4**. Ensuite, les cellules ont été rincées deux fois avec du milieu de culture cellulaire et laissées dans un volume final de 100 µL. Enfin la fluorescence est

mesurée dans le temps à une longueur d'onde d'excitation de 485 nm et une longueur d'onde d'émission de 535 nm. L'intensité corrigée normalisée a été obtenue par soustraction de la fluorescence basale dans le milieu pour chaque composé et par division par un facteur donné par les mesures d'ICP-MS. Ce facteur correspond au rapport de l'intensité de fluorescence du composé dans la lignée cellulaire considérée à 37 °C et de la quantité d'or dosée pour ce composé par ICP-MS (Figure 55). De cette manière, on peut s'affranchir des différences de réponse en fluorescence de chacun des composés dans le milieu cellulaire. De ce fait, en regardant les intensités corrigées de fluorescence, il est possible de comparer facilement quantitativement les accumulations de composé dans les cellules.

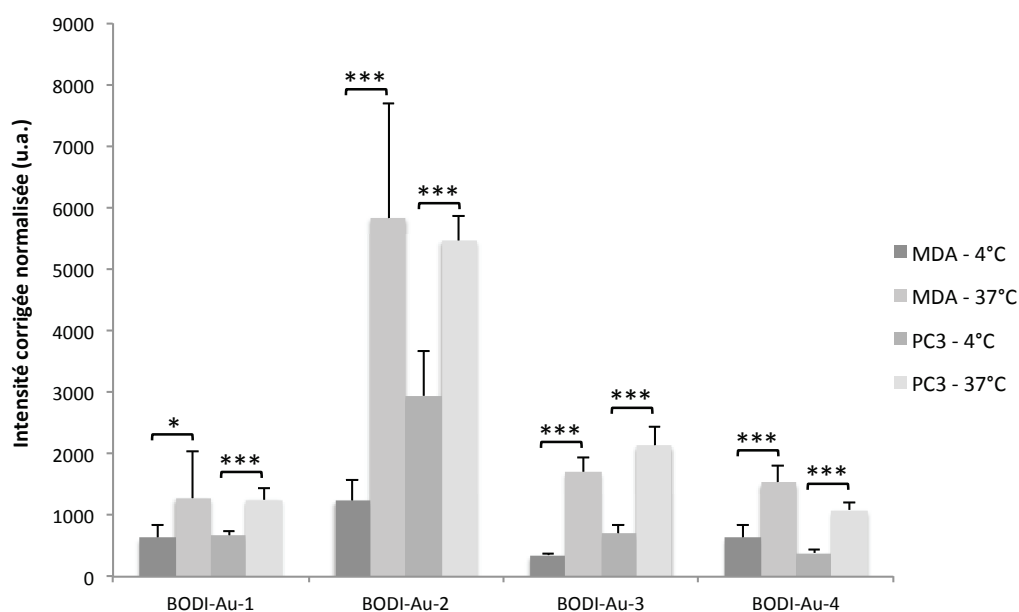


Figure 55 : Intensité de fluorescence dans MDA-MB-231 (MDA) et PC3 après 1 h d'incubation à 4 °C ou 37 °C avec 50 µM de BODI-Au-1, BODI-Au-2, BODI-Au-3 ou BODI-Au-4 (exc. 485 nm, ém. 535 nm). Différences significatives dans le test de Mann-Whitney, * $p < 0,05$, * $p < 0,005$.**

Ces résultats montrent que l'accumulation des théranostiques dans les cellules est fonction de la lignée cellulaire, de la température d'incubation et du composé étudié et doivent donc être interprétés avec beaucoup de précaution. La principale information à tirer de ces expériences est que mis à part pour **BODI-Au-1**, il y a une différence sensible d'intensité de fluorescence à 4 °C et 37 °C. Cela laisse à penser que les complexes **BODI-Au-2**, **BODI-Au-3** et **BODI-Au-4** pénètrent dans les cellules au moins partiellement *via* un transport actif et ce pour les deux lignées cellulaires étudiées. Il semblerait donc que les vecteurs introduits jouent bien leur rôle. Cette méthode pourrait être une solution rapide pour tester différents vecteurs sur différentes lignées cellulaires et pourrait même

être employée pour étudier l'influence d'adjuvants sur l'incorporation des composés dans les cellules.

Afin de rationaliser ces résultats, nous avons essayé de quantifier le nombre de récepteurs à la bombésine. Pour cela, une étude d'immunofluorescence par cytométrie de flux a été réalisée avec un anticorps anti-GRPR. Malheureusement, l'étude ne s'est pas avérée concluante ; un problème de marquage a été noté lors de l'expérience qui peut être dû à un mauvais choix d'anticorps.

Afin de confirmer que **BODI-Au-2** et **BODI-Au-3** pénètrent dans les cellules *via* les transporteurs Glut, dans l'avenir, il nous faudra réaliser une expérience de compétition avec un inhibiteur de ces transporteurs disponible commercialement et déterminer l'activité antiproliférative sur une lignée cellulaire n'exprimant pas de récepteurs au glucose.

Pour conclure sur cette évaluation, il apparaît clairement que les théranostiques **BODI-Au-1**, **BODI-Au-2**, **BODI-Au-3** et **BODI-Au-4** peuvent être suivis *in vitro* par microscopie confocale de fluorescence à une concentration de l'ordre de grandeur de leur IC₅₀ validant l'utilisation du BODIPY comme traceur et le concept de théranostique. De plus, les composés, à l'exception de **BODI-Au-1**, pénètrent dans les cellules *via* un transport actif en partie et s'accumulent dans le cytoplasme.

IV. Conclusion

Les propriétés photophysiques et biologiques des théranostiques **BODI-Au-1**, **BODI-Au-2**, **BODI-Au-3** et **BODI-Au-4** ont été évaluées. Les théranostiques présentent une bonne brillance et une stabilité satisfaisante dans les milieux biologiques permettant un suivi par fluorescence *in vitro* à une concentration de l'ordre de grandeur de leur IC₅₀ validant ainsi le système BODIPY en tant qu'agent traceur.

L'étude biologique a permis de montrer que les théranostiques sont relativement cytotoxiques, pénètrent dans les cellules par un transport actif en partie et s'accumulent dans le cytoplasme. De plus, les composés peuvent être suivi *in vitro* par microscopie confocale de fluorescence validant ainsi le concept de théranostique et l'association BODIPY – complexe d'or (I).

Lors de cette étude, l'impact de l'introduction de la sonde sur les propriétés antiprolifératives des composés a également été noté. Cette constatation met en relief le fait que lors de l'élaboration d'un théranostique en greffant un traceur sur un agent thérapeutique, il faut considérer ce théranostique comme nouvel agent et non pas comme une optimisation de l'agent thérapeutique. En effet, l'introduction du traceur entraîne des modifications des propriétés physico-chimiques du composé résultant et modifie donc sa biodistribution et sa pharmacocinétique. Ainsi le traceur doit faire partie intégrante du composé dès le début de l'évaluation d'un nouvel agent thérapeutique. À titre d'exemple, dans notre groupe nous avons travaillé à l'introduction de différents traceurs sur le complexe phosphine-or : le complexe contenant une coumarine s'accumule dans des microdomaines de la membrane, les radeaux lipidiques¹¹³, le complexe contenant un BODIPY, **BODI-Au-1**, s'accumule dans le cytoplasme¹⁸⁰, enfin le complexe contenant une porphyrine forme des agrégats s'accumulant sur la membrane externe⁹⁹ (Figure 56).

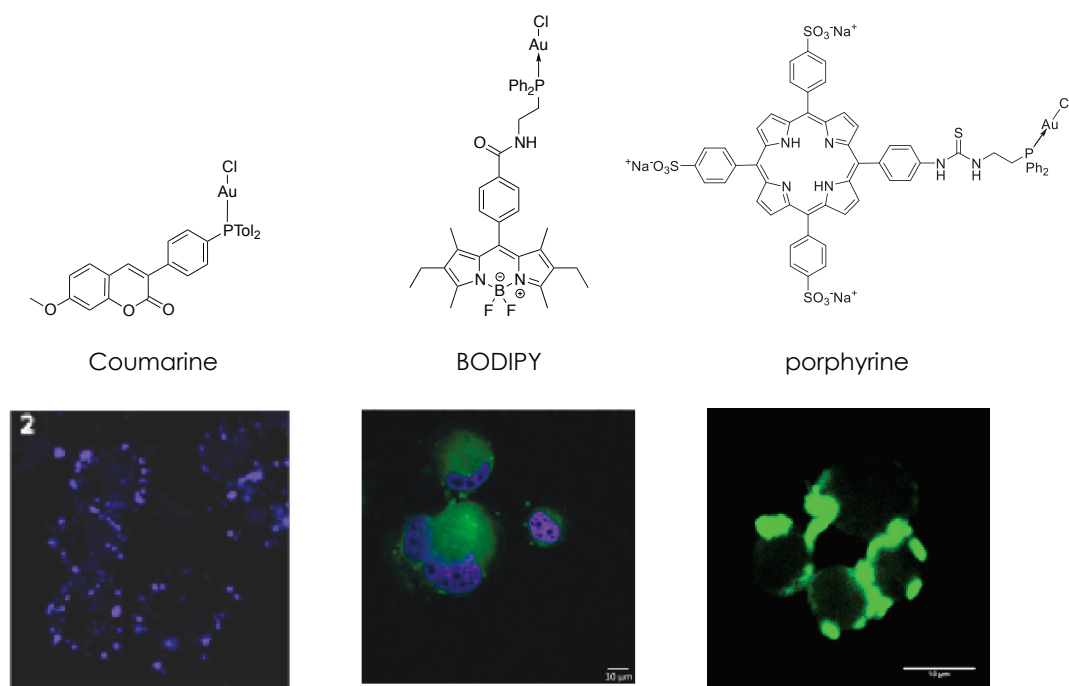


Figure 56 : Images de microscopie confocale de complexes phosphine - or (I) comprenant une coumarine (bleu, gauche), un BODIPY (vert, centre) ou une porphyrine (vert, droite).

L'ensemble de ces études montre tout le potentiel de ces théranostiques et des études *in vivo* sont envisagées afin d'évaluer la sélectivité des composés, d'étudier leur biodistribution et leur pharmacocinétique.

Cependant à l'heure actuelle ces théranostiques ne peuvent être suivis par fluorescence *in vivo*. L'optimisation de ces théranostiques pour une application *in vivo* est en cours et est traitée dans la partie 3.

PARTIE 3 :
ÉVOLUTION DES COMPOSÉS POUR UNE
APPLICATION *IN VIVO*

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, deux points ont retenu notre attention dans le cahier des charges d'un fluorophore pour l'imagerie *in vivo* : (i) l'absorbance des sondes dans la « fenêtre thérapeutique », (ii) la minimisation de l'agrégation des sondes en milieu physiologique. Après une description des stratégies exposées dans la littérature pour optimiser ces deux propriétés, ces deux points centraux seront décrits dans cette partie comme stratégie d'optimisation de nos BODIPYs.

Chapitre 1 : Absorption dans la « fenêtre thérapeutique » : les NIR-BODIPYs

Doullain P.-E., Racoeur C., Lerondel S., Decréau R., Paul C., Goze C.,* Bodio E.**

Depuis le développement de l'indocyanine verte (ICG) et son utilisation en clinique, un nombre croissant de sondes émettant dans le proche infrarouge pour l'imagerie optique *in vivo* ont été développées. Actuellement, il existe deux principales catégories de sondes proche infrarouge : les quantum dots et les fluorophores organiques. Quatre principales familles de fluorophores organiques composent les sondes optiques émettant dans le proche infrarouge : les cyanines, dont l'ICG, les porphyrines et dérivés porphyrinoïdes, les squaraines et les BODIPYs.⁵⁹ Chacune de ces familles possède ses avantages et ses inconvénients avec une utilisation prépondérante des cyanines dans le cadre d'une imagerie *in vivo*. L'objectif étant d'optimiser nos complexes BODIPY-phosphine-or (I), dans les pages suivantes, nous nous concentrerons sur les différentes stratégies développées pour décaler les longueurs d'onde d'excitation et d'émission des BODIPYs vers le proche infrarouge.

I. Stratégies de synthèse pour l'élaboration de NIR-BODIPYs

Afin de déplacer les maxima d'excitation et d'émission du BODIPY, la stratégie consiste à augmenter la conjugaison du cœur fluorescent. En effet, cette augmentation de conjugaison diminue les niveaux énergétiques de la transition S_0-S_1 ce qui se traduit par un décalage bathochrome de l'absorption et de l'émission. La contrepartie inhérente à ce décalage bathochromique est une diminution du rendement quantique de fluorescence plus ou moins prononcée.

Les principales stratégies de synthèse et de modifications structurales pour le déplacement bathochromique des bandes d'absorption et d'émission afin d'obtenir un NIR-BODIPY (BODIPY proche-infrarouge) vont être présentées (Figure 57).^{79,80}

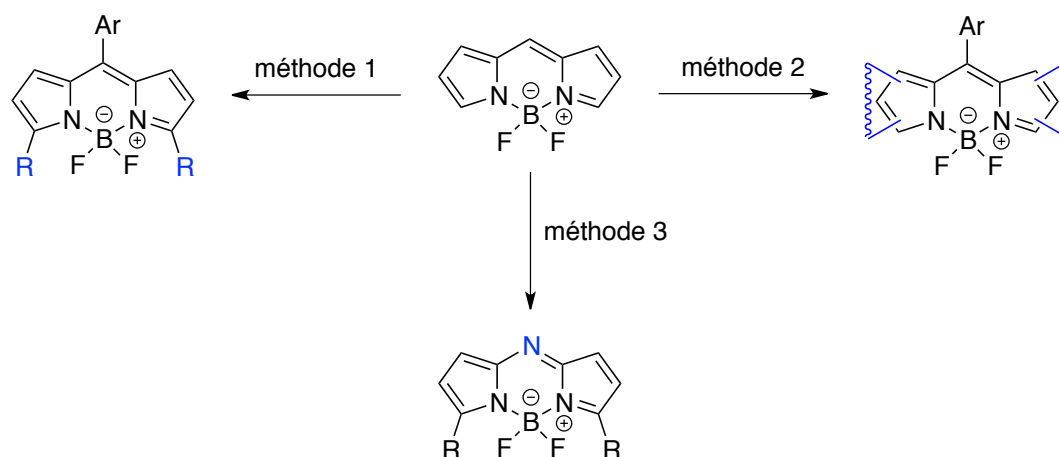


Figure 57 : Stratégies de synthèse de NIR-BODIPYs d'après Lu et al.⁷⁹

I.1. Méthode 1 : substitution sur les positions α -pyrroliques

I.1.1. Substitutions nucléophiles et réactions de couplage des 3,5-dihalogéno-BODIPYs

Les 3,5-dihalogéno-BODIPYs (chlorés le plus fréquemment utilisés) sont réactifs vis à vis de nucléophiles oxygénés, azotés, soufrés entre autres (Figure 58).

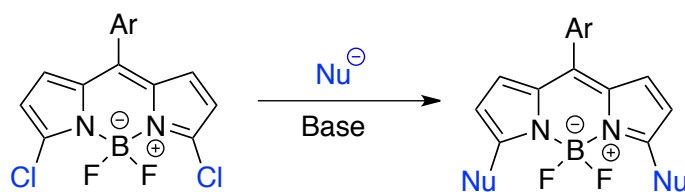


Figure 58 : Modification structurale du 3,5-dichloro-BODIPY par substitution nucléophile.

Cette méthode bien que permettant un décalage bathochromique le plus souvent n'aboutit pas à des BODIPYs avec des bandes d'absorption et d'émission dans la « fenêtre thérapeutique ».^{181,182}

Les 3,5-dichloro-BODIPY sont également réactifs dans différentes réactions de couplage telles que les réactions de Suzuki, Stille, Heck et Sonogashira (Figure 59).

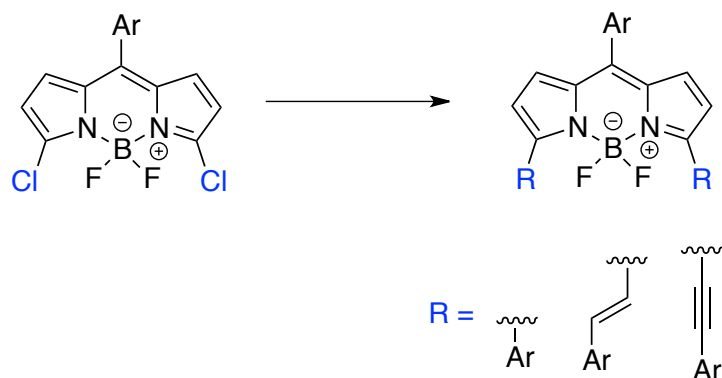


Figure 59 : Modification structurale du 3,5-dichloro-BODIPY par réactions de couplage.

Cette méthode de modification des 3,5-dichloro-BODIPYs permet de décaler les bandes d'absorption et d'émission vers le proche infrarouge par une augmentation de la conjugaison du BODIPY (Figure 60).

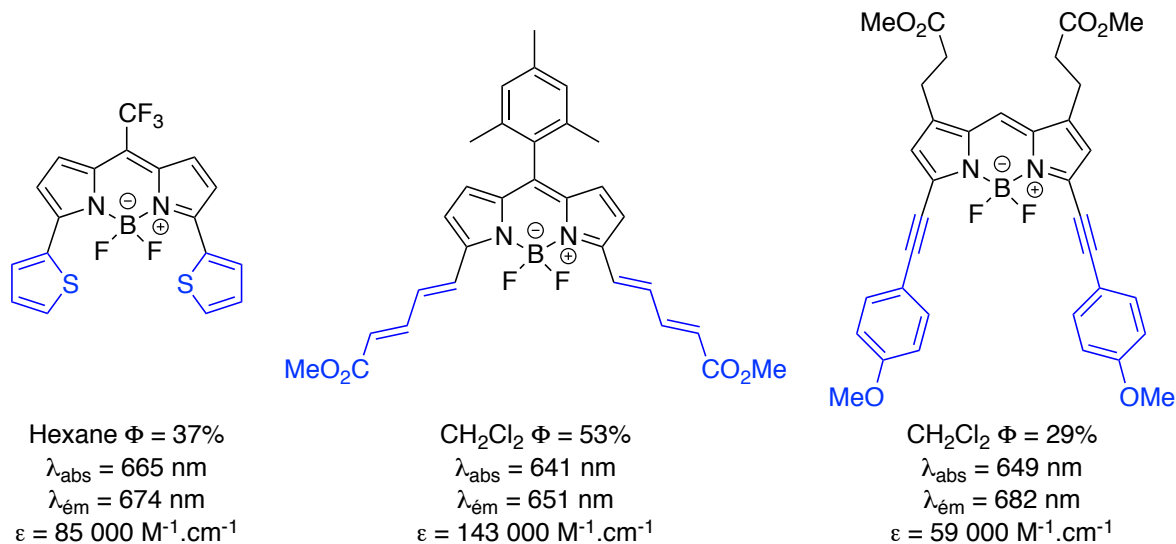


Figure 60 : Exemples de modifications structurales du 3,5-dichloro-BODIPY aboutissant à des BODIPYs émettant dans le proche infrarouge extrait de Lu et al.⁷⁹

1.1.2. Condensation des 3,5-diméthyl-BODIPYs avec les aldéhydes aromatiques

De par l'acidité des protons portés par les méthyles en position α -pyrroliques, une condensation de Knoevenagel permet l'introduction de groupements vinyl-aryl en faisant réagir le BODIPY avec un aldéhyde aromatique (Schéma 15).

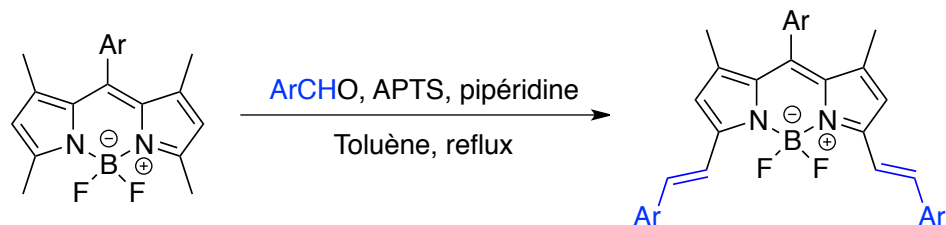


Schéma 15 : Modification structurale du 3,5-diméthyl-BODIPY par condensation avec les aldéhydes aromatiques.

Cette réaction dans le cas des BODIPYs a été découverte par les groupes de Daub¹⁸³ et Akkaya¹⁸⁴ (Figure 61 1^{ère} structure) et est actuellement une des méthodes les plus classiques et les plus efficaces pour décaler de manière significative les maxima d'absorption et d'émission dans le proche infrarouge par augmentation de la conjugaison du BODIPY (Figure 61).

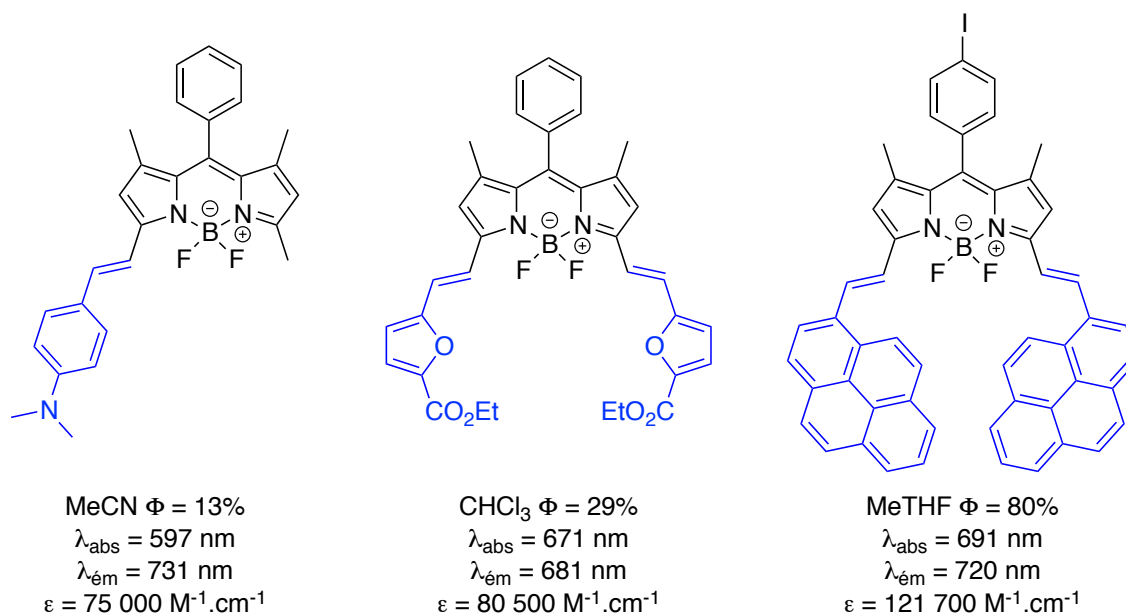


Figure 61 : Exemples de BODIPYs émettant dans le proche infrarouge par condensation d'aldéhydes aromatiques extrait de Lu et al.⁷⁹

Par ailleurs, les groupes d'Akkaya et de Ziessel ont montré que les méthyles en position β' -pyrroliques pouvaient également réagir pour conduire à des dérivés BODIPYs tétrasubstitués.^{185,186} Mais la troisième et quatrième condensation n'entraîne qu'un faible déplacement bathochromique (Figure 62). De plus, l'introduction de bras styryles diminue le rendement quantique du BODIPY notamment par une augmentation des processus de

désexcitation non radiative dus à une augmentation de la flexibilité conformationnelle. En outre, la stabilité photochimique du BODIPY est moindre de par la réactivité des doubles liaisons vis à vis de l'oxygène.

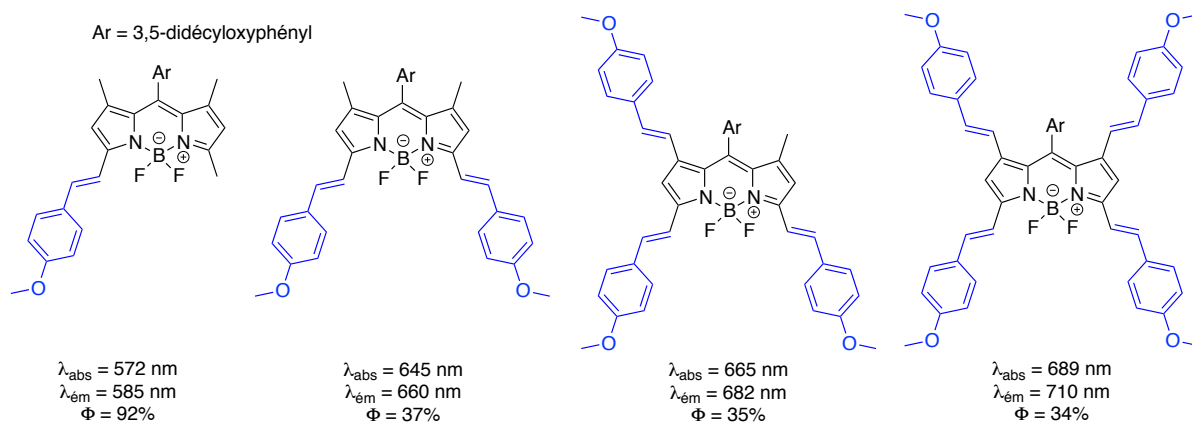


Figure 62 : Influence des condensations sur les propriétés photophysiques (mesures dans le chloroforme) d'après Buyukcakil et al.¹⁸⁵

I.2. Méthode 2 : synthèse de BODIPYs avec systèmes π étendus rigides

La fusion de cycles aromatiques avec les pyrroles du squelette BODIPY permet d'obtenir des BODIPYs avec un système π étendu rigide entraînant ainsi un décalage bathochrome de l'absorption et de l'émission. Les méthodes de synthèse classiques permettent l'obtention de tels BODIPYs en partant de pyrroles fusionnés avec un autre cycle aromatique.

L'un des premiers exemples de synthèse utilisant cette approche a été développé par Wada *et al.*¹⁸⁷ La synthèse consiste à condenser deux motifs **9** pour former le BODIPY **10** correspondant qui ensuite par réaction de rétro-Diels-Alder aboutit au BODIPY final **11** (Schéma 16). Les BODIPYs ainsi obtenus présentent bien une absorption et une émission décalées mais ce décalage n'est pas suffisant pour se trouver dans la « fenêtre thérapeutique ». On pourra alors additionner une modification structurale afin d'avoir un décalage bathochrome suffisant.

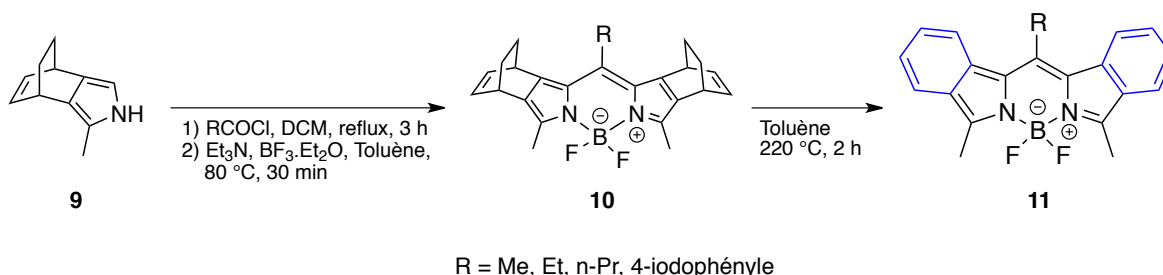


Schéma 16 : Synthèse de BODIPYs avec système π conjugué rigide **11** d'après Wada *et al.*¹⁸⁷

Plus récemment, une autre méthode consistant à condenser deux unités furanopyrroliques différentes **12** et **13** a été développée par le groupe de Suzuki (Schéma 17).¹⁸⁸ Cette méthode donne accès à des BODIPYs, les Keio-BODIPYs (KFL), symétriques ou non et présente l'avantage d'obtenir des BODIPYs absorbant et émettant dans le proche infrarouge tout en conservant des rendements quantiques élevés (56% à 97%).

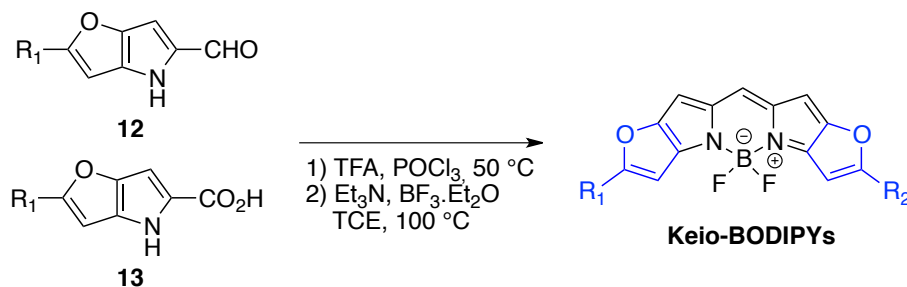


Schéma 17 : Synthèse de Keio-BODIPYs d'après Umezawa et al.¹⁸⁸

D'autres méthodes de synthèse ont également été développées mais ne sont pas détaillées ici.

L'extension de la conjugaison par introduction de système π étendu rigide a permis l'obtention de BODIPYs absorbant et/ou émettant dans la « fenêtre thérapeutique » (Figure 63).

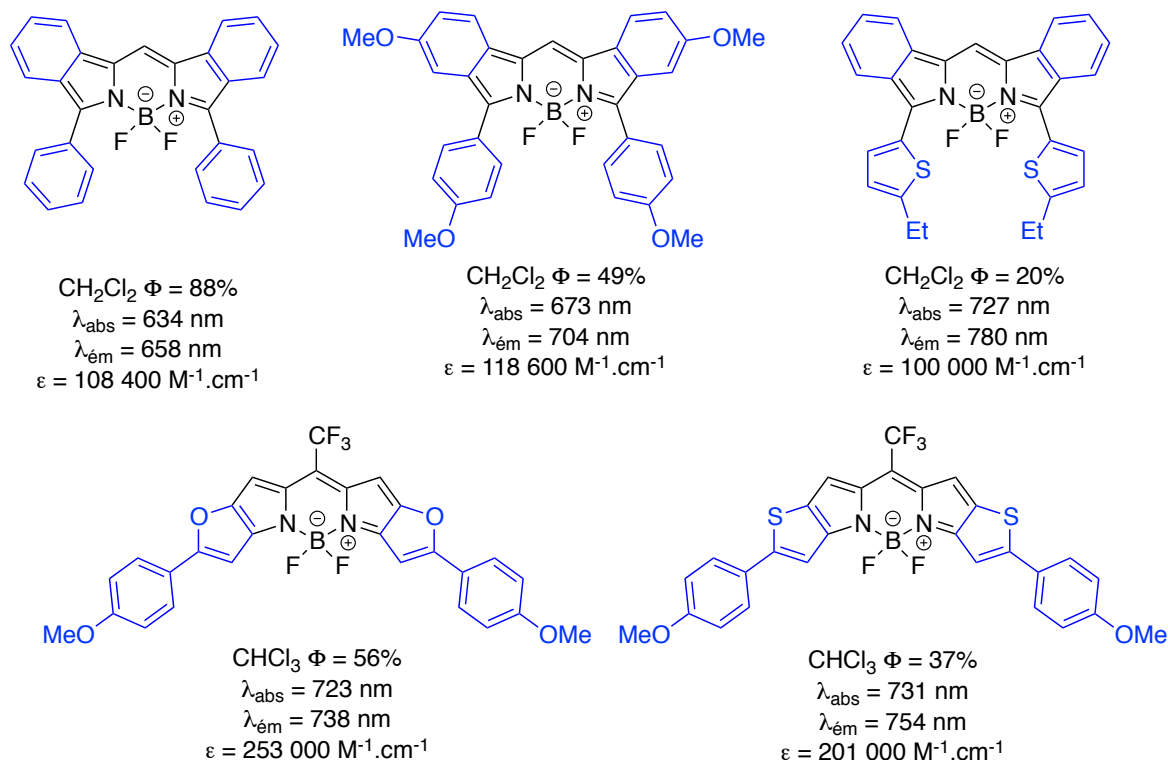


Figure 63 : Exemples de BODIPYs avec système π étendu rigide émettant dans le proche infrarouge extrait de Lu et al.⁷⁹

I.3. Méthode 3 : substitution aza sur la position *meso* : les aza-BODIPYs

Les aza-BODIPYs sont constitués d'un squelette BODIPY sur lequel un azote substitue le carbone en position *meso*.

La première synthèse d'un aza-BODIPY a été développée par Rahn *et al.*¹⁸⁹ et consiste à former *in situ* un nitroso pyrrole qui réagit avec un pyrrole en partant du 2,4-diphénylpyrrole en présence de nitrite de sodium (Schéma 18).

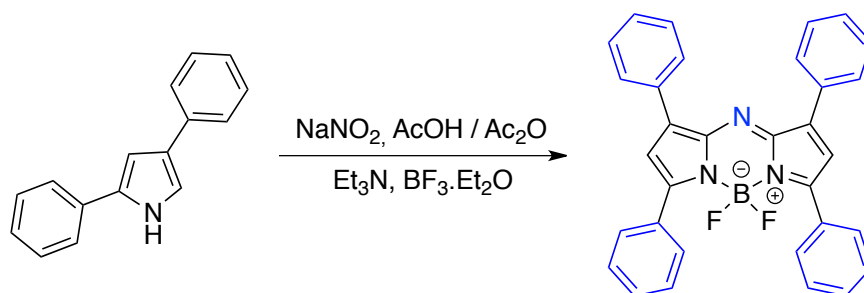


Schéma 18 : Synthèse d'un aza-BODIPY développé par Rahn *et al.*¹⁸⁹

Cette méthode a été reprise par le groupe de O'Shea pour synthétiser des aza-BODIPYs non symétriques par condensation de 2,4-diaryl-5-nitroso-pyrroles et de 2,4-diaryl-pyrroles (Schéma 19).¹⁹⁰

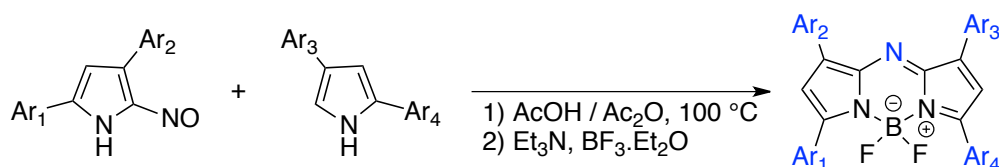
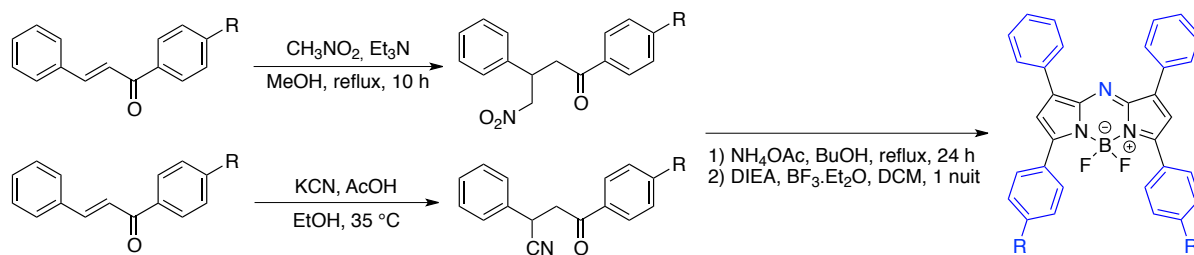
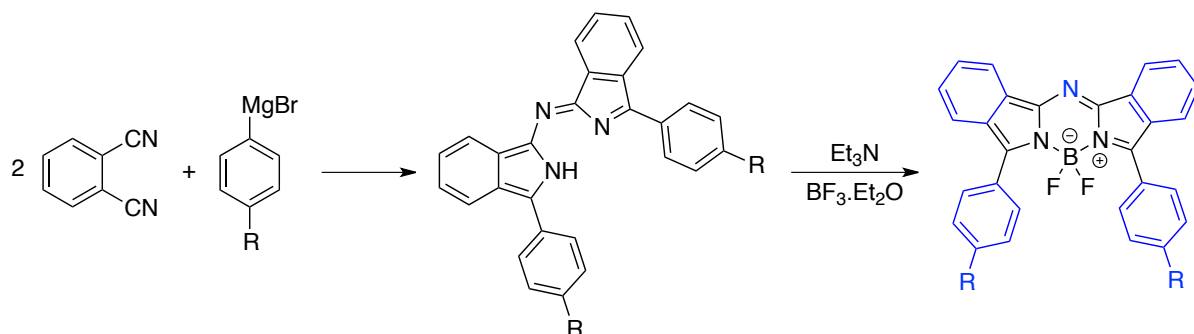


Schéma 19 : Synthèse d'aza-BODIPYs asymétriques d'après Hall *et al.*¹⁹⁰

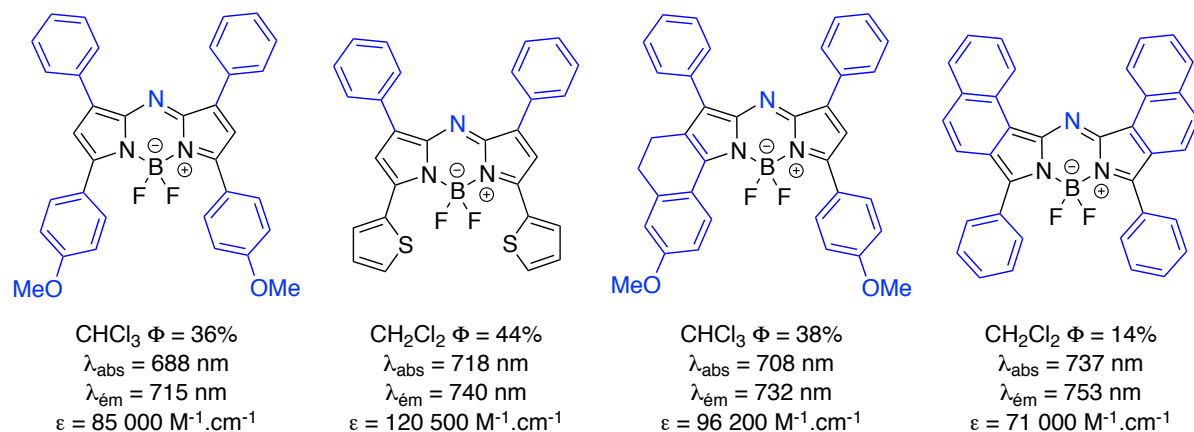
Les 1,3,5,7-tétraaryl-aza-BODIPYs peuvent être également préparés par réaction d'addition de chalcones et nitrométhane ou cyanure de potassium suivi d'une condensation en présence d'acétate d'ammonium pour former l'aza-dipyrrométhane correspondant qui après complexation avec le trifluorure de bore étherate aboutit à l'aza-BODIPY (Schéma 20). Cette méthode a été utilisée notamment par le groupe de O'Shea pour la synthèse de 1,7-diphényl-3,5-diaryl-aza-BODIPYs.¹⁹¹

Schéma 20 : Synthèse d'aza-BODIPY à partir de chalcones extrait de Lu et al.⁷⁹

Enfin la réaction faisant intervenir des phthalonitriles en présence de bromure d'arylmagnésium conduit à des benzo-aza-dipyrrométhènes avec des rendements moyens, pour donner après complexation aux benzo-aza-BODIPYs. Cette méthode a été développée notamment par le groupe de Kobayashi.¹⁹² Elle présente l'avantage de la disponibilité des phthalonitriles commercialement et de la facilité de préparation du dérivé magnésien (Schéma 21).

Schéma 21 : Synthèse de benzo-aza-BODIPYs extrait de Lu et al.¹⁹²

Les aza-BODIPYs présentent des propriétés photophysiques très intéressantes : un décalage bathochrome des maxima d'absorption et d'émission dans le proche infrarouge, des rendements quantiques élevés et une bonne stabilité chimique et photochimique (en particulier par rapport aux dérivés styryles) (Figure 64).

Figure 64 : Exemples d'aza-BODIPYs absorbant et émettant dans le proche infrarouge extrait de Lu et al.⁷⁹

II. Élaboration d'un théranostique à partir d'une nouvelle sonde NIR-BODIPY pour une imagerie *in vivo*

Nous avons opté pour une modification structurale du squelette BODIPY *via* l'introduction de groupements styryle (cf. 0). En effet cette méthode est bien décrite et maîtrisée au laboratoire. De plus, elle va nous permettre d'utiliser strictement la même stratégie de synthèse que dans la partie II en partant du même synthon de départ BODIPY acide.

Dans notre cas, il sera introduit deux groupements 4-hydroxystyryle. La raison de ce choix repose sur l'observation qu'un atome d'oxygène (dans le cas d'un groupe méthoxy) améliore le rendement quantique par rapport à un hydrogène et la supposition qu'introduire deux groupes phénols permettra d'obtenir un produit plus hydrosoluble, le tout en utilisant un réactif commercial, le 4-hydroxybenzaldéhyde.

La synthèse du théranostique **NIR-BODI-Au-1** comprend deux étapes clés (Figure 65) :

- Synthèse du NIR-BODIPY
- Couplage entre le NIR-BODIPY et le complexe d'or

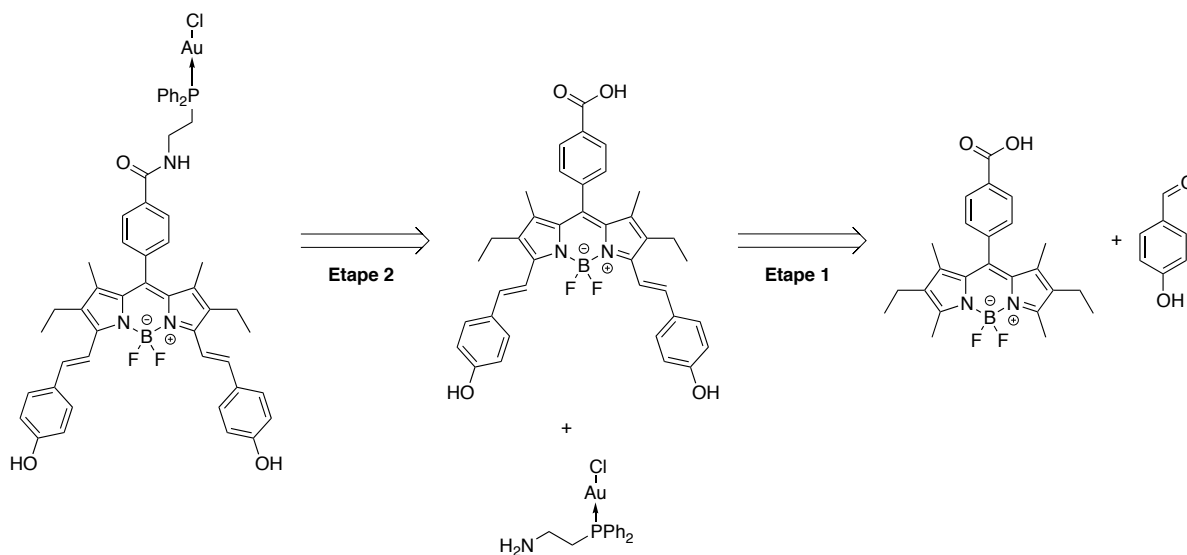


Figure 65 : Schéma rétrosynthétique de NIR-BODI-Au-1.

II.1. Synthèse du NIR-BODIPY

Pour la synthèse du NIR-BODIPY acide **14**, l'introduction des groupements *para*-hydroxystyryles a été réalisée par condensation de Knoevenagel sur le synthon BODIPY acide **5**. Des BODIPYs portant ces groupements 4-hydroxystyryles ont déjà été décrits dans la littérature.^{193,194} Cette voie de synthèse a été développée par les groupes de Daub et Akkaya (cf. 0) et a été optimisée au laboratoire. À savoir qu'en lieu et place de travailler à reflux du toluène avec un montage Dean-Stark afin d'éliminer l'eau formée au cours de la réaction, la synthèse a été réalisée à 100 °C sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif. Cette méthode a l'avantage de diminuer considérablement les temps de réaction et dans notre cas, de meilleurs rendements ont été obtenus. Ainsi le précurseur BODIPY acide **5** est mis en réaction avec deux équivalents de 4-hydroxybenzaldéhyde dans du toluène à 100 °C sous pression réduite (environ 400 mbar) jusqu'à évaporation totale du solvant. Puis, deux équivalents de 4-hydroxybenzaldéhyde dans du toluène sont ajoutés au milieu réactionnel. Cette opération est réalisée jusqu'à conversion complète du BODIPY acide de départ suivi par CCM. Le NIR-BODIPY acide **14** est obtenu après purification sur colonne de silice avec un rendement de 52% (Schéma 22). Le produit de monosubstitution a également été isolé ($\approx 5\%$).

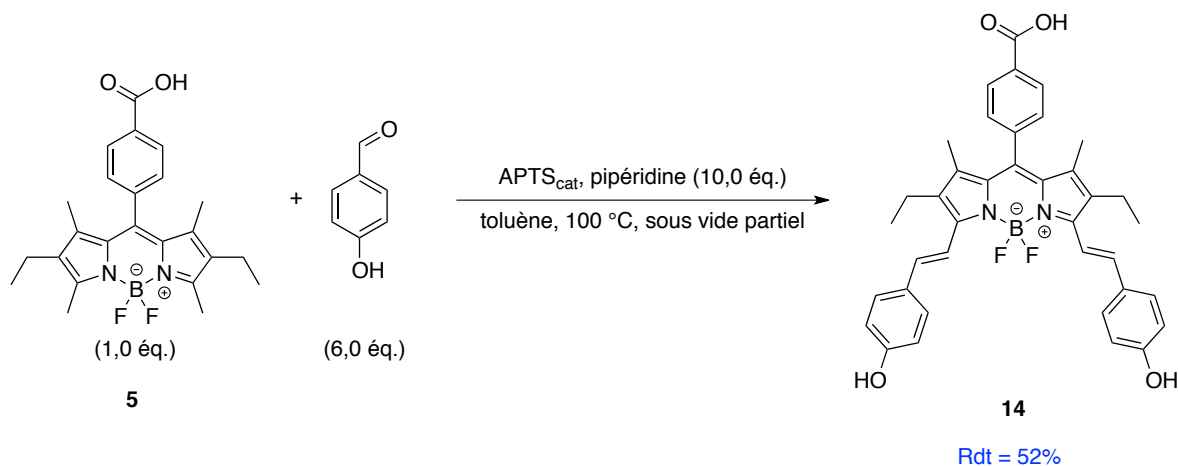


Schéma 22 : Synthèse de NIR-BODIPY acide **14**.

Le spectre RMN ^1H de **14** a permis de confirmer la présence de deux groupements hydroxystyryles (Figure 66). En effet, deux signaux à 7,34 ppm et 7,68 ppm sont caractéristiques des protons éthyléniques (1 et 2), de plus la constante de couplage ($^3J_{\text{H-H}} = 16,6$ Hz) permet de confirmer la configuration E de la double liaison.

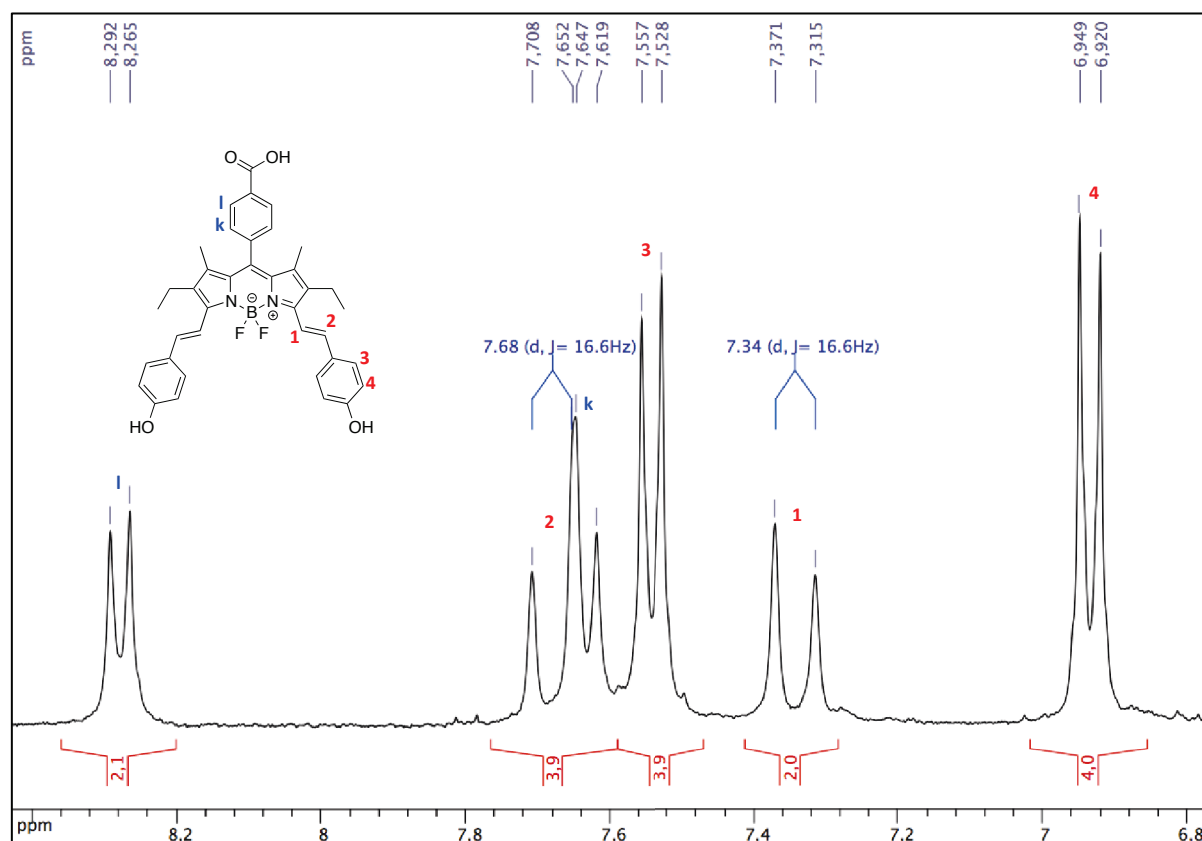


Figure 66 : Spectre RMN ¹H du NIR-BODIPY acide 14 (300,13 MHz, Acétone-d₆, 300 K).

II.2. Couplage du NIR-BODIPY avec le complexe d'or

Pour l'obtention du théranostique portant un BODIPY absorbant et émettant dans le proche infrarouge, **NIR-BODI-Au-1**, la même stratégie est utilisée, activation de la fonction acide du NIR-BODIPY **14** puis couplage peptidique avec le complexe aminoéthyl-diphénylphosphine-or **7**.

II.2.1. Activation de la fonction acide du NIR-BODIPY 14

La même méthode d'activation que précédemment est utilisée. Après lavages et purification sur colonne, le NIR-BODIPY ester activé **15** est obtenu avec un rendement de 24% (Schéma 23). Ce faible rendement peut s'expliquer par le fait que (i) la conversion n'est pas totale (du NIR-BODIPY acide **14** a été isolé) ; (ii) les multiples lavages entraînent une perte du produit ; (iii) les doubles liaisons des groupements styryles sont connues pour s'isomériser et pour être réactives vis à vis de l'oxygène.⁷⁵

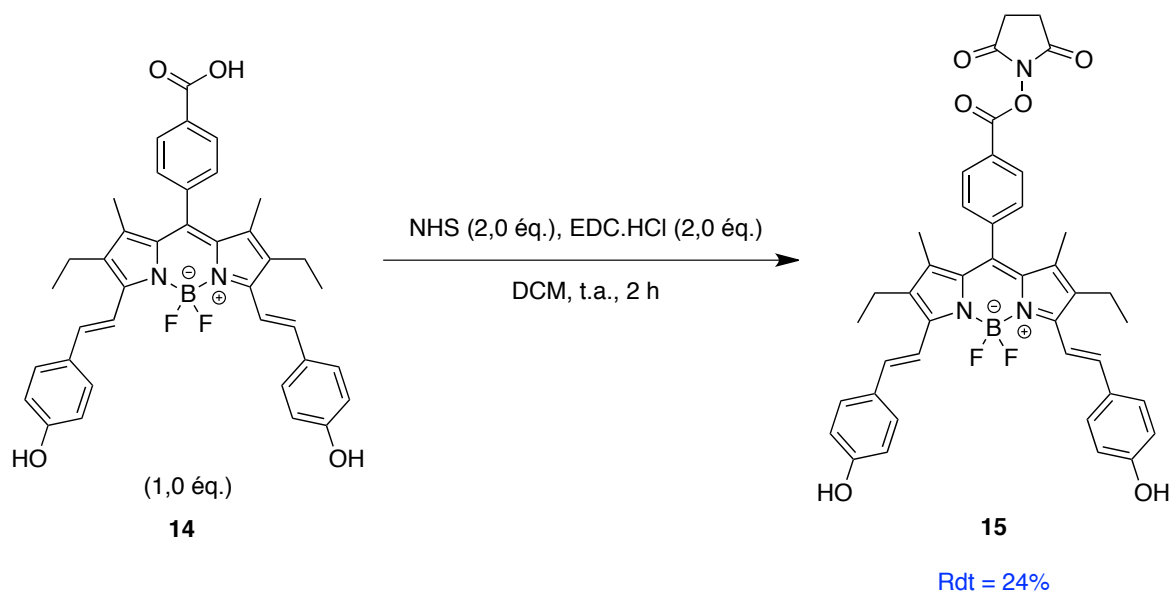


Schéma 23 : Synthèse du NIR-BODIPY ester activé 15.

II.2.2. Couplage de NIR-BODIPY ester activé 15 avec le complexe d'or 7

L'introduction du complexe d'or **7** est réalisée de la même manière par couplage peptidique. Pour cela, le NIR-BODIPY ester activé **15** est mis en réaction avec un léger excès de complexe phosphine-or **7** et deux équivalents de triéthylamine à reflux du chloroforme pendant 24 h. Après lavage aqueux acide et au pentane, le produit **NIR-BODI-Au-1** est obtenu, même si la présence d'impureté(s) est notable. Le « rendement » de 73% est purement indicatif (Schéma 24). Nous avons essayé différents types de lavage, de chromatographie ou de cristallisation sans succès.

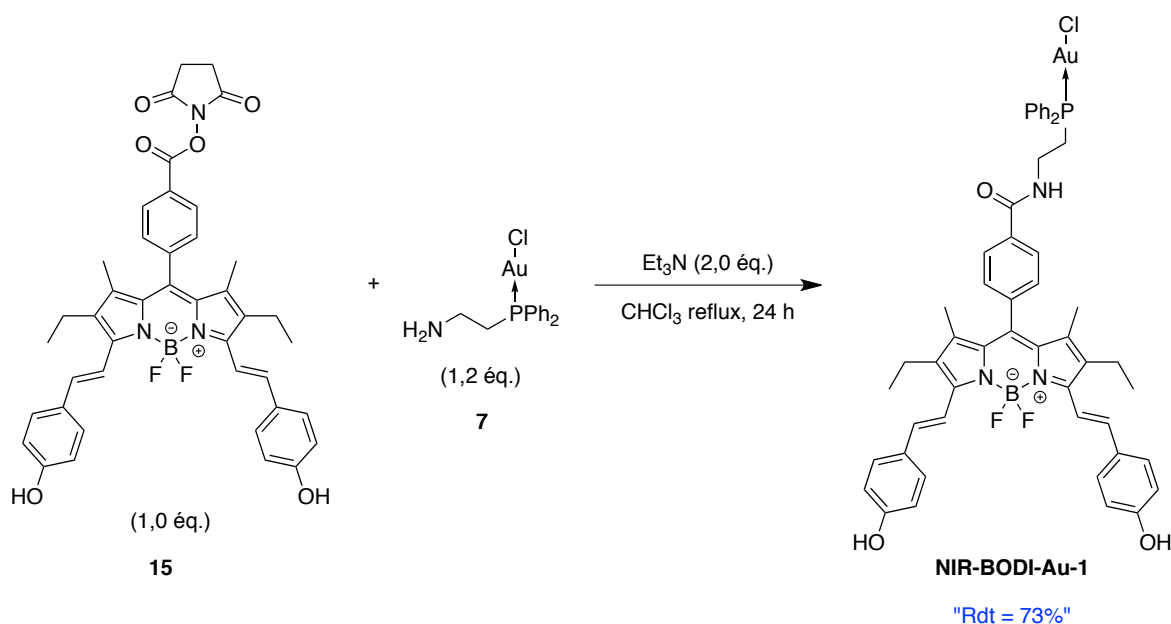


Schéma 24 : Synthèse du théranostique NIR-BODI-Au-1.

Néanmoins, l'analyse du produit montre que la conversion est totale. En effet, le spectre RMN ^{31}P découplé du proton montre qu'il ne reste plus de complexe **7** de départ (Figure 67). Le spectre RMN ^1H confirme que le couplage a eu lieu et qu'il ne reste plus de NIR-BODIPY ester activé **15** (Figure 68).

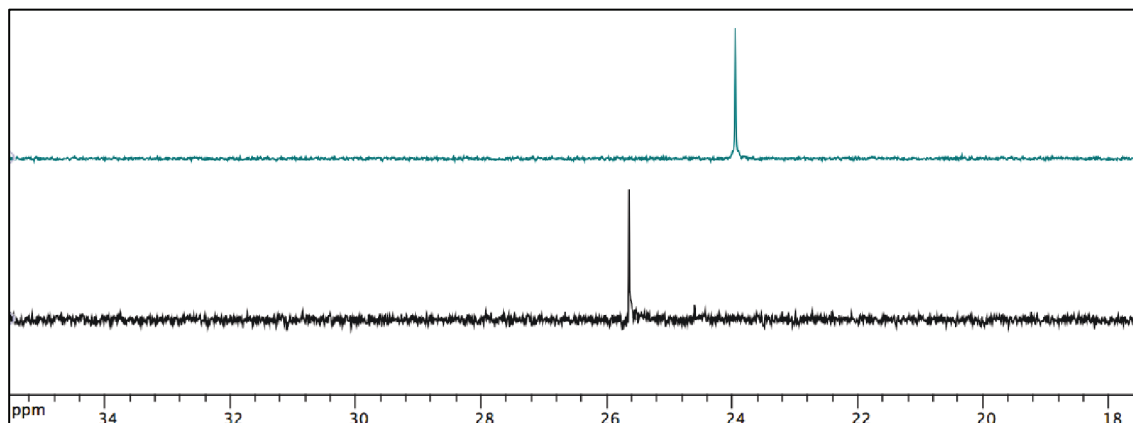


Figure 67 : Spectres ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ du complexe **7** (haut, CDCl_3) & NIR-BODI-Au-1 (bas, Acétone- d_6) (202,45 MHz, 300 K).

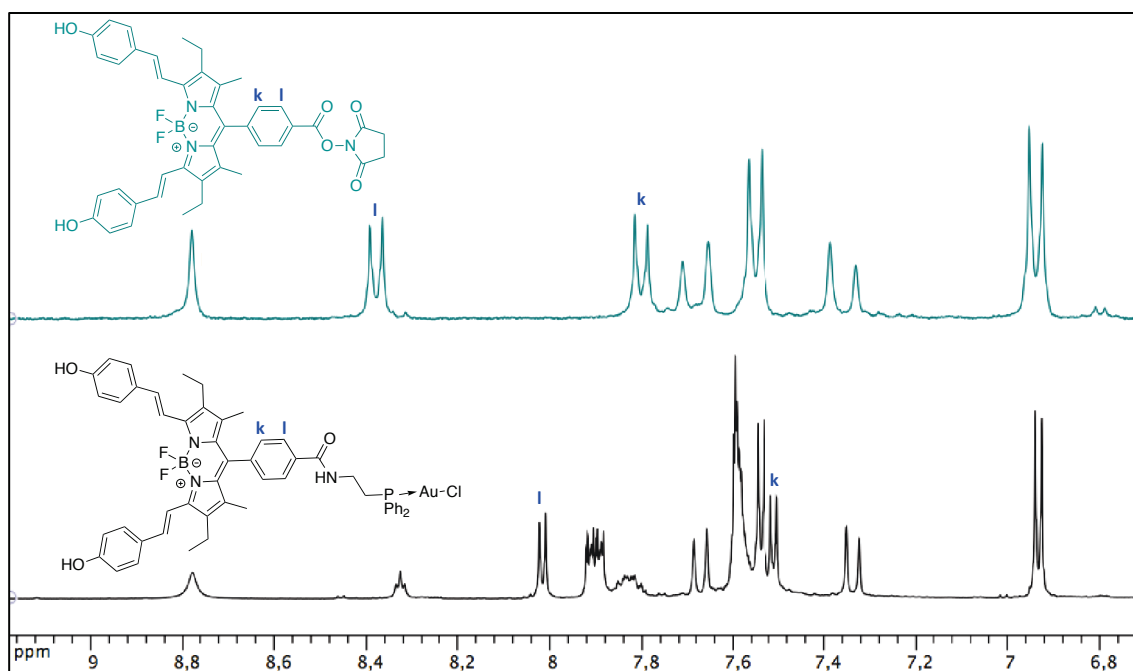


Figure 68 : Superposition des spectres RMN ^1H du NIR-BODIPY ester activé **15** et du produit NIR-BODI-Au-1 (300,13 MHz pour **15**, 600,23 MHz pour NIR-BODI-Au-1, Acétone- d_6 , 300 K).

Afin de valider la possibilité d'introduire un vecteur *via* l'atome d'or, nous avons réalisé la réaction de substitution du chlore par le thioglucose peracétylé (Schéma 25). Cette synthèse a été testée sur faible quantité de réactif (20 mg) mais a quand même permis l'obtention de NIR-BODI-Au-2 avec un « rendement » satisfaisant de 40% (l'impureté présente dans NIR-BODI-Au-1 est toujours visible après purification de NIR-BODI-Au-2).

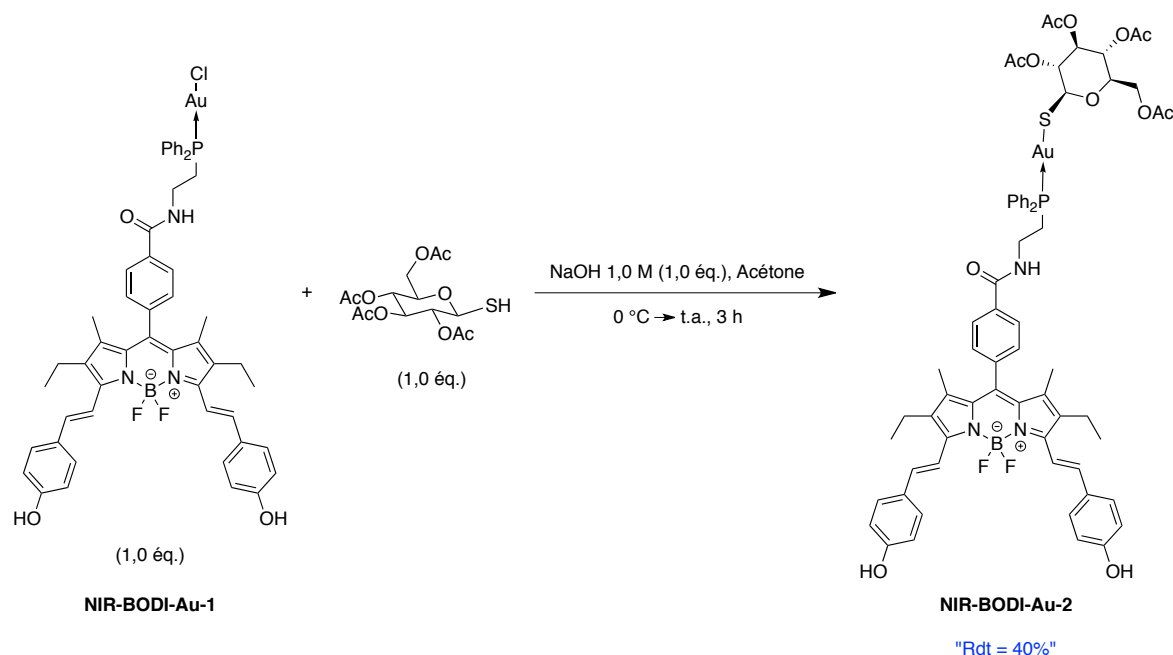


Schéma 25 : Synthèse du théranostique NIR-BODI-Au-2.

La synthèse des théranostiques **NIR-BODI-Au-1** et **NIR-BODI-Au-2** a été réalisée en utilisant la même stratégie que précédemment à l'exception d'une étape préalable d'introduction de groupements 4-hydroxystyryles sur le BODIPY. Les rendements observés sont plus faibles et pourraient s'expliquer par la moins bonne stabilité du NIR-BODIPY vis à vis notamment de l'oxydation des groupements styryles. Même si la pureté des produits finaux n'est pas parfaite, nous avons décidé de faire des études préliminaires de caractérisation photophysique et d'évaluation biologique afin de déterminer le potentiel de ces composés.

III. Étude photophysique de NIR-BODI-Au-1 et NIR-BODI-Au-2

Les propriétés photophysiques de **NIR-BODI-Au-1** et **NIR-BODI-Au-2** ont été évaluées afin de vérifier qu'ils absorbaient et émettaient dans la « fenêtre thérapeutique » et que l'introduction de la partie phosphine-or n'altérait pas les propriétés de fluorescence. Pour cela, les propriétés photophysiques du NIR-BODIPY acide **14** ont été comparées à celles des deux complexes **NIR-BODI-Au-1** et **NIR-BODI-Au-2**.

Les spectres d'absorption (en bleu) et d'émission (en rouge) sont présentés pour le NIR-BODIPY acide **14** (Figure 69), **NIR-BODI-Au-1** (Figure 70) et **NIR-BODI-Au-2** (Figure 71). Ces spectres ont été réalisés dans le DMSO à température ambiante et à une longueur d'excitation de 610 nm.

Le spectre d'absorption pour les trois composés présente une bande intense à 665 nm correspondant à la transition S_0-S_1 , une seconde bande d'intensité relativement élevée se situant aux alentours de 375 nm. Nous pouvons remarquer que cette bande d'absorption est plus intense que pour les composés avec un BODIPY émettant dans le visible. Ces deux bandes d'absorption sont caractéristiques de ces BODIPYs distyryles.^{195,196} L'introduction de la partie phosphine-or sur le BODIPY ne déplace pas le maximum d'absorption.

Le spectre d'émission des trois composés excités dans la bande d'absorption à 610 nm présente un seul maximum à 683 nm pour **14**, 679 nm pour **NIR-BODI-Au-1** et 680 nm pour **NIR-BODI-Au-2**. L'introduction de la partie phosphine-or sur le BODIPY déplace légèrement le maximum d'émission (déplacement hypsochromique de 3-4 nm).

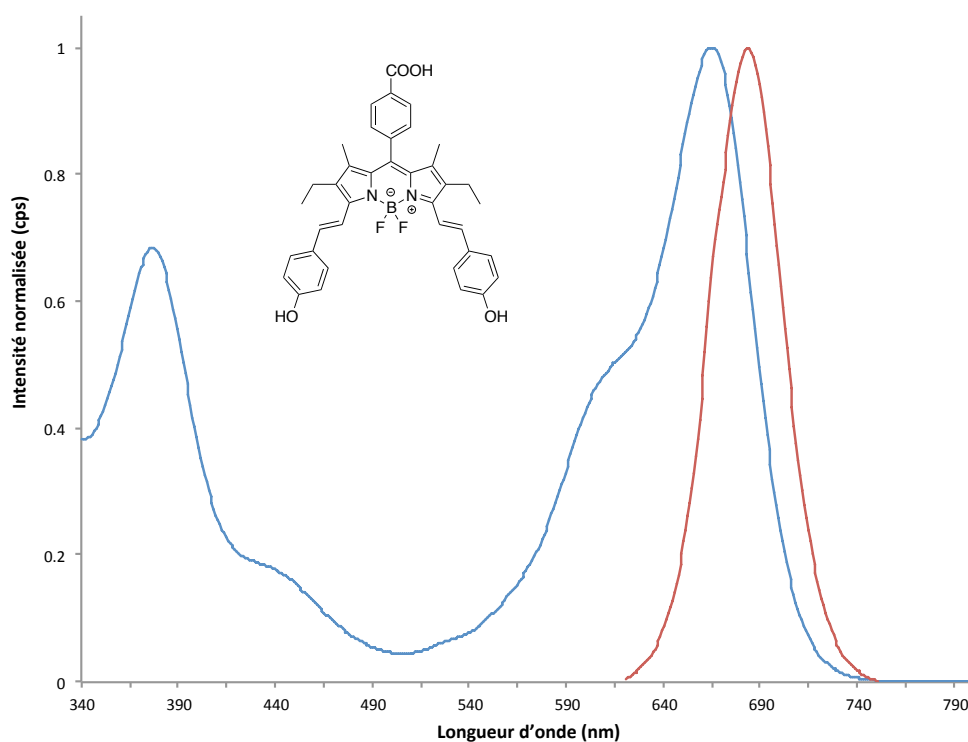


Figure 69 : Spectres d'absorption (bleu) et d'émission (rouge) du NIR-BODIPY acide 14 dans le DMSO à 298 K ($\lambda_{exc} = 610$ nm).

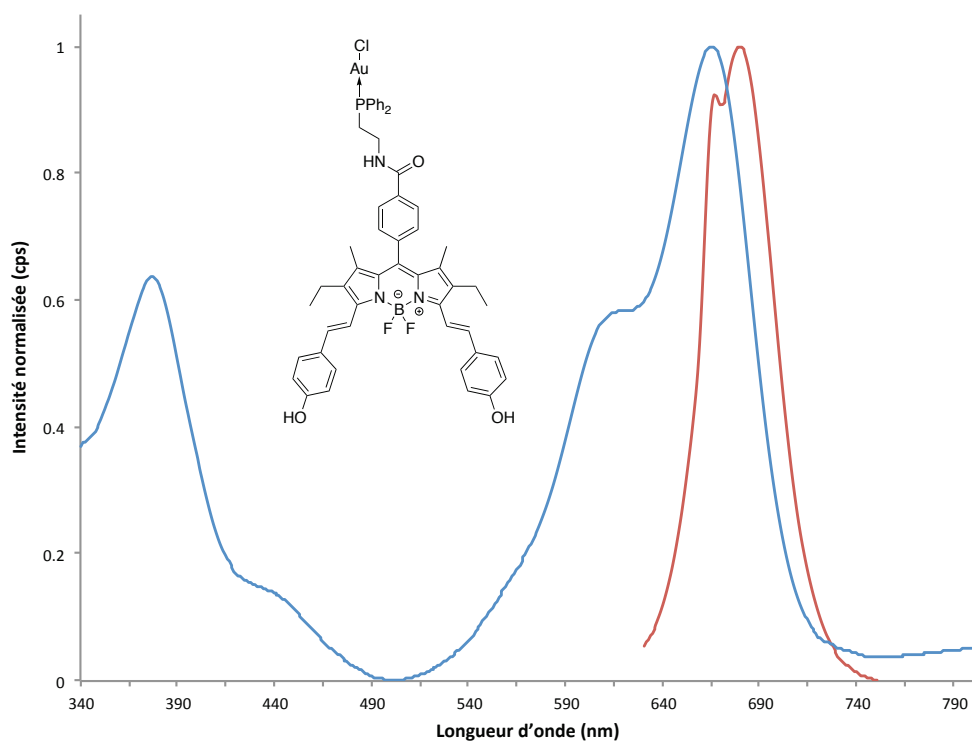


Figure 70 : Spectres d'absorption (bleu) et d'émission (rouge) de NIR-BODI-Au-1 dans le DMSO à 298 K ($\lambda_{exc} = 610$ nm).

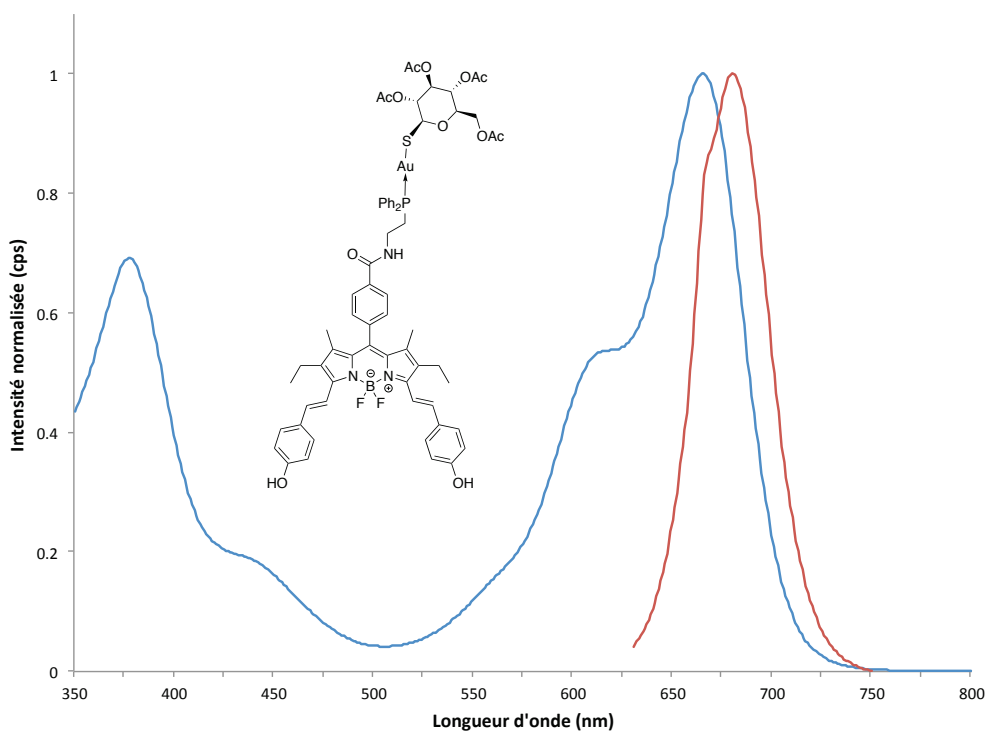


Figure 71 : Spectres d'absorption (bleu) et d'émission (rouge) de NIR-BODI-Au-2 dans le DMSO à 298 K ($\lambda_{exc} = 610$ nm).

Les rendements quantiques de fluorescence Φ_F ainsi que la brillance B des deux composés ont été déterminés dans le DMSO à température ambiante en utilisant la cyanine 5.29 comme référence ($\Phi_F = 0,30$ dans l'éthanol)⁷³ (Tableau 14). Le composé **14** possède un rendement quantique de fluorescence moyen mais intéressant pour des fluorophores de la « fenêtre thérapeutique » et caractéristique des BODIPYs distyryles. L'introduction de la partie phosphine-or semble faire baisser légèrement le rendement quantique ($\Phi_F = 17\%$ pour **NIR-BODI-Au-1** vs 25% pour **14**), mais surtout entraîne un effet hypochrome très significatif et difficilement justifiable (division par plus d'un facteur 3 du coefficient d'absorption molaire). De plus, en comparant la brillance de **NIR-BODI-Au-1** à celle de **BODI-Au-1**, nous remarquons qu'elle a été divisée d'un facteur 11. Cependant, la brillance reste satisfaisante pour une imagerie par fluorescence *in vivo*. Il faut cependant garder à l'esprit que ces mesures sont à prendre avec précaution de par la pureté du composé **NIR-BODI-Au-1**. Ces mesures seront à refaire après confirmation de la pureté du composé.

Composé	λ_{abs} nm	ϵ $\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$	λ_{em} nm	Φ_F % ^{a,b}	B $\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ^c
BODI-Au-1	525	33530	543	98	32850
14	665	61840	683	25	15220
NIR-BODI-Au-1	665	18000	679	17	2970

a) $\lambda_{\text{exc}} = 610$ nm. b) Cyanine 5.29 utilisée comme référence, $\Phi_F = 0,30$ dans l'éthanol, $\lambda_{\text{exc}} = 610$ nm, tous les rendements quantiques Φ_F sont corrigés de l'indice de réfraction des solvants. c) Brillance $B = \epsilon \times \Phi_F$.

Tableau 14 : Propriétés photophysiques du NIR-BODIPY acide 14 et NIR-BODI-Au-1 en comparaison avec BODI-Au-1 dans le DMSO à 298 K.

L'évaluation photophysique des composés a montré que l'introduction de deux groupements 4-hydroxystyryles entraîne un décalage bathochrome de l'absorption et de l'émission. De plus, cette stratégie est suffisante pour atteindre la « fenêtre thérapeutique » avec une absorption à 665 nm et une émission vers 680 nm validant ainsi cette méthode pour l'obtention de NIR-BODIPYs.

IV. Évaluation biologique de NIR-BODI-Au-1 et NIR-BODI-Au-2

Comme pour l'étude photophysique, l'évaluation biologique de ces composés n'est que très préliminaire et ces expériences seront à confirmer. C'est pourquoi nous allons nous focaliser sur les résultats obtenus et les conclusions que nous pouvons en tirer.

Premièrement, les propriétés antiprolifératives de **NIR-BODI-Au-1** ont été étudiées dans les mêmes conditions que les **BODI-Au-1** à **4**. Lors de la préparation des puits pour les tests, il a été remarqué la formation « importante » d'un précipité, sûrement résultant de l'agrégation de **NIR-BODI-Au-1**. Ce précipité rend difficile le calcul d'une IC_{50} , au mieux, il est possible d'affirmer que l' IC_{50} est inférieure à 150 μM . De plus, comme la précipitation a lieu avant l'entrée du composé dans les cellule, l'activité antiproliférative du complexe est vraisemblablement significativement sous-estimée.

Pour les tests suivants, nous avons profité d'une campagne d'évaluation des propriétés de fluorescence *in vivo* de fluorophores émettant dans le proche infrarouge couplée à des tests photo acoustiques sur gel fantôme. Ces expériences ont été réalisées par le CIPA à Orléans

Les tests de fluorescence *in vivo* ont été réalisés sur souris saine et avec **NIR-BODI-Au-2** (possibilité de ne tester qu'un seul composé). Nous avons privilégié l'analogue porteur du dérivé de thioglucose car nous pensons que ce vecteur en fait un composé plus prometteur. Ce composé a été injecté par voie intraveineuse et un suivi cinétique a été réalisé pendant 24 h par fluorescence sur Perkin Elmer Lumina III (Figure 72).

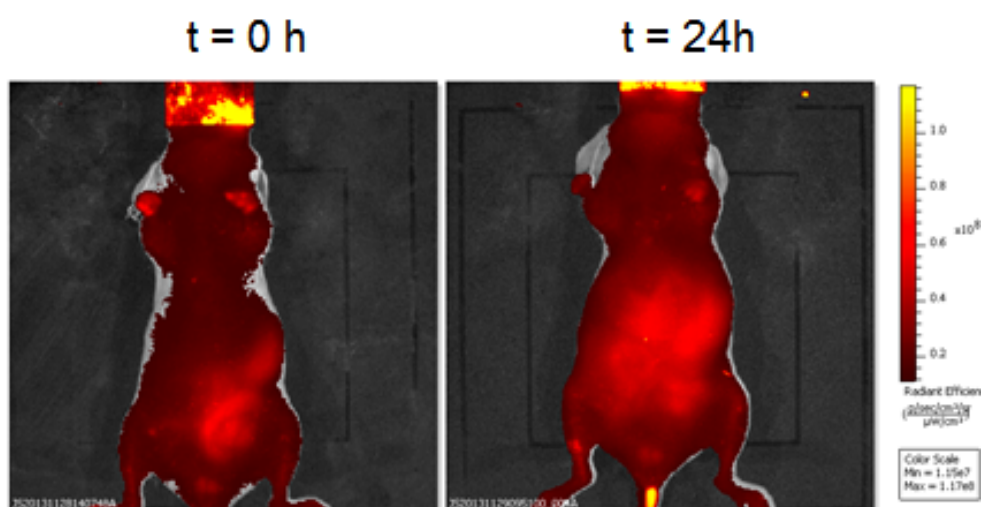


Figure 72 : Suivi cinétique par fluorescence après injection intraveineuse de NIR-BODI-Au-2.

Même si le signal n'est pas très intense, la répartition du théranostique dans l'organisme est visible sur l'image prise à 24 h. Il est donc possible de suivre notre composé sur petit animal. Plus intéressant, l'autopsie de la souris a été réalisée après 24 h (Figure 73). Sur ces clichés, les organes dans lesquels **NIR-BODI-Au-2** s'est accumulé sont aisément identifiables. Sans surprise, il est majoritairement localisé dans le foie. Il est également présent dans l'estomac et les intestins. Ces résultats sont plutôt encourageants car ils montrent que le complexe se retrouve dans des organes classiques de l'élimination de produits et non dans les poumons ou le cœur, ce qui aurait pu laisser entrevoir une potentielle toxicité. De plus, au cours des 24 h la souris injectée n'a pas montré de comportement anormal ce qui est rassurant quant à une bonne tolérance du composé.

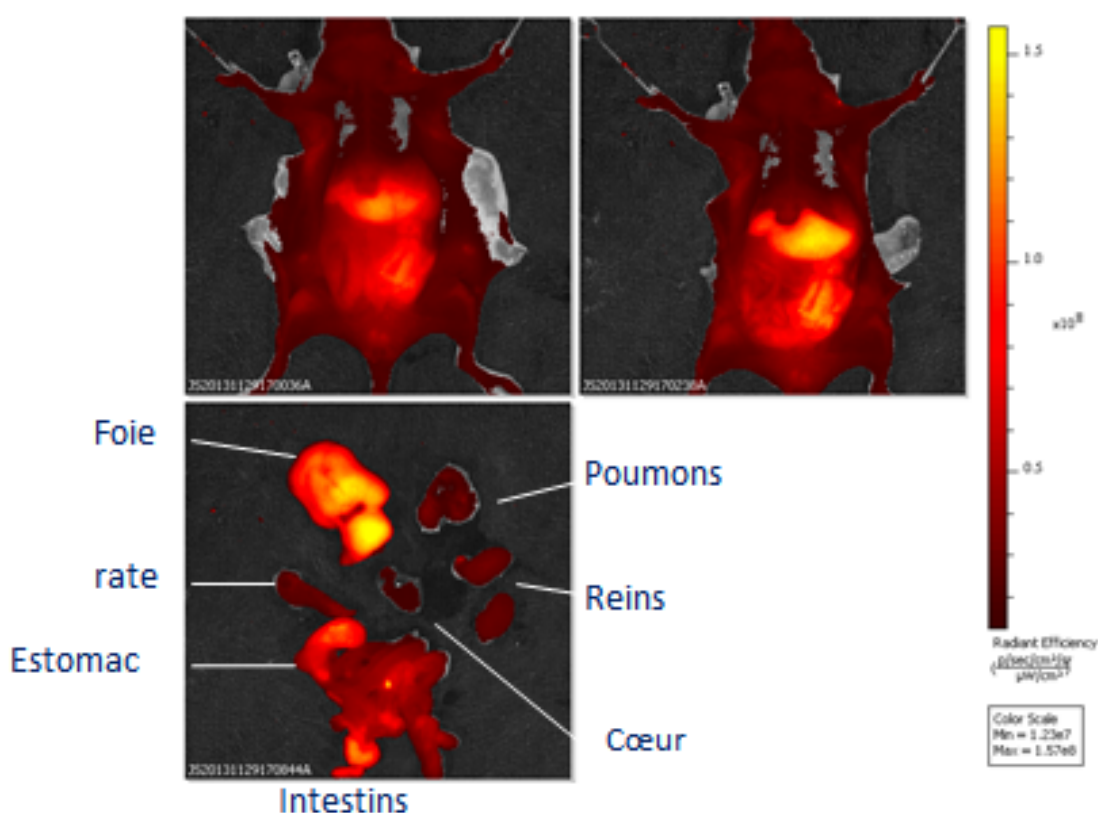


Figure 73 : Intensité de fluorescence des différents organes après autopsie de la souris à 24 h.

Une imagerie FLECT (« Fluorescence Emission Computed Tomography ») a également été réalisée. Cette technique permet de reconstruire des images tomographiques 3D à partir de l'émission de photons détectés par un ensemble de détecteurs déployés à 360° autour de l'animal. Cette technique permet une amélioration importante de la résolution et de la sensibilité. L'image obtenue montre que **NIR-BODI-Au-2** est compatible pour une application *in vivo*. (Figure 74).



Figure 74 : Image FLECT obtenue après injection intraveineuse de NIR-BODI-Au-2.

Une dernière série de tests a pu être réalisée sur **NIR-BODI-Au-1** et **NIR-BODI-Au-2**. Il s'agit de tests préliminaires permettant de déterminer si nos complexes possèdent un fort potentiel ou non pour de l'imagerie photoacoustique. Cette technique d'imagerie avait été évoquée en introduction lors du tableau récapitulatif des caractéristiques des modalités d'imagerie et repose sur le principe de la photoacoustique. Ce phénomène, rapporté par Alexander Graham Bell en 1880,¹⁹⁷ repose sur le principe que l'absorption d'une onde électromagnétique, lumineuse par exemple, va transmettre son énergie au récepteur qui peut la rayonner sous forme de chaleur. Cette augmentation locale de la température va dilater le milieu environnant générant ainsi une onde acoustique. Pour détecter un signal, il est nécessaire de générer des séries d'ondes mécaniques ce qui peut être obtenu par impulsion laser par exemple (impulsion = dilatation, absence d'irradiation = compression). Ces ondes photoacoustiques permettent de combiner les avantages de l'imagerie optique et de l'acoustique : profondeur d'exploration intéressante due à une faible atténuation dans les milieux mous, bon contraste, sélectivité chimique ou fonctionnelles suivant la fréquence des ondes électromagnétiques employées (Figure 75).

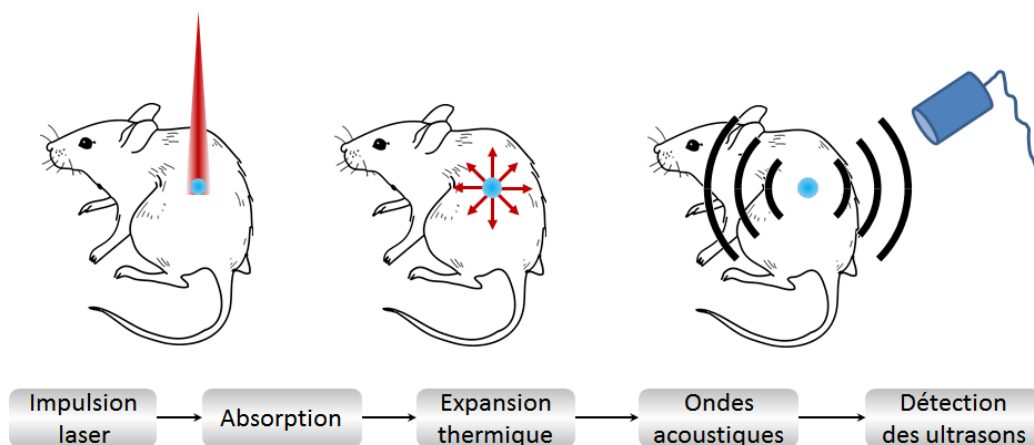


Figure 75 : Principe simplifié de la photoacoustique.

Si l'on réfléchit au principe, il apparaît qu'un mauvais fluorophore devrait donner de bons résultats en photoacoustique. En effet, généralement un mauvais fluorophore se caractérise après irradiation par une désexcitation importante sous forme de chaleur. Or c'est l'effet recherché en photoacoustique. En ce qui concerne nos composés, leur qualité en tant que fluorophore est plutôt bonne, mais le rendement quantique est faible (contrairement à **BODI-Au-1**, **BODI-Au-2** et **BODI-Au-3**).

Les tests ont été réalisés sur fantôme, plus précisément sur un gel mimant les tissus biologiques. Les résultats obtenus montrent le signal que donnerait une accumulation de fluorophore à 11 mm de profondeur (Figure 76). En rouge apparaît le signal du fluorophore irradié et en bleu une zone contrôle. Pour une irradiation comprise entre 680 et 730 nm les deux théranostiques répondent en photoacoustique (on peut comparer leur signal par rapport à un fluorophore ne répondant pas cf. Figure 76 à droite). Les résultats sont meilleurs pour **NIR-BODI-Au-2** où il est possible d'aller au-delà de 730 nm et qui émet un signal plus intense que **NIR-BODI-Au-1** (attention les graphiques ne sont pas à la même échelle pour **NIR-BODI-Au-1**, à gauche, le maximum est à 0,58 u.a. et pour **NIR-BODI-Au-2**, au centre, il est de 1,70 u.a.).

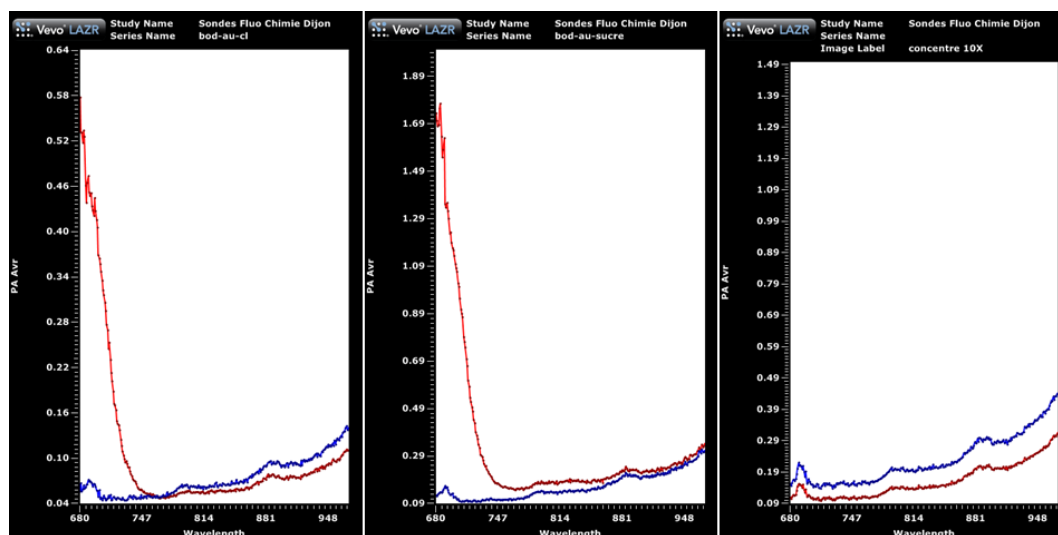


Figure 76 : Signaux photoacoustiques obtenus sur gel fantôme pour NIR-BODI-Au-1 (gauche), NIR-BODI-Au-2 (milieu), un fluorophore ne répondant pas (droite) (rouge : fluorophore irradiée, bleu : zone contrôlée).

Ces valeurs ont surpris nos collaborateurs car elles leur paraissent élevées pour un composé visible par fluorescence *in vivo*.

Au bilan de ces tests biologiques préliminaires, il apparaît que **NIR-BODI-Au-2** est un bon candidat pour l'imagerie de fluorescence sur petit animal et que **NIR-BODI-Au-1** et **NIR-BODI-Au-2** sont prometteurs pour la photoacoustique. Les tests de prolifération cellulaire ont donné des résultats moins encourageants du fait de la précipitation partielle du complexe **NIR-BODI-Au-1**. Néanmoins, il a montré une certaine toxicité qui nous pousse à travailler sur son hydrosolubilisation. Pour finir, **NIR-BODI-Au-2** semble bien circuler dans l'organisme de la souris, ne semble pas présenter de toxicité à 24 h et s'accumule dans des organes classiques pour un produit injecté de façon intraveineuse.

Chapitre 2 : Contre le phénomène d'agrégation des BODIPYs

*Doulain P.-E., Richard, P., Goze C.; Bodio E.; Decréau R.**

I. Introduction

Les BODIPYs sont des fluorophores présentant des propriétés photophysiques très intéressantes pour une application en imagerie optique. Dans le cadre d'une imagerie *in vivo* nous venons de voir qu'il est nécessaire d'avoir un BODIPY absorbant et émettant dans la « fenêtre thérapeutique ». En outre, le BODIPY doit être biocompatible à savoir qu'il doit être stable en milieu physiologique, suffisamment soluble et considéré comme non toxique pour l'organisme. La solubilité aqueuse est une des principales limites de l'utilisation des BODIPYs. En effet, la faible solubilité des BODIPYs peut entraîner des phénomènes d'agrégation qui ont pour conséquence d'altérer les propriétés photophysiques et surtout qui peuvent les rendre incompatibles avec des applications biomédicales. Pour améliorer la solubilité aqueuse des BODIPYs différentes stratégies peuvent être envisagées :

- une encapsulation du BODIPY lipophile, par exemple encapsulation du BODIPY dans des nanoparticules de silice⁸³
- une introduction de groupements hydrosolubilisants^{81,82}
- une construction du BODIPY afin d'empêcher l'agrégation

L'utilisation de nanoparticules pour notre projet n'aurait pas de réel sens. En effet, nous cherchons à faire un théranostique moléculaire pour nous affranchir des défauts et limitations des nanoobjets. Quant à l'introduction de groupements hydrosolubilisants, cela fait l'objet de plusieurs autres projets du laboratoire. Nous nous sommes donc focalisés sur le troisième point : travailler la structure tridimensionnelle du BODIPY pour limiter le phénomène d'agrégation.

I.1. Phénomènes d'agrégation des BODIPYs

Les BODIPYs sont connus pour s'agréger en milieux aqueux par un phénomène de « π -stacking » intermoléculaire altérant ainsi les propriétés photophysiques notamment le rendement quantique. De plus, Johansson *et coll.* ont montré la formation de deux types de dimères en fonction de l'environnement dans lequel se trouve le BODIPY. Ainsi dans un environnement aqueux, un dimère de type H, résultant de l'empilement « sandwich » de deux BODIPYs, non fluorescent et dont l'absorption est décalée vers les basses longueurs d'onde est observé. Dans un environnement lipidique, un dimère de type J fluorescent et dont l'absorption est décalée vers les hautes longueurs d'onde est observé (Figure 77).^{198,199} Brennan *et coll.* ont montré qu'en réalité en solution aqueuse les monomères de BODIPYs s'agrégent rapidement puis le dimère se forme lentement à partir de l'agrégat.²⁰⁰

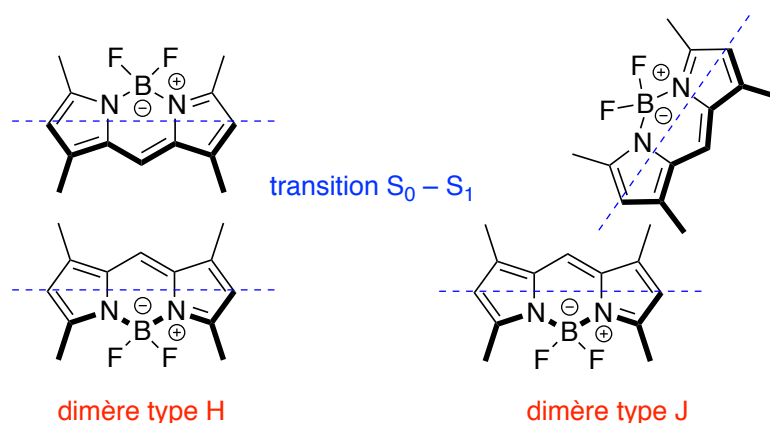


Figure 77 : Structures des dimères H et J de BODIPYs adapté de Loudet *et al.*¹¹⁷

I.2. Solution pour empêcher l'agrégation des BODIPYs

Afin de prévenir l'agrégation des BODIPYs, une des stratégies est l'introduction de groupements encombrants. Ainsi, Pansu *et coll.* ont synthétisé plusieurs BODIPYs substitués sur les positions α pyrroliques par des groupements mésityles,²⁰¹ [2,2]-paracyclophanes²⁰² et plus récemment adamantyles²⁰³ (Figure 78). Ils ont montré qu'avec l'introduction de ces groupements, les phénomènes d'agrégation par « π -stacking », et donc l'inhibition de la fluorescence, étaient diminués et ces structures présentaient alors des propriétés photophysiques très intéressantes pour une imagerie à l'état solide.

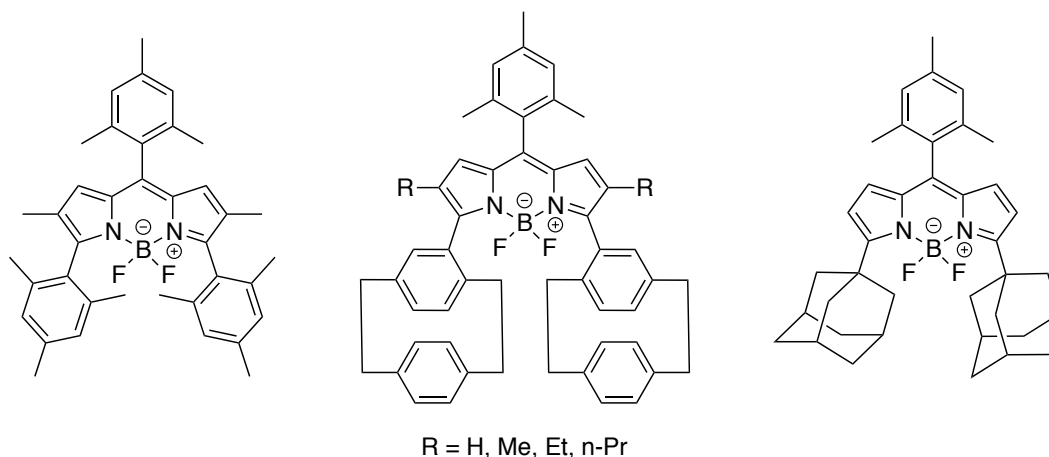


Figure 78 : BODIPYs possédant des groupements volumineux en position α pyrroliques développés par Pansu et coll.

De la même manière, d'autres groupes ont travaillé à l'introduction de groupements volumineux sur les positions β -pyrroliques du squelette BODIPY qui ont montré de bonnes propriétés photophysiques. Lu *et al.* ont ainsi synthétisé des BODIPYs portant des groupements tétraphénylsilyles²⁰⁴ et Zhang *et al.* ont introduits des 4-tritylphényles²⁰⁵ (Figure 79).

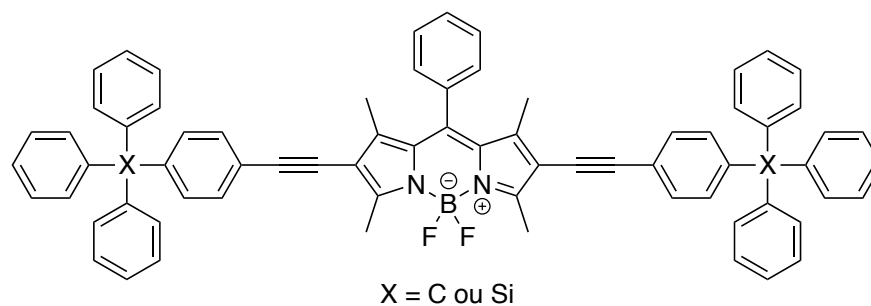


Figure 79 : BODIPYs portant des groupements encombrants en position β -pyrroliques.

Cependant, l'introduction de groupements encombrants hydrophobes ne va pas dans le sens d'une utilisation pour une imagerie en solution *in vivo* utilisant des espèces hydrosolubles.

II. Les BODIPYs–Piquets pour prévenir l'agrégation

II.1. BODIPYs–Piquets : design d'une architecture moléculaire superstructurée

L'approche « Picket-Fence »^{206,207}

Notre approche s'est calquée sur celle développée pour les modèles de site actifs d'hémoprotéines, en particulier les complexes de l'oxygène. Plus précisément, il s'agit d'une approche « Picket-Fence » qui propose d'introduire un ensemble de « piquets » dont l'ensemble constitue une poche stérique apposée sur la face d'une plateforme, porphyrinique de fer (Figure 80), permettant ainsi d'une part de stabiliser les complexes de l'oxygène et d'autre part de prévenir la réaction intermoléculaire spontanée conduisant à l'espèce μ -oxo. Nous avons transposé la problématique « complexes de l'oxygène » à la problématique « fluorophores » en pensant que ces appendices structuraux pourraient, de la même manière, permettre de répondre aux prérequis d'un fluorophore risquant de s'agréger en milieu physiologique. Les piquets utilisés sont des piquets pivalamides qui résultent de l'acylation par le chlorure de pivaloyle avec l'*ortho*-aminophényle (Figure 80).

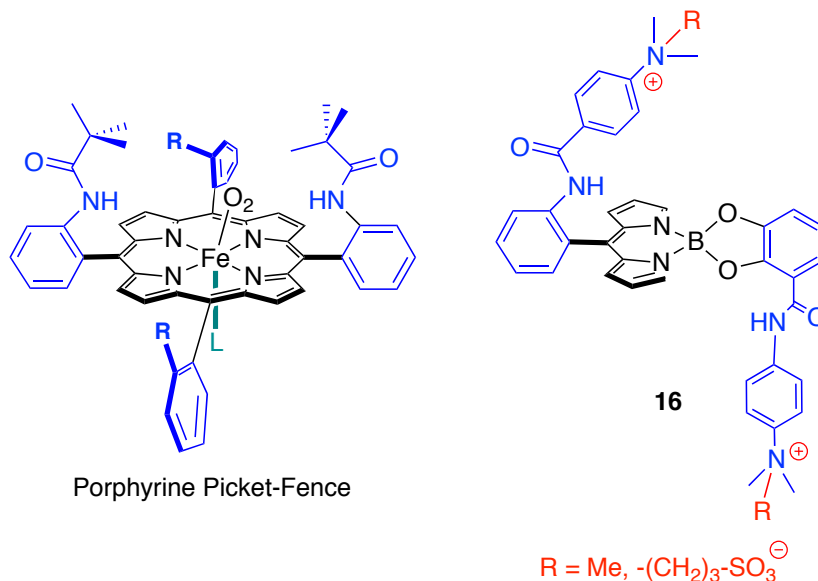


Figure 80 : Structures d'une porphyrine Picket-Fence et du BODIPY 16 avec les groupements encombrants.

Les piquets

Nous avons décidé de remplacer le *tert*-butyle du groupement pivaloyle du Picket-Fence « historique » par une diméthylaniline qui apportera un encombrement stérique axial au moins comparable à celui du *tert*-butyle (Figure 80). De plus, ce piquet

diméthylaniline est pro-hydrosolubilisant, c'est à dire qu'il est quaternisable en une espèce ammonium hydrosolubilante. Ce type de piquet sera également introduit sur l'aryle lié au bore.

Le site et la fonction d'accroche (Figure 81)

Deux sites (position *meso* et *via* le bore) et trois fonctions d'accroche (aniline, phénol et acide benzoïque) sont envisageables pour la conjugaison des piquets sur la plateforme BODIPY.

1- Le *meso*-phényle **dis**substitué, où idéalement deux fonctions pourraient être présentes afin d'y introduire les groupements et répondre au cahier des charges. Le précurseur 2,6-dinitrobenzaldéhyde (coûteux) a d'abord été considéré, mais la synthèse du dipyrrométhane correspondant s'est avérée difficile à réaliser. Avec un précurseur 2,6-diméthoxybenzaldéhyde la déprotection ultérieure de deux fonctions OH en *ortho* se produit mais conduit à de nombreux produits secondaires. En partant directement du 2,6-dihydroxybenzaldéhyde, les condensations donnent lieu à des rendements médiocres. Pour ces raisons, la stratégie de disubstitution 2,6 a été abandonnée.

2- Le *meso*-phényle **mono**substitué : c'est la stratégie développée pour la tétraaminophénylporphyrine, synthon de base de la porphyrine Picket-Fence qui a été suivie pour le BODIPY. En choisissant cette méthode, le deuxième piquet est introduit sur l'aryle lié au bore (Figure 81).

L'introduction de l'aryle sur le bore peut se faire soit par formation de liaison bore-carbone^{208,209} soit par création de liaisons bore-oxygène et conduire ainsi à des composés mono et disubstitués. Par commodité de synthèse, disponibilité des synthons, et pour des applications futures, nous avons décidé de nous orienter vers la formation de liaisons B-O. Deux méthodes ont été développées permettant l'introduction de dérivés oxygénés : (i) réaction des dipyrrométhènes avec des dérivés fonctionnalisés du bore²¹⁰ (ii) ou par substitution des fluors du BODIPY.^{125,211,212} Ainsi dans la littérature, des dérivés de type alkoxy, aryloxy et catéchol ont pu être introduits sur le bore des BODIPYs.²¹³⁻²¹⁷

Dans le cadre de notre étude, nous avons décidé d'introduire un dérivé catéchol en émettant l'hypothèse que le catéchol permettra de rigidifier la structure et d'orienter correctement le groupe (Figure 81). Cette approche catéchol a été également choisie par facilité de synthèse par rapport à l'introduction de deux phénols fonctionnalisés et aussi

parce que les liaisons B-O peuvent s'hydrolyser en milieu biologique et le côté chélate du catéchol devrait limiter cette dégradation. L'approche phénol sera cependant rapidement abordée en fin d'étude puis comparée à l'approche catéchol.

3- Le *meso*-phényle **non** substitué : cela nécessite d'utiliser un catéchol disubstitué qu'il faudrait synthétiser. Cette approche pourrait être séduisante du point de vue synthèse (très peu d'étape de synthèse à effectuer sur le BODIPY une fois le catéchol couplé) mais n'offre pas la meilleure orientation des piquets.

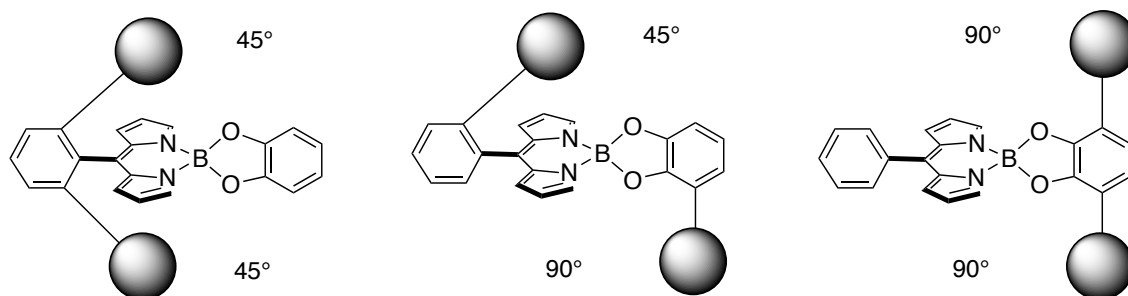


Figure 81 : Représentation de la plateforme BODIPY avec introduction d'une ou deux fonctions par phényle et angles correspondants.

L'orientation du piquet.

Par définition, le piquet introduit est axial. On constate que l'angle formé entre le piquet et la plateforme BODIPY est d'environ 45° dans le cas du piquet *meso* phényle, et de 90° dans le cas du piquet sur le bore (Figure 81). Bien que cette configuration soit très favorable par rapport au cas d'un BODIPY plan, il faut cependant noter que la configuration idéale serait celle d'un piquet sur le bore avec une orientation d'environ 45° pour permettre un « recouvrement » complet de la plateforme BODIPY. À l'inverse le recouvrement actuel laisse encore une légère possibilité de formation d'empilement conduisant à un dimère. Ceci serait encore plus prononcé dans le cas d'une configuration 90° / 90° avec un piquet catéchol doublement fonctionnalisé (Figure 81).

L'atropoisomérisation des BODIPYs

En réalisant le couplage de ces piquets permettant un encombrement des deux faces du BODIPY, on peut imaginer que la réaction de couplage, qu'elle quelle soit, conduise non seulement au produit désiré avec des piquets en haut et en bas (*trans*, α,β Figure 82, gauche), mais aussi au produit secondaire où les deux piquets sont sur la même face (*cis*, α,α Figure 82, droite). Cela signifie une chute des rendements globaux de la cible *trans* désirée.

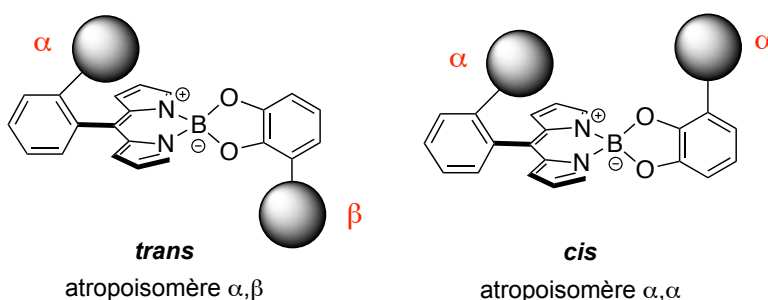


Figure 82 : Isomères cis et trans du BODIPY cible.

Pour éviter ce problème, nous nous sommes là encore basés sur des travaux antérieurs effectués en série porphyrine et corrole, mettant en œuvre des atropoisomères interconvertibles.^{206,218}

Un atropoisomère est une sous-classe de rotamère où la rotation autour d'une liaison simple est gênée en raison d'un encombrement stérique important. La gêne est telle que la barrière énergétique devient très élevée, il devient alors possible d'isoler ces rotamères. Un exemple est celui des biaryles *ortho*-substitués, et dimères de naphthalène.²¹⁹

Ainsi le *meso-ortho*-aminophényle du synthon BODIPY amino est un analogue du *meso-ortho*-aminophényle rencontré en série porphyrine, comme dans le cas de la tétraaminophényle porphyrine ou triaminophényle corrole. Ces atropoisomères sont interconvertibles, mais restent cependant suffisamment stables à température ambiante pour être isolés et manipulés.

Notons que le nombre d'atropoisomères obtenu en série porphyrine est de quatre,^{206,207} en série corrole de trois,²¹⁸ et nous nous attendons à ce qu'il soit de deux dans le cas du BODIPY (Figure 82). Classiquement, les groupements pointant sur la face supérieure sont définis par « alpha », et ceux sur la face inférieure par « bêta ».

Dans le cas de la porphyrine on peut envisager les atropoisomères suivants (Figure 83) :

- ✓ quatre groupements pointant en haut soit $\alpha,\alpha,\alpha,\alpha$ (encore noté α_4)
- ✓ trois en haut et un en bas $\alpha,\alpha,\alpha,\beta$ encore (noté $\alpha_3\beta$)
- ✓ deux en haut et deux en bas $\alpha,\alpha,\beta,\beta$ (encore noté $\alpha_2\beta_2$)
- ✓ deux en haut et deux en bas $\alpha,\beta,\alpha,\beta$

La même approche existe en série corrole avec seulement trois aminophényle, puisqu'un groupement *meso* disparaît au profit d'une liaison pyrrole-pyrrole directe, qui donne lieu à trois atropoisomères : α,α,α (encore noté α_3), α,α,β (encore noté $\alpha_2\beta$) et α,β,α (Figure 83).

De la même façon, grâce à la libre rotation de ce même groupement *ortho*-aminophényle on envisage deux atropoisomères en série BODIPY (Figure 83) :

- ✓ deux groupements pointant vers le haut : atropoisomère α,α (ou *cis*)
- ✓ un groupement pointant vers le haut, l'autre vers le bas : atropoisomère α,β (ou *trans*).

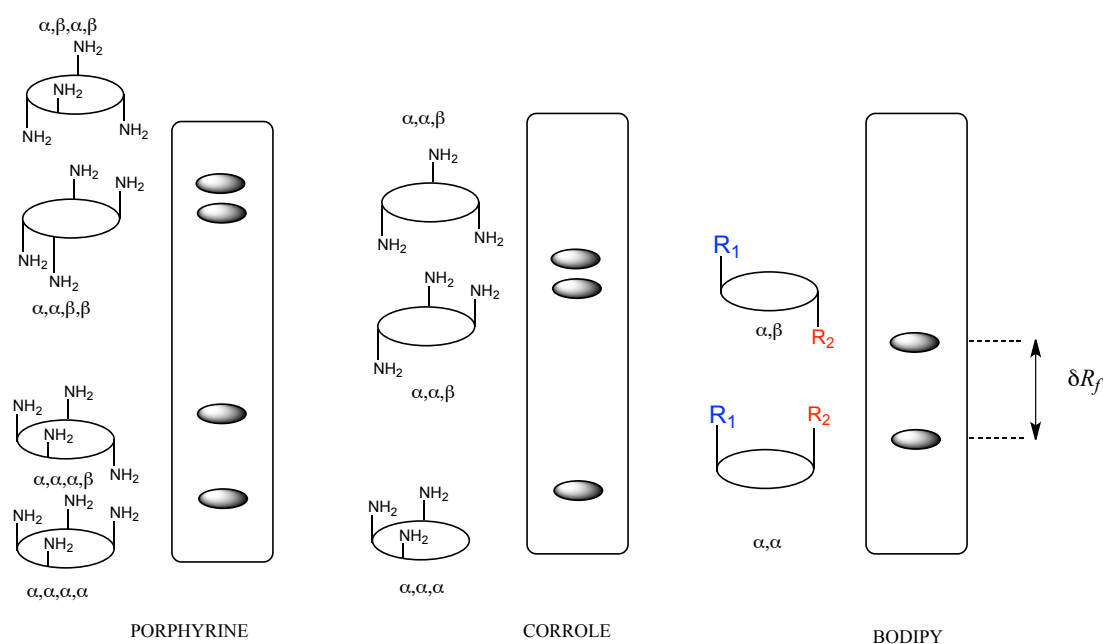


Figure 83 : Atropoisomères en série porphyrine, corrole et BODIPY.

La Figure 83 montre le profil CCM avec la mobilité des différentes espèces indicatives de leur polarité respective : lorsque toutes les fonctions amine pointent dans la même direction (α_4 en série porphyrine, α_3 en série corrole) la polarité est beaucoup plus élevée. Au fur et à mesure que le nombre de *meso-ortho*-aminophényle ayant effectué leur rotation de 180° augmente, la polarité diminue. On s'attend donc à retrouver une telle tendance en série BODIPY, avec l'atropoisomère ayant les deux fonctions polaires pointant dans la même direction α,α (*cis*) comme étant le plus polaire. La suite de ces travaux exposera une stratégie visant à déterminer quel couple de fonctions polaires (**R1**, **R2**) devra être choisi pour permettre une bonne séparation des atropoisomères (c'est à dire une différence de mobilité δR_f en CCM ou de temps de rétention en chromatographie δR_t).

II.2. Validation de la méthodologie de synthèse : composés modèles

Afin de vérifier la faisabilité de la réaction avec les dérivés catéchols, trois composés modèles ont été synthétisés en partant du synthon BODIPY **17**. Le mode opératoire développé par Tahtaoui *et al.*¹²⁵ a été utilisé.

Le BODIPY **17** est mis en réaction en présence d'un excès de trichlorure d'aluminium à reflux du dichlorométhane pendant 10 min. Le milieu réactionnel devient violet au cours du temps. Puis le milieu réactionnel est laissé revenir à température ambiante et un excès de catéchol (catéchol, acide 2,3-dihydroxybenzoïque ou pyrogallol) solubilisé dans de l'acétonitrile est ajouté goutte à goutte au milieu réactionnel qui est ensuite agité pendant 30 min à température ambiante. Après filtration sur célite afin d'éliminer les sels d'aluminium et purification sur colonne de silice, le produit est obtenu avec un rendement de 42 à 76%. Cette méthode a permis ainsi d'introduire le catéchol, le dérivé catéchol acide et le dérivé catéchol hydroxy et d'obtenir les dérivés BODIPYS correspondants **18**, **19** et **20** avec de bons rendements pour ce genre de composés (Schéma 26).

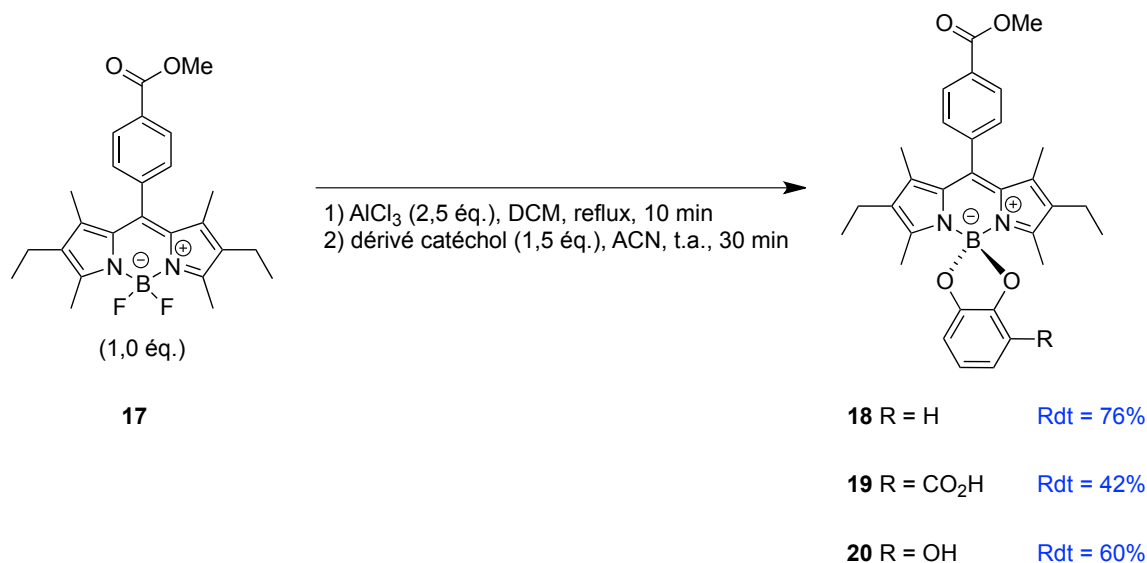


Schéma 26 : Synthèse des 3 composés modèles BODIPY - catéchol.

Une analyse par RMN ¹¹B nous a permis de confirmer la formation du produit ainsi que l'absence de produit de départ et de produit de monosubstitution. En effet, le signal du bore dans le BODIPY de départ est un triplet à 0,71 ppm, le bore couplant avec le fluor. Le signal du bore dans les espèces bore-catéchol est quant à lui un singulet à 7,22 ppm pour **18** (Figure 84), à 2,15 ppm pour **19** et à 7,27 ppm pour **20**. La différence de déplacement

chimique pour le composé **19** pourrait s'expliquer par la présence de la fonction acide sur le catéchol, groupement électro-attracteur.

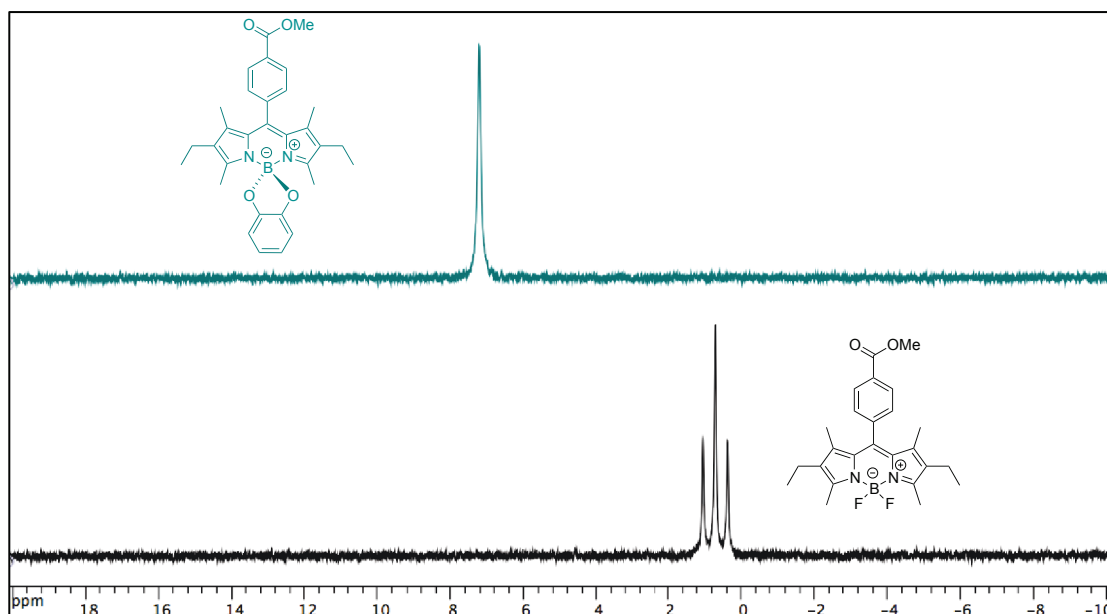


Figure 84 : Spectres RMN ^{11}B des BODIPYs 17 et 18 (96,29 MHz, Acétone- d_6 , 300 K).

La synthèse de ces trois composés modèles a montré la versatilité de la réaction sur l'introduction de différents catéchols possédant un groupement électro-donneur ou électro-accepteur en position 3. De plus, par rapport à la littérature nous n'avons utilisé qu'un faible excès de dérivé catéchol (1,5 équivalent) tout en obtenant des rendements très satisfaisants. Cette méthode de synthèse a été utilisée pour l'introduction du groupement encombrant *via* l'atome de bore.

II.3. Synthèse du synthon *meso-ortho*-nitrophényle BODIPY

Nous avons travaillé sur la synthèse d'un synthon BODIPY différent. En position *meso* du BODIPY un *ortho*-nitrophényle est introduit afin de pouvoir greffer dans un deuxième temps le piquet diméthylaniline. De plus les pyrroles ne sont plus substitués. Ce choix se justifie par le fait que lors de l'introduction du dérivé catéchol deux isomères sont formés *cis* et *trans*, appelés atropoisomères, et l'idée est de pouvoir recycler l'atropoisomère *cis* non souhaité par simple chauffage puis séparation. En effet, seul l'atropoisomère *trans* permet un encombrement des deux faces du BODIPY. Pour cela, il faudra que les deux atropoisomères aient une différence de polarité suffisante pour leur séparation et une stabilité suffisante, en terme de barrière d'activation de rotation de la liaison BODIPY – *meso* phényle, à température ambiante pour pouvoir les manipuler

facilement, mais sans que cette stabilité soit trop prononcée pour permettre l'interconversion à une température raisonnable (Figure 85).

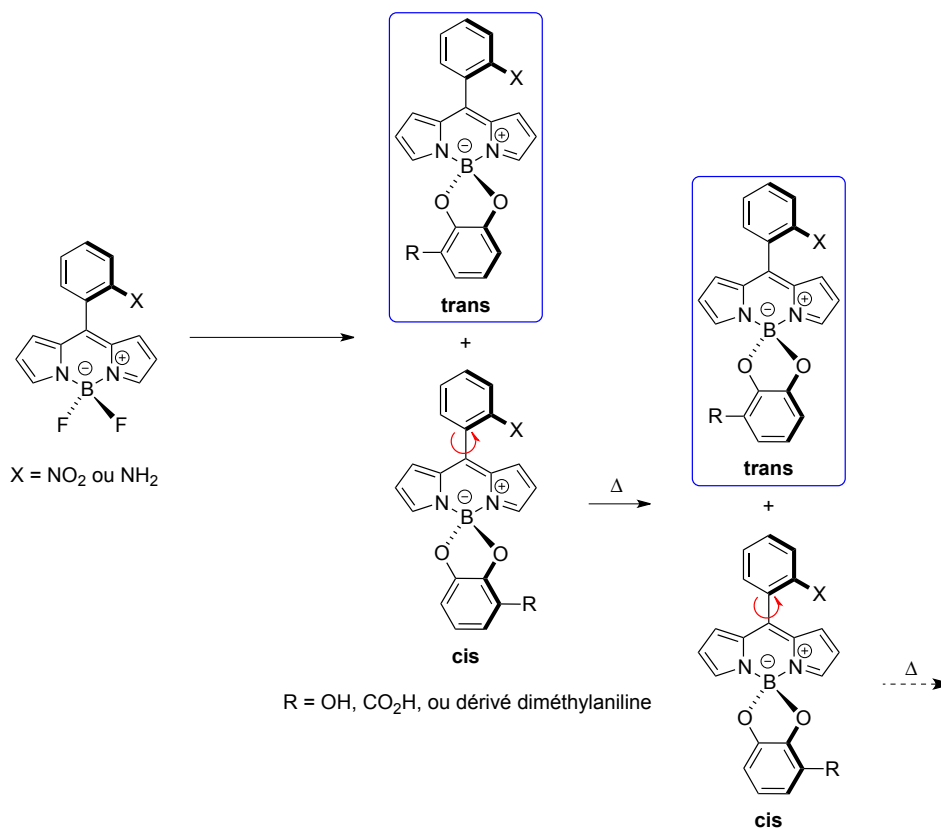


Figure 85 : Formation des deux atropoisomères *trans* (α,β) et *cis* (α,α) et recyclage de l'atropoisomère *cis*.

Pour la synthèse du BODIPY nitro **22**, la voie de synthèse des dipyrrométhanes développée par Lindsey *et coll.*²²⁰ a été utilisée. En effet, des essais de synthèse « one pot » n'ont pas été concluants. Ainsi, le nitro-dipyrrométhane **21** a été synthétisé en faisant réagir un équivalent de 2-nitrobenzaldéhyde avec 25 équivalents de pyrrole fraîchement distillé en présence d'acide trifluoroacétique 10 min à température ambiante. Après lavage aqueux et purification sur silice, le produit est obtenu sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 91% (Schéma 27).

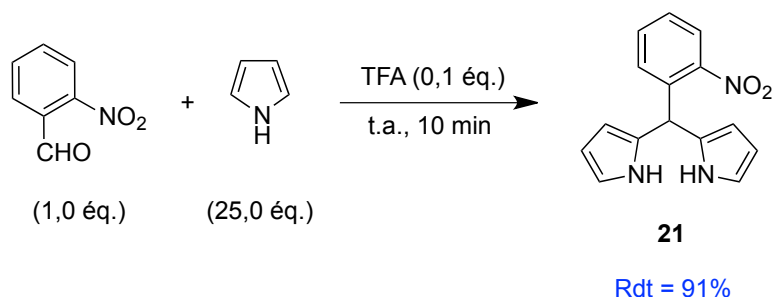


Schéma 27 : Synthèse du nitro-dipyrrométhane **21.**

Le nitro-dipyrrométhane **21** est ensuite mis en réaction avec un équivalent de DDQ dans du dichlorométhane pendant 30 min à température ambiante. Puis 6 équivalents de triéthylamine sont ajoutés au milieu réactionnel. Au bout d'une heure, 9 équivalents de trifluorure de bore étherate sont ajoutés goutte à goutte au milieu réactionnel qui est laissé agité deux heures à température ambiante. Après lavages aqueux et purification sur colonne de silice, le BODIPY nitro est obtenu avec un rendement de 45% (Schéma 28).

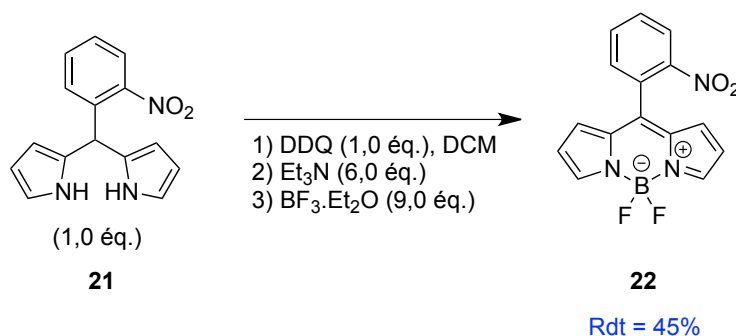


Schéma 28 : Synthèse du BODIPY nitro 22 à partir du dipyrrométhane 21.

L'analyse RMN ^1H a permis d'identifier si l'étape d'oxydation a bien eu lieu, de par la disparition du singulet à 6,21 ppm correspondant au proton *meso* du dipyrrométhane. De plus, la RMN du ^{11}B et du ^{19}F ont permis de confirmer la formation du BODIPY.

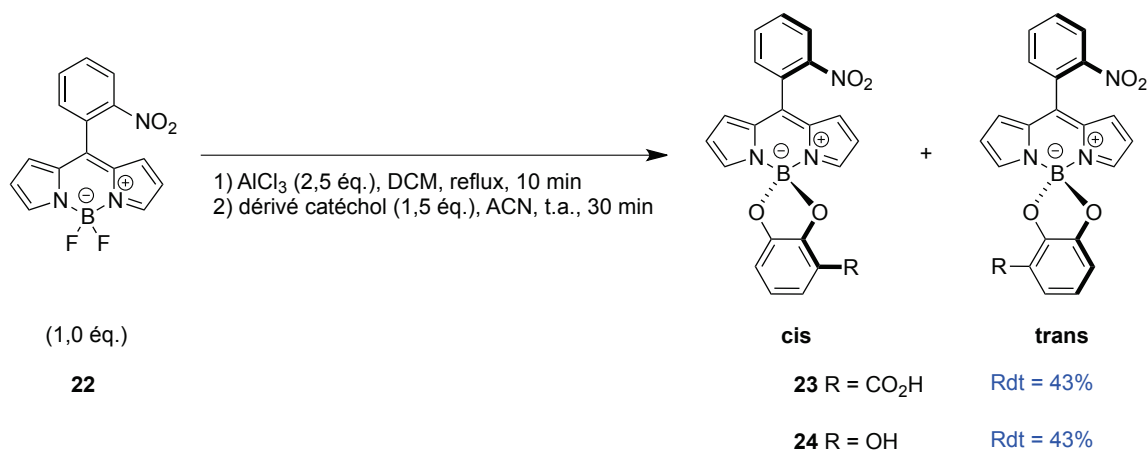
Ainsi le synthon BODIPY nitro **22** a pu être obtenu à une échelle de deux grammes.

II.4. Introduction des dérivés catéchols sur le synthon BODIPY

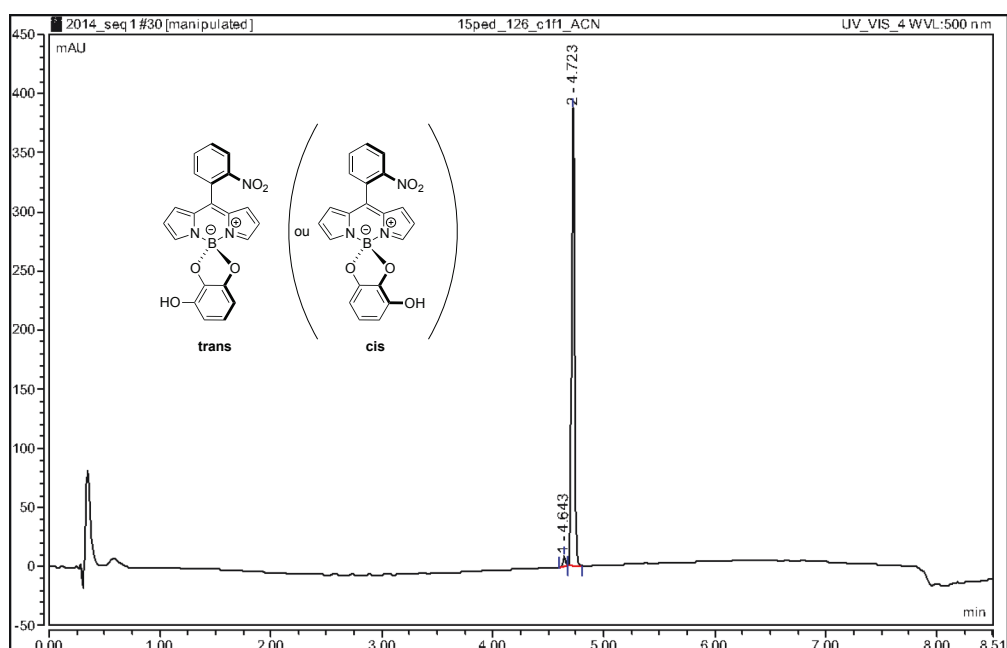
Afin de vérifier que la réaction d'introduction des catéchols était compatible avec un BODIPY « nu » (pyrroles non protégés), les dérivés catéchol acide et hydroxyle ont été introduits. De plus, cela nous a permis d'avoir accès à deux premiers couples d'atropoisomères et de confirmer leur stabilité ainsi que d'évaluer la possibilité de leur séparation.

II.4.1. Synthèse des deux couples d'atropoisomères

Pour la synthèse de ces deux composés, le même protocole développé précédemment a été utilisé (cf. II.2). Après purification sur silice, les composés **23** ($\text{NO}_2 / \text{COOH}$) et **24** (NO_2 / OH) sont isolés avec un rendement de 43% (Schéma 29).

Schéma 29 : Synthèse des couples d'atropoisomères **23** et **24**.

Il est à noter que les deux atropoisomères ont pu être séparés avec une pureté variable lors de la purification sur colonne de silice pour le BODIPY **24** (NO_2 / OH). Le ratio entre les deux atropoisomères est de 2 : 1 (avec des puretés déterminées par RP-HPLC-MS à 500 nm de 98% pour le moins polaire ($R_t = 4,72$ min) et 90% pour le plus polaire ($R_t = 4,64$ min) respectivement) (Figure 86). Par analogie avec les porphyrines, on peut supposer que le moins polaire correspond au *trans* et le plus polaire correspond au *cis*. Le fait que le composé le moins polaire soit majoritaire va dans le même sens que l'analogie avec la porphyrine : formation préférentielle du composé le moins encombré. Les deux fractions correspondent bien à des isomères ayant les mêmes spectres UV-visible et de masse.



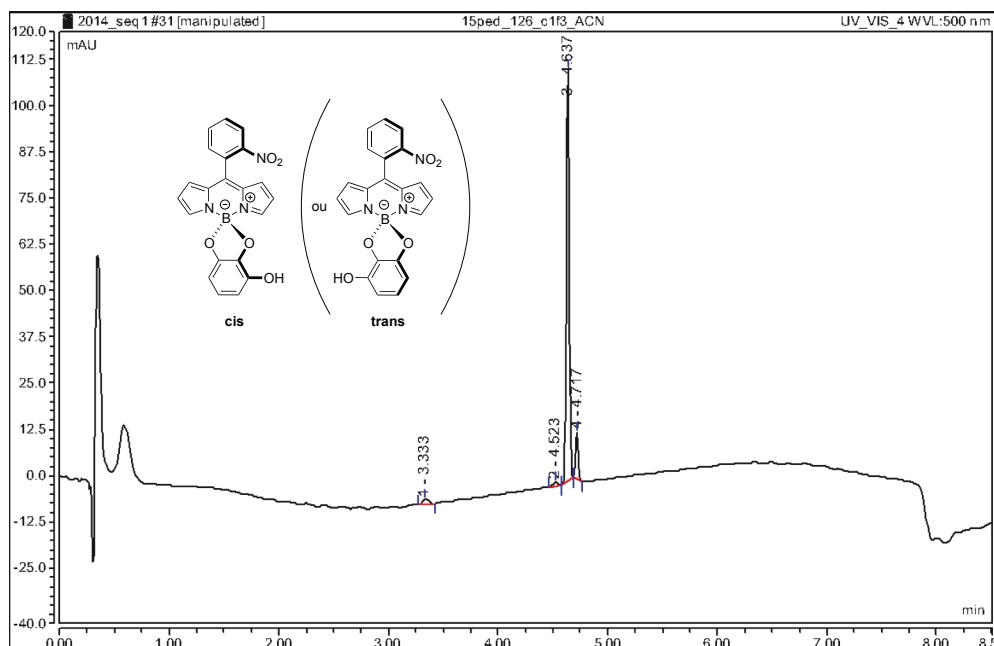


Figure 86 : Chromatogrammes RP-HPLC-MS des deux atropoisomères cis et trans de 24 après purification sur colonne de silice (éluant : ACN + 0,1% acide formique / H₂O + 0,1% acide formique, 5% – 100% en 5 min à 0,5 mL/min, détection UV à 500 nm).

À l'inverse, aucune séparation des deux atropoisomères n'a pu être réalisée pour le BODIPY 23 (NO₂ / COOH) lors de la purification sur colonne de silice. Plusieurs fractions ont été isolées avec des rapports variables en atropoisomères. Une RP-HPLC semi-préparative a été réalisée dans un deuxième temps pour séparer les deux atropoisomères. Seul l'atropoisomère le moins polaire (R_t = 4,68 min) a été obtenu propre (pureté > 99% à 500 nm) (Figure 87).

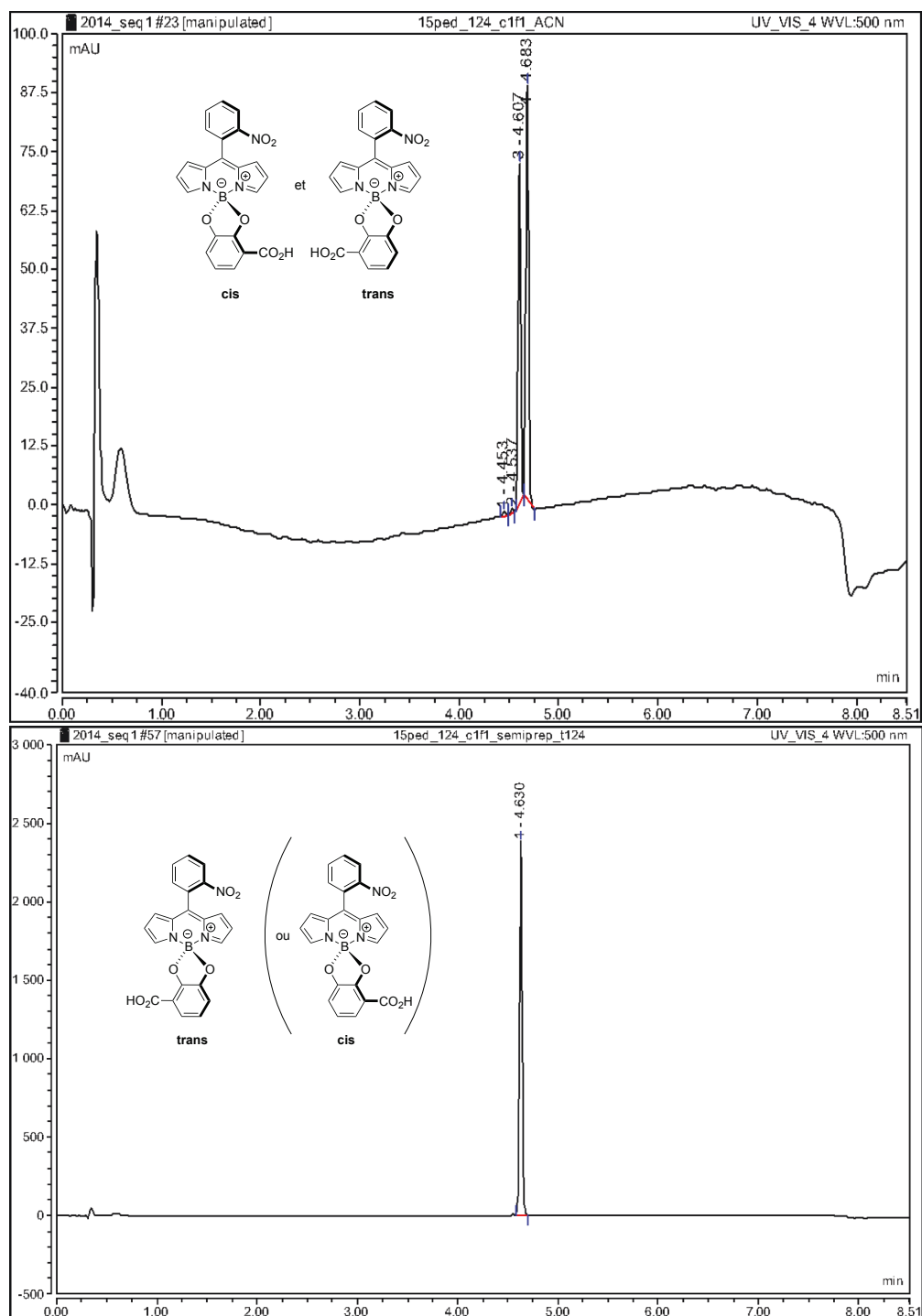


Figure 87 : Chromatogrammes RP-HPLC-MS à 500 nm des atropoisomères cis et/ou trans avant (haut) et après (bas) RP-HPLC semi-préparative (éluant : ACN + 0,1% acide formique / H₂O + 0,1% acide formique, 5% – 100% en 5 min à 0,5 mL/min, détection UV à 500 nm).

Des analyses par RMN ¹¹B et du ¹H ont permis de confirmer la formation du produit.

II.4.2. Expérience pour confirmer que les deux isomères correspondent à des atropoisomères

Afin de confirmer que les deux isomères soient bien des atropoisomères convertibles, l'échantillon RP-HPLC-MS de la fraction pure à 98% de **24** (NO₂ / OH) a été chauffé une nuit à 50 °C puis une analyse RP-HPLC-MS a été réalisée. La même expérience a été réalisée sur l'échantillon après RP-HPLC semi-préparative pour **23** (NO₂ / COOH) (Figure 88).

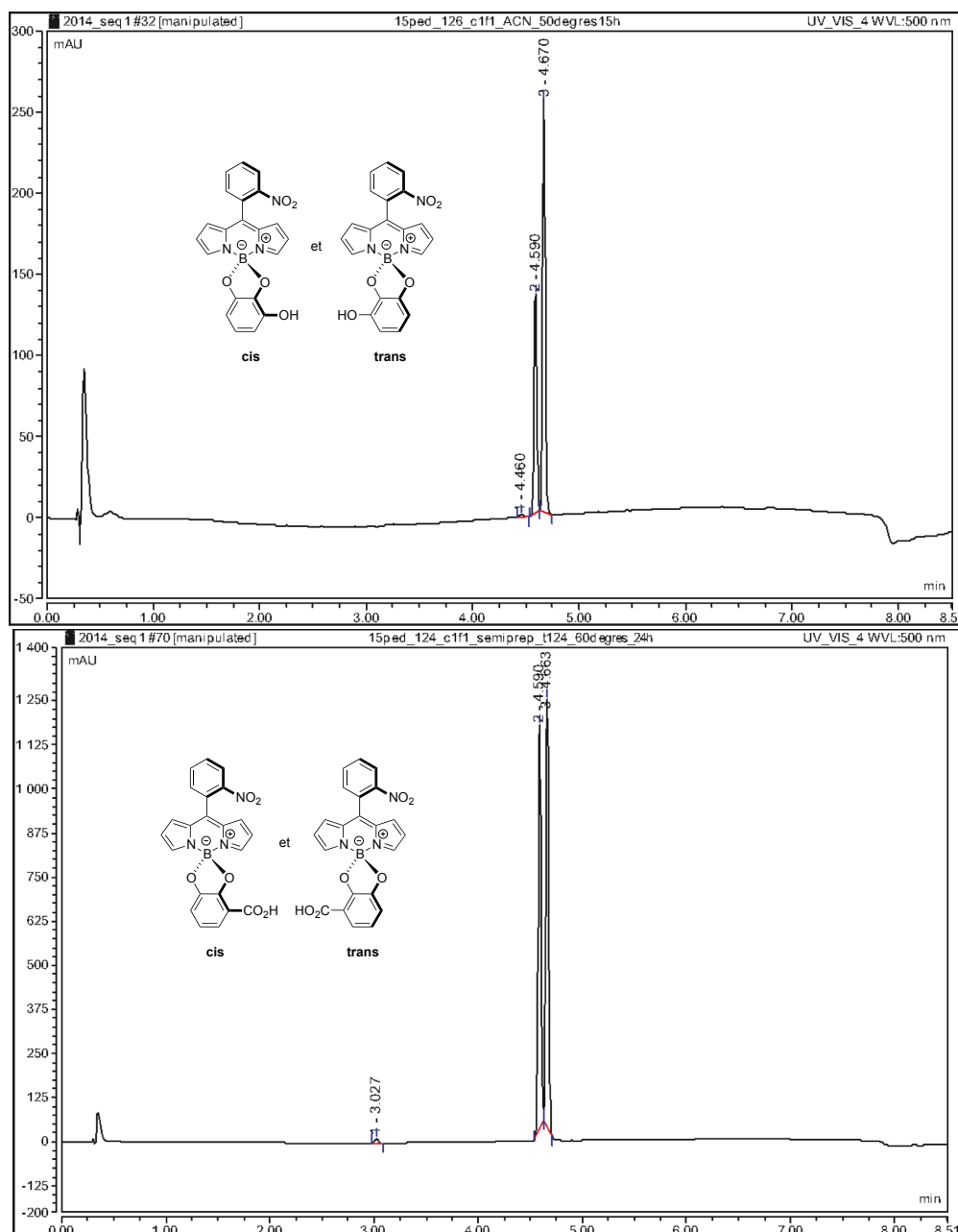


Figure 88 : Chromatogrammes RP-HPLC des fractions propres de **24** (haut) et **23** (bas) après chauffage une nuit à 50 °C (éluant : ACN + 0,1% acide formique / H₂O + 0,1% acide formique, 5% - 100% en 5 min à 0,5 mL/min, détection UV à 500 nm).

Cette expérience a permis de confirmer que dans les deux cas l'introduction du dérivé catéchol conduit à un mélange de deux atropoisomères interconvertibles.

II.5. Réduction du BODIPY nitro

Afin de pouvoir coupler le piquet diméthylaniline, la fonction nitro du BODIPY **22** a été réduite. Pour cette étape indispensable, la méthode de réduction ainsi que les conditions opératoires ont été optimisées.

Dans un premier temps, nous avons voulu utiliser l'hydrazine en présence de palladium en tant qu'agent réducteur. Cette méthode de réduction a déjà été utilisée pour la réduction de BODIPY nitro.^{169,221} Mais dans notre cas, des rendements faibles ainsi que des problèmes de reproductibilité ont été rencontrés lors d'une augmentation d'échelle. Une « décomplexation » du motif « BF₂ » a notamment été observée comme cela a été démontré RMN ¹¹B, ¹⁹F et ¹H. Cette voie de synthèse a donc été abandonnée.

Nous nous sommes alors orientés vers une hydrogénation catalytique également décrite dans la littérature pour la réduction de BODIPY nitro.^{222,223} Pour cela le BODIPY nitro est mis en présence de palladium (10%) en quantité catalytique dans un mélange dichlorométhane / éthanol (1 : 1) sous une atmosphère d'hydrogène une nuit. Les premiers essais ont conduit à des produits de « sur-réduction », réduction au moins partielle des pyrroles. Nous avons alors diminué le temps de réaction et avons fait un suivi par RP-HPLC-MS pour optimiser les conditions opératoires. Mais avec un temps de réaction plus court (3 heures) la formation d'une impureté a été observée ; d'après les analyses RP-HPLC-MS nous supposons qu'il pourrait s'agir de l'hydroxylamine produit intermédiaire de réduction (Schéma 30).

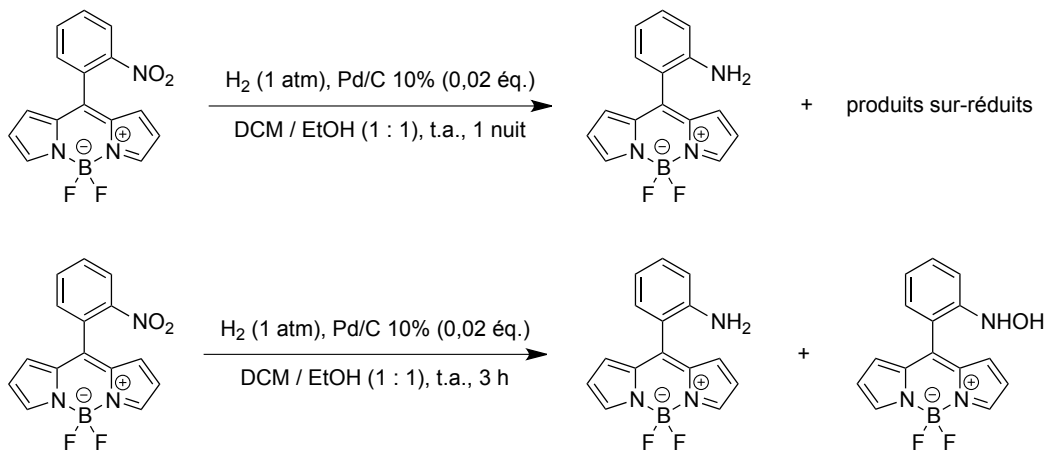


Schéma 30 : Conditions testées pour la réduction du BODIPY nitro par hydrogénation catalytique.

Nous avons alors modifié légèrement les conditions opératoires en travaillant dans un mélange de solvants différent : tétrahydrofurane / éthanol / acide acétique (1 : 3 : 3). Ces conditions ont permis d'obtenir le BODIPY amino **25** avec un rendement de 40% après purification (Schéma 31).

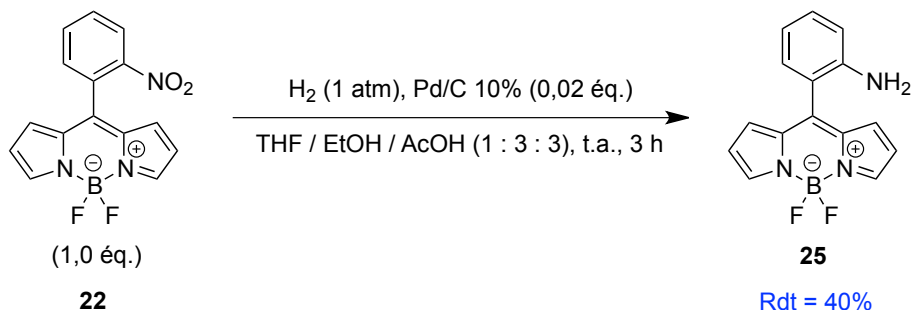


Schéma 31 : Conditions optimisées de réduction du BODIPY nitro **22**.

II.6. Introduction d'un dérivé catéchol sur le BODIPY amino

Afin d'évaluer l'influence de la fonction amino sur le δR_t entre les deux atropoisomères et la différence de polarité et de stabilité le pyrogallol a été introduit sur le BODIPY amino **25**. Ainsi en utilisant le même protocole, le dérivé **26** (NH₂ / OH) a été obtenu sous forme d'un mélange d'atropoisomères avec un rendement de 42% après purification (Schéma 32).

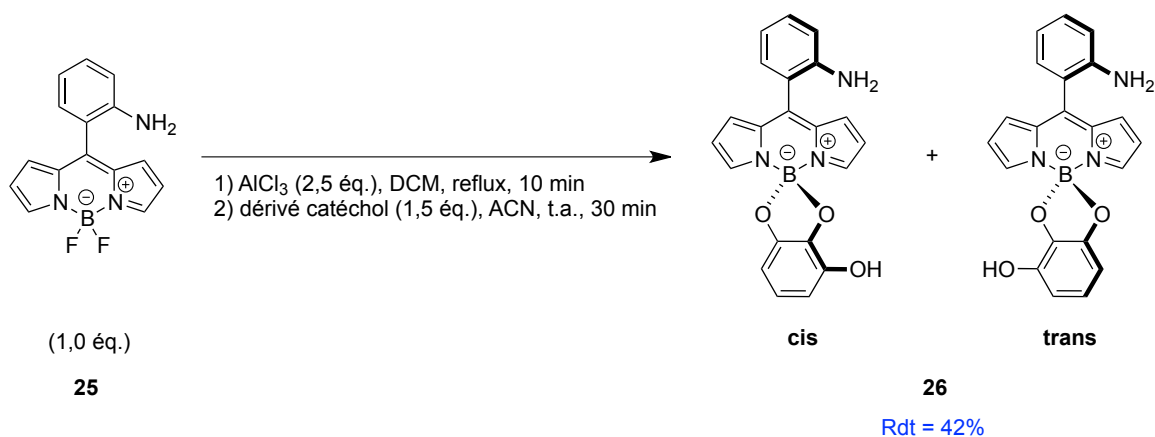


Schéma 32 : Synthèse du couple d'atropoisomères **26**.

Contrairement à **24** les atropoisomères n'ont pas pu être séparés lors de la purification sur colonne de silice. En réalité, nous avons remarqué que la séparation des deux atropoisomères est réalisée mais qu'une interconversion a lieu presque instantanément à température ambiante conduisant à un mélange d'atropoisomères. Ceci a été montré par des CCM en sortie de colonne et après 5 min.

Ce problème pourrait être résolu : (i) si l'on réalise la fonctionnalisation de l'aniline avant la séparation. Mais dans ce cas, on perd *de facto* l'avantage d'une approche interconversion de l'isomère *cis*, puisque l'espèce superstructurée bis-piquet résultant de l'acylation ne sera pas recyclable en sa forme *trans*, contrairement à ce qui est attendu au stade synthon amine. (ii) L'approche préférée consisterait à refroidir l'éluant pour prévenir la rotation durant la chromatographie sur colonne, comme cela a été démontré en série corrole.²¹⁸

II.7. Synthèse des piquets dérivés de la diméthylaniline

Afin de pouvoir introduire les deux piquets dérivés de la diméthylaniline sur les deux faces du BODIPY il a fallu dans un premier temps synthétiser les précurseurs (Figure 89) :

- la diméthylaniline activée sous forme de chlorure d'acide pour l'introduction sur la fonction amine du BODIPY **25**
- le catéchol fonctionnalisé par la diméthylaniline pour l'introduction sur le bore.

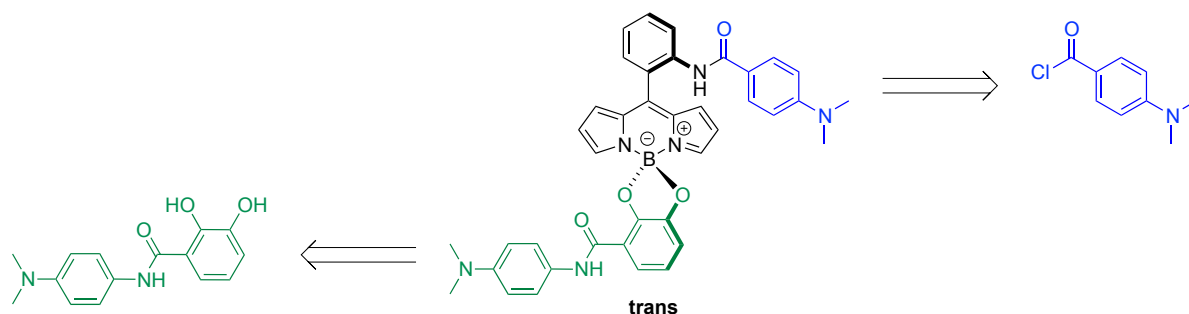
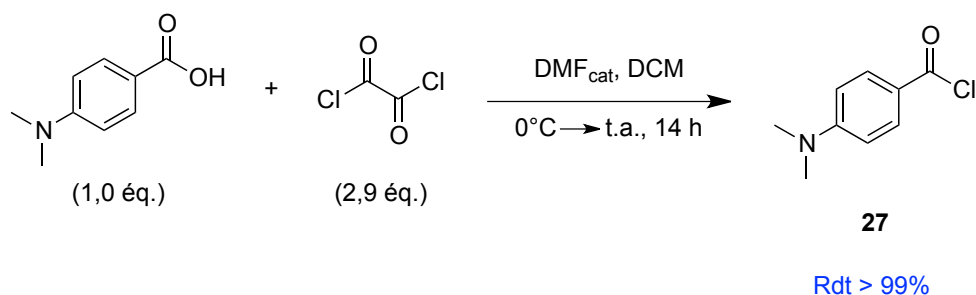


Figure 89 : Schéma rétrosynthétique de l'introduction des piquets.

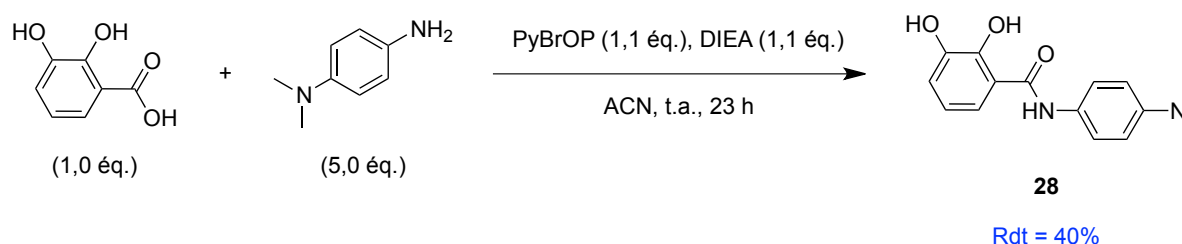
II.7.1. Synthèse de la diméthylaniline activée

Nous avons décidé d'activer la diméthylaniline sous forme de chlorure d'acyle. Pour cela, l'acide 4-diméthylaminobenzoïque a été mis en réaction en présence d'un excès de chlorure d'oxalyle et de diméthylformamide en quantité catalytique dans du dichlorométhane pendant 14 heures. Après évaporation du solvant et séchage, le chlorure d'acide **27** est obtenu quantitativement sous forme d'une poudre beige (Schéma 33).

Schéma 33 : Synthèse du chlorure d'acide **27**.

II.7.2. Synthèse du catéchol fonctionnalisé par la 4-diméthylaminoaniline

L'idéal aurait été de coupler le catéchol amine avec le chlorure d'acyle **27**. Mais nous n'avons pas à disposition le catéchol amine. Nous sommes donc partis du catéchol acide sur lequel a été couplé la 4-diméthylaminoaniline. Ce couplage peptidique a été réalisé en présence de diisopropyléthylamine et d'hexafluorophosphate de bromotripyrrolidinophosphonium (PyBrOP) qui permet d'activer l'acide *in situ* conduisant après lavage et purification au composé **28** avec un rendement de 40% (Schéma 34).

Schéma 34 : Synthèse du dérivé catéchol **28**.

Un excès de 4-diméthylaminoaniline est utilisé afin de limiter l'attaque d'une fonction phénol sur l'acide activé.

II.8. Introduction des piquets

II.8.1. Couplage entre le BODIPY amino et le chlorure d'acide

L'introduction du piquet sur le BODIPY amino **25** a été réalisée par couplage entre la fonction amine du BODIPY et le chlorure d'acyle **27**. Ainsi, le produit d'acylation **29** est obtenu après lavage et purification avec un rendement de 81% (Schéma 35).

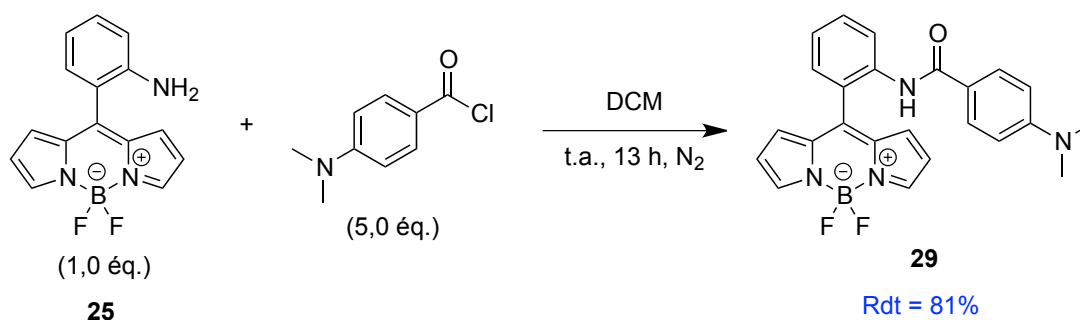


Schéma 35 : Synthèse du BODIPY avec un piquet **29**.

Lorsqu'aucune base n'est utilisée de meilleurs rendements sont observés. En effet, l'utilisation d'un excès de base (DIEA) entraîne la formation d'une impureté moins polaire difficilement séparable. D'après des analyses MS en introduction directe, nous supposons que cette impureté résulte d'une attaque intermoléculaire de la diméthylaniline sur elle-même. Cette impureté n'a pas été observée lorsque la réaction se fait sans base. Cela peut s'expliquer par le fait que la molécule d'acide chlorhydrique dégagée pendant la réaction va protoner le groupement diméthylamino et ainsi prévenir sa réaction avec un autre équivalent de chlorure d'acyle.

II.8.2. Introduction du dérivé catéchol sur le bore

Afin d'introduire le dérivé de catéchol portant la diméthylaniline **28**, le même protocole a été utilisé avec le BODIPY amino **25** et le dérivé **29** (Schéma 36). La solubilité limitée de ces composés a conduit à des pertes lors de la filtration et lors de la purification sur colonne, entraînant de faibles rendements (16% dans les deux cas).

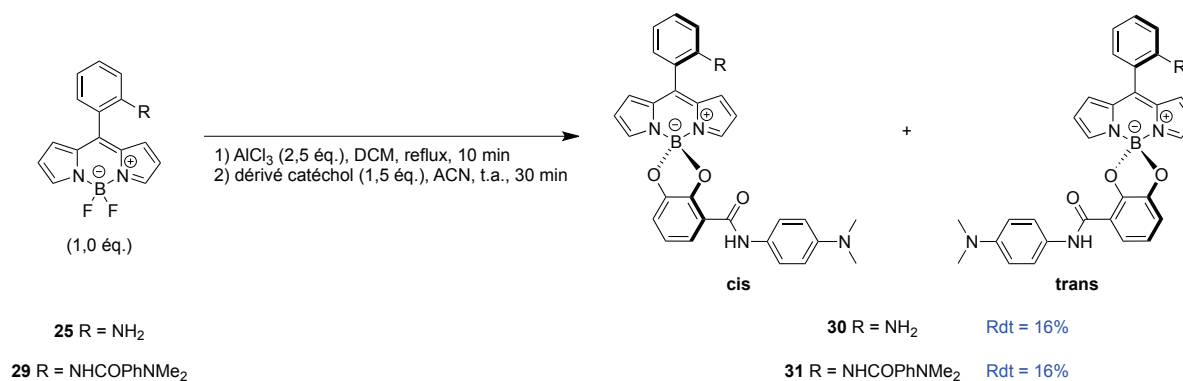


Schéma 36 : Synthèse des BODIPYs **30** et **31**.

Le BODIPY amino portant un piquet sur l'atome de bore **30** a été obtenu sous forme d'un mélange d'atropoisomères non séparables. Par contre, le BODIPY cible **31** portant les deux piquets a été obtenu sous forme de mélange des deux atropoisomères qui ont pu être séparés par RP-HPLC semi-préparative (Figure 90).

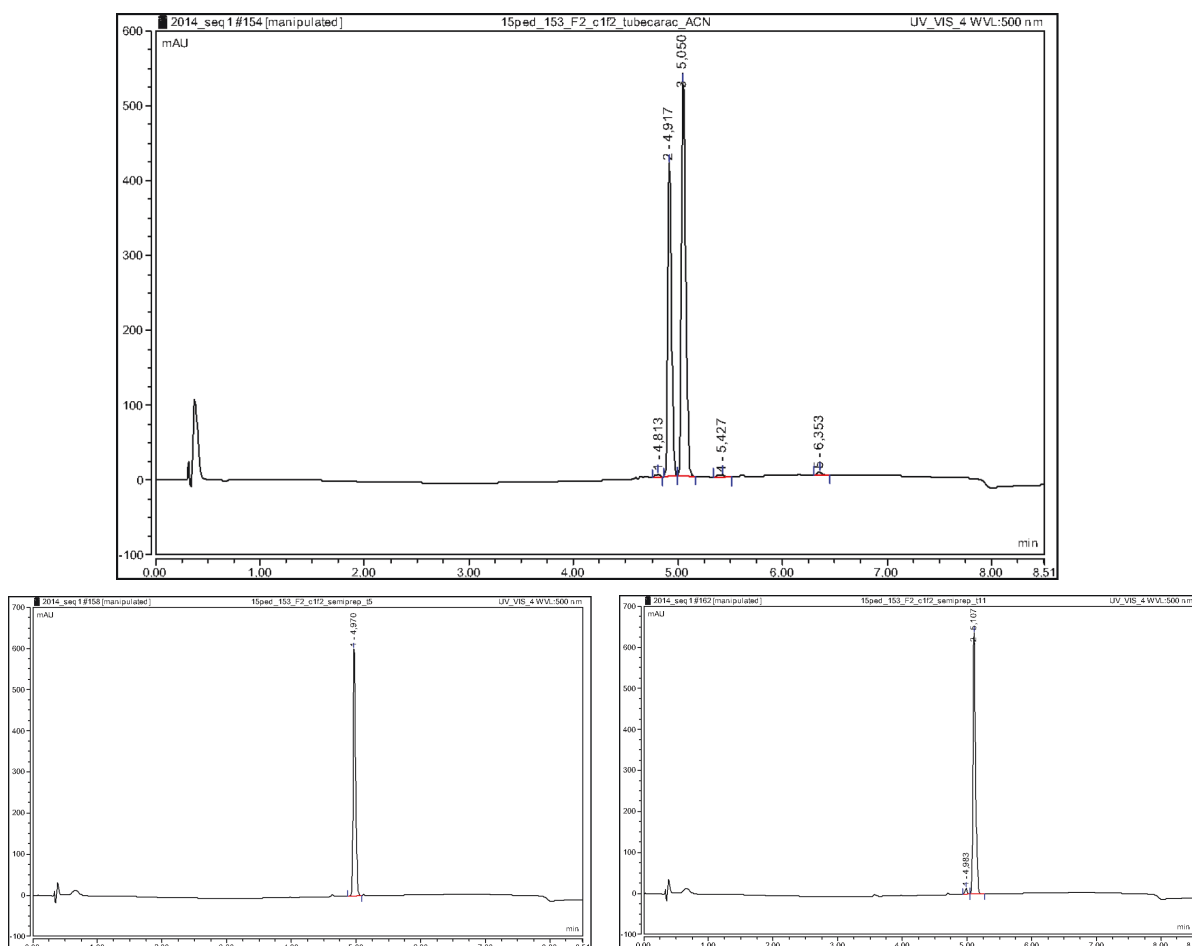


Figure 90 : Chromatogrammes RP-HPLC du BODIPY (piquet / piquet) **31** avant (haut) et après (bas) RP-HPLC semi-préparative (éluant : ACN + 0,1% acide formique / H_2O + 0,1% acide formique, 5 – 100% en 5 min à 0,5 mL/min, détection UV à 500 nm).

L'analyse RMN ^{11}B a permis de confirmer la formation du produit et l'absence de BODIPY de départ (singulet vers 6,5 ppm pour les produits BODIPY- BO_2 **30** et **31** vs triplet vers 0,3 ppm pour les BODIPY- BF_2 **25** et **29**) (Figure 91).

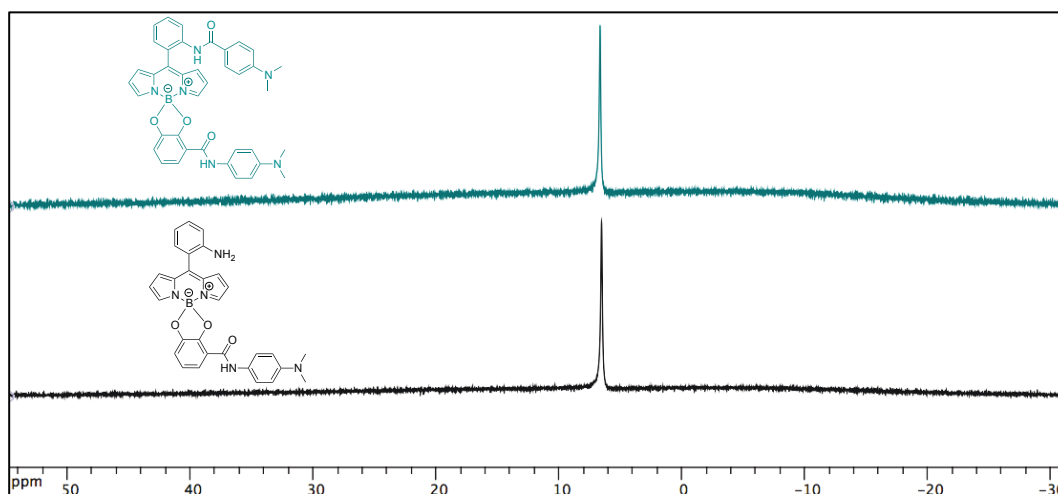


Figure 91 : Spectres RMN ^{11}B des BODIPYs **30** et **31** (160,42 MHz, CDCl_3 , 300 K).

L'introduction du piquet supplémentaire complique les analyses RMN ^1H notamment par superposition de certains signaux aromatiques. De plus, un dédoublement de certains signaux en RMN ^1H dans le cas du mélange des deux atropoisomères est observé. Des analyses RMN COSY et NOESY ont été réalisées pour nous aider à attribuer les différents protons et voir les couplages scalaires et spatiaux. Mais à l'heure actuelle, tous les protons n'ont pu être attribués avec certitude. Dans le cas du BODIPY **31** (piquet / piquet) des analyses RMN ^1H ont été réalisées sur le mélange ainsi que sur chaque atropoisomère pur après séparation.

II.9. Étude préliminaire d'évaluation de l'agrégation

Une étude préliminaire de spectroscopie UV-visible a été réalisée afin de vérifier que la transposition du concept Picket-Fence en série BODIPY est une stratégie efficace permettant de diminuer l'agrégation du BODIPY en solution aqueuse. Cette étude a été réalisée en comparant les spectres d'absorption du BODIPY **31** (piquet / piquet) à ceux d'un BODIPY « plat » **22** (BODIPY nitro) dans un mélange eau / DMSO contenant des quantités croissantes d'eau. Dans un premier temps, le spectre d'absorption des deux BODIPYs **22** et **31** a été réalisé dans le DMSO qui montre une bande d'absorption bien résolue dont le maximum se situe vers 505 (**22**) et 515 nm (**31**) (Figure 92). Dans un deuxième temps, le spectre d'absorption a été réalisé pour chacun des deux BODIPYs à

différents ratio eau / DMSO (5%, 4%, 2% et 1% de DMSO). Pour le BODIPY **31** dans un mélange eau / DMSO (95 : 5), un léger déplacement bathochromique (environ 10 nm) et hypochromique du maximum d'absorption sont observés ainsi qu'un élargissement du spectre d'absorption. En augmentant la quantité d'eau jusqu'à 99%, les spectres d'absorption du BODIPY **31** ont la même allure (Figure 92 B). À l'inverse, lorsque la quantité d'eau augmente, l'absorption du BODIPY **22** diminue fortement avec un léger déplacement hypsochromique (environ 5 nm) et un élargissement du spectre d'absorption (Figure 92 A). Ces résultats indiquent des problèmes de solubilité et d'agrégation.

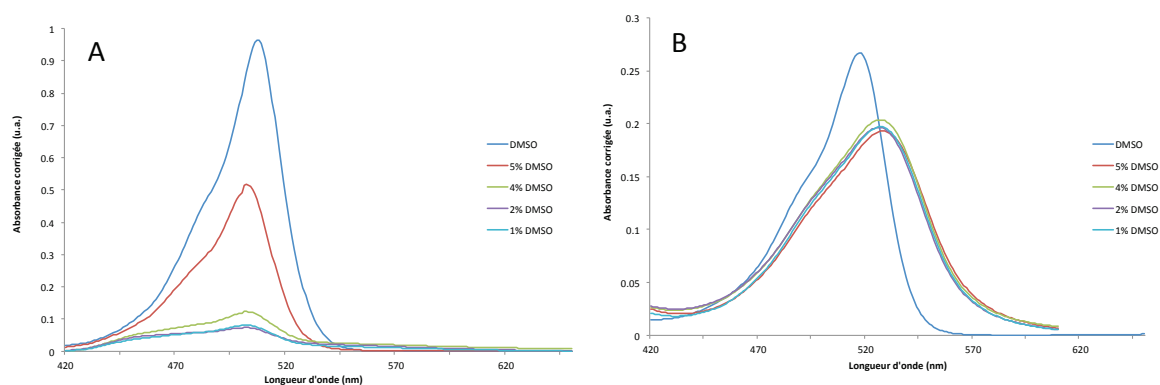


Figure 92 : Spectres d'absorption du BODIPY 22 (A) et du BODIPY 31 (piquet / piquet) (B) dans le DMSO (bleu) et dans différents mélanges eau / DMSO (de 5% à 1% de DMSO).

Ces résultats sont une première confirmation de l'intérêt de l'introduction de groupements axiaux volumineux dans le but de prévenir l'agrégation en milieux aqueux. Des études photophysiques complémentaires sont nécessaires afin de confirmer cette tendance.

III. Conclusion et perspectives

III.1. Séparation et identification des atropoisomères

Un tableau comparatif des δR_t (R_t est le temps de rétention de l'atropoisomère *cis* ou *trans* déterminé par RP-HPLC-MS) pour chaque couple d'atropoisomère et pour chaque couple de fonctions **R1** / **R2** a été établi (Tableau 15). Il donne une indication sur les tendances de polarité. Il est intéressant de noter que cet écart est faible dans le cas NO_2/COOH et NO_2/OH , alors qu'il est important en série NH_2/OH . Les résultats, décevants, d'interconversion spontanée à température ambiante des *meso-ortho*-aminophényles (espèces **26** et **30**), empêchent la séparation des

atropoisomères au stade nitro, puisqu'une fois l'amine formée, l'interconversion se produirait spontanément. Une étude préliminaire examinant la barrière d'activation par la méthode PM6 semi-empirique de Hyperchem a été réalisée. Elle n'est pas concluante puisqu'elle indique une enthalpie de 20 kCal/mol pour le *meso-ortho*-aminophényle dans le cas du BODIPY, alors qu'elle est à peine supérieure dans le cas de la porphyrine (23 kCal/mol), où les quatre atropoisomères sont stables. De plus cette étude *in silico* préliminaire montre une distorsion significative du BODIPY lors de la rotation. Ces résultats préliminaires sont à prendre avec précaution avant d'entamer des études plus poussées de calculs DFT pour déterminer cette barrière.

R1 / R2	Numéro de produit	δR_t (min)
NO ₂ / COOH	23	0,076
NO ₂ / OH	24	0,080
NH ₂ / OH	26	0,223
NH ₂ / piquet	30	0,120
piquet / piquet	31	0,133

Tableau 15 : Tableau récapitulatif des δR_t déterminés par RP-HPLC-MS pour une série de BODIPYs fonctionnalisés R1 / R2.

Lorsque les travaux de synthèse ont été achevés une caractérisation aboutie de tous les couples d'atropoisomères n'a pu être effectuée. Cependant il se dégage la tendance suivante:

i) en série BF₂, la RMN du ¹⁹F du BODIPY nitro **22** montre que les deux faces ne sont pas identiques, ce qui est le cas des deux fluors, donnant lieu à deux pseudo-octuplets au lieu d'un quadruplet.

ii) par contre la RMN du proton des deux atropoisomères du BODIPY **24** (NO₂ / OH) ne montre pas de différences très marquées.

iii) en revanche la RMN du proton des deux atropoisomères du BODIPY **31** (piquet / piquet) montre des différences significatives entre la forme α,α (*cis*) et la forme α,β (*trans*). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que ces superstructures aromatiques carbonylées s'influencent mutuellement magnétiquement lorsqu'elles sont en vis-à-vis dans la forme *cis* (α,α).

iv) les spectres UV-visible sont similaires d'un atropoisomère à l'autre.

III.2. Hydrosolubilisation et études de spectrofluorimétrie

À ce stade d'avancement du projet, nous sommes très proches de voir si l'objectif final de l'étude est atteint. Les amines tertiaires portées par les piquets seront quaternisées par alkylation par exemple avec l'iodure de méthyle, conduisant à un di-cation, ou avec la 1,3-propanesultone pour conduire à un zwitterion. Les études de fluorescence seront conduites sur ce composé, en particulier en comparant l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration, qui donnera une indication à partir de quelle concentration l'agrégation est observée. Une telle étude de fluorescence sera également réalisée avec un composé ne présentant pas de superstructure, mais soluble dans l'eau comme ceux décrits dans la littérature.^{81,224}

III.3. Bloquer la rotation : stratégie des méthyles α, β -pyrroliques

Pour s'affranchir du problème de rotation du *meso-ortho*-aminophényle rencontré, une alternative serait d'utiliser des BODIPYs porteurs de groupements alkyles en position β' . Cette approche présente l'avantage de pouvoir isoler un synthon atropoisomériquement pur à température ambiante, et donc de s'affranchir du refroidissement qui présente le risque d'hygroscopicité et d'hydrolyse du chlorure d'acyle introduit. Cependant cette approche présente un inconvénient, l'atropoisomère α, α (*cis*) qui n'est pas désiré pour l'étude actuelle sera lui aussi figé, et donc non interconvertible en un mélange contenant l'atropoisomère α, β (*trans*) (raison pour laquelle, cette stratégie avait été laissée de côté précédemment). Cette approche a cependant été initiée, et le synthon BODIPY nitro **32** a été synthétisé (Figure 93).

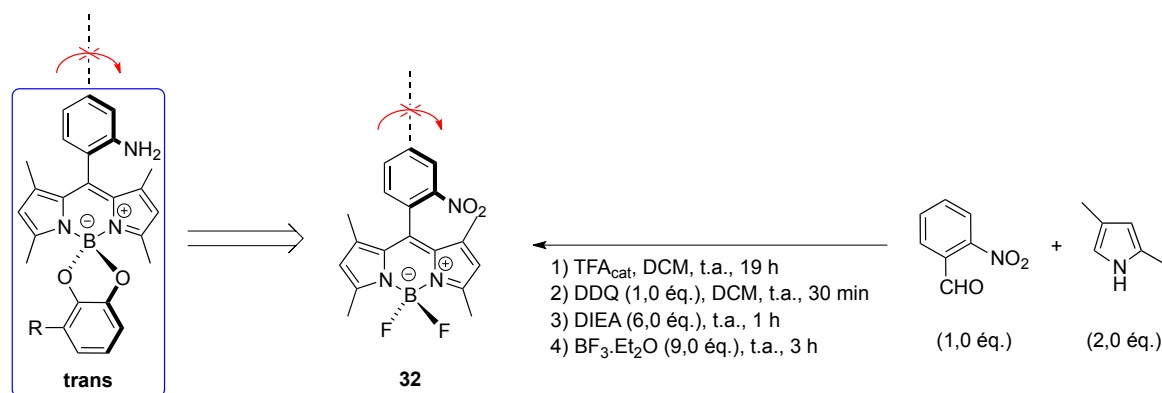


Figure 93 : Synthèse d'un analogue de la cible 31 avec le *meso-ortho*-aminophényle bloqué.

III.4. Stratégie des phénols versus stratégie des catéchols

De la même façon, des essais de discrimination des faces du BODIPY ont été initiés en couplant le *para*-aminophénol ou *para*-nitrophénol (au lieu des dérivés catéchols) aux BODIPY-BF₂ amino et nitro respectivement. Pour permettre une discrimination, le dérivé de mono-couplage est désiré. Malheureusement, le composé de monosubstitution a été obtenu en très faible quantité, alors que le produit résultant du couplage avec deux phénols est obtenu très majoritairement (Schéma 37).

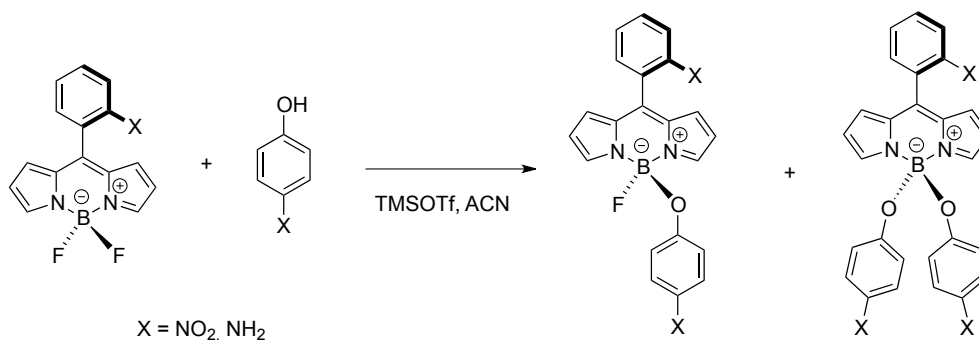


Schéma 37 : Stratégie des phénols ; essais de synthèse de produit de mono-substitution.

III.5. Autres superstructures et complexation avec des métaux (perspectives)

Ce chapitre ouvre la voie vers des perspectives intéressantes : permettre d'introduire des superstructures, en position axiale, permettant de complexer des métaux. On peut imaginer que **31-cis** bien qu'imparfait puisse déjà permettre de réaliser cet objectif : les deux piquets co-faciaux et à bonne distance permettraient de complexer certains métaux pour l'imagerie et la thérapie (avec un intérêt prononcé pour un examen des propriétés optiques avant et après complexation) (Figure 94).

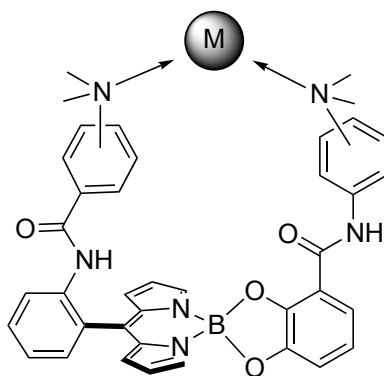


Figure 94 : Structure de 31-cis complexant un métal.

Ensuite réaliser l'introduction de poches chélatantes conduisant au BODIPY-DOTA, non plus en mode planaire comme précédemment décrit,¹¹⁴ mais en mode superstructure selon l'approche Collman^{218,225} : afin de réaliser une approche 2 en 1 introduction de poche chélatrice répondant *de facto* au concept de Picket-Fence encombrant contrant l'agrégation (Figure 95).

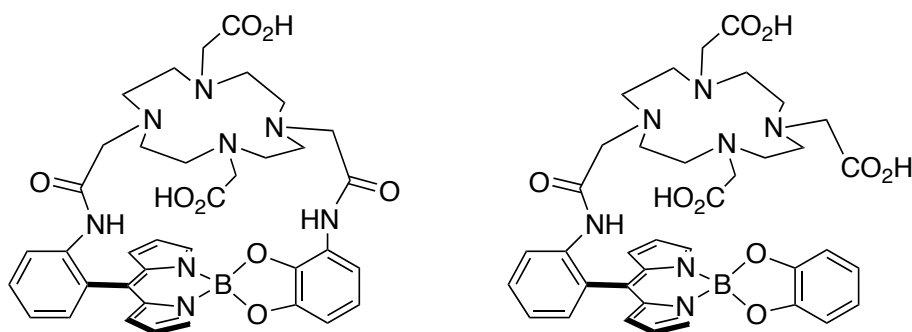


Figure 95 : Structures de BODIPY-DOTA envisagées.

Enfin, dans une approche théranostique décrite précédemment, cette fois-ci axiale et non plus planaire, on peut imaginer un dérivé de **31-trans** où la 4-diméthylaminoaniline serait remplacée par le complexe d'or **7**. Le bras phosphine-or permettra dès lors l'introduction de la modalité de thérapie et d'un éventuel vecteur (Figure 96).

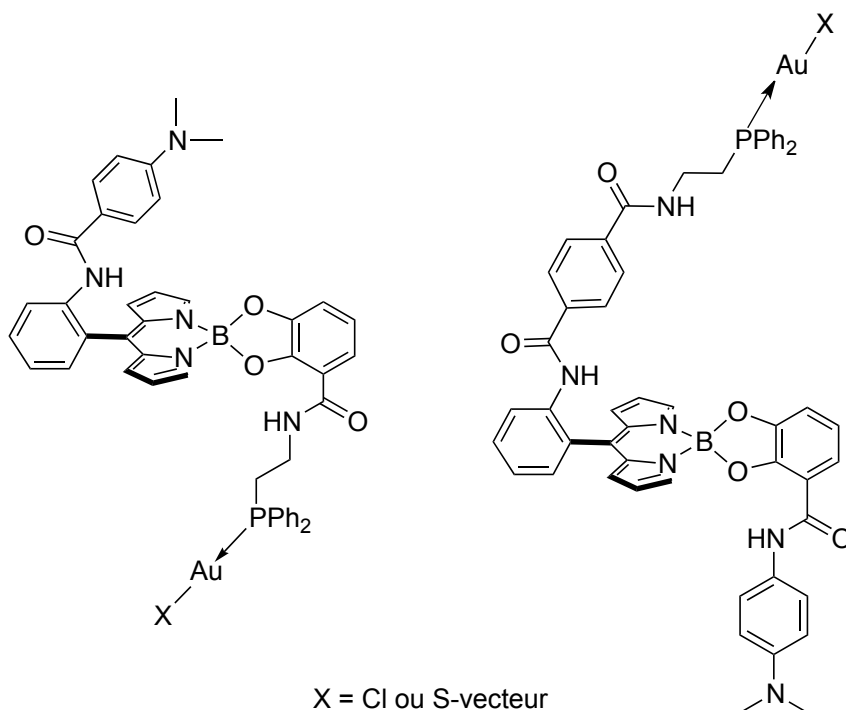


Figure 96 : Exemples d'une nouvelle génération possible de théranostiques BODIPY-Au.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Le but de ce travail de thèse a consisté en la conception, l'élaboration et l'étude de nouveaux composés thérapeutiques anticancéreux traçables par imagerie optique appelés théranostiques optiques. Après avoir travaillé sur la synthèse à l'échelle du gramme sur un premier « hit » qui avait pu être développé lors d'un travail de thèse précédent, l'optimisation de ce premier composé prometteur a été entreprise. Les principales voies d'amélioration sont résumées dans la figure ci-dessous (Figure 97). Nous avons tout d'abord voulu améliorer la synthèse des composés, mais également travailler sur leur structure dans le but de pouvoir les appliquer *in vivo*. Enfin, différents vecteurs ont été introduits afin de rendre les composés plus sélectifs des cellules tumorales vis à vis des cellules saines. Cette facilité de modification : sonde, vecteur, structure 3D... est tout à fait en accord avec l'idée de conception d'une plateforme théranostique adaptable aux besoins de clients et pourrait entrer dans le développement du kit qui intéressait la société Fluoptics®.

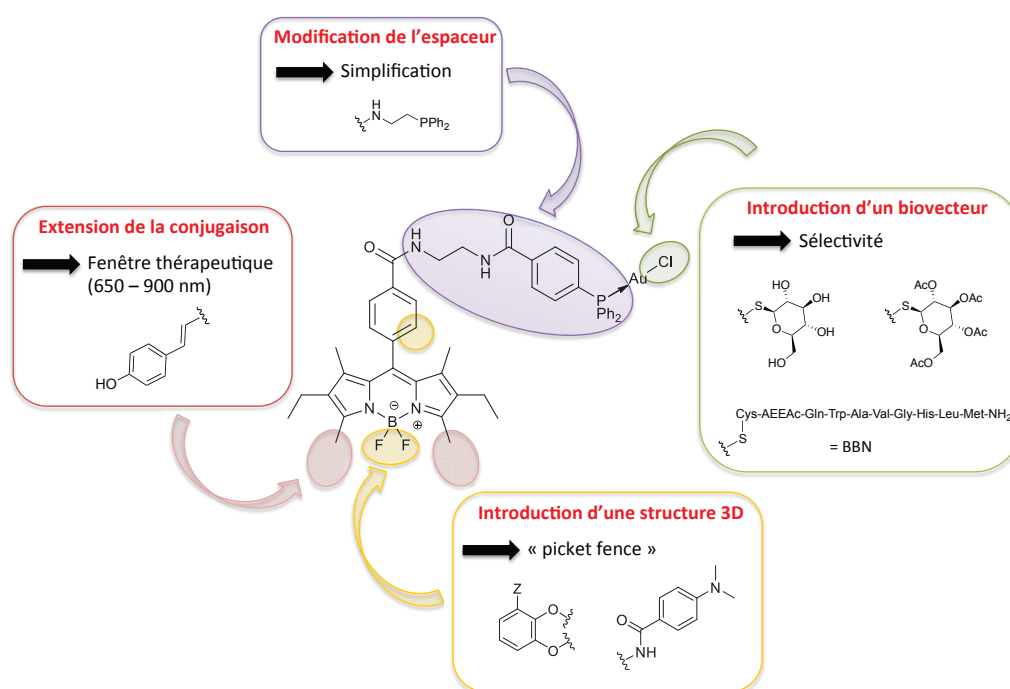


Figure 97 : Optimisations apportées lors de ce travail de thèse.

Ainsi, dans un premier temps, la synthèse du théranostique BODIPY phosphine-or a pu être optimisée grâce à l'introduction d'un nouvel espaceur phosphine entre le fluorophore BODIPY et le complexe d'or. Ceci a permis de diminuer le nombre d'étapes de la synthèse, de baisser significativement le temps de réaction global et d'obtenir une synthèse plus compatible avec une augmentation d'échelle. De plus, modifier l'espaceur a

également permis d'augmenter, modérément, le caractère hydrosoluble des composés résultants.

Dans un deuxième temps, une méthode simple et efficace de biovectorisation a été développée permettant l'introduction de différents vecteurs comme des dérivés de glucose ou peptide (dérivé de la bombésine). Les études photophysiques et biologiques réalisées ont démontré tout le potentiel de ces théranostiques dans le cadre d'un suivi de composé *in vitro* et l'impact que pouvait avoir le vecteur choisi.

Par la suite, nous nous sommes focalisés sur l'optimisation de la sonde BODIPY afin de la rendre compatible avec une imagerie optique *in vivo*. La synthèse de deux nouveaux BODIPY-Au(I) émettant dans la « fenêtre thérapeutique » (650-900 nm) a ainsi été réalisée par extension de la conjugaison à l'aide de groupements 4-hydroxystyryles. Des études préliminaires *in vivo* ainsi que des tests en imagerie photoacoustique ont donné des résultats très prometteurs et ont validé la possibilité d'une application sur petit animal. Dans l'avenir, un travail sur l'amélioration de leur solubilité dans l'eau serait souhaitable ainsi que des tests sur souris porteuses de tumeurs pour déterminer leur activité thérapeutique *in vivo*.

Dans une dernière partie plus exploratoire, nous nous sommes penchés sur les problèmes d'agrégation des BODIPYs en milieu biologique, problème pouvant limiter leur utilisation à des fins médicales. Nous avons choisi une stratégie basée sur le développement d'une architecture 3D du BODIPY *via* l'introduction de piquets qui devraient limiter ce phénomène d'agrégation par π -stacking. De plus, ce travail nous a permis d'appliquer le concept d'atropoisométrie, bien connu dans le domaine des porphyrines et des corroles, en série BODIPY ce qui n'avait jamais été fait auparavant. Une série de couples d'atropoisomères de BODIPY a ainsi pu être synthétisée et pour certains d'entre eux ont pu être séparés sur colonne chromatographique et interconvertis par simple chauffage. Ce travail a produit des premiers résultats très encourageants mais ce n'est que le commencement d'une toute nouvelle étude. Les pistes qu'il ouvre sont nombreuses et devraient permettre, à moyen terme, l'élaboration d'objets très élaborés qui pourrait mener à la synthèse de théranostiques innovants.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

General information

Instrumentation

The analyses were performed at the “Plateforme d’Analyses Chimiques et de Synthèse Moléculaire de l’Université de Bourgogne”. The identity and purity ($\geq 95\%$) of the compounds were unambiguously established using high-resolution mass spectrometry (HR-MS), multinuclear NMR spectroscopy and RP-HPLC-MS.

The exact mass of the compounds was obtained on a Thermo LTQ Orbitrap XL ESI-MS.

^1H (300.13, 500.13, 500.03 or 600.23 MHz), ^{11}B (96.29 or 160.42 MHz), ^{13}C (125.77 or 125.75 MHz), ^{19}F (282.38 or 470.55 MHz) and ^{31}P (121.49, 202.45, or 242.9 MHz) NMR spectra were recorded at rt on Bruker 300 Avance III, Bruker 500 Avance III, or Bruker 600 Avance II spectrometers. Chemical shifts are quoted in parts per million (δ) relative to tetramethylsilane, TMS (^1H and ^{13}C), using the residual protonated solvent (^1H) or the deuterated solvent (^{13}C) as an internal standard. Alternatively, 85% H_3PO_4 (^{31}P) and CFCl_3 (^{19}F) were used as external standards. The coupling constants are reported in Hertz.

Infrared spectra were recorded on a Bruker Vertex 70v FT-IR spectrophotometer (transmission mode).

The elemental analyses were performed using a Thermo Electron Flash EA 1112 Series CHNS/O elemental analyzer instrument.

X-Ray Diffraction data were collected for 24 h using a Bruker D8 diffractometer. The lattice parameters and the crystallite size calculations were obtained using the Topas software from Bruker.

RP-HPLC-MS analyses were performed using a Thermo-Dionex Ultimate 3000 instrument equipped with a diode array detector (Thermo-Dionex DAD 3000-RS) and a MSQ Plus single quadrupole mass spectrometer (LRMS analyses through ESI). The method used was the following:

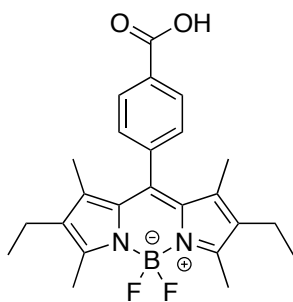
- Column: Kinetex 2.6 μm C18 100A (50 x 2.1 mm)
- Eluent A: H_2O + 0.1% FA; eluent B: ACN + 0.1% FA. Flow 0.5 mL/min; gradient 5 to 100% B in 5 min. UV detectors: 214, 254, 500 nm.

Semi-preparative RP-HPLC were performed using a Thermo-Dionex Ultimate 3000 instrument equipped with a diode array detector (UV-vis). The method used was the following:

- Column: SiliCycle SiliaChrom C18 (250 x 20 mm)
- Eluent A: H₂O + 0.1% TFA; eluent B: ACN + 0.1% TFA. Flow 20 mL/min; gradient 25 to 65% B in 40 min. UV detectors: 214, 254, 500 nm.

Materials

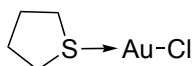
All solvents used were analytical grade and when specified taken from a Mbraun solvent purification system or dried and distilled under Ar atmosphere. BODIPY acid **5** and activated ester **8** were synthesized as reported by Tomasulo *et al.*¹²⁶ and Brellier *et al.*²²⁶ respectively. The gold complexes [Au(tht)Cl] **6** and phosphine-gold **7** were synthesized as reported by Uson *et al.*²²⁷ and Dupré *et al.*²²⁸ respectively. BODIPY ester was synthesized by Doctor Damien Lhenry as reported by Kondo *et al.*²²⁹ All other reagents were commercially available and used as received.

**C₂₄H₂₇BF₂N₂O₂****Exact Mass: 424.21****Molecular Weight: 424.29 g.mol⁻¹**

Freshly distilled 2,4-dimethyl-3-ethylpyrrole (12 mL, 89 mmol, 2.0 eq.) and 4-carboxybenzaldehyde (6.68 g, 45 mmol, 1.0 eq.) were dissolved in deoxygenated DCM (4 L). TFA (350 μ L, 4.6 mmol, 0.1 eq.) was added and the mixture was stirred at rt for 16 h. DDQ (10.1 g, 45 mmol, 1.0 eq.) was added and the mixture was stirred for 1 h. TEA (93 mL, 667 mmol, 15.0 eq.) and boron trifluoride diethyl etherate (90 mL, 710 mmol, 16.0 eq.) were added and the solution turned purple. After 2 h of stirring, the mixture was washed three times with water (3 x 1 L), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (eluent: EtOAc – heptane (gradient 2:8 to 7:3)) to afford the compound **5** as a red solid (10.7 g, 56%).

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0.96 (t, 6H, ³J = 7.5 Hz), 1.25 (s, 6H), 2.23 (q, 4H, ³J = 7.5 Hz), 2.52 (s, 6H), 7.44 (d, 2H, ³J = 8.2 Hz), 8.21 (d, 2H, ³J = 8.1 Hz).

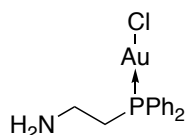
¹⁹F {¹H} NMR (282.38 MHz, CDCl₃): δ (ppm) -145.9 (q, ¹J_{F-B} = 32.7 Hz).

**C₄H₈AuClS****6²²⁷****Exact Mass: 319.97****Molecular Weight: 320.59 g.mol⁻¹**

Tetrachloroauric acid H₂HAuCl₄·H₂O (1.45 g, 4.3 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in absolute EtOH / water (5 : 1) (28.5 mL). Tetrahydrothiophene (tth) (950 μL, 10.7 mmol, 2.5 eq.) was added dropwise. The mixture was stirred at rt for 30 min during which a yellow precipitate was formed. The precipitate was isolated by filtration and then washed several times with absolute EtOH to afford the complex [Au(tth)Cl] **6** as a white powder (987 mg, 72%).

¹H NMR (500.13 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2.19 (broad d, 4H), 3.42 (broad d, 4H).

HR-MS (ESI): m/z calcd for C₄H₈AuClS + Na⁺: 342.95930 [M+Na]⁺. Found: 342.95913.

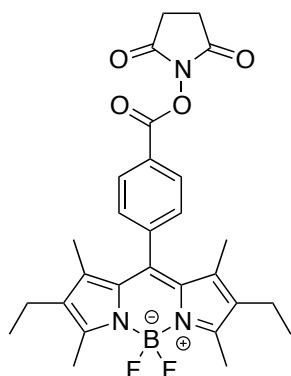
**C₁₄H₁₆AuClNP****Exact Mass: 461.04****Molecular Weight: 461.68 g.mol⁻¹****7²²⁸**

The reaction was carried out in a glove box. [Au(tht)Cl] **6** (280 mg, 0.87 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in dry DCM. 2-(diphenylphosphino)ethanamine (200 mg, 0.87 mmol, 1.0 eq.) was added and the mixture was stirred overnight at rt in the glove box. The reaction was monitored by ³¹P NMR. The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was washed three times with pentane and dried under reduced pressure. The complex **7** was isolated as a white powder (352 mg, 87%).

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2.63 (m, 2H), 3.08 (m, 2H), 7.49 (m, 6H), 7.68 (m, 4H).

³¹P {¹H} NMR (121.49 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 24.0 (s, P-Au-Cl).

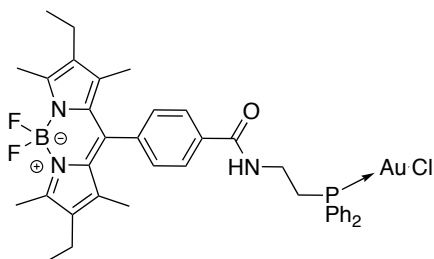
HR-MS (ESI): m/z calcd for C₁₄H₁₆AuClNP - Cl: 426.06804 [M-Cl]⁻. Found: 426.06763.

**C₂₈H₃₀BF₂N₃O₄****Exact Mass: 521.23****Molecular Weight: 521.36 g.mol⁻¹**

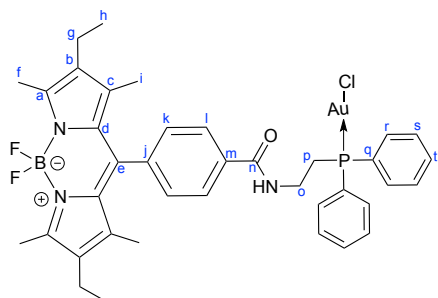
BODIPY-acid **5** (500 mg, 1.18 mmol, 1.0 eq.), N-hydroxysuccinimide (271 mg, 2.36 mmol, 2.0 eq.) and EDC.HCl (452 mg, 2.36 mmol, 2.0 eq.) were dissolved in DCM (75 mL). The mixture was stirred at rt for 2 h. The reaction was monitored by TLC (silica gel, eluent: EtOAc – heptane (1:1)). The solution was washed three times with distilled water (3 × 100 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (eluent: EtOAc – heptane (gradient 3:7 to 1:1)) to afford the BODIPY activated ester **8** as a red powder (453 mg, 74%).

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0.99 (t, 6H, ³J = 7.6 Hz), 1.28 (s, 6H), 2.31 (q, 4H, ³J = 7.6 Hz), 2.54 (s, 6H), 2.96 (s, 4H), 7.50 (d, 2H, ³J = 8.3 Hz), 8.27 (d, 2H, ³J = 8.3 Hz).

¹⁹F {¹H} NMR (282.38 MHz, CDCl₃): δ (ppm) -145.8 (q, ¹J_{F-B} = 32.7 Hz).

BODI-Au-1**C₃₈H₄₁AuBClF₂N₃OP****Exact Mass: 867.24****Molecular Weight: 867.95 g.mol⁻¹**

The reaction was carried out under an Ar atmosphere. BODIPY-ester activated **8** (250.0 mg, 0.480 mmol, 1.0 eq.), complex **7** (265.6 mg, 0.575 mmol, 1.2 eq.) and distilled TEA (135 μ L, 0.969 mmol, 2.0 eq.) were dissolved in deoxygenated chloroform (24 mL). The mixture was refluxed for 23 h. The reaction was monitored by ³¹P NMR. The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was dissolved in deoxygenated DCM and washed three times with deoxygenated HCl 0.1 M and distilled water, dried over anhydrous MgSO₄, filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The product was washed three times with deoxygenated pentane and dried under reduced pressure. **BODI-Au-1** was isolated as a red powder (322 mg, 77%).



¹H NMR (500.13 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 0.94 (t, 6H_h, ³J = 7.6 Hz), 1.24 (s, 6H_i), 2.29 (q, 4H_g, ³J = 7.6 Hz), 2.44 (s, 6H_j), 3.12 (dt, 2H_p, ²J = 11.6 Hz, ³J = 7.1 Hz), 3.60 (m, 2H_o), 7.43 (d, 2H_k, ³J = 8.2 Hz), 7.56 (m, 6H, 4H_s & 2H_t), 7.81 (m, 4H_r), 7.92 (d, 2H_l, ³J = 8.4 Hz), 8.89 (t, NH, ³J = 5.5 Hz).

¹³C {¹H} NMR (125.77 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 11.5 (s, 2C_i), 12.2 (s, 2C_f), 14.5 (s, 2C_h), 16.4 (s, 2C_g), 26.4 (d, C_p, ¹J_{C-P} = 38.7 Hz), 36.0 (d, C_o, ²J_{C-P} = 5.8 Hz), 128.0 (s, 2C_k & 2C_l), 129.1 (s, C_d), 129.3 (d, 4C_s, ³J_{C-P} = 11.7 Hz), 129.6 (d, 2C_q, ¹J_{C-P} = 11.4 Hz), 132.0 (s, 2C_t), 132.7 (s, 2C_b), 133.1 (d, 4C_r, ²J_{C-P} = 13.1 Hz), 134.2 (s, C_e), 137.6 (s, C_m), 138.0 (s, 2C_c), 139.6 (s, C_j), 153.4 (s, 2C_a), 165.5 (s, C_n).

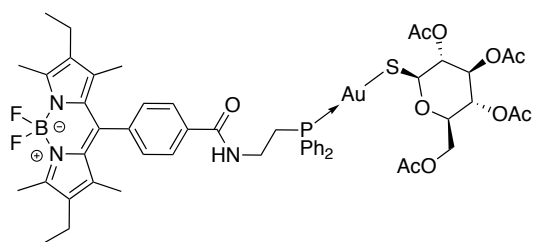
¹⁹F {¹H} NMR (470.55 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) -143.0 (q, ¹J_{F-B} = 31.8 Hz).

³¹P {¹H} NMR (202.45 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 25.7 (s, P-Au-Cl).

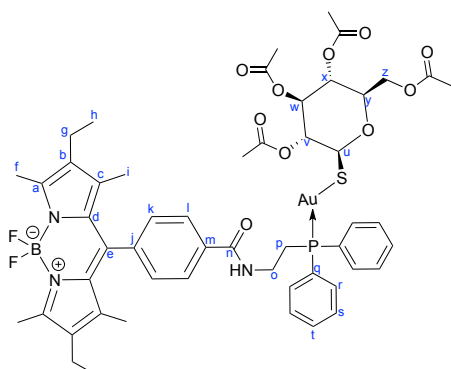
HR-MS (ESI): m/z calcd for C₃₈H₄₁AuBClF₂N₃OP + Na⁺: 890.23012 [M+Na]⁺. Found: 890.23383.

IR: ν (cm⁻¹) 319 ($\nu_{\text{Au-Cl}}$), 1538 ($\nu_{\text{N-H}}$ bend), 1654 ($\nu_{\text{C=O}}$), 3335 ($\nu_{\text{N-H}}$ stretch).

Anal. Calcd for C₃₈H₄₁AuBClF₂N₃OP + H₂O: C, 51.52, H, 4.89, N, 4.74%. Found: C, 51.54, H, 4.69, N, 4.91%.

**BODI-Au-2****C₅₂H₆₀AuBF₂N₃O₁₀PS****Exact Mass: 1195.35****Molecular Weight: 1195.86 g.mol⁻¹**

The reaction was carried out under an Ar atmosphere. In a schlenk tube, 1-thio-β-D-glucose tetraacetate (42.0 mg, 0.115 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in distilled acetone (3 mL) and deoxygenated NaOH 1.0 M (115 μL, 0.115 mmol, 1.0 eq.) was added. The mixture was stirred 15 min at rt in the dark. In another schlenk tube, **BODI-Au-1** (100.0 mg, 0.115 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in distilled acetone (3 mL) and stirred 5 min at 0°C. The first solution was slowly added to the other one at 0°C, and the resulting reaction mixture was stirred at rt for 3 h in the dark. The reaction was monitored by ³¹P NMR. The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was dissolved in deoxygenated DCM and filtrated to remove salts, washed three times with deoxygenated pentane and dried under reduced pressure. **BODI-Au-2** was obtained as a red powder (112 mg, 82%).



¹H NMR (600.23 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 0.94 (t, 6H_b, ³J = 7.6 Hz), 1.23 (s, 6H_i), 1.84, 1.90, 1.97, 1.98 (s, 12H, 4CH₃CO), 2.29 (q, 4H_g, ³J = 7.5 Hz), 2.44 (s, 6H_f), 3.08 (m, 2H_p), 3.60 (m, 2H_o), 4.00 (m, 1H_z & H_y), 4.09 (dd, 1H_z, ²J = 12.9 Hz & ³J = 5.7 Hz), 4.88 (t, H_v, ³J_{a-a} = 9.3 Hz), 4.93 (t, H_x, ³J_{a-a} = 9.7 Hz), 5.18 (t, H_w, ³J_{a-a} = 9.5 Hz), 5.32 (d, H_w, ³J_{a-a} = 9.4 Hz), 7.44 (d, 2H_k, ³J = 8.2 Hz), 7.56 (m, 6H, 4H_s & 2H_l), 7.89 (m, 4H_r & 2H_l), 8.86 (t, NH, ³J = 5.5 Hz).

¹³C {¹H} NMR (125.77 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 11.5 (s, 2C_i), 12.3 (s, 2C_f), 14.5 (s, 2C_h), 16.4 (s, 2C_g), 20.4 to 20.8 (s, 4CH₃CO), 26.5 (d, C_p, ¹J_{C-P} = 34.1 Hz), 36.1 (d, C_o, ²J_{C-P} = 7.7 Hz), 62.5 (s, C_z), 68.6 (s, C_x), 73.3 (s, C_w), 74.3 (s, C_y), 77.3 (s, C_v), 81.7 (s, C_u), 128.1 (pseudo-d, 2C_k & 2C_l), 129.3 (d, 4C_s, ³J_{C-P} = 10.9 Hz), 129.7 (s, 2C_d), 130.2 (d, 1C_q, ¹J_{C-P} = 35.0 Hz), 130.6 (d, 1C_q, ¹J_{C-P} = 32.2 Hz), 131.8 (s, 2C_t), 132.8 (s, 2C_b), 133.3 (t, 4C_r, ²J_{C-P} = 12.2 Hz), 134.4 (s, C_e), 137.6 (s, C_m), 138.0 (s, 2C_c), 139.6 (s, C_j), 153.5 (s, 2C_a), 165.5 (s, C_n), 169.1, 169.4, 169.6, 170.0 (s, 4CH₃CO).

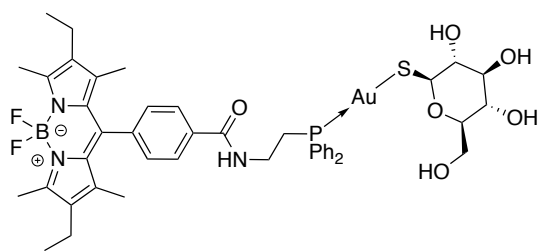
¹⁹F {¹H} NMR (470.55 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) -143.0 (q, ¹J_{F-B} = 34.7 Hz).

³¹P {¹H} NMR (202.45 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 30.8 (s, P-Au-S).

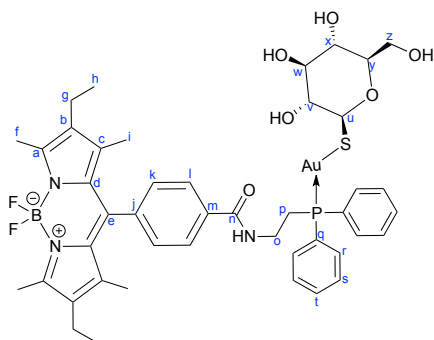
HR-MS (ESI): m/z calcd for $C_{52}H_{60}AuBF_2N_3O_{10}PS + Na^+$: 1218.33647 $[M+Na]^+$. Found: 1218.33910.

IR: ν (cm^{-1}) 311, 373, 481, 532, 599, 1538, 1654, 3335.

Anal. Calcd for $C_{52}H_{60}AuBF_2N_3O_{10}PS + H_2O$: C, 51.45, H, 5.15, N, 3.46, S, 2.64%. Found: C, 51.30, H, 5.82, N, 3.51, S, 2.16%.

**BODI-Au-3****C₄₄H₅₂AuBF₂N₃O₆PS****Exact Mass: 1027.30****Molecular Weight: 1027.71 g.mol⁻¹**

The reaction was carried out under an Ar atmosphere. In a schlenk tube, **BODI-Au-1** (40.0 mg, 0.046 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in deoxygenated DCM (2 mL) and stirred 10 min at 0°C. In another schlenk tube, 1-thio-β-D-glucose sodium salt (10.1 mg, 0.046 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in deoxygenated MeOH (2 mL) and stirred 5 min at rt in the dark. This solution was slowly added to the first one at 0°C, and the resulting reaction mixture was stirred at rt for 3 h in the dark. The reaction was monitored by ³¹P NMR. The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was dissolved in deoxygenated DCM and filtrated, washed three times with deoxygenated pentane and dried under reduced pressure. **BODI-Au-3** was isolated as a red powder (35 mg, 74%).



¹H NMR (600.23 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 0.94 (t, 6H_h, ³J = 7.6 Hz), 1.24 (s, 6H_i), 2.29 (q, 4H_g, ³J = 7.4 Hz), 2.44 (s, 6H_f), 3.03 (m, 3H, 2H_p & H_y), 3.13 (m, 3H, H_v, H_w & H_x), 3.43 (m, 1H_z), 3.60 (m, 2H_o), 3.70 (m, 1H_z), 4.49 (pseudo-t, 2H, OH), 4.74 (d, H_u, ³J_{a-a} = 9.0 Hz), 4.85 (pseudo-dd, 2H, OH), 7.45 (d, 2H_k, ³J = 8.2 Hz), 7.54 (m, 6H, 4H_s & 2H_t), 7.87 (m, 4H_r), 7.94 (d, 2H_i, ³J = 8.1 Hz), 8.87 (t, NH, ³J = 5.5 Hz).

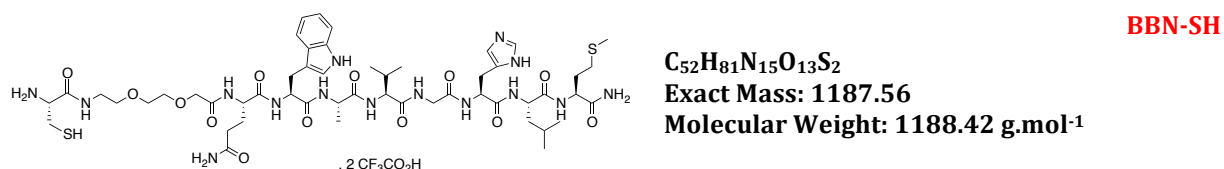
¹³C {¹H} NMR (125.77 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 11.5 (s, 2C_i), 12.3 (s, 2C_f), 14.5 (s, 2C_h), 16.4 (s, 2C_g), 26.7 (d, C_p, ¹J_{C-P} = 34.1 Hz), 36.2 (d, C_o, ²J_{C-P} = 9.1 Hz), 61.5 (s, C_z), 70.6 (s, C_w), 77.6 (s, C_x), 80.7 (s, C_y), 81.2 (s, C_v), 85.4 (s, C_u), 128.2 (pseudo-d, 2C_k & 2C_l), 129.3 (d, 4C_s, ³J_{C-P} = 11.4 Hz), 129.7 (s, 2C_d), 130.3 (d, 1C_q, ¹J_{C-P} = 15.0 Hz), 130.8 (d, 1C_q, ¹J_{C-P} = 15.0 Hz), 131.7 (s, 2C_t), 132.8 (s, 2C_b), 133.3 (d, 4C_r, ²J_{C-P} = 13.2 Hz), 134.4 (s, C_e), 137.6 (s, C_m), 138.1 (s, 2C_c), 139.6 (s, C_j), 153.5 (s, 2C_a), 165.6 (s, C_n).

¹⁹F {¹H} NMR (470.55 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) -143.0 (q, ¹J_{F-B} = 31.8 Hz).

³¹P {¹H} NMR (202.45 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 30.2 (s, P-Au-S).

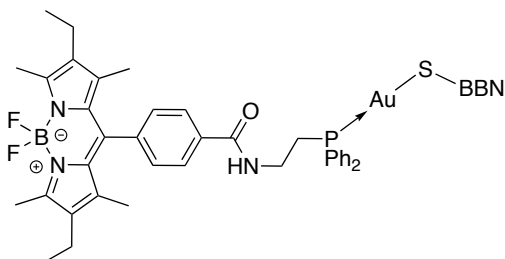
HR-MS (ESI): m/z calcd for C₄₄H₅₂AuBF₂N₃O₆PS + Na⁺: 1050.24909 [M+Na]⁺. Found: 1050.29201.

IR: ν (cm⁻¹) 307, 478, 531, 1538, 1654, 3335.

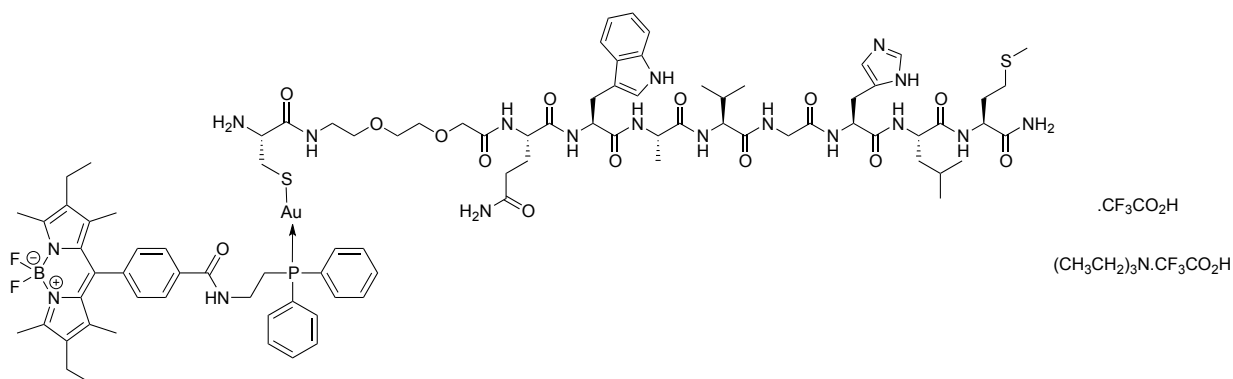


BBN-SH was synthesized by Dr Victor Goncalves. The peptide **BBN-SH** (Cys-AEEAc-bombesin₍₇₋₁₄₎) was obtained by automated solid phase peptide synthesis on a Liberty Blue microwave synthesizer (CEM). The synthesis was carried out on a 0.25 mmol scale on a Rink Amide AM resin (Iris Biotech, 0.48 mmol/g) using predefined CEM High Swelling cycles. All amino acids and the spacer 2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)acetic acid (AEEAc), from Iris Biotech, were N- α -terminal protected by Fmoc. The final peptide was cleaved from the resin with simultaneous removal of the side-chain protecting groups by treatment with TFA/TIS/DODT/water (92.5/2.5/2.5/2.5 v/v; 10 mL) at rt for 2 h. The filtrate from the cleavage mixture was concentrated, precipitated in cold Et₂O, collected by centrifugation (twice), and lyophilized to afford crude peptide. The crude peptide was dissolved in a mixture of ACN / water and was purified by semi-preparative RP-HPLC on a Dionex Ultimate 3000 system (Thermo Scientific) equipped with a BetaBasic-18 column (ThermoFisher, 150 × 30 mm, 5 μ m) with a gradient program from 20% to 35% of solvent B over 30 min (solvent A is water with 0.1% TFA and solvent B is ACN with 0.1% TFA) at a flow rate of 15 mL/min with UV detection at 214 and 280 nm. Fractions were analysed by RP-HPLC on a Dionex Ultimate 3000 system, with a photodiode array detector, on a Kinetex C18 column (Phenomenex, 50 × 2.1 mm, 2.6 μ m), at a flow rate of 0.5 mL/min with a gradient program from 5% to 100% of solvent B over 5 min. The pure fractions were collected and lyophilized to give **BBN-SH** as a white solid in 18% yield (TFA salt, 60 mg, purity at 214 nm > 98.5%, R_t = 3.07 min).

HR-MS (ESI): m/z calcd for C₅₂H₈₁N₁₅O₁₃S₂ + H⁺: 1188.56525 [M+H]⁺. Found: 1188.56562.

BODI-Au-4**C₉₀H₁₂₁AuBF₂N₁₈O₁₄PS₂****Exact Mass: 2018.82****Molecular Weight: 2019.91 g.mol⁻¹**

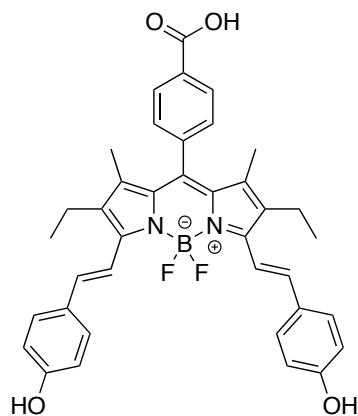
The reaction was carried out under an Ar atmosphere. In a schlenk tube, **BBN-SH** (13.3 mg, 9.4 μmol, 1.0 eq.) was dissolved in distilled DMF (1 mL) and distilled TEA (7 μL, 50.2 μmol, 5.3 eq.) was added. The mixture was stirred 20 min at rt in the dark. In another schlenk tube, **BODI-Au-1** (8.2 mg, 9.4 μmol, 1.0 eq.) was dissolved in distilled DMF (1 mL) and stirred 5 min at 0°C. The first solution was slowly added to the next one at 0°C, and the resulting reaction mixture was stirred at rt for 3 h in the dark. The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was washed four times with dry THF to remove traces of DMF and dried under reduced pressure. **BODI-Au-4** was obtained as a red powder (95%).



¹⁹F {¹H} NMR (470.55 MHz, CD₃OD): δ (ppm) -146.4 (q, ¹J_{F-B} = 32.3 Hz), -76.8 (s, CF₃CO₂H).

³¹P {¹H} NMR (202.45 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 29.4 (s, P-Au-S).

HR-MS (ESI): m/z calcd for C₉₀H₁₂₁AuBF₂N₁₈O₁₄PS₂ + H⁺: 2019.83020 [M+H]⁺. Found: 2019.83759.

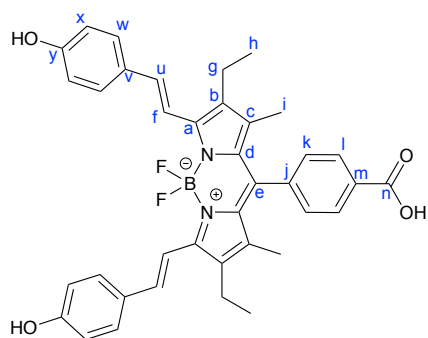


C₃₈H₃₅BF₂N₂O₄

Exact Mass: 632.27

Molecular Weight: 632.50 g.mol⁻¹

BODIPY-acid **5** (1.0 g, 2.36 mmol, 1.0 eq.), 4-hydroxybenzaldehyde (576 mg, 4.71 mmol, 2.0 eq.), piperidine (2.3 mL, 23.3 mmol, 9.9 eq.) and a crystal of *para*-toluenesulfonic acid were dissolved in toluene (80 mL). The mixture was refluxed at 100°C under reduced pressure (approximately 400 mbar) until complete evaporation of the solvent. Then 4-hydroxybenzaldehyde (576 mg, 4.71 mmol, 2.0 eq.), piperidine (2.3 mL, 23.3 mmol, 9.9 eq.) and toluene (80 mL) were added to this residue. The resulting mixture was refluxed until complete evaporation of the solvent. This operation was repeated one time more. The reaction mixture turned purple then blue with time. The crude product was dissolved in MeOH and purified by silica gel plug (eluent: MeOH). Then the residue was purified by silica gel column chromatography (eluent: MeOH – DCM (gradient 100% DCM to 1:4)) to afford NIR-BODIPY **14** as a dark green solid (780 mg, 52%).

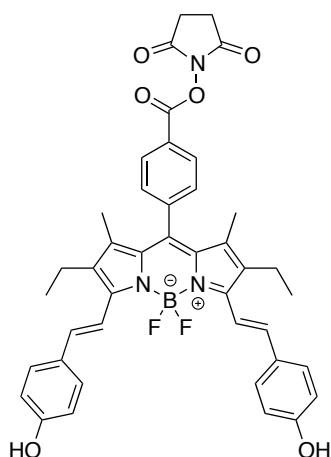


¹H NMR (500.13 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 1.09 (t, 6H_h, ³J = 7.5 Hz), 1.28 (s, 6H_i), 2.59 (q, 4H_g, ³J = 7.3 Hz), 6.88 (d, 4H_w, ³J = 8.6 Hz), 7.25 (d, 2H_f, ³J = 16.8 Hz), 7.45 (d, 2H_u, ³J = 16.7 Hz), 7.48 (d, 4H_x, ³J = 8.7 Hz), 7.56 (d, 2H_k, ³J = 8.2 Hz), 8.12 (d, 2H_i, ³J = 8.3 Hz), 9.96 (broad s, 2H, OH).

¹³C {¹H} NMR (125.77 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 11.3 (s, 2CH₃), 13.9 (s, 2CH₃), 17.1 (s, 2CH₂), 115.9 (s, CH), 116.0 (s, CH), 127.8 (s, C), 128.8 (s, CH), 129.1 (s, CH), 130.0 (s, CH), 131.7 (s, C), 133.5 (s, C), 136.2 (s, CH), 136.6 (s, C), 138.3 (s, C), 139.5 (s, C), 149.9 (s, C), 158.8 (s, C), 166.9 (s, C).

¹⁹F {¹H} NMR (282.38 MHz, Acetone-d₆): δ (ppm) -138.4 (q, ¹J_{F-B} = 34.7 Hz).

HR-MS (ESI): m/z calcd for C₃₈H₃₅BF₂N₂O₄ + Na⁺: 655.25567 [M+Na]⁺. Found: 655.25315.



C₄₂H₃₈BF₂N₃O₆

Exact Mass: 729.28

Molecular Weight: 729.58 g.mol⁻¹

NIR-BODIPY acid **14** (240 mg, 0.38 mmol, 1.0 eq.), N-hydroxysuccinimide (87 mg, 0.76 mmol, 2.0 eq.) and EDC.HCl (145 mg, 0.76 mmol, 2.0 eq.) were dissolved in DCM (25 mL). The mixture was stirred at rt for 2 h. Then saturated ammonium chloride (50 mL) was added to the reaction mixture, which was extracted with DCM. The organic layer was washed one time with distilled water, dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (eluent: MeOH – DCM (gradient 100% DCM to 5:95)) to afford NIR-BODIPY activated ester **15** as a dark green solid (65 mg, 24%).

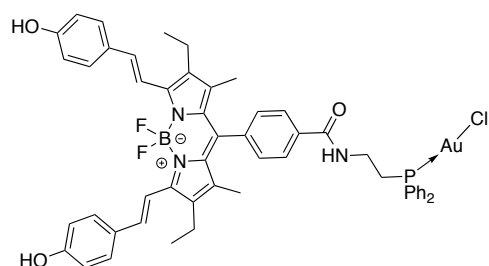
¹H NMR (300.13 MHz, Acetone-d₆): δ (ppm) 1.17 (t, 6H, ³J = 7.4 Hz), 1.41 (s, 6H), 2.68 (q, 4H, ³J = 7.4 Hz), 3.01 (s, 4H), 6.94 (d, 4H, ³J = 8.2 Hz), 7.36 (d, 2H, ³J = 16.7 Hz), 7.55 (d, 4H, ³J = 8.3 Hz), 7.69 (d, 2H, ³J = 16.8 Hz), 7.80 (d, 2H, ³J = 7.9 Hz), 8.38 (d, 2H, ³J = 7.9 Hz), 8.77 (broad s, 2H, OH).

¹³C {¹H} NMR (125.77 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 11.5 (s, 2CH₃), 13.9 (s, 2CH₃), 17.7 (s, 2CH₂), 25.6 (s, 2CH₂), 115.8 (s, CH), 116.1 (s, CH), 125.0 (s, C), 127.8 (s, C), 128.9 (s, CH), 130.3 (s, CH), 130.8 (s, CH), 131.5 (s, C), 132.1 (s, C), 133.6 (s, C), 135.5 (s, C), 136.4 (s, CH), 138.1 (s, C), 142.3 (s, C), 150.1 (s, C), 158.9 (s, C), 161.4 (s, C), 170.3 (s, C).

¹¹B {¹H} NMR (96.29 MHz, Acetone-d₆): δ (ppm) 1.25 (t, ¹J_{B-F} = 35.2 Hz).

¹⁹F {¹H} NMR (282.38 MHz, Acetone-d₆): δ (ppm) -138.4 (q, ¹J_{F-B} = 34.7 Hz).

HR-MS (ESI): m/z calcd for C₄₂H₃₈BF₂N₃O₆ + Na⁺: 752.27212 [M+Na]⁺. Found: 752.27177.

**NIR-BODI-Au-1****C₅₂H₄₉AuBClF₂N₃O₃P****Exact Mass: 1075.29****Molecular Weight: 1076.16 g.mol⁻¹**

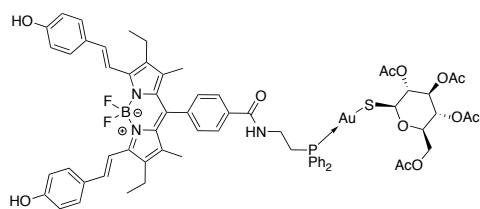
The reaction was carried out under an Ar atmosphere. NIR-BODIPY ester activated **15** (30 mg, 0.041 mmol, 1.0 eq.), complex **7** (23 mg, 0.050 mmol, 1.2 eq.) and distilled TEA (11 μ L, 0.082 mmol, 2.0 eq.) were dissolved in deoxygenated chloroform (2 mL). The mixture was refluxed for 24 h. The reaction was monitored by ³¹P NMR. The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was dissolved in deoxygenated DCM and washed three times with deoxygenated HCl 0.1 M and distilled water, dried over anhydrous MgSO₄, filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The product was washed three times with deoxygenated pentane and dried under reduced pressure. **NIR-BODI-Au-1** was isolated as a dark green powder (32 mg, 73%).

¹H NMR (600.23 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 1.09 (t, 6H, ³J = 7.5 Hz), 1.28 (s, 6H), 2.60 (pseudo-q, 4H, ³J = 7.3 Hz), 3.13 (m, 2H), 3.61 (m, 2H), 6.87 (d, 4H, ³J = 8.6 Hz), 7.25 (d, 2H, ³J = 16.8 Hz), 7.44 (d, 2H, ³J = 16.6 Hz), 7.48 (d, 4H, ³J = 8.7 Hz), 7.49 (d, 2H, ³J = 8.1 Hz), 7.57 (m, 8H), 7.79 (m, 6H), 7.94 (d, 2H, ³J = 8.1 Hz), 8.92 (t, 1H, NH).

¹⁹F {¹H} NMR (470.55 MHz, Acetone-d₆): δ (ppm) -138.4 (q, ¹J_{F-B} = 32.9 Hz).

³¹P {¹H} NMR (202.45 MHz, Acetone-d₆): δ (ppm) 25.8 (s, P-Au-Cl).

HR-MS (ESI): m/z calcd for C₅₂H₄₉AuBClF₂N₃O₃P + Na⁺: 1098.28276 [M+Na]⁺. Found: 1098.28494.

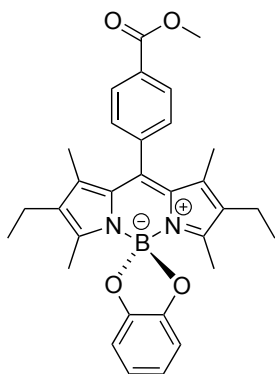
NIR-BODI-Au-2**C₆₆H₆₈AuBF₂N₃O₁₂PS****Exact Mass: 1403.40****Molecular Weight: 1404.07 g.mol⁻¹**

The reaction was carried out under an Ar atmosphere. In a schlenk tube, 1-thio-β-D-glucose tetraacetate (6.9 mg, 0.019 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in distilled acetone (0.7 mL) and deoxygenated NaOH 1.0 M (19 μL, 0.019 mmol, 1.0 eq.) was added. The mixture was stirred 15 min at rt in the dark. In another schlenk tube, **NIR-BODI-Au-1** (20.0 mg, 0.019 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in distilled acetone (0.5 mL) and stirred 5 min at 0°C. The first solution was slowly added to the other one at 0°C, the first schlenk tube was rinsed with distilled acetone (0.5 mL) and added to the mixture. The resulting reaction mixture was stirred at rt for 4 h in the dark. The reaction was monitored by ³¹P NMR. The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was dissolved in deoxygenated DCM (2 mL) and filtrated to remove salts, washed three times with deoxygenated pentane and dried under reduced pressure. **NIR-BODI-Au-2** was obtained as a dark green powder (10.7 mg, 40%).

¹⁹F {¹H} NMR (470.54 MHz, Acetone-d₆): δ (ppm) -138.4 (q, ¹J_{F-B} = 35.5 Hz).

³¹P {¹H} NMR (202.45 MHz, Acetone-d₆): δ (ppm) 31.5 (s, P-Au-S).

HR-MS (ESI): m/z calcd for C₆₆H₆₈AuBF₂N₃O₁₂PS + Na⁺: 1426.38909 [M+Na]⁺. Found: 1426.38877.

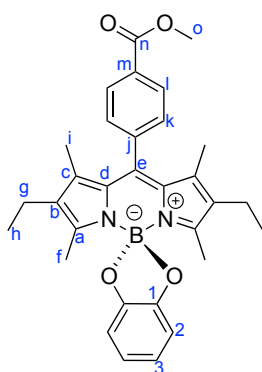


C₃₁H₃₃BN₂O₄

Exact Mass: 508.25

Molecular Weight: 508.42 g.mol⁻¹

The reaction was carried out under an Ar atmosphere using schlenk technics. A mixture of BODIPY ester (96.4 mg, 0.22 mmol, 1.0 eq.) and AlCl₃ (75 mg, 0.56 mmol, 2.5 eq.) in dry DCM (10 mL) was refluxed for 10 min. After cooling down this solution, catechol (36.7 mg, 0.33 mmol, 1.5 eq.) dissolved in deoxygenated ACN (10 mL) was added dropwise to the reaction mixture. The resulting reaction mixture was stirred at rt for 30 min, then concentrated in vacuo. The crude product was dissolved in DCM, filtered through celite (Dicalite 4158, Carlo Erba) and concentrated under reduced pressure. This residue was purified by silica gel column chromatography (eluent: EtOAc – heptane (gradient 100% heptane to 1:9)) to afford the compound **18** as a red powder (85 mg, 76%).



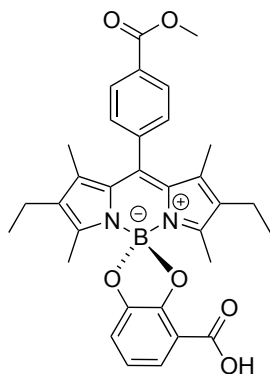
¹H NMR (500.03 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0.92 (t, 6H_h, ³J = 7.5 Hz), 1.26 (s, 6H_i), 2.05 (s, 6H_f), 2.23 (q, 4H_g, ³J = 7.5 Hz), 3.98 (s, 3H_o), 6.78 (s, 4H, 2H₂ & 2H₃), 7.42 (d, 2H_k, ³J = 8.2 Hz), 8.18 (d, 2H_l, ³J = 8.1 Hz).

¹³C {¹H} NMR (125.75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 12.1 (s, 2C_i), 12.9 (s, 2C_f), 14.7 (s, 2C_h), 17.2 (s, 2C_g), 52.5 (s, C_o), 108.9 (s, 2C₂), 119.6 (s, 2C₃), 128.9 (s, 2C_k), 130.5 (s, 2C_l), 130.8 (s, C_m), 131.2 (s, 2C_d), 133.9 (s, 2C_b), 138.7 (s, C_e), 139.0 (s, 2C_c), 141.1 (s, C_j), 152.1 (s, 2C₁), 156.2 (s, 2C_a), 166.7 (s, C_n).

¹¹B {¹H} NMR (96.29 MHz, Acetone-*d*₆): δ (ppm) 7.22 (s).

HR-MS (ESI): m/z calcd for C₃₁H₃₃BN₂O₄ + Na⁺: 531.24256 [M+Na]⁺. Found: 531.24146.

Anal. Calcd for C₃₁H₃₃BN₂O₄: C, 73.23, H, 6.54, N, 5.51%. Found: C, 71.87, H, 6.65, N, 5.47%.

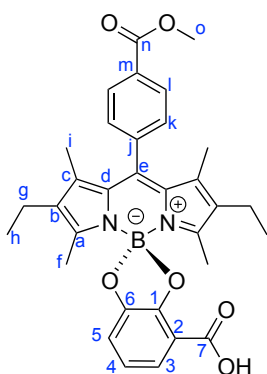


C₃₂H₃₃BN₂O₆

Exact Mass: 552.24

Molecular Weight: 552.43 g.mol⁻¹

A mixture of BODIPY-ester (96.4 mg, 0.22 mmol, 1.0 eq.) and AlCl₃ (75 mg, 0.56 mmol, 2.5 eq.) in DCM (10 mL) was refluxed for 10 min. After cooling down this solution, 2,3-dihydroxybenzoic acid (51 mg, 0.33 mmol, 1.5 eq.) dissolved in ACN (10 mL) was added dropwise to the reaction mixture. The resulting reaction mixture was stirred at rt for 30 min, then filtered through celite and concentrated under reduced pressure. This residue was purified by silica gel column chromatography (eluent: EtOAc – heptane (gradient 1:9 to 3:7)) and then was washed several times with pentane to afford the compound **19** as a red powder (51 mg, 42%).

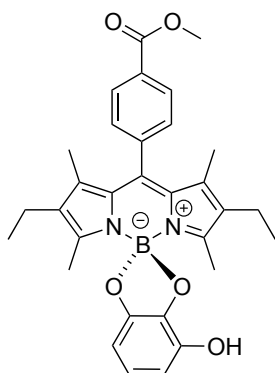


¹H NMR (500.03 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0.93 (t, 6H_h, ³J = 7.5 Hz), 1.29 (s, 6H_i), 2.09 (s, 6H_f), 2.25 (q, 4H_g, ³J = 7.7 Hz), 3.99 (s, 3H_o), 5.73 (s, 1H, COOH), 6.90 (t, H₄, ³J = 7.9 Hz), 7.15 (dd, H₅, ³J = 7.8 Hz, ⁴J = 1.6 Hz), 7.44 (m, 2H_k), 7.61 (dd, H₃, ³J = 7.9 Hz, ⁴J = 1.6 Hz), 8.21 (d, 2H_l, ³J = 8.5 Hz).

¹³C {¹H} NMR (125.75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 12.2 (s, 2C_i), 13.1 (s, 2C_f), 14.7 (s, 2C_h), 17.2 (s, 2C_g), 52.6 (s, C_o), 115.7 (s, C₂), 119.5 (s, C₅), 119.8 (s, C₄), 120.9 (s, C₃), 128.7 & 128.9 (2s, 2C_k), 130.5 & 130.7 (2s, 2C_l), 131.0 (s, C_m or 2C_d), 131.1 (s, 2C_d or C_m), 134.1 (s, 2C_b), 139.3 (s, C_e), 139.5 (s, 2C_c), 140.6 (s, C_j), 145.0 (s, C₆), 147.3 (s, C₁), 155.0 (s, 2C_a), 163.6 (s, C₇), 166.6 (s, C_n).

¹¹B {¹H} NMR (160.42 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2.16 (s).

HR-MS (ESI): m/z calcd for C₃₂H₃₃BN₂O₆ + Na⁺: 575.23239 [M+Na]⁺. Found: 575.23182.

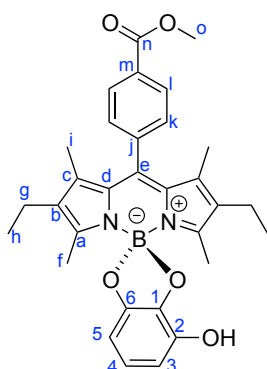


C₃₁H₃₃BN₂O₅

Exact Mass: 524.25

Molecular Weight: 524.42 g.mol⁻¹

A mixture of BODIPY-ester (96.4 mg, 0.22 mmol, 1.0 eq.) and AlCl₃ (75 mg, 0.56 mmol, 2.5 eq.) in DCM (10 mL) was refluxed for 10 min. After cooling down this solution, pyrogallol (41.6 mg, 0.33 mmol, 1.5 eq.) dissolved in ACN (10 mL) was added dropwise to the reaction mixture. The resulting reaction mixture was stirred at rt for 30 min, then filtered through celite and concentrated under reduced pressure. This residue was purified by silica gel column chromatography (eluent: EtOAc – heptane (gradient 1:9 to 2:8)) and then was washed several times with pentane to afford the compound **20** as a red powder (69 mg, 60%).

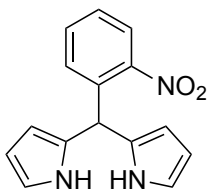


¹H NMR (500.03 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0.93 (t, 6H_h, ³J = 7.6 Hz), 1.27 (s, 6H_i), 2.06 (s, 6H_f), 2.25 (q, 4H_g, ³J = 7.6 Hz), 3.98 (s, 3H_o), 4.90 (s, 1H, OH), 6.44 (dd, H₅, ³J = 7.7 Hz, ⁴J = 1.1 Hz), 6.48 (dd, H₃, ³J = 8.4 Hz, ⁴J = 1.0 Hz), 6.68 (t, H₄, ³J = 8.0 Hz), 7.42 (m, 2H_k), 8.19 (m, 2H_j).

¹³C {¹H} NMR (125.75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 12.2 (s, 2C_i), 12.8 (s, 2C_f), 14.7 (s, 2C_h), 17.2 (s, 2C_g), 52.5 (s, C_o), 102.5 (s, C₅), 108.0 (s, C₃), 119.7 (s, C₄), 128.9 (2s, 2C_k), 130.5 (s, 2C_j), 130.9 (s, C_m), 131.1 (s, 2C_d), 134.1 (s, 2C_b), 138.2 (s, C₁), 138.8 (s, C_e), 139.2 (s, 2C_c), 139.9 (s, C₂), 140.9 (s, C_j), 152.6 (s, C₆), 156.3 (s, 2C_a), 166.7 (s, C_n).

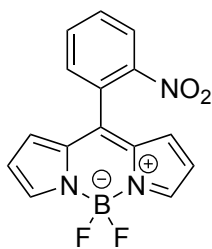
¹¹B {¹H} NMR (160.42 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.26 (s).

HR-MS (ESI): m/z calcd for C₃₁H₃₃BN₂O₅ + H⁺: 525.25553 [M+H]⁺. Found: 525.25514.

**21**²³⁰**C₁₅H₁₃N₃O₂****Exact Mass: 267.10****Molecular Weight: 267.28 g.mol⁻¹**

2-nitrobenzaldehyde (2.0 g, 13.2 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in distilled pyrrole (23 mL, 331 mmol, 25.0 eq.) followed by bubbling N₂ for 3 min. TFA (100 μL, 1.3 mmol, 0.1 eq.) was added and the mixture was stirred at rt under a N₂ atmosphere for 10 min until complete consumption of the 2-nitrobenzaldehyde was observed by TLC (eluent: DCM). The reaction was quenched by adding NaOH 0.1 M (45 mL). The organic layer was extracted with EtOAc (50 mL) and washed three times with distilled water (3 x 100 mL) and with saturated NaCl (100 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (eluent: DCM - heptane (gradient 7:3 to 9:1)) to afford 5-(2-nitrophenyl)dipyrromethane **21** as a brown oil (3.22 g, 91%).

¹H NMR (500.03 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 5.87 (m, 2H_{pyrrole}), 6.15 (q, 2H_{pyrrole}, ³J = 2.9 Hz), 6.21 (s, H), 6.73 (td, 2H_{pyrrole}, ³J = 2.7 Hz, ³J = 1.6 Hz), 7.29 (dd, H_{Ar}, ³J = 7.8 Hz, ⁴J = 1.6 Hz), 7.38 (td, H_{Ar}, ³J = 7.8 Hz, ⁴J = 1.5 Hz), 7.51 (td, H_{Ar}, ³J = 7.7 Hz, ⁴J = 1.4 Hz), 7.87 (dd, H_{Ar}, ³J = 8.1 Hz, ⁴J = 1.5 Hz), 8.15 (br s, 2H, NH).

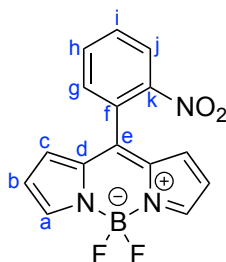


$C_{15}H_{10}BF_2N_3O_2$

Exact Mass: 313.08

Molecular Weight: 313.07 g.mol⁻¹

5-(2-nitrophenyl)dipyrrromethane **21** (3.21 g, 12 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in DCM (150 mL). A solution of DDQ (2.73 g, 13 mmol, 1.0 eq.) in DCM (100 mL) was added and the mixture was stirred at rt for 30 min until complete consumption of the dipyrrromethane was observed by TLC (eluent: DCM). TEA (10 mL, 72 mmol, 6.0 eq.) was added to the mixture and stirred 1 h. Boron trifluoride diethyl etherate complex (13.3 mL, 108 mmol, 9.0 eq.) was added dropwise to the mixture and stirred another 2 h. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was diluted in DCM (150 mL) and washed four times with distilled water (4 x 200 mL) and with saturated NaCl (1 x 200 mL). The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel pad (eluent: DCM) and silica gel column chromatography (eluent: DCM – heptane (gradient 1:1 to 7:3)) to afford BODIPY-nitro **22** as an orange powder (1.69 g, 45%).



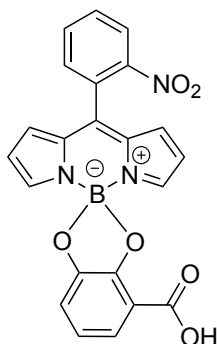
¹H NMR (500.03 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 6.51 (d, 2H_b or 2H_c, ³J = 4.4 Hz), 6.67 (d, 2H_c or 2H_b, ³J = 4.4 Hz), 7.57 (dd, H_g, ³J = 7.3 Hz, ⁴J = 1.8 Hz), 7.77 (2 td, H_h & H_i, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.7 Hz), 7.95 (s, 2H_a), 8.22 (dd, H_j, ³J = 7.9 Hz, ⁴J = 1.5 Hz).

¹³C {¹H} NMR (125.75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 119.3 (2s, 2C_b or 2C_c), 125.2 (s, C_j), 128.5 (s, C_k), 129.8 (2s, 2C_c or 2C_b), 131.3 (s, C_h or C_i), 132.4 (s, C_g), 133.2 (s, C_i or C_h), 134.7 (s, C_d), 142.7 (s, C_e), 145.4 (s, 2C_a), 149.2 (s, C_f).

¹¹B {¹H} NMR (96.29 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0.27 (t, ¹J_{B-F} = 28.4 Hz).

¹⁹F {¹H} NMR (470.45 MHz, CDCl₃): δ (ppm) -144.2 (pseudo-octuplet, 1F, ¹J_{F-B} = -28.9-Hz, ²J_{F-B-F} = 103.3 Hz), -146.5 (pseudo-octuplet, 1F, ¹J_{F-B} = 27.8 Hz, ²J_{F-B-F} = 103.0 Hz).

HR-MS (ESI): m/z calcd for C₁₅H₁₀BF₂N₃O₂ + Na⁺: 336.07263 [M+Na]⁺. Found: 336.07226.

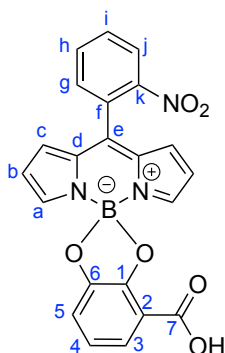


C₂₂H₁₄BN₃O₆

Exact Mass: 427.10

Molecular Weight: 427.17 g.mol⁻¹

A mixture of BODIPY-nitro **22** (94 mg, 0.30 mmol, 1.0 eq.) and AlCl₃ (100 mg, 0.75 mmol, 2.5 eq.) in DCM (10 mL) was refluxed for 10 min, the reaction mixture turned purple with time. After cooling down this solution, 2,3-dihydroxybenzoic acid (69 mg, 0.45 mmol, 1.5 eq.) dissolved in ACN (10 mL) was added dropwise to the reaction mixture. The resulting reaction mixture turned red with time and was stirred at rt for 30 min, then filtered through a celite pad and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (eluent: EtOAc – heptane (gradient 3:7 to 1:1)) and then was washed several times with pentane to afford the compound **23** as a mixture of both atropisomers (55 mg, 43%, R_t = 4.61 and 4.68 min).

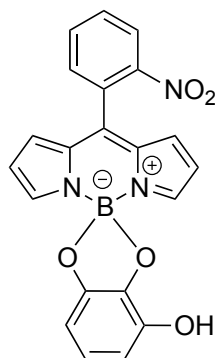


¹H NMR (500.03 MHz, 300 K, DMSO-d₆): δ (ppm) 6.61 (dd, 2H_b, ³J = 4.3 & 1.9 Hz), 6.86 (t, H₄, ³J = 7.9 Hz), 6.91 (d, 2H_c, ³J = 4.3 Hz), 7.05 / 7.07 (dd / dd, H₅, ³J = 7.9 Hz, ⁴J = 1.7 Hz), 7.34 / 7.36 (dd / dd, H₃, ³J = 7.9 Hz, ⁴J = 1.6 Hz), 7.79 / 7.84 (dd / dd, H_g, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 1.4 Hz), 7.96 (s, 2H_a), 7.96 (m, 2H, H_h & H_i), 8.35 / 8.36 (dd / dd, H_j, ³J = 8.1 Hz, ⁴J = 1.2 Hz), 9.31 / 9.45 (br s / br s, 1H, COOH).

¹³C {¹H} NMR (125.75 MHz, 300 K, DMSO-d₆): δ (ppm) 115.26 / 115.28 (s / s, C₂), 119.37 / 119.43 (s / s, C₃), 119.81 (s, C₄), 120.06 (s, 2C_b), 120.60 / 120.75 (s / s, C₅), 125.37 / 125.44 (s / s, C_j), 126.96 / 126.99 (s / s, C_k), 130.56 / 130.60 (s / s, 2C_c), 132.05 (s, C_h or C_i), 132.33 / 132.57 (s / s, C_g), 133.87 / 133.89 (s / s, 2C_d), 134.13 / 134.16 (s / s, C_i or C_h), 142.94 (s, C_e), 146.05 (s, 2C_a), 146.73 / 146.82 (s / s, C₆), 147.16 / 147.37 (s / s, C₁), 148.42 / 148.50 (s / s, C_f), 162.21 / 162.24 (s / s, C₇).

¹¹B {¹H} NMR (160.42 MHz, 300 K, DMSO-d₆): δ (ppm) 1.64 (s).

HR-MS (ESI): m/z calcd for C₂₂H₁₄BN₃O₆ + H⁺: 428.10484 [M+H]⁺. Found: 428.10372.

 $C_{21}H_{14}BN_3O_5$

Exact Mass: 399.10

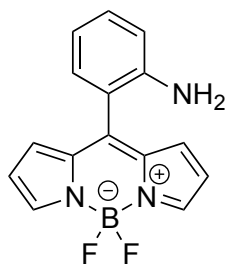
Molecular Weight: 399.16 g.mol⁻¹

A mixture of BODIPY-nitro **22** (94 mg, 0.30 mmol, 1.0 eq.) and AlCl₃ (100 mg, 0.75 mmol, 2.5 eq.) in DCM (10 mL) was refluxed for 10 min, the reaction mixture turned purple with time. After cooling down this solution, pyrogallol (57 mg, 0.45 mmol, 1.5 eq.) dissolved in ACN (10 mL) was added dropwise to the reaction mixture. The resulting reaction mixture turned red with time and was stirred at rt for 30 min, then filtered through a celite pad and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (eluent: EtOAc – heptane (gradient 2:8 to 4:6)) to afford **24-trans** (18 mg, R_t = 4.72 min, purity at 214 nm > 98%), **24-cis** (8 mg, R_t = 4.64 min, purity at 214 nm > 90%) and a fraction containing the both atropisomers. All fractions were obtained as a red powder (51 mg, 43%).

¹H NMR (300.13 MHz, Acetone-d₆): δ (ppm) 6.33-6.56 (m, 4H), 6.59 (dd, 2H, ³J = 4.3 & 2.0 Hz), 6.93 (d, 2H, ³J = 4.3 Hz), 7.65 (s, 2H), 7.86 (dd, 1H, ³J = 7.2 Hz, ⁴J = 1.8 Hz), 7.94-8.05 (m, 2H), 8.36 (dd, 1H, ³J = 7.8 Hz, ⁴J = 1.6 Hz).

¹¹B {¹H} NMR (96.29 MHz, Acetone-d₆): δ (ppm) 6.73 (s).

HR-MS (ESI): m/z calcd for C₂₁H₁₄BN₃O₅ + H⁺: 400.10993 [M+H]⁺. Found: 400.10886.

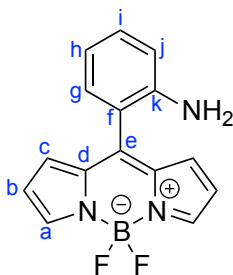


$C_{15}H_{12}BF_2N_3$

Exact Mass: 283.11

Molecular Weight: 283.08 g.mol⁻¹

BODIPY-nitro **22** (111 mg, 0.355 mmol, 1.0 eq.) and Pd/C (10% w, 7.5 mg, 0.02 eq.) were dissolved in a mixture of THF/EtOH/acetic acid (1:3:3) (42 mL). The reaction was carried out under a H₂ atmosphere (1 atm) and stirred vigorously at rt until complete consumption of the BODIPY-nitro derivative was observed by TLC (eluent: DCM) and RP-HPLC-MS. After 3 h, the reaction mixture was filtered over celite pad to remove palladium and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (eluent: DCM) to afford BODIPY-amino derivative **25** as a brownish solid (44 mg, 43%).



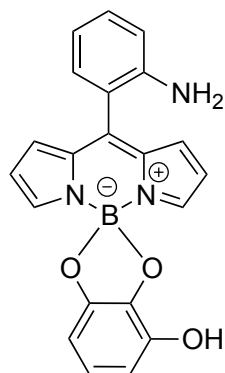
¹H NMR (500.03 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 6.51 (d, 2H_b or 2H_c, ³J = 4.3 Hz), 6.79 (d, H_i, ³J = 8.1 Hz), 6.84 (td, H_h, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 0.9 Hz), 6.96 (d, 2H_c or 2H_b, ³J = 4.3 Hz), 7.14 (dd, H_g, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.6 Hz), 7.30 (td, H_i, ³J = 7.8 Hz, ⁴J = 1.6 Hz), 7.92 (s, 2H_a).

¹³C {¹H} NMR (125.75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 116.4 (s, C_j), 118.0 (s, C_h), 118.6 (s, C_f), 118.8 (s, 2C_b or 2C_c), 131.4 (s, C_i or C_g), 131.4 (s, 2C_c or 2C_b), 131.5 (s, C_g or C_i), 135.2 (s, C_d), 144.5 (s, C_k), 144.6 (s, 2C_a), 145.1 (s, C_e).

¹¹B {¹H} NMR (96.29 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0.26 (t, ¹J_{B-F} = 28.6 Hz).

¹⁹F {¹H} NMR (470.45 MHz, CDCl₃): δ (ppm) -144.5 (pseudo-octuplet, F, ¹J_{F-B} = 29.5 Hz, ²J_{F-B-F} = 105.8 Hz), -145.7 (pseudo-octuplet, 1F, ¹J_{F-B} = 28.6 Hz, ²J_{F-B-F} = 105.8 Hz).

HR-MS (ESI): m/z calcd for C₁₅H₁₂BF₂N₃ + Na⁺: 306.09846 [M+Na]⁺. Found: 306.09702.

 $C_{21}H_{16}BN_3O_3$

Exact Mass: 369.13

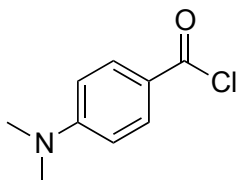
Molecular Weight: 369.18 g.mol⁻¹

A mixture of BODIPY-amino **25** (89 mg, 0.31 mmol, 1.0 eq.) and AlCl₃ (104 mg, 0.78 mmol, 2.5 eq.) in DCM (10 mL) was refluxed for 10 min, the reaction mixture turned purple with time. After cooling down this solution, pyrogallol (43 mg, 0.34 mmol, 1.1 eq.) dissolved in ACN (10 mL) was added dropwise to the reaction mixture. The resulting reaction mixture turned red with time and was stirred at rt for 30 min, then filtered through a celite pad and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (eluent: EtOAc – heptane (gradient 3:7 to 1:1)) to afford the compound **26** as a mixture of both atropisomers (48 mg, 42%, R_t = 4.53 and 4.75 min).

¹H NMR (300.13 MHz, Acetone-d₆): δ (ppm) 4.90 / 4.97 (broad s, 2H_{amine}), 6.32-6.38 (m, 2H_{Cat}), 6.54-6.58 (m, 2H_{pyr}, H_{Cat}), 6.78-6.83 (m, 1H_{meso-Ar}), 6.94 (d, 1H_{meso-Ar}, ³J = 8.2 Hz), 7.07 (d, 2H_{pyr}, ³J = 4.3 Hz), 7.18 (m, 1H_{meso-Ar}), 7.31 (pseudo t, 1H_{meso-Ar}, ³J = 7.8 Hz), 7.44 / 7.54 (broad s, 1H_{OH}), 7.70 (s, 2H_{pyr}).

¹¹B {¹H} NMR (96.29 MHz, Acetone-d₆): δ (ppm) 6.65 (s).

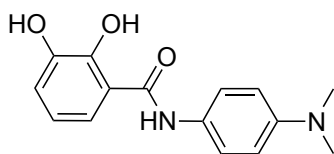
HR-MS (ESI): m/z calcd for C₂₁H₁₆BN₃O₃ + H⁺: 370.13575 [M+H]⁺. Found: 370.13594.

**27****C₉H₁₀ClNO****Exact Mass: 183.05****Molecular Weight: 183.63 g.mol⁻¹**

4-(dimethylamino)benzoic acid (1.0 g, 6.1 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in dry DCM (10 mL), oxalyl chloride (1.5 mL, 17.7 mmol, 2.9 eq.) and DMF (2 drops) were added dropwise to the mixture at 0°C under a N₂ atmosphere. The reaction mixture was stirred 1 h at 0°C and warmed at rt overnight under a N₂ atmosphere. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and dried to afford 4-(dimethylamino)benzoyl chloride **27** as a white powder (quant.) used without purification.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 3.11 (s, 6H), 6.68 (pseudo-d, 2H, ³J = 9.1 Hz), 7.97 (pseudo-d, 2H, ³J = 9.3 Hz).

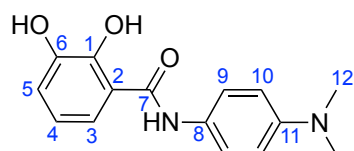
IR: ν (cm⁻¹) 860 (ν_{Ph-C} stretch), 1714 (ν_{C=O} stretch).



C₁₅H₁₆N₂O₃
Exact Mass: 272.12
Molecular Weight: 272.30 g.mol⁻¹

28

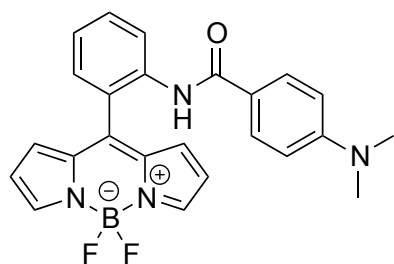
2,3-dihydroxybenzoic acid (154 mg, 1.0 mmol, 1.0 eq.), 4-(dimethylamino)aniline (681 mg, 5.0 mmol, 5.0 eq.) and PyBrOP (513 mg, 1.1 mmol, 1.1 eq.) were dissolved in distilled ACN (5 mL). DIEA (200 μ L, 1.1 mmol, 1.1 eq.) was added to the reaction mixture and the reaction was carried out under an Ar atmosphere at rt overnight until complete consumption of the benzoic acid derivative was observed by TLC (eluent: EtOAc – heptane (1:1)). The reaction mixture was concentrated under reduced pressure, diluted in EtOAc (40 mL) and washed three times with distilled water (3 x 50 mL) and with saturated NaCl (1 x 50 mL). The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (eluent: EtOAc – petroleum ether (gradient 2:8 to 3:7)) to afford catechol derivative **28** as a pale yellow solid (103 mg, 38%).



¹H NMR (500.03 MHz, Acetone-d₆): δ (ppm) 2.93 (s, 6H₁₂), 6.76 (t, H₄, ³J = 8.0 Hz), 6.76 (d, 2H₁₀, ³J = 9.1 Hz), 7.00 (dd, H₅, ³J = 7.8 Hz, ⁴J = 1.4 Hz), 7.45 (pseudo-dd, H₃, ³J = 8.1 Hz, ⁴J = 1.4 Hz), 7.55 (m, 2H₉), 9.49 (s, 1H, NH).

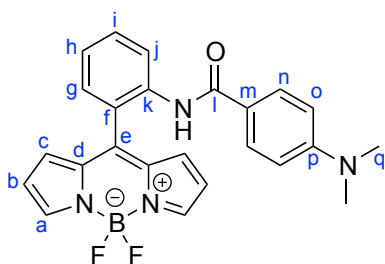
¹³C {¹H} NMR (125.75 MHz, Acetone-d₆): δ (ppm) 40.8 (s, 2C₁₂), 113.4 (s, 2C₁₀), 116.2 (s, C₂), 118.0 (s, C₃), 119.2 (s, C₄), 119.4 (s, C₅), 123.8 & 123.9 (2s, 2C₉), 128.1 & 128.2 (2s, C₈), 147.3 (s, C₆), 149.4 (s, C₁₁), 150.8 (s, C₁), 169.3 & 169.4 (2s, C₇).

HR-MS (ESI): m/z calcd for C₁₅H₁₆N₂O₃ + H⁺: 273.12337 [M+H]⁺. Found: 273.12311.



C₂₄H₂₁BF₂N₄O
Exact Mass: 430.18
Molecular Weight: 430.26 g.mol⁻¹

BODIPY-amino **25** (72 mg, 0.25 mmol, 1.0 eq.) and 4-(dimethylamino)benzoyl chloride (234 mg, 1.27 mmol, 5.0 eq.) were dissolved in dry DCM. The reaction was carried out under a N₂ atmosphere at rt overnight until complete consumption of the BODIPY-amino derivative was observed by TLC (eluent: EtOAc – heptane (1:1)) and RP-HPLC-MS. The reaction mixture was washed three times with distilled water (3 x 30 mL) and with saturated NaCl (1 x 40 mL), dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (eluent: EtOAc – DCM (98:2)) to afford BODIPY derivative **29** as a red solid (89 mg, 81%).



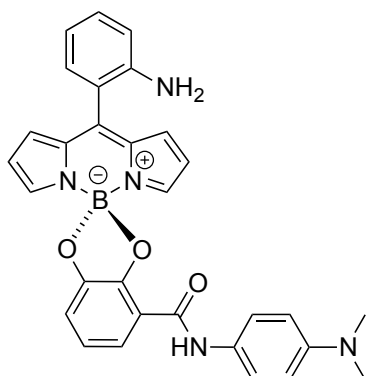
¹H NMR (500.03 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2.98 (s, 6H_q), 6.54 (m, 2H_b), 6.56 (pseudo-d, 2H_o, ³J = 9.1 Hz), 6.92 (d, 2H_c, ³J = 4.3 Hz), 7.25 (td, H_n, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 1.0 Hz), 7.36 (dd, H_g, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.7 Hz), 7.37 (pseudo-d, 2H_n, ³J = 9.0 Hz), 7.58 (ddd, H_i, ³J = 8.4 & 7.3 Hz, ⁴J = 1.6 Hz), 7.82 (br s, 1H, NH), 7.98 (s, 2H_a), 8.55 (d, H_j, ³J = 8.4 Hz).

¹³C {¹H} NMR (125.75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 40.2 (s, 2C_q), 111.3 (s, 2C_o), 119.5 (s, 2C_b), 120.6 (s, C_m), 122.5 (s, C_j), 123.5 (2s, C_h & C_f), 128.6 (s, 2C_n), 130.7 (s, C_g), 131.3 (s, C_i), 131.5 (s, 2C_c), 135.2 (s, C_d), 136.7 (s, C_k), 143.1 (s, C_e), 145.5 (s, 2C_a), 152.9 (s, C_p), 165.3 (s, C_l).

¹¹B {¹H} NMR (160.42 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0.32 (t, ¹J_{B-F} = 28.6 Hz).

¹⁹F {¹H} NMR (470.45 MHz, CDCl₃): δ (ppm) -144.3 (pseudo-octuplet, F, ¹J_{F-B} = 29.5 Hz, ²J_{F-B-F} = 103.2 Hz), -147.2 (pseudo-octuplet, 1F, ¹J_{F-B} = 28.6 Hz, ²J_{F-B-F} = 102.3 Hz).

HR-MS (ESI): m/z calcd for C₂₄H₂₁BF₂N₄O + Na⁺: 453.16687 [M+Na]⁺. Found: 453.16591.

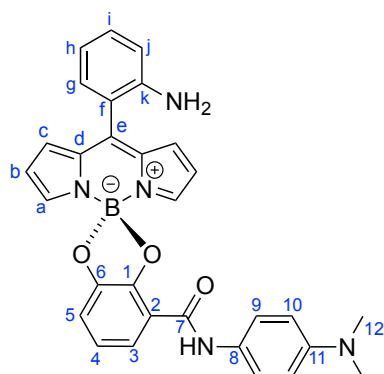


$C_{30}H_{26}BN_5O_3$

Exact Mass: 515.21

Molecular Weight: 515.37 g.mol⁻¹

A mixture of BODIPY-amino **25** (86 mg, 0.30 mmol, 1.0 eq.) and AlCl₃ (101 mg, 0.76 mmol, 2.5 eq.) in DCM (10 mL) was refluxed for 10 min, the reaction mixture turned purple with time. After cooling down this solution, catechol derivative **28** (87 mg, 0.32 mmol, 1.1 eq.) dissolved in ACN (10 mL) was added dropwise to the reaction mixture. The resulting reaction mixture turned red with time and was stirred at rt for 1 hour and concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in DMF and filtered through a celite pad. The filtrate was concentrated under reduced pressure, then poured in cold diethyl ether and filtered. The filtrate was concentrated under reduced pressure and washed twice with THF and finally concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (eluent: EtOAc – DCM (gradient 1:9 to 2:8)) and then was washed several times with pentane to afford BODIPY derivative **30** as a pale purple powder of both atropisomers (24 mg, 16%, R_t = 4.77 and 4.89 min).



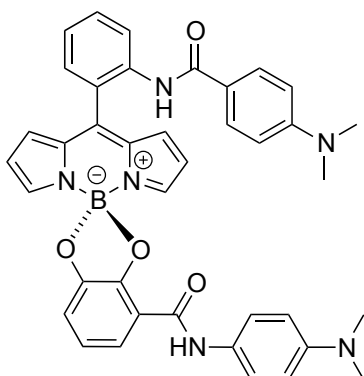
¹H NMR (500.03 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2.89 (2s, 6H₁₂), 3.92 / 3.97 (br s / br s, 2H, NH₂), 6.51 (dd, 2H_b, ³J = 4.3 & 1.9 Hz), 6.71 (d, 2H₁₀, ³J = 7.7 Hz), 6.83 (t, H_i, ³J = 8.2 Hz), 6.88 (t, H_h, ³J = 7.4 Hz), 6.92 (t, H₄, ³J = 7.9 Hz), 6.98 (pseudo-td, H₅, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.6 Hz), 7.08 (d, 2H_c, ³J = 4.4 Hz), 7.18 / 7.25 (dd / dd, H_g, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.6 Hz), 7.34 (pseudo-tt, H_i, ³J = 7.8 Hz, ⁴J = 1.8 Hz), 7.48 (m, 2H₉), 7.66 (m, H₃), 7.70 (s, 2H_a), 9.61 / 9.64 (br s / br s, 1H, CONH).

¹³C {¹H} NMR (125.75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 41.24 (s, 2C₁₂), 112.77 / 112.84 (s / s, C₅), 113.35 (s, 2C₁₀), 116.54 / 116.58 (s / s, C_j), 117.99 (s, C₂), 118.21 / 118.25 (s / s, C_h), 118.42 (s, C_f), 119.37 (s, 2C_b), 120.01 (s, C₄), 120.19 / 120.21 (s / s, C₃), 122.40 & 122.54 (2s, 2C₉), 128.72 & 128.76 (2s, C₈), 131.57 (s, C_g or C_i), 131.66

(s, C_i or C_g), 132.43 (s, 2C_c), 135.15 (s, C_d), 144.46 / 144.57 (s / s, C_k), 145.48 / 145.53 / 145.56 (s / s / s, 2C_a & C_e), 147.89 (s, C₁₁), 149.26 (s, C₁), 150.75 / 150.83 (s / s, C₆), 163.13 & 163.22 (2s, C₇).

¹¹B {¹H} NMR (160.42 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 6.54 (s).

HR-MS (ESI): m/z calcd for C₃₀H₂₆BN₅O₃ + Na⁺: 538.20209 [M+Na]⁺. Found: 538.20181.



$C_{39}H_{35}BN_6O_4$

Exact Mass: 662.28

Molecular Weight: 662.54 g.mol⁻¹

A mixture of BODIPY derivative **29** (61 mg, 0.142 mmol, 1.0 eq.) and AlCl₃ (47 mg, 0.355 mmol, 2.5 eq.) in DCM (10 mL) was refluxed for 10 min, the reaction mixture turned purple with time. After cooling down this solution, catechol derivative **28** (58 mg, 0.213 mmol, 1.5 eq.) dissolved in ACN (10 mL) was added dropwise to the reaction mixture. The resulting reaction mixture turned red with time and was stirred at rt for 4 hours and concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc, filtered through a celite pad that was then rinsed with MeOH. The filtrates were concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (eluent: EtOAc – petroleum ether (1:1) and then was washed several times with pentane to afford BODIPY derivative **31** as a red powder of both atropisomers (15 mg, 16%, R_t = 4.92 and 5.05 min). The atropisomers were separated by semi-preparative RP-HPLC (R_t = 4.97 min, purity > 99% at 214 nm and R_t = 5.11 min, purity 98% at 214 nm).

Mixture of both atropisomers:

¹H NMR (500.03 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2.75 / 2.83 / 2.90 / 3.02 (4s, 12H), 6.41 / 6.46 / 6.61 / 6.71 (4d, 4H, ³J = 9.0 Hz), 6.53-6.54 / 6.56-6.58 (2m, 2H), 6.91-7.08 (m, 4H), 7.28 / 7.34 / 7.45 / 7.49 (4d, 4H, ³J = 8.9 Hz), 7.29-7.49 (m, 2H), 7.63 (m, 1H), 7.67 (pseudo-dd, 1H, ³J = 8.1 Hz, ⁴J = 1.4 Hz), 7.76 / 7.81 (2s, 2H), 7.84 / 8.06 (2s, 1H, CONH), 8.53 / 8.64 (2d, 1H, ³J = 8.2 Hz), 9.58 / 9.60 (s / s, 1H, CONH).

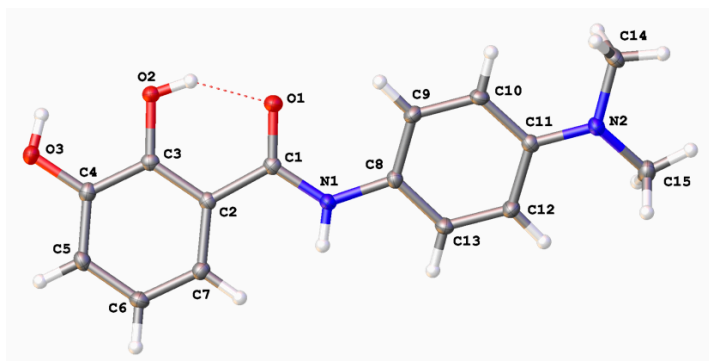
¹³C {¹H} NMR (125.75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 14.2, 22.5, 34.3, 40.0, 40.3, 41.2, 111.3, 111.5, 112.8, 113.0, 113.3, 116.9, 120.1, 120.2, 120.4, 120.5, 120.7, 121.5, 122.5, 123.2, 123.7, 123.8, 128.3, 128.8, 129.1, 130.9, 131.1, 131.7, 131.9, 132.6, 132.7, 135.1, 135.3, 136.9, 136.9, 143.6, 143.6, 146.5, 146.6, 147.6, 149.0, 149.3, 150.9, 151.0, 152.9, 153.1, 162.9, 163.1, 165.1, 165.6.

¹¹B {¹H} NMR (160.42 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 6.68 (s).

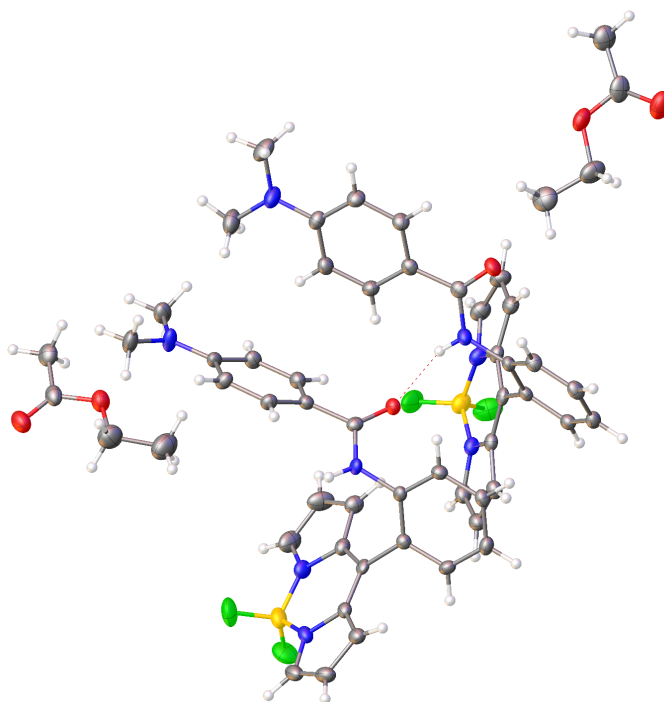
HR-MS (ESI): m/z calcd for C₃₉H₃₅BN₆O₄ + Na⁺: 685.27051 [M+Na]⁺. Found: 685.27018.

Comparison of ^1H NMR (500.03 MHz, DMSO- d_6) of each atropisomer after separation:

Fraction 2				Fraction 1			
δ (ppm)	Multiplicity	Nb protons	J (Hz)	δ (ppm)	Multiplicity	Nb protons	J (Hz)
9.80	s	1H		9.88	s	1H	
9.66	s	1H		9.58	s	1H	
7.80	s	2H		7.80	s	2H	
7.64-7.75	m	2H		7.54-7.66	m	5H	
7.42-7.59	m	6H		7.40-7.45	m	3H	
7.32	dd	1H	8.1 Hz	7.27	dd	1H	8.2 Hz
7.02	d	2H	4.2 Hz	7.02	d	2H	
6.98	dd	1H	7.5 Hz	6.93	dd	1H	7.5 Hz
6.86	t	1H	7.9 Hz	6.84	t	1H	
6.74	s	2H		6.81	d	2H	
6.54	dd	2H	4.3 Hz	6.65	d	2H	9.1 Hz
6.43	d	2H	9.1 Hz	6.54	dd	2H	4.3 Hz
2.86	s	6H		2.95	s	6H	
2.78	s	6H		2.87	s	6H	

Crystal Data for compound 28

Identification code	mo_pe10082015_0ma_a
Empirical formula	C ₁₅ H ₁₆ N ₂ O ₃
Formula weight	272.30
Temperature/K	100
Crystal system	monoclinic
Space group	P2 ₁ /c
a/Å	14.1864(16)
b/Å	6.5916(7)
c/Å	13.5878(16)
α/°	90
β/°	93.270(4)
γ/°	90
Volume/Å ³	1268.5(2)
Z	4
ρ _{calc} /cm ³	1.426
μ/mm ⁻¹	0.101
F(000)	576.0
Crystal size/mm ³	0.4 × 0.12 × 0.12
Radiation	MoKα (λ = 0.71073)
2θ range for data collection/°	6.51 to 55.34
Index ranges	-18 ≤ h ≤ 18, -8 ≤ k ≤ 8, -17 ≤ l ≤ 17
Reflections collected	47427
Independent reflections	2952 [R _{int} = 0.0379, R _{sigma} = 0.0172]
Data/restraints/parameters	2952/0/185
Goodness-of-fit on F ²	1.073
Final R indexes [I ≥ 2σ (I)]	R ₁ = 0.0393, wR ₂ = 0.0995
Final R indexes [all data]	R ₁ = 0.0488, wR ₂ = 0.1078
Largest diff. peak/hole / e Å ⁻³	0.40/-0.22

Crystal Data for compound 29

Identification code	pe18052014_0m_a
Empirical formula	C ₅₄ H ₅₄ B ₂ F ₄ N ₈ O ₅
Formula weight	992.67
Temperature/K	115
Crystal system	monoclinic
Space group	P2 ₁ /c
a/Å	13.3756(19)
b/Å	14.865(2)
c/Å	24.544(3)
α/°	90
β/°	91.671(3)
γ/°	90
Volume/Å ³	4877.8(12)
Z	4
ρ _{calc} /cm ³	1.352
μ/mm ⁻¹	0.098
F(000)	2080.0
Crystal size/mm ³	0.45 × 0.12 × 0.05
Radiation	MoKα (λ = 0.71073)
2θ range for data collection/°	5.33 to 55.024
Index ranges	-17 ≤ h ≤ 16, -19 ≤ k ≤ 19, -31 ≤ l ≤ 26
Reflections collected	55917
Independent reflections	11178 [R _{int} = 0.1119, R _{sigma} = 0.1139]
Data/restraints/parameters	11178/30/693
Goodness-of-fit on F ²	0.983
Final R indexes [I ≥ 2σ (I)]	R ₁ = 0.0533, wR ₂ = 0.1015
Final R indexes [all data]	R ₁ = 0.1503, wR ₂ = 0.1349
Largest diff. peak/hole / e Å ⁻³	0.28/-0.28

Photophysical studies

UV-Visible absorption spectra were recorded on a JASCO V630BIO spectrometer. Solutions of compound were prepared in DMSO to a final concentration of 10 μM . The steady-state fluorescence emission and excitation spectra were obtained by using a JASCO FP8560 spectrofluorometer instrument. All fluorescence spectra were corrected for instrument response. The fluorescence quantum yield (Φ_F) was calculated from equation:

$$\frac{\Phi_F}{\Phi_{FR}} = \frac{n^2}{n_R^2} \times \frac{\int_0^{\infty} I_F(\lambda_E, \lambda_F) d\lambda_F}{\int_0^{\infty} I_{FR}(\lambda_E, \lambda_F) d\lambda_F} \times \frac{1 - 10^{-A_R(\lambda_E)}}{1 - 10^{-A(\lambda_E)}}$$

Φ_F and Φ_{FR} are fluorescence quantum yields of the compound and the reference respectively. $A(\lambda_E)$ and $A_R(\lambda_E)$ are the absorbance at the excitation wavelength, and n is the refractive index of the medium. I_F and I_{FR} are fluorescent intensities of the compound and the reference respectively. The reference system used was rhodamine 6G ($\Phi_F = 0.94$ in EtOH, $\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm) for **BODI-Au-1** to **BODI-Au-4** and cyanine 5.29 ($\Phi_F = 0.30$ in EtOH, $\lambda_{\text{ex}} = 610$ nm) for NIR-BODIPY-acid **14**, **NIR-BODI-Au-1** and **NIR-BODI-Au-2**.

Biological experiments

Bombesin receptors binding assay

The affinity of **BODI-Au-1** for bombesin receptors was evaluated by Cerep (Poitiers, France) on a radioactive binding assay. Briefly, rat cerebral cortex membranes, expressing GRPR, NMBR and BRS-3 receptor subtypes, were incubated in the presence of 0.01 nM [¹²⁵I]-[Tyr⁴]bombesin ligand ($K_D = 0.71$ nM) and a range of concentrations of tested compounds for 60 min at rt. Non-specific binding was determined in presence of an excess (1 μ M) of “cold” bombesin₍₁₋₁₄₎. The results are expressed as a percent of control specific binding. The IC₅₀ values (concentration causing a half-maximal inhibition of control specific binding) were determined by non-linear regression analysis of the competition curves generated with duplicate values using GraphPad Prism version 6.00 for Mac. The corresponding inhibition constants (K_i) were calculated using the Cheng-Prusoff equation. Bombesin₍₁₋₁₄₎ was used as a reference compound ($K_i = 0.28$ nM). Further details of the methodology for the assay can be found at <http://www.cerep.fr>.

IC₅₀ determinations on cancer cells

Human MDA-MB-231 breast cancer cells and PC3 prostate cancer cells were obtained from the ATCC. These cells were maintained at 37°C in DMEM with 4.5 g/L glucose supplemented with 10% FBS and antibiotics (Dutscher, Brumath, France). DMSO at comparable concentrations did not show any effects on MDA and PC3 cell cytotoxicity. Human mammary epithelial cells (HMEC) were purchased from Invitrogen (Cergy Pontoise, France) and grown into HuMEC ready medium (Invitrogen). IC₅₀ on HMEC were corrected from the toxicity of DMSO.

Cells were grown at a density of 1×10^4 cells per well in 96-well cell culture plates (Dutscher) the day before treatment with different concentrations of BODIPY complexes, compound **7** and auranofin, during 48 h. Thereafter, 10 μ L of MTS (Promega, Charbonnières, France) was added in 200 μ L of medium and absorbance at 490 nm was measured after 3 h incubation at 37°C.

In vitro confocal fluorescence microscopy

MDA and PC3 cells (2×10^5 cells per well) were incubated at 37°C one hour with 50 μ M **BODI-Au-1, -2, -3** or **-4**. Thereafter, cells were rinsed twice with PBS before paraformaldehyde fixation and visualization by confocal microscopy (Nikon Eclipse TE 2000). The transmitted light images and confocal epifluorescence images are acquired simultaneously using the same illumination beam. Excitation was provided by a 405 nm laser diode. Fluorescence emission was collected in the 503-568 nm range (BODIPY fluorescence) or 408-488 nm range (DAPI fluorescence) using the Nikon spectral imaging system. Image analysis was performed with Image J software.

Uptake of gold in cells by ICP-MS

MDA and PC3 cells (5×10^5 cells per well) were incubated at 37°C one hour with 50 μ M **BODI-Au-1, -2, -3, -4** or auranofin. Thereafter, cells were rinsed twice with PBS and lysed in water before protein concentration determination (Bio-Rad DC protein assay kit, BioRad, Marnes la Coquette, France). All samples were digested in ICP-MS grade concentrated hydrochloric acid (OPTIMA Grade, Fisher Chemical) for 3 h at rt and filled to a total volume of 10 mL with ultrapure water. Indium was added as an internal standard at a concentration of 1 ppb. Determinations of total metal contents were achieved using a Thermo Element 2 ICP-MS. The instrument was tuned daily using a solution provided by the manufacturer containing 1 ppb each of Ba, B, Co, Fe, Ga, In, K, Li, Lu, Na, Rh, Sc, Tl, U, Y (Tune-Up Solution ELEMENT, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). External standard was prepared gravimetrically in an identical matrix to the samples (with regard to internal standard and hydrochloric acid) with gold solution single element standard at 1000 ppm (ASSURANCE, SPEX CertiPrep).

Fluorescence experiment to track the BODIPY-complexes in living cells

The detection of the BODIPY compounds in living cells was performed by fluorescence measurements. MDA and PC3 cells (1×10^5 cells per well) were incubated, at 4°C or 37°C for one hour with either 25 μ M **BODI-Au-2** or 50 μ M **BODI-Au-1, -3** or **-4** in 96-well black plates (VWR, Strasbourg, France). Thereafter, cells were rinsed twice with medium and left in a final volume of 100 μ L. Fluorescence levels were measured on a Victor3 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) at 485 nm excitation wavelength and 535 nm emission wavelength. The normalized corrected intensity (N.C. Intensity) was obtained by subtraction for each

compound of basal fluorescence in the medium and division by a response factor given by ICP-MS measurements. This factor corresponds to the ratio of the intensity of fluorescence of the studied compound on the cell line considered at 37°C on the value of the uptake of this compound measured by ICP-MS.

$$N.C. \text{ intensity}_{(BODI-Au-x)} = \frac{Corr. \text{ intensity}_{(BODI-Au-x)}}{Corr. \text{ intensity}_{(BODI-Au-x \text{ in } PC3 \text{ at } 37^\circ C)} / Uptake_{(BODI-Au-x \text{ in } PC3 \text{ at } 37^\circ C)}}$$

BIBLIOGRAPHIE

- 1 B. W. Stewart and P. Kleihues, *Le cancer dans le monde*, 2006.
- 2 B. Rosenberg, L. VanCamp, J. E. Trosko and V. H. Mansour, *Nature*, 1969, **222**, 385-386.
- 3 D. Wang and S. J. Lippard, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2005, **4**, 307-320.
- 4 A. V. Klein and T. W. Hambley, *Chem. Rev.*, 2009, **109**, 4911-4920.
- 5 J. Reedijk, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2499-2510.
- 6 T. C. Johnstone, K. Suntharalingam and S. J. Lippard, *Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci.*, 2015, **373**, 20140185.
- 7 M. J. Clarke, F. Zhu and D. R. Frasca, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2511-2533.
- 8 M. J. Clarke, *Coord. Chem. Rev.*, 2003, **236**, 209-233.
- 9 P. Schluga, C. G. Hartinger, A. Egger, E. Reisner, M. Galanski, M. A. Jakupec and B. K. Keppler, *Dalton Trans.*, 2006, 1796-1802.
- 10 J. M. Rademaker-Lakhai, D. van den Bongard, D. Pluim, J. H. Beijnen and J. H. M. Schellens, *Clin. Cancer Res.*, 2004, **10**, 3717-3727.
- 11 S. Kapitza, M. Pongratz, M. A. Jakupec, P. Heffeter, W. Berger, L. Lackinger, B. K. Keppler and B. Marian, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2005, **131**, 101-110.
- 12 A. Bergamo, C. Gaiddon, J. H. M. Schellens, J. H. Beijnen and G. Sava, *J. Inorg. Biochem.*, 2012, **106**, 90-99.
- 13 A. Casini, C. Gabbiani, F. Sorrentino, M. P. Rigobello, A. Bindoli, T. J. Geldbach, A. Marrone, N. Re, C. G. Hartinger, P. J. Dyson and L. Messori, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 6773-6781.
- 14 R. E. Aird, J. Cummings, A. A. Ritchie, M. Muir, R. E. Morris, H. Chen, P. J. Sadler and D. I. Jodrell, *Br. J. Cancer*, 2002, **86**, 1652-1657.
- 15 C. Scolaro, A. Bergamo, L. Brescacin, R. Delfino, M. Cocchietto, G. Laurencyzy, T. J. Geldbach, G. Sava and P. J. Dyson, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 4161-4171.
- 16 C. F. Shaw III, in *Uses of inorganic chemistry in medicine*, ed. N. P. Farrel, 1999, 26-28.
- 17 A. Bindoli, M. P. Rigobello, G. Scutari, C. Gabbiani, A. Casini and L. Messori, *Coord. Chem. Rev.*, 2009, **253**, 1692-1707.
- 18 B. Bertrand and A. Casini, *Dalton Trans.*, 2014, **43**, 4209-4219.
- 19 L. Messori, F. Abbate, G. Marcon, P. Orioli, M. Fontani, E. Mini, T. Mazzei, S. Carotti, T. O'Connell and P. Zanello, *J. Med. Chem.*, 2000, **43**, 3541-3548.
- 20 A. Garza-Ortiz, H. den Dulk, J. Brouwer, H. Kooijman, A. L. Spek and J. Reedijk, *J. Inorg. Biochem.*, 2007, **101**, 1922-1930.
- 21 A. Casini, M. A. Cinellu, G. Minghetti, C. Gabbiani, M. Coronello, E. Mini and L. Messori, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 5524-5531.
- 22 T. M. Simon, D. H. Kunishima, G. J. Vibert and A. Lorber, *Cancer*, 1979, **44**, 1965-1975.
- 23 C. K. Mirabelli, R. K. Johnson, C. M. Sung, L. Faucette, K. Muirhead and S. T. Crooke, *Cancer Res.*, 1985, **45**, 32-39.
- 24 C. K. Mirabelli, B. D. Jensen, M. R. Mattern, C. M. Sung, S. M. Mong, D. T. Hill, S. W. Dean, P. S. Schein, R. K. Johnson and S. T. Crooke, *Anticancer Drug Des.*, 1986, **1**, 223-234.
- 25 I. Ott, *Coord. Chem. Rev.*, 2009, **253**, 1670-1681.
- 26 S. J. Berners-Price and A. Filipovska, *Metallomics*, 2011, **3**, 863-873.
- 27 M. M. Harding and G. Mokdsi, *Curr. Med. Chem.*, 2000, **7**, 1289-1303.

- 28 N. P. E. Barry and P. J. Sadler, *Chem. Comm.*, 2013, **49**, 5106-5131.
- 29 J. A. Lessa, G. L. Parrilha and H. Beraldo, *Inorg. Chim. Acta*, 2012, **393**, 53-63.
- 30 <http://www.intezyne.com/content/pipeline/it-235.php>.
- 31 C. S. Cutler, H. M. Hennkens, N. Sisay, S. Huclier-Markai and S. S. Jurisson, *Chem. Rev.*, 2013, **113**, 858-883.
- 32 R. Weissleder and M. J. Pittet, *Nature*, 2008, **452**, 580-589.
- 33 J. Culver, W. Akers and S. Achilefu, *J. Nucl. Med.*, 2008, **49**, 169-172.
- 34 B. J. Pichler, A. Kolb, T. Nägele and H.-P. Schlemmer, *J. Nucl. Med.*, 2010, **51**, 333-336.
- 35 M. L. James and S. S. Gambhir, *Physiol. Rev.*, 2012, **92**, 897-965.
- 36 E. W. Price and C. Orvig, *Chem. Soc. Rev.*, 2014, **43**, 260-290.
- 37 J. Chan, S. C. Dodani and C. J. Chang, *Nature Chem.*, 2012, **4**, 973-984.
- 38 B. Valeur, *Invitation à la fluorescence moléculaire*, 2008.
- 39 A. Jablonski, *Nature*, 1933, **131**, 839-840.
- 40 D. Frackowiak, *J. Photoch. Photobio. B*, 1988, **2**, 399-401.
- 41 P. Sarder, D. Maji and S. Achilefu, *Bioconjugate Chem.*, 2015, **26**, 963-974.
- 42 S. Nickell, M. Hermann, M. Essenpreis, T. J. Farrell, U. Krämer and M. S. Patterson, *Phys. Med. Biol.*, 2000, **45**, 2873-2886.
- 43 V. Ntziachristos, J. Ripoll and R. Weissleder, *Opt. Lett.*, 2002, **27**, 333-335.
- 44 H. Kobayashi, M. Ogawa, R. Alford, P. L. Choyke and Y. Urano, *Chem. Rev.*, 2010, **110**, 2620-2640.
- 45 W. R. Zipfel, R. M. Williams, R. Christie, A. Y. Nikitin, B. T. Hyman and W. W. Webb, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2003, **100**, 7075-7080.
- 46 J. Frangioni, *Current Opinion in Chemical Biology*, 2003, **7**, 626-634.
- 47 V. J. Pansare, S. Hejazi, W. J. Faenza and R. K. Prud'homme, *Chem. Mater.*, 2012, **24**, 812-827.
- 48 R. Weissleder and V. Ntziachristos, *Nature Medicine*, 2003, **9**, 123-128.
- 49 C. Bremer, V. Ntziachristos and R. Weissleder, *Eur Radiol*, 2003, **13**, 231-243.
- 50 S. A. Hilderbrand and R. Weissleder, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2010, **14**, 71-79.
- 51 X. Wu and W. Zhu, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44**, 4179-4184.
- 52 X. Gao, Y. Cui, R. M. Levenson, L. W. K. Chung and S. Nie, *Nat. Biotechnol.*, 2004, **22**, 969-976.
- 53 X. He, J. Gao, S. S. Gambhir and Z. Cheng, *Trends Mol. Med.*, 2010, **16**, 574-583.
- 54 H. S. Choi, B. I. Ipe, P. Misra, J. H. Lee, M. G. Bawendi and J. V. Frangioni, *Nano Lett.*, 2009, **9**, 2354-2359.
- 55 M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward and D. C. Prasher, *Science*, 1994, **263**, 802-805.
- 56 N. C. Shaner, G. H. Patterson and M. W. Davidson, *J. Cell Sci.*, 2007, **120**, 4247-4260.
- 57 L. D. Lavis and R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.*, 2008, **3**, 142-155.
- 58 L. M. Wysocki and L. D. Lavis, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2011, **15**, 752-759.
- 59 S. Luo, E. Zhang, Y. Su, T. Cheng and C. Shi, *Biomaterials*, 2011, **32**, 7127-7138.
- 60 J. T. Hewitt and B. W. Perkins, *J. Chem. Soc.*, 1900, 1324-1334.
- 61 M. Beija, C. A. M. Afonso and J. M. G. Martinho, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**, 2410-2424.
- 62 Q. A. Best, R. Xu, M. E. McCarroll, L. Wang and D. J. Dyer, *Org. Lett.*, 2010, **12**, 3219-3221.
- 63 Sung-Kyun Ko, Young-Keun Yang, A. Jinsung Tae and I. Shin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 14150-14155.
- 64 A. Chevalier, C. Mercier, L. Saurel, S. Orenge, P.-Y. Renard and A. Romieu, *Chem. Comm.*, 2013, **49**, 8815-8817.
- 65 L. V. Johnson, M. L. Walsh and L. B. Chen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1980, **77**, 990-994.

- 66 A. Chevalier, P.-Y. Renard and A. Romieu, *Chem. Eur. J.*, 2014, **20**, 8330-8337.
- 67 K. Kolmakov, C. A. Wurm, D. N. H. Meineke, F. Göttfert, V. P. Boyarskiy, V. N. Belov and S. W. Hell, *Chem. Eur. J.*, 2014, **20**, 146-157.
- 68 Y.-Q. Sun, J. Liu, X. Lv, Y. Liu, Y. Zhao and W. Guo, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2012, **51**, 7634-7636.
- 69 Y. Koide, Y. Urano, K. Hanaoka, T. Terai and T. Nagano, *ACS Chem. Biol.*, 2011, **6**, 600-608.
- 70 Y. Kushida, T. Nagano and K. Hanaoka, *Analyst*, 2015, **140**, 685-695.
- 71 J. T. Alander, I. Kaartinen, A. Laakso, T. Pättilä, T. Spillmann, V. V. Tuchin, M. Venermo and P. Välisuo, *Int. J. Biomed. Imaging*, 2012, **2012**, 1-26.
- 72 R. B. Mujumdar, L. A. Ernst, S. R. Mujumdar, C. J. Lewis and A. S. Waggoner, *Bioconjugate Chem.*, 1993, **4**, 105-111.
- 73 S. R. Mujumdar, R. B. Mujumdar, C. M. Grant and A. S. Waggoner, *Bioconjugate Chem.*, 1996, **7**, 356-362.
- 74 M. Levitus and S. Ranjit, *Q. Rev. Biophys.*, 2011, **44**, 123-151.
- 75 E. M. S. Stennett, M. A. Ciuba and M. Levitus, *Chem. Soc. Rev.*, 2014, **43**, 1057-1075.
- 76 H. S. Choi, K. Nasr, S. Alyabyev, D. Feith, J. H. Lee, S. H. Kim, Y. Ashitate, H. Hyun, G. Patonay, L. Strekowski, M. Henary and J. V. Frangioni, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2011, **50**, 6258-6263.
- 77 B. Ballou, L. A. Ernst and A. S. Waggoner, *Curr. Med. Chem.*, 2005, **12**, 71-88.
- 78 A. Treibs and F.-H. Kreuzer, *Liebigs Ann. Chem.*, 1968, **718**, 208-223.
- 79 H. Lu, J. Mack, Y. Yang and Z. Shen, *Chem. Soc. Rev.*, 2014, **43**, 4778-46.
- 80 Y. Ni and J. Wu, *Org. Biomol. Chem.*, 2014, **12**, 3774-3791.
- 81 A. Romieu, C. Massif, S. Rihn, G. Ulrich, R. Ziessel and P.-Y. Renard, *New J. Chem.*, 2013, **37**, 1016-1027.
- 82 G. Fan, L. Yang and Z. Chen, *Front. Chem. Sci. Eng.*, 2014, **8**, 405-417.
- 83 X. Hong, Z. Wang, J. Yang, Q. Zheng, S. Zong, Y. Sheng, D. Zhu, C. Tang and Y. Cui, *Analyst*, 2012, **137**, 4140-4149.
- 84 N. Boens, V. Leen and W. Dehaen, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 1130-1172.
- 85 G. Ulrich, R. Ziessel and A. Harriman, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2008, **47**, 1184-1201.
- 86 S. S. Kelkar and T. M. Reineke, *Bioconjugate Chem.*, 2011, **22**, 1879-1903.
- 87 R. Kumar, W. S. Shin, K. Sunwoo, W. Y. Kim, S. Koo, S. Bhuniya and J. S. Kim, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44**, 6670-6683.
- 88 P. Marqués-Gallego, H. den Dulk, J. Brouwer, S. Tanase, I. Mutikainen, U. Turpeinen and J. Reedijk, *Biochem. Pharmacol.*, 2009, **78**, 365-373.
- 89 A. A. Nazarov, J. Risse, W. H. Ang, F. Schmitt, O. Zava, A. Ruggi, M. Groessl, R. Scopelitti, L. Juillerat-Jeanneret, C. G. Hartinger and P. J. Dyson, *Inorg. Chem.*, 2012, **51**, 3633-3639.
- 90 A. Citta, E. Schuh, F. Mohr, A. Folda, M. L. Massimino, A. Bindoli, A. Casini and M. P. Rigobello, *Metallomics*, 2013, **5**, 1006-1015.
- 91 G. V. Kalayda, G. Zhang, T. Abraham, H. J. Tanke and J. Reedijk, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 5191-5202.
- 92 B. Bertrand, A. de Almeida, E. P. M. van der Burgt, M. Picquet, A. Citta, A. Folda, M. P. Rigobello, P. Le Gendre, E. Bodio and A. Casini, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2014, 4532-4536.
- 93 M. A. Phaniband, S. D. Dhumwad and S. R. Pattan, *Med. Chem. Res.*, 2011, **20**, 493-502.
- 94 H. Brunner and N. Gruber, *Inorg. Chim. Acta*, 2004, **357**, 4423-4451.
- 95 C. Lottner, K.-C. Bart, G. Bernhardt and H. Brunner, *J. Med. Chem.*, 2002, **45**, 2079-2089.

- 96 Y.-S. Kim, R. Song, D. Hyun Kim, M. J. Jun and Y. S. Sohn, *Bioorg. Med. Chem.*, 2003, **11**, 1753-1760.
- 97 F. Schmitt, P. Govindaswamy, G. Süß-Fink, W. H. Ang, P. J. Dyson, L. Juillerat-Jeanneret and B. Therrien, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 1811-1816.
- 98 P. D. Harvey, S. Tasan, C. P. Gros, C. H. Devillers, P. Richard, P. L. Gendre and E. Bodio, *Organometallics*, 2015, **34**, 1218-1227.
- 99 S. Tasan, C. Licon, P.-E. Doulain, C. Michelin, C. P. Gros, P. Le Gendre, P. D. Harvey, C. Paul, C. Gaiddon and E. Bodio, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2014, **20**, 143-154.
- 100 T. Sun, X. Guan, M. Zheng, X. Jing and Z. Xie, *ACS Med. Chem. Lett.*, 2015, **6**, 430-433.
- 101 Q.-X. Zhou, W.-H. Lei, Y.-J. Hou, Y.-J. Chen, C. Li, B.-W. Zhang and X.-S. Wang, *Dalton Trans.*, 2013, **42**, 2786-2791.
- 102 T. Wang, Y. Hou, Y. Chen, K. Li, X. Cheng, Q. Zhou and X. Wang, *Dalton Trans.*, 2015, **44**, 12726-12734.
- 103 S. Tasan, O. Zava, B. Bertrand, C. Bernhard, C. Goze, M. Picquet, P. Le Gendre, P. Harvey, F. Denat, A. Casini and E. Bodio, *Dalton Trans.*, 2013, **42**, 6102-6109.
- 104 G. V. Kalayda, B. A. J. Jansen, C. Molenaar, P. Wielaard, H. J. Tanke and J. Reedijk, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2004, **9**, 414-422.
- 105 R. G. Balasingham, C. F. Williams, H. J. Mottram, M. P. Coogan and S. J. A. Pope, *Organometallics*, 2012, **31**, 5835-5843.
- 106 C. P. Bagowski, Y. You, H. Scheffler, D. H. Vlecken, D. J. Schmitz and I. Ott, *Dalton Trans.*, 2009, 10799-10805.
- 107 A. Meyer, L. Oehninger, Y. Geldmacher, H. Alborzinia, S. Wölfl, W. S. Sheldrick and I. Ott, *ChemMedChem*, 2014, **9**, 1794-1800.
- 108 E. E. Langdon-Jones, D. Lloyd, A. J. Hayes, S. D. Wainwright, H. J. Mottram, S. J. Coles, P. N. Horton and S. J. A. Pope, *Inorg. Chem.*, 2015, **54**, 6606-6615.
- 109 R. Wai-Yin Sun, A. Lok-Fung Chow, X.-H. Li, J. J. Yan, S. Sin-Yin Chui and C.-M. Che, *Chem. Sci.*, 2011, **2**, 728-736.
- 110 K. Li, T. Zou, Y. Chen, X. Guan and C.-M. Che, *Chem. Eur. J.*, 2015, **21**, 7441-7453.
- 111 J. L.-L. Tsai, A. O.-Y. Chan and C.-M. Che, *Chem. Comm.*, 2015, **51**, 8547-8550.
- 112 M. Frik, J. Jiménez, V. Vasilevski, M. Carreira, A. de Almeida, E. Gascón, F. Benoit, M. Sanaú, A. Casini and M. Contel, *Inorg. Chem. Front.*, 2014, **1**, 231-241.
- 113 M. Ali, L. Dondaine, A. Adolle, C. Sampaio, F. Chotard, P. Richard, F. Denat, A. Bettaieb, P. Le Gendre, V. Laurens, C. Goze, C. Paul and E. Bodio, *J. Med. Chem.*, 2015, **58**, 4521-4528.
- 114 C. Bernhard, C. Goze, Y. Rousselin and F. Denat, *Chem. Comm.*, 2010, **46**, 8267-8269.
- 115 M. Galletta, F. Puntoriero, S. Campagna, C. Chiorboli, M. Quesada, S. Goeb and R. Ziessel, *J. Phys. Chem. A*, 2006, **110**, 4348-4358.
- 116 L. H. Davies, R. W. Harrington, W. Clegg and L. J. Higham, *Dalton Trans.*, 2014, **43**, 13485-13499.
- 117 A. Loudet and K. Burgess, *Chem. Rev.*, 2007, **107**, 4891-4932.
- 118 T. E. Wood and A. Thompson, *Chem. Rev.*, 2007, **107**, 1831-1861.
- 119 R. W. Wagner and J. S. Lindsey, *Pure Appl. Chem.*, 1996, **68**, 1373-1380.
- 120 A. Burghart, H. Kim, M. B. Welch, L. H. Thoresen, J. Reibenspies, K. Burgess, F. Bergström and L. B.-Å. Johansson, *J. Org. Chem.*, 1999, **64**, 7813-7819.
- 121 J. Chen, A. Burghart, A. Derecskei-Kovacs and K. Burgess, *J. Org. Chem.*, 2000, **65**, 2900-2906.
- 122 Z. Li, E. Mintzer and R. Bittman, *J. Org. Chem.*, 2006, **71**, 1718-1721.
- 123 D. Wang, J. Fan, X. Gao, B. Wang, S. Sun and X. Peng, *J. Org. Chem.*, 2009, **74**, 7675-7683.
- 124 L. Wu and K. Burgess, *Chem. Commun.*, 2008, 4933-4935.

- 125 C. Tahtaoui, C. Thomas, F. Rohmer, P. Klotz, G. Duportail, Y. Mély, D. Bonnet and M. Hibert, *J. Org. Chem.*, 2007, **72**, 269-272.
- 126 M. Tomasulo, E. Deniz, R. J. Alvarado and F. M. Raymo, *J. Phys. Chem. C*, 2008, **112**, 8038-8045.
- 127 B. P. Joshi and T. D. Wang, *Cancers*, 2010, **2**, 1251-1287.
- 128 X. H. Shan, H. Hu, F. Xiong, N. Gu, X. D. Geng, W. Zhu, J. Lin and Y. F. Wang, *Eur. J. Radiol.*, 2012, **81**, 95-99.
- 129 P. Effert, A. J. Beniers, Y. Tamimi, S. Handt and G. Jakse, *Anticancer Res.*, 2004, **24**, 3057-3063.
- 130 A. Sturzu, S. Sheikh, H. Echner, T. Nägele, M. Deeg, B. Amin, C. Schwentner, M. Horger, U. Ernemann and S. Heckl, *Invest. New Drugs*, 2014, **32**, 37-46.
- 131 C. Chao, K. Ives, H. L. Hellmich, C. M. Townsend Jr and M. R. Hellmich, *J. Surg. Res.*, 2009, **156**, 26-31.
- 132 O. Patel, A. Shulkes and G. S. Baldwin, *BBA Rev. Cancer*, 2006, **1766**, 23-41.
- 133 T. J. Hoffman and C. J. Smith, *Nucl. Med. Biol.*, 2009, **36**, 579-585.
- 134 N. Parker, M. J. Turk, E. Westrick, J. D. Lewis, P. S. Low and C. P. Leamon, *Anal. Biochem.*, 2005, **338**, 284-293.
- 135 I. R. Vlahov and C. P. Leamon, *Bioconjugate Chem.*, 2012, **23**, 1357-1369.
- 136 C. P. Leamon, I. R. Vlahov, J. A. Reddy, M. Vetzal, H. K. R. Santhapuram, F. You, A. Bloomfield, R. Dorton, M. Nelson, P. Kleindl, J. F. Vaughn and E. Westrick, *Bioconjugate Chem.*, 2014, **25**, 560-568.
- 137 M.-R. Ke, S.-L. Yeung, D. K. P. Ng, W.-P. Fong and P.-C. Lo, *J. Med. Chem.*, 2013, **56**, 8475-8483.
- 138 A. Guaragna, A. Chiaviello, C. Paoletta, D. D'Alonzo, G. Palumbo and G. Palumbo, *Bioconjugate Chem.*, 2011, **23**, 84-96.
- 139 D. Satpati, A. Mukherjee, M. Venkatesh and S. Banerjee, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 2011, **290**, 89-93.
- 140 C. J. Mathias, S. Wang, D. J. Waters, J. J. Turek, P. S. Low and M. A. Green, *J. Nucl. Med.*, 1997, **39**, 1579-1585.
- 141 C. J. Mathias, S. Wang, P. S. Low, D. J. Waters and M. A. Green, *Nucl. Med. Biol.*, 1999, **26**, 23-25.
- 142 A. F. Trindade, R. F. M. Frade, E. M. S. Maçôas, C. Graça, C. A. B. Rodrigues, J. M. G. Martinho and C. A. M. Afonso, *Org. Biomol. Chem.*, 2014, **12**, 3181-3190.
- 143 M. Srinivasarao, C. V. Galliford and P. S. Low, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2015, **14**, 203-219.
- 144 C. Leamon, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2004, **56**, 1127-1141.
- 145 P. S. Low and S. A. Kularatne, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2009, **13**, 256-262.
- 146 E. M. Sletten and C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, **48**, 6974-6998.
- 147 J. C. Jewett and C. R. Bertozzi, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 1272-1279.
- 148 C. S. McKay and M. G. Finn, *Chem. Biol.*, 2014, **21**, 1075-1101.
- 149 A. D. Baldwin and K. L. Kiick, *Bioconjugate Chem.*, 2011, **22**, 1946-1953.
- 150 S. D. Fontaine, R. Reid, L. Robinson, G. W. Ashley and D. V. Santi, *Bioconjugate Chem.*, 2015, **26**, 145-152.
- 151 H. C. Kolb, M. G. Finn and K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2001, **40**, 2004-2021.
- 152 W. Tang and M. L. Becker, *Chem. Soc. Rev.*, 2014, **43**, 7013-7039.
- 153 C. W. Tornøe, C. Christensen and M. Meldal, *J. Org. Chem.*, 2002, **67**, 3057-3064.
- 154 A. J. Link and D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 11164-11165.
- 155 X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert and G. J. Boons, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2008, **47**, 2253-2255.

- 156 N. J. Agard, J. M. Baskin, J. A. Prescher, A. Lo and C. R. Bertozzi, *ACS Chem. Biol.*, 2006, **1**, 644-648.
- 157 E. Saxon and C. R. Bertozzi, *Science*, 2000, **287**, 2007-2010.
- 158 F. L. Lin, H. M. Hoyt, H. van Halbeek, R. G. Bergman and C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 2686-2695.
- 159 N. K. Devaraj and R. Weissleder, *Acc. Chem. Res.*, 2011, **44**, 816-827.
- 160 M. L. Blackman, M. Royzen and J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 13518-13519.
- 161 S. S. Gunatilleke and A. M. Barrios, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 3933-3937.
- 162 B. Bertrand, A. de Almeida, E. P. M. van der Burgt, M. Picquet, A. Citta, A. Folda, M. P. Rigobello, P. Le Gendre, E. Bodio and A. Casini, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2014, **2014**, 4532-4536.
- 163 T. Shoeib, D. W. Atkinson and B. L. Sharp, *Inorg. Chim. Acta*, 2010, **363**, 184-192.
- 164 M. Wenzel, E. Bigaeva, P. Richard, P. Le Gendre, M. Picquet, A. Casini and E. Bodio, *J. Inorg. Biochem.*, 2014, **141**, 10-16.
- 165 V. Sancho, A. Di Florio, T. W. Moody and R. T. Jensen, *Curr. Drug Deliv.*, 2011, **8**, 79-134.
- 166 E. A. Allen and W. Wilkinson, *Spectrochim. Acta A*, 1972, **28**, 2257-2262.
- 167 C. P. Leamon, I. Pastan and P. S. Low, *J. Biol. Chem.*, 1993, **268**, 24847-24854.
- 168 J. Luo, M. D. Smith, D. A. Lantrip, S. Wang and P. L. Fuchs, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 10004-10013.
- 169 A. Cui, X. Peng, J. Fan, X. Chen, Y. Wu and B. Guo, *J. Photochem. Photobiol. B*, 2007, **186**, 85-92.
- 170 R. Ziessel, G. Ulrich and A. Harriman, *New J. Chem.*, 2007, **31**, 496-501.
- 171 B. Brizet, V. Goncalves, C. Bernhard, P. D. Harvey, F. Denat and C. Goze, *Chem. Eur. J.*, 2014, **20**, 12933-12944.
- 172 Y. Volkova, B. Brizet, P. D. Harvey, F. Denat and C. Goze, *Eur. J. Org. Chem.*, 2014, **2014**, 2268-2274.
- 173 G. Lewis and C. F. Shaw, *Inorg. Chem.*, 1986, **25**, 58-62.
- 174 A. L. Hormann, C. F. Shaw, D. W. Bennett and W. M. Reiff, *Inorg. Chem.*, 1986, **25**, 3953-3957.
- 175 S. Guard, K. J. Watling and W. Howson, *Eur. J. Pharmacol.*, 1993, **240**, 177-184.
- 176 Y.-C. Cheng and W. H. Prusoff, *Biochem. Pharmacol.*, 1973, **22**, 3099-3108.
- 177 S. Lindner, C. Michler, S. Leidner, C. Rensch, C. Wängler, R. Schirrmacher, P. Bartenstein and B. Wängler, *Bioconjugate Chem.*, 2014, **25**, 738-749.
- 178 M. V. Berridge and A. S. Tan, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1993, **303**, 474-482.
- 179 Promega, *CellTiter 96(R) Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay Technical Bulletin TB245*, 2014.
- 180 P.-E. Doulain, R. Decréau, C. Racœur, V. Goncalves, L. Dubrez, A. Bettaieb, P. Le Gendre, F. Denat, C. Paul, C. Goze and E. Bodio, *Dalton Trans.*, 2015, **44**, 4874-4883.
- 181 T. Rohand, M. Baruah, W. Qin, N. Boens and W. Dehaen, *Chem. Commun.*, 2006, 266-268.
- 182 C. Zhao, X. Wang, J. Cao, P. Feng, J. Zhang, Y. Zhang, Y. Yang and Z. Yang, *Dyes Pigments*, 2013, **96**, 328-332.
- 183 K. Rurack, M. Kollmannsberger and J. Daub, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2001, **40**, 385-387.
- 184 A. Coskun, E. Deniz and E. U. Akkaya, *Tetrahedron Lett.*, 2007, **48**, 5359-5361.
- 185 O. Buyukcakir, O. A. Bozdemir, S. Kolemen, S. Erbas and E. U. Akkaya, *Org. Lett.*, 2009, **11**, 4644-4647.
- 186 T. Bura, P. Retailleau, G. Ulrich and R. Ziessel, *J. Org. Chem.*, 2011, **76**, 1109-1117.

- 187 M. Wada, S. Ito, H. Uno, T. Murashima, N. Ono, T. Urano and Y. Urano, *Tetrahedron Lett.*, 2001, **42**, 6711-6713.
- 188 K. Umezawa, A. Matsui, Y. Nakamura, D. Citterio and K. Suzuki, *Chem. Eur. J.*, 2009, **15**, 1096-1106.
- 189 M. D. Rahn and T. A. King, *Proc. SPIE 2288, Sol-Gel Optics III*, 1994, **2288**, 382-391.
- 190 M. J. Hall, S. O. McDonnell, J. Killoran and D. F. O'Shea, *J. Org. Chem.*, 2005, **70**, 5571-5578.
- 191 J. Killoran, L. Allen, J. F. Gallagher, W. M. Gallagher and D. F. O. Shea, *Chem. Comm.*, 2002, 1862-1863.
- 192 H. Lu, S. Shimizu, J. Mack, Z. Shen and N. Kobayashi, *Chem. Asian J.*, 2011, **6**, 1026-1037.
- 193 O. Galangau, C. Dumas-Verdes, R. Méallet-Renault and G. Clavier, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 4546-4553.
- 194 J. Bartelmess and W. W. Weare, *Dyes Pigments*, 2013, **97**, 1-8.
- 195 B. Brizet, N. Desbois, A. Bonnot, A. Langlois, A. Dubois, J.-M. Barbe, C. P. Gros, C. Goze, F. Denat and P. D. Harvey, *Inorg. Chem.*, 2014, **53**, 3392-3403.
- 196 O. Galangau, C. Dumas-Verdes, R. Méallet-Renault and G. Clavier, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 4546-4553.
- 197 S. A. Akhmanov and V. É. Gusev, *Sov. Phys. Usp.*, 1992, **35**, 153-191.
- 198 F. Bergström, I. Mikhalyov, P. Hägglöf, R. Wortmann, T. Ny and L. B. Å. Johansson, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **124**, 196-204.
- 199 D. Marushchak, S. Kalinin, I. Mikhalyov, N. Gretskaya and L. B.-Å. Johansson, *Spectrochim. Acta A*, 2006, **65**, 113-122.
- 200 D. Tleugabulova, Z. Zhang and J. D. Brennan, *J. Phys. Chem. B*, 2002, **106**, 13133-13138.
- 201 A. B. Zaitsev, R. Méallet-Renault, E. Y. Schmidt, A. I. Mikhaleva, S. Badré, C. Dumas, A. M. Vasil'tsov, N. V. Zorina and R. B. Pansu, *Tetrahedron*, 2005, **61**, 2683-2688.
- 202 T. T. Vu, S. Badré, C. Dumas-Verdes, J.-J. Vachon, C. Julien, P. Audebert, E. Y. Senotrusova, E. Y. Schmidt, B. A. Trofimov, R. B. Pansu, G. Clavier and R. Méallet-Renault, *J. Phys. Chem. C*, 2009, **113**, 11844-11855.
- 203 T. T. Vu, M. Dvorko, E. Y. Schmidt, J.-F. Audibert, P. Retailleau, B. A. Trofimov, R. B. Pansu, G. Clavier and R. Méallet-Renault, *J. Phys. Chem. C*, 2013, **117**, 5373-5385.
- 204 H. Lu, Q. Wang, L. Gai, Z. Li, Y. Deng, X. Xiao, G. Lai and Z. Shen, *Chem. Eur. J.*, 2012, **18**, 7852-7861.
- 205 D. Zhang, Y. Wen, Y. Xiao, G. Yu, Y. Liu and X. Qian, *Chem. Comm.*, 2008, 4777-4779.
- 206 J. P. Collman, R. R. Gagne, C. A. Reed, T. R. Halbert, G. Lang and W. T. Robinson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1975, **97**, 1427-1439.
- 207 P. Maillard, S. Vilain, C. Huel and M. Momenteau, *J. Org. Chem.*, 1994, **59**, 2887-2890.
- 208 C. Goze, G. Ulrich, L. J. Mallon, B. D. Allen, A. Harriman and R. Ziessel, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 10231-10239.
- 209 C. Goze, G. Ulrich and R. Ziessel, *Org. Lett.*, 2006, **8**, 4445-4448.
- 210 V. J. Richards, A. L. Gower, J. E. H. B. Smith, E. S. Davies, D. Lahaye, A. G. Slater, W. Lewis, A. J. Blake, N. R. Champness and D. L. Kays, *Chem. Comm.*, 2012, **48**, 1751-1753.
- 211 Y. Gabe, T. Ueno, Y. Urano, H. Kojima and T. Nagano, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, **386**, 621-626.
- 212 A. L. Nguyen, P. Bobadova-Parvanova, M. Hopfinger, F. R. Fronczek, K. M. Smith and M. G. H. Vicente, *Inorg. Chem.*, 2015, **54**, 3228-3236.
- 213 B. Brizet, A. Eggenpiller, C. P. Gros, J.-M. Barbe, C. Goze, F. Denat and P. D. Harvey, *J. Org. Chem.*, 2012, **77**, 3646-3650.

- 214 A. M. Courtis, S. A. Santos, Y. Guan, J. A. Hendricks, B. Ghosh, D. M. Szantai-Kis, S. A. Reis, J. V. Shah and R. Mazitschek, *Bioconjugate Chem.*, 2014, **25**, 1043-1051.
- 215 B. Brizet, C. Bernhard, Y. Volkova, Y. Rousselin, P. D. Harvey, C. Goze and F. Denat, *Org. Biomol. Chem.*, 2013, **11**, 7729-7737.
- 216 N. Umeda, H. Takahashi, M. Kamiya, T. Ueno, T. Komatsu, T. Terai, K. Hanaoka, T. Nagano and Y. Urano, *ACS Chem. Biol.*, 2014, **9**, 2242-2246.
- 217 E. Deniz, M. Battal, J. Cusido, S. Sortino and F. M. Raymo, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2012, **14**, 10300-10307.
- 218 J. P. Collman and R. A. Decréau, *Org. Lett.*, 2005, **7**, 975-978.
- 219 G. Bringmann, A. J. Price Mortimer, P. A. Keller, M. J. Gresser, J. Garner and M. Breuning, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2005, **44**, 5384-5427.
- 220 B. J. Littler, M. A. Miller, C.-H. Hung, R. W. Wagner, D. F. O'Shea, P. D. Boyle and J. S. Lindsey, *J. Org. Chem.*, 1999, **64**, 1391-1396.
- 221 J.-Y. Shin, B. O. Patrick and D. Dolphin, *Tetrahedron Lett.*, 2008, **49**, 5515-5518.
- 222 T. Matsumoto, Y. Urano, T. Shoda, H. Kojima and T. Nagano, *Org. Lett.*, 2007, **9**, 3375-3377.
- 223 H. Sunahara, Y. Urano, H. Kojima and T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 5597-5604.
- 224 S.-L. Niu, G. Ulrich, R. Ziessel, A. Kiss, P.-Y. Renard and A. Romieu, *Org. Lett.*, 2009, **11**, 2049-2052.
- 225 J. P. Collman, R. A. Decréau and S. Costanzo, *Org. Lett.*, 2004, **6**, 1033-1036.
- 226 M. Brellier, G. Duportail and R. Baati, *Tetrahedron Letters*, 2010, **51**, 1269-1272.
- 227 R. Uson, A. Laguna, M. Laguna, D. A. Briggs, H. H. Murray and J. P. Fackler Jr, *Inorg. Synth.*, 1989, **26**, 85-91.
- 228 N. Dupré, C. Brazel, L. Fensterbank, M. Malacria, S. Thorimbert, B. Hasenknopf and E. Lacôte, *Chem. Eur. J.*, 2012, **18**, 12962-12965.
- 229 M. Kondo, S. Furukawa, K. Hirai and S. Kitagawa, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2010, **49**, 5327-5330.
- 230 S. J. Vigmond, M. C. Chang, K. M. R. Kallury and M. Thompson, *Tetrahedron Lett.*, 1994, **35**, 2455-2458.

COMMUNICATION DES RÉSULTATS

Publications

(publiées) :

« Towards the elaboration of new gold-based optical theranostics » Doulain P.-E., Decréau R., Racœur C., Goncalves V., Dubrez L., Bettaieb A., Le Gendre P., Denat F., Paul C.,* Goze C.,* Bodio E.* *Dalton Trans.* **2015** 44, 4874-4883. doi: 10.1039/c4dt02977a.

« Gold-phosphine-porphyrin as potential metal-based theranostics » Tasan S., Licona C., Doulain P.-E., Michelin C., Gros C. P.,* Le Gendre P., Harvey P. D., Paul C., Gaiddon C., Bodio E.* *J. Biol. Inorg. Chem.* **2015** 20, 143-154. doi: 10.1007/s00775-014-1220-8.

(soumises) :

« BODIPY atropisomers, face discrimination, and structure appending to prevent aggregation » Doulain, P.-E.; Goze, C.; Bodio, E.; Richard, P.; Decréau, R.* soumise à *Chem. Com.*

« Development of metal based theranostics: new generation of therapeutic agents » Doulain P.-E., Bertrand B., Goze C.,* Bodio E.* soumise à *Dalton Trans.*

Communications orales

« Towards the elaboration of new gold-based optical theranostics for *in vivo* applications » XVI^{èmes} JED Carnot-Pasteur, 22 mai **2015**, Dijon.

« Towards the elaboration of new gold-based optical theranostics for *in vivo* applications » SECO 52, 28 mai **2015**, Morzine.

« Towards the elaboration of new gold-based optical theranostics for medical application » ONCOTRANS 2015, 25 juin **2015**, Dijon.

Communications par affiche

« New BODIPY-Metal theranostics : from *in vitro* to *in vivo* » XIV^{èmes} JED Carnot-Pasteur, 30-31 mai **2013**, Dijon.

« Towards the elaboration of new gold-based optical theranostics » EuroBIC 12, 24-28 août **2014**, Zurich.

« Towards the elaboration of BODIPY-gold (I) theranostics for medical applications » FLI, Agents d'imagerie pour les applications en oncologie, 15-16 avril **2015**, Dijon.

Ce travail décrit de nouveaux composés thérapeutiques anticancéreux traçables par imagerie optique appelés théranostiques optiques.

Après un premier chapitre bibliographique décrivant le contexte de l'imagerie et la thérapie des cancers, un deuxième chapitre présente une première série de théranostiques BODIPY-phosphine-or dont la synthèse a été optimisée (diminution du nombre d'étapes, baisse du temps de réaction, compatibilité avec une augmentation d'échelle). Leur conjugaison à des biomolécules (glucose, peptide) a été réalisée par une méthode simple et efficace par couplage entre l'atome d'or de la sonde et la fonction thiol de la biomolécule (modifiée ou non), conduisant à une liaison or-soufre. Elle permet une biovectorisation pour rendre les composés plus sélectifs des cellules tumorales vis à vis des cellules saines. Les études photophysiques et biologiques réalisées ont démontré tout le potentiel de ces théranostiques dans le cadre d'un suivi de composé *in vitro* et l'impact que pouvait avoir le vecteur choisi.

Le troisième chapitre présente deux autres séries de théranostiques et précurseurs visant deux objectifs distincts pour rendre la sonde plus compatible avec une imagerie optique *in vivo*. La modification structurale de la plateforme BODIPY par introduction de groupements augmentant la conjugaison permet d'obtenir des BODIPYs absorbant et émettant dans la « fenêtre thérapeutique » (650-900 nm, proche-infrarouge). Des études préliminaires *in vivo* ainsi que des tests en imagerie photoacoustique ont donné des résultats prometteurs. Une deuxième modification structurale par introduction de groupements encombrants sur chaque face du BODIPY vise à empêcher l'agrégation des BODIPYs en milieu biologique (phénomène connu pour affecter leurs propriétés optiques). Cette approche « Picket-Fence » des porphyrines transposée en série BODIPY a permis d'appliquer pour la première fois en série BODIPY le concept d'atropoisomérisation et d'atropoisomères interconvertibles.

Mots clés :

Imagerie optique	BODIPY	Atropoisomères
Théranostique	Phosphine-or	Picket-Fence
Études <i>in vitro</i>	Proche infra-rouge	Agrégation
	Photoacoustique	

This work describes new anticancer agents that could be detected by optical imaging, namely optical theranostics.

After a first chapter describing the context of cancer imaging and therapy, a second chapter describes a first series of BODIPY-phosphine-gold theranostics, the synthesis of which has been optimized (less steps, shortening the reaction time, scale up). Their conjugation with biomolecules (glucose, peptide) has been achieved by developing a simple and efficient method that leads to the coupling between the gold atom of the probe and the thiol of the biomolecule (modified or not), leading to a gold-sulfur bound. Hence, it makes the biovectorization of the probes possible in order to get selectivity against tumor cells compared with healthy cells. Subsequent photophysical and biological studies demonstrated the potential of such theranostics, such as *in vitro* monitoring, and the impact of a chosen biomolecule (vector).

A third chapter presents two additional series of theranostics and precursors with two distinct objectives aimed at making the probe more suitable for *in vivo* optical imaging. A first structural modification of the BODIPY platform was achieved upon introducing chemical groups allowing an extension of the π conjugation. It leads to BODIPYs that absorb and emit in the « therapeutic window » (650-900 nm, NIR). Preliminary *in vivo* studies and preliminary photoacoustic imaging studies with such compounds led to promising results. A second structural modification upon introducing bulky groups on each face of the probe was aimed at preventing stacking of BODIPYs platforms in biological media (a phenomenon known to affect their optical properties). Hence, a porphyrin « Picket-Fence » approach was successfully transposed to BODIPY together with the concept of atropisomerism and atropisomer interconversion.

Keywords:

Optical Imaging	BODIPY	Atropisomers
Theranostic	Phosphine-Gold	Picket-Fence
<i>In vitro</i> studies	Near-infrared	Aggregation
	Photoacoustic	