Synthèse et étude de nouvelles sondes fluorescentes pour l'imagerie optique, l'imagerie Cherenkov et les imageries multimodales

Yann Bernhard

▶ **To cite this version:**

Yann Bernhard. Synthèse et étude de nouvelles sondes fluorescentes pour l'imagerie optique, l'imagerie Cherenkov et les imageries multimodales. Chimie théorique et/ou physique. Université de Bourgogne, 2015. Français. NNT : 2015DIJOS015 . tel-02343185

HAL Id: tel-02343185
https://theses.hal.science/tel-02343185

Submitted on 2 Nov 2019

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-Physique

Par

Yann BERNHARD

Maître ès Sciences

Synthèse et étude de nouvelles sondes fluorescentes pour l'imagerie optique, l'imagerie Cherenkov et les imageries multimodales

---

Soutenue le 20 avril 2015 devant la commission d'examen

P-Y. RENARD	Professeur à l'Université de Rouen	Rapporteur
T. S. BALABAN	Professeur à l'Université d'Aix Marseille	Rapporteur
Y. BRETONNIERE	Chargé de Recherche à l'ENS de Lyon	Examinateur
R. GUILARD	Professeur Émérite à l'Université de Bourgogne	Examinateur
F. DENAT	Professeur à l'Université de Bourgogne	Examinateur
R. DECRÉAU	Maître de Conférences à l'Université de Bourgogne	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé au département chimie de l'Université de Bourgogne (UB), à l'Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne (ICMUB), dans l'équipe Porphyrines, Polyamines, Développement et Applications (P2DA), Unité Mixte de Recherche (UMR 6302) entre l'Université de Bourgogne et le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). Je tiens donc tout d'abord à remercier Messieurs Franck Denat, Pierre Legendre et Claude Gros, Professeurs à l'Université de Bourgogne, pour m'avoir accueilli au sein de l'ICMUB dans l'équipe P2DA.

Je tiens à remercier Monsieur Pierre-Yves Renard, Professeur à l'Université de Rouen, et Monsieur Silviu Balaban, Professeur à l'Université d'Aix Marseille, pour avoir accepté la charge de rapporteur de thèse.

Je remercie également Monsieur Yann Bretonnière, Chargé de Recherche à l'Ecole Nationale Supérieure (ENS) de Lyon, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie très sincèrement Monsieur Roger Guilard, Professeur Émérite à l'Université de Bourgogne, et Monsieur Franck Denat, Professeur à l'Université de Bourgogne, pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de participer à ce jury.

Je remercie très sincèrement Monsieur Richard Decréau, Maître de Conférences HDR à l'Université de Bourgogne, pour avoir dirigé ma thèse, pour m'avoir guidé dans mes recherches, pour son esprit toujours positif, son soutien et sa bonne humeur. Je le remercie également pour m'avoir permis d'acquérir des connaissances ou un aperçu de plusieurs aspects et domaines de la recherche scientifique et de la chimie. Je lui exprime finalement ma gratitude pour la pleine confiance qu'il a su m'accorder et pour les nombreuses discussions scientifiques toujours plus imaginatives et enrichissantes.

Les études sur l'imagerie Cherenkov ont été réalisées à la plateforme d'imagerie préclinique du département de médecine nucléaire du Centre régional de lutte contre le cancer Georges François Leclerc (CGFL). Je remercie donc Monsieur Bertrand Collin pour m'avoir accueilli au sein de cette plateforme mais également pour son aide précieuse et ses nombreux conseils. Je remercie également Sylviane Prévot pour m'avoir sensibilisé aux risques radiochimiques.

La préparation des nanohybrides a été réalisée en collaboration avec l'équipe Matériaux Nanostructurés : Phénomènes à l'Interface (MaNaPI) du Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne (ICB - UMR6303). Je tiens donc à remercier Madame Nadine Millot, Professeur à l'Université de Bourgogne et directrice de l'équipe MaNaPI, ainsi que Monsieur Julien Boudon, Maître de Conférences à l'Université de Bourgogne. Je remercie bien entendu le Docteur Jérémy Paris, dit « le bon », qui a préparé les nanoparticules et nanotubes fonctionnels et réalisé la plupart des mises aux points de nanohybrides et leurs analyses durant sa thèse à l'Université de Bourgogne.

Mes remerciements vont à Victor Goncalves, Maître de Conférences à l'Université de Bourgogne, pour m'avoir fourni les peptides fonctionnels, mais également pour son aide et ses nombreux conseils en chimie peptidique et en HPLC.

Je tiens également à exprimer ma profonde reconnaissance à Rémi Chassagon, Ingénieur de Recherche au Laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne, pour son aide concernant la microscopie électronique en transmission.

Je remercie très sincèrement Marie José Penouilh, Fanny Chaux et Myriam Heydel pour les analyses de spectrométrie de masse et d'ICP, ainsi que Philippe Richard pour les analyses DRX.

Je voudrais également remercier Monsieur Fréderic Boschetti, PDG de la société Chematech®, pour la mise à disposition des précurseurs macrocycliques ainsi que pour ses conseils avisés.

Je remercie vivement Christine Stern pour avoir résolu les nombreux problèmes informatiques qui comme par hasard « n'arrivent qu'à moi ».

J'exprime ma profonde gratitude au Docteur Maryline Beyler, qui a notamment préparé certains des composés présentés dans cette thèse, et à tous les stagiaires qui ont contribué à ce travail : Jonathan Bonnefoy, Nils Muurmans, Elodie Gigot, Faustine Bizet et Ivain Gérard.

J'adresse également mes remerciements à tous les membres de l'équipe P2DA que j'ai cotoyés au quotidien.

Je remercie plus particulièrement et chaleureusement mes collègues et amis ayant séjourné ou séjournant à l'institut : Clément (la Mich / Mimi), Damien (sans plus d'originalité : Lhenry), Rémi (La Plamz), Sophie (Spot), Léo (Buchette), Antoine (Da Spiela), Bertrand (Le Grand…), Mathieu (Morus), Guillaume (Papa Paulin), Eric (Coco), Nicolas (Maindrus), Guillaume (La Fougasse),

Antoine (Le Surfeur Australien), Pauline (Paulette), Semra, Mylène, Adrien, Benoit, Marie-Jo, Marc, Victor, Pizzouille, Fred, Pawel, Maryline, Jon, Nils, P-E et ceux que j'ai oubliés.
Je n'oublie pas de remercier Claire, sœur et collègue à la fois, pour ses innombrables conseils avisés, son aide précieuse et son encouragement.

Je remercie ma famille, mes parents, mes sœurs Aline et Claire, mes beaux-frères Seb et Greg, ma nièce Louise, mon neveu Léo, ma grand-mère Lise, et ma belle-famille pour leur soutien au quotidien. Un grand merci à ma mère pour la relecture de la thèse.

Je remercie finalement ma Sophie, pour son soutien, pour son aide, pour sa patience, pour son esprit positif, pour avoir su tant de fois me changer les idées et pour beaucoup d'autres chose encore. Merci.

TABLE DES MATIERES

Notations et abréviations **13**

Avant-propos **17**

Introduction générale : l'imagerie médicale, techniques, agents de contraste et multimodalité **21**

Partie I : Les différentes techniques d'imagerie médicale, aspects théoriques et technologiques **23**

I.1. Les techniques d'imagerie structurale : analyse anatomique 23

I.2. Les techniques d'imagerie fonctionnelle : vers l'imagerie moléculaire 29

I.3. Quelques modalités émergentes en imagerie médicale 39

Partie II : Transport et distribution spécifique d'une sonde imageante, constitution d'un agent d'imagerie médicale **44**

II.1. Les modes de ciblage d'une zone tumorale et agents associés 44

II.2. Association de la sonde imageante avec un vecteur biologique ou une nanoparticule : outils chimiques 50

Partie III : Les différents types de sondes imageantes et exemples d'agents d'imagerie médicale **53**

III.1. Les agents de contraste paramagnétiques pour l'IRM 53

III.2. Les radiopharmaceutiques pour les scintigraphies, le CLI et la radiothérapie 59

III.3. Les agents fluorescents pour l'imagerie optique 62

Partie IV : L'approche multimodale **74**

IV.1. Intérêts et principes d'association en imagerie multimodale 74

IV.2. Quelques associations possibles 74

IV.3. Mise au point d'un agent multimodal pour l'imagerie 76

IV.4. Exemples d'agents multimodaux 77

IV.5. Approche théranostique : intérêt et principe 80

Objectifs du travail de thèse **83**

CHAPITRE I : Synthèse et étude de subphtalocyanines et phtalocyanines fonctionnelles pour une application en imagerie optique **89**

Partie I : Introduction sur les dérivés poly-isoindoliques **89**

I.1. Les phtalocyanines 89

I.2. Les subphtalocyanines 101

I.3. Les benzo-azaBODIPY fusionnés 105

I.4. Comparaison des avantages et inconvénients des trois fluorophores 105

Partie II : Synthèse, fonctionnalisation et étude de subphtalocyanines pour une application en imagerie optique 109
II.1. Synthèse de subphtalocyanines fonctionnelles 110
II.2. Synthèse et étude de systèmes sensibles au pH 119
II.3. Introduction d'agents chélatants 126
II.4. Etude du comportement chimique et de la stabilité des subphtalocyanines synthétisées 137
II.5. Conclusion 145
Partie III : Synthèse, fonctionnalisation et étude de phtalocyanines pour une application en imagerie optique 148
III.1. Synthèse de phtalocyanines fonctionnelles 149
III.2. Synthèse de sondes composées d'une phtalocyanine et d'un dérivé DOTA 163
III.3. Vers l'amélioration de l'hydrosolubilité 167
III.4. Synthèse de phtalocyanines stériquement encombrées 171
III.5. Conclusion 185

CHAPITRE II : Bio- et nano- vectorisation de subphtalocyanines et phtalocyanines pour l'imagerie de fluorescence et les imageries bimodales - Application à l'imagerie cellulaire 191
Partie I : Bio- et nano-vectorisation de subphtalocyanines 191
I.1. Association de subphtalocyanines avec un peptide 191
I.2. Incorporation de subphtalocyanines dans un liposome 194
I.3. Vectorisation du liposome par un peptide 202
I.4. Conclusion 211
Partie II : Imagerie cellulaire de subphtalocyanines 213
II.1. Culture cellulaire et méthode d'incorporation 213
II.2. Toxicité et stabilité 213
II.3. Microscopies confocale et biphotonique 214
II.4. Conclusion 216
Partie III : Association de phtalocyanines avec des nano-objets d'intérêt médical : les nanoparticules d'oxyde de fer et les nanotubes d'oxyde de titane 218
III.1. Association de phtalocyanines avec des nanoparticules d'oxyde de fer pour une imagerie bimodale IRM/IO 219
III.2. Association de phtalocyanines avec des nanotubes d'oxyde de titane pour le théranostique 222
III.3. Conclusion 225

CHAPITRE III : Etude du transfert des radiations Cherenkov vers des fluorophores organiques 229

Partie I : Introduction sur le CRET 229

I.1. Principe et utilisations du CRET 229

I.2. Objectifs du chapitre 232

Partie II : Luminescence d'un radioélément seul 233

II.1. Méthode de mesure des courbes 233

II.2. Courbes de luminescence 233

Partie III : Transfert intermoléculaire entre radioéléments et fluorophores 236

III.1. Calcul du ratio de CRET 236

III.2. Etude des paramètres influant sur le phénomène de CRET 237

III.3. Etude avec d'autres fluorophores organiques 244

III.4. Mesures de CRET sur un imageur optique 247

Partie IV : Synthèse d'un système monomoléculaire et mesures du CRET 250

IV.1. Synthèse de la fluorescéine DOTAGA et caractérisations 250

IV.2. Propriétés spectroscopiques et photophysiques du système 254

IV.3. Métallation à chaud et mesure du CRET 255

Partie V : Etude du multi-transfert de type CRET-FRET 259

V.1. Systèmes fluorescéine/rhodamine 6G/rhodamine 101 259

V.2. Multi-transferts avec le crésyl violet 264

Partie VI : Conclusion 266

Conclusion générale 271

Experimental section 275

A. Instrumentation 275

B. Step-by-step demonstration for calculation of ZnPc coverage on SPIO Nanoparticles 279

C. Operating procedures 281

D. Cristallographic data 343

Références bibliographiques 353

Communication des résultats 365

NOTATIONS ET ABREVIATIONS

Techniques d'imagerie et de thérapie

ARM : **A**ngio-**IRM**

BLI : **B**io**L**uminescence **I**maging

BOLD-MRI : **B**lood **O**xygen **L**evel **D**ependent **MRI**

CEST : **C**hemical **E**xchange **S**aturation **T**ransfer

CFLSM : **C**on**F**ocal **L**aser **S**canning **M**icroscopy

CFM : **C**on**F**ocal **M**icroscopy

CLI : **C**herenkov **L**uminescence **I**maging

CLT : **C**herenkov **L**uminescence **T**omography

CT : **C**omputed **T**omography

DCE-MRI : **D**ynamic **C**ontrast **E**nhanced-**MRI**

DOT : **D**iffuse **O**ptic **T**omography

DW-MRI : **D**iffusion **W**eighted-**MRI**

fDOT : **f**unctionnal **D**iffuse **O**ptic **T**omography

FMT : **F**luorescence-mediated **M**olecular **T**omography

FRI : **F**luorescence **R**eflectance **I**maging

IO : **I**magerie **O**ptique

IRM : **I**magerie par **R**ésonnance **M**agnétique (**MRI** : **M**agnetic **R**esonance **I**maging)

IRMf : **IRM f**onctionnelle

MIV : **M**icroscopie **I**ntra**V**itale (**IVM** : **I**ntra**V**ital **M**icroscopy)

MRS : **M**agnetic **R**esonance **S**pectroscopy

PAI : **P**hoto**A**ccoustic **I**maging

PARACEST : **PARA**magnetic **C**hemical **E**xchange **S**aturation **T**ransfer

PDT : **P**hoto**D**ynamic **T**herapy

RIT : **R**adio-**I**mmuno**T**hérapie

RT-fDOT : **R**eal **T**ime-**f**unctionnal **D**iffuse **O**ptic **T**omography

RX : **R**ayons **X**

SCIFI : **S**econdary **C**herenkov **I**nduced **F**luorescence **I**maging

SERS : **S**urface **E**nhanced **R**aman **S**cattering

STED : **ST**imulated-**E**mission-**D**epletion microscopy

TEP : **T**omographie par **É**mission de **P**ositrons (**PET : P**ositron **E**mission **T**omography)

TEMP : **T**omographie par **É**mission **M**ono-**P**hotonique (**SPECT : S**ingle **P**hoton **E**mission **C**omputed **T**omography**)**

US : **U**ltra**S**ound

Techniques analytiques et de purification

AES : **A**tomic **E**mission **S**pectroscopy

CCM : Chromatographie sur **C**ouche **M**ince

DLS : **D**iffusion **L**ight **S**caterring

DRX : **D**iffraction des **R**ayons **X**

ESI : **E**lectro**S**pray **I**onisation

FPLC : **F**ast **P**rotein **L**iquid **C**hromatography

FTIR : **F**ourrier **T**ransformer **I**nfra**R**ed

HPLC : **H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography

HRMS : **H**igh **R**esolution **M**ass **S**pectrometry

ICP : **I**nductively **C**oupled **P**lasma

MALDI : **M**atrix **A**ssisted **L**aser **D**esorption **I**onisation

MS : **M**ass **S**pectrometry

NOESY : **N**uclear **O**verhauser **E**ffect **S**pectroscop**Y**

RITLC : **R**adioactive **I**nstant **T**hin **L**ayer **C**hromatography

RMN : **R**ésonance **M**agnétique **N**ucléaire (**NMR** : **N**uclear **M**agnetic **R**esonance)

TEM : **T**ransmission **E**lectron **M**icroscopy

TGA : **T**hermo**G**ravimetric **A**nalysis

TOF : **T**ime **O**f **F**light

UV : **U**ltra**V**iolet

XPS : **X**-ray **P**hotoelectron **S**pectrometry

Classes de molécules

AzaPc : **Aza**P**h**talo**c**yanine

BFA-BODIPY : **B**enzo-**F**used **AzaBODIPY**

BODIPY : **BO**ro**DIPY**rométhène

Cy : **Cy**anine

Nc : **N**aphtalo**c**yanine

Pc : **P**htalo**c**yanine

Pz : **P**orphyra**z**ine

Rh : **Rh**odamine

SubNc : **Sub**N**a**phtalo**c**yanine

SubPc : **Sub**P**h**talo**c**yanine

Réactifs, solvants et composés chimiques

APTES : **A**mino**P**ropyl**T**ri**É**thoxy**S**ilane

APTS : **A**cide **P**ara**T**oluène **S**ulfonique

BSA : **B**is-**S**téaryl**A**mide

Chol : **Chol**estérol

DAMN : **D**i**A**mino**M**aléo**N**itrile

DAPI : 4',6'-**D**i**A**mino-2-**P**hényl**I**ndole

dba : **d**i**b**enzylidèn**a**cétone

DBU : 1,8-**D**iaza**B**icyclo[5.4.0]**U**ndéc-7-ène

DCC : **D**i**C**yclohexyl**C**arbodiimide

DCM : **D**i**C**hloro**M**éthane

DFO : **D**es**F**erri**O**xamine

DHB : **D**i**H**ydroxy**B**enzoic acid

DIPEA : *N*,*N*-**D**i**I**so**P**ropyle **É**thyl**A**mine

DMAE : **D**i**M**éthyl**A**mino**É**thanol

DMF : **D**i**M**éthyl**F**ormamide

DMSO : **D**i**M**éthyl**S**ulf**O**xyde

DO3AtBu : tri-*tert*-butyl 2,2',2''-(1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetate

DOTA : 1,4,7,10-tetraazacyclo**DO**decane-1,4,7,10-**T**etraacetic **A**cid

DOTAGA-anhydride : 2,2',2''-(10-(2,6-dioxotetrahydro-2H-pyran-3-yl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid

DPBF : **D**i**P**hényliso**B**enzo**F**urane

DPPC : 1,2-**D**i**P**almitoyl**P**hosphatidyl **C**holine

DPPE : 1,2-**D**i**P**almitoyl**P**hosphatidyl **É**thanolamine

DSPE : 1,2-**D**i**S**téaroyl**P**hosphatidyl **É**thanolamine

DT4AtBu : 3,6,9-tris(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-13,13-dimethyl-11-oxo-12-oxa-3,6,9-triazatetradecan-1-oic acid

DTPA : **D**iethylene **T**riamine **P**entaacetic **A**cid

DSPE : 1,2-**D**i**S**téaroyl-sn-glycero-3-**P**hospho**É**thanolamine

FDG : **F**luoro**D**ésoxy**G**lucose (2-désoxy-2-fluoro-D-glucose)

FITC : **F**luorescein **I**so**T**hio**C**yanate

FLT : 3′-déoxy-3′ **FL**uoro**T**hymidine

HATU : 1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate

HBTU : *N*,*N*,*N*′,*N*′-Tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate

HIB : **H**exadecyl-4-**I**odo**B**enzoate

HMPAO : **H**exa**M**ethyl**P**ropylene**A**mine **O**xime

HOBt : 1-**H**ydr**O**xy**B**enzo**t**riazole

HOPO : **H**ydr**O**xy**P**yridin**O**ne

ICG : **I**ndo**C**yanine **G**reen

L-DOPA : L-3,4-**D**ihydr**O**xy**P**hényl**A**lanine

MSA : **M**ethane**S**ulfonic **A**cid

MTT : bromure de 3-(4,5-di**M**éthyl**T**hiazol-2-yl)-2,5-diphényle **T**étrazolium

NHS : *N*-**H**ydroxy**S**uccinimide

NOTA : 2,2',2''-(1,4,7-triazacyclo**NO**nane-1,4,7-triyl)**T**riacetic **A**cid

PBS : **P**hosphate **B**uffer **S**aline

PC : **P**hosphatidyl**C**holine

PEG : **P**oly**E**thylene **G**lycol

PHA : 6-**P**hosphono**H**exanoic **A**cid

TAMRA : **T**etr**AM**ethyl**R**hod**A**mine

TFA : **T**ri**F**luoroacetic **A**cid

THF : **T**étra**H**ydro**F**urane

TIPS : **T**ri**I**so**P**ropyl**S**ilane

TMSA : **T**rifluoro**M**ethane**S**ulfonic **A**cid

TMSI : **T**ri**M**ethyl**S**ilyl **I**odide

TPPS : **T**étra**P**hény**P**orphyrine tétra**S**ulfonate

Groupements chimiques

Ac : **Ac**étate

Asc : **Asc**orbate

BOC : *tert*-**B**ut**O**xy**C**arbonyl

DMNP : 1-(4,5-**D**i**M**éthox-2-**N**itro**P**hényl) éthoxy

fmoc : **F**luorényl**M**éth**O**xy**C**arbonyle

MTT : 4-**M**é**T**hoxy**T**rityle

Propsulf : **Prop**yl**sulf**onate

TMS : **T**ri**M**éthyl**S**ilyle

Tr : **Tr**ityle

Ts : **T**o**s**yle

Biochimie / Biologie

ADN : **A**cide **D**ésoxyribon**u**cléique

BBN : **B**om**B**ési**N**e

FAP : **F**ibroblast **A**ctivation **P**rotein alpha

GFP : **G**reen **F**luorescent **P**rotein

GRPR : **G**astrin **R**elease **P**eptide **R**eceptor

Hb : **H**émoglo**b**ine

HER : **HE**rceptin **R**eceptor

HSA : **H**uman **S**erum **A**lbumin

IC_{50} : half maximal **I**nhibitor **C**oncentration

LDL : **L**ow **D**ensity **L**ipoprotein

mAb : **m**onoclonal **A**nti**b**ody

MMP : **M**atricial **M**etallo**P**roteinase

OC : **OC**tréotide

RGD : Arginylglycylaspartic acid

RPMI : **R**oswell **P**ark **M**emorial **I**nstitute **M**edium

TOC : [D-Phe^1,**T**yr^3]-**OC**tréotide

Nanoparticules / Liposomes

CLIO : **C**ross-**L**inked **I**ron **O**xyde

LUV : **L**arge **U**nilamellar **V**esicles

MLV : **M**ulti**L**amellar **V**esicles

MPIO : **M**icrometer-sized **P**aramagnetic **I**ron **O**xyde

QD : **Q**uantum **D**ot

SUV : **S**mall **U**nilamellar **V**esicles

SPIO : **S**uper**P**aramagnetic **I**ron **O**xyde

TiONts : **T**itane **O**xyde **N**anot**u**be**s**

ULV : **U**ni**L**amellar **V**esicles

USPIO : **U**ltra **S**mall **S**uper**P**aramagnetic **I**ron **O**xyde

VSOP : **V**ery **S**mall super**P**aramagnetic iron **O**xyde **P**article

Divers

AMM : **A**utorisation de **M**ise sur le **M**arché

B : Brillance

BRET : **B**ioluminescence **R**esonance **E**nergy **T**ransfer

CCD : **C**harged-**C**oupled **D**evice

CE : **C**apture **É**lectronique

CR : **C**herenkov **R**adiation

CRET : **C**herenkov **R**adiation **E**mission **T**ransfer

EPR : **E**nhanced **P**ermeability and **R**etention

FG : **F**onction de **G**reffage

FRET : **F**örster **R**esonance **E**nergy **T**ransfer

IEP : **I**so**E**lectric **P**oint

ICT : **I**nternal **C**harge **T**ransfer

LCD : **L**iquid **C**ristal **D**isplay

MOMIA : **MO**nomolecular **M**ultimodal **I**maging **A**gent

MSAP : **M**ultifunctionnal **S**ingle **A**ttachment **P**oint

NIR : **N**ear **I**nfra-**R**ed

ORTEP : **O**ak **R**idge **T**hermal **E**llipsoid **P**lot

PET : **P**hotoinduced **E**lectron **T**ransfer

PROS : **P**hoto-induced **R**eactive **O**xygen **S**pecies

PS : **P**hoto**S**ensibilisateur

RNS : **R**eactive **N**itrogen **S**pecies

ROS : **R**eactive **O**xygen **S**pecies

Note : Le nom propre Черенков peut être traduit de l'alphabet cyrillique de plusieurs manières : « Tcherenkov » (écriture préférentielle en français), « Cherenkov » (écriture préférentielle en anglais), « Čerenkov » (translitération du russe). Nous avons privilégié l'écriture « Cherenkov » aussi bien dans les textes en français qu'en anglais, afin de garder une homogénéité.

AVANT-PROPOS

L'imagerie médicale est un outil précieux pour le diagnostic et le traitement de nombreuses pathologies. En cancérologie, elle est une méthode de choix pour la détection d'une tumeur et le suivi de l'évolution des tissus malins avant ou après traitement. Si les techniques les plus anciennes comme la radiographie ou l'échographie sont aujourd'hui utilisées en routine en milieu clinique, de nouvelles techniques sont apparues au fil du temps, comme l'IRM ou les scintigraphies, et ont accru le potentiel et le champ d'application de l'imagerie médicale.

Les progrès récents dans les domaines de la physique, de la biologie et de la chimie ont également permis l'essor de techniques toujours plus performantes délivrant des informations inédites. C'est notamment grâce à l'exploitation du phénomène de fluorescence que l'imagerie optique a pu se développer. Cette méthode, dite « fonctionnelle », permet de visualiser des processus à l'échelle cellulaire ou subcellulaire afin d'obtenir des informations d'ordre moléculaire. Elle nécessite l'utilisation de marqueurs fluorescents qui sont sélectivement biodistribués dans le corps afin de visualiser un site d'intérêt précis.

Afin d'améliorer la quantité et la qualité d'informations obtenues, ces marqueurs fluorescents peuvent être associés à des sondes détectables dans les autres modes d'imagerie. Cette approche, dite bimodale, permet d'allier les avantages inhérents à chaque technique afin d'obtenir un diagnostique plus précis et plus fiable.

D'autre part, il reste encore de nombreux phénomènes physiques exploitables pour une application en imagerie médicale. C'est notamment le cas du phénomène Cherenkov, responsable de l'émission lumineuse d'un radioélément, qui a depuis très récemment été étudié dans cet objectif. Cela nécessite cependant de comprendre, d'étudier et de maîtriser précisément cet outil.

Ces avancées demandent donc l'appui en amont des chimistes et des biochimistes pour mettre au point des outils moléculaires au service de la conception d'agents d'imagerie, mais aussi pour la création de nouveaux marqueurs plus performants et plus adaptés aux applications visées. Ces objectifs nécessitent donc de développer les outils synthétiques adéquats et d'étudier les propriétés des composés préparés. C'est dans ce contexte que ce travail de thèse a été réalisé.

INTRODUCTION GENERALE

L'IMAGERIE MEDICALE, TECHNIQUES, AGENTS DE CONTRASTE ET MULTIMODALITE

INTRODUCTION GENERALE : L'IMAGERIE MEDICALE, TECHNIQUES, AGENTS DE CONTRASTE ET MULTIMODALITE

Le concept d'imagerie médicale regroupe les différentes techniques qui permettent de créer une représentation visuelle intelligible d'une information à caractère médical. La capture d'une image d'un organisme vivant peut être obtenue en exploitant différents phénomènes tels que l'absorption de rayons X, de photons, la réflexion d'onde, la résonance magnétique nucléaire ou encore la radioactivité.[1] Au fil des années et à travers les constantes améliorations technologiques, l'imagerie médicale s'est révélée être un outil essentiel pour le diagnostic et le traitement de nombreuses pathologies, telles que les maladies cardio-vasculaires ou le cancer. Dans cet objectif, les premières méthodes comme les rayons X ou l'échographie sont aujourd'hui utilisées en routine dans les hôpitaux. Depuis quelques années, le domaine de l'imagerie connaît un essor important. En effet, nombre de nouvelles méthodes sont étudiées afin d'obtenir des informations plus précises permettant un diagnostic plus efficace et une amélioration du traitement.

Les différentes techniques d'imagerie médicale peuvent être classées en deux catégories ayant chacune des objectifs distincts. L'imagerie structurale regroupe des techniques telles que l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) ou le scanner, et permet d'obtenir des informations anatomiques, sur la structure des organes. Les méthodes d'imagerie fonctionnelles sont quant à elles adaptées pour observer des processus à l'échelle de la cellule, voire de la molécule. Ce concept, appelé imagerie moléculaire, s'est notamment développé grâce aux avancées dans le domaine de l'imagerie de fluorescence, et vise à étudier des processus à l'échelle cellulaire et sub-cellulaire pour la compréhension de phénomènes biologiques.[2] Les recherches en médecine et biologie qui concernent l'innovation thérapeutique et l'étude du cancer profitent largement de ces techniques.[3]

La détection et le traitement d'une pathologie, à travers l'imagerie et la thérapie, nécessitent dans la plupart des cas l'utilisation de composés actifs permettant de créer ou renforcer un contraste. Ceux-ci permettent d'améliorer la qualité d'image (imageries structurales) ou peuvent être détectés et suivis dans l'organisme afin d'apporter des informations cruciales pour la recherche, le diagnostic et le traitement (imageries fonctionnelles).[1]

Depuis plusieurs années déjà, la communauté scientifique se tourne également vers la combinaison et l'utilisation simultanée de plusieurs techniques d'imagerie médicale. Cette approche, appelée multimodale, permet de tirer parti des avantages propres à chaque technique, tels que la haute sensibilité ou la bonne résolution, afin d'obtenir une combinaison complémentaire d'informations pour un meilleur diagnostic.[4] D'autre part, l'association d'une méthode d'imagerie médicale avec

une action thérapeutique va quant à elle constituer une approche dite « théranostique ». Cet aspect de l'imagerie directement appliquée à la thérapie est également de plus en plus étudié afin de pronostiquer, suivre et évaluer l'efficacité du traitement.[5]

Le premier défi pour les chimistes dans le domaine de l'imagerie médicale réside donc dans la mise au point de nouveaux agents propres aux modalités concernées et appropriés à l'application visée.[6] Les différentes techniques d'imagerie ainsi que les méthodes et agents associés abordés dans ce manuscrit concernent plus principalement le domaine de l'oncologie. Cette introduction décrit dans un premier temps les principales techniques d'imagerie. Puis nous discuterons de la nature et des stratégies relatives à la mise au point des agents d'imagerie. Pour finir, les approches multimodales et théranostiques seront abordées.

Partie I : Les différentes techniques d'imagerie médicale, aspects théoriques et technologiques

Les techniques d'imagerie médicale les plus couramment utilisées en milieu clinique ou en développement préclinique sont référencées dans le *tableau 1*. Elles sont classées selon leur utilité (anatomique ou fonctionnelle), et selon le principe physique sur lequel elles reposent (RX, ultrasons, radioactivité,…). Chacune possède ses avantages et inconvénients, que ce soit du point de vue de leur efficacité, de leur praticité ou de leur toxicité.[7] Les techniques qui concernent particulièrement ce travail de thèse seront décrites plus en détails, à savoir l'IRM, les imageries scintigraphiques (TEP-TEMP) et les imageries de fluorescence. De plus, certaines techniques plus récentes et innovantes, telles que l'imagerie photo-accoustique (PAI) ou l'imagerie de luminescence Cherenkov (CLI) seront présentées.

I.1. Les techniques d'imagerie structurale : analyse anatomique

L'imagerie structurale, largement utilisée en clinique, cherche à identifier, localiser et mesurer les différentes parties de l'anatomie du corps, afin de détecter des anomalies d'ordre structural. Les techniques d'imagerie anatomique sont généralement peu sensibles mais possèdent une bonne résolution spatiale.

I.1.1. Les rayons X : radiographie et tomodensitométrie

Les rayons X ont été découverts en 1895 par le physicien allemand Wilhelm Röntgen, ce qui lui a valu le premier prix Nobel de physique en 1901. Leur étude lui a permis de réaliser les premières radiographies de la main (*figure 1*), ce qui donna naissance à l'imagerie médicale que l'on connaît aujourd'hui. L'absorption des rayons X par les tissus biologiques permet d'obtenir un contraste endogène entre les zones absorbantes (tissus) et les zones plus denses (os). Par la suite, les progrès technologiques dans le domaine de la physique et du traitement des données informatiques ont permis d'améliorer le procédé pour conduire à la tomodensitométrie ou scannographie (Computed Tomography, CT) qui délivre des informations en trois dimensions. Ces techniques trouvent des applications en routine en milieu clinique, par exemple pour détecter et suivre l'ostéoporose. La CT est également la technique la plus utilisée pour imager le cancer, compte tenu de son faible coût et de sa bonne résolution spatiale, par détection

Figure 1 : L'une des premières radiographies de la main (par Wilhem Röntgen en 1896)

	Principe physique	Modalité	Abréviation anglaise	Développement	Agent de contraste	Résolution temporelle	Résolution spatiale	Sensibilité ($mol.L^{-1}$)	Profondeur
Structurale / Anatomique	Absorption des rayons X	Radiographie	-	Routine clinique	Produits iodés	min	µm	-	Sans limite
		Tomodensitométrie	CT	Routine clinique		min	50-200 µm	-	Sans limite
	Ultrasons	Échographie	-	Routine clinique	Micro-bulles	-	-	-	Sans limite
		Ultrasons haute fréquence	US	Routine clinique		sec-min	10-100 µm	10^{-12}	mm - cm
	Résonance magnétique nucléaire	Imagerie par Résonance Magnétique	MRI	Routine clinique	Chélates de gadolinium / SPIO/USPIO	min-h	10-100 µm	10^{-3} - 10^{-5}	Sans limite
	Diffusion Raman	Imagerie de diffusion Raman exaltée en surface	SERS	Pré-clinique	Nanoparticules	min-jour	1 mm	10^{-12} - 10^{-15}	5 mm
Fonctionnelle / Moléculaire	Désintégration radioactive	Tomographie par Émission de Positrons	PET	Routine clinique	Émetteurs de positrons	sec-min	1-2 mm	10^{-11} - 10^{-12}	Sans limite
		Tomographie par Émission Mono-Photonique	SPECT	Routine clinique	Émetteurs de photons gamma	min	1-2 mm	10^{-10} - 10^{-11}	Sans limite
	Absorption - Émission lumineuse	Imagerie de fluorescence par réflexion	FRI	En développement	Fluorophores	min	1 mm	10^{-9} - 10^{-12}	< 1 cm
		Tomographie de fluorescence	FMT	En développement	Fluorophores NIR	sec	1 mm	10^{-9} - 10^{-12}	2-3 cm
		Microscopie intravitale	IVM	En développement	Fluorophores	sec-h	1 µm	10^{-15} - 10^{-17}	400-800 µm
	Absorption lumineuse - Ultrasons	Imagerie photo-acoustique	PAI	Pré-clinique	Fluorochrome / Nanoparticules	sec-min	10 µm - 1 mm	-	6 mm – 5 cm
	Émission lumineuse	Imagerie de bioluminescence	BLI	Pré-clinique	Fluorophore endogène	sec-min	3-5 mm	10^{-9} - 10^{-12}	1-2 cm
		Imagerie de luminescence Cherenkov	CLI	Pré-clinique / Essais cliniques	Émetteurs de particules chargées (β^+, β^-, α)	min	1-2 mm	10^{-10} - 10^{-12}	1 – 1,6 mm

Tableau 1 : Les principales méthodes d'imagerie in vivo[8]

des anomalies morphologiques qu'induit une tumeur. Pour augmenter la sensibilité de cette technique, il est possible d'injecter au patient un agent de contraste (produit iodé hydrosoluble injecté à haute dose) capable d'absorber favorablement les rayons X. On parle de contraste exogène, qui permet de blanchir certaines zones d'intérêt telles que le réseau vasculaire, les reins, la vessie, les cavités intra-articulaires.

I.1.2. Les ultrasons au service de l'échographie

L'échographie, basée sur l'émission et la détection de signaux ultrasonores, est une technique simple d'utilisation, peu coûteuse, et qui offre une résolution spatiale de quelques micromètres. C'est pourquoi elle est utilisé dans le milieu médical. Cependant, elle ne permet pas d'observer les zones très profondes car les ultrasons sont stoppés par les os. Elle est bien connue pour la visualisation du développement du fœtus et du suivi de la grossesse, mais est également utilisée pour des applications cardiaques, vasculaires, endoscopiques, ou la mise en évidence de la présence de certaines zones tumorales. Comme pour le scanner, il est possible de renforcer la qualité d'image en injectant un agent de contraste. Il existe plusieurs types de composés permettant d'améliorer le contraste lorsqu'ils sont exposés à une source ultrasonore, les plus utilisés étant les microbulles. Celles-ci vont créer une différence d'échogénicité entre le sang, devenant hyperéchogène, et les parois des vaisseaux sanguins. Des phénomènes physiques tel que l'effet Doppler peuvent également être exploités afin d'obtenir des informations supplémentaires, comme la vitesse de circulation sanguine ou la vitesse de pulsation des parois cardiaques.

I.1.3. L'imagerie par résonance magnétique

L'apparition de l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) dans les années 1970 constitue une importante avancée dans le domaine de l'imagerie structurale. Cette méthode repose sur le principe de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), qui utilise les propriétés magnétiques des noyaux constituant les atomes de la matière. Elle permet d'obtenir des images tridimensionnelles de l'anatomie et la physiologie d'animaux entiers ou d'humains avec une bonne résolution spatiale et temporelle.

I.1.3.1. Principe : RMN, IRM, relaxation et grandeurs associées

La RMN exploite la modification des propriétés magnétiques des noyaux atomiques lorsqu'ils sont placés dans un champ magnétique intense. Dans ce champ unidirectionnel, les spins nucléaires vont s'aligner de façon parallèle ou anti-parallèle (selon leur charge) avec celui-ci. Si l'action magnétique est brutalement stoppée, les spins vont alors retourner à leur état d'équilibre en un temps donné : c'est le temps de relaxation. Ce temps va dépendre de la nature et de l'environnement du noyau.

C'est ce même principe qui est utilisé en IRM. Le patient va être placé dans un champ magnétique afin de mesurer la relaxation des protons des molécules d'eau contenues en grande quantité dans le corps. Celles-ci se trouvant dans des environnements et à des concentrations différentes selon la nature et la localisation des tissus, le temps de relaxation varie donc selon la zone concernée. C'est ce qui va permettre d'obtenir un contraste lors des mesures et d'obtenir une image. D'autre part, la relaxation est un mouvement hélicoïdal autour de l'axe z (axe du champ magnétique imposé). Ainsi la diminution de l'aimantation jusqu'à un point d'équilibre est observable selon l'axe z ou le plan xy (*figure 2*). Il est donc possible d'extraire deux composantes temporelles : une composante longitudinale T_1 (axe z) et une composante transversale T_2 (plan xy). Selon la méthode utilisée en IRM, les images pourront être recueillies par mesure des temps de relaxation longitudinaux ou transversaux.

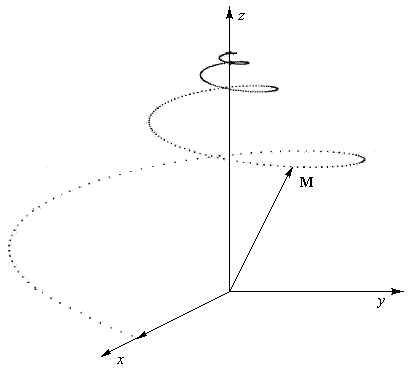


Figure 2 : Mouvement de relaxation d'un spin nucléaire

I.1.3.2. Modification de la relaxation : agents de contraste

Les examens IRM souffrent d'une faible sensibilité, et nécessitent donc souvent un temps d'acquisition long (environ 20 min). Pour pallier ce problème, il est possible d'injecter un agent de contraste qui va influer sur la relaxation des protons des molécules d'eau. Il existe plusieurs catégories d'agents de contraste, qui sont dans tous les cas composés de métaux paramagnétiques. Les agents utilisés dans 95 % des examens sont des complexes de gadolinium (III). Ils permettent de réduire le temps de relaxation longitudinal (T_1) des protons des molécules d'eau qui se trouvent à sa proximité, ce qui « blanchit » certaines zones.[9] Malheureusement, ils doivent être utilisés à hautes doses compte tenu de la faible sensibilité de la méthode, ce qui induit une certaine toxicité.[8c] Les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques (SPIO) sont très étudiées comme alternative aux complexes de gadolinium. Elles influencent plus particulièrement la valeur de relaxivité axiale (T_2), ce qui crée un contraste « noir ».[9]

Le pouvoir d'un agent de contraste paramagnétique est caractérisé par sa valeur de relaxivité (longitudinale ou transversale, r_1 ou r_2 en $mM^{-1}.s^{-1}$), correspondant à sa vitesse de relaxation (1/T) normalisée par rapport à sa concentration en métal paramagnétique ([M]) (*figure 3*) (*équation 1*).

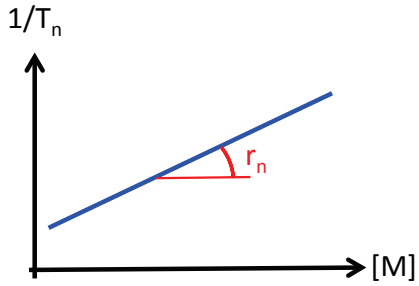


Figure 3 : Vitesse de relaxation en fonction de la concentration métallique

$$\left(\frac{1}{Tn}\right) = \left(\frac{1}{Tn}\right) dia + \left(\frac{1}{Tn}\right) para = \left(\frac{1}{Tn}\right) dia + r_n[M]$$

Avec n = 1, 2

Équation 1 : La vitesse de relaxation globale est la somme des vitesses de relaxation diamagnétique (dia) et paramagnétiques (para)

Cette valeur est fonction de la température ainsi que du champ magnétique de l'appareil avec lequel le temps de relaxation (T_n) est mesuré. Plus celle-ci sera grande, plus l'agent de contraste aura une influence sur la relaxivité des protons des molécules d'eau et sera donc efficace.

I.1.3.3. Les méthodes et applications de l'IRM en examen clinique

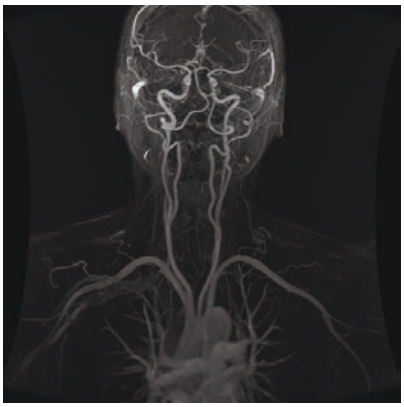


Figure 4 : Image d'angio-IRM sur un patient Humain

L'IRM est largement utilisée en clinique, notamment pour visualiser le système nerveux central, les muscles, le cœur, mais aussi pour détecter la présence de tumeurs. Le mode d'acquisition et la nécessité d'un agent de contraste varient selon la zone à observer. L'**IRM cardiaque** nécessite par exemple des acquisitions rapides : le cœur étant en mouvement, les acquisitions se font en apnée sur une durée de 15 à 20 secondes. Elle permet de détecter des maladies valvulaires, coronariennes ou d'autres dysfonctionnements du cœur. L'**angio-IRM** (ARM), qui utilise un agent de contraste à base de gadolinium, permet de visualiser les artères afin de détecter des anomalies telles que les sténoses, les fistules, les anévrismes et autres problèmes de circulation sanguine (*figure 4*).

I.1.4. Les méthodes structurales appliquées à l'information fonctionnelle

Avec le développement de l'imagerie moléculaire, les techniques d'imagerie anatomiques ont été utilisées pour obtenir des informations d'ordre fonctionnel. Dans la plupart des cas, cela consiste à transporter sélectivement l'agent de contraste dans le corps au moyen d'un vecteur biologique. La principale limite de cette approche réside dans la faible sensibilité des techniques structurales, nécessitant une haute dose d'agent de contraste et compliquant la vectorisation.

I.1.4.1. L'échographie moléculaire

Comme mentionné précédemment, l'échographie est une technique simple et peu coûteuse, mais qui ne donne que des informations d'ordre anatomique. Cependant, les microbulles peuvent être associées à un biovecteur pour réaliser de l'échographie moléculaire. Dans le domaine du cancer, cette approche innovante permet de réaliser des images d'ordre fonctionnel pour visualiser l'angiogénèse tumorale. Cette approche reste actuellement au stade de la recherche mais semble prometteuse pour l'acquisition d'informations en temps réel, compte tenu de ses bonnes résolutions spatiale et temporelle.[10] Le premier essai sur l'homme réalisé en 2013 pour un cas de cancer de la prostate a démontré la faisabilité et l'utilité de cette approche pour la détection précoce du cancer.[11]

I.1.4.2. Les nouvelles méthodes pour une IRM fonctionnelle

De la même manière, la vectorisation des agents paramagnétiques permet d'obtenir des informations fonctionnelles.[12] Cet aspect sera détaillé et illustré dans la partie qui concerne les agents de contraste pour l'IRM. D'autre part, de nouvelles méthodes utilisant le principe de l'IRM ont été développées afin de visualiser des processus à l'échelle moléculaire.[8b] En voici quelques exemples :

* L'**IRM de contraste dynamique amélioré** (Dynamic Contrast Enhanced MRI, DCE-MRI) met en oeuvre des agents de contraste (complexes de gadolinium ou nanoparticules) qui sont bloqués par la barrière hémato-encéphalique dans le cas de vaisseaux sanguins alimentant des tissus sains, et non bloqués lorsque les vaisseaux alimentent une tumeur. L'acquisition avant et après injection de l'agent de contraste permet ainsi la localisation d'une zone tumorale.[3c]

* L'**IRM de diffusion** (Diffusion Weight MRI, DW-MRI) se base sur la visualisation du mouvement des molécules d'eau dans le corps (direction de diffusion). Cette technique relativement récente permet entre autre de réaliser de la tractographie, c'est-à-dire la reconstruction du trajet d'un faisceau de fibres (nerveuses par exemple).[13] Elle est utilisée sur l'homme pour la détection précoce de l'accident vasculaire cérébral, de la sclérose en plaques ainsi que pour la détection du cancer, les molécules d'eau diffusant plus lentement dans les tumeurs.

* La technique la plus répandue d'**IRM fonctionnelle** (IRMf) se base sur l'aimantation de l'hémoglobine (qui contient l'hème, une porphyrine de fer paramagnétique) : les globules rouges oxygénés sont inactifs en IRM tandis que les désoxygénés sont actifs. On parle de Blood Oxygen Level Dependent MRI (BOLD-MRI). Cette technique permet de suivre les afflux sanguins oxygénés dans le cerveau et de visualiser sous la forme d'un film (environ une image par seconde) les activités cérébrales. En oncologie, la BOLD-MRI permet de suivre le taux d'oxygénation des tissus pour détecter la présence d'une zone tumorale dont l'hypoxie est caractéristique.[14]

* La **spectroscopie de résonance magnétique** (Magnetic Resonance Spectroscopy, MRS) utilise exactement le principe de la RMN pour la détection de certains métabolites endogènes dont l'afflux est parfois supérieur dans les zones tumorales (choline, créatine, lactate, glucamate, lipides,…). Le seuil de détection endogène restant bas, ces métabolites étant présents à faible concentration, des agents de contraste exogènes peuvent être injectés. Ce sont par exemple les mêmes métabolites, mais marqués au carbone-13 hyperpolarisé. On parle alors de spectroscopie de résonance magnétique hyperpolarisée (Hyperpolarized MRS).[7]

I.2. Les techniques d'imagerie fonctionnelle : vers l'imagerie moléculaire

Contrairement aux différentes techniques d'imagerie structurale, les imageries fonctionnelles possèdent une sensibilité bien supérieure et sont adaptées pour le suivi de processus moléculaires *in vivo* tout en restant le plus possible non invasives.[8a]

I.2.1. L'imagerie nucléaire

Les imageries nucléaires, appelées aussi scintigraphies, consistent à administrer et accumuler dans le corps des radioéléments puis à détecter les rayonnements issus de leur désintégration radioactive. Ceci permet de localiser la zone d'accumulation de la source radioactive et ainsi d'obtenir une image de leur distribution dans le corps. Selon le radioélément utilisé, le mode d'émission est variable. C'est pourquoi il existe deux types d'imagerie scintigraphique : la Tomographie par Émission de Positrons (TEP) et la Tomographique par Émission Mono-Photonique (TEMP).

I.2.1.1. La désintégration radioactive : principe et grandeurs caractéristiques

La décroissance radioactive est un phénomène statistique pour lequel des atomes radioactifs (instables) retrouvent un état d'équilibre stable. Ce phénomène suit une loi exponentielle décroissante et chaque élément radioactif est caractérisé par la période radioactive (ou temps de demi-vie $t_{1/2}$), période au bout de laquelle la moitié des atomes à l'état excité sont revenus à l'état fondamental. Selon l'élément radioactif, plusieurs chemins sont possibles pour un retour à l'état stable (*figure 5*) :

* La **désintégration β^+** est la transformation d'un proton en neutron avec émission d'un positron (e^+) et d'un neutrino (ν).
* La **désintégration β^-** est l'expulsion d'un électron (e^-), avec émission d'un antineutrino ($\bar{\nu}$). On peut considérer que c'est la transformation d'un neutron en proton.
* La **capture électronique** (CE) est la capture d'un électron situé sur une des couches

électroniques de l'atome. Il y a donc transformation d'un proton en neutron avec émission d'un neutrino (ν).

* La **désintégration α** est la transformation d'un noyau radioactif en un noyau fils par émission d'un ion hélium (II) (He^{2+}), soit une perte de deux neutrons et de deux protons.

* La **désintégration γ** est l'émission d'un photon de haute énergie (appelé photon gamma). C'est un phénomène qui accompagne souvent les désintégrations α, β^+ et β^-.

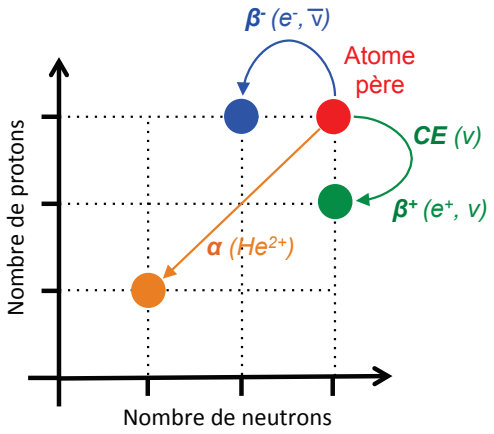


Figure 5 : Les différents modes de retour à l'équilibre par désintégration radioactive

I.2.1.2. Les radioisotopes en imagerie nucléaire

Dans le cas des imageries radioisotopiques, ce sont plus particulièrement les radioéléments de type émetteurs β^+ (TEP) et γ (TEMP) qui sont concernés. Les éléments les plus fréquemment utilisés en clinique sont le fluor-18 (^{18}F) pour la TEP et le technétium-99 métastable (^{99m}Tc) pour la TEMP. Mais d'autres éléments peuvent également être utilisés (*tableau 2*).

Le choix du radioélément se base sur les critères suivants :

* La **demi-vie** doit être suffisamment longue en considération de la méthode de synthèse du radiotraceur (marquage) et de la durée de l'analyse.

* La **méthode de production**, la **disponibilité** et le **coût** du radioélément sont trois critères importants dans le cas d'une application clinique. La production par l'intermédiaire d'un générateur reste plus simple que par un cyclotron.

* La **facilité de synthèse** du radiotraceur : le mode d'introduction de l'élément radioactif (substitution d'un atome ou d'un groupe d'atome, formation d'un complexe métallique) doit être simple et rapide en considération du temps de demi-vie et du temps d'exposition à la radioactivité de l'opérateur.

	Élément	Temps de demi-vie	Mode de décroissance			Mode de production
			Type	Energie (kEV)	Abondance (%)	
TEP	^{11}C	0,3 h	β^+		99	
	^{18}F	1,83 h	β^+	633	96,7	Cyclotron
	^{55}Co	17,5 h	β^+	1498 ; 1021	46,0 ; 25,6	Cyclotron
			γ	931 ; 477	75,0 ; 20,2	
	^{64}Cu	12,7 h	β^+	653	17,6	Cyclotron
			β^-	579	38,5	
			γ	1346	0,5	
	^{68}Ga	1,10 h	β^+	1899	87,4	Générateur ^{68}Ge
			γ	1077 ; 1883	82,5 ; 32,6	
	^{89}Zr	78,5 h	β^+	902	22,7	Cyclotron
			γ	909 ; 1713	99,0 ; 0,7	
TEMP	^{99m}Tc	6 h	γ	140	89,1	Générateur (^{99}Mo)
	^{67}Ga	78,2 h	γ	93 ; 185 ; 300	35,7 ; 19,7 ; 16,0	Cyclotron
	^{111}In	67 h	γ	171 ; 245	94,1 ; 90,7	Cyclotron
	^{123}I	13,2 h	γ	159		Cyclotron
	^{177}Lu	14,7 h	γ	498 ; 208 ; 112	79,4 ; 10,4 ; 6,2	Cyclotron
			β^-	167 ; 135	10,0 ; 2,6	

Tableau 2 : Principaux radioéléments utilisés en TEP et TEMP

I.2.1.3. Principe de détection du signal

Pour la TEP comme pour la TEMP, les espèces détectées, issues des désintégrations radioactives, sont des photons. Les détecteurs (caméras), sont donc de même nature pour les deux techniques, c'est-à-dire composés de collimateurs, scintillateurs et photomultiplicateurs qui permettent la détection lumineuse. Cependant, le nombre de photons émis en TEP et en TEMP n'étant pas le même, les appareils utilisés lors des examens scintigraphiques diffèrent.

Lors d'une désintégration β^+, le positron (e^+) émis peut s'annihiler avec un électron pour produire deux photons d'énergie égale (511 keV) mais de directions diamétralement opposées. Lors d'examens PET (ou PET-scan), le patient est donc installé entre deux caméras tournantes équidistantes placées en opposition qui détectent l'émission photonique en coïncidence (*figure 6*). La rotation de ces caméras permet par des séries de mesures de localiser le point d'émission par triangularisation, et de reconstituer une image 3D de la zone d'émission.

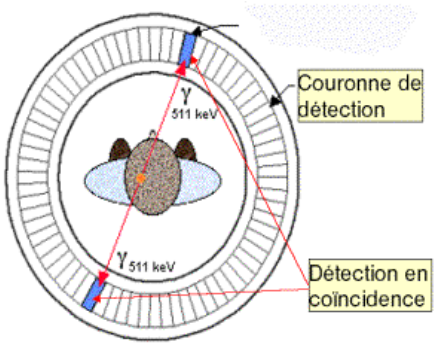


Figure 6 : Schéma et principe des caméras utilisées pour les PET-scans

Pour la scintigraphie de type mono-photonique (TEMP), la détection du signal émis est réalisée à l'aide d'une seule gamma-caméra. Celle-ci tourne autour du patient afin d'accumuler des mesures sous différents angles et de localiser le point émissif. La cartographie tridimensionnelle de l'agent radioactif dans le corps peut ensuite être réalisée.

Aujourd'hui, les imageurs TEP ou TEMP sont souvent associés avec une autre modalité (CT), afin de superposer l'image scintigraphique obtenue avec un aperçu anatomique et donc de situer précisément la zone émissive dans le corps.

I.2.1.4. Applications des techniques scintigraphiques

Les imageries scintigraphiques se sont révélées particulièrement efficaces dans les domaines de la cardiologie, de la neurologie ou de l'infection, mais aussi en cancérologie pour la détection et le suivi des tumeurs. La TEMP est par exemple utilisée dans le cas de dysfonctionnement de la thyroïde ou du système lymphatique. La TEP intervient lors des différentes étapes du cancer. Lorsqu'une anomalie anatomique est détectée au moment d'un examen préliminaire (radiographie, échographie), l'examen TEP permet de diagnostiquer la présence et la nature d'une tumeur (maligne ou bénigne). Un bilan d'extension est ensuite réalisé pour déterminer l'étendue précise de la zone tumorale et la présence d'éventuelles métastases. Après la thérapie (radiothérapie, chimiothérapie, chirurgie), elle permet de juger son efficacité. Finalement, elle permet un suivi à plus long terme de la résurgence potentielle de tissus tumoraux.

Les imageries scintigraphiques sont donc largement utilisées pour les examens sur l'homme, mais ces techniques sont également très importantes pour la recherche, notamment pour les études sur petit animal.[15] Elles offrent des informations inédites d'ordre moléculaire qui permettent la compréhension de processus biologiques complexes.[16] Elles sont également utilisées pour évaluer la biodistribution et obtenir des données pharmacocinétiques de médicaments en phase de développement, par marquage de la molécule active avec un radioisotope.[17]

I.2.2. L'imagerie optique

L'Imagerie Optique (IO), ou imagerie de fluorescence, est une technique dont l'utilisation *in vivo* est relativement nouvelle. Cette modalité a fortement contribué au développement de l'imagerie moléculaire.[2a] Le terme « imagerie optique » regroupe les techniques qui utilisent les photons du visible (ou proche infrarouge) pour réaliser une image d'un sujet d'étude (homme, animal ou cellule). Elle possède des caractéristiques intéressantes pour de nombreuses applications : bonne sensibilité, sélectivité, rapidité, faible coût et facilité de mise en œuvre. Cette technique offre notamment la possibilité de réaliser le suivi en temps réel d'événements biologiques directement au sein d'un organisme vivant.

I.2.2.1. Théorie et principe de la fluorescence

La fluorescence est la capacité de certaines molécules, appelées fluorophores, à capter des photons lumineux pour réémettre des rayonnements de même nature mais d'énergie différente. C'est un phénomène photophysique qui se traduit par l'excitation du fluorophore jusqu'à un état instable (l'état excité *S1* ou *S2*), puis sa désexcitation spontanée par émission de fluorescence pour retourner à l'état stable (l'état fondamental *S0*) (*figure 7*).

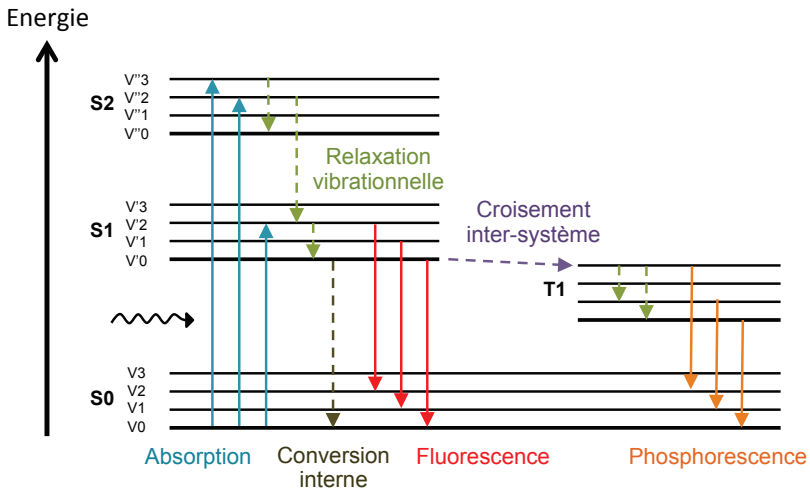


Figure 7 : Diagramme de Jablonski présentant les phénomènes photophysiques d'absorption et émission de fluorescence ou de phosphorescence (adaptée de Jablonski, A. Nature ***1933****)*[18]

Cependant, d'autres phénomènes peuvent être impliqués. D'une part, lorsque l'absorption ne conduit pas à un niveau vibrationnel *V'0* le plus bas en énergie, il peut y avoir une désexcitation appelée relaxation vibrationnelle. Le même type de stabilisation énergétique peut se produire pour un retour à l'un des niveaux vibrationnels de l'état fondamental *S0* (*V0, V1, V2, V3*). Dans ce dernier cas, on parle alors de conversion interne, qui est un chemin ne conduisant pas à la fluorescence, et pour lequel l'énergie est directement convertie en chaleur. La phosphorescence est

quant à elle issue d'un croisement inter-système entre l'état *S1* et un état triplet *T1*, puis retour à l'état d'équilibre *S0*.

I.2.2.2. Grandeurs caractéristiques

Les **longueurs d'onde d'absorption** (λ_{abs}) d'un composé fluorescent sont inversement proportionnelles au gap d'énergie à franchir afin d'atteindre l'état excité (*V'1*, *V'2*, *V''1*,…). L'efficacité de cette absorption est caractérisée par le **coefficient d'extinction molaire** (ε). De même manière que pour l'absorption, la **longueur d'onde d'émission** (λ_{em}) dépendra du gap à franchir pour le retour à un état fondamental (*V1*, *V2*,…). L'écart entre les longueurs d'ondes d'absorption et d'émission, caractéristique de chaque fluorophore, est défini comme le **déplacement de Stokes** (*figure 8*).

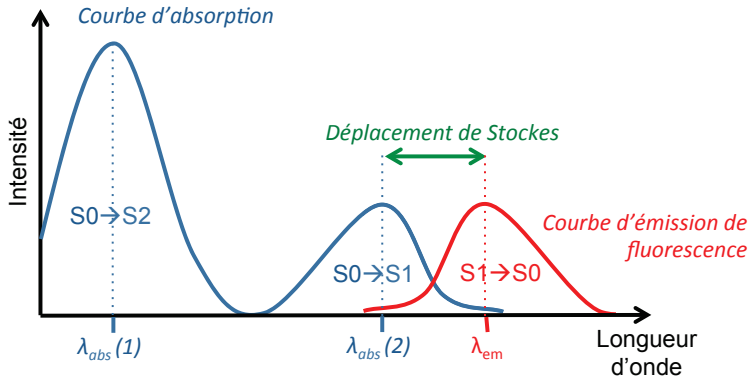


Figure 8 : Spectres d'absorption, d'émission, d'excitation et grandeurs associées

L'efficacité d'un fluorophore à absorber des photons pour conduire à une émission de fluorescence est quantifiée par le **rendement quantique de fluorescence** (Φ_F). C'est une probabilité, définie comme le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés. Le produit du coefficient d'extinction molaire par le rendement quantique de fluorescence, nommé **brillance** ($B = \varepsilon \times \Phi_F$), permet de comparer l'efficacité des fluorophores pour une application en imagerie.

I.2.2.3. La fluorescence au service de l'imagerie : principe, avantages et limites

L'imagerie de fluorescence consiste, dans la plupart des cas, à injecter (homme, animal) ou incorporer (cellules) un agent fluorescent, puis à étudier sa distribution par excitation avec une source de photons externe (laser), et par détection des photons de fluorescence émis (caméra optique). C'est une technique rapide, facile à mettre en œuvre et bon marché, en comparaison des scintigraphies (pas de radioactivité à manipuler, caméras moins chères). De plus, la quantité d'agent fluorescent à injecter nécessaire pour l'acquisition d'une image est faible compte tenu de sa bonne

sensibilité. Cependant, l'utilisation de cette technique en milieu clinique reste encore rare compte tenu de certaines limitations, principalement la faible pénétrabilité. Cette limitation provient desdifférentes interactions de la lumière avec les tissus biologiques (*figure 9*) :

* **La réflexion** : une fraction de la lumière incidente peut être réfléchie lorsqu'elle rencontre une interface entre deux milieux.
* **La réfraction** : une autre fraction peut être déviée de sa trajectoire.
* **La diffusion** : lorsque la lumière traverse les tissus, elle peut rencontrer des petits éléments qui vont dévier sa trajectoire par diffusion.
* **L'absorption** : les tissus contiennent de nombreux composés qui peuvent absorber la lumière.
* **L'auto-fluorescence** : les tissus contiennent également des composés fluorescents, dont l'émission va produire un signal parasite.

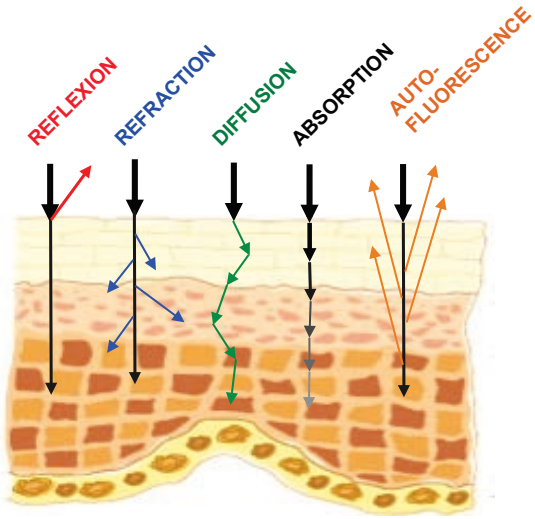


Figure 9 : Limitations de l'excitation et de la détection d'un fluorophore dans un milieu biologique (adaptée de Valentine, R. M. Photochem. Photobiol. Sci ***2013****)*[19]

Ces phénomènes affectent le trajet des photons incidents, mais aussi celui des photons de fluorescence réémis. Ils font de l'imagerie de fluorescence une méthode de surface, adaptée pour imager des tissus peu profonds. Elle est donc utilisée pour l'imagerie cellulaire, les études sur petit animal (de faible épaisseur), sur les tissus excisés (*ex vivo*) ou lors d'opérations à cœur ouvert. Son utilisation se limite aujourd'hui majoritairement au stade préclinique et pour la recherche clinique, même si cette technique possède un grand potentiel dans le domaine clinique de l'imagerie intra-opératoire pour l'aide à la chirurgie.

Il est cependant possible de limiter ces phénomènes en utilisant des fluorophores possédant les propriétés adéquates, notamment une gamme d'absorption et d'émission dans le domaine du proche infrarouge, pour lequel ces phénomènes sont diminués. En effet, les principaux acteurs de l'absorption et de l'auto-fluorescence présents dans les tissus biologiques sont l'eau, l'hémoglobine (Hb) et l'oxyhémoglobine (HbO_2). Leur domaine d'absorption se situant avant 650 nm et au delà de 900 nm, la fenêtre délimitée par ces deux valeurs, nommée fenêtre thérapeutique, est particulièrement adaptée à une imagerie plus profonde (*figure 10*).[20]

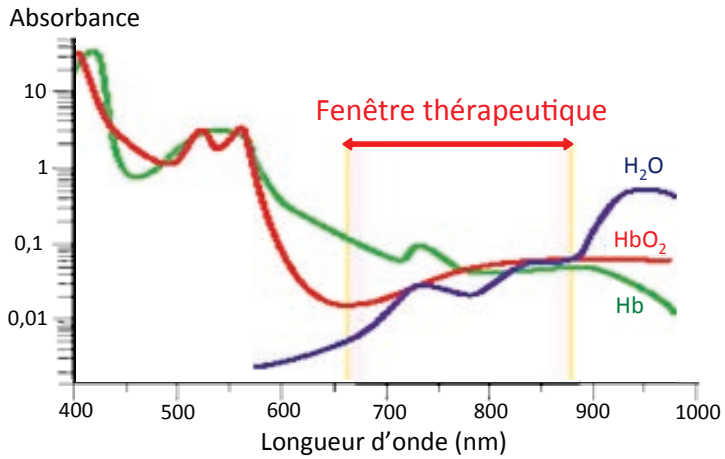


Figure 10 : La fenêtre thérapeutique (Weissleder, R. Nature Biotechnology 2001)[20b]

D'autre part, les problèmes rencontrés en imagerie de fluorescence peuvent également provenir du fluorophore. En effet, celui-ci peut d'une part se désactiver par interaction avec différents groupements chimiques présents dans les tissus (phénomène de transfert), et d'autre part se dégrader lorsqu'il est exposé à l'excitation laser (phénomène de photoblanchiment).

I.2.2.4. Les méthodes d'imagerie par fluorescence et leurs applications

Selon le domaine d'application concerné, les techniques d'imagerie optique peuvent être classées en deux catégories majeures :[8c]

* Les techniques de **résolution microscopique** : les microscopies en épifluorescence, confocale (ConFocal Microscopy, CFM), et multiphotoniques (MultiPhoton Microscopy, MPM), pour imager à l'échelle cellulaire.

* Les techniques de **résolution macroscopique** : la tomographie optique diffuse (Diffuse Optic Tomography, DOT), l'imagerie de fluorescence par réflexion (Reflectance Fluorescence Imaging, FRI), la tomographie de fluorescence moléculaire (Fluorescence-mediated Molecular Tomography, FMT) et l'imagerie de bioluminescence (Bioluminescence Imaging, BLI) qui permettent de faire de l'imagerie de tissus, d'organes ou de corps entier.

I.2.2.4.1. Les microscopies de fluorescence

La microscopie de fluorescence est une des méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire, puis plus récemment dans le domaine de l'imagerie médicale. Elle trouve des applications dans l'imagerie cellulaire (*in vitro*), pour imager des tissus de surface ou mis à nus (*in vivo*) ou bien excisés (*ex vivo*). Il existe plusieurs techniques pour réaliser des images de fluorescence microscopique, et donc plusieurs types de microscope :

* Les microscopes les plus communs fonctionnent en **épifluorescence**, c'est à dire que la lumière excitatrice passe par l'objectif. Cette technique est limitée à des sujets d'étude très fins.

* Le **microscope confocal** permet de réaliser des images plus profondes en déplaçant le plan focal sur toute l'épaisseur de l'échantillon. Dans cette technique, le détecteur se trouve à l'opposé de la source d'excitation et derrière un sténopé (pinhole) dont le rôle est d'éliminer les photons ne provenant pas du plan focal. Une adaptation utilisant une source confocale à balayage permet d'obtenir des informations en trois dimensions (Confocal Laser Scanning Microscopy, CFLSM).[21]

* La **microscopie par absorption biphotonique** exploite la faculté de certains fluorophores à pouvoir absorber de façon simultanée deux photons d'énergie identique pour n'en réémettre qu'un seul (*figure 11*).[22] Cette méthode, qui utilise un laser pulsé, possède plusieurs avantages : l'excitation à une longueur d'onde plus élevée permet une meilleure pénétrabilité dans les tissus (car dans la fenêtre thérapeutique) ; l'excitation se fait sur un point focal et non sur un plan, ce qui diminue le photoblanchiment du fluorophore ; cette technique ne nécessite pas l'utilisation d'un pinhole.[24]

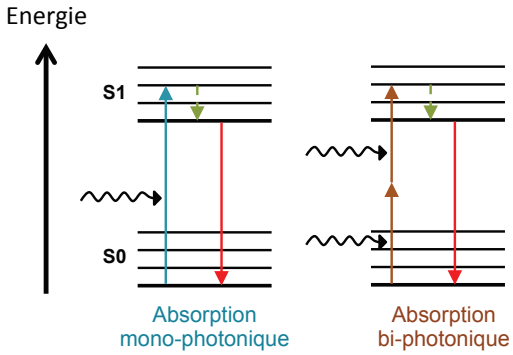


*Figure 11 : Absorptions à un et deux photons (adaptée de Goeppert-Mayer, M. Annals of Physics **1931**)*[23]

Le domaine des microscopies de fluorescence est en évolution constante par la mise au point de nouvelles techniques afin d'obtenir d'avantage de pénétrabilité, de sensibilité ou de résolution. On peut par exemple citer la **microscopie de déplétion par émission stimulée** (STimulated Emission Depletion, STED) qui est une évolution récente de la microscopie confocale permettant d'obtenir une plus grande profondeur de champ mais aussi une limite de résolution plus faible (2,4 nm en champ lointain). Elle permet de l'imagerie *in vivo* (cellules vivantes) avec une très bonne résolution.[25]

Lorsque la microscopie de fluorescence est utilisée pour observer des tissus biologiques vivants, on parle alors de **Microscopie IntraVitale** (MIV). Les principales utilisations portent sur l'imagerie de processus cellulaires au stade de la recherche et au stade préclinique (activités biologiques et enzymatiques, étude des tumeurs, distribution d'agents thérapeutiques,…). Mais la MIV est également appliquée à la chirurgie assistée par fluorescence, en complément de l'imagerie de

fluorescence par réflexion (Fluorescence Reflectance Imaging FRI), pour analyser les tissus excisés (*ex vivo*).[26]

I.2.2.4.2. L'imagerie planaire : imagerie de fluorescence par réflexion

L'appareillage utilisé en FRI se compose d'une source de lumière continue, d'une caméra CCD (Charged-Coupled Device), et d'un jeu de filtres pour sélectionner les gammes d'excitation et d'émission. C'est un appareillage permettant la détection de composés fluorescents présents dans des tissus peu profonds. La FRI est la technique d'imagerie optique la plus simple pour les études sur l'homme. Elle est prometteuse dans le domaine du traitement du cancer, notamment pour l'assistance à la chirurgie. En effet, lors d'opérations visant à la résection tumorale (opération « à cœur ouvert »), le chirurgien peut directement détecter la fluorescence émise par la zone tumorale, en utilisant un système FRI portatif, et ainsi l'exciser avec précision. Cette technique a fait ses preuves pour la résection de métastases, la localisation des ganglions sentinelles, et une meilleure élimination des marges tumorales.[27]

I.2.2.4.3. La tomographie optique de fluorescence

La **tomographie optique diffuse** (fluorescence Diffuse Optic Tomography, fDOT) pallie les problèmes de la FRI, car elle permet d'obtenir des images en profondeur et ainsi une visualisation 3D de la zone fluorescente. La source lumineuse est cette fois un laser en mouvement qui permet de réaliser un éclairage ponctuel. L'accumulation d'acquisitions à différentes positions permet d'obtenir, après reconstruction informatique, une image tridimensionnelle. Cette technique souffre cependant d'une faible résolution en profondeur.

La **tomographie optique résolue en temps** (Time Resolved Diffuse Optic fluorescence Tomography, TR-fDOT) conduit à de meilleurs résultats en terme de résolution. Elle se base sur l'utilisation d'un laser pulsé et prend en compte le « temps de vol » des photons.

Ces techniques permettent notamment d'étudier la distribution d'un agent fluorescent dans un sujet vivant afin d'obtenir des informations d'ordre moléculaire.[27] Cet objectif constitue la tomographie de fluorescence moléculaire (Fluorescence-mediated Molecular Tomography, FMT). [28] Dans ces techniques, les agents fluorescents doivent impérativement absorber et émettre dans la fenêtre thérapeutique pour être détectables. La tomographie de fluorescence est principalement utilisée pour la recherche préclinique. En effet, étant donné qu'elle délivre des informations en trois dimensions, elle est adaptée pour des études du corps entier, mais se limite au petit animal (souris), la pénétrabilité n'étant pas suffisante pour l'homme compte tenu de l'épaisseur des tissus à traverser.

Elle permet l'étude en temps réel de tumeurs, notamment leur apparition, leur évolution ou leur réaction face à un traitement.

I.3. Quelques modalités émergentes en imagerie médicale

Dans un objectif de développer au maximum l'imagerie moléculaire, la recherche s'oriente aujourd'hui vers l'étude de nouvelles techniques afin de pallier les problèmes des techniques existantes. Deux modalités innovantes liant les domaines des ultrasons, de l'imagerie optique et de l'imagerie nucléaire sont abordées dans les paragraphes suivants.

I.3.1. L'imagerie photo-acoustique : entre optique et ultrasons

L'imagerie photo-acoustique (Photo-Accoustic Imaging, PAI) consiste à générer des ultrasons grâce à la lumière, afin de tirer parti de la très bonne résolution des ultrasons tout en gardant l'information fonctionnelle délivrée par l'optique. C'est une technique non-invasive qui permet une plus grande profondeur d'investigation *in vivo* que l'imagerie optique. Le principe repose sur l'irradiation lumineuse d'une zone d'étude (tissus) au moyen d'un pulse laser, qui va se propager dans le milieu. Les sites de plus forte absorption vont capter la lumière et générer une expansion thermique par transfert d'énergie non radiatif (échauffement local). La relaxation rapide des tissus ayant subi l'expansion va ensuite provoquer la génération d'une onde acoustique (ultrasons) détectable. Afin de renforcer le phénomène et obtenir une information moléculaire, il est possible d'utiliser des traceurs qui vont capter de façon préférentielle la lumière et pourront être localisés (composés absorbants : molécules fluorescentes, nanoparticules d'or ou nanotubes de carbone).

Les études applicatives portent sur la visualisation de réseaux vasculaires, la mammographie (*figure 12*), la détection de l'hypoxie cérébrale, la détection du cancer de la prostate.[29]

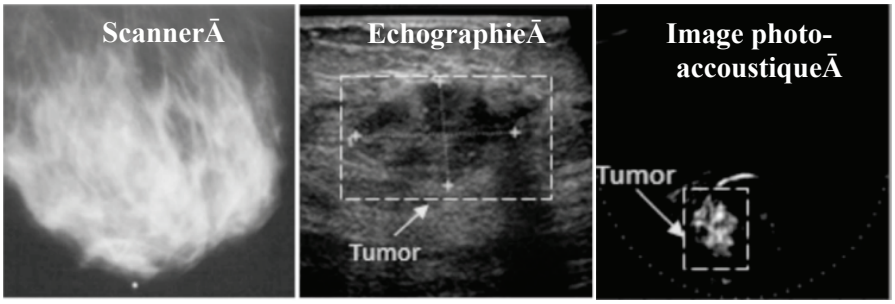


*Figure 12 : Scanner, échographie et image photo-acoustique d'une tumeur mammaire (Heijblom, M. et al. Optic Express **2012**)*[29c]

I.3.2. L'imagerie de luminescence Cherenkov : la radioactivité au service de l'imagerie optique

L'effet Cherenkov est un phénomène similaire à une onde de choc, lors duquel certains radioéléments émettent un rayonnement lumineux lors de leur désintégration. Il a longtemps été exploité pour la détection de particules subatomiques dans le domaine de l'astrophysique. Mais depuis quelques années, les chercheurs se sont intéressés à l'utilisation de ce phénomène pour des applications en imagerie médicale. Cette partie détaille le principe et les applications de l'imagerie par luminescence Cherenkov (Cherenkov Luminescence Imaging, CLI).

I.3.2.1. L'effet Valivov-Cherenkov

La première personne à avoir observé l'effet Cherenkov est Marie Curie en 1910, en montrant qu'une source radioactive dans l'eau pouvait produire de la lumière. Par la suite, les recherches de Pavel Cherenkov, Ilia Frank et Igor Tamn dans les années 40 permirent d'expliquer et d'établir les propriétés générales du phénomène, ce qui leur valut le partage du prix Nobel de physique de 1958. Cet effet est observable lorsque l'on regarde le cœur d'une centrale nucléaire, laissant apparaître une lumière bleutée qui correspond à la lumière Cherenkov (*figure 13*). Lorsque les particules chargées issues de la désintégration radioactive (β^+, β^- ou α) traversent un milieu diélectrique à une vitesse donnée (v), elles perdent de l'énergie par interaction avec ce milieu. Dans le cas où la vitesse des particules est **inférieure** à la vitesse de la lumière dans le milieu (la vitesse de la lumière dans ce milieu c_1 correspondant à la vitesse de la lumière dans le vide c sur l'indice de réfraction du milieu n), les molécules du milieu, d'orientation initiale, aléatoire, vont s'aligner avec la trajectoire de la particule (polarisation du milieu). Après son passage, elles vont retourner à un état de plus basse énergie par relaxation. Cependant, si la vitesse de la particule est **supérieure** à la vitesse de la lumière (vitesse de phase supraluminique), l'excédant d'énergie est plus important et les molécules se relaxent par émission de photons constituant un spectre continu dans le domaine de l'ultraviolet et du visible (*figure 14*) (*équation 2*).[30] Plus l'énergie cinétique de la particule émise est grande, plus l'effet Cherenkov sera important. De plus, l'émission dépend de l'indice de réfraction du milieu : la quantité de photons émise est croissante à mesure que l'indice augmente. Le front d'onde lumineuse émis, résultant de l'émission de toutes les molécules ayant relaxé, se déplace plus lentement que la vitesse de la lumière dans le

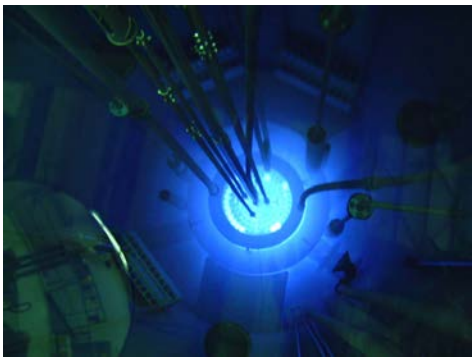


Figure 13 : Cœur d'un réacteur nucléaire montrant la lumière Cherenkov

milieu, et forme un cône lumineux centré sur la trajectoire de la particule et d'ouverture angulaire caractéristique (angle Cherenkov) (*équation 3*). Cet angle dépend également de la vélocité de la particule et de la nature du milieu.

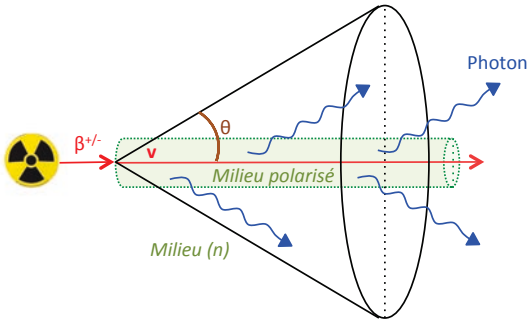


Figure 14 : Front d'onde lumineuse émis

$$\text{Si } v > c_1 = {}^{c}/_{n} \rightarrow \text{hv}$$

Équation 2 : Condition d'émission Cherenkov

$$cos\theta = \frac{1}{v \times {}^{n}/_{c}}$$

Équation 3 : Angle d'ouverture du cône d'émission Cherenkov

Notons qu'il est également possible de produire des photons par effet Cherenkov en envoyant des flux de photons X ou des flux d'électrons sur un milieu polarisable.[31]

I.3.2.2. Applications à l'imagerie médicale

Les chercheurs se sont récemment intéressés à la détection de la lumière Cherenkov pour des applications dans le domaine de la santé. Le terme « Cherenkov Luminescence Imaging » (CLI) a été proposé par Robertson et son équipe en 2009. Ils réalisèrent pour la première fois une image optique d'une souris en utilisant un traceur radioactif (^{18}F-FDG) et détecté par un dispositif d'imagerie ultrasensible (*figure 15 - gauche*).[32]

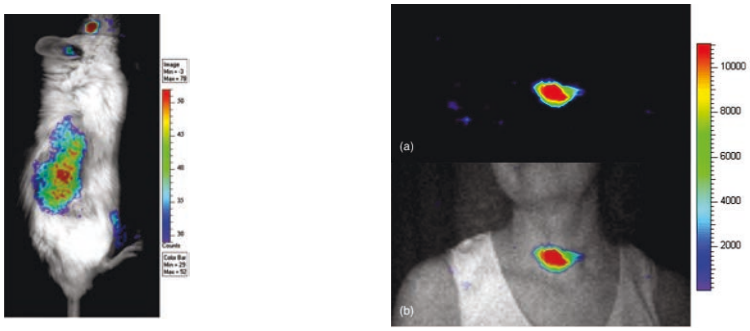


*Figure 15 : Première image Cherenkov sur petit animal (^{18}F-FDG, Robertson, R. et al, Phys. Med. Biol. **2009**)[32] (gauche) et première Cherenkographie humaine (^{123}I, Spinelli, A. E. et al., J. BioMed. Opt. **2013**)[33] (droite).*

Les études sur petit animal se sont ensuite multipliées, à travers l'utilisation de différents agents radioactifs et pour des applications variées.[34] En 2013, l'équipe de Spinelli a pu réaliser la première Cherenkographie humaine, en imageant la thyroïde d'une patiente avec de l'iode radioactif (^{123}I) et un appareillage adapté (*figure 15 - droite*).[33] Une étude de faisabilité clinique du CLI sur plusieurs

patients a récemment (2014) été mise en œuvre par les équipes de D. Thorek et J. Grimm. Elle s'est révélée concluante pour imager les ganglions lymphatiques.[35]

Comme pour les autres techniques d'imagerie, les premières technologies planaires ont laissé place à des méthodes permettant d'obtenir des informations en trois dimensions. C'est la tomographie de luminescence Cherenkov (Cherenkov Luminescence Tomography, CLT) qui livre des informations quantitatives tridimensionnelles.[36]

Plusieurs revues récentes retracent le développement du CLI, ses avantages et inconvénients, ainsi que ses applications.[37]

I.3.2.3. Avantages et inconvénients du CLI

Malgré leur utilité, les différentes sondes et techniques pour l'imagerie optique sont pour l'instant restreintes à une utilisation au stade préclinique, compte tenu notamment des problèmes de pénétrabilité des tissus et de toxicité des agents fluorescents. En comparaison, le CLI utilise des radiotraceurs déjà approuvés vis-à-vis des législations (AMM). De plus, dans cette technique, la source lumineuse est endogène (pas de laser). Ainsi, l'imagerie est plus profonde que pour les techniques optiques classiques, car les phénomènes de réflexion et d'auto-fluorescence conduisant à un important bruit de fond (dû à la source d'excitation) sont limités.[38]

Cependant, contrairement aux imageries de fluorescence classiques, le CLI utilise des radioéléments, ce qui nécessite de prendre en compte les temps de demi-vie, et peut conduire à une diminution du signal au court du temps. Cela nécessite également la prise en compte de certaines contraintes liées à la radioprotection. D'autre part, la quantité de lumière produite par effet Cherenkov est bien inférieure à celle issue de l'excitation d'un fluorophore, ceci pour une même quantité d'agent actif. Et comme la dose injectable d'agent radioactif est rapidement limitée compte tenu de la toxicité de certaines radiations, ceci limite donc la quantité de signal qui pourra être détectée. Pour finir, quel que soit le radioélément, le domaine d'émission se situe hors de la fenêtre thérapeutique, ce qui rend difficile une imagerie profonde. Mais en comparaison des imageries scintigraphiques, c'est une technique plus rapide, moins chère, au même titre que l'imagerie optique (sec-min), et qui permet d'imager plusieurs souris de façon simultanée.

En combinaison avec des équipements de détection optique adaptés, le CLI semble donc une technique d'imagerie moléculaire prometteuse pour les études précliniques voire même la transposition en milieu clinique, compte tenu de sa bonne sensibilité, de sa facilité d'utilisation, des temps d'acquisition courts et de son prix réduit.

I.3.2.4. Applications et perspectives du CLI

L'imagerie Cherenkov possède des caractéristiques avantageuses qui ont permis d'envisager différentes applications :

* L'application potentielle majeure du CLI à ce jour reste l'**imagerie tumorale**. Le ^{18}F-fluorodehydroxyglucose (^{18}F-FDG) est un radiotraceur utilisé en TEP ayant déjà fait ses preuves en cancérologie : détection, suivi de tumeur, suivi de thérapie. Cet agent est également utilisable en CLI, comme l'ont montré les équipes de Robertson et d'autres sur des souris, puis l'équipe de Thorek sur l'homme, et ceci pour la même application mais avec des avantages notables (temps, coût).[32,35,39] D'autres agents scintigraphiques ont également été testés pour une application similaire (^{18}F-FLT, ^{123}I, ^{89}Zr-DFO-Trastuzumab) (imagerie de tumeur ou suivi d'efficacité de traitement).[33,39-40] De plus, un agent Cherenkov est intrinsèquement bimodal, car il est également avant tout un agent pour les scintigraphies (TEP ou TEMP). Ainsi, les études de biodistribution en CLI peuvent être co-validées par des études de tomographies radioactives.[34a]

* Un des problèmes du traitement cancéreux par Radio-ImmunoThérapie (RIT) réside dans la difficulté de visualisation de la **biodistribution de l'agent radiothérapeutique**. Ces agents étant des émetteurs énergétiques β^-, il est cependant possible de connaître leur distribution grâce au CLI, comme l'ont montré plusieurs équipes.[41]

* Le CLI est également envisageable comme alternative au BLI pour l'**expression de gènes rapporteurs**, car plus économique et plus simple à mettre en œuvre.

* Au même titre que l'imagerie de fluorescence (FRI), cette technique est envisageable pour l'**assistance à la chirurgie** lors de l'excision tumorale. Des essais d'endoscopie Cherenkov ont par exemple été réalisés dans cet objectif sur le petit animal. La dose radioactive doit cependant être faible pour ne pas induire de nocivité pour le chirurgien.[42]

* Plus récemment, plusieurs équipes ont démontré qu'il était possible d'utiliser les radiations Cherenkov comme une source lumineuse interne pour l'excitation de composés fluorescents (Cherenkov Radiation Emission Transfer, CRET), notamment pour décaler la zone d'émission vers le proche infrarouge.[43] Cet aspect, ouvrant de nombreuses portes dans le domaine de la recherche, sera plus détaillé au début du chapitre III.

Partie II : Transport et distribution spécifique d'une sonde imageante, constitution d'un agent d'imagerie médicale

Chaque technique d'imagerie présentée précédemment peut utiliser des composés permettant d'améliorer l'image ou de délivrer des informations inédites : les agents d'imagerie. Dans le cas des structurales, ces agents sont distribués uniformément dans le corps et ont pour rôle d'augmenter la qualité d'image. Dans le cas de l'imagerie moléculaire, le fragment émetteur du signal doit être sélectivement distribué dans une zone d'intérêt au moyen d'un vecteur afin d'obtenir des informations d'ordre fonctionnel (*figure 16*). Cette deuxième partie aborde donc le principe de ciblage des agents d'imagerie dans le cadre du cancer, et les différents types d'agents associés. La nature de la partie imageante capable de délivrer le signal sera abordée dans la partie suivante (*partie III*).

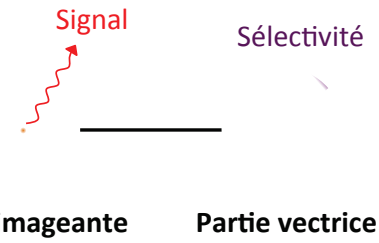


Figure 16 : Constitution d'un agent d'imagerie moléculaire

II.1. Les modes de ciblage d'une zone tumorale et agents associés

II.1.1. Les caractéristiques d'une tumeur cancéreuse

Les tumeurs cancéreuses sont caractérisées par des cellules de croissance et de reproduction rapide, ansi que par la capacité à former des métastases, ce qui induit des différences notables avec les tissus sains. Dans leur revue « The Hallmarks of cancers » (2000), D. Hanahan et R. Weinberg ont classé en six catégories les capacités distinctives des cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines :[44]

* L'**autosuffisance en signaux de croissance** : les cellules cancéreuses sont capables de produire elles-même leurs signaux de croissance et les récepteurs associés.
* L'**insensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance** : la croissance cellulaire est normalement régulée par ces signaux.
* La **capacité à éviter l'apoptose** (mort cellulaire).
* L'**immortalité** : contrairement au cellules saines, les cellules tumorales peuvent se répliquer sans limite.

* L'**induction de l'angiogénèse** : les cellules cancéreuses expriment des signaux induisant un développement anormal du système vasculaire.
* La **capacité à former des métastases**.

En 2011, les auteurs ont ensuite étendu leur classification en ajoutant deux catégories et deux caractéristiques favorisant le cancer, pour obtenir un classement en dix caractéristiques : la **dérégulation du métabolisme énergétique cellulaire**, la **capacité à éviter une destruction par le système immunitaire**, l'**inflammation** favorisant les tumeurs, l'**instabilité et les mutations du génome.** [45]

Chacune de ces particularités induit des expressions génétiques, enzymatiques, métaboliques, uniques ou surexprimées dans le cas de cellules cancéreuses qui peuvent être utilisées comme cible thérapeutique. Par exemple, les récepteurs HER-2 (Hepidermal Growth factor) sont exprimés dans certains cas de cancer du sein pour la détection des signaux de croissance. Le bloquage de ces récepteurs au moyen d'un agent exogène approprié (anticorps) permet d'inhiber la croissance tumorale. De la même manière, le marquage de cet anticorps avec une sonde fluorescente ou radioactive permet de cibler et imager la tumeur. La plupart des processus de développement des cellules tumorales induit l'expression de signaux et récepteurs spécifiques. Ainsi, il est possible d'utiliser une multitude de cibles pour la mise au point d'agents d'imagerie vectorisés (récepteurs, transporteurs, enzymes, protéase,…).

D'autre part, l'hypervascularisation, cause de l'angiogénèse, induit un système vasculaire anormalement développé dans le but d'améliorer le transport des facteurs de croissance et des nutriments. Ainsi, les vaisseaux irrigant la zone maligne sont caractérisés par une paroi d'une plus grande perméabilité et par un faible drainage lymphatique. Ceci favorise notamment l'accumulation de particules de tailles données (100-200 nm) dans les tumeurs ; on parle d'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention). Cette caractéristique, toutefois controversée car dépendante du type de tumeur, constitue également une voie d'intérêt pour distribuer un agent d'imagerie dans une zone tumorale.

Par souci de clarté et de lisibilité, les agents d'imagerie ont ici été regroupés selon leur mode de ciblage.

II.1.2. Mode de ciblage

De manière schématique, il est possible de classer les agents d'imagerie en trois catégories associées aux techniques d'imagerie et agents de contraste qui nous concernent (*tableau 3*) :

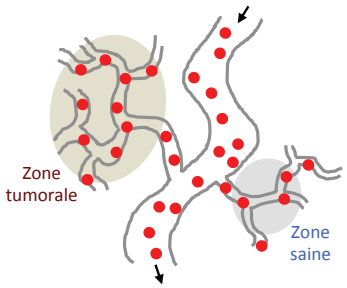
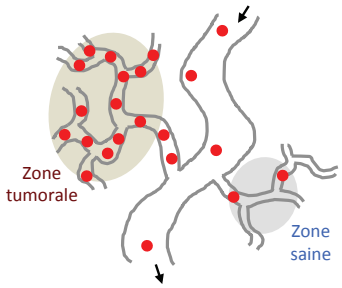
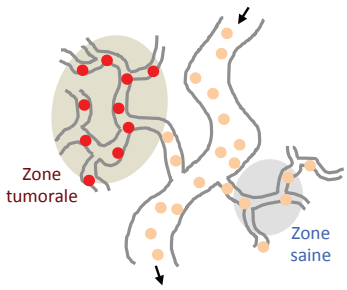
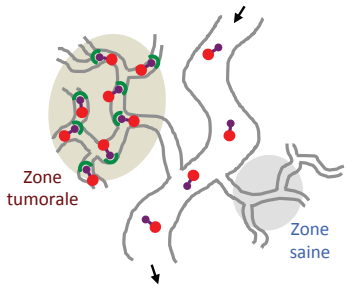
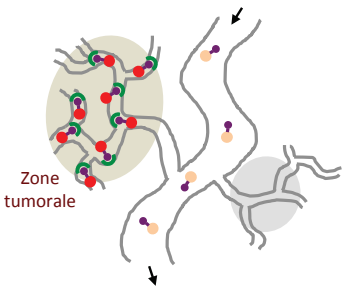
(A) Agents non ciblants	 Répartis uniformément dans les tissus	Légende Sonde imageante toujours ON Sonde imageante ON/OFF Sonde imageante vectorisée Sonde ON/OFF vectorisée Récepteurs
(B) Ciblage passif	 Accumulation supérieure dans la zone tumorale par effet EPR	 Activité imageante seulement dans la zone tumorale par activation
(C) Ciblage actif	 Distribution sélective dans la zone tumorale (vectorisation)	 Agents activables vectorisés

Tableau 3 : Les différents modes de ciblages : non-ciblant (A), agents dépendants du micro-environnement (B) et ciblant des récepteurs (D) (adaptée de Licha, K.et al. Drug Dicov. Today: Technol. ***2011****)*[46]

Drug disc(**A**) Les **agents non ciblants** (ou non spécifiques) sont distribués uniformément dans le corps. Ils permettent seulement de renforcer le contraste entre les différents tissus pour obtenir une image de meilleure qualité. Ils sont notamment utilisés dans les imageries de type structural (IRM, échographie, radiographie).

- (**B**) Les **agents à ciblage micro-environnemental (ciblage « passif »)** : ils se basent sur les caractéristiques différentes du micro-environnement tumoral par rapport à des tissus sains, tels que l'effet EPR ou des pH acides (conséquence de l'angiogénèse, de la dérégulation du métabolisme énergétique). On retrouve dans cette catégorie les agents activables, c'est à dire actifs (ON) dans la

zone tumorale et inactifs (OFF) dans la zone saine. Dans le cas de l'effet EPR, ce sont des nanoparticules. Celles-ci peuvent être actives dans une modalité d'imagerie ou de thérapie (microbulles, quantum dots, nanoparticules d'oxyde de fer, de gadolinium, d'or) ou bien servir de simple transporteur de l'agent d'intérêt (liposomes, nanoparticules de silice, dendrimères).

- (**C**) Les **agents à ciblage actif** (ou agents spécifiques) sont des biomolécules sélectives de récepteurs surexprimés à la surface des cellules cancéreuses ou intervenant dans les processus enzymatiques ou de métabolisation (conséquence de l'autosuffisance, de l'immortalité,…).

Les deux dernières approches sont primordiales pour délivrer des informations fonctionnelles, et sont donc systématiquement utilisées pour les techniques d'imagerie moléculaire (imagerie optique, scintigraphies).

Notons qu'il est possible de combiner un ciblage du micro-environnement tumoral avec un ciblage actif pour une plus grande sélectivité. C'est souvent le cas pour les nanoparticules, qui peuvent être biovectorisées afin de combiner l'effet EPR et le ciblage de récepteurs.[47]

II.1.3. Cas particulier des agents à ciblage passif

II.1.3.1. Les nanomatériaux et l'effet EPR

Lorsque la taille des nanomatériaux est contrôlée, ils bénificient de l'effet EPR qui permet une biodistribution avantageuse. Ils sont égalemment adaptés pour introduire plusieurs fonctionnalités (modalité supplémentaire, entité de reconnaissance).[48] Cependant, l'utilisation des particules *in vivo* est parfois limitée par la toxicité des métaux qui les composent. L'effet EPR est avantageux pour une accumulation dans une zone tumorale mais rend souvent l'élimination difficile (lente). Cet effet varie cependant selon le type de tumeur, il est même inexistant pour certaines, ce qui n'a à ce jour pas pu être completement rationnalisé.

Dans la plupart des cas, l'utilisation des nanoparticules nécessite une fonctionnalisation de surface pour rendre l'objet soluble et furtif afin d'augmenter son temps de résidence dans le corps et ainsi bénéficier de l'effet EPR (ex : greffage de chaîne polyéthylène glycol, PEG). Dans le cas contraire, le système immunitaire reconnaît les corps étrangers qui sont rapidement éliminés par l'action des macrophages.[49]

II.1.3.2. Les agents activables : mode d'activation

Le principe d'un agent activable repose sur l'émission d'un signal détectable provoqué par l'action d'un stimulus *in vivo*. On appelle ce type d'agent « sonde intelligente », ou « smart-probes » en anglais. Afin d'obtenir une sélectivité entre zone saine et zone tumorale, ce stimulus doit être

spécifique ou surexprimé dans le cas des cellules cancéreuses. De plus, l'agent doit être « ON », c'est à dire actif, dans les zones tumorales (sous l'action du stimulus), et OFF, soit inactif, dans l'environnement sain.[46,50]

Il existe différentes caractéristiques micro-environnementales exploitables pour mettre au point des agents activables (*schéma 1*), notamment : une **différence de pH** (A), la **présence d'agents oxydants** (B), la **présence de substrats spécifiques** (C), la **présence d'enzymes spécifiques** (C).

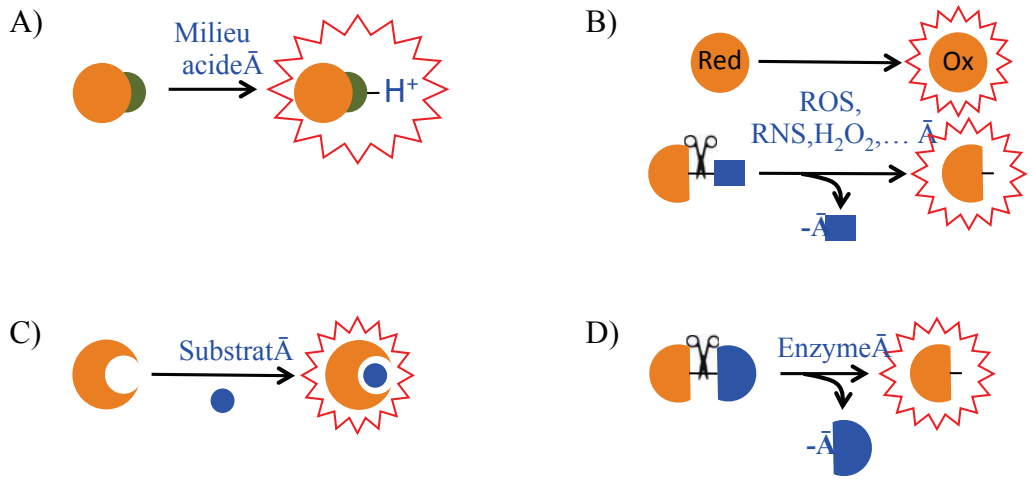


Schéma 1 : A) Activation en milieu acide ; B) Activation par oxydation ; C) Activation par intéraction avec un substrat ; D) Activation enzymatique (adaptée de Terai, T. et al, Eur. J. Physiol. ***2013****)*[51]

II.1.4. Cas particulier des agents ciblant des récepteurs

Comme mentionné précédemment, il existe différents types de cibles biologiques pour imager le cancer, et donc plusieurs récepteurs associés. Selon le cas, les agents permettant de visualiser ces récepteurs peuvent être des petites molécules, des peptides ou fragments peptidiques, des aptamères, des fragments d'anticorps ou des anticorps entiers.[8b]

II.1.4.1. Les petites molécules

Il existe de nombreuses petites molécules pouvant jouer le rôle de vecteur biologique. Ce sont dans la plupart des cas des métabolites ou des principes actifs :

- les sucres (glucose, galactose, fructose,…)
- les acides aminés et dérivés (ex : L-DOPA)
- les antagonistes de récepteurs de stéroides (ex : le mifeprisone, un antagoniste de la progesterone)
- les neurotransmetteurs : dopamine, serotonine
- les inhibiteurs de métalloprotéinase (MMP) (ex : Prinamast®)

- les vitamines (vitamine B9 : folate ; vitamine B8 : biotine)
- la nicotine, le flumazenil,…

Le marquage de ces molécules par une sonde imageante permet ainsi de distribuer cette sonde pour détecter une activité métabolique, enzymatique, ou l'expression de récepteurs surexprimés par les cellules cancéreuses. Cependant, plus l'agent imageant sera de taille importante par rapport à la molécule vectrice, plus la reconnaissance sera diminuée. Cette approche est donc particulièrement adaptée pour le marquage par un radioélément afin d'obtenir un agent d'imagerie scintigraphique.

II.1.4.2. Les peptides

Les peptides utilisés pour la vectorisation d'une sonde imageante sont généralement des analogues synthétiques de peptides naturels présents dans le corps et spécifiques de certains récepteurs protéiques surexprimés dans le cas du cancer (*tableau 4*). Bien que la partie de reconnaissance doive rester inchangée, il est possible de modifier certains acides aminés périphériques notamment pour introduire la partie imageante tout en limitant la perte d'affinité avec la cible.

Récepteur cible	**Peptide**	**Principal analogue synthétique**	**Type de tumeur**
Récepteur à la Somatostatine (sst1-sst5)	Somatostatine	Octréotide (OC)	Neuroendocrines, gastro-entéro-pancréatiques, carcinomes, paragangliomes, mélanomes, seins, cerveau, poumon
GRPR (Gastrin-Releasing Peptide Receptor)	Bombésine	Bombésine 7-14 (BBN(7-14))	Prostate, seins, pancréas, poumon, gastro-intestinal, colorectal
Intégrine $\alpha_v\beta_3$	RGD	Cyclo-RGD	Gliome, poumon, prostate

*Tableau 4 : Quelques exemples de récepteurs surexprimés dans les cancers, peptides naturels, analogues synthétiques et types de tumeur associés (Fani, M. et al. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging **2012**)*[52]

Leur développement dans le domaine de l'imagerie connait un essor notable car ils sont hautement spécifiques, facilement synthétisables et modifiables. Ils sont également rapidement éliminés par le corps par voie rénale, ce qui ne pose pas de problèmes liés à la rétention. La nature du peptide est également adaptable au récepteur qui est visé, et donc au type de cancer que l'on souhaite diagnostiquer.

II.1.4.3. Les anticorps et fragments d'anticorps

Les anticorps monoclonaux (mAbs) sont également largement utilisés en imagerie médicale comme vecteur biologique.[53] Le trastuzumab (Herceptin®, Roche), qui cible les récepteurs HER-2, a par exemple été étudié pour la vectorisation de sondes fluorescentes ou scintigraphiques dans le cas du cancer du sein.[54] Ce type de vectorisation est cependant limité par une distribution lente dans la tumeur. Dans le cas de l'association avec un radioélément détectable en scintigraphie, cela peut poser problème en considération de la demi-vie du radioisotope. Ils bénéficient cependant d'une haute spécificité et d'une faible toxicité, mais leur élimination après analyse est lente. Les fragments d'anticorps (minibodies, diabodies) permettent de pallier certains de ces problèmes car leur accumulation et leur élimination sont beaucoup plus rapides.

II.2. Association de la sonde imageante avec un vecteur biologique ou une nanoparticule : outils chimiques

Afin de lier covalentement la sonde imageante avec un vecteur biologique, des outils chimiques appropriés ont été développés par la communauté scientifique. Cela nécessite dans la plupart des cas d'introduire sur le fragment imageant une fonction de choix, appelée fonction de greffage (FG), capable de cibler spécifiquement un site résiduel naturel du biovecteur. Ces outils sont également utiles à la fonctionnalisation de surface des diverses nanoparticules utilisées en imagerie médicale (USPIO, QD, liposome,…).[55]

Des approches plus récentes consistent à amener un groupement réactif artificiel sur la biomolécule ou la particule. Celui-ci est capable de réagir plus rapidement et plus spécifiquement avec une sonde possédant le groupement complémentaire approprié, sans pour autant être réactif vis-à-vis des différents sites résiduels de la biomolécule ou de la particule.[56]

II.2.1. Les techniques classiques de biovectorisation

Les résidus biologiques ciblés pour marquer une biomolécule sont généralement de type amine (résidu lysine) et thiol (résidu cystéine) dans le cas des peptides et des anticorps. Les fonctions de greffage alors utilisées peuvent par exemple être des esters de maléimide, des esters activés ou des isothiocyanates (*tableau 5*).[52a] Mais il est également possible d'utiliser les résidus tryptophane ou tyrosine par des méthodes moins conventionnelles, comme des couplages catalysés par des métaux.

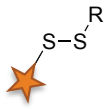
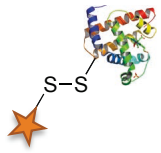
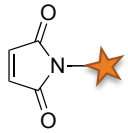
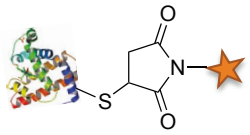
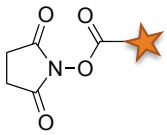
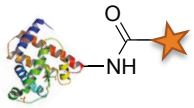
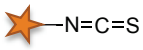
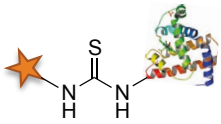
Résidus	Fonction de greffage (FG)	Produit
Cystéine (SH)	Dithiol 	
	Maléimide 	
Lysine (NH_2)	Ester de NHS 	
	Isothiocyanate (NCS) 	

Tableau 5 : Exemples de fonctions de greffage ciblant les résidus cystéine et lysine, et produits formés (adaptée de McKay, C. S. and Finn, M. G., Chem. Biol. ***2014****)*[55d]

II.2.2. La chimie click

Les cyclisations de type 1,3-dipolaires ont notamment été découvertes et étudiées par Huisgen dans les années 60.[57] Mais le terme « click » n'a été introduit que récemment par B. Sharpless et concerne plus particulièrement la condensation d'un alcyne terminal avec un azoture en présence de cuivre (I) pour former un cycle triazole (*schéma 2*).[58]

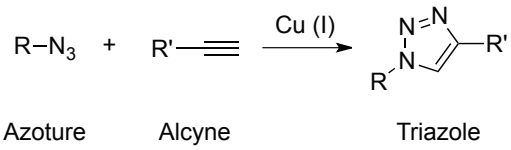


Schéma 2 : Réaction de type Huisgen catalysée au cuivre (I) (Kolb. H. C. Angew. Chem. Int. Ed. ***2001****)*[58]

Cette réaction trouve des applications dans de nombreux domaines, parmi lesquels la bioconjugaison appliquée à l'imagerie médicale. Cela nécessite cependant d'introduire préalablement la fonction artificielle alcyne ou azoture sur la biomolécule en utilisant les techniques conventionnelles (*schéma 3*), ou par génie génétique grâce à des acides aminés non naturels.

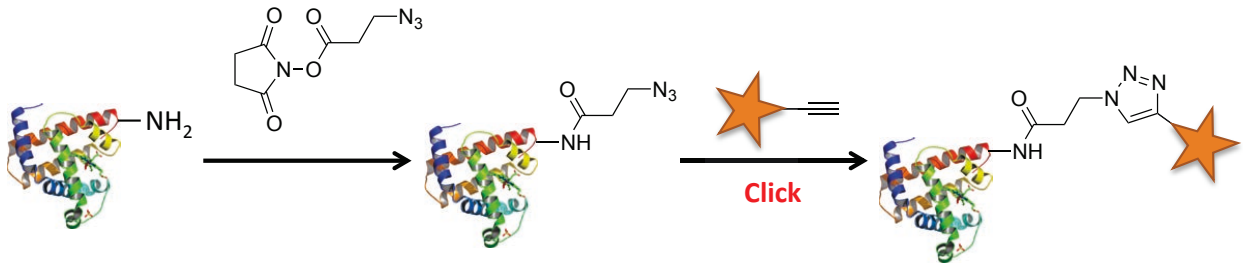


Schéma 3 : Exemple de méthode de biovectorisation en deux temps par chimie click

II.2.3. La chimie bioorthogonale et l'approche dite « site specific »

Le terme de chimie bioorthogonale, introduit par C. Bertozzi, désigne les réactions chimiques pouvant se produire à l'intérieur de systèmes vivants sans interférer avec les processus biologiques naturels. Il regroupe un certain nombre de réactions de la catégorie des cycloadditions, comme par exemple la « chimie click sans cuivre », qui met en œuvre les cyclooctynes, ou la réaction de condensation d'une tétrazine avec un alcène (*schéma 4*).[55b-d,56]

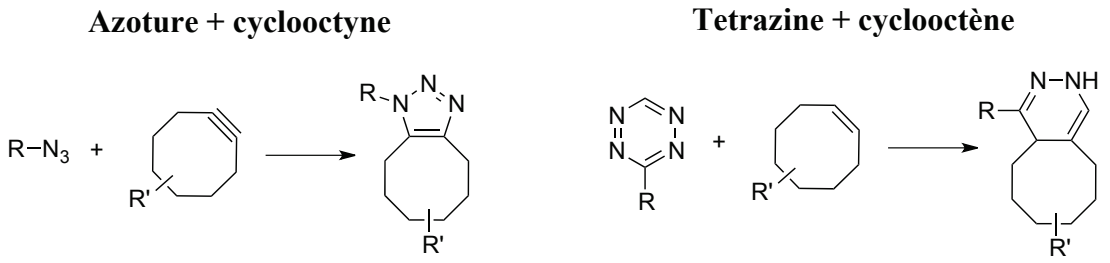


Schéma 4 : Réaction de chimie click sans cuivre entre un azoture et un cyclooctyne (gauche) et réaction d'une tétrazine avec un cyclooctène (droite) (McKay, C. S. and Finn, M. G., Chem. Biol. ***2014****)*[55d]

Un exemple d'utilisation de cette chimie bioorthogonale consiste à pré-modifier la biomolécule d'intérêt par bio-ingénierie afin d'introduire l'agent d'imagerie sur un site spécifique (« site specific ») en réalisant la réaction *in vivo*. Ces réactions trouvent ainsi de nombreuses applications dans le domaine de l'imagerie médicale. Elles permettent par exemple de marquer efficacement les membranes cellulaires avec un composé fluorescent par pré-ciblage (« pre-targeting »).[59]

Bien que ces réactions aient notamment été développées pour avoir lieu *in vivo*, elles sont également utilisées *in vitro* pour le marquage de biomolécules ou pour la fonctionnalisation de particules.[60]

Partie III : Les différents types de sondes imageantes et exemples d'agents d'imagerie médicale

Cette partie décrit plus précisement la nature de l'entité imageante (sonde) constituant un agent d'imagerie médicale et propose des exemples d'association de cette sonde avec un vecteur biologique. Les agents d'imagerie sont classifiables en plusieurs catégories selon la nature de la partie responsable du signal : échogènes, iodés, paramagnétiques, radioactifs, fluorescents. Seuls les agents associés à l'IRM, aux scintigraphies, à l'imagerie Cherenkov et aux imageries de fluorescence seront abordés.

III.1. Les agents de contraste paramagnétiques pour l'IRM

Comme énoncé précédemment, il existe deux types d'agents de contraste pour l'IRM :

* les agents influençant majoritairement la valeur de relaxivité longitudinale (T_1) qui sont principalement des complexes de métaux paramagnétiques.
* les agents influençant majoritairement la valeur de relaxivité transversale (T_2) qui sont principalement des nanoparticules d'oxydes métalliques.

III.1.1. Les complexes de métaux paramagnétiques

Les métaux utilisés en IRM sont très toxiques lorsqu'ils sont sous forme d'ions libres dans l'organisme. C'est pourquoi ils se doivent d'être complexés par un ligand organique adapté pour former un complexe non toxique stable. Ainsi, les agents de contraste IRM T_1 se présentent sous la forme de complexes organiques de métaux paramagnétiques. Ces complexes vont permettre de modifier la relaxation des protons d'une ou de plusieurs molécules d'eau par interaction avec le centre métallique du complexe et formation d'une liaison de coordination. Cette molécule d'eau coordinée est ensuite échangeable avec d'autres molécules d'eau du milieu qui vont alors subir à leur tour l'effet du centre métallique. Plusieurs paramètres influencent la valeur de relaxivité du complexe (*schéma 5*) :

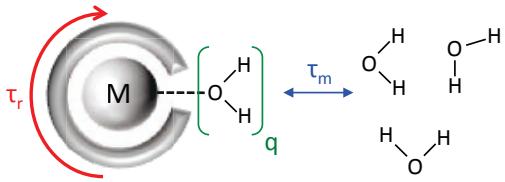


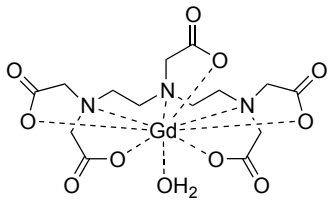
Schéma 5 : Facteurs influençant la relaxivité des complexes métalliques paramagnétiques (adaptée de Raymond, K. N. et al. Bioconjugate Chem. ***2005****)*[61]

* Le **nombre de molécules d'eau** directement coordinées au métal (q).
* Le **temps moyen de résidence** des molécules d'eau (τ_m).
* Le **temps de corrélation rotationnel**, qui traduit la vitesse à laquelle le complexe tourne sur lui même (τ_r).

La valeur de relaxivité sera la plus importante lorsqu'il y aura le maximum de molécules d'eau coordinées (q élevé), une vitesse d'échange ($1/\tau_m$) rapide, et pour des complexes de grosse taille une vitesse de rotation ralentie ($1/\tau_r$).[61-62]

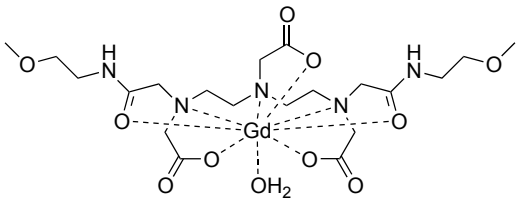
III.1.1.1. Les complexes de gadolinium

Dans le cas du gadolinium, qui est utilisé dans 95 % des examens IRM, les agents chélatants les plus utilisés pour piéger le centre métallique sont les polyaminocarboxylates linéaires (DTPA) ou cycliques (DOTA), la version cyclique conduisant généralement à des complexes plus stables. Leur valeur de relaxivité est généralement comprise entre 4 et 10 $mM^{-1}.s^{-1}$ (*figure 17*).[62b]



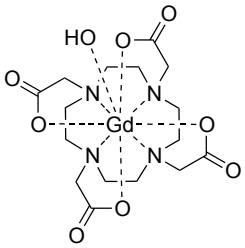
Magnevist® (Bayer Schering Pharma)

log K : 22,1 / r_1 = 4,1 $mM^{-1}.s^{-1}$



Omniscan® (GE Healthcare)

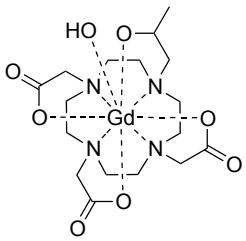
log K : 16,9 / r_1 = 4,3 $mM^{-1}.s^{-1}$



Dotarem® (Guerbet)

log K : 25,8

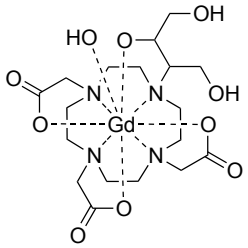
r_1 = 3,6 $mM^{-1}.s^{-1}$



ProHance® (Bracco)

log K : 23,8

r_1 = 4,1 $mM^{-1}.s^{-1}$



Gadovist® (Bayer Schering Pharma)

log K : 21,8

r_1 = 4,7 $mM^{-1}.s^{-1}$

Figure 17 : Structures et caractéristiques des principaux agents de contraste commerciaux à base de gadolinium (III) (constante de stabilité thermodynamique log K, relaxivité longitudinale r_1 à 1,5 T) (adaptée de Werner, E. J. et al. Angew. Chem. Int. Ed. ***2008****)*[62b]

Après injection, ils vont très rapidement être distribués dans le corps, notamment dans le plasma et les espaces extravasculaires. Ils sont ensuite éliminés en quelques heures par les reins, compte tenu de leur fort caractère hydrophile.

La recherche dans le domaine des nouveaux complexes de gadolinium pour l'IRM s'oriente aujourd'hui vers la préparation d'agents chélatants permettant l'accès à plusieurs molécules d'eau et possédant une vitesse d'échange supérieure, comme par exemple les complexes d'hydroxypyridinone (HOPO).[61] Les travaux de recherche visant à augmenter la taille des complexes dans le but de diminuer la vitesse de rotation du système ($1/\tau_r$) et d'accroître la relaxivité sont également très prometteurs. La stratégie consiste à créer des systèmes mono ou multi-métalliques en liant covalentement un ou plusieurs complexes de gadolinium à de petites molécules (espaceurs polyfonctionnels) et/ou de plus grosses molécules (protéines, dendrimères, polymères, virus capsules, liposomes,…).[62b,63]

III.1.1.2. Les complexes d'autres métaux paramagnétiques

Les complexes de manganèse ont également été étudiés pour des applications en IRM (Manganese-Enhanced Magnetic Resonance Imaging, MEMRI). Le seul agent commercial à base de manganèse est le Teslascan® (Mn^{2+}, ligand dipyridyloxy diphosphate). Sa valeur de relaxivité est faible (r_1 = 1,5 $mM^{-1}.s^{-1}$ à 4,7 T) car il ne possède pas de molécule d'eau directement coordinée au métal.[64] Les complexes de lanthanides autres que le gadolinium sont également très étudiés et semblent prometteurs. Des travaux récents ont par exemple montré que certains cryptates d'europium permettaient d'obtenir des relaxivités longitudinales allant jusqu'à 7,17 $mM^{-1}.s^{-1}$ à 7 Tesla.[65]

III.1.2. Entre complexe métallique et particule : les liposomes magnétiques

Les liposomes sont des vésicules formées de composés amphiphiles organisées de manière structurée afin que la tête polaire s'oriente vers la phase aqueuse et que les chaînes grasses se regroupent entre elles. Alors que les micelles sont composées d'une simple couche formant une sphère dont l'intérieur est organique, les liposomes s'organisent en bicouche, mimant les membranes cellulaires, et formant un cœur hydrophile (*figure 18*).

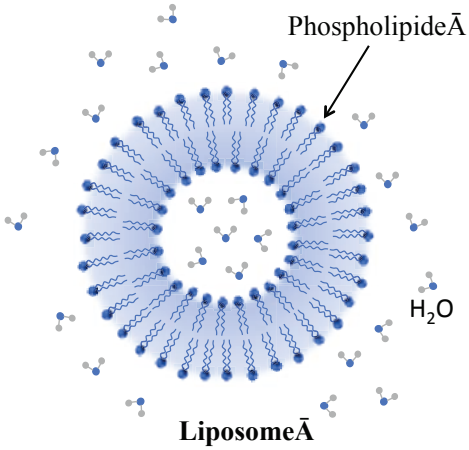
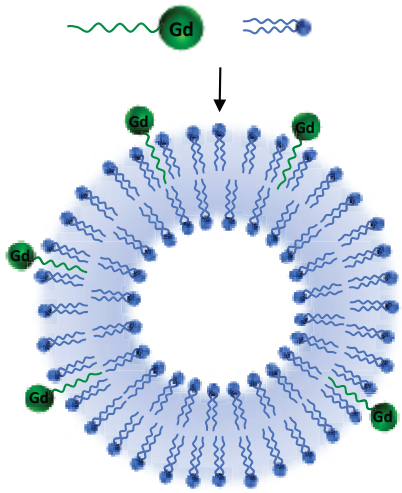


Figure 18 : Structure d'un liposome

L'encapsulation de complexes de gadolinium dans la bicouche ou dans le lumène aqueux d'un liposome conduit généralement à une baisse de relaxivité de l'agent de contraste. En effet, bien que la membrane synthétique du liposome soit perméable, le transport des molécules d'eau à travers celle-ci est limité. Au contraire, lorsque le liposome est formé en présence de dérivés amphiphiles

possédant un complexe de gadolinium comme tête polaire (Gd-DTPA, Gd-DOTA,…) et une queue apolaire (chaîne longue, stérol,…), la valeur de relaxivité est augmentée (*tableau 6*). Ceci s'explique par la modification du temps de corrélation rotationnel, le système obtenu étant beaucoup plus volumineux par rapport au complexe seul.[63a,66]



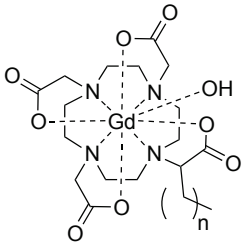
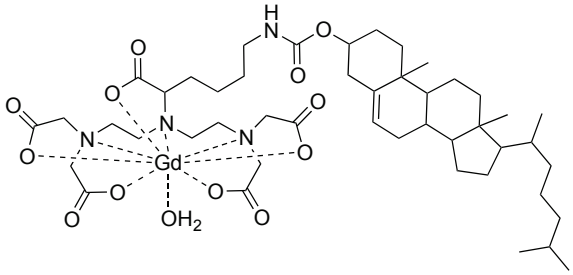
		r_1 ($mM.s^{-1}$)
	n = 9	9,3
	n = 11	17,2
	n = 13	21,5
		27,2

*Tableau 6 : Exemples de magnétoliposomes formés à partir de dérivés DOTA-Gd (Accardo, A. et al. Coord. Chem. Rev. **2009**)*[63a]

III.1.3. Les nanoparticules d'oxyde de fer

Les nanoparticules d'oxyde de fer utilisées en IRM sont composées d'un cœur de magnétite (Fe_3O_4) ou maghémite (Fe_2O_3). En milieu physiologique, elles induisent une inhomogénéité magnétique locale qui déphase les spins des protons des molécules d'eau, réduisant ainsi leur temps de relaxivité transversale T_2. Ces particules sont classées en plusieurs catégories de taille :

* Les **MPIO** (Micrometer-sized Paramagnetic Iron Oxyde), nanoparticules de l'ordre du micromètre.
* Les **SPIO** (Super Paramagnetic Paramagnetic Iron Oxyde), dont la taille est de quelques centaines de nanomètres.
* Les **USPIO** (Ultrasmall Super Paramagnetic Paramagnetic Iron Oxyde), qui sont de taille inférieure à cinquante nanomètres.
* Les **VSOP** (Very Small superParamagnetic iron Oxyde Particle), de taille inférieure à dix nanomètres.

La taille de la particule va conditionner son temps de résidence dans le corps : les très petites et les grosses particules seront plus rapidement éliminées. Cette taille conditionne également la valeur de relaxivité transversale de la particule.

Afin d'augmenter la solubilité et la biocompatibilité de l'objet, il est généralement recouvert d'une enveloppe qui peut être inorganique (silice, phosphates, or) ou organique (PEG, Chitosan, Dextran, polyethyleneimine,…).[67] Il existe plusieurs catégories de particules selon le type et le mode d'incorporation du manteau protecteur (*figure 19*) :[68]

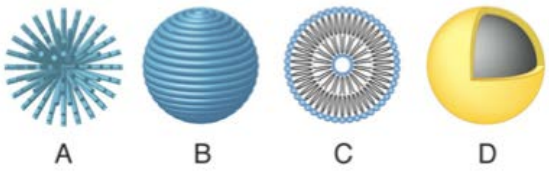


Figure 19 : Les différents types de couvertures de nanoparticules (Sun, C. et al. Adv. Drud Deliv. Rev. ***2008****)*[68]

(A) Les nanoparticules recouvertes de polymères liés en bout de chaîne ;
(B) Les nanoparticules complètement encapsulées dans le polymère ;
(C) Les nanoparticules encapsulées dans un liposome ;
(D) Les « core-shell » nanoparticules.

Les particules les plus étudiées pour des applications cliniques sont les CLIO (Cross Linked Dextran loated Iron Oxyde Nanoparticles) qui font partie de la catégorie B. La couverture de type dextran permet une post-fonctionnalisation relativement aisée.[69] De nombreux produits de contraste commerciaux à base de nanoparticules d'oxydes de fer ont été développés. Le *tableau 7* en donne quelques exemples.

Nom commercial	Enveloppe	Diamètre du coeur	Diamètre de la particule	Relaxivité transversale r_2 ($mM^{-1}.s^{-1}$ à 1,5 T)
Feridex® (Guerbet)	Dextran	4,96 nm	160 nm	120
Resovist® (Shering)	Carboxydextran	4,00 nm	60 nm	186
Combidex® (Advance Magnetics)	Dextran	5,85 nm	35 nm	65

Tableau 7 : Exemples d'agents de contraste commerciaux à base de nanoparticules de fer et leurs caractéristiques (Laurent, S. et al. Chem. Rev. ***2008****)*[67a]

Ces différents agents ont fait leurs preuves dans le domaine de l'imagerie tumorale comme dans d'autres domaines d'intérêt médical.[67a,68] Leur application clinique reste cependant limitée compte tenu de leur toxicité et de leur temps de rétention trop long.

III.1.4. Vers l'IRM moléculaire : activation et vectorisation des agents paramagnétiques

Avec le développement de l'imagerie moléculaire, les chercheurs se sont tournés vers la mise au point d'agents IRM permettant d'obtenir des informations d'ordre fonctionnel. Trois stratégies sont alors possibles : l'utilisation d'agents dits activables, d'agents PARACEST, ou la biovectorisation de la sonde paramagnétique.

III.1.4.1. Agents IRM intelligents

Il est possible de mettre au point des agents IRM sensibles à certaines conditions physiologiques (pH, métabolisme, expression génétique, phénomènes d'oxydo-réduction,…).[70] Dans la plupart des cas, le principe repose sur la saturation de la sphère de coordination du métal par un ligand sensible à un stimulus ou par l'encombrement stérique du métal pour empêcher l'accès de la molécule d'eau (*figure 20 - gauche*).

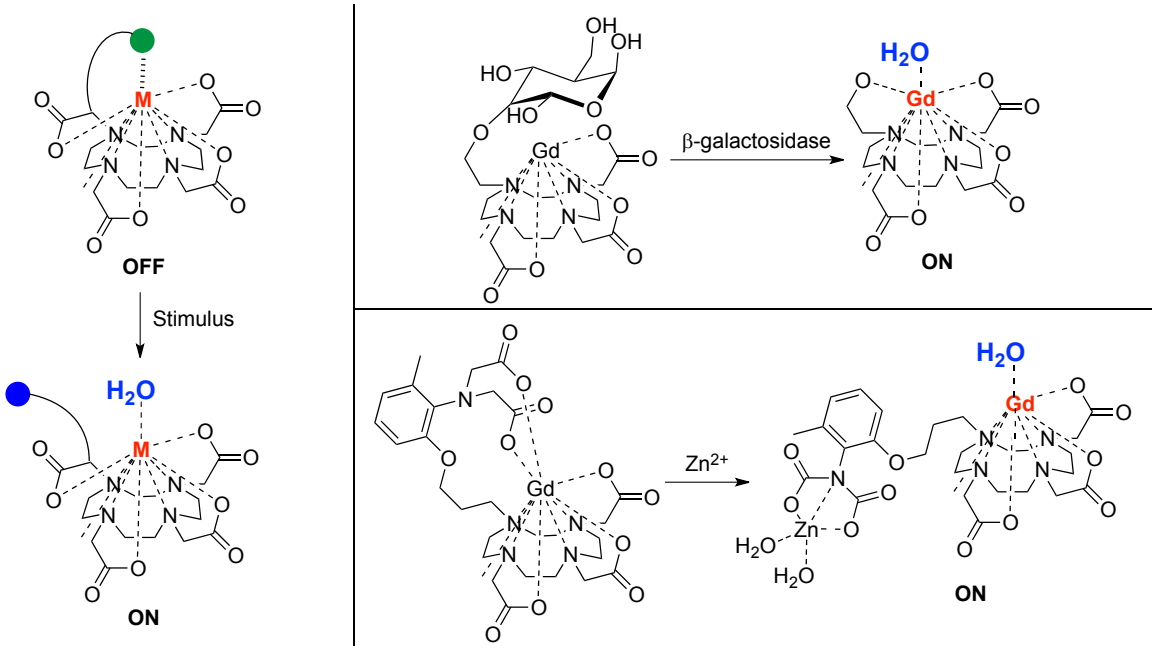


Figure 20 : Agent d'IRM activable : principe (gauche), agent sensible à la β-galactosidase (droite haut), agent sensible aux ions zinc (II) (droite bas) (adaptée de Major, J. L. and Meade, T. J. Accounts Chem. Res. ***2009)***[70b]

Lors de la libération de la position de coordination, la sonde passe d'un état « OFF » à un état « ON » dans lequel une molécule d'eau est coordinée au gadolinium, ce qui va conduire à une augmentation locale du contraste (blanchissement). Il est par exemple possible d'obtenir des sondes permettant de d'observer l'activité glycolytique ou la présence de cations métalliques (*figure 20 - droite*).[70b] Ces agents permettent la visualisation de processus moléculaires par IRM et conduisent à des images possédant un bon rapport signal/bruit. Cependant, ils restent actuellement au stade de la recherche et peu d'entre eux ont été testés *in vivo*.

III.1.4.1. Agents CEST et PARACEST

La technique d'imagerie CEST (pour Chemical Exchange Saturation Transfer) utilise la propriété de certains protons à pouvoir s'échanger avec les protons de la molécule d'eau. Pendant une analyse RMN il est possible de diminuer l'intensité d'un signal à un déplacement chimique connu par l'application d'une radio fréquence à la longueur d'onde adéquate, c'est le phénomène de saturation. Si cette saturation s'effectue sur des protons échangeables, il est possible de diminuer aussi l'intensité du signal des protons avec lesquels cet échange a lieu, en IRM, les molécules d'eau. Les agents CEST sont donc des molécules discrètes ou des polymères portant des fonctions avec des protons échangeables comme les amines, amides ou les groupements guanidinium. Pour obtenir une image CEST il faut faire deux acquisitions, la première où un groupe de protons est saturé par une radio fréquence, la seconde sans saturation préalable. La différence entre ces deux acquisitions est l'image CEST où les zones contenant l'agent de contraste sont mises en évidence.

Mais pour pouvoir saturer les protons de l'agent de contraste sans saturer directement les protons de la molécule d'eau, la différence de déplacement chimique doit être assez importante, de l'ordre de plusieurs ppm. Ce problème peut être résolu par l'utilisation d'agents de contraste PARACEST (pour PARAmagnetic Chemical Exchange Transfert). Ces agents sont des complexes de lanthanides paramagnétiques, qui induisent un très fort déplacement chimique pour certains groupes de protons, quelques dizaines de ppm.[70a,70c,71]

III.1.4.2. Les agents d'IRM vectorisés

Malgré la faible sensibilité de cette technique, il est possible et intéressant de vectoriser des agents d'IRM. En effet, différents groupes de recherche ont conjugué des complexes de gadolinium ou des nanoparticules d'oxyde de fer avec des entités de reconnaissance afin de cibler les tumeurs.[12] La stratégie est plus profitable dans le cas des nanoparticules car elle permet d'amener une plus grande quantité d'agents paramagnétiques par récepteur. L'entité vectrice peut alors être un anticorps,[72] un peptide,[70a] ou même une petite molécule.
Les liposomes paramagnétiques peuvent également être vectorisés en surface par des biovecteurs afin d'obtenir une meilleur sélectivité.[66a]

III.2. Les radiopharmaceutiques pour les scintigraphies, le CLI et la radiothérapie

III.2.1. Stratégies d'incorporation du radioélément

Pour chaque technique scintigraphique, le radioélément devra être lié à une molécule vectrice afin de constituer un traceur radioactif spécifique de la zone à visualiser, et ceci de deux manières possibles (*figure 21*). Il pourra être lié directement à la molécule vectrice : on parle de **marquage**

direct. Dans le cas des métaux, ils peuvent être complexés efficacement par un agent chélatant, lui même lié à la molécule vectrice (**marquage indirect**). Dans ce cas, le complexe doit être suffisamment stable pour éviter le relargage du radiométal par transmétallation ou transchélation.

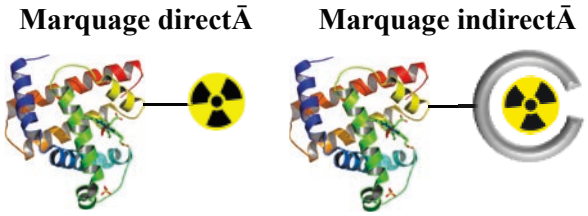
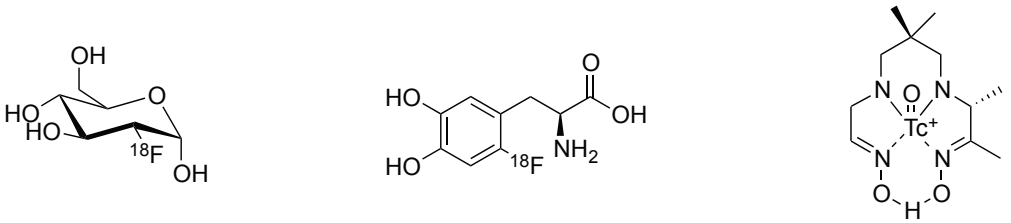


Figure 21 : Marquage direct et marquage indirect

III.2.1. Les radiopharmaceutiques conventionnels

Le fluor-18 est actuellement le radioélément le plus utilisé en TEP en milieu clinique. En effet, le ^{18}F-fluorodehydroxyglucose ([^{18}F]-FDG, *figure 22 - gauche*) est employé dans la majorité des examens réalisés dans le domaine de l'oncologie. Sa distribution est tout d'abord guidée par la forte activité de métabolisation du glucose par les cellules cancéreuses (glycolyse). Une fois dans la cellule, il est phosphorylé par l'hexokinase en [^{18}F]-fluorodésoxyglucose-6-phosphate, forme sous laquelle il ne peut plus quitter la cellule. Le groupement hydroxyle situé en position 2 étant cependant nécessaire à la métabolisation complète du glucose, son absence dans le [^{18}F]-FDG bloque par conséquent sa dégradation. Ces phénomènes expliquent pourquoi ce radiotraceur s'accumule préférentiellement dans les cellules tumorales. D'autres agents incorporant du fluor-18 sont également utilisés, comme par exemple le [^{18}F]-DOPA (*figure 22 - centre*) qui permet de suivre l'activité dopaminergique dans le cerveau et qui est donc notamment indiqué pour la détection de la maladie de Parkinson.[73]



(^{18}F-FDG) (^{18}F-DOPA) [^{99m}Tc]HMPAO (Ceretec®)

Figure 22 : Structures du ^{18}F-FDG, du ^{18}F-DOPA et du Ceretec®

L'élément le plus utilisé en imagerie SPECT dans le domaine clinique est le technium-99 métastable (80% des analyses) car il est facilement obtenu à partir d'un générateur au molybdène-99, et possède une demi-vie adéquate à l'application. Les principaux agents TEMP commerciaux à base de ^{99m}Tc sont des complexes non spécifiques, comme le Ceretec® (*figure 22 - droite*).

III.2.2. Vers de nouveaux agents pour la scintigraphie

Aussi bien pour la TEP que pour la TEMP, les agents présentés précédemment possèdent des inconvénients, notamment leur manque de sélectivité. C'est pourquoi de nombreuses recherches portent sur la mise au point d'agents vectorisés par des biomolécules plus efficaces.[74]

Le marquage de petites molécules visant des récepteurs protéiques par du fluor-18 a par exemple permis la mise au point d'agents PET plus ciblants (ex : 3'-[^{18}F]-fluoro-L-3'-deoxythymidine, FLT, pour la visualisation de la prolifération cellulaire).

Le marquage indirect de peptides par des radiométaux a également été largement étudié.[52,75] Les agents chélatants utilisés dans la plupart des cas sont, comme pour le gadolinium, des polyaminocarboxylates cycliques (DTPA-DOTA).[76] Par exemple, l'Octreoscan® est un agent TEMP obtenu par marquage de l'Octréotide avec de l'Indium-111 (*figure 23*). Il permet de cibler les récepteurs à la somatostatine, surexprimés dans le cas de cellules cancéreuses, et est donc utilisé en oncologie pour la détection de tumeurs, notamment neuroendocrines. Une adaptation dans laquelle le ligand linéaire est remplacé par un ligand cyclique (DOTATOC) permet de former des complexes plus stables et de moduler la nature du radiométal selon l'application choisie (^{111}In pour la TEMP, ^{68}Ga pour la TEP et ^{90}Y pour la RIT).

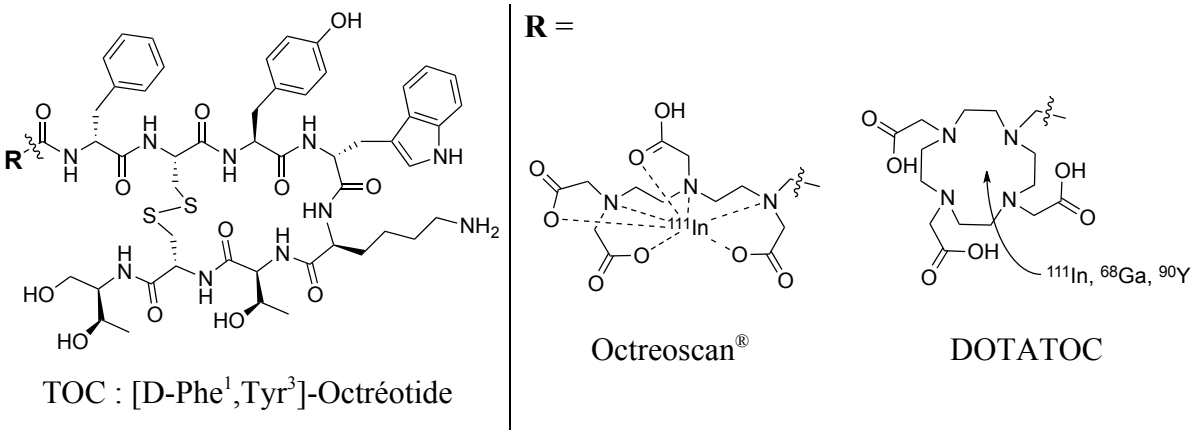


Figure 23 : Structures de l'Octreoscan® et des différents dérivés métallés du DOTATOC

Les anticorps peuvent également être marqués par un radioélément pour la détection de tumeurs. Par exemple, l'arcitumomab et le nofetumomab marqués au technecium-99m sont respectivement utilisés pour le diagnostic du cancer colorectal et du cancer des poumons (CEA-scan® et Verluma®, respectivement).

III.2.3. Les agents radioactifs en imagerie Cherenkov

La plupart des radioéléments testés en imagerie Cherenkov sont des agents commerciaux de scintigraphie. Ils doivent cependant émettre des particules chargées (β^+, β^-). C'est pour le moment le ^{18}F-FDG qui a été le plus étudié pour l'imagerie sur le petit animal et sur l'homme.[8d,32,34c,35,41b,42b] Cependant, des études avec des agents plus spécifiques ont été réalisées. Par exemple, Satpati et al. ont récemment préparé un chélate d'yttrium-90 associé à un peptide, la bombésine, pour imager les intégrines $\alpha_v\beta_6$.[41a] Des essais ont également été réalisés en marquant de manière indirecte un anticorps (J591) avec du Zirconium-89 (DFO-^{89}Zr).[34b]

III.3. Les agents fluorescents pour l'imagerie optique

III.3.1. Cahier des charges d'un fluorophore

Le potentiel d'utilisation d'un fluorophore en imagerie optique, et son domaine d'application, dépendent de certains critères :[77]

* **Domaines d'absorption et d'émission adaptés.** Les fluorophores possédant une gamme d'absorption et d'émission entre 500 et 800 nm sont utilisables en MIV ou en FRI. Dans le cas de la FMT, il est indispensable que cette gamme se situe dans la fenêtre thérapeutique.

* **Déplacement de Stockes important.** Plus l'écart entre les maxima d'absorption et d'émission sera important, plus le bruit de fond sera réduit. En effet, ceci permettra par un jeu de filtre d'éliminer aussi bien le rayon réfléchi issu du laser d'excitation qu'une partie de l'autofluorescence des tissus.

* **Brillance élevée.** Le fluorophore doit donc posséder un coefficient d'extinction molaire et un rendement quantique de fluorescence élevés.

* **Faible photoblanchiment.** Un fluorophore doit posséder un faible rendement en oxygène singulet, au contraire des photosensibilisateurs utilisés en thérapie photo-dynamique (PhotoDynamic Therapy, PDT), car cette espèce très réactive peut induire sa dégradation chimique (notamment par oxydation), que l'on nomme photoblanchiment. L'agent photoblanchissant peut également provenir du milieu proche (exogène) et dégrader la molécule lorsqu'elle se trouve dans son état excité.

* **Stabilité chimique.** Etant donné que le fluorophore sera mis en présence d'un milieu physiologique, contenant de nombreux agents capables de le dégrader (agents oxydants, enzymes), il doit être stable chimiquement vis-à-vis de ces attaques.

* **Solubilité en milieu aqueux et agrégation limitée.** Dans la plupart des cas, le composé fluorescent doit posséder un caractère hydrophile pour être injectable *in vivo*, ce qui n'est souvent pas le cas des fragments fluorescents, et nécessite donc l'ajout de fonctions hydrosolubilisantes. De plus, la fluorescence peut facilement être désactivée par dissipation non radiative (transfert d'énergie) due à une interaction des fluorophores entre eux ou avec d'autres molécules du milieu lorsqu'ils ne sont pas suffisamment solubles. Ce phénomène, nommé agrégation, est notamment présent avec les fluorophores organiques. C'est une interaction de type π-π entre groupements aromatiques dans de nombreux de cas.

* **Facilité de synthèse et de fonctionnalisation.** Le fluorophore doit être relativement accessible d'un point de vue synthétique, et posséder une voie d'entrée simple pour l'introduction de groupements réactifs, notamment une fonction de greffage pour la bioconjugaison.

* **Faible toxicité.** Comme toutes molécules injectées dans le corps, même pour des applications diagnostiques où la dose reste faible, une étude de toxicité fait partie des contraintes réglementaires.

À ce jour, il n'existe pas de fluorophores combinant tous ces critères de manière optimale. C'est pourquoi la recherche synthétique de nouveaux composés fluorescents est un domaine très étudié. Les fluorophores les plus utilisés pour l'imagerie optique actuellement sont la GFP (Green Fluorescent Protein), la FITC (Fluoresceine IsoThioCyanate) et l'ICG (IndoCyanine Green).

III.3.2. Les différents types de sondes fluorescentes

III.3.2.1. Les protéines fluorescentes

La protéine fluorescente verte (Green Fluorescente Protein, GFP), est largement utilisée comme marqueur pour l'imagerie de fluorescence. C'est une protéine naturelle constituée de 238 acides aminés qui est aujourd'hui modifiable par ingénierie génétique afin d'obtenir d'autres dérivés émettant dans une gamme de longueur d'onde différente (YFP, BFP, RFP,…) ou possédant des caractéristiques d'émission uniques (PHluorin : GFP sensible au pH).[78]
La GFP est produite relativement facilement, non toxique et également modifiable pour introduire une unité de reconnaissance. Cependant, sa fluorescence est difficilement discernable du bruit de fond lorsque sa distribution est trop diffuse.

III.3.2.2. Les nano-cristaux semi-conducteurs (Quantum-Dots)

Un trou quantique, principalement nommé selon l'appellation anglophone « quantum dot », est une nanoparticule structurée de semi-conducteurs qui se comporte comme un puits de potentiel. Son excitation lumineuse conduit à une émission de fluorescence. La nature et la taille de la particule permettent de moduler facilement la gamme d'émission. Elles sont notamment commercialisées par Life Technologies (appellation QDots® ou Qtrackers®). Ces particules possèdent une brillance élevée, en raison d'un coefficient d'extinction molaire très élevé, et sont également très stables photochimiquement. Leur utilisation *in vivo* est cependant limitée par leur toxicité, étant donné leur composition à base de métaux lourds.

III.3.2.3. Les complexes de lanthanides

La luminescence issue des lanthanides est un phénomène intéressant pour réaliser de l'imagerie optique en temps résolu. Ce mode d'imagerie consiste à exciter la sonde grâce à un laser, comme dans toute imagerie optique, et de détecter le signal avec un certain décalage temporel par rapport à l'excitation. Il permet de diminuer le bruit de fond dû à l'auto-fluorescence des tissus (*figure 24*). Cette technique est possible en utilisant les lanthanides car leur temps de vie de fluorescence est relativement long par rapport aux fluorophores organiques. Il est cependant nécessaire d'utiliser une antenne organique (fluorophore) qui capte les photons d'excitation puis délivre l'énergie au lanthanide par phénomène de transfert. Certains lanthanides (Yb, Nd) sont capables d'émettre avantageusement dans la fenêtre du proche infrarouge voir dans l'infrarouge, ce qui conduit à une plus grande profondeur de travail. Ces systèmes sont cependant limités par une brillance faible, une perte d'énergie lors du transfert, et car la longueur d'onde d'excitation se situe généralement hors de la fenêtre thérapeutique.[79]

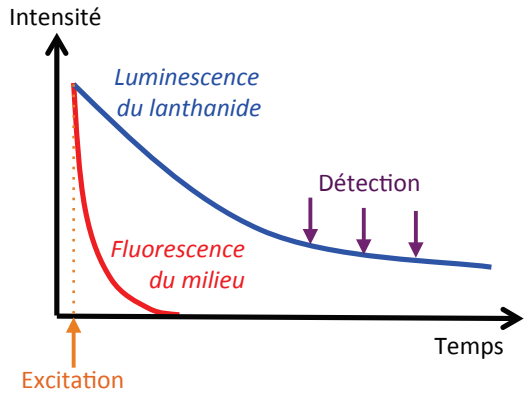


Figure 24 : Détection en temps résolu dans le cas des lanthanides luminescents

III.3.2.4. Les fluorophores organiques

Les molécules organiques fluorescentes appartiennent à la catégorie de sondes luminescentes la plus utilisée. Leur petite taille leur confère des avantages notables : facilité de synthèse, furtivité, faible incidence sur l'affinité du biovecteur, et en général une faible toxicité. Ces composés sont classables en plusieurs catégories d'après la nature du fragment photoactif.[20a,50a,80,81]

III.3.2.4.1. Les gammes de fluorophores commerciales

Plusieurs industriels ont développé et commercialisé des gammes de fluorophores organiques, qui possèdent souvent une fonction appropriée à la bioconjugaison ainsi que des groupements hydrosolubilisants :[82]

- GE Healtcare (CyDyes®)
- Molecular Probes (BODIPY®)
- Invitrogen (Alexa Fluor®)
- LiCOR Bioscience (IRDyes®)
- Dyomics (DyLight Fluor®)
- Molecular Targeting Technologies (SR Fluor®)
- Anaspec (HyLyte Fluor®)
- Interchim (Fluoprobes®)

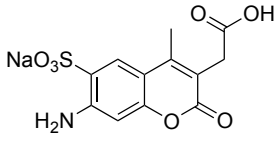
La structure exacte de ces composés n'est évidemment pas toujours connue (ainsi que leurs propriétés), mais elle se base sur des motifs coumarine, pyrène, rhodamine, cyanine ou encore squaraine qui sont dans beaucoup de cas mono- ou poly-sulfonatés pour augmenter l'hydrosolubilité. Certains industriels commercialisent également des versions déjà bioconjuguées de leur fluorophore, comme c'est le cas de Life Science (Molecular Probes).

III.3.2.4.2. Les fluorophores organiques par catégorie

Voici une liste non exhaustive des différents fragments organiques fluorescents exploités pour une utilisation en imagerie optique.

A. Les coumarines

La classe des coumarines comprend les molécules présentant le motif 2H-1-benzopyrane-2-one, une molécule naturelle présente dans divers végétaux (fève, céleri,…). La fonctionnalisation de ce cœur aromatique permet d'obtenir un composé fluorescent aux propriétés voulues (solubilité, fonction de greffage) (*figure 25*).



Alexa Fluor® 350

$\lambda_{ex}/\lambda_{em} \approx 350/450$ nm

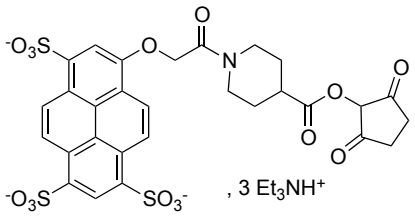
$\varepsilon = 19000$ mol^{-1}.L.cm^{-1}

Figure 25 : Structure et propriétés de l'Alexa Fluor®350

Ces composés absorbent et émettent à des longueurs d'onde basses, ce qui limite leur application en imagerie optique *in vivo*. Cependant, elles possèdent d'important déplacement de Stokes, et peuvent également être modifiés chimiquement afin d'atteindre une gamme de longueur d'onde plus adaptée et sont également très utiles pour la mise au point de sondes fluroescentes activables.[83]

B. Les pyrènes

Les pyrènes sont constitués d'un cœur aromatique formé par quatre groupements benzéniques accolés, fortement hydrophobes. La fonctionnalisation périphérique, notamment par des groupements sulfonates, permet de rendre hydrosoluble le composé, ou d'amener une fonction de conjugaison comme c'est le cas pour l'Alexa Fluor® 405 (*figure 26*).



$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 400/424 nm

ε = 35000 $mol^{-1}.L.cm^{-1}$

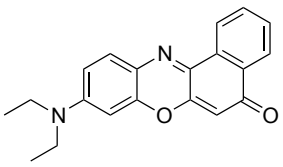
Alexa Fluor® 405 – ester succinimidylique

Figure 26 : Structure et propriétés de l'Alexa Fluor®405

Comme les coumarines, les pyrènes possèdent des longueurs d'onde d'absorption et d'émission basses difficilement modulables.

C. Les benzophénoxazines

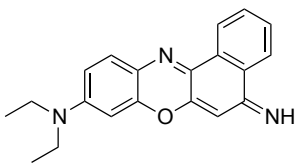
Cette classe de composés est principalement utilisée en imagerie cellulaire et en histologie comme colorant. Le Nile Blue (*figure 27*) permet par exemple de marquer les membranes cellulaires. Leurs propriétés de fluorescence sont très dépendantes du solvant et du pH, compte tenu des différents sites de protonation qu'ils présentent. Les benzophenoxazines manquent cependant d'hydrosolubilité ce qui suscite de nouvelles recherches dans ce domaine.[84]



Nile Red

$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 554/638 nm

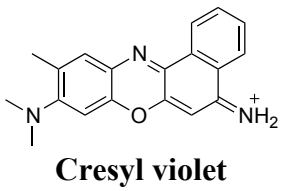
ϕ_F = 0,38 (EtOH)



Nile Blue

$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 626/668 nm

ϕ_F = 0,27 (MeOH)



Cresyl violet

$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 602/623 nm

ϕ_F = 0,56 (EtOH)

*Figure 27 : Structures et propriétés du Nile Red, du Nile Blue et du Cresyl violet (Jose, J. and Burgess, K. Tetrahedron **2006**)*[84b]

D. Les xanthènes

Par extension, on appelle xanthènes tous les dérivés substitués du 9H-xanthène. Ils forment une classe très étudiée de fluorophores car ils possèdent de bonnes propriétés photophysiques. Leur synthèse est également relativement simple : condensation de l'anhydride phtalique avec des dérivés de la résorcine ou du 3-aminophénol. Cette famille comprend notamment la fluorescéine et la classe des rhodamines.

i. La fluorescéine

La présence du carbone spyranique dans la structure de ce dérivé conduit à plusieurs formes interchangeables par l'équilibre spyro-énolique et protonations / déprotonations (*figure 28*).

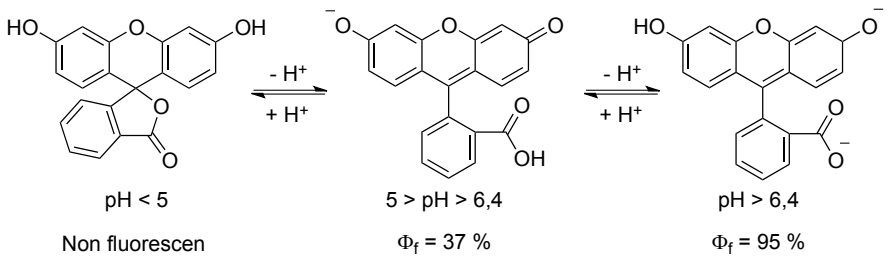


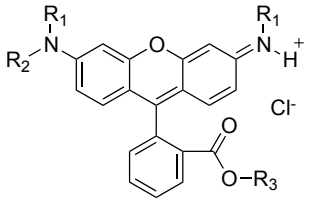
Figure 28 : Les différentes formes de la fluorescéine en fonction du pH

La structure et les propriétés de la fluorescéine vont donc dépendre du pH. Le rendement quantique de fluorescence sera maximal (95 %) en milieu basique (pH = 9), avec un maximum d'absorption à 490 nm et un maximum d'émission à 514 nm.

Ce composé trouve des applications dans de nombreux domaines, en particulier l'imagerie optique. Il a largement été utilisé dans le domaine biomédical, notamment pour les angiographies de l'œil. Cependant il est aujourd'hui fréquemment remplacé par d'autres fluorophores pour des raisons de toxicité. Il reste encore utilisé dans le domaine de la recherche, et notamment son dérivé réactif la FITC (Fluorescéine IsoThioCyanate). Ce fluorophore est cependant peu photostable, très fluorescent en milieu basique seulement, et présente un domaine d'absorption et d'émission peu adapté pour l'imagerie en profondeur.

ii. Les rhodamines

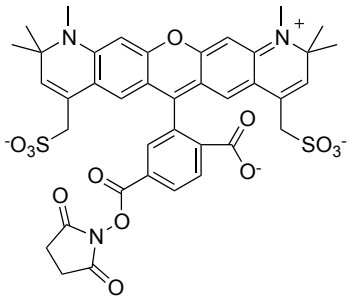
Les rhodamines possèdent un motif de base similaire à la fluorescéine, mais la substitution des oxygènes phénoliques par des azotes conduit à des composés ayant des longueurs d'onde d'absorption et d'émission plus grandes ainsi qu'une meilleure photostabilité. Il existe beaucoup de rhodamines commerciales, dont voici quelques exemples parmi les plus courants (*tableau 8*) :



	R_1	R_2	R_3	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$	ε ($mol^{-1}.L.cm^{-1}$)	ϕ_F
RhB	Et	Et	H	543/565	106000	0,7
Rh6G	Et	Et	Et	530/552	116000	0,94
Rh123	H	H	Et	512/530	85200	0,9

Tableau 8 : Structures et propriétés de fluorescence de quelques rhodamines commerciales dans l'éthanol (Rh = Rhodamine)

De nombreuses études visent à modifier la structure des rhodamines pour introduire des groupements conduisant à un décalage des longueurs d'onde d'absorption et d'émission vers la fenêtre du proche infrarouge. Ainsi, il est possible d'obtenir une absorption autour de 600 nm tout en conservant une bonne valeur de rendement quantique de fluorescence. On peut par exemple citer la rhodamine 101, le Texas Red® ou encore l'Alexa Fluor®594 (*figure 29*). Des études visent également à disymériser la molécule pour introduire plus aisément les fonctions d'intérêt (fonction de conjugaison).[85]



Alexa Fluor®594 – ester succinimidylique

ε = 92000 $mol^{-1}.L.cm^{-1}$

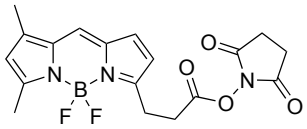
$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 590/617 nm / ϕ_F = 0,66

Figure 29 : Structure et propriétés de l'ester activité de l'Alexa Fluor®594

E. Les BODIPY®

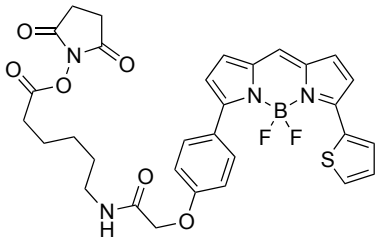
Les dérivés du 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diazaindacène, plus communément appelés BODIPY® (pour BOroDIPYrrométhène - marque déposée par Invitrogen) constituent une classe de fluorophores très attractive dans de nombreux domaines, dont l'imagerie médicale. Les dérivés les plus connus dans le domaine du marquage de biomolécules sont le BODIPY®-FL et le BODIPY®-TR, dont les analogues possédant une fonction de conjugaison (ester de NHS) sont commercialisés par Life Technologies (*figure 30*).

Leur utilisation en imagerie optique *in vivo* reste cependant limitée à un domaine d'absorption/émission en dessous de la fenêtre du proche infrarouge. De plus, ils souffrent d'une faible solubilité en milieu physiologique. Mais des modifications chimiques permettent de pallier ce problème, comme l'ont montré plusieurs groupes de recherche, en étendant la conjugaison (Keio Fluor, BODIPY-styryles, BODIPY-thiophènes) et en introduisant des groupements ammonium ou sulfonate pour augmenter l'hydrosolubilité.[86]



BODIPY®FL – ester succinimidylique

($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 505/511 nm ; ϕ = 0,94)



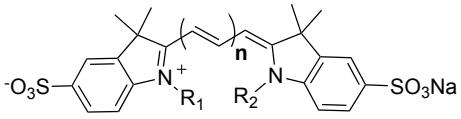
BODIPY®TR – ester succinimidylique

($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 550/576 nm ; ϕ = 0,9)

Figure 30 : Structures et propriétés de deux dérivés BODIPY® commerciaux

F. Les cyanines

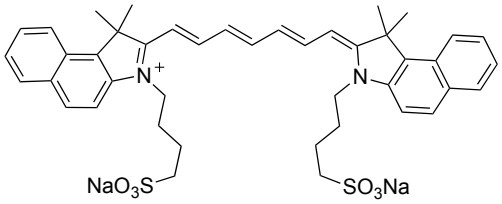
Les cyanines sont des fluorophores formés de deux groupements hétérocycliques (indole, quinoléine, benzothiazole) reliés par un pont polyméthène (*tableau 9*). La taille de ce pont permet de moduler les longueurs d'onde d'absorption et d'émission, ce qui permet d'atteindre très facilement le domaine du proche infrarouge. La plupart des fluorophores proche infrarouge commerciaux sont donc des cyanines (CyDyes, IRDyes,…), car elles sont facilement synthétisables et possèdent de bonnes propriétés, notamment un domaine d'absorption et d'émission adapté pour l'imagerie en profondeur.



	n	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (nm)	ϕ_F
Cy3®	1	550/570	0,15
Cy5®	2	650/670	0,28
Cy7®	3	743/767	0,28

Tableau 9 : Structures et propriétés de quelques CyDyes® commercialisées par GE Healtcare (généralement, R_1 = alkyl (Me, Et) et R_2 = fonction de greffage ($(CH_2)_nCO$-NHS)

Le vert d'indocyanine (IndoCyanine Grenn, ICG) est le seul fluorophore proche infrarouge possédant une autorisation de mise sur le marché (AMM), et c'est donc le seul utilisé en imagerie médicale *in vivo* sur l'homme (*figure 31*).



$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (nm) = 795/813

ϕ_F = 0,027 % (H_2O)

Figure 31 : Structure et propriété optique du vert d'indocyanine (ICG)

L'inconvénient majeur des cyanines réside dans leur faible stabilité, notamment en milieu acide. La rigidification de l'espaceur polyméthine en utilisant un espaceur de type cyclopentène ou cyclohexène permet cependant de limiter ce problème, et également de réduire le phénomène de photoblanchiment.[87]

G. Les phtalocyanines

Les phtalocyanines sont des dérivés porphyriniques composés de quatre unités isoindoles reliées par quatre ponts azaméthines. Ce sont des fluorophores connus pour leur grande stabilité chimique et photochimique, ainsi que pour leur coefficient d'extinction molaire élevé. De plus, ils présentent une fluorescence dans la fenêtre du proche infrarouge. Une présentation plus détaillée des phtalocyanines sera faite dans la section appropriée.

Les seules phtalocyanines commerciales dédiées à l'imagerie optique sont l'IRDye700DX® (LiCOR) et La Jolla Blue® (Hyperion Inc.) (*figure 32*). Ce sont des phtalocyanines de silicium hydrosolubilisées grâce à la présence de substituants sur le centre métalloïdique, et possédant une fonctionnalité (R-NHS ou COOH) sur l'un des groupements aromatiques permettant la bioconjugaison.

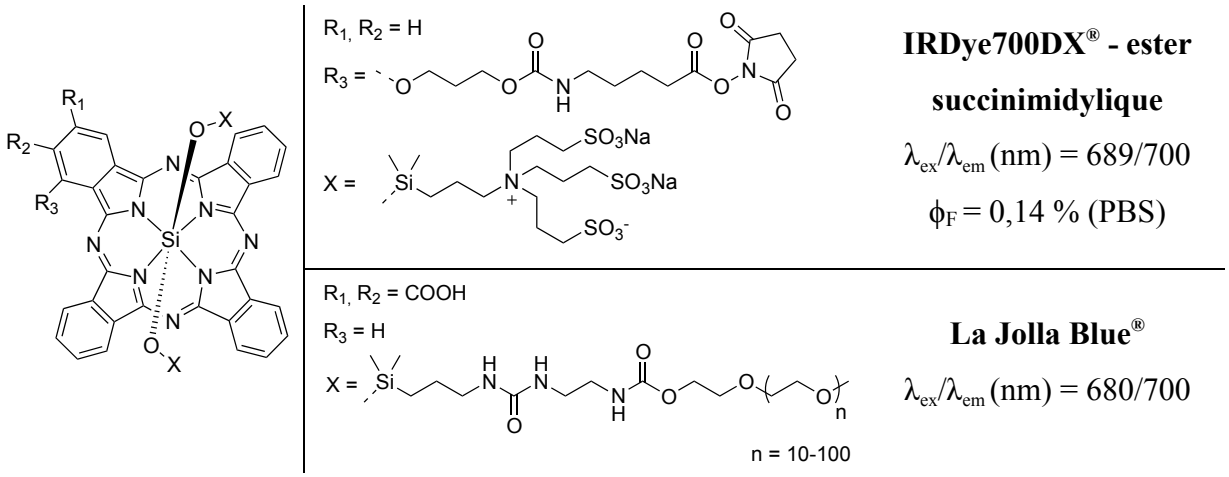


Figure 32 : Structures et propriétés de l'ester activé de l'IRDye700DX® et de La Jolla Blue®

Compte tenu de leur grande surface aromatique plane, les phtalocyanines ont une forte tendance à s'agréger par interaction cofaciale. Ceci est limité dans le cas de l'IRDye700DX® ou de La Jolla Blue® grâce à l'introduction des groupements apicaux sur le silicium, perpendiculaires au plan du cœur aromatique, qui créent une gêne stérique minimisant le phénomène d'agrégation. De plus, il est relativement difficile d'introduire sélectivement un groupement permettant la conjugaison.

III.3.3. Exemples d'agents d'imagerie optique

III.3.3.1. Exemples d'agents fluorescents activables

Les fluorophores organiques sont des sujets de choix pour la mise au point de sondes intelligentes, c'est pourquoi il existe de nombreux exemples de fluorophores activables pour l'imagerie optique.[51,88] En effet, leur fluorescence et leur gamme d'absorption/émission peuvent facilement être modulées par des phénomènes de transfert d'énergie. Dans beaucoup de cas, ce transfert a lieu entre un groupement donneur d'énergie présent sur la molécule et le centre fluorogénique. La modification de ce groupement donneur (annulation ou modification du caractère donneur) conduit aux changements photophysiques.[50b,c,89]

Trois types de mécanisme de transfert d'énergie principaux peuvent entrer en jeu dans l'activation de sondes fluorescentes :

- Le **transfert d'électrons photo-induit** (Photo-induced Electron Transfer, PeT)
- Le **transfert de charge interne** (Internal Charge Transfer, ICT)
- Le **transfert d'énergie de résonance de type Förster** (Förster Resonance Energy Transfer, FRET).

Dans beaucoup de cas, les sondes modulables par effet de pH présentent un ou des groupements amine protonables (*figure 33 - gauche*).

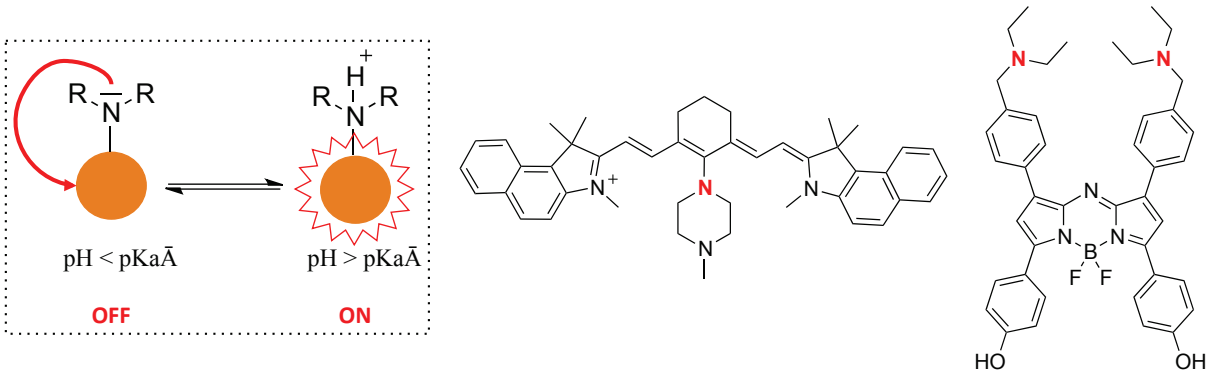


Figure 33 : Principe des sondes à pH (gauche) et deux exemples (droite) (Myochin, T. et al. J. Am. Chem. Soc. ***2011****)*[90] *(Zhan, X. et al. Mol. Pharmaceutics* ***2013****)*[91]

Cette amine peut être conjuguée au centre aromatique fluorescent, comme dans le cas de la cyanine présentée sur la *figure 33 - centre* : le transfert d'énergie se fait alors majoritairement par les liaisons.[90] Dans le cas où le site donneur n'est pas conjugué, comme pour le dérivé de type aza-BODIPY (*figure 33 – droite)*, le transfert entre les azotes et le cœur indacène a lieu à travers l'espace.[91] D'autres types de fonctions peuvent être utilisés, comme par exemple les groupements phénol dont la déprotonation engendre l'état photoactif.[92]

Le phénomène de FRET peut être utilisé pour visualiser une expression enzymatique comme c'est le cas de l'exemple décrit par Li et al. (*schéma* 6). Le fluorophore (Cy5.5) est lié à un extincteur (« quencher ») de fluorescence, ici un dérivé rhodamine (QSY®21, GE Healtcare), via un espaceur contenant une séquence d'acide aminé (KGPGN) sensible à l'activité d'une protéine d'activation fibroblastique (Fibroblast Activation Protein alpha, FAPα). Lorsque les deux chromophores sont liés, le phénomène de FRET annule la fluorescence (OFF). Mais lors de la coupure de l'espaceur peptidique par l'enzyme, la fluorescence de la cyanine est retrouvée (ON).[93]

Ce système a pu être étudié pour la visualisation de tumeurs *in vivo* (souris), la FAP étant une glycoprotéine sélectivement exprimée par les fibroblastes tumoraux entrant en jeu dans la croissance et dans l'invasion tumorale.

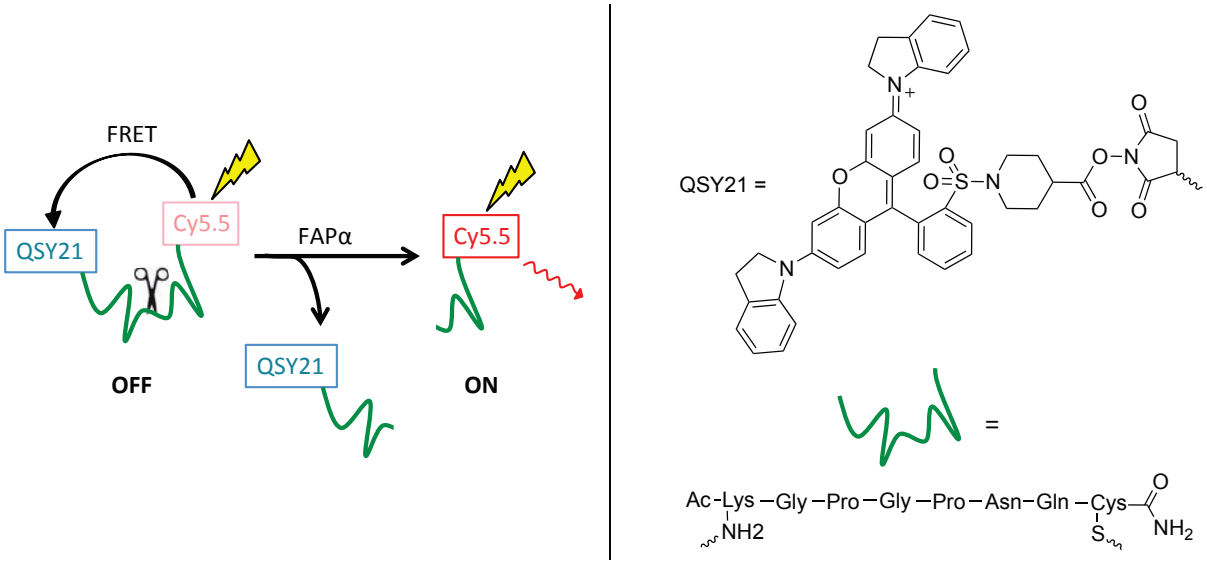


Schéma 6 : Schéma et composants de la paire FRET développée par Li et al. et réaction avec la FAPα (Li, J. et al. Bioconjugate Chem. ***2012****)*[93]

III.3.3.2. Exemples d'agents fluorescents vectorisés

Pour que les fluorophores délivrent des informations utiles à l'imagerie moléculaire, ils sont souvent vectorisés par des biomolécules. Par exemple, la fluorescéine a pu être récemment associée à l'acide folique (*figure 34*) pour l'imagerie intraopératoire sur l'homme dans le cas de tumeur ovarienne.[94]

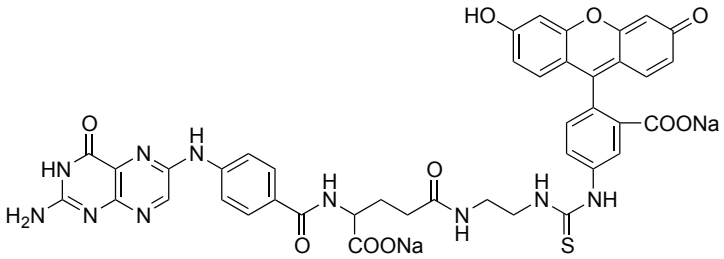


Figure 34 : Fluorescéine vectorisée par un acide folique (van Dam, G. M. et al. Nat. Med. ***2011****)*[94]

L'association avec des petites biomolécules neutres, comme par exemples les sucres, permet quant à elle de favoriser la localisation dans les membranes cellulaires.[95]

Le marquage de peptides avec des sondes fluorescentes a également été exploré avec différents types de fluorophores, principalement des cyanines, et différents vecteurs peptidiques. On retrouve notamment des exemples avec le cyclo-RGD,[27,96] ou des analogues de la somatostatine, comme cette cyanine (Cy7) vectorisée par l'octréotide (*figure 35*).[97]

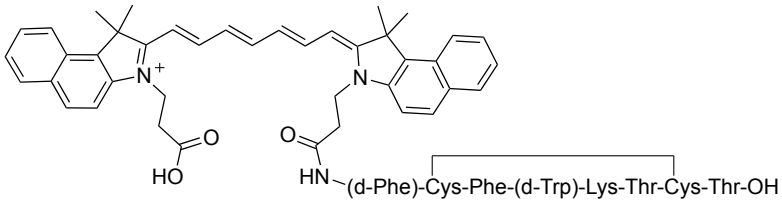


Figure 35 : Octréotide marqué par une cyanine (Achilefu, S. J. Med. Chem. ***2002)***[97]

Comme pour les agents scintigraphiques, les anticorps se sont également révélés être de bons vecteurs dans le cas des sondes fluorescentes. Le groupe de P. van Driel a pu montrer l'efficacité de l'imagerie de fluorescence intraopératoire pour la résection de tumeurs sur petit animal en associant l'IRDye800CW (Cy7 rigidifié) avec un fragment d'anticorps (nanobody) ciblant les récepteurs de facteurs de croissance épidermiens (EGFR).[98]

Les quantum dots peuvent également être vectorisés par des anticorps, des oligonucléotides ou des petites molécules pour l'imagerie moléculaire *in vivo*.[99]

Partie IV : L'approche multimodale

IV.1. Intérêts et principes d'association en imagerie multimodale

La combinaison de deux techniques d'imagerie a pour objectif de pallier les limites intrinsèques d'une première par association avec une deuxième complémentaire, et *vice-versa*. En recoupant les données issues de chaque modalité, on obtient des informations plus précises et donc un diagnostic plus efficace. Paradoxalement, les techniques d'imagerie ayant la meilleure résolution (CT, IRM,…) ont une faible sensibilité, tandis que celles ayant une bonne sensibilité (TEP, TEMP, IO,…) souffrent d'une faible résolution. De ce constat, il apparaît que l'association de deux de ces techniques, soit l'association d'une imagerie structurale avec une imagerie fonctionnelle, permet d'obtenir des informations d'ordre anatomique et fonctionnel de manière simultanée. Parfois, l'association de deux imageries fonctionnelles peut également permettre de renforcer la véracité du diagnostic, d'augmenter la qualité d'image ou de réaliser un suivi précis d'une action thérapeutique.[4,100]

IV.2. Quelques associations possibles

L'exemple d'association le plus représentatif et le plus utilisé reste la combinaison des imageries scintigraphiques avec la tomodensitométrie (PET/CT et SPECT/CT). Dans ce cas, seule l'imagerie radioactive nécessite un agent d'imagerie, qui va délivrer l'information moléculaire, comme la localisation d'une tumeur. Cependant, cette information se doit d'être replacée d'un point de vue anatomique grâce au CT-scan. La superposition des deux images permet ainsi d'observer la zone tumorale et sa localisation anatomique (*figure 36*).[101]

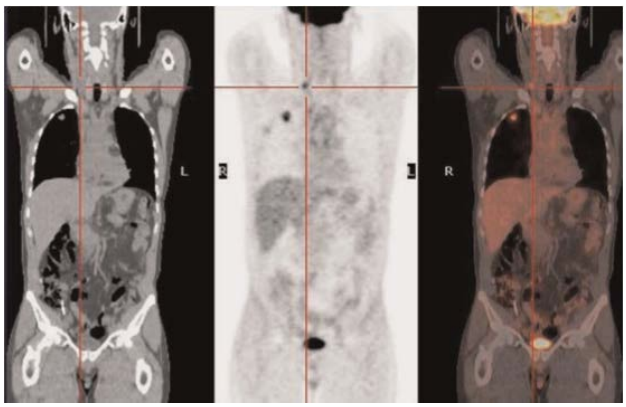


Figure 36 : Tomodensitométrie (gauche), PET-scan (centre) et superposition des deux images (droite) (Marti-Bonmati, L. et al. Contrast Media Mol. Imaging ***2010****)*[101]

Aujourd'hui, les appareils de TEP utilisés en routine dans les hôpitaux combinent systématiquement les caméras scintigraphiques avec un système tomodensitométrique.
Avec le développement plus récent de l'imagerie moléculaire, la recherche actuelle s'oriente toujours vers ce même objectif, mais en mettant à profit les nouvelles techniques d'imagerie plus performantes. Ainsi, les associations des scintigraphies avec l'imagerie de résonnance magnétique (TEP/MRI ou SPECT/MRI) sont énormément étudiées, l'IRM conduisant généralement à de meilleures informations anatomiques que le CT. De plus, certaines techniques plus récentes d'IRM permettent d'obtenir des informations d'ordre moléculaire. Ainsi, cette association peut conduire d'une part à une combinaison d'image anatomique et fonctionnelle, mais également à une combinaison de deux données moléculaires. Dans le cas du cancer par exemple, il est possible de détecter à la fois l'hypoxie grâce à un agent TEP comme le [^{18}F]-FLT, et de manière complémentaire de suivre le degré d'oxygénation par BOLD-IRM.[102]

De même, les approches associant deux techniques d'imagerie fonctionnelle, comme la TEP avec l'imagerie optique, présentent un fort potentiel aussi bien dans la recherche que pour des applications du domaine clinique, notamment pour la chirurgie assistée par imagerie. Cette bimodalité combine en effet des informations à plusieurs stades de la chirurgie : la scintigraphie permet la localisation (corps entier) de la tumeur tandis que l'imagerie optique va aider le chirurgien pour la résection de la tumeur (FRI) puis pour l'étude des tissus excisés (IVM). Cette approche combine les avantages de chaque technique : l'agent scintigraphique délivre une information de faible résolution temporelle (dûe à la désintégration radioactive) mais avec une pénétrabilité sans limite, tandis que la sonde fluorescente peut être suivie à plus long terme, mais souffre d'une faible pénétrabilité (< 1 cm).[103] Des études récentes ont pu montrer tout l'intérêt de cette approche sur le petit animal et sur l'homme.[104]

La combinaison de l'IRM et de l'optique est également très étudiée. Cette bimodalité présente une synergie similaire au cas de l'association de l'IO avec les scintigraphies. Elle allie la haute résolution spatiale de l'IRM à la bonne résolution temporelle de l'imagerie optique. À titre d'exemple, la localisation de la tumeur peut être réalisée par IRM, puis sa résection à l'aide de l'imagerie optique. Au contraire de l'approche OI/TEP-TEMP, le problème potentiel d'exposition du patient et du chirurgien à la radioactivité est avantageusement éliminé.

D'autres combinaisons sont également possibles, comme l'association de l'IRM avec la tomodensitométrie. D'autre part, avec le développement des nouvelles et nombreuses imageries (PAI, SERS, US) de multiples bimodalités sont envisageables et sont pour certaines en cours d'étude (PAI/MRI, US/MRI, SERS/MRI,…).[105]

IV.3. Mise au point d'un agent multimodal pour l'imagerie

L'approche la plus simple envisagée pour réaliser des images dans deux modalités distinctes sur un même sujet d'étude consiste à lui injecter un mélange de deux agents, chacun respectivement actif dans une technique d'imagerie mais possédant une même cible biologique. Cette approche, nommée « approche cocktail », souffre cependant de nombreux problèmes, notamment d'une différence de distribution des deux agents. C'est pourquoi les chercheurs se tournent maintenant vers l'association des deux sondes sur un vecteur commun afin d'obtenir un agent traçable actif dans les deux modalités.

D'autre part, les différentes techniques d'imagerie ne présentant pas toujours la même sensibilité, elles doivent donc être associées de manière stratégique afin de pallier ce problème. C'est par exemple le cas de l'IRM (10^{-3}-10^{-5} mol.L^{-1}) qui est bien moins sensible que la TEP (10^{-11}-10^{-13} mol.L^{-1}).

IV.3.1. Les différentes approches

Il existe trois types d'approches pour la mise au point d'un agent d'imagerie bimodal : « le dual labelling », l'approche moléculaire et l'utilisation de nano-objets (*figure 37*) :

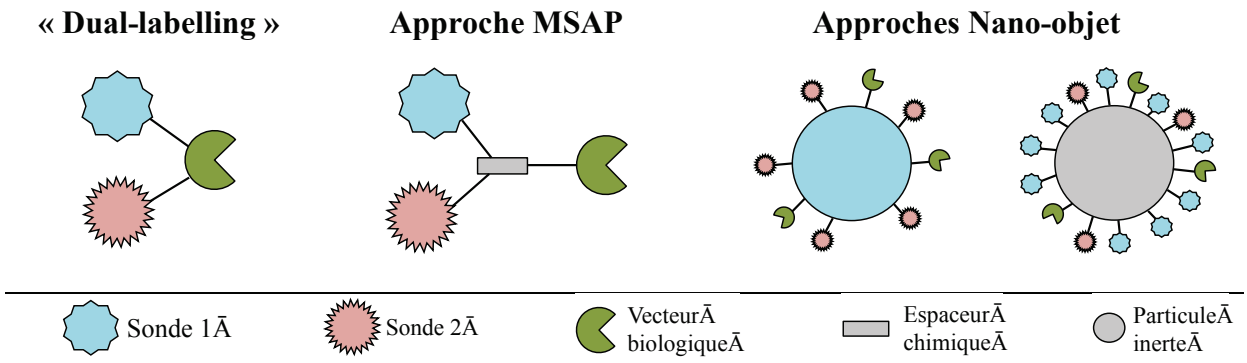


Figure 37 : Les différentes approches pour la mise au point d'un agent bimodal

* Le « **dual-labelling** » consiste à marquer consécutivement une biomolécule avec deux sondes distinctes. Cette approche est principalement utilisée dans le cas des anticorps. Elle pose cependant parfois des problèmes de perte de fluorescence (quenching) compte tenu de la proximité de la sonde avec les motifs désactivants de l'anticorps. De plus, il est difficile d'obtenir un marquage homogène et ainsi de connaître parfaitement le ratio entre chaque sonde imageante. Mais c'est une technique pouvant être réalisée rapidement et à partir d'agents commerciaux.

* L'**approche MSAP**, (Multifunctionnal Single Point Attachement) consiste à lier les deux entités imageantes et la biomolécule à un même espaceur moléculaire. Dans ce cas, on parle généralement de MOMIA (MOnomolecular Multimodal Imaging Agent). Elle permet de connaître précisement le ratio entre les deux sondes imageantes. Ce type d'approche sera préférentiel pour l'association de deux techniques de sensibilité comparables (ex : IO et scintigraphies). Elle nécessite cependant un important travail de chimie pour mettre au point la sonde bimodale possédant une fonction de greffage.

* Les **nanoparticules, nanotubes, liposomes, et autres objets de grande taille**, sont des plateformes de choix pour la mise au point d'agents multimodaux. Ils permettent en effet de remedier au problème de sensibilité inégale, car le ratio entre les sondes de chacune des techniques concernées peut être modulable, tout en garantissant une même biodistribution.

IV.4. Exemples d'agents multimodaux

Il existe de nombreux exemples d'association de sondes pour l'imagerie afin d'obtenir des agents de contraste multimodaux et/ou théranostiques.[82,106] Quelques-uns, associant diverses modalités, sont décrits dans ce paragraphe.

Les agents associant des sondes IRM et scintigraphiques peuvent être monomoléculaires[107] ou particulaires.[107b,108] Notons que l'approche nano-objet permet d'ajuster au mieux le ratio entre les deux techniques.[109] L'exemple ci-dessous combine les deux techniques en utilisant un liposome, sur lequel les auteurs ont introduit un complexe linéaire de gadolinium actif en IRM (Gd-DTPA) et de l'iode-124 pour la TEP (*figure 38*).

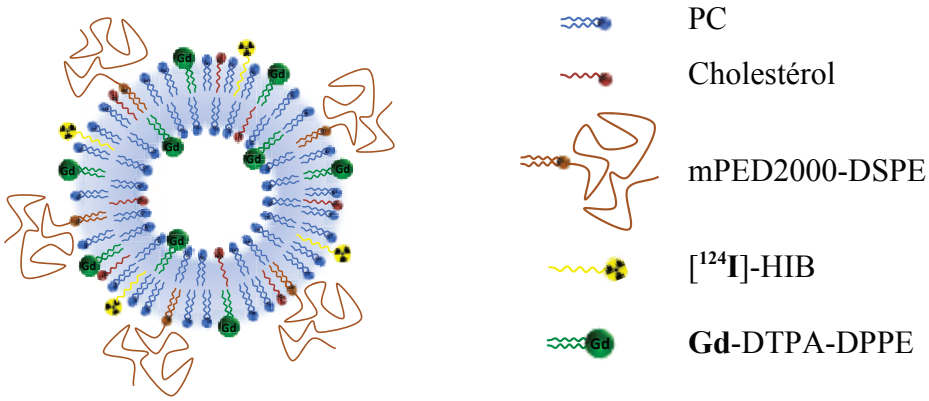


*Figure 38 : Liposome multimodal développé par Kim et al. (PC, DSPE et DPPE sont des phospholipides, HIB une chaîne grasse) (Kim, J. et al. ACS Med. Chem. Lett. **2014**)*[110]

Notons que ce système présente également une modalité supplémentaire de type imagerie optique, car les auteurs ont montré la possibilité de suivre le liposome *in vivo* par imagerie Cherenkov (CLI), grâce à l'émission β^+ de l'iode-124.

Le cas de l'association de l'imagerie optique avec une technique scintigraphique a également été exploré a plusieurs reprises et selon différentes approches.[111] Plusieurs exemples de « dual-labelling » d'anticorps se sont montrés efficaces pour visualiser des tumeurs sur le petit animal.[112] Le même principe peut également être utilisé dans le cas des peptides.[113] La sonde est introduite à l'une des extrémités de la chaîne d'aminoacides tandis que l'agent chélatant, apte à incorporer le radiométal, est introduit sur l'autre extrémité. Cette méthode n'est possible que si les deux acides aminés terminaux ne sont pas impliqués dans l'affinité du vecteur pour sa cible. Dans le cas contraire, il est préférable d'utiliser la technique dite MSAP.

La mise au point, via un espaceur, d'une sonde contenant un fragment fluorescent et un agent chélatant s'est montrée souvent avantageuse. Plusieurs sondes multimodales récentes contenant à la fois les deux sources imageantes et une fonction de greffage ont pu être répertoriées dans la littérature.[111b,114] Certaines ont ensuite été couplées à un anticorps ou un peptide, et étudiées pour l'imagerie *in vivo*.[115] Par exemple, Azhdarinia et al. ont pu préparer selon cette méthode un MOMIA constitué d'un peptide (HWGF), d'une entité chélatante de type DOTA pour introduire du gallium-68 et d'une sonde fluorescente de type cyanine (IRDye800CW) (*figure 39*).[116]

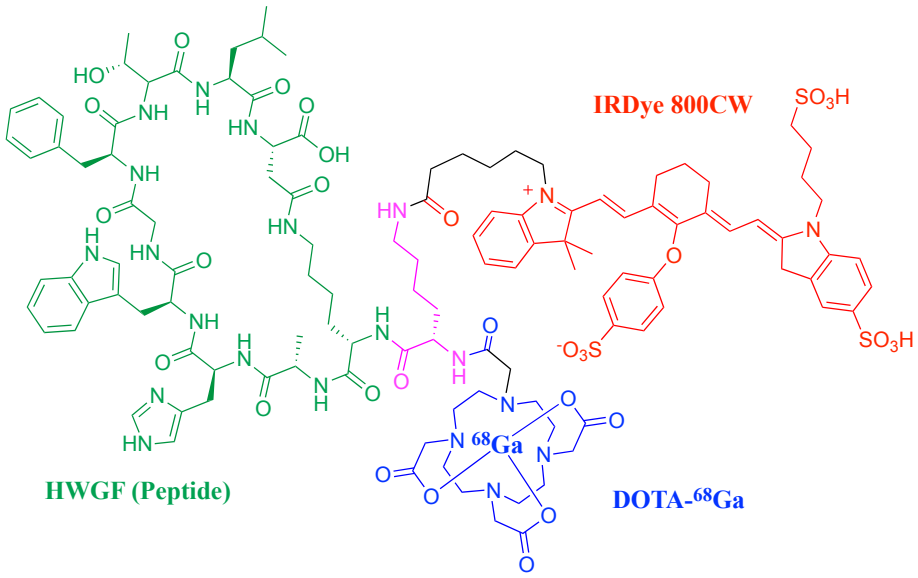
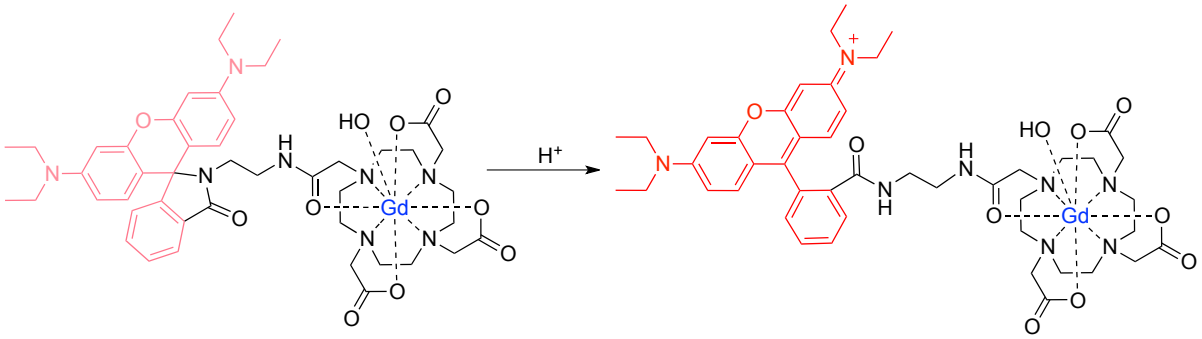


*Figure 39 : Exemple de MOMIA pour l'imagerie bimodale IO/TEP (Azhdarinia, A. et al. Bioorg. Med. Chem. **2011**)*[116]

Dans ce cas, l'espaceur utilisé est une lysine.[116] Le système a permis de visualiser l'expression des métalloprotéinases MMP-2 *in vivo* par les deux techniques (IO et TEP).

La bimodalité IRM/IO étant également très étudiée, il existe de nombreuses sondes associant une entité fluorescente avec un agent paramagnétique. L'agent peut être de type MOMIA ou basé sur l'approche nano-objet.[117] Le *schéma 7* présente un agent moléculaire IRM/IO, composé d'un chélate cyclique de gadolinium et d'une rhodamine liés covalentement par un pont éthylène diamine.[118]



Monomodal (IRM) Bimodal (IRM/IO)

Schéma 7 : Exemple d'un système bimodal IRM/IO pH-activable (Rivas, C. et al. Inorg. Chem. ***2013****)*[118]

Ce système est également une sonde intelligente car la fluorescence de la rhodamine est activable sous l'action des protons du milieu, le phénomène étant réversible. Il a pu être utilisé pour localiser une tumeur par IRM (souris), et la microscopie cellulaire (confocale) a également permis de visualiser la sonde dans les mitochondries.

Comme dans le cas des bimodalités IRM/TEP ou IRM/TEMP, l'utilisation de liposomes fonctionnalisés s'est montrée une méthode de choix pour ajuster les sensibilités de l'IRM et de l'imagerie optique. Nakamura et al. ont de cette manière pu développer une sonde liposomiale active en IRM et en IO via l'introduction d'un complexe de gadolinium et d'une cyanine, respectivement (*figure 40*).[119] Le système présente d'une part des chaînes PEG qui vont augmenter sa furtivité et ainsi son temps de résidence dans le corps, mais également un vecteur biologique, le folate, qui va permettre la distribution effective du système. Les études sur des cellules surexprimant les récepteurs de l'acide folique ont pu montrer l'effet bénéfique de la présence du vecteur biologique.

Dans le même objectif, l'équipe de X. Chen a pu développer une nanoparticule d'oxyde de fer active en IRM, et fonctionnalisée en surface par une cyanine, qui joue le rôle de sonde optique (*figure 41*).[120] De part la présence de complexes de cuivre-64, la particule est également traçable en imagerie TEP. De plus, sa surface a été fonctionnalisée par la dopamine afin de permettre d'encapsuler la particule dans une matrice de HSA (Human Serum Albumin), qui est utilisée en milieu clinique pour le transport de médicaments.

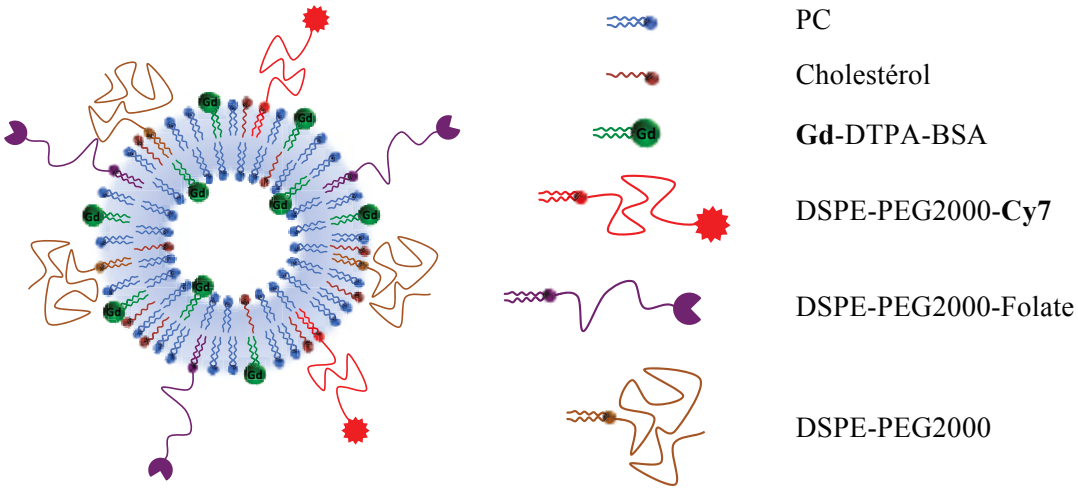


Figure 40 : Exemple d'un liposome multimodal possédant un chélate de gadolinium (Gd-DTPA), un fluorophore (Cy7) et une fonction biovectrice (folate) (DSPE est un phospholipide, BSA et une chaine grasse) (Nakamura, T. et al. Biol. Pharm. Bull. ***2014)***[119]

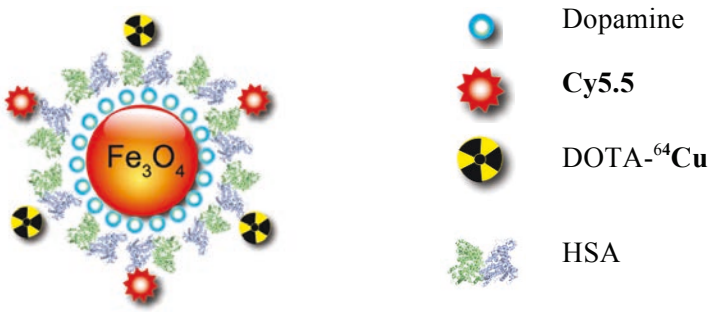


Figure 41 : Exemple d'une nanoparticule d'oxyde de fer trimodale (IRM/TEP/IO) (Xie, J. et al. Biomaterials ***2010)***[120]

IV.5. Approche théranostique : intérêt et principe

Au même titre que l'imagerie multimodale, l'approche théranostique connaît depuis plusieurs années un intérêt croissant. La localisation par imagerie (scintigraphie par exemple) de la zone tumorale permet par exemple de réaliser une radiothérapie externe ou bien de la photothérapie ciblée. D'autre part, l'association covalente d'un agent thérapeutique de radiothérapie ou chimiothérapie avec une entité imageante permet de vérifier la bonne distribution de l'agent, puis à plus long terme de confirmer l'action thérapeutique (agent compagnon).[5a,121]

Une approche plus récente consiste à utiliser des systèmes capables de relarguer des médicaments par stimulation externe.[5b,122] Par exemple, les microbulles vectorisées encapsulant un principe actif sont traçables en échographie moléculaire, puis une action externe permet ensuite de détruire les microbulles pour libérer l'agent thérapeutique.[123]

Dans ce domaine, l'imagerie Cherenkov est également avantageuse car elle permet de suivre certains agents radiothérapeutiques, comme l'yttrium-90, afin de connaître leur biodistribution. De même, les agents photothérapeutiques actifs en PDT peuvent être suivis par imagerie de fluorescence, comme c'est le cas pour les porphyrines et les phtalocyanines.

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Comme nous avons pu le voir dans l'introduction, l'imagerie moléculaire est un secteur d'importance aussi bien pour la recherche préclinique que pour une application directe en milieu clinique. Elle met en œuvre des techniques telles que l'IRM fonctionnelle, l'imagerie nucléaire ou l'imagerie optique, qui peuvent être utilisées séparément (approche monomodale) ou de manière associative (approche bimodale) afin d'obtenir des informations inédites d'ordre fonctionnel. De nouvelles techniques sont également développées afin d'améliorer les techniques existantes ou d'ouvrir le champ d'applications potentiel, comme c'est le cas de l'imagerie Cherenkov.

Chacune de ces techniques se base sur l'utilisation d'agents de contraste ou d'agents d'imagerie, constitués d'une sonde responsable du signal qui peut être associée avec un vecteur biologique. Dans le cas de l'imagerie optique, une multitude d'agents fluorescents a été préparée et développée par la communauté scientifique. Cependant, rares sont les fluorophores respectant tous les critères pour concevoir une sonde parfaite. Généralement, un compromis entre brillance, domaines d'absorption et d'émission, solubilité, stabilité, et autres critères, doit être envisagé. C'est pourquoi seuls quelques uns sont concrètement utilisés pour l'application concernée. Il existe ainsi un besoin croissant de nouveaux agents possédant des propriétés appréciables pour l'imagerie optique. C'est dans ce contexte que les chimistes interviennent, afin d'étudier et développer de nouvelles sondes fluorescentes qui possèdent les propriétés adéquates permettant d'envisager un intérêt en imagerie optique, voir en imagerie multimodale.

Au sein de l'institut (ICMUB), plusieurs équipes de recherche se sont intéressées à la mise au point d'outils chimiques pour la conception d'agents imageants, notamment à travers les projets de recherche menés dans le cadre de la convention 3MIM (Marquage de Molécules par des Métaux pour l'Imagerie Médicale) et du GIE Pharmimage®. Pour notre part, nous avons choisi d'étudier le potentiel d'utilisation de certaines familles de fluorophores dans le domaine de l'imagerie de fluorescence. Nous avons notamment cherché à savoir s'il était possible de préparer des sondes respectant au mieux le cahier des charges établi. Cela nécessite d'évaluer si d'un point de vue synthétique, de leurs propriétés chimiques ou encore photophysiques, elles peuvent prétendre trouver un intérêt dans ce domaine. Pour cela, différents critères ont été étudiés, comme par exemple la possibilité d'introduire des fonctions d'intérêt pour l'association avec un vecteur biologique (bioconjugaison) ou une sonde supplémentaire (système bimodal).

À partir d'un précurseur commun qui est le 1,2-dicyanobenzène (ou phtalonitrile), il est possible d'obtenir trois familles de dérivés aromatiques, comprenant deux, trois ou quatre unités imino-isoindoliques : les phtalocyanines et deux de ses homologues de taille réduite, les subphtalocyanines et les dérivés étendus des BODIPY que l'on nommera BenzoFused-AzaBODIPY (BFA-BODIPY) (*schéma 8*).

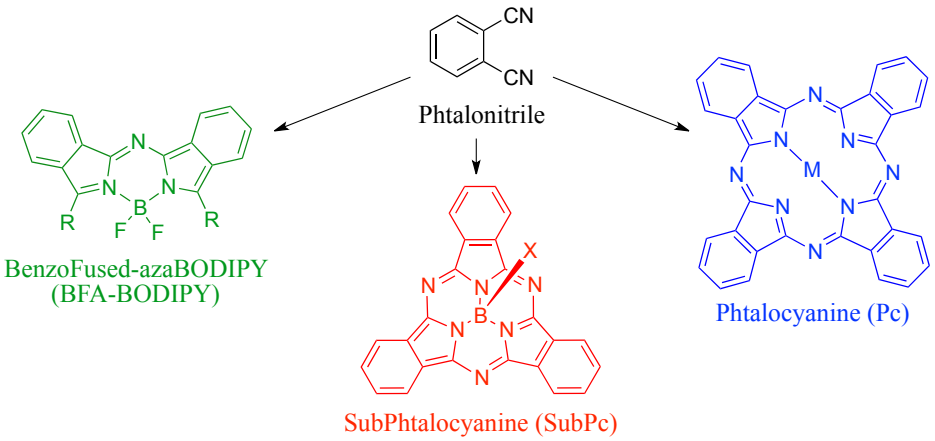


Schéma 8 : Les trois classes de fluorophores obtenues à partir d'un précurseur commun : le phtalonitrile

Les composés de ces trois familles possèdent des propriétés de fluorescence qui ont suscité notre intérêt afin d'étudier leur potentiel d'utilisation en imagerie optique. Bien que les phtalocyanines aient déjà été utilisées dans cet objectif, les exemples restent rares en comparaison du potentiel de cette famille de fluorophores. Dans les cas des subphtalocyanines et des BFA-BODIPY, ils n'ont quant à eux jamais été étudiés dans ce but. Il est donc primordial de déterminer s'ils sont accessibles d'un point de vue synthétique et s'ils possèdent des propriétés satisfaisantes, en considération du cahier des charges propre aux fluorophores organiques appliqués à l'imagerie optique.

Nous avons donc cherché à préparer les représentants les plus simples de chaque famille, à partir desquels nous avons pu comparer les propriétés et les intérêts de chacune. Nous verrons que les catégories des subphtalocyanines et des phtalocyanines de zinc ont été retenues, tandis que les dérivés BODIPY et les autres dérivés métalliques des phtalocyanines n'ont pas été sélectionnés pour la suite des recherches. Par la suite, nous avons cherché à vérifier la possibilité d'introduire des groupements chimiques permettant la biovectorisation, l'hydrosolubilisation, l'activation de la fluorescence (via une fonction désactivante) ou encore la chélation d'un métal d'intérêt médical (*figure 42*).

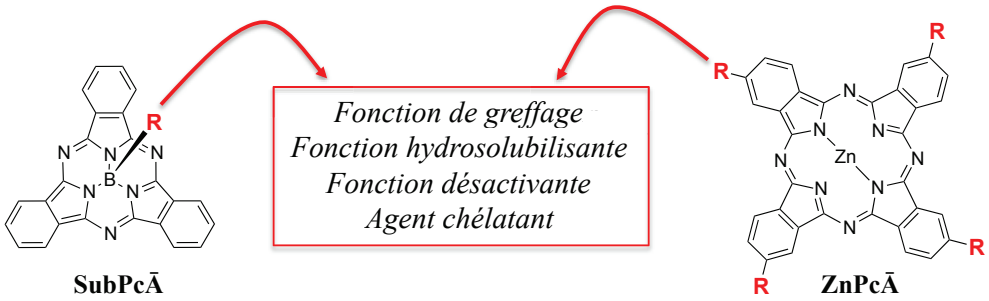


Figure 42 : Objectifs synthétiques du premier chapitre

Les composés seront également étudiés en terme de propriétés chimiques, photophysiques ou encore imageantes. Nous verrons que ces objectifs nécessitent parfois l'étude plus fondamentale du fluorophore afin de chercher à comprendre ce qui régit son comportement et ainsi améliorer son accessibilité ou ses propriétés.

Par la suite nous avons cherché à déterminer si les subphtalocyanines et phtalocyanines fonctionnelles préparées permettaient de mettre au point des agents d'imagerie mono- ou multimodaux. Dans ce contexte, nous avons associer des subphtalocyanines avec un vecteur biologique, un peptide. Puis une stratégie utilisant les liposomes pour encapsuler la sonde a ensuite été étudiée afin de tirer parti des avantages de cette méthode (*figure 43*). Nous avons également examiné la possibilité de réaliser de l'imagerie cellulaire avec les sondes préparées.

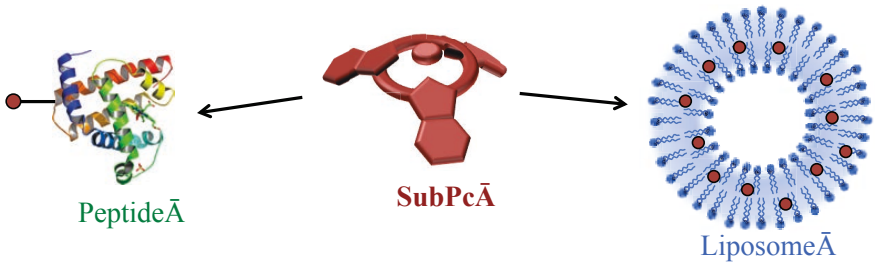


Figure 43 : Association d'une subphtalocyanine avec un peptide et encapsulation dans un liposome

Dans le cas des phtalocyanines, nous avons évalué la possibilité d'associer ce fluorophore avec des nanoparticules d'oxyde de fer paramagnétiques (Ultra Small SuperParamagnetic Iron Oxyde, USPIO) afin d'obtenir une sonde bimodale IRM/IO. Nous avons également cherché à associer les phtalocyanines à un transporteur inorganique et radiosensibilisateur, les nanotubes d'oxyde de titane (TiONts) (*figure 44*).

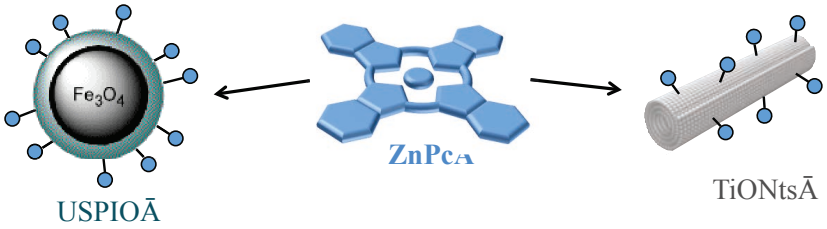


Figure 44 : Association d'une phtalocyanine de zinc avec un USPIO ou un nanotube d'oxyde de titane

Le dernier axe de recherche de ce travail de thèse est centré sur des études autour d'une imagerie optique particulière, l'imagerie Cherenkov. Comme mentionné précédemment, l'utilisation de la luminescence Cherenkov pour l'imagerie médicale s'est récemment montrée prometteuse. Dans ce contexte, il a été démontré que les composés fluorescents, capables de capter les photons Cherenkov pour les retransmettre sous forme de fluorescence (phénomène de CRET), pouvaient avoir un apport bénéfique et conduire à de nouvelles approches plus abouties. À ce jour, ce phénomène n'a cependant pas été étudié en détail et nous nous sommes donc intéressés à rationnaliser certains paramètres ayant une influence sur l'efficacité du transfert. Notre objectif principal consiste à étudier le phénomène de CRET entre différents radioéléments et fluorophores organiques, notamment afin d'augmenter le signal lumineux émis à une longueur d'onde choisie pour améliorer la pénétrabilité du CLI (*figure 45 - gauche*).

Figure 45 : Illustrations des phénomènes de CRET (gauche) et de CRET-FRET (droite)

Suite à cela, nous avons exploré la possibilité de mettre au point une sonde Cherenkov associant le radioélément et le fluorophore, en considération des résultats paramétriques obtenus. Pour finir, nous avons également étudié la possibilité de transférer les photons du radioélément dans la fenêtre du proche infrarouge en se basant sur une cascade de transfert d'énergie de type CRET-FRET (*figure 45 - droite*).

Cette thèse s'articule donc autour de trois chapitres. Le premier est consacré à l'étude synthétique des familles de sondes fluorescentes choisies et l'étude de leurs propriétés. Dans le deuxième chapitre, les approches de bioconjugaison et d'association avec des nano-objets seront discutées. Pour finir, le troisième chapitre portera sur l'étude du transfert de l'émission Cherenkov vers des fluorophores organiques classiquement utilisés en imagerie optique.

CHAPITRE I

SYNTHESE ET ETUDE DE SUBPHTALOCYANINES ET PHTALOCYANINES FONCTIONNELLES POUR UNE APPLICATION EN IMAGERIE OPTIQUE

CHAPITRE I : SYNTHESE ET ETUDE DE SUBPHTALOCYANINES ET PHTALOCYANINES FONCTIONNELLES POUR UNE APPLICATION EN IMAGERIE OPTIQUE

Partie I : Introduction sur les dérivés poly-isoindoliques

Dans un premier temps, ce chapitre expose de l'état de l'art concernant les trois fluorophores obtenus à partir du phtalonitrile, à travers leur découverte, leur synthèse, leurs propriétés et leurs applications. Un intérêt particulier sera porté sur leur utilisation dans le domaine médical, pour l'imagerie optique ou la photochimiothérapie.

I.1. Les phtalocyanines

Les phtalocyanines, analogues des porphyrines de taille et d'aromaticité supérieures, sont connues depuis plus de cent ans par la communauté scientifique. Elles ont été étudiées et caractérisées par Linstead et al. dans les années trente, et ces composés se sont révélés de puissants chromophores.[124] Elles furent donc tout d'abord abondamment utilisées comme pigments bleus (phtalocyanine de cuivre et base libre, PB15 et PB16) et verts (phtalocyanine de cuivre polychlorée et polybromée, PBPG7 et PG36) dans les industries du textile et du papier, compte tenu de leur haute stabilité chimique, photochimique et thermique. La cavité centrale d'une phtalocyanine est capable de piéger de nombreux métaux de degrés d'oxydation variables, qui peuvent permettre l'introduction de ligands apicaux dans le cas où leur degré d'oxydation est supérieur à 2. La modification des unités aromatiques en position alpha ou beta permet d'introduire des groupements dits périphériques (*figure 46*).[125]

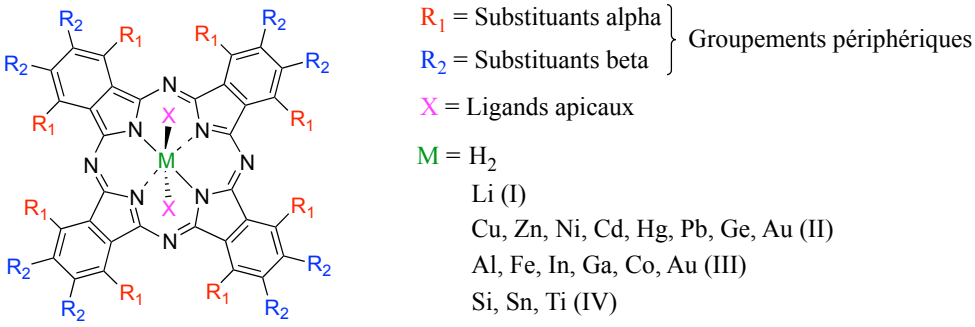


Figure 46 : Structure générale d'une phtalocyanine : substituants périphériques, métaux (quelques exemples) et ligands apicaux

Ces composés sont parfaitement plans, et la grande surface aromatique qui les constitue est ainsi sujette à une importante agrégation par interaction de type π-π.[126] Elles sont donc connues pour être très peu solubles dans les solvants organiques communs et nécessitent l'utilisation de solvants à haut point d'ébullition comme le 1-chloronaphtalène ou la quinoline. Les modifications chimiques

apicales ou périphériques permettent d'augmenter la solubilité, mais également de modifier les diverses propriétés de la molécule. Ceci profite au champ d'application possible de ces composés.

I.1.1. Propriétés optiques et photophysiques des phtalocyanines

Les phtalocyanines sont des composés possédant une forte absorption lumineuse dans le domaine du rouge (650-700 nm). Leur spectre d'absorption est similaire à celui des porphyrines, car il est caractérisé par une bande de Soret correspondant à une transition de haute énergie, et des bandes dites Q, de transition énergétique plus basse. Cependant, contrairement à leurs homologues d'aromaticité plus réduite, l'intensité de la bande de Soret est plus faible, mais les bandes Q sont plus intenses. Les phtalocyanines sont caractérisées par une fluorescence notable, variable selon la nature du métal et des substituants. Et par croisement inter-système, elles sont également efficaces pour produire de l'oxygène singulet.[127]

I.1.2. Synthèse des phtalocyanines

Les phtalocyanines peuvent être obtenues à partir de différents précurseurs, comme le montre le *schéma 9*.[128]

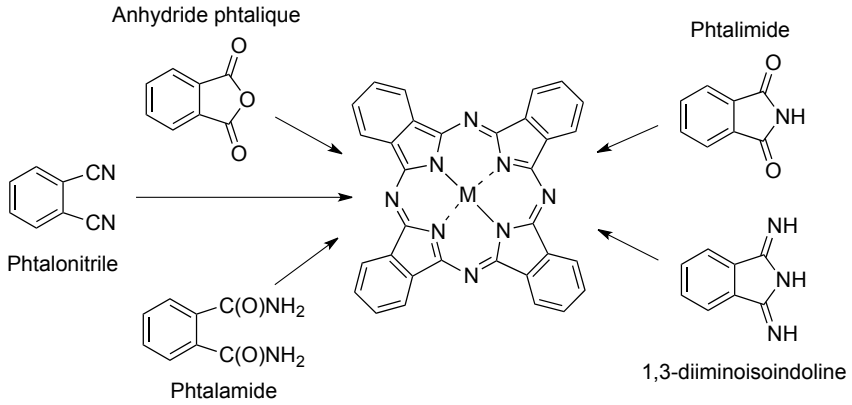


*Schéma 9 : Les différents précurseurs de phtalocyanines (Nemykin, V. N. and Lukyanets, E. A. Arkivoc **2010**)*[125]

Le plus commun et le plus simple d'utilisation reste le 1,2-dicyanobenzène (phtalonitrile), dont plusieurs dérivés substitués sont commerciaux. La réaction est généralement réalisée en présence du sel métallique voulu, qui joue le rôle de template, et dans un solvant à haut point d'ébullition (1-chloronaphtalène, quinoline, octanol,…). La méthode est variable selon la nature du template métallique et du précurseur.

I.1.3. Fonctionnalisation des phtalocyanines

I.1.3.1. Fonctionnalisation périphérique et symétrie

Bien que la modification des groupements aromatiques des phtalocyanines après cyclisation soit possible (halogénation, sulfonation), il est généralement plus commun d'utiliser un précurseur préalablement modifié avec le groupement de choix (fonctionnel, solubilisant). Dans le cas où le précurseur phtalonitrile est disubstitué en « alpha » (positions 3,6) ou en « beta » (positions 4,5) de manière symétrique, la condensation conduit à un seul produit. Mais dans le cas où le précurseur est monosubstitué (en alpha ou en beta), quatre isomères constitutionnels sont obtenus, possédant chacun leur propre symétrie : D_{2h}, C_{4h}, C_{2v} et C_s (*figure 47*).[125,128a]

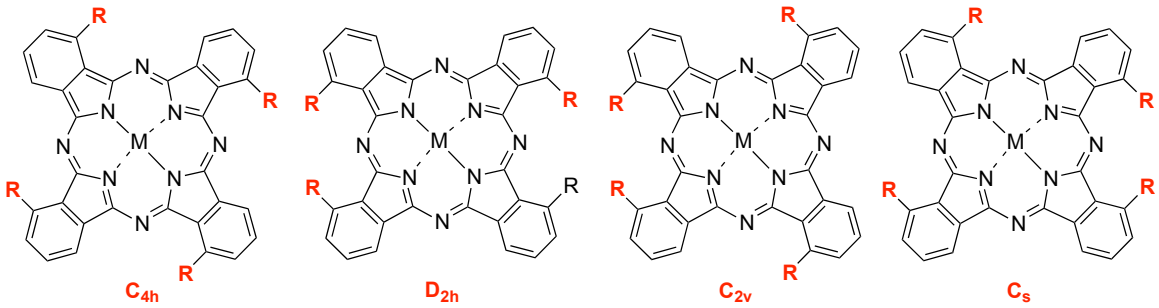


*Figure 47 : Les quatre régioisomères possibles d'une phtalocyanine tétrasubstituée en position alpha (Nemykin, V. N. and Lukyanets, E. A. Arkivoc **2010**)*[125]

Bien que généralement difficile, la séparation de ces régioisomères reste tout de même possible.[129] Dans le cas où ils ne sont pas séparés, le mélange est représenté comme sur la *figure 48* (cas d'une phtalocyanine tétrasubstituée en position beta). Les modifications chimiques postérieures sont alors réalisées sur ce mélange.

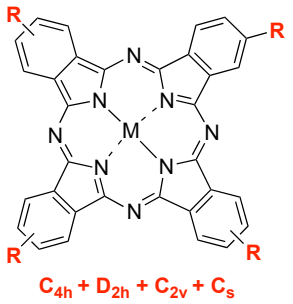


Figure 48 : Représentation du mélange de phtalocyanines tétrasubstituée en position beta

I.1.4. Fonctionnalisation périphérique dissymétrique

Pour de nombreuses applications, il est nécessaire de synthétiser des phtalocyanines dites dissymétriques : monosubstituées, disubstituées de façon adjacente ou opposée (*cis*/*trans*), ou trisubstituées. Plusieurs méthodes sont alors possibles pour obtenir le composé possédant le nombre de fonctions voulu.[128,130]

I.1.4.1. Méthode statistique

La méthode la plus courante pour obtenir des phtalocyanines dissymétriques consiste à condenser statistiquement différents dicyanobenzènes et à isoler par purification le produit de symétrie d'intérêt. Lorsque l'on condense deux précurseurs différemment substitués, nommés A et B, on obtient plusieurs phtalocyanines dont la nature des unités isoindoliques varie, nommées A_4, A_3B, A_2B_2, AB_3 et B_4 (*schéma 10*).

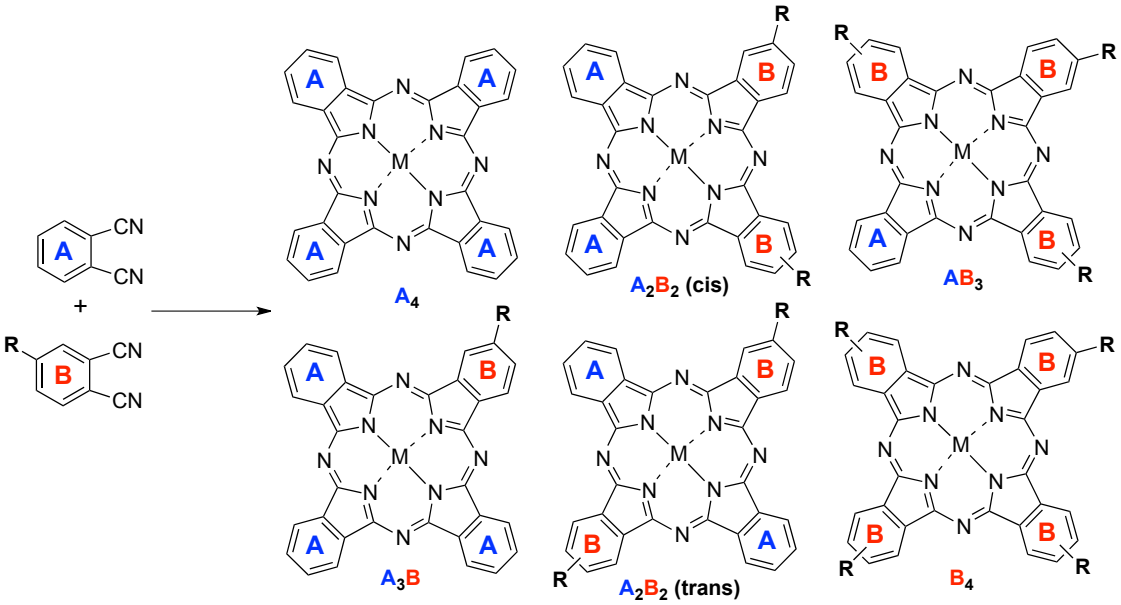


Schéma 10 : Les différentes phtalocyanines obtenues lors de la condensation statistique de deux précurseurs phtalonitriles A et B (Mack, J. and Kobayashi, N. Chem. Rev. ***2011****)*[128b]

D'autre part, si les précurseurs phtalonitriles A et B sont monosubstitués, il existe également différents régioisomères associés aux symétries mentionnées dans le paragraphe précédent (C_{2v}, D_{2h},…).

Dans de nombreux cas, l'espèce désirée est souvent la phtalocyanine de type A_3B, car elle possède un site fonctionnel (B) distinct des trois autres. Pour l'obtenir par la méthode statistique, la procédure générale consiste à condenser le précurseur B avec un grand excès de précurseur A (5-10 équivalents), afin d'obtenir un mélange de seulement deux phtalocyanines : les composés A_3B et A_4. Il est alors envisageable de séparer ces deux espèces par purification, dans la plupart des cas, sur colonne de silice. Cependant, ces purifications restent compliquées, longues, et parfois impossibles, compte tenu de la faible solubilité des phtalocyanines.

Afin de pallier ce problème, un groupe de recherche a pu montrer qu'il était possible de purifier une phtalocyanine de type A_3B en la greffant sur un support solide (silice, matrice polymère) en utilisant la réactivité du fragment B. Après réaction de greffage, la phtalocyanine non greffée A_4 peut être

éliminée par lavage abondant (soxhlet) du solide. Puis l'espèce dissymétrique est libérée et isolée par clivage de la liaison Pc-support solide.[131] Cette méthode reste cependant fastidieuse.

I.1.4.2. Méthodes sélectives

Des méthodes alternatives à la condensation statistique ont par ailleurs été développées afin de donner accès aux phtalocyanines dissymétriques de manière sélective. Elles permettent d'accéder selon le cas à des phtalocyanines de type A_3B ou A_2B_2. Par souci de clarté, seule la méthode permettant d'accéder à l'espèce A_3B sera décrite.

Découverte dans les années 80 par N. Kobayashi, la réaction d'ouverture de cycle des subphtalocyanines consiste à utiliser les analogues plus petits des phtalocyanines, les subphtalocyanines de bore.[132] Elles peuvent être ouvertes et réorganisées en une phtalocyanine par l'action d'un 1,2-dicyanobenzène ou d'une 1,3-diiminoisoindoline dans des conditions relativement drastiques (haute température) (*schéma 11*). Cette réaction est cependant très dépendante de la richesse électronique de la subphtalocyanine et du dérivé phtalonitrile ou 1,3-diiminoisoindolique. Dans les cas défavorables, d'autres phtalocyanines sont également obtenues (A_4, A_2B_2,…).

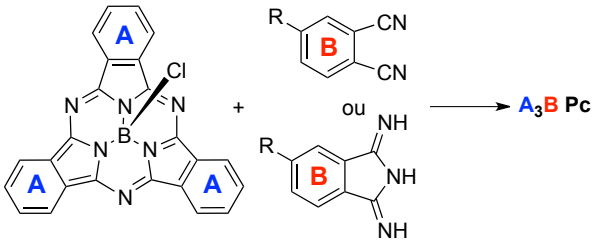


*Schéma 11 : Réaction d'élargissement de cycle d'une subphtalocyanine (Mack, J. and Kobayashi, N. Chem. Rev. **2011**)*[128b]

I.1.4.3. Fonctionnalisation apicale pour les métaux tri et tétravalents

Dans les cas où le métal central possède une valence supérieure à deux, comme c'est le cas pour les phtalocyanines d'aluminium ou de silicium, l'espèce obtenue présente un ou plusieurs atomes de chlore en position apicale. Ceux-ci peuvent être substitués par un nucléophile de choix pour introduire la fonctionnalité voulue. Cependant, les espèces chlorées de départ sont parmi les phtalocyanines les plus insolubles, la réaction de substitution peut donc parfois s'avérer difficile.[133]

I.1.1. Solubilisation des phtalocyanines par modifications périphériques

Comme mentionné précédemment, les phtalocyanines sont des composés très peu solubles en milieu organique, et totalement insolubles dans l'eau. En vue de leur utilisation pour diverses applications, la première étape consiste donc souvent à les rendre solubles dans le milieu d'intérêt.

I.1.1.1. Solubilisation en milieu organique

La plupart des phtalocyanines non substituées ou substituées avec de petits groupements ne sont pas suffisamment solubles pour appliquer les méthodes de travail de chimie organique classiques, (lavages, purification chromatographique). Ces techniques sont cependant essentielles à la synthèse de systèmes complexes tels que les phtalocyanines dissymétriquement substituées, généralement préparées par méthode statistique. C'est pourquoi il est souvent nécessaire de préparer des précurseurs dicyanobenzènes ayant pour rôle de solubiliser le motif aromatique en milieu organique.

De nombreuses méthodes de synthèse ont été développées pour préparer des dérivés phtaliques substitués par des groupements alkyles, oxyalkyles, thioalkyles, aryles et autres.[125,128a] Le plus commun reste le 4-tertbutylphtalonitrile, qui permet d'obtenir des phtalocyanines plus solubles. Cependant, il est généralement d'efficacité insuffisante, l'agrégation étant toujours très présente. Les routes synthétiques permettant de donner accès aux phtalonitriles substitués sont pour la plupart longues et fastidieuses. Mais à ce jour, plusieurs intermédiaires clefs sont commerciaux, comme les 3- ou 4-nitrophtalonitrile, le 2,6-dihydroxyphtalonitrile ou encore le 4,5-dichloro-phtalonitrile, et permettent d'accéder relativement facilement aux phtalonitriles mono/di-substitués par des groupements alkoxy/phénoxy ou thioalkoxy/thiophénoxy par substitution nucléophile.

I.1.1.2. Hydrosolubilisation

Certaines applications, notamment dans le domaine médical, nécessitent de synthétiser des phtalocyanines solubles en milieu aqueux. Comme pour d'autres systèmes hydrophobes, la stratégie consiste à introduire des motifs hydrophiles sur la molécule. Ils peuvent être de plusieurs natures :[134]

* Groupements neutres : PEG, carbohydrate, sucres, polyamines[135]
* Groupements purement anioniques : sulfonates, carboxylates, phosphonates[136]
* Groupements purement cationiques : ammonium, pyridinium[136b,137]
* Groupements zwitérioniques : acides aminés, sulfobétaïnes

Ces groupements peuvent être introduits en position périphérique, ou apicale dans le cas de phtalocyanine d'aluminium ou de silicium. Mais malgré de nombreux exemples, rares sont les phtalocyanines totalement non agrégées en milieu aqueux.

I.1.1.1. Conséquences de la fonctionnalisation périphérique sur les propriétés optiques

La fonctionnalisation périphérique des phtalocyanines conduit généralement à une modification des propriétés du macrocycle, notamment à un déplacement des maxima d'absorption. Ce phénomène dépend du nombre de substituants, de leur nature (donneur ou attracteur) et de leur position (alpha ou beta).

Le déplacement batochrome de la bande Q sera plus important si :

* le nombre de substituants augmente ;
* la fonctionnalisation est en alpha ;
* l'effet donneur des substituants augmente.

Le *tableau 10* décrit quelques effets de substitution sur la longueur d'onde d'absorption maximale de phtalocyanines de zinc.

Substituants beta	Substituants alpha	Bande Q (nm)	Références
H	H	665 (THF)	Vincett *et al.*[138]
$(O\text{-}R)_4$	H	677 (DMF)	Zorlu *et al.*[139]
$(O\text{-}R)_8$	H	678 (DCM)	Topal *et al.*[140]
$(S\text{-}R)_8$	H	711 (DCM)	Topal *et al.*[140]
H	$(O\text{-}R)_4$	696 (DMF)	Zorlu *et al.*[139]
H	$(O\text{-}R)_8$	729 (DMF)	Zorlu *et al.*[139]
H	$(S\text{-}R)_8$	800 (DCM)	Topal *et al.*[140]
$(O\text{-}Ar)_8$	$(O\text{-}R)_8$	741 (DCM)	Atsay *et al.*[141]

Tableau 10 : Exemples de longueurs d'onde d'absorption maximales de phtalocyanines de zinc avec variation de la nature, du nombre et de la position des substituants

Dans ce contexte, Kobayashi et al. ont pu rationnaliser le moyen d'obtenir des phtalocyanines absorbant à des longueurs d'onde supérieures à 1000 nm. Cela nécessite d'introduire dans la cavité centrale des éléments électro-déficients (P, As, Sb), et en position alpha des chalcogènes donneurs (S, Se, T).[142]

I.1.2. Applications des phtalocyanines

Les phtalocyanines restent encore aujourd'hui utilisées dans le domaine des pigments, mais la majorité de la consommation mondiale est dédiée à la catalyse. La phtalocyanine de cobalt sulfonatée, utilisée dans des systèmes industriels, permet en effet de désulfuriser le pétrole par oxydation (procédé Merox).[143] Grâce à leurs propriétés conductrices, ces composés sont également présents dans les imprimantes, dans les disques enregistrables ou encore dans les écrans LCD. Mais depuis plusieurs années déjà, l'intérêt de la communauté scientifique pour les phtalocyanines s'est fortement accru dans de nouveaux domaines comme le transfert d'énergie et le photovoltaïque,[144] l'optique non linéaire,[145] les détecteurs[146] ou encore la santé.[147] Ce dernier point sera plus

particulièrement développé à travers l'utilisation des phtalocyanines en thérapie photodynamique et en imagerie optique.

I.1.2.1. Les phtalocyanines en PDT

Depuis les années 1990, la communauté scientifique s'est intéressée à l'utilisation des phtalocyanines en PDT. Cette classe de photosensibilisateurs possède en effet, les avantages suivants :

* absorber dans la fenêtre thérapeutique, ce qui permet une meilleure pénétrabilité en terme d'excitation du photosensibilisateur ;
* posséder de bons rendements en état triplet ;
* être fluorescente, ce qui permet un suivi par imagerie optique proche infrarouge de leur distribution. Elles sont donc intrinsèquement des sondes théranostiques ;
* être hautement photostable, ce qui permet une irradiation de longue durée.

Plusieurs phtalocyanines sont aujourd'hui en évaluation clinique et ont montré une bonne activité photosensibilisatrice. On retrouve des phtalocyanine d'aluminium (Photosens®), de silicium (Pc4) et de zinc (CGP55847 et photocyanine) (*figure 49*).

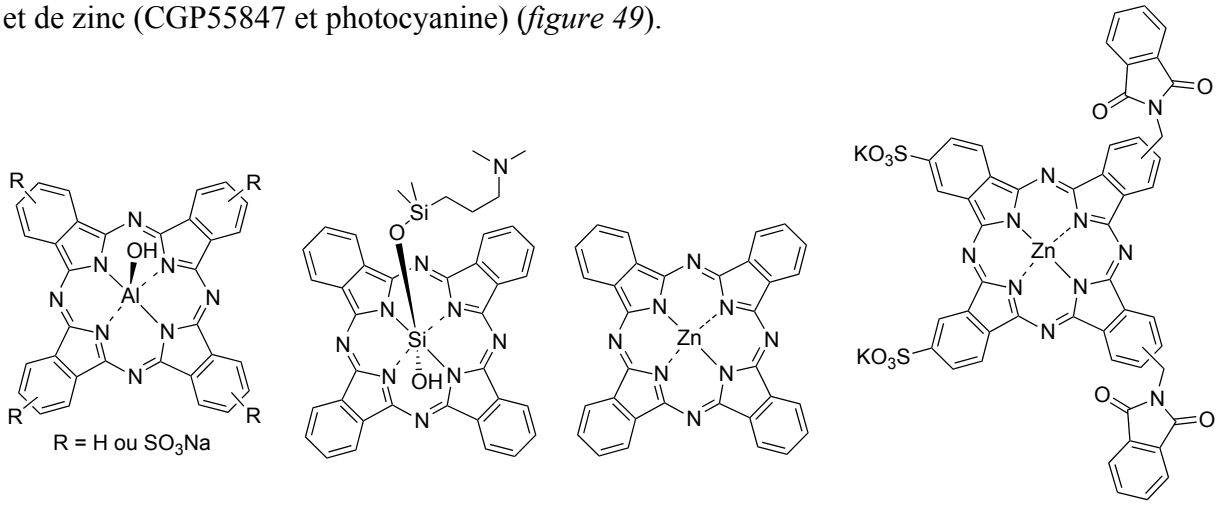


*Figure 49 : Structures des phtalocyanines photosensibilisatrices évaluées en milieu clinique (Jiang, Z. et al. J. Pharmaceutic. Biomed. **2014**)*[147b]

Seul le Photosens est commercial pour une application clinique (en Russie) tandis que les trois autres sont en essais cliniques (Phase I/II - USA, Suisse et Chine).[147b] Ces phtalocyanines sont indiquées pour différents types de cancers, notamment de surface (peau, œil, nez, cervicales). Leur manque de spécificité pour la cible limite cependant leur application.

L'une des méthodes examinées pour améliorer l'efficacité thérapeutique consiste donc à biovectoriser ce composé photosensibilisant afin d'obtenir une distribution sélective permettant une thérapie plus ciblée. Plusieurs approches ont été explorées, comme la bioconjugaison avec un anticorps,[148] des oligonucléotides[149] ou des petites molécules vectrices (oses,[135g-i] acide folique,[150] mestranol,[151] erlotinib[152]). Dans ce contexte, les équipes de J.E. van Lier et B. Guerin ont exploré la bioconjugaison d'une phtalocyanine de zinc sur différents peptides, notamment la bombésine et le RGD, en utilisant des réactions de couplage croisé telles que les réactions de Sonogashira ou Suzuki (*schéma 12*).[153]

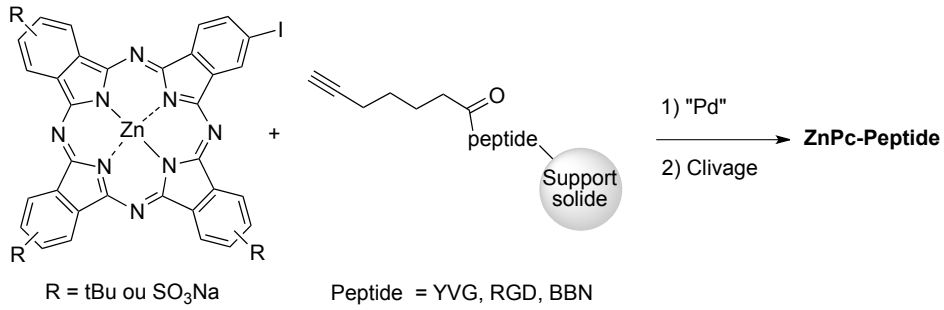


Schéma 12 : Bioconjugaison de phtalocyanines de zinc avec différents péptides par réaction de Sonogashira (Ranyuk, E. et al. J. Med. Chem. ***2013****)*[153c]

La présence du peptide permet d'augmenter la solubilité en milieu aqueux de la phtalocyanine et d'augmenter l'activité photodynamique sur les cellules exprimant les récepteurs GRP ou intégrines. Plusieurs autres études ont également été menées dans un but d'association des phtalocyanines avec divers peptides, afin par exemple de cibler les récepteurs de facteurs de croissance de l'épiderme (EGFR).[154] L'approche d'encapsulation dans une micelle ou un liposome, comme dans le cas de CGP55847 (solution liposomiale de ZnPc) est également explorée.[155] D'autres approches visent à améliorer les propriétés du photosensibilisateur par introduction de nouveaux groupements permettant d'augmenter l'hydrosolubilité ou la production de PROS,[136a-c,137b,137d,137n,o,156] de combiner les phtalocyanines avec un autre agent thérapeutique ou photosensibilisateur,[157] d'utiliser des nanovecteurs (polymères, dendrimères, nanoémulsions),[157d,158] ou encore de mettre au point des phtalocyanines activables.[159]

I.1.2.2. Les phtalocyanines en imagerie

La plupart des phtalocyanines utilisées, testées ou mises au point pour la PDT discutées précédemment sont également des sondes traçables en l'imagerie optique. Mais les phtalocyanines sont parfois seulement étudiées comme agent d'imagerie. Nous avons pu voir dans l'introduction que GE-Healtcare et Hyperion commercialisaient respectivement l'IRDye700DX® et la JollaBlue® dans ce but. Récemment, l'équipe de T. Liu a développé un certain nombre de phtalocyanines

substituées par différents saccharides (glucose, lactose et galactose) comme agents d'imagerie optique proche infrarouge, notamment pour imager le cancer du foie.[135b,135d-f] Les deux composés présentés sur la *figure 50* ont été synthétisés et testés avec succès sur le modèle animal (souris) pour imager les ganglions sentinelles.

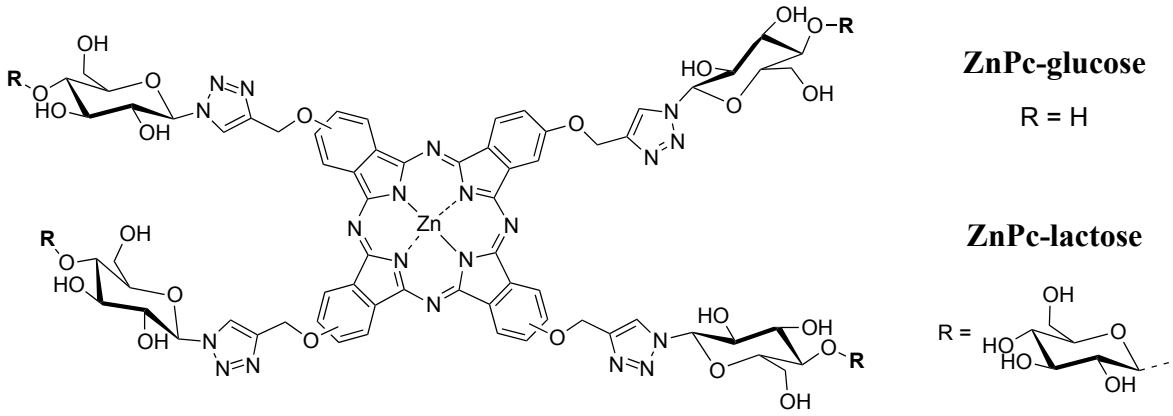


*Figure 50: Structures de deux phtalocyanines développées par Lu, L. et al. (Molecules **2014**)[135b]*

I.1.2.3. Association avec une autre modalité d'imagerie

Avec l'essor des approches multimodales, plusieurs phtalocyanines combinant l'imagerie optique ou la thérapie photo-dynamique avec la TEP ou l'IRM ont été développées. Dans ce but, Ranyuk *et al.* ont récemment étudié différentes approches pour associer un radioélément avec une phtalocyanine.

∗ La première approche repose sur l'introduction de cuivre-64 dans la cavité de phtalocyanines hydrosolubles (*figure 51 - gauche*).[160]

∗ Une deuxième approche propose la fonctionnalisation de phtalocyanines par un atome de fluor-18 en substituant un groupe partant (mesyl). La preuve de concept a été développée sur des composés hydrophobes (*figure 51 - milieu*).[161]

∗ Dans un dernier article, les auteurs ont associé une phtalocyanine hydrosoluble avec des agents chélatants de type polyazacycloalcane, le DOTA et le NOTA, capables de piéger le gallium-68 et le cuivre-64, respectivement (*figure 51 - droite*).[162]

Ces trois systèmes ne sont cependant pas optimaux compte tenu de l'absence d'une biomolécule vectrice.

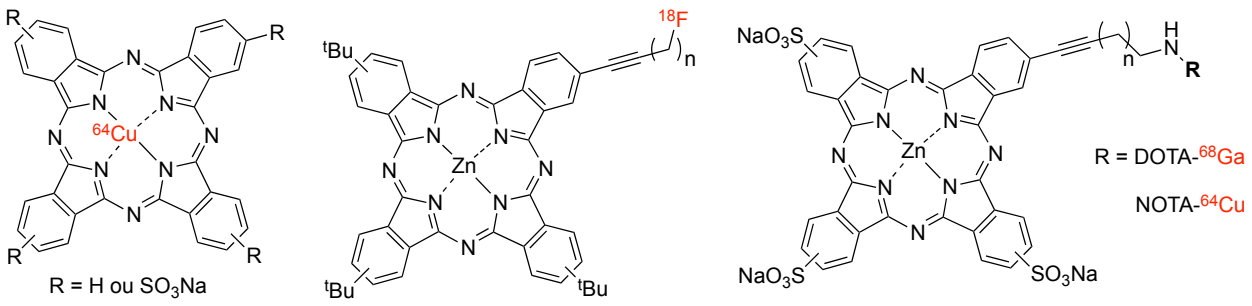


*Figure 51: Structures des phtalocyanines préparées par Ranyuk, E. et al. lors des différentes approches d'association avec un radioélément (Bioorg. Med. Chem. Lett. **2011** – J. Porphyrins Phthalocyanines **2013** – Bioconjugate Chem. **2013**)*[162]

Plus récemment, un composé associant une phtalocyanine avec un complexe de gadolinium (DOTA-Gd) a pu être préparé par Tekdas et al. afin d'obtenir une sonde bimodale et théranostique IRM/IO/PDT (*figure 52*).[163]

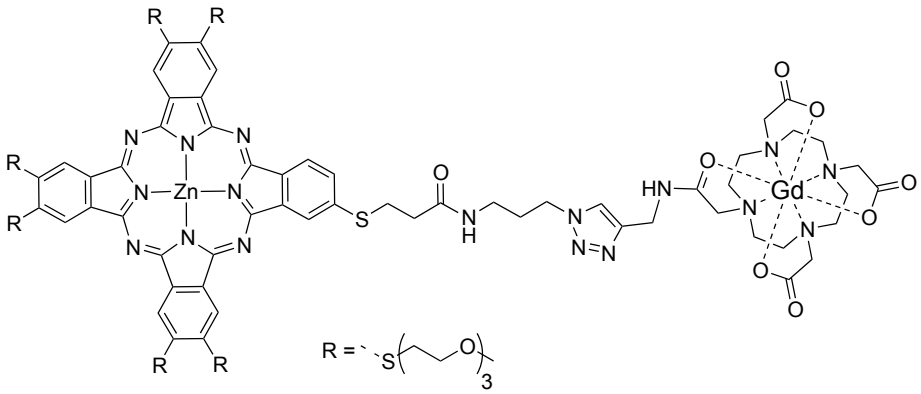


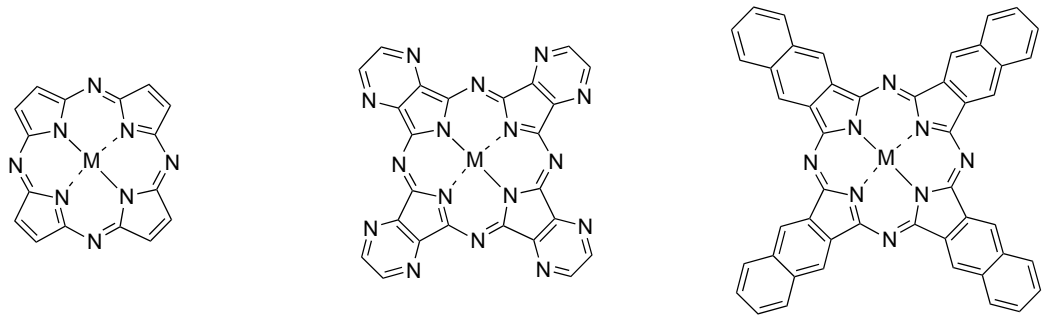
*Figure 52: Structure de la phtalocyanine préparée par Tekdas D. A. et al. pour l'association IO/PDT/IRM (Photochem. Photobiol. **2014**)*[163]

Les propriétés imageantes et thérapeutiques du composé ont pu être évaluées *in vitro*, grâce à la mesure du rendement en oxygène singulet, la microscopie cellulaire confocale et l'acquisition d'images en T_1 (fantômes).

Cependant, l'utilisation de ces différents systèmes bimodaux est limitée par l'absence d'une entitée vectrice visant à être selectif des zones tumorales.

I.1.2.4. Les analogues de phtalocyanines en PDT et en imagerie

Certains analogues des phtalocyanines ont également été étudiés pour une application en PDT ou en imagerie, notamment les porphyrazines, les pyrazino-porphyrazines fusionnées (azaphtalocyanines) et les naphtalocyanines (*figure 53*).



Porphyrazine (Pz) **AzaPhtalocyanine (AzaPc)** **Naphtalocyanine (Nc)**

Figure 53 : Structures d'une naphtalocyanine, d'une porphyrazine et d'une azaphtalocyanine

Certaines **porphyrazines** ont suscité l'intérêt pour une utilisation en PDT mais aussi en imagerie optique. Ce sont généralement des *trans*-hémiporphyrazines qui peuvent posséder des fragments hydrosolubilisants comme des polyéthers,[164] des sucres,[165] ou à défaut être incorporées dans des liposomes.[164b] L'hémiporphyrazine chirale développée par Trivedi et al., étudiée en imagerie optique sur le petit animal, a par exemple montré une accumulation préférentielle dans la zone tumorale.[166] Le même groupe de recherche a également mis au point des porphyrazines fonctionnalisées par des complexes de gadolinium (DOTA-Gd) en utilisant la chimie click catalysée au cuivre, pour une application en imagerie multimodale IO/IRM.[167]

Les **azaphtalocyanines** sont aujourd'hui principalement étudiées par le groupe de P. Zimcik. Son équipe a pu synthétiser des composés possédant des propriétés intéressantes pour différentes applications du domaine médical, notamment de bons rendements quantiques de fluorescence ou de production d'oxygène singulet. Parmi les composés développés, on retrouve :

* des azaPc hydrosolubles comme sondes potentielles pour la thérapie ou l'imagerie ;[168]
* des azaPc qui possèdent des propriétés de quencher de fluorescence (Dark quencher)[169] pour la mise au point de sonde FRET ;
* des azaPc pH-activables.[170]

Certaines aza-phtalocyanines de magnésium qu'ils ont synthétisé possèdent d'excellents rendements quantiques de fluorescence en solution aqueuse (Φ_F = 25 %) ou en suspension liposomiale (Φ_F = 65 %).[168]

Les **naphtalocyanines** possèdent l'avantage d'absorber les photons au delà de 700 nm, ce qui offre une meilleure pénétrabilité tissulaire en terme d'excitation. Plusieurs exemples traitent de l'utilisation des naphtalocyanines en PDT, qui sont soit hydrosolubilisées par une substitution périphérique adaptée,[136d,171] soit formulées avec un surfactant[172] ou des LDL reconstituées.[173]

I.2. Les subphtalocyanines

Les sousphtalocyanines ou "subphtalocyanines" sont les analogues de taille plus réduite des phtalocyanines. Elles sont composées de trois unités iminoisoindoliques cyclisées autour d'un atome de bore. Elles furent découvertes accidentellement par Meller et Osko en 1972 alors qu'ils essayaient d'obtenir la phtalocyanine de bore, en condensant le phtalonitrile avec des halogénoboranes.[174] La première structure cristallographique d'une subphtalocyanine, la *B*-chlorosubphthalocyanine de bore (III), fut ensuite reportée en 1974.[175] La tension de cycle et la taille trop importante du bore leurs confèrent une structure conique, avec le substituant apical pointant à l'opposé du cône, contrairement à leurs analogues porphyrinoïdes (porphyrine, phtalocyanine) qui sont parfaitement plans.

Suite aux résultats obtenus par Meller et Osko, peu de travaux furent publiés sur le sujet jusqu'en 1990, lorsque le groupe de Kobayashi rendit publique la réaction d'élargissement de cycle conduisant aux phtalocyanines A_3B.[132a] Par la suite, la communauté scientifique montra un intérêt croissant pour les subphtalocyanines comme précurseurs de phtalocyanines dissymétriques, mais aussi parce que ces composés présentent des propriétés uniques. Comme dans le cas des phtalocyanines, il est possible d'introduire des substituants périphériques en position alpha ou beta et également un substituant apical directement lié à l'atome de bore (*figure 54*).

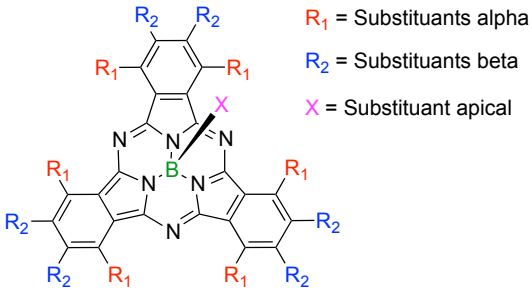


Figure 54 : Structure générale d'une subphtalocyanine et positions de substitution

La synthèse, la fonctionnalisation, les propriétés et applications de cette famille de molécules ont été abordées dans plusieurs revues.[176]

I.2.1. Propriétés des subphtalocyanines

Les subphtalocyanines possèdent un système de 14 électrons π délocalisés, ce qui leur confère une intense coloration rouge. Leur spectre d'absorption présente, au même titre que tout porphyrinoïde, une bande de Soret vers 300 nm et une seule bande Q vers 565 nm. Cette catégorie de molécules possède de nombreuses propriétés intéressantes, notamment une émission de fluorescence notable.

I.2.2. Méthode de synthèse des subphtalocyanines

À ce jour, le seul moyen connu d'obtenir une subphtalocyanine est la condensation d'un phtalonitrile avec un dérivé boronique de type halogénoborane, arylborane ou mixte (Ar_nX_mB). Le dérivé

boronique joue un rôle important dans le succès de la réaction. Les meilleurs résultats sont généralement obtenus en utilisant le trichlorure de bore BCl_3.[176a] La formation du cycle nécessite d'autre part des solvants à haut point d'ébullition, comme dans le cas des phtalocyanines. Si les premières synthèses furent réalisées dans le chloronaphtalène, il a par la suite été montré que le p-xylène était plus adapté à la réaction et facilite le traitement.[177] Le rendement de réaction est variable selon la nature des substituants périphériques. Un mécanisme de formation du cycle subphtalocyanine a récemment été proposé par le groupe de T. Torres.[178] Il suppose l'intervention du trichlorure de bore à plusieurs stades de la réaction, ce qui confirme la nécessité d'utiliser ce réactif en équivalence par rapport au phtalonitrile.

I.2.3. Fonctionnalisation des subphtalocyanines

I.2.3.1. Fonctionnalisation périphérique

Comme dans le cas des phtalocyanines, il est possible d'utiliser des précurseurs substitués pour accéder à des SubPc fonctionnelles. La méthode statistique permet également d'obtenir une subphtalocyanine dissymétrique (A_2B). Lorsque la subphtalocyanine est di- ou trisubstituée (A_2B et A_3), il existe également les différents régioisomères et énantiomères issus de la position du substituant (C_3 et C_1).[179]

I.2.3.2. Fonctionnalisation apicale

Il a été montré de nombreuses fois que l'halogénure apical porté par l'atome de bore (Cl ou Br) peut être substitué par différents nucléophiles. La facilité de cette réaction va dépendre de la richesse électronique du cycle aromatique et de la nature du substituant. Les dérivés phénoliques se sont montrés plus particulièrement efficaces comme nucléophiles.[177] Mais il est également possible d'introduire d'autres types de groupements en position apicale, notamment des alcools,[180] des dérivés azotés,[181] des alcynes,[182] et d'autres.[176c] La substitution du chlore par un groupement partant comme un triflate permet également d'améliorer la réaction et offre une plus grande diversité dans la nature du substituant.[183]

I.2.3.3. Influence des substituants sur les propriétés optiques

De la même manière que pour les phtalocyanines, la présence de groupements périphériques donneurs induit un décalage de la longueur d'onde d'absorption de la bande Q vers le rouge. Ce phénomène dépend également de la nature, du nombre et de la position du/des substituants.[176a,184] Ces paramètres influent également sur le rendement quantique de fluorescence (*tableau 11*).

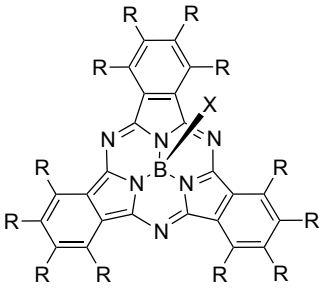
	R	X	Solvant	$\lambda_{Abs}/\lambda_{Em}$	Φ_F
	H	Cl	$CHCl_3$	564/569	0,25
	H	O-C_6F_5	CH_2Cl_2	563/592	0,42
	F	Cl	$CHCl_3$	574/579	0,66
	Cl	Cl	CH_3CN	569/581	0,26
	-O-CH_2-CF_3	Cl	$PhCF_3$	602/618	0,95
Subnaphtalocyanine (SubNc)		Cl	CH_3CN	669/681	0,26

*Tableau 11 : Propriétés photophysiques de quelques subphtalocyanines de substitution variable (Claessens, C. G. et al. Chem. Rev. **2002** - Chem. Rev. **2014**)*[176a,176c]

La subphtalocyanine dodécafluorée est par exemple deux fois plus fluorescente que la version non substituée. Le plus haut rendement quantique mesuré pour les subphtalocyanines est de 95 % dans le trifluorotoluène et concerne le composé fonctionnalisé en périphérie par des motifs trifluoroéthoxy.[180] La substitution apicale quant à elle, modifie peu les domaines d'absorption et d'émission, mais a parfois une influence sur la valeur de rendement quantique de fluorescence.

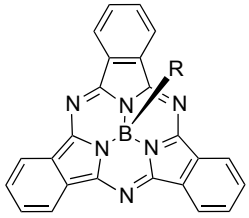
I.2.4. Solubilisation des subphtalocyanines

I.2.4.1. Organosolubilisation

Contrairement à leurs homologues de taille supérieure, les subphtalocyanines possèdent généralement une meilleure solubilité en milieu organique. Ceci est principalement dû à deux facteurs : l'aspect non plan qui défavorise l'agrégation, et la présence d'un groupement apical. La SubPc la plus simple reste tout de même peu soluble, mais la substitution du chlore par un groupement plus encombrant permet rapidement d'obtenir une solubilité satisfaisante. Il est donc moins souvent nécessaire d'introduire des groupements périphériques organo-solubilisants.

I.2.4.2. Hydrosolubilisation

Il existe plusieurs exemples de subphtalocyanines hydrosolubles dans la littérature.[134a] Le ou les fragments solubilisant ont pu être introduits en position périphérique ou apicale. On retrouve des exemples de subphtalocyanines hydrosolubles cationiques (ammonium, pyridinium),[185] zwitérioniques[185c] ou anioniques (carboxylates, sulfonates).[185b,186] Le *tableau 12* présente les subphtalocyanines hydrosolubles synthétisées par Xu et al. par fonctionnalisation apicale.



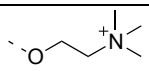
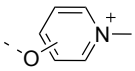
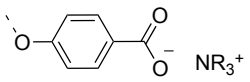
R	Φ_F (DMF)	Φ_Δ (DMF)
	0,10	0,59
	0,08 - 0,09	0,61 - 0,66
	0,09 - 0,10	0,56 - 0,60

Tableau 12 : Structures des subphtalocyanines hydrosolubles développées par Xu, H. et al. (Φ_Δ = rendement en état triplet) (Chem. Asian J. 2009)[185b]

I.2.5. Applications des subphtalocyanines

Les SubPc sont aujourd'hui majoritairement utilisées dans le domaine du photovoltaïque. Elles ont notamment été appliquées à la préparation de cellules solaires,[187] et de nombreuses études portent sur la mise au point de photosystèmes artificiels. Pour ce dernier point, les subphtalocyanines ont été associées avec d'autres fluorophores, comme les porphyrines,[188] les phtalocyanines,[188c,189] les BODIPY,[182b,190] et d'autres,[191] et/ou avec un fullerène,[192] afin d'étudier les phénomènes de transfert d'énergie. Mais elles ont également été étudiées dans de nombreux autres domaines comme l'optique non linéaire,[184b,193] les détecteurs,[194] les semi-conducteurs,[195] les diodes électroluminescentes[196] ou les transistors à effet de champ.[197]

À ce jour, rares sont les subphtalocyanines qui ont été utilisées pour des applications dans le domaine de la santé. K. Adachi et H. Watarai ont fonctionnalisé une subphtalocyanine en position apicale par la testostérone en vue de mettre au point un test de détection de la HSA (Human Serum Albumine) (*figure 55 - gauche*).

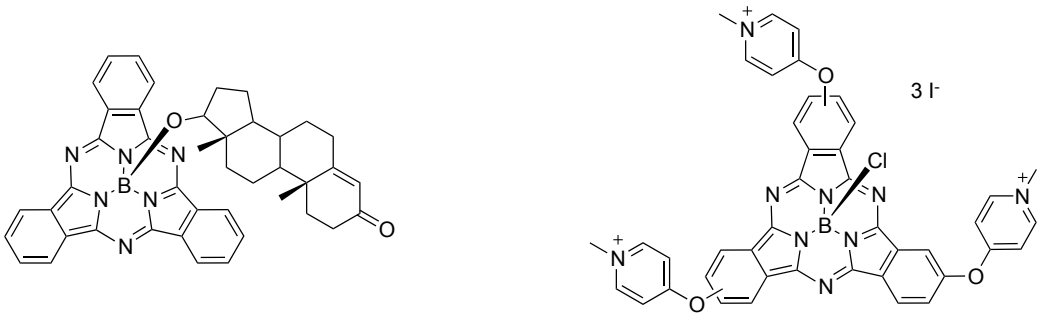


Figure 55 : Structures des subphtalocyanines synthétisées par Adachi, K. et al. (droite – Anal. Chem. ***2006****)*[198] *et Spesia, M. B. et al. (gauche – Dyes Pigments* ***2008****)*[185a]

M. Spesia et E. Durantini ont examiné la possibilité d'utiliser ces composés comme photosensibilisateurs pour la PDT. Pour cela, ils ont synthétisé une subphtalocyanine tricationique

hydrosoluble et testé son activité photothérapeutique (PDT) *in vivo* sur des bactéries (*Escherichia Coli*) (*figure 55 - droite*).[185a]

I.3. Les benzo-azaBODIPY fusionnés

Le complexe difluoré de bore du 3,3'diphénylazadiisoindolylméthène n'a été synthétisé que récemment par les équipes de Lukyanets et Kobayashi (2008).[199] Ce dérivé étendu des aza- BODIPY a été obtenu par condensation du dicyanobenzène avec un organomagnésien aromatique puis traitement par le trifluorure de bore. Les conditions réactionnelles ont ensuite été améliorées et étendues à d'autres dérivés magnésiens par l'équipe de R. Gresser.[200] Ce sont des composés fluorescents, absorbant vers 720 nm et émettant vers 740 nm, avec des rendements quantiques de fluorescence avoisinant les 15 %.

À ce jour, ces dérivés n'ont été étudiés que pour deux applications : la mise au point de cellules photovoltaïques[201] et les détecteurs.[202] Dans ce dernier cas, les équipes de Kobayashi et Shen ont préparé un composé analogue pour lequel le cycle aromatique de l'isoindole a été remplacé par un motif pyrazine (*figure 56*). Ce composé s'est montré capable de détecter la présence d'ions ammoniums, l'interaction de l'atome d'azote pontant avec ces ions, assistés par la présence des azotes des cycles pyrazines, conduisant à une modification des propriétés d'absorption et d'émission du fluorophore.

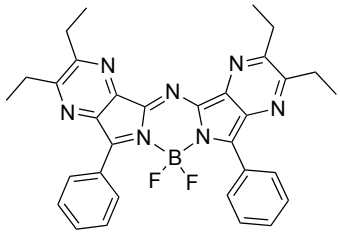


*Figure 56 : Structure du dérivé BODIPY synthétisé par Liu, H. et al. (Chem. Commun. **2011**)*[202]

I.4. Comparaison des avantages et inconvénients des trois fluorophores

Comme présenté dans l'objectif général, nous avons envisagé ces trois familles de fluorophores afin de mettre au point des sondes pour l'imagerie optique. Elles possèdent chacune des critères uniques qui peuvent être avantageux pour l'application visée. En s'appuyant sur ces critères, nous avons ainsi pu sélectionner les sondes qui seront plus particulièrement étudiées par la suite.

I.4.1. Synthèse des représentants simples de chaque famille de fluorophore

Afin de pouvoir apprécier la faisabilité et la maniabilité de synthèse de ces trois catégories de fluorophores, ainsi que leurs propriétés optiques, nous avons préparé et comparé les représentants les plus simples de chaque famille à partir du phtalonitrile (*schéma 13*).

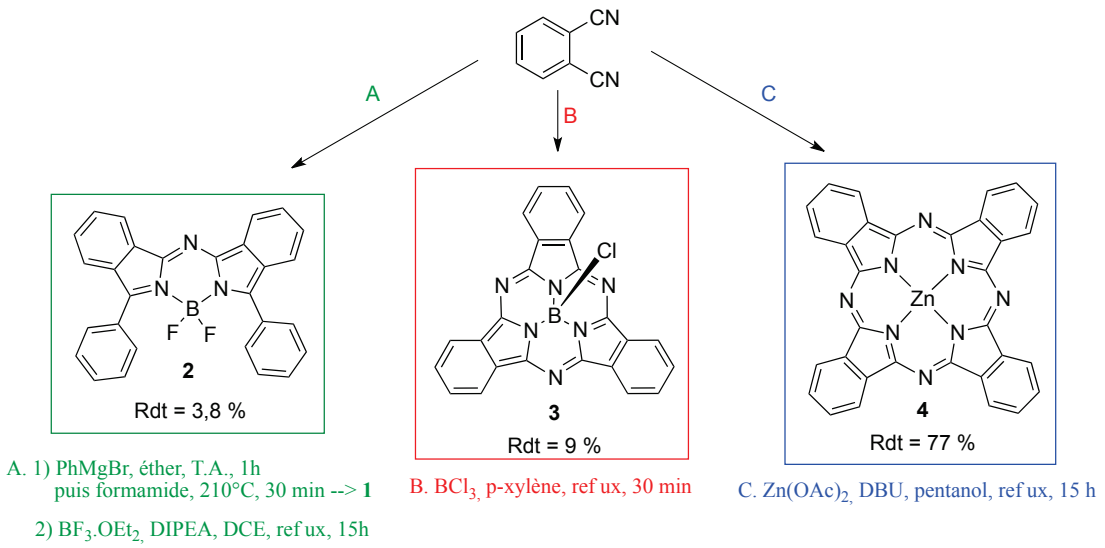


*Schéma 13 : Synthèse des composés **2**, **3** et **4***

Les réactions, basées sur des procédures de la littérature,[177,200,203] ne sont pas détaillées par souci de clarté, mais les modes opératoires apparaissent dans la partie appropriée (partie expérimentale). On note que les rendements de réaction sont faibles dans le cas de l'aza-BODIPY étendu **2** et de la SubPc **3**. Dans ce deuxième cas, nous verrons par la suite qu'ils peuvent être améliorés par la présence de groupements périphériques ou la substitution apicale « one pot ».

I.4.2. Mesures des propriétés photophysiques

Nous avons ensuite pu évaluer et comparer les propriétés d'absorption et d'émission de ces trois composés. La *figure 57* superpose leurs spectres d'absorption.

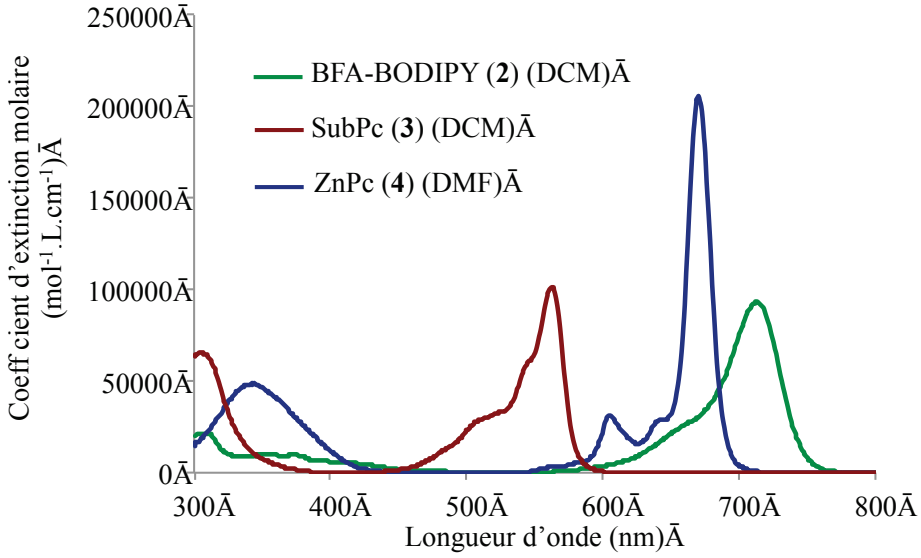


*Figure 57 : Superposition des spectres d'absorption des composés **2**, **3** et **4** (coefficient d'extinction molaire en fonction de la longueur d'onde)*

Le *tableau 13* résume quant à lui certaines des propriétés photophysiques des composés synthétisés. Notons que les valeurs mesurées sont concordantes avec celles de la littérature.[176a,199] Le calcul de la brillance (B) permet de comparer ces trois sondes en terme d'efficacité de fluorescence.

	BFA-BODIPY (**2**) (DCM)	SubPc (**3**) (DCM)	ZnPc (**4**) (DMF)
$\lambda_{abs}/\lambda_{em}$ (nm)	715 / 736	565 / 571	670 / 678
ε ($mol^{-1}.L.cm^{-1}$)	69 600	101 200	205 800
Φ_F	0,15[a]	0,25[b]	0,27[a]
Brillance (B)	10 440[a]	25 300[b]	55 570[a]

Tableau 13 : Propriétés photophysiques des principaux représentants des trois familles de fluorophores 298 K ; a : référence : crésyl violet dans EtOH, Φ_F = 0,56, λ_{ex} = 602 nm ; Incertitude de mesure : ± 10 % ; b : référence : rhodamine 6G dans MeOH, Φ_F = 0,96, λ_{ex} = 488 nm)

I.4.3. Comparaison des trois fluorophores

Nous avons ensuite comparé ces trois fluorophores en considération des propriétés requises pour une sonde fluorescente applicable à l'imagerie optique. Les points cruciaux, obtenus par étude des composés précédemment synthétisés ou d'après la littérature, sont résumés dans le *tableau 14*. Les points d'interrogation indiquent les données à ce jour inconnues dans la littérature.

	BFA-BODIPY	**SubPc**	**ZnPc**
Domaines d'absorption / d'émission	+	±	+
Déplacement de Stockes	+	−	−
Brillance	±	+	+
Stabilité et photoblanchiment	?	?	++
Solubilité et agrégation	?	+	−
Facilité de synthèse	−	±	+
Facilité de fonctionnalisation	−	++	−

Tableau 14 : Propriétés photophysiques des principaux représentants des trois familles de fluorophores

Même si les dérivés **BFA-BODIPY** possèdent une gamme d'absorption/émission ainsi qu'un déplacement de Stockes avantageux, leur brillance est inférieure aux deux autres fluorophores. De plus, le seul mode opératoire existant pour leur préparation s'est révélé complexe, et à ce jour peu d'exemples traitent de leur fonctionnalisation. Nous avons donc décidé de ne pas poursuivre nos recherches sur cette famille de fluorophore.

La brillance de la **SubPc** semble être convenable pour envisager une application en imagerie optique. Sa gamme d'absorption et d'émission n'est pas adaptée à une imagerie optique en profondeur, mais peut cependant être envisageable pour les microscopies, également d'utilité importante dans le domaine de la recherche et le domaine médical. En comparaison des phtalocyanines, leur agrégation est moins problématique, de part leur structure non plane. La présence d'un site de fonctionnalisation unique, à savoir la position apicale, semble également être un atout majeur, permettant d'accéder à des composés possédant les groupements d'intérêt. Ce fluorophore devra cependant être étudié en terme de stabilité, qui reste à ce jour peu connue.

Les **ZnPc** possèdent quant à elles des maxima d'absorption et d'émission adaptés à l'imagerie en profondeur et sont également très photostables, ce qui constitue des avantages notables pour leur utilisation comme sondes fluorescentes en imagerie optique. Bien que les réactions de cyclisation soient aisément réalisées, elles présentent cependant une faible solubilité, une forte tendance à l'agrégation et les méthodes de fonctionnalisation sont souvent laborieuses. Ces critères représentent donc des défis synthétiques qui, une fois relevés, conduisent à des fluorophores aux propriétés appréciables. D'autre part, les phtalocyanines de zinc ont été choisies en particulier, car leur agrégation est plus faible que l'espèce base libre, et leur fonctionnalisation est plus aisée que les phtalocyanines d'aluminium et de silicium.

Ainsi nous avons choisi de nous concentrer sur les subphtalocyanines et les phtalocyanines de zinc. Les défis synthétiques pour obtenir des benzo-aza-BODIPY fusionnés possédant des propriétés et des fonctions d'intérêt semblent en effet trop importants en considération des propriétés de la sonde.

Partie II : Synthèse, fonctionnalisation et étude de subphtalocyanines pour une application en imagerie optique

Cette deuxième partie décrit la synthèse de subphtalocyanines possédant des fonctions de choix pour la mise au point de sondes pour l'imagerie optique (*figure 58*) :

* des **fonctions réactives** (fonctions acide carboxylique, amine, alcyne) adaptées à la bioconjugaison ou à l'introduction d'une modalité supplémentaire ;
* des **fonctions permettant d'activer ou de désactiver la fluorescence** en fonction du pH (alkylamine) ;
* des **fonctions chélatantes**, permettant une bimodalité supplémentaire par chélation de métaux pour les scintigraphies ou pour l'IRM (DTPA, DOTA) ;
* des **fonctions hydrosolubilisantes** (sulfonate).

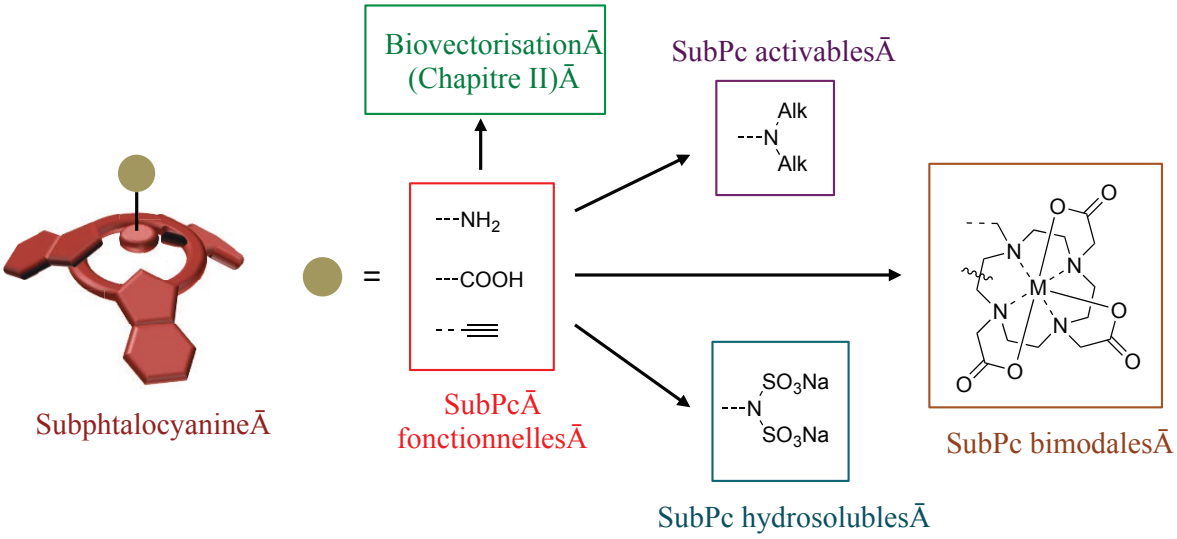


Figure 58 : Objectifs de synthèse de la deuxième partie du chapitre I

Les fonctionnalités d'intérêt seront introduites en position apicale par modification du substituant présent sur l'atome de bore. À travers la synthèse de ces différentes subphtalocyanines, nous pourrons également explorer certaines propriétés inédites de ces composés, comme leur protonation. Ces propriétés ne sont pas toujours directement liées à l'application recherchée, mais permettent de comprendre certains aspects de la chimie de ces fluorophores. Elles seront notamment indispensables pour comprendre et étudier la stabilité des subphtalocyanines.

II.1. Synthèse de subphtalocyanines fonctionnelles

II.1.1. Synthèse du cycle et fonctionnalisation apicale

La première étape de synthèse consiste à former le cycle subphtalocyanine. Puis les fonctionnalités de choix seront introduites par substitution de l'atome de chlore apical. Pour obtenir les premiers synthons *B*-substitués, deux stratégies de synthèse ont été envisagées.

II.1.1.1. Méthode en deux temps

La cyclisation est réalisée par condensation stœchiométrique du trichlorure de bore commercial en solution molaire dans le p-xylène, et du phtalonitrile sec, selon un mode opératoire établi par Claessens et al.[177] La réaction est portée au reflux du p-xylène, pendant 30 min et sous atmosphère inerte. Le solvant de la réaction ainsi que l'excès de BCl_3 sont ensuite évaporés, puis le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice. Nous avons envisagé plusieurs précurseurs phtalonitriles pour réaliser cette réaction (*schéma 14*).

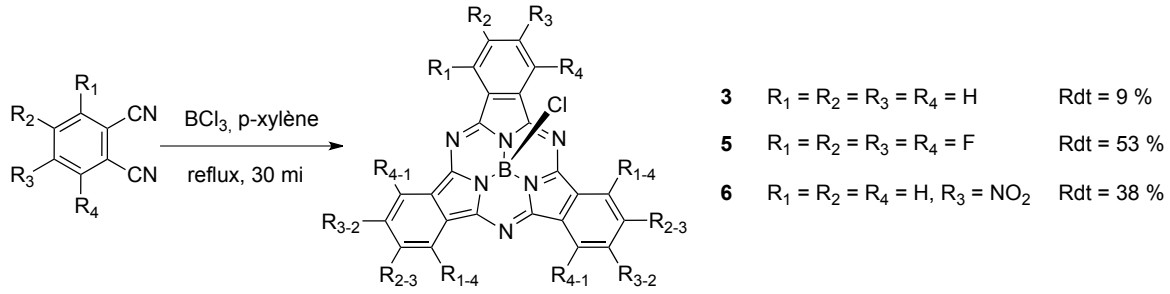


*Schéma 14 : Synthèse des subphtalocyanines de départ **3**, **5** et **6***

Dans le cas du tétrafluorophtalonitrile et du 4-nitrophtalonitrile, les subphtalocyanines correspondantes **5** et **6** sont obtenues avec des rendements acceptables, comparables aux données disponibles dans la littérature.[176a] Cependant, dans le cas du phtalonitrile non substitué, il nous a été impossible d'obtenir des rendements supérieurs à 9 % en produit attendu **3**, alors que certaines publications relèvent des rendements allant jusqu'à 82 %.[177]

Plusieurs hypothèses ont été envisagées pour expliquer ce résultat. Le phtalonitrile de départ reste relativement peu soluble dans le milieu réactionnel, ce qui peut défavoriser la réaction. D'autre part, la subphtalocyanine **3** formée est également relativement peu soluble dans les solvants organiques communs (DCM, $CHCl_3$,...), c'est pourquoi la purification sur colonne de silice est laborieuse et conduit à une perte importante de produit. Ce phénomène est moins contraignant dans le cas des subphtalocyanines substituées **5** et **6**, celles-ci étant beaucoup plus solubles.

Les essais réalisés pour isoler le produit selon d'autres méthodes décrites dans la littérature, principalement par précipitation, se sont révélés infructueux.[177] Bien que la quantité de produit isolé soit en effet très supérieure, l'analyse par spectroscopie de RMN du proton révèle une pureté peu satisfaisante même après de nombreux lavages.

Les composés **3** et **6** ont pu être analysés par spectroscopie de RMN du proton et la subphtalocyanine perfluorée **5** par spectroscopie de RMN du fluor. Ces analyses confirment l'absence de phtalonitrile de départ résiduel et traduisent la pureté des produits isolés.
L'effet attracteur des substituants est directement observable sur les spectres UV de ces quatre espèces (*figure 59*). Il conduit à un déplacement batochrome de la bande Q. Dans le cas du dérivé nitré, l'existence probable d'un transfert de charge interne (ICT) entre les trois groupements nitro et le cœur aromatique conduit à un élargissement du spectre et à une diminution du coefficient d'extinction molaire.

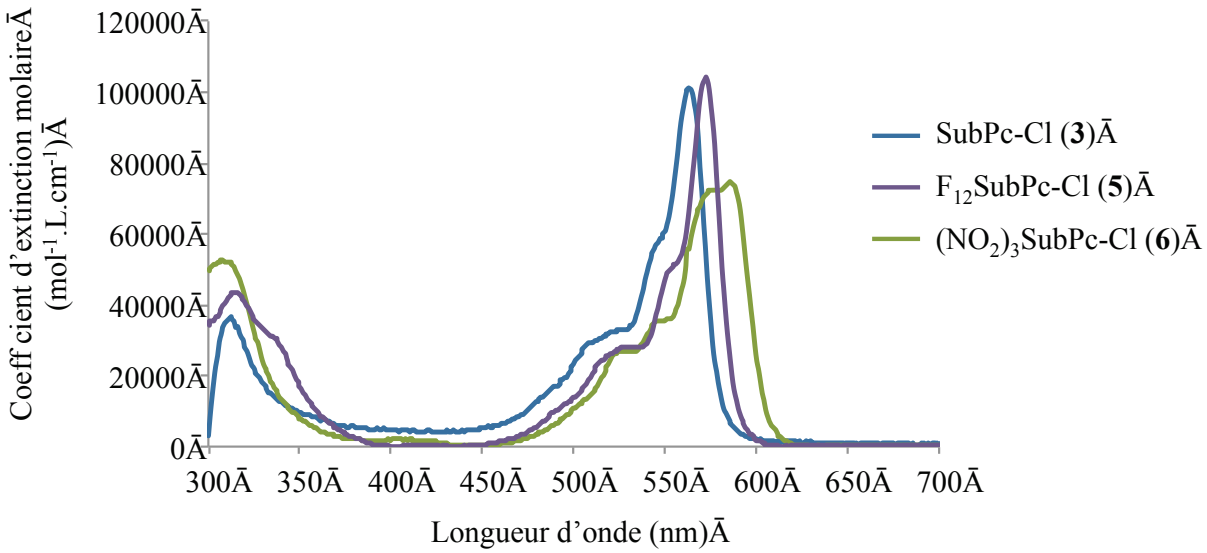


*Figure 59 : Superposition des spectres d'absorption des SubPc **3**, **5** et **6** (coefficient d'extinction molaire en fonction de la longueur d'onde - $CHCl_3$)*

La substitution apicale de l'atome de chlore peut ensuite être réalisée, par exemple sur le composé **3**, par condensation d'un excès (3,3 équivalents) de 4-bromophénol au reflux du toluène jusqu'à complète consommation du produit de départ (suivi CCM) (*schéma 15*). Le temps de réaction est variable selon la richesse du cœur aromatique et la nature du phénol.

L'analyse par spectroscopie de RMN du proton du composé **7** permet de confirmer la présence du substituant en position apicale. En effet, les doublets correspondant aux protons des groupements phénoxy sont fortement blindés (5,27 et 6,84 ppm) en comparaison de ceux du précurseur

phénolique (6,84 et 7,43 ppm) car ils se situent dans le cône d'anisotropie du cœur aromatique subphtalocyanine.

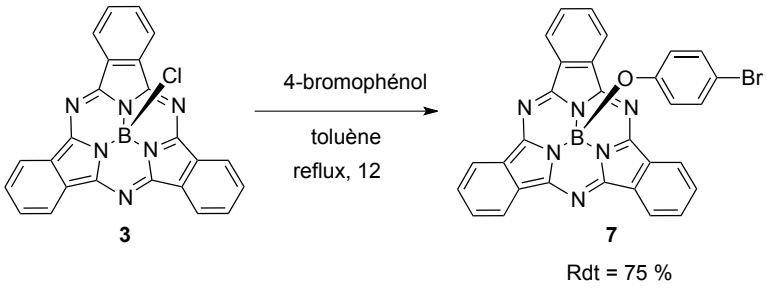


*Schéma 15 : Substitution du chlore apical du composé **3** par un groupement p-bromophénoxy*

Les spectres de RMN du bore (^{10}B) résentent un singulet à -15,68 ppm dans le cas du précurseur chloré **3**, qui est déplacé à -15,07 ppm pour le composé **7**. L'analyse par DRX de cristaux obtenus par lente évaporation d'une solution de SubPc **7** dans le dichlorométhane a permis d'obtenir une structure cristallographique. On peut observer sur la *figure 60* l'aspect conique du cœur aromatique, ce qui est caractéristique de cette famille de molécules. On note aussi la présence du groupement apical *para*-bromophénoxy.

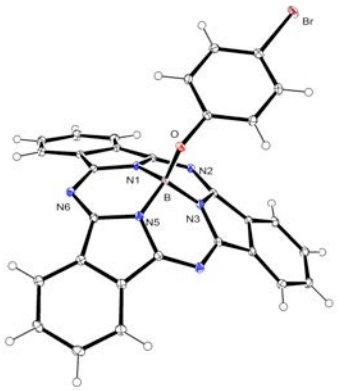


Figure 60 : Vue ORTEP du composé 7

II.1.1.2. Méthode one-pot

Une autre méthode plus directe permet d'accéder aux subphtalocyanines fonctionnalisées en position apicale. Elle consiste à évaporer les solvants et réactifs liquides du mélange réactionnel après cyclisation (*p*-xylène et BCl_3), et sans isoler l'intermédiaire chloré, à ajouter le toluène et le phénol puis à porter le mélange à reflux (*schéma 16*).

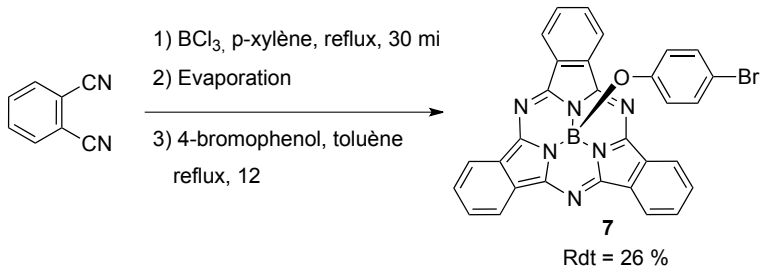


Schéma 16 : Synthèse « one-pot » du composé 7

Le produit est ensuite purifié par filtration sur plug (colonne courte) d'alumine afin d'éliminer l'excès de phénol, puis par colonne de silice et recristallisation si nécessaire. Alors que la méthode en deux temps conduit au composé **7** avec un rendement global de 7 %, la méthode one-pot permet d'améliorer le rendement à 26 %.

Cependant, le rendement de réaction diminue de manière importante à mesure que la quantité de produit de départ (phtalonitrile) est augmentée. Ce phénomène rend difficile la préparation d'une grande quantité des synthons d'intérêt.

II.1.2. Introduction de fonction réactives

II.1.2.1. Introduction d'une fonction aniline

Plusieurs stratégies de synthèse ont été mises en œuvre afin d'obtenir une subphtalocyanine comportant une fonction aniline en position apicale. La condensation directe avec le *p*-aminophénol en utilisant la méthode « one-pot » s'est révélée inadaptée (*schéma 17*). Bien que le produit **8** soit présent dans le brut réactionnel, comme le montre l'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF, la présence de nombreux sous-produits complique la purification et conduit à un faible rendement.

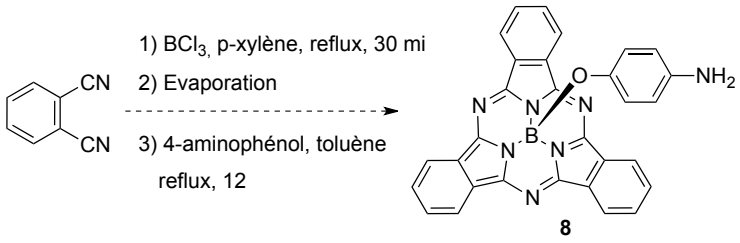


*Schéma 17 : Essai de synthèse « one-pot » du composé **8** à partir du p-aminophénol*

L'utilisation d'un groupement protecteur est alors envisagée comme une option de choix. Les protections étudiées sont de type acétamide et trifluoroacétamide. Les dérivés phénoliques protégés sont préparés par l'action de l'anhydride acétique ou trifluoroacétique sur le *p*-aminophénol, selon des modes opératoires décrits dans la littérature (*schéma 18*).[204]

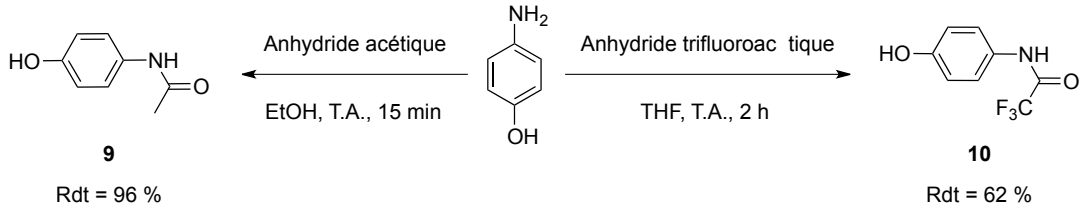


Schéma 18 : Protection de l'amine du 4-aminophénol par un groupement acétamide ou trifluoroacétamide

Puis les subphtalocyanines sont synthétisées selon la procédure établie. Elles sont obtenues avec 16 et 19 % de rendement après purification sur colonne de silice (*schéma 19*).

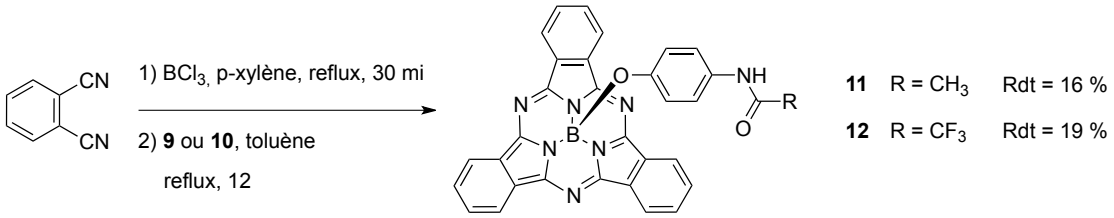


*Schéma 19 : Synthèse des subphtalocyanines protégées **11** et **12***

Par la suite, plusieurs essais de déprotection ont été réalisés sur ces deux composés, notamment des traitements acides ou basiques (HCl/EtOH, acide paratoluène sulfonique (APTS)/EtOH, NH_3/DCM, NaOH/H_2O). Dans tous les cas, le produit déprotégé n'a jamais pu être obtenu, le produit de départ ayant été soit retrouvé intact, soit dégradé.

La dernière stratégie envisagée consiste à préparer une subphtalocyanine possédant un groupement apical *p*-nitrophénoxy, puis à réduire le groupement nitro en amine par hydrogénation catalysée au palladium sur charbon. La méthode « one-pot » permet d'obtenir l'intermédiaire nitré **13** avec 29 % de rendement. La réduction est ensuite menée dans un mélange dichlorométhane/méthanol 75:25 et nécessite 72 heures de réaction (*schéma 20*).

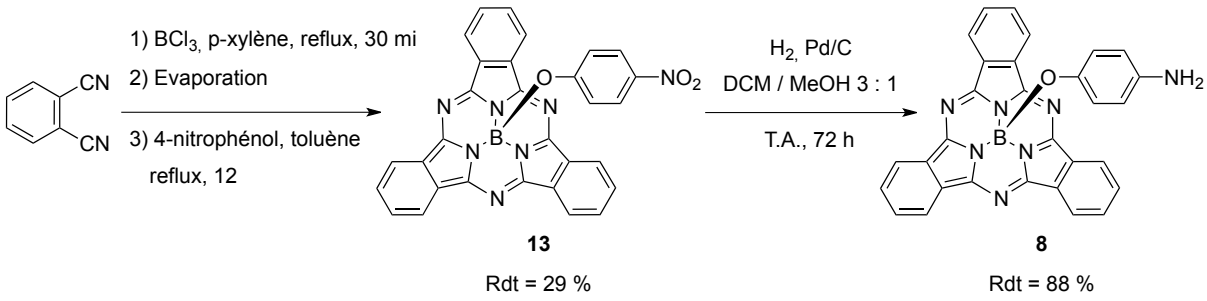


*Schéma 20 : Synthèse du composé nitré **13** puis réduction du groupement nitro en amine*

Cette méthode s'est montrée fructueuse et le produit recherché a été isolé avec un rendement maximal de 88 % après purification chromatographique (silice). Le spectre de RMN du proton du composé **8** est superposé à celui du produit de départ (**13**) sur la *figure 61*. Les protons portés par les motifs isoindoliques apparaissent sous la forme de deux multiplets correspondant aux protons situés en position alpha (a et a') et beta (b et b'). Le blindage des deux doublets correspondant aux protons aromatiques du groupement 4-aminophénoxy (c' et d') par rapport aux protons du 4-nitrophénoxy (c et d) est caractéristique de la transformation réductrice. Le spectre laisse également apparaître un signal large à 3,05 ppm correspondant aux protons portés par l'atome d'azote (e).

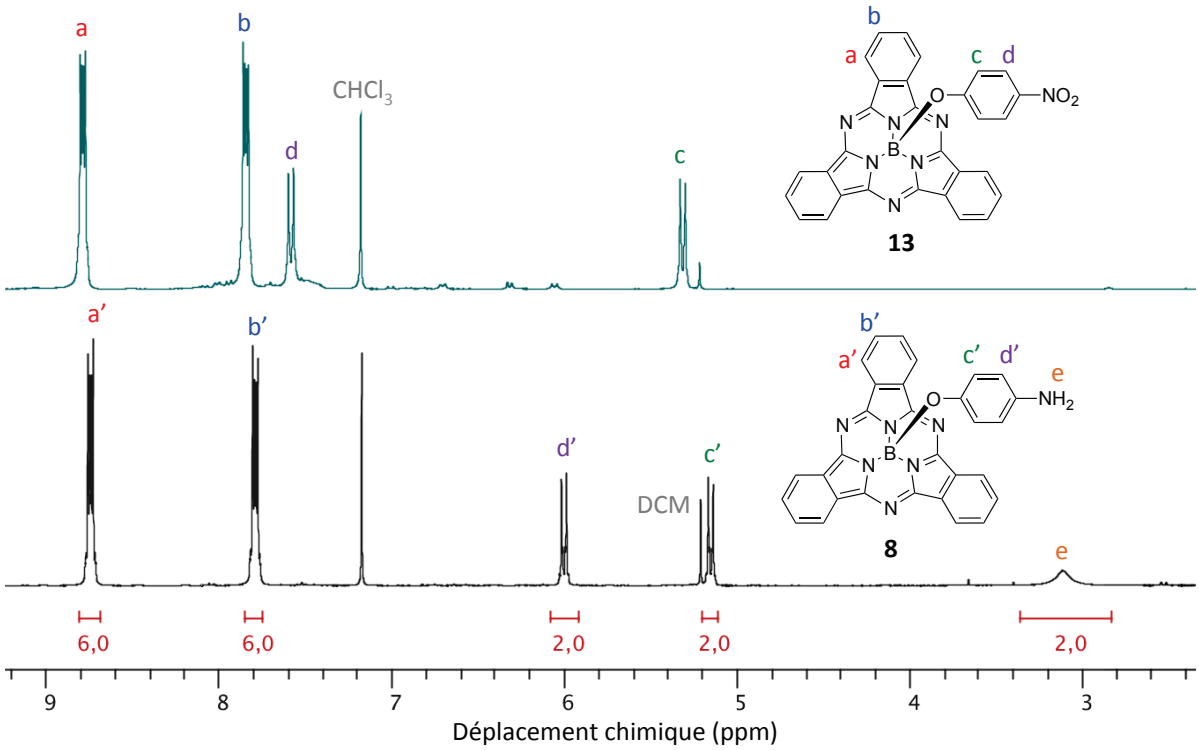


*Figure 61 : Superposition des spectres de RMN du proton des composés **13** et **8** ($CDCl_3$, 300 MHz, 300 K)*

Ce synthon clef a également été analysé par spectrométrie de masse MALDI-TOF (masse standard) ou ESI (masse exacte). Le spectre de masse exacte présente un amas isotopique correspondant à l'adduit $[M+H]^+$ (*figure 62*). De plus, des cristaux ont été obtenus par lente évaporation d'une solution de ce composé dans le dichlorométhane et ont conduit après analyse par DRX à la structure présentée sur la *figure 63*.

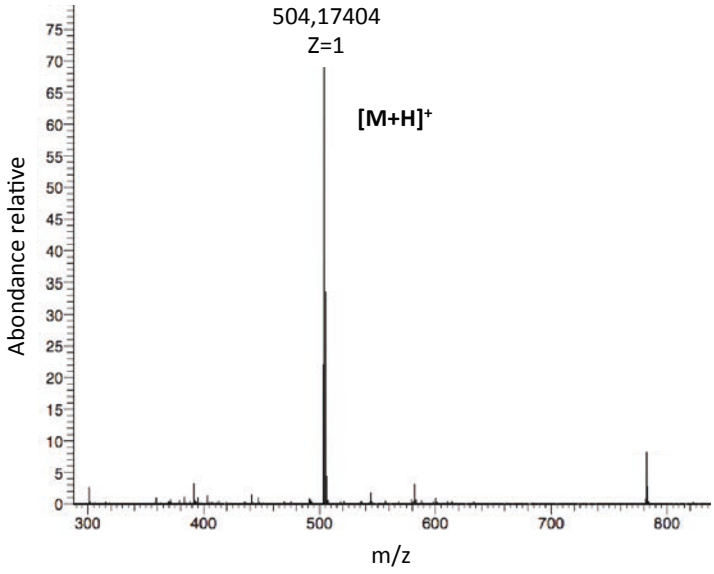


*Figure 62 : Spectre de masse exacte (ESI) de la SubPc-NH_2 **8***

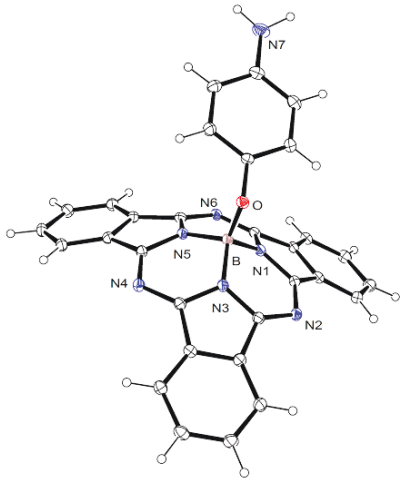


*Figure 63 : Vue ORTEP du composé **8***

Cette SubPc, synthétisée avec un rendement global de 26 % à partir du phtalonitrile, est un synthon clef pour les objectifs suivants, car elle permet d'introduire plusieurs des fonctionnalités visées (fonction acide, agents chélatants).

II.1.2.2. Introduction d'une fonction acide

À partir du composé **14**, une fonction acide carboxylique peut être introduite par réaction avec 1,1 équivalents d'anhydride succinique dans le THF à température ambiante pendant 12 h (*schéma 21*). Le produit est isolé avec 70 % de rendement après purification.

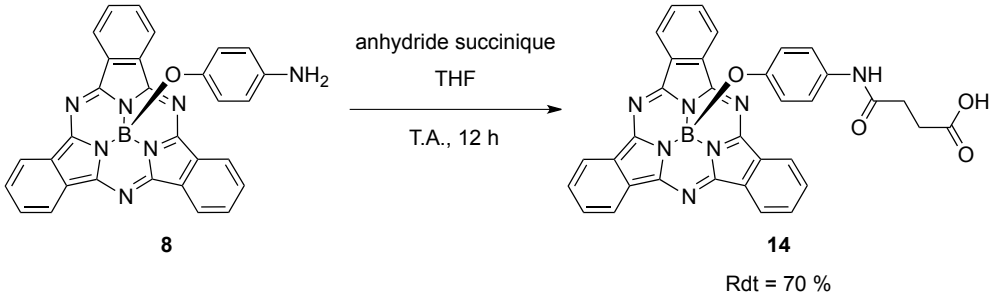


Schéma 21 : Ouverture de l'anhydride succinique sur la 4-aminophénoxysubphtalocyanine de bore (III)

Le produit a été caractérisé par les méthodes spectroscopiques (RMN ^{1}H, RMN ^{13}C, UV) ainsi que par spectrométrie de masse (MALDI-TOF et masse exacte ESI). Le spectre de RMN présente des signaux de déplacement caractéristiques d'un proton d'amide (9,59 ppm) et d'un proton d'acide carboxylique (11,55 ppm) ainsi que les multiplets correspondant aux protons des CH_2 aliphatiques du groupement introduit (0,84 et 1,26 ppm).

Le chromatogramme HPLC du composé **14** présente quant à lui un pic principal au temps de rétention de 2,83 min et donne une pureté de 94 % (C18).

II.1.2.3. Introduction d'une fonction alcyne

Plusieurs méthodes ont été envisagées afin d'amener un groupement alcyne vrai en position apicale. Une première utilise la subphtalocyanine bromée **7**, précédemment synthétisée, pour introduire le groupement alcyne par couplage pallado-catalysé de type Sonogashira (*schéma 22*). La mise en jeu de ce dérivé avec l'acétylène protégé par un groupement triméthylsilyle dans les conditions de couplage s'est malheureusement révélée non concluante, malgré plusieurs essais.

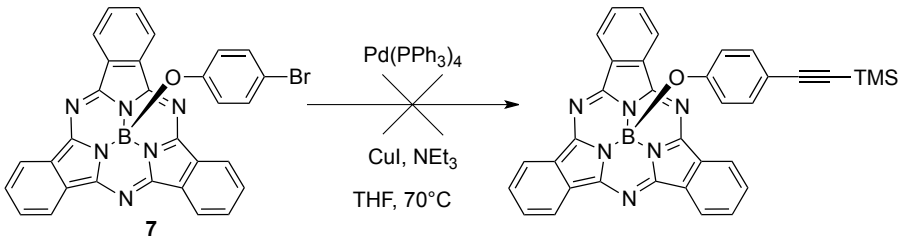


Schéma 22 : Essai de synthèse d'une subphtalocyanine fonctionnalisée par un alcyne par couplage de Sonogashira

La deuxième méthode envisagée consiste à réaliser une réaction de couplage peptidique entre le dérivé amine **8** et l'acide propargylique (*schéma 23*). Cependant la formation du produit n'a pas été observée, ce qui peut être attribué à la faible réactivité du dérivé alcyne.

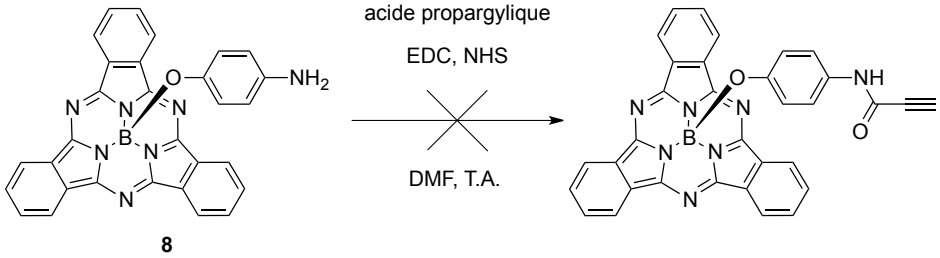


Schéma 23 : Essai de synthèse d'une subphtalocyanine fonctionnalisée par un alcyne par couplage peptidique

Une dernière approche utilise l'hydroquinone, qui est introduite en position apicale par substitution du chlore de la SubPc **3**. L'alkylation du phénol **15** par l'action du bromure de propargyle dans le diméthylformamide en présence de carbonate de potassium permet alors d'obtenir une subphtalocyanine fonctionnalisée par un motif alcyne terminal (*schéma 24*). Les deux étapes conduisent au composé désiré avec un rendement global de 78 % à partir du composé **3**.

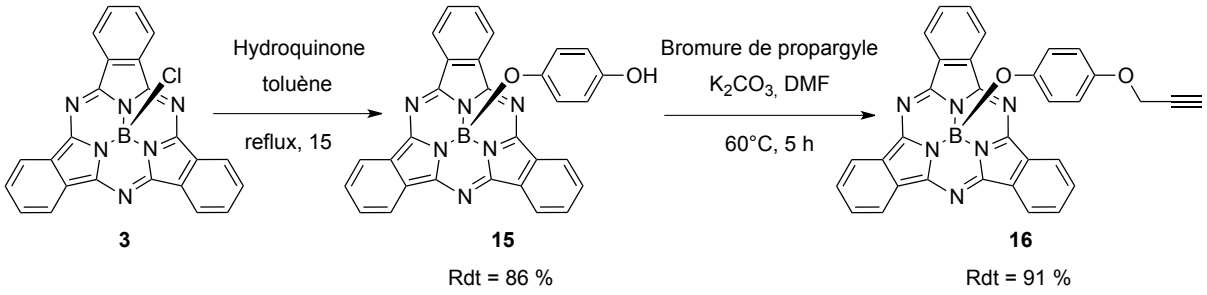


*Schéma 24 : Synthèse du composé **16** par substitution apicale puis alkylation*

La présence du groupement alcyne vrai est confirmée par spectroscopie de RMN du proton. Le proton de l'alcyne vrai conduit à un triplet à 2,39 ppm de petite constante (^4J= 2,4 Hz) dû au

couplage avec les protons du groupement méthylénique à travers la triple liaison. Ce composé a également pu être cristallisé par évaporation lente d'un mélange dichlorométhane/heptane, et l'analyse par diffraction des rayons X des cristaux a permis d'obtenir sa structure cristallographique (*figure 64*).

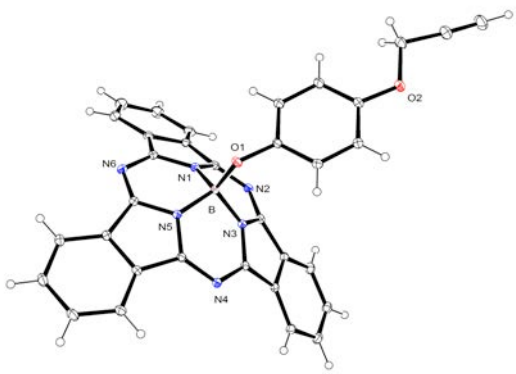


Figure 64 : Vue ORTEP du composé ***16***

II.1.3. Propriétés photophysiques des subphtalocyanines fonctionnelles

Afin de confirmer que les synthons amine, acide et alcyne conservent leurs propriétés optiques, nous avons réalisé des mesures d'absorption et de fluorescence (*tableau 15*).

	Composé	Solvant	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	ε ($.10^3$ $mol^{-1}.L.cm^{-1}$)	ϕ_F [a]
3	SubPc-Cl	$CHCl_3$	565	571	101,2	0,25
13	SubPc-NO_2	$CHCl_3$	563	572	56,7	0,14
8	SubPc-NH_2	$CHCl_3$	562	571	79,1	0,01
		$CHCl_3$ + TFA	564	572	81,0	0,15
14	SubPc-COOH	MeOH	560	569	52,8	0,07
16	SubPc-CCH	$CHCl_3$	564	572	52,3	0,10

Tableau 15 : Propriétés photophysiques des SubPc fonctionnelles (a : 298 K ; Réference : rhodamine 6G dans MeOH, ϕ_F = 0,96, λ_{ex} = 488 nm ; Incertitude de mesure : ± 10 %)

De manière générale, la substitution apicale du chlore du composé **3** conduit à une diminution du coefficient d'extinction molaire et du rendement quantique de fluorescence. Le cas de l'amine **8** est particulier car son rendement quantique de fluorescence est très faible dans le chloroforme. On suppose que ce phénomène est dû à un transfert d'énergie de type PET entre l'azote porté par le groupement aromatique apical et le cœur aromatique fluorescent, qui conduit à une extinction de fluorescence. Ce type de transfert, mettant en jeu une SubPc et un centre azoté donneur situé en position apicale, a déjà pu être observé dans la littérature,[192d,205] mais n'a jamais été étudié dans le but de de mettre au point des sondes fluorescentes activables.

Cette hypothèse est confirmée grâce à la mesure de l'absorption en présence d'acide trifluoroacétique. La fluorescence est restaurée à mesure que la quantité d'acide augmente, ce qui témoigne de l'annulation du phénomène de transfert par protonation de l'aniline (*figure 65*).

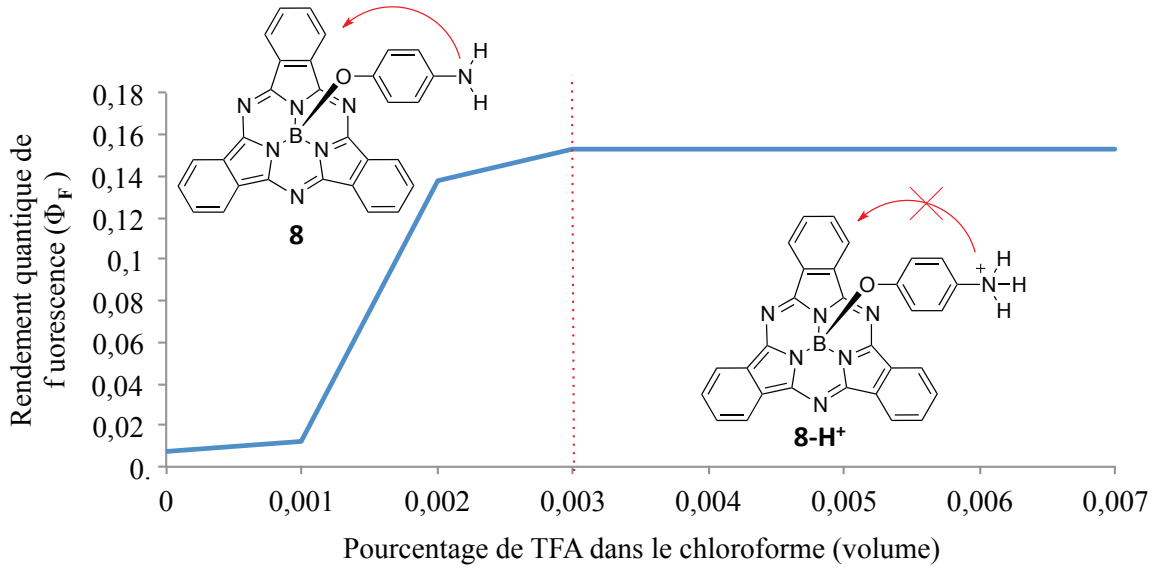


*Figure 65 : Rendement quantique de fluorescence du composé **8** en fonction du pourcentage de TFA ajouté (solution à 0,1 % en volume - $CHCl_3$)*

Cette famille de composés semble donc appropriée pour la mise au point d'une sonde intelligente dont les propriétés dépendent du pH. La valeur du pKa doit cependant être ajustée pour concorder avec un pH d'intérêt biologique, et l'ajout de fonctions permettant d'utiliser le composé en milieu aqueux peut également être intéressant.

D'autre part, on remarque que l'acylation de l'amine, comme dans le cas de la SubPc-COOH **14**, limite le phénomène de transfert. La SubPc-NH_2 **8** reste donc toujours un intermédiaire de synthèse potentiel pour introduire d'autres groupements d'intérêt par couplage peptidique.

II.2. Synthèse et étude de systèmes sensibles au pH

II.2.1. Synthèse d'akylamino-phenoxy subphtalocyanines

Afin d'adapter le pH d'activation des SubPcs pour des applications biologiques, nous avons cherché à moduler la nature de l'aniline apicale. Les anilines secondaires ou tertiaires, qui possèdent des pKa supérieurs aux anilines primaires, seront plus adaptées. L'objectif consiste donc à introduire des groupements *N*-alkylaminophénoxy en position apicale de la subphtalocyanine.

En premier lieu, les groupements alkyles seront de type méthyle ou éthyle, conduisant à des sondes organosolubles. Afin d'étudier et d'utiliser ces agents en milieu aqueux, il sera alors nécessaire de les incorporer dans des liposomes, ce qui sera abordé dans le deuxième chapitre. Nous avons également souhaité introduire des groupements alkyles porteurs de fonctions hydrosolubilisantes afin de mettre au point une sonde activable hydrosoluble.

II.2.1.1. Sondes organosolubles

Deux chemins synthétiques ont été envisagés pour introduire des motifs dialkylaniline en position apicale : l'alkylation direct la SubPc-NH_2 **8** ou la substitution apicale sur la SubPc-Cl **3** avec des phénols porteurs d'un groupement alkyle amine.

La première stratégie a permis d'obtenir les deux espèces alkylées **17** et **18** en utilisant deux équivalents d'iodure de méthyle ou de bromure d'éthyle en présence de carbonate de potassium dans le DMF (*schéma 25*).

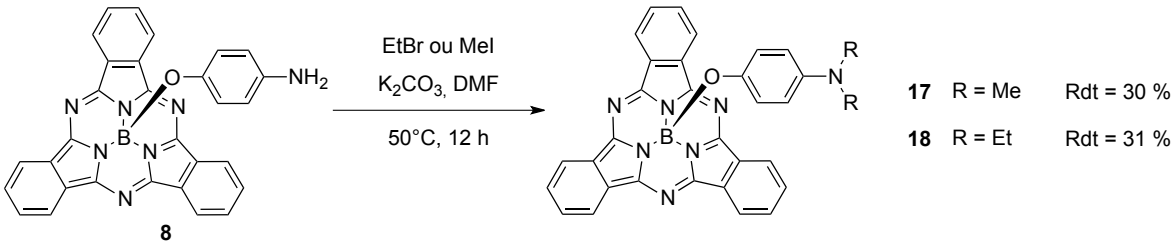


*Schéma 25 : Méthylation et éthylation de la SubPc-NH_2 **8***

Les rendements restent cependant faibles car les réactions conduisent également aux espèces cationiques trialkylées, plus polaires, qui sont éliminées lors des purifications sur colonne de silice. Le succès des alkylations se confirme par les analyses de spectroscopie de RMN du proton et du carbone ainsi que par spectrométrie de masse.

Pour la deuxième stratégie synthétique, les phénols utilisés sont substitués en position *méta* car les équivalents *para*-substitués ne sont tout simplement pas accessibles commercialement. Cependant, on peut espérer que l'orientation *méta* rapproche l'azote donneur du cœur fluorescent afin de favoriser le phénomène de transfert. Le chlore apical du composé **3** peut être substitué par les groupements voulus en utilisant les conditions opératoires habituelles. La réaction, ici relativement longue (48 heures), conduit aux SubPcs souhaitées avec respectivement 58 et 51 % de rendement après purification (*schéma 26*).

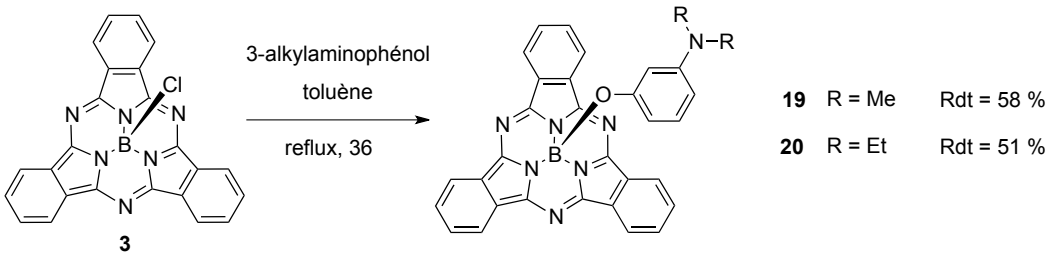


*Schéma 26 : Synthèse des composés **19** et **20** par substitution du chlore apical du composé **3***

Ces deux derniers composés ont été analysés par les techniques spectroscopiques courantes. De plus, leurs structures cristallographiques ont été résolues par diffraction des rayons X et sont présentées sur la *figure 66*.

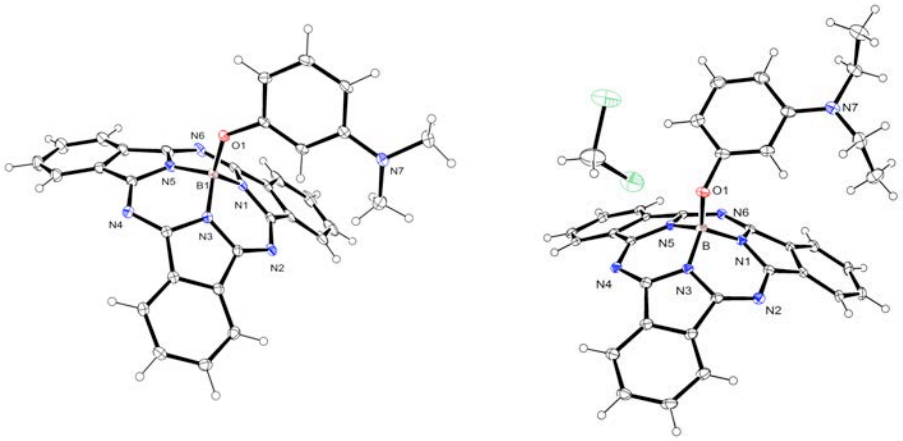


Figure 66 : Structures cristallographiques des composés ***19*** *(gauche) et* ***20*** *(droite)*

Comme on peut le voir sur la structure de droite, le composé **20** co-cristallise avec une molécule de dichlorométhane.

II.2.1.2. Sonde hydrosoluble

Comme mentionné plus haut, nous avons également cherché à préparer une version hydrosoluble de subphtalocyanine activable. Dans cet objectif, le composé **8** a été mis en présence de deux équivalents de 1,3-propanesultone, dans la DMF à 50°C (*schéma 27*).

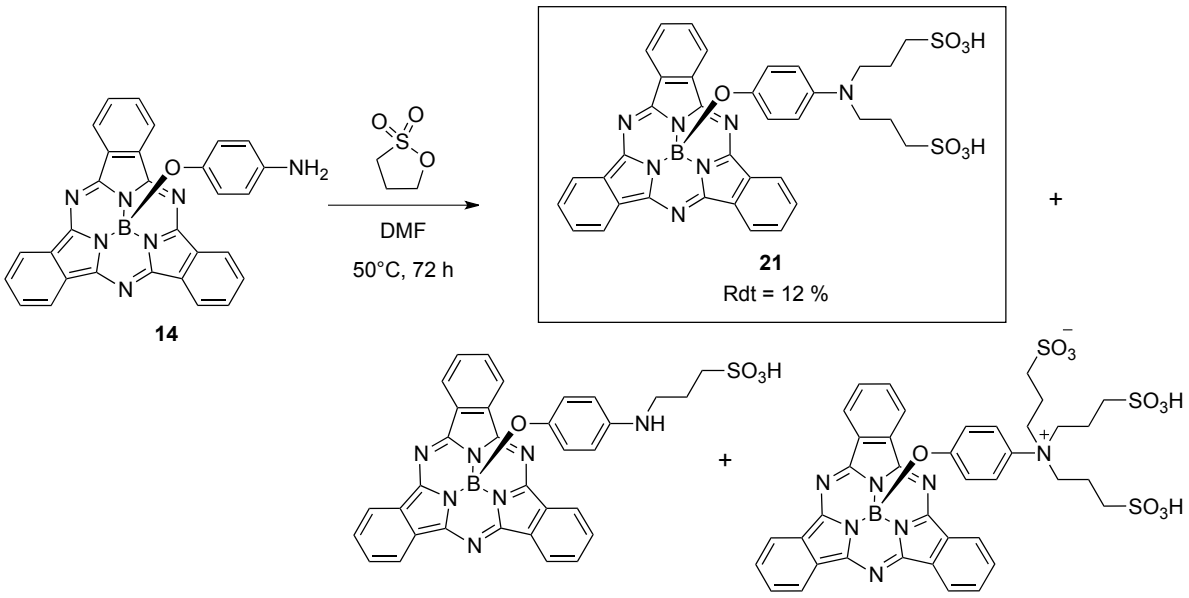


Schéma 27 : Condensation de la SubPc-NH_2 ***8*** *avec la 1,3-propanesultone*

Plusieurs produits peuvent potentiellement être formés, à savoir les espèces de mono-, di- et tri-alkylation. La première étape de purification, une chromatographie sur colonne de silice, permet d'éliminer l'espèce quaternisée. Puis une chromatographie en phase inverse (C18) sépare les différents composés restants : le produit désiré (**21**), le produit de monoalkylation et le produit de départ résiduel. L'attribution des différents produits a été réalisée par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Les chromatogrammes HPLC des produits isolés lors de la deuxième étape de purification sont superposés au chromatogramme du mélange après purification en phase normale sur la *figure 67*. Le rendement est faible (12 %), compte tenu des pertes occasionnées par les différentes étapes de purification.

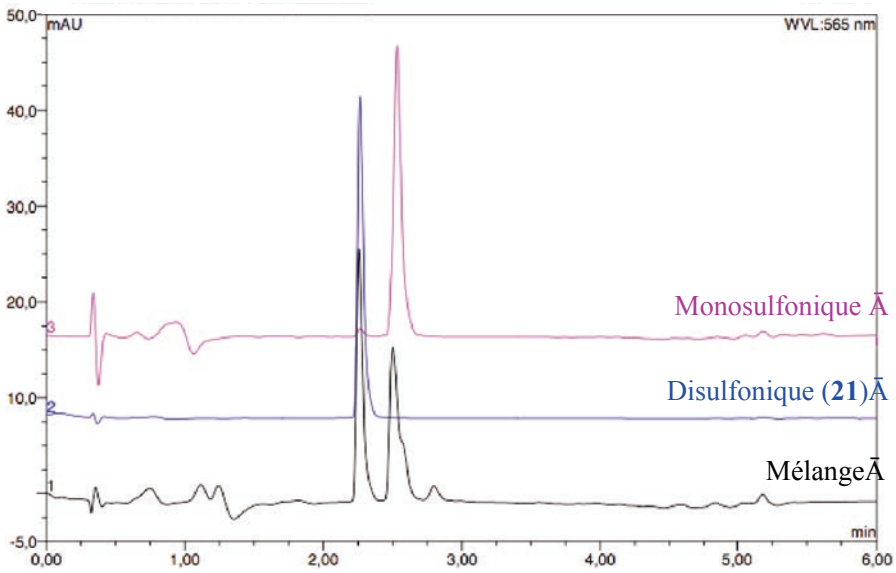


Figure 67: Chromatogrammes HPLC du mélange avant purification en phase inverse et des produits après purification

Le composé d'intérêt (**21**) a été analysé par RMN du proton et spectrométrie de masse exacte ESI négative. Les différents amas isotopiques observés sont attribués sur la *figure 68*. On retrouve les amas correspondant aux espèces monochargées ($[M-H]^-$ et $[M-2H+Na]^-$) ainsi qu'à l'espèce dichargée $[M-2H]^{2-}$, qui conduit au pic majoritaire.

La SubPc-PropSulf$_2$ **21** est totalement soluble dans l'eau ou dans le PBS (tampon phosphate pH 7,4), contrairement à l'espèce monoalkylée, ne contenant qu'un seul acide sulfonique, pour laquelle il est nécessaire d'additionner du DMSO (10 % vol.).

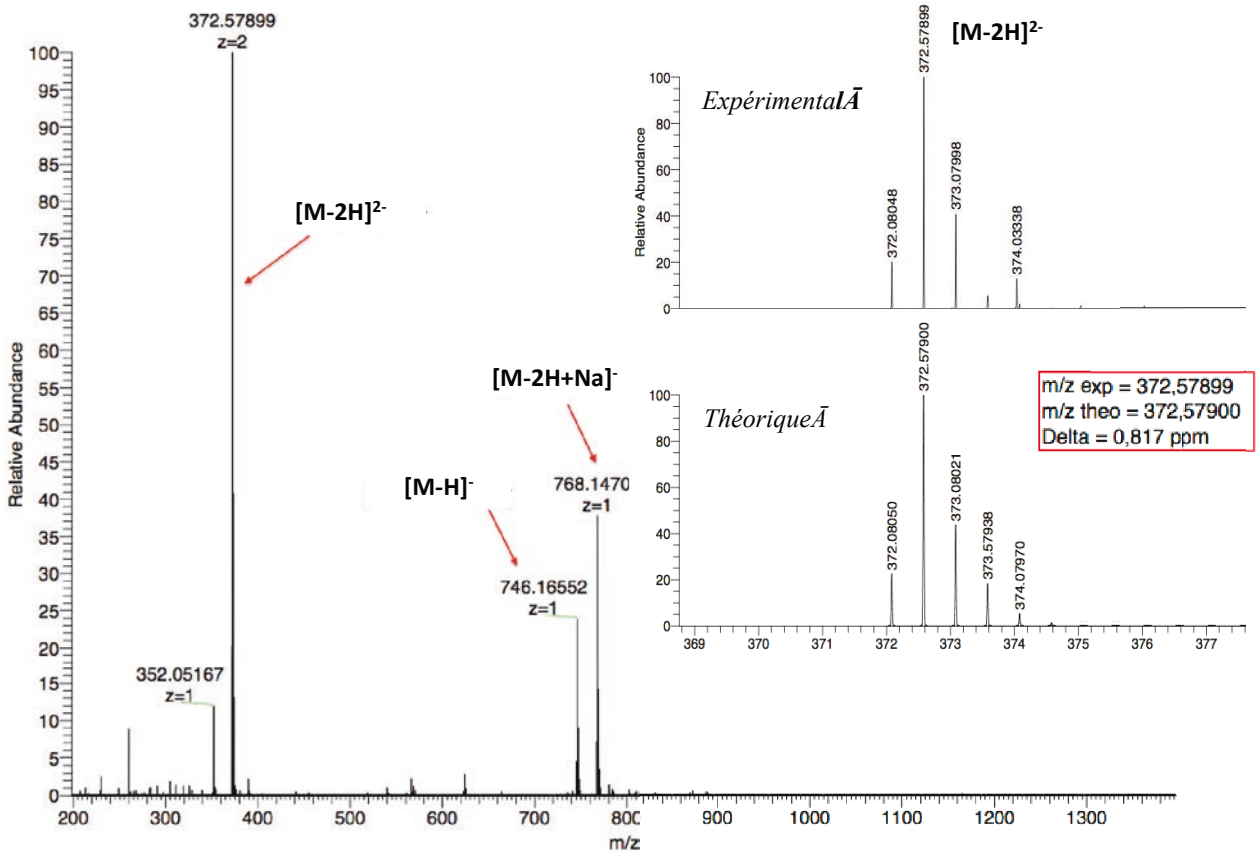


*Figure 68: Spectre de masse exacte du composé **21** et superposition avec le spectre théorique de l'espèce dichargée $[M-2H]^{2-}$ (haut droite)*

II.2.2. Études des propriétés d'activation

L'aniline et les alkyles anilines précédemment synthétisées ont été étudiées en termes d'activation de fluorescence. Ces mesures ont été réalisées dans le DMF en utilisant l'acide sulfurique comme source protonique dans le cas des espèces hydrophobes (**8**, **17-20**), et dans des tampons aqueux dans le cas de l'espèce hydrosoluble **21**. Les propriétés photophysiques de ces différents composés, notamment le rendement quantique de fluorescence, ont été déterminées à l'état OFF (en l'absence d'acide) ainsi qu'a l'état ON (en présence suffisante d'acide). Il est ainsi possible de définir le facteur d'augmentation (**F**) qui correspond au rapport des deux rendements quantiques à chaque état. Il traduit l'efficacité du fluorophore comme sonde activable (*figure 69*). Il est également possible de définir le volume d'acide à partir duquel la moitié de la fluorescence est restaurée ($V_{1/2}$).

Notons que la concentration en SubPc des solutions étudiées est pour tous les cas la même afin de pouvoir comparer les résultats obtenus. Il a également été vérifié que l'ajout d'acide n'a pas d'influence sur l'allure des spectres d'absorption, ainsi que sur le rendement quantique de fluorescence dans le cas d'un composé non activable (SubPc-NO_2 **8**). Les résultats obtenus pour les différents composés synthétisés sont reportés dans le *tableau 16*.

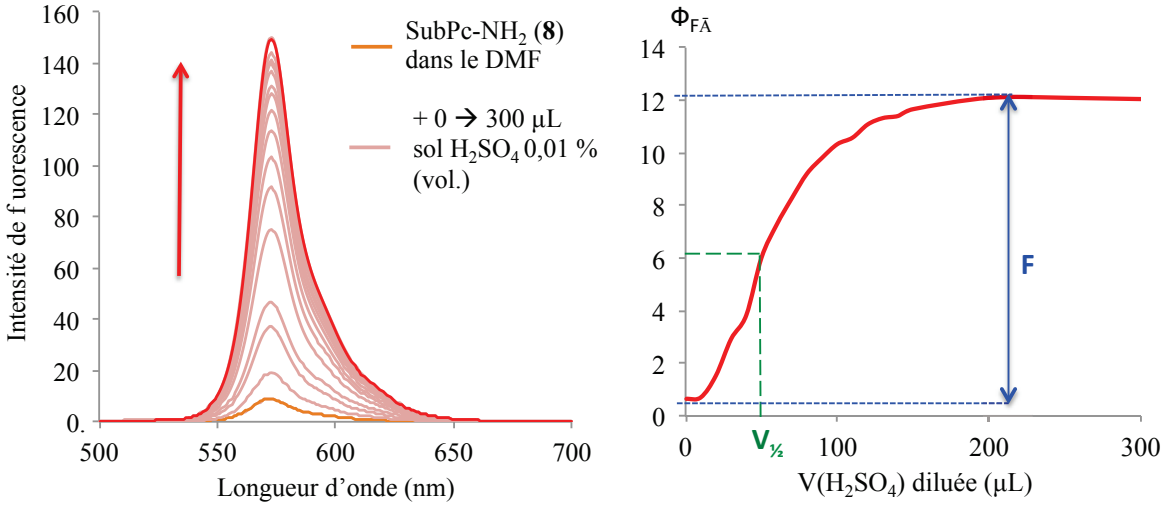


*Figure 69 : Superposition des spectres de fluorescence de la SubPc-NH_2 (**14**) dans le DMF pour différents volumes d'acide sulfurique dilué (0,01 % vol.) ajouté (gauche) et rendement quantique de fluorescence en fonction du volume d'acide ajouté (droite)*

	Composés	Solvant	λ_{abs}/ λ_{em} (nm)	ε ($.10^3$ $mol^{-1}.L.cm^{-1}$)	ϕ_F	F	$V_{½}$ (µL)
8	SubPc-NH_2	DMF	563/572	85,4	0,006	20,2	50
		DMF + H_2SO_4	564/573	88,2	0,121		
17	SubPc-NMe_2 (*p*)	DMF	563/572	79,6	0,009	7,4	80
		DMF + H_2SO_4	564/573	76,9	0,067		
18	SubPc-NEt_2 (*p*)	DMF	565/572	72,4	0,008	6,8	100
		DMF + H_2SO_4	564/573	73,1	0,054		
19	SubPc-NMe_2 (*m*)	DMF	564/570	72,1	0,002	50,5	300
		DMF + H_2SO_4	565/573	83,6	0,101		
20	SubPc-NEt_2 (*m*)	DMF	564/570	72,1	0,003	27,7	400
		DMF + H_2SO_4	564/573	83,6	0,083		
		Tampon					$pH_{½}$
21	SubPc-$NPropsulf_2$	pH 8	563/572	57,9	0,011	3,3	pH 5
		pH 3	563/574	58,4	0,036		

*Tableau 16 : Proriétés d'absorption, d'émission et d'activation des SubPc **8** et **17** à **21** (298 K ; Réference : rhodamine 6G dans MeOH, ϕ_F = 0,96, λ_{ex} = 488 nm ; Incertitude de mesure : ± 10 %)*

Notons que le facteur d'augmentation F est plus élevé dans le cas des alkylamines positionnées en *meta* du groupement phénoxy. Ceci peut être attribué à la plus grande proximité entre le centre azoté donneur et le cœur aromatique fluorescent, comme anticipé plus haut. Le phénomène de transfert, dépendant de la distance, est ainsi plus efficace et la fluorescence de l'état OFF est donc plus faible.

Le volume de demi-activation $V_{½}$ est théoriquement dépendant du pKa du composé. Plus l'aniline est basique, plus il sera faible. Cependant, dans le cas des espèces organosolubles **17** à **20**, les valeurs obtenues ne sont pas en adéquation avec celles attendues. En effet, le volume d'acide nécessaire pour activer la sonde augmente avec le pKa de l'aniline, ce qui traduit un comportement inverse aux prévisions. De plus, les valeurs sont étonnamment élevées dans le cas des espèces substituées en position *méta*. Ce phénomène reste malheureusement jusqu'à maintenant inexpliqué.

Dans le cas de la SubPc-Propsulf$_2$ **21**, le pH de demi-activation, pH auquel la moitié de la fluorescence est restaurée, est de 5. Ceci est en adéquation avec le pKa d'une aniline secondaire. Cependant, le facteur d'augmentation (F = 3,3) calculé pour ce composé est beaucoup plus faible que pour les espèces organosolubles. Néanmoins, les spectres d'absorption et d'émission de cette sonde confirment sa bonne hydrosolubilité et l'absence d'agrégation (*figure 70*).

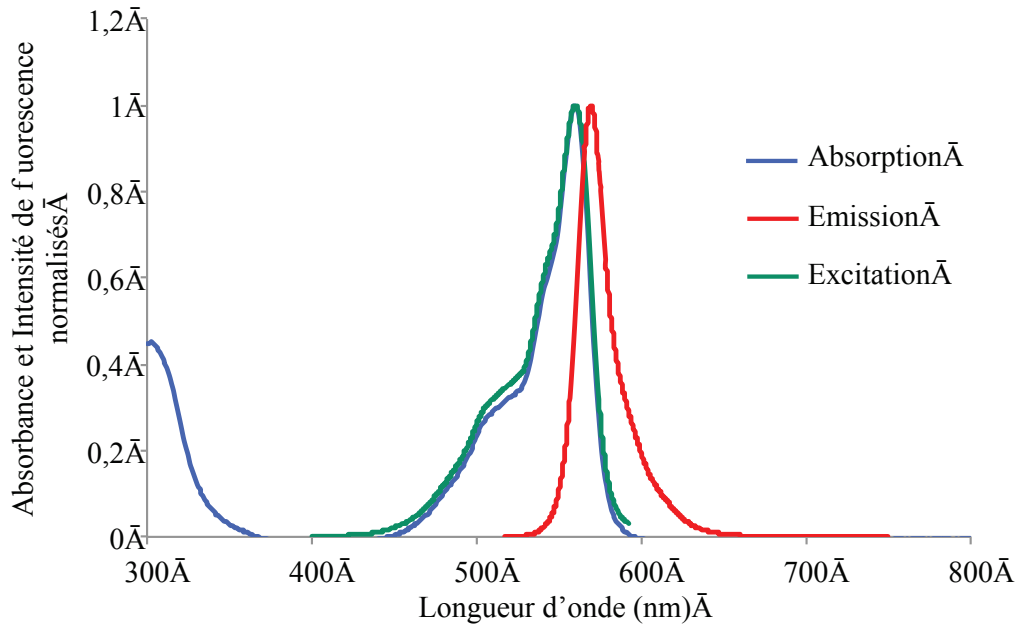


*Figure 70 : Superposition des spectres d'absorption, d'émission et d'excitation du composé **21** dans le PBS (pH 7,4)*

En résumé, les subphtalocyanines organosolubles ont montré un potentiel d'activation intéressant de part leur facteur d'augmentation appropriés. Mais pour des raisons inexpliquées, le pH d'activation n'est pas en adéquation avec les critères d'une sonde pH-activable utilisable en milieu biologique. Au contraire, le pH d'activation de l'espèce hydrosoluble est satisfaisant, mais son facteur d'augmentation est faible. Cette dernière est donc à considérer plutôt comme une sonde fluorescente « toujours ON » plutôt qu'une sonde activable.

II.3. Introduction d'agents chélatants

Comme mentionné plus tôt, nous nous sommes également intéressés à la mise au point de systèmes ditopiques associant une subphtalocyanine à un agent chélatant afin d'explorer l'accessibilité de sonde bimodales IO/IRM ou IO/TEP-TEMP à partir de subphtalocyanines. Deux types d'agents chélatants ont été envisagés : une polyamine linéaire de type DTPA et une version cyclique de type DOTA. Il est également anticipé que le motif polyaminocarboxylate permettra d'apporter de l'hydrosolubilité au système.

II.3.1. Introduction d'un agent chélatant linéaire analogue du DTPA

Dans un premier temps, la synthèse d'une subphtalocyanine porteuse d'un agent chélatant linéaire a été envisagée par condensation du composé **8** avec le DTPA-dianhydride (*schéma 28*), par analogie avec un exemple de la littérature.[206] Les auteurs parviennent à obtenir sélectivement le composé issu de l'ouverture d'un anhydride d'acide, sans observer le produit de di-condensation.

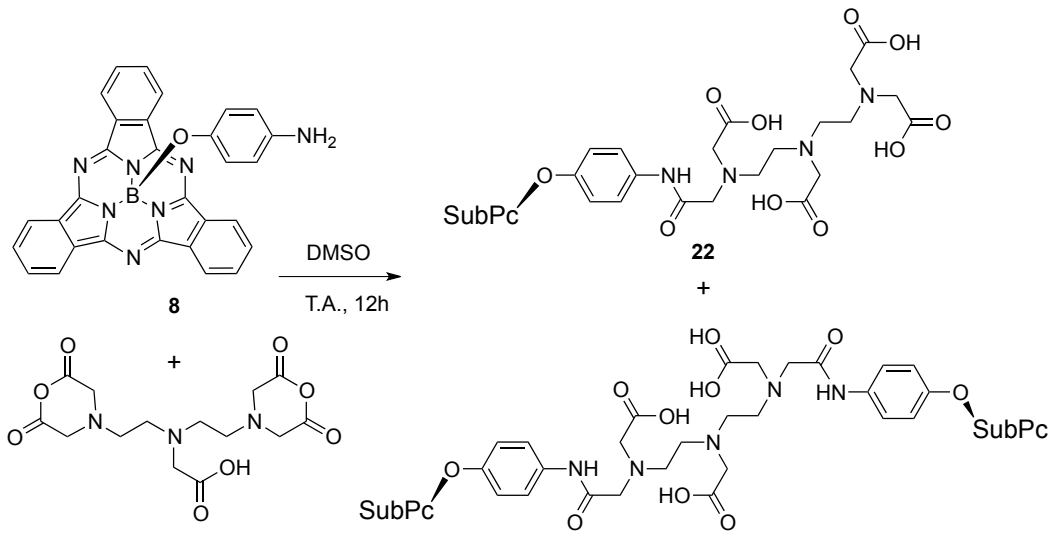


*Schéma 28 : Essai de synthèse du composé **25** par condensation avec le DTPA dianhydride*

Cependant, les analyses (CCM, HPLC et MALDI-TOF) montrent que dans notre cas les deux produits se forment. Bien que ces deux composés soient potentiellement séparables et isolables par chromatographie en phase inverse, nous avons plutôt choisi d'utiliser une méthode sélective pour introduire le motif DTPA.

La deuxième stratégie utilise donc un dérivé du DTPA pour lequel quatre des cinq fonctions acides sont sélectivement protégées sous forme d'esters *tert*-butyliques (DT4AtBu). Le couplage peptidique entre ce composé et la SubPc-NH_2 est réalisé dans le THF, en présence d'un agent de couplage, l'HBTU, et d'une base, la DIPEA (*schéma 29*).

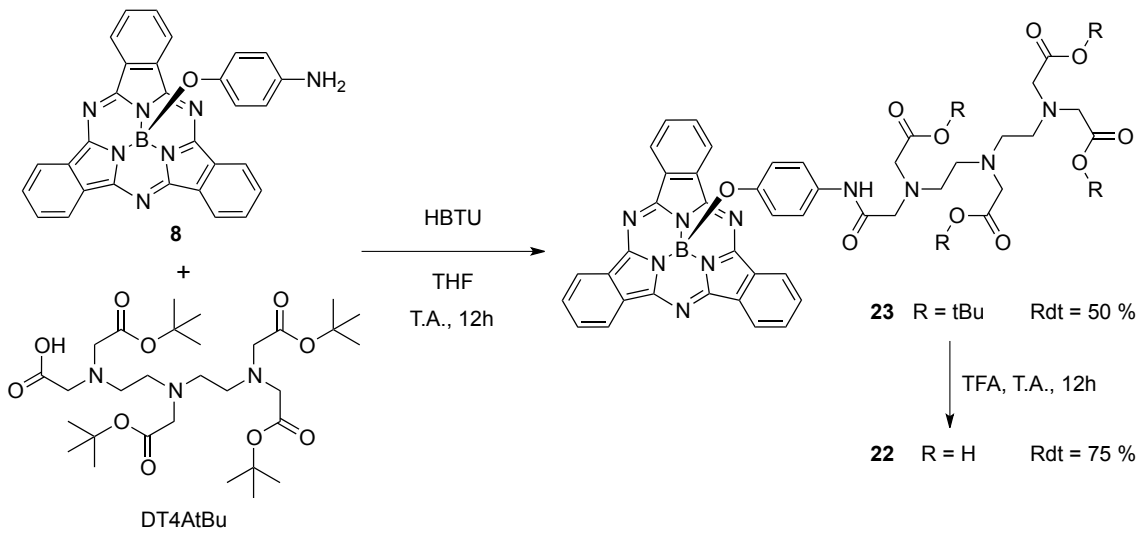


*Schéma 29 : Synthèse de la SubPc-DTPA **22** par couplage peptidique puis déprotection des groupements acétates*

Le suivi par CCM met en évidence la formation du produit, mais montre également que la réaction est incomplète lorsque les deux synthons sont mis en jeu de façon équimolaire. L'utilisation d'un excès de polyaminocarboxylate permet alors d'augmenter la conversion. Mais il est cependant préférable de rester dans les conditions d'équivalence, car l'excès d'aminoacide est ensuite difficile à séparer du composé d'intérêt lors de la purification sur colonne de silice.

La SubPc-DTPA-tBu_4 **23** est ainsi obtenue avec 50 % de rendement. Les fonctions acides peuvent ensuite être libérées par traitement au TFA pur à température ambiante pendant 15 h. Le produit, alors hydrophile, est isolé par précipitation et lavages dans le dichlorométhane.

L'analyse par spectroscopie de RMN du proton du composé protégé **23** permet de confirmer le succès du couplage peptidique (*figure 71*). L'intégration des signaux correspondant aux protons des groupements *tert*-butyles (h, i et j) est en concordance avec les intégrations des signaux caractéristiques du motif subphtalocyanine (a, b, c et d). On note également la présence des signaux des protons aliphatiques du dérivé DTPA (f et g) ainsi que du signal du proton de l'amide (e) qui attestent également du succès de la réaction.

Le spectre de RMN du proton du composé déprotégé **22**, réalisé à haute température (400 K) afin de garantir une meilleure résolution des signaux des protons aliphatiques, se caractérise par la disparition des signaux des protons des groupements *tert*-butyles (non présenté).

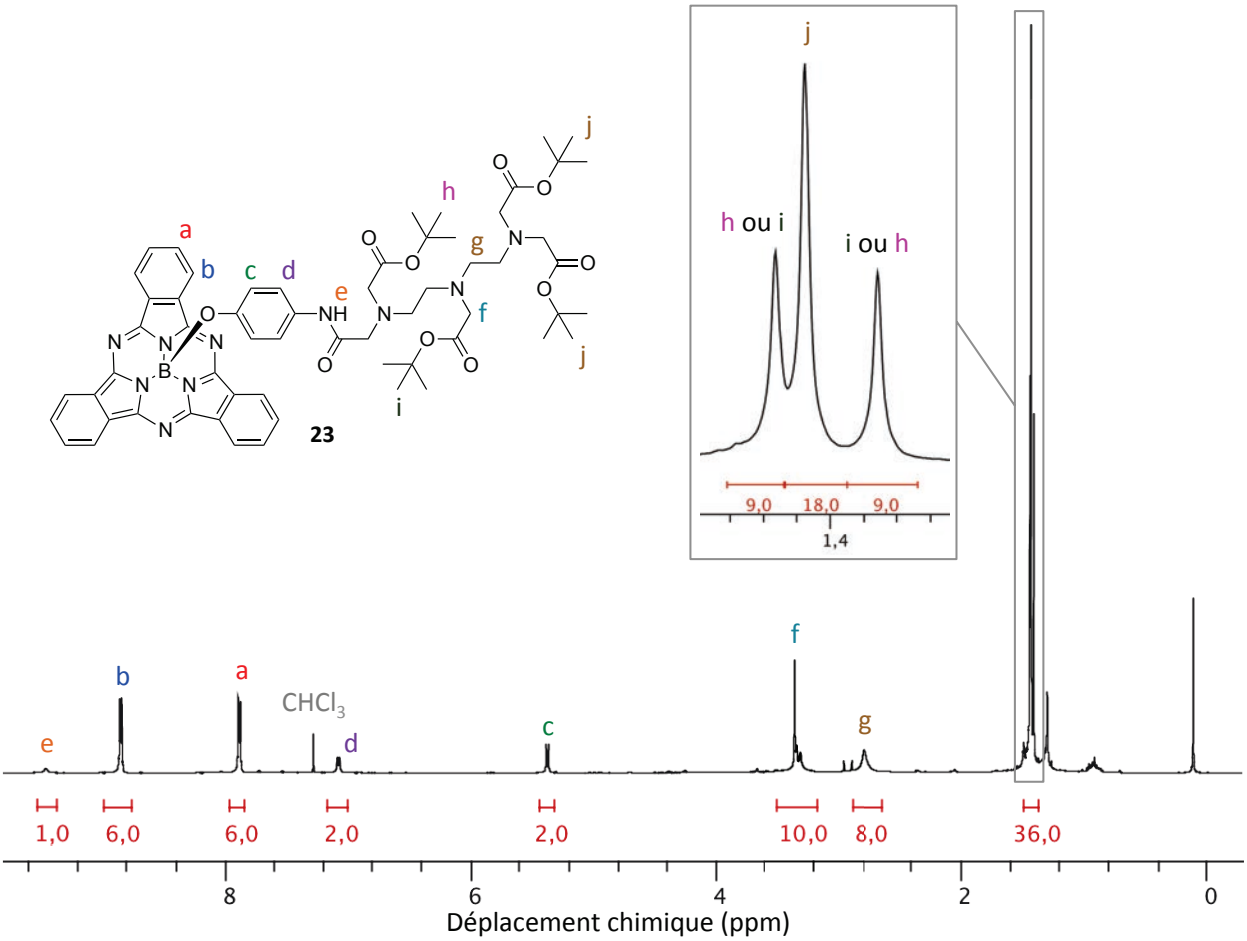


*Figure 71 : Spectre de RMN ^{1}H du composé **23** ($CDCl_3$, 500 MHz, 300 K)*

Ces deux composés ont également été analysés par spectrométrie de masse basse résolution (MALDI-TOF) et haute résolution (ESI). Les spectres obtenus permettent de confirmer la nature du produit obtenu et l'absence de produit de départ résiduel.

II.3.2. Introduction d'un agent chélatant cyclique analogue du DOTA

Une stratégie identique a été adoptée en vue d'introduire le dérivé de type DOTA. Le précurseur DO3AtBuA commercial est engagé dans les mêmes conditions de couplage peptidique que précédemment, et le composé tri-protégé **24** est isolé avec 61 % de rendement après purification chromatographique. Puis de la même manière, les groupements acétates sont déprotégés en milieu acide pour conduire à la SubPc-DOTA **25** avec 95 % de rendement, soit 58 % de rendement global sur les deux étapes (*schéma 30*).

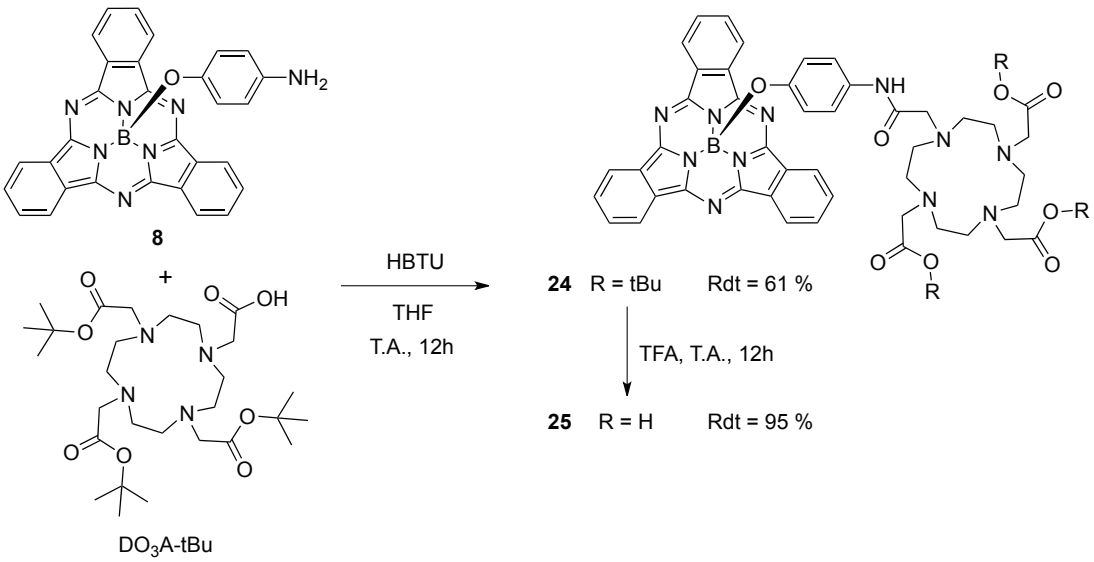


Schéma 30 : Synthèse de la SubPc-DOTA ***25***

Comme pour le dérivé DTPA, le succès de ces deux étapes est confirmé par spectroscopie RMN du proton, ainsi que par spectrométrie de masse (MS MALDI-TOF et HRMS ESI). Le spectre de RMN ^{1}H du composé après déprotection, réalisé à haute température, est présenté *figure 71*.

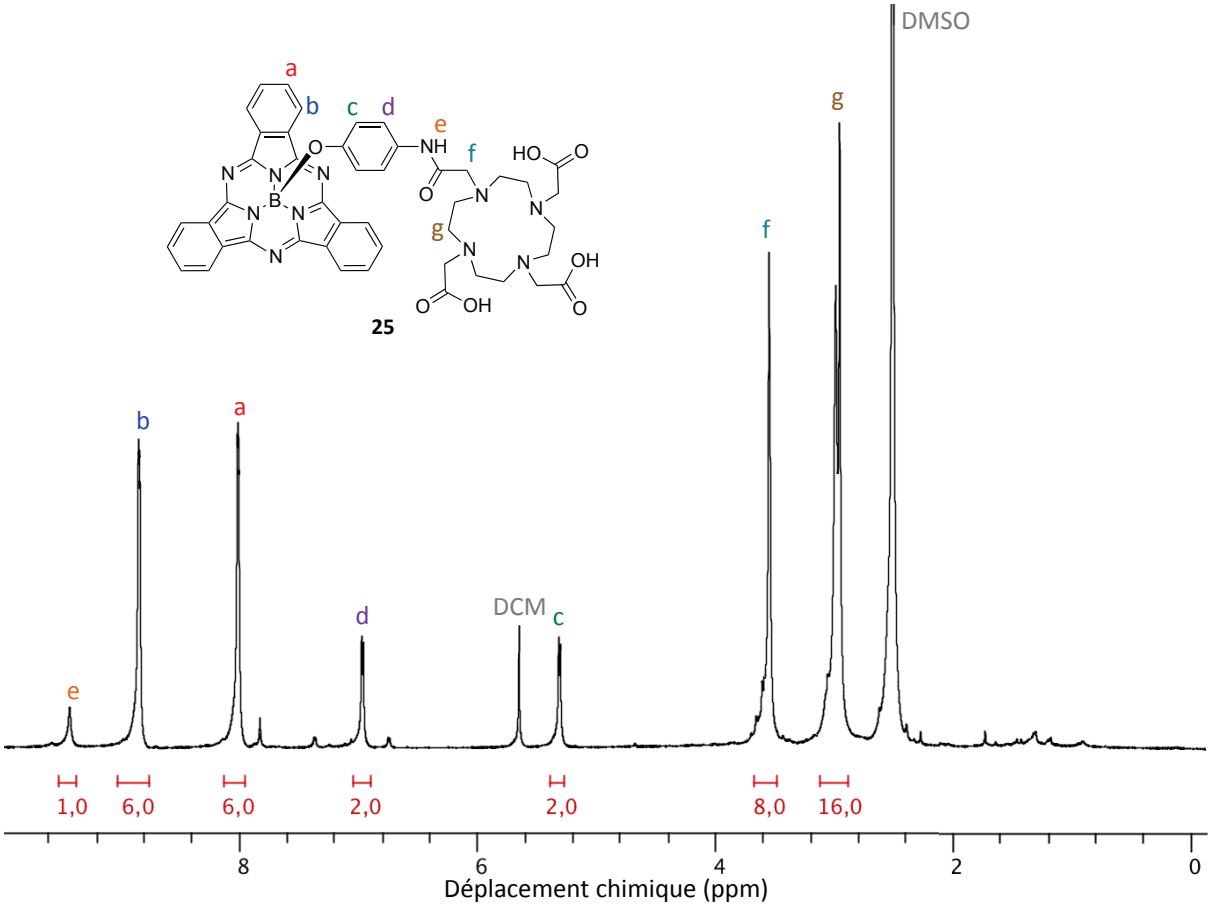


Figure 72 : Spectre de RMN ^{1}H du composé ***25*** *(DMSO-d_6, 600 MHz, 400 K)*

On note ici l'absence des signaux correspondant aux groupements *tert*-butyles à 1,25 et 1,41 ppm pour le précurseur protégé **24**, ce qui confirme la déprotection des fonctions acides carboxyliques.

II.3.3. Métallation avec des métaux utiles pour l'imagerie

Nous avons ensuite métallé ces deux ligands avec différents métaux d'intérêt pour l'imagerie médicale : le gadolinium (IRM) ; les analogues froids de l'indium-111, du gallium-67/68, du cuivre-64, du lutétium-177 et de l'yttrium-86 (TEP-TEMP).

Bien que les deux ligands **22** et **25** soient très hydrophiles, ils ne sont pas complètement solubles dans l'eau pure. Les métallations sont donc réalisées dans un mélange eau/DMSO 95:5 (v/v). La méthode générale consiste à placer le mélange à pH 6-7, à introduire le réactif métallique puis à laisser la réaction sous agitation à 50°C pendant 2 heures (*schéma 31*).

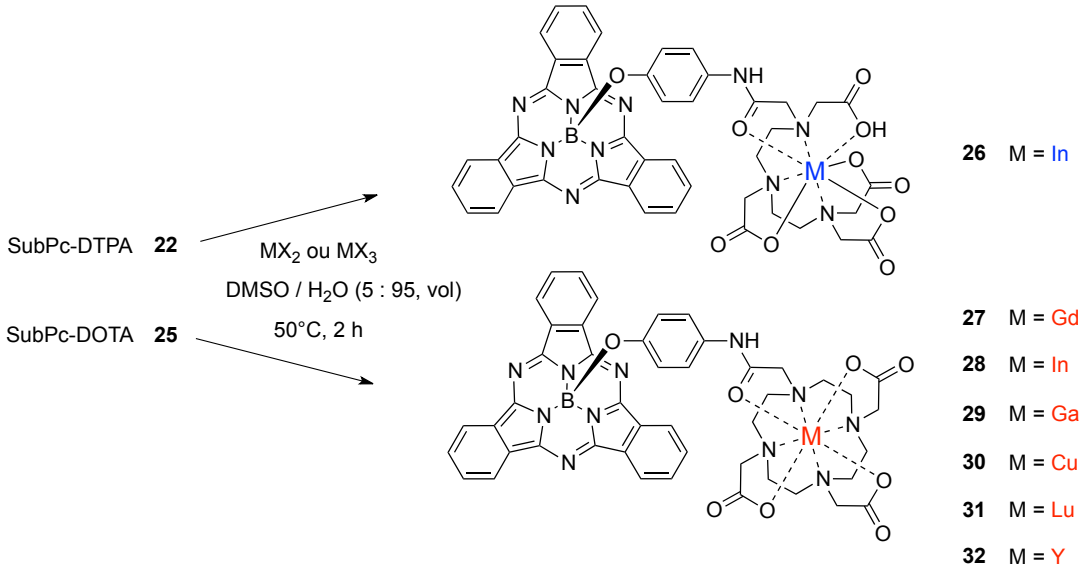


*Schéma 31 : Métallations des ligands SubPc-DTPA **22** et SubPc-DOTA **25***

Les différents produits métallés sont ensuite isolés et lavés à l'eau par centrifugation afin d'éliminer l'excès de réactif métallique.

Le *tableau 17* reprend les réactifs utilisés, les rendements de métallation obtenus ainsi que les résultats des analyses spectrométriques (masse exacte, ESI) et chromatographiques (HPLC). Les rendements de réaction sont variables selon la nature du métal introduit. Les suivis en spectrométrie de masse (MALDI-TOF) des différentes réactions attestent d'une complète métallation.

Composé		Réactif	Rendement	Masse exacte (m/z $[M+Na]^+$)		Pureté HPLC
				Théorique	Expérimentale	
26	SubPc-DTPA-In	$InCl_3$	81 %	/	/	93,2 %
27	SubPc-DOTA-Gd	$Gd(NO_3)_3$	82 %	1067,2383	1067,2398	96,5 %
28	SubPc-DOTA-In	$InCl_3$	74 %	1024,2172	1024,2181	86,2 %
29	SubPc-DOTA-Ga	$GaCl_3$	51 %	978,2389	978,2411	87,5 %
30	SubPc-DOTA-Cu	$Cu(NO_3)_2$	66 %	973,2507	973,2522	95,9 %
31	SubPc-DOTA-Lu	$LuCl_3$	51 %	1084,2541	1084,2561	89,2 %
32	SubPc-DOTA-Y	YCl_3	92 %	998,2191	998,2199	87,5 %

*Tableau 17 : Récapitulatif des réactifs utilisés, rendements obtenus et valeurs analytiques caractéristiques lors des métallations des composés **26** et **32***

La perte de produit peut être attribuée au mode d'isolement et de purification. En effet, selon la nature du métal, l'hydrosolubilité du complexe est variable. Ainsi, les lavages en milieu aqueux (centrifugation) vont conduire à une perte plus ou moins importante de produit. Dans tous les cas, les composés isolés possèdent une pureté, déterminée par HPLC, relativement satisfaisante.

Rappelons que ces composés sont des modèles de sondes bimodales qui ont été préparées dans le but de déterminer leur accessibilité et leurs propriétés (excepté pour le complexe de gadolinium). Il faut donc noter que le ligand n'est pas toujours parfaitement adapté au métal. En effet, l'introduction d'un dérivé de taille réduite de type NOTA à la place du dérivé DOTA serait plus adéquate dans le cas du cuivre ou du gallium.[76b] Pour cela, le chemin synthétique mis en place dans le cas du dérivé DOTA pourra facilement être utilisé pour introduire le NOTA.

II.3.4. Etudes des propriétés des complexes

Les complexes ont ensuite été évalués en terme de propriétés imageantes, afin de déterminer leur aptitude à produire le signal d'intérêt.

II.3.4.1. Etude des propriétés photophysiques

Les propriétés d'absorption et d'émission des ligands libres**,** des précurseurs protégés ainsi que des complexes ont été mesurées par spectroscopie d'absorption et fluorimétrie, et ceci dans différents solvants (MeOH, DMSO ou 5% DMSO vol. dans l'eau). Les résultats figurent dans le *tableau 18*.

	Composé	Solvant	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	ε (.10^3 mol^{-1}.L.cm^{-1})	Φ_F
23	SubPc-DTPAtBu_4	$CHCl_3$	563	571	66,1	0,10
22	SubPc-DTPA	MeOH	560	570	65,1	0,18
		DMSO	566	574	/	0,06
		5% DMSO/H_2O	567	575	/	0,10
26	SubPc-DTPA-In	MeOH	560	570	63,2	0,10
24	SubPc-DOTAtBu_3	$CHCl_3$	563	571	67,0	0,12
25	SubPc-DOTA	MeOH	560	569	61,6	0,17
		DMSO	566	574	/	0,07
		5% DMSO/H_2O	567	576	/	0,07
27	SubPc-DOTA-Gd	MeOH	561	570	52,1	0,09
28	SubPc-DOTA-In	MeOH	561	570	52,1	0,11
29	SubPc-DOTA-Ga	MeOH	561	570	60,3	0,08
30	SubPc-DOTA-Cu	MeOH	560	570	49,6	0,03
31	SubPc-DOTA-Lu	MeOH	559	570	59,8	0,10
32	SubPc-DOTA-Y	MeOH	560	570	66,2	0,10

*Tableau 18 : Résumé des propriétés photophysiques des ligands **22** et **25**, des précurseurs **23** et **24** et des complexes **26** à **32** (298 K ; Référence : rhodamine 6G dans MeOH, Φ_F = 0,96, λ_{ex} = 488 nm ; Incertitude de mesure : ± 10 %)*

Pour les ligands libres, les rendements quantiques de fluorescence sont plus élevés dans le méthanol que dans le DMSO ou le mélange DMSO/H_2O. Ceci traduit l'hydrosolubilité non optimale des composés, soit une probable agrégation, ce qui conduit à la baisse de fluorescence. Dans le cas des complexes, les mesures ont seulement été réalisées dans le méthanol, car suite à la métallation, le composé perd de son hydrosolubilité.

Dans le cas du complexe de cuivre, la fluorescence mesurée est plus faible que pour les autres complexes métalliques. Ce phénomène, déjà observé dans la littérature,[85b,207] est attribuable à un transfert d'énergie de type TEP (Transfer d'électrons photo-induit) entre le métal et le cœur aromatique fluorescent.

II.3.4.2. Cas du complexe de gadolinium : études de relaxivité

Comme nous avons pu le voir dans l'introduction sur l'imagerie, l'efficacité d'un agent de contraste IRM de type complexe de gadolinium est quantifiée par sa relaxivité longitudinale (R_1). Nous avons donc calculé cette valeur dans le cas de la SubPc-DOTAGd **27**, en mesurant le temps de relaxation

pour différentes concentrations. Il est cependant nécessaire que le produit ne contienne pas de trace de gadolinium libre résiduel, afin d'obtenir une valeur exacte.

II.3.4.2.1. Mesure du Gd libre

Pour détecter l'éventuelle présence de gadolinium non complexé par le DOTA, nous avons utilisé la méthode au xylénol.[208] Ce chromophore est capable de complexer le lanthanide (log K = 5,8) et l'association métal-ligand est caractérisée par une modification du spectre d'absorption. La méthode consiste à mélanger la SubPc-DOTAGd avec du xylénol puis mesurer l'absorption du mélange (*figure 72*).

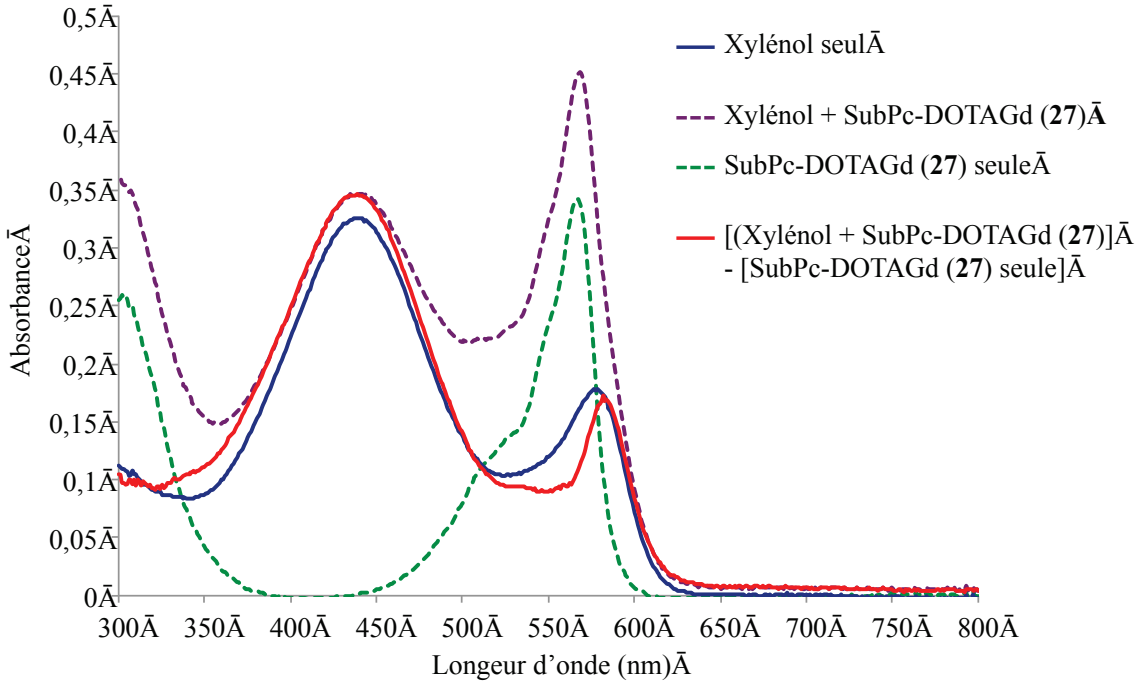


Figure 73 : Spectres d'absorption superposés pour la mesure du gadolinium libre par la méthode au xylénol (mesures dans tampon acétate pH 5,8)

Si le xylénol libre possède un maximum d'absorption à 433 nm, le complexe de gadolinium présente quant à lui une absorption caractéristique à 573 nm. Etant donné que la SubPc absorbe également à cette longueur d'onde, il est donc nécessaire de soustraire la courbe du mélange à la courbe de la SubPc-DOTAGd seule. Le spectre obtenu (tracé continu rouge) est alors à comparer avec le spectre du xylénol seul en solution (tracé continu bleu).

Dans notre cas, ces deux spectres sont quasiment superposables, ce qui signifie que la SubPc-DOTAGd synthétisée ne contient pas de gadolinium libre. La valeur de relaxivité du complexe peut alors être mesurée.

II.3.4.2.2. Mesure de relaxivité

Les mesures de relaxivité ont été réalisées à l'aide d'un appareil minispec (Bruker), avec lequel il est possible de déterminer la vitesse de relaxation des molécules d'eau d'une solution donnée. En réalisant la mesure sur des solutions contenant le complexe de gadolinium à différentes concentrations précises, il est possible de déterminer la constante de relaxivité du complexe. Il correspond au coefficient directeur de la droite représentant l'inverse du temps de relaxation en fonction de la concentration en gadolinium ($1/T_1=f([Gd])$) (*figure 73)*. Le composé n'étant pas totalement soluble dans l'eau, les mesures sont réalisées dans un mélange eau/DMSO 95:5 (v/v).

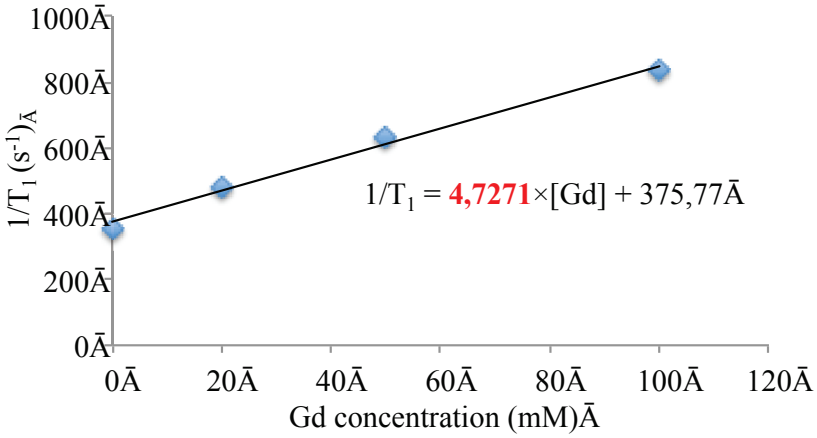


*Figure 74 : Inverse du temps de relaxation longitudinal en fonction de la concentration en gadolinium pour le composé **27** (eau/DMSO 95:5 v/v)*

La méthode permet de déterminer une valeur de relaxivité longitudinale r_1 à 0,5 Tesla (20 MHz) et à 40°C de 4,73 $mM^{-1}.s^{-1}$. Pour comparaison, la valeur déterminée dans le cas du Dotarem® (DOTA-Gd) dans les mêmes paramètres de mesure est de 4,2 $mM^{-1}.s^{-1}$.[209]

II.3.5. Vers une optimisation des propriétés optiques et photophysiques

Comme présenté dans l'introduction sur les subphtalocyanines, l'extension de la conjugaison périphérique permet de décaler les longueurs d'ondes d'absorption et d'émission vers la fenêtre du proche infrarouge, ce qui est un atout pour une imagerie en profondeur. Nous avons donc envisagé de transposer la voie de synthèse précédente, permettant d'introduire un groupement aniline en position apicale, à un analogue de conjugaison étendu des SubPc : la subnaphtalocyanine (SubNc).

D'autre part, il a également été énoncé que la présence d'atomes de fluor en position périphérique d'une SubPc conduit à un rendement quantique de fluorescence 2,6 fois supérieur (0,66 dans le DCM contre 0,25 pour la SubPc non fluorée). Nous avons donc également étudié la possibilité d'appliquer cette voie de synthèse à partir de la subphtalocyanine dodécafluorée (F_{12}SubPc-Cl **5**),

d'autant que ce synthon est obtenu avec un bien meilleur rendement de cyclisation (53 %) que le synthon non substitué (SubPc-Cl **3**, 9%).

II.3.5.1. Subnaphtalocyanine

Le mode opératoire « one-pot » utilisé pour la synthèse de subphtalocyanines substituées par un groupement phénolique en position apicale a été appliqué à la préparation du dérivé subnaphtalocyanine **33** (*schéma 32*). Le phtalonitrile est donc ici remplacé par du naphtalonitrile.

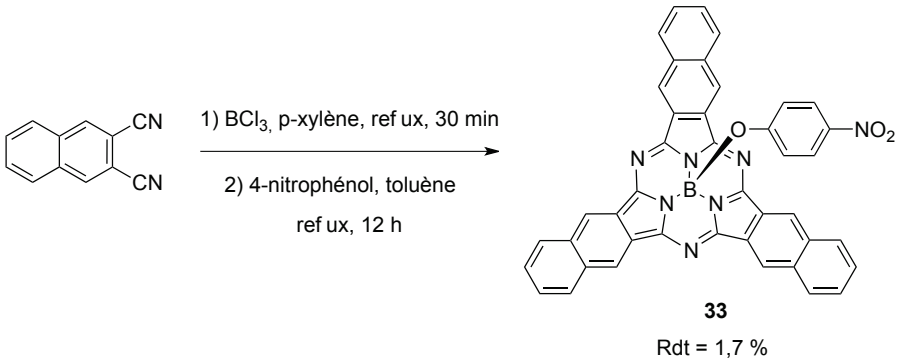


*Schéma 32 : Synthèse de la SubNc-NO_2 **33***

L'analyse par CCM du mélange réactionnel met en évidence la présence de quatre produits de couleur bleue. Ces composés ont été séparés et isolés par chromatographie sur colonne de silice. La spectrométrie de masse (MALDI-TOF) permet de déterminer que l'une des fractions correspond au composé souhaité **33**. Deux autres fractions peuvent être attribuées à l'intermédiaire réactionnel chloré (SubNc-Cl) ainsi qu'une espèce pour laquelle la position apicale est hydrolysée (B-OH). Le dernier produit n'a pas pu être identifié. La SubNc-NO_2 est obtenue avec un faible rendement de 1,7 %. Son spectre d'absorption présente une bande de Soret à 327 nm et une bande Q à 656 nm, ce qui correspond à un déplacement de 93 nm par rapport à la bande Q de la SubPc-NO_2 **13** (*figure 75*).

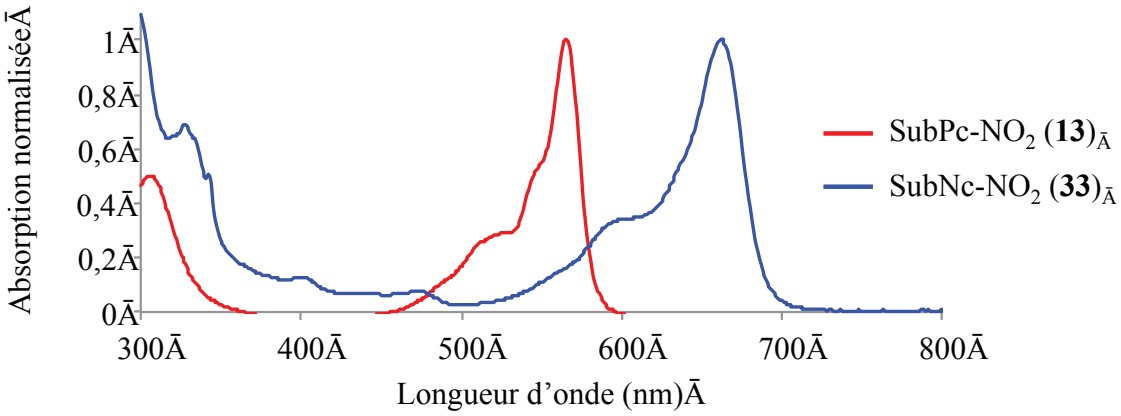


*Figure 75 : Spectre d'absorption de la SuNc-NO_2 **33***

Même si le composé obtenu possède de meilleures propriétés optiques que la subphtalocyanine simple, le faible rendement de synthèse obtenu ne permet pas d'envisager une transposition des voies de synthèse utilisées précédemment pour amener une fonction d'intérêt pour la conjugaison.

II.3.5.2. Subphtalocyanine perfluorée

Comme précédemment, le groupement *para*-nitrophénoxy peut être introduit par substitution du chlore apical du composé **5** dans le toluène à reflux (*schéma 33*).

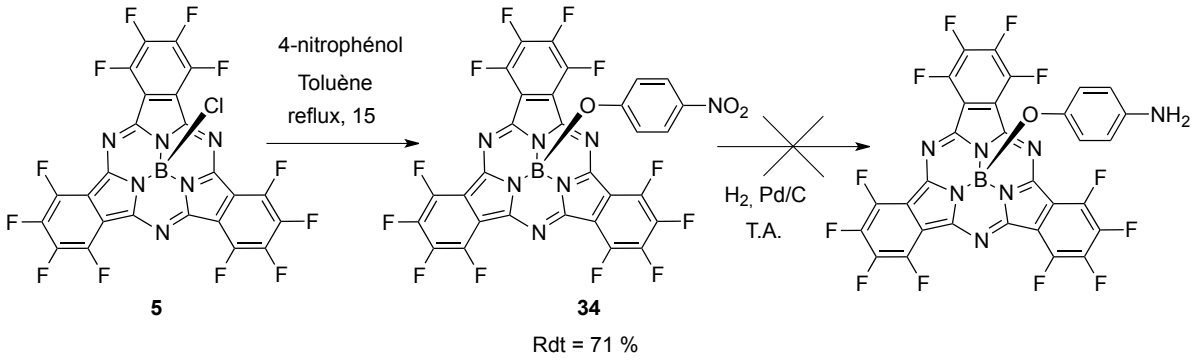


*Schéma 33 : Synthèse du composé **34** et essai de réduction du groupement nitro*

Le composé **34** est alors obtenu avec un rendement de 71 %. Sa structure cristallographique a été résolue par diffraction des rayons X (*figure 76*). Par la suite, les essais d'hydrogénation catalytique du groupement nitro n'ont pas permis d'obtenir l'amine voulue. Quelles que soient les conditions utilisées, le milieu réactionnel évolue très rapidement d'une couleur violette, caractéristique du produit de départ, à un bleu intense. La CCM du mélange montre la consommation complète du produit de départ et la formation de plusieurs produits. Les espèces formées ne semblent pas être stables, car aucune n'a pu être isolée par purification sur colonne de silice ou d'alumine.

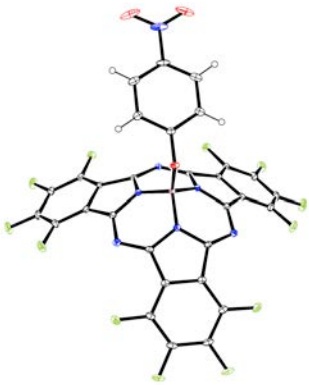


*Figure 76 : Vue ORTEP du composé **34***

La mise au point d'une sonde pour l'imagerie optique à partir de l'espèce perfluorée n'a donc pas été étudiée plus en détail.

II.4. Etude du comportement chimique et de la stabilité des subphtalocyanines synthétisées

Les fluorophores organiques appliqués à l'imagerie optique doivent entre autre posséder une bonne stabilité chimique et photophysique, ainsi qu'être inertes vis-à-vis du milieu biologique. Ces propriétés n'ont que rarement été étudiées dans le cas des subphtalocyanines. Nous avons donc cherché à comprendre les phénomènes chimiques observés dans le cas des essais de réduction de l'espèce dodécafluorée **34** et à déterminer leur importance dans le cas des SubPc fonctionnelles non substituées en périphérie, afin d'évaluer leur impact sur leur stabilité chimique.

II.4.1. Comportement chimique

Les mêmes types de comportement, à savoir la transformation de la SubPc en un ou plusieurs produits bleus, peuvent être observés dans les conditions suivantes :

* Lorsque la subphtalocyanine est **mise en présence d'agents ou de solvants potentiellement nucléophiles,** tels que le méthanol, l'hydrogène (en présence de palladium sur charbon), l'ammoniac ou une amine. L'absorption obtenue est variable selon l'agent. Ce premier phénomène est visible si la subphtalocyanine **possède des groupements attracteurs**, par exemple dans le cas de l'espèce perfluorée **34**. Il est également observé pour la subphtalocyanine trinitrée **6**, lorsqu'on essaie de réduire les groupements nitro par hydrogénation catalytique. Il est d'autre part irréversible. Dans le cas de l'espèce non substituée (SubPc-Cl **3**), il n'est pas observé.

* Lorsqu'une subphtalocyanine est **mise en présence d'acide de Lewis**, comme le trichlorure d'aluminium ou le trifluorure de bore.

* Lorsque elle est **mise en présence d'acide de Brönsted fort** comme l'acide sulfurique (couleur bleu-vert) ou l'acide trifluoroacétique (couleur bleu foncé). Cependant, l'espèce formée en présence d'acide sulfurique n'est stable que quelques dizaines de secondes et le mélange devient rapidement incolore. Dans le cas du TFA, la solution est inchangée après plusieurs jours à température ambiante.

Ces deux derniers phénomènes sont observés aussi bien pour les SubPc non substituées que substituées. De plus, il est réversible, la SubPc de départ pouvant être retrouvée par neutralisation de l'acide. Deux conditions sont donc à différencier, car ils semblent provenir de deux phénomènes distincts : la **mise en présence d'agent nucléophile** et la **mise en présence d'acide**. Les études

bibliographiques et des expériences supplémentaires sur ces phénomènes permettent de révéler certains indices liés au comportement des SubPc.

II.4.1.1. Comportement électrophile

Il a été montré dans la littérature que la présence de substituants périphériques attracteurs sur la SubPc conduit à une réactivité supérieure en réaction de Kobayashi (élargissement de cycle).[186a,210] Nous avons également pu le constater. La condensation de la 1,3-diiminoisoindoline **35** avec le composé **5** en présence d'acétate de zinc permet en effet d'accéder à la phtalocyanine de symétrie A_3B **36** en quelques heures à température ambiante, alors que ce type de réaction nécessite habituellement une haute température (150°C) ainsi que la présence d'une base (DBU ou DMAE) (*schéma 34*).

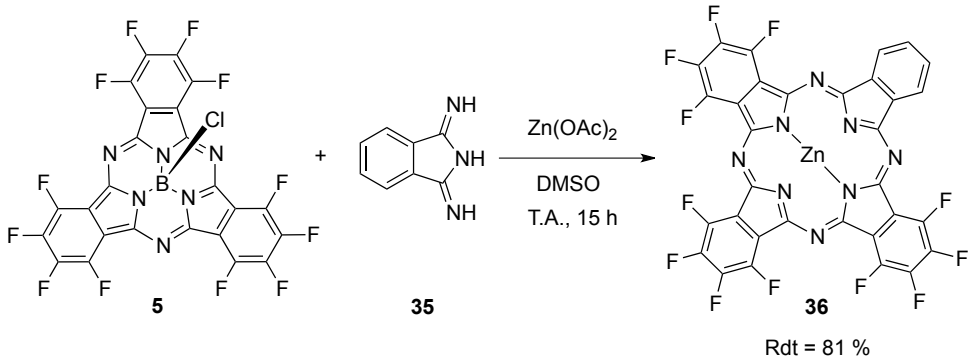


*Schéma 34 : Elargissement de la subphtalocyanine **5** avec la diiminoisoindoline pour obtenir la phtalocyanine **39***

Notons que la première étape dans le mécanisme d'ouverture de cycle est généralement supposée être l'attaque nucléophile de l'iminoisoindoline ou d'une espèce activée de dicyanobenzène sur le carbone électrophile situé en alpha de l'azote du pont.[211]

D'autre part, le groupe de Van Lier a également décrit en 2006 la formation d'un produit bleu qui n'a pas pu être identifié lorsque la synthèse de la SubPc perfluorée **5** a été tentée à température ambiante.[210] On peut supposer que le produit observé est un intermédiaire réactionnel de la formation de la SubPc.

En conclusion, d'après nos propres observations et les observations de la littérature, la présence de suffisamment de groupements attracteurs en position périphérique d'une subphtalocyanine semble conduire à une plus grande réactivité des liaisons carbones-azotes pontant les unités isoindoliques vis-à-vis d'espèces nucléophiles. Il est donc envisagé que les produits bleus formés dans notre cas soient des espèces, cycliques ou non cycliques, issues de la transformation d'une ou de plusieurs de ces liaisons sous l'action de l'agent nucléophile.

Même si le phénomène n'a pu être complètement expliqué, il permet de conclure que l'utilisation de subphtalocyanines porteuses de groupements attracteurs pour la synthèse d'espèces utiles à l'imagerie médicale n'est pour l'instant pas envisageable. Ce constat nous a également poussé à étudier plus en détail la stabilité des sondes basées sur le motif subphtalocyanine non fluoré synthétisées précédemment. Mais dans un premier temps nous avons exploré le phénomène réversible d'interaction avec les acides de Lewis et de Brönsted.

II.4.1.2. Comportement basique

Dans le cas de la réactivité en présence d'acide de Lewis, des phénomènes similaires ont déjà été observés dans la littérature. Le groupe de T. Bender a récemment publié une méthode de substitution apicale basée sur l'utilisation du trichlorure d'aluminium.[212] L'article mentionne que la mise en présence des SubPc avec cet agent conduit à une coloration bleue, attribuée à l'interaction de l'$AlCl_3$ avec l'un des azotes pontants (interaction acide-base).

Nous avons choisi d'explorer plus en détail le cas de l'utilisation d'acide de Brönsted. Il a été montré à de nombreuses reprises que la mise en solution d'une phtalocyanine dans l'acide sulfurique ou dans l'acide trifluoroacétique conduit à la formation d'une espèce de couleur marron, attribuable à une forme où un voire plusieurs atomes d'azote pontant les unités isoindolique sont protonés.[213] À l'inverse, la possibilité de protoner les ponts azotés des subphtalocyanines a seulement été brièvement mentionnée dans la littérature (cas de l'H_2SO_4).[176c]

Pour former les espèces mono ou multi-protonées, l'emploi d'acides organiques a été nécessaire afin d'éviter la présence d'eau, présumée responsable de l'instabilité de l'espèce formée (cas de l'acide sulfurique). Nous avons alors réalisé les études de protonation en utilisant l'acide trifluoroacétique (TFA, pKa = 0,3), l'acide méthanesulfonique (MSA, pKa = -1,9) et l'acide trifluorométhanesulfonique (TMSA, pKa = -14,9).

Afin de mettre en évidence le phénomène de première protonation, nous avons réalisé un dosage spectroscopique par ajout de TFA. À mesure que le pourcentage de TFA ajouté croît, une absorption à environ 610 nm peut être observée dans le cas du composé **3** (SubPc-Cl). Comme mis en évidence *figure 77*, le TFA n'est pas un acide suffisamment fort pour compléter la protonation.

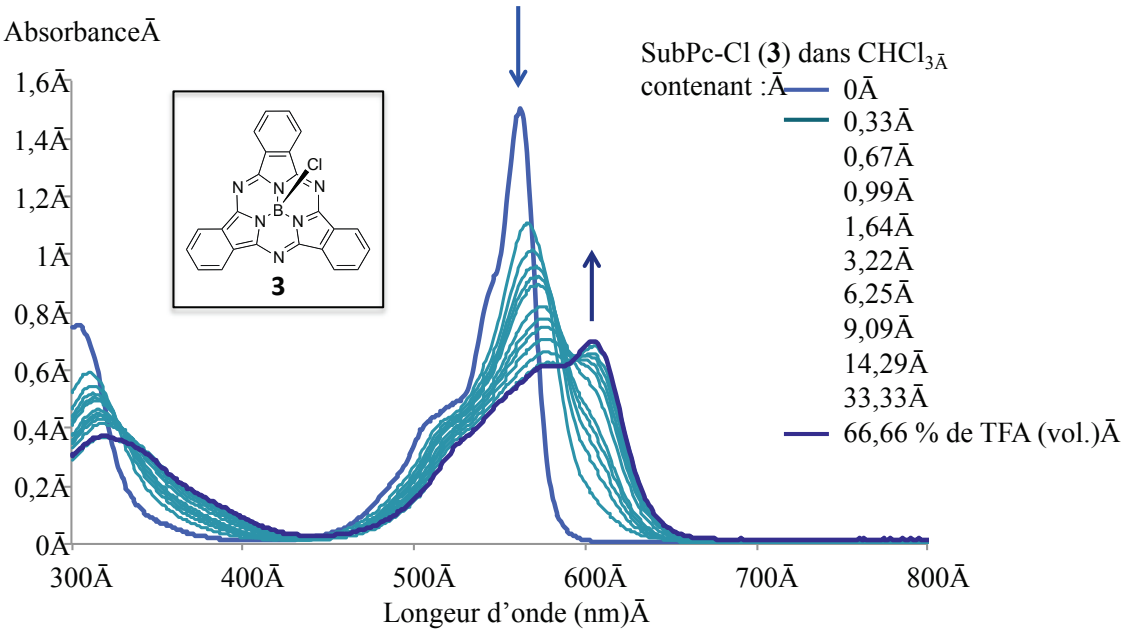


*Figure 77 : Superposition des spectres d'absorption du composé **3** dans le chloroforme contenant un pourcentage croissant de TFA*

Lorsque la subphtalocyanine est mise en solution dans un acide plus fort, de nouvelles espèces sont formées. Dans le MSA, cette SubPc conduit à un maximum d'absorption à 631 nm, et 665 nm dans le cas du TMSA (*figure 78*). Notons que la mise en solution dans un mélange DCM/TMSA conduit à la précipitation du produit, ce qui laisse à penser que le composé formé est une espèce multichargée. De plus, l'étude montre que ce phénomène de protonation dépend de la richesse électronique du macrocycle. En effet, dans le cas de la subphtalocyanine perfluorée **5**, elle procède plus difficilement. Dans le TFA pur, l'espèce monoprotonée n'est quasiment pas observée (*figure 79*).

Des tests ont d'autre part montré la reversibilité du phénomène lorsque l'acide utilisé est le TFA. L'ajout d'eau ou d'une base non nucléophile conduit généralement à un retour à l'absorption initiale. Ceci n'est pas systématiquement vrai pour le MSA et le TMSA, pour lesquels les espèces formées semblent plus instables.

Une étude plus poussée de ce phénomène de protonation, notamment à travers des dosages précis, peut être envisageable pour calculer la valeur du pKa de chacun des azotes pontants, et ceci pour des subphtalocyanines de richesse électronique variable.

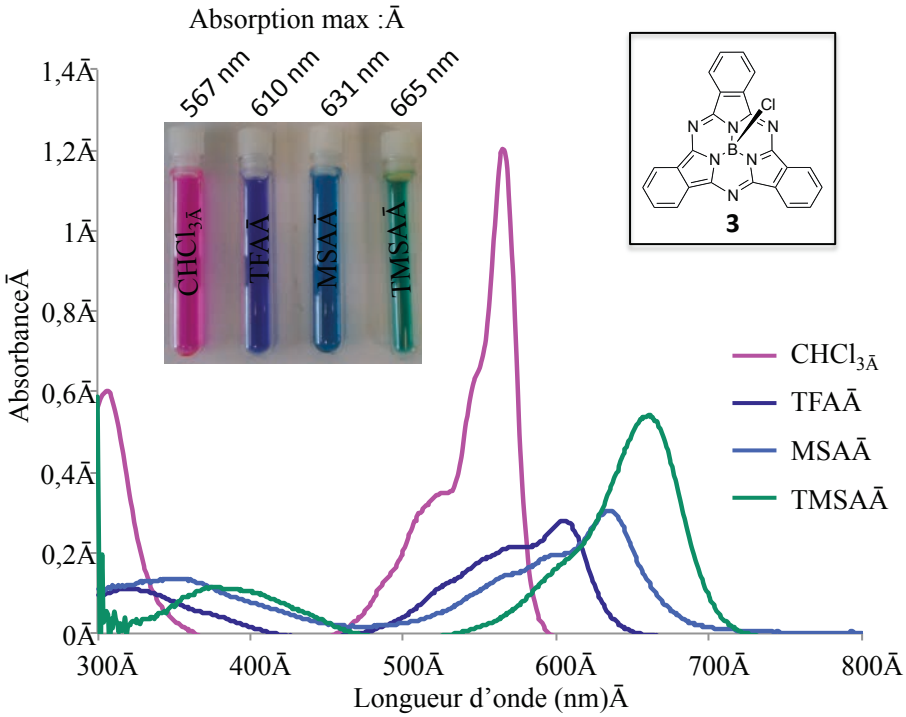


*Figure 78 : Superposition des spectres d'absorption du composé **3** dans le chloroforme, le TFA, le MSA et le TMSA*

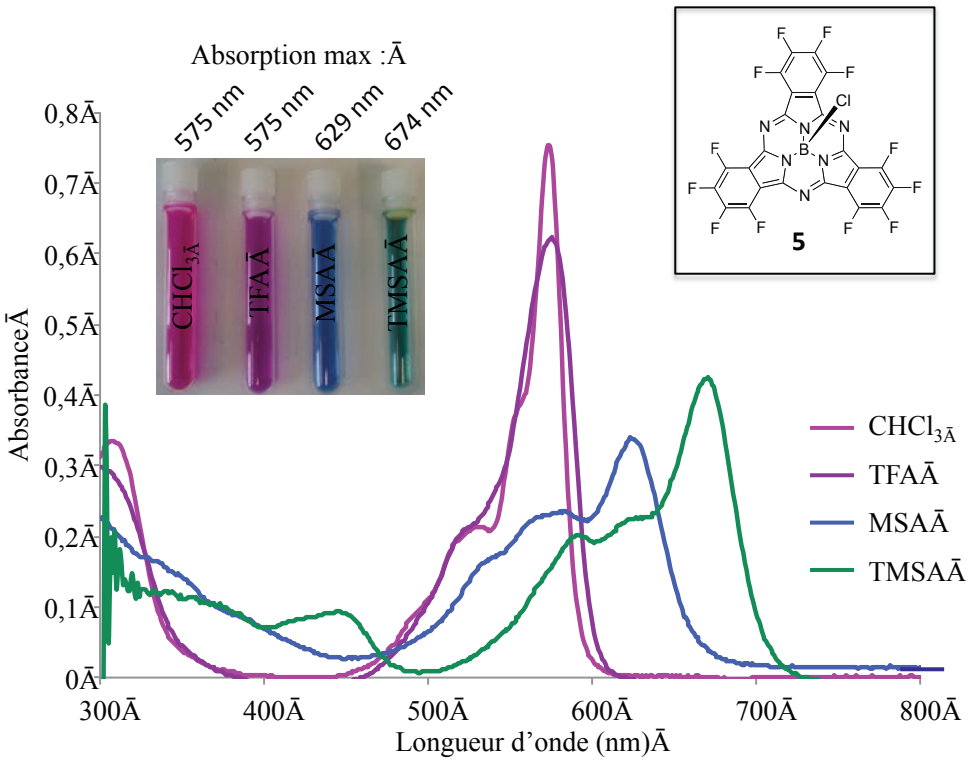


*Figure 79 : Superposition des spectres d'absorption du composé **5** dans le chloroforme, le TFA, le MSA et le TMSA*

Ces mesures ont permis de montrer qu'il était possible de protoner les ponts azotés des subphtalocyanines. À notre connaissance de la bibliographie, nous sommes les premiers à mettre clairement en évidence ce phénomène. D'autre part, les subphtalocyanines semblent relativement stables en conditions acides, mais seulement si l'acide utilisé est organique.

II.4.2. Interprétation des phénomènes

En terme de comportement chimique, les résultats obtenus permettent de rationaliser certains points liés à la stabilité et à la réactivité des SubPc en fonction de leur richesse électronique (*figure 80*). Lorsque le cycle aromatique est appauvri en électrons, la SubPc présente une plus faible basicité des ponts azotés ainsi qu'une plus grande réactivité des liaisons carbone-azotes pontantes. Comme nous avons pu le voir précédemment, ce phénomène est moins important dans le cas d'une subphtalocyanine substituée, qui ne présente pas de groupements attracteurs. Ainsi, il semble y avoir une corrélation directe entre le caractère donneur ou accepteur des substituants et la réactivité de certains sites de la molécule, soit la stabilité chimique de la SubPc. On peut donc penser qu'une subphtalocyanine substituée par des groupements donneurs sera moins réactive vis-à-vis des espèces nucléophiles mais plus facilement protonable. Cette proposition reste à verifier.

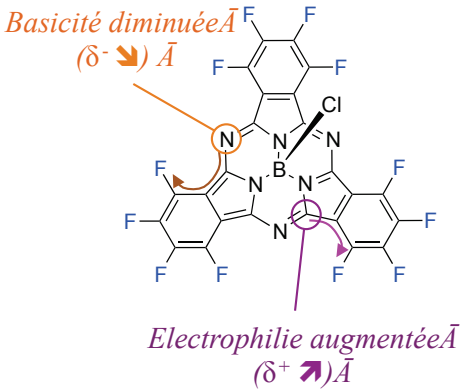


Figure 80 : Conséquences de la présence de substituants périphériques attracteurs

II.4.3. Stabilité chimique et photophysique

II.4.3.1. Stabilité chimique

Suite aux constats précédents, nous avons étudié la stabilité chimique de certaines des sondes préparées par suivis UV. Ces suivis ont été réalisés sur une subphtalocyanine hydrosoluble, la SubPc-DTPA **22**, et dans trois solvants : le méthanol, le DMSO et l'eau. Les échantillons suivis ont été placés sous agitation et selon le cas en l'absence ou en présence de lumière. À titre de comparaison, des mesures ont également été réalisées dans le dichlorométhane sur une subphtalocyanine organosoluble, la SubPc-NO_2 **13**. Les mesures consistent à suivre dans le temps l'absorbance à la longueur d'onde d'absorption maximale. Les courbes d'évolution de l'absorbance en fonction du temps sont représentées sur la *figure 81*.

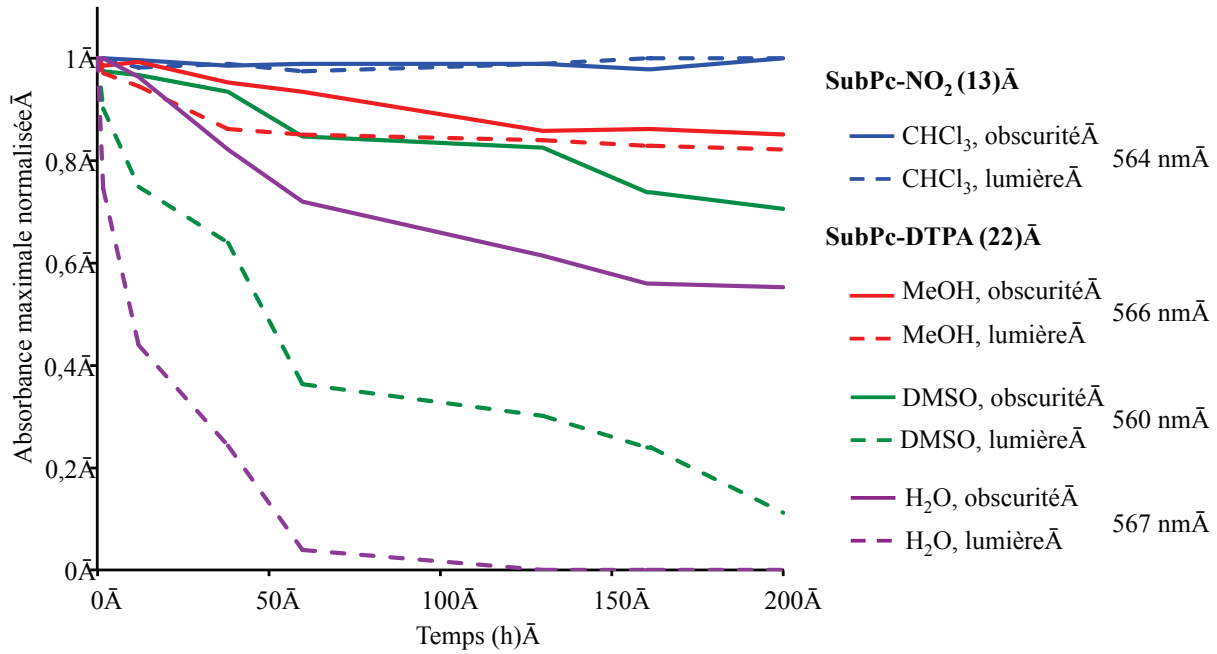


Figure 81 : Evolution de l'absorbance de deux subphtalocyanines en fonction du temps : influence du solvant et de la lumière

On note tout d'abord que la SubPc-NO_2 est stable en milieu organique sur toute la durée de la mesure, que ce soit en présence ou en absence de lumière. Au contraire, la SubPc-DTPA montre une instabilité dans les trois solvants étudiés. Cette instabilité est plus importante dans le DMSO que dans le méthanol, et plus importante encore dans l'eau. Ce phénomène peut être attribuable au caractère nucléophile des solvants étudiés. De plus, la présence de photons semble augmenter davantage le phénomène de dégradation.

Nombreux sont les nucléophiles présents en milieu physiologique, notamment des amines, des thiols ou autres. Nous avons donc complété nos mesures en réalisant un suivi en présence de méthylamine (100 équivalents) afin d'évaluer la stabilité de la sonde vis-à-vis de ces agents. Les résultats sont présentés *figure 82*. Comme précédemment, l'espèce organosoluble (SubPc-NO_2) est relativement stable, même en présence de méthylamine. L'instabilité de la SubPc-DTPA dans le méthanol ou dans l'eau est quant à elle augmentée lorsque l'on ajoute la base nucléophile. On peut donc vraisemblablement attribuer l'instabilité observée lors des premières mesures (solvant seul) à la réactivité des liaisons C-N pontantes.

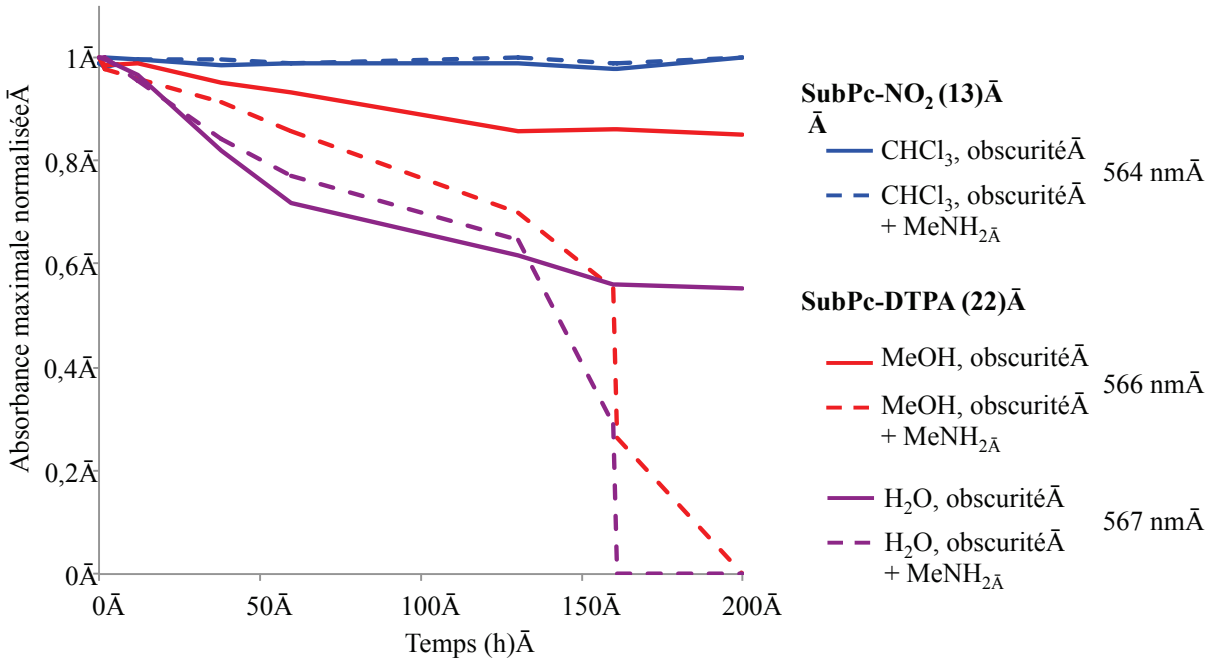


Figure 82 : Evolution de l'absorbance de deux subphtalocyanines en fonction du temps : influence de la présence de méthylamine

Les SubPc, à minima la SubPc-DTPA **22**, présentent donc une instabilité lorsqu'elles sont mises en présence d'un milieu contenant un **agent nucléophile**, instabilité qui est accrue par la présence de **lumière**.

II.4.3.2. Stabilité photophysique

Nous avons également réalisé des mesures de photoblanchiment à l'aide d'un fluorimètre afin d'évaluer plus précisément l'influence de la lumière. La mesure a été réalisée sur la SubPc-DTPA **22** en solution dans le méthanol, ainsi que sur la fluorescéine (NaOH 0,1 M) pour comparaison. La méthode consiste à exciter en continu le fluorophore à sa longueur d'onde maximale d'absorption (566 nm pour la SubPc et 490 nm pour la fluorescéine) et de mesurer l'évolution de l'émission de fluorescence au cours du temps.

Comme le montre la *figure 83*, la SubPc-DTPA **22** se dégrade plus vite que la fluorescéine. Cependant, cette dégradation n'est pas linéaire. À nouveau, ceci met en évidence que la perte d'intensité de fluorescence n'est pas seulement due à l'exposition lumineuse mais est également d'ordre chimique.

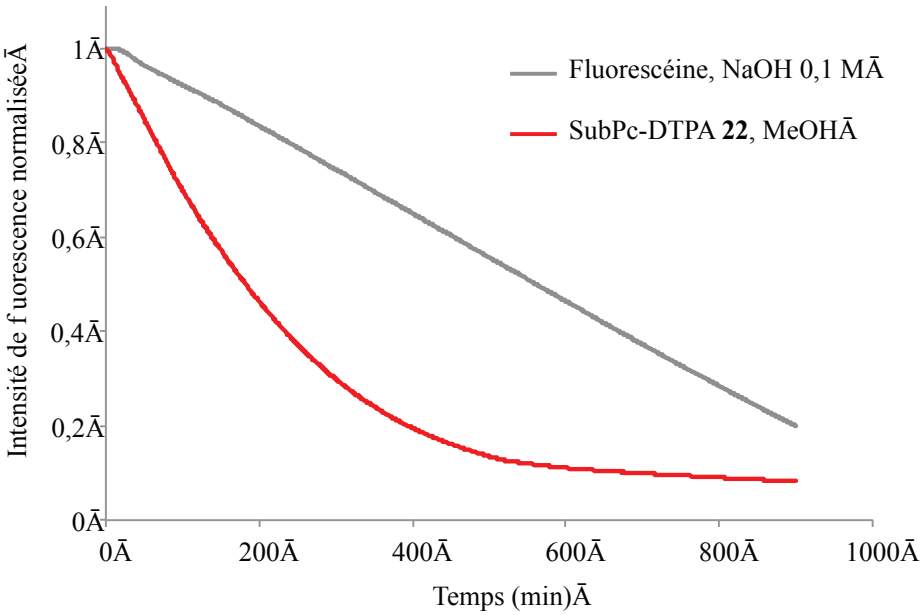


*Figure 83 : Intensité de fluorescence de la SubPc-DTPA **22** dans le méthanol et de la fluorescéine dans la soude 0,1 molaire sous irradiation continue*

II.5. Conclusion

Dans cette partie, nous avons donc pu synthétiser des subphtalocyanines contenant différentes fonctionnalités utiles à une application dans le domaine de l'imagerie médicale (*figure 84*).

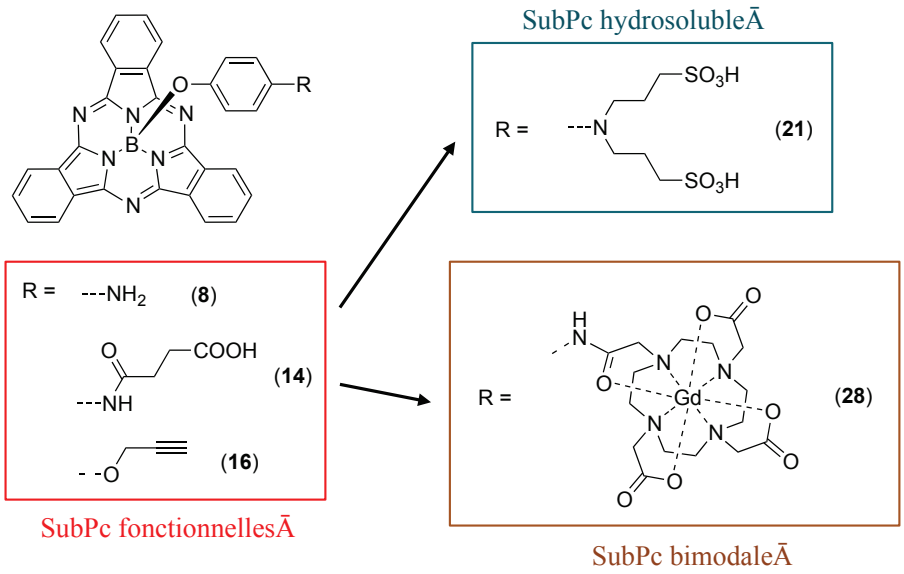


Figure 84 : Subphtalocyanines fonctionnelles, hydrosoluble et bimodale préparées

La fonctionnalisation apicale permet d'introduire des groupements amine, acide ou alcyne, et les composés obtenus (**8**, **14** et **16**) conservent leurs propriétés de fluorescence. Ces SubPcs seront notamment utiles pour permettre une association à un vecteur biologique (chapitre II).

Nous avons également exploré la possibilité de mettre au point des subphtalocyanines intelligentes sensibles au pH du milieu. Malgré la faisabilité de synthèse et l'observation d'un comportement ON/OFF, les mesures photophysiques ont montré qu'un phénomène jusqu'à maintenant non expliqué interférait avec l'activation des sondes. Des études supplémentaires permettraient éventuellement de mettre en évidence le phénomène interférant. Selon une méthode de synthèse similaire, nous avons également préparé une subphtalocyanine hydrosoluble (**21**) qui présente une émission de fluorescence en milieu aqueux.

De plus, des agents chélatants ont été introduits pour permettre une hydrosolubilisation de la sonde et tirer parti de la présence de métaux utiles à l'imagerie. Certaines propriétés imageantes des complexes métalliques préparés ont été évaluées, notamment la fluorescence et la relaxivité dans le cas du complexe de gadolinium **28**.

Les essais de transposition des voies de synthèse utilisées sur des subphtalocyanines présentant des propriétés imageantes supérieures (SubNc et F_{12}SubPc) n'ont pour l'instant pas été fructueux. Mais ils ont permis de montrer que la présence de groupements attracteurs en périphérie du cycle conduit à une plus grande instabilité de la sonde. Ce phénomène a été étudié et compris grâce à des expériences et une étude bibliographique poussée. Pour la première fois dans la littérature, nous avons mis clairement en évidence le phénomène de protonation des ponts azotés des subphtalocyanines, phénomène qui dépend également de la richesse électronique de la subphtalocyanine.

Les études de stabilité réalisées sur les sondes synthétisées ont ensuite mis en exergue leur sensibilité au milieu environnant et à la lumière.

Malgré la faible stabilité des subphtalocyanines, les composés préparés possèdent tout de même certaines propriétés requises pour une utilisation comme sonde d'imagerie optique, comme une bonne hydrosolubilité, une faible tendance à l'agrégation ou encore une émission de fluorescence suffisante. Nous avons alors choisi d'explorer quelques unes des approches possibles pour la mise au point d'agents fluorescents à partir des SubPcs synthétisées par biovectorisation. Nous avons également étudié leur viabilité pour la microscopie cellulaire. Ces approches seront décrites dans le chapitre II.

À partir des constats réalisés sur les paramètres chimiques liés à la stabilité de la sonde, on peut imaginer une conception rationnelle d'une subphtalocyanine plus stable. La substitution périphérique par des atomes donneurs est une option envisagée pour assurer une plus grande résistance du cycle aromatique. De plus, ce type de substitution conduira à un déplacement des

bandes d'absorption et d'émission vers le domaine du proche infrarouge, ce qui constitue également un avantage non négligeable. Dans cet objectif, il sera donc nécessaire de mener les voies de synthèse développées au départ d'un précurseur dicyanobenzène di- ou tétra-substitué par des groupements oxygénés ou soufrés. Cette option hypothétique reste bien entendu à vérifier suite à la préparation des composés d'intérêt par mesure de leurs propriétés.

Si l'approche s'avère concluante, les voies de synthèse précédemment établies pourront également être améliorées, notamment en utilisant un espaceur trifonctionnel (approche MSAP), afin d'introduire simultanément une fonction de conjugaison et un agent chélatant et ainsi d'obtenir une sonde bimodale vectorisable (*figure 85*).

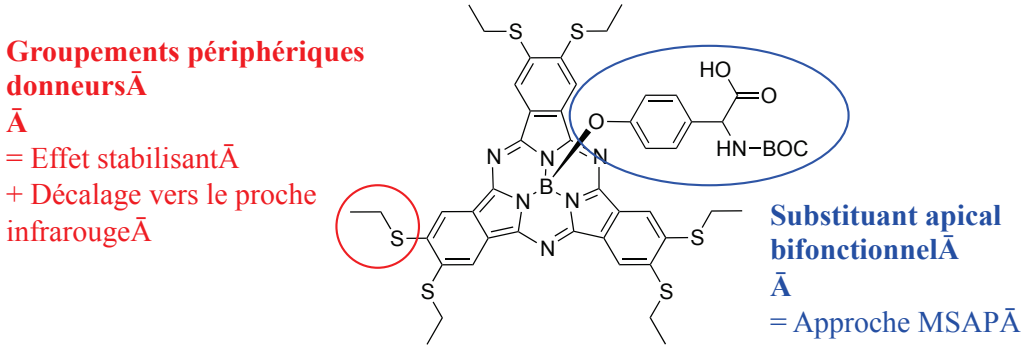


Figure 85 : Synthon réactionnel envisagé pour apporter de la stabilité et une voie d'entrée pour l'association avec agent chélatant et un vecteur biologique

Partie III : Synthèse, fonctionnalisation et étude de phtalocyanines pour une application en imagerie optique

Comme énoncé dans les objectifs, une autre partie de ce travail de thèse a consisté à préparer et étudier des sondes appartenant à la deuxième catégorie de fluorophores envisagés, à savoir les phtalocyanines. De manière similaire au cas des subphtalocyanines, il s'agit d'introduire :

* des **fonctions réactives** (fonctions acides carboxyliques, amine, alcyne) qui seront notamment utiles pour la préparation de nano-hybrides ;
* un **agent chélatant** (type DOTA), permettant une bimodalité supplémentaire par chélation d'un métal actif en scintigraphie ou en IRM (*figure 86*).

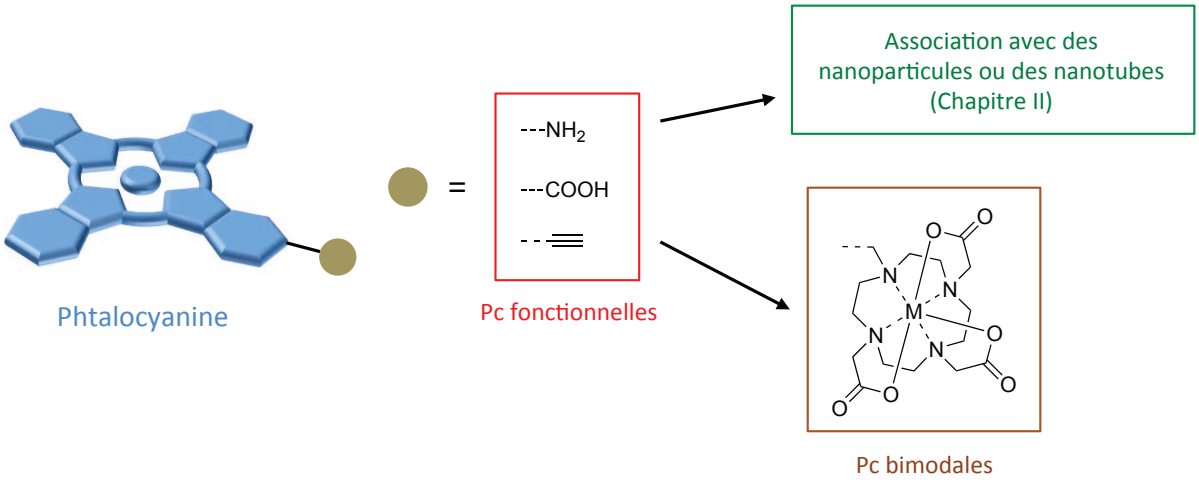


Figure 86 : Premiers objectifs de synthèse de la troisième partie du chapitre II

Les fonctionnalités d'intérêt seront introduites en position périphérique, ce qui nécessite de préparer des phtalocyanines dissymétriques. Comme nous l'avons vu lors de la présentation de ces fluorophores, la méthode la plus couramment utilisée pour obtenir ce type de phtalocyanines est la méthode statistique. C'est ce chemin d'accès synthétique que nous avons suivi.

Compte tenu des propriétés de solubilité des composés préparés, nous serons également amenés à synthétiser des phtalocyanines tétra- ou octasubstituées en périphérie par des groupements hydrosolubilisants (pyridine, acide carboxylique, DOTA), ce qui nécessitera parfois de synthétiser au préalable des phtalocyanines tétrafonctionnelles (*figure 87*). Leur étude en terme de solubilité et d'agrégation nous poussera alors vers la mise au point d'outils chimiques permettant d'encombrer stériquement les faces des phtalocyanines et réduire ainsi l'agrégation. Dans ce cas, nous seront amenés à préparer des phtalocyanines ou des aza-phtalocyanines octasubstituées par des groupements de type phényle *ortho*-substitués.

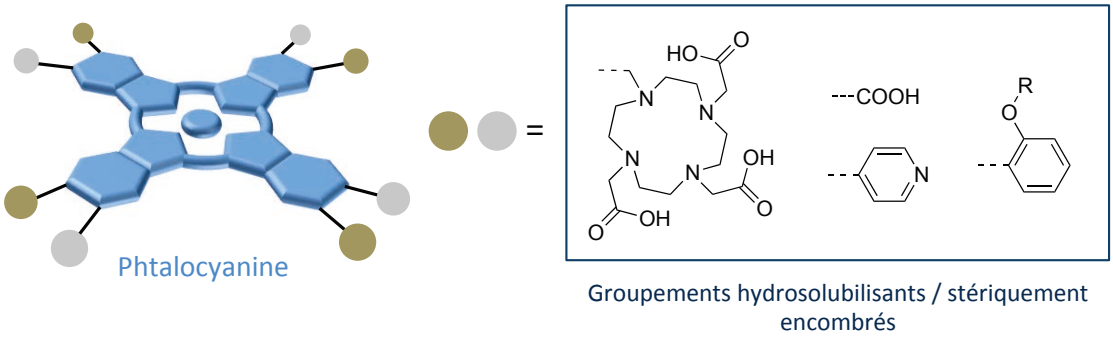


Figure 87 : Seconds objectifs de synthèse de la troisième partie du chapitre II

Comme dans le cas des subphtalocyanines, nous serons amenés à étudier plus en détail certaines propriétés des phtalocyanines, notamment la protonation des azotes pontants, qui guideront parfois les choix en terme de type de groupement introduit.

III.1. Synthèse de phtalocyanines fonctionnelles

III.1.1. Synthèse de phtalocyanines monofonctionnelles

III.1.1.1. Synthèse de l'aminophtalocyanine

Le premier chemin d'accès que nous avons envisagé pour obtenir une phtalocyanine fonctionnalisée par un groupement amine se base sur des exemples de la littérature,[214] et utilise le précurseur 4-nitrophtalonitrile. Il est condensé de manière statistique avec 7 équivalents de phtalonitrile, en présence de deux équivalents d'acétate de zinc et 8 équivalents de DBU. La réaction est menée dans l'octanol à 130°C, et permet d'obtenir le mélange statistique des deux phtalocyanines de zinc, à savoir la phtalocyanine monosubstituée **37** et la ZnPc **4** (*schéma 35*).

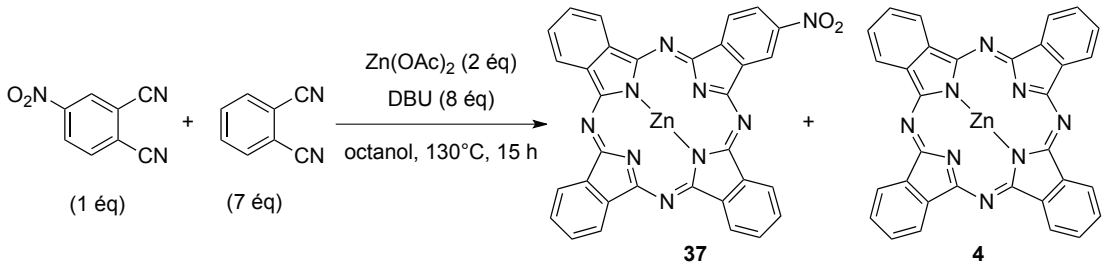


*Schéma 35 : Synthèse du mélange statistique de la phtalocyanine **37** et du co-produit de condensation **4***

Elles peuvent être séparées des produits de départ et des sous-produits de la réaction par lavages avec différents solvants, notamment le dichlorométhane et le méthanol, en utilisant un extracteur de type soxhlet. La séparation des phtalocyanines A_3B (**37**) et A_4 (**4**) n'est cependant pas possible compte tenu de la polarité trop proche des deux composés. Le mélange est donc directement engagé dans la prochaine étape qui consiste à réduire le groupement nitro en amine.

La réduction est réalisée selon un protocole de la littérature, qui utilise du sulfite de sodium comme agent réducteur. Le mélange est agité à 60°C dans le DMF pendant 5 heures, puis le produit est isolé par centrifugation dans l'eau suivie de lavages (*schéma 36*).

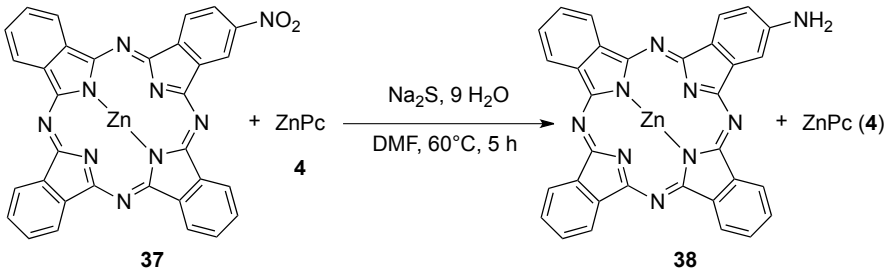


*Schéma 36 : Réduction du composé nitré **37** en amine **38***

Comme la différence de polarité entre les deux phtalocyanines est maintenant supérieure, la CCM du mélange statistique fait apparaître deux tâches de rapports frontaux bien distincts et suffisamment éloignés pour envisager une chromatographie sur colonne de silice. Cependant, les essais de purification montrent que la forte insolubilité des deux composés, et ceci pour plusieurs éluants testés, nuit à l'élution et ne permet pas de séparer les deux produits.

Cette méthode ne permettant pas d'introduire une grande versatilité de fonctions, une autre stratégie synthétique a été explorée.

III.1.1.2. Synthèse de précurseurs phtalonitriles fonctionnels

La substitution du nitro du 4-nitrophtalonitrile par un dérivé phénolique est quant à elle une méthode de choix pour préparer les précurseurs fonctionnels car elle est applicable à une large gamme de dérivés. Elle est réalisée dans le DMF en utilisant généralement deux équivalents de carbonate de potassium et le phénol adéquat. L'isolement du produit après le temps de réaction nécessaire (2-15 heures) est relativement simple. Il consiste dans la plupart des cas à additionner de l'eau au mélange réactionnel puis à filtrer, laver et sécher le précipité formé.

Il est ainsi possible d'obtenir un dicyanobenzène substitué en position 4 par un groupement *para*-aminophénoxy (**39**), *méta*-carboxyphénoxy (**40**) ou *para*-bromophénoxy (**41**), et ceci avec des rendements quasiment quantitatifs (*schéma 37*). Plusieurs de ces composés ont déjà été préparés dans la littérature.[203,215]

Cette méthode de synthèse permet également d'introduire deux fonctionnalités, une fonction acide et une fonction amine protégée, en utilisant la N-BOC-tyrosine. Le précurseur **42** est dans ce cas obtenu avec 68 % de rendement.

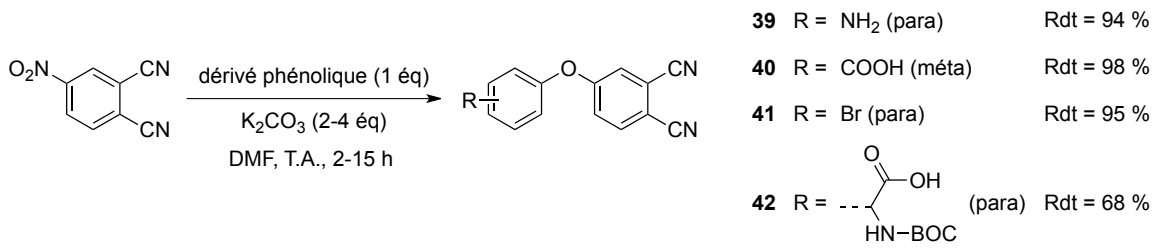


*Schéma 37 : Synthèse des précurseurs **39** à **42** par substitution du groupement nitro du 4-nitrophtalonitrile*

Dans le cas de l'acide benzoïque **40** et de l'aminoacide **42**, quatre équivalents de carbonate de potassium sont utilisés pour compenser l'acidité du précurseur phénolique, alors que deux équivalents seulement sont nécessaires pour les autres cas.

À partir du dérivé bromé **41**, un couplage pallado-catalysé de type Sonogashira avec l'acétylène protégé (TMS-CCH) permet ensuite d'introduire un groupement alcyne protégé. La réaction est réalisée à 60°C dans la triéthylamine en présence de tétrakistriphénylphosphine palladium (0), d'iodure de cuivre (I), et conduit au produit désiré **43** avec 77 % de rendement après purification (*schéma 38*).

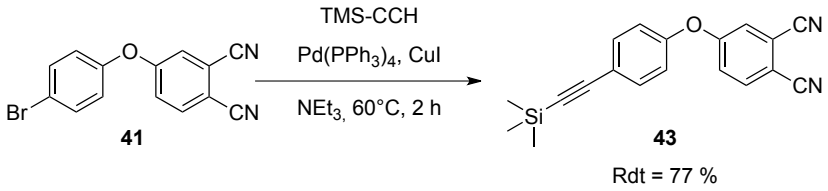


*Schéma 38 : Couplage de Sonogashira entre le dérivé bromé **44** et le triméthysilylacétylène*

Ces différents précurseurs ont tous été caractérisés par spectroscopie de RMN du proton et du carbone. Les signaux des protons portés par le cycle aromatique phtalique sont caractéristiques d'une substitution en position 4. Ils conduisent en effet à deux doublets, l'un de constante de couplage d'ordre 3 ($^3J \approx 2$-3 Hz, $H_{position\ 6}$) et le second d'ordre 4 ($^4J \approx 7$-8 Hz, $H_{position\ 3}$), ainsi qu'un doublet dédoublé caractérisé par les mêmes constantes de couplage ($H_{position\ 5}$) (*figure 88*).

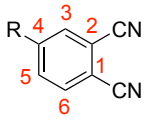


Figure 88 : Numérotation des positions d'un phtalonitrile

III.1.1.3. Synthèse des phtalocyanines monosubstituées

III.1.1.3.1. Préparation des mélanges statistiques

Certains de ces précurseurs ont été condensés avec le phtalonitrile dans les conditions habituelles de la méthode statistique, à savoir en présence d'acétate de zinc (II) et de DBU. Il est ainsi possible de former les composés présentant un motif amine, acide, alcyne ou aminoacide protégé, dont certains

sont déjà décrits dans la littérature (*schéma 39*). Notons qu'à partir d'ici, les phtalocyanines sont synthétisées dans le pentanol, ce solvant étant plus pratique que l'octanol. En effet, son point d'ébullition plus faible (135°C) autorise le traitement de la réaction par évaporation et sa viscosité plus faible permet de réaliser plus aisément les filtrations sur filtre fritté.

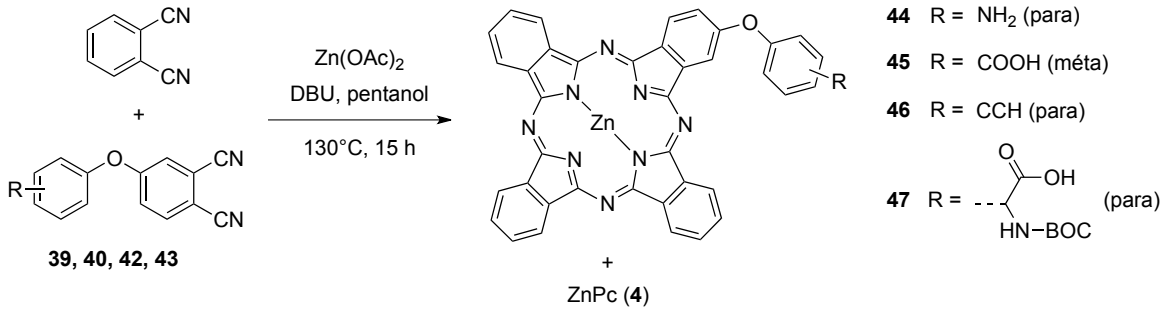


*Schéma 39 : Synthèse des mélanges statistiques contenant les phtalocyanines **44** à **47***

Dans tous les cas, la présence du produit est confirmée par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Les spectres de masse présentent également les amas isotopiques correspondant à la phtalocyanine A_4 et révèlent parfois la présence d'une faible quantité de phtalocyanine disubstituée A_2B_2.

Dans le cas de la phtalocyanine **46**, les analyses par spectrométrie de masse MALDI-TOF et par spectroscopie de RMN du proton mettent en évidence que le produit est directement obtenu sous sa forme déprotégée. Les conditions basiques semblent donc suffisantes pour éliminer le groupement triméthylsilyl, ce qui permet de réaliser les deux étapes en une fois.

Le ratio entre les deux phtalocyanines peut être déterminé par spectroscopie de RMN. À partir de ce ratio, il est possible de calculer ce que l'on nommera un « rendement indicatif ». Celui-ci permet d'estimer le succès de la réaction, mais il n'est bien entendu pas un véritable rendement de réaction, valeur pour laquelle il serait nécessaire d'isoler l'espèce A_3B seule.

À titre de démonstration, l'agrandissement de la zone spectrale des signaux aromatiques du mélange contenant l'alcyne **46**, est présenté *figure 89*.

Les intégrations des protons directement portés par les groupements aromatiques du macrocycle sont comparées à celles des protons du dérivé phénoxy. On constate sur le spectre que pour deux protons phénoxy (f et g), on compte 21 protons beta (b, b' et d) et 22 protons alpha (a, a', c et e). Comme seulement 7 protons beta et 8 protons alpha sont attribuables à l'espèce A_3B, les 13 et 14 restants appartiennent donc à l'espèce A_4, ce qui correspond à 1,7 ZnPc. Ainsi il est possible de déterminer que pour une phtalocyanine A_3B, il y a 1,7 phtalocyanines A_4, soit 36,3 % d'A_3B et 63,6 % d'A_4.

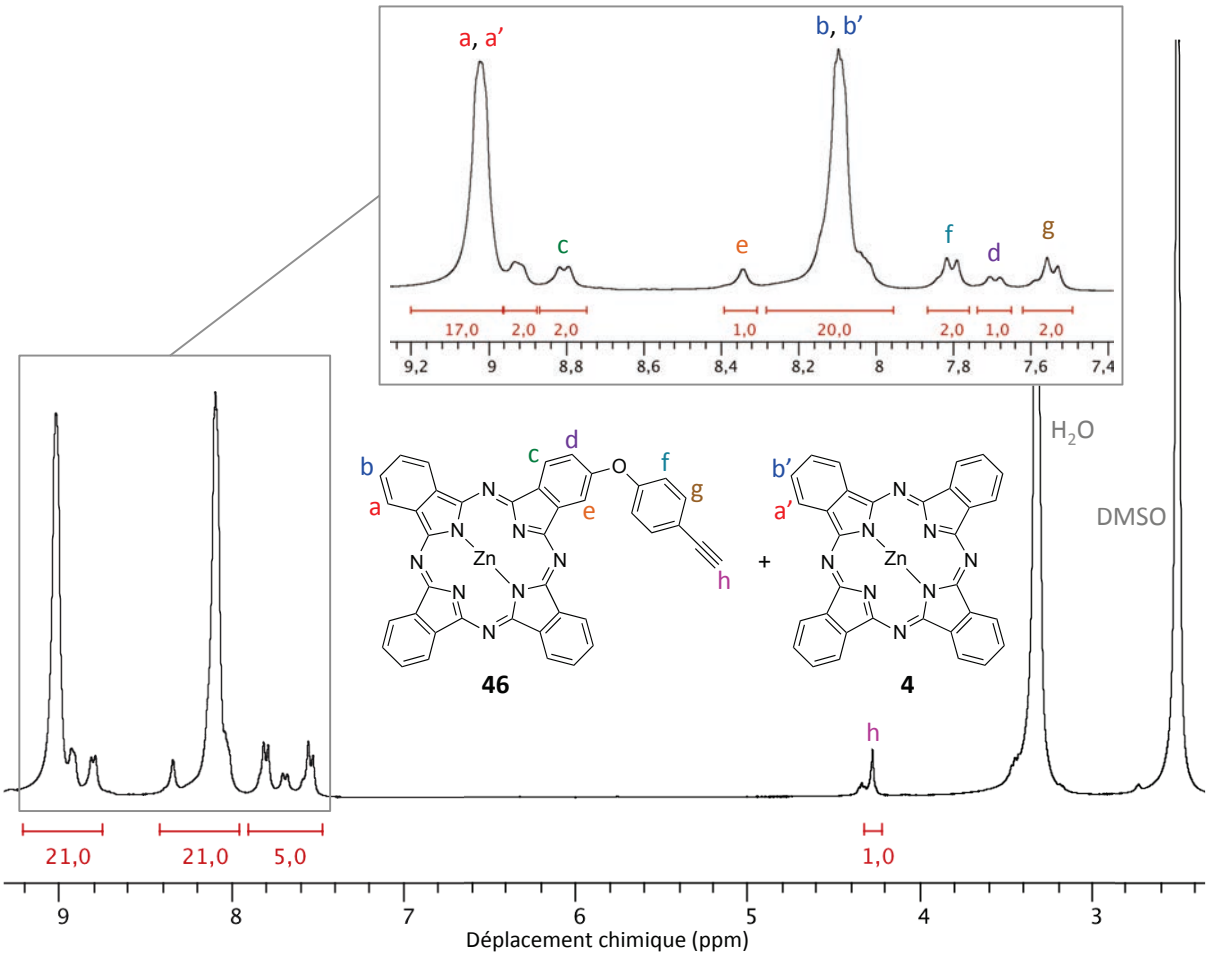


*Figure 89 : Spectre de RMN ^1H du mélange statistique contenant le composé **46** (DMSO-d_6, 300 MHz, 300 K) et agrandissement de la zone des aromatiques*

À partir de cette valeur et de la quantité de mélange A_3B + A_4 synthétisée, il est possible de retrouver la quantité d'A_3B contenue dans le mélange, ce qui permet finalement de déterminer le « rendement indicatif » (*équation 4*).

$$m(totale) = m(A_4) + m(A_3B)$$

Et $n(A_4) = R \times n(A_3B)$

Donc $$\frac{m(totale) - m(A_3B)}{M(A_4)} = R \times \frac{m(A_3B)}{M(A_3B)}$$

Soit $$\boldsymbol{m(A_3B) = \frac{m(totale) \times M(A_3B)}{M(A_4) \times R + M(A_3B)}}$$

Avec :

n : nombre de moles (mol)

m : masse (g)

M : masse molaire ($g.mol^{-1}$)

R : Ratio A_4/A_3B

Équation 4 : Calcul de la masse de phtalocyanine A_3B contenue dans le mélange à partir du ratio molaire

Soit dans le cas d'un mélange de 550 mg de ZnPc **46** (alcyne) et **4** :

$m(A_3B) = 550 \times 694 / (577 \times 1{,}7 + 694) = 227\ mg$

Le rendement indicatif est alors calculé comme le rapport de cette masse sur la masse théorique de phtalocyanine A_3B attendue. Les résultats obtenus en utilisant cette méthode pour chacun des mélanges statistiques sont regroupés dans le *tableau 19*.

	Mélange	Ratio A_3B / A_4 (RMN)	Rendement indicatif
44 + **4**	ZnPc-NH_2 + ZnPc	2,5	11,4%
45 + **4**	ZnPc-COOH + ZnPc	1,8	25,7 %
46 + **4**	ZnPc-CCH + ZnPc	1,7	20,4 %

Tableau 19 : Ratios A_3B/A_4 et rendements indicatifs pour les différents mélanges

On note que le rendement indicatif est plus faible dans le cas du composé **44** que dans les autres cas. Ceci s'explique par la présence d'une quantité importante de phtalocyanine A_4 dans le mélange. On en conclut donc que le précurseur aniline **39** possède une faible réactivité.

III.1.1.3.2. Séparation A_3B/A_4

La séparation chromatographique des phtalocyanines A_4 et A_3B a ensuite été explorée dans le cas des mélanges obtenus plus haut. Il est connu en chimie des phtalocyanines que cet objectif peut se révéler difficile dans le cas d'espèces faiblement ou non substituées. En effet, la faible solubilité des produits conduit généralement à un élargissement important des bandes d'élution. Ainsi, deux phtalocyanines qui semblent séparables d'après la chromatographie sur couche mince, peuvent se révéler impossibles à isoler séparement compte tenu de ce phénomène.

Comme le montre la CCM, les différences de polarité entre la ZnPc (A_4) et les espèces monsubstituées (A_3B) sont variables selon la nature du groupement introduit **(***schéma 40***)**. Dans le cas de du mélange contenant l'alcyne **46**, pour lequel une seule tache est visible, la réduction de la polarité de l'éluant ne permet pas de mettre en évidence la présence de l'espèce A_3B. La séparation des deux phtalocyanines est donc inconcevable. Dans le cas du composé aminé **44**, deux taches distinctes sont visibles. La séparation par chromatographie sur colonne de silice de ces deux espèces est possible, mais reste très fastidieuse et ne peut être réalisée que sur de petites quantités de produit.

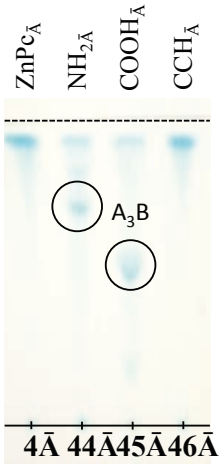


Schéma 40 : CCM des mélanges statistiques (éluant : THF/Cyclo 60:40 v/v)

Pour la phtalocyanine contenant une fonction acide carboxylique (**45**), la différence de polarité des deux espèces est plus grande. La séparation est alors plus aisée. De plus, un artifice consiste à solubiliser le mélange dans la pyridine puis à le déposer en tête de colonne. L'élution avec du DCM puis du THF pur permet alors d'éliminer l'espèce A_4. L'espèce A_3B quant à elle reste au point de dépôt car la fonction acide est déprotonée. Une fois la totalité de la ZnPc éliminée, ce qui nécessite une quantité importante de solvant, le composé d'intérêt est récupéré via l'emploi d'un mélange plus polaire (THF/MeOH). La phtalocyanine dissymétrique pure est ainsi obtenue avec 15 % de rendement. La méthode appliquée à la purification du dérivé tyrosine **47** permet d'isoler le produit avec 12 % de rendement.

Les phtalocyanines pures ont été analysées par spectrométrie de masse MALDI-TOF ainsi que par spectroscopie de RMN du proton pour vérifier la complète élimination de l'espèce A_4.

III.1.1.3.3. Synthèse par élargissement de cycle

Afin d'éviter les problèmes liés à la séparation de deux phtalocyanines obtenues par condensation statistique, nous avons également exploré la méthode sélective d'ouverture de cycle des subphtalocyanines. Cette voie de synthèse a été étudiée pour préparer la ZnPc-CCH **46**. La réaction d'élargissement de cycle de la SubPc **3** est donc réalisée en utilisant le précurseur dicyanobenzène **43**, en présence d'acétate de zinc et de DBU dans le DMSO (*schéma 41)*.

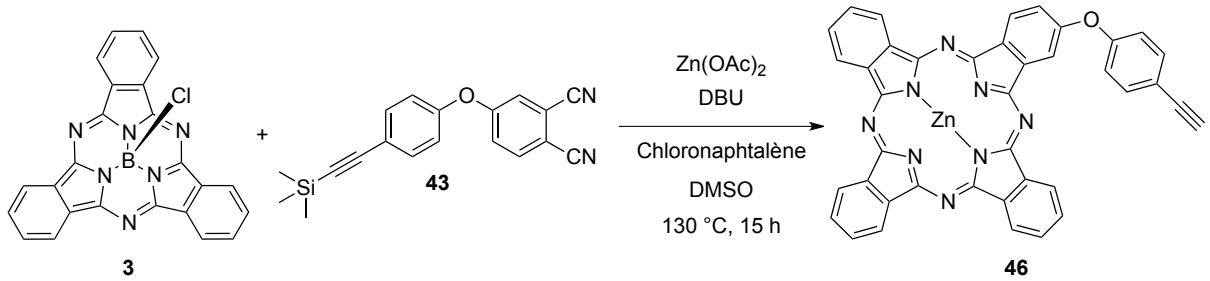


*Schéma 41 : Synthèse de la phtalocyanine **46** par élargissement de cycle de la subphtalocyanine **3***

La spectroscopie UV-visible est tout à fait adaptée pour suivre l'évolution de la réaction, car elle permet d'observer la disparition du signal d'absorption de la subphtalocyanine à 565 nm, tandis que le pic caractéristique d'une phtalocyanine apparaît à 667 nm (THF). L'analyse par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) confirme la formation du produit désiré. Cependant, le spectre de masse révèle également l'amas isotopique caractéristique de l'espèce symétrique (ZnPc). La sélectivité de la réaction est donc faible dans ce cas. L'utilisation de cette méthode pour obtenir les phtalocyanines monosubstituées désirées n'a donc pas été explorée d'avantage.

D'autre part, il a été observé dans la partie dédiée aux subphtalocyanines, que l'espèce perfluorée **5** est beaucoup plus réactive et plus sélective en réaction d'élargissement de cycle. Elle peut donc potentiellement être adaptée pour préparer les phtalocyanines d'intérêt par condensation avec des iminosisoindolines fonctionnelles. Cela requiert de synthétiser les iminoisoindolines correspondantes à partir des phtalonitriles fonctionnels précédents (**39**, **40**, **42** et **43**). Malheureusement, faute de temps, cette approche prometteuse n'a pas pu être étudiée.

III.1.1.4. Synthèse de phtalocyanines A_3B organosolubles

Afin d'augmenter l'organosolubilité des systèmes et ainsi faciliter la purification des mélanges statistiques ainsi que les purifications lors des étapes suivantes de fonctionnalisation, nous avons également exploré la synthèse de phtalocyanines présentant des fragments organosolubilisants.
Ces fragments sont des chaînes grasses (thiooctyles), qui doivent préalablement être introduites sur le précurseur phtalonitrile. La condensation de deux équivalents d'octanethiol sur le 4,5-dichlorophtalonitrile en présence de carbonate de potassium permet d'obtenir le produit disubstitué **48** avec 84 % de rendement (*schéma 42*).[184b]

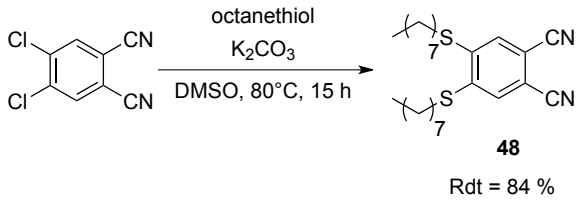


*Schéma 42 : Synthèse du précurseur **48**, disubsitué par des groupements thiooctyles en position 4,5*

L'introduction des substituants en position 3,6 du phtalonitrile a également été envisagée. Le chemin réactionnel procède en deux étapes à partir de la 2,3-dicyanohydroquinone (*schéma 43*).

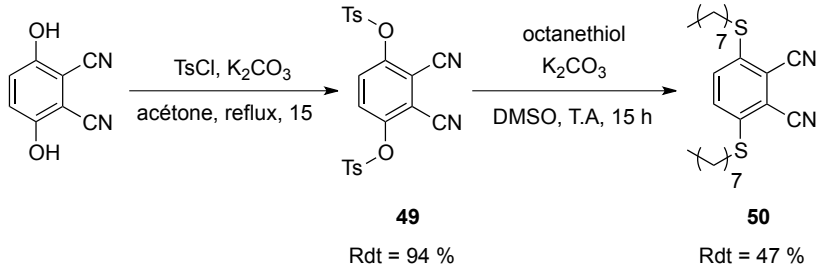


*Schéma 43 : Synthèse du précurseur **50**, disubsitué par des groupements thiooctyles en position 3,6*

Dans un premier temps, les groupements hydroxyles sont tosylés par action du chlorure de tosyle dans l'acétone. Puis la condensation avec l'octanethiol permet de substituer les groupes partants.[216] Le produit est obtenu avec un rendement global sur les deux étapes de 44 %.

Ces deux précurseurs ont ensuite été utilisés afin de synthétiser des phtalocyanines de type A_3B présentant la fonction amine. Leur condensation en excès avec l'aniline **39** permet de synthétiser les ZnPc dissymétriques correspondantes (*schéma 44*).

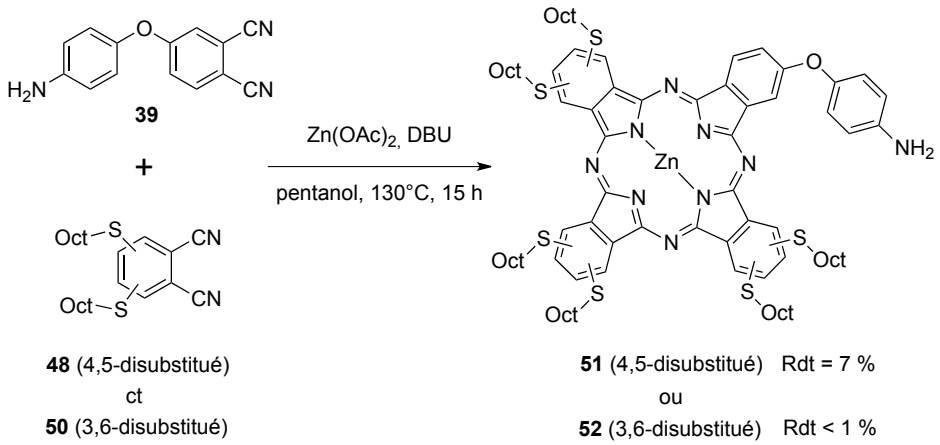


*Schéma 44 : Synthèse des phtalocyanines organosolubles **51** et **52***

Même si elles nécessitent toujours d'importants volumes de solvants, les purifications par chromatographie sur colonne de silice des composés **51** et **52** sont facilitées, comparées à celles des espèces monosubstituées précédentes (**44**-**47**). Lorsque les chaînes alkyles se situent en position alpha, la formation de la phtalocyanine A_3B (**52**) est cependant défavorisée au profit de l'espèce A_2B_2, comme le montrent les analyses CCM et spectrométriques (MALDI-TOF). Ce phénomène est principalement dû à l'encombrement stérique généré par la présence des substituants en position 3,6 du précurseur. Le composé **52** est donc obtenu avec un très faible rendement (<1%). Même si ce phénomène n'a lieu que lorsque les substituants se situent en position alpha, le rendement de l'espèce β-substituées **51** est également faible (7 %). Mais encore une fois, il est supposé que ce résultat provient de la faible réactivité du précurseur fonctionnel utilisé (**39**).

Les spectres d'absorption des espèces A_3B et A_4 dans le cas des phtalocyanines β-substituées se distinguent par la position de leur bande Q. L'espèce dissymétrique, heptasubstituée, conduit en effet à un maximum d'absorption à 703 nm tandis que le sous-produit symétrique, octasubstitué, absorbe majoritairement à 708 nm (*figure 90*).

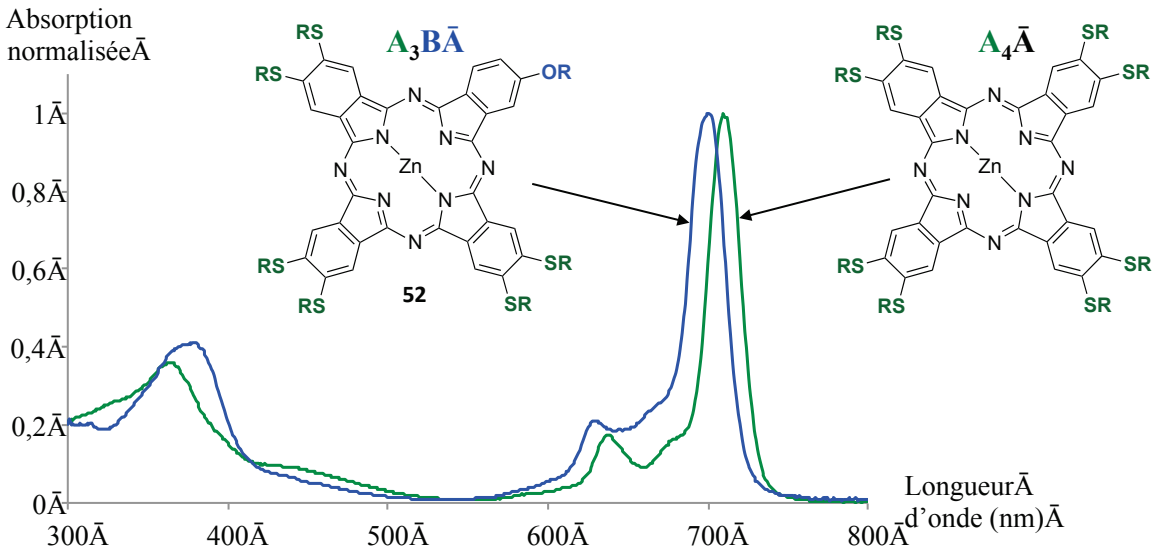


*Figure 90 : Superposition des spectres d'absorption du composé **52** et du sous-produit de réaction A_4 (β-octathiooctylptalocyanine de zinc)*

L'utilisation du précurseur organosolubilisant substitué en position 4,5 permet donc d'isoler plus facilement l'espèce dissymétrique d'intérêt. La fonctionnalisation en position 3,6 s'est quant à elle montrée inadaptée dans ce cas.

III.1.2. Synthèse de phtalocyanines tétrafonctionnelles

Nous avons également envisagé d'autres stratégies de synthèse qui permettent d'introduire plusieurs fonctions d'intérêt sur une phtalocyanine. L'objectif consiste à préparer des phtalocyanines tétrafonctionnelles qui seront notamment adaptées pour ajouter quatre entités chélatantes.

III.1.2.1. Synthèse de la ZnTAPc

En premier lieu, nous avons exploré la possibilité d'introduire quatre fonctions amine directement sur le cœur phtalocyanine, en utilisant le 4-nitrophtalonitrile. La tétraaminophtalocyanine de zinc (II) (ZnTAPc **54**) a déjà été décrite dans la littérature à plusieurs reprises.[214b] La cyclotétramérisation est réalisée dans les conditions réactionnelles habituelles et conduit au composé tétranitré **53** avec 87 % de rendement après purification par lavages (soxhlet). Les groupements nitro sont ensuite réduits en amine par l'action du sulfite de sodium nonahydraté, ce qui conduit à la ZnTAPc **54** avec 65 % de rendement (*schéma 45)*.

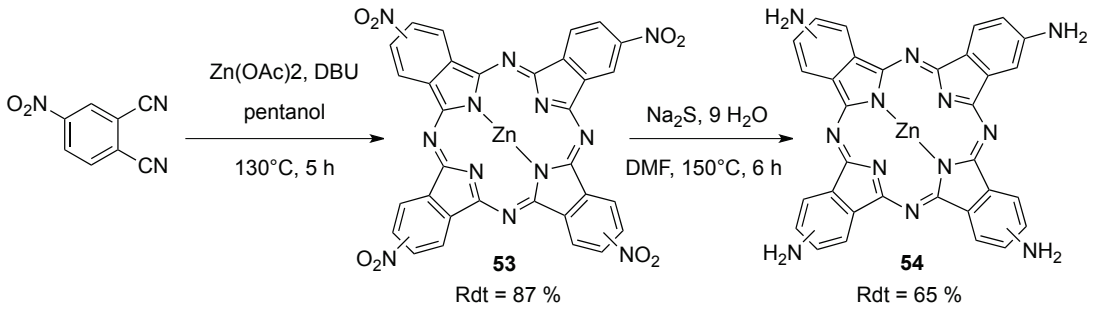


*Schéma 45 : Synthèse de la ZnTAPc **64***

Le spectre de RMN du proton de la phtalocyanine **54**, comme beaucoup de spectres de phtalocyanines tétrasubstituées, présente des signaux peu intenses et très élargis (*figure 91*).

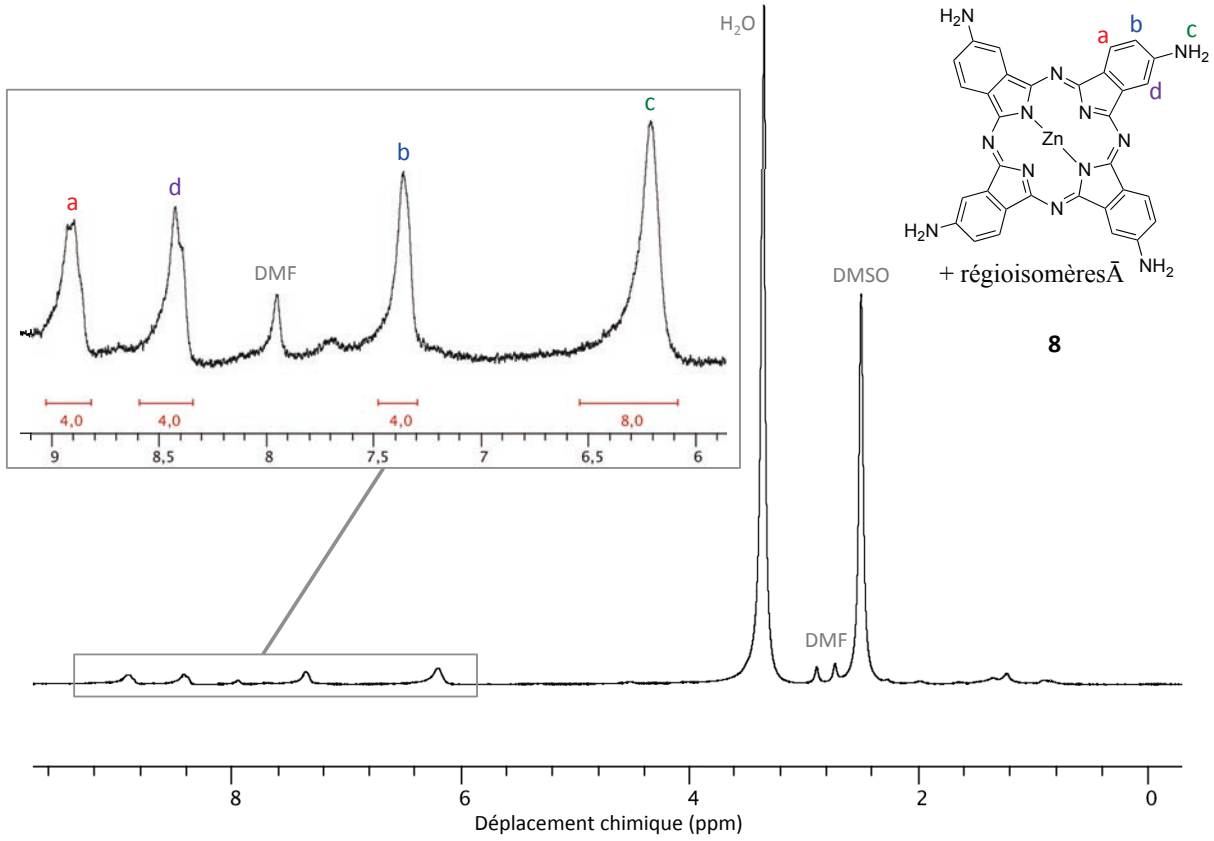


*Figure 91 : Spectre de RMN ^{1}H de la ZnTAPc **64** et zoom sur la zone des aromatiques*

Ce phénomène est notamment lié à deux facteurs :

* Pour la plupart des phtalocyanines présentant une solubilité faible ou moyenne dans le solvant deuteré, l'agrégation présente en solution conduit à un élargissement des signaux de RMN. De plus cette faible solubilité ne permet pas d'atteindre la gamme de concentration adaptée pour la RMN, d'où une intensité faible des signaux.

* Comme le précurseur phtalonitrile est monosubstitué, la phtalocyanine obtenue est en réalité un mélange de quatre régioisomères (C_{4h}, D_{2h}, C_{2v} et C_s). Ils conduisent chacun à leur propre spectre de RMN. Le spectre présenté *figure 91* correspond donc à la superposition de ces quatre spectres, ce qui explique la présence de nombreux signaux. Il en résulte des signaux larges et mal définis.

Néanmoins, ce spectre présente les trois signaux correspondant au trois types de protons aromatiques (a, b et d) ainsi que le signal des protons portés par les atomes d'azote (c).

Cet intermédiaire de synthèse peut ensuite être acylé par l'action d'un excès de bromure de bromoacétyle (8 équivalents) ou par ouverture de l'anhydride succinique (8 équivalents) (*schéma 46)*. Il est ainsi possible d'obtenir avec 87 % de rendement une phtalocyanine tétrabromée (**55**) et avec 65 % de rendement une phtalocyanine contenant quatre groupements acides carboxyliques (**56**).

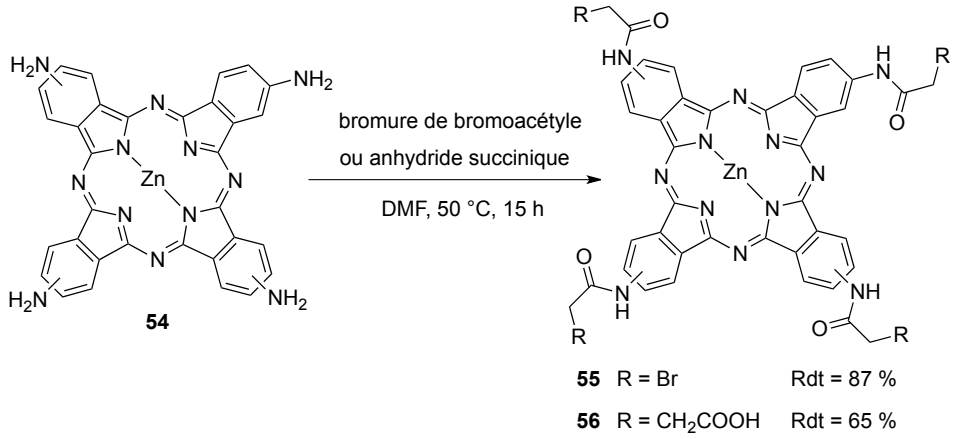


*Schéma 46 : Acylations de la ZnTAPc **54***

Les phtalocyanines formées sont purifiées par précipitation et lavages (eau, méthanol, acétone). Elles ont pu être analysées par spectrométrie de masse MALDI-TOF et par spectroscopie de RMN. Ces deux techniques permettent de confirmer l'absence de produit de départ résiduel et la pureté des produits.

Cependant, leur faible solubilité constitue un frein pour une fonctionnalisation ultérieure par alkylation ou couplage peptidique, comme l'ont montré certains tests préliminaires (non présentés).

C'est pourquoi des phtalocyanines tétrafonctionnelles plus solubles ont été préparées à partir d'un 4-phénoxyphtalonitrile précédemment synthétisé.

III.1.2.1. Synthèses d'une phtalocyanine tétrasubstituée par des groupements p-aminophénoxy

Une voie de synthèse a été imaginée en vue d'introduire quatre fonctions *para*-aminophénoxy. Dans un premier temps, l'utilisation directe du synthon **39** dans la réaction de cyclisation et selon le protocole général a été étudiée (*schéma 47*). Cependant, la réaction n'a pas lieu en raison de la faible solubilité du synthon dans le mélange réactionnel, même à 130°C.

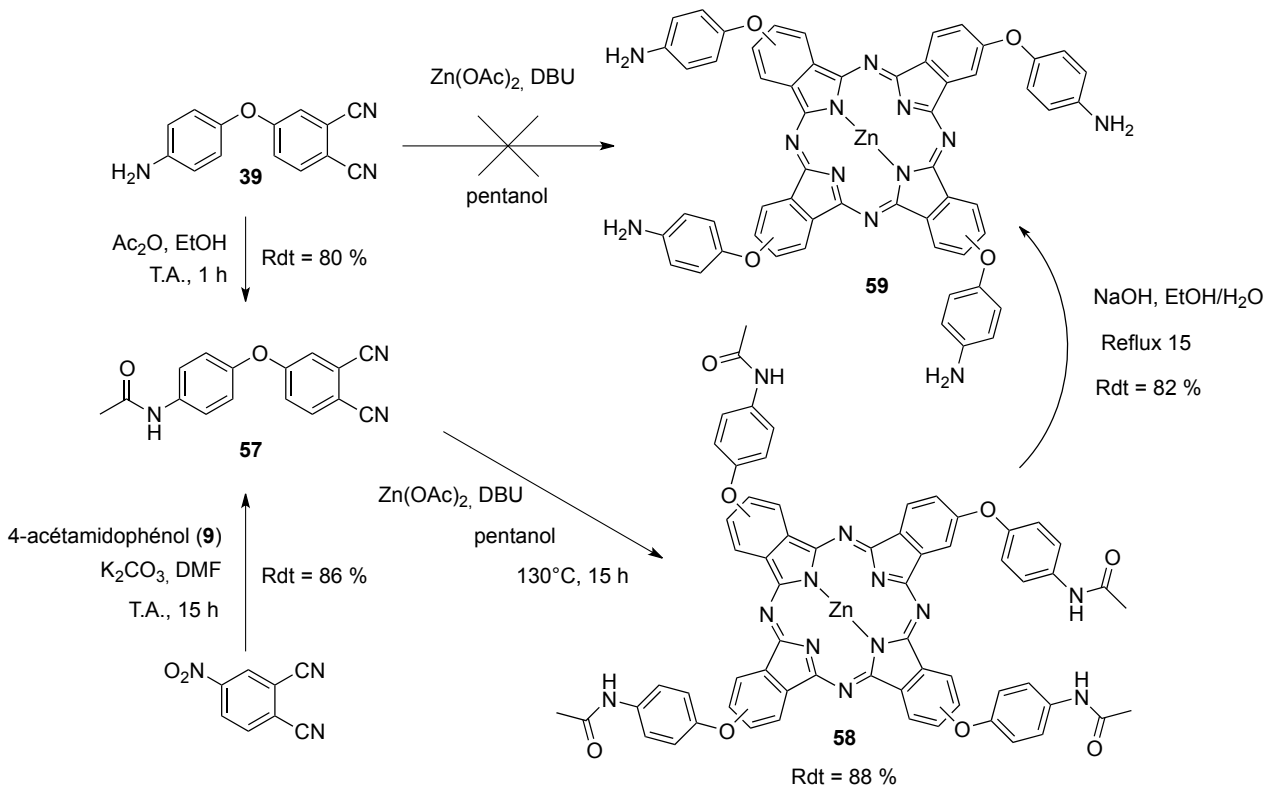


*Schéma 47 : Essais de synthèse directe de la phtalocyanine **59** et chemin de synthèse alternatif par protection du précurseur*

Une voie de synthèse alternative, utilisant un précurseur plus adapté, a donc été mise en œuvre pour obtenir le composé **59**. Elle consiste à protéger la fonction amine du 4-(4-aminophénoxy)phtalonitrile **39** sous forme d'acétamide. Le composé **57** a été obtenu par condensation de l'amine **39** avec l'anhydride acétique, ou par l'action nucléophile du *para*-acétamidophénol **9** sur le 4-nitrodicyanobenzène. Notons que sa structure cristallographique a pu être obtenue par diffraction des rayons X (*figure 92*). Le précurseur étant cette fois soluble dans le mélange réactionnel, il permet de réaliser la cyclisation avec 88 % de rendement. Les quatre fonctions aniline peuvent ensuite être libérées par déprotection dans un mélange éthanol/soude concentrée et permet d'obtenir la ZnPc tétrasubstituée **59**.

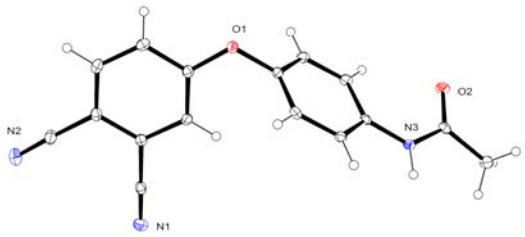


*Figure 92 : Structure cristallographique du composé **57***

III.1.2.2. Phtalocyanine dissymétrique polyfonctionnelle

Pour la mise au point d'agents bimodaux de type IO/TEP, il est nécessaire de synthétiser une phtalocyanine qui possède deux types de fonctions. Le premier sera adapté pour introduire les agents chélatants (fonction amine), et le deuxième pour la biovectorisation (fonction isothiocyanate). Nous avons donc exploré la synthèse d'une phtalocyanine tétrasubstituée dissymétrique. La voie de synthèse utilisée est similaire à celle permettant d'obtenir le composé **59**. Mais dans le cas présent, l'un des motifs *para*-aminophénoxy est remplacé par un groupement *para*-nitrophénoxy. Suite à l'introduction des agents chélatants via les fonctions amine, le groupement nitro pourra être réduit en amine puis converti en isothiocyanate. La première étape consiste donc à synthétiser le dicyanobenzène nitré **60**. La substitution nucléophile est réalisée de manière habituelle et permet d'obtenir le produit avec 81 % de rendement (*schéma 48*).

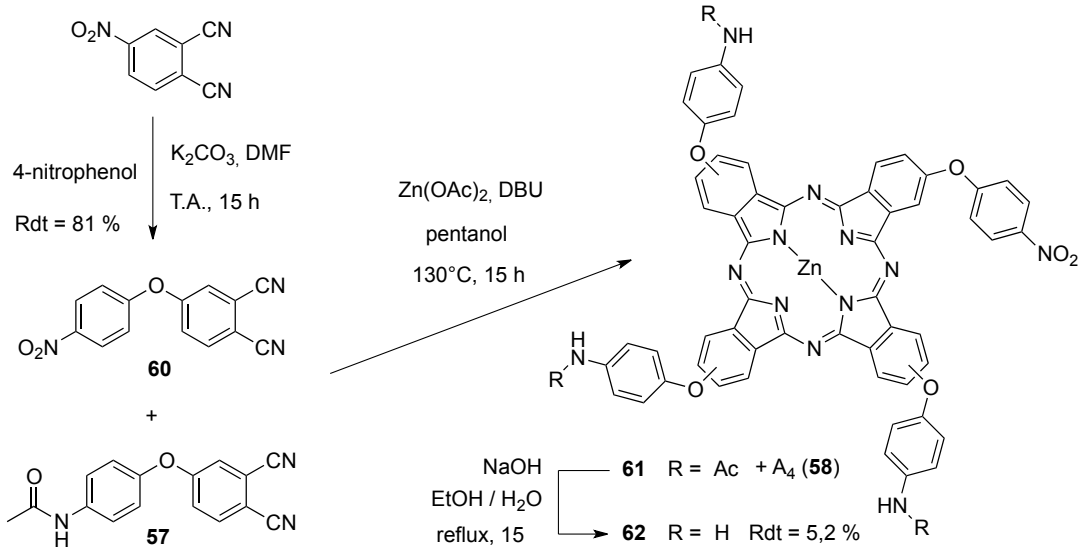


*Schéma 48 : Synthèse de la phtalocyanine tétrasubstituée dissymétrique **62***

La condensation statistique des deux précurseurs est ensuite réalisée, puis la déprotection est mise en œuvre sur le mélange des deux phtalocyanines, selon les mêmes modes opératoires que précédemment. On obtient alors un mélange statistique de deux phtalocyanines : l'A_3B-ZnPc **62**, comportant trois fonctions aniline et l'A_4-ZnPc **59**, qui en possède quatre. Ces deux composés

peuvent alors être séparés par chromatographie sur colonne de silice (éluant : gradient AcOEt/MeOH), et la phtalocyanine **62** est obtenue avec 5,2 % de rendement globale sur les deux dernières étapes.

III.2. Synthèse de sondes composées d'une phtalocyanine et d'un dérivé DOTA

Comme mentionné plus haut, l'un de nos objectifs consiste à associer une phtalocyanine à un agent chélatant analogue au DOTA. Pour cela, plusieurs chemins de synthèse ont été étudiés à partir de synthons réactionnels synthétisés précédemment.

Pour rappel, plusieurs exemples de la littérature décrivant l'association d'une phtalocyanine à un agent chélatant de type DOTA ont été récemment reportés.[162-163] Notons que ces différents travaux ont été publiés alors que nous étions en train de synthétiser les systèmes ditopiques présentés ci-dessous.

Notons que la phtalocyanine **47** (ZnPc-N-BOC-Tyrosine) précédemment synthétisée est tout à fait adaptée pour introduire une entité chélatante, tout en conservant une voie d'entrée pour la bioconjugaison. Cependant, nous avons utilisé dans un premier temps des précurseurs plus simples, ne possédant que la fonction apte à l'introduction du motif chélatant (NH_2, COOH). Ceci va permettre de vérifier la faisabilité des synthèses, et d'obtenir un aperçu des propriétés de phtalocyanines fonctionnalisées par un DOTA.

III.2.1. À partir d'une phtalocyanine monofonctionnelle organosoluble

Nous avons tout d'abord exploré la possibilité d'introduire un dérivé DOTA à partir de la phtalocyanine monofonctionnelle organosoluble **51** précédemment synthétisée. La voie de synthèse se déroule en deux étapes successives (*schéma 49*). La première consiste à acyle l'aniline **51** par l'action du chlorure de chloroacétyle dans le DCM en présence de triéthylamine. Le dérivé chloré **63** est obtenu quantitativement à l'issue de 16 heures de réaction Celui-ci est ensuite condensé sur le DO3AtBu, et le produit est purifié par traitement chromatographique puis directement déprotégé en milieu acide (TFA). Le produit **64** est finalement isolé par précipitation et lavages.

La phtalocyanine obtenue (**64**) possède un fort caractère amphiphile, ce qui induit de manière simultanée une hydrophobicité et une organophobicité. Elle est donc faiblement soluble dans le DMF et le DMSO, et insoluble aussi bien dans le DCM ou le THF que dans le méthanol ou l'eau.

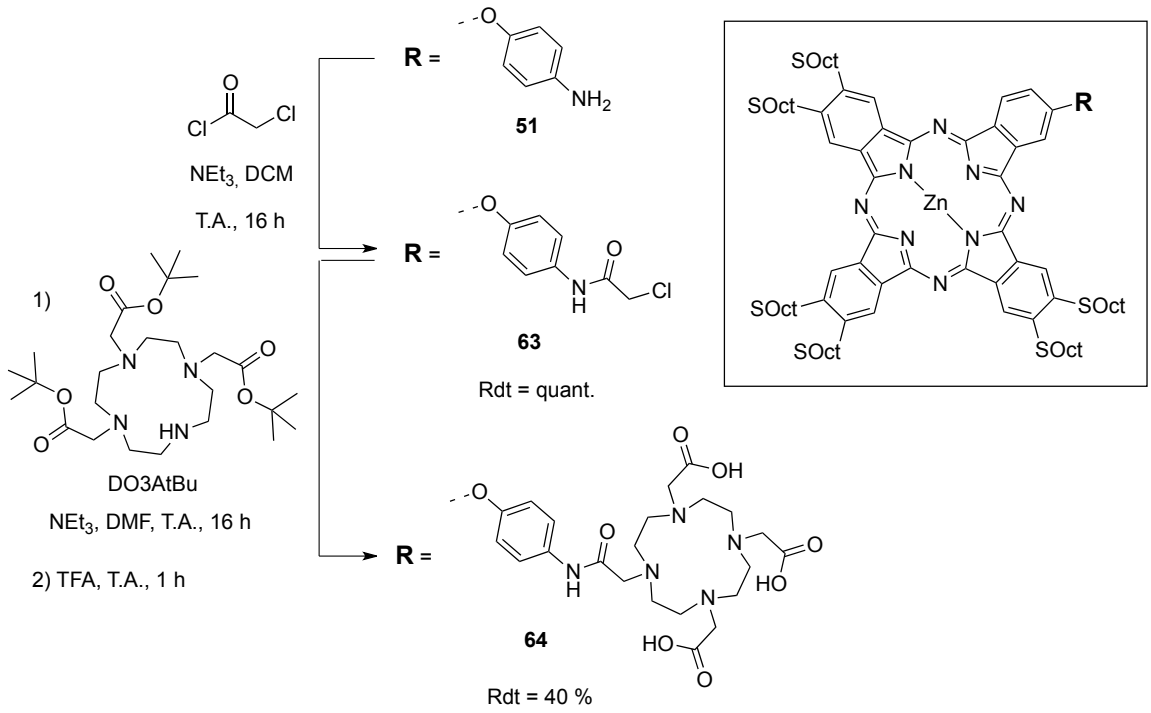


*Schéma 49 : Synthèse du composé **64***

Bien que l'amphiphilie soit une propriété parfois appréciable pour un composé destiné à une utilisation *in vivo*, notamment afin de faciliter le passage des membranes cellulaires, l'approche utilisée ici conduit à un composé possédant une trop faible solubilité. Son utilisation pour des applications en milieu biologique est donc difficilement envisageable. Même si la présence des chaînes grasses facilite la synthèse du précurseur, l'introduction du dérivé DOTA a donc été examinée au départ d'une phtalocyanine d'organosolubilité plus faible.

III.2.2. À partir d'une phtalocyanine monofonctionnelle simple

Nous avons choisi d'étudier la possibilité d'introduire l'agent chélatant à partir de la phtalocyanine monosubstituée **45**. La méthode consiste à réaliser un couplage peptidique entre ce précurseur et le DO3AtBu-éthylènediamine, qui possède trois fonctions acide carboxylique protégées et une fonction amine libre (*schéma 50*). Le produit de couplage est purifié puis directement traité en milieu acide pour conduire au composé **65**.

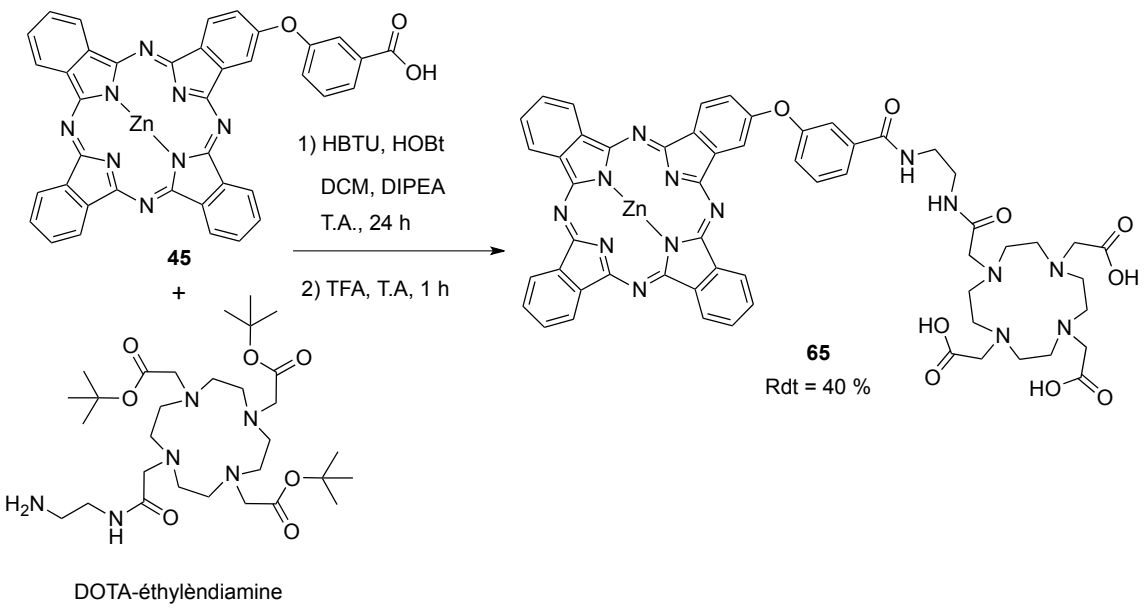


Schéma 50 : Synthèse du système ditopique ZnPc-DOTA ***65***

Cette phtalocyanine a été caractérisée par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) ainsi que par spectroscopie de RMN du proton. Comme à chaque fois que la molécule présente un motif DOTA, il est préférable de réaliser la RMN à haute température afin d'améliorer la résolution des pics correspondant aux protons aliphatiques. D'autre part, la présence de l'agent chélatant améliore la solubilité de la phtalocyanine, ce qui permet d'observer des signaux aromatiques bien résolus (*figure 93*).

De part sa symétrie d'ordre 2, le fragment DOTA présente 5 types de protons, dont trois sont attribuables aux fonctions acétate (n, q et p), et deux aux méthylènes du cyclame (o et r), les protons des méthylènes situés en alpha de l'azote portant l'acétamide (r) étant différenciés. Concernant le fragment phtalocyanine, les protons des positions alpha et beta des motifs isoindoliques non substitués A (a et b) conduisent à deux multiplets, tandis que tous les protons du motif substitué B (c, d et e) et du groupements phénoxy (f, g, h et i) sont différenciés. Les protons de l'espaceur éthylène (k et l) et les deux protons d'amide (j et m) conduisent à quatre signaux dont l'attribution exacte n'est pas connue. L'acquisition du spectre RMN deux dimensions (COESY) permettrait probablement d'associer chaque amide avec chaque méthylène, en observant le couplage d'ordre 3 procédant à travers les liaisons H-N-C-H.

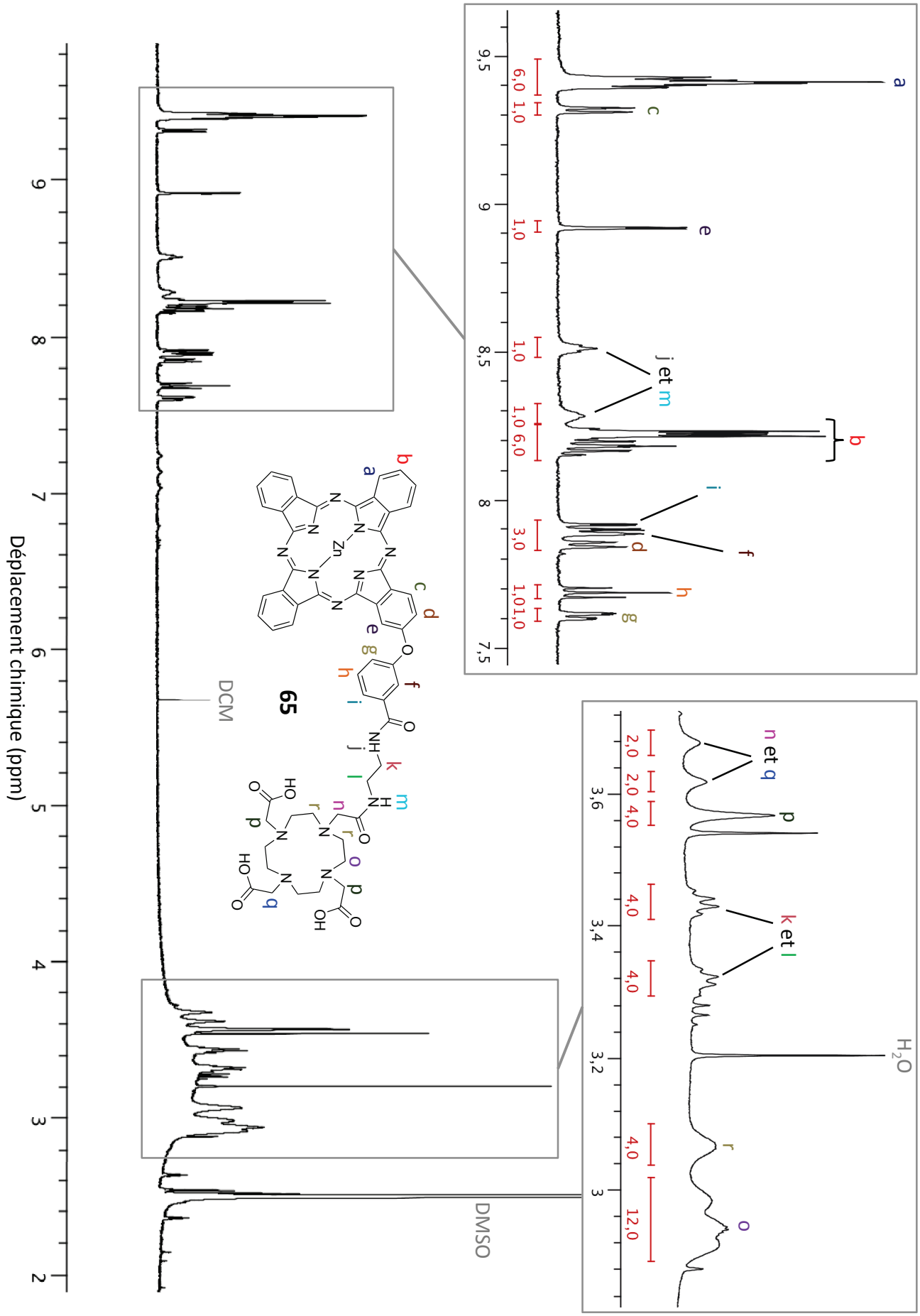


*Figure 93 : Spectre de RMN ^{1}H du composé **65** (DMSO-d_6, 500 MHz, 390 K)*

En comparaison du système ZnPc-DOTA (**64**) contenant les chaînes thiooctyles, ce composé (**65**) possède une bien meilleure solubilité. Il est en effet soluble dans les solvants polaires tels que le DMSO, le DMF ou le méthanol. Cependant, il n'est soluble dans l'eau que si l'on ajoute au moins 10 % de DMSO (DMSO/H_2O 10:90 v/v). Et dans ce système de solvants, son rendement quantique de fluorescence est faible (< 1%), ce qui peut être attribué au phénomène d'agrégation. En considération de ce résultat, nous nous sommes alors tournés vers l'exploration de méthodes pour améliorer l'hydrosolubilité des systèmes combinant phtalocyanine et dérivé DOTA.

III.3. Vers l'amélioration de l'hydrosolubilité

III.3.1. Introduction de quatre agents chélatants de type DOTA

Si l'introduction d'un dérivé DOTA sur la phtalocyanine permet d'augmenter le caractère hydrophile de la sonde, il est envisagé que l'incorporation de plusieurs agents chélatants permettra d'obtenir des composés hydrosolubles. Notons qu'il existe dans la littérature des exemples combinant une porphyrazine avec plusieurs entités de type DOTA.[167] Cependant, aucun système similaire n'a été préparé en série phtalocyanine, fluorophore qui possède des propriétés plus adéquates pour l'imagerie optique que l'analogue d'aromaticité plus réduite.

À partir de l'un des synthons tétrafonctionnels précédemment préparé (**59**), nous avons exploré la possibilité d'introduire quatre unités tétraazamacrocycliques. Pour cela, deux modes d'association ont été envisagés, mettant en œuvre soit une réaction de substitution nucléophile, soit l'ouverture d'un anhydride d'acide. Les réactifs macrocycliques correspondants sont donc le DOTAGA-anhydride (apte à réagir sur les amines) et le DO3AtBu (dans le cas où la phtalocyanine possède des atomes d'halogènes (*schéma 51*).

Lorsque le composé **59** est condensé avec un excès de DOTAGA-anhydride, le suivi CCM met en évidence la consommation du produit de départ et la formation de produits plus polaires. Le solide obtenu après précipitation (DCM) et lavages (DCM, MeOH) est uniquement soluble dans l'eau, ce qui tend à confirmer le succès de la réaction. Cependant, il a été impossible de le caractériser, et de déterminer si la réaction a eu lieu sur les quatre amines. En effet, les analyses par spectrométrie de masse (MALDI-TOF, ESI basse et haute résolution) se sont révélées non concluantes, car aucun amas isotopique correspondant à l'un des produits potentiellement formés n'a pu être détecté. Le chromatogramme HPLC conduit quant à lui à un signal large. Même si le mode de détection (UV) permet de mettre en évidence une absorption à la longueur d'onde caractéristique (670 nm), il est impossible de déterminer le nombre et la pureté des produits présents. D'autre part, le spectre de

RMN du proton (D_2O) met également en évidence la présence des protons de la phtalocyanine et du DOTAGA, mais étant donné qu'aucune purification n'a été effectuée, il est impossible à ce stade de savoir si ces deux entités sont covalentement liées, et quel est le nombre de DOTA par ZnPc.

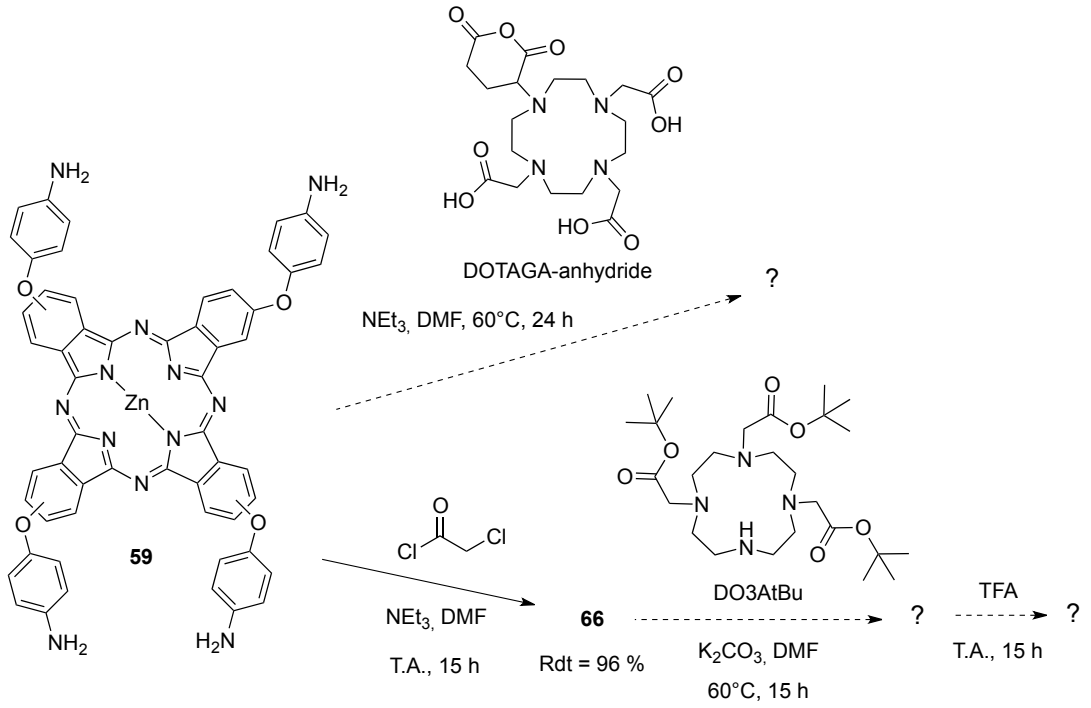


*Schéma 51 : Essais d'introduction de quatre agents chélatants à partir de la phtalocyanine **59***

Le constat est réalisé lorsque la deuxième voie de synthèse est mise en œuvre. La première étape de condensation avec le chlorure de chloroacétyle est réalisée avec 96 % de rendement et le produit **66** a pu être identifié et caractérisé (RMN ^{1}H, MALDI-TOF). Il est ensuite mis en présence de DO3AtBu dans le DMF et en présence de carbonate de potassium. Après 24 heures de réaction, un composé parfaitement organosoluble est obtenu. Sa solubilité est en effet bien supérieure à celle des intermédiaires réactionnels **59** ou **66**, notamment dans le DCM. Lorsqu'il est traité en milieu acide (TFA), il conduit à un produit ayant alors complètement perdu son organosolubilité, car il est cette fois complètement soluble dans l'eau. Ces constats qualitatifs tendent vers la même conclusion que pour le cas précédent. En effet, les variations de solubilité mettent en évidence le bon déroulement de la synthèse. Mais de la même manière, les produits, l'intermédiaire protégé et l'espèce déprotégée, n'ont pas pu être identifiés et caractérisés. Les spectres de RMN du proton mettent en évidence la présence des deux entités, mais ne permettent pas de déterminer la nature du/des produits obtenus et sa/leur pureté. Des essais de purification de l'intermédiaire protégé sur colonne chromatographique en phase normale ont été effectués et se sont révélés infructueux. Dans le cas du produit déprotégé, les analyses HPLC conduisent aux mêmes résultats que dans le cas de la condensation avec le DOTAGA-anhydride. Egalement, ces deux composés ne sont à première vue pas détectables en spectrométrie de masse.

Ainsi, l'hydrosolubilité des produits obtenus tend à confirmer le bon déroulement des étapes réactionnelles, mais il n'a malheureusement pas été possible ni de le prouver, ni d'isoler et caractériser les produits.

III.3.2. Introduction de groupements hydrosolubilisants

Même si l'ajout de plusieurs entités de type DOTA semble conduire à des composés très hydrosolubles (bien qu'ils n'aient pas pu être identifiés) les composés obtenus dans le cas de l'introduction d'un seul dérivé de DOTA ou d'une fonction de greffage souffrent en revanche d'une faible hydrosolubilité. Dans ce contexte, nous avons cherché à étudier l'introduction de groupements hydrosolubilisants. Les phtalocyanines synthétisées sont alors des espèces symétriques (A_4), car plus simples à préparer dans un premier temps. L'étude de ces composés modèles permettra par la suite de déterminer l'efficacité et les effets des groupements introduits sur l'hydrosolubilisation et le phénomène d'agrégation en milieu aqueux. Si l'approche est concluante, elle pourra être transposée à la préparation de phtalocyanines fonctionnelles dissymétriques.

III.3.2.1. Synthèse

Nous avons exploré la possibilité d'hydrosolubiliser les phtalocyanines par introduction de huit fonctions acide carboxylique ou huit fonctions pyridine. Pour cela, nous avons synthétisé les deux précurseurs correspondants par condensation du 3-carboxyphénol ou de la 4-hydroxypyridine sur le 4,5-dichloro-1,2-dicyanobenzène. Les dérivés diacide **67** et bis pyridine **68** sont respectivement obtenus avec 59 et 93 % de rendement (*schéma 52*).

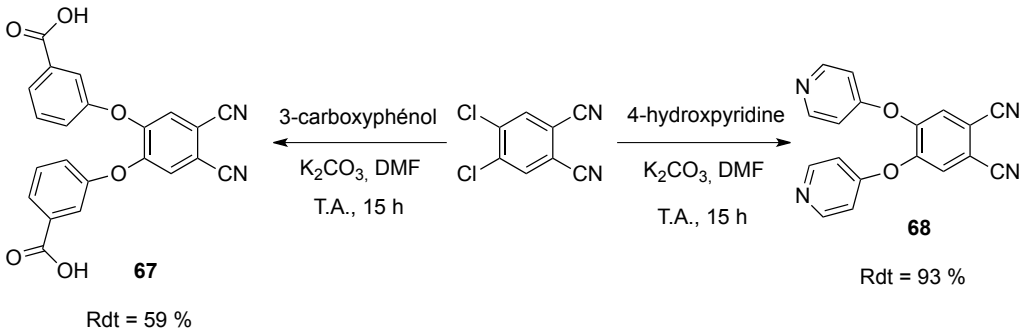


Schéma 52 : Condensation du 4,5-dichlophtalonitrile avec le 3-carboxyphénol ou la 4-hydroxypyridine

Les réactions de cyclisation sont ensuite mises en œuvre (*schéma 53)*. Le composé acide **69** est simplement isolé par précipitation et purifié par des lavages tandis que l'espèce **70** est soumise à une colonne chromatographique en phase inverse (flash). Notons que des composés proches de ces deux

phtalocyanines, qui diffèrent notamment par la position des substituants, ont déjà été décrits dans la littérature.[134b,137k]

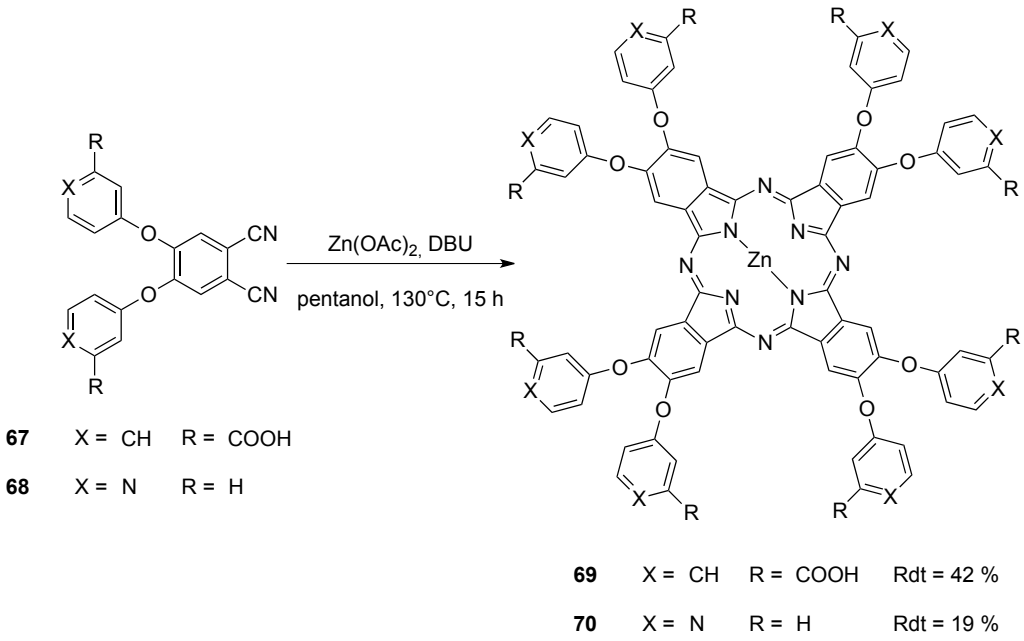


*Schéma 53 : Synthèse des phtalocyanines octasubstituées **69** et **70***

III.3.2.2. Hydrosolubilité et analyses spectroscopiques

Ces deux phtalocyanines hydrophiles ont ensuite été étudiées et comparées en termes de solubilité et de propriétés d'absorption. L'espèce octapyridyle (**70**) est hautement soluble dans l'eau, dans l'acide chlorhydrique 0,1 M ou dans le PBS (jusqu'à 10^{-3} M). Quant à la version octacarboxylique **69**, elle n'est soluble dans l'eau que qu'à pH basique (NaOH 0,1 M).

En revanche, les mesures UV-visibles mettent en évidence le phénomène d'agrégation. Les spectres d'absorption normalisés du composé **69** dans le DMF et dans la soude 0,1 M ainsi que celui du composé **70** dans le méthanol, le DMF, le DMSO et l'acide chlorhydrique 0,1 M sont superposés sur la *figure 94*. Pour tous solvants organiques utilisés, l'allure des spectres correspond au spectre usuel d'une phtalocyanine, avec un maximum d'absorption vers 677 nm. Les mesures en milieu aqueux conduisent quant à elles à une absorption maximale de plus basse longueur d'onde (640 nm). Ce déplacement hypsochrome est caractéristique de la formation de dimères (ou multimères) de type H, qui sont non fluorescents.[137a]

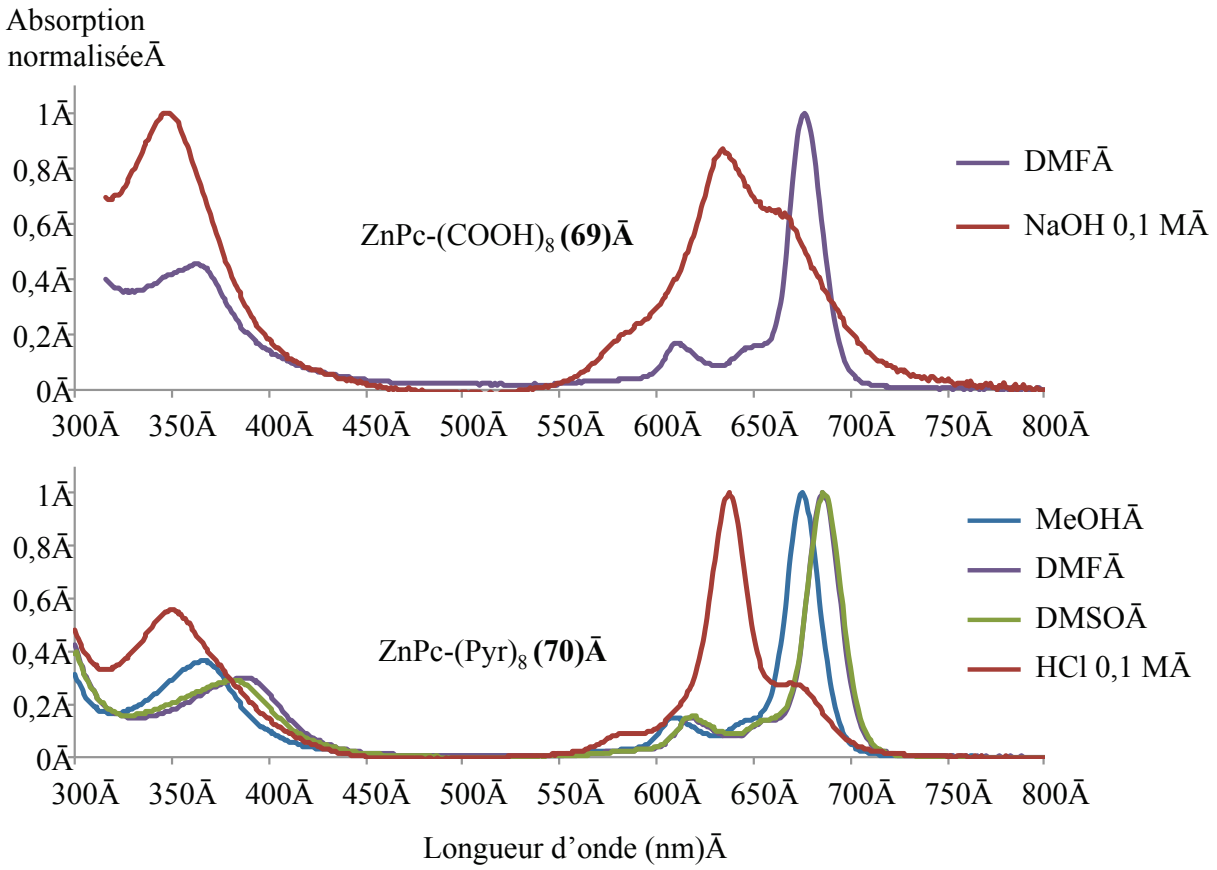


*Figure 94 : Superposition des spectres d'absorption du composé **69** dans le DMF et dans la soude 0,1 M et du composé **70** dans le MeOH, le DMF, le DMSO et H_2O*

Les groupements introduits sont donc efficaces pour solubiliser les phtalocyanines en milieu aqueux. Néanmoins, même en l'absence de mesures fluorimétriques pour le confirmer, il est prévisible que la valeur de rendement quantique de fluorescence soit fortement diminuée par l'agrégation présente, comme observé dans la littérature.[137k]

Ainsi, nous avons estimé qu'il était primordial de développer des outils chimiques pour faciliter la solubilisation des phtalocyanines et surtout réduire leur agrégation. Il existe de très nombreuses études qui portent sur la synthèse de nouvelles phtalocyanines plus solubles, que ce soit en milieu organique ou aqueux. Mais rares sont les cas où l'approche est parfaitement efficace pour éliminer l'agrégation. C'est dans ce contexte que nous avons cherché à introduire des groupements adaptés en périphérie des phtalocyanines.

III.4. Synthèse de phtalocyanines stériquement encombrées

L'agrégation des phtalocyanines se produit de part leur grande surface aromatique plane. L'interaction π-π conduisant à l'empilement (π –stacking) est un phénomène intense difficile à éliminer. Dans ce but, le seul moyen rationnel envisagé consiste à encombrer stériquement les faces

du macrocycle afin de rendre impossible l'approche mutuelle de deux phtalocyanines. Dans le cas de métaux tétravalents, la fonctionnalisation sur le centre métallique s'est montrée particulièrement efficace car le groupement introduit se place de manière orthogonale au plan du cœur aromatique. La formation de dimère d'agrégation s'en trouve alors fortement gênée. Cette approche n'est bien entendu pas transposable aux phtalocyanines de zinc. En effet, les groupements encombrants se doivent ici d'être introduits sur les positions périphériques.

Dans la littérature, cette approche est de plus en plus étudiée et utilisée afin de solubiliser et de réduire l'agrégation des phtalocyanines de métaux divalents tel que le zinc (II). On retrouve quelques exemples récents pour lesquels l'introduction de groupements phénoxy encombrés en **position beta** est bénéfique et réduit notablement l'agrégation en milieu organique.[217] Les substituants se doivent cependant d'être importants en terme de taille afin de rendre difficile l'interaction de deux phtalocyanines. Zimcik et al. ont utilisé cette approche pour obtenir une phtalocyanine hydrosoluble très encombrée contenant 16 groupements imidazolinium (*figure 95*).[137d] Il en résulte un composé très hydrosoluble et peu agrégé, qui s'est montré efficace pour une application en thérapie photodynamique.

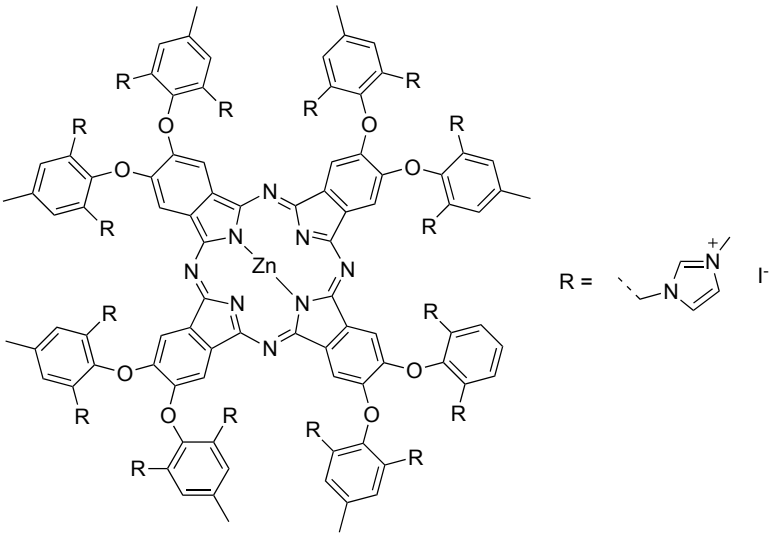


*Figure 95 : Phtalocyanine de zinc hydrosoluble non agregée synthétisée par Makhseed, S. et al. (Chem. Commun. **2013**)*[137d]

La fonctionnalisation en **position alpha** est également reconnue pour réduire notablement l'agrégation en milieu organique ou aqueux.[136a,141] Dans ce cas, les groupements introduits ne sont nécessairement pas aussi importants en terme de taille pour être efficaces.

De notre côté, nous avons choisi d'étudier l'impact de nouveaux substituants introduits en position alpha ou beta des phtalocyanines de zinc sur les phénomènes de solubilisation et d'agrégation.

L'objectif premier consiste à obtenir des composés non agrégés en milieu organique. Si la stratégie s'avère concluante, elle pourra être transposée à la préparation de systèmes hydrosolubles.

Deux approches, qui diffèrent par la nature des précurseurs, ont été envisagées. Dans un premier temps, les substituants introduits seront de type phénoxy ou alkoxy, en portant une attention particulière sur l'impact de la position de fonctionnalisation. On qualifiera de souples ces substituants, en considération de leur flexibilité. Dans un deuxième temps, nous avons cherché à introduire des groupements plus rigides de type phényle, afin d'orienter préférentiellement les groupements encombrants.

III.4.1. Première approche : substituants souples

III.4.1.1. Précurseurs

Nous avons envisagé trois possibilités pour introduire des groupements organosolubilisants souples sur le phtalonitrile : la fonctionnalisation en position 4,5 (beta), en position 3,6 (alpha) ou en position 3,4,5,6 (alpha et beta). Les substituants introduits en position beta sont de taille importante (*p-t*Buphénoxy), pour apporter de l'encombrement stérique, tandis que ceux introduits en position alpha sont plus réduits (éthoxy), afin de ne pas nuire à la formation de la phtalocyanine. Dans le premier cas, la synthèse est réalisée à partir du dichlorophtalonitrile (*schéma 54*).

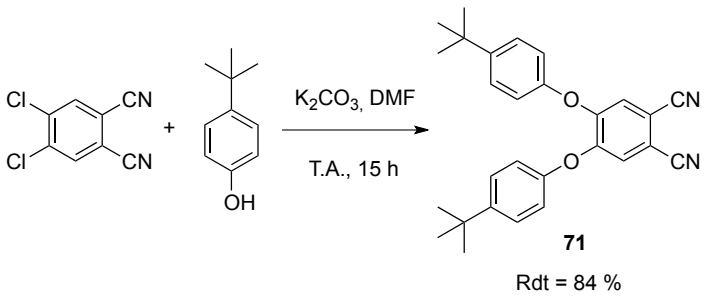
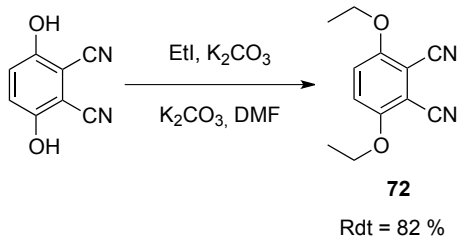


*Schéma 54 : Synthèse du précurseur **71** fonctionnalisé en position 4,5*

Les deux atomes de chlore peuvent être substitués par des groupements *p-tert*butylphénoxy par action du phénol correspondant en présence de carbonate de potassium dans le DMF pendant 15 heures à température ambiante.[218] Le composé **71** est obtenu avec 84 % de rendement.

Pour ce qui est de l'espèce substituée en position 3,6, il est possible d'introduire des groupements éthoxy à partir de la 2,3-dicyanohydroquinone. La réaction est effectuée dans le DMF en présence de carbonate de potassium et le produit est obtenu avec 82 % de rendement (*schéma 55*).

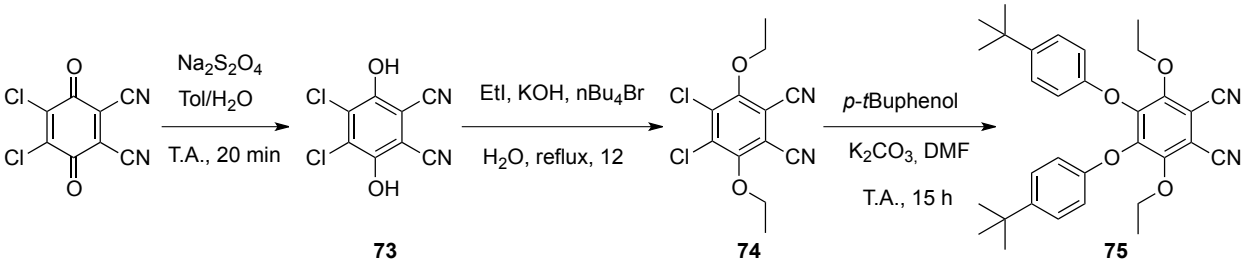


72

Rdt = 82 %

*Schéma 55 : Synthèse du précurseur **72** fonctionnalisé en position 3,6*

À partir de la 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ), il est possible d'obtenir un phtalonitrile substitué en position 3, 4, 5 et 6.[136a,219] Le chemin réactionnel procède en trois étapes (*schéma 56*). Dans un premier temps, la DDQ est rapidement réduite en hydroquinone par l'action de l'hydrosulfite de sodium ($Na_2S_2O_4$) dans un mélange toluène/eau. Après recristallisation dans l'acétone, le produit **73** est obtenu avec 83 % de rendement, puis est engagé dans l'étape d'alkylation. Celle-ci est réalisée dans la potasse en utilisant de l'iodure d'éthyle et un catalyseur de transfert de phase, le bromure de tétrabutylammonium. Pour finir, les deux atomes de chlore du composé **74** sont substitués par des groupements *p-tert*butylphénoxy selon la même procédure que précédemment. Le phtalonitrile **75** est alors obtenu avec 82 % de rendement, soit un rendement global sur les trois étapes de 60 %.



73 Rdt = 83 %

74 Rdt = 88 %

75 Rdt = 82 %

*Schéma 56 : Synthèse du précurseur **75** fonctionnalisé en position 3,4,5,6*

III.4.1.2. Synthèses des phtalocyanines modèles

Les cyclisations sont ensuite réalisées dans les conditions habituelles et conduisent aux phtalocyanines octasubstituées en position beta (**76**), alpha (**77**) ou à la phtalocyanine dodécasubstituée (**78**) avec respectivement 47, 13 et 62 % de rendement (*schéma 57*). Ces trois produits sont facilement purifiés par chromatographie sur colonne de silice, compte tenu de leur bonne solubilité.

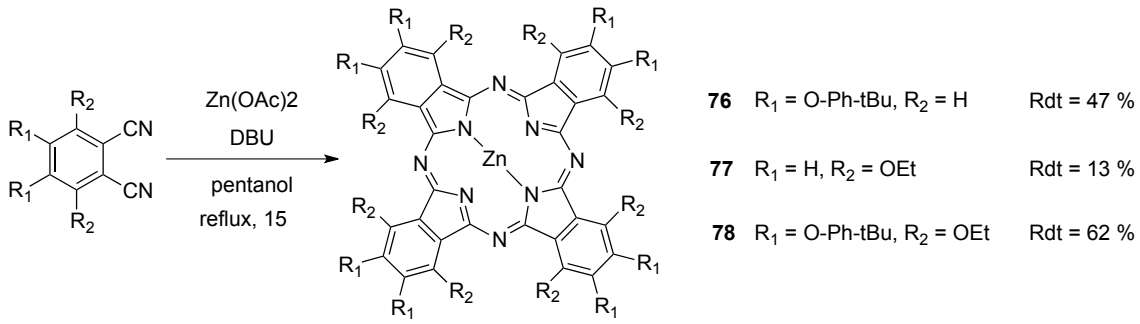


*Schéma 57 : Synthèse des phtalocyanines octa- et dodéca-substituées **76**, 77 et **78***

Ces composés ont été caractérisés par spectroscopie UV-Visible. Encore une fois, le nombre et la position des substituants périphériques modifient les longueurs d'onde d'absorption des bandes caractéristiques, comme le montre le *tableau 20*.

Composé		Bande de Soret		Bande Q principale	
		λ (nm)	ε ($mol^{-1}.L.cm^{-1}$)	λ (nm)	ε ($mol^{-1}.L.cm^{-1}$)
76	$ZnPc(\beta\text{-}OPhtBu)_8$	358	109,8	677	339,1
77	$ZnPc(\alpha\text{-}OEt)_8$	326	47,8	732	184,0
78	$ZnPc(\beta\text{-}OPhtBu)_8(\alpha\text{-}OEt)_8$	369	64,4	731	278,3

*Tableau 20 : Propriétés d'absorption des composés **76**, 77 et **78** dans le THF*

Ils possèdent tous trois une solubilité bien supérieure aux phtalocyanines mono- ou tétra-substituées précédemment préparées. Cependant l'agrégation persiste dans le cas du composé **76** uniquement substitué en position beta, comme révélé par les mesures d'absorption à différentes concentrations (non présentées). Dans le cas des espèces α-substituées, cette agrégation est diminuée. En effet, les groupements éthoxy sont proches les uns des autres et ont tendance à s'orienter perpendiculairement au plan de la phtalocyanine. L'interaction entre deux cœurs aromatiques est ainsi diminuée. Cette orientation est notamment visible sur la structure cristallographique du composé **78** (*figure 96*). On peut également noter sur cette structure la présence de deux molécules de méthanol coordinées à l'atome de zinc, provenant probablement du milieu de recristallisation (DCM/MeOH).

Lors du traitement des réactions, nous avons également pu constater que les espèces substituées en position alpha (**77** et **78**) sont aisément protonables. En effet, ces composés de couleur initiale verte, deviennent marron lorsque les lavages acides sont menés (NH_4Cl saturé). L'acidité de la silice est également suffisante pour protoner ces phtalocyanines, ce qui conduit à une perte notable de produit lors de la purification. En vue de ces observations, nous avons cherché à mieux comprendre le phénomène, celui-ci pouvant s'avérer contraignant.

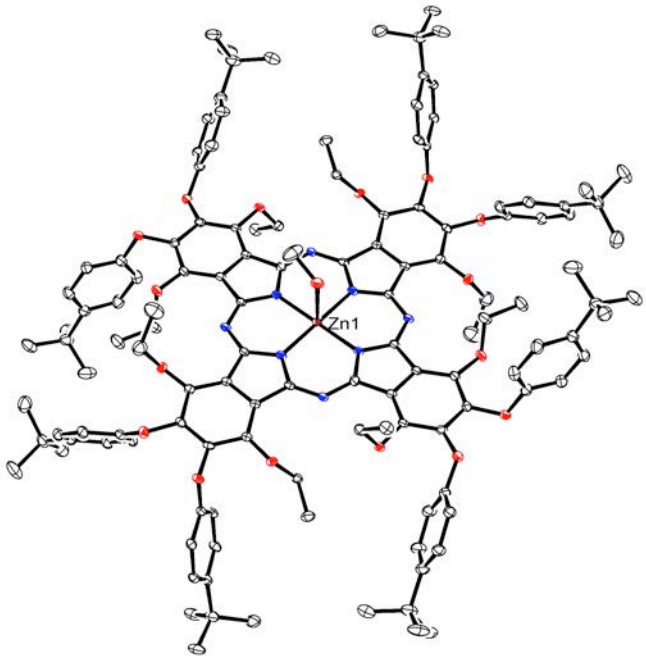


*Figure 96 : Vue ORTEP du composé **78***

III.4.1.3. Protonation des azotes pontants

Les mesures de spectroscopie d'absorption dans le THF en présence de quantités variables de TFA ont souligné l'imapct de la position des substituants sur la facilité de protonation des ponts azotés des phtalocyanines. En effet, de faibles ajouts d'acide sont suffisant dans le cas des espèces substituées en position alpha (**77** et **78**) contrairement aux cas des espèces non substituées (ZnPc **4**) ou uniquement substituées en position beta (**76**) (*figure 98*). La simple acidité du dichlorométhane (pureté standard), due à la présence d'acide chlorydrique résiduel, est par exemple suffisante pour observer l'apparition d'une absorption à 814 nm dans le cas du composé **77**, ou 804 nm pour le composé **78** (spectres non présentés).

Ce phénomène de protonation, facilité dans le cas de phtalocyanines α-substituées par des hétéroatomes, a déjà pu être observé à plusieurs reprises dans la littérature.[141,220] Il a été proposé par l'équipe de N. Kobayashi que la protonation de l'azote est facilitée par les oxygènes proximaux capables d'interagir avec le proton par liaison hydrogène, ce qui augmente considérablement sa valeur de pKa (*figure 97*).

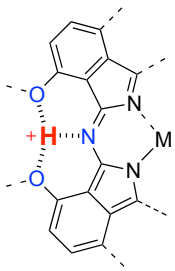


*Figure 97 : Mode de protonation dans le cas des ZnPc α-substituées par des groupements alkoxy (adaptée de Honda, T. et al. Chem. Commun. **2013**)[220]*

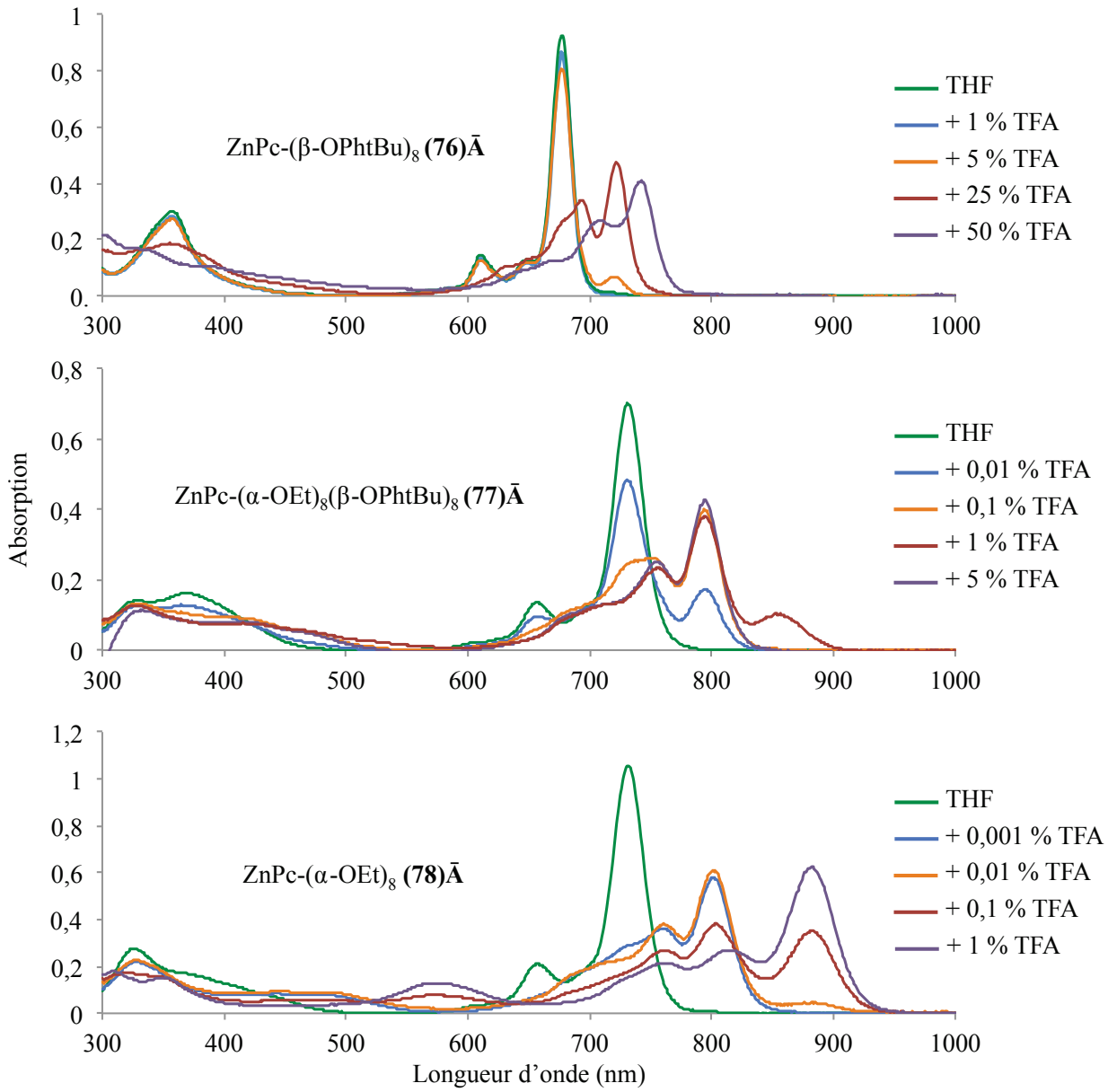


*Figure 98 : Superposition des spectres d'absorption des phtalocyanines **76-78** dans le THF en présence de quantité variable de TFA*

Dans le cas du composé **78**, des états de protonnation supplémentaires sont observables à mesure que l'acidité augmente, ce qui traduit de la basicité plus importante de cette phtalocyanine.

Pour conclure, l'introduction de groupements éthoxy en position alpha permet de limiter efficacement l'agrégation alors que la présence unique de substituants beta n'est pas suffisante. Malheureusement, les espèces α-substituées présentent des inconvénients liés au phénomène de protonation qui peut nuire à leur synthèse et leur fonctionnalisation. D'autre part, les formes protonées qui pourront être formées à pH physiologique sont non fluorescentes, ce qui constitue également un frein pour une application en imagerie optique.[213] Nous nous sommes donc tournés vers l'introduction de nouveaux groupements plus adaptés à nos objectifs.

III.4.2. Deuxième approche : substituants rigides

Nous avons alors choisi d'introduire des substituants rigides en position beta afin d'apporter de la gène stérique de part et d'autre du plan de la phtalocyanine. Cette approche a déjà été explorée par quelques équipes de recherche, notamment par introduction de groupements phényle ou d'hétérocycles directement liés au cœur phtalocyanine.[221] De manière similaire, nous nous sommes intéressés à la synthèse de phtalocyanines directement substituées en position beta par des groupements aromatiques de type *ortho*-substitués (*figure 99*). La position de substitution (*ortho*) est primordiale car elle permettra d'encombrer efficacement les faces du macrocycle. De plus, il est indispensable que le précurseur soit disubstitué pour maintenir une orientation orthogonale du groupement. En effet, alors que le composé monosubstitué possède une libre rotation, l'espèce disubstituée sera bloquée dans une conformation de type *trans*. Par la suite, il pourra être envisagé de moduler les groupements introduits pour augmenter l'encombrement stérique ou apporter, à loisir, de l'organosolubilité ou de l'hydrosolubilité.

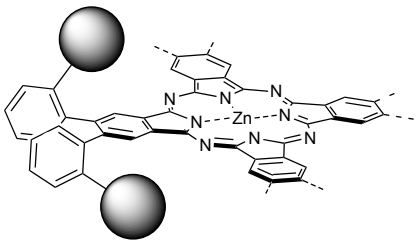


Figure 99 : Mode d'encombrement stérique envisagé

Notons que la fonctionnalisation par des groupements phényle en position alpha n'a pas été étudiée, mais pourrait également se révéler prometteuse, comme il a déjà été montré dans la littérature dans le cas de phtalocyanines tétrasubstituées.[222] L'octasubstitution par des phényles en position alpha complique quant à elle la cyclisation et conduit à une distorsion importante du cœur phtalocyanine qui s'accompagne d'une modification des propriétés.[223]

Pour des raisons d'accessibilité des précurseurs, deux types de composés ont également été envisagés, à savoir les phtalocyanines et les azaphtalocyanines.

III.4.2.1. Synthèse des précurseurs

La première étape consiste naturellement à préparer des précurseurs dicyanobenzène (précurseur Pc) ou pyrazine-dicarbonitrile (précurseur azaPc) substitués en position 4,5 par des groupements phényle *ortho*-substitués.

III.4.2.1.1. En série dicyanobenzène

Les méthodes les plus appropriées pour lier directement deux groupements phényle par une liaison directe sont à ce jour les réactions de couplage croisé pallado-catalysés. La réaction de Suzuki a fait

ses preuves pour la substitution des deux chlores du 4,5-dichlorophtalonitrile par deux groupements phényle.[217b,224] Elle reste cependant compliquée dans ce cas compte tenu de la nature de l'halogène (chlore) qui est peu réactif et de l'encombrement stérique induit par le premier phényle introduit limitant le deuxième couplage. De plus, la présence du groupement en position *ortho* du précurseur boronique nuit également au bon déroulement de la réaction.

Dans le cas de l'acide *ortho*-méthoxyphényle boronique, les meilleurs résultats ont été obtenus en utilisant du palladium (II) comme catalyseur en présence de carbonate de potassium et de bromure de sodium. Après 15 heures de reflux dans un mélange THF/eau, il est possible d'isoler par colonne chromatographique les espèces résultant d'un seul (**79**) ou de deux (**80**) couplages avec respectivement 59 et 33 % de rendement (*schéma 58*).

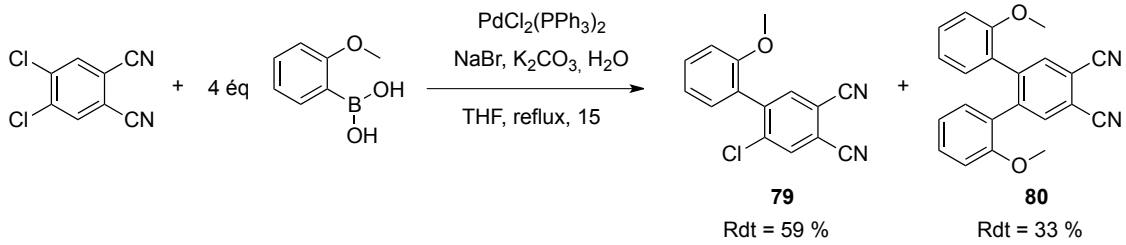


Schéma 58 : Couplage de Suzuki entre le 4,5-dichlorophtalonitrile et l'acide orthométhoxyphénylboronique

Le produit de monosubstitution **79** peut ensuite être remis en jeu dans les mêmes conditions réactionnelles afin de produire davantage de composé **80**. Alternativement, il peut également être condensé avec l'acide *p*-t*ert*butylboronique pour conduire au précurseur dissymétrique **81** contenant un phényle *ortho*-substitué et un phényle *para*-substitué (*schéma 59*). La réaction est ici facilitée de part la diminution de la gène stérique. Le produit est ainsi obtenu avec 87 % de rendement.

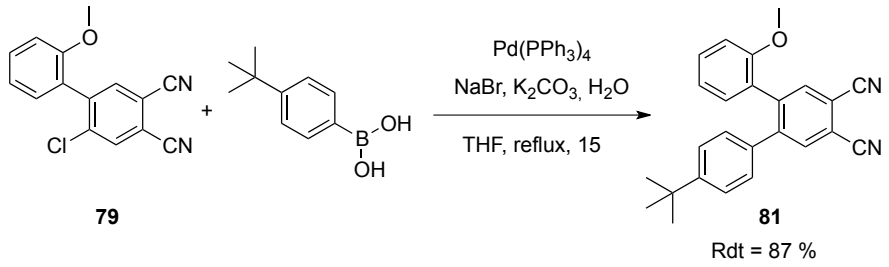


*Schéma 59 : Synthèse du composé **81** par couplage de Suzuki*

D'autres dérivés boroniques ont également été envisagés, afin de faire varier la nature ou le nombre de substituants en position *ortho*. Dans le cas de l'acide *o*-(diméthoxy)phényle boronique, seul le produit de monosubstitution **82** est observé, l'encombrement stérique trop important défavorisant la réaction (*schéma 60*). Le même résultat a été observé avec l'acide *o*-nitrophényle boronique. Bien

qu'il ne possède qu'un seul substituant en position *ortho* de la fonction acide boronique, seul le produit **84** est formé et avec un faible rendement. Cependant, le nitro est une fonction d'encombrement stérique plus important qu'un méthoxy, mais également un groupement attracteur qui tend à désactiver la réaction. De plus, le dérivé boronique **83** ne semble pas très stable dans les conditions réactionnelles appliquées.

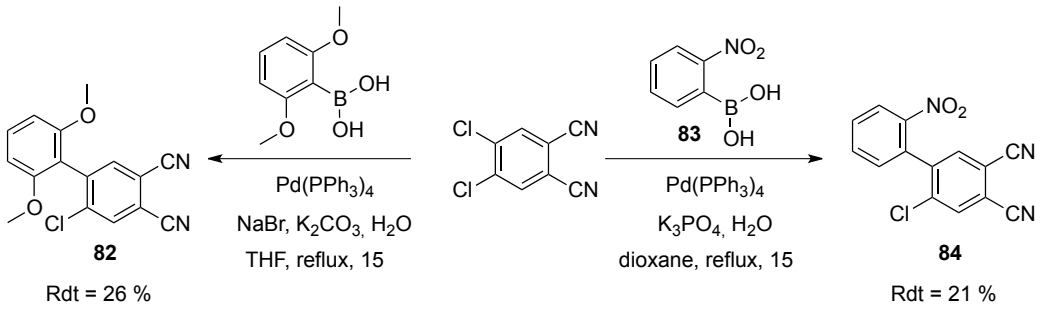


Schéma 60 : Essais de couplages avec les acides boroniques orthodiméthoxy et orthonitro

Notons que pour mettre en œuvre cette réaction, il a été nécessaire de préparer l'acide boronique nitré **83**. Il est obtenu en deux étapes à partir du 1-chloro-2-nitrobenzène, par couplage de Miyaura avec le bispinacol diborane puis hydrolyse de l'ester boronique en son dérivé acide par l'action du périodate de sodium en milieu aqueux (*schéma 61*).[225]

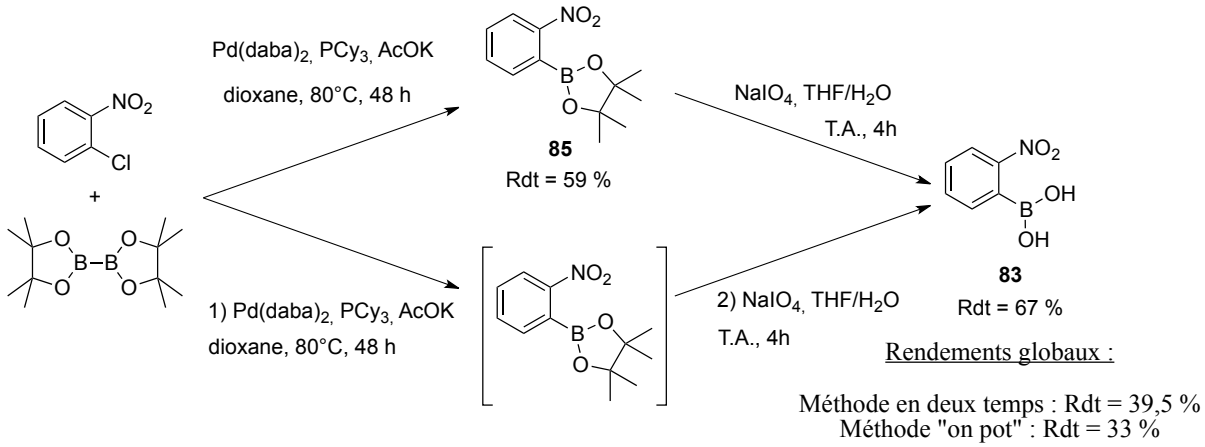


*Schéma 61 : Synthèse de l'acide orthonitroboronique **83** par la méthode en deux étapes ou la méthode « one-pot »*

Il est possible de réaliser la séquence réactionnelle en deux temps, en purifiant et isolant l'intermédiaire **85**, ou « one-pot » en le mettant directement en jeu dans l'étape d'hydrolyse après lavages. Les rendements obtenus dans les deux cas sont relativement proches (33 et 39,5 %), mais la méthode « one pot » est moins contraignante en terme de temps.

III.4.2.1.2. En série pyrazine dicarbonitrile

Un synthon équivalent au composé triphényle **80**, précurseur non plus de phtalocyanines mais d'azaphtalocyanines, a été préparé en trois étapes à partir de l'anisaldéhyde, selon une méthodologie de la littérature (*schéma 62*).[170]

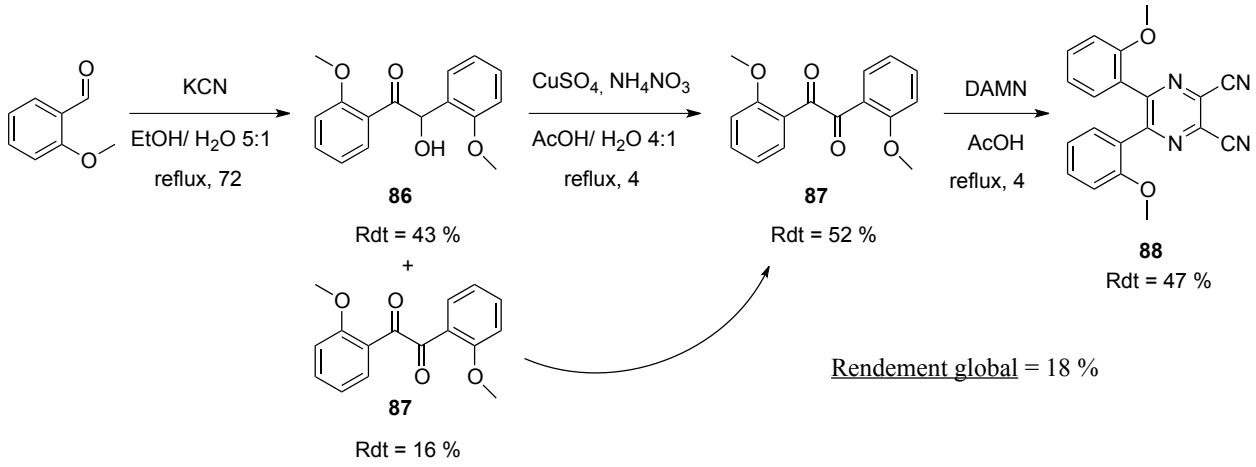


*Schéma 62 : Préparation du précurseur pyrazine dicarbonitrile disubstitué par des groupements o-méthoxyphényle (**88**)*

La première étape consiste à réaliser une condensation de benzoïne dans un mélange éthanol/eau catalysée par la présence d'ions cyanure (0,1 équivalents). Le meilleur rendement, 43 %, est obtenu pour un temps de réaction de 72 heures. On note également que la réaction conduit à une quantité non négligeable de produit oxydé, la dione **87**. Celle-ci est séparée du produit de réaction sur colonne chromatographique et conservée pour être remise en jeu lors de la troisième étape. La benzoïne non oxydée est quant à elle mise en présence de sulfate de cuivre et de nitrate d'ammonium pendant 4 heures au reflux de l'acide acétique à 80 % pour conduire à la dione **87** avec 52 % de rendement. Notons que le seul sous produit organique de la réaction est le produit de départ (**87**) qui peut être récupéré pour être remis en jeu dans la même réaction.
Pour finir, la dione est condensée sur le 2,3-diaminomaléonitrile (DAMN) dans l'acide acétique pur, ce qui permet d'obtenir la pyrazine **88** avec 47 % de rendement. Le rendement global des trois étapes est donc de 18 %, en prenant en compte la remise en jeu dans la troisième étape de la dione formée lors de la première étape.

La structure cristallographique de ce précurseur a été obtenue par DRX sur monocristal (*figure 100*). Comme attendu, les groupements méthoxy se placent à l'opposé l'un de l'autre (*trans*). L'analyse par spectroscopie de RMN du proton du produit, réalisée à différentes températures, mais également les analyses en deux dimensions (COSY et NOESY), prouvent que seul cet atropoisomère est formé.

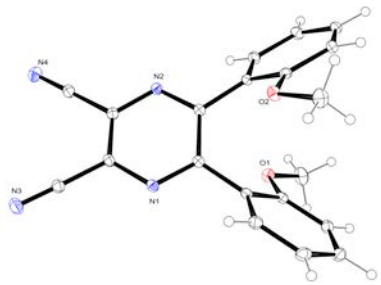


*Figure 100 : Structure cristallographique du composé **88***

III.4.2.2. Synthèse des phtalocyanines et de l'azaphtalocyanines

III.4.2.2.1. Cyclisations

Les différents précurseurs synthétisés ont alors été mis en jeu dans les réactions de cyclisation dans le but de former les phtalocyanines ou l'azaphtalocyanine correspondantes. La méthode utilisée pour réaliser la condensation est la méthode usuelle, qui emploie l'acétate de zinc et de la DBU dans le pentanol (*schéma 63*).

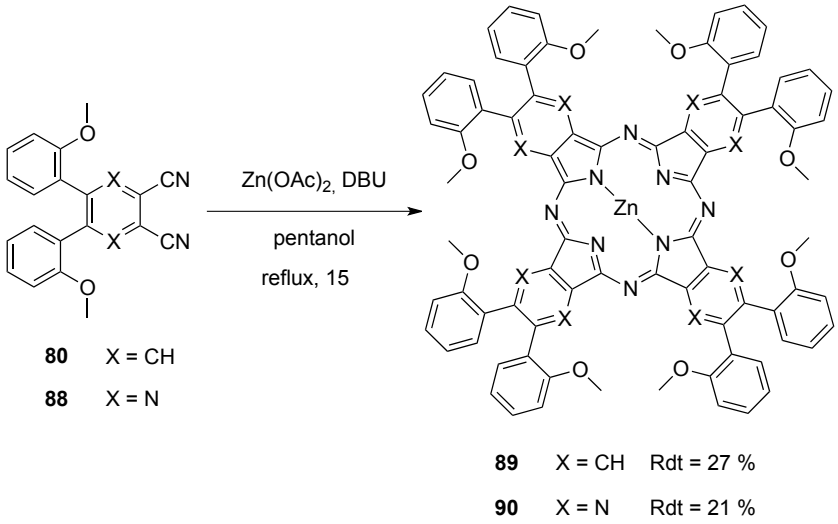


*Schéma 63 : Synthèse des octaphénylphtalocyanines **89** et de l'octaphénylazaphtalocyanine **90***

Lorsque la réaction est réalisée à partir des précurseurs **80** et **88**, la phtalocyanine **89** ou l'azaphtalocyanine **90** peuvent être facilement purifiées par chromatographie sur colonne de silice, compte tenu de la bonne solubilité apportée par les fragments *o*-méthoxyaryles périphériques.

La réaction peut également être menée avec le précurseur dissymétrique **81** (*schéma 64*). De la même manière, le produit possède une solubilité suffisante pour être purifié sur colonne de silice.

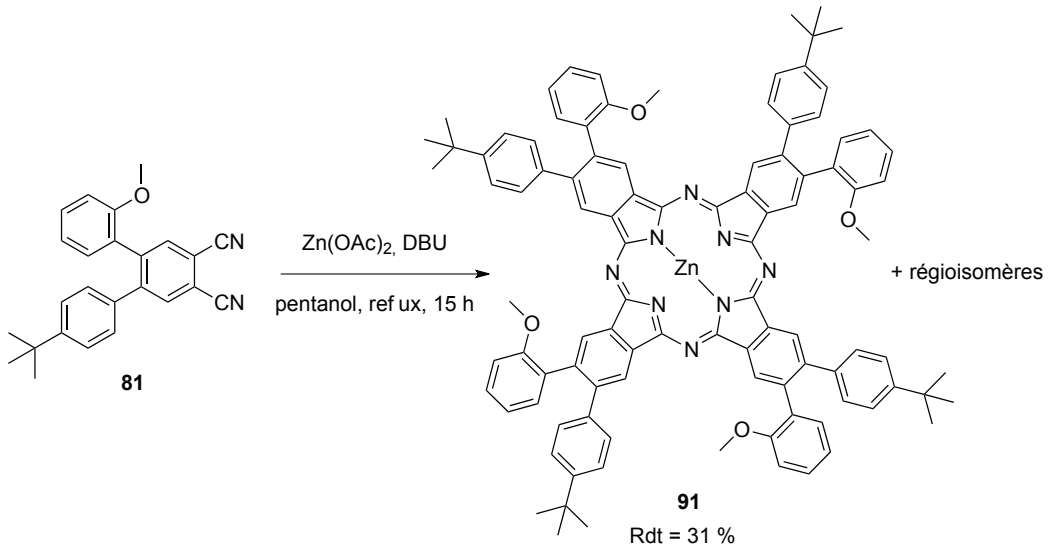


*Schéma 64 : Cyclotétramérisation du précurseur dissymétrique **91***

Ces trois composés (**89-91**) ont été analysés par les différentes techniques de spectroscopie (RMN ^{1}H, UV-Vis) et spectrométrie (MALDI-TOF) usuelles. Les signaux des protons aromatiques visibles sur les spectres de RMN du proton des composés **89** et **90** sont élargis et mal résolus compte tenu de la présence des différents régioisomères et atropoisomères (*figure 101*).

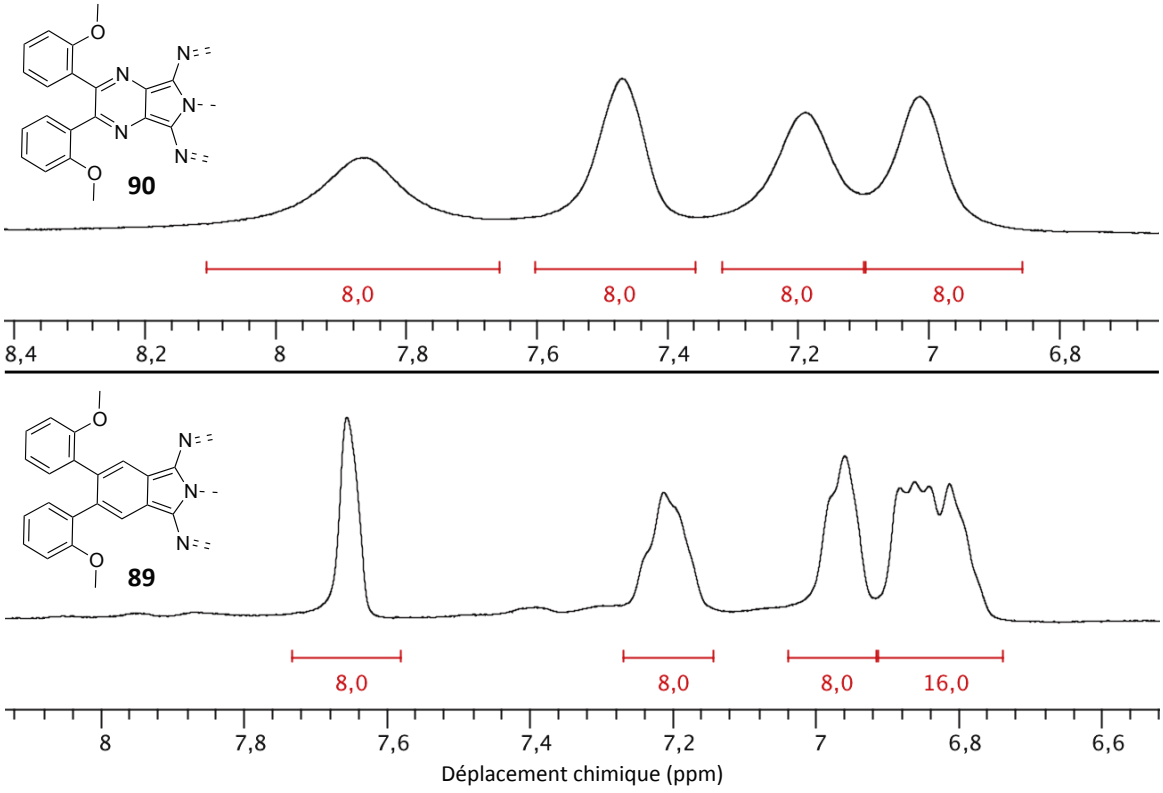


*Figure 101 : Zones aromatique des spectres de RMN du proton de la phtalocyanine **89** et de l'azaphtalocyanine **90***

Ces régioisomères sont issus de la configuration figée des groupements phényle périphériques, les groupements méthoxy pouvant se placer alternativement en haut puis en bas du plan, ou l'inverse.

Malgré cela, ces spectres permettent, en complément des analyses par spectrométrie de masse (MALDI-TOF), de confirmer la structure des produits formés.

Les propriétés d'absorption de ces deux phtalocyanines et de l'azaphtalocyanine ont également pu être mesurées par spectroscopie UV-visible. Elles sont résumées dans le *tableau 21*.

	Composé	Bande de Soret (nm)	Première bande Q (nm)	Seconde bande Q (nm)
89	$ZnPc(PhOMe)_8$	358	619	687
90	$ZnAzaPc(PhOMe)_8$	364	582	641
91	$ZnPc(PhOMe)_4(PhtBu)_4$	362	622	690

*Tableau 21 : Propriétés d'absorption des composés **89**, **90** et **91** dans le THF*

Par comparaison avec la phtalocyanine non substituée (ZnPc **4**), l'ajout de 8 groupements phényle directement liés au cœur phtalocyanine conduit à un déplacement batochrome d'environ 20 nm de la bande Q la plus intense (seconde bande Q), comme le montrent les mesures réalisées sur les composés **90** et **91**. On note également que la modification du groupement benzénique par un groupement pyrazine, caractéristique des azaPc, induit un déplacement hypsochrome de 50 nm de cette même bande Q (cas du composé **90**).

III.4.2.2.2. Modulation des groupements introduits

Afin d'améliorer la solubilité et le caractère non-agrégé des composés, et d'explorer l'ajout de fonctions hydrosolubilisantes, il a été envisagé de remplacer les groupements méthoxy par des groupements plus adaptés. La première étape consiste à libérer les fonctions phénol par déprotection des méthoxy, ce qui a été étudié dans les cas des composés **90** et **91**. La réaction de déprotection est menée par ajout de tribromure de bore (BBr_3) dans le dichlorométhane (*schéma 65*). Elle nécessite un excès important de réactif (32 ou 16 équivalents) ainsi qu'un temps de réaction long (8 et 6 heures) afin de garantir la libération de toutes les fonctions hydroxy, ce qui a ensuite été vérifié par spectroscopie de RMN du proton et spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Par la suite, quelques tests d'alkylation ont été menés, mais comme le montre le suivi par spectrométrie de masse, les réactions ne sont à chaque fois pas totale. Il est en effet difficile d'alkyler tous les phénols et les CCM mettent alors en évidence la présence de nombreux produits.

Des essais supplémentaires seront nécessaires pour améliorer la conversion réactionnelle et obtenir une alkylation complète.

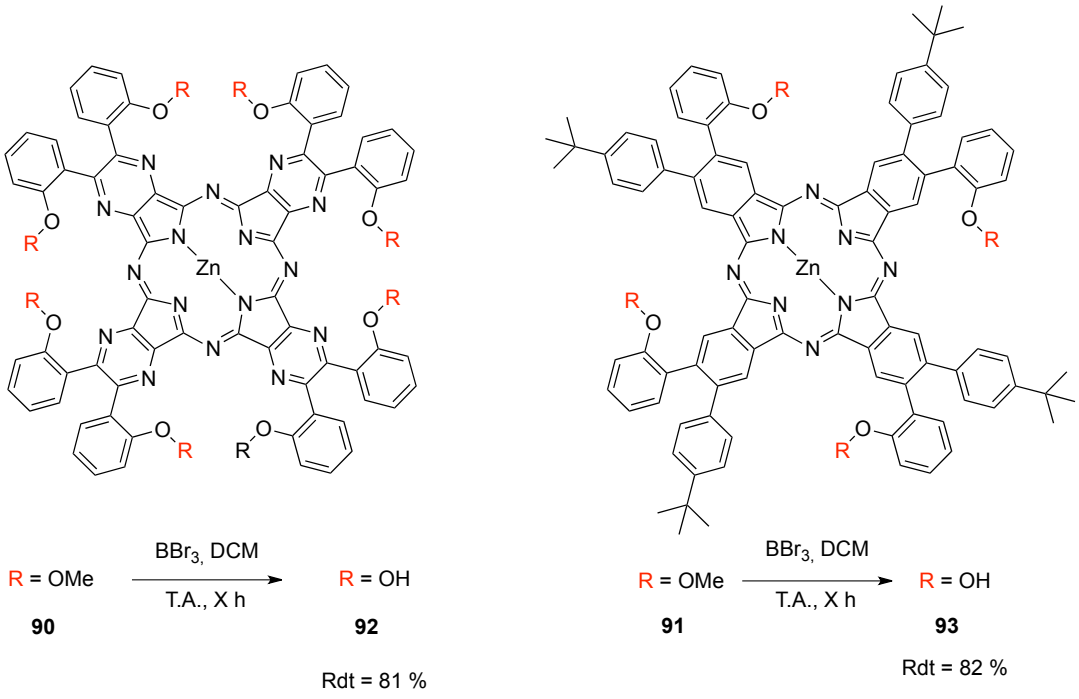


*Schéma 65 : Déprotection des fonctions hydroxyle des composés **90** et **91***

Notons que la réaction de déprotection a également été envisagée au stade des précurseurs (**80**, **81** ou **88**), mais ces composés sont malheureusement sensibles au BBr_3 de part la présence du motif 1,2-dicyanobenzène, même à basse température. Les déprotections en utilisant d'autres réactifs (TMSI, Pyr.HCl) ne nous ont également pas permis d'obtenir les produits d'intérêt.

III.5. Conclusion

Cette partie a été consacrée à la préparation de phtalocyanines de zinc fonctionnelles en vue d'associer ces fluorophores à des entités d'intérêt pour l'imagerie médicale. Dans cet objectif, nous avons pu préparer des phtalocyanines de type A_3B comportant une fonction acide, amine, alcyne ou acide aminé (*figure 102)*. Compte tenu de la faible solubilité de cette famille de composés, seuls certaines phtalocyanines ont pu être séparées de l'espèce statistique A_4. L'ajout de groupements organosolubilisants sur les motifs A (thiooctyls) permet de faciliter cette purification. Ces composés ont été utilisés pour préparer des systèmes ditopiques ZnPc-DOTA. Ils seront également utiles pour l'association avec une nanoparticule d'oxyde de fer et un nanotube d'oxyde de titane, ce qui est décrit dans le chapitre suivant.

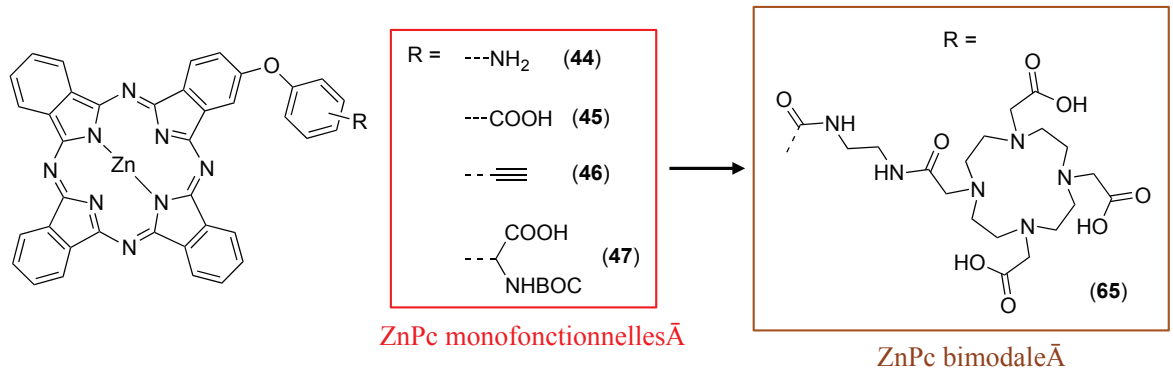


Figure 102 : Phtalocyanines fonctionnelles et bimodale préparées

Cependant, les systèmes obtenus souffrent d'une faible hydrosolubilité, que nous avons alors souhaité à améliorer. Dans cet objectif, nous avons exploré plusieurs chemins réactionnels permettant d'introduire quatre groupements fonctionnels. À partir des synthons réactifs obtenus, nous avons alors cherché à lier quatre agents chélatants dérivés du DOTA avec une phtalocyanine (*figure 103)*. Les essais réalisés se sont montrés encourageants, mais des expériences supplémentaires pour sont nécessaires pour isoler et caractériser les composés d'intérêt.

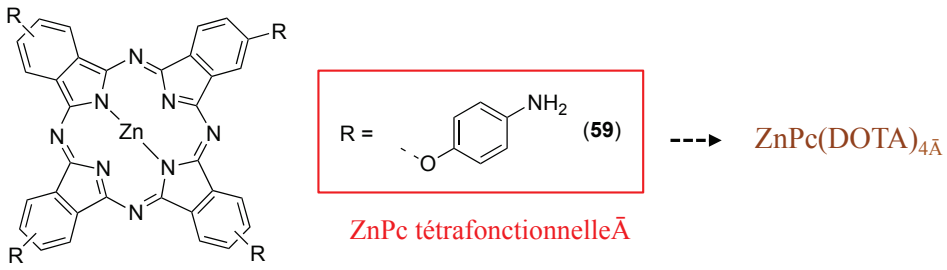


Figure 103 : Phtalocyanine tétrafonctionnelle préparée et essais d'introduction de quatre agents chélatants

Dans le même objectif, l'ajout de groupements hydrosolubilisants a été exploré. Les composés octasubstitués (ZnPc-$COOH_8$ **69** et ZnPc-Pyr_8 **70**) obtenus sont parfaitement solubles dans l'eau. Mais les analyses spectroscopiques mettent en évidence la persistance importante de l'agrégation. Dans ce contexte et à travers la synthèse des composés modèles organosolubles, nous avons alors étudié rationnellement le moyen d'encombrer stériquement les faces planes des phtalocyanines pour supprimer l'agrégation. La substitution par des groupements éthoxy en position alpha permet d'obtenir des composés très organosolubles. Cependant, les inconvénients liés à la protonation des azotes pontants nous ont poussé à développer de nouveaux outils synthétiques.

Nous nous sommes alors orientés vers l'introduction de groupements phényle *ortho*-susbstitués en position beta. Des essais de fonctionnalisation plus élaborés, à travers la déprotection des méthoxy

puis l'alkylation, ont également été réalisés afin de renforcer l'encombrement stérique et explorer la possibilité d'ajout de fonctions hydrosolubilisantes (*figure 104*).

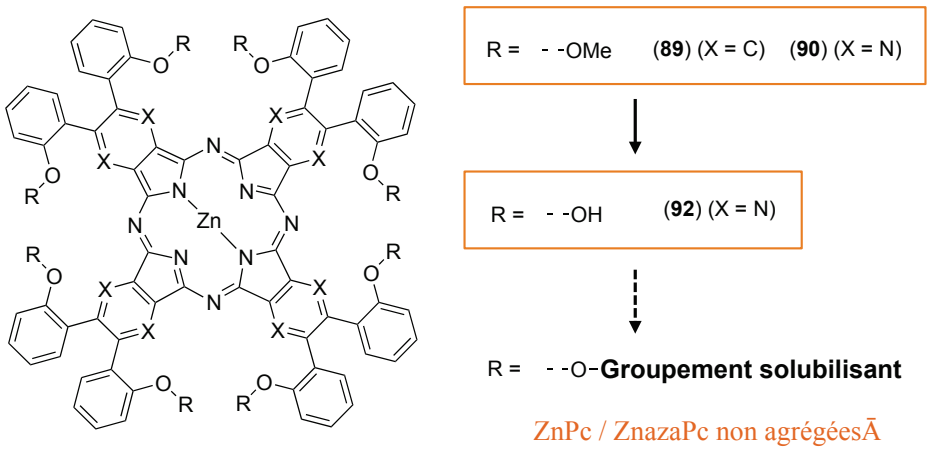


Figure 104 : Phtalocyanines et azaphtalocyanines synthétisées et perspectives

Des essais supplémentaires d'alkylation, ou la mise au point d'une nouvelle voie de synthèse visant à réaliser l'étape d'alkylation avant cyclisation, pourront peut être permettre d'obtenir des phtalocyanines hydrosolubles non agrégées. Les études photophysiques permettront alors d'évaluer l'effet bénéfique des groupements introduits sur le phénomène d'agrégation. Si cette dernière approche s'avère concluante, ces outils synthétiques pourront être utilisés pour préparer des phtalocyanines A_3B pour lesquelles les unités isoindoliques A sont des motifs phényle hydrosolubilisants et l'unité B est une fonction d'intérêt (fonction de greffage, agent chélatant, ou encore espaceur trifonctionnel permettant de les introduire simultanément) (*figure 105*).

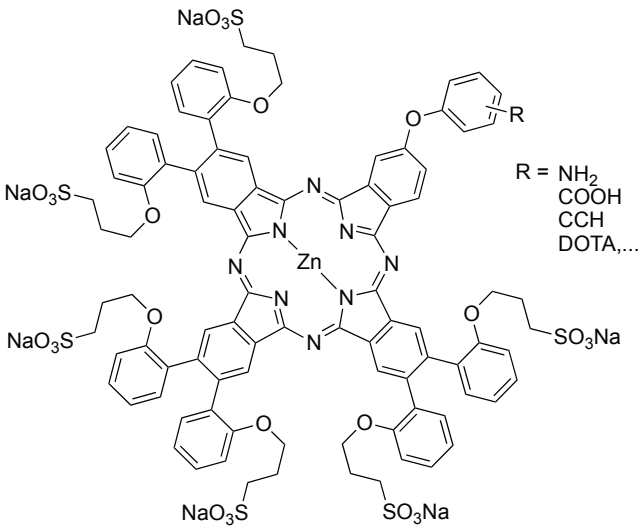


Figure 105 : Exemple de phtalocyanines hydrosolubles fonctionnelles envisagées

CHAPITRE II

BIO- ET NANO- VECTORISATION DE SUBPHTALOCYANINES ET PHTALOCYANINES POUR L'IMAGERIE DE FLUORESCENCE ET LES IMAGERIES BIMODALES - APPLICATION A L'IMAGERIE CELLULAIRE

CHAPITRE II : BIO- ET NANO- VECTORISATION DE SUBPHTALOCYANINES ET PHTALOCYANINES POUR L'IMAGERIE DE FLUORESCENCE ET LES IMAGERIES BIMODALES - APPLICATION A L'IMAGERIE CELLULAIRE

Ce chapitre est consacré à l'utilisation de certaines des subphtalocyanines et phtalocyanines fonctionnelles synthétisées dans le chapitre I en vue d'explorer la faisabilité de mise au point d'agents d'imagerie mono- ou multimodaux inédits.

Partie I : Bio- et nano-vectorisation de subphtalocyanines

Dans le cas des subphtalocyanines, l'attention sera principalement portée sur la vectorisation biologique du fluorophore, à travers l'utilisation de peptides ou de liposomes (*figure 106*). Egalement, les études d'imagerie cellulaire réalisées sur certaines des sondes préparées seront présentées.

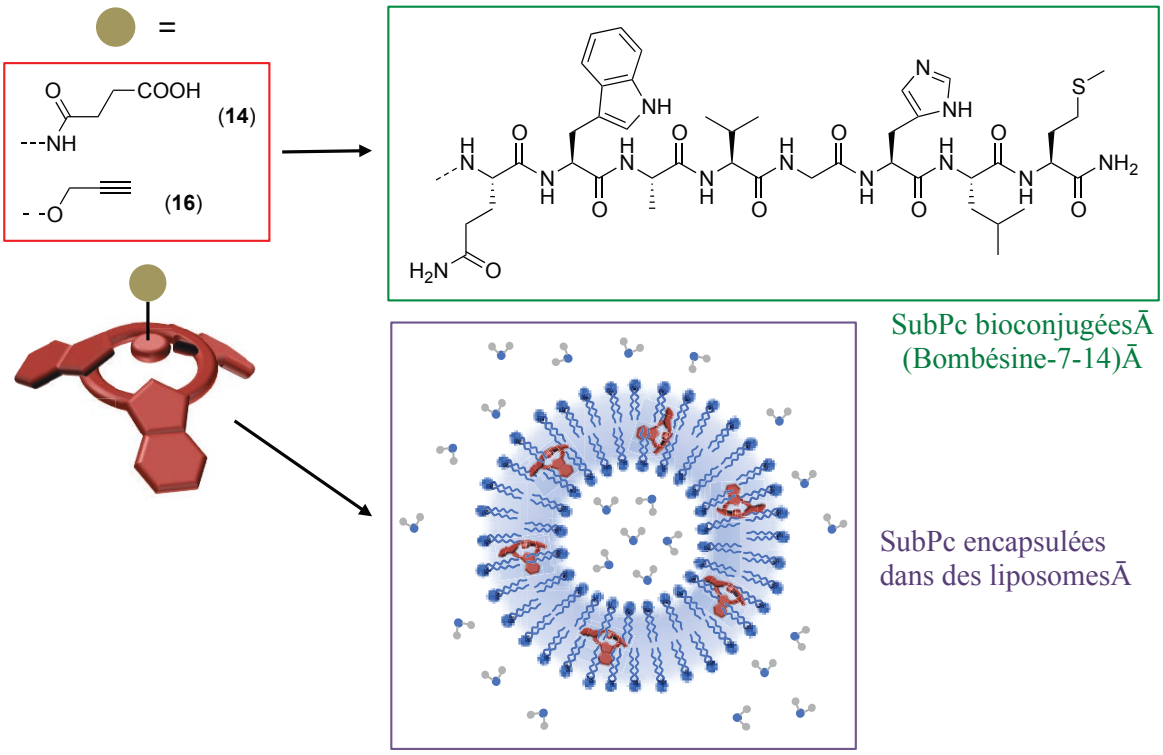


Figure 106 : Objectifs de la première partie du chapitre II

I.1. Association de subphtalocyanines avec un peptide

Nous avons étudié la possibilité d'associer une subphtalocyanine à un vecteur biologique pour mettre au point un agent d'imgerie optique sélectif des zones tumorales. Compte tenu du savoir-faire du laboratoire d'accueil, la biomolécule choisie est un peptide, la bombésine-7-14. Cet

analogue synthétique du peptide naturel (la bombésine) a été brièvement présenté lors de l'introduction générale. Il est spécifique de plusieurs cibles biologiques (les récepteurs couplés à la protéine G : GRP-R, NMB-R et BRS-3) qui sont surexprimées dans une large variété de tissus cancéreux. Il représente donc une cible de choix pour étudier la mise au point d'un agent d'imagerie optique peptidique à partir de notre sonde fluorescente.[226]

La bombésine-7-14 est constituée d'une séquence de 8 acides aminés (Met-Leu-His-Gly-Val-Ala-Trp-Gln), dont la glutamine terminale est modifiable pour favoriser l'introduction du groupement d'intérêt. Une équipe du laboratoire (V. Goncalves) a ainsi synthétisé différents dérivés contenant notamment un groupement amine ou azoture espacé du peptide par le motif ((éthoxy)éthoxy)acétyle (EEAc). Les synthèses de ces peptides sont réalisées sur support solide (polystyrène, PS) en utilisant un synthétiseur peptidique automatisé (micro-onde).

Deux voies de synthèse ont été envisagées pour associer une subphtalocyanine à ce vecteur biologique. La première consiste à réaliser un couplage peptidique entre la SubPc-COOH **14** et un dérivé bombésine amine. Ce couplage est réalisé lorsque le peptide est complètement protégé et greffé sur la résine pour assurer une acylation sélective (*schéma 66*).

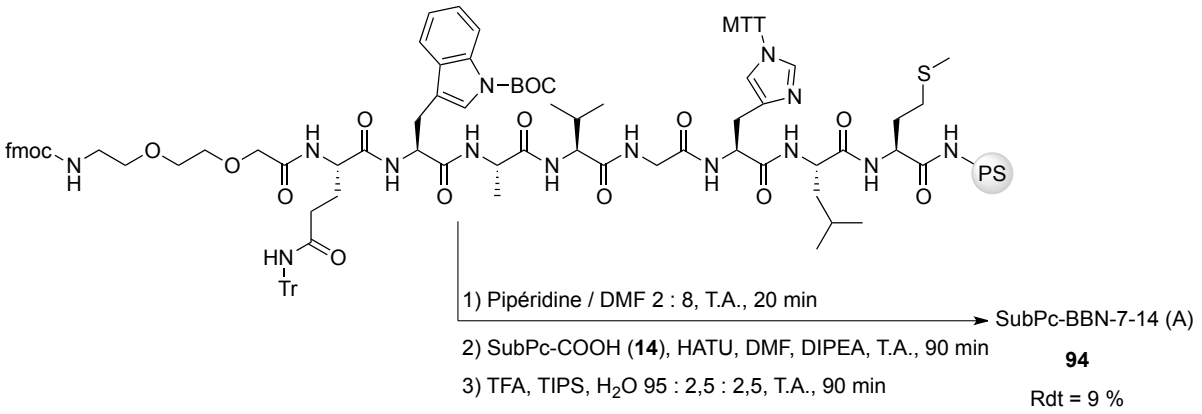


*Schéma 66 : Synthèse de la SubPc-BBN-7-14 (A) **94** par couplage peptidique*

Une fois la réaction terminée, le support ainsi que les groupements protecteurs sont alors éliminés afin d'isoler le composé voulu. La première étape, utilisant de la pipéridine, consiste à éliminer le groupement fmoc présent sur l'amine terminale. Puis la réaction de couplage est réalisée en présence d'HATU (agent de couplage) et de DIPEA. Finalement, le produit est libéré du support et déprotégé par traitement acide (TFA).

Les analyses par spectrométrie de masse et HPLC (détection UV à 200, 254 et 565 nm) confirment la formation du produit, mais révèlent également la présence de plusieurs sous-produits. Parmi eux, on retrouve notamment les formes mono- et dioxydées du composé **94** (m/z = M+16 et M+32). On

suppose que les oxydations ont lieu au niveau de la méthionine et du tryptophane, ce phénomène ayant déjà été observé dans la littérature.[227]
L'adduit SubPc-BBN (A) (**94**) est ensuite purifié par chromatographie en phase inverse (HPLC semi-préparative). Il est obtenu avec un rendement de 9 % puis caractérisé par spectrométrie de masse exacte (ESI). L'amas isotopique observé sur le spectre obtenu correspond bien à la masse attendue (m/z = 1671,62 $[M+H]^+$).

Le rendement quantique de fluorescence dans le méthanol de cet adduit SubPc-BBN-7-14 **94** a été déterminé (référence, rhodamine 6G). Il est de 2 %, ce qui est relativement faible mais confirme que la sonde conserve des propriétés de fluorescence après bioconjugaison.

La deuxième méthode explorée met en œuvre une réaction de chimie click entre la SubPc-CCH **16** et un peptide comportant un groupement azoture. La méthode orthogonale utilisée permet de réaliser la réaction sur un peptide déjà déprotégé et clivé de la résine (*schéma 67*). Dans ce cas, la réaction est suivie par HPLC (phase inverse). Elle révèle la formation de plusieurs produits, identifiés par spectrométrie de masse comme étant le composé **95** et ses formes oxydées. Le temps de réaction a donc été optimisé afin de former une quantité satisfaisante de composé cible tout en limitant la formation des sous-produits. Ainsi, les meilleures conditions consistent à réaliser le couplage à température ambiante sur une durée de 90 minutes. Le produit est obtenu avec 7 % de rendement après purification par HPLC semi-préparative.

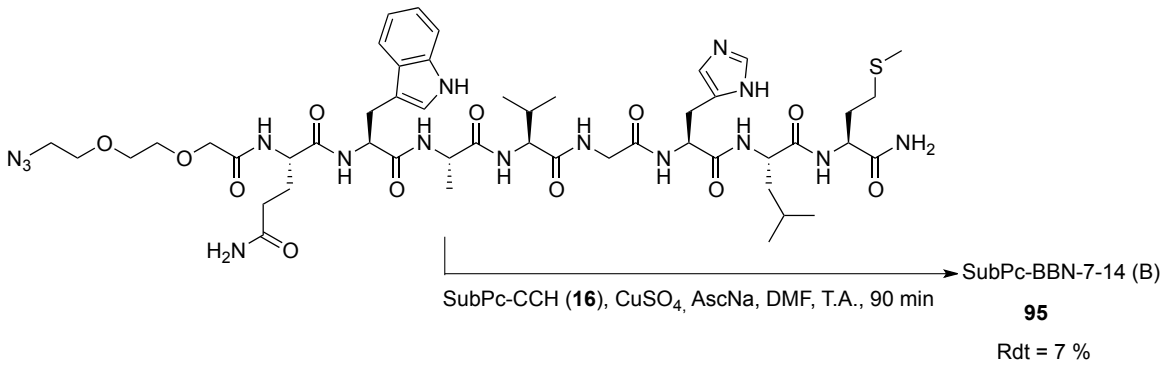


*Schéma 67 : Synthèse de la SubPc-BBN-7-14 **95** par réaction de chimie click*

Cependant, des études supplémentaires nous ont permis de montrer que ces composés se dégradent rapidement en milieux aqueux. En effet, les chromatogrammes HPLC réalisés à différents intervalles de temps laissent apparaître après quelques heures des pics de produits de dégradation. Après analyse par spectrométrie de masse, il est convenu que ce phénomène provient de la coupure de la liaison B-O. En effet, le spectre met en évidence la présence d'amas isotopiques attribuables au

fragment subphtalocyanine (SubPc-OH) ainsi qu'au motif peptidique associé au résidu phénol (SubBBN-EEAc-CONH-Ph-OH ou SubBBN-EEAc-triazole-CH_2-Ph-OH).

Nous avons vu dans le chapitre précédent que les subphtalocyanines présentaient des problèmes de stabilité liés à la réactivité des liaisons carbone-azote pontantes. Nous constatons ici une faible stabilité de la liaison apicale bore-oxygène. À ce stade, ces paramètres réduisent le potentiel des subphtalocyanines en tant que candidates pour la mise au point d'agents d'imagerie optique. Compte tenu de ces problèmes, nous avons alors envisagé une approche de biovectorisation plus avantageuse pour ce fluorophore.

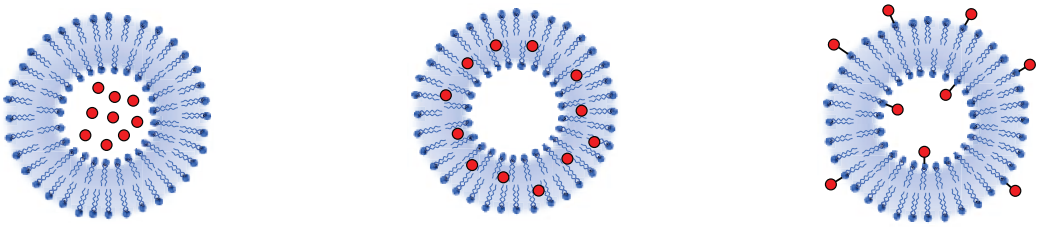
I.2. Incorporation de subphtalocyanines dans un liposome

Comme abordé dans l'introduction générale, les liposomes sont des vésicules permettant d'encapsuler et de vectoriser des agents d'imagerie hydrophobes. Ils permettent également de protéger l'agent des attaques du milieu biologique. Ce sont donc des transporteurs de choix pour les subphtalocyanines dont la stabilité chimique est faible. L'encapsulation dans un liposome de certaines des subphtalocyanines préparées précédemment a alors été étudiée.

I.2.1. Les liposomes

Les liposomes sont utilisés dans l'industrie pharmaceutique, notamment lorsque le médicament est peu compatible avec le milieu physiologique, dans un but de solubilisation, de protection vis-à-vis d'une dégradation enzymatique et de vectorisation (exemple : l'amphotéricine B, AmBisome®). Ils sont également utilisés en imagerie médicale pour l'encapsulation de substances fluorescentes ou radiomarquées et permettent de suivre l'accumulation de ces substances dans le corps étudié.[228]

Plusieurs modes d'incorporation d'un agent imageant à un liposome sont possibles (*figure 107*) :



Encapsulation dans le cœur aqueux

Encapsulation dans la bicouche (lumène)

Fonctionnalisation de surface

Figure 107 : Modes d'incorporation d'un agent imageant dans un liposome

* **Encapsulation dans le cœur aqueux** : cette méthode permet le passage de substances hydrosolubles à travers la barrière hydrophobe.
* **Encapsulation dans la bicouche**, dans le cas où le composé est hydrophobe.
* **Introduction en surface** par fonctionnalisation d'un phospholipide.

Les liposomes souffrent cependant de plusieurs inconvénients : le manque de spécificité pour une cible et l'instabilité *in vivo* (due à l'oxydation des phospholipides). Afin de pallier ces problèmes, de nouvelles « générations » de liposomes ont été développées (*tableau 22*) :

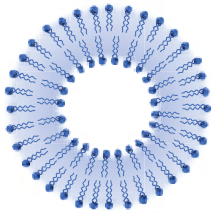
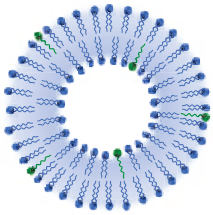
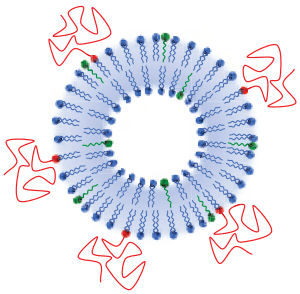
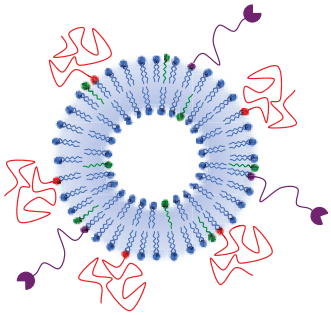
1ère génération		**2ème génération**	**3ème génération**
			
liposome simple	liposome stabilisé	liposome furtif	liposome vectorisé
phospholipide	cholestérol	chaîne PEG	biovecteur

Tableau 22 : Les différentes générations de liposome (de haut en bas : génération, structure du liposome, élément nouveau introduit)

* Les **liposomes de première génération** sont stabilisés par incorporation de cholestérol dans la bicouche.
* Les **liposomes de deuxième génération** possèdent des chaînes PEG en surface afin d'augmenter leur furtivité et donc de prolonger leur temps de résidence dans le corps en limitant les attaques du milieu biologique.
* Les **liposomes de troisième génération** combinent leur biodistribution naturelle (effet EPR) avec un ciblage spécifique grâce à l'introduction d'une unité de reconnaissance.

I.2.2. Types de liposome

Selon la méthode de préparation utilisée et les phospholipides mis en œuvre, plusieurs types de liposomes peuvent être obtenus. Ils se différencient notamment par leur taille, qui varie de 20 nm à plusieurs dizaines de micromètres, et par leur lamélarité (nombre de bicouches). Les vésicules unilamellaires (UniLamellar Vesicles, ULV) sont formées d'une seule bicouche concentrique. À

l'inverse, les vésicules multilamellaires (MultiLamellar Vesicles, MLV) comptent plusieurs bicouches concentriques.

En terme de taille, les vésicules géantes unilamellaires (Large Unilamellar Vesicles, LUV) sont des vésicules comprises entre 0,1 et 1 µm et les petites vésicules unilamellaires (Small Unilamellar Vesicles, SUV) ont une taille comprise entre 0,02 et 0,1 µm. Les vésicules multilamellaires mesurent quant à elles entre 0,2 et 100 µm. Il existe également des liposomes multivésiculaires qui sont formés de plusieurs petites vésicules emprisonnées dans une vésicule plus grosse.

Les liposomes qui nous intéressent ici sont constitués d'une simple bicouche de phospholipides et sont de petite taille (SUV). Il existe plusieurs méthodes pour les préparer, telles que l'hydratation d'un film de phospholipide ou la méthode à l'injection. Cette dernière est choisie parce qu'elle est plus simple à mettre en œuvre et donne lieu à une population de liposomes homogènes en taille. Elle consiste à « injecter », à l'aide d'une seringue, une solution concentrée de phospholipide et de sonde dans un tampon aqueux sous vive agitation. Elle est cependant limitée par deux inconvénients majeurs : une faible concentration finale en sonde obtenue et un faible taux d'incorporation.

D'autre part, les liposomes peuvent être purifiés afin d'éliminer le résidu de sonde non encapsulé. Parmi les techniques de purification existantes, ont retrouve notamment la centrifugation, la filtration, la dialyse ou la FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography). L'utilisation d'un extrudeur permet quant à lui d'homogénéiser la taille de la population à une valeur maximale donnée (selon le filtre choisi) en restructurant les vésicules de grosse taille et les multicouches de phospholipides.

Dans un premier temps, les liposomes préparés seront constitués de phospholipides simples (non fonctionnalisés) et ne seront ni purifiés ni extrudés. Le phospholipide utilisé est le 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) (*figure 108*).

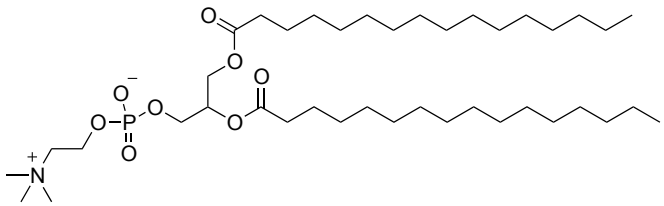


Figure 108 : Structure du 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)

Sa température de transition de phase, température au delà de laquelle il est capable de s'organiser sous forme d'un liposome, est de 41,4°C. C'est pourquoi l'injection est réalisée à une température supérieure à cette valeur (50°C).[229]

I.2.3. Incorporation de subphtalocyanines dans un liposome de première génération

Plusieurs des subphtalocyanines synthétisées ont été incorporées dans un liposome (*figure 109*).

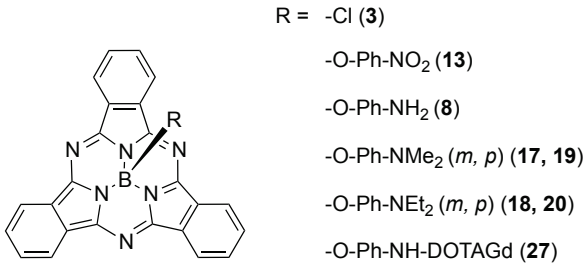


Figure 109 : Structure des subphtalocyanines encapsulées dans un liposome

La méthode générale de formation du liposome et d'encapsulation de la sonde est donnée en partie annexe dans la section dédiée aux modes opératoires (B4).

L'analyse comparative par spectroscopie d'absorption et fluorimétrie permet de prouver l'incorporation dans le liposome. À titre d'exemple, les superpositions des spectres d'absorption ou d'émission de la SubPc **13** dans le THF, dans l'eau (contenant 1 % d'éthanol et de THF) ou dans le liposome (PBS) sont présentées sur la *figure 110*.

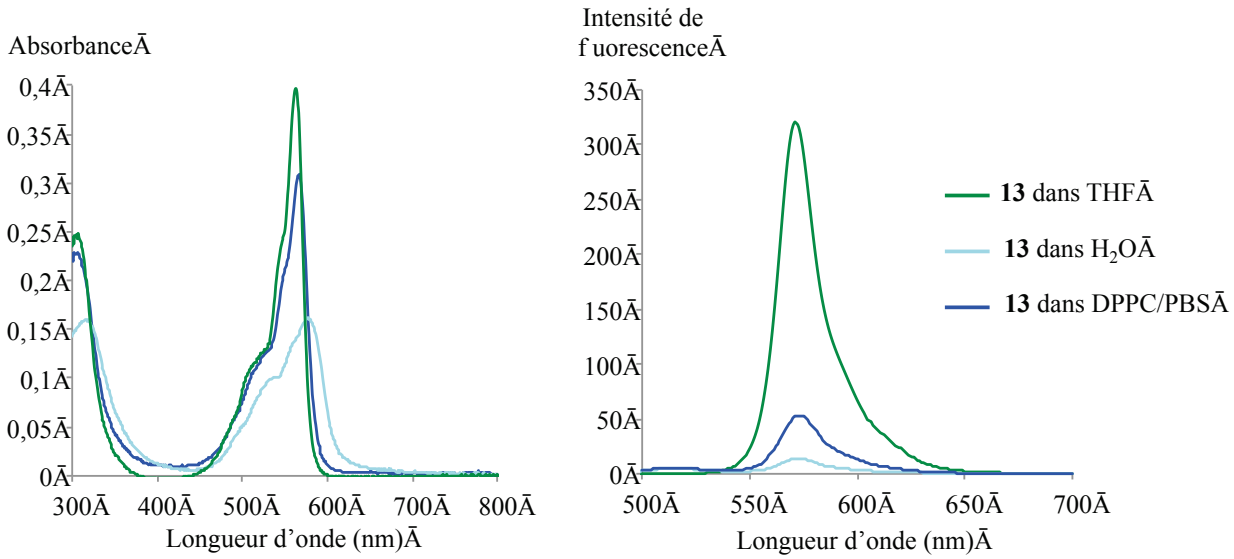


*Figure 110 : Courbes d'absorption (gauche) et d'émission (droite) de la SubPc-NO_2 (**13**) dans le THF, dans l'eau et dans un liposome de DPPC (PBS)*

Les courbes associées à la solution liposomiale (bleu foncé) présentent une restauration partielle des propriétés optiques du composé par rapport à la solution aqueuse (bleu clair). Ceci confirme que la subphtalocyanine se trouve dans un environnement organique pour lequel l'agrégation et l'extinction de fluorescence sont réduites, soit dans la bicouche du liposome.

Par la suite, les liposomes ont été étudiés et caractérisés par différentes techniques afin d'établir leurs propriétés, notamment leur taille, mais également leur fluorescence ou leur relaxivité dans le cas de l'espèce contenant du gadolinium.

I.2.4. Caractérisation des liposomes

Les liposomes ont été caractérisés en terme de taille par diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering, DLS) et par microscopie électronique en transmission (Transmission Electron Microscopy). Le diamètre hydrodynamique a été mesuré en DLS dans le solvant de préparation (tampon). Les liposomes encapsulant la SubPc-NO_2 (**13**) possèdent un diamètre moyen de 21 nm (*figure 111*).

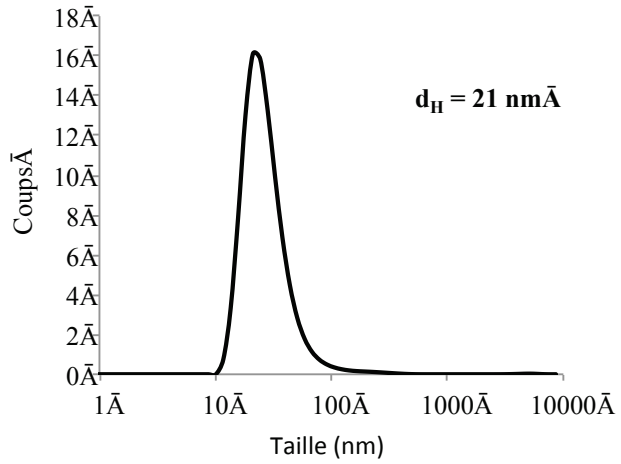


*Figure 111 : Courbe DLS (en taille) de la solution liposomiale contenant la SubPc **13***

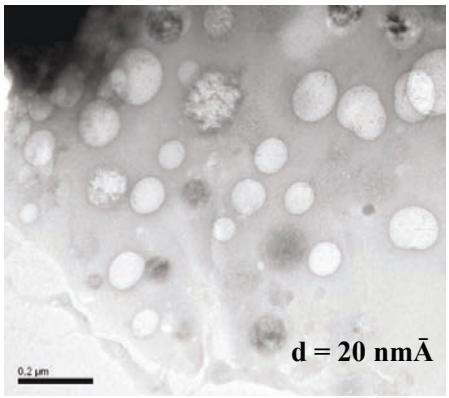


*Figure 112 : Image TEM de la solution liposomiale contenant la SubPc **13***

Il existe deux méthodes pour visualiser des liposomes en TEM. La première, la cryo-TEM, pour laquelle l'échantillon est refroidi, permet de visualiser les membranes des vésicules en noir et le centre aqueux en blanc. Lorsque les images sont réalisées sur un équipement ne possédant pas de système de refroidissement à basse température, il est possible d'utiliser un sel métallique, comme le molybdate d'ammonium, qui va conduire à un assombrissement de l'image. Le liposome, qui n'incorpore pas le métal, va alors apparaître en blanc, comme c'est le cas sur la *figure 112*. Cette méthode est dite de marquage en contraste noir. La mesure manuelle du diamètre de plusieurs vésicules permet d'estimer un diamètre moyen de 20 nm dans le cas de ces liposomes. Selon la nature de la subphtalocyanine encapsulée, la taille du liposome pourra varier de quelques nanomètres voir dizaines de nanomètres.

I.2.5. Mesure des propriétés dans le liposome

Etant donné qu'ici les liposomes ne sont pas purifiés, il est évident que les solutions liposomiales préparées contiennent de la sonde encapsulée, mais également de la sonde libre qui n'a pas été incorporée dans la bicouche. Il est dans ce cas impossible de calculer les valeurs de rendement quantique de fluorescence des subphtalocyanines dans le liposome. C'est donc des valeurs d'intensité de fluorescence par unité d'absorption (I/Abs) qui sont présentées dans le paragraphe suivant, l'absorption étant mesurée à la longueur d'onde d'excitation.

I.2.5.1. Cas des subphtalocyanines simples

Les émissions de fluorescence des solutions liposomiales de subphtalocyanines **3** et **13** ont été mesurées dans le sérum physiologique (sérum φ = 0,9 % NaCl dans l'eau) et comparées aux valeurs dans le même tampon sans utilisation de DPPC. Les résultats sont présentés dans le *tableau 23*.

	Sondes	Solvant	**I/Abs**
3	SubPc-Cl	THF	298 133
		EtOH/THF/sérum φ (1:1:98 v/v/v)	37 250
		Solution liposomiale (sérum φ)	111 667
13	SubPc-O-Ph-NO_2	THF	190 375
		EtOH/THF/Tampon NaCl (1:1:98 v/v/v)	12 936
		Solution liposomiale (sérum φ)	96 243

*Tableau 23 : Rendements quantiques de fluorescence des SubPc **3** et **13** dans le THF, en solution aqueuse et en solution liposomiale (DPPC/ sérum φ)*

Ces mesures mettent en évidence que les SubPc présentent une émission de fluorescence lorsqu'elles sont encapsulées dans un liposome. La fluorescence en solution liposomiale est supérieure à celle observée en milieux aqueux, ce qui traduit de l'effet bénéfique de l'encapsulation. Notons que l'intensisté de fluorescence mesurée dans ce dernier cas correspond à un mélange de sonde encapsulée et non encapsulée dans le liposome. Ce qui explique en partie pourquoi cette fluorescence reste plus faible qu'en milieu purement organique (THF).

I.2.5.2. Cas des subphtalocyanines activables

Le même type de mesures a été réalisé sur les solutions liposomiales des subphtalocyanines activables. Dans ce cas, la nature du tampon utilisé, notamment son pH, va avoir une influence sur l'intensité de fluorescence de la sonde. Notons qu'il est établi que les protons sont capables de

diffuser du milieu de solvatation vers le centre aqueux du liposome, en passant à travers la bicouche. Ils sont donc aptes à protoner un composé présent dans cette bicouche hydrophobe.

Les intensités de fluorescence mesurées pour une même concentration en SubPc de solutions liposomiales des composés **8**, **19** et **20** sont présentées dans le *tableau 24*.

	Sondes	pH de la solution liposomiale	I/Abs	$pH_{½}$
8	SubPc-O-Ph-NH_2 (*p*)	2,6 8	71 671 392	< 3
19	SubPc-O-Ph-NMe_2 (*m*)	2,6 8	38 245 867	< 3
20	SubPc-O-Ph-NEt_2 (*m*)	2,6 8	49 931 1 268	< 3

*Tableau 24 : Intensité de fluorescence divisée par l'absorption et pH de demi-activation des SubPc **8**, **19** et **20** en solution solution liposomiale à pH 2,6 et 8*

Le phénomène d'activation est observé car la fluorescence est supérieure pour les solutions liposomiales préparées en milieu acide par rapport à une préparation en milieu basique. Cependant, il était attendu que le pH de demi-activation corrèle avec le pKa des anilines concernées, ce qui n'est pas le cas. Ce qui avait été observé en milieu organique (Chapitre I - Partie I) est retrouvé ici dans le cas des solutions liposomiales. Les sondes activables mises au point à partir d'alkyles anilines ne s'activent pas aux pH attendus, et ceci pour une raison qui reste ici encore inexpliquée.

I.2.5.3. Cas de la SubPc-DOTAGd

Dans le cas du complexe de gadolinium (SubPc-DOTAGd **27**), nous avons souhaité déterminer si la mise en solution liposomiale conduisait à une modification de la relaxivité. Comme précédemment, le liposome ne sera pas purifié et la mesure sera donc réalisée sur un mélange de sondes encapsulées et non encapsulées. Ainsi, la valeur obtenue ne sera pas la valeur juste de relaxivité, mais traduira de l'effet bénéfique, ou non, de l'encapsulation dans le liposome. D'autre part, comme la SubPc-DOTAGd **27** est un composé amphiphile, on suppose que l'encapsulation dans la bicouche ne sera pas complète. En effet, il est probable que le fragment chélatant, de par son hydrophilicité, se place en surface du liposome tandis que le cœur subphtalocyanine hydrophobe se positionne dans la bicouche (*figure 113*).

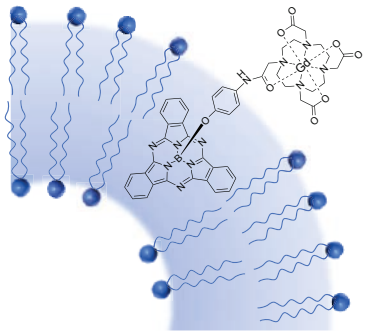


*Figure 113 : Mode d'incorporation supposé de la SubPc-DOTAGd **27** dans le liposome*

La mesure de relaxivité permettra de confirmer cette hypothèse, car si la sonde est totalement encapsulée, l'accès de la molécule d'eau sera limité et la relaxivité longitudinale sera ainsi diminuée. Dans le cas d'une encapsulation partielle, la valeur de relaxivité sera supérieure à celle du ligand seul en solution, la taille de l'objet modifiant le temps de corrélation rotationnel.

Ce phénomène a déjà été démontré dans la littérature (cf introduction générale).[63a] Si la valeur est inchangée, cela supposera que le composé ne s'encapsule pas dans le liposome, ou que l'incorporation dans la vésicule n'a aucun effet sur la relaxivité.

Un problème se pose cependant pour les mesures de relaxivité. La méthode de formation du liposome (méthode à l'injection) conduit à une concentration maximale en gadolinium de 5 mM, inférieure à la concentration habituellement utilisée pour ce type de mesure (20-100 mM). Un pré-requis consiste à vérifier s'il est possible de déterminer une valeur de relaxivité dans cette gamme de concentration (1-5 mM), qui se trouve proche de la limite de quantification de la méthode. Pour cela, nous avons recalculé la relaxivité du composé **27** dans le mélange DMSO/H_2O (5:95 v/v) aux concentrations d'intérêt (*schéma 68*).

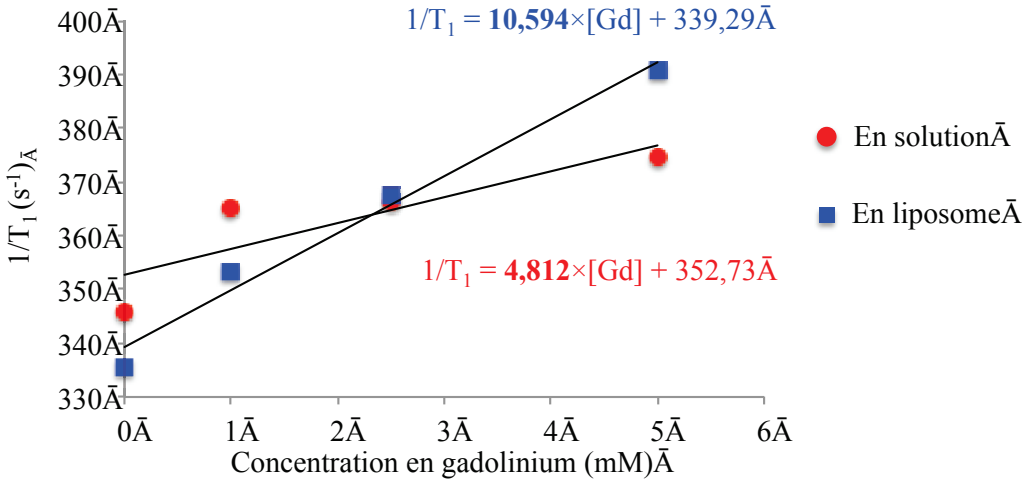


*Schéma 68 : Inverse du temps de relaxation longitudinal de la SubPc-DOTA-Gd **27** en solution ou en liposome en fonction de la concentration en gadolinium*

La valeur obtenue (4,81 $mM^{-1}.s^{-1}$) est proche de celle précédemment calculée pour des concentrations de l'ordre de 100 mM (chapitre I, 4,2 $mM^{-1}.s^{-1}$). Cette méthode s'applique donc pour la mesure dans la gamme de concentration visée. Nous avons alors mesuré la vitesse de relaxation dans le cas de la solution liposomiale, puis calculé la relaxivité longitudinale.

Le résultat obtenu est de 10,59 $mM^{-1}.s^{-1}$. Le liposome a donc bien l'effet bénéfique attendu sur la relaxation des protons des molécules d'eau de la SubPc-DOTAGd **27**. Ces résultats confirment également que la partie DOTA-Gd se place en surface du liposome.

I.3. Vectorisation du liposome par un peptide

Par la suite, nous avons souhaité augmenter la sélectivité du liposome pour une cible biologique. Pour cela, nous avons cherché à mettre au point un liposome encapsulant vectorisé par un peptide. Comme nous l'avons vu précédemment, ce type de liposome (liposome de 3ème génération) est de plus en plus utilisé afin de diriger la vésicule vers la cible biologique d'intérêt, car il pallie le manque de spécificité des liposomes simples.

I.3.1. Stratégies de vectorisation

Pour introduire une fonctionnalité à la surface du liposome, il est nécessaire de synthétiser un composé amphiphile qui pourra s'organiser de la même manière que le phospholipide, tout en présentant la fonction d'intérêt. Dans notre cas, nous avons choisi de modifier le cholestérol pour introduire le groupement permettant la conjugaison avec le dérivé bombésine. Cette approche est généralement plus simple que de concevoir un phospholipide modifié, la chimie de ces composés étant relativement difficile à maîtriser.

Deux stratégies ont été envisagées pour obtenir la particule voulue (*schéma 69*). La première consiste à préparer le liposome à partir du DPPC et du stérol fonctionnel, puis à coupler le peptide à la surface de la vésicule ainsi formée (post-conjugaison). La deuxième vise à tout d'abord préparer l'adduit stérol-BBN puis former le liposome avec le précurseur obtenu (pré-conjugaison).

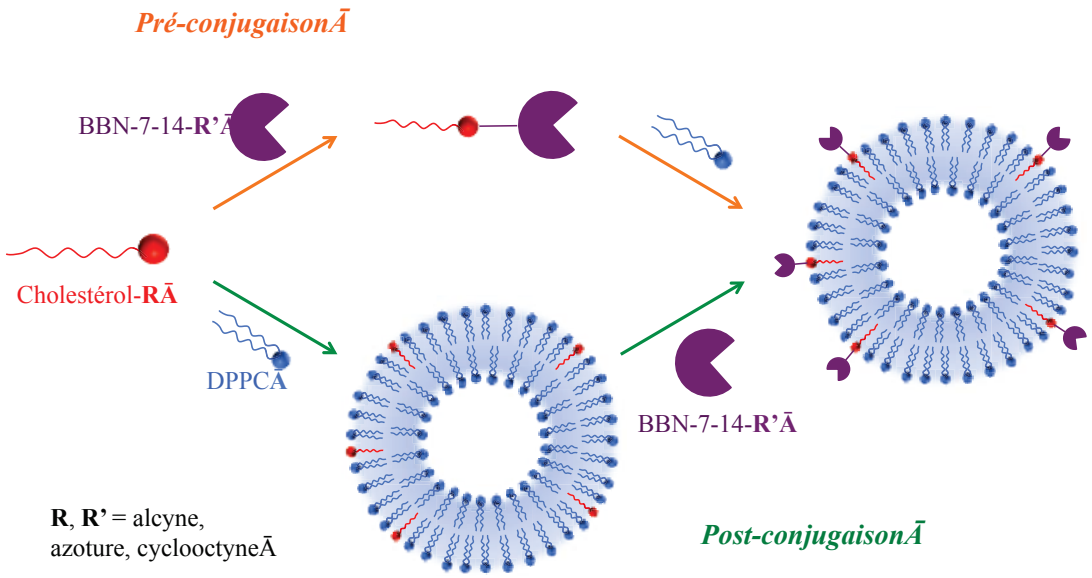


Schéma 69 : Les deux chemins d'accès envisagés pour la préparation du liposome bioconjugué avec un peptide : pré- et post-conjugaison

Les deux voies possibles ont été explorées. Elles débutent par la préparation du stérol fonctionnel. La fonction introduite est un alcyne ou un azoture, la méthode de couplage envisagée étant la chimie click.

I.3.2. Synthèse de stérols fonctionnels

La fonctionnalisation est réalisée par modification chimique de l'alcool secondaire du cholestérol. Afin de conserver le caractère amphiphile du composé, indispensable à la bonne organisation au sein du liposome, la stratégie consiste à introduire le groupement de choix par quaternisation d'une amine secondaire (*schéma 70*).[230]

Il est donc tout d'abord nécessaire de préparer un dérivé cholestérolique comportant un halogène. Pour cela, le cholestérol est condensé sur le chlorure de bromoacétyle dans le THF à reflux pendant 90 minutes.[231] Le dérivé **96** est alors isolé par précipitation et recristallisation avec 65 % de rendement. Il peut ensuite être utilisé pour quaterniser la diméthylpropargylamine ou la 2-azido-N,N-diméthyléthanamine. Les deux composés cibles sont obtenus avec 78 % (alcyne **97**) et 13 % (azoture **98**) de rendement.

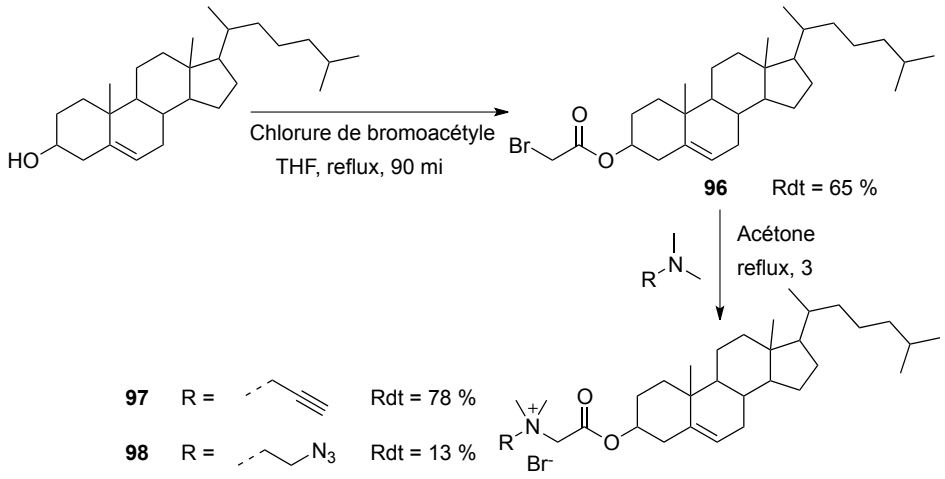


Schéma 70 : Synthèse des cholestérols fonctionnalisés par un groupement alcyne ou azoture

Les deux dérivés stéroliques **97** et **98** ainsi que les intermédiaires de synthèse on pu être caractérisés par les techniques de spectroscopie et spectrométrie usuelles (RMN ^{1}H, RMN ^{13}C et ESI). La superposition des spectres du cholestérol, de l'intermédiaire **96** et de l'alcyne **97** est présentée sur la *figure 114*.

La première étape d'alkylation se traduit par le déblindage du signal du proton porté par le carbone en alpha de l'atome d'oxygène (a) ainsi que par la présence d'un singulet correspondant aux protons du méthylène du groupement bromoacétyle (h). Le spectre de RMN du produit quaternisé **97** présente les signaux du groupement introduit : un singulet pour les protons du méthylène en alpha de l'alcyne (i ou k), un singulet pour les protons des méthyles (j) et un triplet de constante de couplage d'ordre 4 pour le proton de l'alcyne (l).

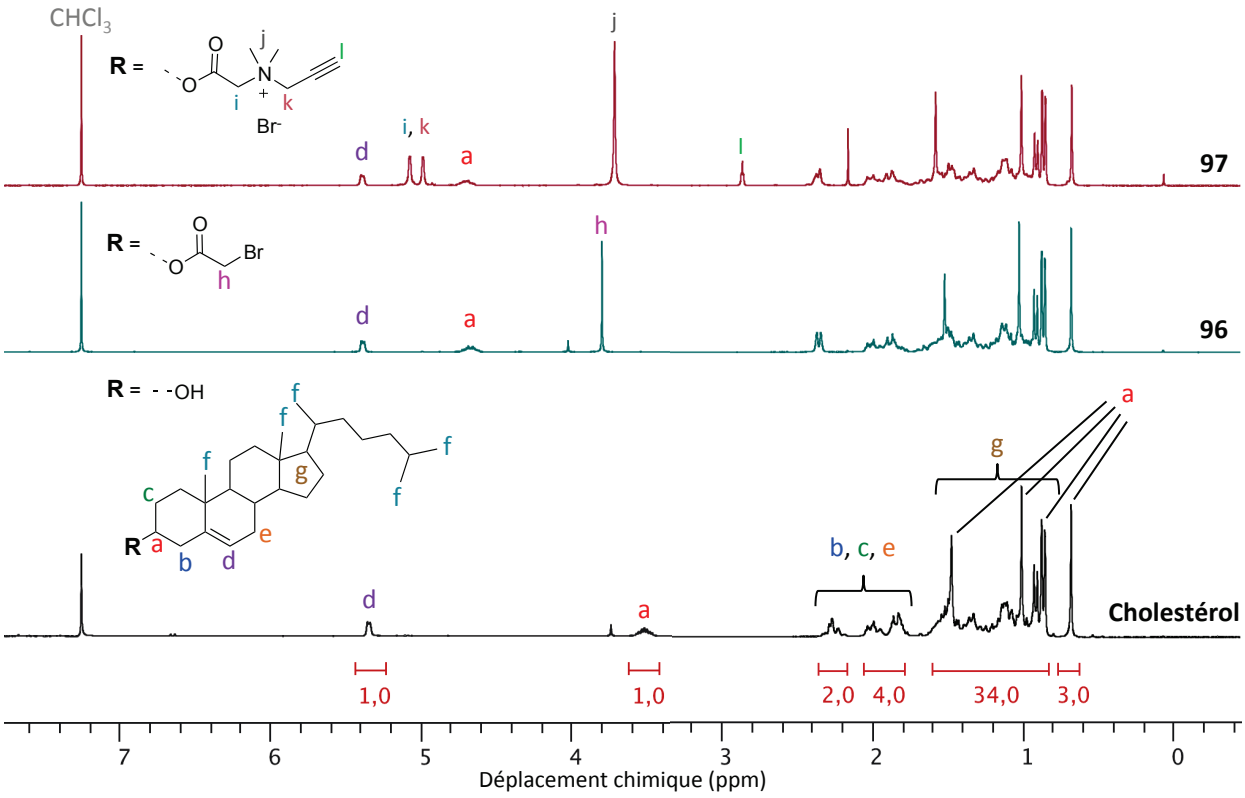


*Figure 114 : Superposition des spectres de RMN du cholestérol et des composés **96** et **97***

Notons que la 2-azido-N,N-diméthyléthanamine **100** a été préparée en trois étapes à partir du N,N-diméthylaminoéthanol (*schéma 71*).

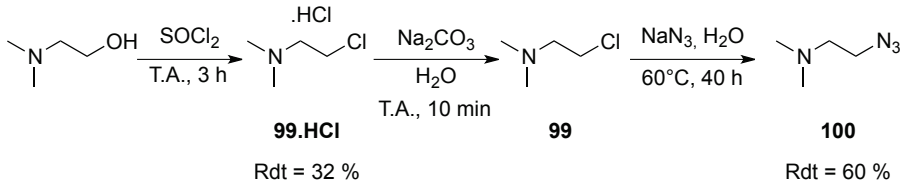


*Schéma 71 : Synthèse du 2-azido-N,N-diméthyléthanamine **100***

La première consiste à préparer le dérivé chloré **99** par action du chlorure de thionyle, qui est isolé sous la forme d'un sel de chlorhydrate (**99.HCl**). Un retour base est ensuite réalisé par traitement au carbonate de sodium, puis la substitution nucléophile du chlore par un azoture permet d'obtenir l'amine **100** avec un rendement global sur les trois étapes de 19 %.

I.3.3. Pré-conjugaison

Comme mentionné précédemment, cette stratégie consiste tout d'abord à coupler le cholestérol avec le dérivé peptidique, puis dans un deuxième temps à former le liposome.

I.3.3.1. Couplage du stérol avec la bombésine

Deux méthodes de chimie click ont pu été appliquées pour obtenir l'adduit stérol-BBN (*schéma 72*). La première, qui utilise du cuivre, est la même que celle mise en œuvre lors de la conjugaison de la SubPc-alcyne avec le bombésine-7-14. Elle consiste à condenser le même dérivé peptide contenant un groupement azoture avec le cholestérol **97**. Après 4 heures de réaction à température ambiante, le produit est purifié par HPLC semi-préparative. Il est obtenu avec 31 % de rendement et 93 % de pureté HPLC.

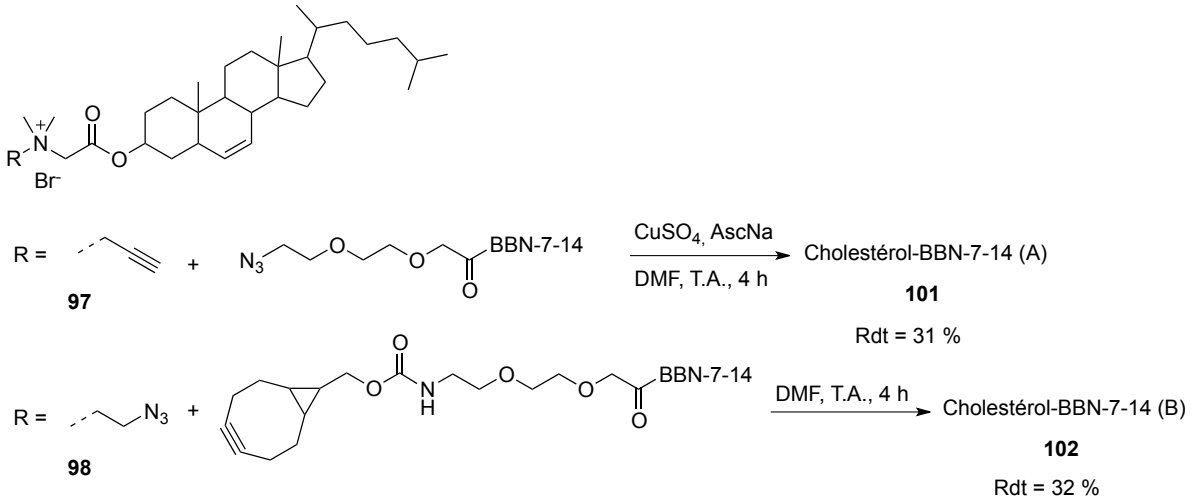


*Schéma 72 : Synthèse des conjugués cholestérol-bombésine-7-14 par chimie click avec cuivre (**101**) ou sans cuivre (**102**)*

La deuxième méthode, qui est une réaction de chimie click sans cuivre, utilise un peptide fonctionnalisé par un groupement cyclooctyne et le cholestérol-azoture **98**. Après 3 heures de réaction à 30°C, l'adduit Cholestérol BBN-7-14 (B) **102** a été purifié de la même manière que précédemment, et obtenu avec 32 % de rendement. Ces deux composés ont également été identifiés par spectrométrie de masse (ESI ou MALDI-TOF).

I.3.3.2. Préparation du liposome

À partir des dérivés peptidiques obtenus, nous avons alors cherché à former le liposome. La méthode à l'injection utilise donc cette fois un mélange de DPPC et de stérol-BBN (20:1), ainsi que de la subphtalocyanine **13** (SubPc-NO_2).

Les analyses par DLS des suspensions liposomiales obtenues indiquent que les particules formées possèdent un diamètre important (500-1500 nm), ce qui ne concorde pas avec les résultats précédemment obtenus. La présence du fragment peptidique semble donc nuire à la formation du liposome. Ainsi, la méthode de post-fonctionnalisation est probablement plus adéquate pour obtenir la particule voulue. Cette voie de synthèse a alors été étudiée.

Notons que même si la méthode de pré-fonctionnalisation s'est montrée inadaptée, elle a permis de confirmer que les dérivés stéroliques étaient aptes à réagir avec les peptides fonctionnels. De plus, la purification puis l'étude de ces produits va également permettre de déterminer si l'ajout du fragment stérolique conduit à la baisse d'affinité du peptide.

I.3.3.3. Tests d'affinité

Le test d'affinité compétitif des récepteurs à la bombésine du conjugué **98** a été effectué par une société extérieure à notre laboratoire (CEREP). Le composé de référence (contrôle) utilisé est un peptide de type bombésine-1-14 marqué à l'iode-125 et qui possède une IC_{50} de 0,21 nM. La courbe de l'activité spécifique du contrôle par rapport à la concentration ajoutée en produit (**98**) est présentée *figure 115*. Cette courbe permet de déterminer une IC_{50} pour le Stérol-BBN-7-14 (B) **98** de 13,9 nM. La fonctionnalisation du peptide conduit donc à une baisse d'affinité vis-à-vis des récepteurs à la bombésine. Mais ce dérivé peptidique reste tout de même suffisamment affin pour l'utilisation visée.

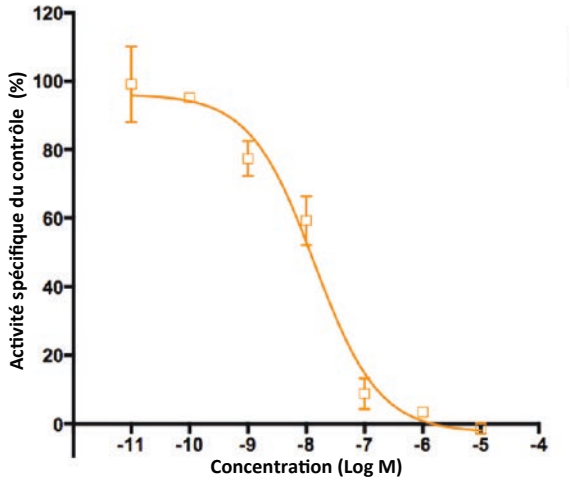


*Figure 115 : Courbe d'IC_{50} du composé **98***

I.3.4. Post-conjugaison

I.3.4.1. Préparation et purification des liposomes fonctionnels

Pour cette méthode, nous avons priorisé la méthode par chimie click sans cuivre. Le liposome préparé est fonctionnalisé en surface par des groupements azotures. Il est obtenu par la méthode à l'injection en utilisant le DPPC, le cholestérol-azoture **98** (ratio molaire 1:20) et la SubPc-NO_2 **13** (*schéma 73*).

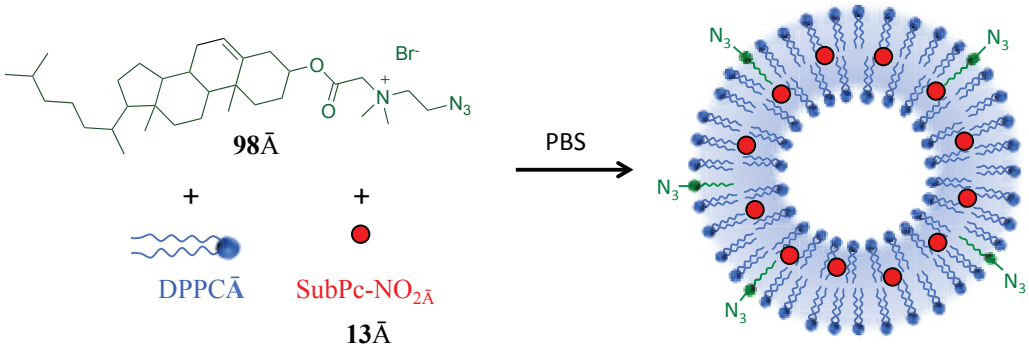


Schéma 73 : Préparation du liposome fonctionnalisé en surface par des groupements azotures

Pour garantir un bon déroulement de la réaction de biconjugaison entre le peptide et le liposome, ce dernier est purifié pour éliminer d'éventuelles molécules libres de stérol non incorporées dans la bicouche. La purification est réalisée par chromatographie liquide pour protéine (Fast Protein Liquid Chromatography, FPLC), équipée d'une colonne type Hi-Trap. C'est une colonne d'exclusion stérique qui va permettre de retenir les petites molécules de moins de 3 kDa alors que les objets de taille supérieure seront rapidement élués. L'éluant utilisé est le PBS (pH =7,4) et la détection peut être faite par UV-Vis ou par conductimétrie. Le chromatogramme de la purification est présenté *figure 116*.

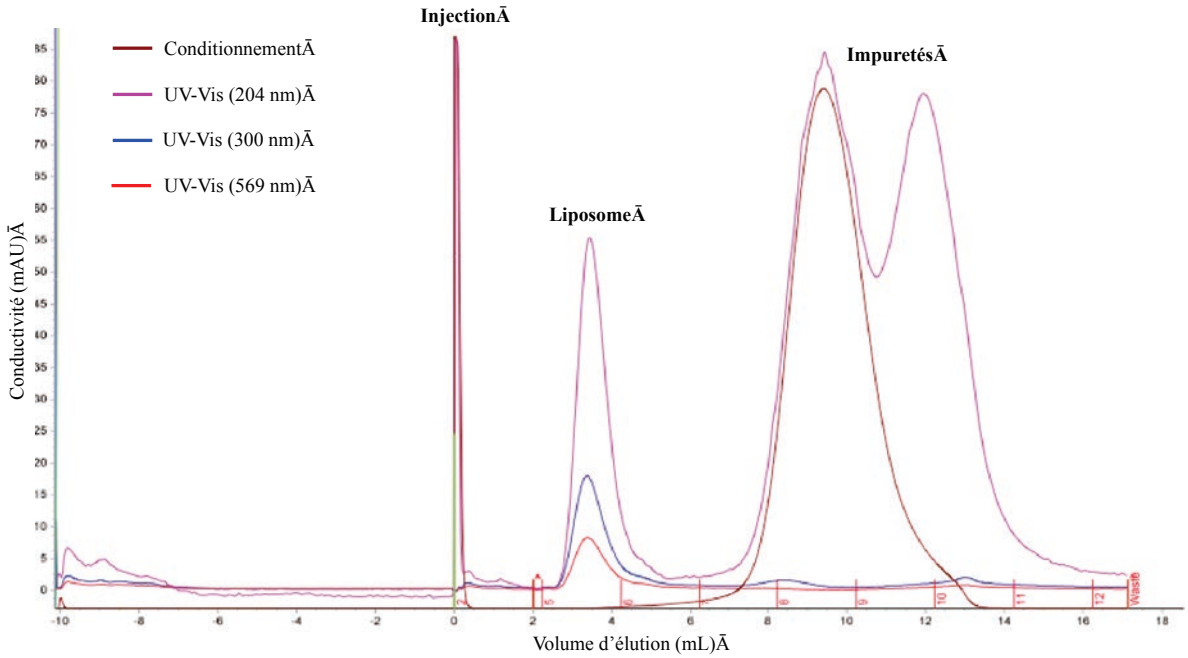


*Figure 116 : Chromatogramme FPLC de la purification du liposome (DPPC - Cholestérol-N_3 **98** - SubPc-NO_2 **13**)*

Il est ainsi possible de purifier le liposome, qui est élué à partir de trois minutes tandis que les petites molécules (DPPC, SubPc, Chol-N_3, solvants organiques) sont éliminées à partir de sept minutes. Le liposome pur peut ensuite être caractérisé par les différentes techniques déjà utilisées précédemment.

I.3.4.2. Taille, taux d'incorporation et stabilité du liposome

La taille du liposome purifié a été évaluée par DLS. Elle est plus importante que dans le cas des liposomes non fonctionnels (DPPC seul). En effet l'ajout du cholestérol modifié conduit à des particules de 67,91 ± 10,19 nm de diamètre hydrodynamique.

Contrairement aux liposomes non purifiés, il est possible de déterminer par UV-visible le taux d'encapsulation de sonde, car la solution est exempte de SubPc non encapsulée. Pour cela, les fractions collectées après purification sont lyophylisées, puis le résidu est repris dans du DCM et l'absorbance de la solution est mesurée (*figure 117*).

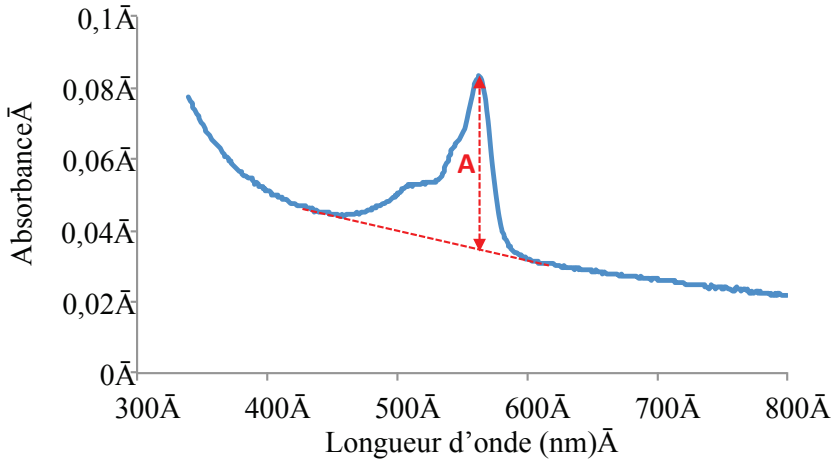


Figure 117 : Spectre d'absorption du liposome fonctionnalisé par des azotures et contenant la SubPc-NO_2 ***13*** *après purification par FPLC et lyophilisation*

À partir du volume de solution injecté en FPLC et de sa concentration en SubPc, il est ainsi possible de retrouver le pourcentage de subphtalocyanine incorporé dans la bicouche (taux d'encapsulation T) (*équation 5*).

$$T = \frac{n(incorporé)}{n(initiale)} \times 100$$

Avec

$$n(incorporé) = \frac{V \times A}{\varepsilon \times l}$$

et

$$n(initiale) = V(purifiée) \times c(initiale)$$

T : taux d'encapsulation (%)

V : volume de DCM pour solubilisation après lyophilisation (L)

A : absorption dans le DCM (à 565 nm)

ε : coefficient d'extinction molaire de la Sub-NO_2 ($mol^{-1}.L.cm^{-1}$)

l : largeur de cuvette (cm^{-1})

V(purifié) : volume injecté en FPLC (L)

c(initiale) : concentration en SubPc-NO_2 de la solution liposomiale injectée en FPLC ($mol.L^{-1}$)

*Équation 5 : Calcul du taux d'incorporation de la subphtalocyanine **13** dans le liposome*

Le taux d'encapsulation ainsi determiné est de 13 %, ce que seule une faible quantitée de la SubPc engagée s'incorpore dans le liposome.

Comme la prochaine étape consiste à coupler le liposome avec le peptide par chimie click sans cuivre, il nous a été nécessaire d'évaluer la stabilité du liposome en solution sur la durée de la réaction. Nous avons donc suivi l'évolution de taille du liposome par DLS. Au bout de 18 heures, le diamètre hydrodynamique moyen augmente de 2 nm. Cette faible évolution traduit une bonne stabilité du nano-objet.

I.3.4.1. Couplage avec le peptide

La bioconjugaison du liposome par la bombésine a été réalisée dans le PBS (*schéma 74*).

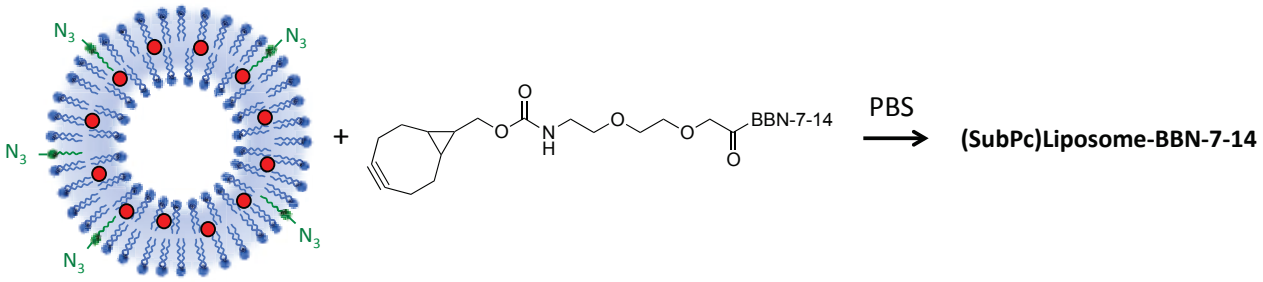


*Schéma 74 : Post-conjugaison du liposome contenant la SubPc **13** et fonctionnalisé par des azotures par chimie click sans cuivre*

Le succès de la réaction est vérifié en analysant par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) un aliquot lyophilisé de la solution liposomiale. La présence de l'amas isotopique correspondant au produit de couplage entre le cholestérol-azoture et la BBN-7-14-cyclooctyne confirme que la réaction a bien lieu. Cependant, elle est relativement lente, car il reste du produit de départ même après 24 heures de réaction (suivi HPLC).

I.4. Conclusion

Dans cette partie, notre objectif principal a été de vectoriser des subphtalocyanines en vue d'obtenir un agent d'imagerie optique. La première stratégie, qui a consisté à lier de manière covalente le fragment fluorescent à un dérivé peptidique, la bombésine-7-14, s'est révélée réalisable. Cependant, le système obtenu est peu stable notamment en raison de la coupure de la liaison bore-oxygène. Pour pallier ce problème, nous avons incorporé des SubPcs dans un liposome, connu pour protéger le composé encapsulé du milieu environnant et pour favoriser la biodistribution. Différentes sondes hydrophobes ou amphiphiles ont été mises en solution liposomiale, dans laquelle leurs propriétés (fluorescence, relaxivité) sont parfois améliorées.

Afin de favoriser la biodistribution du liposome, des essais préliminaires d'association avec un biovecteur ont été réalisés. La post-conjugaison, nécessitant de préparer un liposome fonctionnel (présence d'azotures en surface), s'est révélée plus adaptée que la pré-conjugaison. D'autre part, la méthode de couplage orthogonale choisie permet de réaliser la conjugaison sans dénaturation de la vésicule. De plus, le peptide associé au dérivé stérolique conserve son affinité pour sa cible. Un premier liposome vectorisé encapsulant notre fluorophore a donc ainsi été obtenu.

Il serait cependant nécessaire de purifier par FPLC les premiers liposomes préparés, afin de déterminer les valeurs exactes de rendement quantique de fluorescence et de relaxivité. De plus, des suivis (UV-visible, masse) pourraient également être réalisées sur les solutions liposomiales afin de vérifier que la SubPc présente une meilleure stabilité lorsque elle est encapsulée dans la bicouche.

Des travaux futurs consisteront à reproduire la post-bioconjugaison du liposome encapsulant la sonde. L'objet obtenu pourra alors être étudié par imagerie cellulaire afin de mettre en évidence l'apport bénéfique de la présence du vecteur.
La stratégie établie pourra également être reproduite dans le cas d'autres fluorophores, comme par exemple les phtalocyanines ou les BFA-BODIPY.

D'autre part, il a été montré dans la littérature en série BODIPY que la fonctionnalisation sur l'atome de bore en utilisant un lien de type bore-oxygène conduisait à des composés relativement peu stables. Ce problème à cependant pu être contourné, notamment par l'équipe de R. Ziessel, en introduisant la fonctionnalité via un groupement éthynyle, la liaison bore-carbone étant plus stable.[232]

Dans le cas des subphtalocyanines, des travaux récents réalisés par le même groupe ont montré que ce type de fonctionnalisation est transposable et profitable à ce fluorophore.[182a] Une alternative synthétique aux SubPc fonctionnelles préparées consiste donc à introduire la fonction de greffage en position apicale en utilisant un lien bore-carbone de type éthynyle (*figure 118*). Une telle sonde sera alors plus adaptée pour l'association avec le peptide.

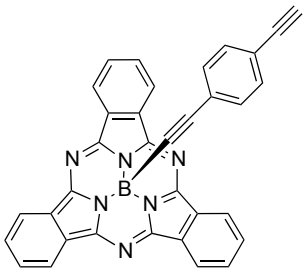


Figure 118 : Exemple de SubPc fonctionnelle avec une fonctionnalisation apicale stable

Partie II : Imagerie cellulaire de subphtalocyanines

Plusieurs subphtalocyanines sous forme libre ou en solution liposomiale déjà préparées ont été utilisées pour imager des cellules du mélanome (B16F10) par fluorescence. Les composés étudiés sont présentés *figure 119*.

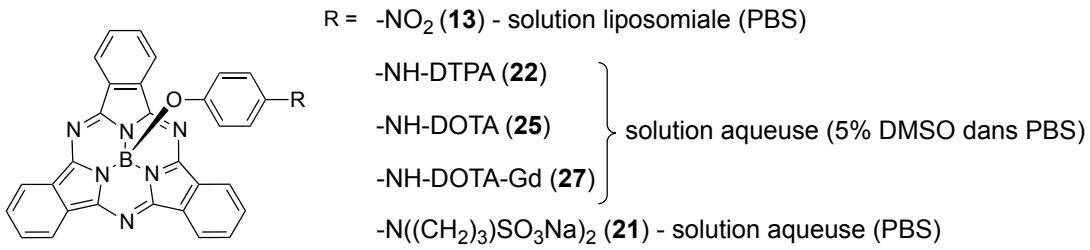


Figure 119 : Structure des subphtalocyanines étudiées sur cellule et en microscopie de fluorescence

Deux techniques de microscopie ont été étudiées, à savoir la microscopie confocale et la microscopie biphotonique.

II.1. Culture cellulaire et méthode d'incorporation

La méthode de culture cellulaire, d'incorporation de la sonde et de fixation des cellules est la suivante : les cellules ont été cultivées dans le RPMI supplémenté en sérum de veau fœtal avec 1% de streptavidine ; pour préparer la plaque de microscopie, le milieu de culture est remplacé par un mélange de RPMI (non supplémenté) et de solution de subphtalocyanine ; les cellules sont alors incubées pendant 1 heure, puis rincées plusieurs fois avec du PBS afin d'éliminer l'excès de sonde non incorporé ; elles sont ensuite fixées au méthanol froid (-30°C) puis rincées au PBS et finalement observées par microscopie de fluorescence. La concentration obtenue en sonde est généralement de 10 µM.

II.2. Toxicité et stabilité

La toxicité des sondes étudiées a été évaluée par un test colorimétrique au tétrazolium (test MTT).[233] Cela consiste à incuber les cellules en présence de différentes concentrations de sonde pendant 6 heures, puis à rajouter la solution de MTT et à incuber à nouveau pendant 2 heures. Les cellules saines vont alors métaboliser le tétrazolium en formazan. Le milieu est ensuite remplacé par du DMSO qui solubilise le formazan dont l'absorbance est alors mesurée à 570 nm.

Le test permet de déterminer que les subphtalocyanines ne sont pas toxiques pour les cellules incubées à la concentration mise en œuvre pour la microscopie (10-100 µM), et même à des concentrations supérieures (jusqu'à 1 mM).

D'autre part, nous avons vu précédemment que les SubPcs présentaient une faible stabilité chimique. Nous avons donc cherché à savoir si ces sondes sont suffisamment stables pour réaliser l'incorporation cellulaire et les études de microscopie. Pour cela, une solution de SubPc (SubPc-DOTAGd **27**) dans le DMSO est mélangée avec du RPMI et l'absorption à 565 nm est suivie dans le temps (*figure 120*).

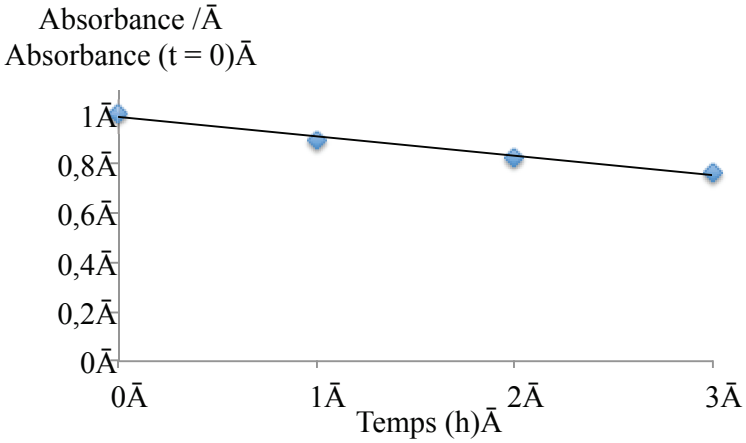


*Figure 120 : Stabilité de la SubPc **30** dans le RPMI*

Dans l'échelle de temps de l'incubation (1 heure), la perte d'absorbance représente 10 %. La stabilité est donc considérée comme suffisante pour incorporer la sonde puis imager les cellules en microscopie.

II.3. Microscopies confocale et biphotonique

Les études de microscopie ont été réalisées à la plateforme DimaCell d'AgroSup. Dans un premier temps, les différentes subphtalocyanines étudiées ont permis l'observation des cellules par microscopie biphotonique. Les images ont été réalisées à l'aide d'un appareil Nikon (A1-MP), avec une longueur d'onde d'excitation de 720 nm. L'appareil possède plusieurs filtres permettant de détecter les photons émis aux longueurs d'ondes choisies : filtre DAPI (435-485 nm), filtre FITC (505-555 nm), filtre TRITC (570-640 nm) et filtre Cy5 (665-715 nm).

Comme on peut le voir sur les images de la *figure 121*, pour la solution liposomiale de $SubNO_2$ (**13**), un maximum de fluorescence est détecté sur la fenêtre de la TRITC, ce qui correspond bien à la gamme d'émission de notre fluorophore. On détecte également de la fluorescence sur la fenêtre de la Cy5 car la subphtalocyanine émet également au delà de 640 nm.

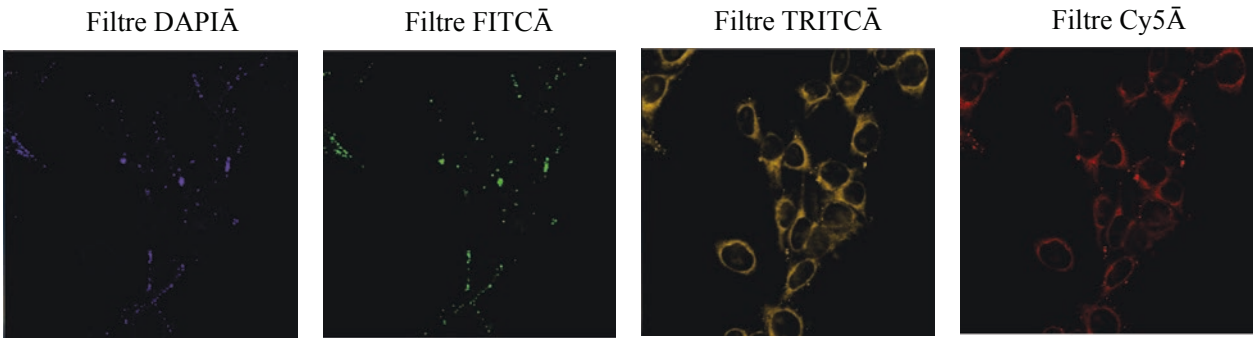
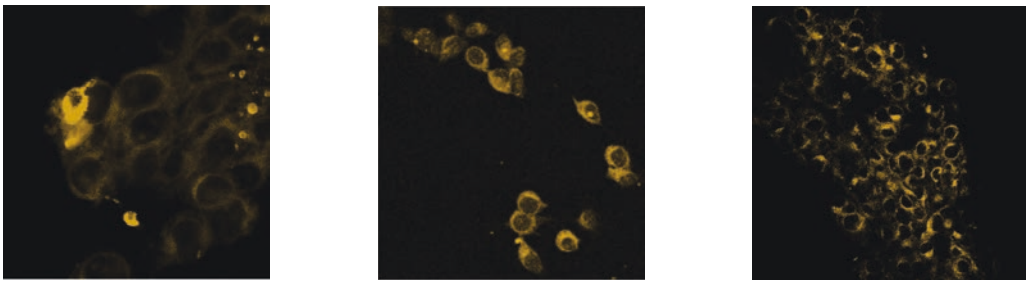


*Figure 121 : Images de fluorescence des cellules B16F10 incubées avec une solution liposomiale de SubPc-NO_2 **13** dans le PBS/RPMI obtenues en microscopie biphotonique et pour les différents filtres de détection (excitation à 720 nm)*

Des images similaires ont pu être obtenues dans le cas des composés hydrosolubles non incorporés dans un liposome, à savoir les SubPc-Propsulf$_2$ **21**, SubPc-DTPA **22**, SubPc-DOTA **25** et le complexe SubPc-DOTAGd **27**. Seules les images obtenues dans la gamme du filtre TRITC sont présentées ci-dessous (*figure 122*).



SubPc-Propsulf$_2$ (**21**)Ā SubPc-DTPA (**22**)Ā SubPc-DOTA-Gd (**27**)Ā

*Figure 122 : Images de fluorescence des cellules B16F10 incubées avec une solution de SubPc-propsulf$_2$ **13** (gauche – PBS/RPMI), de SubPc-DTPA **22** (milieu – PBS/DMSO/RPMI) ou de SubPc-DOTAGd **27** (droite – PBS/DMSO/RPMI) obtenues en microscopie biphotonique et pour le filtre TRITC (excitation à 720 nm)*

Dans tous les cas, un marquage des membranes cellulaires et du cytoplasme est observé. Mais une partie de la sonde peut également traverser la membrane et rentrer dans la cellule, notamment pour les cellules incubées avec la SubPc-DTPA **22**.

Les cellules incubées avec le composé hydrosoluble **21** ont également été observées en microscopie confocale (microscope Nikon C1Si EclipseTE 2000). La superposition de la photographie des cellules à l'image de fluorescence permet de prouver l'incorporation de la sonde dans les cellules (*figure 123*).

*Figure 123 : Photographie (gauche), image de fluorescence (droite) et superposition (centre) des cellules incubées avec une solution de SubPc **21** dans le PBS/RPMI obtenues en microscopie confocale (cellules B16F10 – excitation à 561 nm – détection à 566-720 nm)*

Les études biphotoniques ont d'autre part permis de mettre une fois encore en évidence le phénomène de photoblanchiment (*figure 124*). L'irradiation sur une zone précise pendant 5 minutes conduit à la perte de l'émission orange (fenêtre TRITC). La fluorescence résiduelle est alors bleue (filtre DAPI).

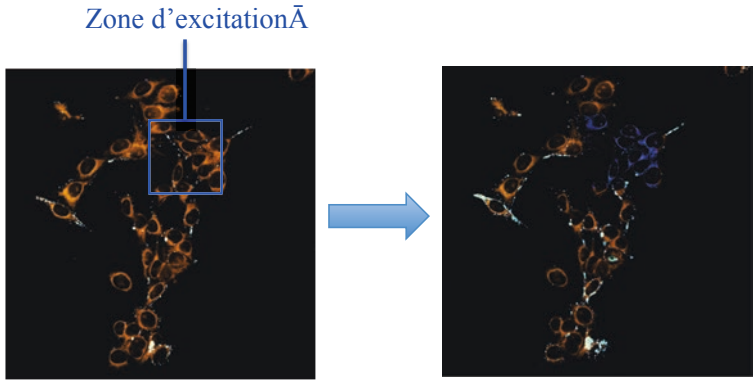


*Figure 124 : Images de fluorescence des cellules B16F10 incubées avec une solution liposomiale de SubPc-NO_2 **13** dans le PBS/RPMI obtenues en microscopie biphotonique et pour tous les filtres confondus. Mise en évidence du photoblanchiment après irradiation sur une zone localisée*

II.4. Conclusion

Certaines sondes fluorescentes basées sur un motif subphtalocyanine préparées dans ce chapitre et dans le chapitre précédent ont été étudiées sur cellules par microscopies de fluorescence confocale et biphotonique. Les premières études mettent en évidence une non toxicité vis-à-vis des cellules, dans la gamme de concentration requise pour la microscopie optique. De plus, les études spectroscopiques réalisées dans le milieu de culture cellulaire montrent que malgré leur faible stabilité, ces sondes sont suffisamment robustes pour réaliser l'incubation puis l'étude de microscopie. Enfin, les sondes préparées se sont montrées aptes à marquer les membranes cellulaires et le cytoplasme, dans le cas des composés les plus hydrophobes. Les espèces hydrophiles sont

quant à elles parfois capables de pénétrer dans la cellule. Mais une fois encore, la faible photostabilité de ces sondes est ici mise en évidence par microscopie biphotonique.

Suite à la préparation des nouvelles générations de subphtalocyanines proposées dans les sections « conclusion » des chapitres I et II, à savoir les SubPcs substituées par des groupements donneur et/ou pour lesquelles le bore est fonctionnalisé via un lien éthynyle, il sera donc primordial d'étudier leur photostabilité aussi bien en solution que par microscopie cellulaire. Il est attendu que les nouveaux groupements introduits soient chimiquement stabilisants, mais ils pourraient également avoir un apport bénéfique sur la photostabilité de la sonde.

Partie III : Association de phtalocyanines avec des nano-objets d'intérêt médical : les nanoparticules d'oxyde de fer et les nanotubes d'oxyde de titane

Cette deuxième partie du chapitre II est consacrée à l'association de phtalocyanines avec deux nano-objets : les USPIO, qui sont actifs en IRM, et les nanotubes d'oxyde de titane qui ont montré des propriétés de vectorisation et de radiosensibilisation. Pour cela, les phtalocyanines dissymétriques préparées dans le chapitre II (partie III) qui possèdent différentes fonctions d'intérêt (acide, amine, alcyne) seront utilisées (*figure 125*).

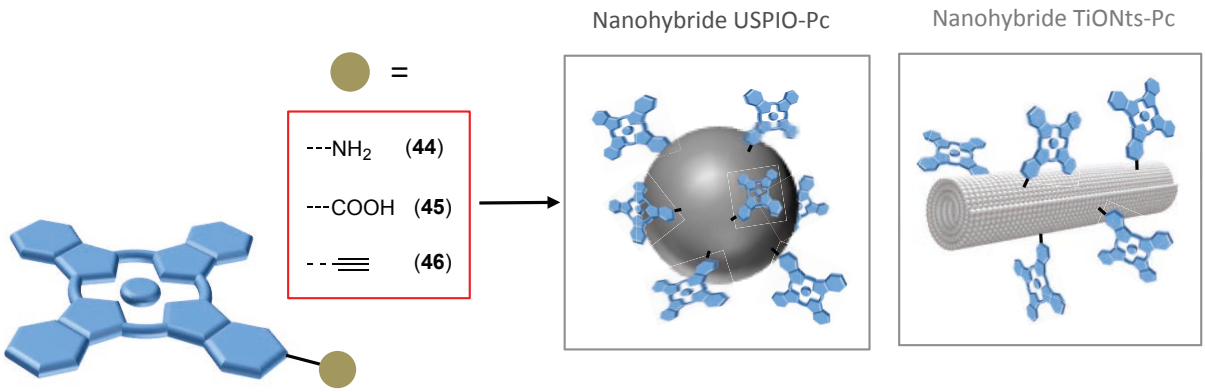


Figure 125 : Objectifs de la troisième partie du chapitre II

Ces travaux ont été réalisés en association avec l'équipe du Pr Nadine Millot (Laboratoire interdisciplinaire Carnot de Bourgogne, ICB - équipe Manapi). La synthèse des nanoparticules fonctionnelles, les réactions de couplage avec les phtalocyanines ainsi que les caractérisations des objets ont principalement été réalisées par le Dr Jérémy Paris lors de ses travaux de thèse à l'université de Bourgogne.[234] Le savoir-faire de notre équipe a également été nécessaire pour mener à bien cette étude (participation à des réactions de couplage et caractérisations, spectroscopie de fluorescence, mesures de relaxivité, mesures ICP).

L'équipe du Pr. N. Millot a montré par le passé l'utilité et l'efficacité des particules qu'ils ont mises au point pour l'imagerie médicale. Dans le cas des USPIO, ont retrouve notamment des systèmes alliant l'IRM aux imageries nucléaires, par fonctionnalisation de la particule par des dérivés chélatants de type DOTA.[234] D'autre part, des études cellulaires ont mis en évidence les propriétés biovectrices et radiosensiblisantes des nanotubes d'oxydes de titane.[235]

Dans la littérature, on retrouve des exemples d'association covalente ou par adsorption de phtalocyanines à des nanoparticules d'oxyde de fer.[236]
Dans le cas des nanotubes d'oxyde de titane, il existe également des exemples pour lesquels le tube est fonctionnalisé pour introduire des phtalocyanines de zinc ou de cuivre.[237] Les objectifs consistent

à améliorer les propriétés photocatalytiques ou photophysiques des tubes. Mais à ce jour, aucune préparation de nanohybrides associant des phtalocyanines avec des USPIO ou des TiONts n'a porté sur une application en imagerie médicale.

III.1. Association de phtalocyanines avec des nanoparticules d'oxyde de fer pour une imagerie bimodale IRM/IO

III.1.1. Synthèse de la nanoparticule fonctionnelle

La méthode envisagée pour lier covalentement le fluorophore (ZnPc) avec la nanoparticule est la réaction de chimie click catalysée au cuivre (I). La première étape a donc consisté à préparer un USPIO présentant en surface des groupements azoture. L'introduction de la fonction choisie a été réalisée étape par étape à partir de la nanoparticule nue (*schéma 75*).

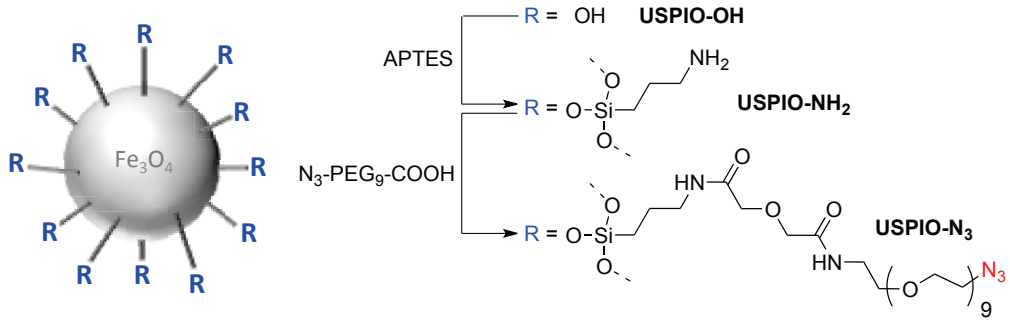


Schéma 75 : Fonctionnalisation multi-étapes de l'USPIO nu pour introduire une fonction azoture

Les fonctions alcool résiduelles présentes après formation de la particule sont modifiées par l'action du 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES) afin de créer un manteau protecteur et d'introduire simultanément des fonctions amine disponibles. Elles sont ensuite acylées par couplage peptidique pour introduire la fonction azoture. Le réactif utilisé est un PEG fonctionnel permettant d'espacer le fluorophore du cœur métallique d'une part, et d'augmenter la solubilité et la furtivité biologique du système d'autre part.

Le système obtenu a été caractérisé par les techniques appropriées (FTIR, TEM, DLS, XPS, potentiel zêta). Les nanoparticules obtenues possèdent un diamètre moyen de 7 nm (avec des agrégats de 73 nm).

III.1.2. Introduction de la phtalocyanine sur la particule

À partir de cet USPIO-N_3 et de la phtalocyanine de zinc synthétisée par condensation statistique et fonctionnalisée par un motif alcyne vrai (**46**) (chapitre I-partie II), le système bimodal IRM/IO a pu

être préparé par réaction de chimie click catalysée au cuivre (I). La réaction est effectuée en 48 heures à température ambiante dans le DMSO, en présence de sulfate de cuivre (II) et d'ascorbate de sodium (*schéma 76*).

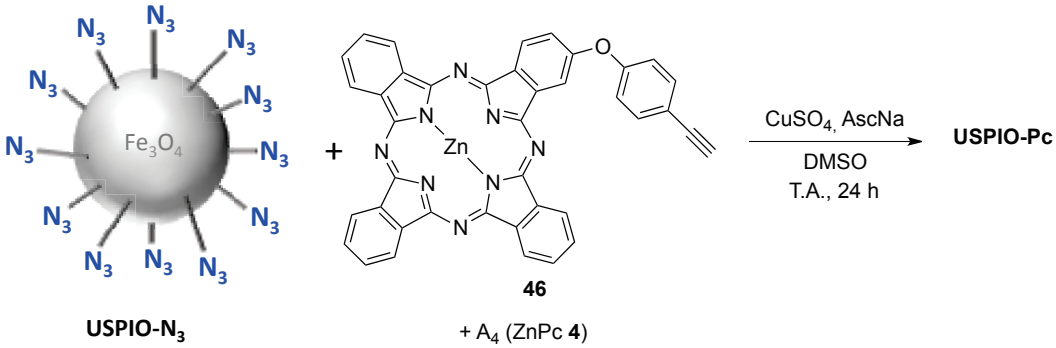


*Schéma 76 : Couplage par chimie click de l'USPIO-azoture avec la phtalocyanine alcyne **46***

Comme le précurseur phtalocyanine utilisé est un mélange statistique de phtalocyanine monosubstituée (A_3B **46**) et non substituée (A_4 **4**), la particule obtenue a due être abondamment lavée pour éliminer l'espèce non réactive (A_4). Des séries de centrifugation, décantation magnétique et ultrafiltration ont donc été réalisées avec différents solvants (DMSO, THF, EtOH). L'objet **USPIO-ZnPc** a ensuite été caractérisé par différentes techniques usuelles permettant de déterminer la taille de l'objet ou le taux de greffage, mais également par des techniques liées à l'application concernée (spectroscopie de fluorescence, mesure de la vitesse de relaxation).

III.1.3. Caractérisations du nanohybride

III.1.3.1. Taille de la particule et nature du manteau

L'analyse par TEM a mis en évidence des nanoparticules de 9 ± 2 nm de diamètre (avec des agrégats de 56 ± 5 nm) (*figure 126*). Ce résultat traduit l'introduction de nouveaux groupements à la surface de la particule, ce qui conduit à une augmentation de taille moyenne (+ 2 nm par rapport à **l'USPIO-N_3**). Le point isoélectrique (8,1), déterminé par la mesure du potentiel zêta, n'est quant à lui que faiblement modifié par la dernière étape de couplage, le groupement initial (N_3) comme le

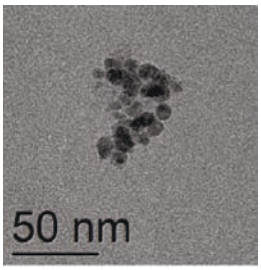


Figure 126 : Image TEM du nanohybride ZnPc-USPIO

groupement ajouté (ZnPc) ne modifiant tous les deux pas drastiquement la charge de la particule. En spectrométrie photoélectronique X (XPS), la contribution des liaisons carbone-azote (N1s) de la phtalocyanine est observée à 397 eV.

De plus, la spectroscopie infrarouge (FTIR) met en évidence la disparition du signal des vibrations de la fonction azoture ($\nu_{as} N_3$) à 3100 cm^{-1}. Le spectre d'absorption (UV-Vis) dans l'éthanol présente quant à lui les signaux caractéristiques des phtalocyanines, à savoir les pics des bandes de Soret (344 nm) et des bandes Q (603/667 nm).

III.1.3.2. Taux de greffage et ratio Fer/ZnPc

La particule obtenue a également été analysée par spectroscopie d'émission atomique (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy, ICP/AES). Cette technique permet de déterminer la présence de **24 mg de fer par mg de zinc**. D'autre part, l'analyse BET donne une **surface spécifique de 103 $m^2.g^{-1}$**. Egalement, la nanoparticule peut être considérée comme une **sphère de diamètre 9 nm** (analyse TEM), dont l'aire de surface est calculable. À partir de ces trois valeurs, il est possible de calculer le nombre de phtalocyanines greffées par nanoparticule ($N_{Pc/Np}$) qui est donné par l'*équation 6* :

$$N_{Pc/Np} = \frac{\mathcal{N}_A \times 3 \times M(Fe) \times \pi \times d^2}{R \times M(Zn) \times M(Fe_3O_4) \times SSA}$$

Avec :

M : masse molaire ($g.mol^{-1}$)

$\mathcal{N}_A$: constante d'Avogadro (mol^{-1})

R : ratio massique obtenu en ICP

d : diamètre de la nanoparticule obtenue en TEM (m)

SSA : surface spécifique obtenue en BET ($m^{-2}.g$)

Équation 6 : Calcul du nombre de phtalocyanines par nanoparticule à partir des données obtenues par ICP/AES, TEM et BET

La démonstration étape par étape est donnée en annexe (section B). Ce calcul permet de déterminer une valeur $N_{Pc/Np}$ de 690 phtalocyanines par nanoparticule (2 ZnPc par nm^2). Cette valeure importante traduit de l'efficacité de la réaction de greffage.

III.1.4. Evaluation des propriétés imageantes

Par la suite, nous avons évalué les propriétés qui font de l'objet obtenu un agent d'imagerie bimodale, à savoir sa relaxivité et sa fluorescence. En fluorimétrie, l'excitation à 600 nm conduit à une émission de fluorescence maximale à 673 nm (EtOH). Malgré la proximité de la particule, la sonde est donc toujours fluorescente. De plus, la longueur d'émission est similaire à celle de la phtalocyanine seule en solution et confirme donc l'absence d'agrégation dans l'éthanol (*figure 127-*

gauche). Cependant, les mesures réalisées dans l'eau montrent la présence d'agrégation en milieu aqueux, même si le nanohybride conserve des propriétés de fluorescence dans ce milieu.

Pour les mesures de relaxivité, la méthode utilisée est la même que dans le cas des complexes de gadolinium précédemment étudiés (appareil Bruker Minispec). Dans ce cas, le temps de relaxation transversale est mesuré, les USPIO ayant pour intérêt d'influencer préférentiellement cette composante. Il est possible de déterminer une relaxivité transversale R_2 de 73 $mM_{Fe}^{-1}.s^{-1}$ (*figure 127-droite*). La relaxivité transversale a quant à elle été mesurée à 3 $mM_{Fe}^{-1}.s^{-1}$

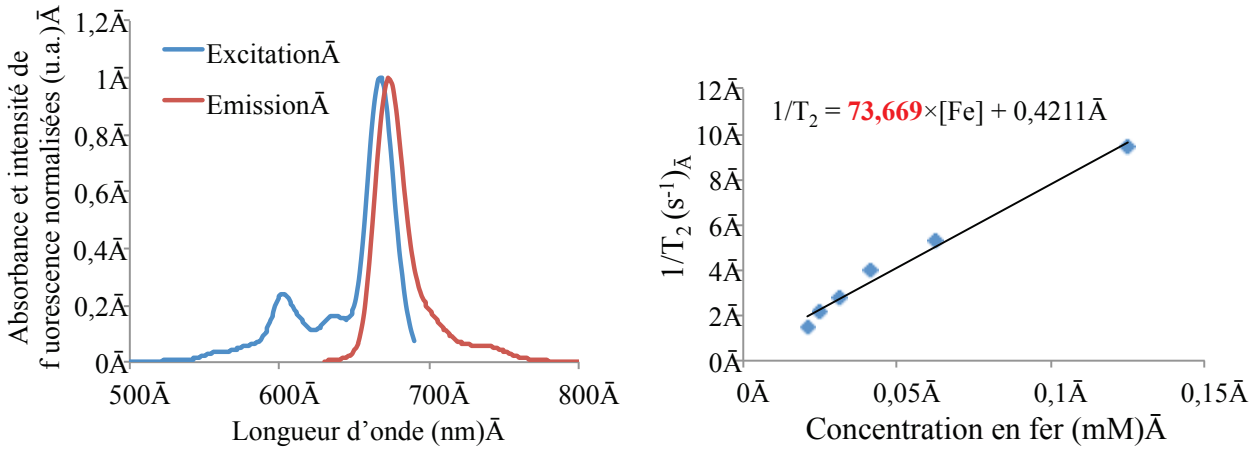


Figure 127 : Spectres d'absorption et d'émission dans l'éthanol (gauche) et inverse du temps de relaxation longitudinal dans l'eau en fonction de la concentration en fer (droite) du nanohybride ***USPIO-ZnPc***

Ces données sont cohérentes avec celles obtenues dans la littérature, même si les valeurs transversales disponibles sont généralement un peu supérieures à notre mesure.[238] Ceci peut s'expliquer par la difficulté d'approche des molécules d'eau vers le cœur paramagnétique de la particule, compte tenu de la présence des groupements phtalocyanines hydrophobes.

III.2. Association de phtalocyanines avec des nanotubes d'oxyde de titane pour le théranostique

III.2.1. Synthèse des nanotubes fonctionnels

Comme mentionné précédemment, nous nous sommes également intéressés à l'introduction de phtalocyanines sur des nanotubes d'oxyde de titane (TiONts). Pour ce faire, l'équipe du Pr. Nadine Millot a synthétisé des nanotubes fonctionnalisés par des groupements amine, acide carboxylique ou azide à partir du tube nu (**TiONts-OH**). Le tube initial mesure respectivement 156 nm de longueur, 9,1 nm de diamètre externe et 3,8 nm de diamètre interne (TEM) (*figure 128*). La stratégie de fonctionnalisation est similaire à celle développée pour les nanoparticules d'oxyde de fer.

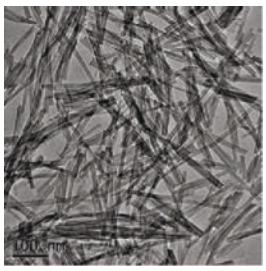


Figure 128 : Image TEM des TiONts nus

Cependant, selon la nature du groupement introduit, la méthode peut varier. En effet, elle utilise un espaceur silylé (aminopropyltriéthoxysilane, APTES) pour introduire l'amine puis l'azide, ou bien un dérivé phosphonique (acide 6-phosphonohexanoïque, PHA) dans le cas de la fonctionnalisation par un acide carboxylique (*schéma 78*). Ces trois précurseurs vont permettre d'introduire des phtalocyanines selon trois chemins d'accès.

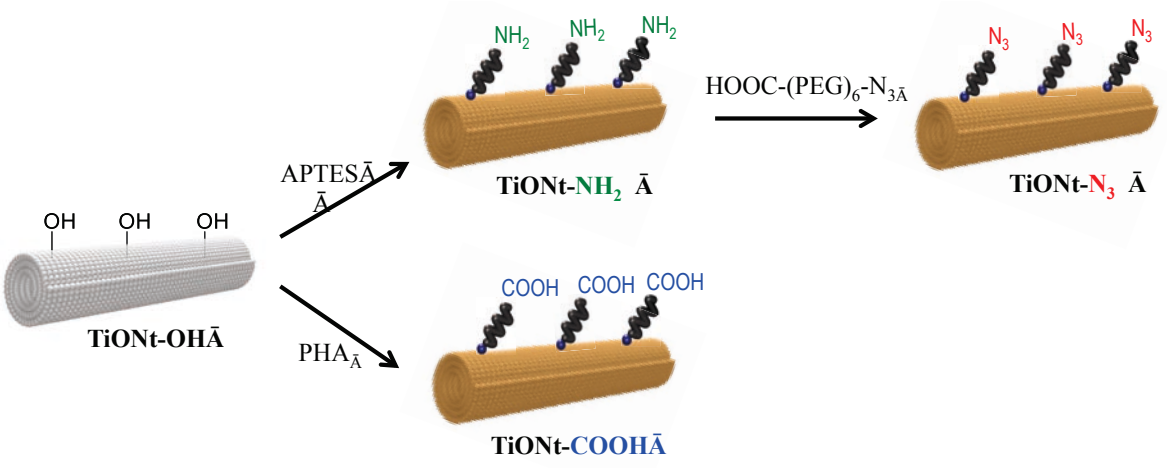


*Schéma 77 : Préparation des nanotubes fonctionnalisés par des amines (**TiONts-NH$_2$**), des azotures (**TiONts-N$_3$**) ou des acides carboxyliques (**TiONts-COOH**) à partir du tube nu (**TiONts-OH**)*

III.2.2. Greffages de phtalocyanines sur des nanotubes d'oxyde de titane

III.2.2.1. Couplages

À partir des nanotubes fonctionnels, le couplage avec un motif phtalocyanine peut se faire par voie peptidique ou par chimie click, en utilisant les mélanges statistiques de phtalocyanines portant un groupement amine (**44** + **4**), acide carboxylique (**45** + **4**) ou alcyne (**46** + **4**) synthétisées et décrites dans le chapitre précédent (*schéma 78*).

Les couplages peptidiques sont mis en œuvre en présence d'agents de couplages, le DCC et le NHS, dans le DMSO pendant 48 heures. Quant à la chimie click qui conduit à la formation du triazole, elle est réalisée en présence du couple sulfate de cuivre/ascorbate de sodium dans un mélange DMSO/eau (4:1 v/v).

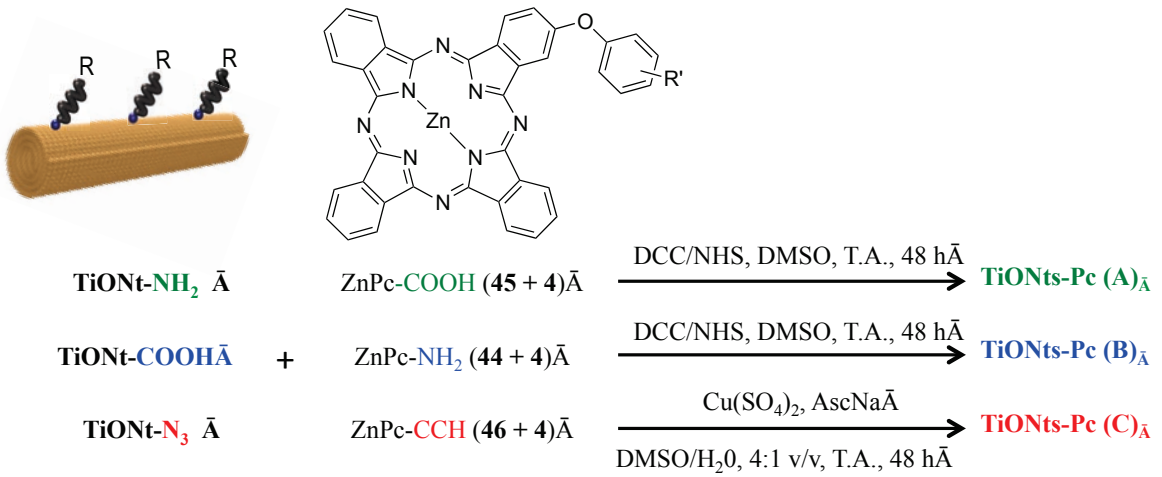


Schéma 78 : Synthèse des conjugués TiONts-ZnPc par couplage peptidique ou par chimie click

Comme pour l'**USPIO-ZnPc**, les précurseurs phtalocyanine mis en œuvre sont issus de synthèses statistiques et contiennent donc une importante quantité d'espèce A_4 non réactive (ZnPc). Les nanotubes sont donc abondamment lavés par centrifugation et ultrafiltration pour l'éliminer.

III.2.2.2. Caractérisations

Les trois objets obtenus ont été caractérisés par les différentes techniques appropriées. La contribution N1s en XPS et la présence des pics d'absorption des bandes Q en spectroscopie UV-visible confirment la présence du motif phtalocyanine sur le tube (*figure 128*).

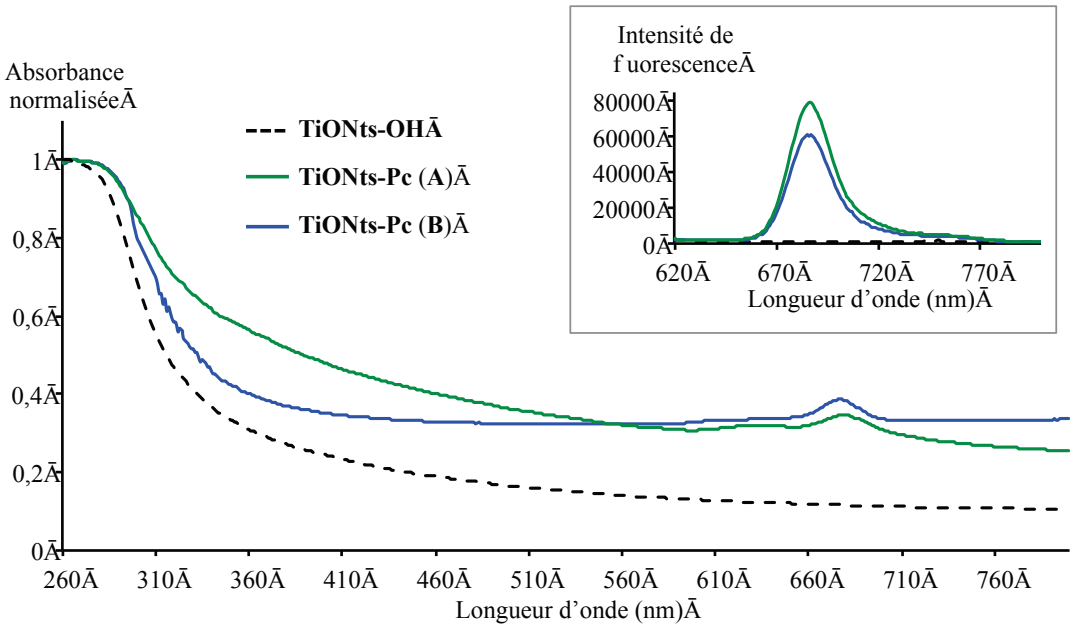


*Figure 129 : Superposition des spectres d'absorption et d'émission (encadré) du tube de départ et des conjugués **TiONts-ZnPc** (**A**) et (**B**) dans l'éthanol*

De plus, une émission de fluorescence peut être observée lorsque les nanohybrides sont excités à 600 nm.

D'autre part, les valeurs des points isoélectriques traduisent la modification de surface, car elles varient depuis le précurseur (TiONts-NH_2, TiONts-COOH ou TiONts-N_3) jusqu'au conjugué (TiONts-ZnPc) (*tableau 25*). Les mesures de surface (BET) et les mesures thermogravimétriques (ThermoGravimetric Analysis, TGA) permettent d'estimer le nombre de phtalocyanines par nanomètre carré à partir de la surface spécifique du matériau et des différentes pertes de masse observées.

Si l'allure des spectres d'absorption et d'émission des nanohybrides dans l'éthanol est similaire à celle des spectres usuels des phtalocyanines, les mesures dans l'eau mettent quant à elles en évidence le phénomène d'agrégation, comme pour le nanohybride **USPIO-ZnPc**.

	λ_{Abs} (nm)	λ_{Em} (nm)	IEP	Nombre de molécules par nm^2
TiONts-NH_2	/	/	6,3	5,7 NH_2 / nm^2
TiONts-ZnPc (A)	679	687	6,4	0,1 ZnPc / nm^2
TiONts-COOH	/	/	3,2	3,1 COOH / nm^2
TiONts-ZnPc (B)	677	685	6,3	0,15 NH_2 /nm^2

Tableau 25 : Caractéristiques des deux nanohybrides obtenus par couplage peptidique

D'autre part, la toxicité du nanohybride C a pu être évaluée sur un modèle animal, le poisson zèbre. Pour une concentration de 50 µg/mL, le taux de survie est proche de 100%, le taux d'éclosion supérieur à 90 %, et les poissons ne présentent pas de malformation après éclosion. La toxicité de cet agent est donc faible.

III.3. Conclusion

Les expériences menées ont prouvé qu'il était possible d'associer des phtalocyanines avec une nanoparticule d'oxyde de fer ou un nanotube d'oxyde de titane selon les méthodes synthétiques choisies. Le premier objet obtenu (**USPIO-ZnPc**) possède les propriétés requises pour un agent bimodal IRM/IO de type T_2, à savoir une émission de fluorescence dans la fenêtre du proche infrarouge ainsi qu'une influence sur la relaxation transversale des protons des molécules d'eau. Dans le cas du deuxième objet (**TiONts-ZnPc**), trois voies de synthèse ont été explorées et permettent d'obtenir le nanohybride voulu. Les mesures de fluorescence mettent également en évidence la fluorescence des phtalocyanines greffées.

Une étude biologique permettra de déterminer si ces propriétés sont suffisantes pour visualiser la distribution de l'agent *in vivo*. Il reste également à savoir, à travers des études sur petit animal, si l'effet EPR est suffisant pour transporter sélectivement l'objet vers la zone d'intérêt. Dans le cas contraire, une étape supplémentaire sera nécessaire pour introduire un vecteur biologique, en utilisant par exemple les fonctions azoture résiduelles n'ayant pas réagi sur une phtalocyanine alcyne.

Compte tenu de l'activité des nanoparticules d'oxyde de fer en thérapie par hyperthermie d'une part, et des phtalocyanines en PDT d'autre part, il serait également intéressant de mesurer la toxicité du système sous l'action d'un champ magnétique et/ou d'une source lumineuse. Le même type d'expérience pourrait être mené dans le cas des nanotubes, en vue de combiner les propriétés radiosensibilisantes et photosensibilisantes des deux entités.

Ces différents objets souffrent cependant d'une faible solubilité et les mesures d'absorption et d'émission mettent en évidence le problème d'agrégation dans l'eau. L'hydrophilie des systèmes devra donc être améliorée, par exemple en introduisant des motifs PEG sur la particule grâce aux résidus amine, acide ou alcyne n'ayant pas réagi sur une phtalocyanine. L'utilisation d'une phtalocyanine fonctionnelle hydrosoluble sera également une méthode de choix pour augmenter l'hydrosolubilité et réduire l'agrégation du fluorophore.

CHAPITRE III

ETUDE DU TRANSFERT DES RADIATIONS CHERENKOV VERS DES FLUOROPHORES ORGANIQUES

CHAPITRE III : ETUDE DU TRANSFERT DES RADIATIONS CHERENKOV VERS DES FLUOROPHORES ORGANIQUES

Partie I : Introduction sur le CRET

I.1. Principe et utilisations du CRET

Le phénomène de CRET (Cherenkov Radiation Energy Transfer) consiste à utiliser les photons de luminescence Cherenkov issus d'un radioélément pour exciter un fluorophore et induire sa fluorescence. Cette notion a été introduite par l'équipe de Dothager en 2010, et sa notation provient de l'analogie avec le FRET ou le BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer), le phénomène reposant sur un principe similaire.[43a] D'autres études ont montré que le principe pouvait être utilisé pour l'excitation de quantums dots,[43c,43e,239] de fluorophores organiques tels que la fluorescéine ou les cyanines (Cy5.5, Cy7),[43b,43e] ou encore de lanthanides luminescents (Eu^{3+}, particules dopées en Er^{3+} ou Yb^{3+}),[43b,43d] et ceci en utilisant différents radioéléments. Il existe plusieurs intérêts pour lesquels le phénomène de CRET peut être étudié et utilisé, comme l'amélioration de l'imagerie Cherenkov (CLI) en terme de pénétrabilité et de sensibilité, ou des applications plus spécifiques telles que l'imagerie multispectrale.

I.1.1. Augmentation du signal Cherenkov et du rapport signal sur bruit

Le signal Cherenkov d'un radioélément est une émission continue entre 200 et 800 nm centrée sur le bleu. En imagerie CLI *in vivo*, les mesures sont réalisées sans filtre, c'est à dire que le signal est détecté sur toute la plage de longueur d'onde pour collecter un maximum de photons. Bien que le CLI ne souffre pas des problèmes d'interaction de la lumière d'excitation avec les tissus, la quantité de lumière émise est fortement diminuée par absorption, diffusion et refraction. C'est notamment le cas pour la partie du Cherenkov se situant dans l'UV et le proche UV, là où malheureusement son intensité est la plus forte. De plus, l'intensité de luminescence diminue graduellement en se déplaçant vers les hautes longueurs d'onde, et reste très faible dans la fenêtre thérapeutique.

L'un des défis du CRET est donc de capter le maximum de luminescence du radioélément, notamment celle de basse longueur d'onde, pour la reconvertir en fluorescence dans les plus hautes longueurs d'onde. Alors, l'utilisation de filtres permettra de centrer la détection sur le fluorophore et d'augmenter ainsi la quantité de photons détectable (*figure 130*). Plus le transfert sera efficace, plus l'intensité de fluorescence dans la fenêtre de détection sera grande.

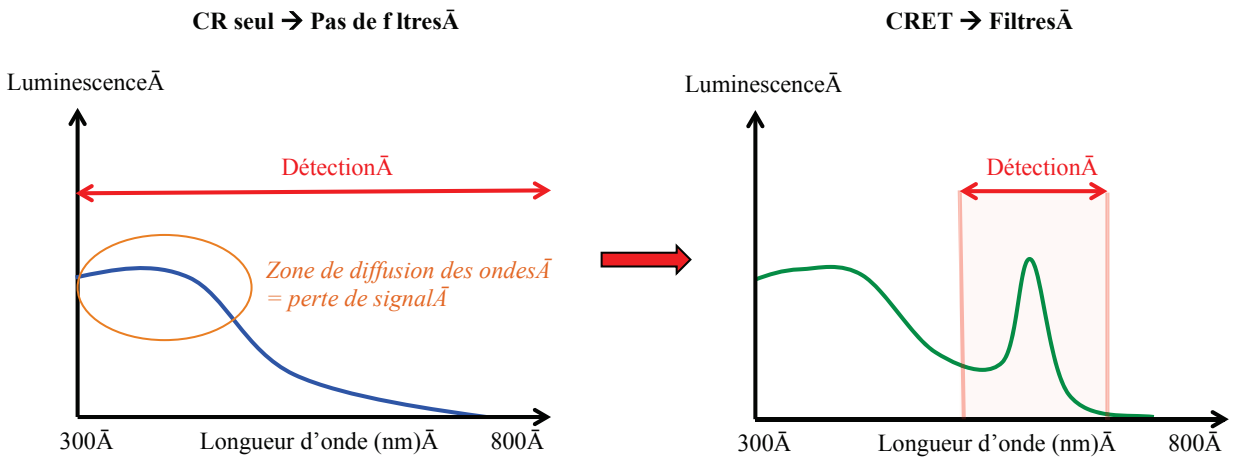


Figure 130 : Détection dans le cas de la luminescence d'un radioélément seul (gauche) et d'un système FRET (droite)

De cette manière, il est envisageable d'obtenir une meilleure pénétrabilité que celle obtenue dans le cas de l'imagerie Cherenkov simple ou de l'imagerie de fluorescence standard.

Si le fluorophore est capable d'émettre dans la fenêtre du proche infrarouge, alors le signal sera encore amélioré. Cela nécessite cependant des agents possédant un important déplacement de Stokes, aptes à capter les photons de luminescence proche UV pour les réémettre dans le proche IR. C'est pourquoi les quantums dots se sont montrés de bons candidats, car ils possèdent une bande d'absorption large dans le domaine des faibles longueurs d'onde et émettent au delà de 600-700 nm. Cependant, ces particules sont toxiques et leur taille importante peut parfois limiter le domaine d'application. Les fluorophores organiques sont donc une alternative de choix, mais à condition d'optimiser le phénomène de CRET.

I.1.2. L'imagerie multispectrale codépendante

Comme mentionné dans l'introduction, les paires FRET combinant deux fluorophores trouvent une grande utilité en imagerie moléculaire. Selon une approche similaire, il est possible d'utiliser le phénomène de CRET pour observer la colocalisation d'un radioélément et d'un fluorophore. On peut parler de SCIFI : Secondary Cherenkov Induced Fluorescence Imaging. Les équipes de Thorek et Grimm ont récemment exploité ce principe pour la visualisation de tumeurs sur le modèle animal (souris) en utilisant deux approches.[43e]

Dans le premier cas, deux composés sont injectés à une souris : un agent radioactif sélectif des récepteurs HER-2 (^{89}Zr-DFO-Trastuzumab) puis un quantum dot ciblant les intégrines $\alpha_v\beta_3$ (QD-cRGD). Plusieurs informations peuvent alors être relevées de façon simultanée (*schéma 79*) : la distribution de l'agent radioactif par PET ou par CLI (sans filtre), ainsi que la codistribution des

deux agents par SCIFI (avec un filtre correspondant à la fluorescence du QD) lorsqu'ils se trouvent à proximité.

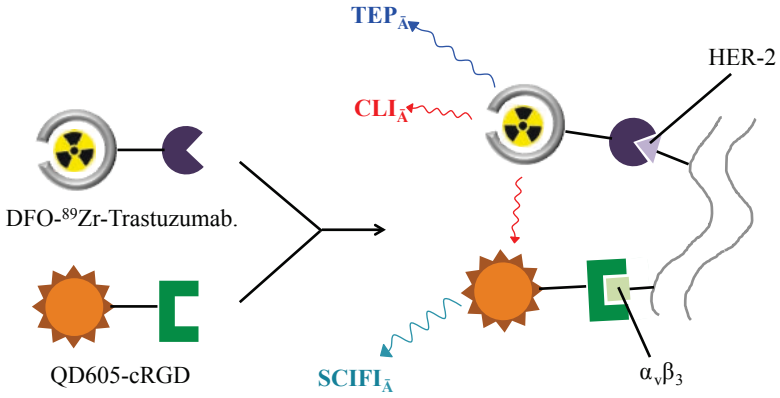


Schéma 79 : Principe de l'approche multispectrale à colocalisation développée par l'équipe de Thorek (adapté de Thorek, D. L. J. et al. Nat. Med. 2013)[43e]

Dans la suite de l'étude, les auteurs ont utilisé une sonde qui est activée sous l'action d'une enzyme (métallopeptidase MMP2). Elle est constituée d'une nanoparticule d'or et d'un dérivé fluorescéine, liés par une séquence peptidique spécifique de l'enzyme (*schéma 80*). Dans l'état initial, la fluorescéine est non fluorescente car elle est désactivée par la proximité de la particule. Mais lorsque la séquence peptidique est coupée sous l'action enzymatique, la fluorescence est restaurée.

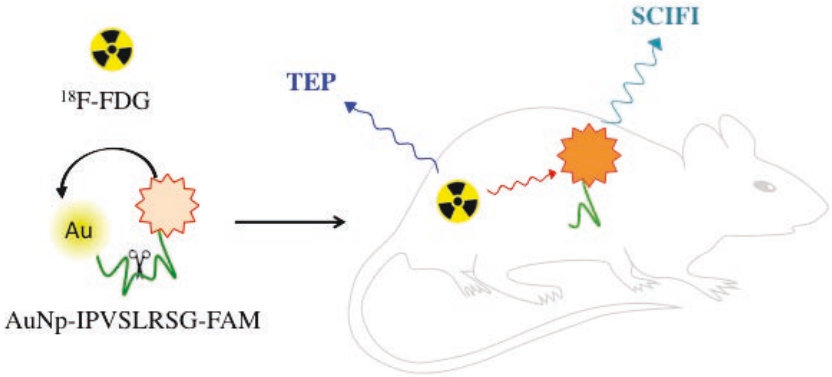


Schéma 80 : Principe de l'approche multispectrale à colocalisation et activation développée par l'équipe de Thorek (adapté de Thorek, D. L. J. et al. Nat. Med. 2013)[43e]

Les auteurs ont injecté cet agent ainsi que du ^{18}F-FDG à une souris. Il est alors possible d'imager de manière simultanée l'activité glycolytique par tomographie (TEP) et l'activité enzymatique par SCIFI.

Ces deux méthodes permettent donc de visualiser l'expression de deux facteurs tumoraux (dans le premier cas) ou de deux activités tumorales (dans le deuxième cas) en utilisant la colocalisation d'un radioélément et d'une sonde fluorescente. Cela conduit à une réponse quantitative, obtenue avec un

meilleur rapport signal sur bruit et une meilleure résolution qu'en imagerie optique classique, en scintigraphie ou en CLI conventionnel.

I.2. Objectifs du chapitre

Ces nouvelles perspectives dans le domaine de l'imagerie Cherenkov nécessitent d'étudier plus en détail le CRET afin d'approfondir la connaissance de ce phénomène. Nous avons pour notre part cherché à optimiser ce transfert énergétique en utilisant des fluorophores organiques et des radioéléments de nature variable.

Nous avons donc mesuré dans un premier temps le signal Cherenkov de plusieurs radioéléments (^{18}F, ^{177}Lu, ^{90}Y), puis étudié le transfert d'énergie avec plusieurs fluorophores organiques, notamment des xanthènes. Une attention particulière a été portée sur l'influence de l'énergie de la particule émise par le radioélément, de l'activité utilisée, de la longueur d'onde d'absorption du fluorophore et de sa concentration. La combinaison des meilleurs paramètres a ensuite guidé notre objectif vers la mise au point d'une sonde CRET qui combine le fluorophore et le radioélément de façon intramoléculaire (*figure 131*).

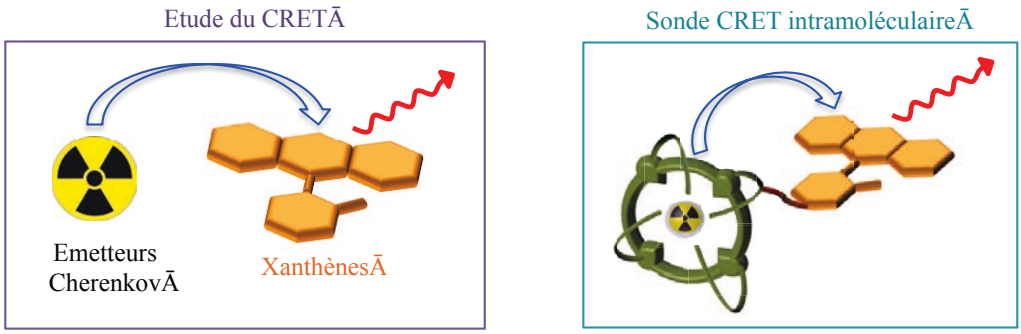


Figure 131 : Objectifs du chapitre III, étude du CRET intra et intermoléculaire

L'étude porte également sur le transfert vers d'autres fluorophores, notamment proche infrarouge, et sur le multi-transfert de type « CRET-FRET » entre un radioélément et plusieurs fluorophores (*figure 132*).

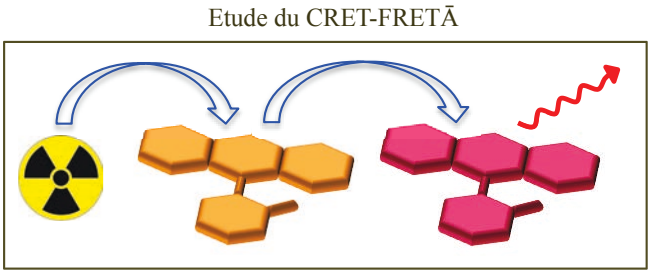


Figure 132 : Objectif du chapitre III, étude du CRET-FRET

Partie II : Luminescence d'un radioélément seul

II.1. Méthode de mesure des courbes

La luminescence des radioéléments émetteurs Cherenkov peut être mesurée au moyen d'un fluorimètre suffisamment sensible. Cela nécessite cependant d'utiliser des paramètres de mesure adaptés :

* Une mesure par accumulation de signal (en bioluminescence)
* Une fente d'émission large (20 nm)
* Un temps d'accumulation long : environ 20 min selon la plage de longueur d'onde examinée, avec un gain d'accumulation de 10 secondes par point et une mesure tous les 3 nanomètres.

Notons que la ligne de base peut varier lors des mesures compte tenu des limites de sensibilité de l'appareil et du solvant utilisé. Lorsque les spectres sont superposés, cette ligne de base est alors ramenée à une même valeur d'intensité pour le point d'abscisse le plus haut de la mesure (700 ou 800 nm). Il est ainsi possible de comparer les résultats en terme d'intensité de luminescence ou de fluorescence. D'autre part, les mesures ont été réalisées dans le sérum physiologique (sérum φ = 0,9 % NaCl dans l'eau).

II.2. Courbes de luminescence

Nous avons étudié l'émission de luminescence et les phénomènes de CRET pour les trois radioéléments présentés dans le *tableau 26.*

Radioélément	Agent	Type d'émission	Energie de la particule	Demi-vie
Fluor-18	[^{18}F]-FDG	β^+	634 keV	109,7 min
Lutétium-177	[^{177}Lu]-$LuCl_3$	β^-	400 keV	14,7 h
Yttrium-90	[^{90}Y]-YCl_3	β^-	2280 keV	64 h

Tableau 26 : Radioéléments étudiés et leurs caractéristiques

Le signal Cherenkov est détecté sous la forme d'un spectre continu dont le maximum se situe autour de 500 nm dans le cas du [^{18}F]-FDG (*figure 133*).

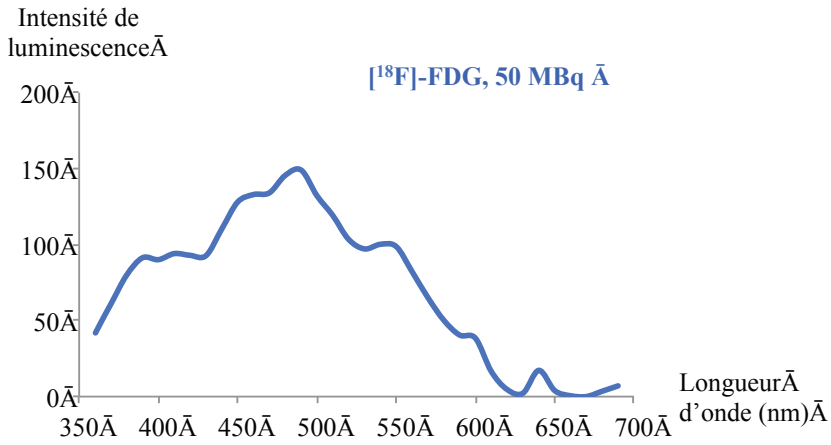


Figure 133 : Spectre de luminescence de 50 MBq de [^{18}F]-FDG

L'allure du signal est similaire pour les deux autres radioéléments ([^{177}Lu]-$LuCl_3$ et [^{90}Y]-YCl_3). La comparaison de l'intensité de luminescence confirme que la quantité de photons émis dépend de l'énergie de la particule. En effet, l'yttrium-90 conduit à une plus grande intensité de luminescence que le lutétium-177 ou le fluor-18, ceci pour une activité utilisée bien moindre (*figure 134*).

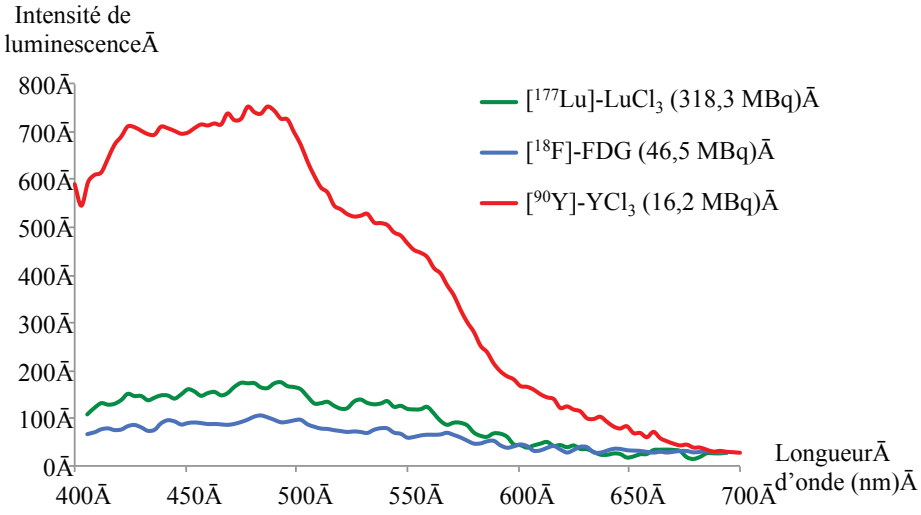


Figure 134 : Superposition des spectre de luminescence du [^{177}Lu]-$LuCl_3$, du [^{18}F]-FDG et du [^{90}Y]-YCl_3

Des études de la littérature ont pu déterminer que l'yttrium-90 était capable d'émettre 70 photons par désintégration contre 3 pour le fluor-18 (non déterminé pour le lutétium-177).[39,240] Dans le cas des mesures précédentes, si l'on compare l'intensité de luminescence au point maximal d'émission (490-500 nm) par unité de radioactivité, on constate en effet une corrélation directe avec le flux de photons (*tableau 27*). Par comparaison des valeurs d'intensité par activité du fluor-18 et de l'yttrium-90, on peut alors vérifier la valeur du nombre de photons émis par desintégration de la littérature en le recalculant par un simple produit en croix (*Equation 7 - A/B*) :

Radioélément	Activité (A, MBq)	Intensité (I)	Intensité par activité (I/A, MBq^{-1})	Flux de photons (littérature) (photon par désintégration)
^{18}F	46,5	103	2,21	3
^{90}Y	16,2	738	45,5	70
^{177}Lu	318,3	163	0,51	?

Tableau 27 : Comparaison du rapport intensité sur activité vis-à-vis du nombre de photons émis

Eq 7-A : Flux de photon du fluor-18

$$F(^{18}F) = \frac{2,21 \times 70}{45,5} = 3,4 \cong 3 \text{ photons/des}$$

Eq 7-B : Flux de photon de l'yttrium-90

$$F(^{90}Y) = \frac{45,5 \times 3}{2,21} = 61,7 \cong 70 \text{ photons/des}$$

Eq 7-C : Flux de photon du lutétium-177 par comparaison avec le fluor-18

$$F(^{177}Lu) = \frac{0,51 \times 3}{2,21} = 0,69 \text{ photons/des}$$

Eq 7-D : Flux de photon du lutétium-177 par comparaison avec l'yttrium-90

$$F(^{177}Lu) = \frac{0,51 \times 70}{45,5} = 0,78 \text{ photons/des}$$

Équation 7 : Calcul par comparaison des flux de photons du fluor-18, de l'yttrium-90 et du lutétium-177

On retrouve ainsi des valeurs proches de celles de la littérature dans le cas du fluor-18 et de l'yttrium-90. On peut également estimer de façon grossière que le flux de photon du lutétium-177 est de **0,7 photon par désintégration** (*équation 7 - C/D*). La reproduction de ces mesures permettrait d'obtenir de manière plus précise et avec une incertitude plus faible la valeur de flux de photons de ce radioélément. Notons que les calculs ont également été réalisés à partir des aires sous les courbes de luminescence et non de l'intensité au maximum d'émission. Ils conduisent à des résultats similaires.

D'autre part, l'yttrium-90 semble être un candidat de choix pour une excitation maximale d'un fluorophore par CRET étant donné qu'il possède le meilleur flux de photons.

Partie III : Transfert intermoléculaire entre radioéléments et fluorophores

III.1. Calcul du ratio de CRET

Afin de pouvoir évaluer l'influence de l'activité en radioélément, de la nature et de la concentration en fluorophore, il est nécessaire de définir le ratio de CRET. Il a été introduit par Dothager en 2010 et se base sur la même méthode de calcul que pour le FRET ou le BRET. Il a été défini comme « le quotient de lumière détectée sur une fenêtre spectrale (X) centrée sur le fluorophore par la lumière détectée sur la fenêtre spectrale (Y) de l'émission Cherenkov, moins le quotient de lumière détectée sur les fenêtres spectrales (X) et (Y) dans le cas du radioélément seul » (*équation 8*).[43a,241]

$$CRET\ (X) = \frac{CR + Fluorophore\ (X)}{CR + Fluorophore\ (Y)} - \frac{CR(X)}{CR(Y)}$$

Équation 8 : Calcul du ratio de CRET

Dans le cas de mesures à l'aide d'un imageur optique, le quotient de lumière correspond directement au flux de photon mesuré, et la gamme spectrale est définie par les filtres d'émission de l'appareil. Comme nous utilisons ici un fluorimètre, nous avons alors défini le quotient de lumière comme l'aire sous la courbe de fluorescence, et les limites des fenêtres spectrales de manière intuitive (*figure 135*). Le ratio de CRET est alors noté comme suit : CRET(Y_1-X_1/X_2-Y_2).

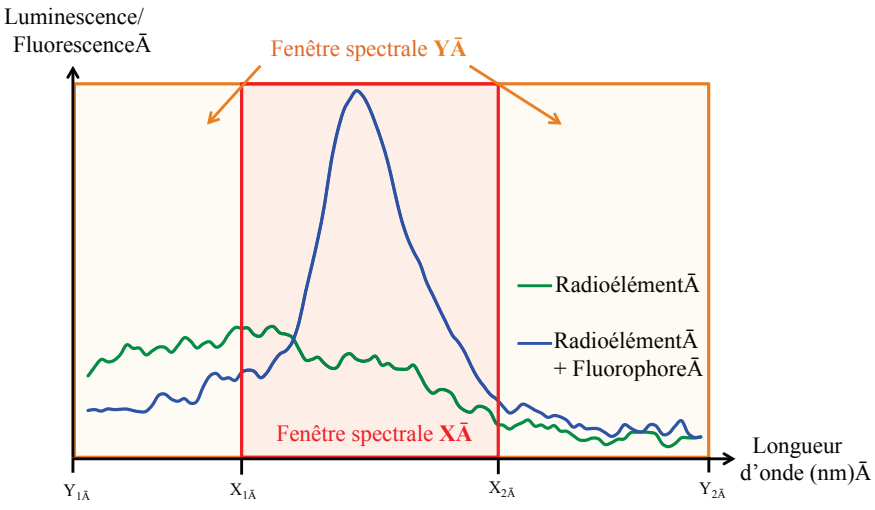


Figure 135 : Illustration du calcul du ratio de CRET à partir des courbes de luminescence du radioélément et de fluorescence du fluorophore mis en présence de radioélément

Notons que les aires sous les courbes sont calculées en utilisant le logiciel Excel et la méthode d'intégration par partie (méthode des rectangles de John Walkenbach).

III.2. Etude des paramètres influant sur le phénomène de CRET

Nous avons étudié quatre facteurs ayant une influence sur le phénomène de CRET : la **nature du radioélément**, l'**activité** utilisée, la **nature du fluorophore** et sa **concentration**. La nature du solvant, notamment son indice de réfraction, est également un phénomène influençant l'émission Cherenkov, et donc le phénomène de CRET. Ce phénomène ne sera pas discuté dans notre cas.

Trois fluorophores xanthéniques ont été utilisés dans cette partie : la fluorescéine, la rhodamine 6G et la rhodamine 101 (*tableau 28*).

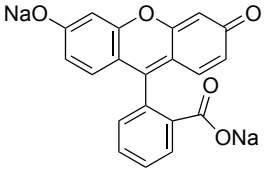
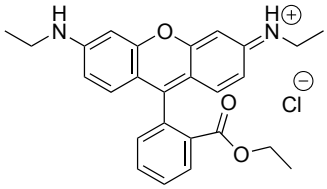
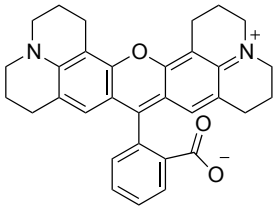
	Fluorescéine	Rhodamine 6G	Rhodamine 101
Structure			
Solvant	NaOH 0,1 M	MeOH	MeOH
λ_{abs} (nm)	490	530	576
λ_{em} (nm)	514	552	600
Φ_F	0.95	0.94	1
ε (mol.L.cm-^{1})	77 000	116 000	95 000
B (mol.L.cm-^{1})	73 000	109 000	95 000

Tableau 28 : Structure et propriétés de la fluorescéine et des rhodamines 6G et 101

Ils possèdent l'avantage d'avoir une brillance relativement proche. Ceci permettra de de s'affranchir de ce paramètre pour comparer les résultats de CRET obtenus.

Pour les mesures de CRET, la méthode générale de préparation des solutions est la suivante : à 400 µL de fluorophore (généralement 10^{-3} M) est ajouté un volume nécessaire de radioélément pour obtenir l'activité voulue, et l'ensemble est complété jusqu'à 1 mL avec du sérum φ. Les valeurs de concentration en fluorophores données par la suite sont celles de la solution finale de mesure (400 µL de solution à 10^{-3} M dans 1 ml, soit 0,4 mM).

III.2.1. Nature du radioélément

Comme anticipé, plus l'énergie de la particule émise par le radioélément est grande, plus le phénomène de CRET est important. En effet, lorsque l'on compare les spectres de CRET obtenus en

utilisant la rhodamine 6G et les trois radioéléments, on constate que l'intensité de fluorescence à 568 nm est supérieure dans le cas de l'yttrium-90 alors que l'activité utilisée est plus faible (*figure 136*).

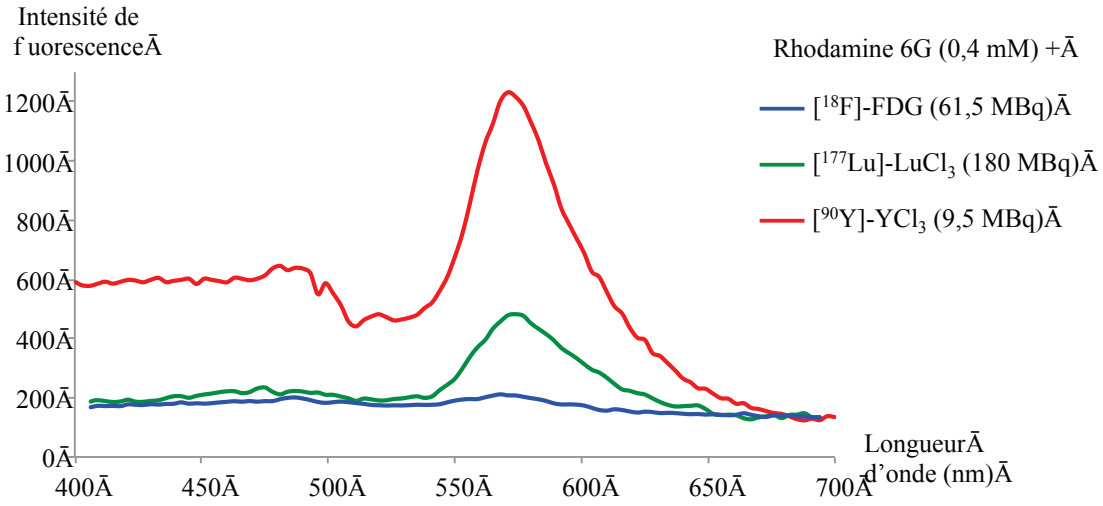


Figure 136 : Superposition des spectres de fluorescence de la rhodamine 6G en présence de [^{18}F]-FDG, [^{177}Lu]-Lucl$_3$ et [^{90}Y]-YCl$_3$

III.2.2. Activité en radioélément

Des mesures ont ensuite été réalisées en présence de fluorescéine et de lutétium-177 pour évaluer l'influence de l'activité utilisée. Pour une même concentration en fluorescéine, l'ajout de quantités croissantes du radioélément conduit à une augmentation de la fluorescence de la fluorescéine (*figure 137*).

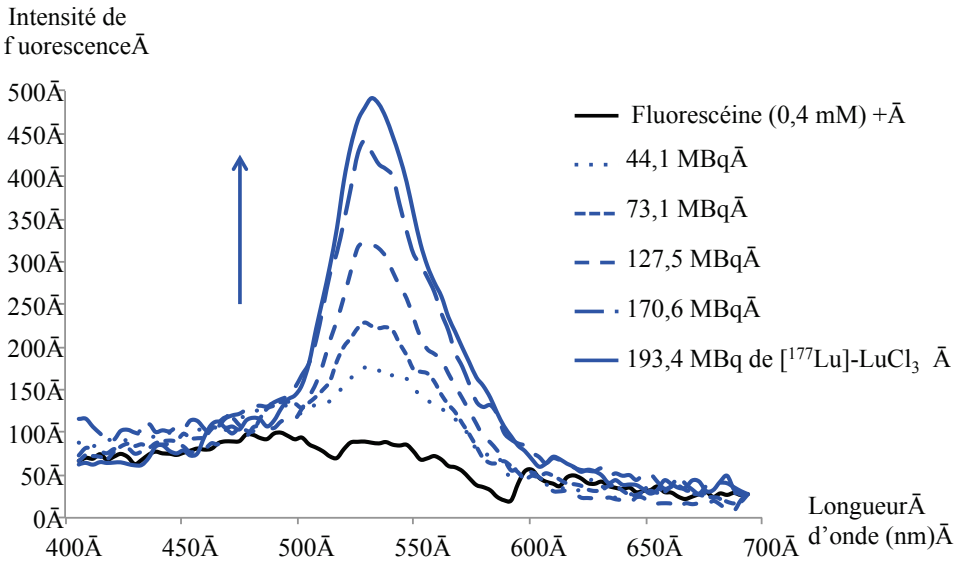


Figure 137 : Superposition des spectres de fluorescence de la fluorescéine en présence de différentes activités de [^{177}Lu]-LuCl$_3$

L'intensité de fluorescence à 529 nm est directement proportionnelle à l'activité utilisée, comme le montre *la figure 138*. Plus l'activité utilisée est importante, plus il y a de photons émis par seconde et donc de fluorescence induite par CRET.

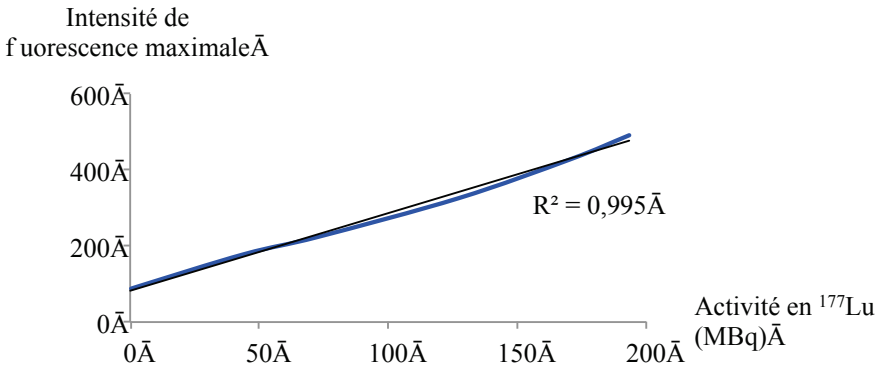


Figure 138 : Intensité de fluorescence au maximum d'émission de la fluorescéine en fonction de l'activité de [^{177}Lu]-$LuCl_3$ utilisée

Le ratio de CRET en fonction de l'activité permet également d'arriver à cette conclusion, bien que la linéarité ne soit pas aussi juste pour les valeurs d'activité hautes (*figure 139*).

Activité en [^{177}Lu]-$LuCl_3$	**Ratio de CRET (400-500/600-700 nm)**
44,1 MBq	0,43
73,1 MBq	0,76
127,5 MBq	1,28
170,6 MBq	1,63
193,4 MBq	2,09

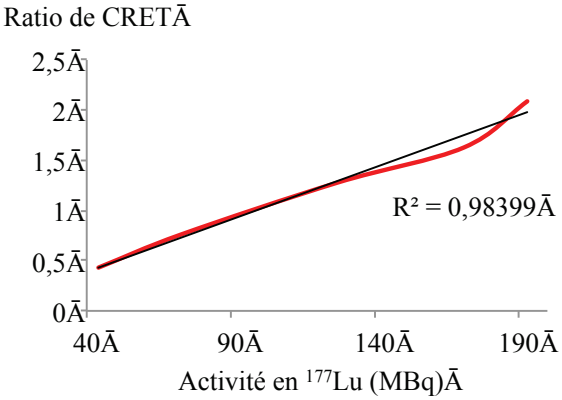


Figure 139 : Ratio de CRET en fonction de l'activité de [^{177}Lu]-$LuCl_3$ utilisée ; valeurs (gauche) et courbe (droite)

Il est donc nécessaire d'utiliser une activité importante en radioélément pour augmenter le phénomène de CRET. Pour des applications *in vivo*, ceci est bien entendu limité par la toxicité du radioélément. La dose utilisée ne doit donc pas dépasser le seuil autorisé, variable selon l'élément concerné.

III.2.3. Nature du fluorophore

Comme nous l'avons vu précédemment, le signal Cherenkov décroit à partir d'environ 500 nm à mesure que la longueur d'onde augmente. La quantité de photons disponible pour un transfert vers

le fluorophore diminue donc en allant vers le proche infrarouge. La *figure 140* superpose le spectre de luminescence de l'yttrium-90 aux spectres d'absorption des trois xanthènes étudiés. Il apparaît bien que le phénomène de CRET devrait être plus faible pour la rhodamine 6G que pour la fluorescéine, et plus faible encore pour la rhodamine 101.

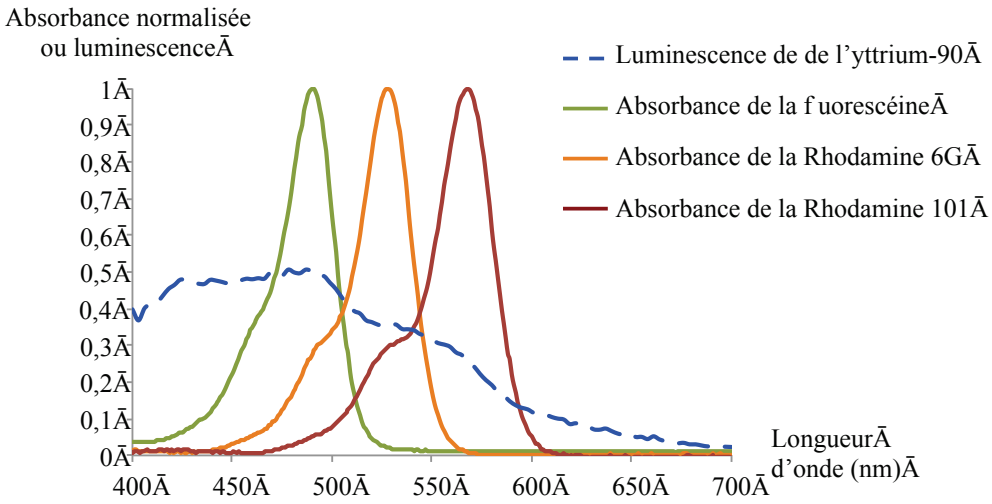
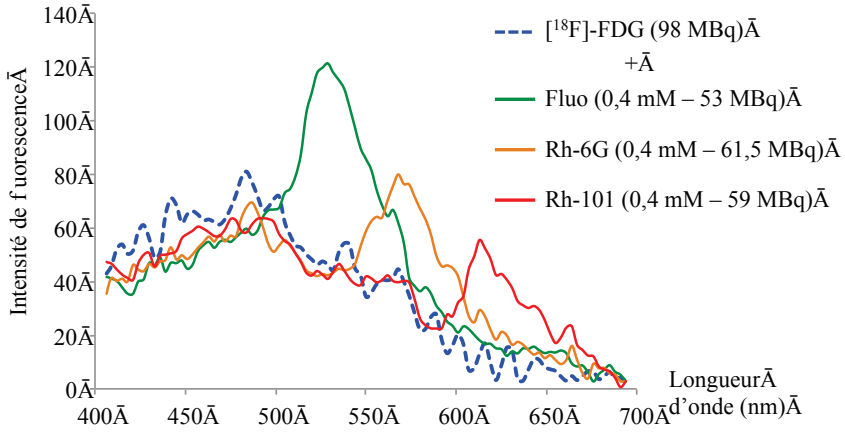


Figure 140 : Superposition des spectres d'absorption normalisés de la fluorescéine et des rhodamines 6G et 101 avec le spectre de luminescence de l'yttrium-90

C'est ce que l'on observe lorsque l'on effectue les mesures de CRET pour des concentrations en fluorophore et activités en radioélément égales, et ceci pour les trois isotopes radioactifs étudiés. Ces différentes mesures ainsi que les valeurs de ratios de CRET calculées pour chacune des courbes de CRET sont présentées sur la *figure 141*.

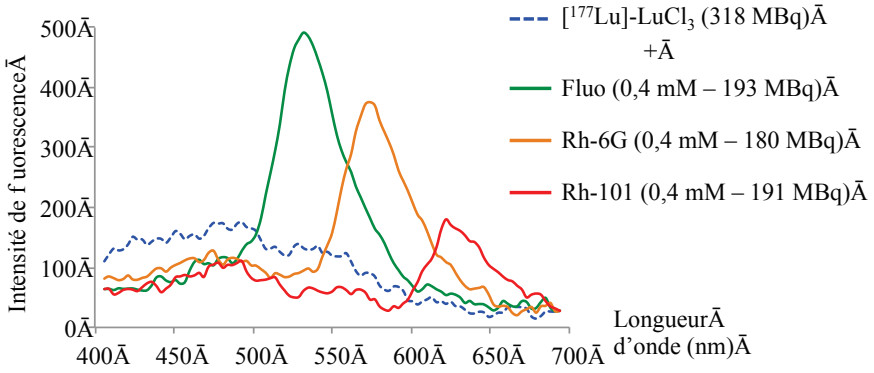
Les fenêtres utilisées pour les calculs de ratio de CRET varient depuis la fluorescéine (400-475/600-700 nm), la rhodamine 6G (400-525/650-700 nm) à la rhodamine 101 (400-580/700-700 nm).

Fluor-18 ([^{18}F]-FDG)



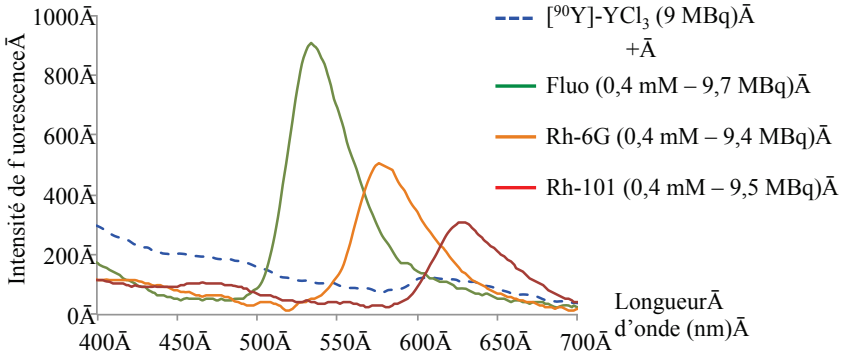
Ratio de CRET	
Fluorescéine	0,82
Rhodamine 6G	0,42
Rhodamine 101	0,24

Lutétium-177 ([^{177}Lu]-$LuCl_3$)



Ratio de CRET	
Fluorescéine	2,09
Rhodamine 6G	0,95
Rhodamine 101	0,63

Yttrium-90 ([^{90}Y]-YCl_3)



Ratio de CRET	
Fluorescéine	1,64
Rhodamine 6G	0,78
Rhodamine 101	0,32

Figure 141 : Mesures comparatives de CRET entre la fluorescéine, la rhodamine 6G et la rhodamine 101 et pour trois radioéléments (fluor-18, lutétium-177 et yttrium-90). Courbes superposées de fluorescence et de luminescence (gauche) et valeurs des ratios de CRET (droite)

Lorsque l'on trace les courbes représentatives des ratios de CRET en fonction de la longueur d'onde d'absorption du fluorophore, on retrouve bien le profil de décroissance de la luminescence Cherenkov (*figure 142*).

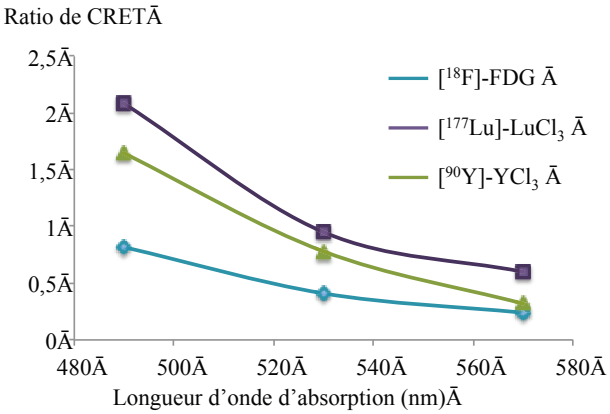


Figure 142 : Ratio de CRET en fonction de la longueur d'onde d'absorption du fluorophore

III.2.4. Concentration en fluorophore

L'influence de la concentration en fluorophore a ensuite été examinée dans le cas de la fluorescéine, et de l'yttrium-90 comme source d'excitation radioactive. Les mesures de CRET ont été réalisées pour une gamme de concentrations allant de 0,4 millimolaire à 4 micromolaires. La fluorescence de la fluorescéine est augmentée à mesure que sa concentration augmente, et ceci pour des activités d'yttrium-90 relativement égales (*figure 143*).

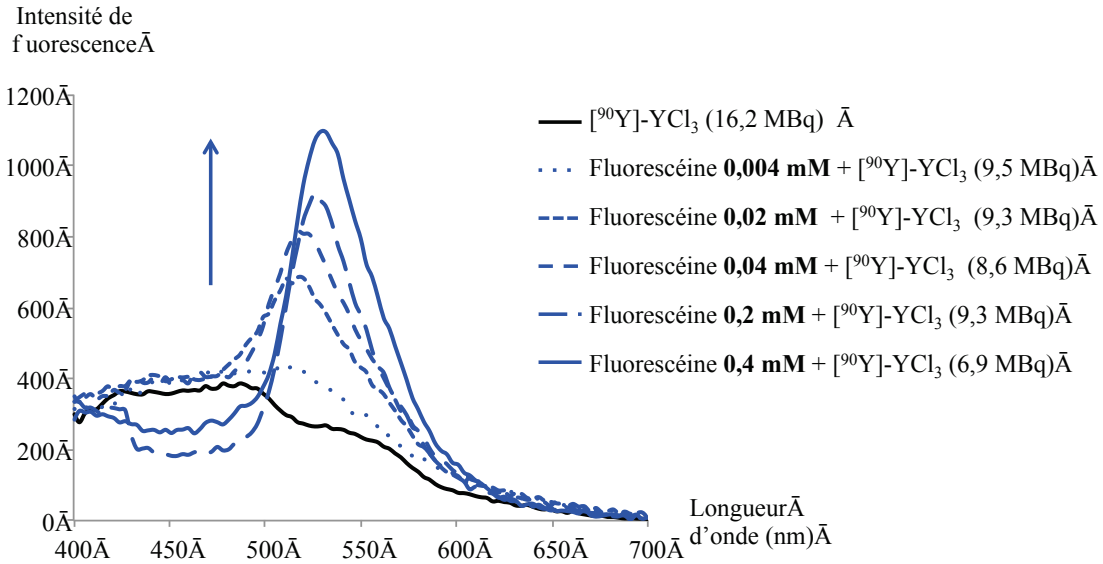


Figure 143 : Superposition des spectres de fluorescence de la fluorescéine pour différentes concentrations (0,4-0,004 mM) en présence de [^{90}Y]-YCl$_3$

Comme pour le suivi de la fluorescence en fonction de l'activité, il est ici possible de tracer l'évolution de l'intensité de fluorescence maximale en fonction de la concentration en fluorophore (*figure 144*). C'est une droite linéaire au delà de 0,04 mM. Pour les plus faibles concentrations (< 0,04 mM), la limite de distinction entre fluorescence du fluorophore et luminescence du radioélément est probablement la cause du changement de linéarité de la droite.

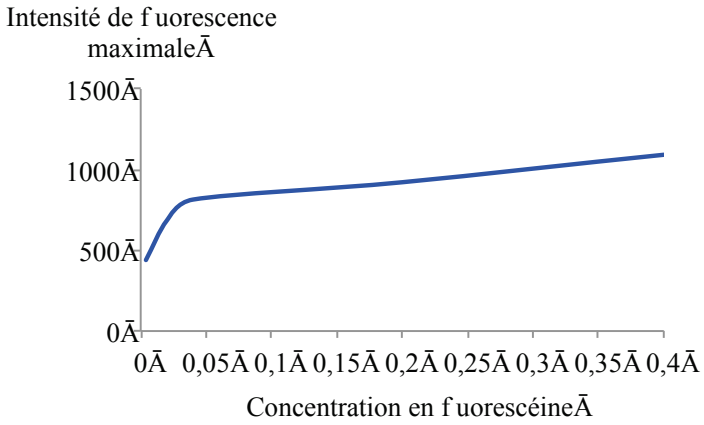


Figure 144 : Intensité de fluorescence maximale de la fluorescéine mise en présence de [^{90}Y]-YCl_3 en fonction de la concentration en fluorescéine

Egalement, il est possible de déterminer les ratios de CRET pour chaque concentration et tracer la courbe relationnelle inhérente (*figure 145*).

Concentration en fluorescéine	**Ratio de CRET (400-500/600-700 nm)**
0,004 mM	0,46
0,02 mM	0,85
0,04 mM	1,03
0,2 mM	1,76
0,4 mM	2,13

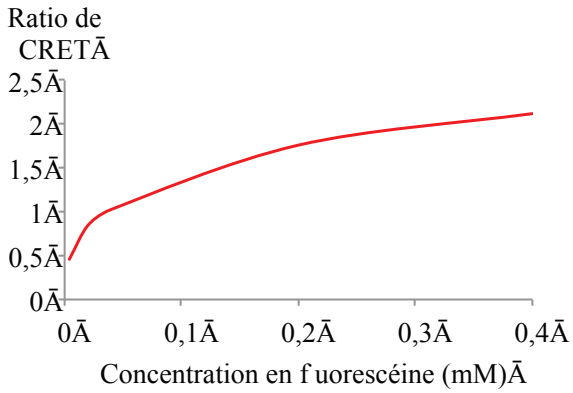


Figure 145 : Ratio de CRET en fonction de la concentration en fluorescéine ; valeurs (gauche) et courbe (droite)

Cette courbe n'est pas linéaire car sa pente diminue au fur et à mesure que la concentration en fluorescéine augmente. On peut penser que ceci est dû à la réabsorbtion par la fluorescéine des photons émis aux plus basses longueurs d'onde. Ce phénomène va conduire à l'augmentation du déplacement de Stokes du composé dans le cas des solutions les plus concentrées. L'évolution de la

longueur d'onde maximale d'émission en fonction de la concentration tend à confirmer ce phénomène, comme le montre le *tableau 29*.

Concentration (mM)	0,004	0,02	0,04	0,2	0,4
Longueur d'onde maximale d'émission par CRET (nm)	514	517	523	526	529

Tableau 29 : Evolution de la longueur d'onde maximale d'émission CRET de la fluorescéine en fonction de la concentration

Les pertes d'énergie dues au transfert de photons vont cependant diminuer l'intensité de fluorescence globale du mélange, ce qui peut expliquer la non linéarité de la courbe de ratio de CRET en fonction de la concentration (*figure 145*).

D'autre part, on peut noter que dans le cas de cette étude, il est possible d'observer la consommation des photons Cherenkov. En effet, dans le domaine d'absorption de la fluorescéine (450/500 nm), l'intensité de luminescence est plus faible pour les concentrations de 0,2 et 0,4 mM que pour les concentrations inférieures (*figure 146*). Bien que l'émission Cherenkov soit continue, il est donc apparemment possible de consommer une partie du signal et de le transformer en fluorescence de longueur d'onde plus grande.

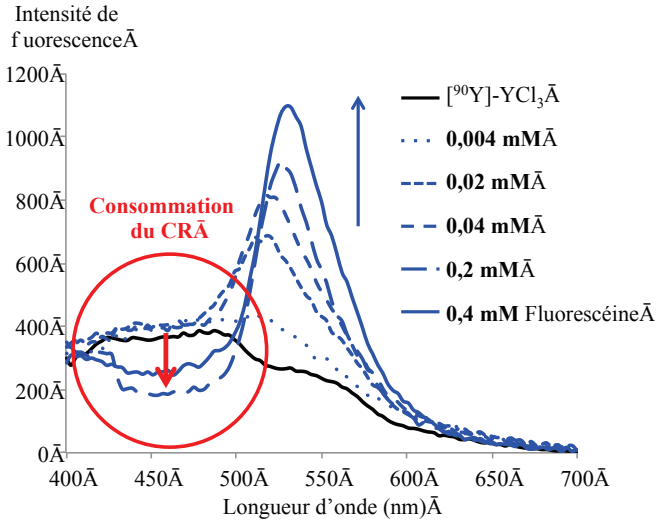


Figure 146 : Reproduction de la figure 143 pour montrer la consommation du signal Cherenkov (CR)

III.1. Etude avec d'autres fluorophores organiques

Par la suite, nous avons étudié le phénomène de CRET avec d'autres fluorophores organiques commerciaux et synthétiques absorbant et émettant à des longueurs d'onde variées. Une attention particulière a été portée sur les fluorophores émettant dans le domaine du proche infrarouge, car ils sont particulièrement intéressants pour l'imagerie *in vivo*. Le *tableau 30* résume les différents tests réalisés et mentionne les solvants et radioéléments utilisés.

Fluorophore	$\lambda_{abs}/\lambda_{em}$ (nm)	Φ_F	Solvant (10^{-3} M)	Radioélément (Activité)	CRET
UV / proche UV					
Pyrène sulfonate	380/410	0,35	H_2O	^{90}Y (9,51 MBq)	OUI
Quinine sulfate	347/451	0,55	ETOH	^{18}F (45 MBq)	NON
400-600 nm					
Rhodamine B	543/570	0,70	MeOH	^{18}F (45-63 MBq)	NON
SubPc-DTPA **22** (synthétique)	565/570	0,10	MeOH/H_2O 50:50	^{18}F (37 MBq) ^{90}Y (13,5 MBq)	NON NON
Proche IR					
Cy 5.18	658/677	0,40	H_2O	^{90}Y (22,3 MBq)	FAIBLE
Crésyl violet	602/623	0,56	EtOH	^{90}Y (7,78 MBq)	OUI
TPPS	/	/	Tampon (pH 8)	^{18}F (45 MBq) ^{177}Lu (192 MBq) ^{90}Y (9 MBq)	NON NON FAIBLE
ZnPc-DOTA **65**	665/670	/	DMSO/H_2O 50:50	^{90}Y (14,7 MBq)	NON
ZnPc-$(Pyr)_8$ **70**	670/680	/	MeOH/H_2O 50:50	^{18}F (58 MBq) ^{90}Y (57 MBq)	NON NON
Vert d'indocyanine	795/813	0,11	H_2O	^{90}Y (18 MBq)	NON

Tableau 30 : Récapitulatif des essais de CRET réalisés avec différents fluorophores

Pour les résultats non concluants, la plupart peuvent être expliqués par des valeurs de rendement quantique de fluorescence trop faibles et/ou une longueur d'onde d'absorption trop élevée. Un système de solvant non adapté peut également être mis en cause (cas de la rhodamine B).

La section suivante décrit les résultats concluants :

* **Cas du pyrène sulfonate :**

L'importante disponibilité de photons Cherenkov dans le domaine de l'UV et du proche UV permet d'observer la fluorescence induite par CRET du pyrène sulfonate. Le spectre est superposé à celui de la fluorescéine réalisé dans les mêmes conditions de mesure, à titre de comparaison (*figure 147*).

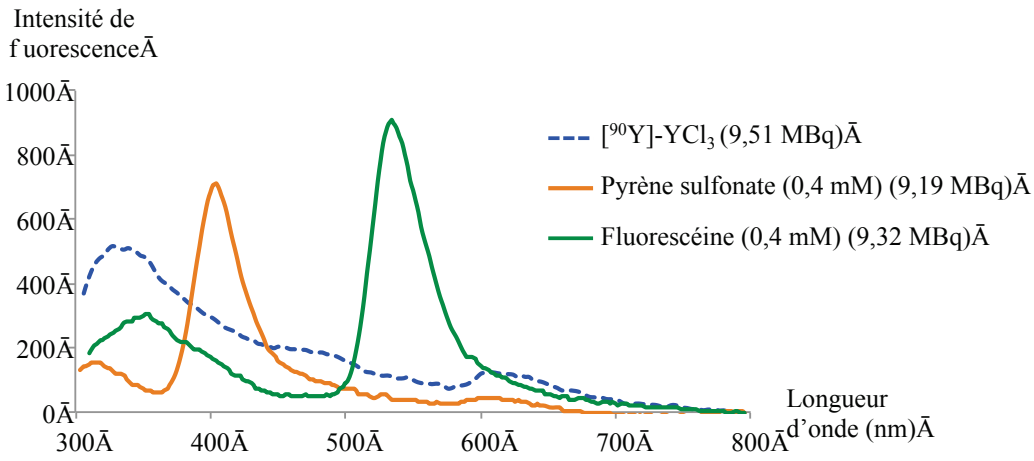


Figure 147 : Spectre de fluorescence du pyrène en présence de [^{90}Y]-YCl_3, et superposition avec les spectres de la fluorescéine et de l'yttrium-90 seul

Les valeurs de rendement de CRET pour ces deux fluorophores ont été calculées :

- Pyrène sulfonate : CRET (300-350/500-800 nm) = 2,90
- Fluorescéine : CRET (300-475/600-800 nm) = 1,27

Le rendement de CRET est donc supérieur dans le cas du pyrène, car son absorption se situe dans une fenêtre spectrale où la luminescence Cherenkov est plus intense, à savoir la fenêtre de l'UV (300-400 nm). Cependant, l'intensité de fluorescence maximum dans le cas de ce fluorophore est inférieure à celle obtenue pour la fluorescéine compte tenu de ses propriétés photophysiques moindres.

* **Crésyl violet, Cyanine 5.19 et TPPS :**

La fluorescence du crésyl violet induite par CRET a pu être observée en utilisant 7,78 MBq d'yttrium-90 comme source de photons (*figure 148*).

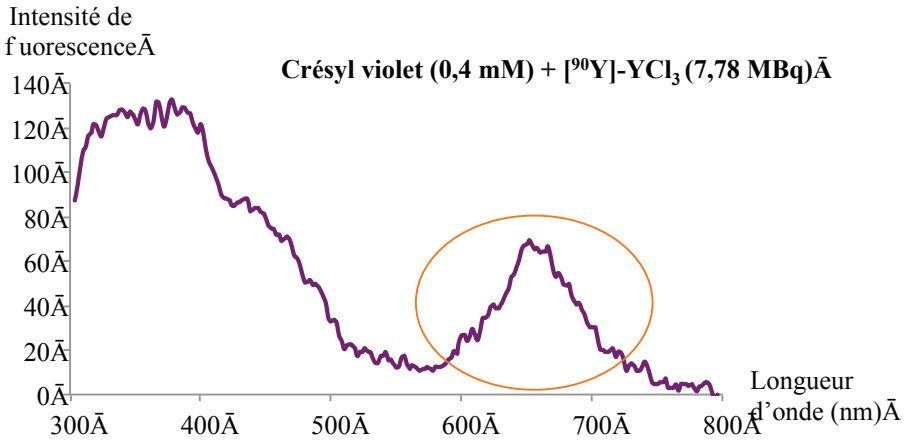


Figure 148 : Fluorescence du crésyl violet en présence de [^{90}Y]-YCl_3

Son intensité de fluorescence est cependant faible en comparaison des xanthènes étudiés précédemment, ce qui s'explique par une moins grande disponibilité de photons Cherenkov à la longueur d'onde d'absorption (602 nm) et des propriétés photophysiques réduites pour ce fluorophore.

C'est également le cas pour la tétraphénylporpyrine tétrasulfonate (TPPS) et la cyanine 5.18 (*figure 149*). Pour ces deux fluorophores, le très faible signal est à la limite de détection.

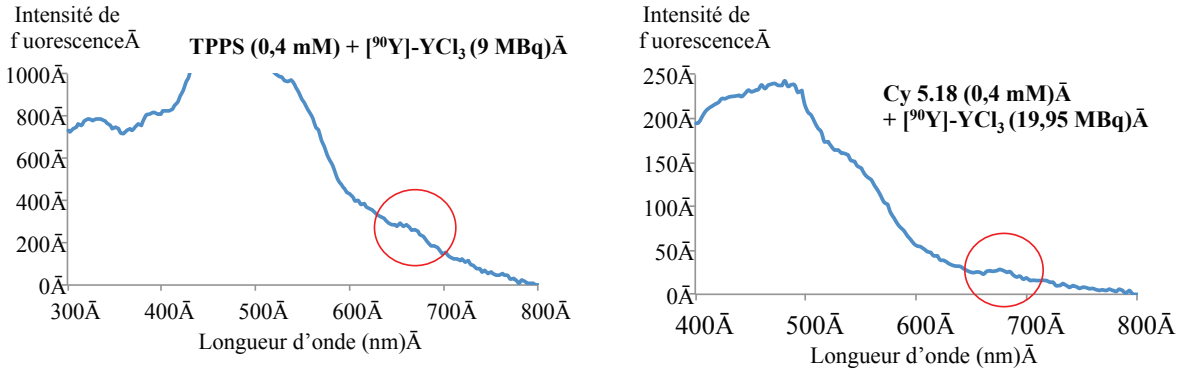


Figure 149 : Mesures de CRET avec la TPPS (gauche) et la cyanine 5.19 (droite) en présence de [^{90}Y]-YCl_3

III.2. Mesures de CRET sur un imageur optique

En complément des études de fluorimétrie, quelques mesures de CRET ont été effectuées sur un imageur optique adapté à l'imagerie Cherenkov (IVIS Lumina series III, Perkin Elmer). Ces mesures « fantômes » ont été réalisées en plaçant les solutions dans des puits (plaque 96 puits), puis en mesurant le flux de photons. Selon le cas, les expériences ont été réalisées sans filtres (mesure du flux de photons sur toute la gamme spectrale) ou avec filtres.

III.2.1. Mesure sans filtres

Les mesures ont été réalisées avec du fluor-18 ([^{18}F]-FDG) comme source d'excitation. L'activité est pour tous les puits sensiblement la même (10 MBq). Les fluorophores testés sont : la fluorescéine (0,4 ; 0,04 ; 0,004 mM), le pyrène sulfonate (0,4 mM), l'éosine Y (0,4 mM) , la rhodamine 6G (0,4 mM), la rhodamine 101 (0,4 mM), le crésyl violet (0,4 mM) et la cyanine 5.18 (0,4 mM). Une première observation montre que le flux de photons est dans le cas de la fluorescéine et des rhodamines supérieur au flux de photons du FDG seul (*figure 150*).

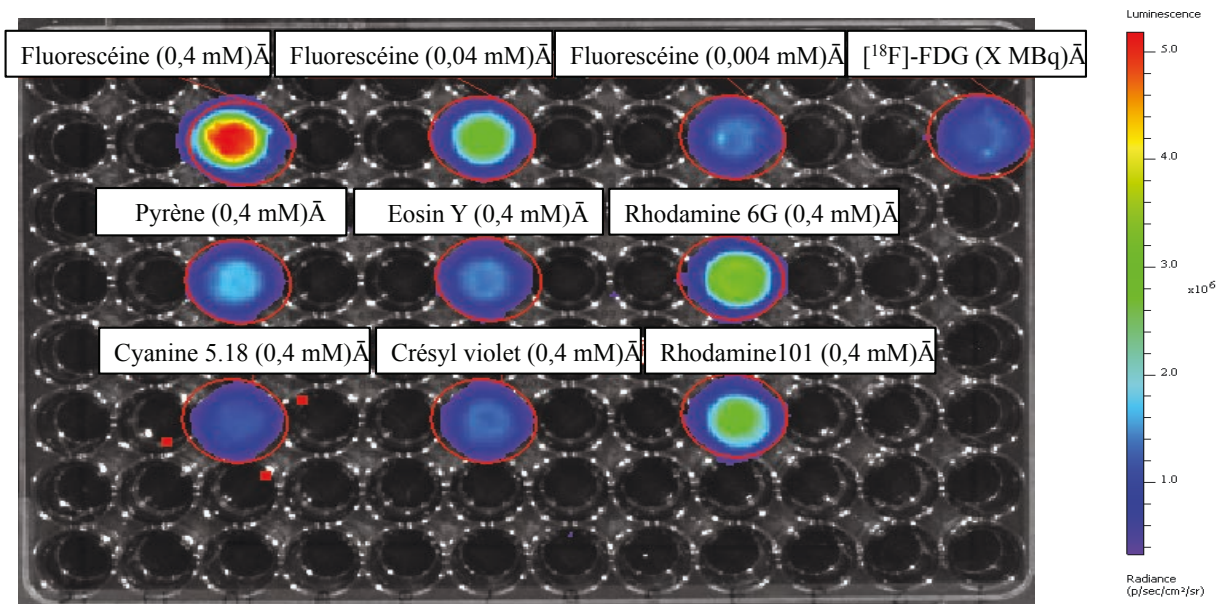


Figure 150 : Images fantômes d'une plaque 96 puits contenant différents fluorophores mis en présence de [^{18}F]-FDG

Le tracé de l'histogramme représentant le flux de photons pour chaque puits confirme cette observation (*figure 151*).

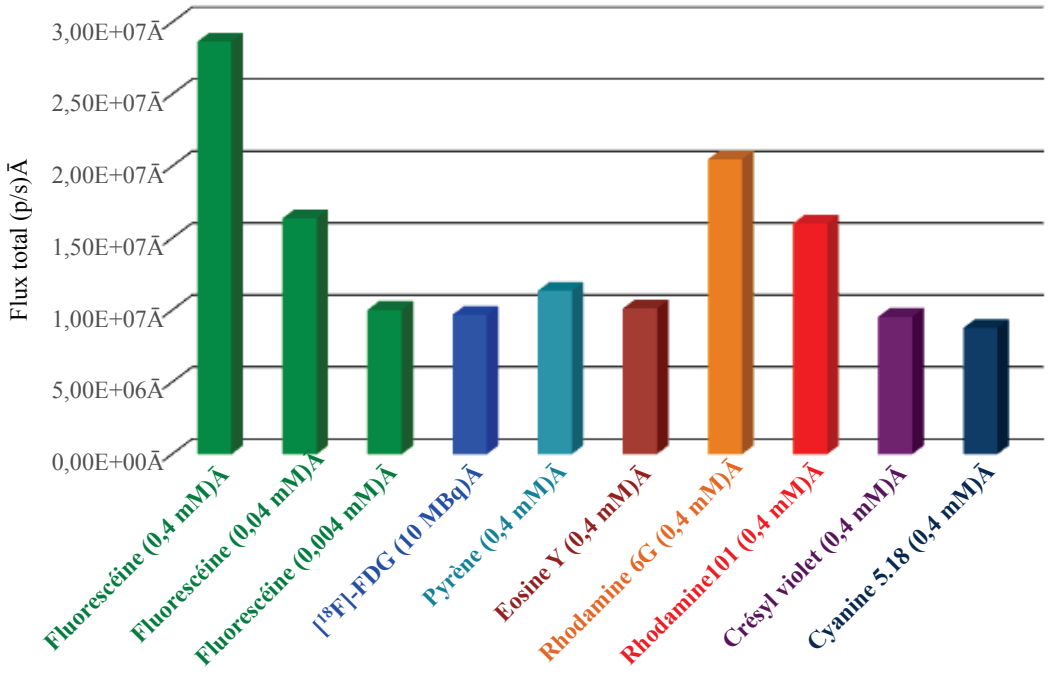


Figure 151 : Histogramme des flux de photons par seconde (p/s) détectés pour chaque puit

En effet, la quantité de lumière captée est :

* 3 fois supérieure en présence de fluorescéine à 0,4 mM ;
* 1,7 fois supérieure en présence de fluorescéine à 0,04 mM ;
* 2,1 fois supérieure en présence de rhodamine 6G à 0,4 mM ;

* 1,7 fois supérieure en présence de rhodamine 101 à 0,4 mM ; et sensiblement la même dans les autres cas, par rapport au [^{18}F]-FDG seul.

Il est ici confirmé que l'utilisation d'un fluorophore organique permet donc d'augmenter sensiblement le signal Cherenkov. La fluorescéine est le fluorophore le plus approprié pour augmenter ce signal, comme nous l'avions déjà conclu précédemment.

III.2.2. Mesure avec filtres

L'utilisation de filtres permet ensuite de détecter et quantifier la lumière émise sur une plage de longueurs d'onde choisie. Le flux de photons détecté pour chaque filtre utilisé est visible sur les images de la plaque présentées sur la *figure 152*.

Les mesures mettent en évidence une augmentation du flux de photons de part la présence du fluorophore. En effet, les puits de plus forte intensité lumineuse pour chaque fenêtre de détection correspondent à chaque fois au fluorophore qui émet dans la gamme de longueur d'onde définie par cette fenêtre.

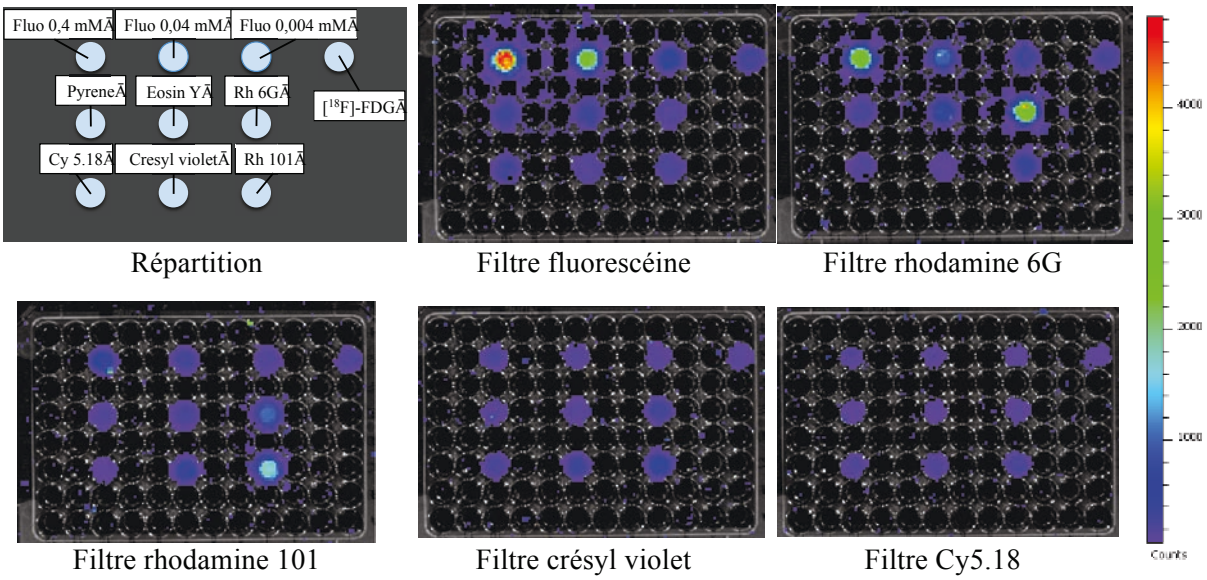


Figure 152 : Images de la plaque 96 puits réalisées en utilisant différents filtres d'émission

Le phénomène de CRET appliqué aux des fluorophores organiques permet donc d'augmenter le signal Cherenkov sur une gamme spectrale choisie. Cependant, ceci est de plus en plus difficile à mesure que l'on approche de la fenêtre du proche infrarouge.

Partie IV : Synthèse d'un système monomoléculaire et mesures du CRET

La partie précédente a notamment permis de démontrer que le couple fluorescéine/yttrium-90 était optimal pour obtenir un phénomène de CRET efficace. Compte tenu de ce résultat, les deux acteurs ont été associés de manière intramoléculaire pour former un agent CRET d'intérêt. Il est constitué de la fluorescéine fonctionnalisée par un agent chélatant adapté à l'yttrium, le DOTAGA.

IV.1. Synthèse de la fluorescéine DOTAGA et caractérisations

La synthèse est réalisée en une étape par condensation du DOTAGA-anhydride sur la 4-aminofluorescéine en utilisant un protocole adapté de travaux du laboratoire (Thèses C. Bernhard et M. Moreau) (*schéma 81*).[242] Le produit **103** est obtenu avec 37 % de rendement suite à une purification par chromatographie semi-préparative (phase inverse). L'analyse HPLC du mélange permet de suivre la réaction puis donne après purification une pureté de 98 %.

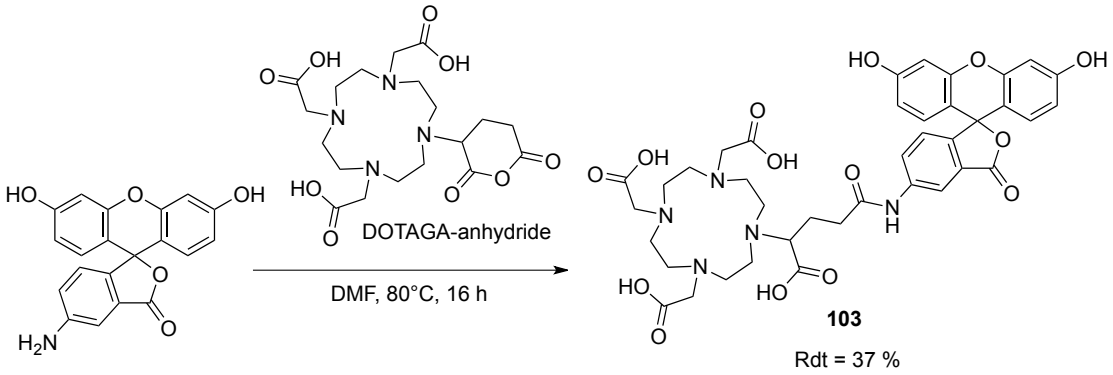


*Schéma 81 : Synthèse de la fluorescéine-DOTAGA **103***

On peut observer sur le spectre MALDI-TOF du produit **103** la présence de plusieurs amas isotopiques correspondant aux adduits avec un hydrogène ($[M+H]^+$), un sodium ($[M+Na]^+$) ou un potassium ($[M+K]^+$), ainsi que les amas issus de la perte d'un hydrogène et de l'ajout de deux cations ($[M-H+2Na]^+$, $[M-H+Na+K]^+$ et $[M-H+2K]^+$). Malgré un mode d'ionisation relativement doux, des amas isotopiques correspondant à la perte d'un groupement carboxyle ($[M-CO_3+H]^+$), ainsi que d'un groupement carboxyle et d'un groupement hydroxyle ($[M-CO_2+H]^+$) sont également observés (*figure 153*).

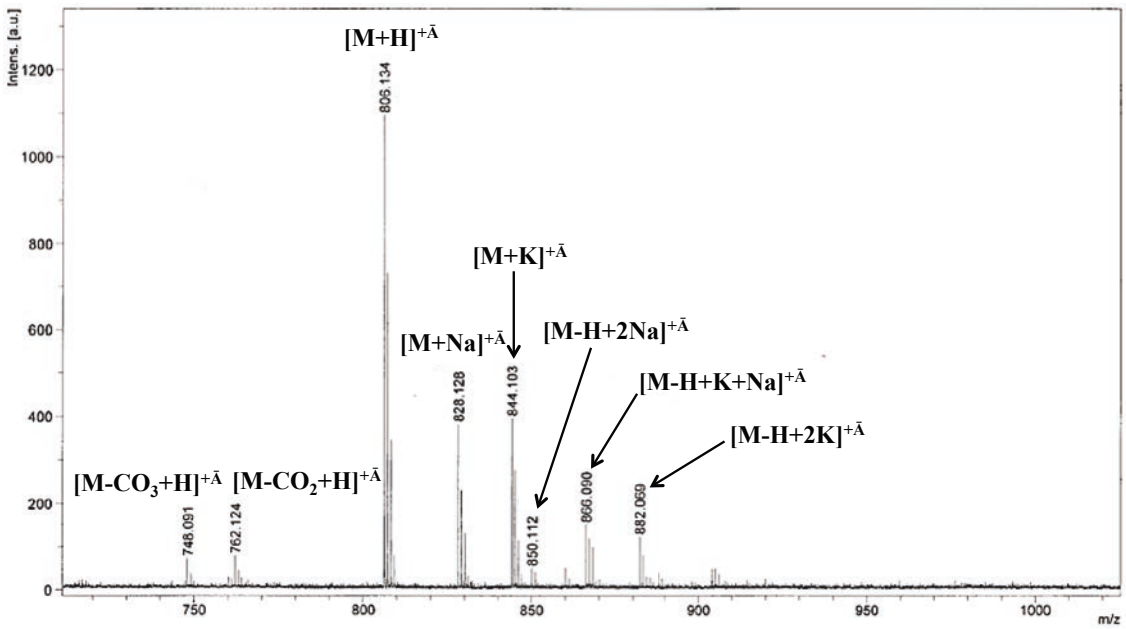


*Figure 153 : Spectre de masse MALDI-TOF de la fluorescéine-DOTAGA **103***

L'acquisition du spectre de RMN du proton du produit **103** a été réalisée à différentes températures (300 K, 330 K, 360 K, 390 K, 420 K) (*figure 154).*

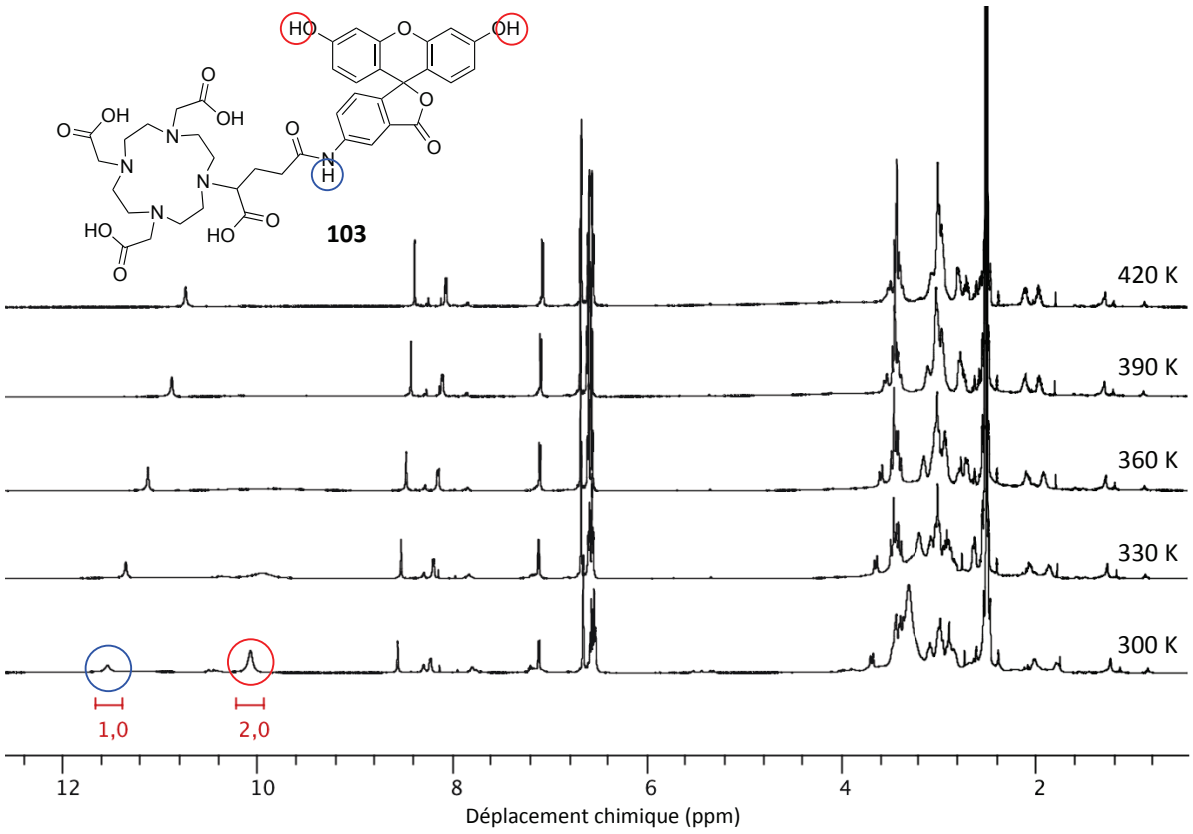


*Figure 154 : Superposition des spectres de RMN ^{1}H du composé **103** réalisés à différentes températures (DMSO-d_6, 600 MHz)*

Comme pour les systèmes ditopiques SubPc-DOTA ou ZnPc-DOTA précédemment synthétisés, l'acquisition à 420 K conduit à l'affinement et la simplification des signaux aliphatiques. On remarque également l'effet de l'augmentation de température sur le pic correspondant au proton de l'amide qui est blindé à mesure que la température augmente. D'autre part, le signal correspondant aux deux protons des phénols de la fluorescéine disparaît pour des températures au delà de 330 K.

L'attribution plus détaillée est présentée sur la *figure 156*. D'une manière générale, les signaux des protons du motif DOTAGA se situent avant 4 ppm, ceux correspondant aux protons de la fluorescéine entre 6 et 9 ppm, et le proton de l'amide au delà de 10 ppm. Les dédoublements des signaux **e** et **f** sont la conséquence de la présence en solution de deux formes du fragment fluorescéine, dues à l'équilibre spyro-énolique du motif xanthène.

Par la suite, ce composé a été métallé avec l'équivalent non radioactif de l'yttrium-90. Le composé obtenu permettra ainsi de mesurer les propriétés spectroscopique et photophysique du complexe. La métallation est réalisée en utilisant 1,1 équivalents de chlorure d'yttrium (III), dans un tampon acétate d'ammonium (pH 5,4) à 60°C pendant 2 heures (*schéma 82*).

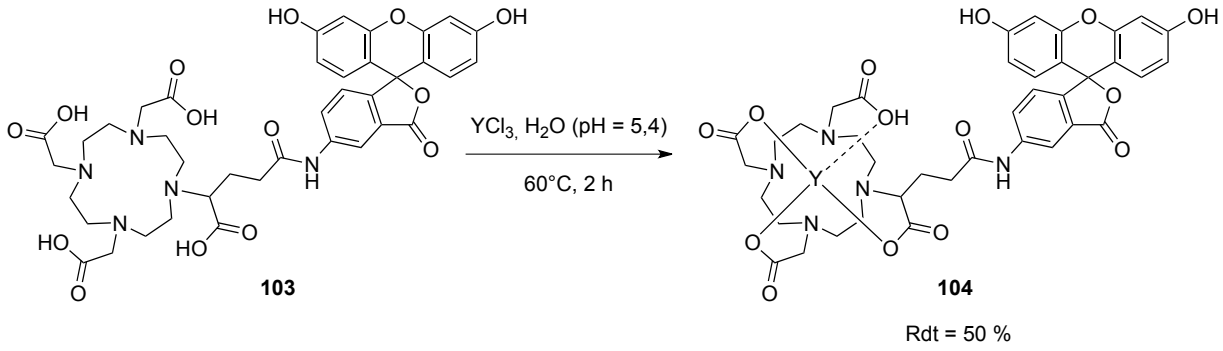


*Schéma 82 : Métallation à l'yttrium de la fluorescéine-DOTAGA **104***

Le composé métallé **104** est obtenu avec 50 % de rendement après purification. Sa pureté a ensuite été confirmée par HPLC, et il a été analysé par spectrométrie de masse haute résolution. Le spectre général révèle l'absence de ligand libre résiduel. La superposition des amas isotopiques obtenus ($[M+H]^+$ et $[M+Na]^+$) aux spectres théoriques confirme l'introduction du métal (*figure 156*).

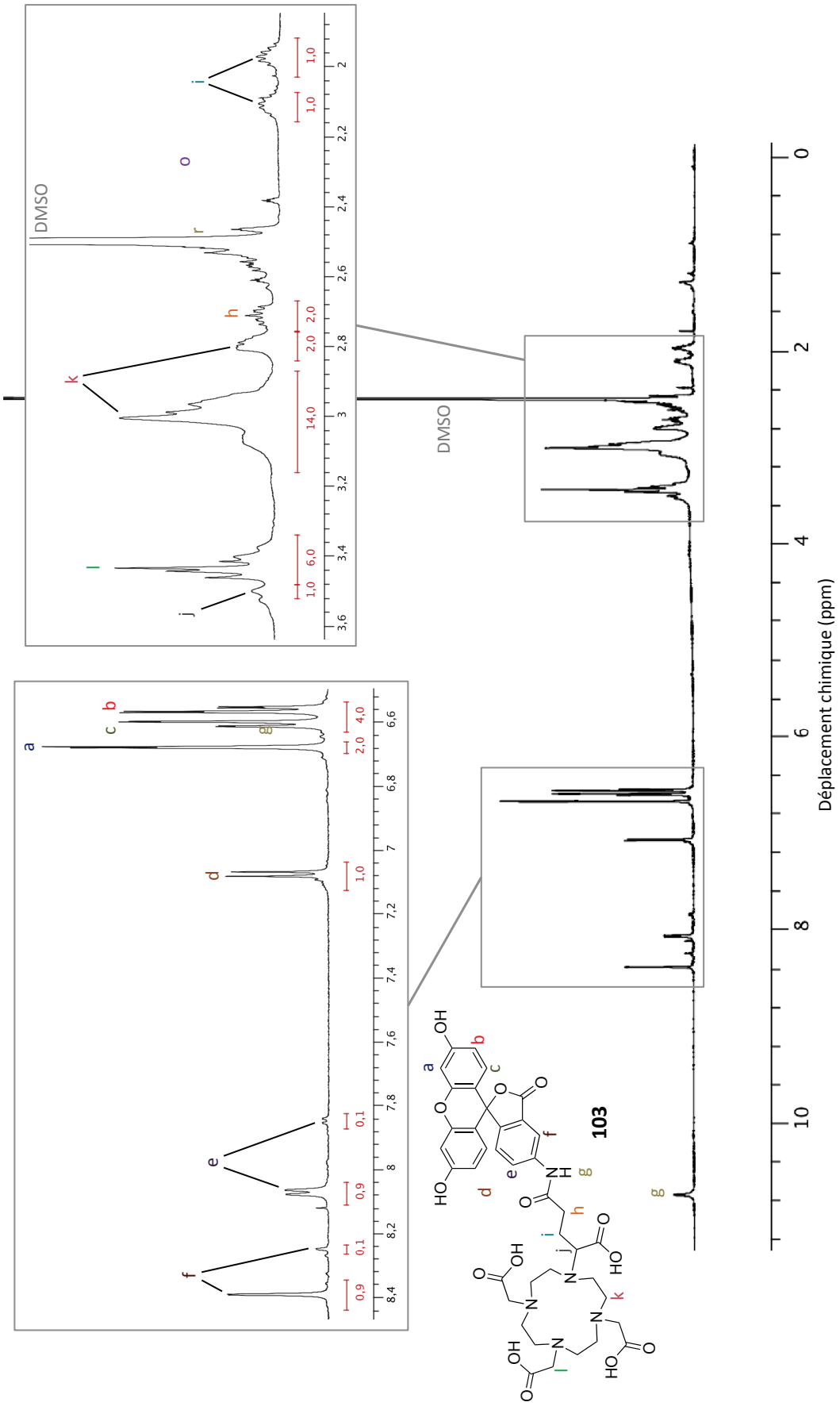


*Figure 155 : Spectre de RMN ^{1}H du composé **103** à 420 K (DMSO-d_6, 600 MHz)*

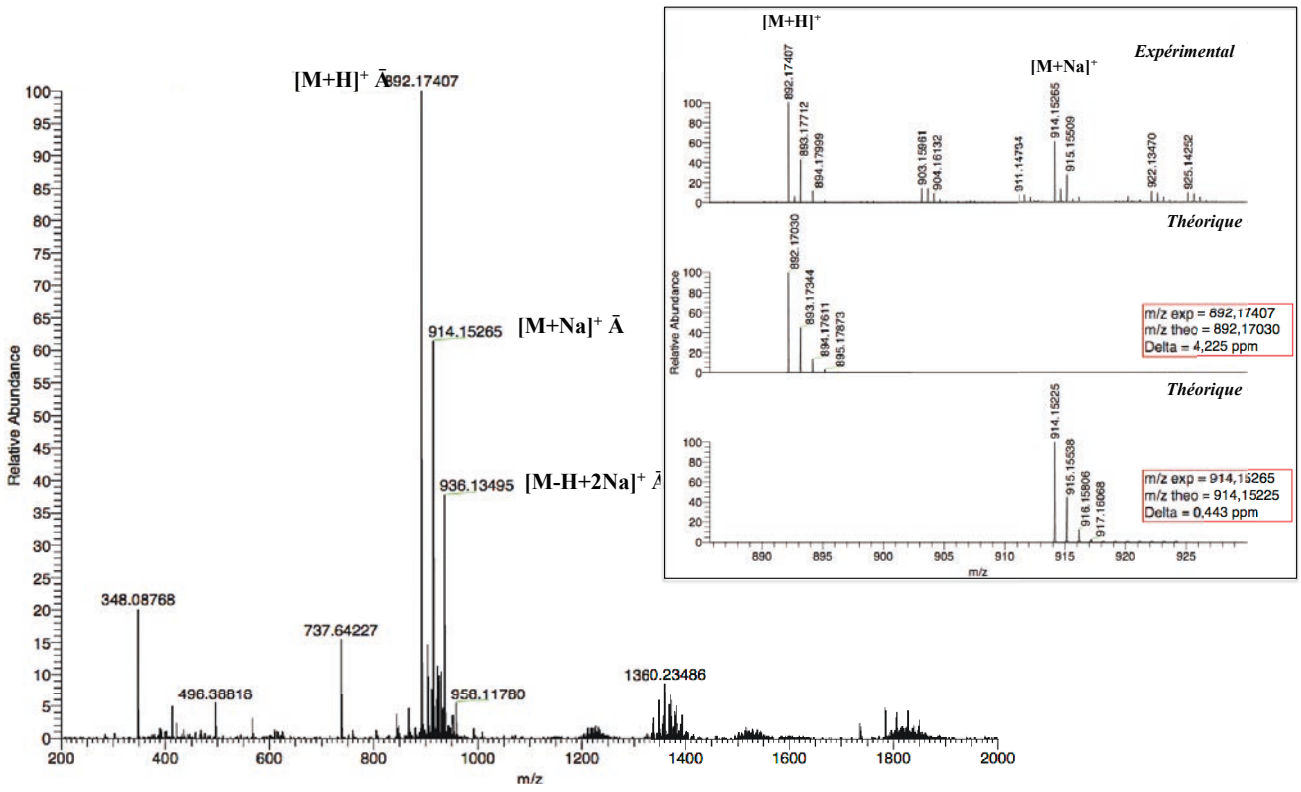


*Figure 156 : Spectre de masse exacte (ESI) de la fluorescéine-DOTAGA-Y **104**, et superposition du spectre expérimental aux spectres théoriques (insert)*

Le spectre RMN du proton (non présenté) reste relativement similaire à celui du ligand libre, bien que l'aspect des signaux des protons du polyazamacrocycle soit modifié par la présence du métal.

IV.2. Propriétés spectroscopiques et photophysiques du système

Le complexe métallique **104** a ensuite été analysé par spectroscopie UV-visible et fluorimétrie en vue de déterminer sa brillance.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la fluorescence de la fluorescéine dépend fortement de l'état de déprotonation de la molécule. Il en sera donc de même pour le composé **104**.

Bien que le DOTAGA soit probablement un ligand suffisamment fort pour contenir l'yttrium dans la soude 0,1 M, il sera préférable de réaliser les mesures de CRET dans des conditions assurant le non relargage du métal, tout en conservant une bonne fluorescence. Les courbes d'absorbance et de fluorescence du complexe **104** en fonction du pH vont ainsi permettre de déterminer un pH de travail adéquat pour les mesures Cherenkov.

La superposition des spectres d'absorption du composé métallé à différents pH révèle la présence des différentes espèces. Au delà de pH 7, seule l'espèce qui absorbe à 490 nm et qui possède le coefficient d'extinction molaire le plus élevé réside en solution (*figure 157*).

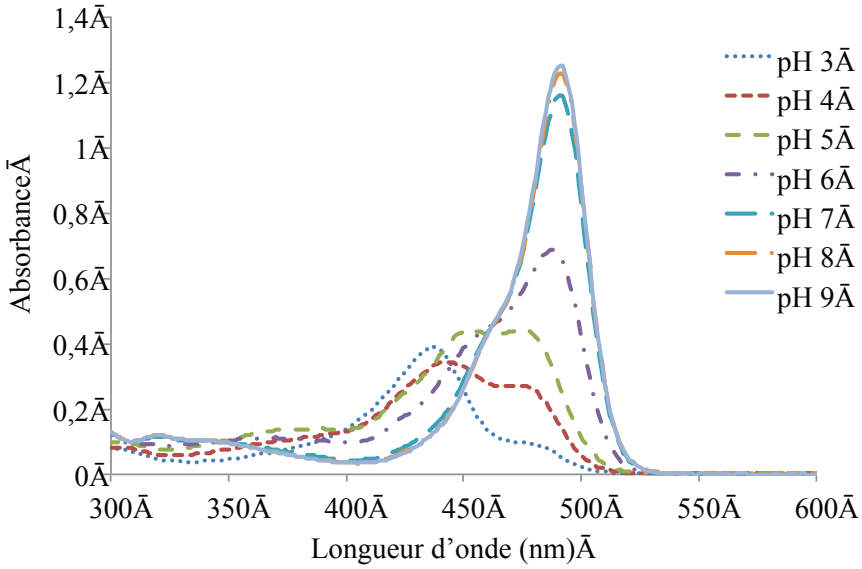


*Figure 157 : Superposition des spectres d'absorption du composé **104** mesurés à différents pH*

Les mesures de fluorescence montrent également un rendement quantique de fluorescence maximal au delà de pH 7 (*figure 158*). Cette valeur est en concordance avec les données de la littérature pour la fluorescéine simple. Ainsi, au delà de ce pH, le complexe d'yttrium **104** présente un maximum d'absorption à 491 nm et un maximum d'émission à 515 nm, et une brillance de 50 000. Les mesures de CRET devront donc être réalisées dans un tampon dont le pH est supérieur à 7.

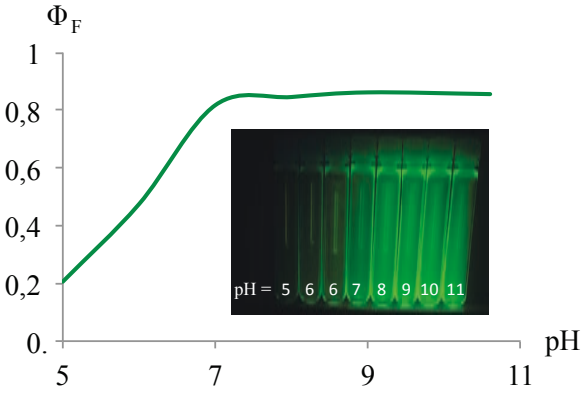


*Figure 158 : Rendement quantique de fluorescence du composé **104** en fonction du pH (298 K ; réference : fluorescéine dans NaOH 0,1 M, ϕ_F = 0,91, λ_{ex} = 470 nm ; incertitude de mesure : ± 10 %)*

IV.3. Métallation à chaud et mesure du CRET

Le composé **103** a ensuite été métallé avec de l'yttrium-90, selon un protocole adapté de la littérature.[76b]

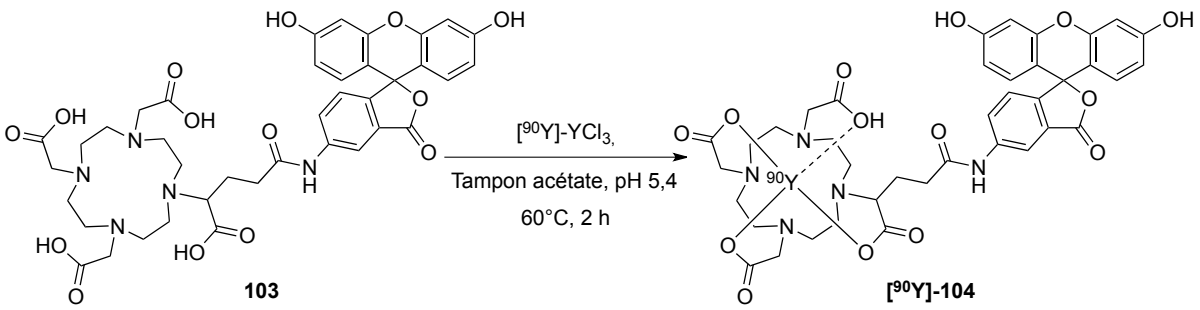


*Schéma 83 : Métallation à chaud de la fluorescéine DOTAGA **103** à partir de [^{90}Y]-YCl$_3$*

Quatre métallations ont été réalisées pour évaluer l'impact de la concentration en sonde sur les spectres de fluorescence CRET, et ceci pour une même activité. Elles sont mises en oeuvre à partir d'une solution mère de fluorescéine-DOTAGA **103** de concentration 4 mM dans le tampon acétate d'ammonium. Le *tableau 31* présente les différentes expériences ainsi que les ratios molaires obtenus entre agent radioactif et sonde.

	Volume de solution de **103** (µL)	*n(**103**)* (mol)	Activité (MBq)	*n(^{90}Y)* (mol)	Ratio molaire (*n(**103**)/ n(^{90}Y)*)
Expérience 1	100	4×10^{-5}	8,953	$4{,}942\times10^{-12}$	$8{,}1\times10^{6}$
Expérience 2	50	2×10^{-5}	7,975	$4{,}402\times10^{-12}$	$2{,}2\times10^{6}$
Expérience 3	10	4×10^{-6}	8,018	$4{,}426\times10^{-12}$	$9{,}0\times10^{5}$
Expérience 4	5	2×10^{-6}	8,743	$4{,}826\times10^{-12}$	$4{,}4\times10^{5}$

Tableau 31 : Résumé des expériences de métallation à chaud

Le nombre de moles d'yttrium-90 est calculé selon l'*équation 9* :

$$n = \frac{A \times t_{1/2}}{N_A \times \ln(2)}$$

Avec : A : activité (Bq)
n : quantité de matière d'yttrium-90 (mol)
$t_{1/2}$: demi-vie de l'yttrium-90 (s)
N_A : constante d'Avogadro (mol^{-1})

Équation 9 : calcul du nombre de moles d'yttrium-90 à partir de l'activité

La valeur de ratio molaire montre pour chaque expérience que le ligand est en grand excès par rapport au métal radioactif (entre 440 mille et 8,1 millions d'équivalents), ce qui indique que la réaction de métallation devrait être rapide.

Chacune des réactions a été suivie par radiochromatographie sur couche mince (RITLC), en utilisant un mélange méthanol/acétate d'ammonium (1:1, v/v) comme éluant et un support silice (*figure 160*).

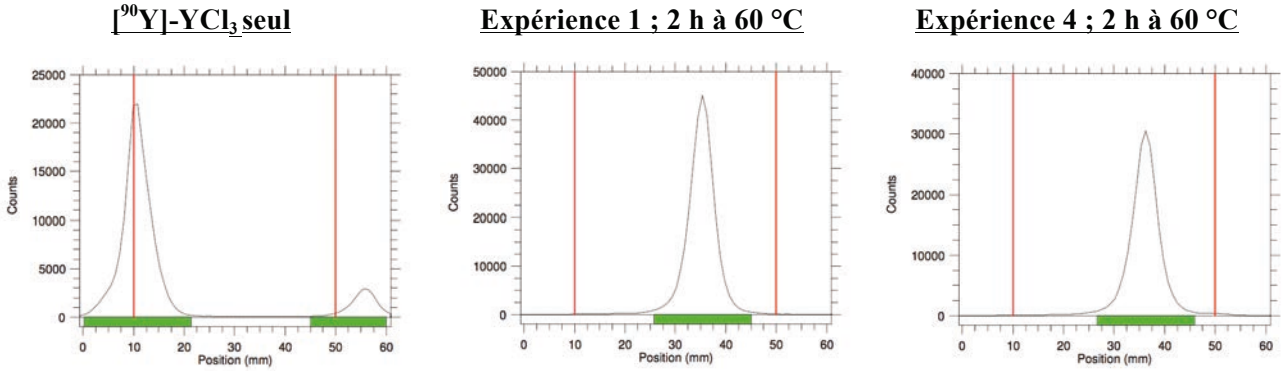


Figure 159 : Radio-CCM de l'[^{90}Y]-YCl_3 seul (gauche) et des expériences 1 et 2 (milieu et droite)

Le complexe radiométallique est observé pour un rapport frontal de 0,8, tandis que le [^{90}Y]-YCl_3 seul reste au point de dépôt (détection radiométrique) et que le produit de départ (ligand seul) migre jusqu'au front de solvant (détection à l'œil nu). Notons que pour la CCM du radiométal seul, la détection d'activité au delà du front de solvant est probablement due à une goutte d'yttrium ayant contaminé la plaque.

Les puretés radiochimiques obtenues après réaction pour chacune des expériences sont :

* Expérience 1 : 97,74 %
* Expérience 2 : 98,45 %
* Expérience 3 : 97,27 %
* Expérience 4 : 96,04 %

La dilution du mélange réactionnel avec du tampon acétate d'ammonium jusqu'à 1 mL permet ensuite de réaliser les mesures fluorimétriques pour les quatre concentrations en sonde: 0,02 ; 0,04 ; 0,2 et 0,4 mM. Comme pour le cas intermoléculaire (partie III), le phénomène de CRET est plus important pour des concentrations hautes (*figure 160*).

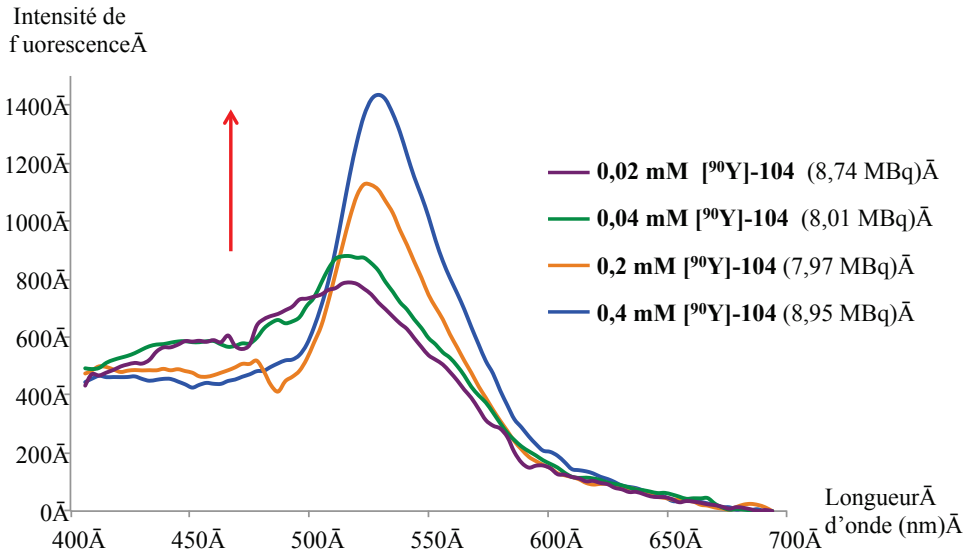


Figure 160 : Superposition des spectres de fluorescence CRET pour les quatre expériences

Ce phénomène est linéaire, comme le confirment le calcul des ratios de CRET et la courbe de ratio de CRET en fonction de la concentration (*figure 161*).

Concentration en [^{90}Y]-104	**Ratio de CRET (400-500/600-700 nm)**
0,02 mM	0,88
0,04 mM	0,92
0,2 mM	1,27
0,4 mM	1,85

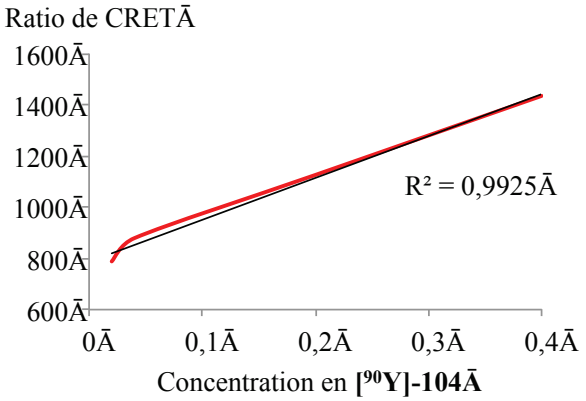


*Figure 161 : Ratio de CRET en fonction de l'activité de la concentration en **[^{90}Y]-104** ; valeurs (gauche) et courbe (droite)*

Nous avons donc pu combiner au sein d'une même espèce moléculaire le meilleur radiométal émetteur Cherenkov au meilleur fluorophore parmi ceux étudiés. D'après nos constats, cette sonde est susceptible de délivrer des images CLI *in vivo* avec une meilleure sensibilité, une meilleure résolution et une plus grande pénétrabilité qu'un radioélément injecté seul.

Partie V : Etude du multi-transfert de type CRET-FRET

Bien que le système précédent semble prometteur, il sera tout de même limité par une émission de fluorescence hors de la fenêtre thérapeutique. Les essais de CRET ne s'étant pas avérés concluants avec les fluorophores proche infrarouge (ZnPc, TPPS, cyanines), nous avons envisagé d'atteindre cette fenêtre par multi-transfert. Cela consiste à utiliser le phénomène de CRET pour exciter des paires de fluorophores FRET. On peut alors parler de CRET-FRET, ou CRET-multiFRET s'il y a plus de deux fluorophores. Nous avons étudié pour la première fois ce phénomène, de manière intermoléculaire, avec certains des fluorophores utilisés dans les parties précedantes.

V.1. Systèmes fluorescéine/rhodamine 6G/rhodamine 101

Les xanthènes sont bien connus pour leur capacité à former des paires FRET efficaces. Les systèmes combinant fluorescéine et rhodamine (FITC/TRITC) trouvent en effet de nombreuses applications dans des domaines variés.[243]
Lorsque l'on compare les domaines d'absorption et d'émission de la fluorescéine, de la rhodamine 6G et de la rhodamine 101, on note que la courbe d'émission de la fluorescéine se superpose relativement bien avec la courbe d'absorption de la rhodamine 6G, de même pour le couple des rhodamines 6G et 101. Ces trois fluorophores sont donc adaptés pour étudier le CRET-multiFRET et la fluorescéine devrait être capable de capter les photons Cherenkov pour les transmettre ensuite jusqu'à la rhodamine 101 par cascade de FRET.

Dans un premier temps, nous avons étudié le simple CRET-FRET entre deux acteurs. La *figure 162* présente les spectres d'émission de la fluorescéine, de la rhodamine 6G ainsi que du mélange équimolaire fluorescéine / rhodamine 6G, mis en présence d'yttrium-90.

On observe que la mesure du CRET pour le mélange des deux fluorophores conduit à une courbe relativement similaire à celle de la rhodamine 6G seule. L'absence du signal d'émission de la fluorescéine confirme que les photons captés à 490 nm ne sont pas émis à 530-550 nm mais transférés à la rhodamine 6G. Le double transfert de type CRET-FRET semble donc avoir lieu. Notons que la rhodamine 6G est probablement excitée par les photons de transfert, ici de la fluorescéine, mais aussi par les photons de luminescence du radioélément.

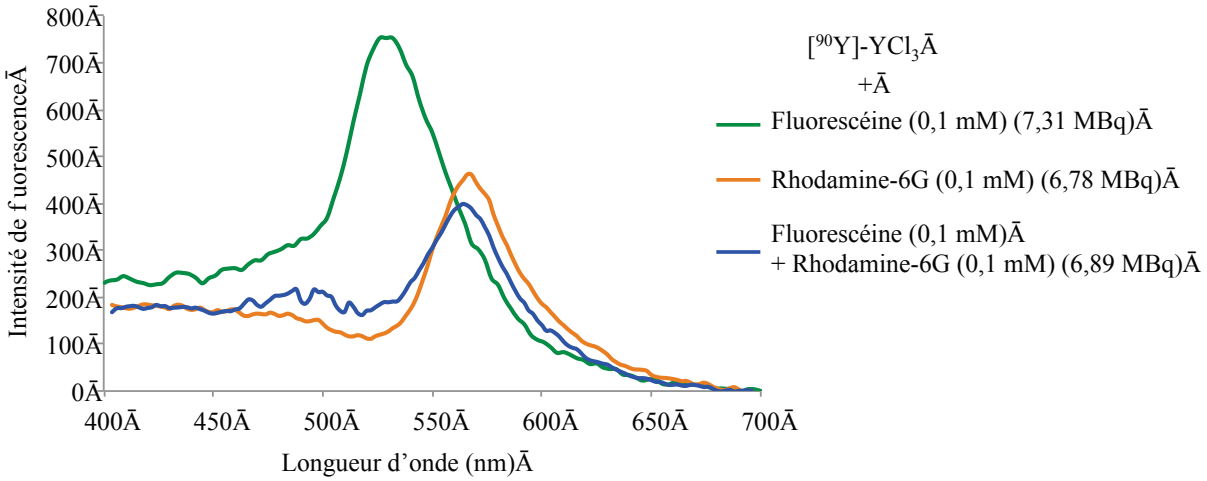


Figure 162 : Superposition des spectres de fluorescence de la fluorescéine, de la rhodamine 6G et du mélange équimolaire fluorescéine/rhodamine 6G en présence de $[^{90}Y]$-YCl_3

L'intensité du pic d'émission dans le cas du mélange n'est cependant pas supérieure à celle obtenue pour le fluorophore seul, ceci pour une même quantité de matière en sonde. Le calcul des ratios de CRET, ramené à une unité de radioactivité, confirme cette observation et met en évidence une meilleure efficacité du phénomène de CRET simple par rapport au CRET-FRET (*tableau 32*).

	Ratio de CRET	**Activité (MBq)**	**Ratio de CRET par activité (MBq^{-1})**
Fluorescéine (400-475/600-700 nm)	1,97	7,31	0,27
Rhodamine 6G (400-525/650-700 nm)	1,09	6,78	0,16
Fluorescéine + Rhodamine 6G (400-525/650-700 nm)	0,91	6,89	0,13

Tableau 32 : Ratio de CRET, activité rapport des deux dans le cas du mélange fluorescéine/rhodamine 6G

Des mesures similaires ont ensuite été réalisées avec le couple rhodamine 6G / rhodamine 101 (*figure 163*). Comme précédemment, on suppose que le double transfert CRET-FRET a lieu, car la courbe du mélange (bleue) ne présente pas le pic de fluorescence de la rhodamine 6G.

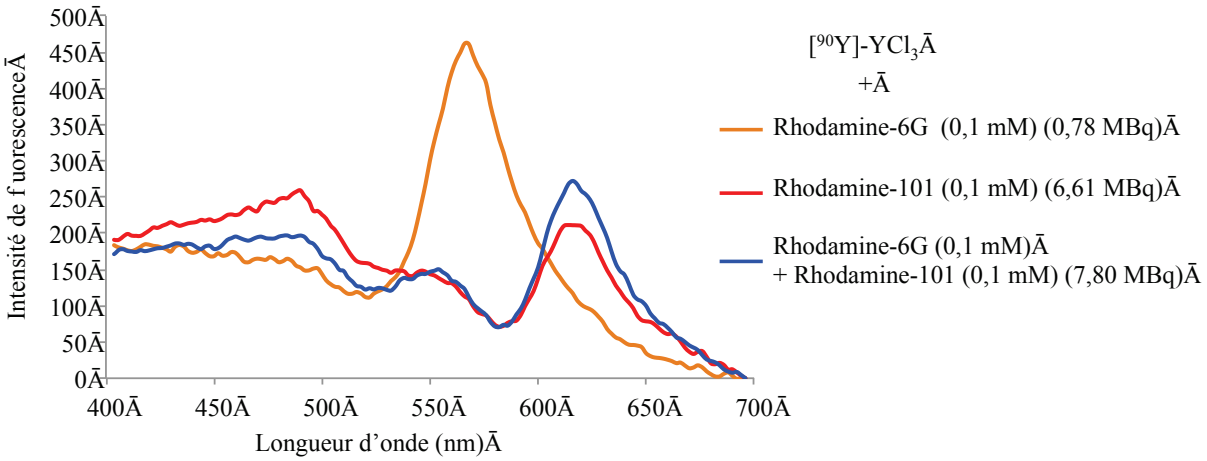


Figure 163 : Superposition des spectres de fluorescence des rhodamine 6G et 101, et du mélange équimolaire rhodamine 6G/101 en présence de [^{90}Y]-YCl_3

Les ratios de CRET par activité ont été calculés (*tableau 33*). Dans ce cas, la valeur pour le mélange (0,042) est faiblement supérieure à celle du fluorophore seul (0,029).

	Ratio de CRET	**Activité (MBq)**	**Ratio de CRET/activité (MBq^{-1})**
Rhodamine 6G (400-525/650-700 nm)	1,09	6,78	0,16
Rhodamine 101 (400-600/700-700 nm)	0,19	6,61	0,029
Rhodamine 6G + 101 (400-600/700-700 nm)	0,33	7,80	0,042

Tableau 33 : Ratio de CRET, activité et rapport dans le cas du mélange rhodamine 6G/rhodamine 101

L'ajout de rhodamine 6G a donc ici un apport bénéfique sur la quantité de photons émise par la rhodamine 101. Pour vérifier ce constat, des mesures du ratio de CRET ont été réalisées en ajoutant des quantités croissantes du fluorophore donneur (Rh6G) (*figure 164).*

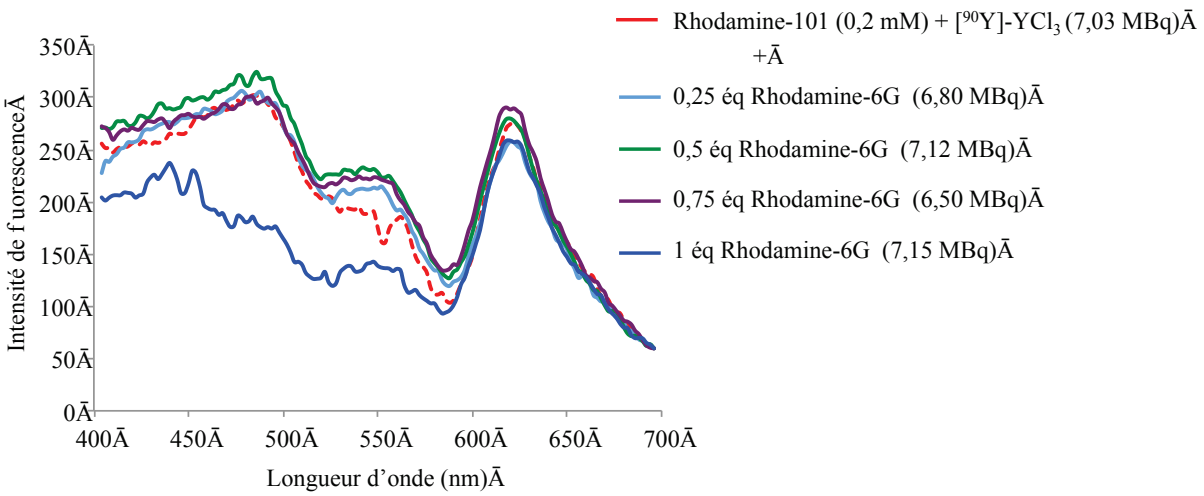


Figure 164 : Superposition des spectres de fluorescence de la rhodamine 6G seule et pour différents équivalents de rhodamine 101 ajoutés (0,25-1 éq), en présence de [^{90}Y]-YCl_3

Les valeurs de ratio de CRET par activité montrent que l'ajout de rhodamine 6G a une influence sur l'intensité de fluorescence de la rhodamine 101 au delà de 0,75 équivalents ajoutés (*tableau 34*). Cependant, on remarque sur les courbes correspondantes (*figure 164*), que cette augmentation n'est pas due à l'augmentation de l'intensité à 625 nm, mais à une baisse du signal Cherenkov de 400 à 575 nm. Cela signifie qu'une quantité plus importante de photons Cherenkov est captée par les fluorophores sans pour autant augmenter la quantité de photons émise par la rhodamine 101.

	Ratio de CRET (400-600/700-700 nm)	**Activité (MBq)**	**Ratio de CRET par activité (MBq^{-1})**
Rhodamine 101	0,067	7,03	$9{,}5.10^{-3}$
+ 0,25 éq Rhodamine 6G	0,039	6,80	$5{,}7.10^{-3}$
+ 0,5 éq Rhodamine 6G	0,034	7,12	$4{,}8.10^{-3}$
+ 0,75 éq Rhodamine 6G	0,074	6,50	$11{,}4.10^{-3}$
+ 0,1 éq Rhodamine 6G	0,21	7,15	$28{,}0.10^{-3}$

Tableau 34 : Ratio de CRET, activité et rapport dans le cas de la rhodamine 101 mise en présence de différents équivalents de rhodamine 6G

Il est donc difficile de tirer des conclusions sur l'effet bénéfique ou non du CRET-FRET par rapport au CRET simple dans le cas de ces deux associations (Fluo/Rh6G et 6G/101).

Une dernière mesure a été réalisée pour le mélange des trois fluorophores afin d'accomplir un triple transfert de type CRET-FRET-FRET. Le résultat obtenu est présenté sur la *figure 165*.

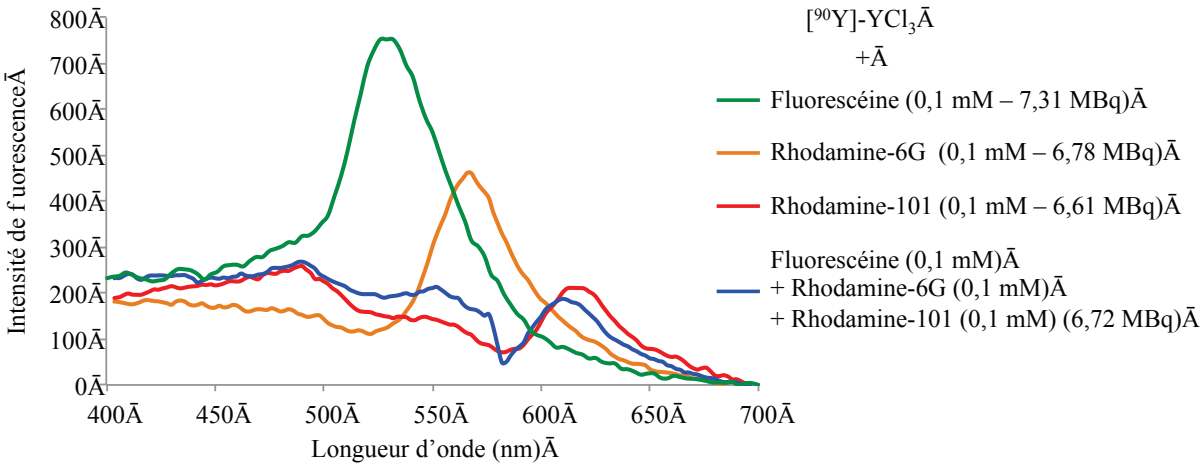


Figure 165 : Superposition des spectres de fluorescence de la fluorescéine, des rhodamine 6G et 101, et du mélange 1:1:1 de fluorescéine/rhodamine 6G/101 en présence de [^{90}Y]-YCl_3

La courbe de fluorescence du mélange présente le pic d'émission du fluorophore de plus grande longueur d'onde, à savoir la rhodamine 101. Cette courbe ne présentant pas les signaux de fluorescence des fluorophores donneurs, à savoir la fluorescéine et la rhodamine 6G, ce qui confirme que phénomène de multi-transfert désiré à lieu. Le *tableau 35* résume quant à lui les valeurs de ratio de CRET par activité pour chacune des mesures.

	Ratio de CRET	**Activité (MBq)**	**Ratio de CRET par activité (MBq^{-1})**
Fluorescéine (400-475/600-700 nm)	1,97	7,31	0,27
Rhodamine 6G (400-525/650-700 nm)	1,09	6,78	0,16
Rhodamine 101 (400-600/700-700 nm)	0,19	6,61	0,029
Fluo + Rh6G + Rh101 (400-600/700-700 nm)	0,18	6,72	0,027

Tableau 35 : Ratio de CRET, activité et rapports dans le cas du mélange Fluorescéine/rhodamine 6G/rhodamine 101

Le résultat est sensiblement le même dans le cas de la rhodamine 101 seule et du mélange rhodamine 6G/101 : le transfert de type CRET-FRET-FRET mis en évidence ne permet pas d'augmenter l'intensité de fluorescence aux plus grandes longueurs d'onde.

V.2. Multi-transferts avec le crésyl violet

Nous avons suite réalisé des études similaires avec le crésyl violet, afin de transférer les photons plus loin vers le proche infrarouge. Nous avons alors mis en jeu ce fluorophore dans un système CRET-FRET et CRET-multiFRET en utilisant les rhodamine 6G et 101 comme fluorophores donneurs (*figure 166*).

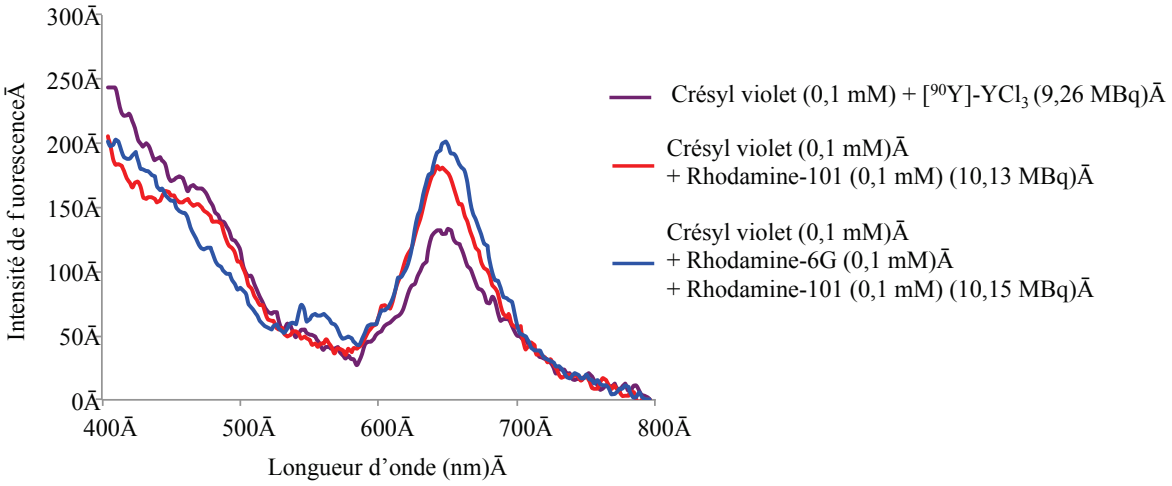


Figure 166 : Superposition du spectre de fluorescence du crésyl violet à ceux des mélanges avec les rhodamines 6G et 101, en présence de [^{90}Y]-YCl_3

Les valeurs de ratios de CRET par activité ont ensuite été déterminées (*tableau 36*).

	Ratio de CRET (400-600/750-800 nm)	**Activité (MBq)**	**Ratio de CRET par activité (MBq^{-1})**
Crésyl violet	0,15	9,26	16,2
+ Rhodamine 101	0,37	10,13	36,5
+ Rhodamine 101/6G	0,44	10,15	43,3

Tableau 36 : Ratio de CRET, activité et rapports dans le cas des mélanges crésyl violet/Rhodamine 101 et crésyl violet/Rhodamine 101/Rhodamine 6G

L'intensité du signal entre 600 et 750 nm, dû à la fluorescence du crésyl violet, est ici augmentée par l'ajout des rhodamines. Les phénomènes de CRET-FRET ou CRET-FRET-FRET sont donc ici bénéfiques.

On notera que dans le cas du mélange de ces trois fluorophores, une faible émission de fluorescence de la rhodamine 6G peut également être observée à 560 nm (*figure 167*). Le phénomène de FRET n'est donc pas total dans ce cas.

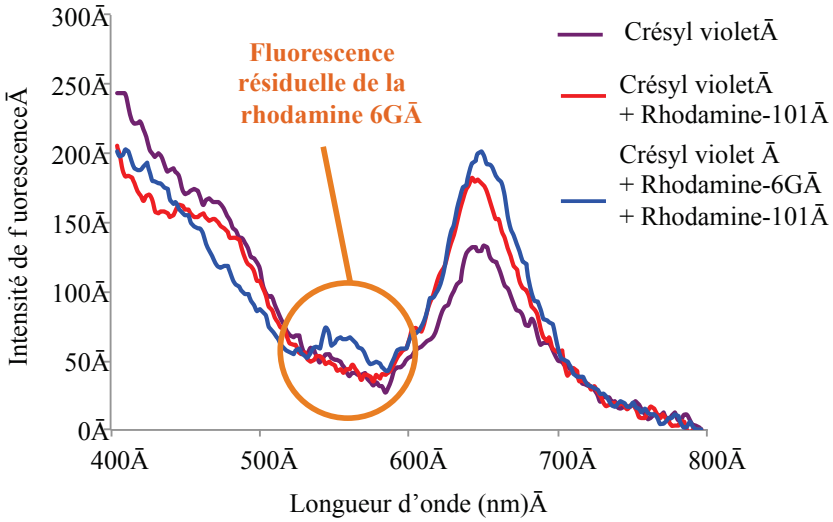


Figure 167 : Reproduction de la figure 166 mettant en évidence la fluorescence résiduelle de la rhodamine 6G

D'autres fluorophores absorbant et émettant plus loin encore vers l'infrarouge (Phtalocyanine et ICG) ont été testés comme acteurs pour le CRET-FRET, en les associant avec des donneurs tels que la rhodamine 101 ou le crésyl violet. Cependant, les résultats se sont montrés non concluants car aucune fluorescence des sondes NIR n'est détectée.

Pour conclure, les spectres de fluorescence des mélanges montrent que le transfert intermoléculaire entre les paires FRET à lieu suite à l'excitation par effet CRET du fluorophore de plus basse longueur d'onde d'absorption. Ce phénomène n'a à ce jour jamais été mis en évidence dans la littérature.

Son impact sur l'intensité du signal résultant et sur le ratio de CRET reste cependant faible, ce qui limite pour l'instant l'application du principe. Il est probable que ce phénomène soit en compétition directe avec la perte d'énergie ayant lieu pendant les différents transferts. Il peut donc être envisagé que des systèmes FRET plus efficaces, comme par exemple des systèmes liants covalentement la paire de fluorophores, pourraient conduire à un résultat plus probant.

Partie VI : Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons étudié le phénomène de transfert des photons Cherenkov émis par un radioélément vers un fluorophore. L'objectif majeur a porté sur la mise au point d'un agent CLI plus performant via le CRET. Pour ce faire, nous avons dans un premier temps étudié le phénomène de façon rationnelle en examinant les différents paramètres influençant le phénomène de CRET intermoléculaire, à savoir la nature du radioélément, l'activité utilisée, la nature du fluorophore et sa concentration. Les meilleurs résultats ont été obtenus en utilisant la fluorescéine et l'yttrium-90.

Nous avons donc associé ces deux acteurs au sein d'une même entité en synthétisant la fluorescéine-DOTAGA-^{90}Y. Cet agent permet d'augmenter l'intensité globale de fluorescence émise et de la centrer sur une fenêtre restreinte de longueurs d'onde. L'utilisation de cette sonde CRET et de filtres appropriés pourrait alors permettre de réduire notablement le bruit de fond nuisant à l'imagerie CLI et à l'imagerie de fluorescence classique, et ainsi d'augmenter la pénétrabilité et la sensibilité du signal.

Ce système nécessite cependant d'être finalisé par modification de la voie de synthèse en vue d'introduire une biomolécule vectrice. Le composé présenté sur la *figure 168*, synthétisé au laboratoire par M. Moreau dans le cadre de sa thèse, semblerait par exemple approprié pour l'introduction d'un vecteur biologique, ainsi que pour la métallation avec l'yttrium-90, dans l'optique de réaliser des études *in vivo* de CRET.[242c]

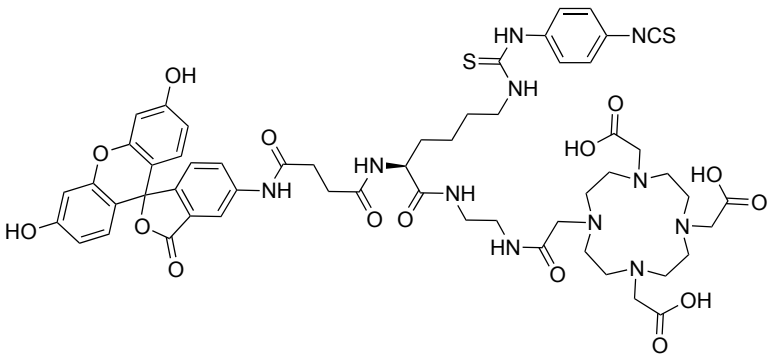


Figure 168 : Système ditopique synthétisé par M. Moreau (thèse de l'Université de Bourgogne)

Il reste également de nombreuses autres familles de fluorophores potentiellement intéressantes à étudier en CRET, comme les BODIPY ou les dikétopyrrolopyrroles.

Afin de transférer les photons Cherenkov jusqu'à la fenêtre thérapeutique, nous avons également étudié les phénomènes de multitransfert de type CRET-FRET et CRET-multiFRET. Bien que nous

ayons pour la première fois démontré la faisabilité du concept, la fluorescence résultant des mélanges de fluorophores libres n'est pas notablement augmentée.

On peut alors espérer que le résultat sera plus probant en utilisant des systèmes associant les différents fluorophores de façon covalente. La phtalocyanine substituée par quatre unités BODIPY via des liaisons triples décrite par Gol et al. en 2014 (*figure 169*), s'est montrée efficace pour transférer jusqu'à 702 nm les photons perçus à 502 nm, et pourrait par exemple se montrer intéressante dans notre cas.[244]

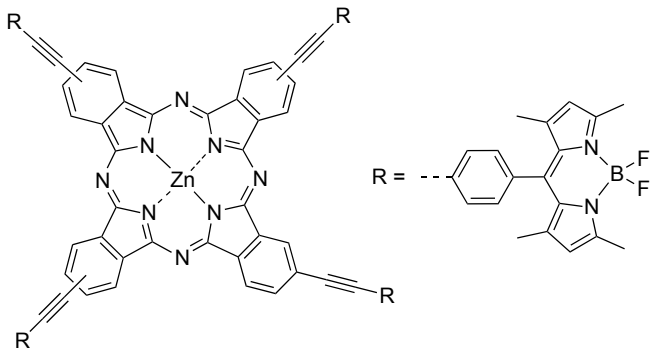


Figure 169 : Structure de la sonde FRET développée par M. Durmus et al.

Ce type de système souffre cependant d'une faible solubilité en milieu aqueux ou alcoolique, ce qui rend difficile son utilisation. Une adaptation structurale judicieuse permettant d'incorporer des fonctions hydrosolubilisantes devra être envisagée.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Ce travail de thèse a intégré plusieurs objectifs. Le premier était d'étudier le potentiel de deux familles de fluorophores, à savoir les subphtalocyanines et les phtalocyanines, pour une application en imagerie optique. Ceci a nécessité de développer des outils synthétiques appropriés pour introduire des fonctions d'intérêts, mais aussi d'étudier les propriétés des systèmes obtenus en considération du cahier des charges propre aux fluorophores appliqués à l'imagerie médicale. Le deuxième objectif a consisté à utiliser certaines des sondes obtenues pour préparer des agents d'imagerie mono- ou multimodaux par biovectorisation ou association avec un nano-objet approprié. Le dernier objectif a porté sur l'étude du phénomène de CRET en vue de déterminer les conditions optimales pour un transfert efficace, puis sur la mise au point une sonde monomoléculaire CRET.

Dans ce manuscrit, nous avons donc décrit dans un premier temps la synthèse de subphtalocyanines et phtalocyanines fonctionnelles, présentant des groupements adaptés à une application en imagerie optique. En effet, nous avons pu préparer des sondes contenant des fonctions permettant la bioconjugaison, l'association avec un agent chélatant ou un nano-objet. Certaines de ces sondes ont été utilisées pour créer des systèmes ditopiques par association avec des agents chélatants.

Dans le cas des subphtalocyanines, la complexation de métaux d'intérêt a été mise en œuvre avec les analogues froids des métaux utilisés en scintigraphie ou avec du gadolinium pour une application en IRM. Comme décrit dans le deuxième chapitre, les subphtalocyanines possédant une fonction de greffage ont été utilisées pour préparer des agents peptidiques. Puis une approche plus avantageuse utilisant les liposomes a été examinée en vue de vectoriser cette nouvelle sonde fluorescente.

Les phtalocyanines fonctionnelles ont quant à elles permis de préparer des nanohybrides bimodaux ou théranostiques, par association avec des nanoparticules d'oxyde de fer ou des nanotubes d'oxyde de titane.

Les propriétés des agents obtenus, comme leur fluorescence ou leur relaxivité, ont également été évaluées et se montrent encourageantes pour une mise en pratique *in vivo*. Dans le cas des subphtalocyanines, des études préliminaires sur un modèle cellulaire ont permis de prouver la possibilité d'utiliser ces sondes en microscopie optique.

Si les sondes préparées possèdent plusieurs critères requis pour une application en imagerie optique, des études ont pu montrer que la stabilité chimique et photophysique dans le cas des

subphtalocyanines, et le phénomène d'agrégation dans le cas des phtalocyanines, constituent pour le moment un frein pour le bon développement de ces sondes. Des études ont cependant permis d'identifier précisément les phénomènes et de définir des moyens rationnels d'amélioration des systèmes obtenus. Dans le cas des subphtalocyanines, il sera primordial de moduler la nature et le mode d'introduction des substituants afin de procurer plus de stabilité à la sonde. Pour les phtalocyanines, des premiers outils synthétiques ont été développés et étudiés en vue de réduire notablement l'agrégation. Ils visent à encombrer stériquement les faces du macrocycle par introduction de groupements orthogonaux au plan de la phtalocyanine.

Dans le dernier chapitre, nous avons étudié le phénomène de CRET de manière intermoléculaire en utilisant divers radioéléments et fluorophores organiques. À travers plusieurs études, nous avons identifié les paramètres conduisant au transfert le plus performant. Ces paramètres ont été pris en considération pour la mise au point d'une sonde combinant le fluorophore et le radioélément de manière intramoléculaire. De manière anticipée, la possibilité d'utiliser un phénomène de double transfert de type CRET-FRET a également été examinée en vue d'obtenir une émission dans le domaine du proche infrarouge. Les travaux futurs devront consister à utiliser les résultats obtenus pour mettre au point des agents CRET permettant d'améliorer la pénétrabilité du CLI.

Ces travaux de thèse constituent les prémices de projets mis tout récemment en place au laboratoire. Certains points ouvrent de nombreuses perspectives tandis que d'autres permettent d'en fermer. En effet, certains chemins synthétiques préférentiels étant maintenant tracés, les méthodologies développées permettront de mettre au point des agents d'imagerie optique mono- ou multimodaux efficaces.

Il est clair qu'aujourd'hui, ce type de recherche axée « chimie » reste primordial et représente un réel défi lorsque l'on souhaite réfléchir en amont au design d'un agent d'imagerie efficace, ou plus largement d'un composé capable de donner des informations biologiques pour aider à améliorer la lutte contre le cancer. Cette reflexion est tout aussi valable pour l'imagerie monomodale que bimodale, avec pour cette dernière un challenge encore plus important. Il est également interessant de continuer à développer de nouvelles techniques d'imagerie, par exemple l'imagerie Cherenkov, qui a vu le jour il y a six ans et qui, au bout de cinq ans, a déjà été transposée au stade préclinique. La recherche chimique au service de l'imagerie médicale est donc un secteur prometteur, d'évolution rapide, dans lequel nous avons cherché à apporter notre contribution, et qu'il est essentiel de continuer à enrichir par l'acquisition de nouvelles connaissances scientifiques sur le sujet.

A. Instrumentation

A.1. Dynamic Light Scattering (DLS) and Zeta Potentiel

Hydrodynamic diameter and zeta potential measurements were performed on a Zeta-Nanosizer (Malvern) into 10^{-2} M NaCl solutions.

A.2. Fluorescence Spectroscopy

A.2.1. . Fluorescence measurement and quantum yield calculation

Fluorescence measurements were performed on a Jasco FP-8500 spectrofluorometer equipped with a Xe source. Fluorescence quantum yields were calculated using fluorescein in NaOH 0.1 M (Φ_F = 0.91), rhodamine 6G in methanol (Φ_F = 0.94), cresyl violet in ethanol (Φ_F = 0.56) as reference. Excitation was performed at 470 nm (fluorescein), 488 nm (Rh 6G) or 602 nm (cresyl violet) for both sample and reference.[245] Emission spectrums were recorded for an absorbance at excitation wavelength comprized between 0.03 and 0.07. Fluorescence quantum yields (Φ_F) were determinated by the comparison method, using the following equation:

$$\phi_F = \phi_F(Std) \times \left(\frac{\eta}{\eta(Std)}\right)^2 \times \left(\frac{1-10^{-Abs}}{1-10^{-Abs(Std)}}\right) \times \left(\frac{A(Std)}{A}\right)$$

With:

Std correspond to standard

Φ_F and Φ_F(Std): fluorescence quantum yields

η and η(Std): refractive indices of solvent

Abs and Abs(Std): absorbances at excitation wavelength (488 nm)

A and A(Std): areas under the fluorescence curves

A.2.2. Photobleaching experiment

Continuous Irradiation of the samples was achieved using a Xenon lamp, at the excitation maximum wavelength of each fluorophore. The solution of fluorophore was placed in a quartz cuvette (1 cm pathlength), and the fluorescence intensity at maximum emission wavelength was measured every 30 seconds over 900 minutes.

A.2.1. Fluorescence mesurement of Cherenkov radiation

Cherenkov Radiation Energy Transfer (CRET) fluorescence measurements were performed on a Agilent Cary Eclipse (sensitivity: *a)* signal-to-noise measurements of Raman band of water 1/700; *b)* theoretical detection limit: 1 pmol of fluorescein) in quartz cuvettes 1x1x3 cm (1 cm path). The method used was the following: 400 µL of fluorophore (10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M in a water-miscible solvent) was mixed with a solution of the radioactive species (i.e. [^{18}F]-FDG, [^{177}Lu]-$LuCl_3$ and [^{90}Y]-YCl_3), the volume of which was varied because it depended upon the desired level of radioactivity to introduce in the cuvette. Subsequent addition of a saline solution (0.9% NaCl) was achieved to reach an overall volume of 1 mL. Measurement parameters were: bioluminescence mode, gate time of 10 s, 20 nm emission slit, 3 nm of data interval, Stavinsky smoothing (factor 5).

A.3. Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

The purification of the liposomes was achieved on a Äkta pure (GE) FPLC. The liposome suspension (500 µL) was injected on a 1 mL loop, and elution was performed on a Hi- trap column (GE) using PBS as the eluent with a flow rate set at 3 mL/min. The detection wavelengths were set at 204 nm, 300 nm, and 580 nm.

A.4. High Pressure Column Chromatography (HPLC)

Hydrophilic compounds were analyzed on Dionex Ultimate 3000. The methods used were the following:

Method A:

Column: Chromolith High Resolution RP-18 (5×4.6 mm)

Eluent A: CH_3CN + 0.1 % TFA; eluent B: H_2O + 0.1 % TFA. Flow: 3 mL/min. Equilibrate for 1.75 afterwards; ramp from 100 % B to 100 % A; duration: 5 min; keep constant for 1 min; return in 1.5 min to initial conditions. UV detectors: 214 nm, 230 nm, 254 nm, 565 nm (SubPc derivatives) or 675 nm (ZnPc derivatives) or 500 nm (Fluorescein derivatives).

Method B:

Column: Kinetex 26u C18 100A (50×2,1 mm)

Eluent A: CH_3CN + 0.1 % TFA; eluent B: H_2O + 0.1 % TFA. Flow: 3 mL/min. Equilibrate for 1.75 min afterwards; ramp from 95 % B to 5 % A; duration: 5 min; keep constant for 1.5 min; return in 1.5 min to initial conditions. UV detectors: 214 nm, 230 nm, 254 nm.

A.5. Inductivity Coupled Plasma (ICP)

Measurements were performed on a ThermoScientific cAP 6000 series ICP Spectrometer, on a SPIO–ZnPc powder (2 mg) mixed in 5:1 volumic ratio of HCl/H_2O_2 (3 mL, 12 and 9.8 mol/L

respectively) to decompose the SPIO leading to a light yellow clear homogeneous solution. The resulting mixture was diluted with water to 10 mL, and two sets of solutions were analyzed, 1/10 and 1/50 dilutions.

A.6. Nuclear Magnetic Resonnance Spectroscopy (NMR)

Measurements were performed on a Bruker Dalton X, at 300 MHz (^{1}H), 500 MHz (^{1}H), 600 MHz, (^{1}H), 75 MHz (^{13}C), 282 MHz (^{19}F) or 96 MHz (^{11}B) in various deutereted solvents ($CDCl_3$, DMSO-d_6, D_2O, acetone-d_6), with the chemical shifts reported as δ in ppm relative to TMS (residual chloroform from deuterated chloroform chemical shift was set at 7.26 ppm, residual dimethylsufoxyde from deuterated dimethylsufoxyde 7.26 ppm, residual acetone from deuterated acetone at 2.05 and residual water from deuterated water at 4.79) and coupling constants expressed in Hz. The following abbreviations were used to describe spin multiplicity: s = singlet, d = doublet, t = triplet, m = multiplet.

A.7. Mass Spectroscopy (MS)

A.7.1. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time of Flight Mass Spectroscopy (MALDI-TOF MS)

Measurements were performed on Ultraflex II LRF 2000 (BRUKER), using dithranol or DHB as a matrix. Solutions were prepared by dissolving 1 mg of compound in 1 mL of the appropriate solvent.

A.7.2. ElectroSpray Ionisation Mass Spectroscopy (ESI MS)

Measurements were performed on LTQ Orbitrap XL (THERMO) coupled to HPLC Ultimate 3000 (DIONEX). Solutions were prepared by dissolving 1 mg compound into 1 mL of appropriate solvent then diluted 100 times with methanol.

A.8. Radioactive Instant Thin Layer Chromatography (RITLC)

The radiolabelled compound was deposited on silica gel TLC plates (at 1 cm height), and eluted with methanol / 1 M ammonium acetate buffer mixture (1:1 vol.) (until 5 cm height). Radioactivity was detected using a AR-2000 radio-TLC scanner (Bioscan, USA).

A.9. Relaxivity Measurement

Measurements were performed on a Bruker Minispec mqvar ND2318. Relaxation measurements were performed at 40°C (*i.e.* close to the physiological temperature) and 20 MHz.

A.10. Transmission Electron Microscopy (TEM)

Transmission Electron Microscopy images were obtained from a JEOL JEM 2100 LaB_6 operating at 200 kV (point resolution 2.5 Å). The copper grids were dipped in dilute suspension of samples in ethanol and naturally dried.

A.11. UV-Visible Spectroscopy (UV-Vis)

UV-Vis measurements were performed on a Shimadzu UV-2550 spectrophotometer in glass cuvettes 1x1x3 cm (1 cm path).

A.12. X-Ray Diffraction (XRD)

X-ray diffraction (XRD) data were collected at room temperature for 24 hours using a Siemens D5000 automatic powder diffractometer, operating at 35 mA and 50 kV. The lattice parameters and the crystallite size ($Ø_{XRD}$) calculations were obtained using the Topas software from Bruker.

B. Step-by-step demonstration for calculation of ZnPc coverage on SPIO Nanoparticles

ICP measurements give:

c(Fe): massic concentration of Zn (0.5 mg/L)

c(Zn): massic concentration of Fe (12 mg/L)

BET measurement give:

SSA : specific surface area of magnetite (m^2/g)

TEM measurement give:

d(Np): diameter of nanoparticles

The number of phthalocyanines per nanoparticle is defined as follow:

$$N\left(\frac{Pc}{Np}\right) = \frac{N(Pc)}{N(Np)}$$

With : N(Pc) : number of Pc

N(Np) : number of Np

The number of Pc for 1 L of solution is given by:

$$N(Pc) = n(Pc)\times\mathcal{N}_A = n(Zn)\times\mathcal{N}_A$$

So

$$N(Pc) = \frac{m(Zn)}{M(Zn)}\times\mathcal{N}_A$$

With : n: number of mole (mol)

m: masse (g)

M: molar mass ($g.mol^{-1}$)

$\mathcal{N}_A$: Avogadro constante

The number of Np for 1 L of solution is given by:

$$N(Np) = \frac{S(tot)}{S(Np)}$$

With : S(tot): total surface of magnetite

S(Np): surface of one nanoparticle

The S(tot) for 1 L of solution is given by:

$$S(tot) = m(Fe_3O_4)\times SSA = n(Fe_3O_4)\times M(Fe3O4)\times SSA$$

Because of 1 mole of Fe represent 3 mole of Fe_3O_4 :

$$S(tot) = \frac{n(Fe)}{3}\times M(Fe_3O_4)\times SSA$$

So

$$S(tot) = \frac{n(Fe) \times M(Fe_3O_4) \times SSA}{3 \times M(Fe)}$$

The nanoparticule is considered as sphere, the surface area of which is:

$$S(Np) = \pi d^2$$

The number of Np for 1 L of solution is finally given by:

$$N(Np) = \frac{S(tot)}{S(Np)} = \frac{m(Fe) \times M(Fe_3O_4) \times SSA}{3 \times M(Fe) \times \pi \times d^2}$$

That give for the number of phthalocyanines per nanoparticle:

$$N\left(\frac{Pc}{Np}\right) = \frac{N(Pc)}{N(Np)} = \frac{m(Zn) \times \mathcal{N}_A \times 3 \times M(Fe) \times \pi \times d^2}{M(Zn) \times m(Fe) \times M(Fe_3O_4) \times SSA}$$

And we defined R as the massic ratio between Fe and Zn:

$$R = \frac{c(Fe)}{c(Zn)} = \frac{m(Fe)}{m(Zn)}$$

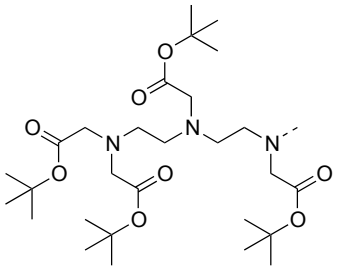
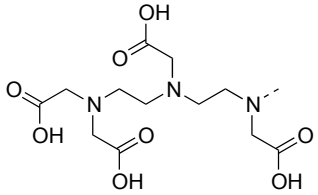
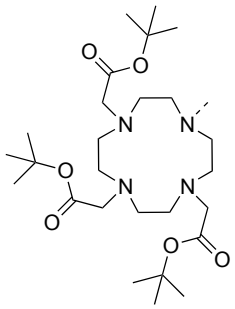
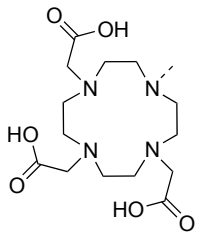
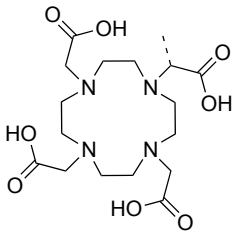
Finally, the number of Pc per nanoprticle is given by :

$$\boldsymbol{N\left(\frac{Pc}{Np}\right) = \frac{N(Pc)}{N(Np)} = \frac{\mathcal{N}_A \times 3 \times M(Fe) \times \pi \times d^2}{R \times M(Zn) \times M(Fe_3O_4) \times SSA}}$$

C. Operating procedures

C.1. Short names

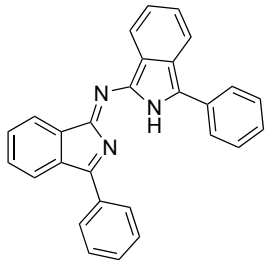
For clarity purpose, polyazaalcane or polyazacycloalcane moities were labelled as follow:

Structure	*IUPAC name*	***Short name***
	(2-((2-(bis(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)amino)ethyl)(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)amino)ethyl)(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)amino	**DT4A(tBu)**
	(2-((2-(bis(carboxymethyl)amino)ethyl)(carboxymethyl)amino)ethyl)(carboxymethyl)amino	**DT4A**
	4,7,10-tris(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl	**DO3A(tBu)**
	4,7,10-tris(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl	**DO3A**
	carboxy(4,7,10-tris(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)methyl	**DOTA**

C.2. Chapter I, Part I

*(N)-3-phenyl-N-(3-phenyl-1H-isoindol-1-ylidene)-2H-isoindol-1-amine (**1**):*

$C_{28}H_{19}N_3$
Exact mass: 397.16 g.mol^{-1}
Molecular weight: 397.47 g.mol^{-1}



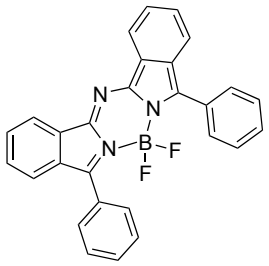
To a suspension of dicyanobenzene (1 g, 7.8 mmol) in 10 mL of freshly distilled diethyl ether at -15°C and under nitrogen atmosphere was slowly added a molar solution of phenyl magnesium bromide in ether (8.6 ml, 8.6 mmol) over a period of 15 min. The mixture was warmed up to room temperature and stirred for 1 h. The black mixture was concentrated under reduced pressure, then 20 mL of formamide was added. The mixture was heated to 210°C and left at this temperature until a shiny-red precipitate appear and the solution turn to dark-blue (30 min). After cooling to room temperature, the mixture was filtered off and the precipitate was washed five time with a MeOH/H_2O mixture (1:2, 5 × 30 mL) and dried on the filter. The product was then purified on silica gel column chromatography (eluent: DCM) to afford a blue/shiny-red powder (0.14 g, 9 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 7.07 (t, ^{3}J= 7.5 Hz, 2H); 7.16 (t, ^{3}J= 7.4 Hz, 2H); 7.22 (t, ^{3}J= 7.4 Hz, 2H); 7.30 (d, ^{3}J= 7.9 Hz, 2H); 7.33 (d, ^{3}J= 7.2 Hz, 2H); 7.7 (d, ^{3}J= 7.9 Hz, 2H); 7.77 (m, 4H); 7.88 (d, ^{3}J= 7.9 Hz, 2H).

UV-Vis (DCM): λ_{max} (nm) (10^3 ε)= 651 (69.6).

*N,N-difluoroboryl-(N)-3-phenyl-N-(3-phenyl-1H-isoindol-1-ylidene)-2H-isoindol-1-amine (**2**):*

$C_{28}H_{18}BF_2N_3$
Exact mass: 445.16 g.mol^{-1}
Molecular weight: 445.27 g.mol^{-1}

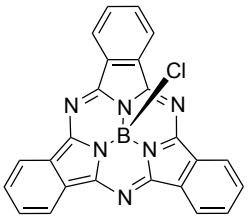


A solution of **1** (100 mg, 0.25 mmol) and DIPEA (219 µL, 1.26 mmol) in dichloroethane (10 mL) was stirred at room temperature for 1 h. Then, boron trifluoride diethyl etherate (322 µL, 2.52 mmol) was added and the mixture was heated to reflux for 15 h. Water (50 mL) was then added to the green solution and the product was extracted with DCM (2 × 50 mL). The combined organic layers were washed with 0.1 M HCl (50 mL), water (3 × 50 mL), dried over magnesium sulfate and concentred under vacuum. The residue was subjected to silica gel column chromatography (eluent: DCM/heptane 30:70) to afford a green solid (47 mg, 42 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 7.32 (t, ^{3}J= 7.6 Hz, 2H); 7.52 (m, 8H); 7.63 (d, ^{3}J= 8.1 Hz, 2H); 7.89 (m, 4H); 8.12 (d, ^{3}J= 8.1 Hz, 2H).

UV-Vis (DCM): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 713 (93.6).

*B-chloro[subphthalocyaninato]boron(III) (**3**):*



$C_{24}H_{12}BClN_6$
Exact mass: 430.09 g.mol^{-1}
Molecular weight: 430.66 g.mol^{-1}

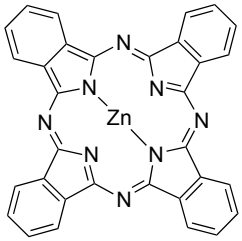
BCl_3 (4 mL, 1 M solution in *p*-xylène) was added to dry phthalonitrile (500 mg, 4 mmol), under an argon atmosphere. The vessel was placed in a preheated oil bath (150°C) and the mixture was stirred and left to reflux for 30 min. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting solid was subjected to silica gel column chromatography (eluent: DCM) (50 mg, 9 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 7.97 (m, 6H); 8.81 (m, 6H).

^{11}B NMR (96 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= -15.68 (s, 1B).

UV-Vis ($CHCl_3$): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 306 (51.2), 565 (101.2).

*Zinc phthalocyanine (**4**):*



$C_{32}H_{16}N_8Zn$
Exact mass: 576,08 g.mol^{-1}
Molecular weight: 577,90 g.mol^{-1}

To a solution of phthalonitrile (1.28 g, 10 mmol) and zinc acetate dihydrate (0.55 g, 2.5 mmol) in octanol (20 mL) was added 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (1.52 g, 10 mmol). The mixture was heated at 130 °C for 2 hours. The reaction was cooled to room temperature and the blue precipitate was filtered off, washed with 1 M hydrochloric acid (3 × 20 mL), water (3 × 20 mL) and methanol (10 mL). The blue solid obtained was dried under reduced pressure (1.12 g, 77 %).

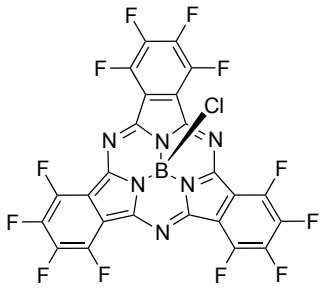
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO, 300 K): δ (ppm) = 8.22 (m, 8 H); 9.30 (m, 8 H).

MS MALDI-TOF: m/z = 577.24 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{32}H_{17}N_8Zn^+$: 577.09).

UV-Vis (DMF): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 344 (48.5), 605 (31.7), 670 (205.8).

C.3. Chapter I, Part II

*B-chloro[1,2,3,4,7,8,9,10,15,16,17,18-dodecafluorosubphthalocyaninato]boron(III) (**5**):*



$C_{24}BClF_{12}N_6$

Exact mass: 645.98 g.mol^{-1}

Molecular weight: 646.54 g.mol^{-1}

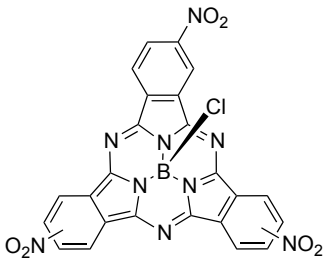
BCl_3 (4 mL, 1 M solution in *p*-xylène) was added to dry tetrafluorophthalonitrile (800 mg, 4 mmol under an argon atmosphere. The vessel was placed in a preheated oil bath (150°C) and the mixture was stirred and left to reflux for 30 min. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting solid was subjected to silica gel column chromatography (eluent: DCM) (455 mg, 53 %).

^{19}F NMR (282 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= -146.95 (m, 6F); -136.65 (m, 6F)

^{11}B NMR (96 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= -14.20 (s, 1B).

UV-Vis ($CHCl_3$): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 307 (43.0), 573 (100.2).

*B-chloro[2,9(10),16(17)-trinitrosubphthalocyaninato]boron(III) (**6**):*



$C_{26}H_{17}BClN_9O_6$

Exact mass: 597.11 g.mol^{-1}

Molecular weight: 597.73 g.mol^{-1}

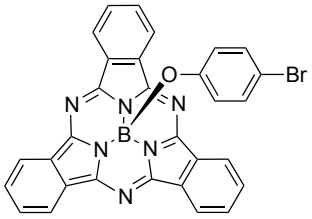
BCl_3 (4 mL, 1 M solution in *p*-xylène) was added to dry 4-nitrophthalonitrile (690 mg, 4 mmol), under an argon atmosphere. The vessel was placed in a preheated oil bath (150°C) and the mixture was stirred and left to reflux for 30 min. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting solid was subjected to silica gel column chromatography (eluent: DCM) (287 mg, 38 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 8.83 (m, 3H); 9.06 (m, 3H); 9.73 (m, 3H).

^{11}B NMR (96 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= -14.00 (s, 1B).

UV-Vis ($CHCl_3$): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 311 (52.0), 586 (74.9).

*B-(4-bromophenoxy)[subphthalocyaninato]boron(III) (**7**):*



$C_{30}H_{16}BBrN_6O$

Exact mass: 566.07 g.mol^{-1}

Molecular weight: 567.20 g.mol^{-1}

Method A:

A mixture of *B*-chloro[subphthalocyaninato]boron(III) **3** (50 mg, 0.12 mmol) and 4-bromophenol (208 mg, 1.2 mmol) in toluene (5 mL) was brought to reflux for 12 hours. After evaporation of the solvent, the residue was subjected to alumina gel column chromatography (eluent: DCM) and then recristallized in a 50:50 DCM/heptane mixture by slow evaporation of DCM, to afford *B*-(4-bromophenoxy)(subphthalocyaninato)boron(III) **7** as a bronze cristalline solid (51 mg, 75 %).

Method B :

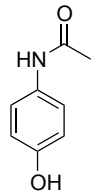
BCl_3 (4 mL, 1 M solution in p-xylene) was added to dry phthalonitrile (500 mg, 4 mmol), under an argon atmosphere. The vessel was placed in a preheated oil bath (150°C) and the mixture was stirred and left to reflux for 30 min. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting solid resuspended in toluene (30 mL). Excess of 4-bromophenol (2.08 g, 12 mmol) was added and the mixture was heated to reflux during 15 hours. After evaporation to dryness, the residue was subjected to alumina gel column chromatography (eluent: dichloromethane) to remove the excess of phenol and then to silica gel column chromatography (eluent: DCM), to afford the desired subphthalocyanine **7** (200 mg, 26 %).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 300 K): δ (ppm)= 5.27 (d, ^{3}J = 8.8 Hz, 2H); 6.84 (d, ^{3}J = 8.8 Hz, 2H); 7.91 (m, 6H); 8.85 (m, 6H).

^{11}B NMR (96 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= -15.07 (s, 1B).

UV-Vis (DCM) : λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 305 (42.3), 564 (61.7).

*N-(4-hydroxyphenyl)acetamide (**9**):*



$C_8H_9BNO_2$

Exact mass: 151.06 g.mol^{-1}

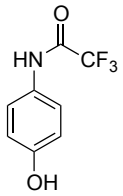
Molecular weight: 151.16 g.mol^{-1}

To a solution of 4-aminophenol (2 g, 18.3 mmol) in 30 mL of absolute ethanol was added acetic anhydride (1.74 mL, 18.3 mmol). The solution was stirred for 15 min at room temperature, then evaporated to dryness. The resulting solid was purified by silica gel column chromatography (eluent: DCM/MeOH 95:5) to give N-(4-hydroxyphenyl)acetamide **9** as a white powder (2.65 g, 96 %).

^{1}H NMR (300 MHz, acetone-d_6, 300 K): δ (ppm)= 2.03 (s, 3H); 6.75 (d, ^{3}J= 9.0 Hz, 2H); 7.43 (d, ^{3}J= 9.0 Hz, 2H); 8.21 (s, 1H) ; 8.94 (s, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 23.7, 115.0, 120.9, 131.0, 153.2, 167.6.

*2,2,2-trifluoro-N-(4-hydroxyphenyl)acetamide (**10**):*

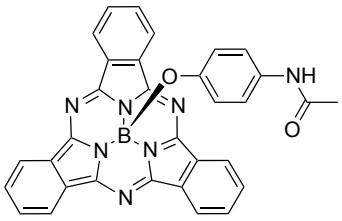


$C_8H_6F_3NO_2$
Exact mass: 205.04 g.mol^{-1}
Molecular weight: 205.13 g.mol^{-1}

A solution of *p*-aminophenol (5 g, 45.8 mmol) in THF (70 mL) was cooled in an ice bath for 15 min. Trifluoroacetic anhydride (19.6 mL, 141.1 mmol) was added dropwise under stirring for 30 min. Then, the reaction mixture was stirred for an additional 1.5 h at 0°C. The solvent was removed under reduced pressure, followed by dissolving the residue in ethyl acetate (200 mL). The solution was washed with saturated aqueous sodium bicarbonate solution (3 × 200 mL) and water (3 × 100 mL), then dried with magnesium sulfate, filtered off, and concentrated under vacuum. The product was subjected to silica gel column chromatography (eluent: DCM/MeOH 95:5) to afford 2,2,2-trifluoro-*N*-(4-hydroxyphenyl)acetamide **10** (3.1 g, 62 %).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d$_6$): δ (ppm)= 6.77 (d, ^{3}J= 9.0 Hz, 2H); 7.43 (d, ^{3}J= 9.0 Hz, 2H); 9.49 (s, 1H); 10.97 (s, 1H).

*B-(4-acetamidophenoxy)[subphthalocyaninato]boron(III) (**11**):*



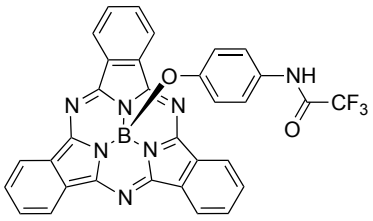
$C_{32}H_{20}BN_7O_2$
Exact mass: 545.18 g.mol^{-1}
Molecular weight: 545.36 g.mol^{-1}

BCl_3 (4 mL, 1 M solution in *p*-xylène, 4 mmol) was added to dry phthalonitrile (0.5 g, 4 mmol), under an argon atmosphere. The vessel was placed in a preheated oil bath (150°C) and the mixture was stirred and left to reflux for 30 min. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting solid resuspended in toluene (30 mL). Excess 4-acetamidophenol **9** (1.81 g, 12 mmol) was added and the mixture was heated to reflux for 15 h. After evaporation to dryness, the residue was subjected to alumina gel column chromatography (eluent: DCM/MeOH 99:1), to afford the desired subphthalocyanine **11** (90 mg, 16 %).

^{1}H NMR (300 MHz, CDCl$_3$, 300 K): δ (ppm)= 1.99 (s, 3H); 5.34 (d, ^{3}J= 8.8 Hz, 2H); 6.86 (d, ^{3}J= 8.8 Hz, 2H); 7.86 (m, 6H); 8.81 (m, 6H).

*B-(4-(2,2,2-trifluoro)acetamidophenoxy)[subphthalocyaninato]boron(III) (**12**):*

$C_{30}H_{17}BF_3N_7O_2$
Exact mass: 599.15 g.mol^{-1}
Molecular weight: 599.33 g.mol^{-1}

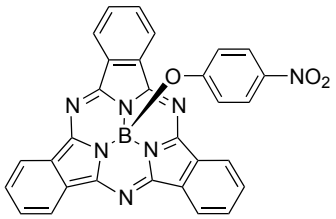


BCl_3 (4 mL, 1 M solution in *p*-xylène, 4 mmol) was added to dry phthalonitrile (0.5 g, 4 mmol), under an argon atmosphere. The vessel was placed in a preheated oil bath (150°C) and the mixture was stirred and left to reflux for 30 min. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting solid resuspended in toluene (30 mL). Excess of phenol **10** (2.5 g, 12 mmol) was added and the mixture was heated to reflux for 15 h. After evaporation to dryness, the residue was subjected to alumina gel column chromatography (eluent: DCM/MeOH 99: 1), to afford the desired subphthalocyanine (0.15 g, 19 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 5.33 (d, ^{3}J= 8.9 Hz, 2H); 6.84 (d, ^{3}J= 8.9 Hz, 2H); 7.84 (m, 6H); 8.81 (m, 6H).

*B-(4-nitrophenoxy)[subphthalocyaninato]boron(III) (**13**):*

$C_{30}H_{16}BN_7O_3$
Exact mass: 533.14 g.mol^{-1}
Molecular weight: 533.30 g.mol^{-1}



BCl_3 (4 mL, 1 M solution in *p*-xylène, 4 mmol) was added to dry phthalonitrile (0.5 g, 4 mmol), under an argon atmosphere. The vessel was placed in a preheated oil bath (150°C) and the mixture was stirred and left to reflux for 30 min. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting solid resuspended in toluene (30 mL). Excess of 4-nitrophenol (1.67 g, 12 mmol) was added and the mixture was heated to reflux for 15 hours. After evaporation to dryness, the residue was subjected to alumina gel column chromatography (eluent: DCM) and then recristallized in a 50:50 DCM/heptane mixture by slow evaporation of DCM, to give *B*-(4-nitrophenoxy)--[subphthalocyaninato]boron(III) **13** as a bronze cristalline solid (0.2 g, 29 %).

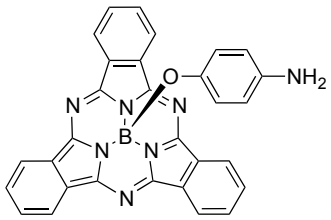
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 5.37 (d, ^{3}J= 9.2 Hz, 2H); 7.64 (d, ^{3}J= 9.2 Hz, 2H); 7.89 (m, 6H); 8.84 (m, 6H).

^{11}B NMR (96 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= -15.07 (s, 1B).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 118.3, 122.1, 125.0, 129.9, 130.7, 141.3, 151.2, 158.5.

UV-Vis (DCM) : λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 305.1 (41.3), 563.5 (56.7).

*B-(4-aminophenoxy)[subphthalocyaninato]boron(III) (**8**):*



$C_{30}H_{18}BN_7O$
Exact mass: 503.17 g.mol^{-1}
Molecular weight: 503.32 g.mol^{-1}

A mixture of *B*-(4-nitrophenoxy)[subphthalocyaninato]boron(III) **13** (240 mg, 0.45 mmol) and activated palladium 10% on carbon (20 mg, 0.17 mmol) in a mixture of DCM/MeOH (20 mL, 1:1) was stirred under hydrogen atmosphere for 72 h. The mixture was filtred off on clarcel® to remove palladium, then concentred under reduced pressure. The resulting solid was subjected to silica gel column chromatography (eluent: DCM/MeOH 99: 1) to afford *B*-(4-aminophenoxy)--[subphthalocyaninato]boron(III) **8** as a bronze solid (200 mg, 88 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 3.60 (s, 2H); 5.23 (d, ^{3}J= 8.8 Hz, 2H); 6.14 (d, ^{3}J= 8.8 Hz, 2H); 7.85 (m, 6H); 8.81 (m, 6H).

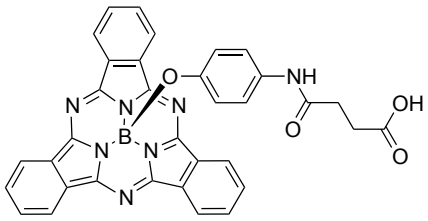
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 116.7, 120.2, 122.4, 129.9, 131.1, 139.2, 145.6, 151.4.

MS MALDI-TOF: m/z= 503.54 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{30}H_{19}BN_7O^+$: 504.17).

HR-MS ESI: m/z= 504.1740 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{30}H_{19}BN_7O^+$: 504.1744).

UV-Vis (DCM): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 303 (38.6), 562 (75.0).

*B-(4-(3-carboxypropanamido)phenoxy)[subphthalocyaninato]boron(III) (**14**):*



$C_{34}H_{22}BN_7O_4$
Exact mass: 603.18 g.mol^{-1}
Molecular weight: 603.39 g.mol^{-1}

To a solution of SubPc **8** (100 mg, 0.2 mmol) in THF (5 mL) was added succinic anhydride (30 mg, 0.3 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 12 h, then evaporated to dryness. The resulting residue was resuspended in 5 mL of methanol and precipited off by addition of water (20 mL), filtered off and washed with a 1:3 MeOH/H_2O mixture (3 × 20 mL), then subjected to silica gel column chromatography (eluent: DCM/MeOH 95:5) and finally dried under reduced pressure to afford compound **14** (84 mg, 70 %).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 300 K): δ (ppm)= 2.40 (m, 4H); 5.24 (d, ^{3}J = 8.8 Hz, 2H); 6.93 (d, ^{3}J = 8.8 Hz, 2H); 8.00 (m, 6H); 8.84 (m, 6H); 9.59 (s, 1H); 11.55 (s broad, 1H).

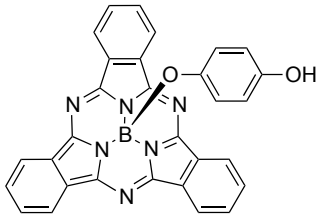
HR-MS ESI: m/z= 604.19160 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{34}H_{23}BN_7O_4^+$: 604.19050); 602.17502 $[M-H]^-$ (calcd for $C_{34}H_{21}BN_7O_4^-$: 602.17485).

HPLC (method A): Rt (min)= 2.94 (94.0 % at 254 nm; 98.5 % at 565 nm).

UV-Vis (MeOH): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 302 (26.5), 560 (52.8).

*B-(4-hydroxyphenoxy)[subphthalocyaninato]boron(III) (**15**):*

$C_{30}H_{17}BN_6O_2$
Exact mass: 504.15 g.mol^{-1}
Molecular weight: 504.31 g.mol^{-1}



A mixture of *B*-chloro[subphthalocyaninato]boron(III) **3** (50 mg, 0.12 mmol) and hydroquinone (256 mg, 1.2 mmol) in toluene (5 mL) was heated under reflux for 15 h. Upon evaporation of the solvent, the residue was subjected to alumina gel column chromatography (eluent: DCM/MeOH 99: 1) and then to silica gel column chromatography (eluant: DCM/MeOH 98:2) and dried under reduced pressure (100 mg, 86 %).

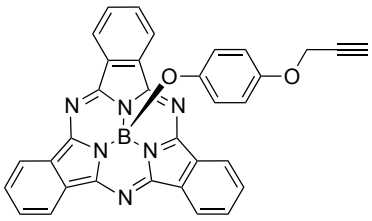
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 5.32 (d, ^{3}J = 8.8 Hz, 2H); 6.28 (d, ^{3}J = 8.8 Hz, 2H); 7.92 (m, 6H); 8.86 (m, 6H).

HR-MS ESI: m/z= 503.1446 $[M-H]^-$ (calcd for $C_{30}H_{16}BN_6O_2^-$: 503.1428).

UV-Vis (DCM): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 304 (29.5), 563 (61.2).

*B-(4-propargyloxyphenoxy)[subphthalocyaninato]boron(III) (**16**):*

$C_{33}H_{19}BN_6O_2$
Exact mass: 542.17 g.mol^{-1}
Molecular weight: 542.35 g.mol^{-1}



To a solution of compound **15** (50 mg, 0.1 mmol) and potassium carbonate (25.5 mg, 0.2 mmol) in 5 mL of DMF was added propargyl bromide (10.7 µL, 0.1 mmol). The mixture was left at 60°C for 5 h, then filtered off on clarcel® and evaporated to dryness under reduced pressure. The product was subjected to silica gel column chromatography (eluant: DCM/MeOH 98:2) and dried under reduced pressure (49 mg, 91 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 2.39 (t, ^{4}J = 2.4 Hz, 1H); 4.42 (d, ^{4}J = 2.4 Hz, 2H); 5.34 (d, ^{3}J = 9.0 Hz, 2H); 6.37 (d, ^{3}J = 9.0 Hz, 2H); 7.90 (m, 6H); 8.84 (m, 6H).

MS MALDI-TOF: m/z= 543.02 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{33}H_{20}BN_6O_2$: 543.17).

HR-MS ESI: m/z= 543.1752 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{33}H_{20}BN_6O_2^+$: 543.1741).

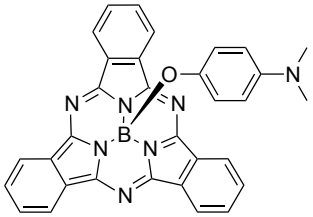
UV-Vis (DCM): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 302 (28.2), 564 (52.3).

*B-(4-(N,N-dimethyl)aminophenoxy)[subphthalocyaninato]boron(III) (**17**):*

$C_{32}H_{22}BN_7O$

Exact mass: 531.20 g.mol^{-1}

Molecular weight: 531.37 g.mol^{-1}



To a solution of compound **8** (50 mg, 0.1 mmol) in DMF (5 mL) was added potassium carbonate (59 mg, 0.4 mmol), then methyl iodide (12.3 µL, 0.2 mmol). The reaction mixture was stirred at 50°C for 12 h, then filtered off on clarcel® and finally evaporated under reduced pressure. The residue was subjected to silica gel column chromatography (eluent: DCM/MeOH 99:1) and dried under reduced pressure (12 mg, 37%).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 2.67 (s, 6H); 5.32 (d, ^{3}J= 8.9, Hz, 2H); 6.17 (d, ^{3}J= 8.9 Hz, 2H); 7.90 (m, 6H); 8.84 (m, 6H).

MS MALDI-TOF: m/z= 531.77 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{32}H_{23}BN_7O^+$: 532.21).

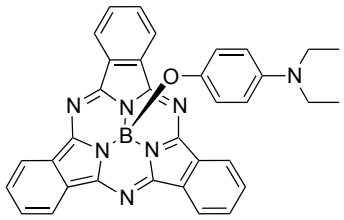
UV-Vis (DMF): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 307 (33.3), 563 (79.7).

*B-(4-(N,N-diethyl)aminophenoxy)[subphthalocyaninato]boron(III) (**18**):*

$C_{34}H_{26}BN_7O$

Exact mass: 559.23 g.mol^{-1}

Molecular weight: 559.43 g.mol^{-1}



To a solution of *B*-(4-aminophenoxy)[subphthalocyaninato]boron(III) **8** (50 mg, 0.1 mmol) in DMF (5 mL) was added potassium carbonate (59 mg, 0.4 mmol), then bromoethane (12.3 µL, 0.2 mmol). The reaction mixture was stirred at 50°C for 12 h, then filtered off on clarcel® and evaporated under reduced pressure. The residue was subjected to silica gel column chromatography (eluent: DCM/MeOH 99:1) and the isolated product was dried under reduced pressure (19 mg, 31 %).

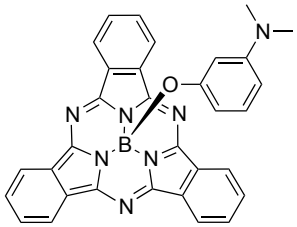
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 0.95 (s, 6H); 3.42 (q, 4H); 5.29 (d, ^{3}J= 8.9, Hz, 2H); 6.15 (d, ^{3}J= 8.9 Hz, 2H); 7.90 (m, 6H); 8.85 (m, 6H).

MS MALDI-TOF: m/z= 559.80 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{34}H_{27}BN_7O^+$: 560.24).

UV-Vis (DMF): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 308 (39.1), 565 (72.1).

*B-(3-(N,N-dimethyl)aminophenoxy)[subphthalocyaninato]boron(III) (**19**):*

$C_{32}H_{22}BN_7O$
Exact mass: 531.20 g.mol^{-1}
Molecular weight: 531.37 g.mol^{-1}



B-Chloro[subphthalocyaninato]boron(III) **3** (50 mg, 0.12 mmol) and 3-(N,N-dimethyl)aminophenol (247 mg, 1.8 mmol) dissolved in toluene (5 mL) were heated to reflux for 36 h. After evaporation of the solvent, the residue was subjected to alumina gel column chromatography (eluent: DCM/MeOH, gradient from 100:0 to 99:1) and then to silica gel column chromatography (eluent: DCM/MeOH 99:1) to give the desired subphthalocyanine **19** (36 mg, 58 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 2.64 (s, 6H); 4.81 (m, 2H); 6.10 (m, 1H); 6.63 (m, 1H); 7.87 (m, 6H); 8.84 (m, 6H).

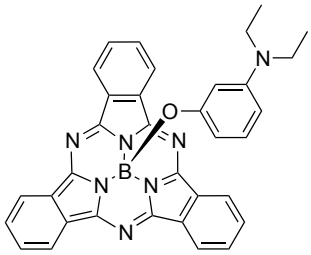
MS MALDI-TOF: m/z= 531.78 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{32}H_{23}BN_7O^+$: 532.21).

HR-MS ESI: m/z= 532.20509 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{32}H_{23}BN_7O^+$: 532.20573).

UV-Vis (DMF): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 309 (31.3), 565 (72.4).

*B-(3-(N,N-diethyl)aminophenoxy)[subphthalocyaninato]boron(III) (**20**):*

$C_{34}H_{26}BN_7O$
Exact mass: 559.23 g.mol^{-1}
Molecular weight: 559.43 g.mol^{-1}



A mixture of chloro[subphthalocyaninato]boron(III) **3** (50 mg, 0.12 mmol) and 3-(N,N-diethyl)aminophenol (297 mg, 1.8 mmol) in toluene (5 mL) was heated under reflux for 36 h. After evaporation of the solvent, the residue was subjected to alumina gel column chromatography (eluent: DCM) and then to silica gel column chromatography (eluent: DCM/MeOH 99:1), to afford the desired subphthalocyanine **20** (33 mg, 51 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 0.91 (t, ^{3}J= 6.8 Hz, 6H); 3.30 (q, ^{3}J= 6.8 Hz, 4H); 4.68 (m, 2H); 5.94 (m, 1H); 6.57 (m, 1H); 7.88 (m, 6H); 8.84 (m, 6H).

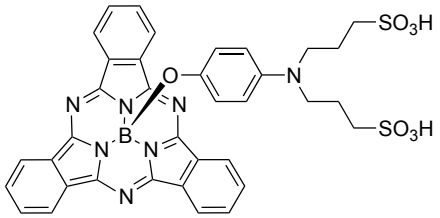
MS MALDI-TOF: m/z= 559.88 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{34}H_{27}BN_7O^+$: 560.24).

HR-MS ESI: m/z= 560.23497 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{34}H_{27}BN_7O^+$: 560.23706).

UV-Vis (DMF): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 309 (36.2), 564 (73.6).

*B-(4-(N,N-bis(sulfopropyl))aminophenoxy)[subphthalocyaninato]boron(III) (**21**):*

$C_{36}H_{30}BN_7O_7S_2$
Exact mass: 747.17 g.mol^{-1}
Molecular weight: 747.61 g.mol^{-1}



To a solution of *B*-(4-aminophenoxy)[subphthalocyaninato]boron(III) **8** (50 mg, 0.1 mmol) in DMF (5 mL) was added 1,3-propanesultone (61 mg, 0.5 mmol). The reaction mixture was stirred at 50°C for 72 h, then evaporated under reduced pressure. The residue was subjected to silica gel column chromatography (eluent: THF/MeOH, gradient from 98:2 to 70:30) and then to semi-preparative reverse phase column chromatography (C18, eluent: CH_3CN-0.1% TFA / H_2O-0.1% TFA vol., gradient from 20:80 to 60:40 in 40 min, Rt= 24.3 min) (10 mg, 12 %).

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d$_6$, 300 K): δ (ppm)= 1.58 (m, ^{3}J= 7.4 Hz, 4H); 2.32 (t, ^{3}J= 7.4 Hz, 4H); 3.05 (t, ^{3}J= 7.4 Hz, 4H); 6.16 (d, ^{3}J= 8.8 Hz, 2H); 7.87 (m, 6H); 8.83 (m, 6H).

MS MALDI-TOF: m/z= 748.04 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{36}H_{31}BN_7O_7S_2^+$: 748.18), 770.03 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{36}H_{30}BN_7O_7S_2Na^+$: 770.16), 786.01 $[M+K]^+$ (calcd for $C_{36}H_{30}BN_7O_7S_2K^+$: 786.14).

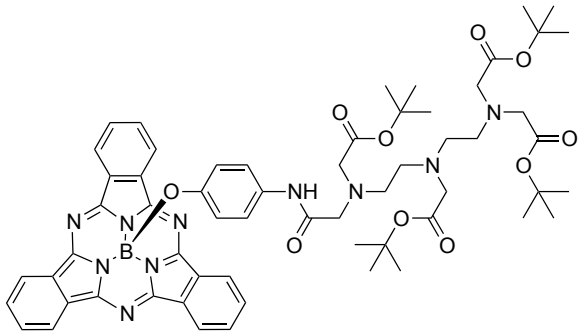
HR-MS ESI: m/z= 372.5789 $[M-2H]^{2-}$ (calcd for $C_{36}H_{28}BN_7O_7S_2^{2-}$: 372.5790).

HPLC (method A): Rt (min)= 2.27 (98.9 % at 254 nm; 99.4 % at 565 nm).

UV-Vis (H_2O): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 315 (14.1), 566 (49.7).

*B-(4-(2-(DT4A(tBu))acetamido)phenoxy)[subphthalocyaninato]boron(III) (**23**):*

$C_{60}H_{71}BN_{10}O_{10}$
Exact mass: 1102.54 g.mol^{-1}
Molecular weight: 1103.08 g.mol^{-1}



A mixture of SubPc **8** (250 mg, 0,55 mmol), DTPA-tetra(*t*Bu)ester (308.6 mg, 0.5 mmol) and HBTU (227 mg, 0.6 mmol) into THF (15 mL) was stirred at room temperature for 12 h. The solvent was removed under reduced pressure, then the resulting solid was solubilized in 50 mL of DCM. The organic layer was washed three times with an aqueous solution of citric acid (pH= 4, 3 × 50 mL) then three times with water (3 × 50 mL), dried with magnesium sulfate, filtered off, and

concentrated under vacuum. The product was purified by silica gel column chromatography (eluent: DCM/MeOH, gradient from 100:0 to 98:2) then dried under reduce pressure (275 mg, 50 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 500 K): δ (ppm)= 1.39 (s, 9H); 1.41 (s, 18H); 1.42 (s, 9H); 2.77 (m, 8H); 3.29 (s, 2H); 3.32 (s, 2H); 3.33 (s, 6H); 5.35 (d, ^{3}J= 8.9 Hz, 2H); 7.06 (d, ^{3}J= 8.9 Hz, 2H); 7.86 (m, 6H); 8.83 (m, 6H); 9.44 (s, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 27.14, 28.69, 80.59, 55.01, 79.98, 118.34, 119.24, 121.20, 128.76, 129.96, 131.30, 147.55, 150.25, 169.45, 169.6.

MS MALDI-TOF: m/z= 1103.58 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{60}H_{77}BN_{10}O_{10}^+$: 1125.53).

HR-MS ESI: m/z= 1125.5296 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{60}H_{71}BN_{10}O_{10}Na^+$: 1125.53498).

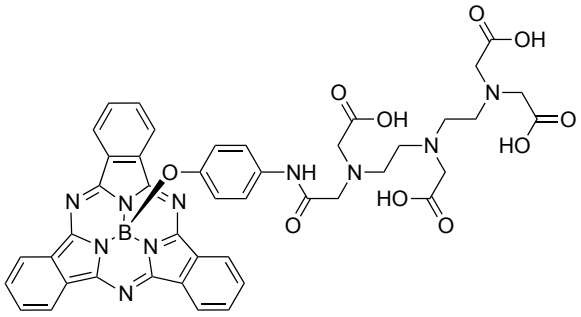
UV-Vis ($CHCl_3$): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 303 (34.0), 563 (66.1).

*B-(4-(2-(DT4A)acetamido)phenoxy)[subphthalocyaninato]boron(III) (**22**):*

$C_{64}H_{39}BN_{10}O_{10}$

Exact mass: 878.29 g.mol^{-1}

Molecular weight: 878.65 g.mol^{-1}



SubPc **23** (150 mg, 0,136 mmol) was stirred for 12 h at room temperature in 5 mL of trifluroacetic acid. The blue solution was concentrated under vacuum and the residue was resuspended in 5 mL of DCM, dispersed by ultrasonication (5 min) and furher evaporeted to dryness. This operation was repeated three times to remove the residual traces of acid. The pink solid obtained was resuspended a last time in 5 mL of DCM, filtered off and washed three times with DCM, then dried under reduced pressure to afford the desired product (90 mg, 75 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 2.83 (m, 4H); 2.93 (m, 4H); 3.30 (s, 2H); 3.37 (s, 2H); 3.38 (s, 4H); 3.47 (s, 2H); 5.25 (d, ^{3}J= 9.0 Hz, 2H); 7.05 (d, ^{3}J= 9.0 Hz, 2H); 8.00 (m, 6H); 8.84 (m, 6H); 9.68 (s, 1H); 12.10 (s broad, 4H).

MS MALDI-TOF: m/z= 879.12 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{44}H_{40}BN_{10}O_{10}^+$: 879.30), 901.11 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{44}H_{39}BN_{10}O_{10}Na^+$: 901.28), 917.08 $[M+K]^+$ (calcd for $C_{44}H_{39}BN_{10}O_{10}K^+$: 917.26).

HR-MS ESI: m/z= 879.2997 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{60}H_{71}BN_{10}O_{10}Na^+$: 879.3024), 901.2806 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{60}H_{71}BN_{10}O_{10}Na^+$: 901.2843).

HPLC (method A): Rt (min)= 2.61 (95.2 % at 254 nm; 96.9 % at 565 nm).

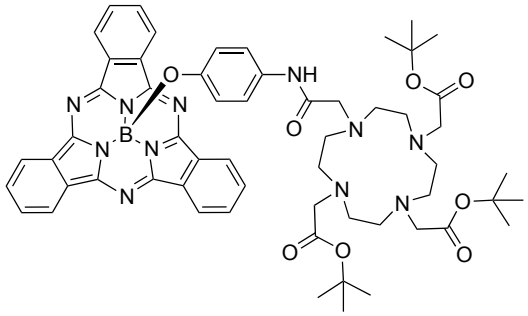
UV-Vis (MeOH): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 303 (33.5), 560 (65.1).

*B-(4-(2-(DO3A(tBu))acetamido)phenoxy)[subphthalocyaninato]boron(III) (**24**):*

$C_{58}H_{68}BN_{11}O_8$

Exact mass: 1057.53 g.mol^{-1}

Molecular weight: 1058.04 g.mol^{-1}



A mixture of SubPc **8** (250 mg, 0,55 mmol), DOTA-tris(*t*Bu)ester (286 mg, 0.5 mmol) and HBTU (227 mg, 0.6 mmol) into THF (15 mL) was stirred at room temperature for 12 h. The solvent was removed under reduced pressure, then the resulting solid was solubilized in 50 mL of DCM. The organic layer was washed three times with an aqueous solution of citric acid (pH= 4, 3 × 50 mL) then three times with water (3 × 50 mL), dried with magnesium sulfate, filtered, and concentrated under vacuum. The product was purified by silica gel column chromatography (eluent: DCM/MeOH, gradient from 100:0 to 98:2) then dried under reduce pressure (320 mg, 61 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 1.25 (s, 18H); 1.41 (s, 9H); 2.65 (m, 16H); 3.50 (m, 8H); 5.24 (d, ^{3}J= 8.9 Hz, 2H); 6.94 (d, ^{3}J= 8.8 Hz, 2H); 7.56 (s, 1H); 7.88 (m, 6H); 8.82 (m, 6H).

MS MALDI-TOF: m/z= 394.35 $[M\text{-}OPhDOTAtBuAM]^+$ (calcd for $C_{24}H_{12}BN_6^+$: 395.12), 685.93 $[M\text{-}Sub+Na]^+$ (calcd for $C_{34}H_{57}N_5O_8Na^+$: 686.41), 1080.37 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{58}H_{68}BN_{11}O_8Na^+$: 1080.52).

HR-MS ESI: m/z= 1080.5192 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{58}H_{68}BN_{11}O_8Na^+$: 1080.5247).

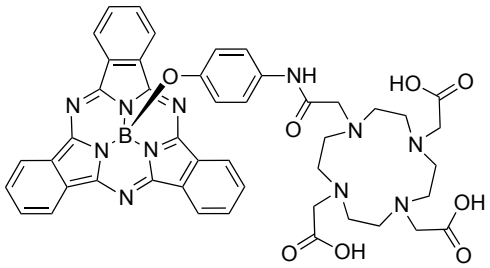
UV-Vis ($CHCl_3$): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 305 (34.5), 563 (67.0).

*B-(4-(2-(DO3A)acetamido)phenoxy)[subphthalocyaninato]boron(III) (**25**):*

$C_{46}H_{44}BN_{11}O_8$

Exact mass: 889.35 g.mol^{-1}

Molecular weight: 889.72 g.mol^{-1}



SubPc **23** (150 mg, 0,142 mmol) was stirred for 12 h at room temperature in 5 mL of trifluroacetic acid. The blue solution was concentrated under vacuum the residue was resuspended in 5 mL of DCM, dispersed by ultrasonication (5 min) and furher evaporeted to dryness. This operation was repeated three times to remove the residual traces of acid. The pink solid obtained was resuspended a last time in 5 mL of DCM, filtered off and washed three times with DCM, then dried under reduced pressure to afford the desired product (119 mg, 95 %).

^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$, 400 K): δ (ppm)= 2.50 (m, 8H); 2.98 (m, 8H); 3.54 (m, 8H); 5.30 (d, ^{3}J= 8.6 Hz, 2H); 6.95 (d, ^{3}J= 8.6 Hz, 2H); 8.00 (m, 6H); 8.83 (m, 6H); 9.41 (s, 1H).

MS MALDI-TOF: m/z= 890.31 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{46}H_{45}BN_{11}O_8^+$: 890.35), 912.23 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{46}H_{44}BN_{11}O_8Na^+$: 912.34), 928.28 $[M+K]^+$ (calcd for $C_{46}H_{44}BN_{11}O_8K^+$: 928.31), 950.20 $[M-H+Na+K]^+$ (calcd for $C_{46}H_{43}BN_{11}O_8NaK^+$: 950.29), 972.19 $[M-2H+2Na+K]^+$ (calcd for $C_{46}H_{42}BN_{11}O_8Na_2K^+$: 972.27).

HR-MS ESI: m/z= 890.3514 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{46}H_{44}BN_{11}O_8^+$: 890.3548), 912.3325 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{46}H_{44}BN_{11}O_8Na^+$: 912.3367).

HPLC (method A): Rt (min)= 2.53 (97.8 % at 254 nm; 99.6 % at 565 nm).

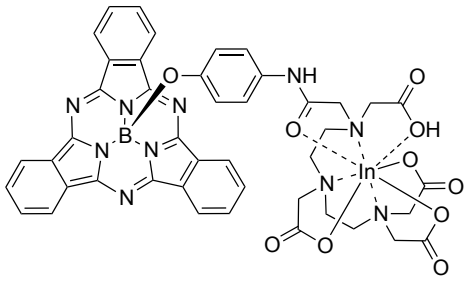
UV-Vis (MeOH): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 303 (31.7), 560 (61.6).

*General procedure for the synthesis of SubPc-DTPA-In (**26**) and SubPc-DOTA-M (**27-32**) complexes:*

B-(4-(2-(DO3A)acetamido)phenoxy)[subphthalocyaninato]boron(III) (**25**) (10 mg, 11.2 µmol) or *B*-(4-(2-(DT4A)acetamido)phenoxy)[subphthalocyaninato]boron(III) (**22**) (10 mg, 11.4 µmol) was dissolved in a 95:5 v/v DMSO/water mixture (10 mL). The pH of the solution was adjusted to approximately 7 using an aqueous solution of sodium hydroxide (0.1 M). Then 1 mL of a solution of the corresponding metallic salt (1.1 eq) was added, and the reaction was left at 50°C for 2 hours. Upon cooling to room temperature, the mixture was diluted with 20 mL of water, centrifuged and the precipitate was washed with water by centrifugation (3 × 30 mL). Finally, the pink residual solid was resuspended in 10 mL of water and lyophilized to yield the desired subphthalocyanine.

*B-(4-(2-(DT4A-indium(III))acetamido)phenoxy)[subphthalocyaninato]boron(III) (**26**):*

$C_{44}H_{36}BInN_{10}O_{10}$
Exact mass: 990.17 g.mol^{-1}
Molecular weight: 990.45 g.mol^{-1}



Metallic salt solution: $InCl_3$, 6 H_2O (2.76 mg, 12.4 µmol) in 1 mL of water. Mass obtained: 7.9 mg (81 %).

MS MALDI-TOF: m/z= 991.12 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{44}H_{37}BInN_{10}O_{10}^+$: 991.18), 1013.21 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{44}H_{36}BInN_{10}O_{10}Na^+$: 1013.16), 1035.19 $[M-H+2Na]^+$ (calcd for $C_{44}H_{35}BInN_{10}O_{10}Na_2^+$: 1035.15), 1051.17 $[M-H+Na+K]^+$ (calcd for $C_{44}H_{35}BInN_{10}O_{10}KNa^+$: 1051.12).

HPLC (method A): Rt (min)= 2.57 (93.5 % at 254 nm; 97.9 % at 565 nm).

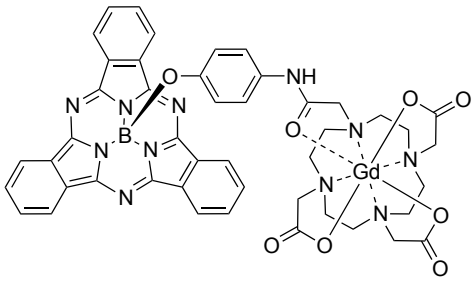
UV-Vis (MeOH): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 303 (31,1.5), 560 (60.9).

*B-(4-(2-(DO3A-gadolinium(III))acetamido)phenoxy)[subphthalocyaninato]boron(III) (**27**):*

$C_{46}H_{41}BGdN_{11}O_8$

Exact mass: 1044.25 g.mol^{-1}

Molecular weight: 1043.95 g.mol^{-}



Metallic salt solution: $Gd(NO_3)_3$, 5 H_2O (5.37 mg, 12.4 µmol) in 1 mL of water. Mass obtained: 9.5 mg (82 %).

MS MALDI-TOF: m/z= 1045.35 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{46}H_{42}BGdN_{11}O_8^+$: 1045.26), 1067.38 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{46}H_{41}BGdN_{11}O_8Na^+$: 1067.24), 1083.35 $[M+K]^+$ (calcd for $C_{46}H_{41}BGdN_{11}O_8K^+$: 1083.21).

HR-MS ESI: m/z= 1067.2398 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{46}H_{41}BGdN_{11}O_8Na^+$: 1067.2382).

HPLC (method A): Rt (min)= 2.62 (96.5 % at 254 nm; 96.9 % at 565 nm).

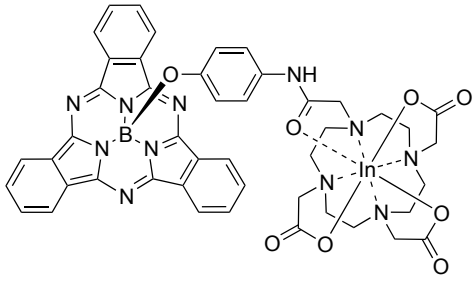
UV-Vis (MeOH): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 301 (31.7), 561 (52.1).

*B-(4-(2-(DO3A-indium(III))acetamido)phenoxy)[subphthalocyaninato]boron(III) (**28**):*

$C_{46}H_{41}BInN_{11}O_8$

Exact mass: 1001.23 g.mol^{-1}

Molecular weight: 1001.52 g.mol^{-1}



Metallic salt solution: $InCl_3$ (2.74 mg, 12.4 µmol) in 1 mL of water. Mass obtained: 8.3 mg (74 %).

MS MALDI-TOF: m/z= 1002.20 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{46}H_{42}BInN_{11}O_8^+$: 1002.23), 1024.18 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{46}H_{41}BInN_{11}O_8Na^+$: 1024.22), 1040.16 $[M+K]^+$ (calcd for $C_{46}H_{41}BInN_{11}O_8K^+$: 1040.19), 1062.15 $[M-H+Na+K]^+$ (calcd for $C_{46}H_{40}BInN_{11}O_8NaK^+$: 1062.17).

HR-MS ESI: m/z= 1024.2181 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{46}H_{41}BInN_{11}O_8Na^+$: 1024.2172).

HPLC (method A): Rt (min)= 2.59 (86.2 % at 254 nm; 79.9 % at 565 nm).

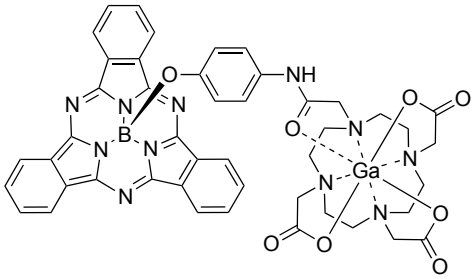
UV-Vis (MeOH): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 300 (32.2), 561 (52.1).

*B-(4-(2-(DO3A-galium(III))acetamido)phenoxy)[subphthalocyaninato]boron(III) (**29**):*

$C_{46}H_{41}BGaN_{11}O_8$

Exact mass: 955.25 g.mol^{-1}

Molecular weight: 956.42 g.mol^{-1}



Metallic salt solution: $GaCl_3$ (44 µL of a solution in acetic acid, 12.4 µmol) in 1 mL of water. Mass obtained: 5.4 mg (51 %).

MS MALDI-TOF: m/z= 599.67 $[M\text{-}Sub+K]^+$ (calcd for $C_{22}H_{31}GaN_5O_8K^+$: 600.10), 956.42 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{46}H_{42}BGaN_{11}O_8^+$: 956.26), 994.38 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{46}H_{41}BGaN_{11}O_8K^+$: 994.21).

HR-MS ESI: m/z= 978.2411 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{46}H_{41}BGaN_{11}O_8Na^+$: 978.2388).

HPLC (method A): Rt (min)= 2.69 (87.5 % at 254 nm; 98.3 % at 565 nm)**.**

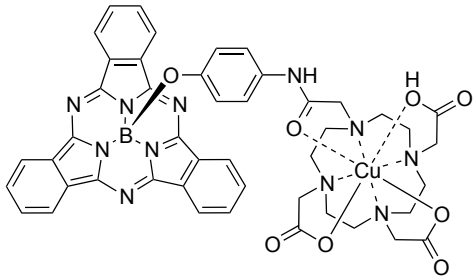
UV-Vis (MeOH): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 303 (31.1), 561 (60.3).

*B-(4-(2-(DO3A-copper(II))acetamido)phenoxy)[subphthalocyaninato]boron(III) (3**0**):*

$C_{46}H_{42}BCuN_{11}O_8$

Exact mass: 950.26 g.mol^{-1}

Molecular weight: 951.25 g.mol^{-1}



Metallic salt solution: $Cu(NO_3)_2$ (3 mg , 12.4 µmol) in 1 mL of water. Mass obtained: 7 mg (66 %).

MS MALDI-TOF: m/z= 952.24 $[M+2H]^+$ (calcd for $C_{46}H_{44}BCuN_{11}O_8^+$: 952.28), 974.22 $[M+H+Na]^+$ (calcd for $C_{46}H_{43}BCuN_{11}O_8Na^+$: 974.26), 990.20 $[M+2+K]^+$ (calcd for $C_{46}H_{43}BCuN_{11}O_8K^+$: 989.22).

HR-MS ESI: m/z= 973.2524 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{46}H_{41}BCuN_{11}O_8Na^+$: 973.2507).

HPLC (method A): Rt (min)= 2.67 (95.92 % at 254 nm; 90.9 % at 565 nm)**.**

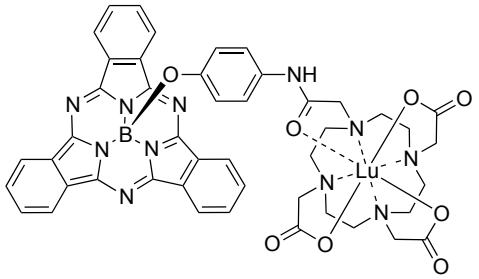
UV-Vis (MeOH): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 300 (30.0), 560 (49.6).

*B-(4-(2-(DO3A-lutetium(III))acetamido)phenoxy)[subphthalocyaninato]boron(III) (**31**):*

$C_{46}H_{41}BLuN_{11}O_8$

Exact mass: 1061.26 g.mol^{-1}

Molecular weight: 1061.66 g.mol^{-1}



Metallic salt solution: $LuCl_3$, 6 H_2O (4.83 mg, 12.4 µmol) in 1 mL of water. Mass obtained: 5.4 mg (51 %).

MS MALDI-TOF: m/z= 1062.36 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{46}H_{42}BLuN_{11}O_8^+$: 1062.27), 1084.38 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{46}H_{41}BLuN_{11}O_8Na^+$: 1084.25), 1100.33 $[M+K]^+$ (calcd for $C_{46}H_{41}BLuN_{11}O_8K^+$: 1100.23).

HR-MS ESI: m/z= 1084.2561 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{46}H_{41}BLuN_{11}O_8Na^+$: 1084.2541).

HPLC (method A): Rt (min)= 2.62 (89.2 % at 254 nm; 96.8 % at 565 nm)**.**

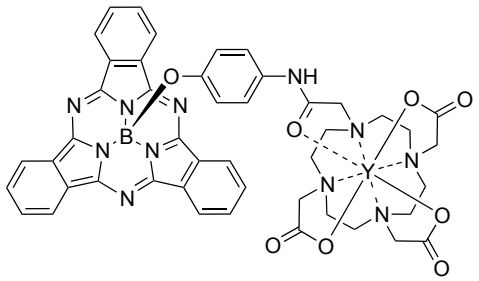
UV-Vis (MeOH): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 302 (28.9), 559 (59.8).

*B-(4-(2-(DO3A-yttrium(III))acetamido)phenoxy)[subphthalocyaninato]boron(III) (**32**):*

$C_{46}H_{41}BYN_{11}O_8$

Exact mass: 975.23 g.mol^{-1}

Molecular weight: 975.60 g.mol^{-1}



Metallic salt solution: YCl_3, 6 H_2O (3.76 mg, 12.4 µmol) in 1 mL of water. Mass obtained: 10 mg (92 %).

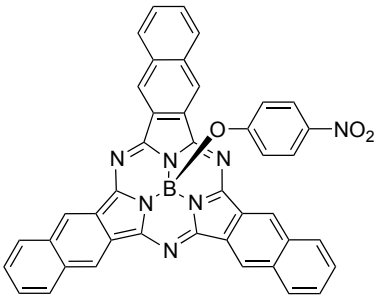
MS MALDI-TOF: m/z= 976.49 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{46}H_{42}BYN_{11}O_8^+$: 976.24), 998.48 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{46}H_{41}BYN_{11}O_8Na^+$: 998.22), 1014.47 $[M+K]^+$ (calcd for $C_{46}H_{41}BYN_{11}O_8K^+$: 1014.19).

HR-MS ESI: m/z= 998.2199 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{46}H_{41}BYN_{11}O_8Na^+$: 998.2191).

HPLC (method A): Rt (min)= 2.62 (87.6 % at 254 nm; 96.4 % at 565 nm)**.**

UV-Vis (MeOH): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 303 (34.1), 560 (66.2).

*B-(4-nitrophenoxy)[subnaphthalocyaninato]boron(III) (**33**):*



$C_{42}H_{22}BN_7O_3$
Exact mass: 683.19 g.mol^{-1}
Molecular weight: 683.48 g.mol^{-1}

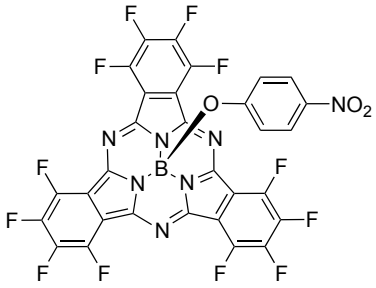
BCl_3 (5,61 mL, 1 M solution in *p*-xylène, 5.61 mmol) was added to dry naphthalonitrile (1 g, 5.61 mmol), under an argon atmosphere. The vessel was pourred in a preheated oil bath (150°C), stirring and left to reflux for 30 min. The solvent and the excess of boron trichloride were removed under reduced pressure and the resulting solid was resuspended in toluene (30 mL). An excess of 4-nitrophenol (2.34 g, 16.83 mmol) was added and the mixture was heated under reflux for 15 hours. After evaporation to dryness, the residue was subjected to alumina gel column chromatography (eluent: DCM) and then to silica gel column chromatography (eluent: DCM/Heptane, gradient from 70:30 to 100:0) (16 mg, 1.3 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 5.63 (d, ^{3}J = 9.2 Hz, 2H); 7.72 (d, ^{3}J = 9.2 Hz, 2H); 7.74 (m, 6H); 8.34 (m, 6H); 9.39 (m, 6H).

MS MALDI-TOF: m/z= 682.77 $[M+H]^{+\bullet}$ (calcd for $C_{42}H_{22}BN_7O_3^{+\bullet}$: 683.19).

UV-Vis (DCM): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 327 (43.2), 656 (63.1).

*B-(4-nitrophenoxy)[1,2,3,4,7,8,9,10,15,16,17,18-dodecafluorosubphthalocyaninato]boron(III) (**34**)*



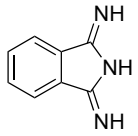
$C_{30}H_4BF_{12}N_7O_3$
Exact mass: 749.03 g.mol^{-1}
Molecular weight: 749.19 g.mol^{-1}

A mixture of *B*-chloro[dodecafluorosubphthalocyaninato]boron(III) (100 mg, 0.15 mmol) and 4-nitrophenol (209 mg, 1.5 mmol) in toluene (5 mL) was heated under reflux for 15 hours. After evaporation of the solvent, the residue was subjected to alumina gel column chromatography (eluent: DCM) and dried under reduced pressure (80 mg, 71 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 5.17 (d, ^{3}J = 9.1 Hz, 2H); 7.47 (d, ^{3}J = 9.1 Hz, 2H).

^{19}F NMR (282 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= -147.14 (m, 6F); -136.88 (m, 6F).

*1,3-diiminoisoindoline (**35**):*



$C_8H_7N_3$

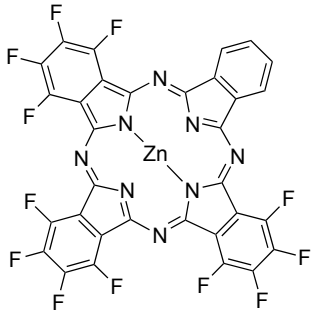
Exact mass: 145.06 g.mol^{-1}

Molecular weight: 145.16 g.mol^{-1}

Dry phthalonitrile (2 g, 15.6 mmol) was placed in a 50 mL three necked round bottom flask flushed with argon. Distilled methanol (25 ml), then sodium (14 mg, 0.6 mmol) were added and the mixture was stirred at room temperature until full dissolution of sodium. Then the mixture was heated to reflux and gazeous ammoniac was bubbled in the solution for 4 h. The reaction mixture was cooled to room temperature, concentred under vacuum until half the volume of the methanol was removed and put in an ice bath. White/green crystals formed were subsequently filtered off and whashed with ether (660 mg, 30 %).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d$_6$, 300 K): δ (ppm)= 7.54 (m, 2H); 7.83 (m, 2H); 8.55 (s broad, 3H).

*29H,31H-[1,2,3,4,8,9,10,11,15,16,17,18-dodecafluorophthalocyanine (**36**):*



$C_{32}H_4F_{12}N_8Zn$

Exact mass: 791.97 g.mol^{-1}

Molecular weight: 793.79 g.mol^{-1}

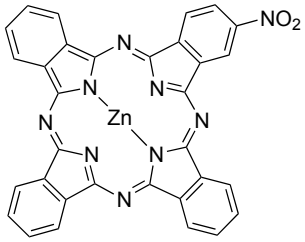
A mixture of perfluorosubphthalocyanine **5** (20 mg, 31 µmol), 1,3-diiminoisoindoline **35 (**4.5 mg, 31 µmol**)** and zinc acetate (6.8 mg, 31 µmol) in 10 mL of DMSO was stirred at room temperature. The colour of the mixture shifts rapidly from red-pink to dark blue. After stirring for 15 h at room temperature, water (50 mL) was added and the solution was left for 30 min until complete precipitation. The precipitate formed was filtered off, washed with water (5 × 30 mL), subjected to a short silica gel column chromatography (eluent: THF) and dried under reduced pressure (20 mg, 81 %).

MS MALDI-TOF: m/z= 792.72 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{32}H_5F_{12}N_8Zn^+$: 792.98).

UV-Vis (DMF): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 355 (34.3), 605 (22.7), 668 (126.4).

C.4. Chapter I, Part III

*2-nitro[phthalocyaninato]zinc(II) (**37**), statistical mixture:*



$C_{32}H_{15}N_9O_2Zn$

Exact mass: 621.06 g.mol^{-1}

Molecular weight: 622.90 g.mol^{-1}

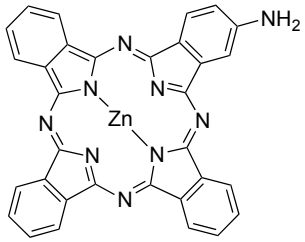
4-nitrophthalonitrile (2.47 g, 2.9 mmol), phthalonitrile (2.6 g, 20.3 mmol) zinc acetate (0.13 mg, 5.8 mmol) and DBU (3.45 mL, 23.1 mmol) were put in 20 mL of octanol and the mixture was stirred at 130 °C for 4 h. After cooling down to room temperature, the blue precipitate was filtered off, washed with 1 M hydrochloric acid (3 × 30 mL), water (3 × 30 mL) and methanol (20 mL). The blue solid was dried under reduced pressure to afford the mixture of non-substituted (**4**) and mono-substituted (**37**) phthalocyanines (1.29 g)

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d$_6$, 300 K): δ (ppm) = 7.75 (d, ^{3}J= 8.5 Hz, 1H); 8.24 (m, 18H); 8.55 (s, 1H); 9.24 (d, ^{3}J= 8.5 Hz, 1H); 9.42 (m, 18H).

MS MALDI-TOF: m/z = 576.61 $[ZnPc+H]^+$ (calcd for $C_{32}H_{16}N_8Zn^+$: 576.08).

UV-Vis (DMSO): λ_{max} (nm) = 609, 646, 675.

*2-amino[phthalocyaninato]zinc(II) (**38**), statistical mixture:*



$C_{32}H_{17}N_9Zn$

Exact mass: 591.09 g.mol^{-1}

Molecular weight: 592.92 g.mol^{-1}

A mixture containing phthalocyanine **37** and **4** (500 mg) was suspended in 10 mL of DMF. Upon addition of sodium sulfite nonahydrate (96 mg, 0.4 mmol), the mixture was heated to 60 °C and stirred for 2 h. The reaction was cooled down to room temperature, and 30 mL of water was added and the solution was left until complete precipitation of the product (1 h). The solid was filtered off and washed with water (4 × 20 mL), then methanol (2 × 10 mL), and finally dried under reduced pressure to afford the mixture of non-substituted (**4**) and mono-substituted (**38**) phthalocyanines (430 mg).

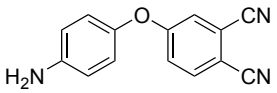
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d$_6$, 300 K): δ (ppm) = 6.43 (s broad, 2H); 7.44 (d, ^{3}J= 8.4 Hz, 1H); 8.22 (m, 25H); 8.62 (s, 1H); 9.04 (d, ^{3}J= 8.4 Hz, 1H); 9.33 (m, 25H).

MS MALDI-TOF: m/z = 576.54 $[ZnPc+H]^+$ (calcd for $C_{32}H_{16}N_8Zn^+$: 576.08); 592.79 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{32}H_{18}N_9Zn^+$: 592.10).

UV-Vis (DMSO): λ_{max} (nm) = 380, 610, 645, 675

*4-(4-aminophenoxy)phthalonitrile (**39**):*

$C_{14}H_9N_3O$
Exact mass: 235.07 g.mol^{-1}
Molecular weight: 235.24 g.mol^{-1}



A mixture of 4-nitrophthalonitrile (3 g, 17.3 mmol), 4-aminophenol (1.89 g, 17.8 mmol) and potassium carbonate (4.78 g, 34.6 mmol) was stirred in DMF (30 mL) at room temperature for 15 h. After addition of 60 mL of water, the resulting precipitate was filtered off and washed with water (3 × 20 mL). The pale yellow solid obtained was dried under reduced pressure to afford compound **39** (3.8 g, 94 %).

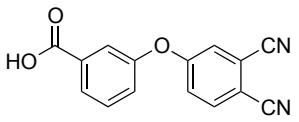
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d$_6$, 300 K): δ (ppm)= 5.18 (s, 2H); 6.64 (d, ^{3}J= 8.9 Hz, 2H); 6.85 (d, ^{3}J= 8.9 Hz, 2H); 7.25 (dd, ^{3}J= 8.8 Hz, ^{4}J= 2.6 Hz, 1H); 7,6 (d, ^{4}J= 2.6 Hz, 1H); 8.02 (d, ^{3}J= 8.8 Hz, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d$_6$, 300 K): δ (ppm)= 106.9, 114.9, 115.4, 116.0, 116.4, 120.7, 121.3, 121.4, 136.1, 143.0, 146.9, 162.2.

MS ESI: m/z= 233.87 [M-H]$^-$ (calcd for $C_{14}H_8N_3O^-$: 234.07).

*4-(3-carboxyphenoxy)phthalonitrile (**40**):*

$C_{15}H_8N_2O_3$
Exact mass: 264.05 g.mol^{-1}
Molecular weight: 264.24 g.mol^{-1}



A suspension of 4-nitro-phthalonitrile (3 g, 17.3 mmol), 3-hydroxybenzoïc acid (2.39 g, 17.3 mmol) and potassium carbonate (9.56 g, 75.2 mmol) was stirred in DMF (30 mL) at room temperature for 15 h. After addition of 100 mL of 1 M hydrochloric acid, the resulting precipitate was filtered off and washed with water (3 × 50 mL). The solid obtained was dried under reduced pressure (3.97 g, 98 %).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d$_6$, 300 K): δ (ppm)= 7.45 (m, 2H); 7.62 (m, 2H); 7.85 (m, 2H); 8.10 (d, ^{3}J= 8.7 Hz, 1H); 13.23 (s broad, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d$_6$, 300 K): δ (ppm)=108.7, 115.3, 115.8, 116.8, 120.6, 122.4, 123.0, 124.7, 126.4, 131.0, 133.4, 136.3, 154.0, 160.6, 166.3.

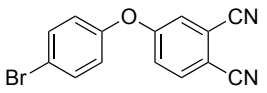
MS ESI: m/z= 262.83 [M-H]$^-$ (calcd for $C_{15}H_7N_2O_3^-$: 263.03).

*4-(4-bromophenoxy)phthalonitrile (**41**):*

$C_{14}H_7BrN_2O$

Exact mass: 297.97 g.mol^{-1}

Molecular weight: 299.12 g.mol^{-1}



A mixture of *4*-nitrophthalonitrile (1 g, 5.8 mmol), 3-bromophenol (1 g, 5.8 mmol) and potassium carbonate (1.6 g, 11.6 mmol) was stirred in DMF (20 mL) at room temperature for 2 h. After addition of 20 mL of water, the resulting precipitate was filtered off and washed with water (3 × 10 mL). The white-pink solid obtained was dried under reduced pressure to afford the desired compound (1.73 g, 95%).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 6.98 (d, ^{3}J= 8.8 Hz, 2H); 7.24 (dd, ^{3}J= 8.6 Hz, ^{4}J= 2.6 Hz, 1H); 7,29 (d, ^{4}J= 2.6 Hz, 1H); 7.58 (d, ^{3}J= 8.8 Hz, 2H); 7.74 (d, ^{3}J= 8.6 Hz, 1H).

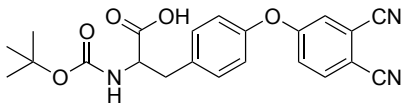
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 109.5, 114.9, 115.4, 117.7, 119.4, 121.6, 121.7, 122.4, 133.9, 135.6, 152.8, 161.3.

*4-(4-(2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-(carboxyethyl)phenoxy)phthalonitrile (**42**):*

$C_{22}H_{21}N_3O_5$

Exact mass: 407.15 g.mol^{-1}

Molecular weight: 407.42 g.mol^{-1}



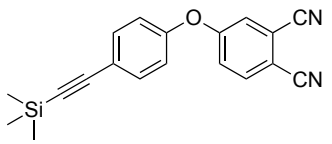
A mixture of 4-nitrophthalonitrile (1 g, 5.8 mmol), *N*-BOC-L-tyrosine (1.63 g, 5.8 mmol) and potassium carbonate (3.19 g, 23.1 mmol) was stirred in DMF (20 mL) at room temperature for 48 h. Upon addition of water (200 mL), the mixture was extracted with DCM (3 × 100 mL). Then the combined organic layers were washed with water (2 × 100 mL), brine (100 mL) and dried with magnesium sulfate. After filtration and evaporation, the residual oil was dried under reduced pressure for 15 h to yield a brown powder (1.59, 68 %).

^{1}H NMR (300 MHz, acetone-d_6, 300 K): δ (ppm)= 1.33 (s, 9H); 3.02 (m, 1H); 3.32 (m, 1H); 4.14 (m, 1H); 6.26 (m, 1H); 6.98 (d, ^{3}J= 8.3 Hz, 2H); 7.3 (dd, ^{3}J= 8.9 Hz, ^{4}J= 2.3 Hz 1H); 7.38 (d, ^{3}J= 8.3 Hz, 2H); 7.47 (d, ^{4}J= 2.3 Hz, 1H); 7.93 (d, ^{3}J= 8.9 Hz, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6, 300 K): δ (ppm)= 28.1; 30.8; 35.8; 77.6; 107.8; 115.3; 115.8; 116.6; 119.8; 121.6; 122.0; 131.5; 136.2; 136.7; 151.7; 154.9; 161.4; 162.3.

*4-(4-((trimethylsilyl)ethynyl)phenoxy)phthalonitrile (**43**):*

$C_{19}H_{16}N_2OSi$
Exact mass: 316.10 g.mol^{-1}
Molecular weight: 316.43 g.mol^{-1}



A solution of ethynyltrimethylsilane (328 mg, 3.34 mmol) in triethylamine (20 mL) was added to a mixture of de 4-(4-bromophenoxy)phthalonitrile **41** (500 mg, 1.67 mmol), tetrakis(triphenylphosphine)palladium (193 mg, 0.167 mmol) and copper iodide (159 mg, 0.835 mmol) under argon atmosphere. The mixture was heated at 60 °C for 2 h. After addition of DCM (30 mL), the organic layer was washed with saturated NH_4Cl (3×30 mL), brine (3×30 mL), water (30 mL) and dried over $MgSO_4$. The solvent was evaporated and the resulting oil was subjected to column chromatography (eluent:AcOEt/heptane 80:20) to afford **43** as a brown-white powder (400 mg, 77 %).

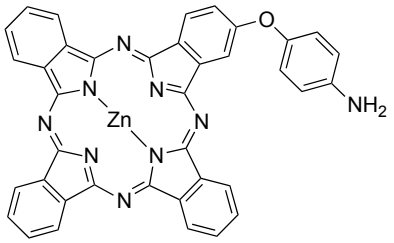
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 0.26 (s, 9H); 7.01 (d, ^{3}J= 8.7 Hz, 2H); 7.23 (dd, ^{3}J= 8.5 Hz, ^{4}J= 2.6 Hz, 1H); 7.29 (d, ^{4}J= 2.6 Hz, 1H); 7.55 (d, ^{3}J= 8.7 Hz, 2H); 7.73 (d, ^{3}J= 8.7 Hz, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6, 300 K): δ (ppm)= -0.1, 94.4, 104.3, 108.9, 115.3, 115.8, 116.8, 119.4, 120.3, 122.8, 123.2, 134.0, 136.3, 154.3, 160.2.

HR-MS ESI: m/z= 339.30 $[M+Na]^+$ ($C_{19}H_{16}N_2OSiNa^+$: 339.09).

*2-(4-aminophenoxy)[phthalocyaninato]zinc(II) (**44**):*

$C_{38}H_{21}N_9OZn$
Exact mass: 683.12 g.mol^{-1}
Molecular weight: 685.01 g.mol^{-1}



*Statistical mixture (A_3B **44** + A_4 **4**):*

To a suspension of 4-(4-(amino)phenoxy)phthalonitrile (0.5 g, 2.13 mmol), phthalonitrile (1.9 g, 14.88 mmol) and zinc acetate dihydrate (0.93 mg, 4.25 mmol) in octanol (10 mL) was added DBU (2.55 mL, 2.59 mmol), then the mixture was heated at 130 °C for 15 h. The reaction mixture was cooled to room temperature and the blue precipitate was filtered off, washed with 1 M hydrochloric acid (3 × 30 mL), water (3 × 30 mL) and methanol (20 mL). The blue-green solid was dried under reduced pressure to afford the mixture of non-substituted (**4**) and mono-substituted (**44**) phthalocyanine (520 mg).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 300 K): 5.40 (s, 2H); 6.86 (d, ^{3}J= 8.7 Hz, 2H); 7.24 (d, ^{3}J= 8.7 Hz, 2H); 7.91 (m, 1H), 8.22 (m, 28H); 8.57 (s, 1H); 9.17 (m, 1H); 9.30 (m, 28H).

MS MALDI-TOF: m/z= 576.68 $[ZnPc+H]^+$ (calcd for $C_{32}H_{17}N_8Zn^+$: 577.09), 683.82 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{38}H_{22}N_9OZn^+$: 684.13).

UV-Vis (DMSO): λ_{max} (nm)= 348, 608, 673.

*Pure A_3B **45**:*

A fraction of the statistical mixture containing compounds **44** and **4** (0.3 g) was subjected to several silica gel column chromatographies (eluent: THF/Cyclohexane, gradient form 50:50 to 80:20) to afford 60 mg of pure disymetric phthalocyanine **44** (7 %).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 300 K): 5.53 (s, 2H); 6.90 (d, ^{3}J= 8.5 Hz, 2H); 7.23 (d, ^{3}J= 8.5 Hz, 2H); 7.79 (d, ^{3}J= 8.4 Hz, 1H), 8.15- 8,28 (m, 6H); 8.55 (s, 1H); 9.19 (d, ^{3}J= 8.4 Hz, 1H); 9.22-9.33 (m, 6H).

MS MALDI-TOF: m/z= 683.71 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{38}H_{22}N_9OZn^+$: 684.13).

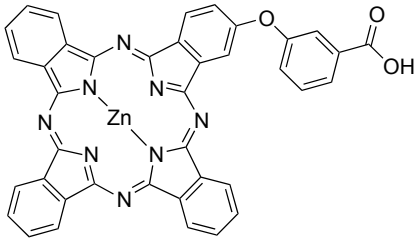
UV-Vis (DMSO): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 347 (40.4), 608 (23.6), 674 (146.7).

*2-(3-carboxyphenoxy)[phthalocyaninato]zinc(II) (**45**):*

$C_{39}H_{20}N_8O_3Zn$

Exact mass: 712.09 g.mol^{-1}

Molecular weight: 714.01 g.mol^{-1}



*Statistical mixture (A_3B **45** + A_4 **4**):*

To a suspension of 3-(3,4-dicyanophenoxy)benzoic acid (0.4 g, 1.51 mmol), phthalonitrile (1.35 g, 10.57 mmol) and zinc acetate dihydrate (0.66 g, 3.02 mmol) in octanol (10 mL) was added DBU (1.8 mL, 1.84 mmol). Then the mixture was heated at 130 °C for 15 h. The reaction mixture was cooled to room temperature and heptane (25 mL) was added. The blue precipitate was filtered off, washed with 1 M hydrochloric acid (3 × 20 mL), water (3 × 20 mL) and methanol (10 mL). The mixture of non-substituted (**4**) and mono-substituted (**45**) phthalocyanines was dried under reduced pressure (0.68 g).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 300 K): 7.78 (m, 2H); 7.85 (d, ^{3}J= 8.0 Hz, 1H); 7.95 (m, 2H); 8.17 (m, 21H), 8.66 (s, 1H); 9.17 (m, 22H); 13.24 (s, 1H).

MS MALDI-TOF: m/z= 576.68 $[ZnPc+H]^+$ (calcd for $C_{32}H_{17}N_8Zn^+$: 577.09), 712.82 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{39}H_{21}N_8O_3Zn^+$: 713.10).

UV-Vis (DMSO): λ_{max} (nm)= 346, 609, 673.

*Pure A_3B **45**:*

A fraction of the blue solid containing compound **45** and **4** (500 mg) was dissolved in a mixture of DCM/pyridine (50:50 v/v) and subjected to several column chromatographies on silica gel (eluent: DCM then THF/MeOH, gradient from 100:0 to 70:30) to afford the pure disymetric phthalocyanine **45** (118 mg, 15.5 %).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 300 K): 7.47 (m, 2H); 7.59 (d, ^{3}J= 8.4 Hz, 1H); 7.69 (m, 2H); 7.77-7.99 (m, 6H), 8.45 (s, 1H); 8.87 (d, ^{3}J= 8.4 Hz, 1H); 8.90-9.08 (m, 6H); 11.31 (s, 1H).

MS MALDI-TOF: m/z= 712.83 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{39}H_{21}N_8O_3Zn^+$: 713.10).

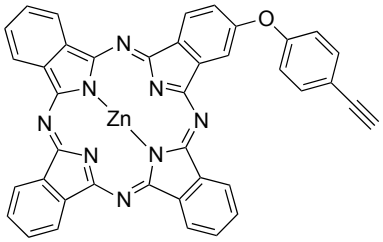
UV-Vis (DMSO): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 347 (45.5), 608 (26.3), 673 (168.2).

*2-(4-(alcynyl)phenoxy)[phthalocyaninato]zinc(II) (**46**), statistical mixture:*

$C_{40}H_{20}N_8OZn$

Exact mass: 692.11 g.mol^{-1}

Molecular weight: 694.02 g.mol^{-1}



A mixture of substitued phthalonitrile **43** (0.4 g, 1.26 mmol), phthalonitrile (1.13 g, 8.82 mmol), zinc acetate dihydrate (553 mg, 2.52 mmol), DBU (1.5 mL, 10.1 mmol) in octanol (10 mL) was heated at 130 °C for 2 h. Then the reaction mixture was cooled to room temperature and the blue precipitate was filtered off, washed with 1 M hydrochloric acid (3 × 20 mL), water (3 × 20 mL) and methanol (10 mL). The blue solid was dried under reduced pressure to afford the mixture of non-substitued (**4**) and mono-substitued (**46**) phthalocyanine (0.55 g).

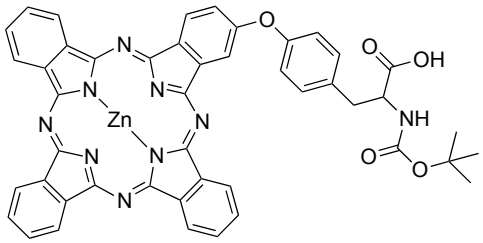
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 300 K): 4.28 (s, 1H); 7.55 (d, J= 8.0 Hz, 2H); 7.67 (d, J= 8.1 Hz, 1H); 7.81 (d, J= 8. 0 Hz, 2H), 8.1 (m, 16H); 8.3 (s, 1H); 8.77 (d, J= 8.1 Hz, 1H); 8.90 (m, 2H); 8.99 (m, 14H).

MS MALDI-TOF: m/z= 576.23 $[ZnPc+H]^+$ (calcd for $C_{32}H_{17}N_8Zn^+$: 577.09), 692.5 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{40}H_{21}N_8OZn^+$: 693.11).

UV-Vis (DMSO): λ_{max} (nm)= 344.1, 602.9, 640.0, 667.4.

*2-(4-(2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-(carboxyethyl)phenoxy)[phthalocyaninato]zinc(II) (**47**):*

$C_{46}H_{33}N_9O_5Zn$
Exact mass: 855.19 g.mol^{-1}
Molecular weight: 857.19 g.mol^{-1}



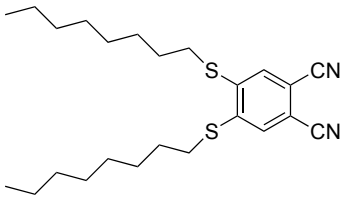
A mixture of substitued phthalonitrile **42** (200 mg, 0.49 mmol), phthalonitrile (565 mg, 4.42 mmol), zinc acétate dihydrate (269 mg, 1.23 mmol) and DBU (754 mg, 4.9 mmol) in octanol (10 mL) was heated at 130°C for 15 h. Then the reaction mixture was cooled to room temperature and 50 mL of cyclohexane were added. The blue-green precipitate was filtered off, washed with pentane (3×20 mL), water (3×20 mL), methanol (10 mL) and diethyl ether (3×20 mL). The mixture was dissolved in a 90:10 DCM/pyridine mixture (v/v) and subjected to silica gel column chromatography (eluent: DCM then THF/MeOH, gradient from 100:0 to 70:30) to yield the pure disymetric phthalocyanine **47** (50 mg, 12 %).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 300 K): 1.40 (s, 9H); 2.73 (m, 1H); 2.97 (m, 1H); 4.24 (m, 1H); 7.10 (m, 1H);7.37 (d, ^{3}J= 7.9 Hz, 2H); 7.48 (d, ^{3}J= 7.9 Hz, 2H); 7.87 (d, ^{3}J= 8.4 Hz, 1H); 8.11-8.32 (m, 6H); 8.8 (s, 1H); 9.32 (d, ^{3}J= 8.4 Hz, 1H); 9.34-9.47 (m, 6H).

MS MALDI-TOF: m/z= 855.50 $[M]^{+\bullet}$ (calcd for $C_{46}H_{33}N_9O_5Zn^{+\bullet}$: 855.19).

*4,5-bis(thiooctyl)phthalonitrile (**48**):*

$C_{24}H_{36}N_2S_2$
Exact mass: 416.23 g.mol^{-1}
Molecular weight: 416.69 g.mol^{-1}



A mixture of 4,5-dichloro-1,2-dicyanobenzene (2.0 g, 10.2 mmol), octanethiol (3.52 mL, 20.4 mmol) and potassium carbonate (14.38 g, 104 mmol) in 100 mL of dry DMSO was heated at 80°C for 15 hours under an argon atmosphere. The reaction mixture was cooled to room temperature, then 100 mL of water were added. The reaction mixture was extracted with diethyl ether (3×150 mL), and the combined organic layers were washed with water (3×150 mL), with brine (150 mL) and finally dried with magnesium sulfate. The residual oil was subjected to silica gel column chromatography (eluent: AcOEt/Cyclohexane 10:90). Upon isolation of the desireted fraction and evaporation of solvants, a yellow-white powder was obtained (3.56 g, 84 %).

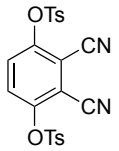
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 0.89 (m, 6H); 1.31 (m, 16H); 1.49 (m, 4H); 1.75 (m, 4H); 3.01 (t, ^{3}J= 7.4 Hz, 4H); 7.41 (s, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 14.1, 22.7, 28.1, 28.9, 29.1, 29.2, 31.8, 32.8, 111.1, 115.7, 138.2, 144.3.

MS ESI: m/z= 415.23 $[M-H]^-$ (calcd for $C_{24}H_{35}N_2S_2^-$: 415.22).

*3,6-ditosylphthalonitrile (**49**):*

$C_{22}H_{16}N_2O_6S_2$
Exact mass: 468.04 g.mol^{-1}
Molecular weight: 468.50 g.mol^{-1}

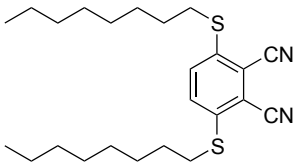


A mixture of 2,3-dicyanohydroquinone (5 g, 31.2 mmol), tosyl chloride (12.9 g, 67.7 mmol) and potassium carbonate (17.25 g, 125 mmol) in 40 mL of acetone was heated under reflux for 15 h. Upon cooling to room temperature, 100 mL of water was added to the mixture and stirring was carried out for 1 h. The white-brown precipitate formed was filtered off, washed with 100 mL of water and dried under reduced pressure to afford the desired compound (14 g, 94 %).

^{1}H NMR (300 MHz, acetone-d_6, 300 K): δ (ppm)= 2.51 (s, 6H); 7.57 (d, ^{3}J= 8.3 Hz, 4H); 7.84 (s, 2H); 7.85 (d, ^{3}J= 8.3 Hz, 4H).

*3,6-dithiooctylphthalonitrile (**50**):*

$C_{24}H_{36}N_2S_2$
Exact mass: 416.23 g.mol^{-1}
Molecular weight: 416.69 g.mol^{-1}



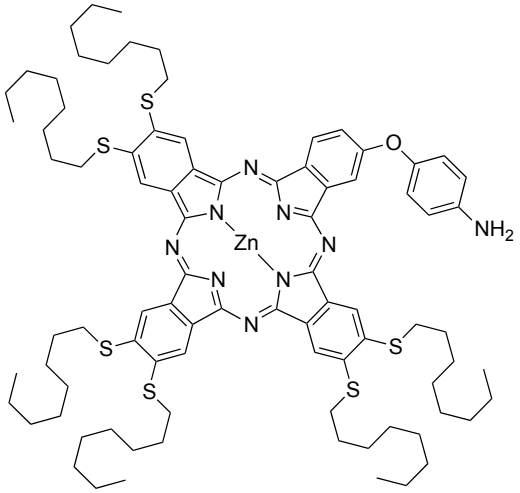
To a solution of 3,6-ditosylphthalonitrile (2 g, 4.27 mmol) in 30 mL of dry DMSO was added under argon atmosphere 1.85 mL of octanethiol (10.6 mmol). The mixture was stirred at room temperature and potassium carbonate (2.36 g, 17.1 mmol) was added in portions every 15 min for 2 h. The mixture was stirred for 15 hours, then 150 mL of water were added. The product was extracted with chloroform (3×150 mL) and the combined organic layers were washed with water (3×150 mL), then dried with magnesium sulfate. The residual solid obtained after evaporation was recristallized in ethanol (50 mL-ice bath). The yellow crystals obtained were filtered off, washed with 10 mL of cold ethanol and dried under reduced pressure to afford 3,6-dithiooctylphthalonitrile **50** (0.84 g, 47 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 0.88 (m, 6H); 1.28 (m, 16H); 1.45 (m, 4H); 1.68 (m, 4H); 3.01 (t, ^{3}J= 7.4 Hz, 4H); 7.49 (s, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 14.1, 22.7, 28.2, 28.8, 29.0, 29.1, 31.8, 33.9, 114.0, 116.9, 132.1, 144.4.

MS ESI: m/z= 415.24 $[M-H]^-$ (calcd for $C_{24}H_{35}N_2S_2^-$: 415.22).

*[2-(4-aminophenoxy)-9,10,16,17,23,24-hexakis(octylthio)phthalocyaninato]zinc(II) (**51**):*



$C_{86}H_{117}N_9OS_6Zn$

Exact mass: 1547.70 g.mol^{-1}

Molecular weight: 1550.68 g.mol^{-1}

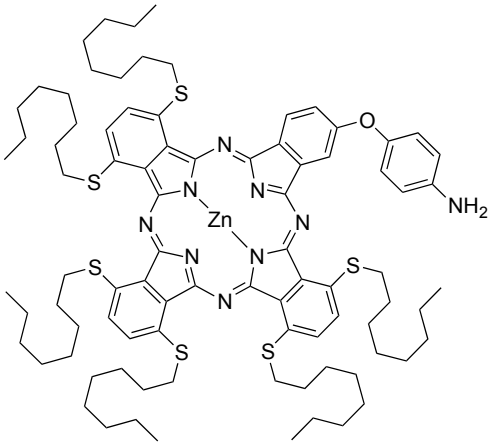
A mixture of zinc acetate (0.45 g, 2.00 mmol), 4,5-bis(octylthio)phthalonitrile (2 g, 4.80 mmol), 4-(4-aminophenoxy)phthalonitrile (0.16 g, 0.69 mmol) and DBU (820 µL, 5.49 mmol) in pentanol (20 mL) was refluxed for 4 h under a slow stream of nitrogen. The mixture was cooled down to room temperature and MeOH (10 mL) was added. The precipitate obtained was filtered off and washed with MeOH, then subjected to silica gel column chromatography (eluent: THF/Cyclohexane, gradient from 90:10 to 50:50). After removing the solvent by evaporation, the residue was again subjected to column chromatography on alumina (eluent: THF/Cyclohexane, gradient from 90:10 to 50:50) as eluent to afford the target compound **51** as a green solid (70 mg, 7 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 0.80 (m, 18H); 1.01-2.06 (m, 72H); 3.06 (m, 12H); 6.30 (s broad, 2H); 7.46 (s, 6H); 9.00-9.27 (m, 5H); 9.61 (d, ^{3}J= 8.4 Hz, 1H); 10.29 (s, 1H).

MS MALDI-TOF: m/z= 1547.58 $[M]^{+\bullet}$ (calcd for $C_{86}H_{117}N_9OS_6Zn^{+\bullet}$: 1547.70).

UV-Vis ($CHCl_3$): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 343 (37.6), 685 (100.2).

*[2-(4-aminophenoxy)-8,11,15,18,22,25-hexakis(octylthio)phthalocyaninato]zinc(II) (**52**):*



$C_{86}H_{117}N_9OS_6Zn$

Exact mass: 1547.70 g.mol^{-1}

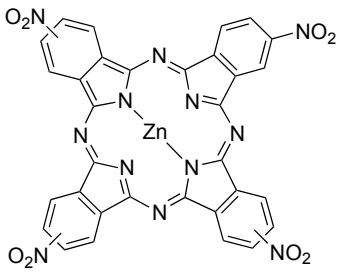
Molecular weight: 1550.68 g.mol^{-1}

A mixture of zinc acetate (0.45 g, 2.00 mmol), 3,6-bis(octylthio)phthalonitrile (2 g, 4.80 mmol), 4-(4-aminophenoxy)phthalonitrile (0.16 g, 0.69 mmol) and DBU (820 µL, 5.49 mmol) in pentanol (20 mL) was refluxed for 4 h under a slow stream of nitrogen. The precipitate obtained was filtered off and washed with MeOH, then subjected to silica gel column chromatography (eluent: THF/Cyclohexane, gradient from 90:10 to 50:50) as the eluent. After removing the solvent by evaporation, the residue was again subjected to column chromatography on alumina using (eluent: THF/Cyclohexane, gradient from 90:10 to 50:50) as eluent to afford the target green solid (8 mg, 0.8 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 0.76-0.89 2.33 (m, 90H); 3.15 (m, 12H); 6.33 (s broad, 2H); 7.15 (s, 6H); 8.94-9.33 (m, 5H); 9.70 (d, ^{3}J= 8.4 Hz, 1H); 10.12 (s, 1H).

MS MALDI-TOF: m/z= 1548.39 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{86}H_{117}N_9OS_6Zn$: 1548.71).

*[2,9(10),16(17),23(24)-tetranitrophthalocyaninato]zinc(II) (**53**):*



$C_{32}H_{12}N_{12}O_8Zn$

Exact mass: 756.02 g.mol^{-1}

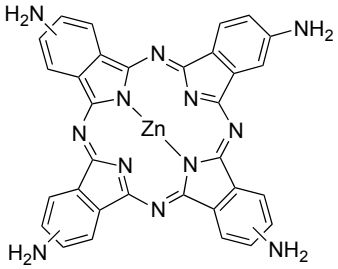
Molecular weight: 757.89 g.mol^{-1}

To a solution of 4-nitrophthalonitrile (2 g, 11.5 mmol) and zinc acetate (0.61 g, 2.8 mmol) in 20 mL of octanol was added DBU (1.76 g, 11.5 mmol). The mixture was heated at 150°C for 6 h. The green precipitate was filtered off, washed with 2 M HCl (3×100 mL), water (3×100 mL) and methanol (50 mL). Compound **53** was purified by continuous extraction of the impurities with DCM using a soxhlet extractor (24 h) and dried under reduce pressure (1.74 g, 87 %).

^{1}H NMR (DMSO-d_6, 300 MHz, 298 K): δ(ppm) = 8.55-9.51 (m, 12 H).

UV-Vis ($CHCl_3$): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 343 (37.6), 685 (100.2).

*[2,9(10),16(17),23(24)-tetraaminophthalocyaninato]zinc(II) (**54**):*



$C_{32}H_{20}N_{12}Zn$
Exact mass: 636.12 g.mol^{-1}
Molecular weight: 637,93 g.mol^{-1}

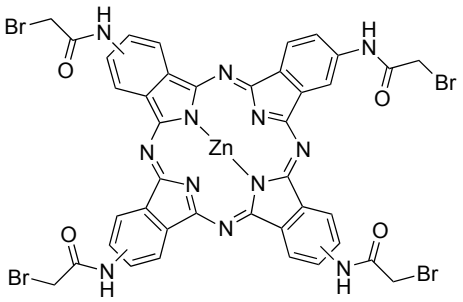
A solution of phthalocyanine **53** (0.35 g, 0.46 mmol) and sodium sulfide nonahydrate (2.22 g, 9.24 mmol) in 10 mL of DMF was stirred at 60°C for 5 h. The mixture was cooled to room temperature and 100 mL of cold water were added. The precipitate was collected and washed by centrifugation with a MeOH/Et_2O mixture (1:9, 100 mL) and ethyl acetate (100 mL). After evaporation to dryness under vacuum, the resulting green solid was dried under reduce pressure (0.23 g, 65 %).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d$_6$, 298 K): δ(ppm) = 6.21 (m, 8 H), 7.37 (m, 4 H), 8.43 (m, 4 H), 8.91 (m, 4 H).

MS MALDI-TOF: m/z= 635.75 $[M]^{+\bullet}$ (calcd for $C_{32}H_{20}N_{12}Zn^{+\bullet}$: 636.12).

UV-Vis ($CHCl_3$): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 351 (50.8), 636 (22.3), 706 (92.0).

*[2,9(10),16(17),23(24)-tetrakis(2-bromoacetamido)phthalocyaninato]zinc(II) (**55**):*



$C_{40}H_{24}Br_4N_{12}O_4Zn$
Exact mass:1115.81 g.mol^{-1}
Molecular weight: 1121.69 g.mol^{-1}

Phthalocyanine **54** (100 mg, 0.157 mmol) was suspended in a 2:1 v/v DMF/THF mixture (30 mL). Then 273 µL of DIPEA (3.14 mmol) were added, followed by 68 µL of bromoacetyl bromide (1.57 mmol). The reaction was stirred at 80°C for 48 h. The solvents were removed under reduced pressure and the resulting solid was suspend in acetone (20 mL), filtered off, washed with water (3×30 mL), methanol (3×30 mL), acetone (3×30 mL), DCM (3×30 mL) and finally dried under reduce pressure (84 mg, 48 %).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d$_6$, 300 K): δ (ppm)= 4.37 (m, 8H); 8.23 (m, 4H), 8.95 (m, 4H), 9.36 (m, 4H), 11.11 (m, 4H).

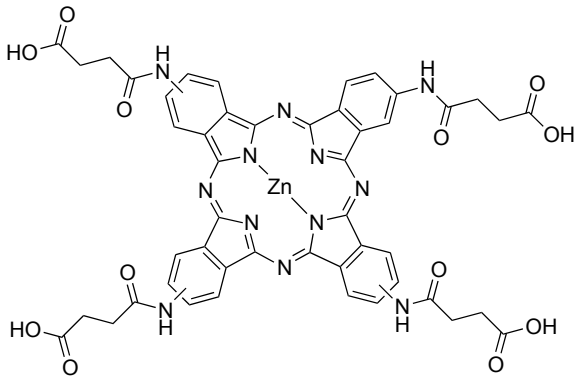
MS MALDI-TOF: m/z= 1037.50 $[M\text{-}Br]^+$ (calcd for $C_{40}H_{24}Br_3N_{12}O_4Zn^+$: 1036.89).

*[2,9(10),16(17),23(24)-tetrakis(3-carboxypropanamido)phthalocyaninato]zinc(II) (**56**):*

$C_{48}H_{36}N_{12}O_{12}Zn$

Exact mass: 1036.19 g.mol^{-1}

Molecular weight: 1038.25 g.mol^{-1}



A mixture of phthalocyanine **54** (100 mg, 0.157 mmol) and succinic anhydride (314 mg, 3.14 mmol) a 2:1 v/v DMF/THF mixture (30 mL) was heated at 80°C for 48 h. The solvents were removed under reduced pressure and the resulting solid was suspend in acetone (20 mL), filtered off, washed with water (3×30 mL), methanol (3×30 mL), acetone (3×30 mL), DCM (3×30 mL) and finally dried under reduce pressure (95 mg, 59 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 2.78 (m, 8H); 2.88 (m, 8H); 8.31 (m, 4H), 9.15 (m, 4H), 9.64 (m, 4H); 10.74 (m, 4H); 12.32 (m, 4H).

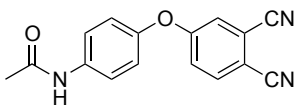
MS MALDI-TOF: m/z= 1075.51 $[M+K]^+$ (calcd for $C_{48}H_{36}N_{12}O_{12}KZn^+$: 1075.15).

*4-(4-acetamidophenoxy)phthalonitrile (**57**):*

$C_{16}H_{11}N_3O_2$

Exact mass: 277.09 g.mol^{-1}

Molecular weight: 277.28 g.mol^{-1}



Method A :

To a solution of 4-(4-aminophenoxy)phthalonitrile (3.5 g, 14.9 mmol) in 100 mL of absolute ethanol was added acetic anhydride (1.7 mL, 17.9 mmol). The solution was stirred for 30 min at room temperature, then filtered off. The brown solid was washed with ethanol (3 × 50 mL) and dried under reduce pressure (3.27 g, 79.2 %).

Method B :

A mixture of 4-nitrophthalonitrile (1 g, 5.8 mmol), *N*-(4-hydroxyphenyl)acetamide **9** (0.77 g, 5.8 mmol) and potassium carbonate (1.6 g, 11.6 mmol) was stirred in DMF (20 mL) at room temperature for 15 h. After addition of 20 mL of water, the resulting precipitate was filtered off and washed with water (3 × 10 mL). The white-pink solid obtained was dried under reduced pressure to afford the desired compound (1.38 g, 86%)

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO, 300 K): δ (ppm)= 2.05 (s, 3H); 7.13 (d, ^{3}J= 8.8 Hz, 2H); 7.33 (dd, ^{3}J= 8.7 Hz, ^{4}J= 2.5 Hz, 1H); 7.68 (d, ^{3}J= 8.8 Hz, 2H); 7.71 (d, ^{4}J= 2.5 Hz, 1H); 8.06 (d, ^{3}J= 8.7 Hz, 1H); 10.06 (s, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO, 300 K): δ (ppm)= 23.9; 107.8; 115.3; 115.9; 116.6; 120.7; 120.8; 121.4; 122.1; 136.2; 137.1; 148.5; 161.5; 168.3.

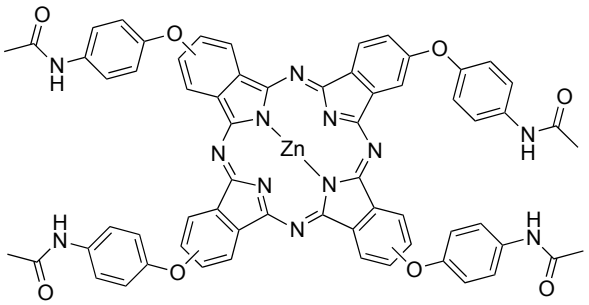
MS ESI: m/z= 275.88 $[M-H]^-$ (calcd for $C_{16}H_{10}N_3O_2^-$: 276.08).

*[2,9(10),16(17),23(24)-tetrakis(4-acetamidophenoxy)phthalocyaninato]zinc(II) (**58**):*

$C_{64}H_{44}N_{12}O_8Zn$

Exact mass: 1172.27 g.mol^{-1}

Molecular weight: 1174.49 g.mol^{-1}



4-(4-acetamidophenoxy)phthalonitrile **57** (1 g, 3.61 mmol), zinc acetate dihydrate (0.20 mg, 0.90 mmol) and DBU (549 mg, 3.61 mmol) in pentanol (10 mL) were heated under reflux for 15 hours. The blue mixture was concentrated under vacuum, and small volume of acetone was added, followed by addition of large quantities of ethyl acetate. The precipitate was then filtered off, washed with 30 mL of ethyl acetate, with 1M hydrochloric acid (3×50 mL) and with water (3×50 mL). The product was dried under reduced pressure to afford pur tetrasubstitued phthalocyanine **58** as a mixture of regioisomers (0.94 mg, 88 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 2.13 (m, 12 H); 7.43 (m, 8H); 7.67 (m, 4H); 7.83 (m, 8H); 8.44 (m, 4H); 8.89 (m, 4H); 10.07 (s, 4H).

MS MALDI-TOF: m/z= 1173.27 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{64}H_{45}N_{12}O_8Zn^+$: 1173.28).

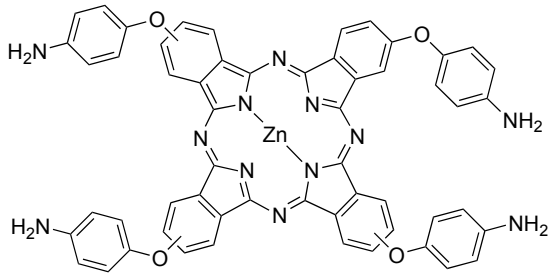
UV-Vis ($CHCl_3$): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 355 (47.4), 612 (23.5), 680 (126.0).

*[2,9(10),16(17),23(24)-tetrakis(4-aminophenoxy)phthalocyaninato]zinc(II) (**59**):*

$C_{56}H_{36}N_{12}O_4Zn$

Exact mass: 1004.23 g.mol^{-1}

Molecular weight: 1006.34 g.mol^{-1}



To a solution of potassium hydroxyde (1.93 g, 34.4 mmol) in a EtOH/H_2O mixture (4:1 v/v, 10 mL) was added phthalocyanine **58** (0.5 g, 0.43 mmol). The reaction mixture was refluxed for 20 h. Upon

cooling to room temperature, the mixture was neutralized with 1 M hydrochloric acid. The precipitate formed was filtered off, washed with water (3×100 mL) and with ether (2×50 mL). The resulting blue-green solid was dried under reduced pressure (354 mg, 82 %).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d$_6$, 300 K): δ (ppm)= 5.24 (s broad, 8H); 6.83 (m, 8H); 7.18 (m, 8H); 7.76 (m, 4H); 8.54 (m, 4H); 9.18 (m, 4H).

MS MALDI-TOF: m/z= 1005.39 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{56}H_{37}N_{12}O_4Zn^+$: 1005.23).

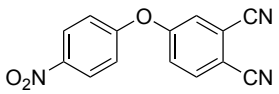
UV-Vis ($CHCl_3$): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 352 (129.1), 614 (60.9), 684 (315.6).

*4-(4-nitrophenoxy)phthalonitrile (**60**):*

$C_{14}H_7N_3O_3$

Exact mass: 265.05 g.mol^{-1}

Molecular weight: 265.22 g.mol^{-1}



A mixture of 4-nitrophthalonitrile (1 g, 5.8 mmol), 4-nitrophenol (0.8 g, 5.8 mmol) and potassium carbonate (1.48 g, 11.6 mmol) was stirred in DMF (20 mL) at 80°C for 15 h. After addition of water (100 mL), the resulting precipitate was filtered off, washed with water (3 × 50 mL). The white-brown solid was dried under reduced pressure for several hours to afford the desired compound (1.24 g, 81 %).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d$_6$, 300 K): δ (ppm)= 7.39 (d, ^{3}J= 9.1 Hz, 2H); 7.65 (dd, ^{3}J= 8.7 Hz, ^{4}J= 2.5 Hz 1H); 8.01 (d, ^{4}J= 2.5 Hz, 1H); 8.20 (d, ^{3}J= 8.7 Hz, 1H); 8.32 (d, ^{3}J= 9.1 Hz, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d$_6$, 300 K): δ (ppm)= 110.1, 115.2, 115.6, 115.9, 119.9, 120.0, 124.2, 124.3, 124.5, 126.3, 139.5, 144.0, 158.9, 159.8.

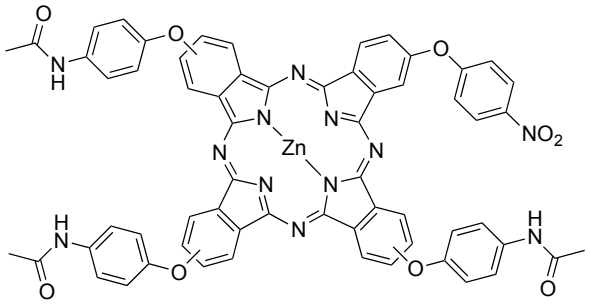
MS ESI: m/z= 263.83 $[M-H]^-$ (calcd for $C_{14}H_7N_3O_3^-$: 264.04).

*[2-(4-nitrophenoxy)-9(10),16(17),23(24)-tris(4-acetamidophenoxy)phthalocyaninato]zinc(II) (**61**), statistical mixture:*

$C_{62}H_{40}N_{12}O_9Zn$

Exact mass: 1160.23 g.mol^{-1}

Molecular weight: 1162.44 g.mol^{-1}



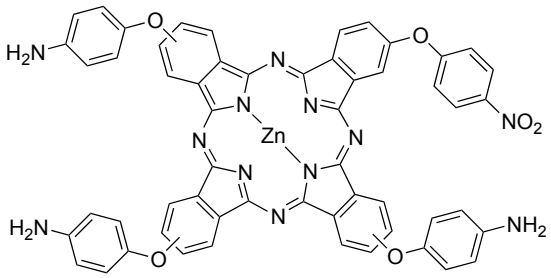
Phthalonitrile **60** (0,2 g, 0.75 mmol), phthalonitrile **57** (1.46 g, 5.28 mmol), zinc acetate dihydrate (0.33 mg, 1.51 mmol) and DBU (0.92 mg, 6.63 mmol) in pentanol (10 mL) were heated under reflux for 15 hours. The solvent was evaporated under reduced pressure, and a small volume of methanol was added, followed by addition of large volumes of water. The precipitate was then filtered off,

washed with 1 M hydrochloric acid (3×100 mL) and with water (3×100 mL). The solid was dried under reduced pressure to afford a mixture of symetric (**58**) and dissymetric (**61**) phthalocyanines (**61** and **58**) (1.48 g).

MS MALDI-TOF: m/z= 1172.98 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{64}H_{45}N_{12}O_8Zn^+$: 1173.28) ($A_4$ **58**); 1161.16 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{62}H_{41}N_{12}O_9Zn^+$: 1161.24) ($A_3B$ **61**).

*[2-(4-nitrophenoxy)-9(10),16(17),23(24)-tris(4-aminophenoxy)phthalocyaninato]zinc(II) (**62**):*

$C_{56}H_{34}N_{12}O_6Zn$
Exact mass: 1034.20 g.mol^{-1}
Molecular weight: 1036.33 g.mol^{-1}



To a solution of potassium hydroxyde (3.86 g, 68.8 mmol) in a EtOH/H_2O mixture (20 mL) was added the statistical mixture containing phthalocyanine **61** (1 g). The reaction mixture was heated under reflux for 20 h. Upon cooling to room temperature, the mixture was neutralized with molar hydrochloric acid. The precipitate formed was filtered off, washed with water (3×100 mL) and with ether (2×50 mL). The resultant blue-green solid was subjected to several column chromatographies (eluant : AcOEt/MeOH, gradient from 100:0 to 95:5) to yield the pure dissymetric phthalocyanine **61** (45 mg, 5.2 % for two steps).

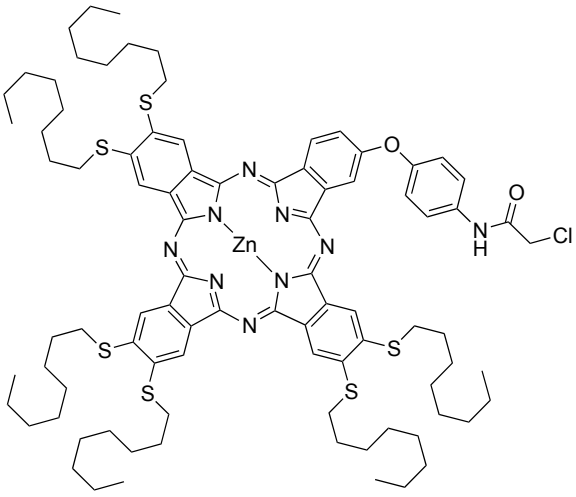
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 5.20 (s broad, 6H); 6.84 (m, 6H); 7.19 (m, 6H); 7.57 (m, 2H); 7.74 (m, 4H); 8.44 (m, 4H); 9.05 (m, 6H).

MS MALDI-TOF: m/z= 1034.86 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{56}H_{35}N_{12}O_6Zn^+$: 1035.21).

UV-Vis ($CHCl_3$): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 352 (133.1), 613 (64.4), 683 (312.8).

*[2-(4-(2-chloroacetamido)phenoxy)-9,10,16,17,23,24-hexakis(octylthio)phthalocyaninato] zinc(II) (**63**):*

$C_{88}H_{118}ClN_9O_2S_6Zn$
Exact mass: 1623.67 g.mol^{-1}
Molecular weight: 1627.16 g.mol^{-1}



In a Schlenck, ZnPc **51** (24 mg, 15 µmol) was dissolved in 3 mL of freshly distilled DCM. EtN_3 (5 µL, 37.5 µmol) and chloroacetyl chloride (5 µL, 37.5 µmol) were successively added. The green solution was stirred under nitrogen at room temperature for 16 h. methanol (2 mL) was added in the reaction mixture. The precipitate was filtered off and washed with methanol to yield the compound **63** quantitatively.

MS MALDI-TOF: m/z= 1626.76 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{88}H_{119}ClN_9O_2S_6Zn^+$: 1624.68).

*[2-(4-(2-(DO3A)acetamido)phenoxy)-9,10,16,17,23,24-hexakis(octylthio)phthalocyaninato] zinc(II) (**64**):*

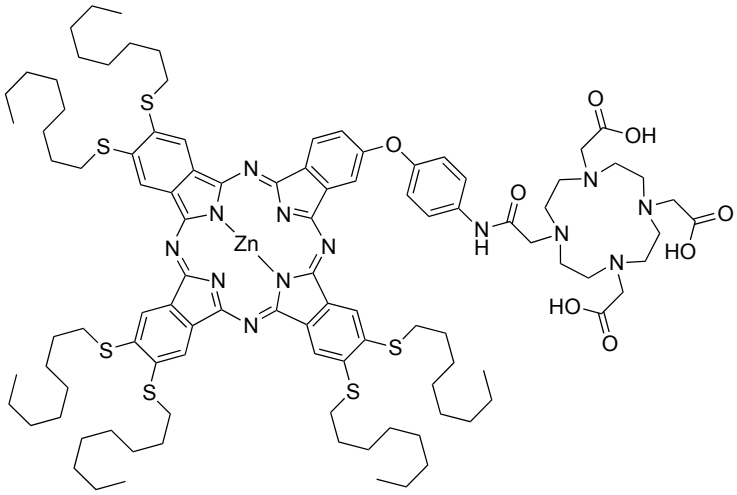
$C_{102}H_{143}N_{13}O_8S_6Zn$

Exact mass:

1933.88 $g.mol^{-1}$

Molecular weight:

1937.08 $g.mol^{-1}$



A mixture of compound **63** (33.5 mg, 20 µmol), DO3AtBu (16 mg, 30 µmol) and NEt_3 (5 µL, 30 µmol) in DMF (3 mL) was stirred for 16 h under a nitrogen atmosphere. Upon removal of the solvent under vacuum, the residue was subjected to silica gel column chromatography (eluent: THF/cyclohexane, gradient from 50:50 to 100:0, then THF/MeOH, gradient from 100:0 to 90:10). The MALDI-TOF analyses of the collected fractions showed partial removal of the *t*Butyl groups. The different fractions were gathered, dissolved in TFA and stirred for 1 h at room temperature. A saturated aqueous solution of $NaHCO_3$ was added. The precipitate was filtred off and washed with water to yield 15.5 mg of compound **64** (40 %).

MS MALDI-TOF: m/z= 1956.67 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{102}H_{143}N_{13}O_8S_6ZnNa^+$: 1956.87).

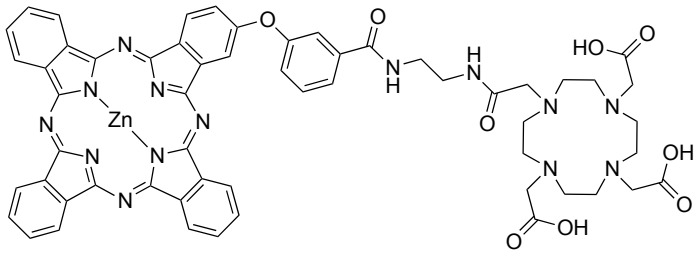
UV-Vis (DMF): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ $L.mol^{-1}.cm^{-1}$)= 378 (75.3), 628 (38.8), 701 (183.9).

*[2-((2-oxo-2-((2-(4-phenoxybenzamido)ethyl)amino)ethyl)DO3A)phthalocyaninato]zinc(II) (**65**):*

$C_{57}H_{52}N_{14}O_9Zn$

Exact mass: 1140.33g.mol^{-1}

Molecular weight: 1142.49 g.mol^{-1}



In a round bottom flask were introduced phthalocyanine **45** (37 mg, 52 µmol), HBtu (24 mg, 63 µmol) and HOBt (8.5 mg, 63 µmol). The mixture was dissolved in 1 mL of DCM and a solution of DO3AtBu-N-(2-aminoethyl)ethanamide (39 mg, 0.063 mmol) in DCM (2 mL) and DIPEA (15 µL, 63 µmol) were added. The resulting solution was stirred at room temperature for 24 h. The crude product was washed with an aqueous citric acid solution (pH= 3-4), then with saturated $NaHCO_3$ solution and finally with water. The organic layer was dried under $MgSO_4$, concentrated under vacuum, and the residue was subject to silica gel cholumn chromatography (eluent: THF/cyclohexane, gradient from 50:50 to 100:0, then THF/MeOH, gradient from 100:0 to 90:10). The MALDI-TOF analyses of the collected fractions showed partial removing of the *t*Butyl groups. The different fractions were gathered, dissolved in TFA and stirred for 1 h at room temperature. A saturated aqueous solution of $NaHCO_3$ was added. The precipitate was filtered and washed with water to yield 23.4 mg of compound **65** (40 %).

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d$_6$, 420 K): δ (ppm)= 2.94 (m, 12H); 3.07 (m, 4H); 3.32 (q, ^{3}J= 5.8 Hz, 2H); 3.44 (q, ^{3}J= 8.1 Hz, 1H); 3.57 (s, 4H); 3.62 (s, 4H); 3.68 (s, 1H); 7.61 (d, ^{3}J= 8.1 Hz, 1H); 7.69 (t, ^{3}J= 8.1 Hz, 1H); 7.85 (d, ^{4}J= 2.1 Hz, 1H); 7.88 (s, 1H); 7.91 (dd, ^{3}J= 7.9 Hz, 2.1 Hz, 1H); 8.14-8.25 (m, 6H); 8.29 (s, 1H); 8.52 (s, 1H); 8.92 (d, ^{4}J= 2.1 Hz, 1H); 9.32 (d, ^{3}J= 7.9 Hz, 1H); 9.42 (m, 6H).

MS MALDI-TOF: m/z= 1141.62 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{57}H_{53}N_{14}O_9Zn^+$: 1141.34).

UV-Vis (DMF): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 378 (75.3), 628 (38.8), 701 (183.9).

*[2,9(10),16(17),23(24)-tetrakis(4-chloroacetamidophenoxy)phthalocyaninato]zinc(II) (**66**):*

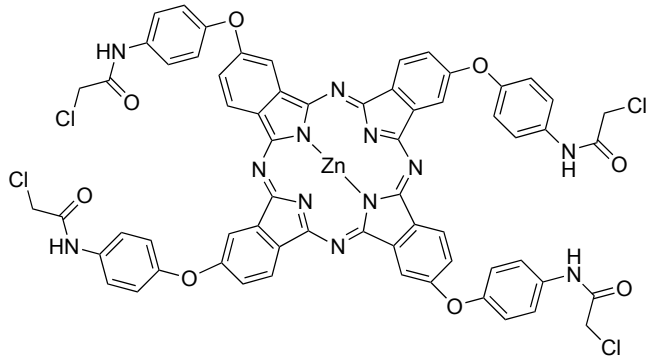
$C_{64}H_{40}Cl_4N_{12}O_8Zn$

Exact mass:

1308.11 g.mol^{-1}

Molecular weight:

1312.27 g.mol^{-1}

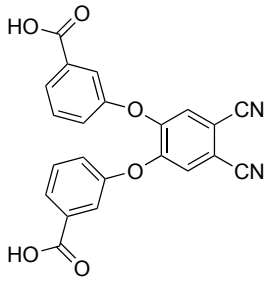


Phthalocyanine **59** (400 mg, 0.40 mmol) was put in 20 mL of DMF, then triethylamine (536 µL, 4.00 mmol) followed by chloroacetyl chloride (158 µL, 2.00 mmol) were added. The mixture was stirred at room temperature for 15 h, then 20 mL of water were added. The precipitate was filtered off, washed with HCl 0,1 M (2 × 30 mL), water (3×30 mL), methanol (3×30 mL) and finally dried under reduced pressure to give the desired product as a dark-blue solid (385 mg, 96 %).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 300 K): δ (ppm)= 4.34 (s, 8H); 7.48 (m, 8H); 7.81 (m, 12H); 8.41 (m, 4H); 8.86 (m, 4H); 10.48 (s broad, 4H).

MS MALDI-TOF: m/z= 1309.01 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{64}H_{41}Cl_4N_{12}O_8Zn^+$: 1309.12).

*4,5-bis(3-carboxyphenoxy)phthalonitrile (**67**):*



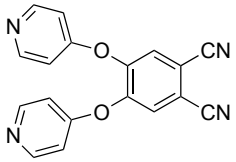
$C_{22}H_{12}N_2O_6$
Exact mass: 400.07 g.mol^{-1}
Molecular weight: 400.34 g.mol^{-1}

A mixture of 4,5-dichloro-1,2-dicyanobenzene (0.5 g, 2.54 mmol), 3-hydroxbenzoic acid (1.32 g, 7.61 mmol) and potassium carbonate (3.9 g, 30.46 mmol) in 10 mL of DMF was stirred at 100°C for 5 h. The reaction mixture was cooled to room temperature and dropped in 200 mL of 1 M hydrochloric acid solution. The precipitate was filtered off, washed with water (3×50 mL) and dried under reduced pressure. The solid was resuspended in DCM (50 mL), filtered off and thoroughly washed with DCM (5×50 mL) to remove the product of monosubstitution and yield the desired compound which was dried under reduced pressure (0.6 g, 59 %).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 300 K): δ (ppm)= 7.35 (d, ^{3}J= 7.9 Hz, 2H); 7.53 (m, 4H); 7.77 (d, ^{3}J= 7.9 Hz, 2H); 7.94 (s, 2H); 13.19 (s broad, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6, 300 K): δ (ppm)= 111.5, 115.2, 118.2, 122.8, 125.7, 130.6, 133.0, 150.6, 154.9, 166.4.

*4,5-bis(pyridin-4-yloxy)phthalonitrile (**68**):*



$C_{18}H_{10}N_4O_2$
Exact mass: 314.08 g.mol^{-1}
Molecular weight: 314.30 g.mol^{-1}

A mixture of 4,5-dichloro-1,2-dicyanobenzene (3 g, 15.23 mmol), 4-hydroxpyridine (2.9 g, 30.42 mmol) and potassium carbonate (8.42 g, 60.91 mmol) in 30 mL of DMF was stirred at room

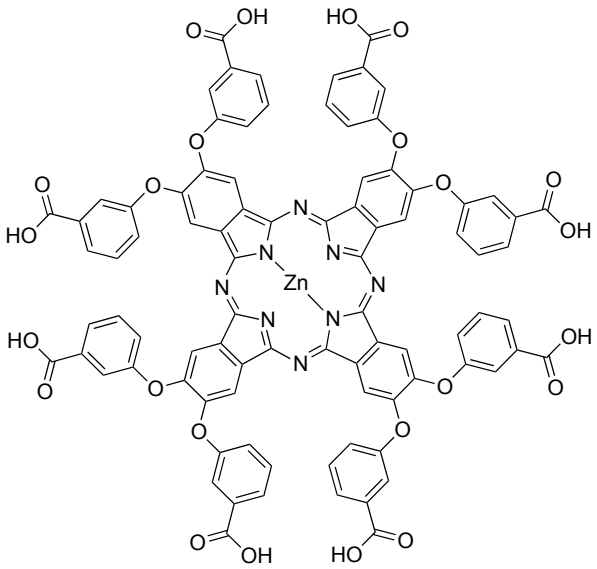
temperature for 20 h. The reaction mixture was filtered off on clarcel®, then DMF was evaporated under reduced pressure. The product was purified on silica gel column chromatography (eluent: MeOH/acetone 50:50) then dried under reduce pressure (4.46 g, 93 %).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 300 K): δ (ppm)= 6.64 (d, ^{3}J= 7.8 Hz, 4H); 8.04 (d, ^{3}J= 7.8 Hz, 4H); 8.79 (s, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO, 300 K): δ (ppm)= 114.5, 115.5, 118.2, 133.6, 139.9, 141.2, 177.1.

MS ESI: m/z= 312.91 $[M-H]^-$ (calcd for $C_{18}H_9N_4O_2^+$: 313.07).

*[2,9,10,16,17,23,24-octakis(3-carboxyphenoxy)phthalocyaninato]zinc(II) (**69**):*



$C_{88}H_{48}N_8O_{24}Zn$

Exact mass: 1664.21 g.mol^{-1}

Molecular weight:

1666.74 g.mol^{-1}

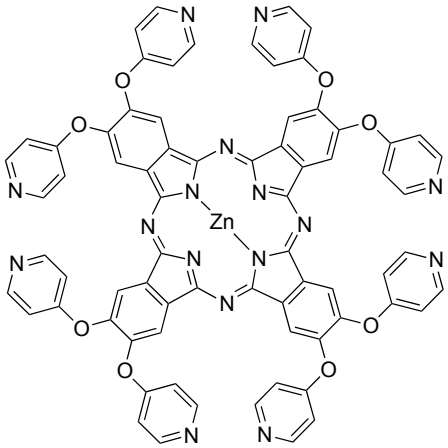
4,5-disubstitued phthalonitrile **67** (500 mg, 1.25 mmol) and zinc acetate dihydrate (68 mg, 0.31 mmol) were suspended in pentanol (10 mL), then DBU (190 mg, 1.25 mmol) was added to the mixture, which was heated under reflux for 15 h. The reaction mixture was diluted with MeOH and filtered off. The blue-green powder obtained was washed with MeOH (3 ×3 0 mL), 1 M hydrochloric acid (3 × 30 mL), water (3 × 50 mL), MeOH (30 mL), several times with DCM, and dried under reduced pressure (216 mg, 42 %).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 300 K): δ (ppm)= 7.26 (m, 8H); 7.47 (m, 16H); 7.71 (m, 16H).

MS MALDI-TOF: m/z= 1666.28 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{88}H_{49}N_8O_{24}Zn^+$: 1665.22), 1703.37 $[M+K]^+$ (calcd for $C_{88}H_{48}KN_8O_{24}Zn^+$: 1703.17).

UV-Vis (NaOH 0.1 M): λ_{max} (nm) (ε × 10^3 L.mol^{-1}.cm^{-1})= 347 (12.9), 634 (111.0).

*[2,9,10,16,17,23,24-octakis(pyridin-4-yloxy)phthalocyaninato]zinc(II) (**70**):*



$C_{72}H_{40}N_{16}O_8Zn$

Exact mass: 1320.25 g.mol^{-1}

Molecular weight: 1322.57 g.mol^{-1}

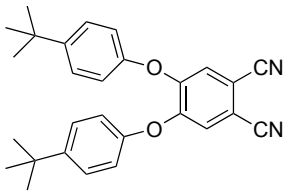
A mixture of 4,5-bis(pyridin-4-yloxy)phthalonitrile **68** (3 g, 9.55 mmol), zinc acetate (0.53 g, 2.39 mmol) and DBU (1.45 g, 9.55 mmol) in pentanol (10 mL) was heated under reflux for 15 h. After cooling to room temperature, the blue suspension was added to 100 mL of cyclohexane. The precipitate was filtered off, washed several times with pentane and with DCM (3 × 100 mL). After drying, the resulting solid was dissolved in a CH_3CN/H_2O mixture (1:1) and subject to reverse phase silica gel flash column chromatography (C18, eluent: CH_3CN - 0.1% HCOOH / H_2O - 0.1% HCOOH, gradient from 10:90 to 50:50 v/v in 30 min, Tr= 18.5 min) to yield the desired product (609 mg, 19%).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d$_6$, 300 K): δ (ppm)= 6.38 (d, ^{3}J= 7.3 Hz, 16H); 7.66 (d, ^{3}J= 7.3 Hz, 16H), 8.18 (s, 8H).

HPLC (method A): Rt (min)= 2.10 (95.6 % at 254 nm; 98.3 % at 670 nm).

UV-Vis (DMF): λ_{max} (nm) (ε × 10^3 L.mol^{-1}.cm^{-1})= 387 (93.5), 618 (46.9), 686 (304.2).

*4,5-bis(4-tert-butylphenoxy)phthalonitrile (**71**):*



$C_{28}H_{28}N_2O_2$

Exact mass: 424.22 g.mol^{-1}

Molecular weight: 424.53 g.mol^{-1}

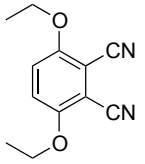
A mixture of 4,5-dichlorophthalonitrile (1 g, 5.07 mmol), 4-tert-butylphenol (1.52 g, 10.15 mmol) and potassium carbonate (2.8 g, 20.3 mmol) in 10 mL of DMF was stirred at 80°C for 15 h. The reaction mixture was cooled to room temperature and dropped in 200 mL of water. The resultant precipitate was filtered off, washed with water (3×50 mL) and dried under reduced pressure. Purification on silica gel column chromatography (eluent: DCM) yield the desired product (1.8 g, 84 %)

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 300 K): δ (ppm)= 1.27 (s, 18H); 7.03 (d, ^{3}J= 8.8 Hz, 4H); 7.43 (d, ^{3}J= 8.8 Hz, 4H); 7.70 (s, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6, 300 K): δ (ppm)= 31.1, 34.1, 110.4, 115.3, 118.2, 124.4, 126.9, 147.3, 151.2; 152.5.

*3,6-diethoxyphthalonitrile (**72**):*

$C_{12}H_{12}N_2O_2$
Exact mass: 216.09 g.mol^{-1}
Molecular weight: 216.24 g.mol^{-1}



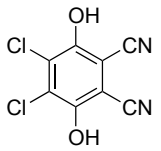
To a mixture of 3,6-dihydroxyphthalonitrile (1 g, 6.25 mmol) and potassium carbonate (3.45 g, 25 mmol) in 10 mL of DMF was added ethyl iodide (1 mL, 12.5 mmol) and the mixture was heated at 60°C for 15 h. Upon cooling to room temperature, the mixture was put in 100 mL of water and the precipitate was filtered off, washed three times with 30 mL of water and dried under reduced pressure to afford 3,6-diethoxyphthalonitrile **72** (1.11 g, 82 %).

^{1}H NMR (300 MHz, acetone-d_6, 300 K): δ (ppm)= 1.35 (t, ^{3}J= 6.9 Hz, 6H); 4.21 (q, ^{3}J= 6.9 Hz, 4H); 7.59 (s, 2H).

MS ESI: m/z= 238.93 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{12}H_{12}N_2O_2Na^+$: 239.08).

*3,6-dihydroxy-4,5-dichlorophthalonitrile (**73**):*

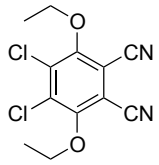
$C_8H_2Cl_2N_2O_2$
Exact mass: 227.95 g.mol^{-1}
Molecular weight: 229.02 g.mol^{-1}



To a solution of DDQ (5 g, 22 mmol) in toluene (25 mL) was added sodium dithionite (5.75 g, 33 mmol) and water (100 mL). The reaction was vigourously stirred for 20 min. After addition of 100 mL of water, the suspension was filtered off and the solid was washed three times with water (3×50 mL) and dried. The product was dissolved in 100 mL of acetone, then crystallized upon addition of 100 mL of water and slow evaporation of acetone at room temperature. The yellow crystals were filtered off and dried under reduced pressure to afford 3,6-dihydroxy-4,5-dichlorophthalonitrile **73** (4.17 g, 83 %).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 101.6, 113.7, 129.2, 150.8.

*3,6-diethoxy-4,5-dichlorophthalonitrile (**74**):*



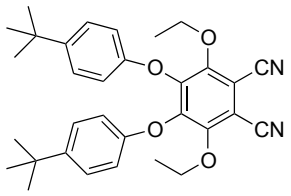
$C_{12}H_{10}Cl_2N_2O_2$
Exact mass: 284.01 g.mol^{-1}
Molecular weight: 285.13 g.mol^{-1}

To a solution of potassium hydroxyde (3.84 g, 68.4 mmol) in water (36 mL) was added 3,6-dihydroxy-4,5-dichlorophthalonitrile (6 g, 26.22 mmol), tetra-n-butylammonium bromide (1.69 g, 5.24 mmol) and finally ethyl iodide (5.24 mL, 65.55 mmol). The reaction was heated under reflux for 15 h. Upon cooling to room temperature, the vigourous stiring of the suspension was carried out for additionnal during 5 hours to yield a fine precipitate, which was filtered off and washed with water (3×50 mL). The product was subjected to silica gel column chromatography (eluent: DCM/Heptane gradient from 50:50 to 80:20) (6.55 g, 88 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 1.51 (t, ^{3}J= 7.1 Hz, 6H); 4.30 (q, ^{3}J= 7.1 Hz, 4H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 15.6; 72.6; 109.1, 112.3, 135.6, 155.3.

*3,6-diethoxy-4,5-bis(4-tert-butylphenoxy)phthalonitrile (**75**):*



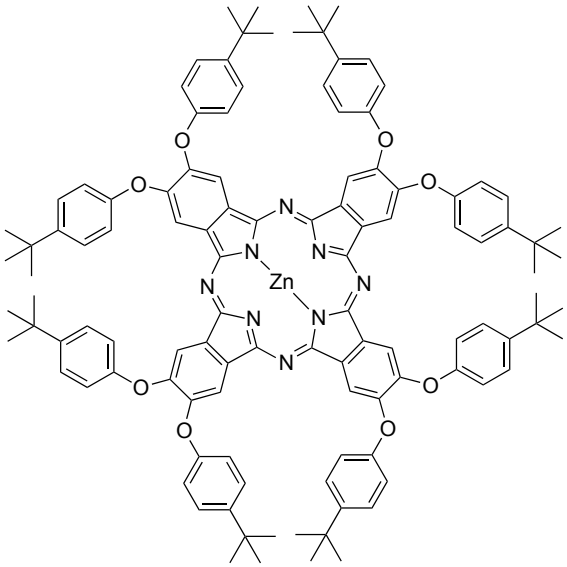
$C_{32}H_{36}N_2O_4$
Exact mass: 512.27 g.mol^{-1}
Molecular weight: 512.64 g.mol^{-1}

A mixture of 3,6-diethoxy-4,5-dichlorophthalonitrile **74** (2 g, 7 mmol), 4-*tert*-butylphenol (2.1 g, 14 mmol) and potassium carbonate (3.9 g, 28 mmol) in 20 mL of DMF was stirred at 80°C for 15 hours. The reaction mixture was cooled to room temperature and 100 mL of water were slowly added under stirring. The resulting precipitate was filtered off, washed with water (3×50 mL) and dried under reduced pressure to afford the pure desired compound (2.96 g, 82 %)

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 300 K): δ (ppm)= 1.15 (t, ^{3}J= 7.1 Hz, 6H); 1.21 (s, 18H); 4.15 (q, ^{3}J= 7.1 Hz, 4H); 6.76 (d, ^{3}J= 8.9 Hz, 4H); 7.23 (d, ^{3}J= 8.9 Hz, 4H)

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6, 300 K): δ (ppm)= 15.1, 31.1, 33.9, 71.1, 105.9, 113.3, 114.8, 126.1, 145.5, 146.4; 152.2, 154.0.

*[2,9,10,16,17,23,24-octakis(4-tert-butylphenoxy)phthalocyaninato]zinc(II) (**76**):*



$C_{112}H_{112}N_8O_8Zn$

Exact mass: 1760.79 g.mol^{-1}

Molecular weight: 1763.52 g.mol^{-1}

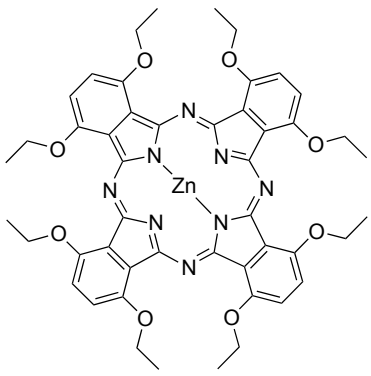
4,5-bis(4-tbutylphenoxy)phthalonitrile (500 mg, 1.18 mmol), zinc acetate dihydrate (64.53 mg, 0.29 mmol) and DBU (179.6 mg, 1.18 mmol) were suspended in 5 mL of pentanol. The mixture was heated under reflux overnight. The solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue was dissolved in DCM (50 mL). The organic layer was washed three times with saturated ammonium chloride (3 × 50 mL) then three times with water (3 × 50 mL) and finaly dried over magnesium sulfate. The product was subjected to silica gel column chromatography (eluent: AcOEt/Heptane, gradient from 50: 50 to 80: 20). After evaporation of the solvent of the blue desired fraction, the residue was taken in methanol, filtered off, washed with methanol an dried to obtained 245 mg of a blue powder (47 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 1.01 (s, 72H); 6.76 (d, ^{4}J= 8.9 Hz, 16H); 6.88 (s, 8H); 7.20 (d, ^{4}J= 8.9 Hz, 16H).

MS MALDI-TOF: m/z= 1761.67 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{112}H_{113}N_8O_8Zn^+$: 1761.80).

UV-Vis (DCM): λ_{max} (nm) (ε × 10^3 L.mol^{-1}.cm^{-1})= 351 (81.7), 615 (44.3), 682 (281.5).

[1,4,8,11,15,18,22,25-octaethoxy)phthalocyaninato]zinc(II) (77):



$C_{48}H_{48}N_8O_8Zn$

Exact mass: 928,29 g.mol^{-1}

Molecular weight: 930,32 g.mol^{-1}

DBU (352 mg, 2.31 mmol) was added to a mixture of 3,6-diethoxyphthalonitrile **72** (500 mg, 2.31 mmol) and zinc acetate dihydrate (127 mg, 0.578 mmol) in 5 mL of pentanol. The mixture was heated under reflux overnight. The solvent was evaporated, and the residus was solubilized in DCM (100 mL). The organic layer (green) was washed with saturated ammonium chloride solution (50 mL) (the organic layer turned to brown), then five times with water (5×50 mL) (the colour returned to green) and dried over magnesium sulfate. The phthalocyanine was subjected to alumina gel column chromatography (eluent: DCM/MeOH, gradient from 100:0 to 94:6). Upon evaporation of the solvent of the green targeted fraction, the product mixed was with pentane, filtered off and washed two times with pentane, and finally dried under reduced pressure (69 mg, 13 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 1.78 (t, ^{3}J= 6.9 Hz, 24H); 4.93 (q, ^{3}J= 6.9 Hz, 16H); 7.51 (s, 8H).

MS MALDI-TOF: m/z= 930.25 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{48}H_{49}N_8O_8Zn^+$: 929.30).

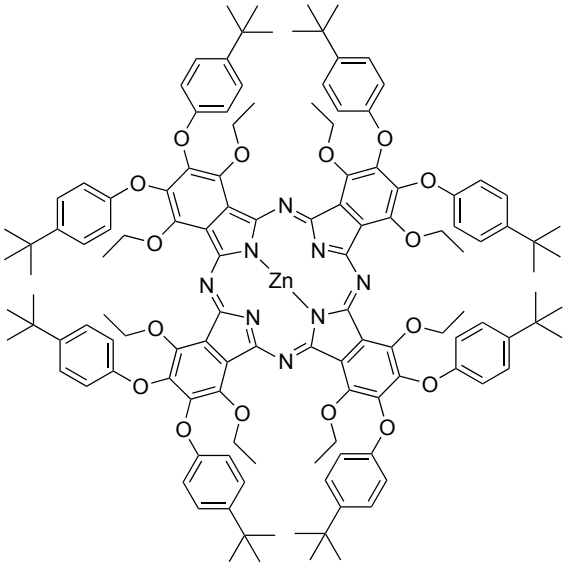
UV-Vis (DMF): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 331 (41.5), 662 (33.1), 738 (159.5).

*[1,4,8,11,15,18,22,25-octaethoxy-2,9,10,16,17,23,24-octakis(4-tert-butylphenoxy)phthalocyaninato]zinc(II) (**78**):*

$C_{128}H_{144}N_8O_{16}Zn$

Exact mass: 2113.00 g.mol^{-1}

Molecular weight: 2115.94 g.mol^{-1}



Tetrasubstitued phthalonitrile **57** (500 mg, 0.98 mmol), zinc acetate dihydrate (54 mg, 0.24 mmol) and DBU (148 mg, 0.98 mmol) were solubilized in 5 mL of pentanol. The mixture was heated under reflux overnight. The solvant was evaporated under reduced pressure, and the residue was resuspended in DCM (50 mL). The organic layer was washed three times with saturated ammonium chloride (3×50 mL) then three times with water (3×50 mL) and finally dried over magnesium sulfate. The product was subjected to silica gel column chromatography (eluent: AcOEt/Heptane, gradient from 50:50 to 80:20). After evaporation of the solvents of the green targeted fraction, the residue was mixed with methanol, filtered off, washed with methanol and dried to obtained compound **78** as a green solid (321 mg, 62 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 1.29 (s, 72H); 1.33 (t, ^{4}J= 7.2 Hz, 16H); 4.96 (q, ^{4}J= 7.2 Hz, 16H); 6.99 (d, ^{4}J= 8.9 Hz, 16H); 7.25 (d, ^{4}J= 8.9 Hz, 16H).

MS MALDI-TOF: m/z= 2114.70 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{128}H1_{45}N_8O_{16}Zn^+$: 2114.01).

UV-Vis (THF): λ_{max} (nm) (10^3 ε)= 369 (64.4), 656 (53.6), 731 (278.3).

*6-chloro-2'-methoxy-[1,1'-biphenyl]-3,4-dicarbonitrile (**79**) and 2,2''-dimethoxy-[1,1':2',1''-terphenyl]-4',5'-dicarbonitrile (**80**):*

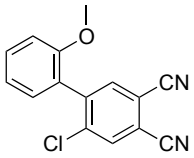
$C_{15}H_9ClN_2O$

Exact mass:

268.04 g.mol^{-1}

Molecular weight:

268.70 g.mol^{-1}



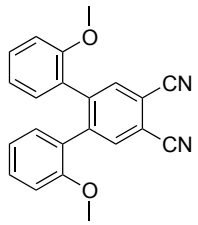
$C_{22}H_{16}N_2O_2$

Exact mass:

340.12 g.mol^{-1}

Molecular weight:

340.37 g.mol^{-1}



A three-necked round bottom flask was charged with 4,5-dichloro-1,2-dicyanobenzene (1 g, 5.1 mmol), 2-methoxyphenyl boronic acid (3.1 g, 20.3 mmol) and sodium bromide (1.1 g, 10.2 mmol). Under nitrogen atmosphere, 70 mL of THF then 10 mL of an aqueous solution of potassium carbonate (2.81 g, 20.3 mmol) were added. The mixture was heated under reflux and bis(triphenylphosphine)palladium dichloride (0.07 mg, 0.1 mmol) was added. After additionnal 15 h under reflux, the reaction mixture was diluted with water (100 mL), extracted with DCM (3×100 mL) and the organic layers were washed with water (3×50 mL) and dried with magnesium sulfate. After evaporation, the residue was subjected to silica gel column chromatography (eluent: DCM/Hept, gradient from 70:30 to 90:10). The first fraction collected correspond to the the product of **81** (0.81 mg), and the second one to the desired product **82** (0.57 mg, 33 %).

Compound 79:

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 3.79 (s, 3H); 7.02 (m, 2H); 7.14 (dd, ^{3}J= 7.4 Hz, ^{4}J= 1.9 Hz, 1H); 7.44 (t, ^{3}J= 7.9 Hz, 1H); 7.72 (s, 1H); 7.85 (s, 1H).

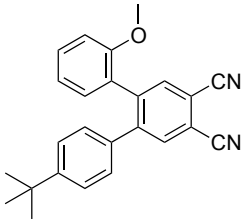
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 55.7, 111.3, 113.9, 114.6, 115.0, 115.4, 120.9, 124.7, 130.3, 131.4, 134.4, 136.8, 140.1, 144.1, 156.3.

Coumpound 80:

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 3.53 (s, 6H); 6.76 (d, ^{3}J= 8.2 Hz, 2H); 6.83 (t, ^{3}J= 7.5 Hz, 2H); 6.95 (d, ^{3}J= 7.6 Hz, 2H); 7.23 (d, ^{3}J= 8.1 Hz, 2H); 7.81 (s, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 55.0, 110.6, 113.7, 115.8, 120.3, 127.0, 130.0, 130.5, 136.0, 144.2, 155.7.

*4''-(tert-butyl)-2-methoxy-[1,1':2',1''-terphenyl]-4',5'-dicarbonitrile (**81**):*

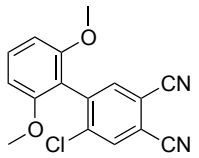


$C_{25}H_{22}N_2O$
Exact mass: 366.17 g.mol^{-1}
Molecular weight: 366.45 g.mol^{-1}

To a solution of phthalonitrile **79** (400 mg, 1.49 mmol), 4-*tert*butylphenyl boronic acid (531 mg, 2.98 mmol) and sodium bromide (247 mg, 1.49 mmol) in THF (10 mL) was added potassium carbonate (412 mg, 2.98 mmol) and water (1.5 mL) under nitrogen atmosphere. The mixture was heated under reflux and tetrakis(triphenylphosphine)palladium (170 mg, 0.15 mmol) was added. After 72 h under reflux, the reaction mixture was diluted with water (50 mL), extracted with DCM (2×50 mL) and the organic layers were washed with water (3×30 mL) and dried with magnesium sulfate. After evaporation, the residue was subjected to silica gel column chromatography (eluent: DCM/Hept 70:30) to yield the targeted product (473 mg, 87 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 1.33 (s, 9H); 3.41 (s, 3H); 6.82 (d, ^{3}J= 8.4 Hz, 1H); 7.05 (m, 3H); 7.13 (d, ^{3}J= 7.5 Hz, 1H); 7.31 (d, ^{3}J= 8.2 Hz, 2H); 7.38 (t, ^{3}J= 7.5 Hz, 2H); 7.83 (s, 1H); 7.87 (s, 1H).

*6-chloro-2',6'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-3,4-dicarbonitrile (**82**):*



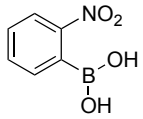
$C_{16}H_{11}N_2O_2$
Exact mass: 298.05 g.mol^{-1}
Molecular weight: 298.72 g.mol^{-1}

In a three-necked round bottom flask was put 4,5-dichlorophthalonitrile (1 g, 5.08 mmol), 2-nitrophenyl boronic acid **83** (3.09 g, 17 mmol) and sodium bromide (1.10 g, 10.2 mmol). Then 10 mL THF were added under nitrogen atmosphere, followed by potassium carbonate (2.81 g, 20.3 mmol) dissolved in 1 mL of water. The mixture was heated under reflux and 116 mg of tetrakis(triphenylphosphine)palladium (0.1 mmol) were finally added. The reaction was heated under reflux for 18 h. After cooling to room temperature, the mixture was diluted with water (60 mL) and extracted with DCM (3×60 mL). The organic layers were washed with water (3×40 mL) and dried with magnesium sulfate. After evaporation, the residue was subjected to silica gel column chromatography (eluent: DCM/Heptane, gradient from 50:50 to 100:0) to afford compound **82** (400 mg, 26 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 3.75 (s, 6H); 6.66 (d, ^{3}J= 8.4 Hz, 2H); 7.41 (t, ^{3}J= 8.4 Hz, 1H); 7.68 (s, 1H); 7.87 (s, 1H).

*2-nitrophenylboronic acid (**83**):*

$C_6H_6BNO_4$
Exact mass: 167.04 g.mol^{-1}
Molecular weight: 166.93 g.mol^{-1}



Method A (sarting from 4,4,5,5-tetramethyl-2-(2-nitrophenyl)-1,3,2-dioxaborolane):
To a solution of 4,4,5,5-tetramethyl-2-(2-nitrophenyl)-1,3,2-dioxaborolane **85** (0.78 g, 3.13 mmol) in THF (25 mL) was added a solution of sodium periodate (2 g, 9.39 mmol) in water (5 mL). The mixture was stirred at room temperature during 4h, then 2 mL of 1 M HCl was added. The product was extracted with ethyl acetate (3×50 mL), then the combined organic layers were washed with water (3×50 mL), dried over magnesium sulfate, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was suspend in 10 mL of pentane and the precipitate was filtered off and washed three times with pentane (3×20 mL) to afford the boronic acid **83** as a white-yellow powder (350 mg, 67%).

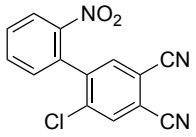
Method B (sarting from 2-nitrochlorobenzene):
A mixture of bis(dibenzylideneacetone)palladium (310.5 mg, 0.54 mmol) and tricyclohexylphosphine (362 mg, 1.29 mmol) in freshly distilled dioxane (30 mL) was stirred at room temperature under nitrogen atmosphere for 30 min. Then bis(pinacolato)diboron (5 g, 19.69 mmol), dry potassium acetate (2.63 g, 4.75 mmol) and 2-nitrochlorobenzene (2.82 mg, 17.9 mmol) were successivelly added, and the reaction mixture was heated at 80°C for 72 h. After addition of 200 mL of toluene, the mixture was filtered off on clarcel®. Then the organic layer was washed with water (2×100 mL), brine (100 mL) and dried over magnesium sulfate. After concentration under vacuum, the resulting mixture was resuspended in THF (80 mL), then a solution of sodium periodate (11.5 g, 5.7 mmol) in water (20 mL) was added. The mixture was stirred at room temperature for 4 h, then 13 mL of 1 M HCl was added. The product was then extracted with ethyl acetate (3×200 mL), and the combined organic layers were washed with water (3×150 mL), dried over magnesium sulfate, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was suspend in 20 mL of pentane and the precipitate was filtered off and washed three times with pentane (3×30 mL) to afford the boronic acid **83** as a white-yellow powder (1 g, 33%).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 7.55 (m, 2H); 7.60 (t, ^{3}J= 7.3 Hz, 1H); 8.15 (d, ^{3}J= 8.3 Hz, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO, 300 K): δ (ppm)= 122.5, 129.1, 132.3, 134.1, 149.9.

MS ESI: m/z= 415.24 $[M-H]^-$ (calcd for $C_{24}H_{35}N_2S_2^-$: 415.22).

*6-chloro-2'-nitro-[1,1'-biphenyl]-3,4-dicarbonitrile (**84**):*

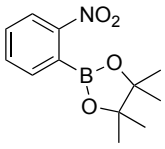


$C_{14}H_6ClN_3O_2$
Exact mass: 283.01 g.mol^{-1}
Molecular weight: 283.67 g.mol^{-1}

In a three-necked round bottom flask were placed 4,5-dichlorophthalonitrile (500 mg, 2.55 mmol), 2-nitrophenyl boronic acid **83** (851 mg, 20.3 mmol) and tetrakis(triphenylphosphine)palladium (271 mg, 0.1 mmol). Under nitrogen atmosphere, 6 mL of dioxane followed by 1 mL of aqueous solution of potassium phosphate tribasic (650 mg, 3.06 mmol) were added. The mixture was heated under reflux for 15 h. After cooling to room temperature, the reaction was diluted with water (50 mL), extracted with DCM (3×50 mL) and the organic layers were washed with water (3×30 mL) and dried over magnesium sulfate. After evaporation, the residue was subjected to silica gel column chromatography (eluent: DCM/Hept, gradient from 60: 40 to 100:0) to yield the biphenyl derivative **84** (35 mg, 21 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 7.32 (dd, ^{3}J= 7.5 Hz,^{4}J= 1.5 Hz, 1H); 7.73 (s, 1H); 7.74 (td, ^{3}J= 7.9 Hz,^{4}J= 1.5 Hz, 1H); 7.81 (td, ^{3}J= 7.5 Hz,^{4}J= 1.5 Hz, 1H); 7.91 (s, 1H); 8.29 (dd, ^{3}J= 8.1 Hz,^{4}J= 1.4 Hz, 1H).

*4,4,5,5-tetramethyl-2-(2-nitrophenyl)-1,3,2-dioxaborolane (**85**):*



$C_{12}H_{61}BNO_4$
Exact mass: 249.12 g.mol^{-1}
Molecular weight: 249.17 g.mol^{-1}

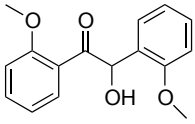
A mixture of bis(dibenzylideneacetone)palladium (109.3 mg, 0.19 mmol) and tricyclohexylphosphine (28.1 mg, 0.1 mmol) in freshly distilled dioxane (20 mL) was stirred at room temperature under nitrogen atmosphere for 30 min. Then bis(pinacolato)diboron (1.77 g, 6.98 mmol), dry potassium acetate (933 mg, 9.51 mmol) and 2-nitrochlorobenzene (100 mg, 6.34 mmol) were successivelly added, and the reaction mixture was heated at 80°C for 72 h. After addition of 20 mL of water, the product was extracted with toluene (3×50 mL), and the combined organic layers were washed with water (2×100 mL), brine (50 mL) and dried over magnesium sulfate. The product

was purified three consecutive times by distillation using a Kugelrohr appartus (200°C, 15 mBar) (942 mg, 59 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 1.43 (s, 12H); 7.54 (m, 2H); 7.66 (t, ^{3}J= 7.3 Hz, 1H); 8.16 (d, ^{3}J= 8.3 Hz, 1H).

*2-hydroxy-1,2-bis(2-methoxyphenyl)ethanone (**86**):*

$C_{16}H_{16}O_4$
Exact mass: 272.10 g.mol^{-1}
Molecular weight: 272.30 g.mol^{-1}



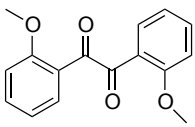
To a solution of 2-methoxybenzaldehyde (2 g, 14.69 mmol) in 5 mL of ethanol was added potassium cyanide (0.1 g, 1.54 mmol) in 1 mL of water. The reaction mixture was heated to reflux for 72 h. After cooling to room temperature, 50 mL of water was added and the product was extracted three times with DCM (3×50 mL). The organic layers were washed with water (5×50 mL) and dried with magnesium sulfate. The residual product obtained after evaporation of the solvent was subjected to silica gel column chromatography (eluent: DCM/hept, gradient from 70:30 to 100:0, then DCM/MeOH 99:1). The first fraction collected corresponds to the oxidation product (1,2-bis(2-methoxyphenyl)ethane-1,2-dione **87**) (DCM pur) (317 mg, 16 %) then the desired compound **86** was eluted (DCM/MeOH 99:1) (854 mg, 43 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 3.71 (s, 3H); 3.72 (s, 3H); 4.46 (s, 0.5H); 4.48 (s, 0.5H); 6.09 (s, 0.5H); 6.11 (s, 0.5H); 6.76 (m, 2H); 6.83 (t, ^{3}J= 7.4 Hz, 1H); 6.92 (t, ^{3}J= 7.5 Hz, 1H); 7.17 (m, 2H); 7.36 (t, ^{3}J= 7.9 Hz, 1H); 7.68 (d, ^{3}J= 7.7 Hz, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 55.1, 55.2, 75.8, 110.9, 111.2, 120.4, 120.5, 125.2;, 127.5, 129.5, 129.9, 130.5, 133.8, 157.2, 158.1, 201.6.

*1,2-bis(2-methoxyphenyl)ethane-1,2-dione (**87**):*

$C_{16}H_{14}O_4$
Exact mass: 270.09 g.mol^{-1}
Molecular weight: 270.28 g.mol^{-1}



A mixture of 2-hydroxy-1,2-bis(2-methoxyphenyl)ethanone **86** (750 mg, 2.75 mmol), ammonium nitrate (275 mg, 3.44 mmol) and copper acetate (5.5 mg, 0.028 mmol) in 20 mL acetic acid/water mixture (80:20 v/v) was heated under reflux for 4 h. The reaction mixture was evaporated to dryness, then the resulting oil was taken in ethyl acetate (50 mL). The organic layer was washed

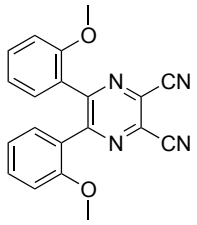
with water (3×50 mL) and dried over magnesium sulfate. The product was then subjected to silica gel column chromatography (eluent: DCM/hept, gradient from 70:30 to 100:0, then DCM/MeOH 99:1) to yield compound **87** as a white powder (386 mg, 52 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 3.58 (s, 6H); 6.95 (d, ^{3}J= 8.3 Hz, 2H); 7.11 (t, ^{3}J= 7.5 Hz, 2H); 7.56 (t, ^{3}J= 7.9 Hz, 2H); 8.08 (d, ^{3}J= 7.7 Hz, ^{4}J= 1.7, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 55.9, 112.5, 121.3, 123.4, 130.4, 135.6, 160.4, 192.5.

*5,6-bis(2-methoxyphenyl)pyrazine-2,3-dicarbonitrile (**88**):*

$C_{20}H_{14}N_4O_2$
Exact mass: 342.11 g.mol^{-1}
Molecular weight: 342.35 g.mol^{-1}



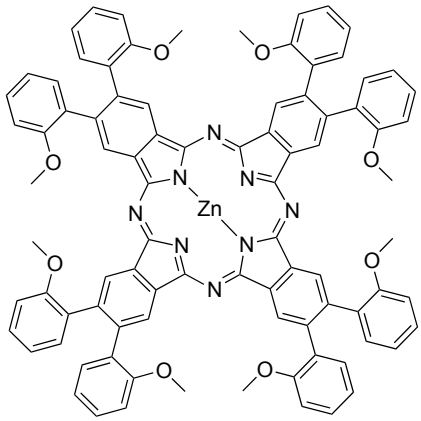
A supension of 1,2-bis(2-methoxyphenyl)ethane-1,2-dione **87** (1.6 g, 5.92 mmol) and diaminomaleonitrile (0.83 g, 7.7 mmol) in acetic acid (45 mL) was heated under reflux for 60 h. The reaction mixture was evaporated under reduced pressure and the residue was taken in 100 mL of ethyl acetate. The organic layer was washed with saturated solution of sodium bicarbonate (100 mL), water (3×100 mL), and dried over magnesium sulfate. The product was subjectd to silica gel column chromatography (eluent: DCM/Hept, gradient from 80:20 to 100:0) 0.(96 mg, 47 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 3.31 (s, 6H); 6.69 (d, ^{3}J= 8.3 Hz, 2H); 7.06 (t, ^{3}J= 7.5 Hz, 2H); 7.35 (t, ^{3}J= 7.9 Hz, 2H); 7.50 (d, ^{3}J= 7.7 Hz, ^{4}J= 1.7, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 54.9; 110.9; 113.6; 120.9; 126.0; 130.4; 131.5; 132.0; 156.1; 156.7.

*[2,9,10,16,17,23,24-octakis(2-methoxyphenyl)phthalocyaninato]zinc(II) (**89**):*

$C_{88}H_{64}N_8O_8Zn$
Exact mass: 1424.41 g.mol^{-1}
Molecular weight: 1426.88 g.mol^{-1}



6-chloro-2'-methoxy-[1,1'-biphenyl]-3,4-dicarbonitrile **57** (200 mg, 0.59 mmol) and zinc acetate (32 mg, 0.15 mmol) were put in 5 mL of pentanol. After addition of 90 mg of DBU (0.59 mmol), the

mixture was heated at 130°C for 15 h. The reaction mixture was cooled to room temperature and 20 mL of methanol were added. The precipitate was filtered off and solubilized in 30 mL of DCM. The organic layer was washed with saturated ammonium chloride (50 mL), water (3×50 mL) and dried over magnesium sulfate. After evaporation of the solvant under reduced pressure, the residue was subject to silica gel column chromatography (eluent: DCM/MeOH, gradient from 100:0 to 98:2). The blue-green fraction collected was concentred under vacuum, and the resulting solid was dried under reduced pressure to afford the desired phthalocyanine (57 mg, 27 %).

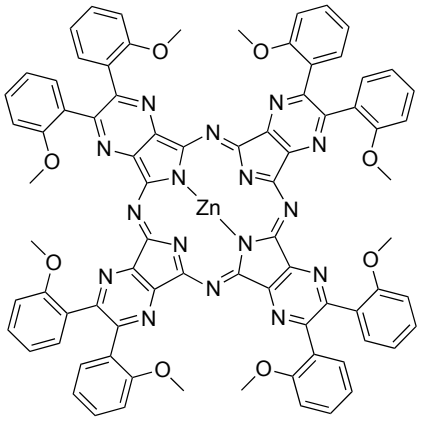
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 3.45 (s, 24H); 6.66 (d, ^{4}J= 7.9 Hz, 8H); 6.75 (t, ^{4}J= 7.5 Hz, 8H); 6.94 (d, ^{4}J= 7.5 Hz, 8H); 7.12 (t, ^{4}J= 7.8 Hz, 8H); 7.81 (s, 8H).

MS MALDI-TOF: m/z= 1424.39 $[M+H]^{+\bullet}$ (calcd for $C_{88}H_{64}N_8O_8Zn^{+\bullet}$: 1424.41).

UV-Vis (THF): λ_{max} (nm) (ε ×10^3 L.mol^{-1}.cm^{-1})= 306 (89.4), 619 (46.3), 687 (280.2).

*[2,9,10,16,17,23,24-octakis(2-methoxyphenyl)azaphthalocyaninato]zinc(II) (**90**):*

$C_{80}H_{56}N_{16}O_8Zn$
Exact mass: 1432.38 g.mol^{-1}
Molecular weight: 1434.78 g.mol^{-1}



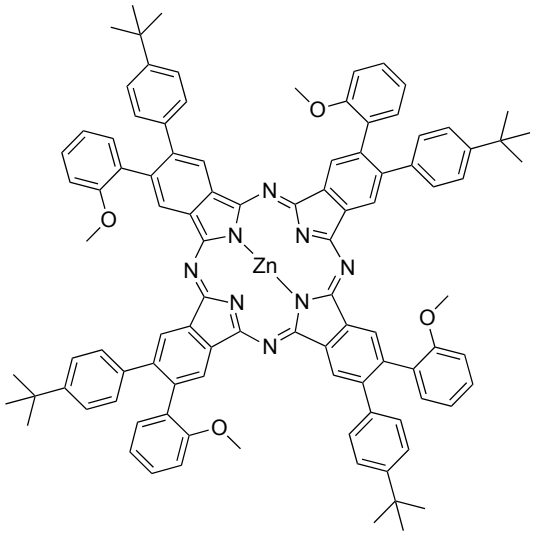
5,6-bis(2-methoxyphenyl)pyrazine-2,3-dicarbonitrile **90** (200 mg, 0.58 mmol) and zinc acetate (32 mg, 0.15 mmol) were suspended in 5 mL of pentanol. After addition of 89 mg of DBU (0.58 mmol), the mixture was heated at 130°C for 15 h. The reaction was cooled to room temperature and 20 mL of methanol were added. The precipitate was filtered off and solubilized in 30 mL of DCM. The organic layer was washed with saturated ammonium chloride (50 mL), water (3×50 mL) and dried over magnesium sulfate. After evaporation of the solvant under reduced pressure, the residue was subjected to silica gel column chromatography (eluent: DCM/MeOH, gradient from 100:0 to 97:3). The blue-green fraction collected was concentred under vacuum, and the resulting solid was dried under reduced pressure to afford the desired azaphthalocyanine (45 mg, 21 %).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, 300 K): δ (ppm)= 3.51 (s, 24H); 7.01 (d, ^{3}J= 8.0 Hz, 8H); 7.18 (m, 8H); 7.47 (t, ^{3}J= 8.0 Hz, 8H); 7.86 (m, 8H).

MS MALDI-TOF: m/z= 1433.51 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{80}H_{57}N_{16}O_8Zn^+$: 1433.39), 1470.99 $[M+K]^+$ (calcd for $C_{80}H_{56}N_{16}O_8KZn^+$: 1471.34).

UV-Vis (THF): λ_{max} (nm) (ε ×10^3 L.mol^{-1}.cm^{-1})= 364 (108.4), 582 (32.2), 641 (259.9).

*[2(3),9(10),16(17),23(24)-tetra(o-methoxyphenyl)-3(2),10(9),17(16),24(23)-tetra(p-tertbutylphenyl)phthalocyaninato]zinc(II) (**91**):*



$C_{100}H_{88}N_8O_4Zn$

Exact mass: 1528.62 g.mol^{-1}

Molecular weight: 1531.20 g.mol^{-1}

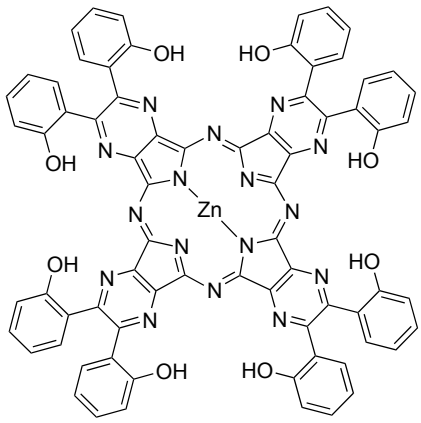
Phthalonitrile **90** (400 mg, 1.09 mmol) and zinc acetate (60 mg, 0.27 mmol) were put in 10 mL of pentanol. After addition of 166 mg of DBU (1.09 mmol), the mixture was heated at 130°C for 15 h. The reaction was cooled to room temperature and 20 mL of methanol were added. The precipitate was filtered off and solubilized in 30 mL of DCM. The organic layer was washed with saturated ammonium chloride (50 mL), water (3×50 mL) and dried over magnesium sulfate. After evaporation of the solvant under reduced pressure, the residue was subjected to silica gel column chromatography (eluent: DCM/MeOH, gradient from 100:0 to 98:2). The blue-green fraction collected was concentred under vacuum, and the resulting solid was dried under reduced pressure to afford the desired phthalocyanine (129 mg, 31 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 1,36 (s, 36H); 3.48 (s, 12H); 6.86 (m, 4H); 7.09 (m, 4H); 7.25 (m, 4H); 7.41 (m, 4H); 7.50 (m, 8H); 7.61 (m, 8H); 9.29-9.50 (m, 8H).

MS MALDI-TOF: m/z= 1529.15 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{100}H_{89}N_8O_4Zn^+$: 1529.63).

UV-Vis (THF): λ_{max} (nm) (ε ×10^3 L.mol^{-1}.cm^{-1})= 362 (109.1), 622 (52.7), 690 (344.0).

*[2,9,10,16,17,23,24-octakis(2-hydroxyphenyl)azaphthalocyaninato]zinc(II) (**92**):*



$C_{72}H_{40}N_{16}O_8Zn$

Exact mass: 1320.25 g.mol^{-1}

Molecular weight: 1322.57 g.mol^{-1}

In a two necked round bottom flask was put 20 mg of azaphthalocyanine **90** (0.014 mmol). Then, 2 mL of freshly distilled DCM was added under nitrogen atmosphere. The reaction mixture was cooled down to -15°C and molar stock solution of boron tribromide in DCM (446 µL, 0.446 mmol) was added to the reaction. The mixture was slowly warm up to room temperature and stirred for 8 h. After addition of 10 mL of DCM, the solid was filtered off, whashed with DCM (3×20 mL), resuspend in 1 % $NaHCO_3$ aqueous solution. The suspension was stirred, and upon filtration, the solid was whashed with water (3×20 mL) and dried under reduced pressure (15 mg, 81 %)

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d$_6$, 300 K): δ (ppm)= 6.75 (m, 4H); 6.91 (m, 4H); 7.30 (m, 4H); 7.70 (m, 4H); 9.49 (s broad, 4H).

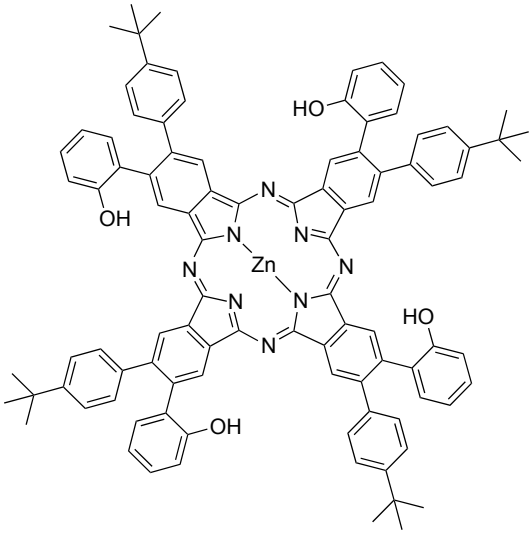
MS MALDI-TOF: m/z= 1343.19 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{72}H_{40}N_{16}O_8NaZn^+$: 1343.24), 1367.18 [$M-H+2Na]^+$ (calcd for $C_{72}H_{39}N_{16}O_8Na_2Zn^+$: 1365.22).

*3-hydroxyphthalonitrile (**93**):*

$C_{96}H_{80}N_8O_4Zn$

Exact mass: 1472.56 g.mol^{-1}

Molecular weight: 1475.09 g.mol^{-1}



In a two necked round bottom flask was put phthalocyanine **91** (20 mg, 0.014 mmol). Then, 2 mL of freshly distilled DCM was added under nitrogen atmosphere. The reaction mixture was cooled down to -15°C and molar stock solution of boron tribromide in DCM (62 µL, 0.062 mmol) was added to the reaction. The mixture was slowly warm up to room temperature and stirred for 8 h. After addition of 10 mL of DCM, the solid was filtered off, whashed with DCM (3×20 mL), resuspend in 1 % $NaHCO_3$ aqueous solution. The suspension was stirred, and upon filtration, the solid was whashed with water (3×20 mL) and dried under reduced pressure (17 mg, 82 %).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d$_6$, 300 K): δ (ppm)= 1,34 (s, 36H); 6.87 (m, 4H); 6.97 (m, 4H); 7.24 (m, 4H); 7.31 (m, 4H); 7.42 (m, 8H); 7.57 (m, 8H); 9.19-9.42 (m, 8H); 9.49 (s broad, 4H).

MS MALDI-TOF: m/z= 1472.49 $[M+Na]^{+\bullet}$ (calcd for $C_{96}H_{80}N_8O_4Zn^{+\bullet}$: 1472.56).

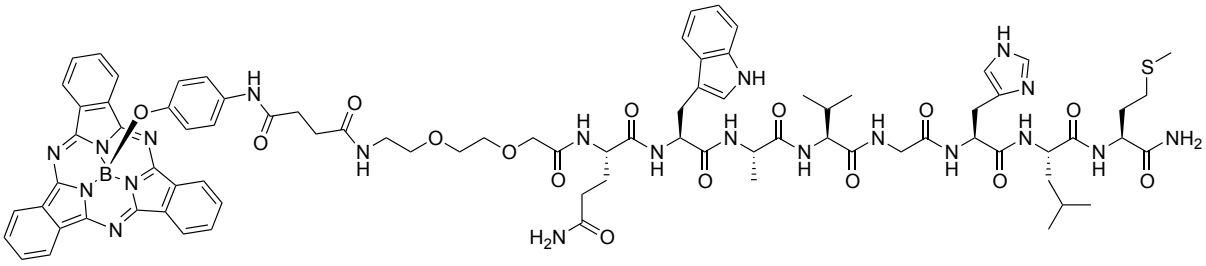
C.5. Chapter 3.1: Sub

*SubPc-spacer-BBN-7-14 (**94**) (peptide coupling method):*

$C_{84}H_{96}BN_{21}O_{15}S$

Exact mass: 1669.72 g.mol^{-1}

Molecular weight: 1670.66 g.mol^{-1}



Rink Amide AM resin grafted (N-(2-(2-(2-(N-fmoc)aminoethoxy)ethoxy))acetyl-(His(N-MTT)-Trp(N-BOC)-Gln(N-Tr))bombesin(7-14)) (66.4 mg, 0.25 mmol/g, 16.6 µmol) was dissolved in 1 mL of DMF and stirred at room temperature for 30 min, then filtered off and washed with DMF (2 mL). The solid was resuspended in 20% piperidine in DMF (1 mL) for 10 min (twice) to deprotect the amino group, then washed with DMF (2×2 mL), DCM (2×2 mL), MeOH (2 mL), DCM (1 mL) and DMF (1 mL). Then SubPc-COOH **14** (15 mg, 12.5 µmol), HATU (9.47 mg, 24.9 µmol) and DIPEA (4.33 µL, 24.9 µmol) were added and the solution was made up with DMF to obtain a total volume of 1 mL. The reaction mixture was stirred at room temperature for 90 min, then the solid was washed with DMF (2×2 mL), DCM (2×2 mL), MeOH (2 mL), DCM (1 mL) and DMF (1 mL). The peptide was cleaved from the resin with simultaneous removal of the side-chain protecting groups by treatment with 1 mL of TFA/TIPS/water mixture (95/2.5/2.5 v/v) for 90 min at room temperature. The filtrate from the cleavage mixture was concentrated, precipitated in cold Et_2O and collected by centrifugation (twice), and lyophilized to afford crude peptide. The peptide was purified by semi-preparative RP-HPLC (C18, eluent: CH_3CN-0.1% TFA / H_2O-0.1% TFA, gradient from 30:70 to 60:40 v/v in 30 min, Rt= 20.7 min), and pure fractions were collected and lyophilized to give SubPc-BBN-7-14 conjugate **94** as a pink solid (2.5 mg, 9 %).

MS ESI: m/z= 1671.62 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{84}H_{97}BN_{21}O_{15}S^+$: 1670.73), 1692.67 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{84}H_{96}BN_{21}O_{15}SNa^+$: 1692.71).

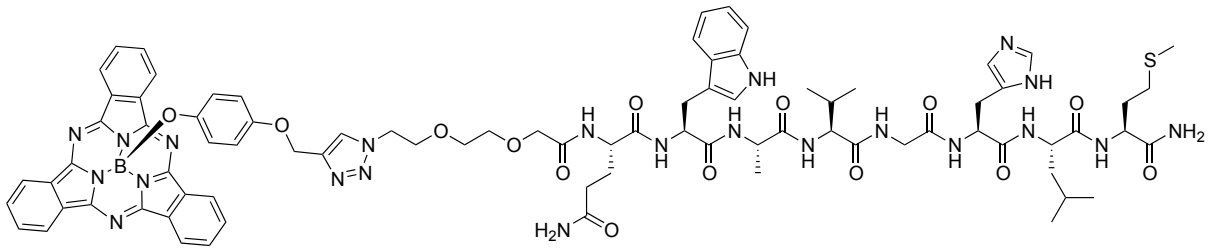
HPLC (method A): Rt (min)= 2.95 (88.2 % at 254 nm; 92.3 % at 565 nm).

*SubPc-spacer-BBN-7-14 (**95**) (click chemistry coupling method):*

$C_{82}H_{93}BN_{22}O_{14}S$

Exact mass: 1652.71g.mol^{-1}

Molecular weight: 1653.63 g.mol^{-1}



(N-(2-(2-(2-(N-azidoethoxy)ethoxy))acetyl-bombesin(7-14)) (15 mg, 12 µmol), SubPc-CCH **16** (6.73 mg, 12 µmol), copper sulfate (3.41 mg, 14 µmol) and sodium ascorbate (7.38, 37 µmol) were mixed together in 100 µL of DMF. The reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min, then the solution was directly purified by semi-preparative RP-HPLC (C18, eluent: CH_3CN-0.1% TFA / H_2O-0.1% TFA, gradient from 35:65 to 65:35 v/v in 40 min, Rt= 27.1 min), and pure fractions were collected and lyophilized to give SubPc-BBN-7-14 conjugate **95** as a pink solid (1.45 mg, 7 %).

MS MALDI-TOF: m/z= 1675.77 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{82}H_{93}BN_{22}O_{14}SNa^+$: 1676.62).

HPLC (method A): Rt (min)= 3.07 (87.90 % at 254 nm; 89.08 % at 565 nm).

General procedure for the preparation of liposome encapsulated subphthalocyanines:

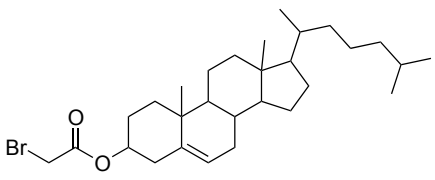
Liposomes were prepared by the injection method using a solution of 1,2-dipalmitoyl-*sn*- glycero-3-phosphocholine (21 mM) in ethanol (solution **A**) and a solution of Subphthalocyanine (0.5 mM) in chloroform. A mixture of 100 µL of SubPc solution and 100 µL of DPPC solution was quickly injected using an Hamilton syringe in 10 mL of buffer solution (PBS, NaCl 0.9 %, citrate,…) under vigourous agition at 60°C. The mixture was kept under agitation during 2 min at 60°C, then cooled down to room temperature and subsequently used for desired applications.

*Cholesteryl bromoacetate (**96**):*

$C_{29}H_{47}BrO_2$

Exact mass: 506.28 g.mol^{-1}

Molecular weight: 507.59 g.mol^{-1}



To a solution of cholesterol (1g, 2.56 mmol) in distilled THF (15 mL) was slowly added bromoacetyl chloride (654 µL, 7.77 mmol) under nitrogen atmosphere. The reaction mixture was heated to reflux for 1.5 h, then concentrated under vacuum. The oil obtained was dissolved in

refluxing ethyl acetate, then left at room temperature for several hours. The crystals formed were filtered off, washed with ethyl acetate and dried under reduced pressure to yield cholesteryl bromoacetate **96** as a white crystalline powder (855 mg, 65 %).

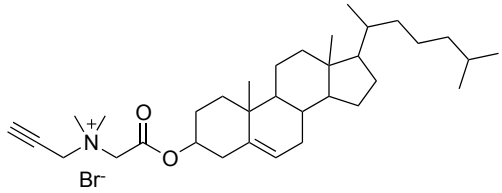
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 0.68 (s, 3H); 0.86-1.70 (m, 34H); 1.75-2.07 (m, 4H); 2.36 (d, ^{3}J= 7.8 Hz, 2H); 3.80 (s, 2H); 4.67 (m, 1H); 5.39 (d, ^{3}J= 4.9 Hz, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 12.0; 18.9; 19.4; 21.2; 22.7; 22.9; 23.0; 24.4; 26.5; 27.7; 28.2; 28.4; 32.0; 32.1; 36.0; 36.3; 36.7; 37.0; 37.9; 39.7; 39.9; 42.5; 50.2; 56.3; 56.8; 76.3; 123.2; 139.3; 166.8.

MS MALDI-TOF: m/z= 506.71 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{29}H_{48}BrO_2^+$: 507,28), 530.27 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{29}H_{47}BrNaO_2^+$: 529,27).

*Cholesteryl (prop-2-ynyl-N,N-dimethylammonium bromide) acetate (**97**):*

$C_{34}H_{56}BrNO_2$
Exact mass: 589.35 g.mol^{-1}
Molecular weight: 590.72 g.mol^{-1}



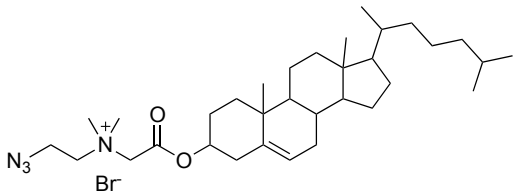
Cholesteryl bromoacetate **96** (250 mg, 0.493 mmol) and dimethylpropargylamine (57 µL, 0.542 mmol) in 10 mL of acetone were stirred under reflux for three hours. The white precipitate observed was filtered off, wased one time with acetone, and dried under reduced pressure to afford the ammonium derivative **97** (227 mg, 78 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 0.68 (s, 3H); 0.86-1.70 (m, 34H); 1.75-2.07 (m, 4H); 2.36 (m, 2H); 2.87 (t, ^{4}J= 2.5 Hz, 1H); 3.72 (s, 6H); 4.71 (m, 1H); 4.98 (s, 2H); 5.08 (s, 2H); 5.40 (d, ^{3}J= 4.9 Hz, 1H).

MS ESI: m/z= 510.37 $[M-Br^-]^+$ (calcd for $C_{34}H_{56}NO_2^+$: 510,43).

*Cholesteryl (2-azidoethyl-N,N-dimethylammonium bromide) acetate (**98**):*

$C_{33}H_{57}BrN_4O_2$
Exact mass: 620.37 g.mol^{-1}
Molecular weight: 621.74 g.mol^{-1}



Cholesteryl bromoacetate (173 mg, 0.34 mmol) and 2-azido-N,N-dimethylethanamine **100** (74 mg, 0.65 mmol) were dissolved in 10 mL of acetone. The mixture was stirred under reflux for three

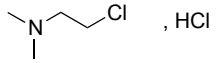
hours. The white precipitate formed was filtered off, whased with acetone (20 mL), and dried under reduced pressure to afford the ammonium derivative **98** (64.3 mg, 78 %).

^{1}H NMR (300 MHz, MeOD, 300 K): δ (ppm)= 0.61 (s, 3H); 0.87-2.11 (m, 40H); 2.41 (m, 2H); 3.35 (s, 6H); 3.83 (m, 2H); 3.97 (m, 2H); 4.73 (m, 1H); 5.40 (d, ^{3}J= 4.9 Hz, 1H).

MS MALDI-TOF: m/z= 540.56 $[M\text{-}Br^-]^+$ (calcd for $C_{33}H_{57}N_4O_2^+$: 541,45).

*2-chloro-N,N-dimethylethanamine hydrochloryde (**99.HCl**):*

$C_4H_{11}Cl_2N$



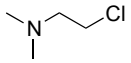
Exact mass: 143.03 g.mol^{-1}

Molecular weight: 144.04 g.mol^{-1}

In a round bottom flask was introduced dimethylaminoethanol (20 mL, 199 mmol), then thionyl chloride (14.5 mL, 200 mmol) was slowly added under stirring and at low temperature (ice bath). After completion of the addition, the visqueous reaction mixture was left at room temperature for 3h, then 100 mL of ethanol were added. The precipitate formed was filtered off, and the filtrate was put in an ice bath for 1h. The crystals of chlorhydrate **99** formed were filtered off and dried under reduced pressure. The filtrate was concentrated under vacuum, and cooled in an ice bath to afford more product (9.3 g, 32 %).

*2-chloro-N,N-dimethylethanamine (**99**):*

$C_4H_{10}ClN$



Exact mass: 107.05 g.mol^{-1}

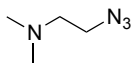
Molecular weight: 107.58 g.mol^{-1}

To a solution of sodium carbonate (3 g, 28.3 mmol) in water (10 mL) was added 2-chloro-N,N-dimethylethanamine hydrochloride (2 g, 13.9), and the mixture was stirred for 10 min. The product was extracted three times with diethyl ether (3 × 10 mL) and the organic layer was dried with magnesium sulfate. After evaporation, the product was obtained as a colorless oil.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 2.33 (s, 6H); 2.69 (t, ^{3}J= 6.7 Hz, 2H); 3.57 (t, ^{3}J= 6.7 Hz, 2H).

*2-azido-N,N-dimethylethanamine (**100**):*

$C_4H_{10}N_4$



Exact mass: 114.09 g.mol^{-1}

Molecular weight: 114.15 g.mol^{-1}

A solution of 2-chloro-N,N-dimethylethanamine (500 mg, 4.65 mmol) and sodium azide (670 mg, 10.31 mmol) in water (12.5 mL) was stirred at 60°C for 40h. After cooling the reaction mixture to room temperature, 0.5 g of potassium hydroxyde were added (ice bath), and the product was extracted with diethyl ether (2 × 25 mL). The combined organic layers were dried over magnesium sulfate and concentrated under vacuum. The residue was dried under reduced pressure to afford a colorless oil (317 mg, 60 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 2.28 (s, 6H); 2.51 (t, ^{3}J= 6.2 Hz, 2H); 3.35 (t, ^{3}J= 6.2 Hz, 2H).

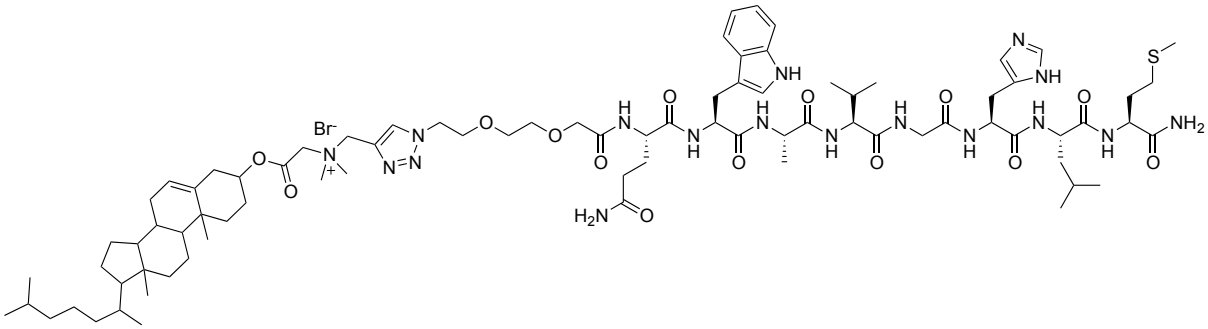
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$, 300 K): δ (ppm)= 45.6, 49.2, 58.2.

*Cholesterol-spacer-BBN-7-14 (**101**) (copper catalyzed click chemistry coupling method):*

$C_{83}H_{130}BrN_{17}O_{14}S$

Exact mass: 1699.89 g.mol^{-1}

Molecular weight: 1701.99 g.mol^{-1}



A mixture of N-(2-(2-(2-(N-azidoethoxy)ethoxy))acetyl-bombesin(7-14)) (5.76 mg, 4.7 µmol), alkyne containing cholesterol derivative **97** (2.78 mg, 4.7 µmol), copper sulfate (0.83 mg, 5.2 µmol) and sodium ascorbate (2.79 mg, 14.1 µmol) in 350 µL of DMF was stirred at room temperature for 8 h. The peptide was purified by semi-preparative RP-HPLC (C18, eluent: CH_3CN-0.1% TFA / H_2O-0.1% TFA, gradient from 70:30 to 100:0 v/v in 40 min, Rt= 17.18 min), and pure fractions were collected and lyophilized to give the desired product (2.5 mg, 31 %).

MS ESI: m/z= 1620.14 $[M-Br]^+$ (calcd for $C_{83}H_{130}N_{17}O_{14}S^+$: 1620.97).

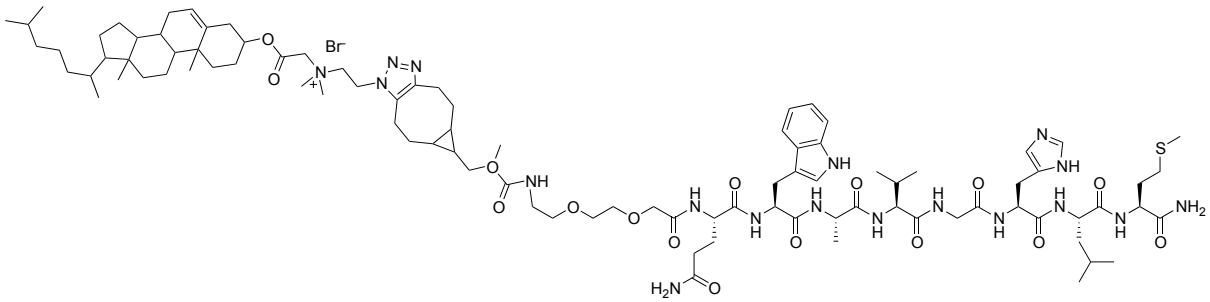
HPLC (method B): Rt (min)= 5.73 (90.8 % at 254 nm).

*Cholesterol-spacer-BBN-7-14 (**102**) (copper free click chemistry coupling method):*

$C_{94}H_{148}BrN_{18}O_{16}S$

Exact mass: 1881.00 g.mol^{-1}

Molecular weight: 1883.23 g.mol^{-1}



N-(2-(2-(2-(N- 4-(((bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethoxy)carbonyl)amino) ethoxy)ethoxy))acetyl-bombesin(7-14)) (5.20 mg, 4.11 µmol) and cholesterol derivative **98** (2.04 mg, 3.28 µmol) were put in 750 µL of DMF. The mixture was stirred at room temperature for 15 h. The peptide was purified by semi-preparative RP-HPLC (C18, eluent: CH_3CN-0.1% TFA / H_2O-0.1% TFA, gradient from 70:30 to 100:0 v/v in 40 min, Rt= 17.25 min), and pure fractions were collected and lyophilized to afford the desired product (2.3 mg, 32 %).

MS MALDI-TOF: m/z= 1802.26 $[M-Br]^+$ (calcd for $C_{93}H_{145}N_{18}O_{16}S^+$: 1802.08).

HPLC (method B): Rt (min)= 5.81 (92.80 % at 254 nm).

General procedure for the preparation of liposome encapsulated subphthalocyanine and containing sterol derivative:

Liposomes were prepared by the injection method using solutions of 1,2-dipalmitoyl-*sn*- glycero-3-phosphocholine (21 mM) in ethanol, azido-cholesterol **98** (3 mM) in ethanol and SubPc-NO_2 **13** (0.5 mM) in chloroform. A mixture of 100 µL of SubPc solution, 100 µL of sterol solution and 100 µL of DPPC solution was quickly injected using an Hamilton syringe in 10 mL of PBS under vigourous agition at 60°C. The mixture was kept under agitation for 2 min at 60°C, then cooled to room temperature and purified by FPLC (HI-TRAP, eluent: PBS, Rt = 3.7 min).

Conjugaison of liposome with BBN :

To the liposomial solution previously prepared was added N-(2-(2-(2-(N- 4-(((bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethoxy)carbonyl)amino) ethoxy)ethoxy))acetyl-bombesin(7-14)) (1.42 mg, 0.45 µmol, 3 eq) and the solution was stirred at room temperature for 18 h. The mixture was lyophilized and subjected to MALDI-TOF MS analysis to confirm the success of the reaction.

MS MALDI-TOF: m/z= 1801.84 $[M-Br]^+$ (calcd for $C_{93}H_{145}N_{18}O_{16}S^+$: 1802.08).

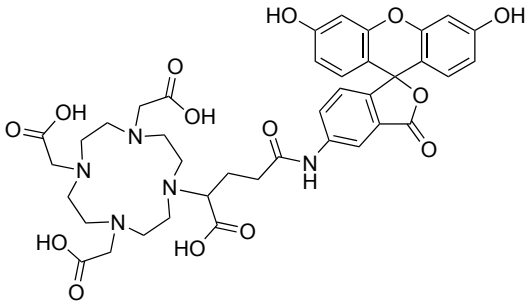
C.6. Chapter 3:

*5-(3-(DOTA)ethanamido)fluorescein (**103**):*

$C_{39}H_{43}N_5O_{14}$

Exact mass: 805.28 g.mol^{-1}

Molecular weight: 805.78 g.mol^{-1}



A mixture of 5-aminofluorescein (100 mg, 0.29 mmol) and DOTA-GA-anhydride (264 mg, 0.48 mmol) was stirred in DMF (3 mL) under nitrogen atmosphere, at 80°C for 16 h. The solvent off thr reaction mixture was evaporated off under reduced pressure. The residual solid was taken in acetone (10 mL), filtered off, washed with acetone (3 × 10 mL), and dried under reduced pressure. The yellow solid obtained was diluted in a H_2O/CH_3CN mixture (70:30, 5 mL), and purified by reverse phase column chromatography (C18, eluent: CH_3CN - 0.1% HCOOH / H_2O - 0.1% HCOOH, 0:100 for 10 min then gradient from 0:100 to 60 40 v/v in 30 min, Tr= 18.5 min) to afford compound **103** (85 mg, 37 %).

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6, 420 K): δ (ppm)= 1.97 (m, 1H); 2.11 (m, 1H); 2.71 (m, 2H); 2.80 (m, 2H); 3.00 (m, 14H); 3.44 (m, 6H), 3.50 (s, 1H); 6.56 (dd, ^{3}J= 8.6 Hz, ^{4}J= 2.3 Hz, 2H); 6.61 (dd, ^{3}J= 8.6 Hz, ^{4}J= 1.6 Hz, 2H); 6.68 (d, ^{4}J= 2.3 Hz, 2H); 7.08 (d, ^{3}J= 8.3 Hz, 1H); 8.07 (d, ^{3}J= 8.3 Hz, 1H); 8.39 (d, ^{4}J= 1.5 Hz, 1H), 10.75 (s, 1H).

MS MALDI-TOF: m/z= 806.13 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{39}H_{44}N_5O_{14}^+$: 806.29), 828.13 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{39}H_{43}N_5O_{14}Na^+$: 828.27), 844.10 $[M+K]^+$ (calcd for $C_{39}H_{43}N_5O_{14}K^+$: 844.24), 850.11 $[M-H+2Na]^+$ (calcd for $C_{39}H_{42}N_5O_{14}Na_2^+$: 850.25), 866.09 $[M-H+Na+K]^+$ (calcd for $C_{39}H_{42}N_5O_{14}KNa^+$: 866.23), 882.07 $[M-H+2K]^+$ (calcd for $C_{39}H_{42}N_5O_{14}K_2^+$: 882.20).

HR-MS ESI: m/z= 806.2867 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{39}H_{44}N_5O_{14}^+$: 806.2879), 828.265 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{39}H_{43}N_5O_{14}Na^+$: 828.2699).

UV-Vis (NaOH 0.1 M in water): λ_{max} (nm) (ε × 10^3 L.mol^{-1}.cm^{-1})= 491 (76.0).

HPLC (method A): Rt (min)= 1.74 (98.1 % at 254 nm; 98.9 % at 565 nm)**.**

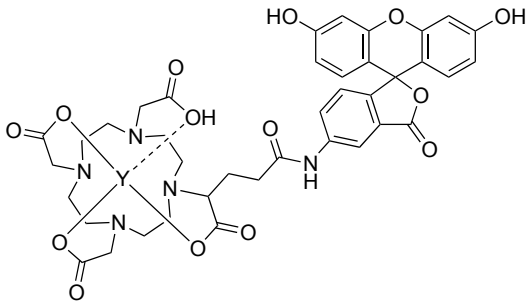
Fluorescence (NaOH 0.1 M in water): λ_{max} (nm) (Φ_F)= 515 (0.702).

*5-(3-(DOTA-yttrium(III))ethanamido)fluorescein (**104**):*

$C_{39}H_{40}N_5O_{14}Y$

Exact mass: 891.16 g.mol^{-1}

Molecular weight: 891.66 g.mol^{-1}



A solution of 5-(3-(DOTA)ethanamido)fluorescein **103** (20 mg, 25 µmol) in water (5 mL) was adjusted to pH 7 using 1M sodium hydroxide solution. Then a solution of yttrium chloride (8.3 mg, 27 µmol) in 1 mL of water was added under agitation. The mixture was heated at 60 °C during 1 h. The water in the reaction mixture was evaporated off under reduced pressure. The residual solid was taken in acetone (10 mL), filtered off, washed with acetone (3 × 10 mL) and dried under reduced pressure. The yellow solid obtained was diluted in a H_20/CH_3CN mixture (50:50, 5 mL) and purified by semi-preparative reverse phase column chromatography (C18, eluent: CH_3CN - 0.1% HCOOH / H_2O - 0.1% HCOOH, gradient from 10:90 to 50:50 in 40 min) to afford compound **104** (11 mg, 50 %).

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6, 390 K): δ (ppm)= 1.97 (m, 2H); 2.65-3.18 (m, 18H); 3.49-3.63 (m, 6H); 3.75 (s, 1H); 6.56 (dd, ^{3}J= 8.6 Hz, ^{4}J= 2.4 Hz, 2H); 6.61 (dd, ^{3}J= 8.6 Hz, ^{4}J= 3.5 Hz, 2H); 6.68 (d, ^{4}J= 2.4 Hz, 2H); 7.12 (d, ^{3}J= 8.3 Hz, 1H); 7.86 (dd, ^{3}J= 8.3 Hz, ^{3}J= 1.9 Hz, 1H); 8.25 (d, ^{4}J= 1.9 Hz, 1H), 10.13 (s, 1H).

MS MALDI-TOF: m/z= 892.12 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{39}H_{41}N_5O_{14}Y^+$: 892.17), 914.11 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{39}H_{40}N_5O_{14}YNa^+$: 914.15), 930.85 $[M+K]^+$ (calcd for $C_{39}H_{40}N_5O_{14}YK^+$: 913.30), 952.08 $[M-H+Na+K]^+$ (calcd for $C_{39}H_{39}N_5O_{14}NaK^+$: 952.11), 990.05 $[M-2H+2Na+K]^+$ (calcd for $C_{39}H_{38}N_5O_{14}Na_2K^+$: 974.09).

HR-MS ESI: m/z= 892.1741 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{39}H_{41}N_5O_{14}Y^+$: 892.1703), 914.1527 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{39}H_{40}N_5O_{14}YNa^+$: 914.15223).

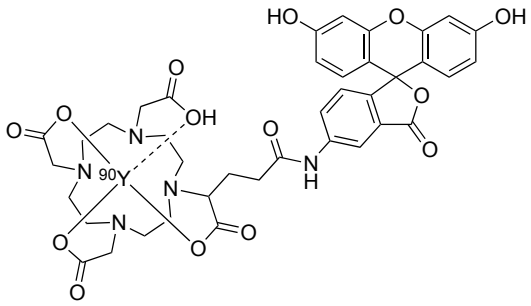
UV-Vis (NaOH 0.1 M in H_2O): λ_{max} (nm) ($\varepsilon \times 10^3$ L.mol^{-1}.cm^{-1})= 491 (62.8).

HPLC (method A): Rt (min)= 1.78 (97.7 % at 254 nm; 98.2 % at 565 nm)**.**

Fluorescence (NaOH 0.1 M in water): λ_{max} (nm) (Φ_F)= 515 (0.856).

*5-(3-(DOTA-^{90}yttrium(III))ethanamido)fluorescein ([^{90}**Y]-104**):*

$C_{39}H_{340}N_5O_{14}{}^{90}Y$



A solution of ^{90}Y-YCl_3 (508.7 MBq, 1 mL) was purchased and used for radiolabelling studies. A solution of **103** (3.22 mg, 25 µmol) in 1 M ammonium acetate buffer (1 mL) was prepared. Several volumes of the solution of **103** (100 µL, 50 µL, 10 µL and 5 µL) were added to a constant volume of ^{90}Y-YCl_3 (20 µL, 8-9 mBq); subsequent addition of ammonium acetate buffer (for experiment 3 and 4) permits to keep a pH value of 5.4:

Experiment 1: 100 µL of a **103** solution + 20 µL of ^{90}Y-YCl_3 solution

Experiment 2: 50 µL of **103** solution + 20 µL of ^{90}Y-YCl_3 solution

Experiment 3: 10 µL of **103** solution + 20 µL of ^{90}Y-YCl_3 solution + 20 µL of $AcONH_4$ buffer

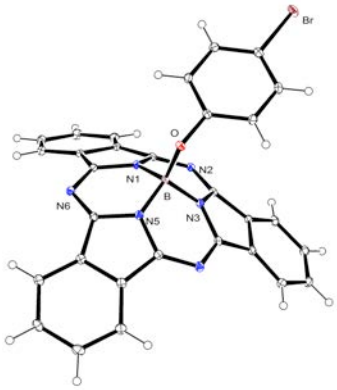
Experiment 4: 5 µL of **103** solution + 20 µL of ^{90}Y-YCl_3 solution + 20 µL of $AcONH_4$ buffer

The mixtures were heated at 80 °C for 2 h. The reaction was monitored by RITLC. After cooling, the solutions were diluted with an appropriate volume of 0.1 M NaOH solution (880 µL, 930 µL, 950 µL and 955 µL respectively) to obtain a total volume of 1 mL, subsequent emission measurements were then achieved.

Radio-TLC (SiO_2, MeOH/$AcONH_4$ 50:50 v/v): Rf = 0.8. Radio-purity: experiment 1: 97.74 %; experiment 2 : 98.45 %; experiment 3: 97.27 %; experiment 4: 96.04 %.

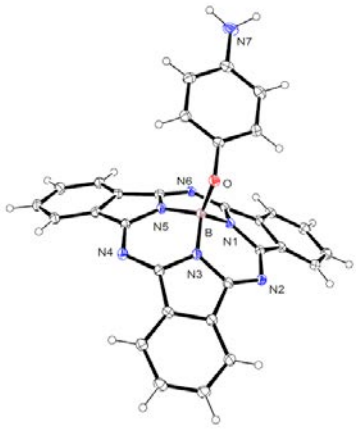
D. Cristallographic data

Crystal Data and structure refinement for compound 7



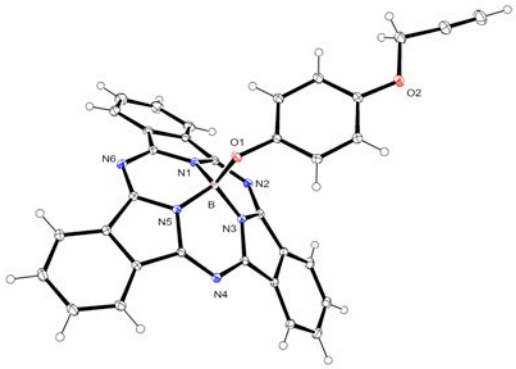
Empirical formula	$C_{30}H_{16}N_6OBBr$
Formula weight	567.21
Temperature	115 K
Crystal system	triclinic
Space group	P-1
Unit cell dimensions	a = 10.1294(5) Å
	b = 11.0037(6) Å
	c = 11.6629(6) Å
	α = 86.9440(10)°
	β = 78.7200(10)°
	γ = 67.9970(10)°
Volume	1181.71(11) $Å^3$
Z	2
Density	1.594 g/cm^3
Absorption coefficient	1.779 μ/mm^{-1}
F(000)	572.0
Crystal size	0.2 × 0.15 × 0.12 mm^3
Radiation	MoKα (λ = 0.71073)
2Θ range for data collection	5.41° to 61.93°
Index ranges	$-13 \leq h \leq 14$, $-15 \leq k \leq 15$, $-16 \leq l \leq 16$
Reflections collected	37598
Independent reflections	6809 [R_{int} = 0.0287, R_{sigma} = 0.0240]
Data/restraints/parameters	6809/0/352
Goodness-of-fit on F^2	1.027
Final R indexes [I>=2σ (I)]	R_1 = 0.0276, wR_2 = 0.0632
Final R indexes [all data]	R_1 = 0.0382, wR_2 = 0.0673
Largest diff. peak/hole	0.43/-0.51 e $Å^{-3}$

*Crystal Data and structure refinement for compound **8***



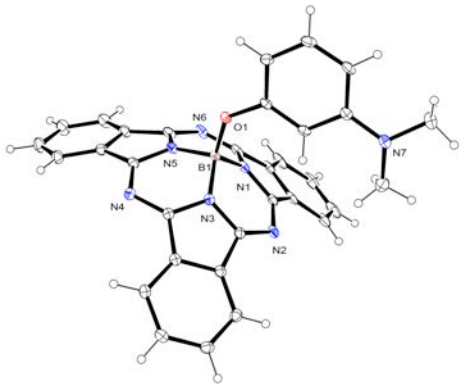
Empirical formula	$C_{30}H_{18}N_7OB$
Formula weight	503.32
Temperature	115 K
Crystal system	triclinic
Space group	P-1
Unit cell dimensions	a = 10.1660(4) Å
	b = 10.7702(3)Å
	c = 11.7522(5) Å
	α = 86.653(2)°
	β = 78.280(2)°
	γ = 66.200(2)°
Volume	1152.38(8) $Å^3$
Z	2
Density	1.451 g/cm^3
Absorption coefficient	0.092 μ/mm^{-1}
Crystal size	0.22 × 0.15 × 0.07 mm^3
Radiation	MoKα (λ = 0.71073)
2Θ range for data collection	3.172° to 27.413°
Index ranges	$-13 \leq h \leq 13$, $-13 \leq k \leq 13$, $-15 \leq l \leq 15$
Reflections collected	9428
Independent reflections	5191 [R_{int} = 0.0269 , R_{sigma} = 0.0371]
Data/restraints/parameters	5191/1/358
Goodness-of-fit on F^2	1.085
Final R indexes [I>=2σ (I)]	R_1 = 0.0489 , wR_2 = 0.0934
Final R indexes [all data]	R_1 = 0.0674 , wR_2 = 0.1039
Largest diff. peak/hole	0.285/-0.265 e $Å^{-3}$

*Crystal Data and structure refinement for compound **16***



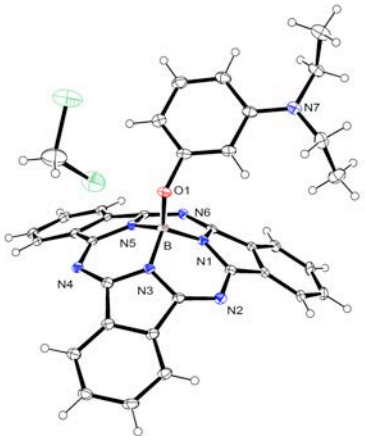
Empirical formula	$C_{33}H_{23}N_7BFO$
Formula weight	547.39
Temperature	115 K
Crystal system	monoclinic
Space group	$P2_1/c$
Unit cell dimensions	a = 12.3797(13) Å
	b = 27.177(3) Å
	c = 7.8604(8) Å
	α = 90°
	β = 98.193(2)°
	γ = 90°
Volume	2617.5(5) $Å^3$
Z	4
Density	1.389 g/cm^3
Absorption coefficient	0.090 μ/mm^{-1}
F(000)	1136.0
Crystal size	0.32 × 0.2 × 0.17 mm^3
Radiation	MoKα (λ = 0.71073)
2Θ range for data collection	4.476° to 64.414°
Index ranges	$-18 \leq h \leq 18$, $-40 \leq k \leq 40$, $-11 \leq l \leq 11$
Reflections collected	76231
Independent reflections	9198 [R_{int} = 0.0336, R_{sigma} = 0.0203]
Data/restraints/parameters	9198/0/379
Goodness-of-fit on F^2	1.051
Final R indexes [I>=2σ (I)]	R_1 = 0.0480, wR_2 = 0.1223
Final R indexes [all data]	R_1 = 0.0591, wR_2 = 0.1305
Largest diff. peak/hole	0.55/-0.28 e $Å^{-3}$

*Crystal Data and structure refinement for compound **19***



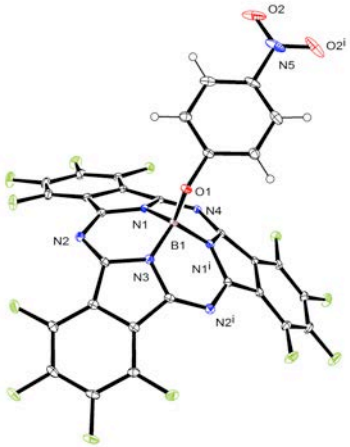
Empirical formula	$C_{32}H_{22}BN_7O$
Formula weight	531.37
Temperature	115 K
Crystal system	triclinic
Space group	P-1
Unit cell dimensions	a = 9.4026(8) Å
	b = 12.0835(12) Å
	c = 12.6647(12) Å
	α = 69.323(3)°
	β = 86.667(3)°
	γ = 72.682(3)°
Volume	1283.4(2) $Å^3$
Z	2
Density	1.375 g/cm^3
Absorption coefficient	0.087 μ/mm^{-1}
F(000)	552.0
Crystal size	0.5 × 0.15 × 0.15 mm^3
Radiation	MoKα (λ = 0.71073)
2Θ range for data collection	3.442° to 55.094°
Index ranges	$-9 \leq h \leq 12$, $-15 \leq k \leq 15$, $-16 \leq l \leq 16$
Reflections collected	12701
Independent reflections	5576 [R_{int} = 0.0294, R_{sigma} = 0.0437]
Data/restraints/parameters	5576/0/372
Goodness-of-fit on F^2	1.007
Final R indexes [I>=2σ (I)]	R_1 = 0.0400, wR_2 = 0.0900
Final R indexes [all data]	R_1 = 0.0654, wR_2 = 0.1028
Largest diff. peak/hole	0.21/-0.25 e $Å^{-3}$

*Crystal Data and structure refinement for compound **20***



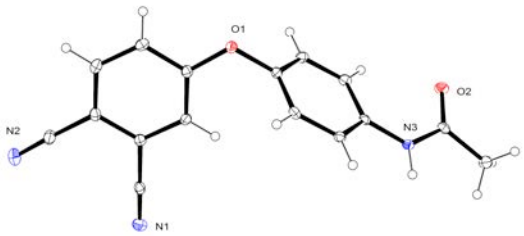
Empirical formula	$C_{34.5}H_{27}BClN_7O$
Formula weight	601.89
Temperature	115 K
Crystal system	monoclinic
Space group	C2/c
Unit cell dimensions	a = 36.428(4) Å
	b = 8.3071(8) Å
	c = 21.168(2) Å
	α = 90°
	β = 5736.0(10)°
	γ = 90°
Volume	1.394 $Å^3$
Z	8
Density	1.360 g/cm^3
Absorption coefficient	0.177 μ/mm^{-1}
F(000)	2504.0
Crystal size	0.37 × 0.22 × 0.05 mm^3
Radiation	MoKα (λ = 0.71073)
2Θ range for data collection	5.276° to 52.238°
Index ranges	$-44 \leq h \leq 38$, $-10 \leq k \leq 10$, $-21 \leq l \leq 26$
Reflections collected	32606
Independent reflections	5603 [R_{int} = 0.0859, R_{sigma} = 0.0643]
Data/restraints/parameters	5603/0/418
Goodness-of-fit on F^2	1.064
Final R indexes [I>=2σ (I)]	R_1 = 0.0887, wR_2 = 0.2429
Final R indexes [all data]	R_1 = 0.1094, wR_2 = 0.2551
Largest diff. peak/hole	0.63/-0.64 e $Å^{-3}$

*Crystal Data and structure refinement for compound **34***



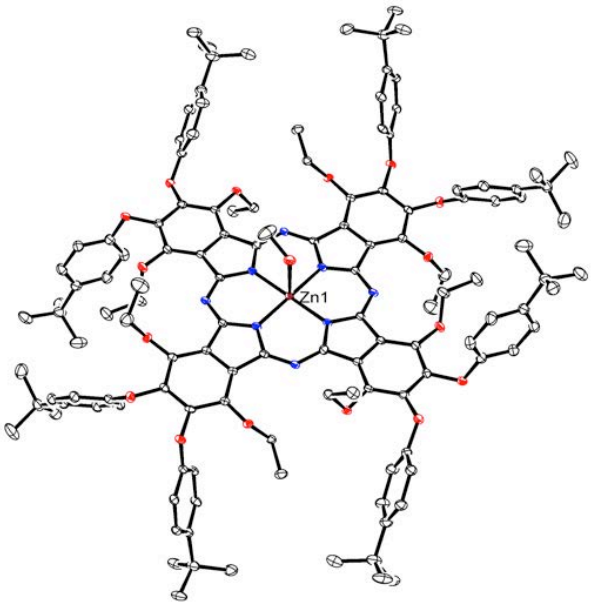
Empirical formula	$C_{30}H_4BF_{12}N_7O_3$
Formula weight	749.21
Temperature	115 K
Crystal system	monoclinic
Space group	$P2_1/m$
Unit cell dimensions	a = 7.2427(6) Å
	b = 19.6259(15) Å
	c = 9.7974(8) Å
	α = 90°
	β = 92.572(2)°
	γ = 90°
Volume	1391.24(19) $Å^3$
Z	2
Density	1.788 g/cm^3
Absorption coefficient	0.173 μ/mm^{-1}
F(000)	740.0
Crystal size	0.3 × 0.25 × 0.1 mm^3
Radiation	MoKα (λ = 0.71073)
2Θ range for data collection	5.63° to 55.628°
Index ranges	$-9 \leq h \leq 9$, $-25 \leq k \leq 25$, $-12 \leq l \leq 12$
Reflections collected	20884
Independent reflections	3373 [R_{int} = 0.0260, R_{sigma} = 0.0184]
Data/restraints/parameters	3373/0/250
Goodness-of-fit on F^2	1.054
Final R indexes [I>=2σ (I)]	R_1 = 0.0344, wR_2 = 0.0819
Final R indexes [all data]	R_1 = 0.0458, wR_2 = 0.0892
Largest diff. peak/hole	0.36/-0.23 e $Å^{-3}$

*Crystal Data and structure refinement for compound **57***



Empirical formula	$C_{16}H_{11}N_3O_2$
Formula weight	277.28
Temperature	115 K
Crystal system	monoclinic
Space group	$P2_1/c$
Unit cell dimensions	a = 18.6447(11) Å
	b = 9.7598(5) Å
	c = 7.5841(4) Å
	α = 90°
	β = 101.200(2)°
	γ = 90°
Volume	1353.78(13) $Å^3$
Z	4
Density	1.360 g/cm^3
Absorption coefficient	0.093 μ/mm^{-1}
F(000)	576.0
Crystal size	0.6 × 0.5 × 0.3 mm^3
Radiation	MoKα (λ = 0.71073)
2Θ range for data collection	6.106 to 55.774°
Index ranges	$-24 \leq h \leq 24$, $-12 \leq k \leq 12$, $-9 \leq l \leq 9$
Reflections collected	18171
Independent reflections	3166 [R_{int} = 0.0295, R_{sigma} = 0.0212]
Data/restraints/parameters	3166/0/191
Goodness-of-fit on F^2	1.048
Final R indexes [I>=2σ (I)]	R_1 = 0.0394, wR_2 = 0.0906
Final R indexes [all data]	R_1 = 0.0495, wR_2 = 0.0970
Largest diff. peak/hole	0.26/-0.28 e $Å^{-3}$

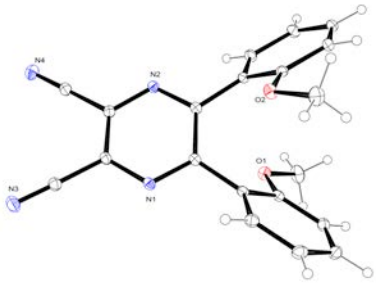
*Crystal Data and structure refinement for compound **78***



Empirical formula	$C_{130.43}H_{152.75}Cl_{0.75}N_8O_{18}Zn$	
Formula weight	2212.40	
Temperature	100 K	
Crystal system	triclinic	
Space group	P-1	
Unit cell dimensions	a = 11.8689(7) Å	α = 76.296(3)°
	b = 20.9802(12) Å	β = 88.934(3)°
	c = 24.6776(15) Å	γ = 89.099(3)°
Volume	5968.6(6) $Å^3$	
Z	2	
Density	1.231 g/cm^3	
Absorption coefficient	0.994 μ/mm^{-1}	
F(000)	2356.0	
Crystal size	0.37 × 0.17 × 0.025 mm^3	
Radiation	CuKα (λ = 1.54178)	
2Θ range for data collection	4.982 to 133.846°	
Index ranges	$-13 \leq h \leq 14$, $-25 \leq k \leq 24$, $-29 \leq l \leq 29$	
Reflections collected	142547	
Independent reflections	21071 [R_{int} = 0.0460, R_{sigma} = 0.0354]	
Data/restraints/parameters	21071/18/1493	

Goodness-of-fit on F^2	1.026
Final R indexes [I>=2σ (I)]	$R_1 = 0.0630$, $wR_2 = 0.1553$
Final R indexes [all data]	$R_1 = 0.0875$, $wR_2 = 0.1710$
Largest diff. peak/hole	1.85/-0.56 e $Å^{-3}$

*Crystal Data and structure refinement for compound **88***



Empirical formula	$C_{20}H_{14}N_4O_2$
Formula weight	342.35
Temperature	115 K
Crystal system	orthorhombic
Space group	Pbca
Unit cell dimensions	a = 11.5766(6) Å
	b = 15.4259(7) Å
	c = 18.6932(9) Å
	α = 90°
	β = 90°
	γ = 90°
Volume	3338.2(3) $Å^3$
Z	8
Density	1.362 g/cm^3
Absorption coefficient	0.092 μ/mm^{-1}
F(000)	1424.0
Crystal size	0.625 × 0.5 × 0.5 mm^3
Radiation	MoKα (λ = 0.71073)
2Θ range for data collection	5.602 to 54.998°
Index ranges	$-15 \leq h \leq 14$, $-18 \leq k \leq 20$, $-24 \leq l \leq 23$
Reflections collected	45320
Independent reflections	3825 [R_{int} = 0.0261, R_{sigma} = 0.0118]
Data/restraints/parameters	3825/0/237
Goodness-of-fit on F^2	1.039
Final R indexes [I>=2σ (I)]	R_1 = 0.0347, wR_2 = 0.0903
Final R indexes [all data]	R_1 = 0.0391, wR_2 = 0.0944
Largest diff. peak/hole	0.33/-0.21 e $Å^{-3}$

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Waterton, J. *Biomedical Imaging: The Chemistry of Labels, Probes and Contrast Agents*; Braddock, M., Ed.; RSC Drug Discovery **2011**.

(2) (a) Weissleder, R.; Pittet, M. J. *Nature* **2008**, *452*, 580. (b) Massoud, T. F.; Gambhir, S. S. *Genes & Development* **2003**, *17*, 545.

(3) (a) Rudin, M.; Weissleder, R. *Nature Reviews* **2003**, *2*, 123. (b) Wang, Y.; Deng, M. *Journal of Thoracic Disease* **2010**, *2*, 245. (c) O'farrell, A. C.; Shnyder, S. D.; Marston, G.; Coletta, P. L.; Gill, J. H. *British Journal of Pharmacology* **2013**, *169*, 719. (d) Hussain, T.; Nguyen, Q. T. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2014**, *66*, 90.

(4) Paeng, J. C.; Lee, D. S. *The Open Nuclear Medicine Journal* **2010**, *2*, 145.

(5) (a) Sumer, B.; Gao, J. M. *Nanomedicine* **2008**, *3*, 137. (b) Lammers, T.; Aime, S.; Hennink, W. E.; Storm, G.; Kiessling, F. *Accounts of Chemical Research* **2011**, *44*, 1029.

(6) Meade, T. J.; Aime, S. *Accounts of Chemical Research* **2009**, *42*, 821.

(7) Pysz, M. A.; Gambhir, S. S.; Willmann, J. K. *Clinical Radiology* **2010**, *65*, 500.

(8) (a) Kuchmiy, A. A.; Efimov, G. A.; Nedospasov, S. A. *Biochemistry-Moscow* **2012**, *77*, 1339. (b) James, M. L.; Gambhir, S. S. *Physiological Reviews* **2012**, *92*, 897. (c) Condeelis, J.; Weissleder, R. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2010**, *2*. (d) Spinelli, A. E.; D'Ambrosio, D.; Calderan, L.; Marengo, M.; Sbarbati, A.; Boschi, F. *Physics in Medicine and Biology* **2010**, *55*, 483.

(9) Shokrollahi, H. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications* **2013**, *33*, 4485.

(10) (a) Voigt, J. U. *Methods* **2009**, *48*, 92. (b) Deshpande, N.; Needles, A.; Willmann, J. K. *Clinical Radiology* **2010**, *65*, 567.

(11) Tranquart, F.; Mercier, L.; Frinking, P.; Gaud, E.; Arditi, M. *Ultraschall in Der Medizin* **2012**, *33*, S31.

(12) Artemov, D. *Journal of Cellular Biochemistry* **2003**, *90*, 518.

(13) Pannek, K.; Scheck, S. M.; Colditz, P. B.; Boyd, R. N.; Rose, S. E. *Developmental Medicine and Child Neurology* **2014**, *56*, 113.

(14) Padhani, A. R.; Krohn, K. A.; Lewis, J. S.; Alber, M. *European Radiology* **2007**, *17*, 861.

(15) de Kemp, R. A.; Epstein, F. H.; Catana, C.; Tsui, B. M. W.; Ritman, E. L. *Journal of Nuclear Medicine* **2010**, *51*, 18S.

(16) Phelps, M. E. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, *97*, 9226.

(17) Matthews, P. M.; Rabiner, E. A.; Passchier, J.; Gunn, R. N. *British Journal of Clinical Pharmacology* **2012**, *73*, 175.

(18) Jablonski, A. *Nature* **1933**, *131*, 839.

(19) Valentine, R. M.; Ibbotson, S. H.; Wood, K.; Brown, C. T. A.; Moseleya, H. *Photochemistry and Photobiology Science* **2013**, *12*, 203.

(20) (a) Licha, K. *Contrast Agents Ii* **2002**, *222*, 1. (b) Weissleder, R. *Nature Biotechnology* **2001**, *19*, 316.

(21) Lavrentovich, O. D. *Characterization of Materials,* **2012**.

(22) Pawlicki, M.; Collins, H. A.; Denning, R. G.; Anderson, H. L. *Angewandte Chemie-International Edition* **2009**, *48*, 3244.

(23) Goeppert-Mayer, M. *Annals of physics* **1931**, *9*, 273.

(24) Helmchen, F.; Denk, W. *Nature Methods* **2005**, *2*, 932.

(25) (a) Eggeling, C.; Willig, K. I.; Barrantes, F. J. *Journal of Neurochemistry* **2013**, *126*, 203. (b) Westphal, V.; Lauterbach, M. A.; Di Nicola, A.; Hell, S. W. *New Journal of Physics* **2007**, *9*.

(26) (a) Weigert, R.; Sramkova, M.; Parente, L.; Amornphimoltham, P.; Masedunskas, A. *Histochemistry and Cell Biology* **2010**, *133*, 481. (b) Amornphimoltham, P.; Masedunskas, A.; Weigert, R. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2011**, *63*, 119. (c) Gavins, F. N. E. *Current Opinion in Pharmacology* **2012**, *12*, 601. (d) Taqueti, V. R.; Jaffer, F. A. *Integrative Biology* **2013**, *5*, 278.

(27) von Wallbrunn, A.; Holtke, C.; Zuhlsdorf, M.; Heindel, W.; Schafers, M.; Bremer, C. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2007**, *34*, 745.

(28) Stuker, F.; Ripoll, J.; Rudin, M. *Pharmaceutics* **2011**, *3*, 229.

(29) (a) Emelianov, S. Y.; Li, P. C.; O'Donnell, M. *Physics Today* **2009**, *62*, 34. (b) Wang, L. V. *Medical Physics* **2008**, *35*, 5758. (c) Heijblom, M.; Piras, D.; Xia, W.; van Hespen, J. C. G.; Klaase, J. M.; van den Engh, F. M.; van Leeuwen, T. G.; Steenbergen, W.; Manohar, S. *Optic express* **2012**, *20*.
(30) (a) Cerenkov, P. A. *Comp Rendus Doklady Akademii Nauk SSSR* **1934**, *2*, 3. (b) Jelley, J. V. *British Journal of Applied Physics* **1955**, *6*, 227.
(31) Axelsson, J.; Davis, S. C.; Gladstone, D. J.; Pogue, B. W. *Medical Physics* **2011**, *38*, 4127.
(32) Robertson, R.; Germanos, M. S.; Li, C.; Mitchell, G. S.; Cherry, S. R.; Silva, M. D. *Physics in Medicine and Biology* **2009**, *54*, N355.
(33) Spinelli, A. E.; Ferdeghini, M.; Cavedon, C.; Zivelonghi, E.; Calandrino, R.; Fenzi, A.; Sbarbati, A.; Boschi, F. *Journal of Biomedical Optics* **2013**, *18*.
(34) (a) Hu, Z. H.; Liang, J. M.; Yang, W. D.; Fan, W. W.; Li, C. Y.; Ma, X. W.; Chen, X. L.; Ma, X. P.; Li, X. S.; Qu, X. C.; Wang, J.; Cao, F.; Tian, J. *Optics Express* **2010**, *18*, 24441; (b) Ruggiero, A.; Holland, J. P.; Lewis, J. S.; Grimm, J. *Journal of Nuclear Medicine* **2010**, *51*, 1123; (c) Boschi, F.; Calderan, L.; D'Ambrosio, D.; Marengo, M.; Fenzi, A.; Calandrino, R.; Sbarbati, A.; Spinelli, A. E. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2011**, *38*, 120.
(35) Thorek, D. L. J.; Riedl, C. C.; Grimm, J. *Journal of Nuclear Medicine* **2014**, *55*, 95.
(36) (a) Li, C. Q.; Mitchell, G. S.; Cherry, S. R. *Optics Letters* **2010**, *35*, 1109; (b) Spinelli, A. E.; Kuo, C.; Rice, B. W.; Calandrino, R.; Marzola, P.; Sbarbati, A.; Boschi, F. *Optics Express* **2011**, *19*, 12605. (c) Hu, Z. H.; Chen, X. L.; Liang, J. M.; Qu, X. C.; Chen, D. F.; Yang, W. D.; Wang, J.; Cao, F.; Tian, J. *Journal of Applied Physics* **2012**, *112*, 024703. (d) Zhong, J. H.; Tian, J.; Yang, X.; Qin, C. H. *Annals of Biomedical Engineering* **2011**, *39*, 1728. (e) Glaser, A. K.; Voigt, W. H. A.; Davis, S. C.; Zhang, R. X.; Gladstone, D. J.; Pogue, B. W. *Optics Letters* **2013**, *38*, 634.
(37) (a) Lucignani, G. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2011**, *38*, 592. (b) Park, J. C.; An, G. I.; Park, S. I.; Oh, J.; Kim, H. J.; Ha, Y. S.; Wang, E. K.; Kim, K. M.; Kim, J. Y.; Lee, J.; Welch, M. J.; Yoo, J. *Nuclear Medicine and Biology* **2011**, *38*, 321. (c) Thorek, L. J.; Robertson, R.; Bacchus, W. A.; Hahn, J.; Rothberg, J.; Beattie, B. J.; Grimm, J. *American Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2012**, *2*, 163.
(38) Chin, P. T. K.; Welling, M. M.; Meskers, S. C. J.; Olmos, R. A. V.; Tanke, H.; van Leeuwen, F. W. B. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2013**, *40*, 1283.
(39) Liu, H. G.; Ren, G.; Miao, Z.; Zhang, X. F.; Tang, X. D.; Han, P. Z.; Gambhir, S. S.; Cheng, Z. *Plos One* **2010**, *5*.
(40) Kim, D. H.; Choe, Y. S.; Choi, J. Y.; Lee, K. H.; Kim, B. T. *Nuclear Medicine and Biology* **2011**, *38*, 541.
(41) (a) Satpati, D.; Hausner, S. H.; Bauer, N.; Sutcliffe, J. L. *Journal of Labelled COmpounds and Radiopharmaceuticals* **2014**, *57*, 558. (b) Xu, Y. D.; Chang, E.; Liu, H. G.; Jiang, H.; Gambhir, S. S.; Cheng, Z. *Journal of Nuclear Medicine* **2012**, *53*, 312.
(42) (a) Holland, J. P.; Normand, G.; Ruggiero, A.; Lewis, J. S.; Grimm, J. *Molecular Imaging* **2011**, *10*, 177. (b) Liu, H. G.; Carpenter, C. M.; Jiang, H.; Pratx, G.; Sun, C.; Buchin, M. P.; Gambhir, S. S.; Xing, L.; Cheng, Z. *Journal of Nuclear Medicine* **2012**, *53*, 1579.
(43) (a) Dothager, R. S.; Goiffon, R. J.; Jackson, E.; Harpstrite, S.; Piwnica-Worms, D. *Plos One* **2010**, *5*, e13300. (b) Lewis, M. A.; Kodibagkar, V. D.; Oz, O. K.; Mason, R. P. *Optics Letters* **2010**, *35*, 3889. (c) Boschi, F.; Spinelli, A. E. *Rsc Advances* **2012**, *2*, 11049. (d) Ma, X. W.; Kang, F.; Xu, F.; Feng, A. L.; Zhao, Y.; Lu, T. J.; Yang, W. D.; Wang, Z.; Lin, M.; Wang, J. *Plos One* **2013**, *8*, e77926. (e) Thorek, D. L. J.; Ogirala, A.; Beattie, B. J.; Grimm, J. *Nature Medicine* **2013**, *19*, 1345.
(44) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell* **2000**, *100*, 57.
(45) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell* **2011**, *144*, 646.
(46) Licha, K.; Ute, R.-G. *drug Discovery Today: Technologies | Imaging techniques* **2011**, *8*, e87.
(47) (a) Wang, M.; Thanou, M. *Pharmacological Research* **2010**, *62*, 90. (b) Accardo, A.; Tesauro, D.; Morelli, G. *Polymer Journal* **2013**, *45*, 481.
(48) Minchin, R. F.; Martin, D. J. *Endocrinology* **2010**, *151*, 474.
(49) Sharma, P.; Brown, S.; Walter, G.; Santra, S.; Moudgil, B. *Advances in Colloid and Interface Science* **2006**, *123*, 471.
(50) (a) Lavis, L. D.; Raines, R. T. *Acs Chemical Biology* **2008**, *3*, 142. (b) Kobayashi, H.; Longmire, M. R.; Ogawa, M.; Choyke, P. L. *Chemical Society Reviews* **2011**, *40*, 4626. (c) Kobayashi, H.; Ogawa, M.; Alford, R.; Choyke, P. L.; Urano, Y. *Chemical Reviews* **2010**, *110*, 2620.
(51) Terai, T.; Nagano, T. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* **2013**, *465*, 347.

(52) Fani, M.; Maecke, H. R. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2012**, *39*, 11.
(53) Olafsen, T.; Wu, A. M. *Seminars in Nuclear Medicine* **2010**, *40*, 167.
(54) Smith-Jones, P. M.; Solit, D. B.; Akhurst, T.; Afroze, F.; Rosen, N.; Larson, S. M. *Nature Biotechnology* **2004**, *22*, 701.
(55) (a) Algar, W. R.; Prasuhn, D. E.; Stewart, M. H.; Jennings, T. L.; Blanco-Canosa, J. B.; Dawson, P. E.; Medintz, I. L. *Bioconjugate Chemistry* **2011**, *22*, 825. (b) Hermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques* **2013**, *3rd edition*, 1. (c) van Berkel, S. S.; van Delft, F. L. *Drug Discovery Today: Technologies* **2013**, *10*, 45. (d) McKay, C. S.; Finn, M. G. *Chemical Biology* **2014**, *21*, 1075.
(56) (a) Bertozzi, C. R.; Sletten, E. M. *Angewandte Chemie-International Edition* **2009**, *48*, 6974(b) Bertozzi, C. R. *Accounts of Chemical Research* **2011**, *44*, 651.
(57) (a) Huisgen, R. *Angewandte Chemie International Edition* **1963**, *2*, 565. (b) Huisgen, R. *Angewandte Chemie-International Edition* **1963**, *2*, 633.
(58) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angewandte Chemie-International Edition* **2001**, *40*, 2004.
(59) (a) Devaraj, N. K.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A. *Bioconjugate Chemistry* **2008**, *19*, 2297. (b) Hilderbrand, S. A.; Devaraj, N. K.; Upadhyay, R.; Hatin, J. B.; Weissleder, R. *Angewandte Chemie-International Edition* **2009**, *48*, 7013. (c) Devaraj, N. K.; Weissleder, R. *Accounts of Chemical Research* **2011**, *44*, 816. (d) Carroll, L.; Evans, H. L.; Aboagye, E. O.; Spivey, A. C. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2013**, *11*, 5772.
(60) Bawendi, M. G.; Han, H. S.; Devaraj, N. K.; Lee, J.; Hilderbrand, S. A.; Weissleder, R. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 7838.
(61) Raymond, K. N. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **2004**, *227*, U145.
(62) (a) Caravan, P. *Chemical Society Reviews* **2006**, *35*, 512. (b) Werner, E. J.; Datta, A.; Jocher, C. J.; Raymond, K. N. *Angewandte Chemie-International Edition* **2008**, *47*, 8568.
(63) (a) Accardo, A.; Tesauro, D.; Aloj, L.; Pedone, C.; Morelli, G. *Coordination Chemistry Reviews* **2009**, *253*, 2193. (b) Gambino, G.; De Pinto, S.; Tei, L.; Cassino, C.; Arena, F.; Gianolio, E.; Botta, M. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2014**, *19*, 133.
(64) Bertin, A.; Steibel, J.; Michou-Gallani, A. I.; Gallani, J. L.; Felder-Flesch, D. *Bioconjugate Chemistry* **2009**, *20*, 760.
(65) Garcia, J.; Neelavalli, J.; Haacke, E. M.; Allen, M. J. *Chemical Communications* **2011**, *47*, 12858.
(66) (a) Langereis, S.; Geelen, T.; Grull, H.; Strijkers, G. J.; Nicolay, K. *Nmr in Biomedicine* **2013**, *26*, 728. (b) Mulder, W. J. M.; Strijkers, G. J.; van Tilborg, G. A. F.; Griffioen, A. W.; Nicolay, K. *Nmr in Biomedicine* **2006**, *19*, 142. (c) Kielar, F.; Tei, L.; Terreno, E.; Botta, M. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 7836.
(67) (a) Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Elst, L. V.; Muller, R. N. *Chemical Reviews* **2010**, *110*, 2574. (b) Veiseh, O.; Gunn, J. W.; Zhang, M. Q. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, *62*, 284.
(68) Sun, C.; Lee, J. S. H.; Zhang, M. Q. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60*, 1252.
(69) Tassa, C.; Shaw, S. Y.; Weissleder, R. *Accounts of Chemical Research* **2011**, *44*, 842.
(70) (a) De Leon-Rodriguez, L. M.; Lubag, A. J. M.; Malloy, C. R.; Martinez, G. V.; Gillies, R. J.; Sherry, A. D. *Accounts of Chemical Research* **2009**, *42*, 948. (b) Major, J. L.; Meade, T. J. *Accounts of Chemical Research* **2009**, *42*, 893. (c) Tsitovich, P. B.; Burns, P. J.; Mckay, A. M.; Morrow, J. R. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2014**, *133*, 143.
(71) (a) Zhang, S. R.; Merritt, M.; Woessner, D. E.; Lenkinski, R. E.; Sherry, A. D. *Accounts of Chemical Research* **2003**, *36*, 783. (b) Woods, M.; Donald, E. W. C.; Sherry, A. D. *Chemical Society Reviews* **2006**, *35*, 500.
(72) (a) Abdolahi, M.; Shahbazi-Gahrouei, D.; Laurent, S.; Sermeus, C.; Firozian, F.; Allen, B. J.; Boutry, S.; Muller, R. N. *Contrast Media & Molecular Imaging* **2013**, *8*, 175. (b) Hansen, L.; Larsen, E. K. U.; Nielsen, E. H.; Iversen, F.; Liu, Z.; Thomsen, K.; Pedersen, M.; Skrydstrup, T.; Nielsen, N. C.; Ploug, M.; Kjems, J. *Nanoscale* **2013**, *5*, 8192. (c) Kinoshita, M.; Yoshioka, Y.; Okita, Y.; Hashimoto, N.; Yoshimine, T. *Contrast Media & Molecular Imaging* **2010**, *5*, 18.
(73) Ametamey, S. M.; Honer, M.; Schubiger, P. A. *Chemical Reviews* **2008**, *108*, 1501.
(74) Zimmer, L.; Luxen, A. *Neuroimage* **2012**, *61*, 363.
(75) Varasteh, Z.; Velikyan, I.; Lindeberg, G.; Sorensen, J.; Larhed, M.; Sandstrom, M.; Selvaraju, R. K.; Malmberg, J.; Tolmachev, V.; Orlova, A. *Bioconjugate Chemistry* **2013**, *24*, 1144.
(76) (a) Ramogida, C. F.; Orvig, C. *Chemical Communications* **2013**, *49*, 4720. (b) Price, E. W.; Orvig, C. *Chemical Society Reviews* **2014**, *43*, 260. (c) Wadas, T. J.; Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Anderson,

C. J. *Chemical Reviews* **2010**, *110*, 2858. (d) Delgado, R.; Felix, V.; Lima, L. M. P.; Price, D. W. *Dalton Transactions* **2007**, 2734.
(77) Lee, J. H.; Park, G.; Hong, G. H.; Choi, J.; Choi, H. S. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery* **2012**, *2*, 266.
(78) Tsien, R. Y. *Annual Review of Biochemistry* **1998**, *67*, 509.
(79) (a) Hemmila, I.; Laitala, V. *Journal of Fluorescence* **2005**, *15*, 529. (b) Yuan, J. L.; Wang, G. L. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **2006**, *25*, 490.
(80) Bremer, C.; Ntziachristos, V.; Weissleder, R. *European Radiology* **2003**, *13*, 231.
(81) (a) Klohs, J.; Wunder, A.; Licha, K. *Basic Research in Cardiology* **2008**, *103*, 144. (b) Escobedo, J. O.; Rusin, O.; Lim, S.; Strongin, R. M. *Current Opinion in Chemical Biology* **2010**, *14*, 64. (c) Luo, S. L.; Zhang, E. L.; Su, Y. P.; Cheng, T. M.; Shi, C. M. *Biomaterials* **2011**, *32*, 7127. (d) Pansare, V. J.; Hejazi, S.; Faenza, W. J.; Prud'homme, R. K. *Chemistry of Materials* **2012**, *24*, 812.
(82) Joshi, B. P.; Wang, T. D. *Cancers* **2010**, *2*, 1251.
(83) (a) Roubinet, B.; Renard, P. Y.; Romieu, A. *Dyes and Pigments* **2014**, *110*, 270. (b) Roubinet, B.; Bailly, L.; Petit, E.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. *Tetrahedron Letters* **2015**, *56*, 1015.
(84) (a) Jose, J.; Ueno, Y.; Burgess, K. *Chemistry-a European Journal* **2009**, *15*, 418. (b) Jose, J.; Burgess, K. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 11021.
(85) (a) Chevalier, A.; Renard, P. Y.; Romieu, A. *Chemistry-a European Journal* **2014**, *20*, 8330. (b) Chevalier, A.; Renault, K.; Boschetti, F.; Renard, P. Y.; Romieu, A. *European Journal of Organic Chemistry* **2015**, 152.
(86) (a) Loudet, A.; Burgess, K. *Chemical Reviews* **2007**, *107*, 4891. (b) Ulrich, G.; Ziessel, R.; Harriman, A. *Angewandte Chemie-International Edition* **2008**, *47*, 1184. (c) Niu, S. L.; Massif, C.; Ulrich, G.; Renard, P. Y.; Romieu, A.; Ziessel, R. *Chemistry-a European Journal* **2012**, *18*, 7229.
(87) Reynolds, G. A.; Drexhage, K. H. *Journol of Organic Chemistry* **1977**, *42*, 885.
(88) (a) Li, X. H.; Gao, X. H.; Shi, W.; Ma, H. M. *Chemical Reviews* **2014**, *114*, 590. (b) Chen, X. Q.; Pradhan, T.; Wang, F.; Kim, J. S.; Yoon, J. *Chemical Reviews* **2012**, *112*, 1910.
(89) (a) Zhang, W.; Ma, Z.; Du, L. P.; Li, M. Y. *Analyst* **2014**, *139*, 2641. (b) Kobayashi, H.; Choyke, P. L. *Accounts of Chemical Research* **2011**, *44*, 83.
(90) Myochin, T.; Kiyose, K.; Hanaoka, K.; Kojima, H.; Terai, T.; Nagano, T. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 3401.
(91) Zhang, X. X.; Wang, Z.; Yue, X. Y.; Ma, Y.; Kiesewetter, D. O.; Chen, X. Y. *Molecular Pharmaceutics* **2013**, *10*, 1910.
(92) Ipuy, M.; Billon, C.; Micouin, G.; Samarut, J.; Andraud, C.; Bretonniere, Y. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2014**, *12*, 3641.
(93) Li, J. B.; Chen, K.; Liu, H. G.; Cheng, K.; Yang, M.; Zhang, J. P.; Cheng, J. D.; Zhang, Y.; Cheng, Z. *Bioconjugate Chemistry* **2012**, *23*, 1704.
(94) van Dam, G. M.; Themelis, G.; Crane, L. M. A.; Harlaar, N. J.; Pleijhuis, R. G.; Kelder, W.; Sarantopoulos, A.; de Jong, J. S.; Arts, H. J. G.; van der Zee, A. G. J.; Bart, J.; Low, P. S.; Ntziachristos, V. *Nature Medicine* **2011**, *17*, 1315.
(95) Redon, S.; Massin, J.; Pouvreau, S.; De Meulenaere, E.; Clays, K.; Queneau, Y.; Andraud, C.; Girard-Egrot, A.; Bretonniere, Y.; Chambert, S. *Bioconjugate Chemistry* **2014**, *25*, 773.
(96) Verbeek, F. P. R.; van der Vorst, J. R.; Tummers, Q. R. J. G.; Boonstra, M. C.; de Rooij, K. E.; Lo ̈wik, C. W. G. M.; Valentijn, A. R. P. M.; van de Velde, C. J. H.; Choi, H. S.; Frangioni, J. V.; Vahrmeijer, A. L. *Annals of Surgical Oncology* **2014**, *21*, 528.
(97) Achilefu, S.; Jimenez, H. N.; Dorshow, R. B.; Bugaj, J. E.; Webb, E. G.; Wilhelm, R. R.; Rajagopalan, R.; Johler, J.; Erion, J. L. *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45*, 2003.
(98) van Driel, P. B. A. A.; van der Vorst, J. R.; Verbeek, F. P. R.; Oliveira, S.; Snoeks, T. J. A.; Keereweer, S.; Chan, B.; Boonstra, M. C.; Frangioni, J. V.; van Bergen en Henegouwen, P. M. P.; Vahrmeijer, A. L.; Lowik, C. W. G. M. *International Journal of Cancer* **2014**, *134*, 2663.
(99) Smith, A. M.; Duan, H. W.; Mohs, A. M.; Nie, S. M. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60*, 1226.
(100) Marti-Bonmati, L.; Sopena, R.; Bartumeus, P.; Sopena, P. *Contrast Media & Molecular Imaging* **2010**, *5*, 180.
(101) Cherry, S. R. *Seminars in Nuclear Medicine* **2009**, *39*, 348.
(102) (a) Sauter, A. W.; Wehrl, H. F.; Kolb, A.; Judenhofer, M. S.; Pichler, B. J. *Trends in Molecular Medicine* **2010**, *16*, 508. (b) Jadvar, H.; Colletti, P. M. *European Journal of Radiology* **2014**, *83*, 84.

(103) (a) Culver, J.; Akers, W.; Achilefu, S. *Journal of Nuclear Medicine* **2008**, *49*, 169. (b) Thorp-Greenwood, F. L.; Coogan, M. P. *Dalton Transactions* **2011**, *40*, 6129.
(104) (a) Schaafsma, B. E.; Verbeek, F. P. R.; Rietbergen, D. D. D.; van der Hiel, B.; van der Vorst, J. R.; Liefers, G. J.; Frangioni, J. V.; van de Velde, C. J. H.; van Leeuwen, F. W. B.; Vahrmeijer, A. L. *British Journal of Surgery* **2013**, *100*, 1037. (b) Buckle, T.; Kuil, J.; van den Berg, N. S.; Bunschoten, A.; Lamb, H. J.; Yuan, H. H.; Josephson, L.; Jonkers, J.; Borowsky, A. D.; van Leeuwen, F. W. B. *Plos One* **2013**, *8*, e48324.
(105) Chen, Z. Y.; Wang, Y. X.; Lin, Y.; Zhang, J. S.; Yang, F.; Zhou, Q. L.; Liao, Y. Y. *Biomed Research International* **2014**, ID 819324.
(106) (a) Louie, A. Y. *Chemical Reviews* **2010**, *110*, 3146. (b) Cheon, J.; Lee, J. H. *Accounts of Chemical Research* **2008**, *41*, 1630.
(107) (a) Park, J. A.; Kim, J. Y.; Lee, Y. J.; Lee, W.; Lim, S. M.; Kim, T. J.; Yoo, J.; Chang, Y.; Kim, K. M. *Acs Medicinal Chemistry Letters* **2013**, *4*, 216. (b) Notni, J.; Hermann, P.; Dregely, I.; Wester, H. J. *Chemistry-a European Journal* **2013**, *19*, 12602.
(108) de Rosales, R. T. M.; Tavare, R.; Glaria, A.; Varma, G.; Protti, A.; Blower, P. J. *Bioconjugate Chemistry* **2011**, *22*, 455.
(109) de Rosales, R. T. M. *Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals* **2014**, *57*, 298.
(110) Kim, J.; Pandya, D. N.; Lee, W.; Park, J. W.; Kim, Y. J.; Kwak, W.; Ha, Y. S.; Chang, Y.; An, G. I.; Yoo, J. *Acs Medicinal Chemistry Letters* **2014**, *5*, 390.
(111) (a) Zhang, Y.; Yang, Y. A.; Cai, W. B. *Theranostics* **2011**, *1*, 135. (b) Seibold, U.; Wangler, B.; Schirrmacher, R.; Wangler, C. *Biomed Research International* **2014**, ID 153741. (c) Liu, Y.; Yu, G.; Tian, M.; Zhang, H. *Contrast Media & Molecular Imaging* **2011**, *6*, 169.
(112) (a) Lutje, S.; Rijpkema, M.; Franssen, G. M.; Fracasso, G.; Helfrich, W.; Eek, A.; Oyen, W. J.; Colombatti, M.; Boerman, O. C. *Journal of Nuclear Medicine* **2014**, *55*, 995. (b) Hong, H.; Zhang, Y.; Severin, G. W.; Yang, Y. N.; Engle, J. W.; Niu, G.; Nickles, R. J.; Chen, X. Y.; Leigh, B. R.; Barnhart, T. E.; Cai, W. B. *Molecular Pharmaceutics* **2012**, *9*, 2339. (c) Paudyal, P.; Paudyal, B.; Iida, Y.; Oriuchi, N.; Hanaoka, H.; Tominaga, H.; Ishikita, T.; Yoshioka, H.; Higuchi, T.; Endo, K. *Oncology Reports* **2009**, *22*, 115.
(113) Huang, M.; Xiong, C. Y.; Lu, W.; Zhang, R.; Zhou, M.; Huang, Q.; Weinberg, J.; Li, C. *Molecular Imaging and Biology* **2014**, *16*, 74.
(114) (a) Kuil, J.; Velders, A. H.; van Leeuwen, F. W. B. *Bioconjugate Chemistry* **2010**, *21*, 1709. (b) Bunschoten, A.; Welling, M. M.; Tennaat, M. F.; Sathekge, M.; van Leeuwen, F. W. B. *Bioconjugate Chemistry* **2013**, *24*, 1971.
(115) Xu, J.; Eck, P. K.; Baidoo, K. E.; Choyke, P. L.; Brechbiel, M. W. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, *17*, 5176.
(116) Azhdarinia, A.; Wilganowski, N.; Robinson, H.; Ghosh, P.; Kwon, S.; Lazard, Z. W.; Davis, A. R.; Olmsted-Davis, E.; Sevick-Muraca, E. M. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, *19*, 3769.
(117) Frullano, L.; Meade, T. J. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2007**, *12*, 939.
(118) Rivas, C.; Stasiuk, G. J.; Gallo, J.; Minuzzi, F.; Rutter, G. A.; Long, N. J. *Inorganic Chemistry* **2013**, *52*, 14284.
(119) Nakamura, T.; Kawano, K.; Shiraishi, K.; Yokoyama, M.; Maitani, Y. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **2014**, *37*, 521.
(120) Xie, J.; Chen, K.; Huang, J. *Nanomedicine* **2010**, *5*, 689.
(121) Teng, F.; Meng, X.; Sun, X.; Yu, J. *International Journal of Nanomedicine* **2013**, *8*, 3703.
(122) (a) Rai, P.; Mallidi, S.; Zheng, X.; Rahmanzadeh, R.; Mir, Y.; Elrington, S.; Khurshid, A.; Hasan, T. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, *62*, 1094. (b) Caldorera-Moore, M. E.; Liechty, W. B.; Peppas, N. A. *Accounts of Chemical Research* **2011**, *44*, 1061.
(123) Ferrara, K. W.; Borden, M. A.; Zhang, H. *Accounts of Chemical Research* **2009**, *42*, 881.
(124) (a) Linstead, R. P. *J. Chem. Soc.* **1934**, 1016. (b) Byrne, G. T.; Linstead, R. P.; Lowe, A. R. *J. Chem. Soc.* **1934**, 1017. (c) Linstead, R. P.; Lowe, A. R. *J. Chem. Soc.* **1934**, 1022. (d) Dent, C. E.; Linstead, R. P. *J. Chem. Soc.* **1934**, 1027. (e) Linstead, R. P.; Lowe, A. R. *J. Chem. Soc.* **1934**, 1031. (f) Dent, C. E.; Linstead, R. P.; Lowe, A. R. *J. Chem. Soc.* **1934**, 1033.
(125) Nemykin, V. N.; Lukyanets, E. A. *Arkivoc* **2010**, 136.
(126) Kadish, K.; Guilard, R.; Smith, K. *The Porphyrin handbook* **2003**, *17*.
(127) Kadish, K.; Guilard, R.; Smith, K. *The porphyrin Handbook* **2003**, *16*.
(128) (a) Kadish, K.; Guilard, R.; Smith, K. *The Porphyrin Handbook* **2003**, *15*. (b) Kobayashi, N.; Mack, J. *Chemical Reviews* **2011**, *111*, 281.

(129) Arnold, K.; Balaban, T. S.; Blom, M. N.; Ehrler, O. T.; Gilb, S.; Hampe, O.; van Lier, J. E.; Weber, J. M.; Kappes, M. M. *Journal of Physical Chemistry A* **2003**, *107*, 794.

(130) (a) Wang, A. J.; Long, L. L.; Zhang, C. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 2433. (b) Tolbin, A. Y.; Tomilova, L. G.; Zefirov, N. S. *Uspekhi Khimii* **2007**, *76*, 732. (c) Torres, T. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2000**, *4*, 325. (d) Nemykin, V. N.; Dudkin, S. V.; Dumoulin, F.; Hirel, C.; Gurek, A. G.; Ahsen, V. *Arkivoc* **2014**, 142.

(131) (a) Leznoff, C. C.; Mcarthur, C. R.; Qin, Y. N. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* **1993**, *71*, 1319. (b) Hirth, A.; Sobbi, A. K.; Wohrle, D. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **1997**, *1*, 275.

(132) (a) Kobayashi, N.; Kondo, R.; Nakajima, S.-I.; Osa, T. *Journal of the American Chemical Society* **1990**, *112*, 9640. (b) Kobayashi, N.; Ishizaki, T.; Ishii, K.; Konami, H. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 9096.

(133) Lieberman, M.; Li, Z. Y. *Inorganic Chemistry* **2001**, *40*, 932.

(134) (a) Dumoulin, F.; Durmus, M.; Ahsen, V.; Nyokong, T. *Coordination Chemistry Reviews* **2010**, *254*, 2792. (b) Soper, S. A.; Verdree, V. T.; Pakhomov, S.; Su, G.; Allen, M. W.; Countryman, A. C.; Hammer, R. P. *Journal of Fluorescence* **2007**, *17*, 547.

(135) (a) Koifman, O. I.; Hanack, M.; Syrbu, S. A.; Lyubimtsev, A. V. *Russian Chemical Bulletin* **2013**, *62*, 896. (b) Lu, L.; Lv, F.; Cao, B.; He, X. J.; Liu, T. J. *Molecules* **2014**, *19*, 525. (c) Kanat, Z.; Dincer, H. *Dalton Transactions* **2014**, *43*, 8654. (d) Lv, F.; Li, Y. Z.; Cao, B.; Liu, T. J. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* **2013**, *24*, 811. (e) Lv, F.; He, X. J.; Wu, L.; Liu, T. J. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2013**, *23*, 1878. (f) Lv, F.; He, X. J.; Lu, L.; Wu, L.; Liu, T. J. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2012**, *16*, 77. (g) Dumoulin, F.; Ali, H.; Ahsen, V.; van Lier, J. E. *Tetrahedron Letters* **2011**, *52*, 4395. (h) Ribeiro, A. O.; Tome, J. P. C.; Neves, M. G. P. M. S.; Tome, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Iamamoto, Y.; Torres, T. *Tetrahedron Letters* **2006**, *47*, 9177. (i) Aggarwal, A.; Singh, S.; Zhang, Y. Z.; Anthes, M.; Samaroo, D.; Gao, R. M.; Drain, C. M. *Tetrahedron Letters* **2011**, *52*, 5456.

(136) (a) Guzel, E.; Atsay, A.; Nalbantoglu, S.; Saki, N.; Dogan, A. L.; Gul, A.; Kocak, M. B. *Dyes and Pigments* **2013**, *97*, 238. (b) Mantareva, V.; Kussovski, V.; Angelov, I.; Borisova, E.; Avramov, L.; Schnurpfeil, G.; Wohrle, D. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007**, *15*, 4829. (c) van Lier, J. E.; Tian, H. J.; Ali, H.; Cauchon, N.; Hassessian, H. N. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *52*, 4107. (d) Luan, L. Q.; Ding, L. L.; Zhang, W. J.; Shi, J. W.; Yu, X. Q.; Liu, W. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2013**, *23*, 3775. (e) Li, Y. J.; Pritchett, T. M.; Huang, J. D.; Ke, M. R.; Shao, P.; Sun, W. F. *Journal of Physical Chemistry A* **2008**, *112*, 7200.

(137) (a) Tasso, T. T.; Yamasaki, Y.; Furuyama, T.; Kobayashi, N. *Dalton Transactions* **2014**, *43*, 5886. (b) Moeno, S.; Krause, R. W. M.; Ermilov, E. A.; Kuzyniak, W.; Hopfner, M. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2014**, *13*, 963. (c) Cakir, V.; Cakir, D.; Biyiklioglu, Z.; Kantekin, H. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2014**, *78*, 61. (d) Makhseed, S.; Machacek, M.; Alfadly, W.; Tuhl, A.; Vinodh, M.; Simunek, T.; Novakova, V.; Kubat, P.; Rudolf, E.; Zimcik, P. *Chemical Communications* **2013**, *49*, 11149. (e) Wang, A.; Zhou, L.; Fang, K. L.; Zhou, L.; Lin, Y.; Zhou, J. H.; Wei, S. H. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *58*, 12. (f) Acar, I.; Cakir, V.; Biyiklioglu, Z.; Kantekin, H. *Synthetic Metals* **2012**, *162*, 1546. (g) Nyokong, T.; Nombona, N.; Antunes, E. *Dyes and Pigments* **2010**, *86*, 68. (h) Durmus, M.; Biyiklioglu, Z.; Kantekin, H. *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry* **2010**, *211*, 32. (i) Idowu, M.; Nyokong, T. *Polyhedron* **2009**, *28*, 416. (j) Durmus, M.; Erdogmus, A.; Ogunsipe, A.; Nyokong, T. *Dyes and Pigments* **2009**, *82*, 244. (k) Li, H. R.; Jensen, T. J.; Fronczek, F. R.; Vicente, M. G. H. *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, *51*, 502. (l) Durmus, M.; Nyokong, T. *Inorganic Chemistry Communications* **2007**, *10*, 332(m) Dabak, S.; Bekaroglu, O. *Journal of Chemical Research-S* **1997**, 8. (n) Cakir, D.; Cakir, V.; Biyiklioglu, Z.; Durmus, M.; Kantekin, H. *Journal of Organometallic Chemistry* **2013**, *745*, 423. (o) Ahsen, V.; Durmus, M. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2010**, *104*, 297.

(138) Vincett, P. S.; Voigt, E. M.; Rieckhoff, K. E. *Journal of Chemical Physics* **1971**, *55*, 4131.

(139) Dumoulin, F.; Zorlu, Y.; Durmus, M.; Ahsen, V. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 3248.

(140) Topal, S. Z.; Isci, U.; Kumru, U.; Atilla, D.; Gurek, A. G.; Hirel, C.; Durmus, M.; Tommasino, J. B.; Luneau, D.; Berber, S.; Dumoulin, F.; Ahsen, V. *Dalton Transactions* **2014**, *43*, 6897.

(141) Atsay, A.; Gul, A.; Kocak, M. B. *Dyes and Pigments* **2014**, *100*, 177.

(142) Furuyama, T.; Satoh, K.; Kushiya, T.; Kobayashi, N. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136*, 765.

(143) Sorokin, A. B. *Chemical Reviews* **2013**, *113*, 8152.
(144) (a) Walter, M. G.; Rudine, A. B.; Wamser, C. C. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2010**, *14*, 759. (b) Ince, M.; Cardinali, F.; Yum, J. H.; Martinez-Diaz, M. V.; Nazeeruddin, M. K.; Gratzel, M.; Torres, T. *Chemistry-a European Journal* **2012**, *18*, 6343. (c) Ikeuchi, T.; Nomoto, H.; Masaki, N.; Griffith, M. J.; Mori, S.; Kimura, M. *Chemical Communications* **2014**, *50*, 1941.
(145) (a) Chen, Y.; Gao, L.; Feng, M.; Gu, L. L.; He, N.; Wang, J.; Araki, Y.; Blau, W. J.; Ito, O. *Mini-Reviews in Organic Chemistry* **2009**, *6*, 55. (b) Claessens, C. G.; Blau, W. J.; Cook, M.; Hanack, M.; Nolte, R. J. M.; Torres, T.; Wohrle, D. *Monatshefte für Chemie* **2001**, *132*, 3. (c) Ayhan, M. M.; Singh, A.; Jeanneau, E.; Ahsen, V.; Zyss, J.; Ledoux-Rak, I.; Gurek, A. G.; Hirel, C.; Bretonniere, Y.; Andraud, C. *Inorganic Chemistry* **2014**, *53*, 4359.
(146) Hong, X. P.; Zhu, Y.; Zhang, Y. Z. *Journal of Zhejiang University-Science B* **2012**, *13*, 503.
(147) (a) Sekkat, N.; van den Bergh, H.; Nyokong, T.; Lange, N. *Molecules* **2012**, *17*, 98. (b) Jiang, Z.; Shao, J. W.; Yang, T. T.; Wang, J.; Jia, L. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2014**, *87*, 98. (c) Kadish, K.; Guilard, R.; Smith, K. *The Porphyrin Handbook* **2003**, *19*.
(148) (a) Carcenac, M.; Dorvillius, M.; Garambois, V.; Glaussel, F.; Larroque, C.; Langlois, R.; Hynes, N. E.; van Lier, J. E.; Pelegrin, A. *British Journal of Cancer* **2001**, *85*, 1787. (b) Vrouenraets, M. B.; Visser, G. W. M.; Stigter, M.; Oppelaar, H.; Snow, G. B.; van Dongen, G. A. M. S. *Cancer Research* **2001**, *61*, 1970.
(149) Patel, P.; Patel, H. H.; Borland, E.; Gorun, S. M.; Sabatino, D. *Chemical Communications* **2014**, *50*, 6309.
(150) Khoza, P.; Antunes, E.; Chen, J. Y.; Nyokong, T. *Journal of Luminescence* **2013**, *134*, 784.
(151) Novakova, V.; Zimcik, P.; Miletin, M.; Kopecky, K.; Ivincova, J. *Tetrahedron Letters* **2010**, *51*, 1016.
(152) Zhang, F. L.; Huang, Q.; Zheng, K.; Li, J.; Liu, J. Y.; Xue, J. P. *Chemical Communications* **2013**, *49*, 9570.
(153) (a) Dubuc, C.; Langlois, R.; Benard, F.; Cauchon, N.; Klarskov, K.; Tone, P.; van Lier, J. E. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2008**, *18*, 2424. (b) Ali, H.; Ait-Mohand, S.; Gosselin, S.; van Lier, J. E.; Guerin, B. *Journal of Organic Chemistry* **2011**, *76*, 1887. (c) Ranyuk, E.; Cauchon, N.; Klarskov, K.; Guerin, B.; van Lier, J. E. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *56*, 1520.
(154) Ongarora, B. G.; Fontenot, K. R.; Hu, X. K.; Sehgal, I.; Satyanarayana-Jois, S. D.; Vicente, D. G. H. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55*, 3725.
(155) (a) de Oliveira, C. A.; Machado, A. E. H.; Pessine, F. B. T. *Chemistry and Physics of Lipids* **2005**, *133*, 69. (b) de Oliveira, C. A.; Kohn, L. K.; Antonio, M. A.; Carvalho, J. E.; Moreira, M. R.; Machado, A. E. H.; Pessine, F. B. T. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* **2010**, *100*, 92.
(156) (a) Marino, J.; Vior, M. C. G.; Furmento, V. A.; Blank, V. C.; Awruch, J.; Roguin, L. P. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2013**, *45*, 2553. (b) Scalise, N.; Durantini, E. N. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2005**, *13*, 3037. (c) Hu, M.; Brasseur, N.; Yildiz, S. Z.; van Lier, J. E.; Leznoff, C. C. *Journal of Medicinal Chemistry* **1998**, *41*, 1789.
(157) (a) Acedo, P.; Stockert, J. C.; Canete, M.; Villanueva, A. *Cell Death & Disease* **2014**, *5*. (b) Nyokong, T. *Pure and Applied Chemistry* **2011**, *83*, 1763. (c) Bio, M.; Rajaputra, P.; Nkepang, G.; You, Y. J. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *57*, 3401. (d) Kandoth, N.; Kirejev, V.; Monti, S.; Gref, R.; Ericson, M. B.; Sortino, S. *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 1768.
(158) (a) Brasseur, N.; Ouellet, R.; La Madeleine, C.; van Lier, J. E. *British Journal of Cancer* **1999**, *80*, 1533. (b) Taratula, O.; Schumann, C.; Naleway, M. A.; Pang, A. J.; Chon, K. J.; Taratula, O. *Molecular Pharmaceutics* **2013**, *10*, 3946.
(159) He, H.; Lo, P. C.; Ng, D. K. P. *Chemistry-a European Journal* **2014**, *20*, 6241.
(160) Ranyuk, E. R.; Cauchon, N.; Ali, H.; Lecomte, R.; Guerin, B.; van Lier, J. E. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *21*, 7470.
(161) Ranyuk, E.; Ali, H.; Guerin, B.; van Lier, J. E. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2013**, *17*, 850.
(162) Ranyuk, E.; Lebel, R.; Berube-Lauziere, Y.; Klarskov, K.; Lecomte, R.; van Lier, J. E.; Guerin, B. *Bioconjugate Chemistry* **2013**, *24*, 1624.
(163) Tekdas, D.; Garifullin, R.; Senturk, B.; Zorlu, Y.; Gundogdu, U.; Atalar, E.; Tekinay, A. B.; Chernonosov, A. A.; Yerli, Y.; Dumoulin, F.; Guler, M. O.; Ahsen, V.; A., G. G. *Photochemistry and Photobiology* **2014**, *90*, 1376.

(164) (a) Piskorz, J.; Skupin, P.; Lijewski, S.; Korpusinski, M.; Sciepura, M.; Konopka, K.; Sobiak, S.; Goslinski, T.; Mielcarek, J. *Journal of Fluorine Chemistry* **2012**, *135*, 265. (b) Sholto, A.; Lee, S.; Hoffman, B. M.; Barrett, A. G. M.; Ehrenberg, B. *Photochemistry and Photobiology* **2008**, *84*, 764.
(165) Horne, T. K.; Cronje, M. J. *Photochemistry and Photobiology* **2014**, *90*, 648.
(166) Trivedi, E. R.; Harney, A. S.; Olive, M. B.; Podgorski, I.; Moin, K.; Sloane, B. F.; Barrett, A. G. M.; Meade, T. J.; Hoffman, B. M. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, *107*, 1284.
(167) (a) Song, Y.; Zong, H.; Trivedi, E. R.; Vesper, B. J.; Waters, E. A.; Barrett, A. G. M.; Radosevich, J. A.; Hoffman, B. M.; Meade, T. J. *Bioconjugate Chemistry* **2010**, *21*, 2267. (b) Trivedi, E. R.; Ma, Z. D.; Waters, E. A.; Macrenaris, K. W.; Subramanian, R.; Barrett, A. G. M.; Meade, T. J.; Hoffman, B. M. *Contrast Media & Molecular Imaging* **2014**, *9*, 313.
(168) Zimcik, P.; Novakova, V.; Kopecky, K.; Miletin, M.; Kobak, R. Z. U.; Svandrlikova, E.; Vachova, L.; Lang, K. *Inorganic Chemistry* **2012**, *51*, 4215.
(169) (a) Kopecky, K.; Satinsky, D.; Novakova, V.; Miletin, M.; Svoboda, A.; Zimcik, P. *Dyes and Pigments* **2011**, *91*, 112. (b) Kopecky, K.; Novakova, V.; Miletin, M.; Kucera, R.; Zimcik, P. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 5956. (c) Kopecky, K.; Novakova, V.; Miletin, M.; Kucera, R.; Zimcik, P. *Bioconjugate Chemistry* **2010**, *21*, 1872.
(170) Novakova, V.; Miletin, M.; Kopecky, K.; Zimcik, P. *Chemistry-a European Journal* **2011**, *17*, 14273.
(171) Spikes, J. D.; van Lier, J. E.; Bommer, J. C. *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry* **1995**, *91*, 193.
(172) Hill, R. A.; Garrett, J.; Reddi, S.; Esterowitz, T.; Liaw, L. H.; Ryan, J.; Shirk, J.; Kenney, M.; Shimuzu, S.; Berns, M. W. *Lasers in Surgery and Medicine* **1996**, *18*, 86.
(173) Song, L. P.; Li, H.; Sunar, U.; Chen, J.; Corbin, I.; Yodh, A. G.; Zheng, G. *International Journal of Nanomedicine* **2007**, *2*, 767.
(174) Meller, A.; Ossko, A. *Monatsh. Chem.* **1972**, *103*, 150.
(175) Kietaibl, H. *Monatsh. Chem.* **1974**, *105*, 405.
(176) (a) Claessens, C. G.; Gonzalez-Rodriguez, D.; Torres, T. *Chemical Reviews* **2002**, *102*, 835. (b) Tolbin, A. Y.; Tomilova, L. G. *Russian Chemical Reviews* **2011**, *80*, 531. (c) Claessens, C. G.; Gonzalez-Rodriguez, D.; Rodriguez-Morgade, M. S.; Medina, A.; Torres, T. *Chemical Reviews* **2014**, *114*, 2192.
(177) Claessens, C. G.; Gonzalez-Rodriguez, D.; del Rey, B.; Torres, T.; Mark, G.; Schuchmann, H. P.; von Sonntag, C.; MacDonald, J. G.; Nohr, R. S. *European Journal of Organic Chemistry* **2003**, 2547.
(178) Torres, T.; Claessens, C. G.; Gonzalez-Rodriguez, D.; Mccallum, C. M.; Nohr, R. S.; Schuchmann, H. P. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2007**, *11*, 181.
(179) (a) Hanack, M.; Geyer, M. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* **1994**, 2253. (b) Claessens, C. G.; Torres, T. *Chemistry-a European Journal* **2000**, *6*, 2168. (c) Claessens, C. G.; Torres, T. *Tetrahedron Letters* **2000**, *41*, 6361.
(180) Shibata, N.; Das, B.; Tokunaga, E.; Shiro, M.; Kobayashi, N. *Chemistry-a European Journal* **2010**, *16*, 7554.
(181) Morse, G. E.; Castrucci, J. S.; Helander, M. G.; Lu, Z. H.; Bender, T. P. *Acs Applied Materials & Interfaces* **2011**, *3*, 3538.
(182) (a) Ziessel, R.; Camerel, F.; Ulrich, G.; Retailleau, P. *Angewandte Chemie-International Edition* **2008**, *47*, 8876. (b) Ziessel, R.; Ulrich, G.; Elliott, K. J.; Harriman, A. *Chemistry-a European Journal* **2009**, *15*, 4980.
(183) (a) Gonzalez-Rodriguez, D.; Guilleme, J.; Torres, T. *Angewandte Chemie-International Edition* **2011**, *50*, 3506. (b) Paton, A. S.; Morse, G. E.; Castelino, D.; Bender, T. P. *Journal of Organic Chemistry* **2012**, *77*, 2531.
(184) (a) Brisson, E. R. L.; Paton, A. S.; Morse, G. E.; Bender, T. P. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2011**, *50*, 10910. (b) del Rey, B.; Keller, U.; Torres, T.; Rojo, G.; Agullo-Lopez, F.; Nonell, S.; Marti, C.; Brasselet, S.; Ledoux, I.; Zyss, J. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 12808. (c) Kamino, B. A.; Bender, T. P. *Dalton Transactions* **2013**, *42*, 13145.
(185) (a) Durantini, E. N.; Spesia, M. B. *Dyes and Pigments* **2008**, *77*, 229. (b) Xu, H.; Ng, D. K. P. *Chemistry-an Asian Journal* **2009**, *4*, 104. (c) Lapok, L.; Claessens, C. G.; Wohrle, D.; Torres, T. *Tetrahedron Letters* **2009**, *50*, 2041.

(186) (a) Kudrevich, S. V.; Gilbert, S.; vanLier, J. E. *Journal of Organic Chemistry* **1996**, *61*, 5706. (b) Kudrevich, S.; Brasseur, N.; LaMadeleine, C.; Gilbert, S.; vanLier, J. E. *Journal of Medicinal Chemistry* **1997**, *40*, 3897.

(187) (a) Gommans, H.; Cheyns, D.; Aernouts, T.; Girotto, C.; Poortmans, J.; Heremans, P. *Advanced Functional Materials* **2007**, *17*, 2653. (b) Gommans, H.; Aernouts, T.; Verreet, B.; Heremans, P.; Medina, A.; Claessens, C. G.; Torres, T. *Advanced Functional Materials* **2009**, *19*, 3435. (c) Heremans, P.; Cheyns, D.; Rand, B. P. *Accounts of Chemical Research* **2009**, *42*, 1740. (d) Mauldin, C. E.; Piliego, C.; Poulsen, D.; Unruh, D. A.; Woo, C.; Ma, B. W.; Mynar, J. L.; Frechet, J. M. J. *Acs Applied Materials & Interfaces* **2010**, *2*, 2833. (e) Kim, J. Y.; Noh, S.; Nam, Y. M.; Kim, J. Y.; Roh, J.; Park, M.; Amsden, J. J.; Yoon, D. Y.; Lee, C.; Jo, W. H. *Acs Applied Materials & Interfaces* **2011**, *3*, 4279. (f) Luhman, W. A.; Holmes, R. J. *Advanced Functional Materials* **2011**, *21*, 764. (g) Beaumont, N.; Cho, S. W.; Sullivan, P.; Newby, D.; Smith, K. E.; Jones, T. S. *Advanced Functional Materials* **2012**, *22*, 561. (h) Chou, C. T.; Tang, W. L.; Tai, Y. A.; Lin, C. H.; Liu, C. H. J.; Chen, L. C.; Chen, K. H. *Thin Solid Films* **2012**, *520*, 2289. (i) Mutolo, K. L.; Mayo, E. I.; Rand, B. P.; Forrest, S. R.; Thompson, M. E. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 8108.

(188) (a) El-Khouly, M. E.; Ju, D. K.; Kay, K. Y.; D'Souza, F.; Fukuzumi, S. *Chemistry-a European Journal* **2010**, *16*, 6193. (b) El-Khouly, M. E.; Ryu, J. B.; Kay, K. Y.; Ito, O.; Fukuzumi, S. *Journal of Physical Chemistry C* **2009**, *113*, 15444. (c) Xu, H.; Ng, D. K. P. *Inorganic Chemistry* **2008**, *47*, 7921.

(189) (a) Tolbin, A. Y.; Tomilova, L. G. *Mendeleev Communications* **2008**, *18*, 286. (b) Tolbin, A. Y.; Breusova, M. O.; Pushkarev, V. E.; Tomiloval, L. G. *Russian Chemical Bulletin* **2005**, *54*, 2083.

(190) (a) Cetindere, S.; Cosut, B.; Yesilot, S.; Durmus, M.; Kilic, A. *Dyes and Pigments* **2014**, *101*, 234. (b) Liu, J. Y.; Yeung, H. S.; Xu, W.; Li, X. Y.; Ng, D. K. P. *Organic Letters* **2008**, *10*, 5421.

(191) (a) Romero-Nieto, C.; Guilleme, J.; Fernandez-Ariza, J.; Rodriguez-Morgade, M. S.; Gonzalez-Rodriguez, D.; Torres, T.; Guldi, D. M. *Organic Letters* **2012**, *14*, 5656. (b) El-Khouly, M. E.; Kim, J. H.; Kim, J. H.; Kay, K. Y.; Fukuzumi, S. *Journal of Physical Chemistry C* **2012**, *116*, 19709. (c) Nieto, C. R.; Guilleme, J.; Villegas, C.; Delgado, J. L.; Gonzalez-Rodriguez, D.; Martin, N.; Torres, T.; Guldi, D. M. *Journal of Materials Chemistry* **2011**, *21*, 15914.

(192) (a) Sanchez-Molina, I.; Grimm, B.; Calderon, R. M. K.; Claessens, C. G.; Guldi, D. M.; Torres, T. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 10503. (b) Guldi, D. M.; Gonzalez-Rodriguez, D.; Carbonell, E.; Rojas, G. D.; Castellanos, C. A.; Torres, T. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 16488. (c) Gonzalez-Rodriguez, D.; Carbonell, E.; Guldi, D. M.; Torres, T. *Angewandte Chemie-International Edition* **2009**, *48*, 8032. (d) E-Khouly, M. E.; Shim, S. H.; Araki, Y.; Ito, O.; Kay, K. Y. *Journal of Physical Chemistry B* **2008**, *112*, 3910. (e) Claessens, C. G.; Gonzalez-Rodriguez, D.; Iglesias, R. S.; Torres, T. *Comptes Rendus Chimie* **2006**, *9*, 1094. (f) Gonzalez- Rodriguez, D.; Torres, T.; Guldi, D. M.; Rivera, J.; Herranz, M. A.; Echegoyen, L. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 6301. (g) Gonzalez-Rodriguez, D.; Torres, T.; Guldi, D. M.; Rivera, J.; Echegoyen, L. *Organic Letters* **2002**, *4*, 335.

(193) (a) Dini, D.; Vagin, S.; Hanack, M.; Amendola, V.; Meneghetti, M. *Chemical Communications* **2005**, 3796. (b) Martin, G.; Rojo, G.; Agullo-Lopez, F.; Ferro, V. R.; de la Vega, J. M. G.; Martinez-Diaz, M. V.; Torres, T.; Ledoux, I.; Zyss, J. *Journal of Physical Chemistry B* **2002**, *106*, 13139. (c) Liang, Z. J.; Tang, F. L.; Gan, F. X.; Sun, Z. R.; Yang, X. H.; Ding, L. E.; Wang, Z. G. *Acta Physica Sinica* **2000**, *49*, 252. (d) Rojo, G.; Hierro, A.; DiazGarcia, M. A.; AgulloLopez, F.; delRey, B.; Sastre, A.; Torres, T. *Applied Physics Letters* **1997**, *70*, 1802. (e) Claessens, C. G.; Gonzalez-Rodriguez, D.; Torres, T.; Martin, G.; Agullo-Lopez, F.; Ledoux, I.; Zyss, J.; Ferro, V. R.; de la Vega, J. M. G. *Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109*, 3800.

(194) Palomares, E.; Martinez-Diaz, M. V.; Torres, T.; Coronado, E. *Advanced Functional Materials* **2006**, *16*, 1166.

(195) Klaus, D.; Knecht, R.; Dragasser, A.; Keil, C.; Schlettwein, D. *Physica Status Solidi a-Applications and Materials Science* **2009**, *206*, 2723.

(196) (a) Chen, Y. H.; Chang, Y. J.; Lee, G. R.; Chang, J. H.; Wu, I. W.; Fang, J. H.; Hsu, S. H.; Liu, S. W.; Wu, C. I.; Pi, T. W. *Organic Electronics* **2010**, *11*, 445. (b) Helander, M. G.; Morse, G. E.; Qiu, J.; Castrucci, J. S.; Bender, T. P.; Lu, Z. H. *Acs Applied Materials & Interfaces* **2010**, *2*, 3147. (c) Morse, G. E.; Helander, M. G.; Maka, J. F.; Lu, Z. H.; Bender, T. P. *Acs Applied Materials & Interfaces* **2010**, *2*, 1934. (d) Wu, C. I.; Chen, Y. H.; Cheng, Y. J.; Lee, G. R.; Pi, T. W. *Organic Electronics* **2011**, *12*, 562.

(197) Awasthi, K.; Nakamura, K.; Kono, H.; Kobayashi, N.; Ohta, N. *Chemical Physics Letters* **2014**, *599*, 163.
(198) Adachi, K.; Watarai, H. *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 6840.
(199) Donyagina, V. F.; Shimizu, S.; Kobayashi, N.; Lukyanets, E. A. *Tetrahedron Letters* **2008**, *49*, 6152.
(200) Gresser, R.; Hummert, M.; Hartmann, H.; Leo, K.; Riede, M. *Chemistry-a European Journal* **2011**, *17*, 2939.
(201) (a) Meiss, J.; Holzmueller, F.; Gresser, R.; Leo, K.; Riede, M. *Applied Physics Letters* **2011**, *99*. (b) Mueller, T.; Gresser, R.; Leo, K.; Riede, M. *Solar Energy Materials and Solar Cells* **2012**, *105*, 328.
(202) Liu, H. Z.; Mack, J.; Guo, Q. L.; Lu, H.; Kobayashi, N.; Shen, Z. *Chemical Communications* **2011**, *47*, 12092.
(203) Wohrle, D.; Eskes, M.; Shigehara, K.; Yamada, A. *Synthesis-Stuttgart* **1993**, 194.
(204) (a) Agag, T.; Arza, C. R.; Maurer, F. H. J.; Ishida, H. *Macromolecules* **2010**, *43*, 2748. (b) Latli, B.; Hrapchak, M.; Switek, H. K.; Retz, D. M.; Krishnamurthy, D.; Senanayake, C. H. *Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals* **2010**, *53*, 15.
(205) Kamino, B. A.; Morse, G. E.; Bender, T. P. *Journal of Physical Chemistry C* **2011**, *115*, 20716.
(206) Semenishyn, N.; Gross, Z. *Dalton Transactions* **2013**, *42*, 3775.
(207) (a) Bernhard, C.; Goze, C.; Rousselin, Y.; Denat, F. *Chemical Communications* **2010**, *46*, 8267. (b) Chaudhry, A. F.; Verma, M.; Morgan, M. T.; Henary, M. M.; Siegel, N.; Hales, J. M.; Perry, J. W.; Fahrni, C. J. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 737.
(208) Barge, A.; Cravotto, G.; Gianolio, E.; Fedeli, F. *Contrast Media & Molecular Imaging* **2006**, *1*, 184.
(209) Eggenspiller, A. *Thesis of University of Burgundy* **2012**, 150.
(210) Sharman, W. M.; van Lier, J. E. *Bioconjugate Chemistry* **2005**, *16*, 1166.
(211) (a) Chauhan, S. M. S.; Kumari, P. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 2518. (b) Sastre, A.; delRey, B.; Torres, T. *Journal of Organic Chemistry* **1996**, *61*, 8591.
(212) Morse, G. E.; Bender, T. P. *Inorganic Chemistry* **2012**, *51*, 6460.
(213) Ogunsipe, A.; Nyokong, T. *Journal of Molecular Structure* **2004**, *689*, 89.
(214) (a) Hammer, R. P.; Owens, C. V.; Hwang, S. H.; Sayes, C. M.; Soper, S. A. *Bioconjugate Chemistry* **2002**, *13*, 1244. (b) Cong, F. D.; Ning, B.; Du, X. G.; Ma, C. Y.; Yu, H. F.; Chen, B. *Dyes and Pigments* **2005**, *66*, 149.
(215) (a) Cosimelli, B.; Roncucci, G.; Dei, D.; Fantetti, L.; Ferroni, F.; Ricci, M.; Spinelli, D. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 10025. (b) Souza, S. D.; Antunes, E.; Nyokong, T. *Inorganica Chimica Acta* **2011**, *367*, 173. (c) Zhao, B.; Yin, Y.; Wang, J.; Li, Y.; Ma, J.; Gao, J.; Fu, Q. *Journal of Molecular Science* **2004**, 38. (d) Huang, J.; Ke, M. Chinese, Feb 16, 2007; Vol. 200710200223.
(216) Sakamoto, K.; Ohno-Okumura, E.; Kato, T.; Soga, H. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2010**, *14*, 47.
(217) (a) Makhseed, S.; Tuhl, A.; Samuel, J.; Zimcik, P.; Al-Awadi, N.; Novakova, V. *Dyes and Pigments* **2012**, *95*, 351. (b) Swain, D.; Singh, R.; Singh, V. K.; Krishna, N. V.; Giribabu, L.; Rao, S. V. *Journal of Materials Chemistry C* **2014**, *2*, 1711. (c) Novakova, V.; Miletin, M.; Filandrova, T.; Lenco, J.; Ruzicka, A.; Zimcik, P. *Journal of Organic Chemistry* **2014**, *79*, 2082.
(218) Nyokong, T.; Chauke, V.; Durmus, M. *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry* **2007**, *192*, 179.
(219) Al-Raqa, S. Y. *Dyes and Pigments* **2008**, *77*, 259.
(220) Honda, T.; Kojima, T.; Fukuzumi, S. *Chemical Communications* **2011**, *47*, 7986.
(221) Chen, Z. H.; Niu, L. H.; Cheng, Y. H.; Zhou, X. Y.; Zhong, C.; Zhang, F. S. *Dalton Transactions* **2011**, *40*, 393.
(222) Iida, N.; Tokunaga, E.; Saito, N.; Shibita, N. *Journal of Fluorine Chemistry* **2014**, *168*, 93.
(223) (a) Fukuda, T.; Homma, S.; Kobayashi, N. *Chemical Communications* **2003**, 1574. (b) Fukuda, T.; Homma, S.; Kobayashi, N. *Chemistry-a European Journal* **2005**, *11*, 5205. (c) Honda, T.; Kojima, T.; Kobayashi, N.; Fukuzumi, S. *Angewandte Chemie-International Edition* **2011**, *50*, 2725.
(224) (a) Sugimori, T.; Torikata, M.; Nojima, J.; Tominaka, S.; Tobikawa, K.; Handa, M.; Kasuga, K. *Inorganic Chemistry Communications* **2002**, *5*, 1031. (b) Dubinina, T. V.; Trashin, S. A.; Borisova, N. E.; Boginskaya, I. A.; Tomilova, L. G.; Zefirov, N. S. *Dyes and Pigments* **2012**, *93*, 1471.
(225) (a) Ishiyama, T.; Ishida, K.; Miyaura, N. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 9813. (b) Tzschucke, C. C.; Murphy, J. M.; Hartwig, J. F. *Organic Letters* **2007**, *9*, 761.
(226) Sancho, V.; Di Florio, A.; Moody, T. W.; Jensen, R. T. *Current Drug Delivery* **2011**, *8*, 79.
(227) Hong, V.; Presolski, S. I.; Ma, C.; Finn, M. G. *Angewandte Chemie-International Edition* **2009**, *48*, 9879.

(228) Petersen, A. L.; Hansen, A. E.; Gabizon, A.; Andresen, T. L. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, *64*, 1417.
(229) Marsh, D. *Biophysical Journal* **2012**, *102*, 1079.
(230) Bhattacharya, S.; Krishnan-Ghosh, Y. *Langmuir* **2001**, *17*, 2067.
(231) Doyle, E. L.; Hunter, C. A.; Phillips, H. C.; Webb, S. J.; Williams, N. H. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 4593.
(232) Ulrich, G.; Goze, C.; Guardigli, M.; Roda, A.; Ziessel, R. *Angewandte Chemie-International Edition* **2005**, *44*, 3694.
(233) Mosmann, T. *Journal of Immunological Methods* **1983**, *65*, 55.
(234) Paris, J. *Thesis of University of Burgundy* **2013**.
(235) Mirjolet, C.; Papa, A. L.; Crehange, G.; Raguin, O.; Seignez, C.; Paul, C.; Truc, G.; Maingon, P.; Millot, N. *Radiotherapy and Oncology* **2013**, *108*, 136.
(236) (a) Kim, H. J.; Shin, K. J.; Han, M. K.; An, K.; Lee, J. K.; Honma, I.; Kim, H. *Scripta Materialia* **2009**, *61*, 1137. (b) Modisha, P.; Nyokong, T.; Antunes, E. *Journal of Molecular Catalysis a-Chemical* **2013**, *380*, 131.
(237) (a) Ju, S. H.; Han, S.; Kim, J. S. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **2013**, *19*, 272. (b) Li, X. Q.; Cheng, Y.; Liu, L. F.; Mu, J. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **2010**, *353*, 226. (c) Cheng, W. X.; Shen, Y.; Wu, G. Z.; Gu, F.; Zhang, J. C.; Wang, L. J. *Semiconductor Science and Technology* **2010**, *25*. (d) Alves, W.; Ribeiro, A. O.; Pinheiro, M. V. B.; Krarnbrock, K.; El Haber, F.; Froyer, G.; Chauvet, O.; Ando, R. A.; Souza, F. L.; Alves, W. A. *Journal of Physical Chemistry C* **2011**, *115*, 12082.
(238) Srivastava, S.; Awasthi, R.; Tripathi, D.; Rai, M. K.; Agarwal, V.; Agrawal, V.; Gajbhiye, N. S.; Gupta, R. K. *Small* **2012**, *8*, 1099.
(239) Kotagiri, N.; Niedzwiedzki, D. M.; Ohara, K.; Achilefu, S. *Angewandte Chemie-International Edition* **2013**, *52*, 7756.
(240) Mitchell, G. S.; Gill, R. K.; Boucher, D. L.; Li, C. Q.; Cherry, S. R. *Philosophical Transactions of the Royal Society a-Mathematical Physical and Engineering Sciences* **2011**, *369*, 4605.
(241) Gammon, S. T.; Villalobos, V. A.; Roshal, M.; Samrakandi, M.; Piwnica-Worms, D. *Biotechnology Progress* **2009**, *25*, 559.
(242) (a) Bernhard, C.; Moreau, M.; Lhenry, D.; Goze, C.; Boschetti, F.; Rousselin, Y.; Brunotte, F.; Denat, F. *Chemistry-a European Journal* **2012**, *18*, 7834. (b) Bernhard, C. *Thesis of University of Burgundy* **2011**. (c) Moreau, M. *Thesis of University of Burgundy* **2012**.
(243) Jares-Erijman, E. A.; Jovin, T. M. *Nature Biotechnology* **2003**, *21*, 1387.
(244) Gol, C.; Malkoc, M.; Yesilot, S.; Durmus, M. *Dalton Transactions* **2014**, *43*, 7561.
(245) Brouwer, A. M. *Pure and Applied Chemistry* **2011**, *83*, 2213.

COMMUNICATION DES RESULTATS

Publications :

« Phthalocyanine-titanate nanotubes: a promising nanocarrier detectable by optical imaging in the so-called imaging window », J. Paris, Y. Bernhard, J. Boudon, O. Heinz, N. Millot, R. A. Decreau, *RSC Advances*, **2015**, 5, 6315-6322.

« Harnessing medically relevant metals onto water-soluble subphthalocyanine: towards bimodal imaging and theranostics », Y. Bernhard, P. Winckler, J-M. Perriet-Cornet, R. A. Decreau, *Dalton Transactions*, **2015**, 44, 3200-3208.

« Subphthalocyanines: addressing water-solubility, nano-encapsulation, and activation for optical imaging of B16 melanoma cells », Y. Bernhard, P. Winckler, R. Chassagnon, P. Richard, E. Gigot, J-M Perrier-Cornet, R. A. Decreau, *Chemical Communications*, **2014**, 50, 13975-13978.

« Inter/intramolecular Cherenkov radiation energy transfer (CRET) from a fluorophore with a built-in radionuclide », Y. Bernhard, B. Collin, R. A. Decreau, *Chemical Communications*, **2014**, 50, 6711-6713.

« Magneto-optical nanomaterials: a SPIO–phthalocyanine scaffold built step-by-step towards bimodal imaging », J. Boudon, J. Paris, Y. Bernhard, E. Popova, R. A. Decreau, N. Millot, *Chemical Communications*, **2013**, 49, 7394-7396.

Communication orale :

« Synthèse et étude de subphtalocyanine pour l'imagerie optique », Y. Bernhard, 26-27 Mai **2014**, XV^{ème} Journées des Ecoles Doctorales Carnot Pasteur, Besançon.

Communications par affiche :

« Synthèse d'agents multimodaux pour l'imagerie médicale», Y. Bernhard, R. Decreau, 15-16 Juin **2012**, XIII^{ème} Journées des Ecoles Doctorales Carnot Pasteur, Besançon.

« Phthalocyanines and Subphthalocyanines for Multimodal Imaging », Y. Bernhard, J. Paris, J. Boudon, N. Millot, R. Decreau, 10-11 September **2012**, 3rd French-Czech Vltava Chemistry Meeting, Dijon.

« Synthèse de subphtalocyanines fonctionnelles pour une application en imagerie médicale», Y. Bernhard, R. Decreau, 14 Décembre **2012**, Journée Hommage au Professeur Jean Tirouflet, Dijon.

« Synthèse de subphtalocyanines fonctionnelles pour une application en imagerie médicale», Y. Bernhard, R. Decreau, 30-31 Mai **2013**, XIVème Journées des Ecoles Doctorales Carnot Pasteur, Dijon.

« Synthesis of Functionnalized Subphthalocyanines for Optical Imaging », Y. Bernhard, R. Decreau, 4-6 June **2014**, European Molecular Imaging Meeting 2014, Antwerp, Belgium.

« Synthesis of Subphthalocyanines for Optical Imaging », Y. Bernhard, R. Decreau, 22-27 June **2014**, Eighth International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines, ICPP-8, Istanbul, Turkey.

Prix :

31 Mai 2013 : prix du meilleur poster des XVème Journées des Ecoles Doctorales Carnot Pasteur, Dijon.

Le travail présenté dans ce mémoire avait pour but d'étudier le potentiel de nouvelles sondes fluorescentes pour la mise au point d'agents d'imagerie optique et d'imagerie Cherenkov inédits.

Le premier chapitre porte sur la synthèse de subphtalocyanines et phtalocyanines fluorescentes possédant des fonctions chimiques qui confèrent à la molécule des propriétés adaptées à une application en imagerie médicale. Les composés obtenus ont été étudiés pour déterminer s'ils possèdent les propriétés requises pour l'application visée, en considération du cahier des charges propre aux fluorophores.

Dans un deuxième temps, certaines sondes fonctionnelles préparées ont été utilisées pour créer des agents d'imagerie inédits. Dans le cas des subphtalocyanines, la biovectorisation a été explorée par association directe de la sonde avec un peptide, ou indirecte grace à un liposome encapsulant la sonde. Dans le cas des phtalocyanines, les sondes fonctionnelles ont été engagées dans la préparation de nanohybrides constitués de nanoparticules d'oxyde de fer ou de nanotubes d'oxyde de titane, afin d'obtenir des agents bimodaux ou théranostiques.

Le troisième chapitre présente l'étude du phénomène de transfert d'énergie (CRET) entre des radioéléments émetteurs Cherenkov et des fluorophores organiques a été étudié. La détermination des paramètres de transfert optimaux a ensuite guidé la mise au point d'une sonde CRET composée d'un fragment fluorescéine lié covalentement à un complexe d'yttrium-90. Pour finir, la possibilité d'émettre dans la fenêtre du proche infrarouge a été explorée par multi-transfert de type CRET-FRET.

Mots clefs :

Imagerie optique
Imagerie multimodale
Imagerie Cherenkov
Subphtalocyanines
Phtalocyanines
DOTA
Fluorescéine
Liposome
USPIO
Nanotubes d'oxyde de titane

The goal of this work was to prepare and study new fluorescent probes, which could give rise to novel optical or Cherenkov imaging agents.

The first section of this work describes the synthesis of fluorescent subphthalocyanines and phthalocyanines probes, which possess relevant chemicals groups suitable for optical imaging applications. The optical and physico-chemical properties of the new probes were carefully examined to ensure they comply with the specification of the fluorophores for the desired application.

The second part focused on the subsequent development of a few selected probes into real imaging agents. The biovectorisation of subphtalocyanines was achieved upon conjugation of a peptide either with the probe or with a liposome that encapsulate the probe. Phthalocyanine-based functional probes were engaged in the synthesis of nanohybrides made of iron oxide nanoparticles or titania nanotubes, to afford bimodal or theranostic agents.

In a final part, the energy transfer phenomenon (CRET) between Cherenkov emitting radionuclides and organic fluorophores was studied. The optimal transfer parameters were considered to prepare a CRET probe made of a fluorescein moiety covalently attached to an Yttrium-90 complex. Finally, the ability to emit in the near infrared window was explored by multi-CRET-FRET transfer.

Keywords:

Optical Imaging
Multimodal Imaging
Cherenkov Imaging
Subphthalocyanines
Phthalocyanines
DOTA
Fluoresceine
Liposome
USPIO
Titania nanotubes