



# THÈSE

*Préparée à*

**Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne**

**UMR CNRS 6302**

École doctorale Carnot-Pasteur (n°533)

*Présentée par*

**Robin LESCURE**

*Pour l'obtention du titre de*

**Docteur de l'Université Bourgogne Franche-Comté**

Discipline : Chimie organique

---

## **Développement d'azaBODIPYs fonctionnalisables pour la conception de sondes d'imagerie bimodale et d'agents théranostiques**

---

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 20 novembre 2020, devant la commission d'examen :

|                        |   |                        |
|------------------------|---|------------------------|
| Pr Françoise SILVESTRE | Professeure des Universités<br><i>École Nationale Supérieure des Ingénieurs en Arts<br/>Chimiques et Technologiques, Toulouse</i> | Présidente du jury     |
| Dr Célia BONNET        | Chargée de recherche<br><i>Université d'Orléans, Orléans</i>  | Rapporteuse            |
| Dr Fabrice ODOBEL      | Directeur de recherche<br><i>Université de Nantes, Nantes</i>   | Rapporteur             |
| Dr Raluca MALACEA      | Chargée de recherche<br><i>Université Bourgogne Franche-Comté, Dijon</i>  | Examinatrice           |
| Pr Ewen BODIO          | Professeur des Universités<br><i>Université Bourgogne Franche-Comté, Dijon</i>  | Directeur de thèse     |
| Dr Christine GOZE      | Maître de conférences<br><i>Université Bourgogne Franche-Comté, Dijon</i>   | Co-directrice de thèse |







---

## Financements

---

Pour les financements ayant permis à ces travaux de thèse de voir le jour, sont remerciés :

- Le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
- Le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)
- Le Conseil Régional de Bourgogne pour les bourses JCE # 2015-9205AAO033S04139 / BG0003203 et # 2018Y-08158)
- L'Agence Nationale de la Recherche (ANR) *via* le projet JCJC « SPID » ANR-16-CE07-0020 et le projet JCJC « WazaBY » ANR-18-CE18-0012.

Ces travaux de thèse font partie des projets « Pharmacoimagerie et agents théranostiques » et « Chimie durable, environnement et agroalimentaire » supportés par l'Université de Bourgogne et le Conseil Régional de Bourgogne représentés par le Plan d'Actions Régional pour l'Innovation (PARI) et l'Union Européenne aux travers des programmes PO FEDER-FSE Bourgogne 2014/2020.

Ces travaux ont également été possible par les subventions de la région Bourgogne Franche-Comté et de la Ligue contre le Cancer, Comité de Côte d'Or.



---

## Remerciements

---

J'aimerais tout d'abord exprimer ma gratitude envers les membres du jury. Le Dr Célia Bonnet et le Pr Fabrice Odobel pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Le Dr Raluca Malacea pour avoir accepté d'examiner ce manuscrit et également le Pr Françoise Silvestre, pour m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury de thèse.

Je souhaite remercier tout particulièrement le Dr Christine Goze et le Pr Ewen Bodio pour m'avoir soutenu tout au long de ces trois années et de m'avoir permis de mener à bien ces travaux de thèse. Vos idées et conseils judicieux ont été une grande source d'inspiration pour moi, et je suis grandement reconnaissant d'avoir pu travailler avec des personnes aussi passionnées que vous.

Je tiens également à remercier toutes les personnes sans qui ces travaux n'auraient pas été possibles :

- Le Pr Catherine Paul, de l'EPHE, pour la réalisation d'un large nombre d'études *in vitro* et *in vivo* sur mes composés. Merci également d'avoir accepté de prendre un chimiste au chômage technique au sein de ton laboratoire lorsque l'ICMUB était fermé.
- Malorie Privat & Aurélie Massot, deux biologistes à l'aide et à la patience inestimables pour m'avoir, entre autres, formé à la réalisation des IC<sub>50</sub> au sein de leur laboratoire. Et bien entendu, comme un chimiste ne serait rien sans une équipe de biologistes à ses côtés, merci infiniment pour le temps et le soin que vous avez apportés à toutes les études de bio sur mes petites molécules.
- Le Dr Lucie Sancey pour la réalisation de l'imagerie confocale sur les azaBODIPYs à visée théranostique.
- Le Dr Frédéric Boschetti, PDG de la société CheMatech, qui a rendu possible la synthèse des azaBODIPYs bimodaux par la mise à disposition des précurseurs macrocycliques.
- Les membres du CGFL, Dr Bertrand Collin, Dr Mathieu Moreau et Dr Pierre-Simon Bellaye sans qui toutes les études d'imagerie n'auraient pas eu lieu.
- Le Pr Paul Fleurat-Lessard, le Dr Miguel Ponce-Vargas et Florent Desroches pour leur investissement dans le calcul théorique des propriétés photophysiques des azaBODIPYs.
- Les membres de la plateforme d'analyse PACSMUB et tout particulièrement le Dr Quentin Bonnin, Marie-José Penouilh et le Dr Myriam Laly, pour leur implication et le temps qu'ils ont consacré à caractériser mes molécules (pas toujours très solubles).
- Dr Yoann Rousselin pour les (nombreuses) tentatives pour tirer des images RX de mes molécules.
- Le Pr Anthony Romieu, qui a été d'une aide précieuse en particulier pour les caractérisations photophysiques.
- Le Dr Jacques Pliquett, pour m'avoir pris sous son aile au tout début de ma thèse, et qui m'a lancé dans la synthèse des azaBODIPYs.

J'aimerais maintenant remercier du fond du cœur tous ceux qui ont été à mes côtés au cours de ces trois années. Tout d'abord, les « anciens », dont l'accueil à mon arrivée à l'ICMUB m'a permis de me sentir immédiatement dans mon élément : Jacques (dont les conseils et autres *tips* pour la synthèse des cailloux insolubles ont été d'une grande aide pour cette thèse), Audrey et Océane (le bureau B218 n'aurait pas été ce qu'il a été sans les expressions tarabiscotées de l'une et l'art culinaire de l'autre), Léa (également nommée « la princesse », merci pour ta bonne humeur (sauf quand tu faisais la tête) et pour ton énergie (sauf que tu décidais qu'on devait te traîner), ça a été un plaisir immense de t'avoir côtoyée au labo mais également en dehors, que ce soit pour les rando ou pour aller courir), et merci à tous les autres que je n'ai pas eu le temps de bien connaître mais dont la présence pour rigoler/discuter/parler science a été incroyable.

Et bien entendu, j'aimerais remercier tous ceux qui sont encore actuellement à l'ICMUB et aux côtés de qui j'ai pu travailler.

Pour le deuxième étage, merci à Benjamin (j'ai pensé à te mettre dans une catégorie « semi-ancien », mais tes blagues toujours du meilleur goût t'auront permis d'être compté parmi les jeunes actuels du labo), un grand merci à Alex et Valentin (bien que je ne crois pas qu'il y ait de bonne ou de mauvaise situation, si je devais résumer ma thèse aujourd'hui avec vous, je dirais que c'est d'abord des rencontres, de superbes rencontres), sans oublier les « nouvelles du fond du couloir » : Amélie, Wassima (ça a été un plaisir de vous avoir au labo et d'avoir pu perpétuer la guerre Nostalgie/Radio Campus) et maintenant Océane *bis* (prend bien soin de ~~ma~~ ta paillasse une fois que je serai parti !).

Pour les autres étages, merci à tous ceux qui ont été là au cours de ces trois ans et qui ont rendu cette thèse encore plus vivante : Garance, Anne, Kevin, Thibaud, Francesco, Pierre, Delphine et j'en passe...

J'aimerais également adresser un remerciement du fond du cœur à Emma, qui a été à mes côtés au cours de cette dernière année. Ton soutien sans faille et ta joie de vivre ont donné un aspect inattendu à ces mois d'écriture et de confinement. Mille merci à toi.

Enfin, je tenais à garder ces dernières lignes pour mes parents, ma sœur, ma famille et mes amis. Merci d'avoir été à mes côtés tout au long de mon parcours et de cette thèse, je vous en suis infiniment reconnaissant.







---

## Table des matières

---

|   |           |
|---|-----------|
| <b>INTRODUCTION GÉNÉRALE</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1 Bref historique</b>  | <b>1</b>  |
| <b>2 Techniques d'imagerie</b>  | <b>4</b>  |
| 2.1 Échographie   | 5         |
| 2.2 Tomodensitométrie (TDM)   | 6         |
| 2.3 Imagerie par résonance magnétique (IRM)   | 7         |
| 2.4 Imagerie radioisotopique  | 8         |
| <b>3 Imagerie optique</b>   | <b>10</b> |
| 3.1 Généralités   | 10        |
| 3.2 Rappels sur les principes de fluorescence et phosphorescence  | 12        |
| 3.3 Systèmes luminescents utilisés en imagerie médicale   | 14        |
| 3.3.1 Quantum dots  | 14        |
| 3.3.2 Lanthanides   | 15        |
| 3.3.3 Fluorophores organiques   | 16        |
| 3.3.4 Bilan sur les propriétés des systèmes luminescents actuels  | 17        |
| 3.4 BODIPYs et azaBODIPYs   | 18        |
| 3.4.1 Fonctionnalisation de l'atome de bore   | 22        |
| <b>4 Objectifs de cette thèse</b>   | <b>23</b> |
| <br>  |           |
| <b>CHAPITRE 1 BIMODALITÉ POUR L'IMAGERIE MÉDICALE</b>   | <b>27</b> |
| <b>1 Bimodalité pour l'imagerie médicale</b>  | <b>29</b> |
| 1.1 Intérêt en comparaison à un agent imageant unique   | 29        |
| 1.2 Composés bimodaux impliquant l'imagerie optique   | 30        |
| 1.2.1 Sonde bimodale optique/tomodensitométrie  | 31        |
| 1.2.2 Sonde bimodale optique/échographie  | 31        |
| 1.2.3 Sonde bimodale optique/IRM  | 32        |
| 1.2.4 Composés bimodaux optiques/TEP et optique/TEMP  | 34        |
| 1.2.5 Utilisation de BODIPYs et azaBODIPYs pour la conception de sondes bimodales optique/TEP ou optique/TEMP | 40        |
| <b>2 But du projet</b>  | <b>46</b> |
| <b>3 Développement d'une sonde bimodale azaBODIPY vectorisée</b>  | <b>47</b> |
| 3.1 Objectif initial et stratégie de synthèse   | 47        |
| 3.2 Choix du vecteur et de la cible   | 48        |
| 3.3 Synthèse de la plateforme azaBODIPY bis-acide   | 48        |
| 3.4 Stratégie de synthèse par réactions successives   | 50        |
| 3.5 Stratégie de synthèse « <i>one-pot</i> »  | 52        |
| 3.5.1 DOTA-azaBODIPY  | 52        |
| 3.5.2 NODAGA-azaBODIPY  | 57        |
| 3.6 Caractérisation photophysique   | 61        |
| 3.7 Bioconjugaison du DOTA-azaBODIPY sur l'anticorps  | 64        |
| 3.7.1 Bioconjugaison sur l'anticorps trastuzumab  | 64        |
| 3.7.2 Détermination du DOL  | 64        |
| 3.7.3 Bioconjugaison sur l'anticorps rituximab  | 65        |
| 3.8 Tests <i>in vitro</i>   | 66        |
| 3.8.1 Test d'affinité pour le récepteur HER2  | 66        |
| 3.8.2 Toxicité sur cellules   | 69        |
| 3.8.3 Stabilité de la sonde vectorisée dans le sérum  | 69        |

|  |   |            |
|--|---|------------|
| 3.9  | Tests <i>in vivo</i>  | 70         |
| 3.9.1  | Radioméallation   | 70         |
| 3.9.2  | Préparation des souris  | 70         |
| 3.9.3  | Imagerie bimodale   | 70         |
| 3.10   | Application en chirurgie assistée par fluorescence (FGS)                    | 75         |
| <b>4</b>   | <b>Conclusions et perspectives</b>  | <b>78</b>  |
| <br><b>CHAPITRE 2 DES AZABODIPYS THÉRANOSTIQUES AUX SONDES INTELLIGENTES</b> |   | <b>81</b>  |
| <b>1</b>   | <b>Synthèse d'azaBODIPYs théranostiques</b>                                 | <b>83</b>  |
| 1.1  | État de l'art   | 83         |
| 1.1.1  | Définition  | 83         |
| 1.1.2  | Problématique des complexes métalliques pour une utilisation anticancéreuse | 84         |
| 1.1.3  | Des BODIPYs théranostiques...   | 85         |
| 1.1.4  | ... aux azaBODIPYs théranostiques   | 90         |
| 1.2  | But du projet   | 91         |
| 1.3  | Première génération d'azaBODIPYs théranostiques                             | 92         |
| 1.3.1  | Molécules visées et stratégie de synthèse                                   | 92         |
| 1.3.2  | Synthèse du premier composé azaBODIPY-or                                    | 93         |
| 1.3.3  | Synthèse de dérivés du composé azaBODIPY-or 20                              | 96         |
| 1.3.4  | Caractérisation photophysique   | 102        |
| 1.3.5  | Étude biologique  | 104        |
| 1.3.6  | Bilan des résultats obtenus pour la première génération de théranostiques   | 109        |
| 1.4  | Perspectives  | 110        |
| 1.5  | Vers un nouveau concept de théranostiques                                   | 111        |
| <b>2</b>   | <b>Synthèse d'azaBODIPYs théranostiques « intelligents »</b>                | <b>112</b> |
| 2.1  | État de l'art   | 112        |
| 2.1.1  | Notion d'intelligence   | 112        |
| 2.1.2  | Applications des sondes fluorescentes intelligentes                         | 113        |
| 2.1.3  | Vers des théranostiques fluorescents intelligents                           | 118        |
| 2.2  | But du projet   | 122        |
| 2.3  | Développement d'azaBODIPYs théranostiques intelligents                      | 124        |
| 2.3.1  | Cibles moléculaires   | 124        |
| 2.3.2  | Calculs théoriques  | 124        |
| 2.3.3  | Synthèse par couplage de Suzuki sur l'azaBODIPY 1,7-(2-bromophényle)        | 127        |
| 2.3.4  | Introduction des ligands dès le début de la synthèse                        | 130        |
| 2.3.5  | Méallation et propriétés photophysiques                                     | 141        |
| 2.3.6  | Bilan   | 150        |
| <b>3</b>   | <b>Conclusions et perspectives</b>  | <b>151</b> |
| <br><b>CONCLUSION GÉNÉRALE</b>   |   | <b>155</b> |
| <br><b>EXPERIMENTAL SECTION</b>  |   | <b>163</b> |
| <b>1</b>   | <b>Material and methods</b>   | <b>165</b> |
| <b>2</b>   | <b>Experimental procedures</b>  | <b>173</b> |

---

## Liste des abréviations

---

|  |   |
|--|---|
| <b>Abs</b> : Absorbance  | <b>FACS</b> : Fluorescence Activated Cell Sorting   |
| <b>ACN</b> : Acétonitrile  | <b>FBS</b> : Foetal Bovine Serum  |
| <b>ADN</b> : Acide DéoxyriboNucléique                                  | <b>FCSB</b> : Flow Cytometry Staining Buffer  |
| <b>Ar</b> : Argon  | <b>FDA</b> : Food and Drug Administration   |
| <b>ATCC</b> : American Type Culture Collection                         | <b>FDG</b> : 2-[ <sup>18</sup> F]-2-déoxy-D-glucose   |
| <b>azaBODIPY</b> : 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a,8a-triaza-s-indacène      | <b>FGS</b> : Fluorescence Guided Surgery  |
| <b>bs</b> : Broad Signal   | <b>FPLC</b> : Fast Protein Liquid Chromatography  |
| <b>BBN</b> : Bombésine   | <b>FRET</b> : Förster resonance energy transfer   |
| <b>BBOF</b> : Double resonance broadband observe                       | <b>GSH</b> : Glutathion sous forme réduite  |
| <b>BLI</b> : BioLayer Interferometry                                   | <b>Hb</b> : Hémoglobine   |
| <b>Boc</b> : <i>tert</i> -butyloxycarbonyl                             | <b>HbO<sub>2</sub></b> : Oxyhémoglobine   |
| <b>BODIPY</b> : 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène             | <b>HBTU</b> : Hexafluorophosphate Benzotriazole Tetramethyl Uronium                                     |
| <b>cat.</b> : Catalytique  | <b>HER</b> : Human Epidermal growth factor Receptor   |
| <b>CCM</b> : Chromatographie sur Couche Mince                          | <b>HOMO</b> : Highest Occupied Molecular Orbital  |
| <b>cLR</b> : Corrected Linear Response                                 | <b>HPLC</b> : High-Performance Liquid Chromatography  |
| <b>CPT</b> : Camptothécine   | <b>HRMS</b> : High Resolution Mass Spectrometry   |
| <b>CT</b> : Computed Tomography  | <b>IC<sub>50</sub></b> : Concentration inhibitrice médiane  |
| <b>Cy</b> : Cyanine  | <b>ICG</b> : Vert d'indocyanine   |
| <b>d</b> : Doublet   | <b>ICMUB</b> : Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne                              |
| <b>DAD</b> : Dideo array detector                                      | <b>ICP</b> : Inductively coupled plasma   |
| <b>DCM</b> : Dichlorométhane   | <b>IR</b> : Infrarouge  |
| <b>DEA</b> : Diéthylamine  | <b>IRM</b> : Imagerie par Résonance Magnétique  |
| <b>DMF</b> : <i>N,N</i> -diméthylformamide                             | <b>J</b> : Constante de couplage  |
| <b>DMSO</b> : Diméthylsulfoxyde  | <b>LR</b> : Linear Response   |
| <b>DOL</b> : Degree of Labelling                                       | <b>LUMO</b> : Lowest Unoccupied Molecular Orbital   |
| <b>DOTA</b> : 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid | <b>m</b> : Multiplet  |
| <b>dppf</b> : 1,1'-bis (diphénylphosphino) ferrocène                   | <b>MAE</b> : Déviation moyenne absolue  |
| <b>DTNB</b> : 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)                     | <b>MALDI-TOF</b> : Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight                         |
| <b>DTPA</b> : Diethylenetriaminepentaacetic acid                       | <b>MS</b> : Mass spectrometry   |
| <b>DTT</b> : Dithiothréitol  | <b>MTS</b> : (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) |
| <b>EDTA</b> : Ethylenediaminetetraacetic acid                          | <b>MW</b> : Microwave   |
| <b>Em</b> : Émission   | <b>NADP</b> : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate   |
| <b>Eq.</b> : Équivalent  |   |
| <b>ESI</b> : ElectroSpray Ionisation                                   |   |
| <b>et al.</b> : et alius ( <i>lat.</i> ), et autres                    |   |
| <b>FA</b> : Acide formique   |   |

**NHS** : *N*-hydroxysuccinimide  
**NIR** : Near-infrared  
**NMR** : Nuclear Magnetic Resonance  
**NODAGA** : 1,4,7-triazacyclononane,1-glutaric acid-4,7-diacetic acid  
**OAc** : O-acétyl  
**OLED** : Organic Light-Emitting Diode  
**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé  
**PACSMUB** : Plateforme d'Analyse Chimique et de Synthèse Moléculaire de l'Université de Bourgogne  
**PARP1** : Poly(ADP-ribose) polymérase 1  
**PBS** : Phosphate Buffer Saline  
**PD-1** : Programmed Cell Death 1  
**PD-L1** : Programmed Cell Death Ligand 1  
**PEG** : Polyethylene Glycol  
**PES** : Phenazine Ethosulfate  
**PLA** : Acide polylactique  
**ppm** : Partie par million  
**q** : Quadruplet  
**quint** : Quintuplet  
**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire  
**RP** : Reverse Phase  
**RPE** : Résonance paramagnétique électronique  
**RPMI** : Roswell Park Memorial Institute medium  
**s** : Singulet  
**SDS** : Dodécylsulfate de sodium  
**SPECT** : Single Photon Emission Computed Tomography  
**SS** : State-Specific  
**t** : Triplet  
**TCO** : Transcyclooctène  
**TD-DFT** : Time-Dependant Density Functional Theory  
**TDM** : Tomodensitométrie  
**TEA** : Triéthylamine  
**TEMP** : Tomographie par Émission MonoPhotonique  
**TEP** : Tomographie par Émission de Positons  
**TFA** : Trifluoroacetic acid  
**THF** : Tétrahydrofurane

**tht** : Tétrahydrothiophène  
**TLC** : Thin Layer Chromatography  
**TMS** : Tétraméthylsilane  
**TOTA** : 4,7,10-trioxa-13-tridecanamine  
**Trx** : Thiorédoxine  
**TrxR** : Thiorédoxine réductase  
**TSTU** : *N,N,N',N'*-tetramethyl-*O*-(*N*-succinimidyl)uronium tetrafluoroborate  
**UV** : Ultraviolet  
**Vis** : Visible







---

# **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

---



L'imagerie médicale est l'un des piliers de la médecine moderne. Elle permet d'observer et de comprendre les mécanismes biologiques, de dresser un diagnostic dans le cas de pathologies, mais également d'orienter vers un traitement adapté le cas échéant. La puissance des techniques d'imagerie réside dans la possibilité d'avoir accès à une information anatomique ou fonctionnelle de manière peu invasive, avec une sensibilité élevée, et permettant d'imager un phénomène à ses débuts, avant même les premiers symptômes.

## 1 Bref historique

L'imagerie médicale est un domaine récent qui repose sur des phénomènes physiques découverts pour la plupart entre la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle et la première moitié du XX<sup>ème</sup> siècle. Le 8 novembre 1895, Wilhelm Roentgen découvre l'existence des rayons X et moins d'un an après, 1044 articles scientifiques débattent déjà de l'utilisation de ces rayons pour l'étude de fractures.<sup>1</sup> L'importance de cette découverte est soulignée quelques années plus tard lorsque le premier prix Nobel de physique est décerné à Roentgen en 1901.<sup>2</sup> La Première Guerre mondiale entraîne un développement massif de l'utilisation de cette nouvelle technologie. C'est ainsi que peu de temps après l'obtention de son prix Nobel de chimie en 1911, Marie Curie conduisit une unité d'imagerie par rayons X portable jusqu'au champ de bataille en France, permettant l'étude d'os fracturés mais également de montrer les effets de la gangrène gazeuse sur les tissus.<sup>3,4</sup>

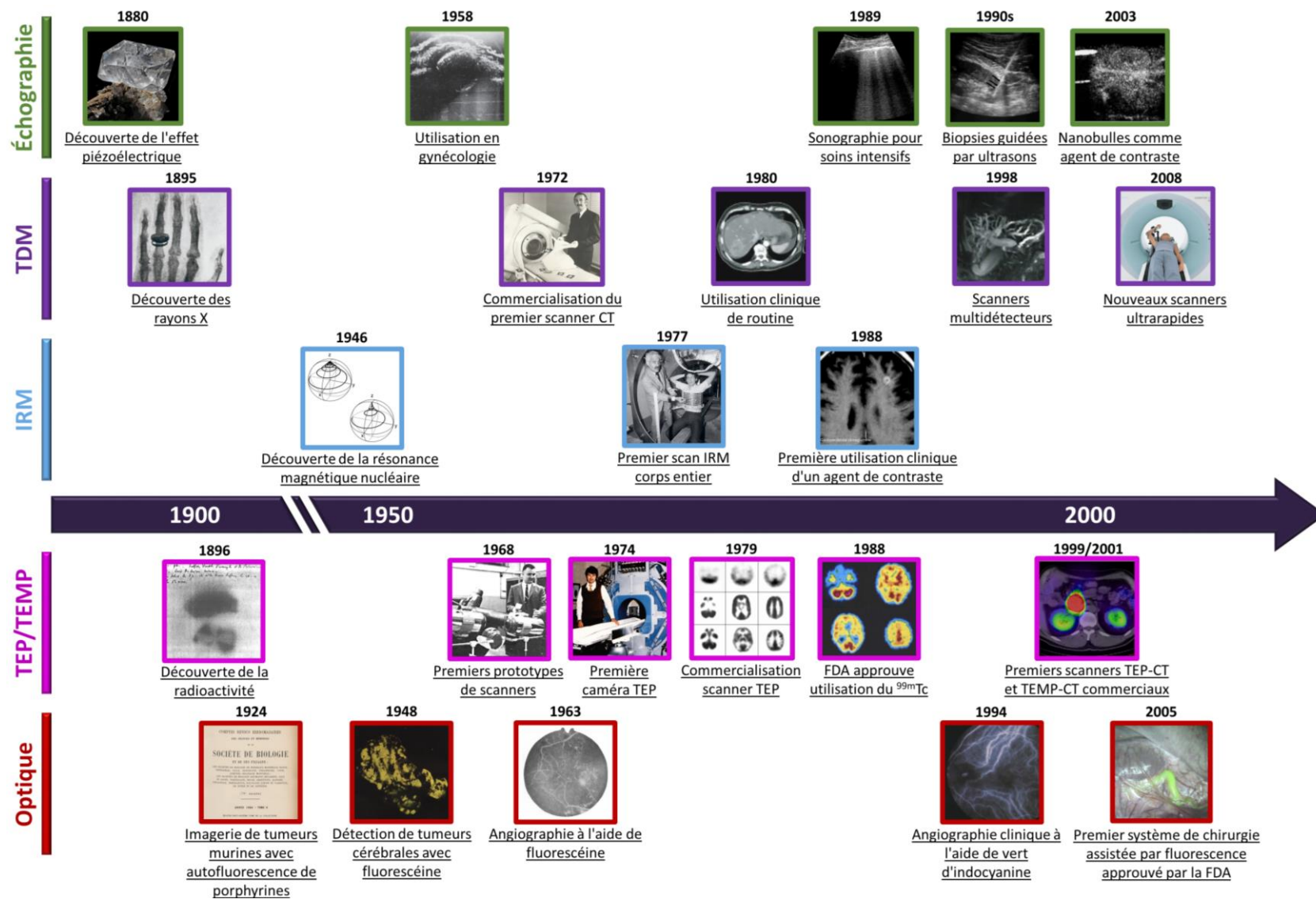
Par la suite, d'autres technologies apparurent telles que l'hydrophone de Paul Langevin basé sur l'utilisation des ultrasons, dont l'utilisation permettra de couler un premier U-Boot allemand le 23 avril 1916.<sup>5</sup>

La radioactivité est quant à elle découverte par Henri Becquerel en 1896. Ces travaux se soldent par l'obtention du prix Nobel de physique en 1903 partagé avec Pierre et Marie Curie, qui mène dès 1913 à des expérimentations médicales visant à déterminer l'effet du radium pour le traitement de l'arthrose.<sup>6</sup> Cette même année, George de Hevesy propose d'utiliser un isotope radioactif du radium afin de déterminer le métabolisme du plomb dans les plantes et chez le petit animal. C'est ainsi que naît l'idée de l'utilisation de traceurs radioactifs.<sup>7</sup>

L'imagerie optique, caractérisée par l'invention du microscope optique au cours du XVII<sup>ème</sup> siècle, est la plus ancienne des techniques d'imagerie. Pendant 300 ans cependant, celle-ci a été limitée à l'étude *in vitro* de cellules non marquées.<sup>8</sup> Il faudra attendre 1911 pour que soit développé le premier véritable microscope par fluorescence, 78 ans après l'observation du phénomène de fluorescence de la chlorophylle par Sir David Brewster.<sup>9,10</sup> C'est ensuite dans les années 1930 que seront utilisés pour la première fois des composés fluorescents exogènes au sujet étudié, permettant le marquage de tissus.<sup>11</sup>

Suite aux avancées technologiques majeures, pour certaines motivées par ce premier conflit mondial, les technologies d'imagerie commencent à être développées et étudiées massivement au cours du XX<sup>ème</sup> siècle. Les décennies suivant la Seconde Guerre mondiale voient l'apparition d'une multitude d'appareils et nouvelles techniques permettant d'imager le vivant (**Figure 1**).

Près de 130 ans après la découverte de Roentgen, l'imagerie médicale est devenue incontournable dans l'élaboration de diagnostics précis et permet d'identifier une maladie à ses prémices, avant même l'apparition des premiers symptômes. Le début de ce siècle a vu un essor fulgurant de nouveaux appareils et agents imageants, permettant une utilisation généralisée et plus sûre pour les études cliniques de routine. De l'imagerie de fractures au début du XX<sup>ème</sup> siècle à l'étude et au diagnostic précoce de cancers de nos jours, l'évolution des techniques a fait de l'imagerie médicale l'un des éléments incontournables de la médecine moderne.

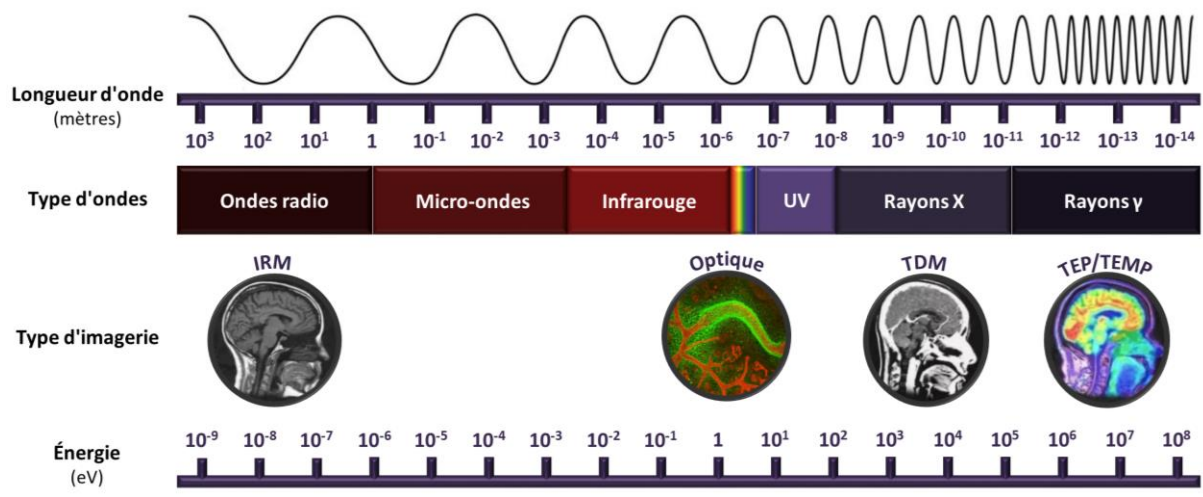


**Figure 1.** Dates-clé de l'évolution de diverses techniques d'imagerie.<sup>12-23</sup> TDM = tomodynamométrie, IRM = imagerie par résonance magnétique, TEP = tomographie par émission de positons, TEMP = tomographie par émission monophotonique. Inspiré de Weissleder *et al.*<sup>24</sup>

Au cours des dernières décennies, un intérêt grandissant a pu être noté pour l'étude et la compréhension des mécanismes biologiques aux échelles cellulaire et moléculaire. Les techniques telles que l'IRM, l'utilisation de radiotraceurs, ou encore l'imagerie optique ont donné naissance à une nouvelle discipline, nommée imagerie moléculaire. Celle-ci est née d'un désir d'imager de la manière la plus faiblement invasive possible les mécanismes biologiques. Pour cela, l'imagerie moléculaire s'appuie généralement sur l'utilisation de composés exogènes. Dans le cas de composés fluorescents, on parle de « marqueurs », alors que pour l'imagerie impliquant des radioéléments, le terme de « traceurs » est appliqué.<sup>25,26</sup> Plus globalement, ces composés peuvent être qualifiés de « sondes ». De nos jours, l'imagerie moléculaire est incontournable dans le milieu clinique, tout particulièrement par l'utilisation de la TEP et TEMP pour l'oncologie, la cardiologie et la neurologie.<sup>27</sup>

## 2 Techniques d'imagerie

Les techniques d'imagerie abordées en partie 1.1 sont chacune basées sur des phénomènes physiques différents. La plupart, hormis les ultrasons qui exploitent la vibration mécanique d'un milieu (ondes acoustiques), s'appuient sur l'utilisation d'ondes électromagnétiques (**Figure 2**).



**Figure 2.** Spectre électromagnétique et techniques d'imagerie associées. Inspiré de Singh *et al.*<sup>28</sup>

Les propriétés de chacune de ces techniques sont directement liées au phénomène physique sur lequel elles reposent (**Tableau 1**). Ainsi, de fortes différences sont notées sur la résolution spatiale, la profondeur de pénétration ou encore la sensibilité (concentration minimale en agent imageant pour permettre la détection) de ces techniques. Il est donc nécessaire de choisir sciemment l'imagerie à réaliser en fonction des informations que l'on souhaite en tirer. Par exemple, certaines techniques telles que les ultrasons, la tomodensitométrie ou encore l'IRM informent davantage sur les caractéristiques anatomiques du vivant, par la mise en valeur des organes ainsi que la nature et les caractéristiques des tissus. Ceci est particulièrement utile lors de l'étude de structures telles le squelette ou encore le système sanguin. Les imageries radioisotopiques et optique quant à elles, peuvent apporter des informations sur le métabolisme des éléments étudiés. Il est alors possible d'obtenir des informations à l'échelle cellulaire voire moléculaire.<sup>29,30</sup>

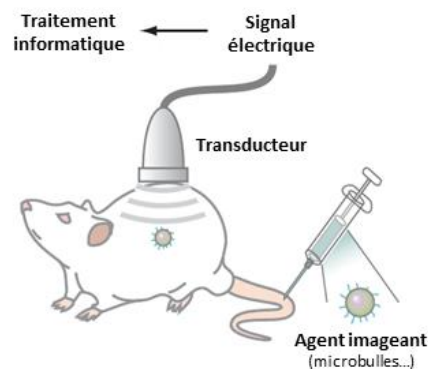
**Tableau 1.** Caractéristiques des principales techniques d'imagerie utilisées en clinique.<sup>29,30</sup>

| Imagerie  | Technique  | Résolution spatiale | Profondeur de pénétration | Sensibilité               | Coût   | Sécurité                   |
|-----------|--|---------------------|---------------------------|---------------------------|--------|----------------------------|
| Ultrasons | Ondes sonores  | 0,01-2 mm           | mm-cm                     | $10^{-12}$ M              | \$     | Rayonnements non-ionisants |
| TDM       | Rayons X   | 0,5-1 mm            | Pas de limite             | N/A                       | \$\$   | Rayonnements ionisants     |
| IRM       | Ondes radio  | 1 mm                | Pas de limite             | $10^{-3}$ - $10^{-5}$ M   | \$\$\$ | Rayonnements non-ionisants |
| TEP       | Emission de rayons $\gamma$ par annihilation de positons | 5-7 mm              | Pas de limite             | $10^{-11}$ - $10^{-12}$ M | \$\$\$ | Rayonnements ionisants     |
| TEMP      | Emission directe de rayons $\gamma$                      | 8-10 mm             | Pas de limite             | $10^{-10}$ - $10^{-11}$ M | \$\$   | Rayonnements ionisants     |
| Optique   | Ondes visibles et infrarouges                            | 2-3 mm              | < 1 cm                    | $10^{-9}$ - $10^{-12}$ M  | \$     | Rayonnements non-ionisants |

Les lignes suivantes ont pour objectif de rappeler le principe des techniques majeures d'imagerie telles que les ultrasons, la tomodensitométrie, l'IRM ou encore l'imagerie radioisotopique. L'imagerie optique sera quant à elle abordée avec plus de détails en partie 3.

## 2.1 Échographie

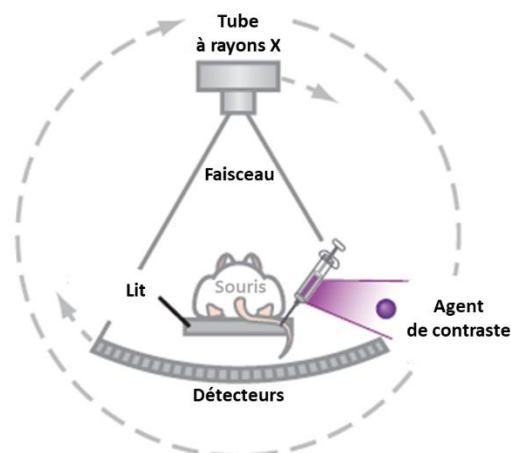
Les ultrasons sont utilisés pour l'imagerie et en particulier en gynécologie depuis les années 50.<sup>31</sup> Cette technologie se base sur l'étude de la réflexion d'ondes acoustiques. Une sonde (appelée transducteur) va produire des ultrasons, qui vont ensuite se propager au sein des tissus à imager (**Figure 3**). L'impédance acoustique du tissu traversé, c'est-à-dire sa résistance au passage de l'onde, est dépendante de la nature du tissu. Une réflexion des ondes, un écho, a alors lieu lorsqu'une interface, entre deux milieux d'impédances acoustiques significativement différentes, est sur le trajet de l'onde. Le transducteur reçoit alors ces ondes réfléchies par les tissus et les transforme en signaux électriques, permettant de reconstruire une image 2D voire 3D des tissus observés. La résolution de l'image obtenue peut être augmentée par l'utilisation de fréquences plus élevées, mais au détriment de la profondeur de pénétration.<sup>30</sup> Ainsi, les paramètres d'analyse doivent être adaptés selon ce que l'on souhaite observer chez l'individu.

**Figure 3.** Principe d'utilisation des ultrasons chez une souris. Adapté de Gambhir *et al.*<sup>30</sup>

Les avantages majeurs de l'utilisation des ultrasons pour l'imagerie sont la facilité d'utilisation, le coût particulièrement modéré, ainsi que l'absence d'un quelconque danger pour le patient ou le personnel réalisant l'imagerie. De plus, l'obtention d'image étant quasi-immédiate, il est possible de réaliser l'analyse en temps réel. D'une sensibilité excellente, cette méthode est toutefois limitée par sa résolution spatiale, dépendante de la profondeur de pénétration. L'utilisation d'agents de contraste tels que les microbulles peut permettre d'améliorer les images obtenues. La publication récente de résultats dans un modèle murin mais également du premier test clinique a pu démontrer le potentiel de cette technique pour la détection de tumeurs.<sup>32,33</sup>

### 2.2 Tomodensitométrie (TDM)

La tomodensitométrie repose sur la différence d'absorption des rayons X par les tissus. Ainsi, la source de rayons X, placée d'un côté de l'individu, émet un faisceau de rayons qui sont ensuite récupérés par une série de détecteurs situés à l'opposé du sujet. Cette technologie permet l'obtention d'une image en coupe (2D) de l'individu et il est alors possible de reconstruire numériquement une image complète 3D par la mise en corrélation des différentes coupes obtenues. Les rayons X étant plus ou moins absorbés par les tissus traversés (forte absorption par les os qui apparaissent blancs et faible absorption pour les tissus mous et l'air qui apparaissent noirs), il est alors possible d'obtenir une image présentant un contraste important (**Figure 4**). L'utilisation d'un agent de contraste peut permettre d'améliorer la qualité des images obtenues. Les agents imageants utilisés ont pour rôle d'absorber fortement les rayons X et c'est dans cette optique que la plupart des agents de contraste TDM présentent un atome lourd tel l'iode,<sup>34,35</sup> l'or<sup>36,37</sup> ou un lanthanide.<sup>38,39</sup>



**Figure 4.** Principe d'une tomodensitométrie chez une souris. Adapté de Gambhir *et al.*<sup>30</sup>

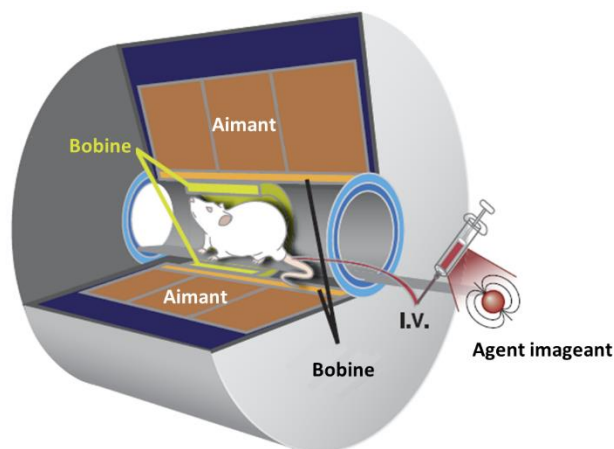
La tomodensitométrie présente plusieurs avantages majeurs, ce qui explique en particulier qu'il s'agit de l'une des techniques d'imagerie les plus utilisées en clinique.<sup>40</sup> L'excellente résolution spatiale proposée par cette technique, sa rapidité en termes de temps d'analyse ou encore sa profondeur de pénétration illimitée expliquent l'utilisation clinique de cette technique. Cependant, les rayons X sont ionisants et peuvent induire une éventuelle augmentation de risques de cancers à long terme pour le patient tout comme pour les praticiens si des mesures de protection efficaces ne sont pas mises en place. De plus, lorsque l'utilisation d'un agent de



contraste est nécessaire, de grandes quantités doivent être utilisées, certaines études ayant montré que des effets secondaires tels des œdèmes, hypotensions ou encore pertes de conscience, bien que rares, peuvent être de gravité élevée.<sup>41</sup>

### 2.3 Imagerie par résonance magnétique (IRM)

Le développement de l'IRM, plus tardif que ceux de l'échographie et de la tomodensitométrie, a révolutionné la médecine. Comme le décrivent Bercovich *et al.*, l'IRM est le fer de lance de l'imagerie médicale, étant utilisée dans tous les domaines de la médecine (oncologie, cardiologie, imagerie du système nerveux entre autres).<sup>1</sup> Le principe de l'IRM est similaire à celui de la RMN utilisée en recherche et se base généralement sur l'étude du spin des atomes d'hydrogène. L'être humain étant composé à environ 63 % d'eau, riche en hydrogène, l'imagerie du proton est ainsi adaptée. L'étude du comportement des spins de ces atomes au sein d'un champ magnétique permet de dresser une image des tissus cartographiés (**Figure 5**). Afin d'augmenter le contraste entre tissus mous, il est alors possible d'avoir recours à l'utilisation d'un agent de contraste. En 1988, le premier agent de contraste, le gadopentétate diméglumine (de nom clinique Magnevist®) est approuvé par la FDA (*Food and Drug Administration*) pour une utilisation clinique.<sup>42</sup> Quasiment trente ans plus tard, pas moins de 8 autres composés au gadolinium sont disponibles cliniquement et il est estimé alors que 30 millions d'analyses IRM sont réalisées chaque année à l'aide d'agents de contraste.<sup>43</sup>

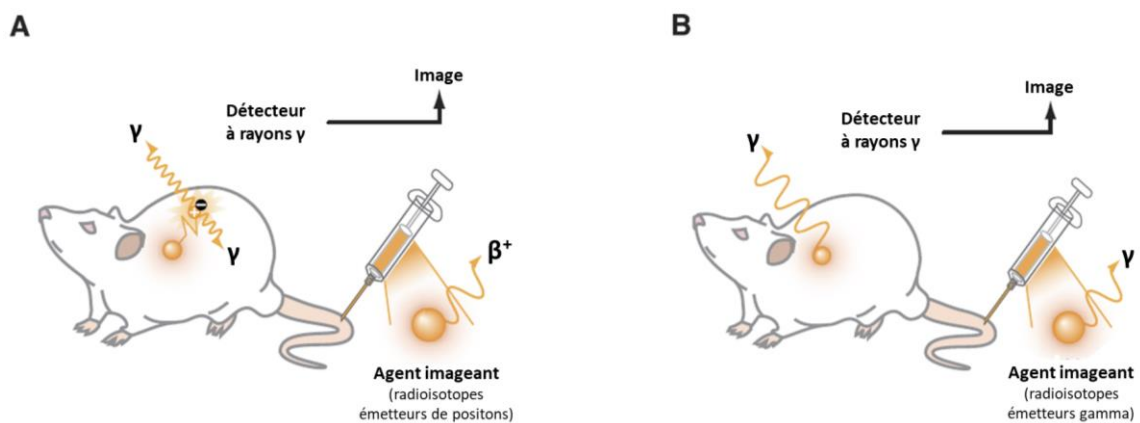


**Figure 5.** Principe d'une analyse IRM. Adapté de Gambhir *et al.*<sup>30</sup>

Les avantages de l'IRM sont multiples. Outre sa résolution spatiale excellente et l'absence de rayonnements ionisants, cette technique d'imagerie peut être réalisée sans agent de contraste si nécessaire (grossesse, allergies). Cependant, la sensibilité de l'IRM est faible et requiert souvent l'utilisation d'une grande quantité d'agent de contraste, ce qui peut provoquer des réactions secondaires chez le patient, due à la forte toxicité du gadolinium lorsque celui-ci est coordonné par des ligands linéaires.<sup>44</sup> De plus les temps d'analyse et de traitement des données sont longs.

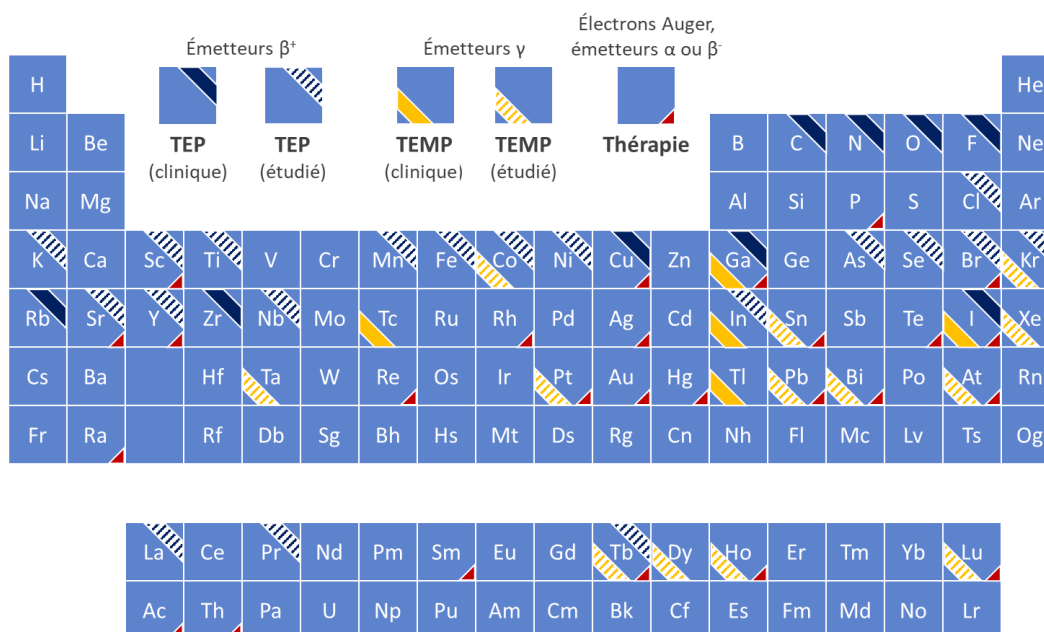
## 2.4 Imagerie radioisotopique

Seulement trente ans après la découverte de Henri Becquerel en 1896, nommée radioactivité l'année suivante par Marie Curie, les premières expériences d'imagerie à l'aide de radiotraceurs tels le  $^{210}\text{Pb}$  ou le  $^{210}\text{Bi}$  sont réalisées, permettant d'observer la circulation sanguine chez l'humain.<sup>45</sup> Une quarantaine d'années plus tard, au cours des années 70, naissent alors la tomographie par émission de positons (TEP) et la tomographie par émission monophotonique (TEMP).<sup>46</sup> Ces deux techniques d'imagerie reposent sur la désintégration d'éléments radioactifs injectés au sein des tissus à imager. Dans le cas de la TEP, la désintégration radioactive mène à l'émission d'une particule  $\beta^+$ , qui parcourt alors une courte distance ( $\approx 1$  mm) avant d'être annihilée par interaction avec un électron, menant à l'émission de deux rayonnements  $\gamma$  de directions opposées et d'énergie de 511 keV.<sup>30,47</sup> La détection de ces deux rayonnements coïncidents est à l'origine du signal, mais la résolution spatiale reste relativement faible, de par le trajet parcouru par la particule avant annihilation. En ce qui concerne la TEMP, le rayonnement  $\gamma$  détecté provient directement de l'atome radioactif. Un seul signal est donc récupéré par le détecteur contrairement à la TEP (**Figure 6**).



**Figure 6.** A : Principe d'une analyse TEP. B : Principe d'une analyse TEMP. Adapté de Gambhir *et al.*<sup>30</sup>

L'utilisation de la TEP ou de la TEMP n'est donc pas possible sans l'utilisation d'un radionucléide. Un vaste choix d'isotopes est disponible pour de telles analyses (**Figure 7**). Certains radioéléments peuvent ainsi être utilisés dans une optique de thérapie, par l'exploitation du caractère fortement ionisant des rayonnements qu'ils émettent (particules  $\alpha$ ,  $\beta^-$ , électrons Auger).



**Figure 7.** Éléments utilisés ou pouvant potentiellement être utilisés dans le cadre d'imageries TEP ou TEMP voire pour une utilisation thérapeutique.<sup>48-57</sup>

Le choix du radionucléide à utiliser pour l'analyse est dépendant de ses propriétés telles que le type d'émission à la suite de la désintégration radioactive, mais également le temps de demi-vie ou encore la disponibilité (nécessité de produire l'élément radioactif à l'aide d'un réacteur ou d'un cyclotron). Il faut également considérer le mode de marquage utilisé, qui peut être direct (radioélément lié de manière covalente au reste de la molécule) ou indirect (utilisation d'agents chélatants). Les éléments les plus couramment utilisés en clinique pour la TEP et la TEMP sont donnés dans le **Tableau 2**.

**Tableau 2.** Éléments utilisés pour la TEP et la TEMP en clinique. L'élément le plus utilisé à ce jour pour chaque type d'imagerie est surligné en jaune.<sup>46,58,59</sup>

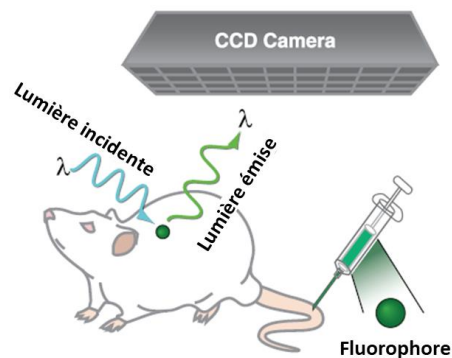
| TEP               |              | TEMP              |              |
|-------------------|--------------|-------------------|--------------|
| Radioélément      | Demi-vie (h) | Radioélément      | Demi-vie (h) |
| <sup>18</sup> F   | 1,8          | <sup>99m</sup> Tc | 6,0          |
| <sup>68</sup> Ga  | 1,1          | <sup>123</sup> I  | 13,2         |
| <sup>82m</sup> Rb | 6,3          | <sup>111</sup> In | 67,9         |
| <sup>64</sup> Cu  | 12,8         | <sup>201</sup> Tl | 73,1         |
| <sup>89</sup> Zr  | 78,4         | <sup>67</sup> Ga  | 78,3         |

La TEP et la TEMP proposent toutes deux une sensibilité excellente (bien que légèrement plus élevée pour la TEP) ainsi qu'une profondeur de pénétration illimitée, ce qui leur procure une place de choix en utilisation clinique. Cependant, deux inconvénients majeurs sont à souligner. La résolution spatiale relativement faible, mais également la nécessité d'utilisation d'un radioélément, soumettant le patient et le personnel médical à des rayonnements ionisants non négligeables. De plus, les éléments radioactifs doivent être au préalable produits dans un réacteur ou générateur, voire dans un cyclotron, ce qui en fait une technique coûteuse et contraignante.

### 3 Imagerie optique

#### 3.1 Généralités

L'imagerie optique se base sur la détection de photons ultraviolets, visibles, ou infrarouges. Diverses techniques existent, telles que l'utilisation de composés bioluminescents (production de lumière par réaction enzymatique) ou l'usage de composés luminescents.<sup>29,30</sup> Dans cette partie, nous nous intéresserons plus particulièrement à cette seconde technique. L'idée est d'injecter un composé qui peut être excité par des photons de longueur d'onde appropriée, amenant à l'émission de photons de longueur d'onde différente (fluorescence ou phosphorescence) lors de la désexcitation (**Figure 8**).

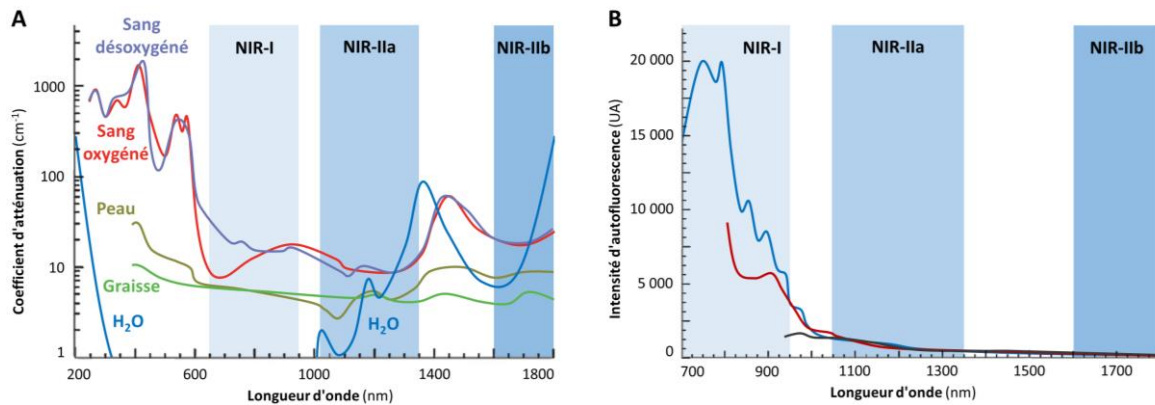


**Figure 8. A** : Principe d'une analyse par imagerie optique de fluorescence. Adapté de Gambhir *et al.*<sup>30</sup>

L'imagerie optique est unique par le fait qu'elle présente à la fois une sensibilité élevée, une résolution spatiale relativement bonne, une facilité d'utilisation mais également un coût limité. De plus, elle peut permettre de suivre en temps réel des modifications physiologiques.<sup>60,61</sup>

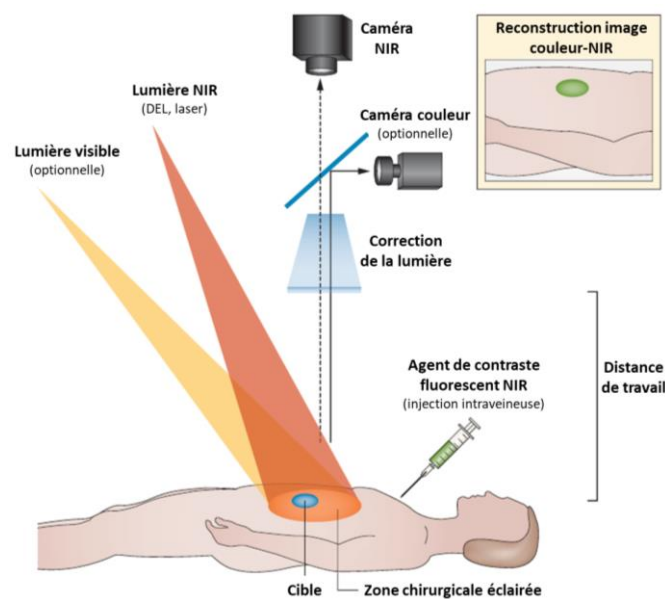
En revanche, le problème majeur de l'imagerie optique est sa profondeur de pénétration très faible des tissus (< 1 cm). En effet, la lumière, lors de sa traversée des tissus, est soumise à différents phénomènes. D'une part, la lumière émise par le fluorophore est impactée par l'absorption et la diffusion des tissus et circulants traversés (**Figure 9 - A**).<sup>62-64</sup> La lumière incidente, nécessaire à l'excitation du fluorophore, est également soumise à ces phénomènes de diffusion par les tissus traversés. De plus, un phénomène d'autofluorescence des tissus est à mentionner, dont l'intensité est dépendante de la longueur d'onde d'excitation de la lumière incidente (**Figure 9 - B**). Le phénomène d'autofluorescence est ainsi particulièrement intense à des longueurs d'onde situées dans la partie visible du spectre électromagnétique.

Cependant, certaines régions du spectre électromagnétique, en particulier dans le proche infrarouge (650 à 2000 nm), présentent une atténuation minimale de la lumière. Ces zones sont découpées en trois zones distinctes : 650-950 nm (NIR-I), 1050-1350 nm (NIR-IIa) et 1600-1800 nm (NIR-IIb).<sup>65-67</sup> Certains fluorophores destinés à une imagerie *in vivo* ont donc été développés afin d'émettre dans ces zones, appelées fenêtres de transparence optique. Ce sujet sera abordé dans la partie **3.3**.



**Figure 9. A :** Courbes de tendance des coefficients d'absorption des principaux tissus entre 0,2 et 1,8  $\mu\text{m}$ . Inspiré de Hemmer *et al.*<sup>63</sup> et Vogel *et al.*<sup>64</sup> **B :** Courbes de tendance de l'intensité d'autofluorescence de tissus hépatiques par excitation laser à 658 nm (courbe bleue), 785 nm (courbe rouge) et 808 nm (courbe noire). Inspiré de Diao *et al.*<sup>68</sup> Les intervalles adaptés à une imagerie dans le proche infrarouge sont identifiés par les zones bleues.

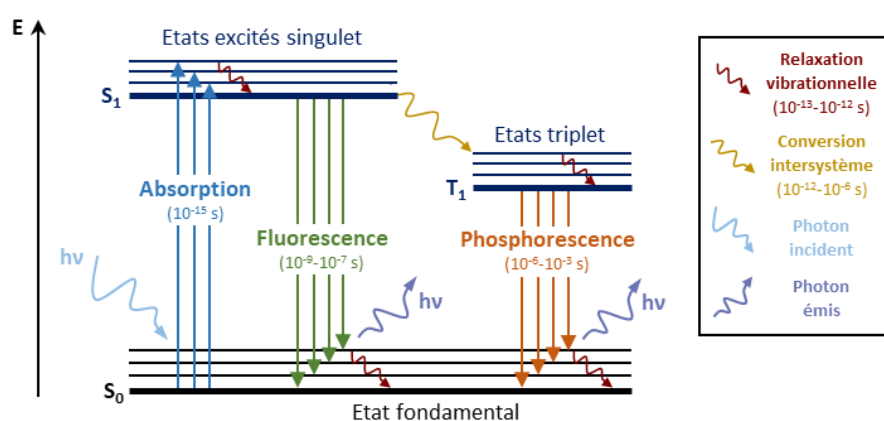
À ce jour, l'imagerie optique est limitée à l'étude des tissus de « surface » (accessibles par voies naturelles ou par incision), que ce soit dans le cadre de l'endoscopie par fluorescence (dont les débuts remontent aux années 2000)<sup>69,70</sup> ou en chirurgie assistée par fluorescence, un domaine ayant pris une ampleur particulièrement importante ces dix dernières années. Le début des années 2010 a mené aux premières preuves de concept de la chirurgie assistée par fluorescence chez l'homme (**Figure 10**).<sup>71,72</sup> Le principe est que la cible, par exemple une tumeur ou les tissus sains alentours tels que les nerfs, puisse être marquée, permettant au chirurgien de déterminer plus précisément les marges chirurgicales à appliquer lors de l'ablation. Ceci apporte donc un avantage significatif lors d'opérations chirurgicales. Le chirurgien n'est alors plus obligé de se fier seulement à la texture et l'apparence des tissus à l'œil nu, les petites zones tumorales ou métastatiques étant clairement apparentes. Ceci diminue le risque de rechute, la tumeur pouvant alors être enlevée dans sa totalité, mais améliore également la récupération du patient après l'opération, une quantité minimale de tissus sains étant retirée.



**Figure 10.** Principe de la chirurgie assistée par fluorescence. Adapté de Vahrmeijer *et al.*<sup>72</sup>

### 3.2 Rappels sur les principes de fluorescence et phosphorescence

Tout composé organique est caractérisé par un état énergétique stable, nommé  $S_0$ , dans lequel il se trouve lorsqu'il n'est pas excité. À la suite de l'absorption d'un photon, un électron de la dernière orbitale moléculaire remplie de plus haute énergie, ou *highest occupied molecular orbital* (HOMO) est transféré sur l'un des états vibrationnels de l'orbitale basse vacante, *lowest unoccupied molecular orbital* (LUMO). La molécule est alors dans un état excité instable  $S_1$ , d'énergie plus élevée que l'état fondamental. L'électron se situant sur l'un des états vibrationnels de l'état excité singulet  $S_1$  relaxe alors très rapidement vers l'état vibrationnel le plus bas en énergie de  $S_1$ . Suite à cela, afin de retourner à un état énergétiquement plus stable, un phénomène de fluorescence (désexcitation rapide avec émission d'un photon) ou de phosphorescence (désexcitation lente par passage à un état excité triplet  $T_1$  plus bas en énergie, puis retour à l'état fondamental par émission d'un photon) peut avoir lieu. Le diagramme de Perrin-Jablonski illustre ces phénomènes de luminescence (**Figure 11**).



**Figure 11.** Diagramme de Perrin-Jablonski simplifié et spectres d'absorption et d'émission en fluorescence ou phosphorescence résultants. Les temps des phénomènes impliqués sont également renseignés. Inspiré de page web<sup>73</sup> et d'articles.<sup>74,75</sup>

Dans les lignes suivantes, nous nous focaliserons plus particulièrement sur les propriétés des composés émettant de la fluorescence.

Une caractéristique des fluorophores est soulignée par ce diagramme. Le déplacement de Stokes est la différence de longueur d'onde entre le maximum en fluorescence et le maximum en absorbance. Cette différence est due à la perte énergétique subie lors du retour à l'état fondamental d'une molécule excitée. En effet, à la suite de l'absorption d'un photon, la molécule se trouve dans un état excité qui, par conversions internes (relaxations vibrationnelles en particulier), perd une petite quantité d'énergie. Le retour à l'état fondamental émet alors un photon, d'énergie légèrement inférieure à celui qui a été absorbé initialement. L'énergie étant inversement proportionnelle à la longueur d'onde, la lumière émise subit donc un effet bathochrome (décalage du maximum d'émission vers de plus hautes longueurs d'onde).

Le coefficient d'absorption molaire  $\epsilon$ , généralement exprimé en  $M^{-1}.cm^{-1}$ , représente la capacité d'une solution ou d'un composé en solution à absorber la lumière. Il est donné par la loi de

Beer-Lambert, reliant le coefficient d'absorption molaire à l'absorbance **A** de la solution, sa concentration **C** et la longueur du trajet optique **L**. Ainsi, il est possible de déterminer la valeur du coefficient d'absorption molaire expérimentalement par mesure de l'absorbance à diverses concentrations, le coefficient directeur de la droite obtenue étant alors égal au produit de  $\epsilon$  par **L**.

Une autre caractéristique des fluorophores est le rendement quantique. Celui-ci est caractérisé par le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés. Sa valeur est donc comprise entre 0 et 1. Il est généralement déterminé par comparaison de l'intensité de fluorescence du composé étudié avec une référence et est donné par l'équation suivante :

$$\Phi_X = \Phi_{ref} \left( \frac{Grad_X}{Grad_{ref}} \right) \left( \frac{\eta_X^2}{\eta_{ref}^2} \right)$$

Où les indices **X** et **ref** désignent respectivement le composé étudié et le composé de référence,  $\Phi$  est le rendement quantique, **Grad** est le gradient de l'intégration de l'intensité de fluorescence en fonction de l'absorbance à la longueur d'onde d'excitation et  $\eta$  est l'indice de réfraction du solvant dans lequel est réalisé la mesure.<sup>76</sup>

La brillance, exprimée en  $M^{-1}.cm^{-1}$ , est donnée par le produit du coefficient d'absorption molaire par le rendement quantique. Une valeur élevée témoigne de l'efficacité de l'absorption et de l'émission du fluorophore.

Enfin, un fluorophore peut être également caractérisé par sa durée de vie, notée  $\tau$ , qui correspond à la durée de vie moyenne de l'état excité. Cette valeur est généralement de l'ordre de la nanoseconde, une valeur faible témoignant de la capacité du fluorophore à revenir rapidement dans son état fondamental. Cette donnée peut être calculée par une étude de fluorimétrie résolue en temps.

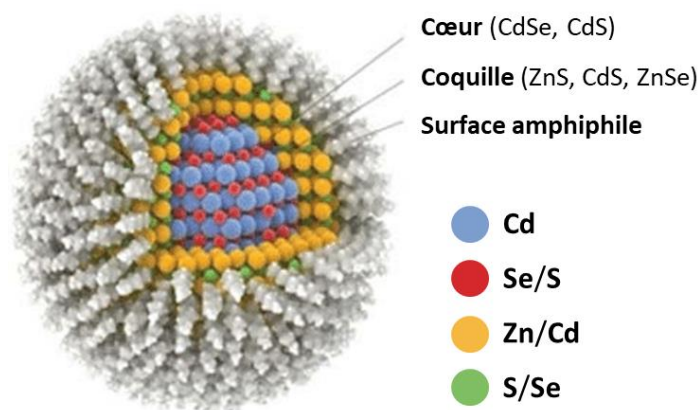
### 3.3 Systèmes luminescents utilisés en imagerie médicale

Le phénomène de luminescence peut avoir lieu à partir d'une excitation qui peut être électrique, mécanique, chimique ou lumineuse. Dans la suite de cette partie, nous nous focaliserons tout particulièrement sur les systèmes photoluminescents développés pour une utilisation médicale.

À ce jour, trois grandes familles de systèmes photoluminescents existent, à savoir les *quantum dots*, les lanthanides et les fluorophores organiques. Dans cette partie, nous évoquerons succinctement le sujet des *quantum dots* et des lanthanides, avant d'aborder plus en détail les fluorophores organiques.

#### 3.3.1 Quantum dots

Une première grande famille de composés luminescents est constituée par les *quantum dots* (QDs). Ces structures, généralement sphériques, présentent un cœur typiquement composé de sulfure ou de séléniure de cadmium (**Figure 12**).<sup>77</sup> Les propriétés photophysiques de ces structures



sont directement dépendantes de la taille de ce cœur métallique. Autour de celui-ci est disposée une coquille zincique ou cadmique, dont le rôle est à la fois de réduire le risque de relargage de métaux lourds, tout en protégeant le cœur de l'oxydation. Enfin, la surface de la nanoparticule peut être fonctionnalisée, dans le but d'y ajouter des groupements la rendant hydrosoluble ou permettant sa vectorisation.

**Figure 12.** Représentation schématique de la configuration coeur/coquille d'un quantum dot. Adapté de Nasirzadeh *et al.*<sup>77</sup>

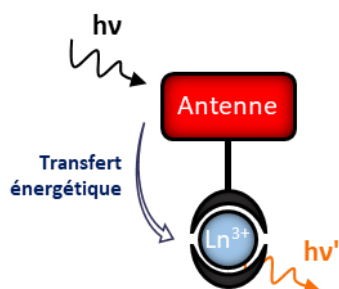
Les *quantum dots* présentent de multiples avantages pour l'imagerie : des coefficients d'absorption molaire entre 10 et 50 fois plus élevés que pour des molécules organiques, des rendements quantiques élevés ou encore une excellente photostabilité notamment.<sup>78</sup> Une première utilisation *in vitro* des QDs a été publiée par Wu *et al.* en 2002, suivie par plusieurs travaux aux cours des dernières années, qui confirment l'intérêt que les *quantum dots* peuvent avoir pour un marquage de cellules cancéreuses.<sup>79-82</sup> Cependant, l'avantage majeur des QDs réside dans leur capacité d'émettre à des longueurs d'onde situées dans la fenêtre de transparence optique. Il est ainsi possible d'atteindre le NIR-I voire NIR-II, zones du spectre électromagnétique où, comme nous l'avons vu précédemment, peu de fluorophores organiques sont à ce jour capables d'émettre.<sup>83</sup> De par cette caractéristique des QDs, des utilisations *in vivo* ont été envisagées, mais sont encore aujourd'hui limitées par les inconvénients inhérents aux *quantum dots*. Ces sondes sont pour la plupart constituées de métaux lourds tels que le tellure, le plomb ou le cadmium et un large nombre d'études ont pu montrer que ces éléments peuvent s'avérer cytotoxiques.<sup>84,85</sup> De plus, certaines études ont pu démontrer que les *quantum dots* ont une durée de vie dans les cellules pouvant aller jusqu'à plusieurs semaines *in vitro*, caractéristique



qui augmente de fait le risque de relargage d'atomes lourds au cours du temps.<sup>86</sup> De nouvelles générations de *quantum dots* ont ainsi pu être développées, impliquant l'utilisation d'autres éléments tels que l'argent, le cuivre ou encore l'indium, mais ce sont surtout les QDs dont le cœur est constitué de carbone, de germanium ou de silicium qui s'avèrent être les plus prometteurs en termes d'innocuité.<sup>83,87</sup> Le groupe de Prasad a ainsi décrit en 2010 un *quantum dot* de silicium qui s'est avéré être non toxique chez la souris pour des concentrations de 380 mg/kg, valeur quinze fois supérieure à la limite de toxicité de QDs à base de plomb et dix fois supérieure pour des QDs à base de cadmium.<sup>88</sup> À ce jour, l'utilisation en imagerie des *quantum dots*, bien que présentant d'intéressantes propriétés photophysiques, est encore freinée par leur toxicité.

### 3.3.2 Lanthanides

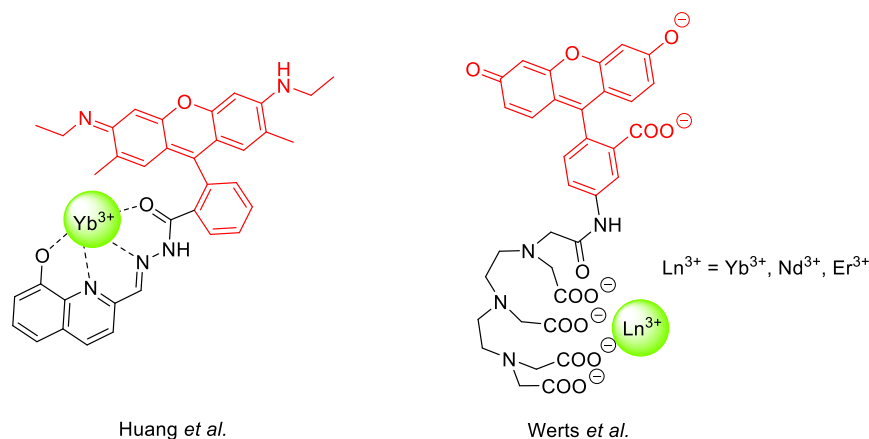
Une autre grande famille de luminophores a été développée à partir d'ions lanthanide(III) (noté Ln(III)). Les lanthanides possédant un coefficient d'absorption molaire faible, deux stratégies peuvent être employées pour surmonter cette limitation : l'utilisation d'un laser (source lumineuse d'énergie très localisée) ou l'utilisation d'un tandem antenne-lanthanide (**Figure 13**).<sup>78</sup>



**Figure 13.** Principe du fonctionnement du tandem antenne-lanthanide(III).

Pour cette seconde stratégie, l'objectif est que l'antenne (chromophore fortement absorbant) absorbe les photons incidents, dont l'énergie est ensuite transférée au lanthanide. Cette classe de luminophore permet de couvrir une large gamme spectrale selon la nature de l'élément employé (du visible au proche infrarouge), tout en présentant des déplacements de Stokes larges et des raies d'émission fines.<sup>89</sup> À titre d'exemple, deux structures antenne-lanthanide sont données **Figure 14**, la première étant basée sur une antenne de type rhodamine, la seconde utilisant la fluorescéine comme chromophore.

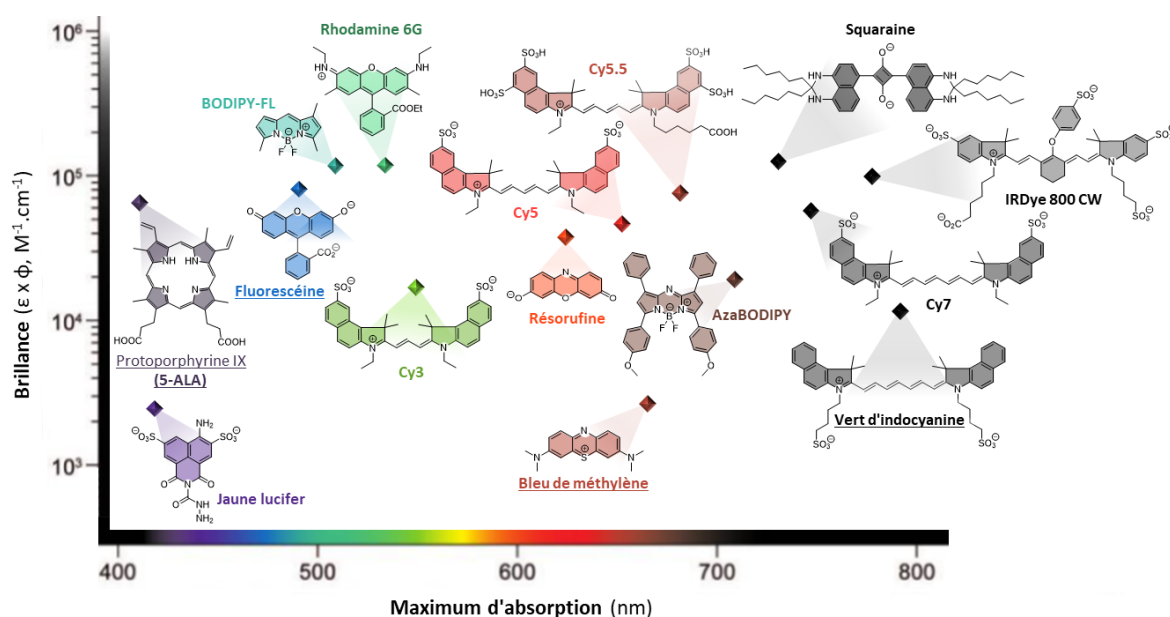
La première utilisation d'un lanthanide(III) pour la détection *in vivo* d'une tumeur remonte à 1989.<sup>90</sup> Au cours des vingt dernières années, plusieurs équipes de recherche se sont intéressées à la synthèse de sondes à base de lanthanide(III) pour des études *in vivo*. Bien que les lanthanides émettent dans la partie proche infrarouge du spectre électromagnétique, le principal handicap réside dans la longueur d'onde d'absorption de l'antenne, qui est, quant à elle, située en deçà de 550 nm, hors de la fenêtre de transparence optique.<sup>91-94</sup> De plus récents travaux décrivent la synthèse de nanoparticules de lanthanides, capables d'absorber dans le NIR-I et d'émettre dans le NIR-I voire NIR-IIa.<sup>95</sup> Cependant, malgré ces succès prometteurs, aucune étude clinique impliquant des nanoparticules de lanthanides n'a été lancée, la notion de toxicité (identiquement aux *quantum dots*) étant l'un des principaux freins.<sup>96</sup>



**Figure 14.** Exemples de deux structures antenne-lanthanide publiée respectivement par Huang *et al.* (gauche) et Werts *et al.* (droite).<sup>91,92</sup> L'antenne est identifiée dans chaque structure par la couleur rouge.

### 3.3.3 Fluorophores organiques

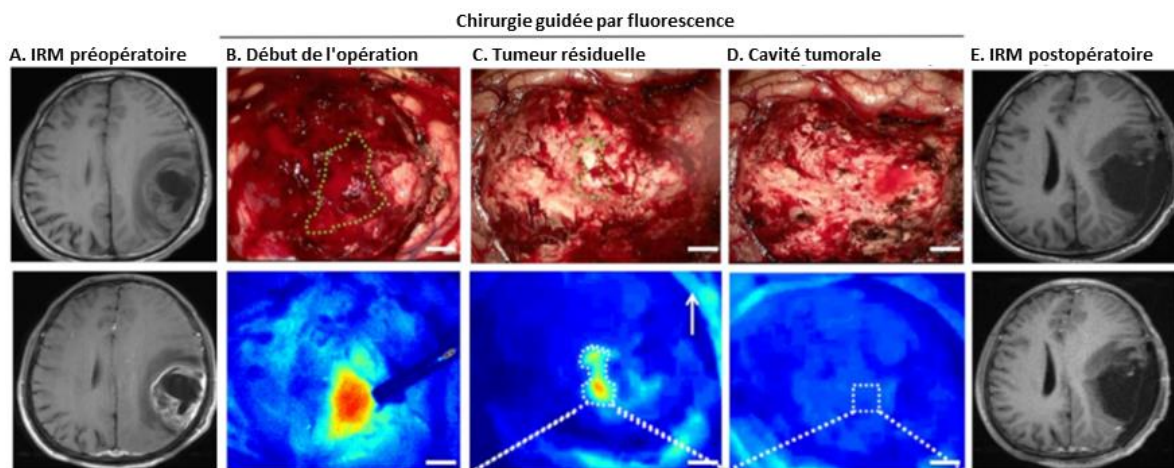
La dernière famille de sondes luminescentes qui sera détaillée dans ce manuscrit sont les fluorophores organiques. Un large éventail de molécules est aujourd'hui disponible (**Figure 15**).



**Figure 15.** Corrélation entre brillance et maximum d'absorption de quelques fluorophores utilisés en imagerie médicale. Les composés dont le nom est souligné sont autorisés actuellement en utilisation clinique par la FDA. Inspiré de Lavis *et al.*<sup>97</sup> Les données photophysique ont été tirées des sources citées ci-après et sont données lorsque cela est possible dans le dichlorométhane.<sup>98-111</sup>

Jusqu'au début des années 2010, seuls deux fluorophores avaient été autorisés par la FDA pour une utilisation clinique (angiographie en particulier), à savoir la fluorescéine, approuvée en 1976,<sup>106</sup> et le vert d'indocyanine, dont l'utilisation a été autorisée dès 1959.<sup>105</sup> Par la suite, le bleu de méthylène ainsi que l'acide  $\delta$ -aminolévulinique 5-ALA (dont la conversion *in situ* mène à la protoporphyrine IX responsable de la fluorescence<sup>112</sup>) ont été autorisés dans le cadre clinique.<sup>104,113</sup>

Au cours des dix dernières années, quelques familles de fluorophores ont été plus particulièrement étudiées afin de repousser leurs domaines d'absorption/émission vers des longueurs d'ondes plus élevées pour atteindre le domaine du proche infrarouge. En particulier, les cyanines ont été le sujet d'une recherche intensive, amenant à de nouvelles molécules telles que les IRDyes dont l'IRDye 800 CW, d'émission maximale à 800 nm, qui émet alors dans le NIR-I. L'intérêt de ce composé par rapport au vert d'indocyanine est la présence de quatre groupes sulfonates, qui lui octroient une grande solubilité dans l'eau, mais également la présence d'une fonction acide, rendant l'IRDye 800 CW vectorisable. Ce fluorophore a prouvé très récemment son efficacité lors de tests cliniques exploitant les propriétés photophysiques de la sonde pour la chirurgie assistée par fluorescence (**Figure 16**).<sup>114</sup> Ces travaux montrent l'intérêt de l'utilisation d'une telle sonde pour la différenciation des tissus sains des tissus tumoraux. Les tissus sains n'ont ainsi pas été endommagés et ont permis l'application d'une marge chirurgicale la plus faible possible, permettant la résection complète de la tumeur (résection jugée complète lors de l'ablation de plus de 95 % du volume initial de la tumeur).












**Figure 16.** Ablation d'une tumeur cérébrale chez un patient humain par chirurgie assistée par fluorescence à l'aide d'une sonde IRDye 800 CW vectorisée. **A** : Coupes axiales IRM avant (haut) et 30 minutes après (bas) injection intraveineuse d'un agent de contraste au gadolinium. **B-D** : Images avant (**B**), pendant (**C**) et après (**D**) résection de la tumeur en lumière blanche (haut) et par fluorescence (bas). **E** : Coupes axiales IRM avant (haut) et 30 minutes après (bas) injection de gadolinium, montrant la complète résection de la tumeur. Adapté de Li *et al.*<sup>114</sup>

### 3.3.4 Bilan sur les propriétés des systèmes luminescents actuels

Trois grandes familles de sondes luminescentes existent aujourd'hui, chacune présentant des intérêts et des inconvénients qui limitent leur utilisation *in vivo* (**Tableau 3**). Des caractéristiques telles que la solubilité, la stabilité en milieu biologique ou encore la stabilité au photoblanchiment (perte de fluorescence) sont autant de paramètres à prendre également en compte lorsqu'un composé est destiné à être utilisé *in vivo*.

**Tableau 3.** Caractéristiques principales des familles de sondes luminescentes pour l'imagerie.

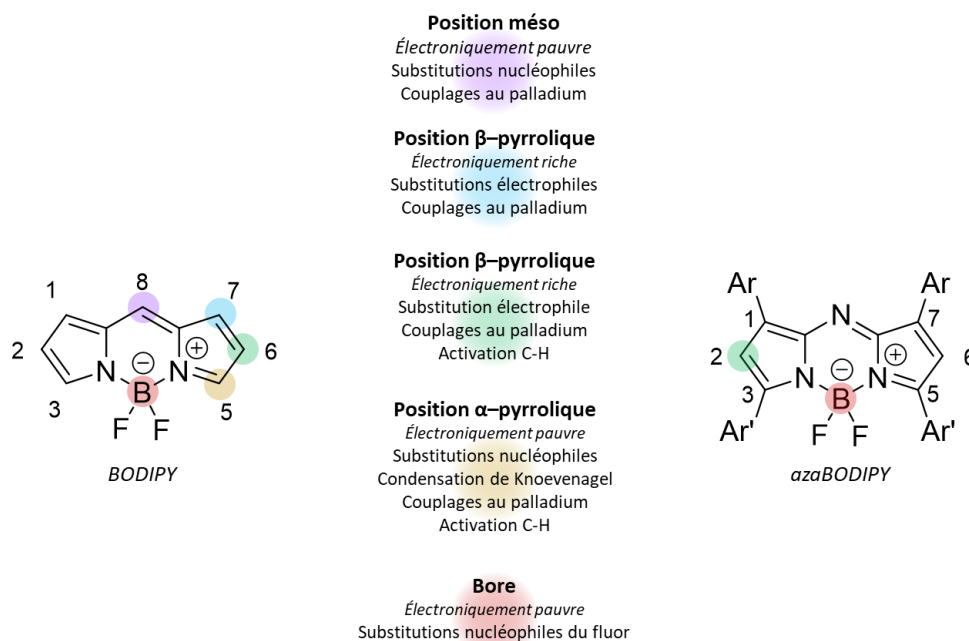
| Famille                 | Émission dans le NIR  | Sécurité   | Facilité et rapidité de synthèse   |
|-------------------------|---|--|--|
| Fluorophores organiques | Non dans la plupart des cas  | Dépend du fluorophore mais toxicité généralement faible     | Vaste choix de fluorophores, synthèses connues  |
| Quantum dots            | Oui                          | Risque de relargage de métaux lourds toxiques               | Synthèse connue mais caractérisation complexe   |
| Lanthanides             | Oui                          | Risque de relargage du lanthanide (cas des nanoparticules)  | Synthèse complexe, nécessite une antenne        |

Malgré la diversité de luminophores disponibles, l'imagerie optique se limite encore aujourd'hui très majoritairement à la microscopie. La principale explication à cela est que les sondes développées ne permettent pas encore une utilisation *in vivo*. Les *quantum dots* et lanthanides, bien que présentant des caractéristiques photophysiques particulièrement attrayantes, nécessitent encore d'être optimisés, en particulier dans le but de réduire le risque de toxicité. En ce qui concerne les fluorophores organiques, un travail est nécessaire pour leur permettre d'être utilisés dans la fenêtre de transparence optique.

Aujourd'hui, de nouvelles technologies émergent (caméras NIR spécialisées) permettant le suivi de sondes fluorescentes, que ce soit dans le NIR-I ou le NIR-II. Il existe ainsi une demande de plus en plus forte pour des composés pouvant être employés *in vivo* en préclinique et clinique. Ce désir de développer de nouvelles sondes chimiquement stables, aux propriétés photophysiques permettant une imagerie *in vivo*, est peut-être en passe de trouver une réponse dans une famille de fluorophores organiques ayant pris une ampleur notable ces dernières années : les BODIPYs.

### 3.4 BODIPYs et azaBODIPYs

Les 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenes, plus communément nommés BODIPYs, sont une classe de fluorophores dérivés de cyanines, dont le cœur est rigidifié par un atome de bore. Ces molécules, en comparaison à d'autres fluorophores, présentent une bonne stabilité chimique et photochimique, de bons rendements quantiques de fluorescence et leur synthèse est relativement aisée. Le premier BODIPY a été obtenu par sérendipité par Treibs *et al.* en 1968.<sup>115</sup> Cet évènement a ouvert la voie vers cette nouvelle famille de molécules fluorescentes, mais il a fallu attendre les années 90 pour que la recherche s'intéresse réellement à ces fluorophores, menant aujourd'hui à la publication de plus de 1000 articles par an sur le sujet.<sup>116</sup> Les dérivés azotés des BODIPYs, nommés azaBODIPYs, ont quant à eux commencé à susciter l'engouement des laboratoires à partir des années 2010. La présence de multiples sites réactionnels sur les cœurs BODIPY et azaBODIPY permet d'y introduire diverses fonctionnalités et leur gamme d'application s'en retrouve particulièrement diversifiée, allant de la conception de matériaux luminescents aux applications biologiques (**Figure 17**). À noter que pour les azaBODIPYs, la présence d'aryles en positions 1,7 ( $\beta$ -pyrrolique) et 3,5 ( $\alpha$ -pyrrolique) est pratiquement systématique.



**Figure 17.** Positions réactives des cœurs BODIPY et azaBODIPY.<sup>116-118</sup>

Ces sites permettent l'introduction de divers groupements, dont les objectifs peuvent être multiples : vectorisation, solubilisation, chélation d'un métal... Cependant, l'une des propriétés majeures de ces sites réactionnels est que leur modification peut directement impacter les propriétés photophysiques du fluorophore qui, par l'augmentation de la conjugaison, peut mener à un déplacement bathochrome.

De plus, il a pu être démontré que la substitution des fluorures sur l'atome de bore par des groupements oxygénés ou alcynes n'impacte pas de manière négative la brillance du composé (**Figure 18** – composés verts).<sup>119,120</sup> La fonctionnalisation de l'atome de bore présente alors l'intérêt de pouvoir introduire diverses fonctionnalités sans altérer les propriétés photophysiques. Cependant, le principal frein à l'utilisation de ces BODIPYs pour une utilisation *in vivo* est le domaine de longueur d'onde dans lequel ils absorbent et émettent, d'un maximum de l'ordre de 550 nm, bien en deçà de la zone du NIR-I.<sup>121</sup>

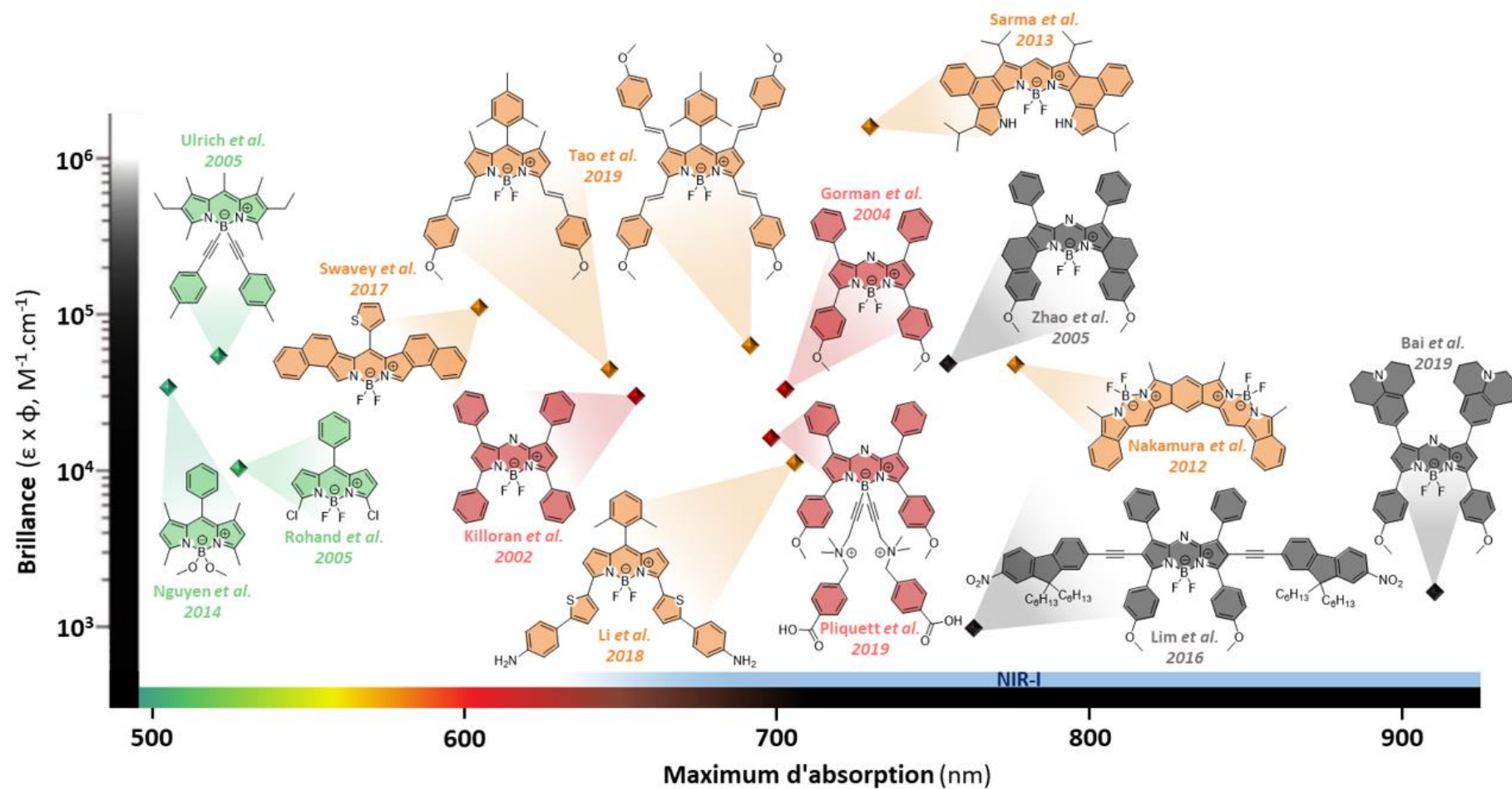
C'est pourquoi les équipes de recherche se sont orientées vers la synthèse de nouveaux BODIPYs aux systèmes  $\pi$  étendus (**Figure 18** – composés oranges). Les travaux tels que ceux de Swavey *et al.* ou Sarma *et al.* ont ainsi montré que l'introduction de cycles aromatiques en positions  $\alpha$  et  $\beta$  pyrroliques permet un décalage bathochromique très important, pouvant aller jusqu'à 200 nm par rapport à des BODIPYs classiques.<sup>122,123</sup> Nakamura *et al.* ont également proposé un dimère de BODIPY rigide dont l'émission maximale se situe à 781 nm, ce qui place ce fluorophore dans la zone du NIR-I.<sup>124</sup> Cependant, la structure relativement plane des composés de ce type les rend sujets à un  $\pi$ -stacking important, d'où une solubilité en milieux aqueux quasiment inexistante. D'autres BODIPYs conjugués ont reçu une attention particulière, les BODIPYs « styryles ». L'introduction de groupements styryles en position  $\alpha$  pyrrolique a permis d'atteindre des maximums en absorption de l'ordre de 700 nm comme en attestent les travaux de Tao *et al.*<sup>125,126</sup>

Cependant, les principaux inconvénients pour de tels fluorophores résident dans leur faible solubilité et stabilité en milieux aqueux, ce qui entrave leur utilisation *in vivo*.

C'est ainsi que depuis une quinzaine d'années, un intérêt tout particulier a été porté sur les dérivés azotés des BODIPYs, les azaBODIPYs. Cette classe de fluorophores, tirant parti de la stabilité et la facilité de synthèse des BODIPYs tout en ayant des propriétés photophysiques attrayantes dans le proche infrarouge, semble être idéale pour une utilisation *in vitro* et *in vivo*. Suite aux travaux initiaux du groupe de O'Shea à partir de 2002, plusieurs équipes dont la nôtre se sont intéressées à ces molécules (**Figure 18** – composés rouges).<sup>127,128</sup> Le challenge principal étant le manque d'hydrosolubilité de ces fluorophores, plusieurs équipes se sont focalisées sur la problématique sans succès, les dérivés obtenus étant trop instables pour être exploités.<sup>129</sup> D'autres équipes ont reporté la synthèse d'azaBODIPYs dont l'hydrosolubilité n'était possible qu'en présence d'un tensioactif.<sup>130-132</sup> Récemment, notre équipe a développé une plateforme azaBODIPY, nommée **WazaBY** (pour *Water-soluble azaBODIPY*) et a pu valoriser le potentiel de ce composé par une étude d'imagerie *in vivo*.<sup>133</sup> Les détails concernant ces travaux seront donnés en partie **3.4.1**.

Enfin, d'autres azaBODIPYs aux systèmes  $\pi$  étendus ont été développés, d'absorption et émission pouvant aller jusqu'à 1000 nm, ce qui en fait des sujets d'étude intéressants pour une utilisation dans le NIR-I et le NIR-IIa (**Figure 18** – composés gris).<sup>134-136</sup>

Les BODIPYs et azaBODIPYs ont montré leur versatilité de par leurs domaines d'application variés. Ainsi certaines équipes ont notamment montré leur potentiel dans le développement de cellules photovoltaïques organiques<sup>137-140</sup> ou la fabrication de diodes électroluminescentes organiques (OLEDs).<sup>141,142</sup> D'autres applications telles que l'étude des organites,<sup>143-145</sup> la détection d'ions métalliques ou encore le marquage de cibles telles que des cellules cancéreuses (ces deux dernières utilisations seront abordées plus en détail dans la suite de ce manuscrit) sont des domaines dans lesquels les BODIPYs et azaBODIPYs ont montré des résultats particulièrement encourageants.

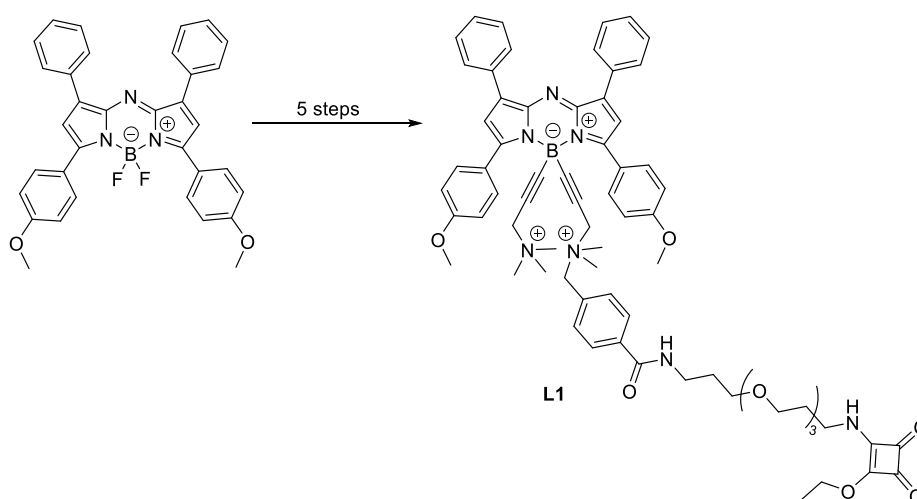


**Figure 18.** Corrélation entre brillance et maximum d'absorption de quelques BODIPYs et azaBODIPYs. Les BODIPYs classiques sont identifiés en vert et ceux présentant un système  $\pi$  étendu sont donnés en orange. Les azaBODIPYs classiques sont en rouge et ceux présentant un système  $\pi$  étendu sont en gris. Les données photophysiques ont été tirées des sources citées ci-après et sont données lorsque cela est possible dans le dichlorométhane.<sup>119,120,122–127,134,135,146–149</sup>

### 3.4.1 Fonctionnalisation de l'atome de bore

Comme cela a été abordé précédemment, la question de l'hydrosolubilité des azaBODIPYs est importante, car c'est d'elle que dépend leur éventuelle utilisation *in vivo*.

Au sein de notre laboratoire, les travaux de thèse du Dr Pliquett (mon prédécesseur au sein de notre équipe) ont permis, par fonctionnalisation de l'atome de bore porté par le cœur azadipyrométhène, de développer une famille d'azaBODIPYs solubles dans l'eau et en milieu physiologique que nous avons nommée WazaBY pour *Water-soluble azaBODIPY* (exemple d'un WazaBY bioconjugué : **L1**, **Figure 19**).<sup>133</sup> L'augmentation significative de l'hydrosolubilité induite par l'introduction d'ammoniums sur l'atome de bore implique que l'azaBODIPY présente une tendance à l'agrégation significativement amoindrie en milieu physiologique, tout en permettant de conserver les propriétés photophysiques particulièrement intéressantes de cette classe de fluorophores (émission proche infrarouge avec une brillance élevée).



**Figure 19.** WazaBY hydrosoluble bioconjugué **L1** publié par notre équipe en 2019.<sup>133</sup>

Le composé **L1** vectorisé par un anticorps anti-PD-L1 a ainsi pu être testé *in vivo*. Les résultats ainsi obtenus ont souligné l'efficacité de ce composé pour marquer une tumeur sous-cutanée (lignée CT26) sur souris BALB/c. Une observation particulièrement importante à prendre en compte est l'absence de signes de toxicité du composé **L1** comme de l'équivalent vectorisé, aux doses étudiées.



## 4 Objectifs de cette thèse

Un large éventail de fluorophores, dont les principales familles ont été présentées dans ce chapitre introductif, sont aujourd'hui disponibles pour des études *in vitro*.<sup>133</sup> Cependant, le passage aux études *in vivo* de ces systèmes est encore grandement freiné par les limitations inhérentes à ces sondes luminescentes, qu'il s'agisse de leur toxicité, de leur stabilité chimique et photophysique, de leur manque d'hydrosolubilité, ou encore de leur capacité à absorber et émettre dans la fenêtre de transparence optique.

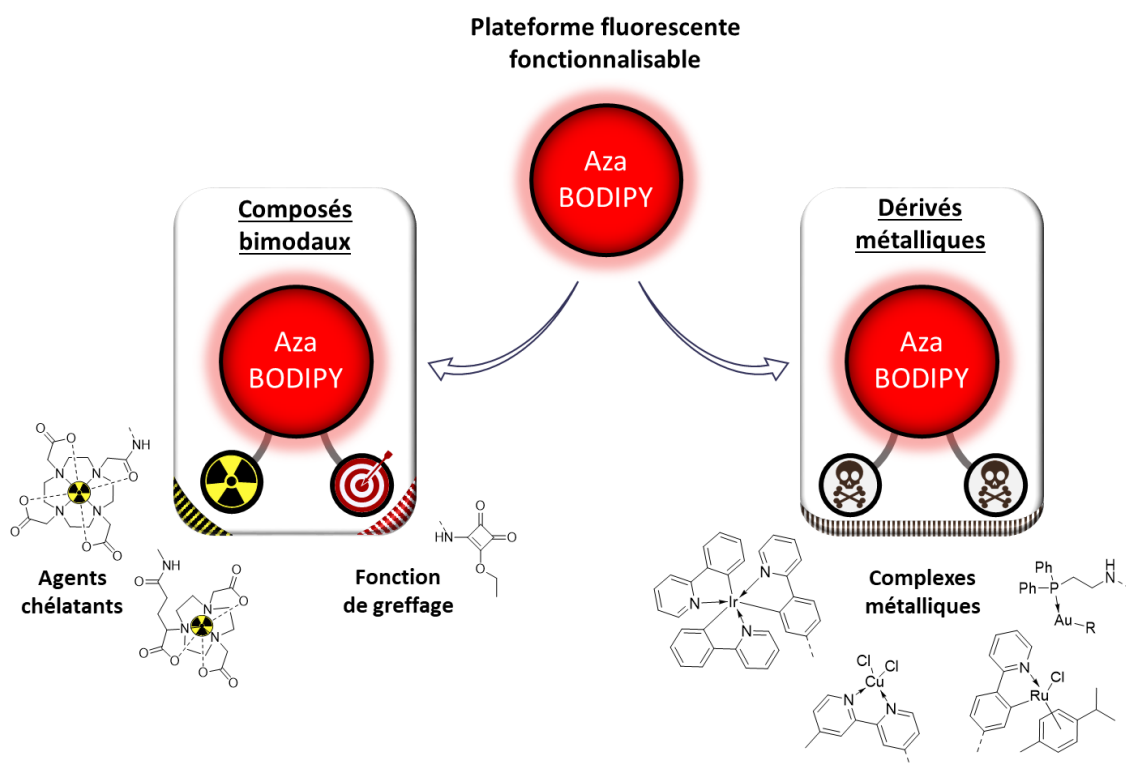
Aujourd'hui, une demande grandissante pour le développement de nouvelles sondes hydrosolubles, non toxiques et capables d'émettre au-delà de 650 nm se fait ressentir. Les azaBODIPYs, dérivés azotés des BODIPYs, ont commencé à faire leurs preuves depuis une quinzaine d'années. L'intérêt pour ces fluorophores est multiple. Au-delà de leur relative simplicité de synthèse, de leur robustesse et de leurs propriétés photophysiques intéressantes, ces composés présentent l'avantage d'être aisément fonctionnalisables. Cependant, le principal frein à leur utilisation (en particulier *in vivo*) est le caractère lipophile de ces composés.

Notre laboratoire, spécialisé dans le développement de fluorophores pour la chimie médicinale, s'est intéressé à cette problématique au cours des dernières années. En 2019, les travaux de thèse du Dr Pliquett ont mené à la publication de la synthèse et des études *in vitro* et *in vivo* du premier azaBODIPY vectorisé hydrosoluble, capable d'émettre dans la fenêtre de transparence optique. Conscients que ces travaux pourraient ouvrir la voie vers une sonde utilisable *in vivo*, nous nous sommes focalisés sur l'optimisation, la validation et la valorisation de cette plateforme imageante fluorescente hydrosoluble azaBODIPY.

Pour cela, nous avons décidé de tester la versatilité de cette sonde pour plusieurs applications distinctes, à savoir :

- Développement de sondes bimodales vectorisées TEP/optique et TEMP/optique pour une utilisation en chirurgie assistée par fluorescence
- Développement de composés théranostiques à base de complexes métalliques d'or
- Développement de composés théranostiques présentant un caractère « intelligent » permettant d'imager des principes actifs à base de métaux

Les deux derniers points seront abordés dans un même chapitre. Deux grandes lignes directrices à ces travaux peuvent alors être tracées avec, d'une part, le développement de bimodaux et, d'autre part, le développement d'azaBODIPYs pour une utilisation théranostique (**Figure 20**).



**Figure 20.** Lignes directrices de ces travaux de thèse.

Le chapitre I de ce manuscrit abordera le développement de sondes bimodales à partir de la plateforme WazaBY. Le chapitre II, quant à lui, sera présenté en deux parties distinctes avec, d'une part, le développement de nouveaux théranostiques et, d'autre part, la synthèse de composés dits « intelligents ». Pour cette dernière partie, l'objectif est de développer des composés dont la fluorescence sera modulée par la coordination ou non d'un métal au fluorophore.

Dans la suite de ce manuscrit, deux numérotations distinctes seront utilisées pour les composés présentés. Les composés dont j'ai été amené à réaliser la synthèse seront classiquement identifiés par un numéro, alors que les composés issus de la littérature seront précédés de la lettre L.





---

# CHAPITRE 1

## BIMODALITÉ POUR L'IMAGERIE MÉDICALE

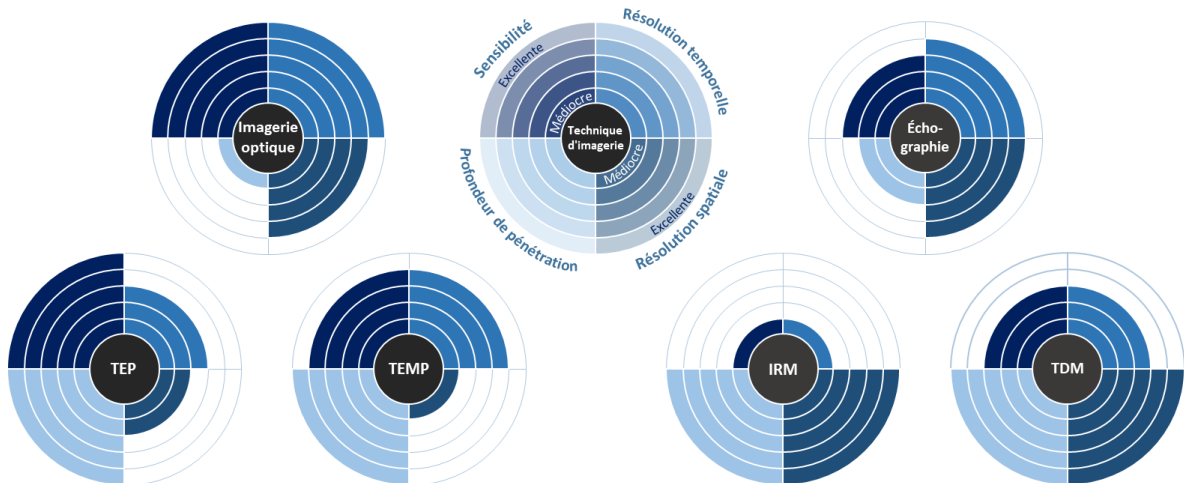
---



## 1 Bimodalité pour l'imagerie médicale

### 1.1 Intérêt en comparaison à un agent imageant unique

Chaque technique d'imagerie possède des caractéristiques en termes de sensibilité, résolution temporelle et spatiale et de profondeur de pénétration qui lui sont propres. Selon ce que l'on souhaite imager (circulation sanguine, système nerveux, processus biologique, organe, os, tumeur...), il convient alors de choisir la technique d'imagerie la plus adaptée, tout en gardant à l'esprit que chaque technique possède des limitations (**Figure 21**).



**Figure 21.** Résumé des caractéristiques principales des techniques d'imagerie couramment utilisées en clinique.<sup>29,30</sup> TEP : tomographie par émission de positons, TEMP : tomographie par émission monophotonique, IRM : imagerie par résonance magnétique, TDM : tomodensitométrie.

Certaines techniques présentent une résolution spatiale faible telles la TEP ou la TEMP, alors que d'autres manquent de sensibilité et nécessitent l'utilisation de larges doses d'agent de contraste, ce qui peut être le cas de l'IRM. Des techniques telles l'imagerie optique ou l'utilisation d'ultrasons peuvent permettre d'allier une bonne sensibilité à une résolution spatiale élevée, au détriment de la profondeur de pénétration.

Afin de combler les lacunes inhérentes à une technique d'imagerie, il est possible d'y associer une seconde technique imageante. Cette combinaison est généralement réalisée entre une technique d'imagerie ne nécessitant pas d'agent de contraste à une imagerie qui en utilise. Dans un souci d'amélioration du contraste, il peut également être possible d'avoir recourt à l'injection d'un agent bimodal qui peut être détecté par deux techniques d'imagerie différentes. Le développement d'appareils d'imagerie combinées mais également de sondes multimodales est devenu, depuis les années 2000, un sujet particulièrement étudié par les laboratoires.<sup>150</sup>

Certaines technologies telles que les scanners TEP/TDM ou TEMP/TDM sont aujourd'hui couramment utilisées en clinique et ont quasiment supplanté l'utilisation seule de la TEP ou TEMP.<sup>151</sup> En ce qui concerne l'imagerie TEP/TDM, un prototype de scanner a vu le jour dès 1999,<sup>152</sup> pour être finalement commercialisé trois ans plus tard.<sup>153</sup> Les scanners combinant TEMP et

tomodensitométrie sont apparus dès les années 90, avant d'être commercialisés à partir de 1999.<sup>154</sup> Ces scanners présentent l'avantage de pouvoir combiner l'imagerie par radionucléide à la tomodensitométrie, cette dernière apportant une information anatomique.

La TEP et la TEMP peuvent également être combinées à l'IRM, permettant ainsi de combler les lacunes de sensibilité de l'IRM tout en apportant une résolution spatiale excellente et une image anatomique précise.<sup>155-158</sup> D'autres techniques bimodales ont été développées ces dernières années, telles des couplages ultrasons/PET ou encore ultrasons/IRM.<sup>159,160</sup>

Dans la suite de ce manuscrit, nous nous focaliserons plus particulièrement sur les techniques d'imagerie bimodale impliquant l'utilisation de l'imagerie optique.

### 1.2 Composés bimodaux impliquant l'imagerie optique

L'imagerie optique est aujourd'hui une technique en plein essor. Le développement de nouveaux fluorophores et de techniques permettant une utilisation en préclinique voire en clinique ont induit un intérêt croissant pour cette imagerie au cours des dernières années.

Le frein majeur à leur utilisation pour le diagnostic *in vivo* reste cependant la profondeur de pénétration à laquelle l'imagerie peut être réalisée. Au-delà de quelques millimètres de profondeur, le signal perçu par le fluorophore n'est plus exploitable. Cette technique est donc majoritairement utilisée aujourd'hui *in vitro* et *in vivo* chez le petit animal, où l'épaisseur plus faible de tissus impacte le signal de manière plus restreinte.

Cependant, un domaine dans lequel l'imagerie optique est en train de prendre une place particulièrement importante concerne son utilisation pour la chirurgie assistée par fluorescence. Le nombre d'articles publiés sur la chirurgie assistée par fluorescence reflète l'attrait des chercheurs pour cette technique, passant de 50 par an en 1995 à 500 en 2015.<sup>104</sup> De même, les études cliniques et précliniques sur le sujet se sont multipliées au cours des dernières années.<sup>161</sup> Une grande part de ces études (60 %) se focalise sur l'utilisation de vert d'indocyanine.<sup>162</sup>

L'avantage majeur de l'imagerie optique par rapport à d'autres techniques est sa facilité d'utilisation et la nécessité d'un matériel relativement peu onéreux et peu encombrant. De plus, il s'agit d'une technique considérée comme étant sûre car non-ionisante contrairement à d'autres techniques telles la TEP, la TEMP ou encore la tomodensitométrie, basées sur l'utilisation de rayons de haute énergie. D'autres techniques, encombrantes, coûteuses et d'utilisation complexe telles que l'IRM ou la tomodensitométrie ne permettent pas une utilisation au bloc opératoire.<sup>163</sup> Ainsi, à ce jour, les chirurgiens doivent alors réussir à opérer et procéder à l'ablation d'une tumeur à l'œil et au touché seulement. Plusieurs risques existent alors. Par difficulté de différenciation entre tissus sains et tissus tumoraux, une ablation partielle involontaire de la tumeur peut induire une rechute. La stratégie généralement employée afin d'éviter cela est l'application de marges chirurgicales, qui mènent alors à l'ablation de tissus sains. Dans ce cas, le risque d'erreur chirurgicale irréversible (telle que la section d'un nerf) existe lors de l'opération.



Les agents bimodaux fluorescents peuvent permettre de réaliser en amont un diagnostic préopératoire (par tomodensitométrie, échographie, IRM ou encore imagerie radioisotopique), suivi de l'opération, assistée par fluorescence. L'idée est que l'injection d'un seul et unique composé permette de réaliser les deux analyses successivement, évitant ainsi d'avoir à injecter un cocktail de sondes au patient. Le défi majeur pour le développement d'une telle sonde est que son signal de fluorescence doit être suffisamment intense pour être détecté à l'œil nu ou par une caméra au bloc opératoire, mais également que celle-ci soit spécifique de la cible à imager.

Ainsi, divers composés bimodaux couplant l'imagerie optique à la tomodensitométrie, l'échographie, l'IRM ou encore l'imagerie radioisotopique ont pu être développés.

### 1.2.1 Sonde bimodale optique/tomodensitométrie

L'utilisation de nanoparticules est le choix le plus courant en ce qui concerne la combinaison entre modalité optique et tomodensitométrie. Les sensibilités très différentes pour les deux modalités d'imagerie font qu'il est complexe de synthétiser une unique sonde permettant d'obtenir un signal satisfaisant pour les deux imageries. Les nanoparticules, par leur fonctionnalisation modulable, permettent d'apporter une réponse à cette problématique.<sup>164</sup> Différents groupes se sont intéressés au développement de telles sondes, en particulier par la combinaison d'huiles iodées ou de *quantum dots* et de différents fluorophores.<sup>165,166</sup> D'autres techniques, telles que l'utilisation de *nanoclusters* ou *nanorods* d'or combinés à des *quantum dots*, ont également été développées récemment.<sup>167–169</sup>

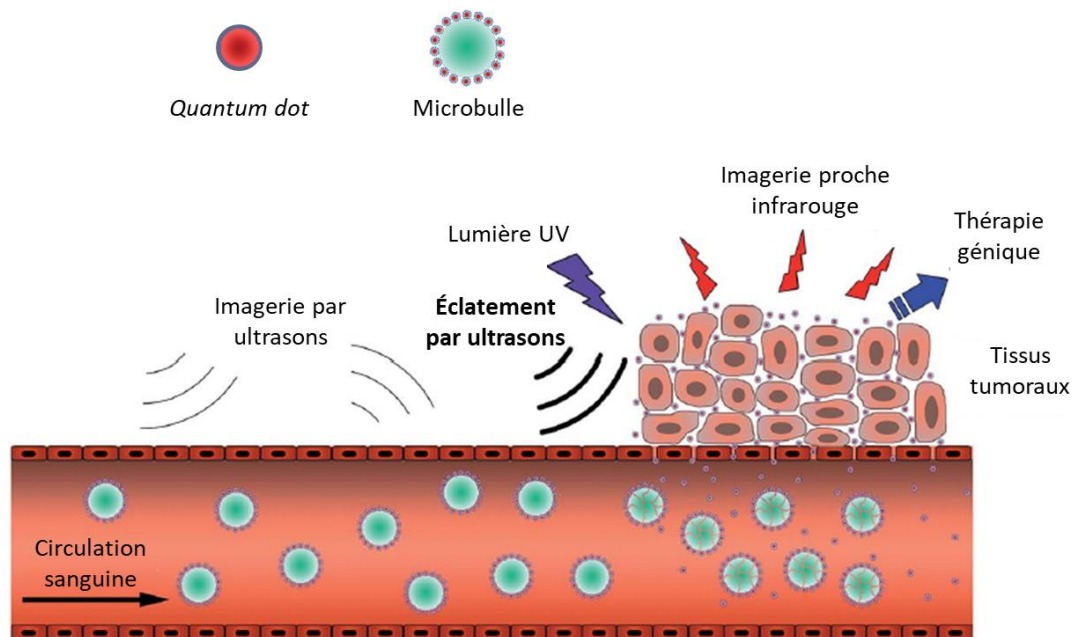
Diverses contraintes, en particulier en ce qui concerne la toxicité, vectorisation, synthèse et caractérisation des nanoparticules, font que cette technique ne s'est pas fortement développée contrairement à d'autres techniques bimodales.<sup>164</sup>

### 1.2.2 Sonde bimodale optique/échographie

Par l'utilisation de microbulles (structures lipidiques ou biopolymériques enfermant un gaz), il est possible de combiner l'imagerie optique à l'échographie et ainsi d'obtenir une sonde exploitant les forces des deux techniques d'imagerie. Lv *et al.* ont ainsi développé en 2018 des nanostructures vectorisées et spécifiques de HER2 (récepteur membranaire impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire et qui est surexprimé chez certaines cellules cancéreuses).<sup>170</sup> L'intérêt est de localiser précisément et de manière non invasive la tumeur par l'utilisation des ultrasons. Suite à cela, la luminescence de la particule permet la détermination des marges chirurgicales à appliquer ainsi que l'identification des ganglions lymphatiques touchés, ce qu'il est impossible de réaliser par l'utilisation seule des ultrasons.

Une autre utilisation possible des ultrasons et des microbulles est le suivi et transport de sondes, telles que les *quantum dots*, jusqu'à leur cible. Yang *et al.* ont montré le potentiel d'un tel système, pour lequel l'éclatement des microbulles peut être déclenché *in vivo* grâce aux ultrasons une fois qu'elles ont atteint leur cible (attesté par suivi par imagerie ultrasonique). La libération des *quantum dots* dans la tumeur permet alors le marquage de celle-ci par luminescence. Une visée

thérapeutique peut également être envisagée par l'utilisation de *quantum dots*. Ceci est le cas dans les travaux décrits par Yang *et al.*, pour lesquels une thérapie génique par l'utilisation de *quantum dots* porteurs de gène exogènes est envisagée (**Figure 22**).<sup>171</sup>

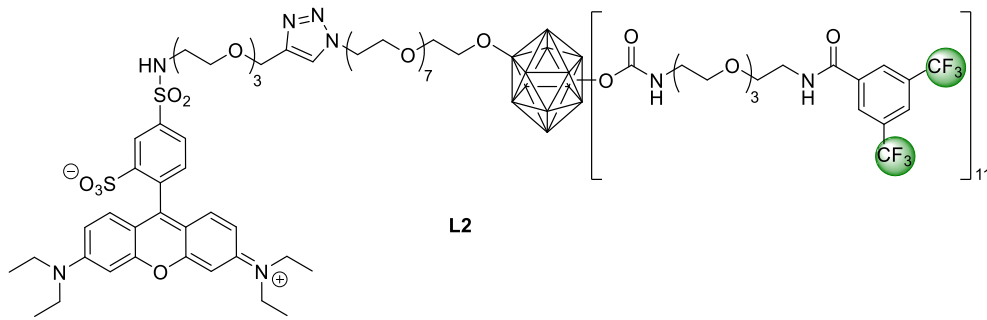


**Figure 22.** Imagerie bimodale par fluorescence et ultrasons permettant le suivi de la libération de *quantum dots* pour de la thérapie génique. Adapté de Yang *et al.*<sup>171</sup>

### 1.2.3 Sonde bimodale optique/IRM

Le couplage de l'imagerie optique à l'IRM est une technique qui a intéressé très tôt les équipes de recherche. L'intérêt étant alors de coupler une seconde modalité d'imagerie à une imagerie pouvant apporter une information anatomique, avec un excellent contraste telle l'IRM. Dès 1998, un premier agent bimodal combinant ces deux techniques d'imagerie est publié par l'équipe de Meade, montrant ainsi l'intérêt porté à de telles sondes.<sup>172</sup> L'alliance d'une tétraméthylrhodamine à un DOTA pouvant chélater du gadolinium s'est révélée efficace en étude *in vitro*. Cependant, les études *in vivo* ont montré un signal inexistant en IRM, alors que le signal fluorescent était observable. Un tel résultat peut être expliqué par la différence de sensibilité entre les deux modalités, la fluorescence pouvant être détectée à des concentrations particulièrement faibles, au contraire de l'IRM, qui requiert des concentrations en sonde jusqu'à 10 000 fois plus élevées pour que l'imagerie puisse être réalisée.<sup>30</sup>

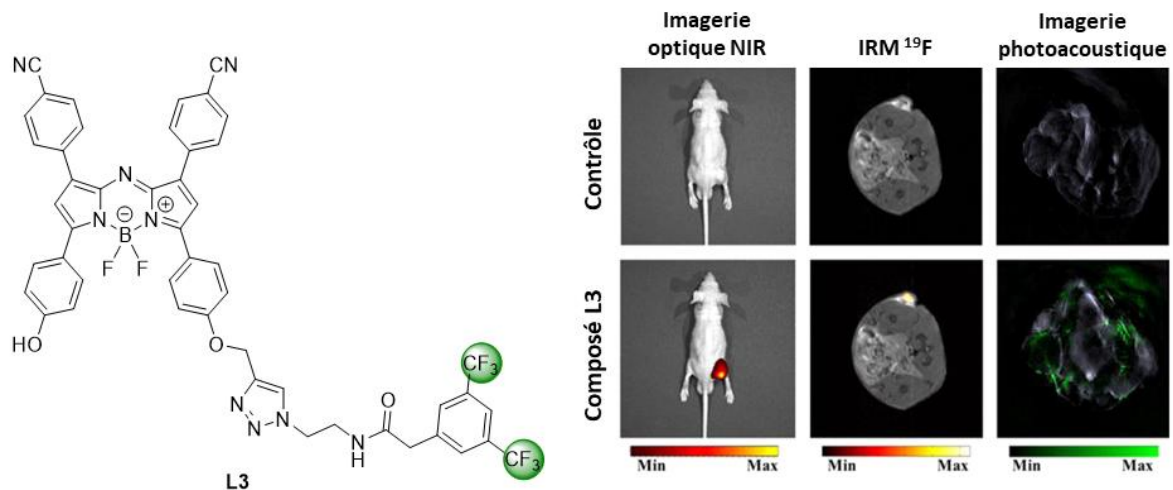
Ainsi, le développement d'une sonde bimodale optique/IRM doit prendre en compte cette différence de sensibilité et par la suite, cette notion a été incluse dans le développement de nouvelles molécules combinant l'IRM et la fluorescence. Des groupes tels que ceux de Meade ou de Hawthorne ont ainsi récemment développé des sondes à base de gadolinium(III)<sup>173</sup> ou de fluor-19,<sup>174</sup> permettant d'obtenir *in vivo* des images de qualité, à la fois en imagerie optique et magnétique, par l'utilisation de structures présentant jusqu'à 66 fonctions IRM par fonction fluorescente telle **L2** (**Figure 23**).



**Figure 23.** Sonde bimodale IRM/optique **L2** présentant 66 atomes de fluor-19 par molécule fluorescente développée par l'équipe de Hawthorne.<sup>174</sup>

De nombreuses sondes moléculaires bimodales optique/IRM ont ainsi émergé, la plupart mettant en jeu le gadolinium(III) pour l'imagerie IRM, couplé à la fluorescéine,<sup>175</sup> coumarine,<sup>176</sup> ou des dérivés de BODIPYs ou cyanines, pour l'imagerie optique.<sup>177,178</sup>

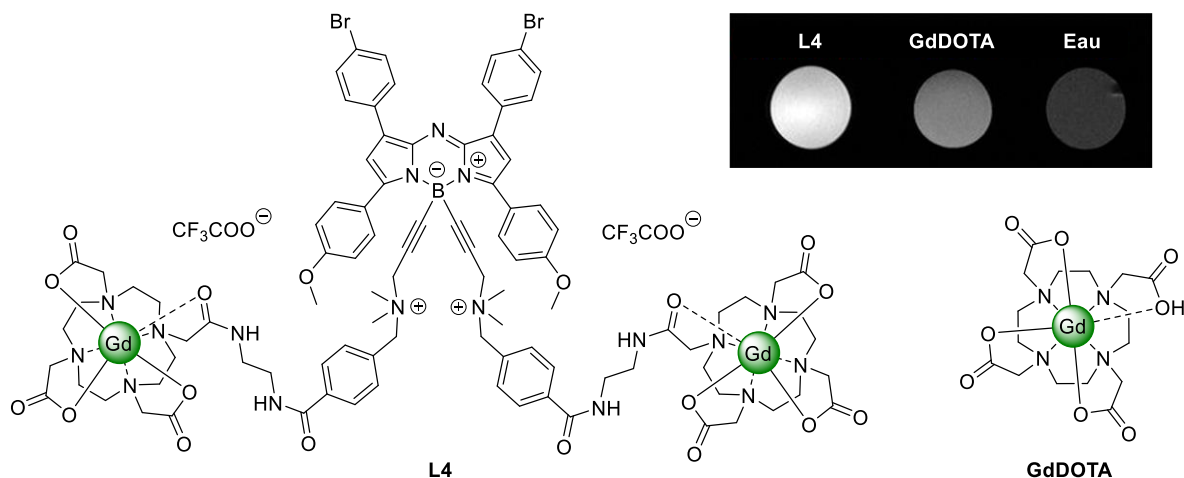
Certaines équipes se sont également intéressées à l'utilisation d'azaBODIPYs, permettant d'étendre le domaine de fluorescence de la sonde vers le proche infrarouge. Liu *et al.* ont publié fin 2019 une sonde trimodale permettant un diagnostic à la fois par fluorescence et IRM, mais également par imagerie photoacoustique (**Figure 24**).<sup>179</sup>



**Figure 24.** AzaBODIPY trimodal **L3** pour une imagerie par fluorescence, IRM et photoacoustique. Les images sont données pour une souris porteuse d'une tumeur A549 avant (haut) et 5 min après l'injection (bas) de **L3**. Adapté de Liu *et al.*<sup>179</sup>

Ainsi, d'autres équipes se sont focalisées sur l'utilisation d'agents imageants pour l'IRM permettant d'obtenir un contraste supérieur. Très récemment, notre équipe a publié ses résultats préliminaires sur une sonde azaBODIPY bimodale optique/IRM (**Figure 25**).<sup>180</sup> Cette sonde s'est révélée particulièrement intéressante, sa fluorescence présentant des rendements quantiques de l'ordre de 10 % dans le PBS, ce qui est élevé pour un fluorophore émettant dans le proche infrarouge. De plus, le signal obtenu en IRM présente un meilleur contraste à 150  $\mu\text{M}$  pour le bimodal **L4** en comparaison avec **GdDOTA**, agent de contraste usuellement utilisé en clinique. Le potentiel de cette sonde sera à confirmer ultérieurement par la réalisation de tests *in vivo*. Le

composé **L4** présente l'avantage d'être parfaitement soluble dans l'eau et en milieu biologique, et ce sans l'aide d'un tensioactif, ce qui en fait un candidat viable pour une utilisation *in vivo*.

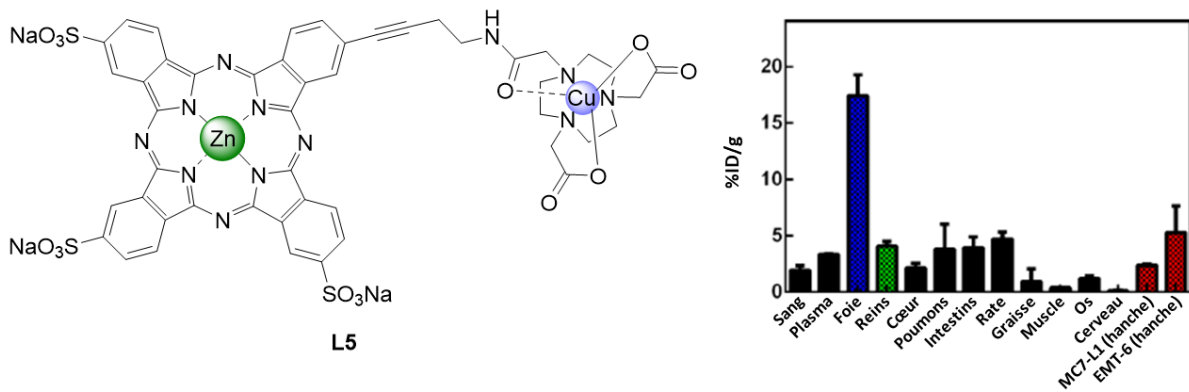


**Figure 25.** Sonde bimodale optique/IRM **L4**, développée par notre équipe et structure de **GdDOTA**. Les images phantom IRM sont données à 150  $\mu\text{M}$  pour **L4** et **GdDOTA**. Adapté de Florès *et al.*<sup>180</sup>

### 1.2.4 Composés bimodaux optiques/TEP et optique/TEMP

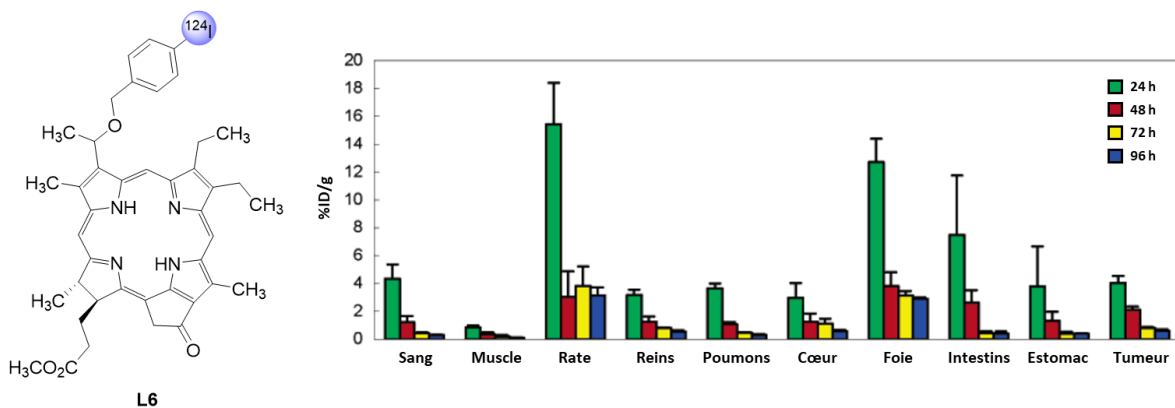
L'utilisation de la TEP ou de la TEMP couplée à la fluorescence semble être un choix judicieux, les deux techniques (optique et radioisotopique) présentant des sensibilités très élevées et du même ordre de grandeur, tout en étant complémentaires. Il est donc possible de coupler directement un agent radiomarqué à une sonde optique tout en ayant un signal convenable pour les deux imageries. De plus, la combinaison de ces deux modalités peut permettre de réaliser un diagnostic *in vivo* par TEP ou TEMP préalablement à une intervention chirurgicale guidée par fluorescence. Pour tous ces avantages, le développement de sondes bimodales optiques/TEP ou optique/TEMP est en pleine expansion.

Quelques agents bimodaux optique/TEP ou optique/TEMP non vectorisés ont été développés, principalement basés sur l'utilisation de phtalocyanines,<sup>181</sup> porphyrines<sup>182</sup> ou cyanines.<sup>183</sup> La biodistribution de ces composés n'est cependant pas avantageuse, par manque d'une vectorisation active. Dans le cas d'une étude réalisée par Ranyuk *et al.*, le composé **L5**, constitué d'une phtalocyanine de zinc et d'un NOTA marqué au cuivre-64, présente une accumulation dans la tumeur, mais une accumulation non spécifique importante dans le foie est observée. En effet, pour les deux tumeurs étudiées MC7-L1 et EMT-6 (lignées cellulaires mammaires cancéreuses murines), le rapport de signal foie/tumeur obtenu 3 h après l'injection est alors respectivement de 7 et 3,5 (**Figure 26**). Les reins sont également le lieu d'une accumulation non spécifique élevée, le rapport du signal rein/tumeur pour EMT-6 étant alors de 1 et de 2 pour la tumeur de lignée MC7-L1.



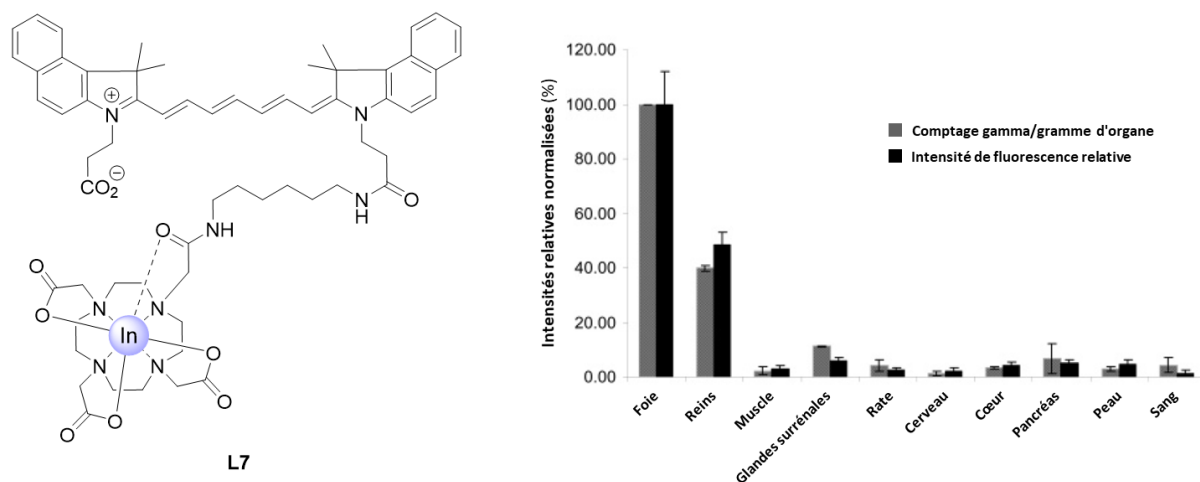
**Figure 26.** Sonde bimodale optique/TEP **L5** développée par Ranyuk *et al.* Les résultats de biodistribution *ex vivo* sont donnés 3 h post-injection sur souris BALB/c. Adapté de Ranyuk *et al.*<sup>181</sup>

Le composé **L6**, une porphyrine porteuse d'iode-124, développé par l'équipe de Pandey s'est révélé également peu spécifique de la tumeur (**Figure 27**). Une accumulation spécifique dans celle-ci est observée, mais des accumulations non spécifiques significatives sont relevées dans la rate, le foie ainsi que les intestins, avec des rapports de signal organe/tumeur allant jusqu'à 4 pour la rate à 24 h après l'injection.



**Figure 27.** Sonde bimodale optique/TEP **L6** développé par Pandey *et al.* Les résultats de biodistribution *ex vivo* sont donnés 24, 48, 72 et 96 h post-injection sur souris C3H. Adapté de Pandey *et al.*<sup>182</sup>

Des résultats similaires ont été obtenus par l'équipe de Achilefu. Leur étude a pu montrer que le composé **L7** s'accumule principalement dans les organes d'élimination tels que le foie et les reins. De plus, ces travaux ont montré que le signal observé pour chaque organe en fluorescence est cohérent avec celui obtenu avec un compteur gamma, montrant ainsi la correspondance des deux signaux (**Figure 28**).<sup>183</sup> Pour les données obtenues en fluorescence, le composé étudié présentait un isotope non radioactif de l'indium, à savoir l'indium-115, afin d'éviter toute contamination radioactive des instruments du laboratoire.



**Figure 28.** Sonde bimodale optique/TEP **L7** développé par Zhang *et al.* Les résultats de biodistribution *ex vivo* sont donnés 24 h post-injection sur souris *nude*. Adapté de Zhang *et al.*<sup>183</sup>

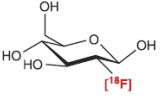
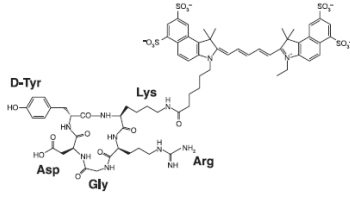


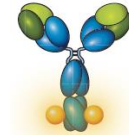
Bien que des sondes non vectorisées ont pu être développées avec succès, la conception de sondes intégrant un vecteur est particulièrement pertinente. L'intérêt est de favoriser l'accumulation de signal dans les tissus ciblés, augmentant le ratio signal/bruit et permettant ainsi d'avoir une image de meilleure qualité, ce qui est primordial pour des applications cliniques. Les lignes suivantes mènent à un court rappel des techniques de vectorisation et plus particulièrement de l'utilisation d'anticorps.

La vectorisation d'un composé, qu'il s'agisse d'un agent d'imagerie ou d'un médicament, permet d'exploiter l'affinité d'un vecteur pour une cible. Deux types de vectorisations sont à distinguer. D'une part le ciblage passif, qui est basé sur l'exploitation de caractéristiques physico-chimiques d'une molécule menant à une accumulation sur une zone cible et, d'autre part, le ciblage actif, pour lequel un groupement spécifique de la cible est greffé à la molécule d'intérêt. Dans la suite de ce manuscrit, nous nous concentrerons en particulier sur un ciblage actif.

Cinq familles de vecteurs pour un ciblage actif sont à différencier (**Tableau 4**).

Les petites molécules présentent des avantages majeurs pour la vectorisation de composés d'intérêt. Leur petite taille leur permet de traverser les barrières biologiques, effet qui peut être modulé par la charge et la lipophilie de la molécule. Cependant, le principal inconvénient est que la petite taille de ces molécules (< 500 Da) implique que leur pharmacocinétique et leur affinité pour le récepteur sont toutes deux fortement impactées par le greffage d'un agent imageant ou thérapeutique. Ainsi, ces molécules sont généralement imagées *via* l'utilisation de radioéléments tels que le fluor-18 (ce qui est le cas du fluorodésoxyglucose ou FDG) ou le carbone-11.<sup>30</sup>

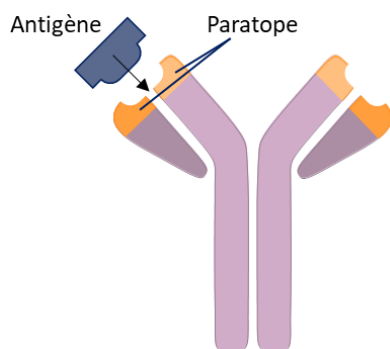
**Tableau 4.** Les différents types de vecteurs pouvant être utilisés dans un ciblage actif. Les exemples donnés montrent une application pour le design d'un agent d'imagerie vectorisé. Adapté de Gambhir *et al.*<sup>30</sup>

| Type    | Petite molécule  | Peptide  | Affibody  | Aptamère  | Anticorps  |
|---------|--|--|---|---|--|
| Taille  | < 1 nm<br>< 0,5 kDa  | 1-4 nm<br>0,5-2 kDa  | 5-10 kDa  | 5-15 kDa  | 150 kDa  |
| Exemple | <br>[ <sup>18</sup> F]FDG | <br>RGD-Cy5.5 | <br>[ <sup>68</sup> Ga]-DOTA-MUT-DS | <br>Molecular Beacon | <br>ICG-Trastuzumab |

Les peptides sont une famille ayant pris une place particulièrement importante dans la vectorisation d'agents thérapeutiques. Leur synthèse est relativement aisée et au contraire des petites molécules (< 500 Da), le greffage d'un agent pharmaceutique altère moins leur pharmacocinétique ou leur affinité à la cible. Cependant, le principal inconvénient est leur dégradation enzymatique rapide en milieu biologique, pouvant ainsi considérablement réduire la quantité de produit capable d'atteindre la cible.

Les aptamères sont quant à eux constitués d'un brin de 20 à 100 nucléotides replié sur lui-même. L'intérêt est que ces vecteurs présentent une très forte spécificité et sélectivité de leur cible, tout en étant relativement simples et peu coûteux à produire. De plus, il est possible de greffer un groupement pharmaceutique de manière site spécifique, c'est-à-dire en une position connue de l'aptamère. Cependant, leur instabilité *in vivo*, couplée à des propriétés pharmacocinétiques variables sont des facteurs limitant leur utilisation.

Les anticorps sont de larges protéines en forme de Y. Ils sont constitués de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères reliées entre elles par des ponts disulfures. Les extrémités variables de



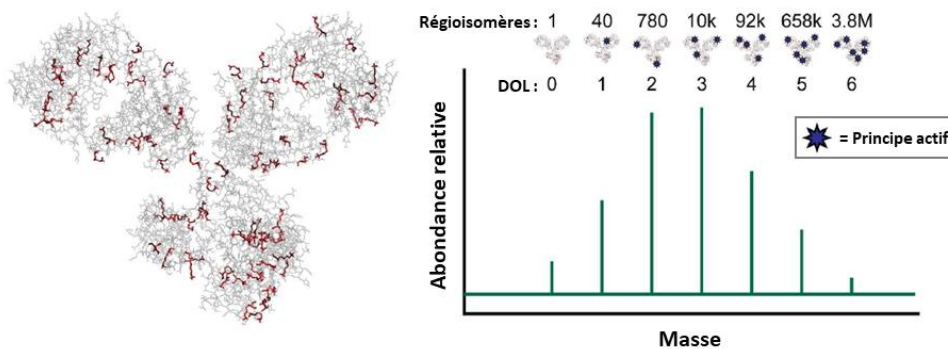
**Figure 29.** Importance du paratope pour la reconnaissance de l'antigène.

la protéine, portant le nom de paratope, sont responsables de la reconnaissance de l'anticorps pour sa cible (**Figure 29**). Les anticorps présentent une affinité et une spécificité excellentes pour leur cible, ce qui explique leur utilisation actuelle dans le domaine clinique. Leur taille imposante (~ 150 kDa) induit que leur affinité pour leur cible est peu impactée par le greffage d'entités pharmaceutiques à l'anticorps. En revanche, ces vecteurs présentent des temps d'accumulation généralement longs (de plusieurs heures à plusieurs jours), ce qui peut s'avérer problématique lors de l'utilisation de radionucléides de courte période. De plus, les anticorps présentent un temps de demi-vie *in vivo* qui peut approcher de la semaine,<sup>184</sup> pouvant engendrer un risque pour le patient, dans le cas où un radioélément est greffé à l'anticorps. Des fragments d'anticorps, aussi nommés affibody, ont été développés dans l'espoir de combiner

l'excellente affinité des anticorps à une pharmacocinétique proche de celle de vecteurs de plus petites tailles.

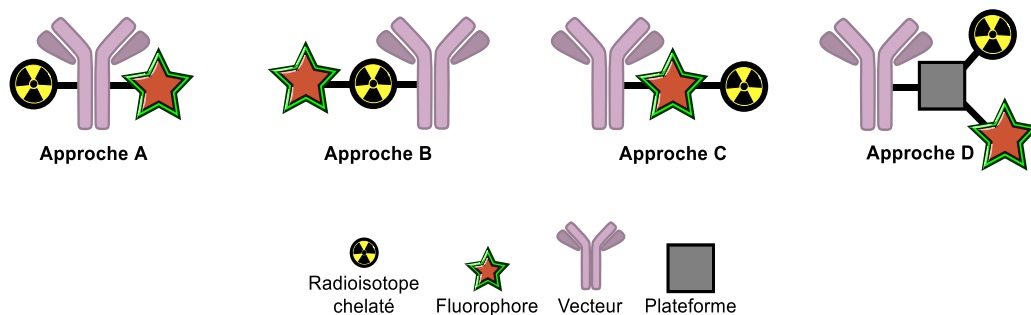
Dans le cas d'une vectorisation par anticorps, la technique de greffage de la molécule à l'anticorps la plus couramment employée, nommée bioconjugaison aléatoire, consiste à greffer la molécule par l'exploitation de sites conjuguables à la surface de l'anticorps, à savoir les lysines et cystéines. Ces acides aminés étant parmi les plus courants dans le génome humain, la bioconjugaison peut alors avoir lieu aléatoirement sur l'un ou plusieurs de ces sites.<sup>185</sup> Le résultat obtenu à la suite de la bioconjugaison aléatoire est alors une population d'anticorps comportant des sondes en nombres et positions variés (**Figure 30**).

Afin de caractériser la population d'anticorps porteurs de la molécule d'intérêt, la notion de DOL, ou degré de greffage moyen, est introduite et permet de déterminer le nombre moyen de molécules greffées aux anticorps. La connaissance de cette valeur est essentielle lors du développement d'un composé vectorisé par anticorps, car de celle-ci dépend l'efficacité de la vectorisation mais également la qualité du signal *in vitro* et *in vivo*.



**Figure 30.** Sites potentiels de greffage sur lysines sur un anticorps humain IgG1. Cas d'un greffage aléatoire, sur les 40 positions accessibles à la surface de l'anticorps. Le nombre de régioisomères est donné sur la base de 40 lysines accessibles. Adapté de Agarwal *et al.*<sup>186</sup>

Diverses stratégies peuvent être adoptées pour l'obtention d'un agent bimodal vectorisé par un anticorps (**Figure 31**). Chaque approche présente des avantages et inconvénients qui lui sont propres, mais nous retiendrons tout particulièrement que les approches B, C et D permettent toutes trois l'obtention de composés **MOMIP (MO**nomolecular **MULTI**modal **IMAGING** **PROBE**), dont l'intérêt principal est la combinaison en une unique molécule de deux sondes permettant des imageries différentes.



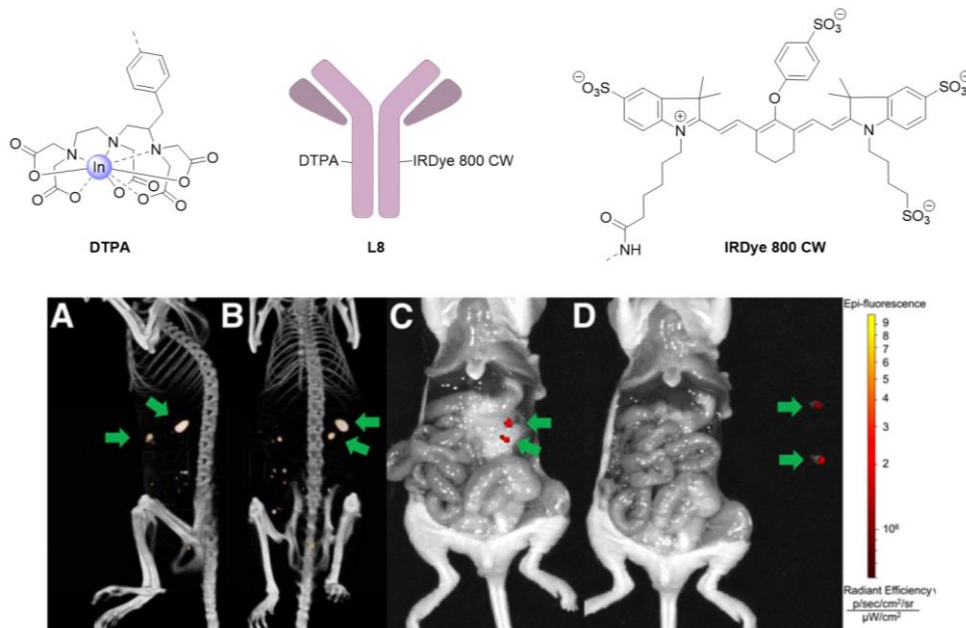
**Figure 31.** Stratégies de greffage de l'anticorps au bimodal. Inspiré de la revue de Ahn *et al.*<sup>187</sup>



Dès 2008, les équipes de recherche se sont intéressées au développement de bimodaux vectorisés. Ainsi, l'équipe de Achilefu a proposé un bimodal peptidique spécifique du récepteur de la somatostatine, impliqué dans un grand nombre de cancers.<sup>188</sup> Le composé bimodal est composé d'un dérivé de cyanine, d'un DOTA chélatant le cuivre-64 et d'un peptide Y3-octreotate. Cependant, malgré la présence du vecteur, les études *in vivo* ont montré une accumulation faible dans la tumeur (lignée cellulaire tumorale murine pancréatique AR42J) révélant une accumulation dans les reins, la rate et tout particulièrement le foie, pour lequel le rapport de signal organe/tumeur est de 9,5. Cette affinité faible pour la tumeur provient alors probablement de la présence de la sonde bimodale sur le peptide. Par la suite, plusieurs sondes peptidiques ont été développées, bien plus spécifiques et permettant d'identifier plus précisément la tumeur.<sup>189-191</sup>

Les anticorps, pour leur spécificité et leur affinité pour leur cible souvent élevées, ont également intéressé les groupes de recherche pour le développement de sondes vectorisées permettant une imagerie TEP ou TEMP et de fluorescence. Ces divers travaux ont ainsi pu montrer que l'utilisation de ces vecteurs permet une accumulation satisfaisante dans la tumeur, malgré une accumulation souvent élevée dans le foie, principale voie d'élimination des anticorps.<sup>192-195</sup>

Comme précisé précédemment, l'un des intérêts à l'utilisation de sondes bimodales vectorisées optique/radioisotopique est la réalisation du diagnostic en amont d'une opération assistée par fluorescence permettant de retirer la tumeur tout en diminuant au maximum les marges tumorales à appliquer. Un exemple montrant l'utilité et le potentiel de telles sondes a été publié par Rijpkema *et al.* La sonde bimodale **L8**, obtenue par le greffage sur un anticorps MN-14 (anticorps spécifique de l'antigène carcinoembryonique) d'une sonde optique proche infrarouge (IRDye 800CW) et d'un agent chélatant l'indium-111 (*diethylenetriaminepentaacetic acid, DTPA*), a permis la réalisation de chirurgie assistée par fluorescence sur souris BALC/*c nude* (**Figure 32**).<sup>196</sup>

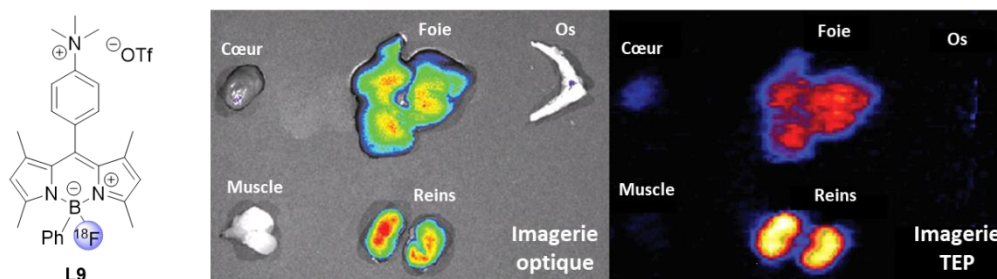


**Figure 32.** Sonde **L8** développée par Rijpkema *et al.* Images TEMP/TDM (**A** : latérale, **B** : ventrale) d'une souris BALC/*c nude* présentant deux tumeurs intrapéritonéales. Inspection laparotomique révélant par fluorescence la présence des deux nodules tumoraux (**C**), retirés avec succès par chirurgie assistée par fluorescence (**D**). Les tumeurs sont pointées par les flèches vertes. Extrait de Rijpkema *et al.*<sup>196</sup>

### 1.2.5 Utilisation de BODIPYs et azaBODIPYs pour la conception de sondes bimodales optique/TEP ou optique/TEMP

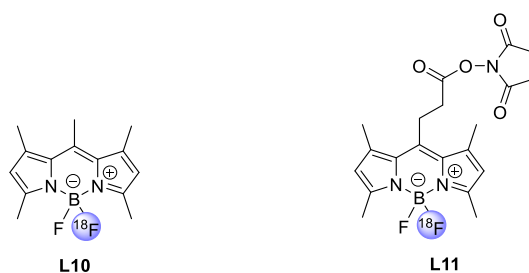
L'utilisation de BODIPYs en tant qu'agents imageants pour la conception de sondes bimodales optique/TEP est particulièrement prometteuse. En effet, le BODIPY peut avoir un double rôle, à la fois d'agent fluorescent, mais également de porteur d'un radioélément pour une imagerie TEP. Par échange isotopique, il est possible d'introduire un atome de fluor-18 sur l'atome de bore, permettant de réaliser l'imagerie TEP en complément de l'imagerie optique.

Ainsi, dès le début des années 2010, certains groupes se sont intéressés à la synthèse de telles molécules. En 2011, le groupe de Conti a reporté l'utilisation d'une première sonde BODIPY optique/TEP **L9** impliquant le fluor-18 sur souris *nude* (**Figure 33**).<sup>197</sup> Une étude TEP *in vivo* ainsi que les résultats *ex vivo* en fluorescence et TEP ont montré une accumulation non spécifique, avec une haute concentration dans les organes d'excrétion tels que le foie, les reins, ainsi que la rate, comme cela peut s'attendre d'une petite molécule hydrophobe non vectorisée. Une bonne corrélation entre les images TEP et de fluorescence des organes *ex vivo* a été mise en évidence par ces travaux, qui constituent une preuve de concept de l'utilisation des BODIPYs comme sonde bimodale optique/TEP. Dans ce cas, le sonde BODIPY n'est pas une sonde émettant dans le proche infrarouge, mais dans la partie visible du spectre électromagnétique. La fluorescence a alors été utilisée pour des études *in vitro* et *ex vivo*, en complément de la TEP, utilisée elle *in vivo*.



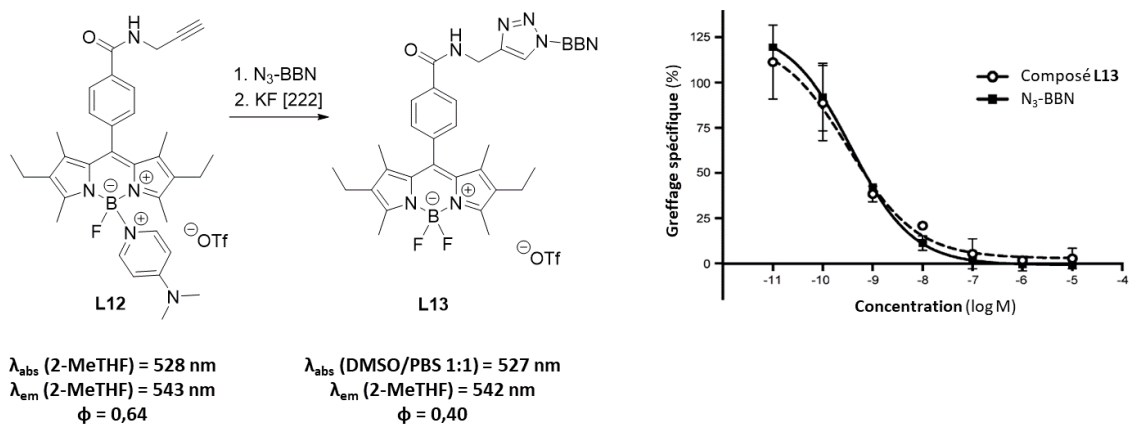
**Figure 33.** Premier BODIPY optique/TEP **L9** et imagerie optique/TEP *ex vivo* sur souris *nude*. Adapté de Li *et al.*<sup>197</sup>

Par la suite, le groupe de Mazitschek a publié en 2012 les résultats de l'incorporation d'un fluor-18 sur un BODIPY présentant un méthyle en position méso (**Figure 34** - composé **L10**).<sup>198</sup> De même, ces travaux ont montré une biodistribution non spécifique, ainsi qu'une excrétion rapide du composé, de l'ordre de l'heure. Ce groupe s'est également intéressé au greffage de cette molécule sur un vecteur de type anticorps (trastuzumab) par le biais de l'introduction d'un groupement NHS en position méso du BODIPY (**Figure 34** - composé **L11**). Les résultats par radio-HPLC ont montré que le greffage est possible sur le trastuzumab.



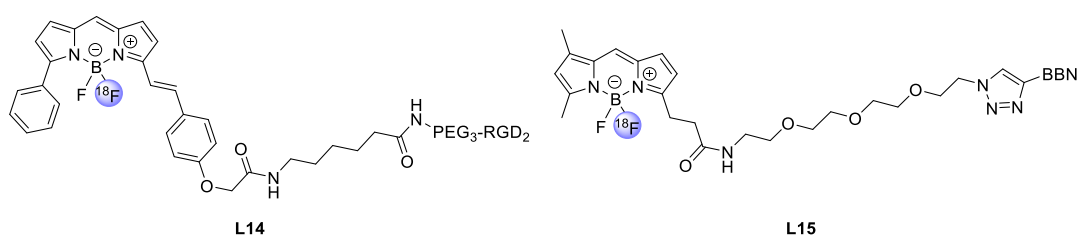
**Figure 34.** BODIPY optique/TEP non vectorisé **L10** développé par Hendricks *et al.* et sa version vectorisable **L11**.<sup>198</sup>

À la suite de ces travaux, d'autres groupes se sont focalisés sur le développement de BODIPYs pouvant être radiomarqués par le fluor-18 et vectorisés par un peptide. L'introduction de sondes d'imagerie sur un peptide peut nettement impacter son affinité pour son récepteur. L'intérêt des BODIPYs radiomarqués au fluor-18 prend alors tout son sens ici : de par leur faible encombrement et leur capacité de combiner deux modalités en une petite molécule, l'impact du greffage de cette sonde sur un peptide peut ainsi être minimisé. C'est dans l'optique de démontrer cela que notre laboratoire s'est intéressé au greffage d'une telle molécule sur la bombésine (**Figure 35**).<sup>199</sup> Un premier BODIPY (composé **L12**) a été synthétisé et greffé par réaction *click* sur la bombésine pour donner la sonde **L13**. La présence du groupement *N,N*-diméthylaminopyridine, groupement partant, sur l'atome de bore a pour utilité ultérieure d'introduire un atome de fluor-18 par substitution nucléophile. L'affinité pour le récepteur de la sonde greffée à la bombésine et de la bombésine seule ne diffèrent pas, ce qui montre un impact non significatif de la présence de la sonde sur l'affinité du peptide. De plus, les caractéristiques photophysiques du composé avant et après greffage sur la bombésine n'ont pas montré d'impact majeur sur la fluorescence. Ainsi, cette étude est la première preuve de concept d'une vectorisation possible d'un BODIPY bimodal.



**Figure 35.** Greffage du potentiel bimodal **L12** à la bombésine (BBN). Les propriétés photophysiques sont données à 25 °C. Le graphe indique le couplage de la bombésine ( $N_3$ -BBN) et de la bombésine marquée par le BODIPY **L13** au récepteur. Adapté de Brizet *et al.*<sup>199</sup>

Ultérieurement, des équipes telles que celles de Li ou de Weber se sont intéressées à l'incorporation de BODIPYs bimodaux sur des peptides tels que la bombésine ou le RGD (**Figure 36**).<sup>200,201</sup> Pour ces deux études, une bonne incorporation de la sonde dans la tumeur a été soulignée et une corrélation satisfaisante des images optique et radioisotopique a été observée. Le signal était également détecté dans les reins et le foie, les voies d'élimination classiques des peptides. On soulignera que le BODIPY développé par l'équipe de Li émet à la limite entre les domaines du visible et du proche infrarouge.

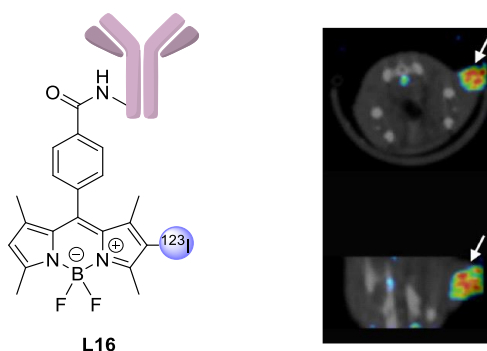


**Figure 36.** BODIPYs bimodaux optique/TEP vectorisés par un peptide RGD (**L14**)<sup>200</sup> ou bombésine (**L15**).<sup>201</sup>

Par la suite, d'autres travaux ont émergé, valorisant l'utilisation de [ $^{18}\text{F}$ ]-BODIPYs. Carlucci *et al.* ont montré la capacité d'un BODIPY à marquer certaines enzymes telles que PARP1 surexprimées dans le cas de certains cancers.<sup>202</sup> Plus récemment, Kim *et al* ont publié en 2019 un BODIPY ayant la capacité de passer la barrière hémato-encéphalique, en exploitant la petite taille de la molécule et son caractère lipophile.<sup>203</sup>

L'inconvénient majeur de l'utilisation du fluor-18 en tant que radionucléide est son temps de demi-vie relativement court ( $t_{1/2} = 109,8$  min) nécessitant une injection rapide, quelques heures après génération du radioélément. *A contrario*, l'utilisation d'autres radioéléments tels que le cuivre-64 ( $t_{1/2} = 12,7$  h) ou le zirconium-89 ( $t_{1/2} = 78,4$  h) pour la TEP, l'iode-123 ( $t_{1/2} = 13,3$  h) ou l'indium-111 ( $t_{1/2} = 2,8$  j) pour la TEMP permet de réaliser le diagnostic à des temps plus longs après l'injection.<sup>29,30</sup> Il est important de souligner que l'utilisation de radioéléments aux temps de demi-vie longs n'est pas compatible avec l'utilisation de vecteurs tels que les peptides, dont les temps de biodistribution sont courts. Il convient alors de choisir une vectorisation adaptée au radioélément utilisé, telle que l'utilisation d'anticorps, de temps de biodistribution pouvant aller jusqu'à plusieurs jours.

En ce qui concerne l'iode-123, l'équipe de Saji s'est intéressée à l'introduction de ce radioélément en position  $\beta$ -pyrrolique du BODIPY (**Figure 37**).<sup>204</sup> Le marqueur radioactif est ainsi porté par la sonde fluorescente permettant, comme dans le cas du fluor-18 vu précédemment, d'obtenir une sonde de petite taille. La preuve de concept de cette sonde a été donnée par les résultats *in vivo*, montrant que le greffage du BODIPY au vecteur trastuzumab n'induisait pas une perte d'affinité pour le récepteur. De plus, l'imagerie TEMP/TDM témoignait d'une excellente accumulation au sein d'une tumeur xéngreffée N87 surexprimant HER2.

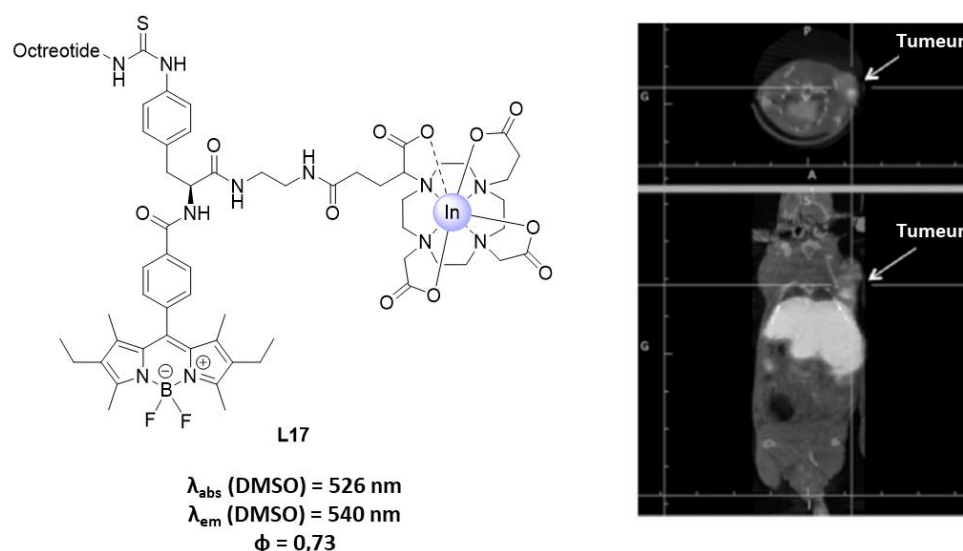


**Figure 37.** BODIPY L16 porteur d'un iode-123 et vectorisé par le trastuzumab. Les images TEMP/TDM (haut : coupe transversale, bas : coupe coronale) sont obtenues 8 h après l'injection. Les flèches blanches identifient la tumeur. Extrait de Ono *et al.*<sup>204</sup>

À l'inverse du fluor-18 ou de l'iode-123, l'utilisation de radioéléments aux temps de demi-vie plus longs peut permettre de s'affranchir des signaux parasites obtenus en particulier dans le foie ou les reins, organes dans lesquels une sonde va généralement s'accumuler et être éliminée au cours des premières 24 h à 48 h suivant l'injection.

Les radionucléides non métalliques tels le fluor-18 ou l'iode-123 sont liés de façon covalente à la molécule. En revanche, l'utilisation de radiométaux (indium-111, gallium-68, cuivre-64...) nécessite la présence d'un agent chélatant sur la sonde. Ainsi, certains laboratoires se sont intéressés au développement de BODIPYs présentant un groupement pouvant chélater un radionucléide. Le premier exemple d'une telle sonde a été publié par notre laboratoire en 2010 et a montré que la chélation d'un centre métallique tel le gallium-68 ou l'indium-111 au sein d'un DOTA en position méso du BODIPY ne modifiait pas les propriétés photophysiques de la sonde.<sup>205</sup> L'introduction de cuivre-64 a également été réalisée et a révélé une division par trois du rendement quantique dans le DMF par rapport à la version non métallée. La versatilité de la stratégie a été reflétée par deux publications ultérieures, qui ont montré possible la synthèse d'une molécule similaire présentant un DOTAGA<sup>206</sup> ou NODA<sup>207</sup> à la place du DOTA, permettant l'introduction de radioéléments variés (indium-111 pour le DOTA et DOTAGA, gallium-68 et cuivre-64 pour le NODAGA). Le dérivé DOTAGA a été étudié plus en détail en termes de propriétés photophysiques et greffage à un peptide ocréotide (**Figure 38**).

Tout d'abord, il est à noter que le greffage au peptide n'impacte pas significativement les propriétés photophysiques. De plus, le marquage à l'indium-111 a permis de montrer une faible accumulation tumorale *in vivo*. Ces images ont également souligné une accumulation non spécifique au sein d'organes tels que le foie, la rate ou encore les reins, comme cela a pu être confirmé par analyse *ex vivo*. Une telle accumulation en particulier dans le foie était probablement due au caractère lipophile du composé **L17**, ainsi qu'à la tendance de l'ocréotide à s'accumuler dans le foie.

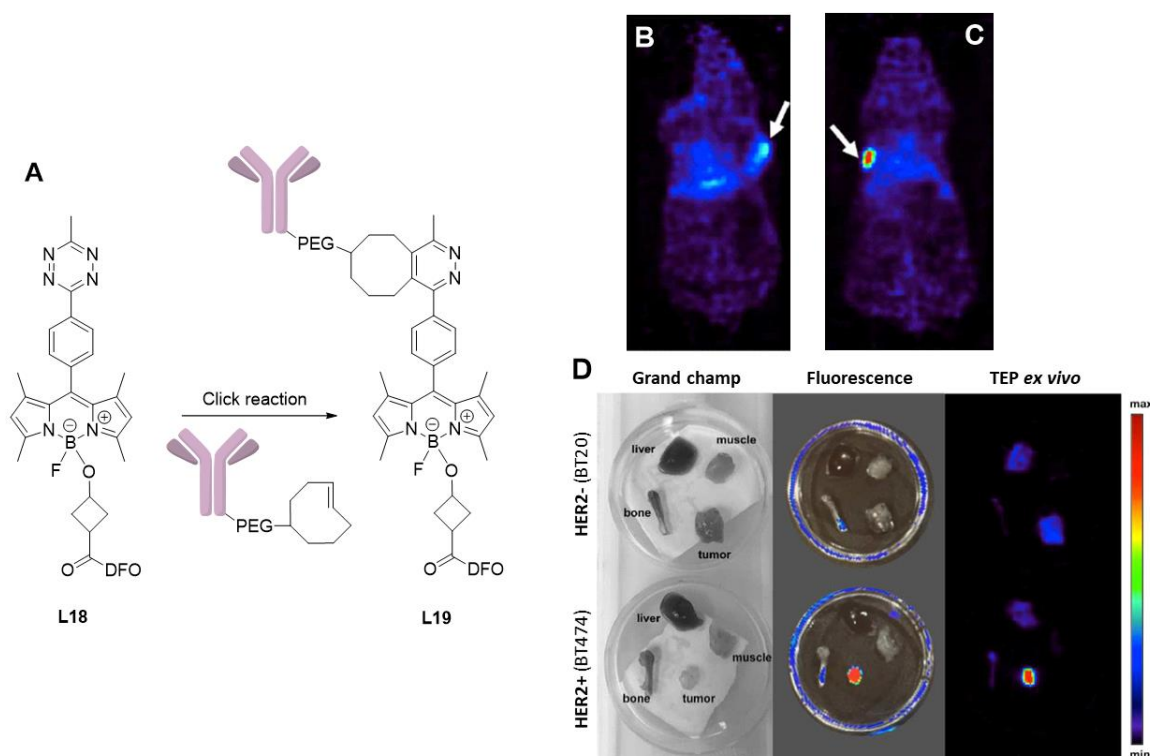


**Figure 38.** BODIPY optique/TEP **L17** vectorisé par le peptide ocréotide. Les propriétés photophysiques sont données pour l'équivalent non métallé dans le DMSO à 25 °C. Les images TEMP sont données 24 h après l'injection de 4 nmol de **L17** sur une souris présentant une tumeur sous-cutanée AR42J. Adapté de Lhenry *et al.*<sup>207</sup>

Le potentiel des BODIPYs impliqués dans l'élaboration de sondes bimodales a également été mis en lumière par l'équipe de Weissleder en 2016, avec l'utilisation de zirconium-89 comme radiotracer TEP.<sup>208</sup> Ils ont proposé une méthode particulièrement élégante permettant de réaliser un suivi de la réaction *click* entre le transcyclooctène (TCO) et la tétrazine par une augmentation drastique de l'intensité de fluorescence entre les composés **L18** et **L19** (**Figure 39**).

Ce phénomène permet d'attester lors de la synthèse de la sonde du greffage rapide (< 3 min) de la sonde bimodale au vecteur trastuzumab, spécifique des cellules tumorales surexprimant HER2 (HER2 positives ou HER2+).

La grande spécificité de la sonde pour les cellules surexprimant HER2 (lignée cellulaire BT474) a été mis en avant par cette étude, le constat étant le même que ce soit *in vivo* ou *ex vivo*. Ces travaux ont montré le grand potentiel des BODIPYs comme sondes bimodales, qui peuvent apporter de précieuses informations pour le diagnostic, en particulier lorsque leur vectorisation permet d'atteindre une spécificité excellente.



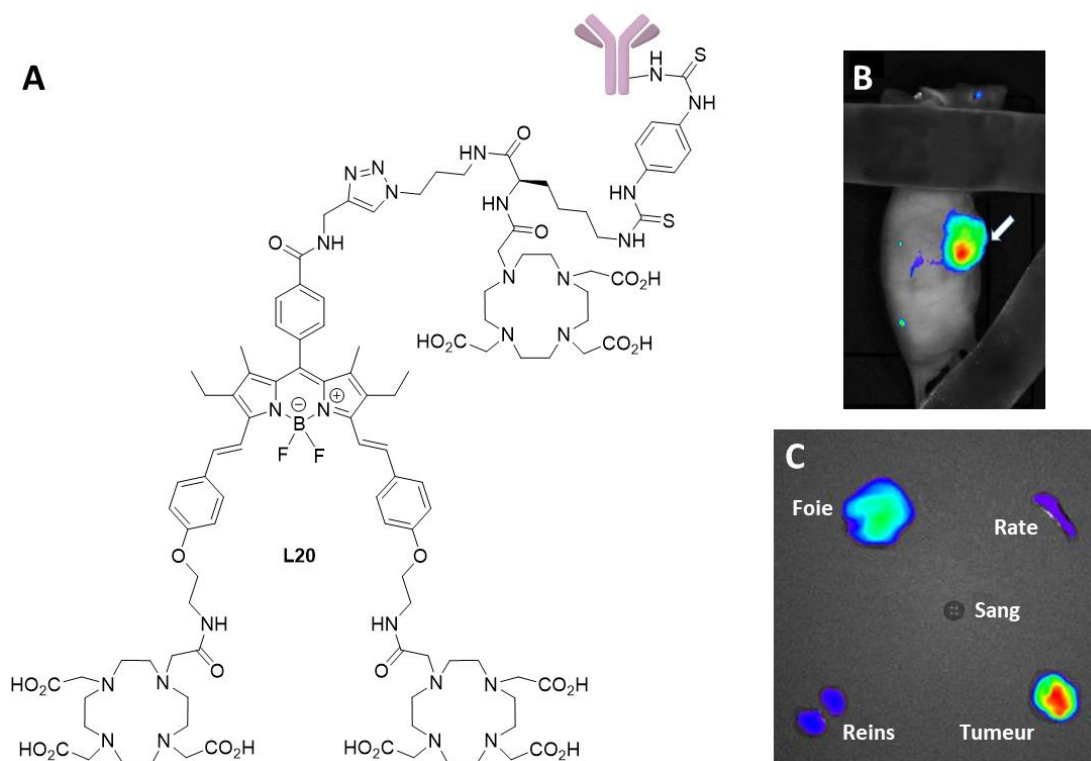
**Figure 39.** **A** : Réaction click de la sonde bimodale sur le TCO porteur du vecteur. **B** et **C** : Images TEP 96 h après l'injection de la sonde vectorisée radiomarquée au  $^{89}\text{Zr}$  sur souris xéno greffée BT20 (HER2 négative - **B**) ou BT474 (HER2 positive - **C**). **D** : Résultats *ex vivo* en fluorescence et TEP 96 h après l'injection. Adapté de Meimetis *et al.*<sup>208</sup>

Comme cela a été abordé précédemment, la principale faiblesse de l'imagerie optique est sa profondeur de pénétration limitée, qui est un frein important à une utilisation *in vivo*. Les tissus (peau, circulants, muscles, ...) situés sur le trajet optique entre le fluorophore et le détecteur induisent des phénomènes de diffusion et d'absorption, diminuant fortement le signal. Ces effets peuvent cependant être minimisés par l'utilisation d'un fluorophore émettant dans la fenêtre de transparence optique.

L'utilisation de BODIPYs ne permet généralement pas d'exploiter la fenêtre de transparence optique du proche infrarouge, les maximums en longueur d'onde d'émission étant généralement aux alentours de 550 nm. Comme cela a été vu en introduction, l'extension du système conjugué du BODIPY peut permettre d'atteindre des longueurs d'onde plus élevées, rendant possible l'exploitation de la fenêtre de transparence optique. Le BODIPY mono-styryle développé par Liu

*et al.* que nous avons abordé précédemment (p.41) ne permet d'atteindre une longueur d'onde d'émission qu'à la limite du domaine proche infrarouge.<sup>200</sup>

C'est dans cet optique que notre équipe a développé le premier bimodal optique/TEMP utilisant un BODIPY di-styryle, dont le système  $\pi$  étendu permet une émission au-delà de la limite basse de la fenêtre du NIR-I de 650 nm. Le composé **L20** résulte de l'introduction de trois DOTA sur un BODIPY di-styryle (**Figure 40**).<sup>209</sup> Dans ce cas, la sonde a été vectorisée à l'aide d'un anticorps, le trastuzumab, l'objectif étant de cibler les cellules cancéreuses surexprimant HER2. Un test de radioméallation et de stabilité de la sonde a été réalisé, révélant une excellente stabilité à 48 h, ce qui en fait un potentiel composé bimodal efficace et utilisable *in vivo*. De plus, par la présence des macrocycles, **L20** s'est révélé parfaitement soluble en milieu aqueux. Les images *in vivo* et *ex vivo* de fluorescence sont données pour la version non radiométallée **L20**. 48 h post-injection, une accumulation élevée a été observée dans la tumeur. Les organes d'élimination tels que le foie ou les reins présentaient un léger signal, bien inférieur à celui de la tumeur. Enfin, on remarquera que ce BODIPY di-styryle permet d'exploiter la fenêtre de transparence optique par une émission à 700 nm.



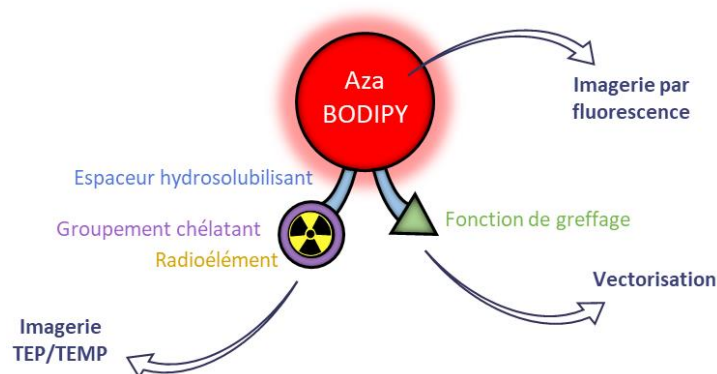
**Figure 40.** **A** : BODIPY bimodal optique/TEP **L20** vectorisé développé par notre équipe. **B** : Imagerie optique *in vivo* à 24 h et 48 h après l'injection de 0,3 nmol de **L20** sur une souris présentant une tumeur sous-cutanée BT474. **C** : Imagerie optique *ex vivo* montrant l'accumulation dans divers organes et circulants. Adapté de Maindron *et al.*<sup>209</sup>

## 2 But du projet

Le développement d'agents bimodaux joue un rôle primordial vers l'élaboration d'une médecine personnalisée, la combinaison de différentes modalités d'imagerie permettant de réaliser un diagnostic plus précis et complémentaire. De plus, par combinaison entre une modalité d'imagerie des tissus profonds telle que la TEP ou la TEMP et l'imagerie optique permettant d'identifier lors d'une opération la position précise d'une tumeur, il est possible de proposer un composé bimodal permettant le diagnostic, directement suivi de l'acte chirurgical. Ce composé peut également s'avérer utile lors de biopsies menant à la réalisation d'études *ex vivo*.

L'objectif du projet présenté dans cette partie est de développer le premier azaBODIPY à utilisation bimodale optique/TEP ou optique/TEMP. Les qualités indéniables des azaBODIPYs telles que leur robustesse, leur facilité de fonctionnalisation ou encore leur capacité à émettre dans le proche infrarouge, sont des atouts considérables dans l'élaboration d'une sonde alliant une imagerie optique et radioisotopique.

Nous nous sommes focalisés sur la synthèse d'un azaBODIPY dont le rôle de plateforme est assuré par une fonctionnalisation de l'atome de bore permettant de greffer d'une part, une fonction pouvant accueillir un radioélément et d'autre part, un groupement permettant la vectorisation de la sonde. Deux sondes ont alors été synthétisées, permettant la réalisation d'une imagerie TEP ou TEMP (**Figure 41**).



**Figure 41.** Plateforme azaBODIPY bimodale vectorisable.

La vectorisation est assurée par le greffage à un anticorps. Afin de montrer l'efficacité de cette sonde bimodale, nous l'avons greffé au trastuzumab, spécifique des récepteurs HER2, surexprimés pour certains types de cancers du sein. Des études *in vitro*, *in vivo* et également une preuve de concept de chirurgie assistée par fluorescence sur souris ont été réalisés, permettant ainsi de mettre en avant le potentiel de cette nouvelle plateforme bimodale.

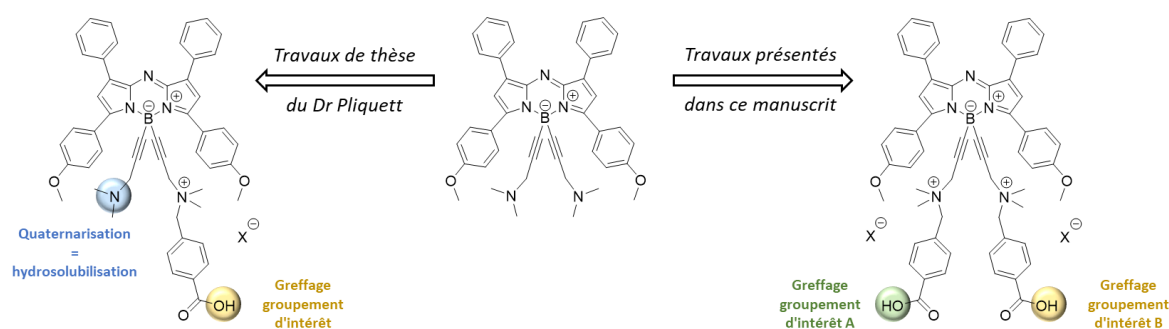


### 3 Développement d'une sonde bimodale azaBODIPY vectorisée

#### 3.1 Objectif initial et stratégie de synthèse

Les azaBODIPYs peuvent être fonctionnalisés sur plusieurs positions et, dans le cadre de ce projet, nous avons décidé de nous focaliser sur l'introduction de groupements d'intérêt au niveau des bras pendants situés sur l'atome de bore. Il est possible d'introduire deux bras augmentant l'hydrosolubilité (par la présence d'ammoniums quaternaires) sur l'atome de bore, pouvant par la suite être utilisés pour l'introduction d'autres groupements. De plus, ces groupements n'impactent pas significativement les propriétés photophysiques de l'azaBODIPY, qui restent alors excellentes.

Dans le cadre des travaux de thèse du Dr Pliquett, un azaBODIPY mono-acide a été développé, permettant l'introduction d'un vecteur d'une part et d'un groupement ammonium hydrosolubilisant d'autre part (**Figure 42**).



**Figure 42.** Stratégie de synthèse de la plateforme azaBODIPY utilisée lors des travaux de thèse du Dr Pliquett et stratégie de synthèse choisie pour nos travaux sur le développement d'une sonde bimodale vectorisable.

L'intérêt de l'utilisation des azaBODIPYs pour une utilisation en tant que sonde bimodale réside dans leur stabilité et leur émission dans le proche infrarouge. De plus, la plateforme azaBODIPY développée par notre laboratoire, nommée **WazaBY** (pour **Water-soluble azaBODIPY**), présente une hydrosolubilité accrue et une propension à l'agrégation en milieux aqueux non détectable aux concentrations utilisées, facilitant son utilisation *in vivo*. C'est donc en se basant sur les études réalisées sur cette plateforme que nous avons décidé de synthétiser le premier azaBODIPY bimodal optique/radioisotopique.

Notre stratégie de synthèse a consisté en l'introduction sur la plateforme azaBODIPY bis-acide des deux groupements d'intérêt. Les sites acides fonctionnalisables de la plateforme azaBODIPY permettent l'introduction de divers groupements par couplage. En ce qui concerne le choix de l'agent chélatant pour l'introduction du radioélément, nous nous sommes focalisés sur le DOTA et le NODAGA. Ces deux macrocycles permettant de chélater différents radioéléments et en particulier l'indium-111 (DOTA) pour la TEMP et le gallium-68 (NODAGA) pour la TEP.<sup>210</sup> Pour la vectorisation de la sonde, l'objectif est d'introduire, sur la seconde position acide, un espaceur permettant l'addition d'une fonction de greffage en son extrémité. Par la suite, la sonde bimodale vectorisable sera greffée sur un vecteur type anticorps, puis radiomarquée (**Figure 43**).

Les macrocycles ont été fournis par l'entreprise CheMatech.

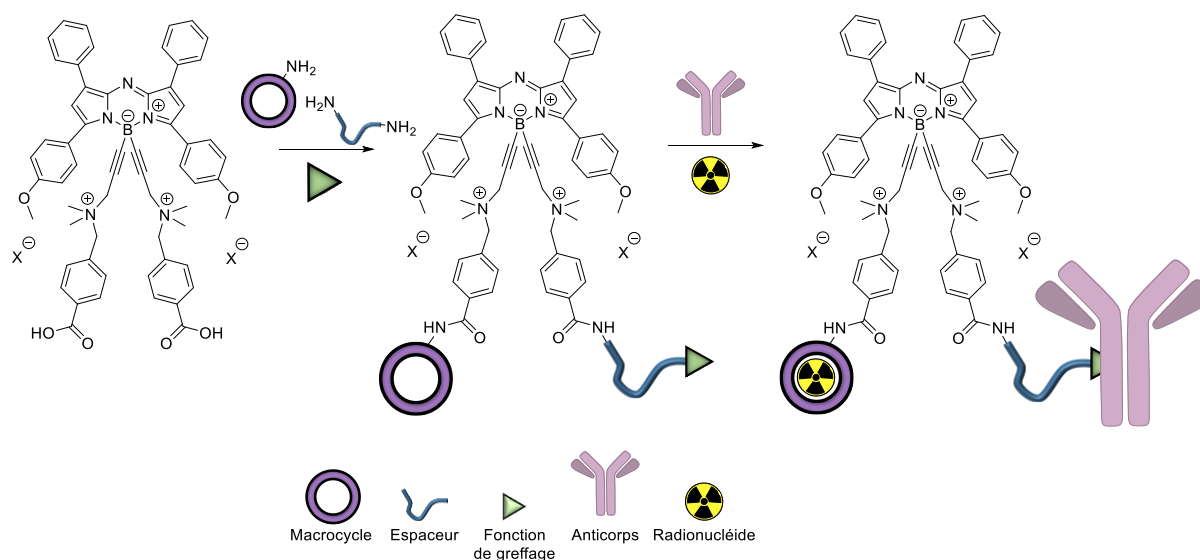


Figure 43. Stratégie de synthèse de la sonde azaBODIPY bimodale optique/radioisotopique vectorisée.

### 3.2 Choix du vecteur et de la cible

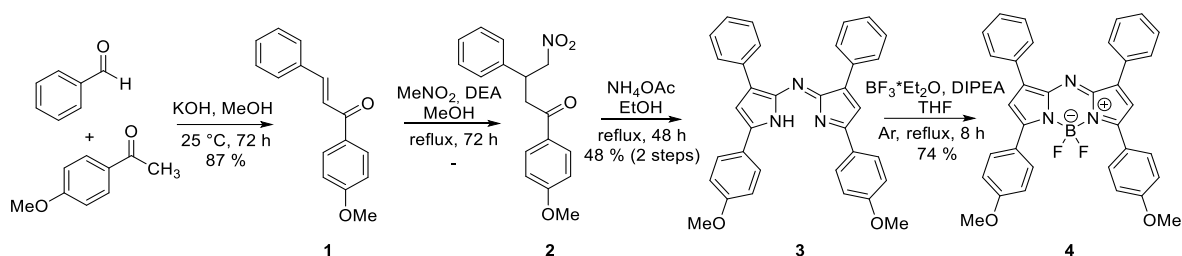
L'utilisation d'un anticorps comme vecteur est un choix permettant d'avoir une haute spécificité pour la cible visée, mais également une excellente affinité. La stratégie de bioconjugaison a été inspirée des travaux réalisés au laboratoire par le Dr Pliquett, décrivant l'introduction d'un anticorps anti-PD-L1 sur un azaBODIPY présentant un diéthyle squarate comme fonction de greffage.<sup>60</sup> Une bioconjugaison aléatoire est envisagée. L'intérêt de ce type de bioconjugaison est la simplicité de mise en œuvre. Une limitation majeure est que cette technique mène à l'obtention d'un échantillon hétérogène non reproductible d'un lot à l'autre, pour lequel la position et nombre des sondes sur l'anticorps est variable.

Afin d'apporter une preuve de concept, nous avons décidé de bioconjuguer la sonde bimodale sur un autre anticorps, à savoir le trastuzumab, anticorps de référence peu onéreux et connu de notre laboratoire, qui présente une bonne affinité pour son récepteur.

### 3.3 Synthèse de la plateforme azaBODIPY bis-acide

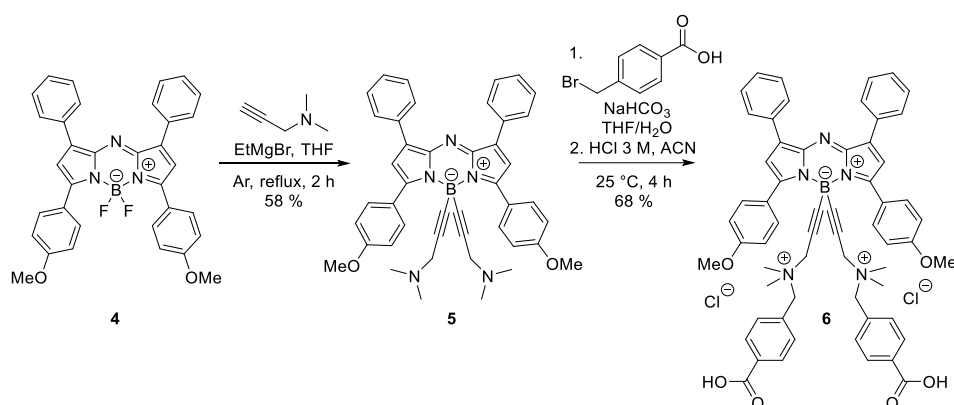
La première étape de cette synthèse est la formation de l'azaBODIPY **4**. Les conditions utilisées lors de cette synthèse en quatre étapes sont directement inspirées des travaux de Rogers *et al.* (pour la synthèse de l'azadipyrrrométhène) et de Killoran *et al.* (pour la boration).<sup>127,211</sup> L'intérêt de cette voie de synthèse est double : elle permet d'accéder à l'azaBODIPY **4** à l'échelle du gramme en une dizaine de jours et cela, en partant de réactifs commercialement disponibles et présentant des coûts raisonnables. Tout d'abord, une crotonisation en milieu basique permet d'obtenir la chalcone **1**. Celle-ci est ensuite soumise à une addition de Michael permettant de former le composé **2**, engagé sans purification dans la formation de l'azadipyrrrométhène **3**. À la suite de cette opération, la boration est réalisée en milieu basique, en présence d'un large excès de

précurseur boré. Le rendement global de cette synthèse est de 30 % et permet d'obtenir l'azaBODIPY **4** à l'échelle du gramme (**Schéma 1**).



**Schéma 1.** Synthèse du précurseur azaBODIPY BF<sub>2</sub> **4**.

La substitution des fluors sur l'atome de bore de l'azaBODIPY **4** est réalisée par le biais d'un magnésien, permettant l'introduction de la *N,N*-diméthylpropargylamine (**Schéma 2**). Une purification sur colonne chromatographique permet d'obtenir le composé **5** avec un rendement de 58 %. L'addition de 2 équivalents d'acide 4-méthylbenzoïque sur **5** permet d'obtenir le bis-acide **6**. Cependant, cette étape mène aussi à la formation de deux sous-produits : le dérivé mono-acide, en particulier pour des températures de réaction faibles (15 °C) et l'ester résultant d'une réaction secondaire dans le cas d'un chauffage au-delà de 40 °C. Les conditions permettant d'obtenir le bis-acide ont donc été optimisées au cours de ma thèse. Par réalisation de la réaction à 17 °C, en présence d'une base inorganique et d'un mélange THF/eau (7:2) permettant de solubiliser à la fois l'azaBODIPY **5** et le carbonate de sodium, il est alors possible d'obtenir le bis-acide **6**. Le composé est ensuite précipité en milieu acide et centrifugé, permettant d'isoler le WazaBY **6** avec une pureté supérieure à 95 % (les impuretés étant principalement le produit issu de la réaction secondaire) et un rendement satisfaisant de 66 % pour un taux de conversion de 100 %.

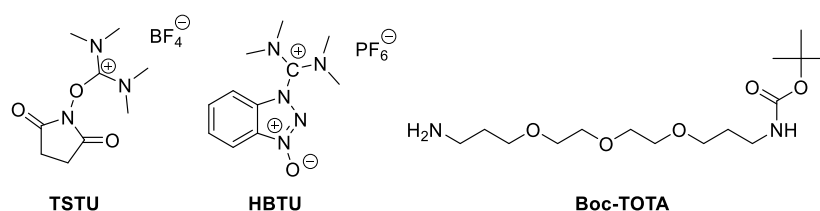


**Schéma 2.** Synthèse du WazaBY bis-acide **6**.

### 3.4 Stratégie de synthèse par réactions successives

La première stratégie envisagée a été d'introduire les divers groupements de manière séquentielle, chaque introduction étant suivie d'une étape de purification. Cette voie de synthèse permet de contrôler précisément la pureté et la nature des composés obtenus après chaque étape.

Tout d'abord, nous avons opté pour l'introduction de l'espaceur avant le macrocycle. L'idée était d'engager le macrocycle, composé onéreux, uniquement en dernière étape de synthèse. La première étape correspond à l'activation des positions acides de la plateforme azaBODIPY. Pour cela, deux agents de couplage ont été envisagés, à savoir le TSTU et le HBTU, couramment utilisés lors de réactions de couplage (**Figure 44**). La seconde étape est focalisée sur l'introduction de l'espaceur monoprotégé Boc-TOTA.

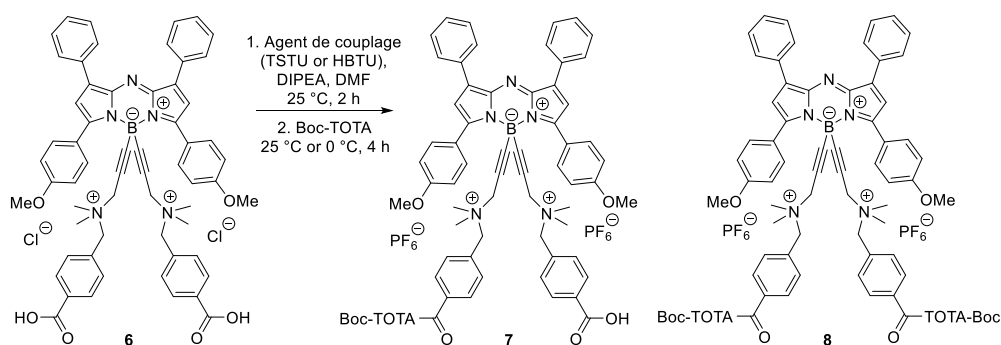


**Figure 44.** Structures du TSTU, HBTU et Boc-TOTA.

Une première purification permettrait d'isoler le composé présentant un seul groupement Boc-TOTA. Ensuite, le macrocycle protégé serait introduit, suivi directement par une déprotection acide du macrocycle et du Boc-TOTA. Après isolement et caractérisation de cet intermédiaire, l'introduction de la fonction de greffage sur le TOTA déprotégé permettrait alors d'obtenir la sonde bimodale prête à être bioconjuguée. Enfin, une dernière étape de bioconjugaison donnerait accès à la sonde pouvant être radiomarquée.

Pour cette stratégie de synthèse, une attention toute particulière doit être portée à la première étape. En effet, il s'agit de dissymétriser la molécule en couplant le bras espaceur TOTA sur l'une des deux fonctions acide carboxylique seulement.

Pour l'étape d'introduction du bras espaceur Boc-TOTA, l'activation des positions acides a été réalisée au préalable par l'un des deux agents de couplage envisagés dans cette synthèse, à savoir le HBTU et le TSTU (**Schéma 3**).



**Schéma 3.** Introduction du Boc-TOTA sur le bis-acide par couplage peptidique.

La difficulté rencontrée lors de cette étape est qu'à température ambiante, en conditions stœchiométriques, aucun greffage du Boc-TOTA n'a pu être observé. Le suivi par RP-HPLC-MS (*reverse phase, high-performance liquid chromatography, mass spectrometry*) a montré que seul le réactif **6** était présent en solution et qu'aucune évolution n'était observée jusqu'à 2 h après l'ajout du Boc-TOTA (**Tableau 5**). L'addition de 0.5 équivalent supplémentaires de Boc-TOTA a alors conduit à la formation du bis-Boc-TOTA **8**, ne permettant pas d'isoler le mono-Boc-TOTA **7**. Nous avons également tenté de réaliser cette réaction à 0 °C afin de favoriser la formation du composé **7**. Dans ce cas, après introduction de 1,2 équivalent de Boc-TOTA, une analyse RP-HPLC-MS a indiqué une faible conversion en **7** (rapport d'aires des composés **6/7** de 97/3 à 260 nm). L'addition d'un excès (0,7 équivalent) de Boc-TOTA a alors mené à la formation d'un mélange de **7** et de **8** (rapport d'aires des composés **6/7/8** de 48/40/12 à 260 nm), de la même manière qu'à 25 °C.

**Tableau 5.** Conditions réactionnelles testées pour le greffage du Boc-TOTA sur l'une des deux positions acide du composé **6**.

| Boc-TOTA | Agent de couplage | Méthode                             | Proportions en composés 6/7/8 après 2 h (RP HPLC-MS) | Proportions en composés 6/7/8 après ajout de Boc-TOTA (RP HPLC-MS) |
|----------|-------------------|-------------------------------------|--|--|
| 1,1 eq.  | TSTU (1,1 eq.)    | Addition rapide du Boc-TOTA à 25 °C | 100/0/0  | -  |
| 1,2 eq.  | HBTU (1,2 eq.)    | Addition rapide du Boc-TOTA à 25 °C | 100/0/0  | 33/48/19   |
| 1,2 eq.  | HBTU (1,2 eq.)    | Addition lente du Boc-TOTA à 0 °C   | 97/3/0   | 48/40/12   |

Plusieurs tentatives de purification de ces couplages n'ont pas permis d'isoler le mono-Boc-TOTA **7**, la migration des trois espèces étant similaire sur colonnes de silice ou d'alumine. L'addition supplémentaire de Boc-TOTA mène à la consommation du réactif **6** mais également à la conversion de mono-Boc-TOTA **7** en bis-Boc-TOTA **8**. Nous n'avons ainsi pas pu pousser la réaction vers une consommation complète du réactif, car l'ajout de Boc-TOTA aurait alors entraîné une conversion de **7** en **8**.

C'est à la suite de ces tentatives infructueuses que nous avons décidé d'introduire le macrocycle au préalable sur le bis-acide. Une stratégie séquentielle aurait, de même que précédemment, pu être envisagée, mais nous avons décidé de nous tourner vers une stratégie « *one-pot* ». L'objectif étant alors d'introduire un macrocycle sur l'une des positions acides, directement suivi de l'introduction du Boc-TOTA sur la seconde position.

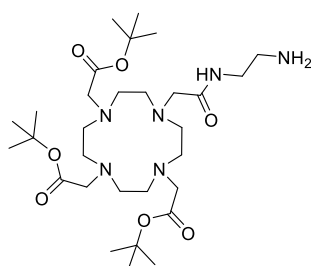
### 3.5 Stratégie de synthèse « one-pot »

L'intérêt de cette stratégie est que l'introduction du macrocycle et de l'espaceur Boc-TOTA suivi par la déprotection sont réalisées en une étape, limitant ainsi les purifications nécessaires et les éventuelles pertes de matière qui en résultent.

#### 3.5.1 DOTA-azaBODIPY

##### 3.5.1.1 Couplage du DOTA sur la plateforme azaBODIPY bis-acide

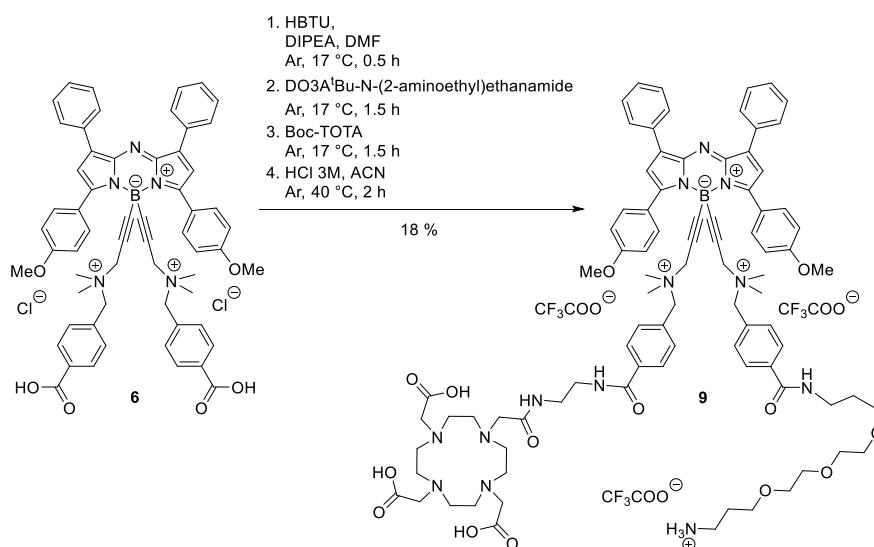
La tentative d'introduction d'un Boc-TOTA sur la plateforme bis-acide **6** a révélé que le couplage sur l'un des deux groupements ester activé ne permet pas d'obtenir majoritairement le composé désiré, un mélange de mono-Boc-TOTA et de bis-Boc-TOTA étant obtenu lors de cette réaction.



Afin de contourner ce problème, nous avons tenté la stratégie inverse ici, impliquant d'abord l'introduction du macrocycle, suivie par le greffage du Boc-TOTA. Le macrocycle choisi a été le DO3A<sup>t</sup>Bu-N-(2-aminoéthyl) éthanamide, dont les fonctions acide carboxylique sont protégées par des groupements *tertio*-butyles (**Figure 45**).

**Figure 45.** DO3A<sup>t</sup>Bu-N-(2-aminoéthyl)éthanamide.

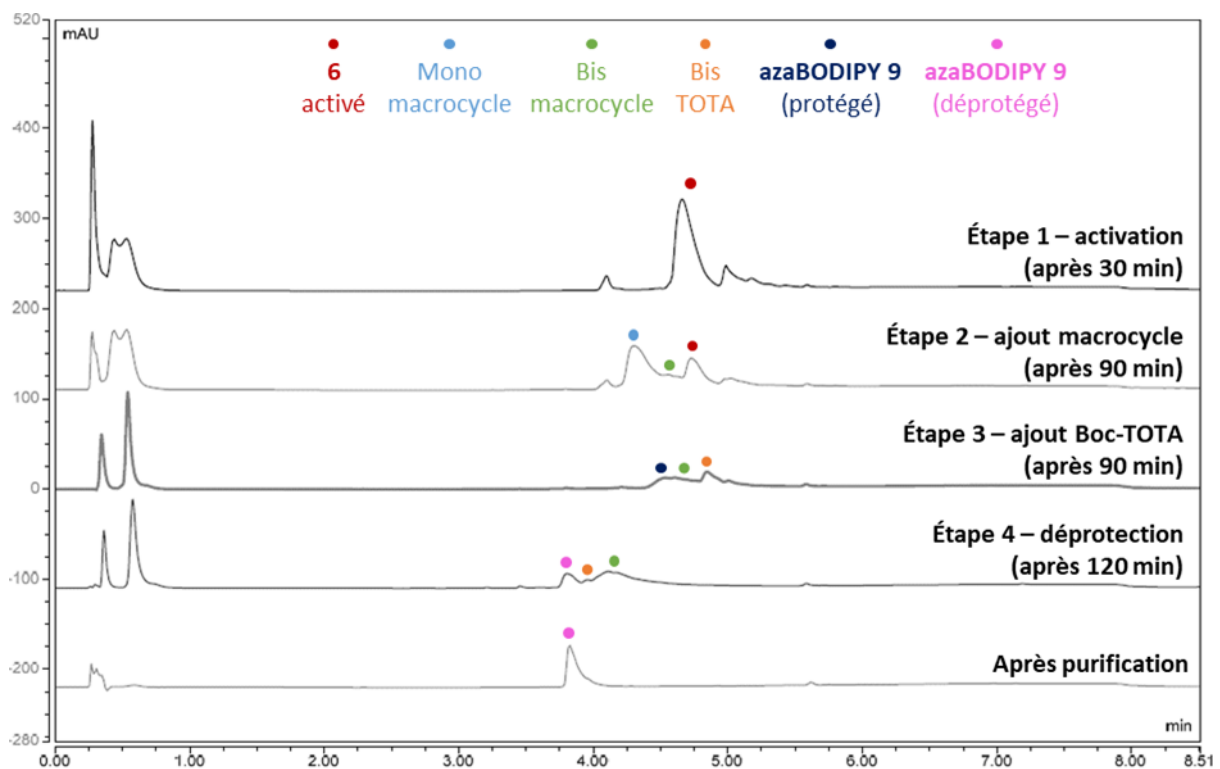
Une première étape d'activation de l'acide est réalisée à l'aide de l'agent de couplage HBTU, à 17 °C, sous atmosphère d'argon (**Schéma 4**).



**Schéma 4.** Couplage peptidique du macrocycle DO3A<sup>t</sup>Bu-N-(2-aminoéthyl) éthanamide (étape 2) puis du Boc-TOTA (étape 3) et déprotection (étape 4).

Cette activation est suivie, après 30 minutes d'agitation, par l'introduction d'une solution de 1,1 équivalent de macrocycle DO3A<sup>t</sup>Bu-N-(2-aminoéthyl) éthanamide dans le DMF. La réaction est contrôlée par RP-HPLC-MS. La formation de l'intermédiaire mono-macrocycle est ainsi notée dès 60 minutes de réaction, qui coexiste alors avec le dérivé bis-macrocycle (**Figure 46**). Après 90 minutes d'agitation à température ambiante, la solution de 1,1 équivalent de Boc-TOTA dans

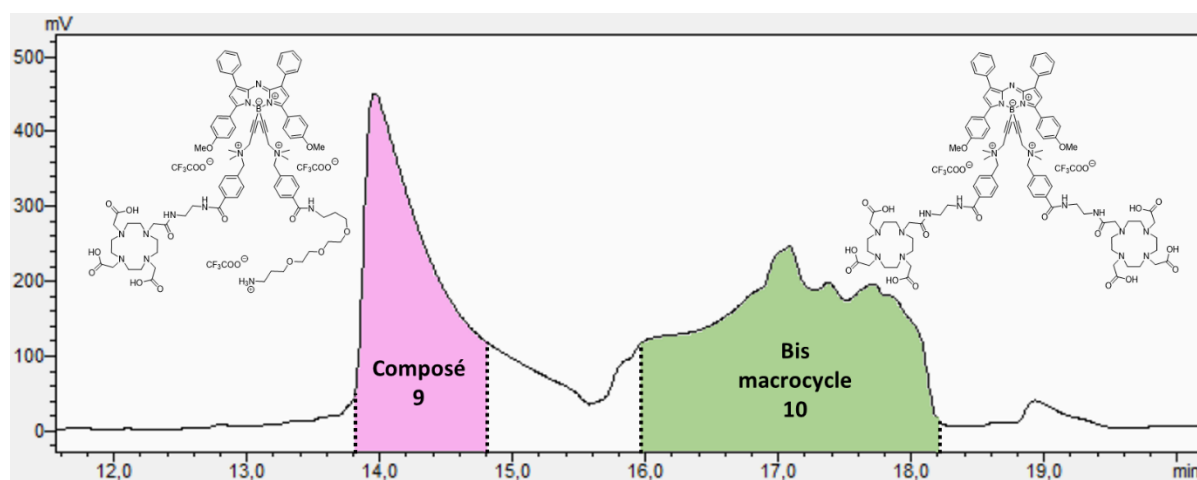
le DMF est alors ajoutée. Une analyse RP-HPLC-MS réalisée à 90 minutes après ajout de la solution de Boc-TOTA révèle la coexistence de trois espèces, à savoir le bis-TOTA, le bis-macrocycle et également le composé ciblé. Plus aucune trace du dérivé mono-macrocycle/monoester activé n'étant décelée par RP-HPLC-MS, le brut réactionnel est évaporé. Le résidu est ensuite solubilisé dans l'acétonitrile, puis l'ajout d'une solution aqueuse de HCl 3 M permet, après 2 h sous agitation à 40 °C, de déprotéger à la fois les fonctions acide carboxyliques du macrocycle, mais également l'amine située sur le TOTA, comme en atteste la RP-HPLC-MS. Le composé ainsi obtenu étant soluble en milieu aqueux, une purification par HPLC semi-préparative a pu être réalisée, permettant d'isoler l'azaBODIPY **9** avec un rendement de 18 %. La reproductibilité de la méthode « *one-pot* » a été confirmée par la réalisation de plusieurs lots. La présence de contre-ions TFA (provenant de la purification par HPLC semi-préparative) est confirmée par RMN du fluor et leur nombre est évalué par chromatographie ionique à 3,5 contre-ions TFA par molécule.



**Figure 46.** Suivi RP-HPLC-MS de la réaction « *one-pot* » par détection à 260 nm.

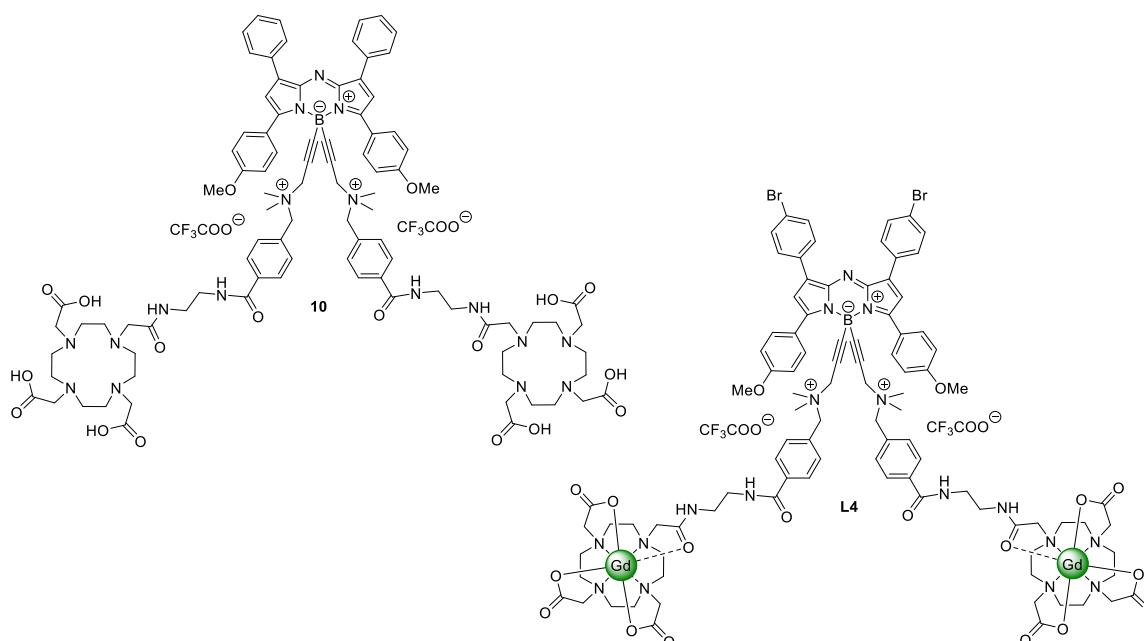
Il est important de souligner l'intérêt de cette méthode, qui permet de réaliser en une seule étape le greffage de deux groupements de natures différentes à la plateforme azaBODIPY, leur déprotection, ainsi que la purification de la molécule obtenue.

La purification de ce composé par HPLC semi-préparative permet d'isoler à la fois le composé d'intérêt **9** avec un rendement de 18 %, mais également l'un des sous-produits, à savoir le composé bis-macrocycle **10** avec un rendement similaire de 20 % (**Figure 47**).



**Figure 47.** Chromatogramme obtenu lors de la purification du composé **9** par HPLC semi-préparative. Les deux fractions récupérées sont identifiées par les zones colorées. La détection est réalisée à 220 nm.

Le dérivé bis-macrocycle **10** ainsi isolé est un analogue du composé **L4** (mentionné page **34**) ayant démontré son efficacité potentielle en tant que sonde bimodale optique/IRM développée au laboratoire (**Figure 48**).<sup>110</sup> Ainsi, ce composé peut également être utilisé en tant que sonde bimodale optique/IRM. Bien qu'il s'agisse d'un sous-produit, nous avons pu isoler 100 mg du composé **10**.



**Figure 48.** Sous-produit bis-DOTA **10** obtenu lors de la synthèse « one-pot » du composé **9** et sonde bimodale optique/IRM **L4** développée par notre équipe et publiée en 2020.<sup>110</sup>

Le sous-produit bis-TOTA n'a pas pu être isolé. Son temps de rétention étant situé entre ceux des composés **9** et **10**, la fraction contenant le composé bis-TOTA était alors polluée par des traces des deux autres composés.



### 3.5.1.2 Introduction de la fonction de greffage

La seconde étape de la synthèse concerne l'introduction de la fonction de greffage. Nous avons choisi d'utiliser le diéthyle squarate, pour sa propension à former des liaisons stables avec les amines par la formation d'un amide (**Figure 49**). De plus, ce groupement est résistant aux acides et son utilisation au sein de notre laboratoire a pu montrer que, contrairement à d'autres fonctions de greffage telles que

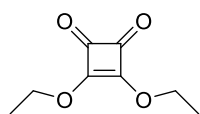
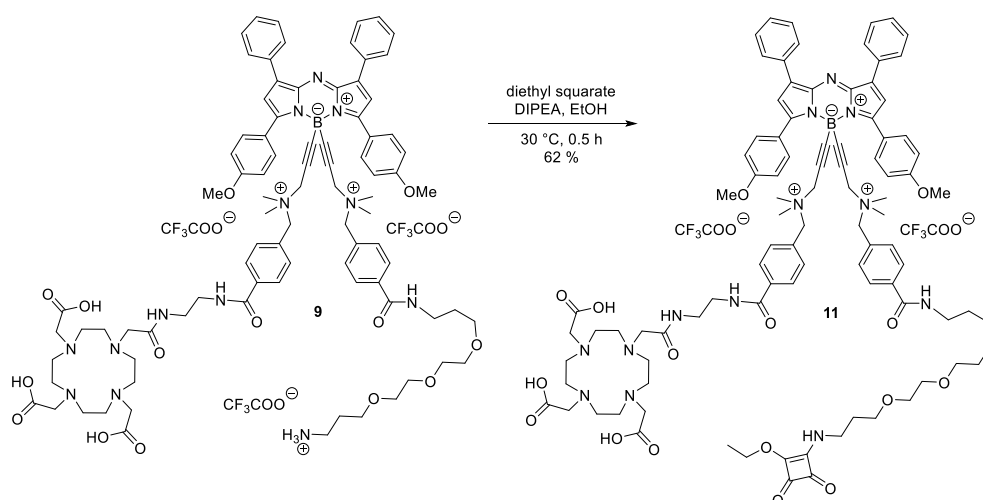


Figure 49. Structure du diéthyle squarate.

l'isothiocyanate bis-phényle, ce groupement n'affecte pas significativement l'hydrosolubilité du composé.<sup>212</sup>

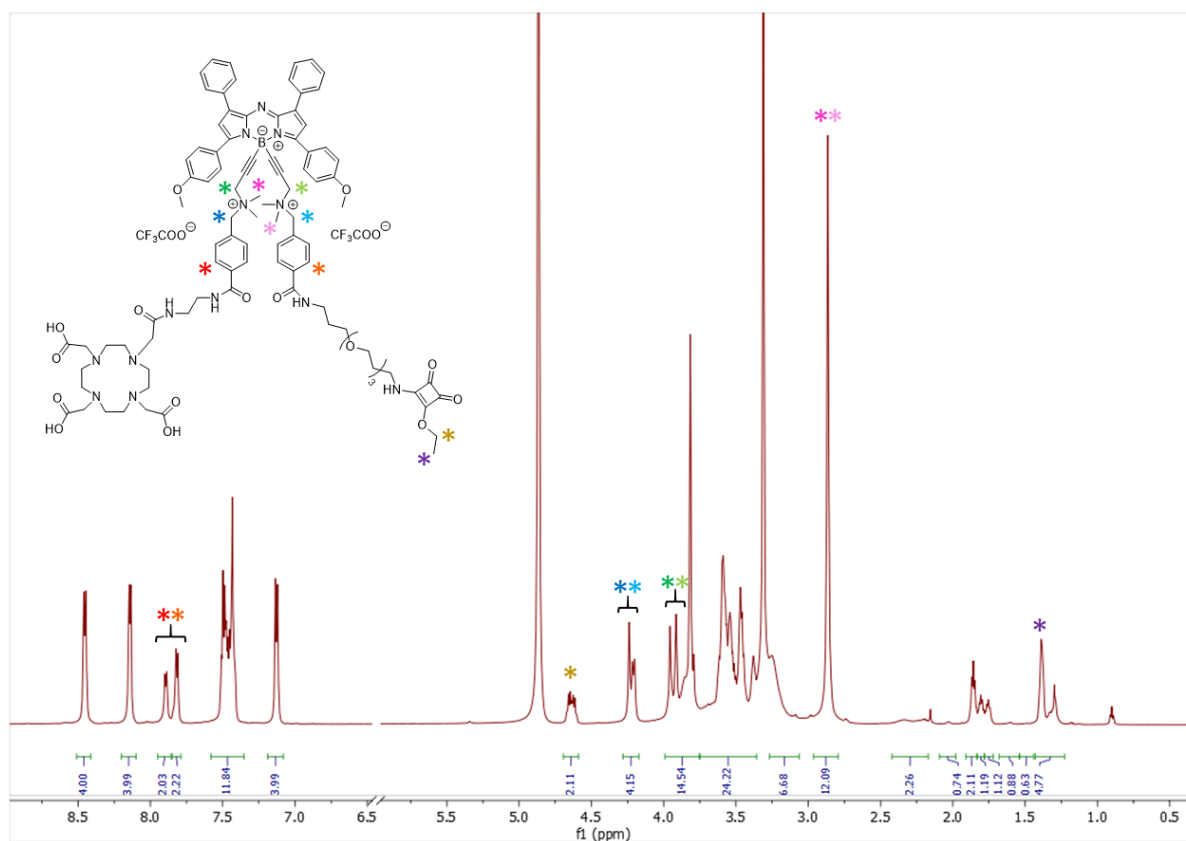
Pour cette étape, nous nous sommes inspirés des conditions décrites dans les travaux de thèse du Dr Pliquet (**Schéma 5**). L'introduction du diéthyle squarate est relativement aisée, la réaction se faisant en 30 minutes à 30 °C. À noter que quelques gouttes d'eau ont dû être ajoutées dans le milieu pour permettre une bonne solubilisation de l'azaBODIPY. De même que pour le composé **9**, une purification par HPLC semi-préparative permet d'obtenir l'azaBODIPY **11** avec un rendement satisfaisant de 62 %.



**Schéma 5.** Introduction de la fonction de greffage sur **9** pour obtenir le composé bioconjugué **11**.

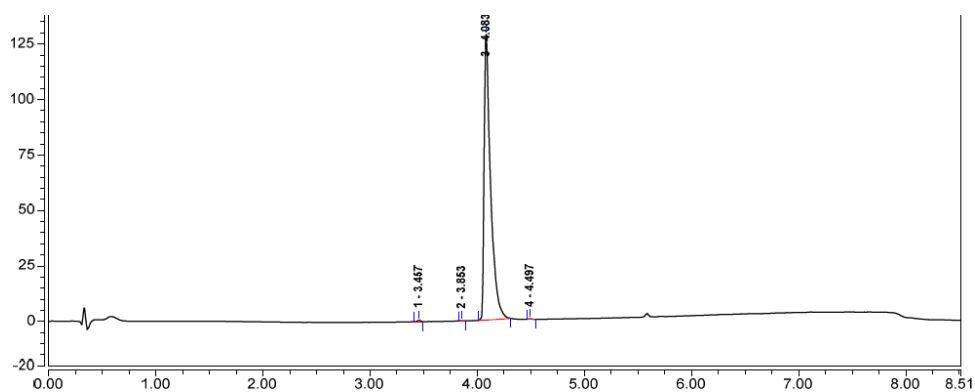
### 3.5.1.3 Caractérisation du composé 11

Le MOMIP **11** a pu être caractérisé en RMN du proton et du carbone. Plusieurs signaux permettent de confirmer la nature du composé **11** (**Figure 50**). On observe tout d'abord une importante dissymétrisation des signaux tels que ceux des protons proches des amines quaternaires. En ce qui concerne les méthyles portés par ces amines, le pic correspondant est large, ce qui tend à aller dans le sens de la présence de deux signaux très proches. La présence des signaux caractéristiques de l'éthyle de l'acide squarique monoamide monoester porté par le TOTA montre également que l'introduction de la fonction de greffage a fonctionné.



**Figure 50.** Spectre RMN du proton ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) du composé **11** montrant la dissymétrisation des protons sur chaque bras porté par l'atome de bore.

La nature du composé est également confirmée par masse exacte et une indication de sa pureté est donnée par RP-HPLC-MS (**Figure 51**).



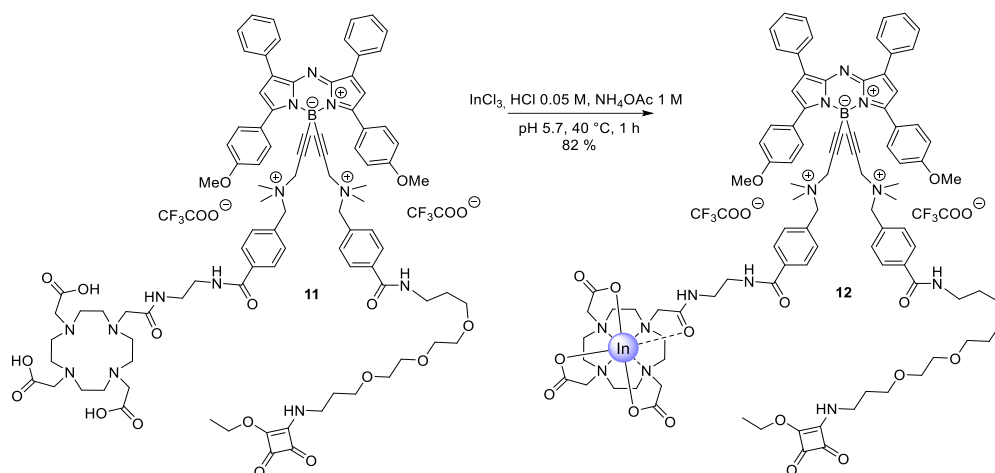
**Figure 51.** Chromatogramme RP-HPLC-MS du composé **11** après purification par HPLC semi-préparative (détection UV à 260 nm).

Le composé a été analysé en chromatographie ionique et a révélé la présence de deux contre-ions TFA, provenant de la purification par HPLC semi-préparative.

### 3.5.1.4 Test de métallation du composé 11

Un test de métallation à l'aide d'indium non radioactif a été réalisé afin d'évaluer l'impact de l'introduction du métal dans le macrocycle sur les propriétés photophysiques (**Schéma 6**).

Pour cela, 1,05 équivalent de chlorure d'indium(III) sont introduits en solution acide, le mélange étant tamponné par l'acétate d'ammonium pour atteindre un pH de 5,7, optimal pour la complexation. L'ajout du composé **11** à 37 °C mène à la chélation de l'indium.



**Schéma 6.** Métallation du composé **11** par introduction d'indium(III) non radioactif.

Le composé a pu être purifié *via* HPLC semi-préparative. Sa nature a pu être confirmée par masse exacte et RP-HPLC-MS et sa pureté est confirmée par RMN.

Ce test montre que l'introduction du centre métallique n'est pas entravée par la présence proche du fluorophore et que le radiomarquage réalisé ultérieurement est réalisable.

## 3.5.2 NODAGA-azaBODIPY

### 3.5.2.1 Introduction du NODAGA sur la plateforme azaBODIPY bis-acide

Nous avons également envisagé de faire la synthèse d'un second composé bimodal, comportant un macrocycle dérivé d'un NODAGA. Pour se faire, nous avons utilisé le NODAGA-NH<sub>2</sub> (**Figure 52**). Nous nous sommes placés dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la formation de l'azaBODIPY-DOTA **9** (**Schéma 7**). Pour le DOTA-NH<sub>2</sub>, un suivi RP-HPLC-MS avait permis de montrer la réalisation avec succès de chaque étape. L'introduction du macrocycle était alors faite en moins de 30 minutes. Cependant, dans le cas du NODAGA-NH<sub>2</sub>, on observe après 2,5 h de réaction la formation faible du mono-NODAGA, de bis-NODAGA ainsi que d'une autre espèce non identifiée. Une grande part de réactif de départ reste dans le brut réactionnel. Aucune évolution n'étant notée après une nuit, une tentative de purification par HPLC semi-préparative est réalisée, aboutissant à un mélange non séparable d'espèces de nature inconnue.

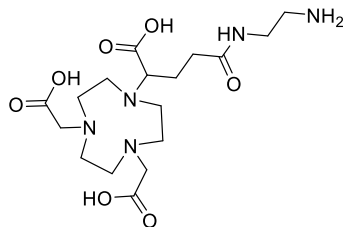
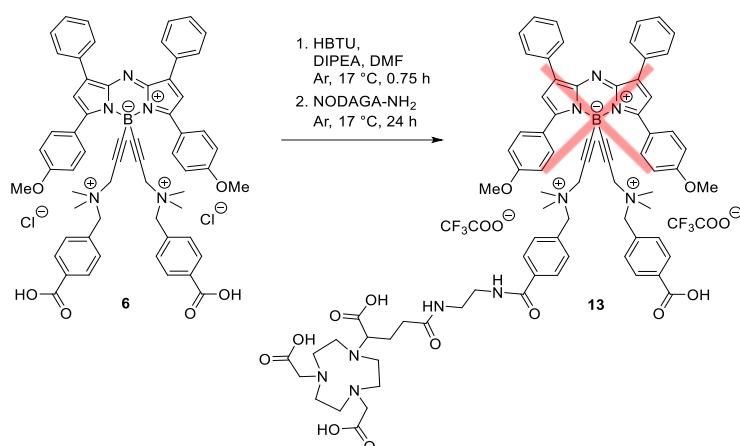


Figure 52. Structure du NODAGA-NH<sub>2</sub>.



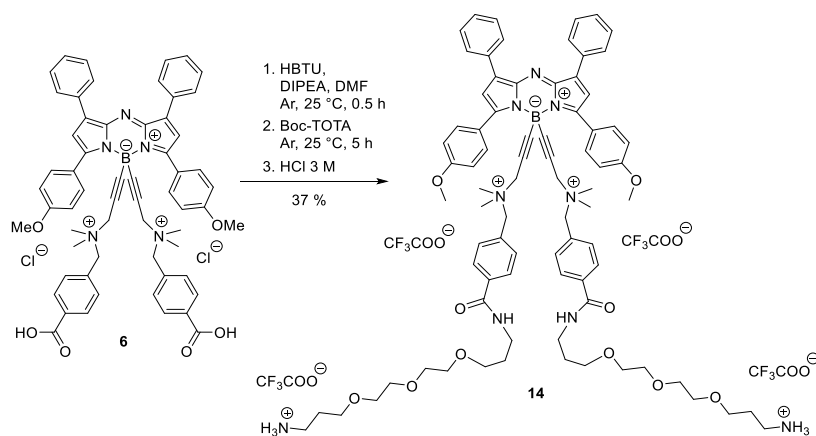
**Schéma 7.** Greffage du NODAGA-NH<sub>2</sub> sur l'un des deux esters activés du composé **6**.

Une première hypothèse pouvant expliquer un tel résultat a été que la présence de fonctions acide carboxylique non protégées sur le macrocycle entraîne une inactivation de la DIPEA (7 équivalents). Un test impliquant un plus large excès de base, à savoir 15 équivalents, s'est cependant soldé par un constat similaire, moins de 30 % du réactif étant convertis après 6 heures à 17 °C.

Une autre hypothèse pouvant être émise s'appuie sur des travaux similaires réalisés au sein de notre laboratoire et impliquant l'utilisation de groupements NODAGA. Nous pouvons supposer que la présence de charges (ammoniums quaternaires) gêne le greffage du macrocycle sur la position acide de la plateforme azaBODIPY **26**. Ainsi, afin de contourner cette limitation, nous avons opté pour le greffage d'un espaceur, sur lequel serait ensuite introduit le macrocycle, permettant de l'éloigner des charges situées à proximité du cœur azaBODIPY.

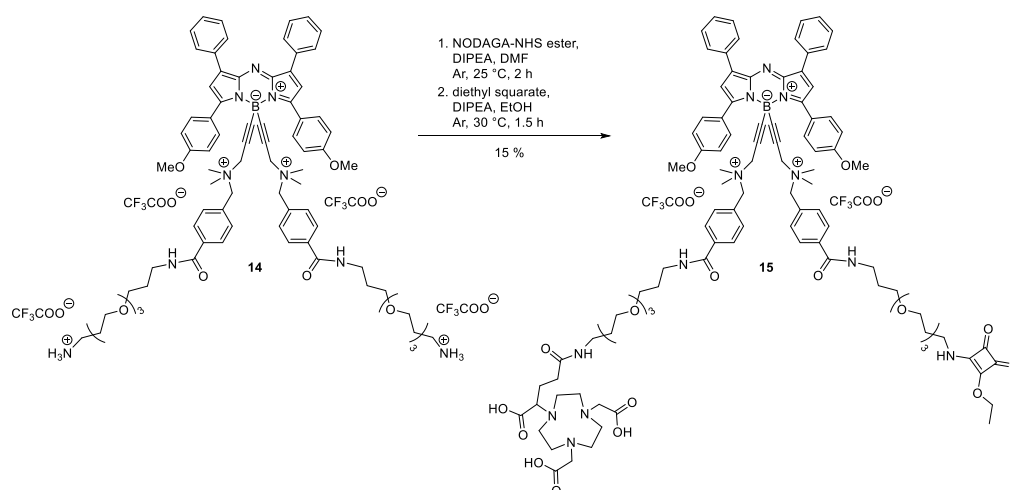
### 3.5.2.2 Introduction du NODAGA sur le bis-TOTA

Afin d'éloigner le macrocycle NODAGA des charges positives, nous avons opté pour l'introduction d'un espaceur TOTA entre la position acide de la plateforme azaBODIPY et le macrocycle. Pour se faire, l'azaBODIPY bis-TOTA **14** a donc été synthétisé, par couplage d'un Boc-TOTA sur chaque position ester activé puis déprotection (**Schéma 8**). Le composé **14** étant hydrosoluble, il a pu être purifié par HPLC semi-préparative, permettant de l'isoler avec un rendement de 37 %.



**Schéma 8.** Greffage de deux Boc-TOTA sur le composé **6** et déprotection.

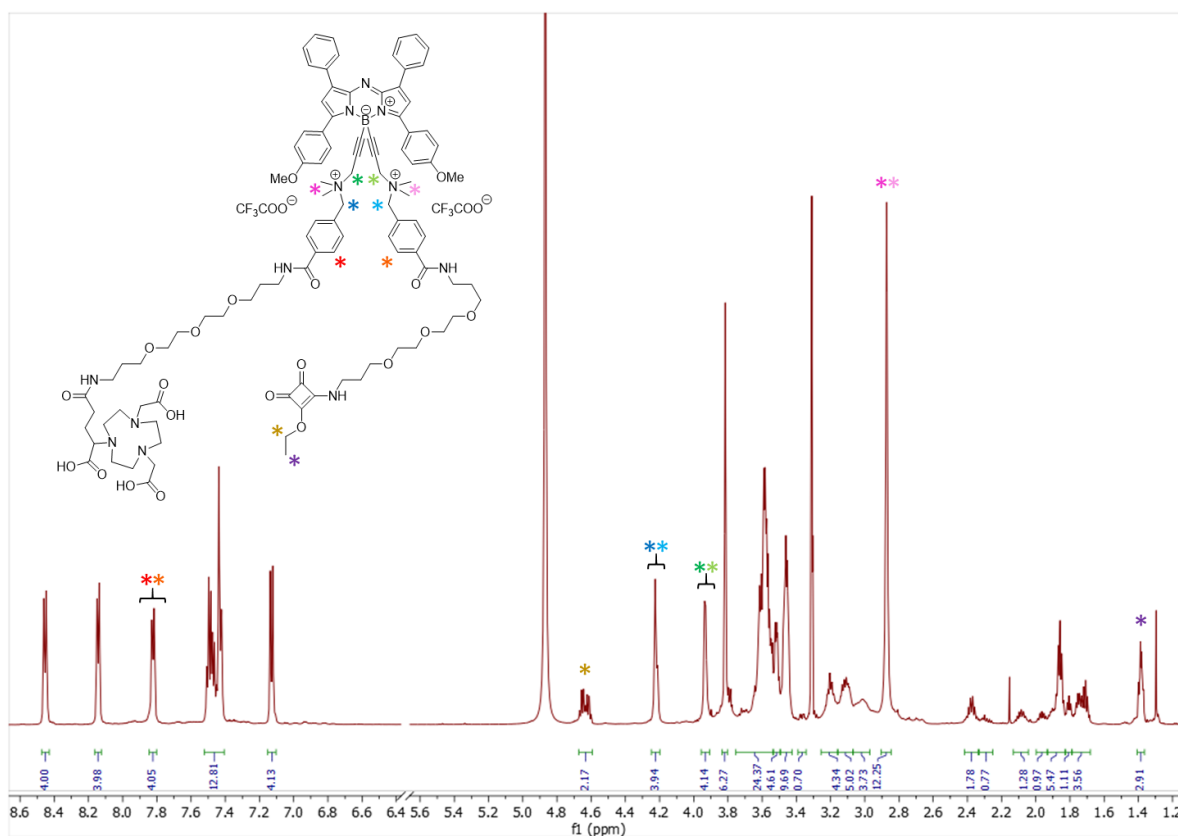
Le bis-TOTA-NH<sub>2</sub> **14** ainsi isolé, celui-ci a d'abord été mis à réagir avec le NODAGA ester activé en présence de base. Le couplage peptidique a alors été réalisé en moins de 2 h comme cela a pu être confirmé par RP-HPLC-MS. Cependant, et ce malgré l'excellente hydrosolubilité du composé mono-NODAGA obtenu, une tentative de purification par HPLC semi-préparative n'a pas permis d'isoler proprement le composé, un mélange d'espèces étant obtenu. Des traces du réactif **14** ainsi que l'espèce bis-NODAGA n'ayant pas pu être éliminées du produit, nous avons donc décidé d'introduire directement le diéthyle squarate sur le brut réactionnel obtenu suite au greffage du macrocycle (**Schéma 9**). Après une purification par HPLC semi-préparative, le composé bioconjugué **15** est obtenu avec un rendement de 15 %, valeur qui reste satisfaisante étant donné que cette étape conduit à l'introduction de deux groupements différents menant à la dissymétrisation de la molécule.



**Schéma 9.** Couplage peptidique du macrocycle et introduction du diéthyle squarate sur le composé **14**.

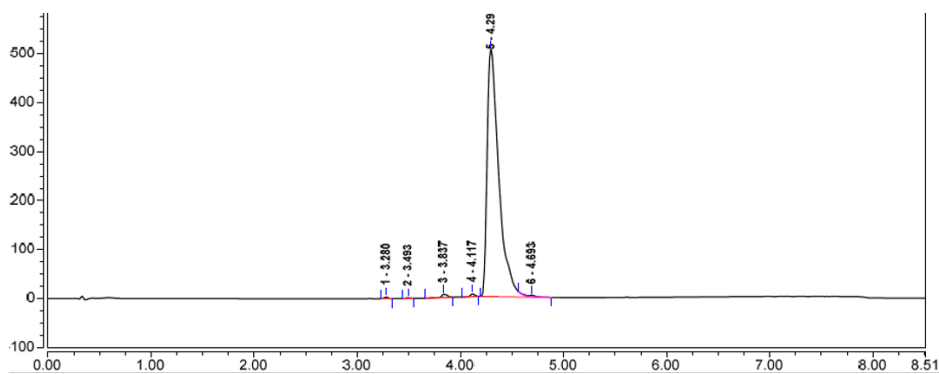
### 3.5.2.3 Caractérisation du composé **15**

De la même façon que pour la caractérisation du DOTA-azaBODIPY **11**, le composé **15** a pu être caractérisé en RMN, indiquant la dissymétrisation du composé lors de l'étape d'introduction du macrocycle et de la fonction de greffage (**Figure 53**). Contrairement au DOTA-azaBODIPY **11** qui ne présentait pas d'espaceur TOTA au niveau du macrocycle, la dissymétrisation des signaux des protons proches de l'ammonium quaternaire est moins marquée. En effet, la présence de deux groupements TOTA sur le NODAGA-azaBODIPY **15** implique que les protons proches de l'atome de bore sont moins impactés par la présence de deux groupements de nature différente.



**Figure 53.** Spectre RMN du proton ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) du NODAGA-azaBODIPY **15** montrant la dissymétrisation des protons sur chaque bras porté par l'atome de bore.

Nous soulignerons également la pureté excellente de 98 % indiquée par analyse RP-HPLC-MS (**Figure 54**).



**Figure 54.** Chromatogramme RP-HPLC-MS de **15** après purification (détection UV à 260 nm).

De même que pour la molécule **11**, le composé **15** a été analysé en chromatographie ionique et présente deux contre-ions TFA, provenant de la purification par HPLC semi-préparative.

### 3.6 Caractérisation photophysique

La caractérisation photophysique ont été réalisée dans le DMSO et le PBS.

Les propriétés photophysiques des composés **9**, **11**, **12**, **14** et **15** sont données dans le DMSO (**Tableau 6**) et le PBS (**Tableau 7**) et sont comparées à celles du précurseur bis-acide **6**.

**Tableau 6.** Propriétés photophysiques du bis-acide **6** et des composés **9**, **11**, **12**, **14** et **15** dans le DMSO à 25 °C. La référence utilisée pour le calcul des rendements quantiques est l'azaBODIPY **4** dans CHCl<sub>3</sub>.<sup>213</sup>

| Composé   | $\lambda_{\max, \text{absorption}}$<br>(nm) | $\epsilon$<br>(M <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ) | $\lambda_{\max, \text{émission}}$<br>(nm) | $\Phi$<br>(-) | Brillance<br>(M <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ) |
|-----------|---|--|---|---------------|---|
| <b>6</b>  | 694   | 60 000   | 727                                       | 0,32          | 19 200  |
| <b>9</b>  | 696   | 56 400   | 729                                       | 0,46          | 24 700  |
| <b>11</b> | 696   | 66 200   | 733                                       | 0,43          | 28 700  |
| <b>12</b> | 696   | 67 200   | 729                                       | 0,38          | 26 000  |
| <b>14</b> | 697   | 75 400   | 727                                       | 0,32          | 23 800  |
| <b>15</b> | 696   | 67 500   | 732                                       | 0,38          | 26 000  |

**Tableau 7.** Propriétés photophysiques du bis-acide **6** et des composés **9**, **11**, **12**, **14** et **15** dans le PBS à 25 °C. La référence utilisée pour le calcul des rendements quantiques est l'azaBODIPY **4** dans CHCl<sub>3</sub>.<sup>213</sup>

| Composé   | $\lambda_{\max, \text{absorption}}$<br>(nm) | $\epsilon$<br>(M <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ) | $\lambda_{\max, \text{émission}}$<br>(nm) | $\Phi$<br>(-) | Brillance<br>(M <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ) |
|-----------|---|--|---|---------------|---|
| <b>6</b>  | 692   | 34 200   | 713                                       | -             | -   |
| <b>9</b>  | 689   | 35 300   | 721                                       | 0,14          | 4 900   |
| <b>11</b> | 688   | 48 400   | 734                                       | 0,15          | 7 500   |
| <b>12</b> | 683   | 45 500   | 718                                       | 0,10          | 4 500   |
| <b>14</b> | 677   | 53 800   | 716                                       | 0,08          | 4 600   |
| <b>15</b> | 685   | 40 500   | 720                                       | 0,11          | 4 600   |

Dans le DMSO, les longueurs d'onde d'absorption des composés se situent autour de 696 nm, pour une émission maximale aux alentours de 730 nm. Dans le PBS, la totalité des composés absorbent entre 677 et 692 nm, pour une émission maximale entre 713 et 734 nm. Ainsi, la fonctionnalisation des positions acides du composé **6** ne semble pas impacter les maximums en longueur d'onde d'émission et d'absorption du fluorophore dans le DMSO, des écarts non significatifs de quelques nanomètres étant mesurés. Dans le PBS, ces écarts sont plus élevés, une différence de 20 nm étant mesurée entre le bis-acide **6** et le composé **11**.

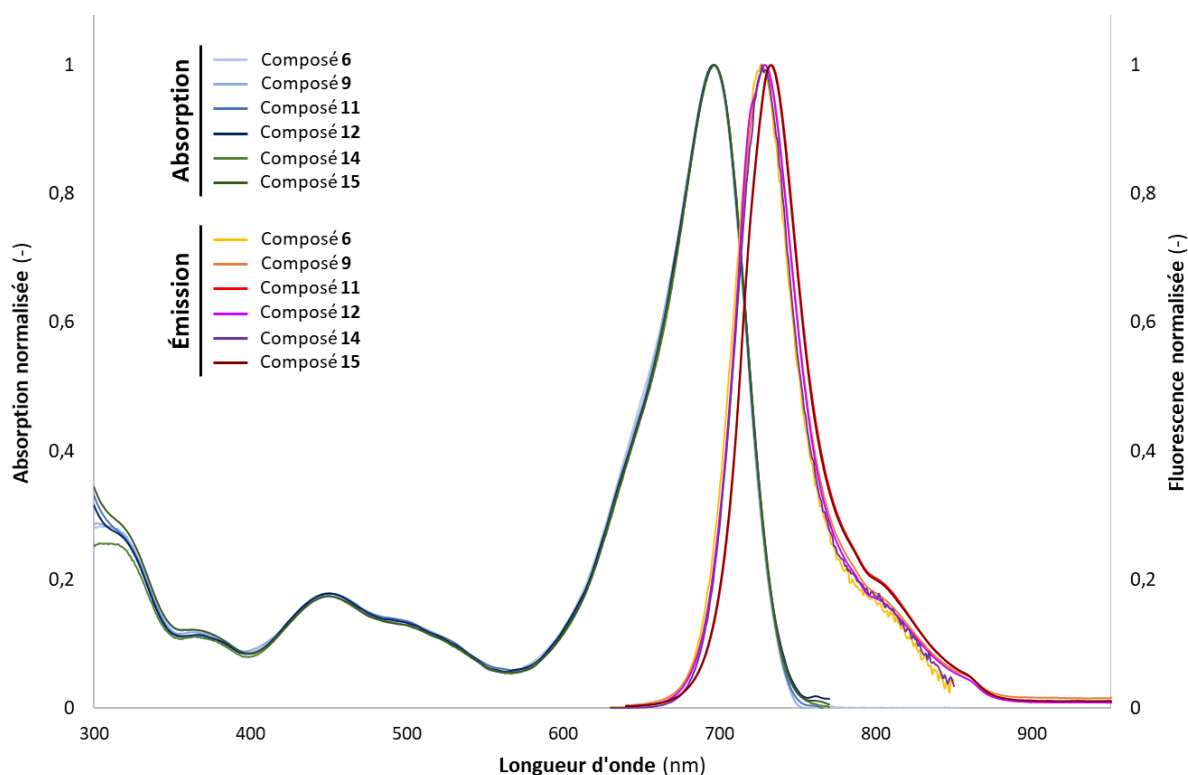
Les rendements quantiques sont particulièrement satisfaisants pour une sonde émettant dans le NIR-I, que ce soit dans le DMSO ( $0,32 < \phi < 0,46$ ) ou dans le PBS ( $0,08 < \phi < 0,15$ ). On soulignera tout particulièrement l'augmentation du rendement quantique dans le DMSO entre le bis-acide **6** et les autres composés (en particulier **9** et **11**). Ce phénomène peut être associé à la présence de groupements acide carboxylique sur l'azaBODIPY **6**, qui peuvent induire une désexcitation non radiative.

Il est à souligner que le coefficient d'absorption molaire du composé **14** est légèrement supérieur à ceux des autres composés, que ce soit dans le DMSO ou le PBS.

En ce qui concerne le composé **12**, l'introduction d'indium(III) au sein du macrocycle ne semble pas impacter les propriétés photophysiques en comparaison avec le DOTA-azaBODIPY **11**. Ce résultat est en accord avec les études précédemment réalisées sur les systèmes MOMIPs développés au laboratoire.<sup>209</sup>

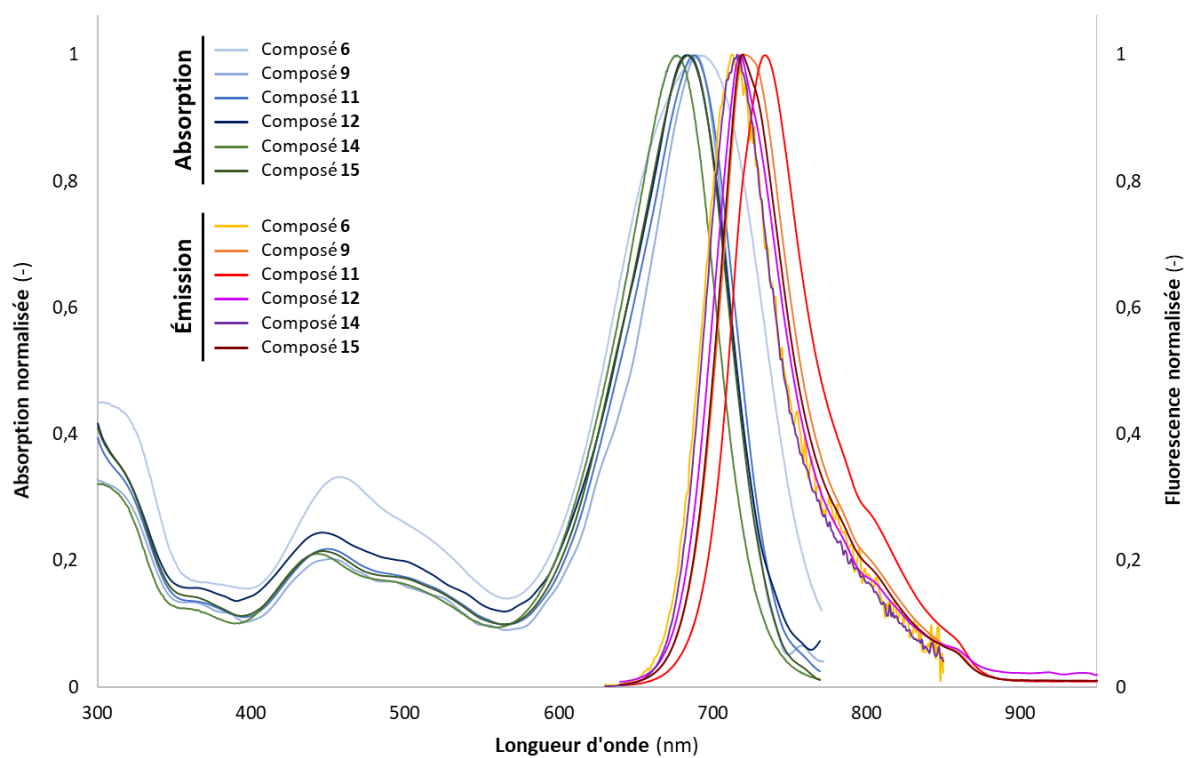
Une comparaison des spectres d'absorption et d'émission dans le DMSO et le PBS est également donnée (**Figure 55** & **Figure 56**). L'aspect des spectres n'est pas impacté par l'introduction de groupements sur les positions acides de **6** et les pics en absorption comme en émission restent fins.

Enfin, les brillances sont comprises entre 19 000 et 29 000  $M^{-1}.cm^{-1}$  dans le DMSO et 4 000 à 8 000  $M^{-1}.cm^{-1}$  dans le PBS. À titre de comparaison, le vert d'indocyanine, le fluorophore le plus couramment utilisé en clinique à ce jour, présente une brillance de 11 000  $M^{-1}.cm^{-1}$  dans le sérum.<sup>101</sup> De même, le bleu de méthylène, autre fluorophore utilisé en clinique, présente une brillance de 3 000  $M^{-1}.cm^{-1}$  dans le sérum. On gardera en tête que ces comparaisons sont à titre purement informatives, les analyses n'étant pas réalisées dans les mêmes solvants (PBS et sérum). En effet, lors d'études précédemment menées au sein de notre laboratoire, nous avons pu voir que dans le cas d'autres WazaBYs, la brillance était plus élevée dans le sérum que dans le PBS.



**Figure 55.** Spectres d'absorption et d'émission des composés **6**, **9**, **11**, **12**, **14** et **15** dans le DMSO à 25 °C. Les composés ont été excités à 620 nm.





**Figure 56.** Spectres d'absorption et d'émission des composés **6, 9, 11, 12, 14** et **15** dans le PBS à 25 °C. Les composés ont été excités à 620 nm.

### 3.7 Bioconjugaison du DOTA-azaBODIPY sur l'anticorps

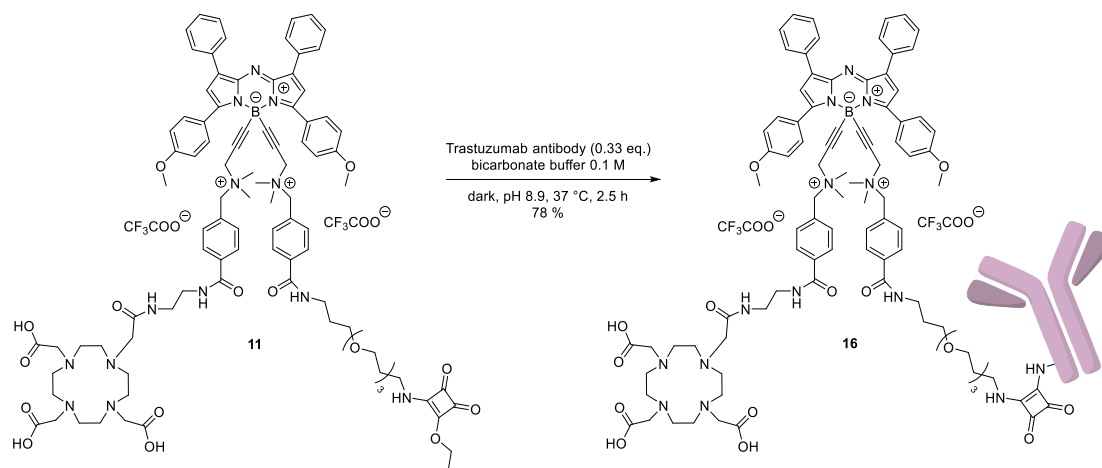
Dans le cadre de ce projet, nous avons décidé de nous focaliser dans un premier temps sur une étude d'imagerie complète du DOTA-azaBODIPY **11**. C'est pourquoi dans la suite de ce chapitre nous nous concentrerons tout particulièrement sur la bioconjugaison et les études *in vitro* et *in vivo* de ce composé.

#### 3.7.1 Bioconjugaison sur l'anticorps trastuzumab

Comme précisé en début de chapitre, nous avons décidé de réaliser la preuve de concept de cette sonde vectorisée par le trastuzumab. Les expériences *in vitro* et *in vivo* présentées dans la suite concerneront donc l'étude de la sonde **11** bioconjugée au trastuzumab.

La bioconjugaison ainsi que les tests biologiques ont été réalisés au laboratoire par Malorie Privat, également en thèse au sein de l'ICMUB et du LIIC (Laboratoire Immunologie et Immunothérapie des Cancers).

Une bioconjugaison aléatoire visant les lysines de l'anticorps a été réalisée en milieu tamponné à pH 8,9 et à 37 °C (**Schéma 10**). La purification est réalisée par FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) et permet d'obtenir le composé **16** avec un rendement de 78 %. À plus grande échelle, une dizaine de milligrammes ont ainsi été obtenus en un seul lot, permettant de réaliser la totalité des tests *in vivo* et *in vitro* présentés dans la suite.



**Schéma 10.** Bioconjugaison de la sonde **11** sur le trastuzumab.

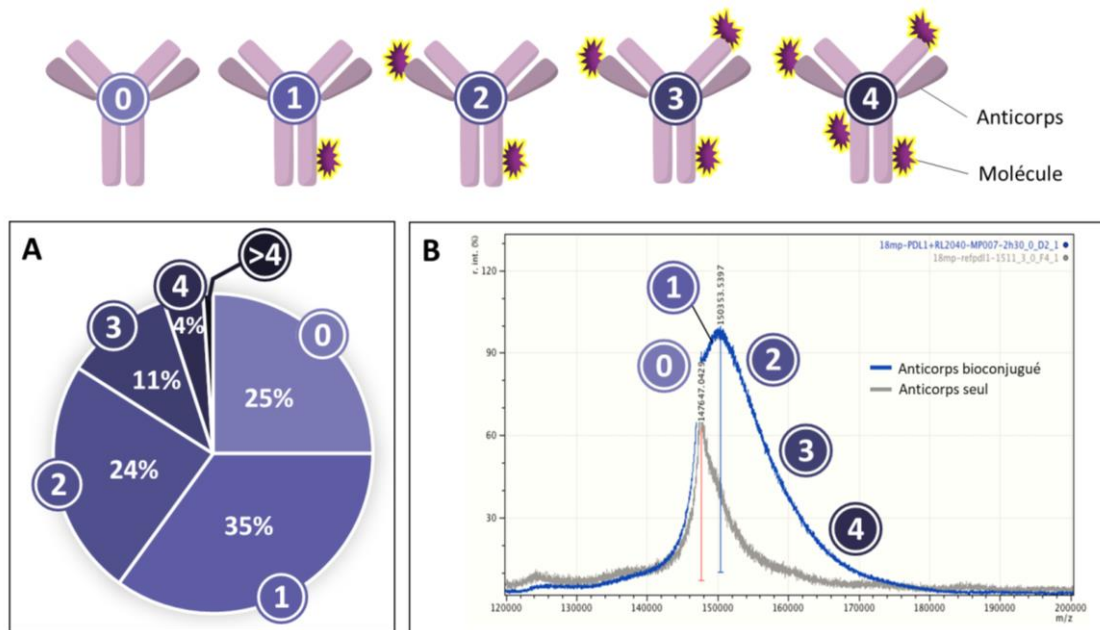
Dans la suite, par souci de clarté, on désignera la sonde vectorisée par le trastuzumab **16** par le nom **DOTA-azaBODIPY-trastuzumab**. De même, la molécule **11**, non vectorisée, sera quant à elle dénommée **DOTA-azaBODIPY**.

#### 3.7.2 Détermination du DOL

Comme cela a été précisé en introduction, le DOL (*degree of labelling*), qui traduit le nombre de sondes greffées par anticorps, est un élément important à prendre en compte lors de la bioconjugaison. Dans le cas d'un DOL faible, ce qui se traduit par un faible nombre de sondes par

anticorps, le signal fluorescent est peu perceptible. Au contraire, un DOL trop élevé, avec beaucoup de sondes par anticorps, peut induire une diminution de l'affinité de l'anticorps pour sa cible.

Ainsi, dans notre cas, la bioconjugaison a été optimisée afin d'atteindre un DOL de 1,4, obtenu dans des conditions impliquant 3 équivalents de composé par équivalent d'anticorps. Cette valeur est répétable et a été calculée par mesure de l'absorbance à 280 nm. Une analyse de masse MALDI-TOF confirme ce résultat par utilisation de la loi de Poisson (**Figure 57**).



**Figure 57.** Analyse du degré de bioconjugaison de la molécule sur le trastuzumab. **A** : Répartition du nombre de molécules par anticorps. **B** : Détermination du DOL par MALDI-TOF (loi de Poisson).

### 3.7.3 Bioconjugaison sur l'anticorps rituximab

À l'inverse du trastuzumab, le rituximab est un anticorps ne ciblant pas les récepteurs HER2. Nous avons décidé de bioconjuguer notre molécule à cet anticorps afin de produire un contrôle négatif qui nous permettrait alors de montrer l'impact de l'utilisation d'un anticorps spécifique des récepteurs HER2 par rapport à un anticorps non spécifique des récepteurs HER2.

Les conditions de bioconjugaison sont les mêmes que pour la bioconjugaison sur le trastuzumab (milieu tamponné à pH 8,9 à 37 °C). Le DOL obtenu à la suite de la bioconjugaison a été évalué de la même manière que pour le trastuzumab. Un DOL de 1,4 est obtenu, identique à celui pour la bioconjugaison sur le trastuzumab. Ce contrôle négatif sera dans la suite de ce manuscrit désigné **DOTA-azaBODIPY-rituximab**.

### 3.8 Tests *in vitro*

Avant de tester la sonde bimodale *in vivo*, nous avons réalisé plusieurs tests *in vitro* afin de déterminer l'affinité, la toxicité et la stabilité de la sonde **DOTA-azaBODIPY-trastuzumab**.

#### 3.8.1 Test d'affinité pour le récepteur HER2

Afin de contrôler l'impact de l'introduction de l'azaBODIPY sur l'anticorps trastuzumab, un test d'affinité par cytométrie de flux a été réalisé. La cytométrie de flux est une technique permettant de caractériser et de compter des cellules défilant devant un faisceau laser. Dans notre cas, cette analyse évalue l'efficacité du marquage sur les cellules, par étude de l'intensité de fluorescence sur un nombre connu et identique de cellules pour chaque mesure. Le marquage des cellules est réalisé par incubation de 30 minutes à 4 °C de cellules HCC1954 en présence de 1 µg de **DOTA-azaBODIPY-trastuzumab** (Figure 58). Les cellules sont ensuite lavées pour retirer toute trace de sonde en excès. L'échantillon est ensuite analysé.

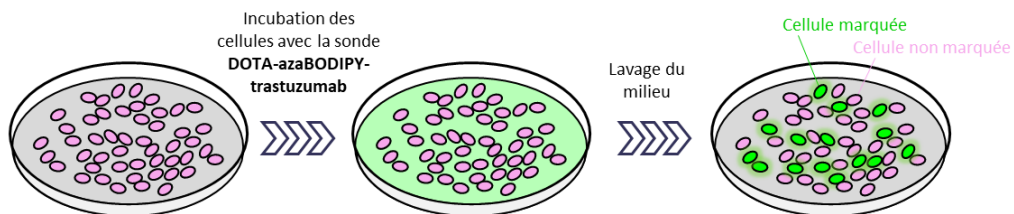


Figure 58. Principe de marquage des cellules avant analyse en cytométrie de flux.

Le principe de l'analyse est donné ci-contre (Figure 59).<sup>214</sup> L'échantillon de cellules ayant été marquées est injecté dans une buse dans laquelle un flux de liquide focalise les cellules permettant de les arranger en une file unique. Chaque cellule passe individuellement devant un laser et la

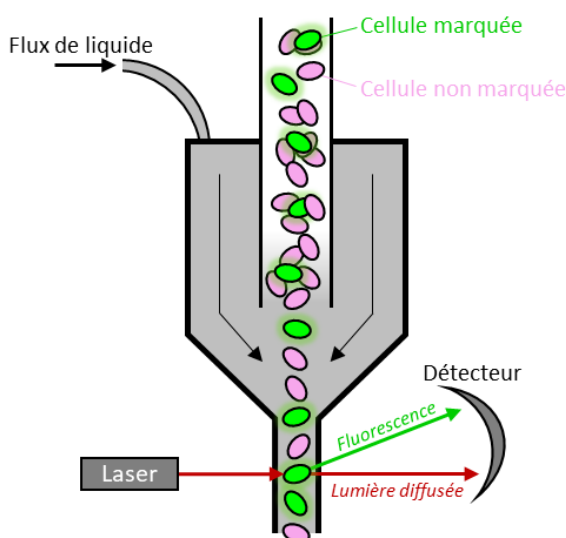


Figure 59. Principe d'une analyse par cytométrie de flux pour l'étude de marquage de cellules. Inspiré des travaux de thèse de Zhong.<sup>214</sup>

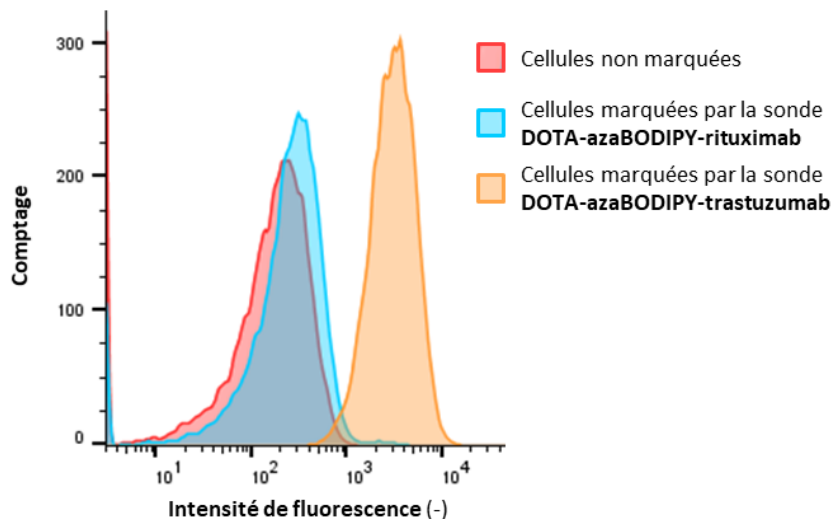
lumière en sortie est alors détectée. Dans le cas de cellules non marquées, seule la lumière diffusée est recueillie et permet de déterminer la taille et la granulométrie des cellules. En revanche, dans le cas de cellules marquées, un signal de fluorescence est également recueilli par le détecteur. Lors de cette analyse, les cellules sont comptées, ce qui permet alors de déterminer la proportion de cellules effectivement marquées.

Pour cette étude, nous avons utilisé des cellules HCC1954, qui surexpriment le récepteur HER2.

Le test réalisé pour ce projet a pour but de montrer la spécificité du **DOTA-azaBODIPY-trastuzumab** pour les cellules surexprimant HER2.

Ainsi, trois tests ont été menés. D'une part la cytométrie de flux sur cellules HCC1954 n'ayant été soumises à aucun marquage a été réalisée. Cela nous a permis d'établir le niveau de fluorescence

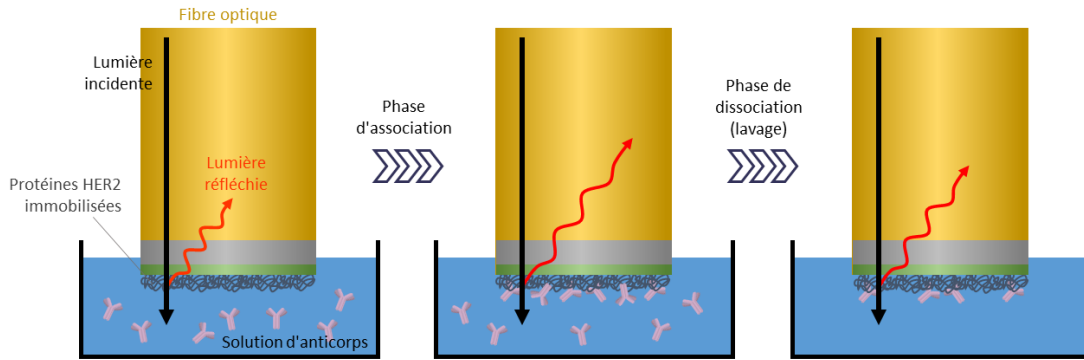
de base des cellules. Ensuite, la fluorescence de cellules marquées par la sonde bimodale spécifique de HER2 a été évaluée, nous permettant d'évaluer l'efficacité du marquage de la sonde bimodale sur les cellules. Enfin, un contrôle négatif a été réalisé par l'analyse de cellules marquées par la sonde **DOTA-azaBODIPY-rituximab**, non spécifique de HER2. Pour chacun de ces tests, le nombre de cellules testées est identique, à savoir  $5.10^5$  cellules. Les résultats de ces analyses se présentent sous la forme d'un graphe pour lequel l'abscisse témoigne de l'intensité de fluorescence du groupe de cellules analysé (**Figure 60**).



**Figure 60.** Cytométrie de flux (725/25 nm) sur cellules HCC1954 non marquées (**rouge**), marquées par la sonde **DOTA-azaBODIPY-rituximab** non spécifique de HER2 (**bleu**), marquées par la sonde **DOTA-azaBODIPY-trastuzumab** spécifique de HER2 (**orange**).

L'aire sous le graphe rouge correspond à la fluorescence basale des cellules HCC1954. Dans le cas d'une incubation préalable des cellules en présence de sonde **DOTA-azaBODIPY-rituximab**, l'intensité de fluorescence qui en résulte est sensiblement identique (aire bleue). En revanche, lors du marquage des cellules par la sonde **DOTA-azaBODIPY-trastuzumab** (aire orange), une forte hausse de l'intensité de fluorescence est observée. Ceci confirme bien que le trastuzumab marqué par le DOTA-azaBODIPY avec un DOL de 1,4 est toujours affiné pour les récepteurs HER2.

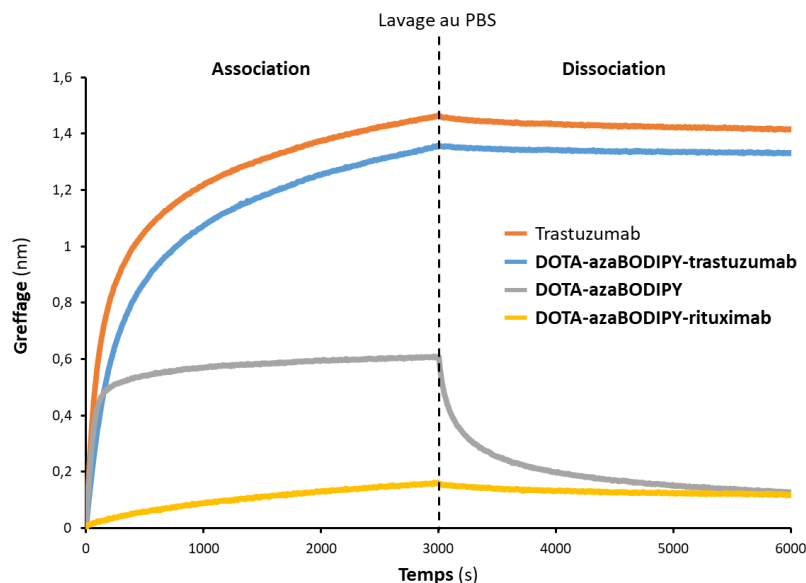
Ces résultats sont confirmés par un test par interférométrie des biocouches (*biolayer interferometry*). Pour ce test, un biocapteur à l'extrémité d'une fibre optique, sur lequel est immobilisée la protéine HER2, est plongé dans une solution d'anticorps (**Figure 61**). Une lumière est alors envoyée sur le capteur et est en partie réfléchi au niveau de la couche située à son extrémité. La longueur d'onde de la lumière réfléchi est dépendante de l'épaisseur située au bout du biocapteur. Par calculs informatiques, il est alors possible de déduire directement de la longueur d'onde mesurée, l'épaisseur de la couche à étudier. Dans notre cas, la mesure est effectuée en deux étapes. Une première phase d'association met en contact le bout du biocapteur (porteur de protéines HER2) avec une solution d'anticorps. Certains anticorps se fixent alors spécifiquement, d'autres étant seulement « piégés » au sein de la couche de protéines. Une étape de lavage, nommée dissociation, permet de décrocher toute molécule ou anticorps non spécifiquement greffé. L'intérêt de cette analyse est qu'elle permet d'observer en temps réel le couplage des anticorps aux récepteurs.



**Figure 61.** Principe d'une analyse d'interférométrie pour l'étude du greffage d'anticorps aux récepteurs HER2.

Dans notre cas, cette étude a permis de comparer l'efficacité de greffage de plusieurs anticorps. Afin de déterminer l'affinité de l'anticorps trastuzumab seul, un test a été réalisé sur l'anticorps non greffé à la sonde. Un second test, impliquant la sonde **DOTA-azaBODIPY-trastuzumab**, permet de déterminer l'impact de la présence du **DOTA-azaBODIPY** sur l'efficacité de greffage de l'anticorps à son récepteur. Un test négatif impliquant l'anticorps rituximab a également été réalisé. Enfin, une étude d'interférométrie a été réalisée sur le **DOTA-azaBODIPY** non vectorisé. L'efficacité de greffage est exprimée en nanomètres, traduisant l'épaisseur de la biocouche. Une épaisseur de biocouche supérieure à 1 nm témoigne d'un greffage efficace.

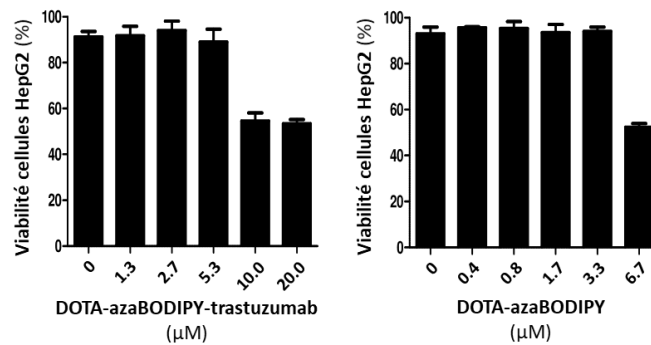
On note tout d'abord que le rituximab n'est pas affiné pour HER2, le couplage anticorps/récepteur étant très faible (**Figure 62** – courbe jaune). Le **DOTA-azaBODIPY** non vectorisé semble s'accrocher de manière non spécifique, ce qui est confirmé par le décrochage très net dès le premier lavage au PBS (courbe grise). Enfin, on remarque que l'affinité pour le trastuzumab seul et pour la sonde **DOTA-azaBODIPY-trastuzumab** sont très proches (courbes orange et bleue), ce qui souligne que le trastuzumab marqué par le **DOTA-azaBODIPY** avec un DOL de 1,4 impacte pas significativement son affinité pour le récepteur HER2.



**Figure 62.** Résultats du test par interférométrie des biocouches sur le récepteur HER2.

### 3.8.2 Toxicité sur cellules

La toxicité de la sonde **DOTA-azaBODIPY-trastuzumab** sur cellules a été déterminée. Pour ce faire, nous avons incubé d'une part la sonde vectorisée par le trastuzumab et d'autre part la sonde sans vecteur en présence de cellules HepG2 (cellules hépatiques cancéreuses humaines) durant 48 h (**Figure 63**). Ces cellules ont été choisies car elles sont HER2 négatives et sont donc ici un modèle pour montrer l'impact de la sonde lorsque celle-ci ne s'accroche pas spécifiquement aux cellules. La viabilité des cellules a ensuite été évaluée par test MTS.

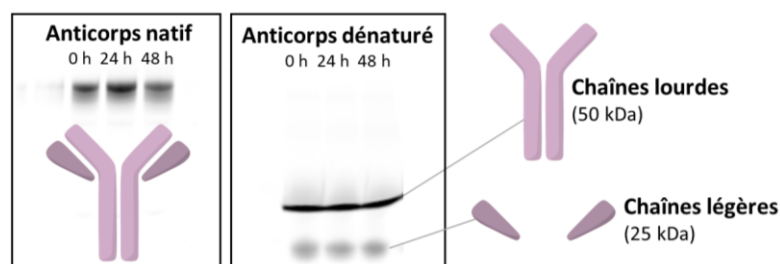


**Figure 63.** Évaluation de la toxicité de la sonde **DOTA-azaBODIPY-trastuzumab** (gauche) et de la molécule **DOTA-azaBODIPY** (droite) sur cellules HepG2.

La sonde vectorisée par le trastuzumab présente une toxicité comparable à celle de la sonde seule. Ces résultats sont cohérents, le test ayant été réalisé sur cellules HepG2 (n'exprimant pas HER2), sur lesquelles la sonde vectorisée ne peut pas être conjuguée spécifiquement. Ainsi, aucune toxicité significative n'a été observée pour la sonde **DOTA-azaBODIPY-trastuzumab** jusqu'à 5,3 µM et jusqu'à 3,3 µM pour le **DOTA-azaBODIPY**.

### 3.8.3 Stabilité de la sonde vectorisée dans le sérum

Cette sonde est destinée à être utilisée en imagerie TEMP. Ce type d'analyse pouvant être réalisé sur des périodes longues de plusieurs jours, il est nécessaire que l'intégrité de la sonde soit assurée sur ce laps de temps. Afin de vérifier cela, la stabilité du vecteur marqué par la sonde a été évaluée sur gel d'électrophorèse à 0 h, 24 h et 48 h après incubation dans du sérum humain. Deux tests ont été réalisés avec d'une part l'anticorps complet et d'autre part l'anticorps dénaturé, dont les chaînes lourdes sont séparées des chaînes légères par rupture des ponts disulfures (**Figure 64**).



**Figure 64.** Électrophorèse des anticorps natifs ou dénaturés après incubation dans du sérum murin à 37 °C pendant 0 h, 24 h, 48 h.

Aucune dégradation n'est observée après 48 h. On note également que la bioconjugaison de la sonde a lieu aussi bien sur les chaînes lourdes que sur les chaînes légères.

## 3.9 Tests *in vivo*

### 3.9.1 Radioméallation

Le radiomarquage a été réalisé la veille de l'injection à l'aide d'indium-111, isotope radioactif de temps de demi-vie de 2,8 jours. L'incorporation de  $[^{111}\text{In}]\text{InCl}_3$  au sein du composé **DOTA-azaBODIPY-trastuzumab** a été réalisée dans des conditions similaires au test réalisé à l'aide d'indium non radioactif (voir partie **3.5.1.4**). Après 16 h d'incubation à 37 °C, le composé radiomarqué est purifié, avec un rendement de radiomarquage de 88 %. Cette valeur est suffisante pour pouvoir réaliser une imagerie TEMP/TDM tout en injectant une quantité raisonnable de bioconjugué aux souris.

Dans la suite de ce manuscrit, nous identifierons le composé **17** radiomarqué et vectorisé par le trastuzumab par le nom de  $[^{111}\text{In}]\text{In-DOTA-azaBODIPY-trastuzumab}$  (Figure 65).

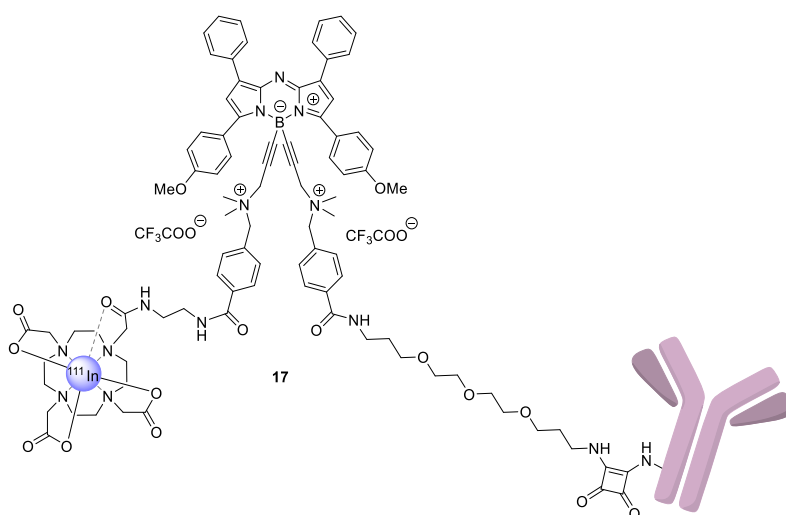


Figure 65. Structure de la sonde bimodale vectorisée  $[^{111}\text{In}]\text{In-DOTA-azaBODIPY-trastuzumab}$ .

### 3.9.2 Préparation des souris

Des cellules tumorales humaines mammaires HCC1954, HER2 positives, ont été greffées en sous-cutané sur le flanc de souris BALB/c *nude* âgées de six semaines. L'imagerie a été réalisée après trois semaines, moment auquel le volume des tumeurs a été jugé suffisant. L'injection de la sonde est réalisée de manière intraveineuse.

### 3.9.3 Imagerie bimodale

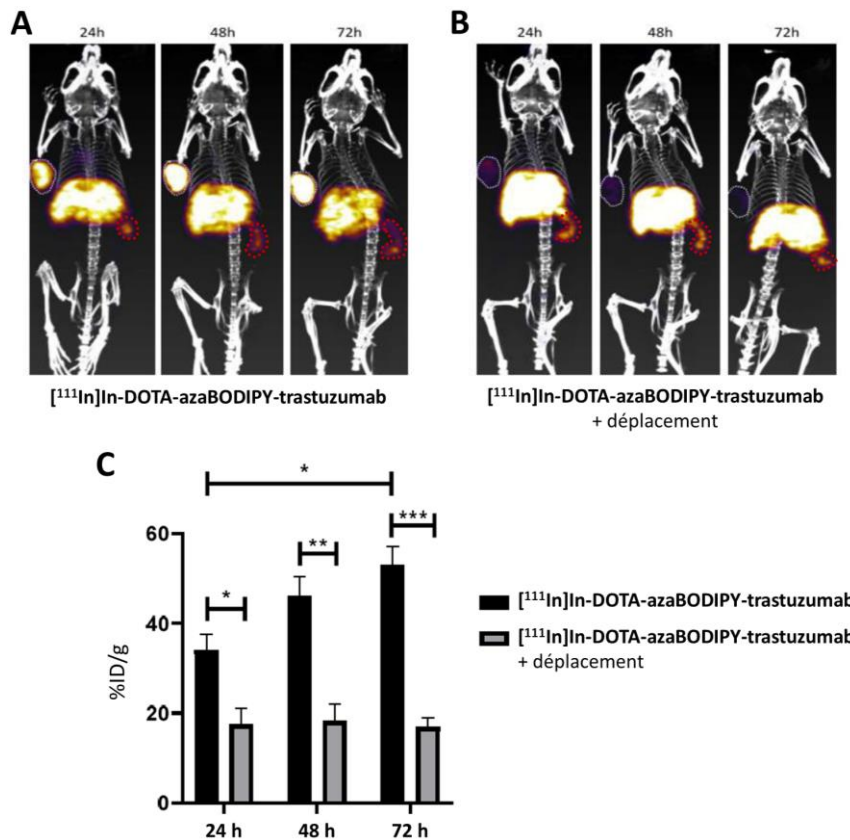
#### 3.9.3.1 Première expérience

Une première expérience d'imagerie bimodale a été réalisée par l'injection de 25  $\mu\text{g}$  de  $[^{111}\text{In}]\text{In-DOTA-azaBODIPY-trastuzumab}$  sur souris BALB/c *nude*. Nous présentons ici le résultat obtenu pour une souris. L'imagerie a été réalisée à 24, 48 et 72 h après l'injection.



La spécificité de la sonde pour la tumeur a été testée par mise en compétition avec du trastuzumab non marqué. Dans ce cas, lors de l'injection de la sonde [ $^{111}\text{In}$ ]In-DOTA-azaBODIPY-trastuzumab, un excès de 100 équivalents d'anticorps non marqué est co-injecté. Dans la suite, nous désignerons ce test par le terme « déplacement ».

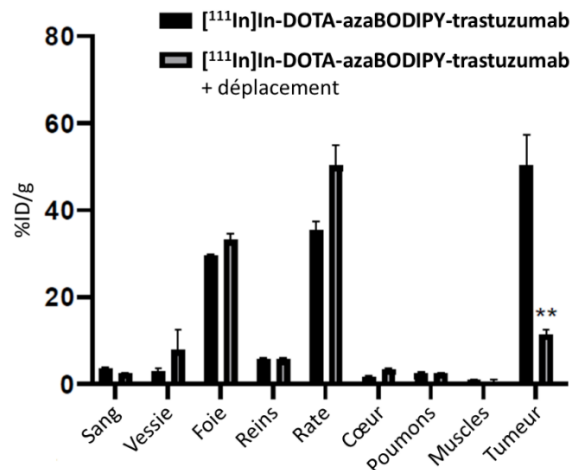
L'imagerie TEMP/TDM montre un signal intense provenant de la tumeur, indiquant la réussite du ciblage (**Figure 66**). Dans le cas de l'expérience de déplacement, un faible signal provenant de la tumeur est observé. Un signal intense provenant du foie est également observé, fait cohérent avec le mode de vectorisation de la sonde choisie, cet organe étant la voie d'excrétion principale des anticorps. On remarque également une accumulation non spécifique dans la rate. Ces résultats sont confirmés par l'étude *ex vivo*, dévoilant un signal 1,5 fois plus élevé à 72 h qu'à 24 h.



**Figure 66.** Imageries TEMP/TDM obtenues 24 h, 48 h et 72 h après l'injection intraveineuse de 25  $\mu\text{g}$  de [ $^{111}\text{In}$ ]In DOTA-azaBODIPY-trastuzumab sur souris BALB/c *nude* porteuse d'une tumeur (identifiée en pointillés blanc) sous-cutanée de cellules HCC1954 HER2+. La rate est identifiée par les pointillés rouge. **A** : Coupe dorsale après l'injection de la sonde bimodale vectorisée par le trastuzumab. **B** : Coupe dorsale après l'injection de la sonde bimodale vectorisée par le trastuzumab avec déplacement. **C** : Évolution de l'intensité de signal provenant de la tumeur au cours du temps en présence ou non de trastuzumab non marqué (déplacement).

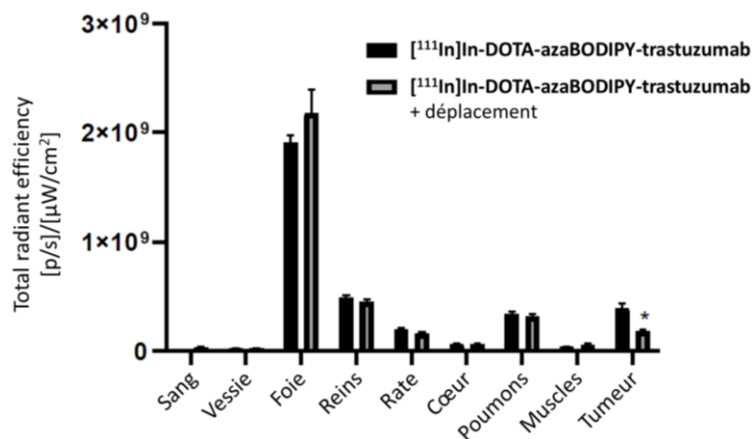
Une étude *ex vivo* réalisée 72 h après l'injection intraveineuse de [ $^{111}\text{In}$ ]In-DOTA-azaBODIPY-trastuzumab a également permis de montrer la bonne affinité de la sonde pour la tumeur (**Figure 67**). En effet, on remarque que la sonde s'accumule principalement dans la tumeur, la rate et le foie. Le signal obtenu dans la tumeur est alors deux fois supérieur à celui provenant du foie et 1,4 fois supérieur à celui obtenu dans la rate. Les autres organes ne présentent que très peu de signal. Aucun signal n'est recueilli dans les muscles, ce qui peut permettre dans le cas d'une

chirurgie assistée par fluorescence de délimiter au mieux les tissus tumoraux. Les résultats obtenus dans le cas d'une expérience de déplacement sont également donnés. On remarque un signal 4,5 fois plus faible dans le cas du déplacement en ce qui concerne le signal provenant de la tumeur, ce qui confirme que la sonde bimodale est bien spécifique des récepteurs HER2. Une accumulation non spécifique de la sonde a alors lieu principalement dans la rate, qui présente un signal 1,4 fois plus élevé que dans le cas de l'expérience sans déplacement. Les signaux provenant des autres organes ne sont pas impactés par l'expérience de déplacement.



**Figure 67.** Étude TEMP *ex vivo* à 72 h après l'injection intraveineuse de 25 µg de [<sup>111</sup>In]In-DOTA-azaBODIPY-trastuzumab sur souris BALB/c *nude* porteuse d'une tumeur sous-cutanée de cellules HCC1954 HER2+. L'étude de déplacement est réalisée dans les mêmes conditions.

En revanche, en ce qui concerne l'imagerie optique, les résultats ont indiqué que la quantité de sonde utilisée était trop faible pour recueillir un signal satisfaisant (**Figure 68**). Des intensités de signaux équivalents étaient recueillis dans les reins, les poumons et la tumeur.



**Figure 68.** Étude en imagerie optique *ex vivo* à 72 h après l'injection intraveineuse de 25 µg de [<sup>111</sup>In]In-DOTA-azaBODIPY-trastuzumab sur souris BALB/c *nude* porteuse d'une tumeur sous-cutanée de cellules HCC1954 HER2+. L'étude de déplacement est réalisée dans les mêmes conditions.

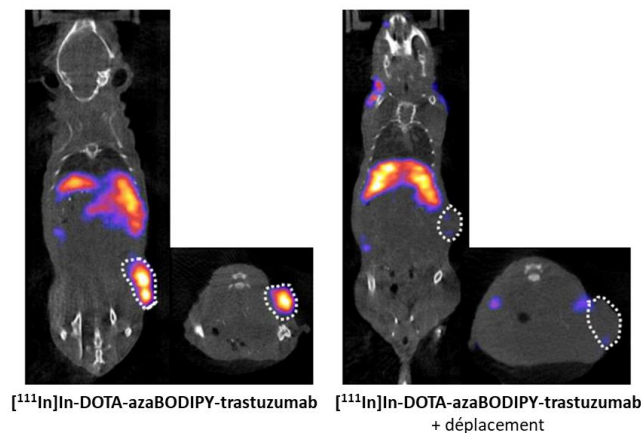
Suite aux résultats obtenus en imagerie optique, nous avons décidé de réaliser l'imagerie avec des quantités en sonde [<sup>111</sup>In]In-DOTA-azaBODIPY-trastuzumab plus élevées, afin de permettre d'observer à la fois un signal TEMP et un signal en imagerie optique satisfaisants.

### 3.9.3.2 Seconde expérience à des concentrations supérieures

Pour cette seconde étude, des quantités supérieures en sonde ont été injectées à chaque souris, à savoir 50, 75 ou 100  $\mu\text{g}$ . Aucun signe de toxicité n'a été décelé pour ces concentrations chez les souris. L'imagerie a été réalisée à 24, 48 et 72 h. Pour les trois concentrations en  $[^{111}\text{In}]\text{In-DOTA-azaBODIPY-trastuzumab}$ , un signal satisfaisant a pu être récupéré pour les deux imageries. Les résultats présentés dans la suite correspondent à une quantité injectée de 100  $\mu\text{g}$ .

#### Imagerie TEMP/TDM

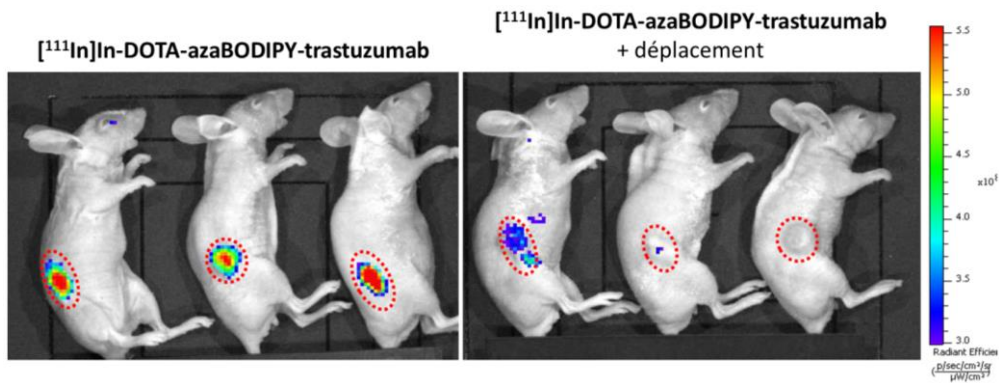
De même que pour le test à 25  $\mu\text{g}$ , les images obtenues en TEMP permettent d'identifier avec précision la position de la tumeur (**Figure 69**). Une accumulation non spécifique au niveau du foie est à signaler.



**Figure 69.** Imageries TEMP/TDM en coupe dorsale obtenues 72 h après l'injection intraveineuse de 100  $\mu\text{g}$  de  $[^{111}\text{In}]\text{In-DOTA-azaBODIPY-trastuzumab}$  sur souris BALB/c *nude* porteuse d'une tumeur (identifiée en pointillées blanc) sous-cutanée de cellules HCC1954 HER2+.

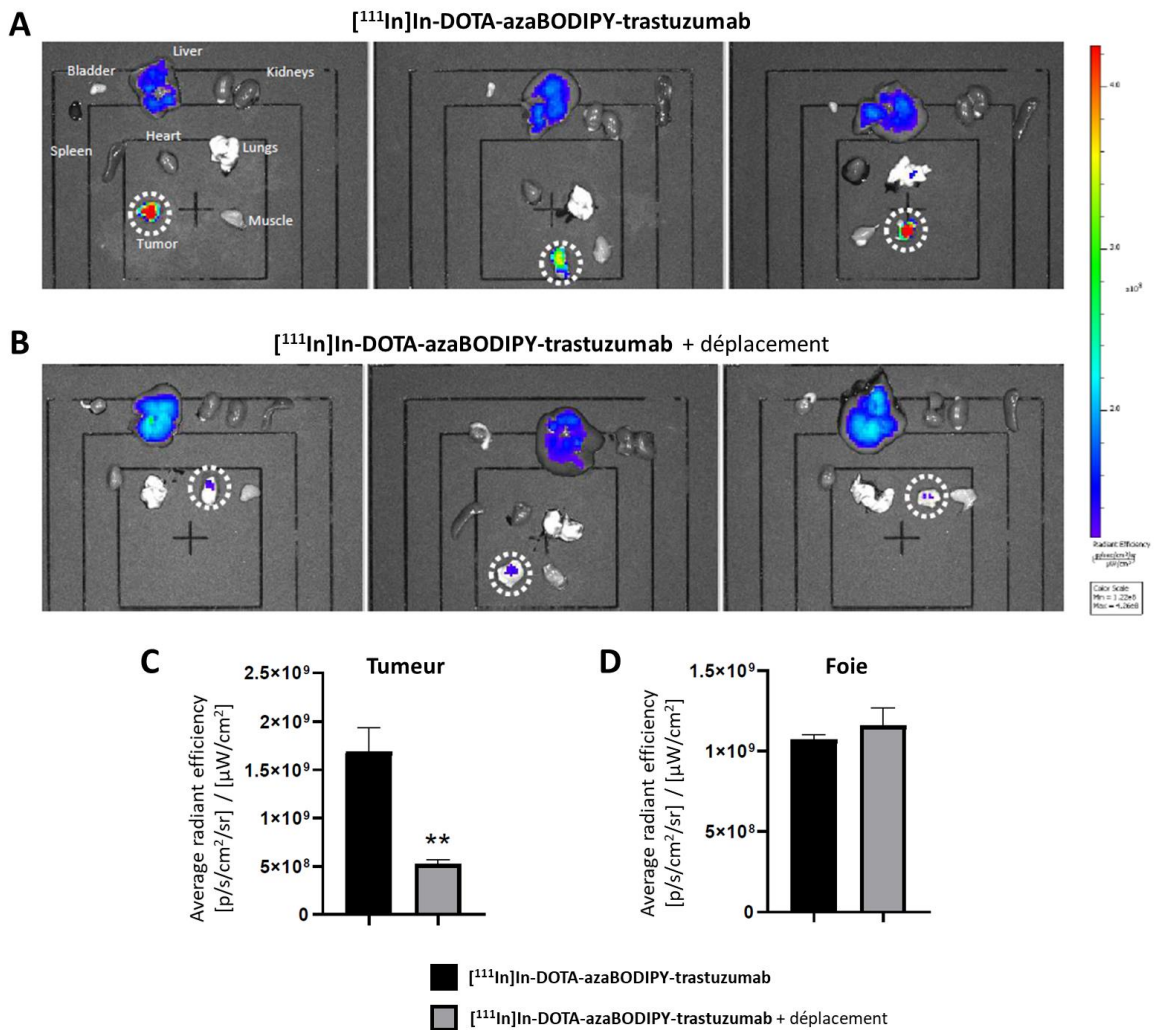
#### Imagerie optique

Une accumulation spécifique dans la tumeur xénotransplantée est clairement visible 72 h après l'injection intraveineuse de  $[^{111}\text{In}]\text{In-DOTA-azaBODIPY-trastuzumab}$  (**Figure 70**). On note également qu'en présence de trastuzumab libre (déplacement), une perte de signal importante est observée.



**Figure 70.** Imagerie optique (Ex 690 nm/Em 710 nm) de souris BALB/c *nude* porteuses d'une tumeur sous-cutanée de cellules HCC1954 HER2+, 72 h après l'injection intraveineuse de 100  $\mu\text{g}$  de  $[^{111}\text{In}]\text{In-DOTA-azaBODIPY-trastuzumab}$  (gauche) ou d'un mélange de  $[^{111}\text{In}]\text{In-DOTA-azaBODIPY-trastuzumab}$  et d'anticorps non marqué en ratio 1:50 (droite). Les tumeurs sont identifiées par les pointillés rouges.

Après euthanasie des souris à la suite de l'imagerie *in vivo*, les organes sont isolés et imagés séparément (**Figure 71**). On note que lors de l'injection de  $[^{111}\text{In}]\text{In-DOTA-azaBODIPY-trastuzumab}$ , une nette accumulation spécifique a lieu dans la tumeur, comme cela avait été observé sur les images optiques *in vivo*. Une accumulation non spécifique est observée dans le foie. Lorsque les récepteurs HER2 sont saturés par la présence de trastuzumab non conjugué, le marquage de la tumeur est nettement moins important. Le foie présente alors une accumulation accrue. Ces résultats montrent la spécificité du bioconjugué pour HER2 et l'intérêt de l'utiliser dans le cas de cancers surexprimant HER2.

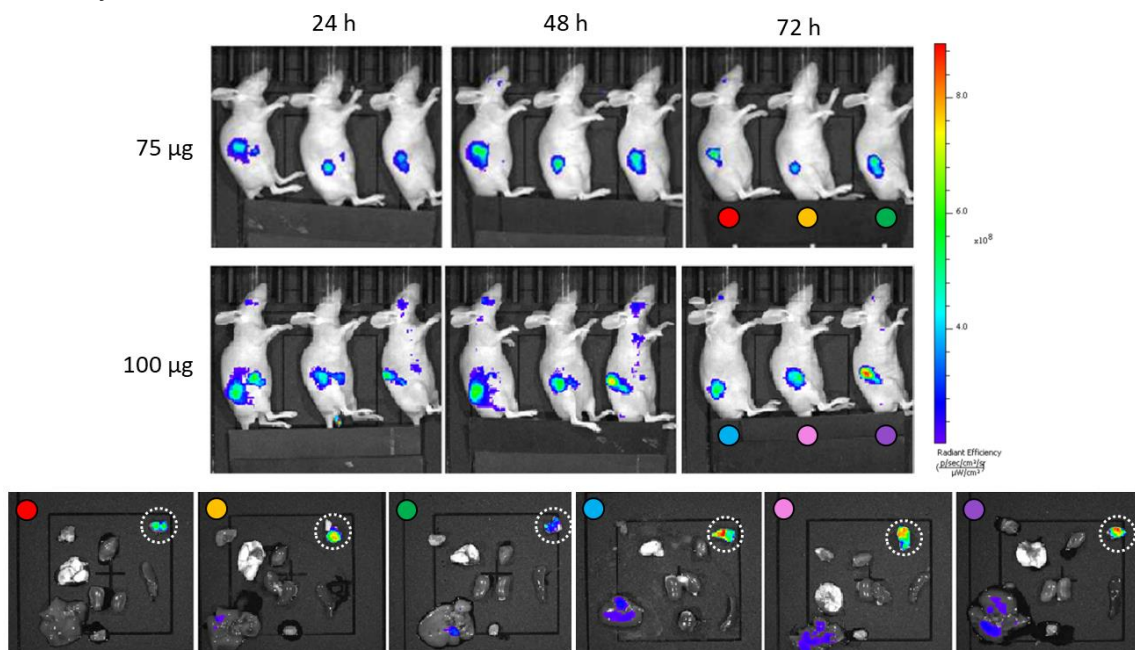


**Figure 71.** Imagerie optique *ex vivo* des organes (triplicats) pour  $[^{111}\text{In}]\text{In-DOTA-azaBODIPY-trastuzumab}$  (A) et pour  $[^{111}\text{In}]\text{In-DOTA-azaBODIPY-trastuzumab}$  en présence d'anticorps non marqué en ratio 1:50 (B). Les tumeurs sont identifiées par les pointillés blancs. C : Comparaison du signal moyen reçu dans la tumeur en présence ou non d'anticorps non marqué. D : Comparaison du signal moyen reçu dans le foie en présence ou non d'anticorps non marqué.

### 3.10 Application en chirurgie assistée par fluorescence (FGS)

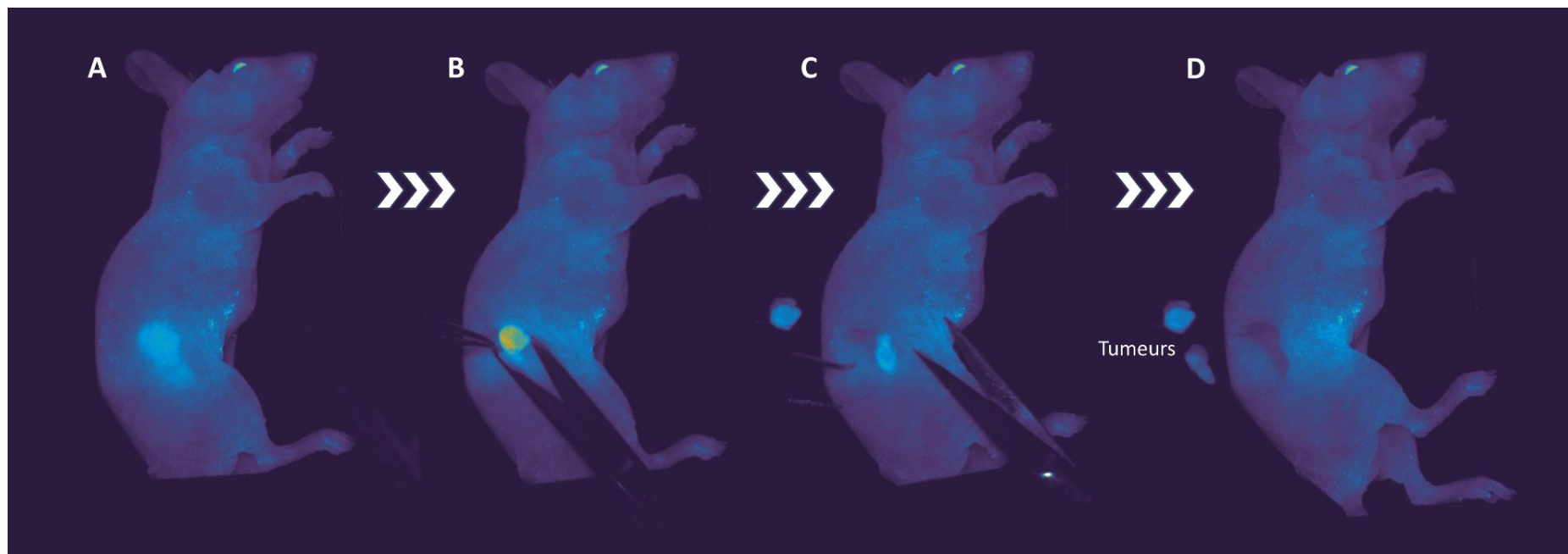
Comme cela a pu être abordé précédemment, l'un des objectifs d'une sonde bimodale optique/radioisotopique est de réaliser en amont le diagnostic *via* imagerie TEP ou TEMP afin de déterminer précisément l'emplacement de la tumeur. Par la suite, la chirurgie peut alors avoir lieu en bénéficiant de l'assistance de l'imagerie optique proche infrarouge.

Afin de valider le rôle potentiel en tant que sonde bimodale pour l'imagerie et la chirurgie, nous avons également évalué l'efficacité de cette sonde en chirurgie. Pour cela, un appareil portatif dédié à la chirurgie clinique assistée par fluorescence nous a été prêté par la société Kaer Labs. Pour la réalisation de cette expérience, l'installation présentait un filtre *KIS 700 High pass* (Ex 640 nm/Em > 665 nm). Six souris présentant des tumeurs sous-cutanées ont été opérées sous cette lampe après euthanasie. Trois de ces souris ont été injectées avec 75 µg de [<sup>111</sup>In]In-DOTA-azaBODIPY-trastuzumab chacune, l'autre moitié ayant été injectée avec 100 µg du même composé chacune (**Figure 72**). Afin de minimiser les signaux parasites pouvant provenir de restes de nourriture fluorescents présents dans les intestins, certaines des souris testées en FGS ont été opérées à jeun.



**Figure 72.** Imagerie optique (Ex 690 nm/Em 710 nm) de souris BALB/c *nude* porteuses d'une tumeur sous-cutanée de cellules HCC1954 HER2+, 24, 48 et 72 h après l'injection intraveineuse de 75 µg ou de 100 µg de [<sup>111</sup>In]In-DOTA-azaBODIPY-trastuzumab. 72 h après l'injection, la tumeur a été retirée en FGS. Les images *ex vivo* font suite à la FGS. Les tumeurs sont identifiées par les pointillés blancs. Les souris identifiées par les ronds vert et violet ont été opérées à jeun. La souris identifiée par un rond vert est celle montrée dans la suite de ce manuscrit.

Pour les six souris, la FGS s'est déroulée normalement et a permis l'ablation de la tumeur dans tous les cas. Une expérience représentative est donnée ci-après (**Figure 73**). Pour cette souris, 75 µg de [<sup>111</sup>In]In-DOTA-azaBODIPY-trastuzumab ont été injectés de manière intraveineuse 72 h avant l'opération. Cette souris avait également été mise à jeûner quelques heures avant l'opération.



**Figure 73.** Chirurgie assistée par fluorescence sur souris BALB/c *nude* porteuse d'une tumeur sous-cutanée de cellules HCC1954 HER2+, 72 h après l'injection intraveineuse de 75 µg de [<sup>111</sup>In]In-DOTA-azaBODIPY-trastuzumab. (A) : avant le début de l'opération, (B) : extraction de la tumeur, (C) : découverte et ablation d'une seconde tumeur, (D) : fin de l'opération.

Nous noterons tout d'abord le signal très intense dans la tumeur lors du retrait de celle-ci (alors placée directement sous la lampe) par rapport aux tissus sains aux alentours. Cette caractéristique de la sonde permet d'apporter un très net contraste entre les tissus sains et cancéreux, apportant alors au chirurgien une aide précieuse dans la détermination des marges opératoires à appliquer.

Un signal fluorescent parasite provenant de l'abdomen de la souris est à signaler. Bien que celle-ci était à jeun, cette fluorescence est probablement due à la présence de résidus de nourriture (légèrement fluorescente aux longueurs d'ondes utilisées pour l'étude) dans les intestins.

Lors de l'opération, la tumeur a pu être retirée avec succès. De plus, grâce à l'imagerie optique, une seconde tumeur, jusque-là invisible, a pu être détectée et retirée. La force d'une technique opératoire telle que la chirurgie assistée par fluorescence est soulignée par l'exemple de cette opération, qui montre qu'un morceau de tumeur qui aurait pu être invisible en chirurgie classique a pu être retiré aisément.

## 4 Conclusions et perspectives

Dans le cadre de cette thèse, nous avons voulu démontrer l'atout majeur que peuvent représenter les azaBODIPYs pour le développement de nouvelles sondes bimodales. Notre intérêt s'est porté plus particulièrement sur l'étude d'une sonde permettant à la fois un diagnostic préopératoire par imagerie radioisotopique, menant ensuite à une assistance au chirurgien par fluorescence au bloc opératoire. Au cours de ce projet, deux potentielles sondes bimodales vectorisées sur la base d'une plateforme azaBODIPY ont été synthétisées : l'une présentant un dérivé DOTA, la seconde un dérivé NODAGA. Une méthodologie « *one-pot* » efficace a pu être mise en place pour la synthèse de ces deux composés et a permis d'obtenir en deux étapes les composés bioconjugués à partir d'un dérivé d'azaBODIPY dont la synthèse est possible à l'échelle du gramme en une dizaine de jours. De plus, ces composés se sont révélés particulièrement stables dans le temps (aucune évolution chimique n'a pu être observée après deux ans à -20 °C ou même après une semaine à 20 °C en solution) et hydrosolubles. Un point particulièrement important de cette étude est que la fonctionnalisation de la plateforme azaBODIPY n'impacte pas ses propriétés photophysiques particulièrement intéressantes pour une sonde émettant dans le NIR-I.

Notre attention s'est focalisée initialement sur le DOTA-azaBODIPY **11** pour une utilisation bimodale optique/TEMP après radiométtallation à l'indium-111. Ce composé a été vectorisé par bioconjugaison aléatoire sur un anticorps spécifique de HER2, permettant de faire la preuve de concept par la réalisation d'une étude biologique complète. Les premiers tests *in vitro* ont montré un excellent comportement du bioconjugué. Aucune perte d'affinité significative pour le récepteur HER2 n'est à déplorer et le bioconjugué reste stable après 48 h dans le sérum. À la suite de ces tests, nous avons pu radiométtaller le composé à l'aide d'indium-111, ce qui nous a conduit à la réalisation d'une étude d'imagerie *in vivo*. Nous avons pu observer une excellente correspondance entre le signal optique et la TEMP, mais également une bonne spécificité de la sonde pour la tumeur, mise en valeur par un test de déplacement. De plus, aucun signe de toxicité n'est décelé *in vivo* et les souris semblent bien supporter l'imagerie, même après 72 h.

Toute l'efficacité de cette nouvelle sonde bioconjuguée a été mise en valeur par le succès de la chirurgie assistée par fluorescence sur souris. Cette opération a permis l'ablation de la tumeur dont les contours précis sont soulignés par la fluorescence de la sonde.

La suite de ces travaux concerne tout d'abord l'étude de l'impact de la bioconjugaison en *site specific* en comparaison avec la conjugaison aléatoire. Par la suite, notre équipe prévoit de changer le vecteur utilisé par la sonde bimodale, l'objectif étant d'utiliser un anticorps anti-PD-L1.

En ce qui concerne la sonde bimodale potentielle pour une imagerie optique/TEP développée dans ce projet, à savoir le NODAGA-azaBODIPY **15**, une étude biologique est également prévue. L'objectif final étant de démontrer que notre plateforme azaBODIPY multimodale peut être potentiellement utilisée comme sonde d'imagerie bimodale versatile, capable d'être utilisée en chirurgie assistée par fluorescence.



L'un des aspects ayant pu être mis en valeur au cours de cette étude est que la sonde développée n'a pas induit de signes de toxicité. Cette caractéristique est nécessaire dans le cadre du développement d'un agent d'imagerie. Un second projet sur lequel nous nous sommes focalisé dans le cadre de cette thèse est le développement de composés théranostiques sur la base de la plateforme azaBODIPY. L'objectif étant alors de combiner le diagnostic apporté par l'azaBODIPY, à l'action thérapeutique d'un complexe métallique. Les travaux relatifs à ce projet sont détaillés dans le chapitre suivant.



---

# CHAPITRE 2

## DES AZABODIPYS THÉRANOSTIQUES AUX SONDES INTELLIGENTES

---



## 1 Synthèse d'azaBODIPYs théranostiques

### 1.1 Etat de l'art

#### 1.1.1 Définition

Le concept de théranostique est apparu il y a une vingtaine d'années lorsque le terme a été proposé pour la première fois en 1998. Il a été inventé dans un but d'une communication commerciale pour la vente de *kits* proposant, d'une part, un traitement pour certains cancers du sein, mais également un test permettant d'évaluer l'efficacité du traitement.<sup>215</sup> Le test était alors réalisé indépendamment du traitement, *a posteriori* de celui-ci. Ce terme ayant été inventé dans une intention commerciale, aucune définition précise et scientifique de la notion de « théranostique » n'existait initialement, permettant une évolution de la définition originelle du concept d'agent théranostique. Il est donc utile aujourd'hui de définir au préalable ce que l'on entend par ce terme, afin d'éviter toute erreur de compréhension. En ce qui nous concerne, nous avons pris l'habitude de séparer la notion générale d'approche théranostique, de celle, plus spécifique, d'agents théranostiques, permettant ainsi de concilier la grande majorité des définitions actuelles.

Ainsi, une « approche théranostique » peut s'inscrire dans une logique de médecine personnalisée avec le développement de tests compagnons (test diagnostic préalable à un traitement permettant de sélectionner les patients pour lesquels le traitement est susceptible d'être efficace).<sup>216</sup> Cette notion de théranostique peut également concerner le développement de composés dédiés au diagnostic qui peuvent être aisément adaptés pour une utilisation thérapeutique (sonde radioisotopique pour l'imagerie pouvant être adaptée en composé thérapeutique par remplacement d'un radioélément émetteur  $\gamma$  ou  $\beta^+$  par un radionucléide émetteur  $\alpha$  ou  $\beta^-$ ).

Le concept d'agent théranostique englobe quant à lui tout composé issu du couplage entre un fragment ayant une fonction thérapeutique telle que la chimiothérapie, l'hyperthermie, la thérapie photodynamique ou encore la radiothérapie, avec un fragment permettant l'imagerie telle que l'IRM, l'imagerie radioisotopique ou optique...<sup>215</sup> Bien que le composé résultant puisse être composé de fragments pour la thérapie ou le diagnostic aux comportements *in vitro* ou *in vivo* connus, il est nécessaire de considérer l'entité théranostique résultante comme unique. Son comportement, et en particulier sa pharmacocinétique, sa biodistribution ou encore son mécanisme d'action, doit alors être étudié et déterminé. Cette stratégie permet de simplifier les études, le composé se suffisant à lui-même pour être suivi *in vitro*, *ex vivo* mais également *in vivo*.

Dans le cadre des travaux présentés dans cette thèse, nous avons décidé de nous focaliser sur la synthèse d'agents théranostiques, couplant imagerie optique et complexe théranostique, pour une application anticancéreuse. L'objectif est de s'inscrire dans une logique intégrant, dès la conception de l'agent thérapeutique, un moyen d'étudier sa pharmacocinétique et ses mécanismes d'action.

### 1.1.2 Problématique des complexes métalliques pour une utilisation anticancéreuse

L'une des limitations majeures actuelles de l'optimisation des agents thérapeutiques est la difficulté de l'étude de leur comportement (pharmacocinétique, dégradation, vectorisation...). Il n'est en effet pas possible de déterminer, entre autres, la biodistribution en temps réel d'un tel composé. Ce manque d'information induit que les procédures pour la réalisation de ces études sont alors souvent complexes et nécessitent plusieurs expériences impliquant le sacrifice de nombreux animaux.

Il est alors difficile de déterminer avec précision les mécanismes d'action de tels composés et leur optimisation s'en retrouve affectée. Ceci est le cas des composés à visée anticancéreuse et plus particulièrement des complexes métalliques. L'utilisation de métaux dans un objectif anticancéreux a vu le jour en 1978 aux États-Unis avec l'autorisation d'utilisation par la FDA du cisplatine pour la lutte contre les cancers testiculaires et ovariens (**Figure 74**).<sup>217</sup> Bien que la

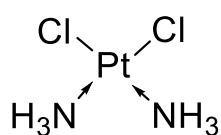


Figure 74. Structure du cisplatine.

majorité d'entre eux n'a pas eu d'autorisation de mise sur le marché, un large panel d'anticancéreux métalliques ont depuis vu le jour, à base de platine mais également d'or, de ruthénium ou encore d'iridium pour ne citer que ceux-là.<sup>218</sup> Cependant, dans de nombreux cas, les mécanismes d'action, la pharmacocinétique ou encore la biodistribution de ces agents anticancéreux ne sont pas connus précisément.

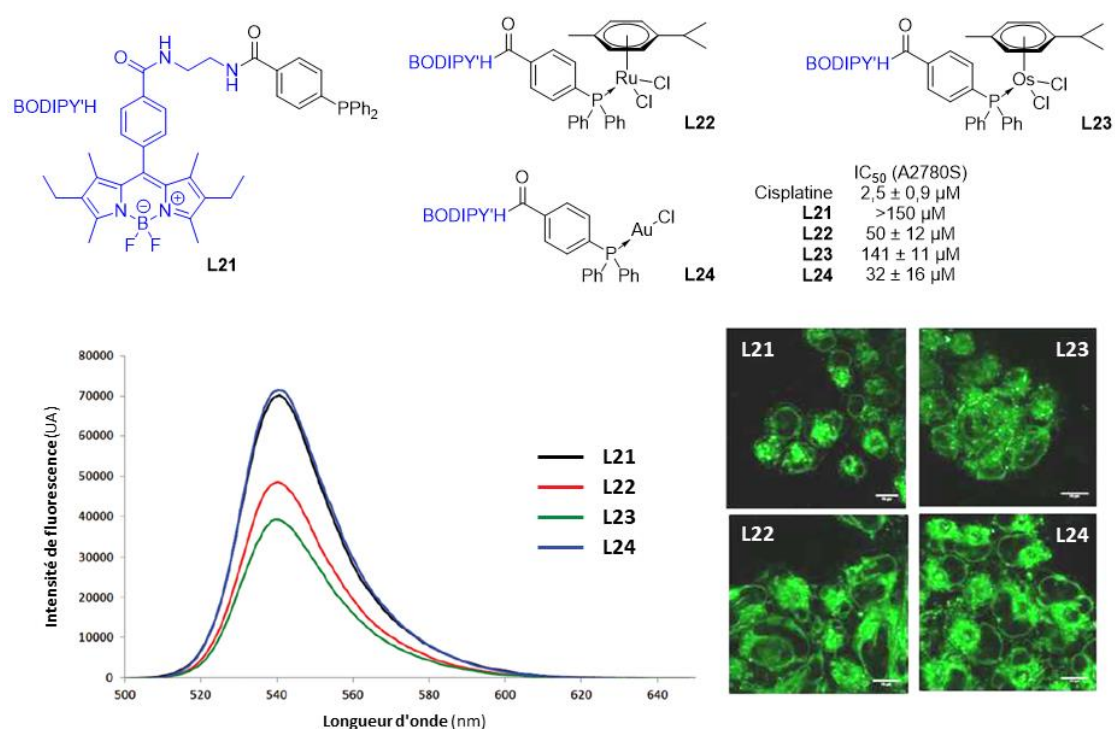
Plusieurs investigations réalisées au cours des dernières années ont montré qu'il n'existe pas un unique mécanisme d'action pour les anticancéreux métalliques. Ainsi, pour les complexes de platine, bien que le mécanisme d'action le plus communément admis est l'apoptose (mort cellulaire programmée),<sup>219,220</sup> d'autres études ont souligné que la mort cellulaire peut être induite par d'autres mécanismes (tel que la paraptose).<sup>221</sup> Pour les complexes d'or(I), les cibles les plus régulièrement investiguées sont les thiorédoxines réductases (TrxRs, enzymes indispensables à la croissance cellulaire).<sup>222,223</sup> Cependant, de plus en plus d'études telles que celle publiée par notre laboratoire en 2014 montrent que pour de nombreux complexes d'or il n'y a pas de corrélation évidente entre inhibition des TrxRs dans les mitochondries et activité anticancéreuse.<sup>224,225</sup>

Ainsi, il apparaît que les mécanismes d'action des anticancéreux métalliques peuvent être multiples et varier d'un composé à l'autre. Cela est également vrai pour la biodistribution et pharmacocinétique, qui sont quant à elles extrêmement dépendantes de la nature même du composé. Afin d'être en mesure de caractériser plus précisément et de comprendre l'action d'un nouveau composé thérapeutique, il devient alors nécessaire de développer des composés pouvant être suivis *in vitro* et *in vivo*. C'est ainsi que l'introduction d'une modalité d'imagerie par fluorescence apparaît comme un véritable atout pour éclairer les zones d'ombre du devenir *in vitro* et *in vivo* des nouveaux composés anticancéreux. Un intérêt particulier a alors été porté sur l'utilisation de fluorophores présentant des propriétés optiques intéressantes (telle qu'une émission dans le NIR), une bonne stabilité et une versatilité permettant leur greffage à un complexe sans entraver leur fluorescence. Les BODIPYs remplissant tous ces critères, ils ont été régulièrement étudiés pour le développement de nouveaux théranostiques.

### 1.1.3 Des BODIPYs théranostiques...

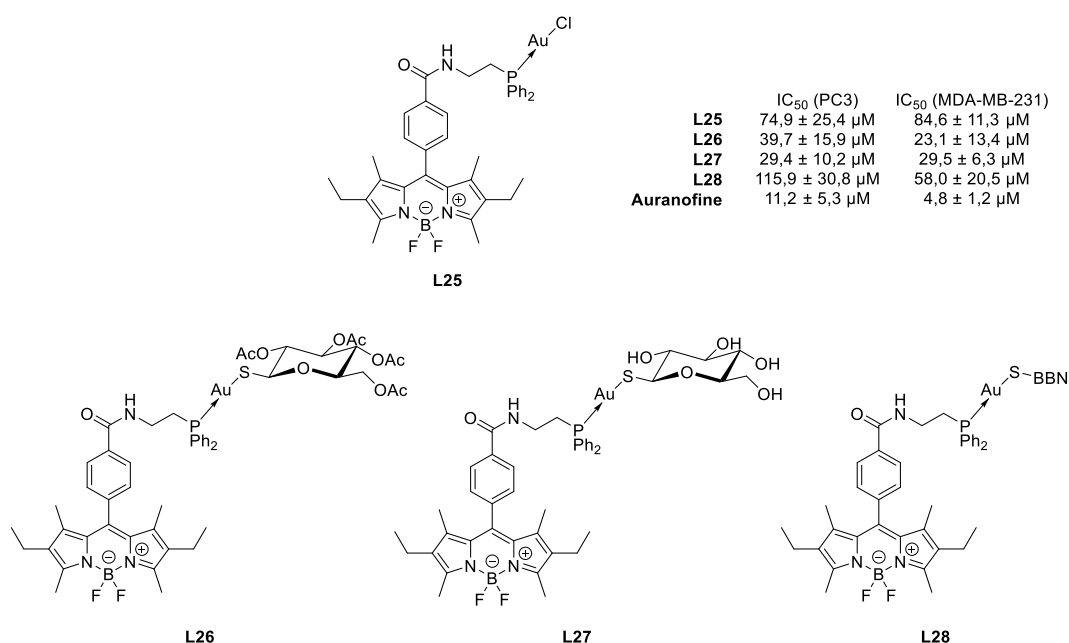
En 2013, notre laboratoire a publié le premier exemple de BODIPY théranostique. Ces travaux montrent le potentiel de complexes de ruthénium(II), d'osmium(II) et d'or(I) couplés à un BODIPY (**Figure 75**).<sup>226</sup> Les composés présentent une activité antiproliférative modérée sur la lignée A2780S (cellules humaines de cancer ovarien) avec des valeurs d'IC<sub>50</sub> comprises entre 30 et 150 µM (on rappelle que l'IC<sub>50</sub> correspond, dans ce cas, à la concentration de produit nécessaire pour inhiber 50 % de la prolifération d'une population de cellules en 48 h, une valeur faible étant donc synonyme de forte activité). Les atomes de ruthénium et d'osmium impactent cependant significativement la fluorescence (chute de l'intensité de fluorescence d'un rapport de 1,4 et 1,8 respectivement par rapport à **L21**) mais, malgré cela, les propriétés optiques du fluorophore restent suffisantes pour visualiser le composé dans les cellules. L'atome d'or, quant à lui, n'a pas d'effet significatif sur la fluorescence du BODIPY. On notera également que la stabilité de la liaison P-Au a été vérifiée en milieu de culture cellulaire (RPMI 1640 + 10 % *fetal calf serum*) à 37 °C au cours de cette étude. Ainsi, il a été montré qu'après plusieurs jours, très peu de dégradation a pu être observée. Sur la lignée A2780S, des études de microscopie confocale ont montré une entrée du composé dans le cytoplasme avec une accumulation préférentielle dans les membranes cellulaires (externe et nucléaire).

Le mode de transport du théranostique dans les cellules semble être passif et indépendant de la présence ou non du complexe, l'accumulation des composés **L21** à **L24** se faisant de manière similaire dans les membranes biologiques. Ainsi, le comportement *in vitro* des complexes semble être principalement influencé par le groupement BODIPY.



**Figure 75.** Premiers BODIPYs complexes métalliques à visée théranostique, valeurs d'IC<sub>50</sub> (lignée A2780S à 72 h d'incubation à 37 °C), spectres d'émission (DMSO à 298 K) et imagerie confocale (lignée A2780S incubée 2 h à 37 °C en présence de **L21**, **L22**, **L23** et **L24** (10 et 20 µM)). Adapté de Tasan *et al.*<sup>226</sup>

Le mécanisme d'action des complexes d'or n'est pas encore établi et il est même probable qu'il existe plusieurs voies d'action potentielles pour ces complexes. Afin de faciliter l'identification des mécanismes d'action mais également de la pharmacocinétique et de la biodistribution de ces complexes, le développement de théranostiques incorporant un dérivé d'or est une solution séduisante et prometteuse. En 2015, notre laboratoire s'est focalisé sur cette question en développant de nouveaux théranostiques BODIPY complexes d'or(I), suite aux résultats encourageants qui avaient été obtenus avec le dérivé **L24** décrit précédemment. Dans cette étude, trois dérivés, **L26**, **L27** et **L28**, ont été obtenus à partir du BODIPY **L25** (**Figure 76**).<sup>227</sup> L'intérêt majeur de cette nouvelle génération de complexes d'or est l'introduction de biovecteurs, pouvant augmenter la sélectivité du complexe, en ciblant les transporteurs du glucose (pour **L26** et **L27**) ou par le biais de récepteurs à bombésine (pour **L28**).

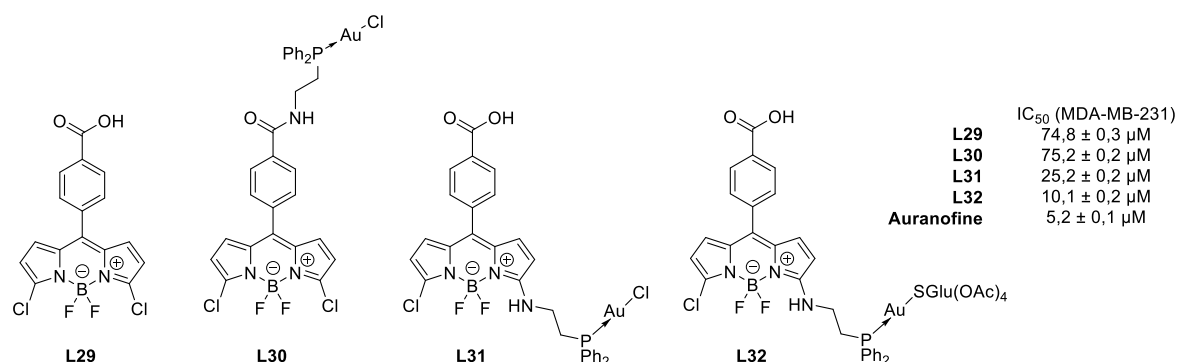


**Figure 76.** Développement de théranostiques biovectorisés BODIPY complexes d'or(I) et IC<sub>50</sub> (lignées PC3 et MDA-MB-231 à 48 h d'incubation). Composés **L26** et **L27** basés sur le modèle de l'auranofine. Pour **L28**, BBN = dérivé de bombésine.

L'évaluation de la cytotoxicité de ces composés sur lignées cellulaires cancéreuses humaines PC3 (prostate) et MDA-MB-231 (mammaire) a montré une activité des dérivés de glucose **L26** et **L27** deux à trois fois plus faible à celle de l'auranofine (complexe d'or utilisé en clinique contre la polyarthrite rhumatoïde) pour la lignée PC3 et cinq à six fois plus faible pour la lignées MDA-MB-231. Nous remarquerons tout particulièrement que dans le cas d'une vectorisation par le glucose des dérivés **L26** et **L27**, les composés présentent une cytotoxicité 2 à 4 fois supérieures à celles du le dérivé non vectorisé **L25** sur lignées PC3 et MDA-MB-231. De plus, la quantité d'or internalisée à 4 °C, température à laquelle les transports actifs ne se produisent plus, est signalée comme étant bien inférieure à celle à 37 °C. L'hypothèse selon laquelle ces théranostiques sont internalisés en partie *via* un transport actif ou facilité semble alors probable.

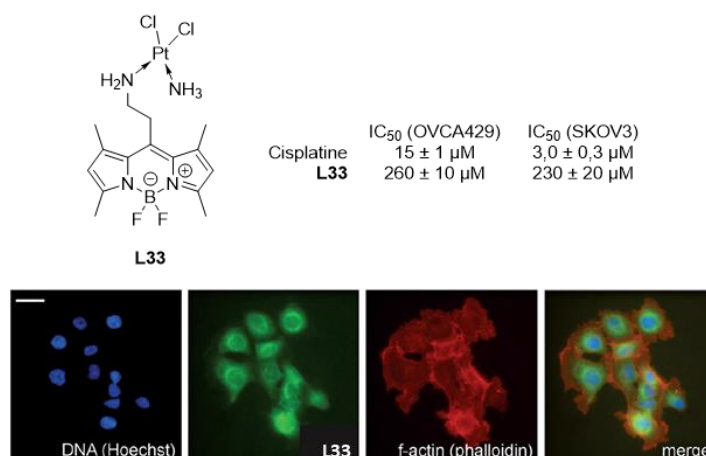


L'importance et le rôle que peut avoir la présence d'un biovecteur sur de telles molécules a ainsi pu être mis en valeur lors de cette étude. C'est donc dans cette logique et suite aux résultats encourageants obtenus avec les BODIPYs porteurs d'or(I) vectorisés que notre équipe s'est focalisée sur la synthèse d'une plateforme BODIPY, permettant à la fois l'introduction de complexes d'or(I), vecteurs et groupements hydrosolubilisants en diverses positions sur le cœur BODIPY (**Figure 77**).<sup>228</sup> Cette approche plateforme a permis l'obtention d'une vingtaine de théranostiques potentiels. L'introduction de la phosphine-or en position  $\alpha$ -pyrrolique du cœur BODIPY impacte fortement la cytotoxicité sur la lignée MDA-MB-231. Cette toxicité est encore accrue par substitution du chlorure porté par l'or par un dérivé de glucose, donnant ainsi une  $IC_{50}$  seulement deux fois supérieure pour **L30** à celle de l'auranofine. En revanche, l'introduction de la phosphine-or sur la position méso ne mène pas à une cytotoxicité supérieure du composé **L31**. Cette étude démontre à la fois l'importance de la position où est introduit le complexe, mais également de la vectorisation par le glucose, qui joue un rôle non négligeable dans l'internalisation et donc l'activité du théranostique.



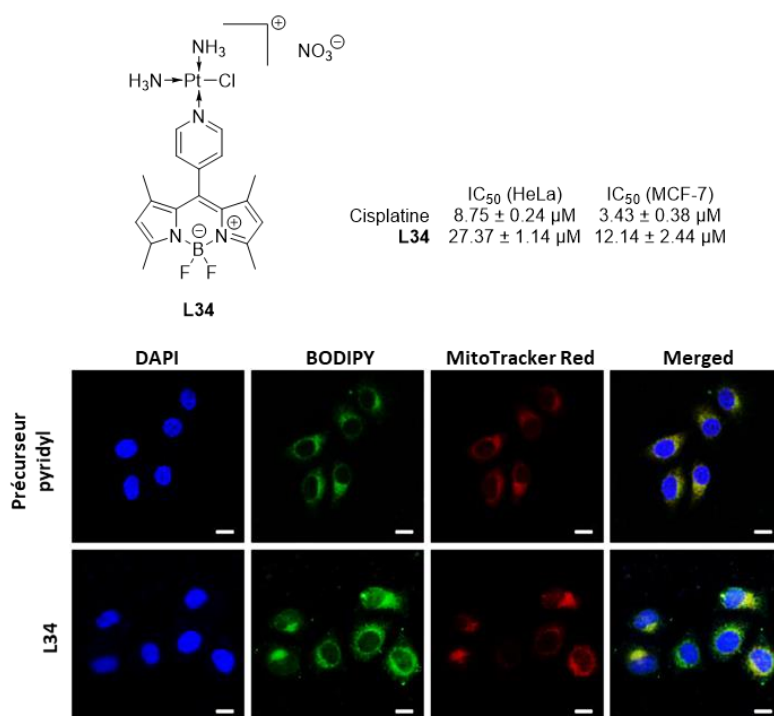
**Figure 77.** Exemple de trois dérivés BODIPYs porteurs d'or(I) obtenus à partir de la plateforme multimodale **L29**. Valeurs d' $IC_{50}$  données après 48 h d'incubation à 37 °C.

À la suite de la preuve de la faisabilité d'un théranostique type BODIPY par Tasan *et al.*, diverses équipes de recherche se sont focalisées sur le couplage entre fluorophores organiques type BODIPY et certains anticancéreux métalliques connus. Le groupe de Weissleder (2014) s'est d'abord intéressé à la synthèse d'un analogue du cisplatine (complexe de platine utilisé en clinique pour le traitement de certains cancers) (**Figure 78**)<sup>229</sup>. Ce premier théranostique BODIPY porteur d'un atome de platine(II) ne présente pas de cytotoxicité significative ( $IC_{50} > 200 \mu\text{M}$ ) pour les lignées cellulaires étudiées, à savoir OVCA429 et SKOV3 (lignées humaines de cancer ovarien). Une étude par imagerie confocale a révélé l'internalisation de **L33** dans les cellules cancéreuses OVCA429 et son accumulation dans le cytoplasme proche du noyau. L'absence de cytotoxicité pourrait s'expliquer par l'impact de la présence proche du fluorophore sur le dérivé de cisplatine, qui pourrait alors empêcher la formation du dérivé aqua du complexe, étape nécessaire à la cytotoxicité du cisplatine. Une autre hypothèse est que la présence du BODIPY perturbe la distribution de la molécule dans la cellule, diminuant son potentiel cytotoxique. Cette première étape vers la synthèse d'un BODIPY-platine théranostique montre toute la difficulté inhérente à la création de tels systèmes et le *challenge* qui réside dans le fait d'accrocher une sonde fluorescente volumineuse à un complexe.



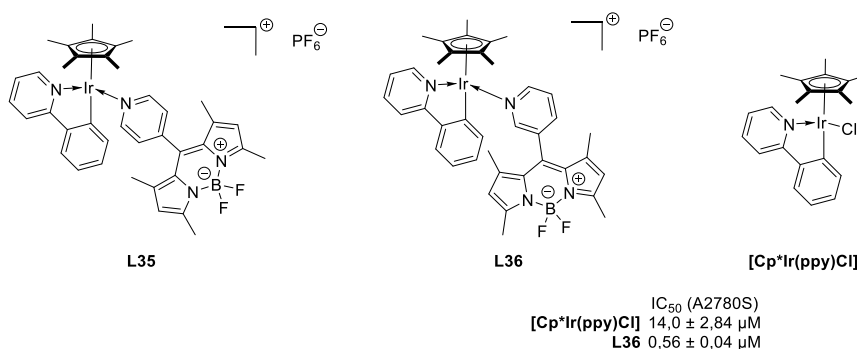
**Figure 78.** Premier dérivé BODIPY porteur d'un atome de platine(II) et valeurs d'IC<sub>50</sub> (lignées OVCA429 et SKOV3 à 48 h d'incubation). Microscopie confocale : cellules OVCA429 incubées 1 h à 37 °C en présence de 50 μM du composé **L33**. Les images fusionnées (*merge*) montrent la présence du BODIPY à proximité des noyaux. Le colorant Hoechst (bleu) positionne le noyau des cellules. Adapté de Miller *et al.*<sup>229</sup>

Dans le cas du composé **L34**, issu des travaux de Sun *et al.*, une cytotoxicité inférieure d'un rapport 3 à 3,5 par rapport au cisplatine est à mentionner, ce qui dénote toutefois une activité cytotoxique du composé **L34** sur les lignées cancéreuses étudiées (HeLa et MCF-7, lignées humaines respectivement de cancer du col de l'utérus et mammaire).<sup>230</sup> L'utilisation de MitoTracker Red, marquant préférentiellement les mitochondries, a permis de souligner la colocalisation de ce traceur et du composé **L34**, prouvant l'accumulation de ce dernier au sein des mitochondries (**Figure 79**).



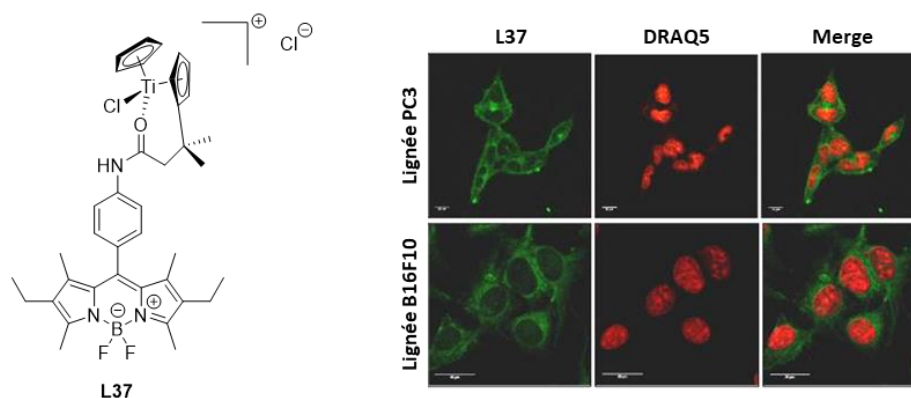
**Figure 79.** Théranostique BODIPY-platine(II) développé par Xie et valeurs d'IC<sub>50</sub> (lignées HeLa et MCF-7 à 48 h d'incubation). Microscopie confocale : cellules HeLa incubées 2 h à 37 °C en présence de 5 μM du précurseur non métallé ou de **L34**. Les images fusionnées (*merged*) montrent la colocalisation (jaune) du BODIPY et du MitoTracker Red. Le DAPI (bleu) positionne le noyau des cellules. Adapté de Sun *et al.*<sup>230</sup>

De manière similaire aux dérivés de platine, plusieurs complexes d'iridium(III) BODIPY pyridyl ont été développés (**Figure 80**).<sup>231,232</sup> L'équipe de Salmain a montré que l'introduction du complexe d'iridium sur le fluorophore pour donner **L35** et **L36** abaisse le rendement quantique d'un rapport 2 à 3 (de 54 à 29 % pour le 3-pyridyl et de 46 à 14 % pour le 4-pyridyl dans le méthanol), mais la fluorescence restait suffisante pour permettre la réalisation d'une imagerie optique. L'activité cytotoxique, évaluée uniquement pour le complexe **L36**, a été réalisée sur cellules A2780S et a souligné des valeurs d'IC<sub>50</sub> submicromolaires (0,56 µM), meilleures que celles du complexe seul [Cp\*Ir(ppy)Cl] (14,0 µM), sur lignée cancéreuse A2780S. Cette étude manque cependant d'une comparaison avec un composé de référence tel le cisplatine. Malgré la charge du complexe, il est supposé que la haute lipophilie du BODIPY (log P = 3,66) entraîne une meilleure internalisation cellulaire du complexe en comparaison aux dérivés type [Cp\*Ir(ppy)Cl] développés par Sadler.<sup>233</sup>



**Figure 80.** Complexes d'iridium(III) développés par l'équipe de Salmain et valeurs d'IC<sub>50</sub> pour **L36** et le complexe libre (lignées A2780S et A2780cisR à 72 h d'incubation).

Les titanocènes ont, quant à eux, été étudiés pour leurs propriétés anticancéreuses dès la fin des années 70, lorsque Köpf-Maier a décrit la synthèse et l'utilisation du dichlorure de titanocène.<sup>234</sup> C'est en 1980 que la même équipe a proposé un mécanisme pour l'action anticancéreuse de ce composé, supposant une action directe du dichlorure de titanocène sur l'ADN et l'ARN.<sup>235</sup> Cependant, de plus récentes études tendent à montrer qu'il n'y a pas de coordination directe entre les complexes de Ti(IV) et l'ADN, remettant l'hypothèse initiale de Köpf-Maier en question.<sup>236</sup> C'est donc dans l'optique de mettre en lumière les mécanismes d'action de ces complexes que des théranostiques dont un BODIPY-titanocène ont été développés au sein de notre équipe, dans le cadre de la thèse du Dr Trommenschlager (**Figure 81**).<sup>237</sup> La microscopie confocale permet de montrer que l'accumulation de **L37** a lieu au sein du cytoplasme et non du noyau, montrant ici que l'activité de ce dérivé de titane ne semble pas impliquer d'interaction avec l'ADN nucléaire.

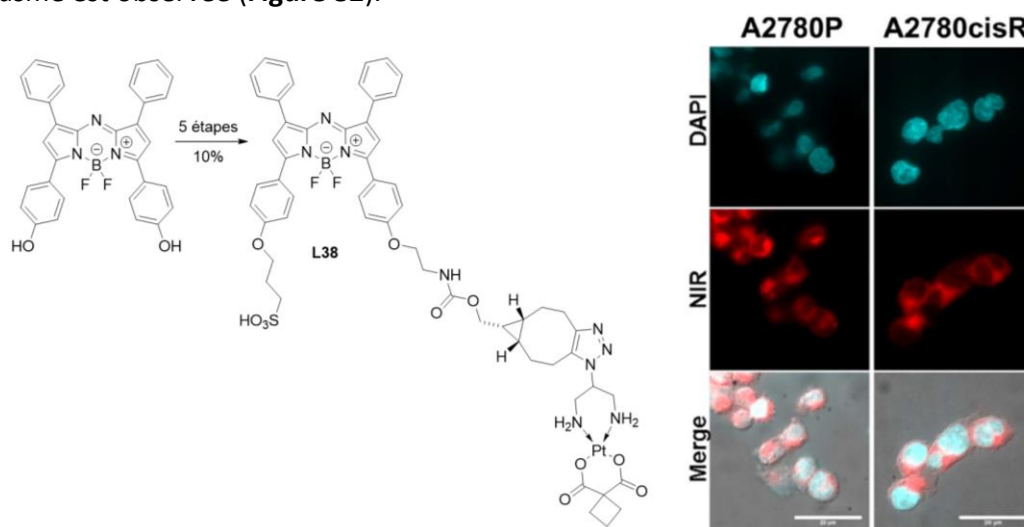


**Figure 81.** Premier théranostique BODIPY porteur d'un titanocène **L37** développé par Florès *et al.* et imagerie confocale sur deux lignées cellulaires (1  $\mu$ M, incubation 4 h à 37 °C), noyaux marqués en rouge par DRAQ5 (marqueur d'ADN). Adapté de Florès *et al.*<sup>237</sup>

Cependant, l'utilisation de BODIPYs pour le développement de théranostiques et leur utilisation *in vivo* en imagerie optique est limitée par leur émission dans la partie visible du spectre. Comme indiqué précédemment, afin d'augmenter la profondeur d'exploration par imagerie optique, le passage à une émission dans le NIR est recommandée. C'est ainsi que nous avons choisi de nous tourner vers les homologues azotés des BODIPYs, les azaBODIPYs.

#### 1.1.4 ... aux azaBODIPYs thérapeutiques

Très peu de travaux ont à ce jour été réalisés concernant le développement de théranostiques à base d'azaBODIPY. Les travaux de l'équipe d'O'Shea publiés en 2018 sont les premiers et, à ce jour, les seuls, à aborder la synthèse d'un azaBODIPY porteur d'un centre métallique pour tenter de concevoir un agent théranostique optique.<sup>238</sup> Cet azaBODIPY, porteur d'un complexe de type carboplatine n'a malheureusement présenté aucune toxicité significative pour les deux lignées étudiées, à savoir A2780P (lignée cancéreuse ovarienne humaine) et A2780cisR (lignée résistante au cisplatine). En revanche, une internalisation cellulaire et une accumulation uniforme au sein du cytoplasme est observée (**Figure 82**).



**Figure 82.** Synthèse d'un azaBODIPY porteur d'un complexe de platine **L38** développée par Kitteringham *et al.* et imagerie confocale de **L38** sur lignées cellulaires A2780P et A2780cisR (5  $\mu$ M, incubation 2 h à 37 °C). Les noyaux cellulaires sont co-marqués par le DAPI (bleu). Extrait de Kitteringham *et al.*<sup>238</sup>

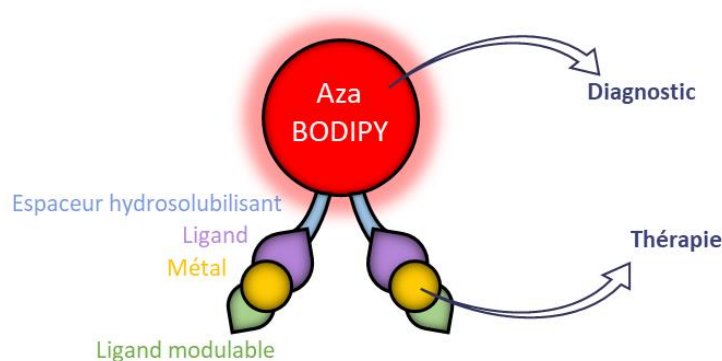
Afin de limiter le manque d'hydrosolubilité du complexe, un groupement hydrosolubilisant a été introduit en position para du phényle en position 3 du cœur azaBODIPY. L'apport du groupement sulfonate en cette position ne semble cependant pas suffisant pour permettre une solubilisation en milieu aqueux sans adjuvant, les mesures photophysiques ayant été réalisées dans l'eau en présence de 1 % de tensioactif SDS (dodécylsulfate de sodium).

## 1.2 But du projet

Depuis une dizaine d'années, des équipes de recherche, dont la nôtre, se sont intéressées à la synthèse de théranostiques, permettant ainsi de développer de nouveaux composés actifs traçables. L'utilisation de BODIPYs a montré que cette famille de fluorophores, de par leurs propriétés optiques et leur stabilité, est adaptée pour une utilisation théranostique. Cependant, leur émission étant limitée au domaine du visible, leur utilisation est restreinte à des applications *in vitro* ou *ex vivo*.

Les azaBODIPYs, quant à eux, peuvent émettre à des longueurs d'onde situées dans la fenêtre de transparence optique, tout en présentant une excellente stabilité chimique et photochimique. Les recherches portant sur le suivi de complexes métalliques à visée thérapeutique par des BODIPYs a été initié en 2013 au sein de notre laboratoire. Au début des travaux de thèse présentés dans ce manuscrit, aucun travail n'avait décrit l'utilisation d'azaBODIPYs théranostiques permettant une utilisation *in vivo*. Ce n'est qu'en 2018 que les premiers et, à notre connaissance, les seuls travaux décrivant ce type d'objet ont été publiés. Il est à noter que cette étude n'a pas abouti à l'obtention de théranostiques, les composés ne présentant pas d'activité cytotoxique significative.

Les travaux présentés dans cette partie se focaliseront sur la synthèse et l'étude biologique des « premiers » théranostiques optiques associant azaBODIPYs et complexes métalliques. Pour cela, la plateforme fluorescente WazaBY développée par notre équipe sera utilisée. Nous y grefferons des complexes d'or(I) par fonctionnalisation de l'atome de bore (**Figure 83**). En premier lieu, l'objectif sera de prouver qu'il est possible de concevoir ce type d'objets tout en conservant l'activité biologique et les propriétés de fluorescence. En fin de partie, la faisabilité d'une version vectorisée sera étudiée.



**Figure 83.** Objectif pour la synthèse d'azaBODIPYs théranostiques.

## 1.3 Première génération d'azaBODIPYs théranostiques

### 1.3.1 Molécules visées et stratégie de synthèse

À ce jour, l'unique tentative visant au développement d'un azaBODIPY théranostique n'a pas été fructueuse, le composé obtenu n'étant pas cytotoxique.<sup>238</sup> Tout comme cela a été souligné précédemment, l'impact de la sonde, en l'occurrence ici l'azaBODIPY, peut être préjudiciable pour l'activité de l'agent thérapeutique, pouvant aller jusqu'à inactiver ce dernier. Nous supposons que les travaux publiés ainsi par l'équipe d'O'Shea en 2018 avaient pour objectif initial l'obtention d'une sonde théranostique. Les résultats obtenus démontrent cependant que le couplage du fluorophore au complexe induit une chute de l'activité antiproliférative par rapport au complexe seul. Une explication possible est qu'il est généralement admis que les complexes de platine nécessitent une pénétration dans le noyau cellulaire pour atteindre leur cible.<sup>219,220</sup> Or, nous avons pu observer que les dérivés de BODIPYs et d'azaBODIPYs ont généralement tendance à s'accumuler dans les membranes cellulaires et/ou le cytoplasme. Ainsi, il est peu surprenant que l'activité du complexe de platine obtenu ait chuté.

Le point crucial de la synthèse d'azaBODIPYs théranostiques est l'introduction d'un complexe métallique cytotoxique sur la sonde fluorescente, dont les caractéristiques photophysiques ne doivent pas être impactées et pour lequel la solubilité, le  $\pi$ -stacking ou la stabilité ne doivent pas être une contrainte à leur utilisation *in vitro* et *in vivo*.

Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, la plateforme azaBODIPY bis-acide, hydrosoluble, s'est révélée être une plateforme de choix pour l'introduction de groupements d'intérêt n'impactant pas les propriétés photophysiques du fluorophore. Ainsi, notre choix s'est orienté vers cette plateforme pour le développement de nouveaux azaBODIPYs théranostiques.

En ce qui concerne le choix du complexe à introduire, nous avons décidé de nous focaliser sur l'utilisation de complexes phosphine-or. En effet, notre équipe a montré à de nombreuses reprises qu'ils étaient compatibles avec la synthèse de théranostiques optiques par greffage sur différents fluorophores : BODIPYs,<sup>228</sup> coumarines,<sup>239</sup> porphyrines<sup>240</sup> ou trisbipyridine ruthénium.<sup>241</sup> En effet, les complexes d'or(I) ne semblent pas affecter l'émission de fluorescence des sondes, leur activité reste significative dans la plupart des cas et nous avons montré que la liaison P-Au pouvait être stable plusieurs jours *in vitro* et *in vivo*. Autre point intéressant, dans nos précédentes études, nous avons vu que ces complexes pouvaient être actifs qu'ils soient dans le cytoplasme ou les membranes cellulaires, lieu d'accumulation probables de nos futurs théranostiques.

Pour cette première génération d'azaBODIPYs théranostiques, deux phosphines-or seront introduites, une sur chaque fonction acide, menant ainsi à un complexe homobimétallique symétrique (**Figure 84**). L'intérêt de l'introduction de deux complexes est que nous pouvons espérer un effet cytotoxique accru par rapport à un composé ne présentant qu'un seul complexe. Cette stratégie nous permet également de simplifier dans un premier temps la synthèse par rapport à une molécule dissymétrique ne présentant qu'un seul complexe. Nous avons également

voulu changer la nature du ligand porté par l'atome d'or afin d'étudier l'impact de la charge sur le comportement du composé, notamment sur sa cible et/ou son internalisation. Ces groupements ont également pour but d'améliorer la solubilité dans l'eau de ces composés. En effet, même si la fonctionnalisation de l'atome de bore des azaBODIPYs par des groupements alcyne-ammonium, mise au point lors de la thèse du Dr Pliquet, a permis de limiter grandement les phénomènes d'agrégation et d'améliorer significativement la solubilité dans l'eau ou les milieux biologiques des azaBODIPYs, l'introduction de complexes d'or aura un effet inverse.

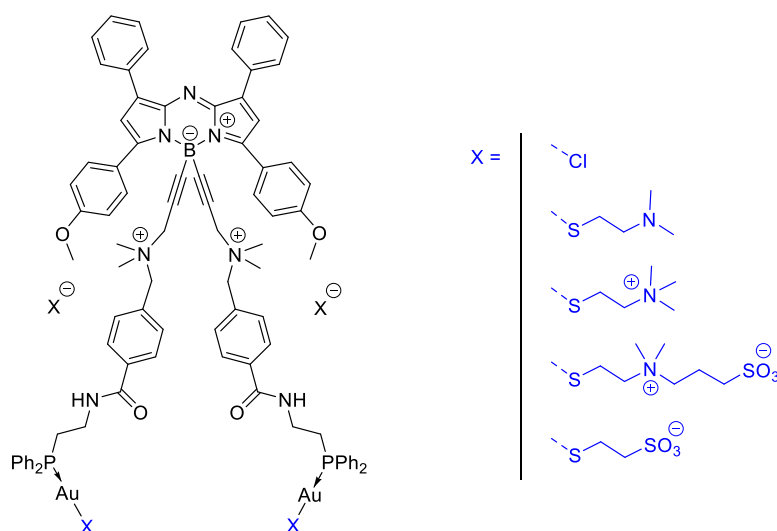


Figure 84. Ligands envisagés pour la synthèse de nouveaux azaBODIPYs-or théranostiques.

### 1.3.2 Synthèse du premier composé azaBODIPY-or

Le composé de départ pour la synthèse des théranostiques est la plateforme bis-acide **6** déjà présentée lors du chapitre précédent. La présence de groupements acides sur les bras pendants de cet azaBODIPY nous a permis d'y introduire par couplage peptidique une amine afin de former l'amide correspondant. Premièrement, le complexe **19** a été synthétisé en deux étapes, mises au point par Doulain *et al.* (Schéma 11).<sup>227</sup> Une première réaction de complexation de l'or(I) au tétrahydrothiophène (tth) nous a permis d'obtenir le complexe (tth)AuCl **18**, qui a ensuite été mis à réagir en conditions stœchiométriques avec la 2-(diphénylphosphino)éthylamine. Le complexe **19** a été isolé par simple précipitation. Cette complexation est réalisée en boîte à gants pour éviter l'oxydation de la phosphine. L'avantage de former le complexe dès le début est que l'or joue le rôle de groupement protecteur de cette phosphine très sensible.

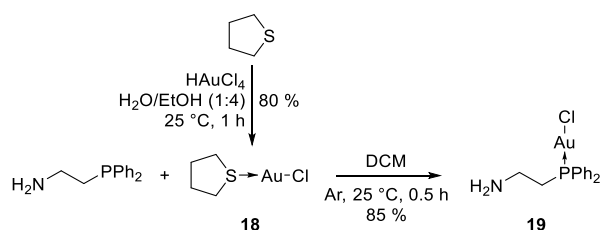
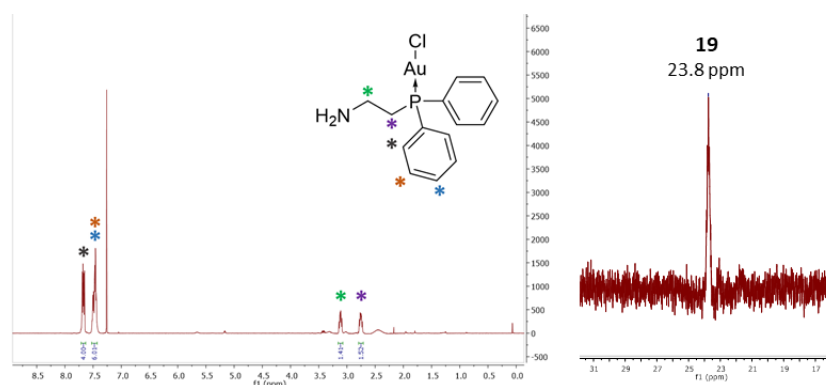


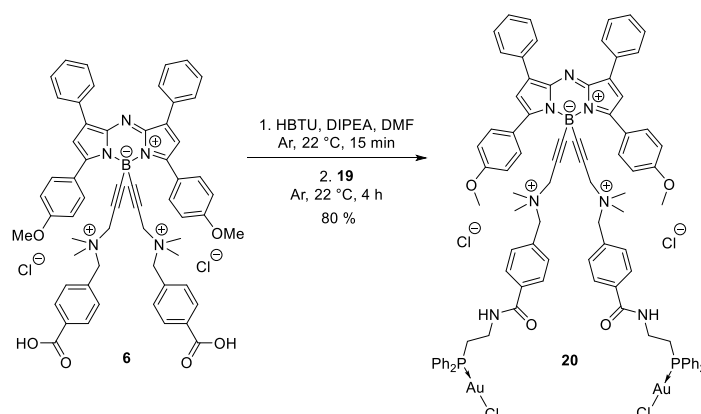
Schéma 11. Synthèse du chlorure de 2-(diphénylphosphino)éthanamide d'or(I) **19**.

Le complexe **19** a été caractérisé en RMN du proton et en RMN du phosphore (**Figure 85**). Les protons éthyliques se situent aux alentours de 3,0 ppm. Le déplacement chimique du phosphore sera une sonde particulièrement utile pour suivre la suite de la synthèse.



**Figure 85.** Spectres RMN  $^1\text{H}$  (gauche -  $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) et  $^{31}\text{P}$  (droite -  $\text{CDCl}_3$ , 202 MHz) du complexe **19**.

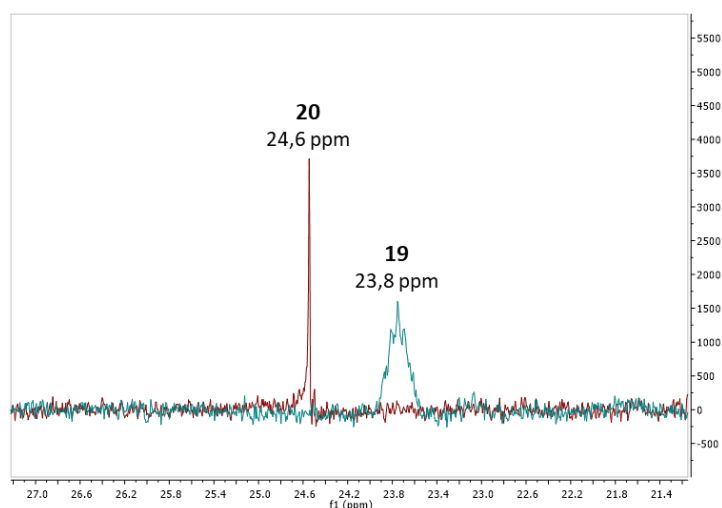
C'est ensuite par couplage peptidique que le complexe d'or **19** a été greffé au composé bis-acide **6** (**Schéma 12**). Cette réaction est réalisée à température ambiante, sous atmosphère d'argon. Le solvant utilisé lors de cette étape était du DMF anhydre. Une étape d'activation de **6** à l'aide de l'agent de couplage HBTU a permis de former l'ester activé correspondant en présence d'une base organique. L'ajout de **19** a alors mené à la formation du complexe bimétallique **20**.



**Schéma 12.** Synthèse du premier azaBODIPY-or(I) théranostique **20**.

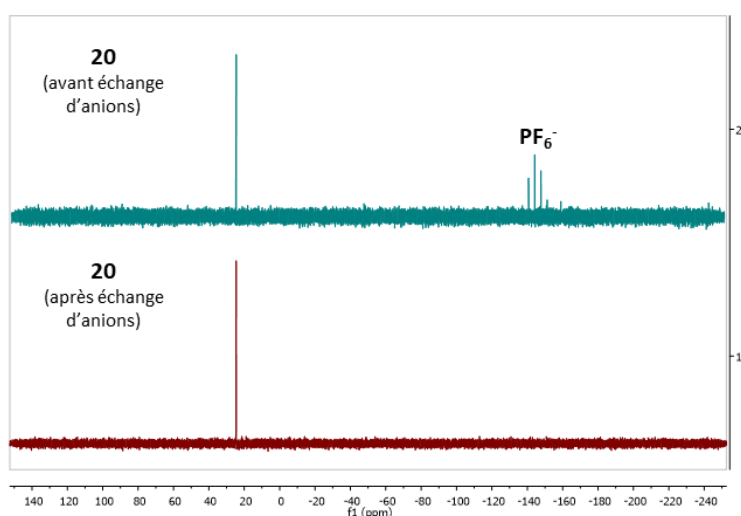
Après purification sur colonne chromatographique d'alumine puis précipitation, 15 mg du complexe **20** ont pu être isolés. La RMN du phosphore témoigne du greffage du complexe **19** sur l'azaBODIPY bis-acide par un déplacement de 0,8 ppm du signal et par un changement d'aspect du signal, qui devient alors particulièrement fin (**Figure 86**).





**Figure 86.** Evolution du signal en RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 202 MHz).

La RMN du phosphore a pu mettre en évidence la présence d'ions  $\text{PF}_6^-$  (signal à -144,2 ppm), provenant de l'agent de couplage HBTU et jouant le rôle de contre-ion, le composé **20** présentant deux sites cationiques. Afin de remplacer ces contre-ions lipophiles par des contre-ions hydrophiles, le composé **20** a été passé sur résine échangeuse d'anions (Amberlite IRA-410, résine présentant des ions chlorure). L'analyse par RMN du phosphore du produit résultant ne présente plus le signal correspondant au ions  $\text{PF}_6^-$ , montrant ainsi l'efficacité de la métathèse d'anions (**Figure 87**).



**Figure 87.** Contrôle de l'échange des contre-ions  $\text{PF}_6^-$  du composé **20** en RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ , 193 MHz).

Cet échange a été confirmé par chromatographie ionique, validant ainsi le fait que les contre-ions sont bien des chlorures.

La structure du composé **20** a pu être confirmée par spectrométrie de masse, mais également par RMN  $^1\text{H}$  (**Figure 88**). La RMN du proton permet de prouver que deux complexes d'or ont été introduits par azaBODIPY, les signaux des  $\text{CH}_2$  de la phosphine intégrant bien pour quatre protons chacun. 200 mg du composé **20** avec une pureté de 96 % (évaluée par RP-HPLC-MS) ont ainsi pu être synthétisés.

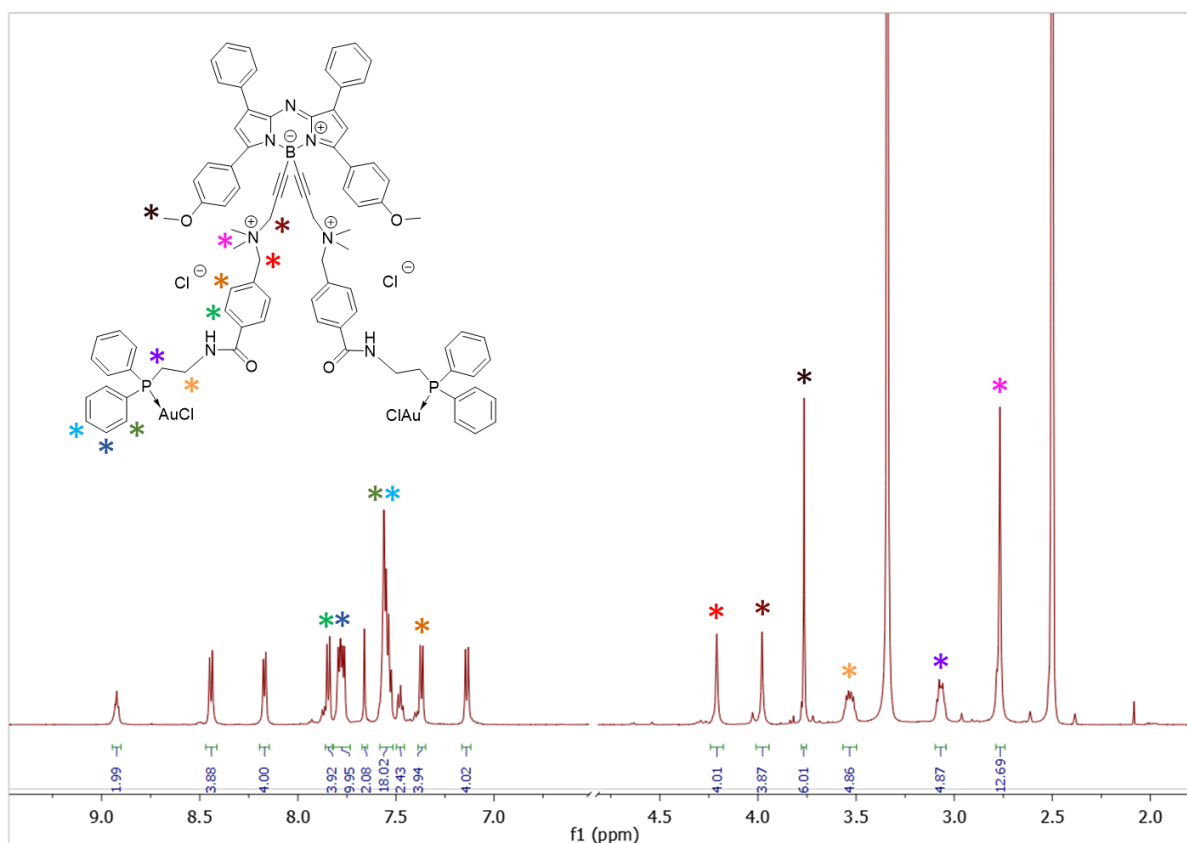


Figure 88. RMN  $^1\text{H}$  du premier azaBODIPY à visée thérapeutique **20** (DMSO- $d_6$ , 600 MHz).

### 1.3.3 Synthèse de dérivés du composé azaBODIPY-or **20**

Nous avons envisagé de modifier la charge des complexes afin d'étudier l'impact sur les propriétés biologiques telles que la solubilité, l'internalisation ou encore la cible atteinte par le thérapeutique.

#### 1.3.3.1 Introduction d'un ligand neutre

Nous nous sommes focalisés sur la substitution du ligand chlorure porté par l'or par un ligand thiolate. Pour cela, nous avons décidé de réaliser au préalable l'échange de ligand sur le complexe non couplé à l'azaBODIPY (**Schéma 13**). Les conditions réactionnelles ont été adaptées des travaux de Doulain *et al.* concernant l'introduction d'un thioglucose sur un thérapeutique BODIPY Au-Cl.<sup>227</sup> Cet échange de ligand est réalisé en milieu basique, à froid (0 °C), sous argon (pour éviter la formation de ponts disulfures) en présence d'hydrochlorure de 2-(diméthylamino)éthanethiol. Cette étape a été suivie par RMN du phosphore et montre qu'elle est réalisée en moins de 15 minutes (temps nécessaire à la préparation du tube et à l'analyse RMN – **Figure 89**).

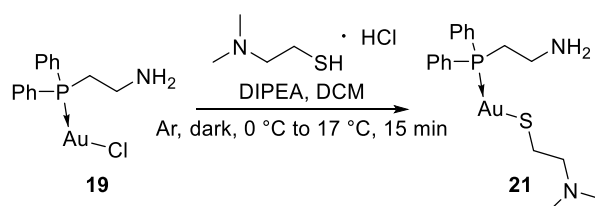
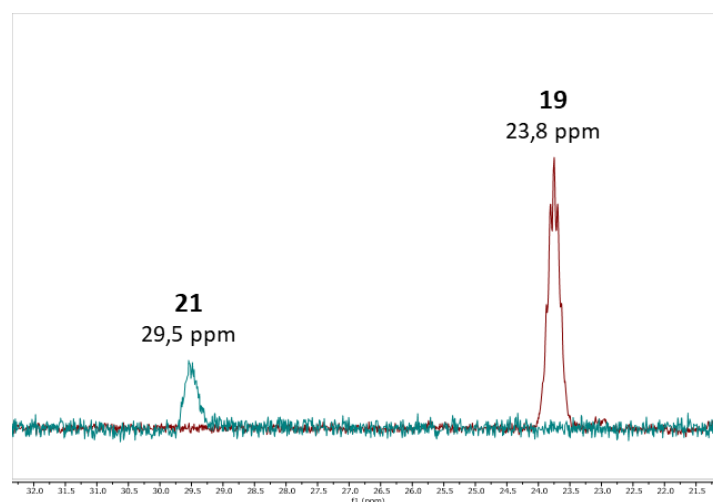
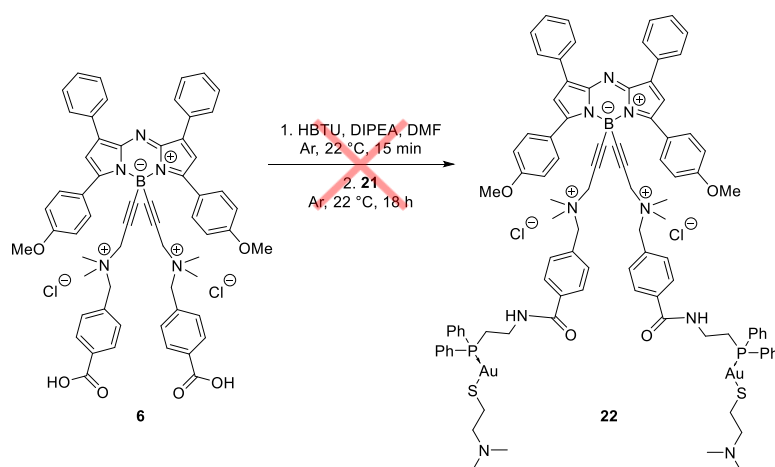


Schéma 13. Substitution du ligand chlorure du complexe **19**.



**Figure 89.** Évolution du signal en RMN  $^{31}\text{P}$  lors de la substitution du ligand chlorure du complexe **19** par le 2-(diméthylamino)éthanethiol ( $\text{CDCl}_3$ , 202 MHz).

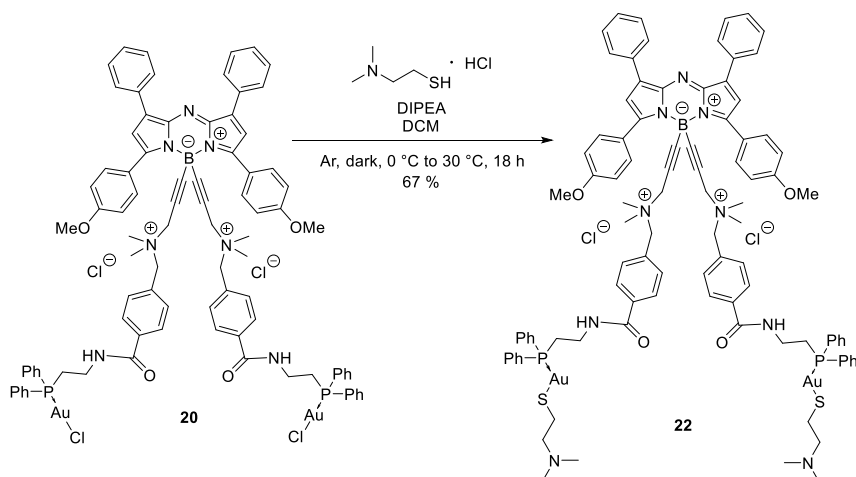
Le complexe **21** n'a pas été purifié et a directement été engagé dans l'étape suivante, consistant en la formation de l'amide sur l'azaBODIPY bis-acide **6**. Les conditions appliquées à cette réaction sont les mêmes que celles utilisées pour la formation du composé **20**, avec l'activation préalable de l'acide par HBTU en présence de base, suivi par une addition sous atmosphère inerte de l'amine **21** (Schéma 14).



**Schéma 14.** Première tentative de synthèse du complexe d'or(I) azaBODIPY **22**.

La réaction a été suivie par RP-HPLC-MS, qui a confirmé la formation du composé après 18 h à température ambiante. La RMN du phosphore a confirmé quant à elle la formation d'une nouvelle espèce (déplacement du signal de 29,7 ppm (**21**) à 28,6 ppm) mais la RMN du proton n'a pas permis de conclure quant à la nature du composé. La purification par filtration sur silice a cependant entraîné une dégradation du composé et la grande majorité du produit n'a pas migré sur la phase solide. Une autre tentative de purification sur gel d'alumine a mené également à ce constat, le composé récupéré ne présentant plus aucun signal en RMN du phosphore. La nature exacte du composé obtenu n'a pas pu être déterminée. Cette voie de synthèse du composé **22** n'a pas été exploitée davantage et nous avons décidé d'opter pour un échange du ligand chlorure du composé **20**.

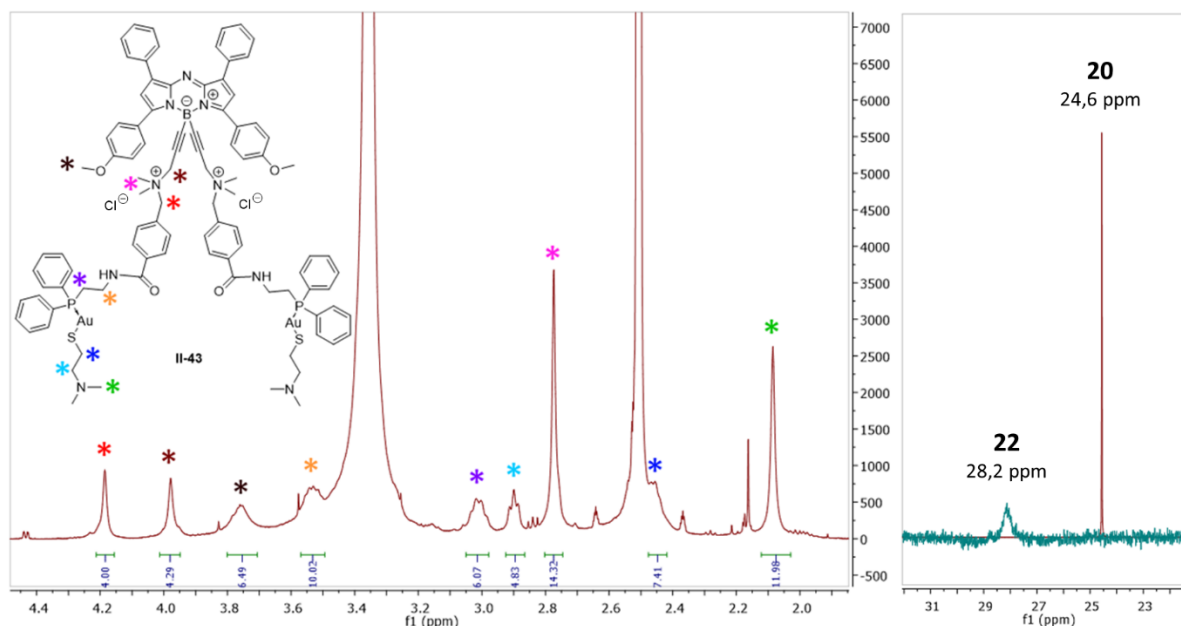
Pour cette méthode, les conditions testées ont été inspirées des travaux de thèse du Dr Doulain (**Schéma 15**).<sup>227</sup> Dans ce cas, après 16 h de réaction, la RMN du brut réactionnel a montré que la réaction n'était pas complète. Le mélange a donc été légèrement chauffé (30 °C) et après 2 h, un suivi CCM a montré une totale consommation du réactif **20**. Une purification sur colonne chromatographique d'alumine a permis d'isoler **22** avec un rendement de 67 %. Dans ce cas, la purification a pu être réalisée avec succès, cela laisse suggérer que lors de la tentative précédente de synthèse du composé **22** (**Schéma 14**), le composé formé n'était alors pas le produit attendu, celui-ci se dégradant alors fortement sur la colonne d'alumine.



**Schéma 15.** Substitution des ligands chlorures par les ligands thiolates.

De même que pour le composé **20**, l'azaBODIPY **22** a été passé sur résine échangeuse d'ions. Une analyse par chromatographie ionique a confirmé la présence de contre-ions chlorure uniquement.

La RMN du noyau phosphore atteste d'un très net déblindage et élargissement du signal, passant de 24,6 ppm pour **20** à 28,2 ppm pour **22** dans le DMSO deutéré à 328 K. La RMN du proton montre l'apparition de signaux correspondant aux protons CH<sub>2</sub> éthyliques portés par le thiolate à des déplacements chimiques de 3,00 ppm et 3,53 ppm (**Figure 90**). Une étude RMN à température variable a dû être réalisée pour ce composé, la résolution des signaux à température ambiante ne permettant pas une exploitation du spectre.

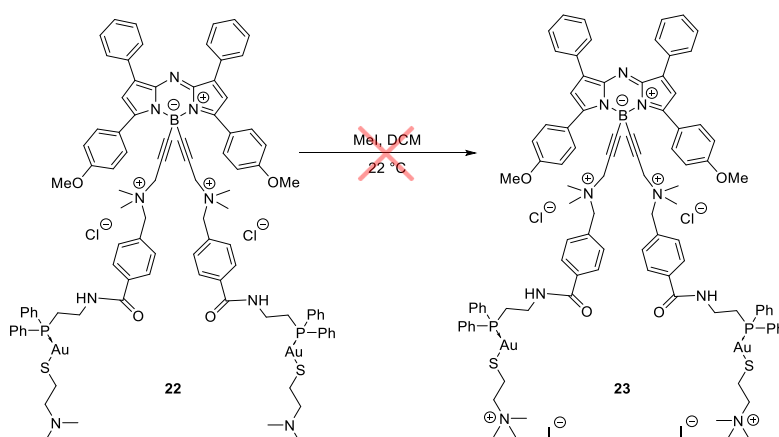


**Figure 90.** RMN  $^1\text{H}$  (gauche – DMSO- $d_6$ , 600 MHz, 318 K) et RMN  $^{31}\text{P}$  (droite – DMSO- $d_6$ , 243 MHz, 328 K) montrant l'introduction du thiol sur l'atome d'or, confirmant la formation du composé **22**.

Ainsi, 50 mg de l'azaBODIPY **22** ont pu être obtenus par cette voie. La pureté de ce composé n'a pas pu être évaluée par RP-HPLC-MS, la RMN semblant cependant indiquer une pureté supérieure à 90 %.

### 1.3.3.2 Méthylation du composé **22**

Afin d'obtenir une version chargée positivement du complexe **22**, la quaternarisation de l'amine du ligand porté par l'or a été tentée. Une première expérience impliquant de l'iodure de méthyle a été réalisée mais n'a cependant pas abouti (**Schéma 16**).



**Schéma 16.** Tentative de quaternarisation des amines du composé **22**.

Diverses conditions ont été testées pour cette synthèse, en particulier au niveau des systèmes de solvants avec l'utilisation de mélanges DCM/MeI, dont un test en mélange équimolaire, ou encore l'ajout d'acétonitrile afin d'augmenter la solubilité du réactif (**Tableau 8**).

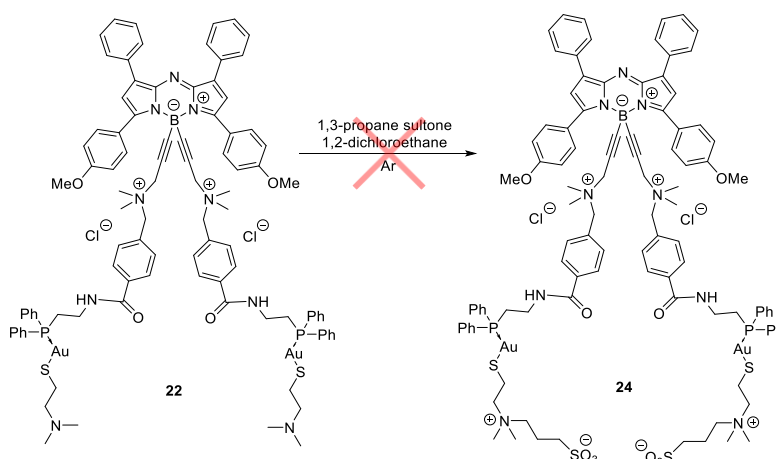
**Tableau 8.** Conditions réactionnelles testées pour la quaternarisation de l'azaBODIPY **20**.

| Solvant             | Équivalents Mel  | Température | Temps |
|---------------------|------------------|-------------|-------|
| DCM                 | 4                | 17 °C       | 4 h   |
| DCM                 | 20               | 17 °C       | 1 h   |
| DCM                 | 120              | 17 °C       | 1 h   |
| DCM/Mel/ACN (6:6:1) | Très large excès | 25 °C       | 4 h   |
| DCM/Mel/ACN (6:6:1) | Très large excès | 25 °C       | 20 h  |

Par suivi CCM et RP-HPLC-MS, aucune de ces conditions n'a mené à la consommation du réactif. Une masse exacte basse résolution a confirmé une très faible conversion en un produit non identifié dans le cas d'un mélange équimolaire de DCM et Mel, en présence d'acétonitrile.

### 1.3.3.3 Formation d'un composé zwitterionique à partir du composé **22**

L'ouverture d'une propane sultone sur l'amine tertiaire de **22** a pour intérêt de former un zwitterion, qui pourrait augmenter l'hydrosolubilité du composé (**Schéma 17**). En s'inspirant des travaux décrits par Dong *et al.* et des travaux de thèse du Dr Pliquet, la formation du dérivé zwitterionique a été tentée avec diverses conditions de température et différents solvants (**Tableau 9**). Le réactif a alors été entièrement consommé lors d'un chauffage à reflux dans l'acétonitrile, comme cela a été attesté par CCM. À la suite d'une extraction permettant de retirer la base inorganique, le brut réactionnel a été séché et une analyse de masse a montré que le produit synthétisé semblait alors être le composé attendu. En revanche, ni la nature du composé ou sa pureté n'ont pu être identifiées par RMN  $^1\text{H}$  ou  $^{31}\text{P}$ . Ces analyses RMN ont été réalisées à 298 K mais également à 318 K.

**Schéma 17.** Tentative de formation d'un dérivé de **22** zwitterionique.**Tableau 9.** Conditions réactionnelles testées pour l'ouverture de la propane sultone sur l'azaBODIPY **22**.

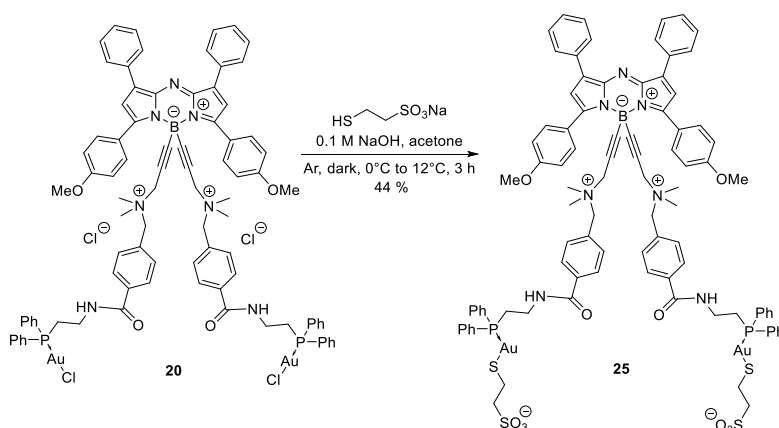
| Solvant            | Base               | Température | Temps | Résultat                          |
|--------------------|--------------------|-------------|-------|-----------------------------------|
| 1,2-dichloroéthane | -                  | 22 °C       | 48 h  | Pas de consommation du réactif    |
| 1,2-dichloroéthane | NaHCO <sub>3</sub> | 84 °C       | 22 h  | Partielle consommation du réactif |
| ACN                | NaHCO <sub>3</sub> | Reflux      | 6 h   | Totale consommation du réactif    |

### 1.3.3.4 Introduction d'un ligand chargé négativement sur le composé **20**

Toujours dans l'idée de favoriser la solubilité du potentiel théranostique et donc de faciliter son utilisation *in vivo*, l'introduction d'un ligand chargé négativement porté par l'or a été envisagé. De plus, la molécule serait alors globalement neutre, ce qui est généralement favorable pour l'entrée dans les cellules.

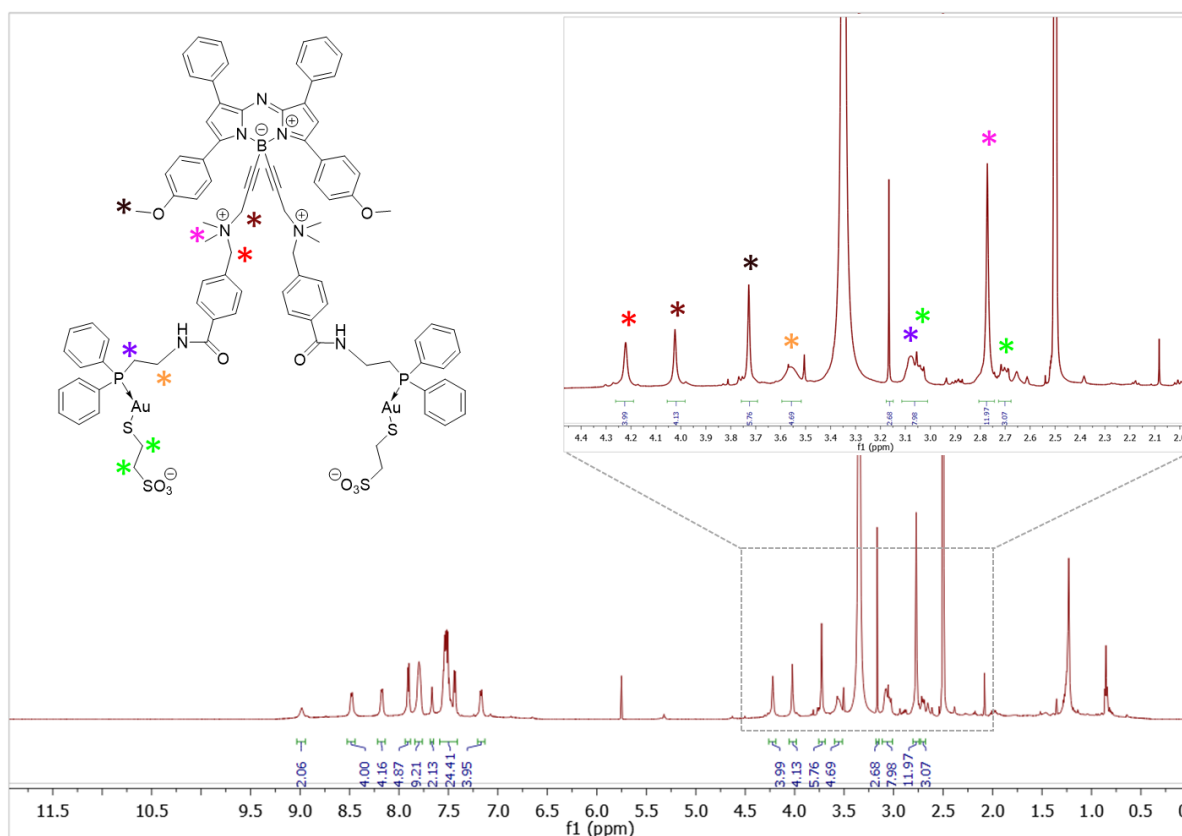
Nous nous sommes focalisé sur l'utilisation de 2-mercaptoéthanesulfonate de sodium. Dans des conditions similaires à la formation du complexe **22**, le composé **20** a été mis à réagir à froid (0 °C) en présence du thiolate et la réaction, réalisée à 12 °C, a été suivie par RMN du phosphore (**Schéma 18**). Après 3 h, une analyse du brut réactionnel révèle un très léger signal à 25,4 ppm, décalé du pic initial à 24,6 ppm. Une analyse de masse a confirmé la substitution des ligands chlorures par le thiol.

Le complexe obtenu a également été passé sur résine échangeuse d'anions. Bien que le composé **25** soit de nature zwitterionique et donc globalement neutre, une analyse par chromatographie ionique a révélé la présence de six ions chlorure.



**Schéma 18.** Introduction d'un ligand anionique sur l'azaBODIPY **20**.

Malgré plusieurs tentatives, en particulier en température variable, il n'a pas été possible d'obtenir une RMN du phosphore acceptable pour ce composé, le signal étant trop faible pour être identifié au milieu du bruit de la ligne de base. En revanche, en RMN du proton, nous avons pu confirmer l'introduction du 2-mercaptoéthanesulfonate de sodium par l'apparition des signaux des CH<sub>2</sub> du ligand à 3,08 ppm et 3,56 ppm (**Figure 91**). La nature du composé a également été confirmée par RP-HPLC-MS et HRMS.



**Figure 91.** RMN <sup>1</sup>H du composé **25** après purification (DMSO-d<sub>6</sub>, 600 MHz).

Ce complexe a également été passé sur résine échangeuse d'ions afin de remplacer les contre-ions par des ions chlorure. 15 mg de ce composé ont pu être obtenus par cette voie. La pureté pour ce composé a été évaluée à 97 % par RP-HPLC-MS.

### 1.3.3.5 Bilan

Nous avons donc mené à bien la synthèse de trois composés à visée théranostique, le complexe initial Au-Cl **20**, ainsi que deux dérivés, l'un présentant des ligands neutres **22** et l'autre aux ligands chargés négativement **25**.

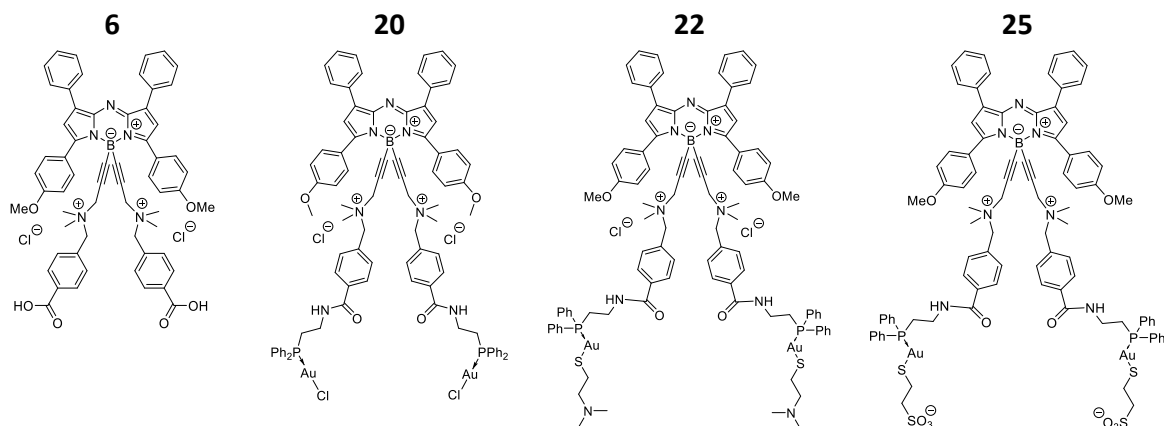
La pureté des azaBODIPYs **20** et **25** a été évaluée par RP-HPLC-MS comme étant supérieure à 95 %, valeur qui est cohérente avec les observations des spectres RMN. En revanche, la pureté du composé **22** est à aborder avec davantage de précaution, celle-ci n'ayant pas pu être confirmée par RP-HPLC-MS.

### 1.3.4 Caractérisation photophysique

Sur les trois complexes dont les propriétés photophysiques ont été évaluées, seul l'azaBODIPY **25** présente un ligand pouvant potentiellement augmenter son hydrosolubilité. Malgré cela, ce complexe, tout comme les composés **20** et **22**, s'est avéré insoluble dans le PBS (*Phosphate Buffer Saline*). Pour cette raison, les caractéristiques photophysiques dans ce solvant n'ont donc pas pu être évaluées. Les mesures réalisées sont donc ici données dans le DMSO (**Tableau 10**).



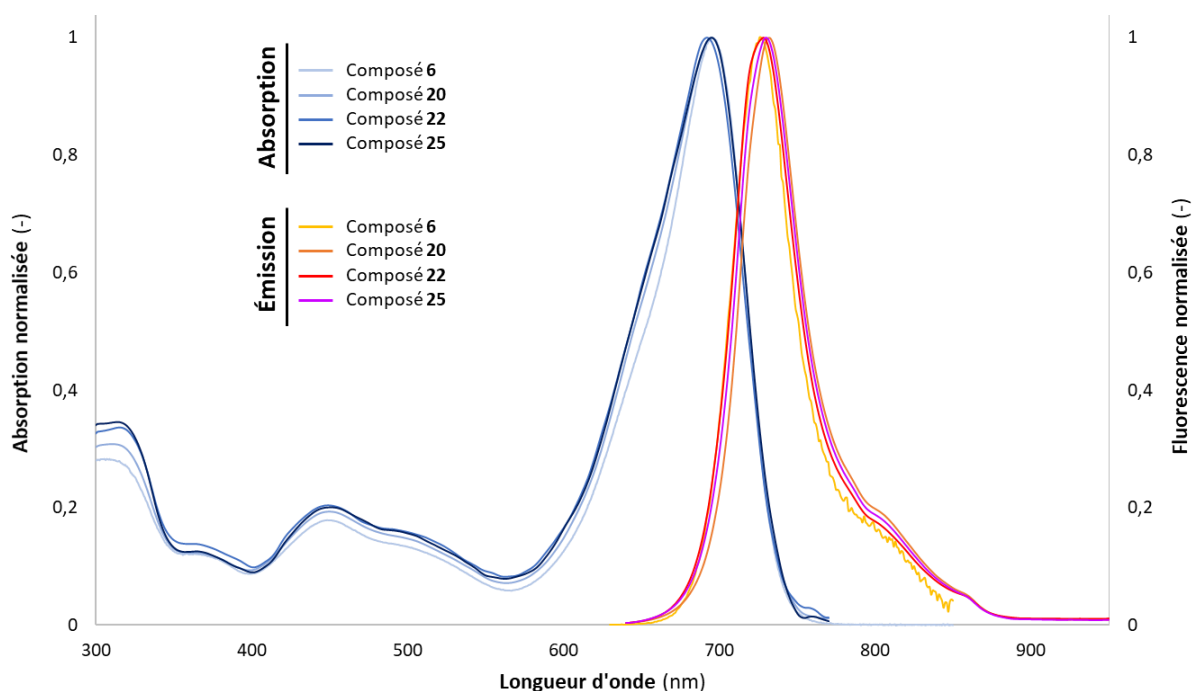
**Tableau 10.** Données photophysiques pour les composés bis-acide **6** et complexes **20**, **22** et **25** dans le DMSO à 25 °C. La référence utilisée pour le calcul des rendements quantiques est l'azaBODIPY **4** dans CHCl<sub>3</sub>.<sup>213</sup>



| Composé   | $\lambda_{\max, \text{absorption}}$<br>(nm) | $\epsilon$<br>(M <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ) | $\lambda_{\max, \text{émission}}$<br>(nm) | $\Phi$<br>(-) | Brillance<br>(M <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ) |
|-----------|---|--|---|---------------|---|
| <b>6</b>  | 694   | 60 000   | 727                                       | 0,32          | 19 200  |
| <b>20</b> | 695   | 62 600   | 732                                       | 0,27          | 16 800  |
| <b>22</b> | 693   | 68 100   | 728                                       | 0,29          | 19 800  |
| <b>25</b> | 695   | 60 000   | 730                                       | 0,25          | 14 800  |

Nous notons tout d'abord que les trois complexes d'or présentent les mêmes longueurs d'onde maximales d'absorption et d'émission que l'azaBODIPY bis-acide **6** (environ 694 nm et 730 nm respectivement). Ce résultat semble logique, l'introduction des complexes sur l'azaBODIPY **6** étant éloignée du cœur azaBODIPY. De tel maximums en absorption et émission permettent d'envisager une utilisation *in vivo* par exploitation de la fenêtre thérapeutique du NIR-I. Les rendements quantiques de l'ordre de 25 à 29 % restent également similaires à celui de 32 % obtenu pour le bis-acide. Il en va de même pour les coefficients d'absorption molaire qui restent aux alentours de 60 000 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>.

Une comparaison des spectres d'absorption et d'émission dans le DMSO est donnée en **Figure 92**. L'aspect des spectres n'est pas impacté par l'introduction des complexes d'or sur les positions acides de l'azaBODIPY **6** et l'introduction de ligands de natures différentes n'a pas d'influence sur les maximums en absorption et émission.



**Figure 92.** Spectres d'absorption et d'émission normalisés des composés **6**, **20**, **22** et **25** dans le DMSO à 25 °C. Les composés ont été excités à 620 nm.

### 1.3.5 Étude biologique

#### 1.3.5.1 Tests *in vitro* de cytotoxicité et d'inhibition des thiorédoxine réductases

##### **IC<sub>50</sub>**

L'évaluation des IC<sub>50</sub> a été réalisée par Malorie Privat, Aurélie Massot et moi-même au sein de l'UFR Sciences de Santé. Ici, comme dans le reste du manuscrit, nous ferons l'abus de langage courant consistant à considérer le terme cytotoxique comme équivalent à antiprolifératif.

Afin d'évaluer les propriétés antiprolifératives des composés, des mesures d'IC<sub>50</sub> ont été réalisées sur quatre lignées cellulaires cancéreuses, dont deux humaines (SW480 et MDA-MB-231) et deux murines (CT26 et 4T1) ainsi que sur une lignée humaine non cancéreuse (HMEC). Les lignées MDA-MB-231, 4T1 et HMEC sont des cellules mammaires, alors que les lignées SW480 et CT26 sont des cellules du côlon. Pour cette expérience, des concentrations croissantes en composés ont été étudiées et le nombre de cellules vivantes par rapport au contrôle est révélé par étude colorimétrique au MTS après 48 h de traitement. La référence utilisée lors de cette expérience est l'auranofine, complexe d'or dont les propriétés anticancéreuses sont actuellement évaluées en essais cliniques.<sup>242</sup> Ces expériences ont été réalisées en triplicats indépendants hormis pour la lignée HMEC, pour laquelle un duplicat a été réalisé (**Tableau 11**). La concentration en DMSO est prise en compte lors des calculs des IC<sub>50</sub>.

**Tableau 11.** Valeurs d'IC<sub>50</sub> des complexes d'or(I) azaBODIPY **20**, **22** et **25** et de l'auranofine sur les lignées 4T1, MDA-MB-231, CT26, SW480 et HMEC.

| Composé           | 4T1          | MDA-MB-231    | CT26          | SW480         | HMEC         |
|-------------------|--------------|---------------|---------------|---------------|--------------|
| <b>20</b>         | 4,9 ± 0,5 µM | 11,0 ± 0,7 µM | 4,6 ± 0,5 µM  | 4,7 ± 0,5 µM  | 3,8 ± 0,9 µM |
| <b>22</b>         | 9,9 ± 0,6 µM | 10,2 ± 0,2 µM | 10,1 ± 0,5 µM | 10,2 ± 0,6 µM | 5,6 ± 0,1 µM |
| <b>25</b>         | 5,1 ± 0,4 µM | 9,8 ± 0,6 µM  | 4,8 ± 0,6 µM  | 4,6 ± 0,6 µM  | 5,9 ± 0,1 µM |
| <b>Auranofine</b> | 3,4 ± 0,9 µM | 2,1 ± 1,0 µM  | 2,5 ± 0,5 µM  | 2,1 ± 0,7 µM  | < 0,5 µM     |

Les valeurs d'IC<sub>50</sub> comprises entre 2,1 µM et 3,4 µM sur toutes les lignées cancéreuses pour l'auranofine soulignent la cytotoxicité de ce composé vis-à-vis des cellules tumorales. On remarque que ce complexe est également fortement cytotoxique envers la lignée de cellules saines HMEC, dont la valeur d'IC<sub>50</sub> est si faible que nous n'avons pas pu la déterminer précisément. Les cellules HMEC sont connues pour être plus sensibles que les cellules cancéreuses, mais peuvent donner une idée de la toxicité relative d'un composé pour les tissus sains.

En ce qui concerne les complexes étudiés, les valeurs mesurées sont comprises entre 5 µM et 10 µM pour les lignées 4T1, CT26 et SW480 et de l'ordre de 10 µM pour MDA-MB-231. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> des composés synthétisés pour la lignée 4T1 sont 1,5 à 3 fois supérieures à la valeur mesurée pour l'auranofine. Les résultats sur les lignées CT26 et SW480 sont similaires, présentant des IC<sub>50</sub> 2 à 5 fois supérieures aux valeurs pour l'auranofine. Dans le cas de la lignée MDA-MB-231, un rapport de 5 entre les valeurs d'IC<sub>50</sub> des composés et de la référence sont à mentionner. Ainsi, pour les trois complexes étudiés sur les quatre lignées cancéreuses, les valeurs d'IC<sub>50</sub> sont du même ordre de grandeur que l'auranofine. Il est important de préciser que nos composés présentent deux atomes d'or par molécule contrairement à l'auranofine qui n'en contient qu'un seul, ce qui diminue leur efficacité relative par atome d'or. Deux expériences complémentaires seraient intéressantes à réaliser :

- Synthétiser l'azaBODIPY porteur d'un seul complexe d'or afin de voir si le second atome d'or améliore l'efficacité du théranostique ou si, comme nous l'avons vu dans certaines études, cela a peu d'influence ;<sup>228</sup>
- Mesurer la quantité d'or internalisée par les cellules, *via* dosage ICP-MS, afin de savoir si les différences observées avec l'auranofine sont dues à une plus faible internalisation des composés ou une plus faible cytotoxicité.

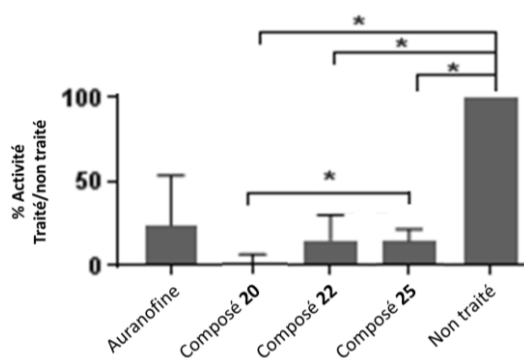
Il faut également souligner que le composé **22** présente des valeurs d'IC<sub>50</sub> globalement plus élevées par rapport aux composés **20** et **25** (IC<sub>50</sub> deux fois plus élevée pour les lignées 4T1, CT26 et SW480 par rapport aux IC<sub>50</sub> des composés **20** et **25**). La faible solubilité de ce complexe et sa tendance à l'agrégation peut expliquer ce phénomène.

Les composés étudiés présentent une cytotoxicité non négligeable sur cellules saines (IC<sub>50</sub> autour de 5 µM pour les trois composés). Cependant, la toxicité sur cellules saines de ces composés est inférieure à celle de l'auranofine (< 0,5 µM), ce qui est un point positif pour nos composés.

Ces valeurs, tant sur cellules cancéreuses que saines, sont particulièrement encourageantes et montrent le potentiel de ces composés en tant que théranostiques.

### Inhibition des thiorédoxine réductases (TrxRs)

Comme cela a été vu en introduction, l'une des hypothèses concernant le mécanisme d'action des complexes d'or concerne leur capacité à inhiber les TrxRs. Nous avons testé l'inhibition des trois complexes d'or(I) azaBODIPY développés dans ce projet envers les TrxRs (**Figure 93**).



**Figure 93.** Activité normalisée des thiorédoxine réductases sur lignée CT26 traitées avec les composés **20**, **22** et **25** et avec l'auranofine (5  $\mu$ M pendant 24 h, n = 4).

Des activités significatives ont été notées pour les trois complexes d'or(I) azaBODIPY, mais le composé **20** semble être le plus actif, son inhibition des TrxRs est telle qu'à la concentration testée aucune activité des TrxRs n'est détectée. Ce composé semble également présenter une meilleure activité inhibitrice que l'auranofine. Il est important de noter que ces tests n'ont pas été réalisés sur l'enzyme purifiée, ce qui « forcerait » le complexe à interagir avec l'enzyme, mais directement sur cellules. Plus précisément, le composé a été incubé avec les cellules et l'activité des TrxRs a été mesurée. Ainsi, de cette façon, nous pouvons être certains que les composés **20**, **22** et **25** vont cibler et inhiber les TrxRs *in vitro*.

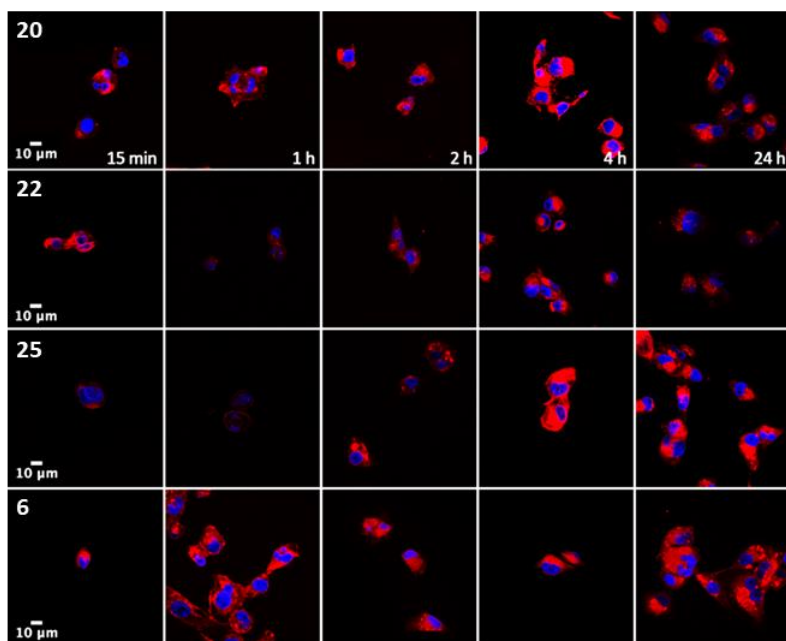
### 1.3.5.2 Imagerie cellulaire et étude en cytométrie de flux

#### Imagerie confocale

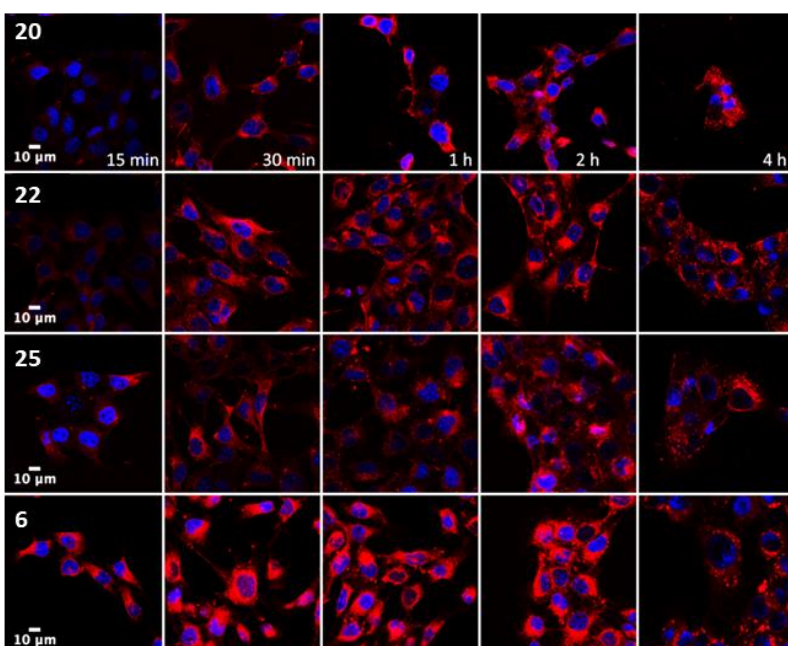
Dans le but d'étudier l'internalisation des cellules *in vitro*, de l'imagerie optique confocale a été réalisée en collaboration avec le Dr Lucie Sancey (*Institute of Advanced Biosciences* – Grenoble). Deux lignées cancéreuses mammaires ont été étudiées, l'une humaine, à savoir MDA-MB-231 (**Figure 94**) et l'autre murine, 4T1 (**Figure 95**). Une solution à 5  $\mu$ M (2 % de DMSO dans le PBS) a été préparée. Les cellules ont été incubées en présence des différents complexes d'or(I) azaBODIPY à 37 °C et 5 % CO<sub>2</sub>. Le noyau a été co-marqué par l'utilisation de colorant Hoechst 33342 (bleu).

Ces images ont révélé une internalisation des trois complexes d'or(I) azaBODIPY. Une internalisation légèrement moins rapide pour les trois complexes en comparaison avec le bis-acide **6** est à souligner, en particulier pour le composé **22** sur la lignée MDA-MB-231. La présence de points lumineux intenses suggère que l'accumulation des composés est non homogène et se situe principalement au sein des vésicules et autour du noyau, probablement

dans l'appareil de Golgi. Cette hypothèse pourrait être confirmée par la réalisation d'un co-marquage spécifique de l'appareil de Golgi. Les images obtenues ne montrent pas d'accumulation des composés dans le noyau cellulaire. Nous soulignerons également que ces images ont été obtenues pour une excitation des composés à une longueur d'onde de 633 nm, où l'absorbance est d'environ 40 % l'absorbance maximale comme cela est mis en évidence dans l'étude photophysique présentée précédemment (**Figure 92**).



**Figure 94.** Microscopie confocale sur la lignée MDA-MB-231 incubée avec les différents azaBODIPYs **6**, **20**, **22** et **25** (5  $\mu$ M) à 37 °C. Le noyau est marqué par le colorant Hoechst (bleu), les azaBODIPYs apparaissent en rouge. L'excitation a lieu à 633 nm et le signal est collecté entre 640 et 747 nm.

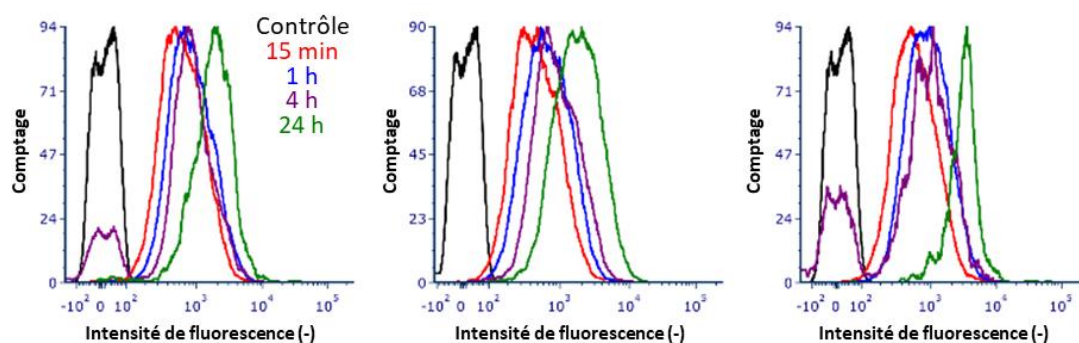


**Figure 95.** Microscopie confocale sur la lignée 4T1 incubée avec les différents azaBODIPYs **6**, **20**, **22** et **25** (5  $\mu$ M) à 37 °C. Le noyau est marqué par le colorant Hoechst (bleu), les azaBODIPYs apparaissent en rouge. L'excitation a lieu à 633 nm et le signal est collecté entre 640 et 747 nm.

### Cytométrie de flux

Les études de cytométrie de flux ont été réalisées par Malorie Privat et Aurélie Massot à l'UFR Sciences de Santé.

De manière concomitante avec les images de microscopie, cette analyse a révélé une internalisation cellulaire des fluorophores, par augmentation de l'intensité de fluorescence pour un même nombre de cellules par rapport aux cellules non marquées (contrôle) (**Figure 96**). L'évolution de l'intensité de fluorescence au cours du temps (augmentation de l'intensité bien visible après 24 h) témoigne d'une augmentation du nombre de cellules marquées.



**Figure 96.** Étude de cytométrie de flux (730/45 nm) sur la lignée 4T1 pour les azaBODIPYs **20** (gauche), **22** (centre) et **25** (droite) à 5  $\mu$ M.

#### 1.3.5.3 Tests *in vivo*

Ces tests ont été réalisés par Malorie Privat au sein de l'UFR Sciences de Santé.

Par soucis éthique, nous avons décidé de ne tester *in vivo* qu'une seule molécule. Même si les résultats *in vitro* ne sont pas directement transposables aux études *in vivo*, le composé **20** semble le plus prometteur. En effet, celui-ci présente de bonnes activités antiproliférative et d'inhibition de TrxRs. De plus, cette molécule est rapidement internalisée et surtout, sa caractérisation par les méthodes spectroscopiques assure qu'elle présente le degré de pureté nécessaire. La toxicité du composé **20** a donc été évaluée *in vivo* sur souris saines BALB/*c nude*. Des concentrations croissantes du composé (0,01 mg/kg à 0,5 mg/kg) dans le DMSO ont été injectées de manière intrapéritonéale sur deux souris. Deux autres souris ont été injectées avec uniquement du DMSO afin d'établir un témoin. Aucun signe de toxicité n'a été observé pour les concentrations testées (**Tableau 12**). La léthargie observée à haute concentration (0,5 mg/kg) est imputable à l'utilisation de DMSO pour l'injection. Ceci a pu être mis en valeur par les souris témoin présentant les mêmes troubles passagers à concentration en DMSO identique. Ces résultats sont rassurants quant à la poursuite de l'étude sur souris porteuses de tumeur.

**Tableau 12.** Évaluation des signes de souffrance après injections croissantes du composé **20** (0,01 mg/kg à 0,5 mg/kg, 2 injections par semaine) sur deux souris saines BALB/c *nude*. Les effets de l'injection de DMSO seul ont été évalués à l'aide de deux souris témoin.

| Critères d'évaluation       |                       |          |           |           |  |       |       |
|-----------------------------|-----------------------|----------|-----------|-----------|--|-------|-------|
| Solution stock (10 mM/DMSO) | Dose injectée (mg/kg) | Diarrhée | Léthargie | Yeux clos | Difficultés à marcher après anesthésie | Total | Morts |
| Composé 20                  | 0,01                  | 0        | 0         | 0         | 0                                      | 0     | 0     |
| DMSO                        | 0,01                  | 0        | 0         | 0         | 0                                      | 0     | 0     |
| Composé 20                  | 0,05                  | 0        | 0         | 0         | 0                                      | 0     | 0     |
| DMSO                        | 0,05                  | 0        | 0         | 0         | 0                                      | 0     | 0     |
| Composé 20                  | 0,5                   | 0        | 2         | 0         | 0                                      | 2     | 0     |
| DMSO                        | 0,5                   | 0        | 2         | 0         | 0                                      | 2     | 0     |

### 1.3.6 Bilan des résultats obtenus pour la première génération de théranostiques

Les trois complexes développés dans le cadre de cette étude ont montré une capacité à être internalisé au sein des cellules et nous pensons que leur accumulation vise plus particulièrement les vésicules cytoplasmiques. De plus, sur cellules cancéreuses 4T1, MDA-MB-231, CT26 et SW480, les complexes d'or(I) azaBODIPY ont révélés des propriétés antiprolifératives de l'ordre du micromolaire. Selon la lignée cellulaire étudiée, le caractère cytotoxique des complexes s'est révélé 1,5 à 5 fois inférieur seulement à celui de l'auranofine. De plus, une forte inhibition des thiorédoxine réductases à des concentrations de 5  $\mu$ M en complexe est à souligner, le composé **20** semblant ainsi avoir une inhibition meilleure que celle de l'auranofine. De par ses excellentes propriétés antiprolifératives sur les lignées cellulaires étudiées et sa forte inhibition des TrxRs, la toxicité de **20** a été évaluée *in vivo*, montrant ainsi l'absence de signes de toxicité aigus jusqu'à 0,5 mg/kg sur souris saines BALB/c *nude*.

Au jour de l'écriture de ces lignes, des tests sur souris porteuses de tumeurs sont en cours afin d'évaluer le potentiel de ces théranostiques *in vivo*.

## 1.4 Perspectives

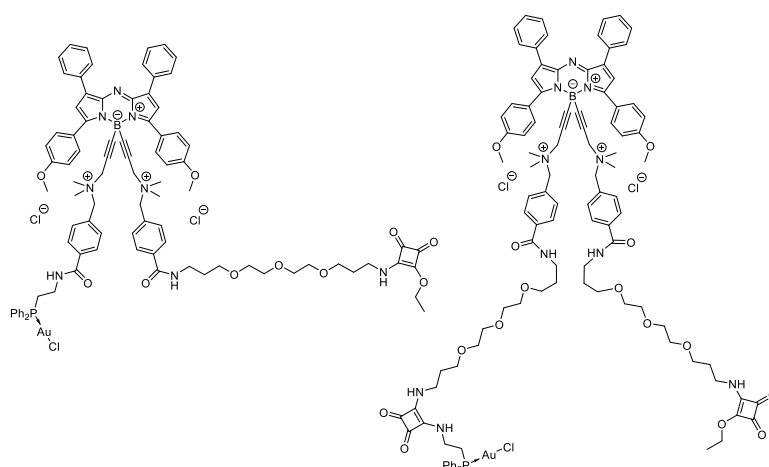
Suite aux résultats particulièrement prometteurs obtenus avec les trois azaBODIPYs porteurs de complexes d'or(I), nous avons décidé de mener une étude *in vivo* sur souris porteuses de tumeurs xénogreffées. Pour cela, nous avons concentré notre attention sur le composé **20**, la réalisation de cette étude étant actuellement en cours au jour de l'écriture de ces lignes.

Nous envisageons également de réaliser dans un avenir proche une étude ICP-MS qui nous permettra de doser la quantité d'or(I) pénétrant au sein des cellules. Les résultats de cette analyse nous renseigneront sur le rôle cytotoxique du métal, ainsi que sur la stabilité de la structure azaBODIPY-or(I).

Dans une optique d'éclaircir le mécanisme d'action de ces composés, nous envisageons également de réaliser une étude d'imagerie confocale plus poussée, en co-marquant spécifiquement l'appareil de Golgi, lieu supposé de l'accumulation des complexes.

Les trois complexes d'or(I) azaBODIPY ainsi développés ne présentent pas de vecteur. Nous avons alors envisagé de nous orienter vers une seconde génération de potentiels théranostiques, pour lesquels un moyen de vectorisation seraient greffé à leur structure. Pour se faire, l'objectif est d'introduire sur l'un des acides carboxyliques de l'azaBODIPY **6** un complexe et, sur l'autre position, un TOTA-NH<sub>2</sub>, sur lequel pourra être greffé un diethyl squarate, fonction bioconjugable permettant le greffage à un anticorps ou à un autre vecteur. L'efficacité de cette méthode a déjà pu être notée au sein de notre laboratoire.<sup>133</sup>

C'est dans le cadre d'un stage de M2 effectué au sein du laboratoire au cours de l'année 2020 qu'Océane Baffroy s'est intéressée au développement de ces nouveaux théranostiques. Deux complexes d'or vectorisables ont ainsi pu être synthétisés (**Figure 97**). À ce jour, ces composés n'ont pas encore été bioconjugués. La synthèse de ces composés ne sera pas détaillée ici, ces travaux étant en cours au jour de l'écriture de ces lignes.



**Figure 97.** Structures des deux complexes d'or azaBODIPYs vectorisables synthétisés.



## 1.5 Vers un nouveau concept de théranostiques

Les théranostiques s'avèrent être des outils puissants pouvant permettre de déterminer le devenir cellulaire et les mécanismes d'action d'agents thérapeutiques. Une limitation majeure est cependant à souligner. En cas de rupture de la liaison entre l'agent d'imagerie et le fragment à visée thérapeutique, le signal récupéré ne correspond alors plus à l'objet à étudier, mais seulement à la sonde.

Afin d'aborder cette problématique, est apparue l'idée de synthétiser de nouvelles sondes ayant la capacité de répondre à la rupture de cette liaison. Dans le cas des fluorophores, cette réponse peut s'opérer de plusieurs façons, telle qu'une diminution drastique du rendement quantique, ayant pour effet « d'éteindre » la sonde, ou par un changement de longueur d'onde d'émission.

## 2 Synthèse d'azaBODIPYs thérapeutiques « intelligents »

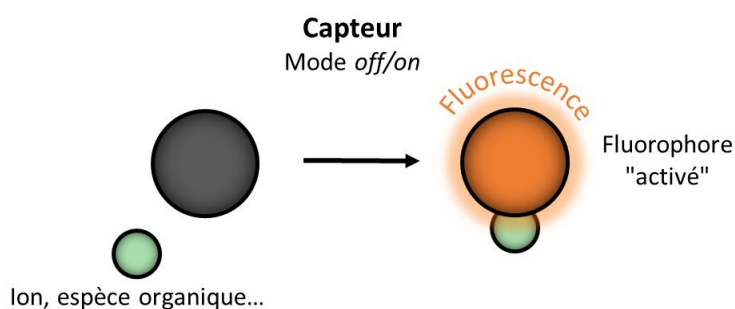
### 2.1 Etat de l'art

#### 2.1.1 Notion d'intelligence

L'intelligence d'une sonde est définie par sa capacité à fournir une information sur l'évolution *in situ* d'un paramètre biologique ou chimique. Il peut alors s'agir d'un changement de pH, de la présence d'une espèce chimique (molécule, ion...), d'une interaction biomoléculaire ou encore de la modification structurale de la sonde elle-même. Une sonde est alors dite intelligente lorsque son signal est directement affecté par modification du milieu dans lequel elle évolue.

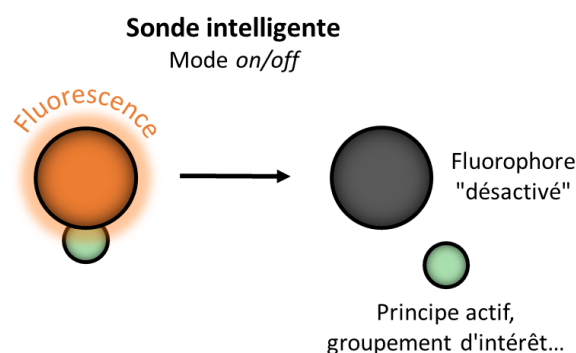
Les différentes modalités d'imagerie disponibles peuvent donner lieu au développement de sondes intelligentes, qu'il s'agisse de l'IRM<sup>243,244</sup> ou d'une imagerie impliquant un radioélément.<sup>245</sup> Mais le principe d'une sonde présentant un signal modulé par son environnement a surtout été exploité dans le cas des fluorophores. Ainsi, dans la suite de ce manuscrit, nous nous intéresserons spécifiquement aux sondes intelligentes fluorescentes.

En ce qui concerne les sondes intelligentes mettant en jeu un fluorophore, trois concepts différents doivent être définis clairement. D'une part, il peut s'agir d'une sonde de type « capteur », dont la fluorescence est généralement régie par un mode *off/on* (**Figure 98**). Dans ce cas, l'intérêt est de créer une sonde profluorescente, c'est-à-dire ayant la capacité d'activer sa fluorescence en présence d'une espèce en particulier dans le milieu dans lequel évolue le capteur.



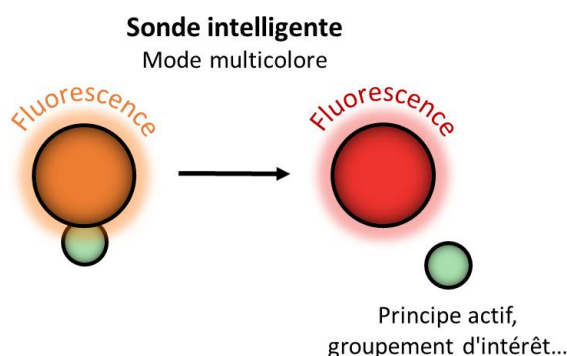
**Figure 98.** Représentation schématique d'un capteur fluorescent.

Il est également possible de créer des sondes *on/off*. Ces sondes sont peu intéressantes pour la détection d'espèce car la perte de signal n'est pas systématiquement due à la détection de l'espèce souhaitée. À l'inverse, elles sont particulièrement intéressantes pour s'assurer de l'intégrité d'un composé. Dans ce cas, la fluorescence sera inhibée par une perte d'un groupement d'intérêt situé sur le fluorophore (**Figure 99**). Contrairement aux thérapeutiques classiques pour lesquels la perte éventuelle du groupement d'intérêt n'est pas signalée par le fluorophore (on ne sait alors pas si le fluorophore observé comporte encore ou non le groupement d'intérêt), ces sondes *on/off* peuvent alors répondre à cette principale lacune par une désactivation de leur fluorescence en cas de perte du fragment d'intérêt. Ainsi, la fluorescence observée ne concerne alors que le thérapeutique intact.



**Figure 99.** Représentation schématique d'une sonde intelligente *on/off*.

Enfin, un troisième type de sonde existe, à savoir les sondes bi ou multicolores, dont la détection du phénomène tel qu'un relargage d'un principe actif induit un changement de couleur de fluorescence (**Figure 100**). L'avantage de ces sondes est double : elles permettent de suivre la sonde tout au long de son évolution *in situ*, tout en ayant une information sur l'intégrité de la sonde. Le changement de couleur (*i.e.* déplacement du maximum d'émission) doit être suffisant pour permettre une détection par les outils d'imagerie actuels *in vivo* (de l'ordre de 30 nm minimum, valeur informative qui nous a été avancée par la société Fluoptics). Ce changement de longueur d'onde de fluorescence serait alors dû à une augmentation ou une diminution de l'écart énergétique entre la LUMO et HOMO de la sonde, provoquée par la perte du principe actif.

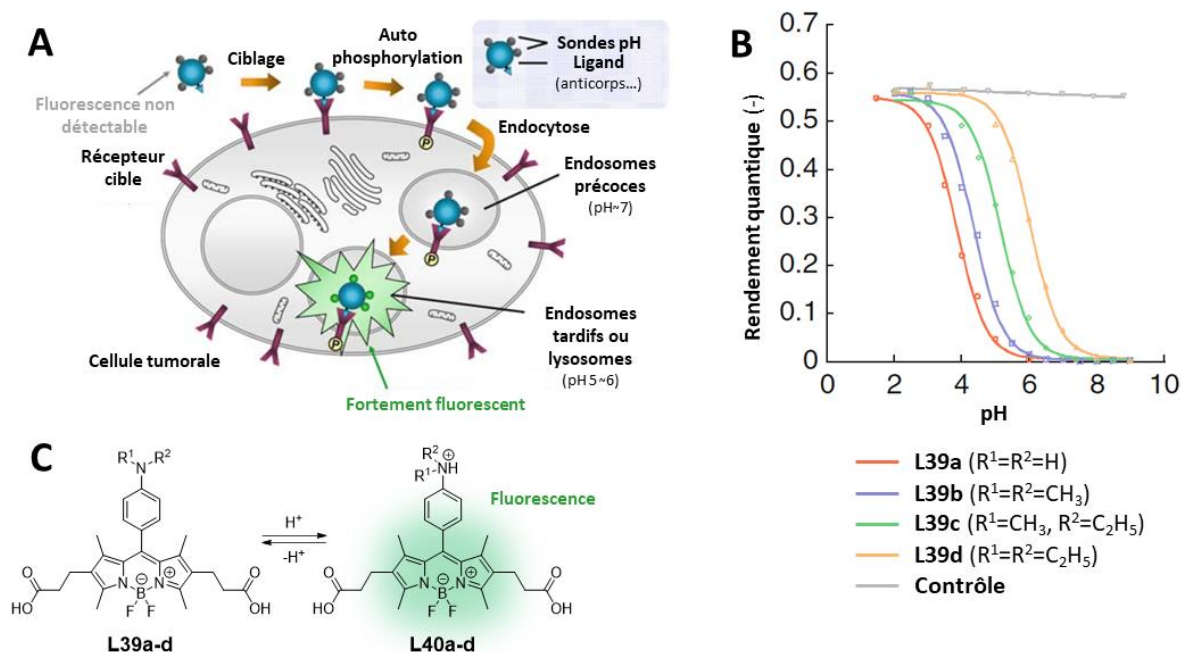


**Figure 100.** Représentation schématique d'une sonde intelligente multicolore.

### 2.1.2 Applications des sondes fluorescentes intelligentes

Le caractère intelligent d'une sonde fluorescente peut être exploité pour une multitude d'applications.

Certains groupes ont ainsi développé des fluorophores dont l'objectif est d'imager spécifiquement les cellules tumorales. Dans ce cas, la stratégie est d'utiliser une sonde dont la fluorescence peut être activée par un ou plusieurs paramètres physiologiques une fois internalisée au sein des cellules tumorales. Ainsi, le groupe d'Urano a développé un dérivé de BODIPY **L39** vectorisé pouvant être internalisé au sein de cellules tumorales (**Figure 101**).<sup>246</sup> Le pH plus acide, de l'ordre de 5-6, au sein du lysosome ou des endosomes provoque alors une modification structurale du fluorophore, activant ainsi la fluorescence. Une étude photophysique des composés à pH variable montre qu'une augmentation de pH induit une extinction complète de la fluorescence, le rendement quantique passant ainsi de 55 % à moins de 1 %.



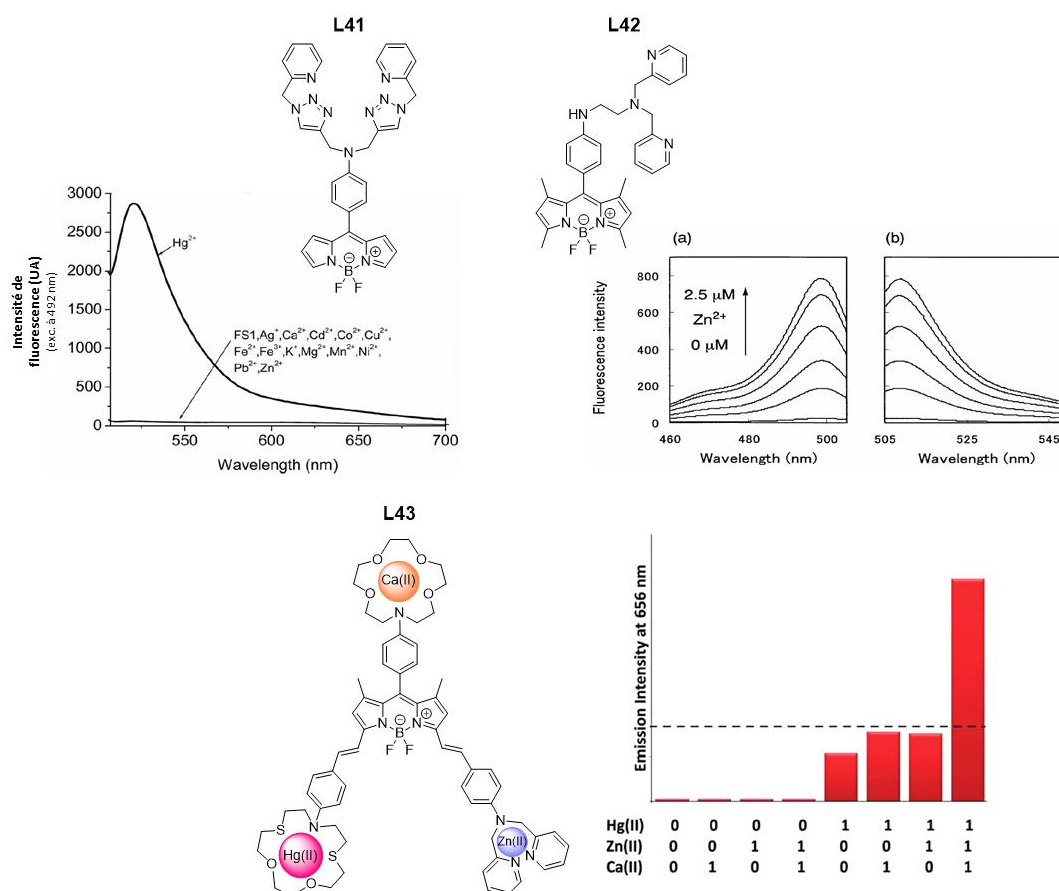
**Figure 101.** **A** : Représentation schématique de l'utilisation de sondes pH-activables pour une imagerie de cellules tumorales. **B** : Réponse du rendement quantique des diverses sondes et d'un composé contrôle (ne présentant pas d'amine sur le phényle en position méso) à une variation de pH. **C** : Structure générale de la sonde sous forme inactivée (**L39a-d**) et activée (**L40a-d**). Adapté de Asanuma *et al.*<sup>246</sup>

D'autres groupes tels ceux de Kobayashi ou de Bogdanov se sont quant à eux intéressés à l'exploitation de la présence d'enzymes au sein des cellules dont l'action sur la sonde active la fluorescence.<sup>247,248</sup> L'intérêt apporté par de telles sondes est une amélioration significative du rapport signal/bruit, pouvant être d'un grand intérêt pour une application en chirurgie assistée par fluorescence.<sup>249</sup>

Le caractère intelligent peut également traduire la faculté d'une sonde à mettre en valeur un processus cellulaire tel l'apoptose, permettant ainsi d'étudier plus en profondeur les mécanismes déclenchant de tels phénomènes.<sup>250</sup> D'autres processus physiologiques cellulaires tels que l'activité enzymatique peuvent également être imagés par l'utilisation de sondes intelligentes.<sup>251</sup>

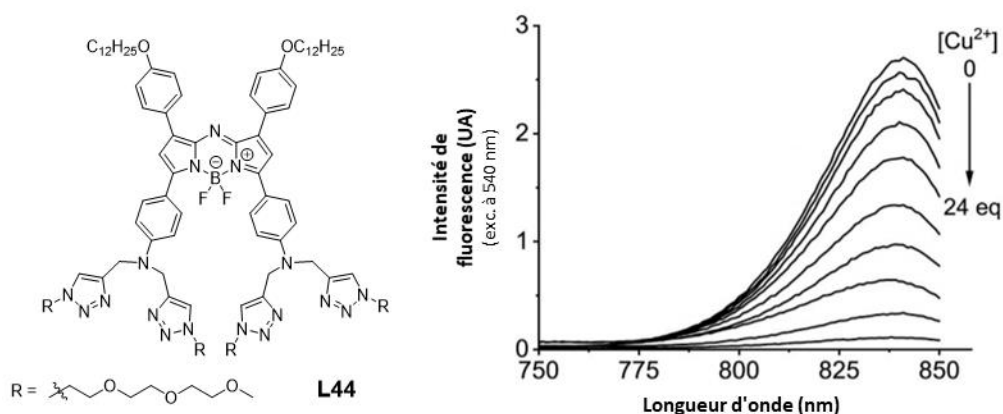
L'intelligence d'une sonde peut également être reflétée par sa capacité à changer de comportement en fonction d'espèces avec lesquelles elle est mise en contact. Dans ce cas, on parle alors de « capteur ». L'objectif de ces sondes est alors de détecter la présence d'une espèce en particulier. En ce qui concerne l'utilisation de fluorophores de la famille des BODIPYs, un large panel de systèmes ont ainsi été développés dans les vingt dernières années, que ce soit pour la détection d'ions métalliques<sup>252-267</sup> ou pour la détection de molécules ioniques ou neutres.<sup>268-270</sup> Certains auteurs ont également reporté des systèmes sensibles aux UV<sup>271,272</sup> ou au pH.<sup>273-275</sup> L'utilisation de ces systèmes en tant que capteurs est très prometteuse et de potentielles applications dans le domaine biologique, en particulier la détection d'ions métalliques dans les cellules, ont déjà été signalées.<sup>252,257,261</sup> De tels détecteurs d'ions peuvent s'avérer très spécifiques de la cible pour laquelle ils sont conçus. Plusieurs auteurs ont montré que cela peut être utilisé pour divers ions, tels que Zn(II)<sup>255</sup> pour **L42**, Cu(II),<sup>257</sup> Hg(II),<sup>264</sup> Ca(II)<sup>265</sup> et que les sondes ainsi

synthétisées sont spécifiques de ces ions. Bozdemir *et al.* ont également créé un système de type porte logique **L43**, dont l'intensité de la fluorescence est modulée par la présence simultanée dans un même milieu des ions Hg(II), Zn(II) et/ou Ca(II) (**Figure 102**).<sup>270</sup>



**Figure 102.** Exemples de sondes *off/on* fluoresçant en présence d'ions mercuriques,<sup>252</sup> d'ions zinciques<sup>255</sup> ou en présence simultanée d'ions mercuriques, zinciques et/ou calcium.<sup>270</sup> Les graphes représentant la réponse de l'intensité de fluorescence en présence d'ions mercuriques pour **L41** ou d'ions zinciques pour **L42** sont adaptés respectivement de Vedamalai *et al.*<sup>252</sup> et de Koutaka *et al.*<sup>255</sup> L'impact sur l'intensité de fluorescence de la réponse de type porte logique de **L43** est adapté de Bozdemir *et al.*<sup>270</sup>

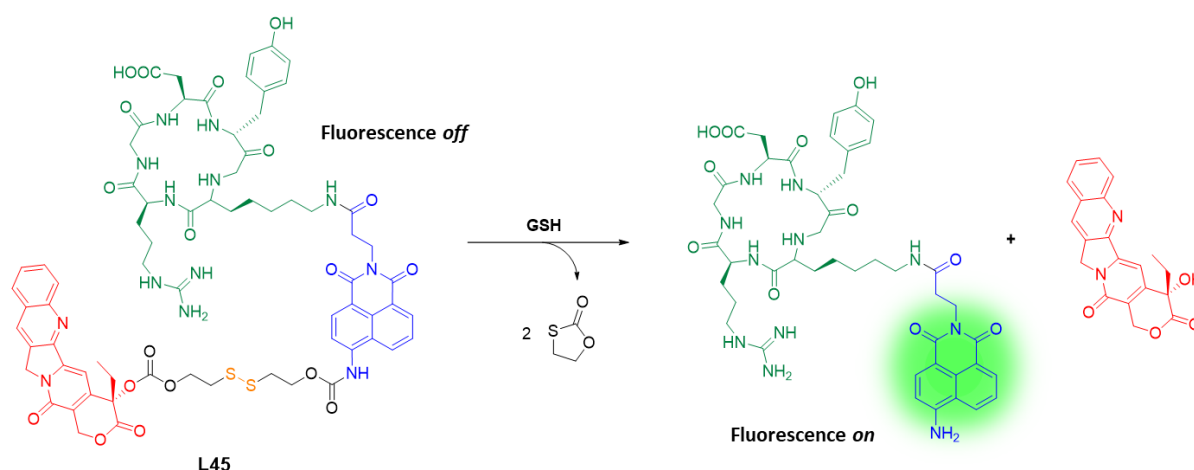
Récemment, Zuo *et al.* ont développé un nouvel azaBODIPY capable de détecter sélectivement les ions Cu(II) (**Figure 103**).<sup>276</sup> Le comportement de ce système est de type *on/off*, la fluorescence étant quenchée lors de l'ajout d'ions cuivriques. L'un des intérêts majeurs à ce système est que la sonde est capable d'émettre dans le proche infrarouge avec un maximum en émission de 838 nm dans le dichlorométhane.



**Figure 103.** Sonde *on/off* développée par Zuo *et al.* Le graphe représentant la réponse de l'intensité de fluorescence en présence d'ions cuivreux est adapté de Zuo *et al.*<sup>276</sup>

Une autre approche des sondes *off/on* peut être celle impliquant le développement de prodrogues, une prodrogue étant un composé inactif qui est métabolisé *in vivo* en un composé actif. Dans ce cas, l'objectif est de créer un tandem sonde-prodrogue, pour lequel le relargage de la prodrogue (qui passe alors sous sa forme activée) induit l'apparition de la fluorescence de la sonde.

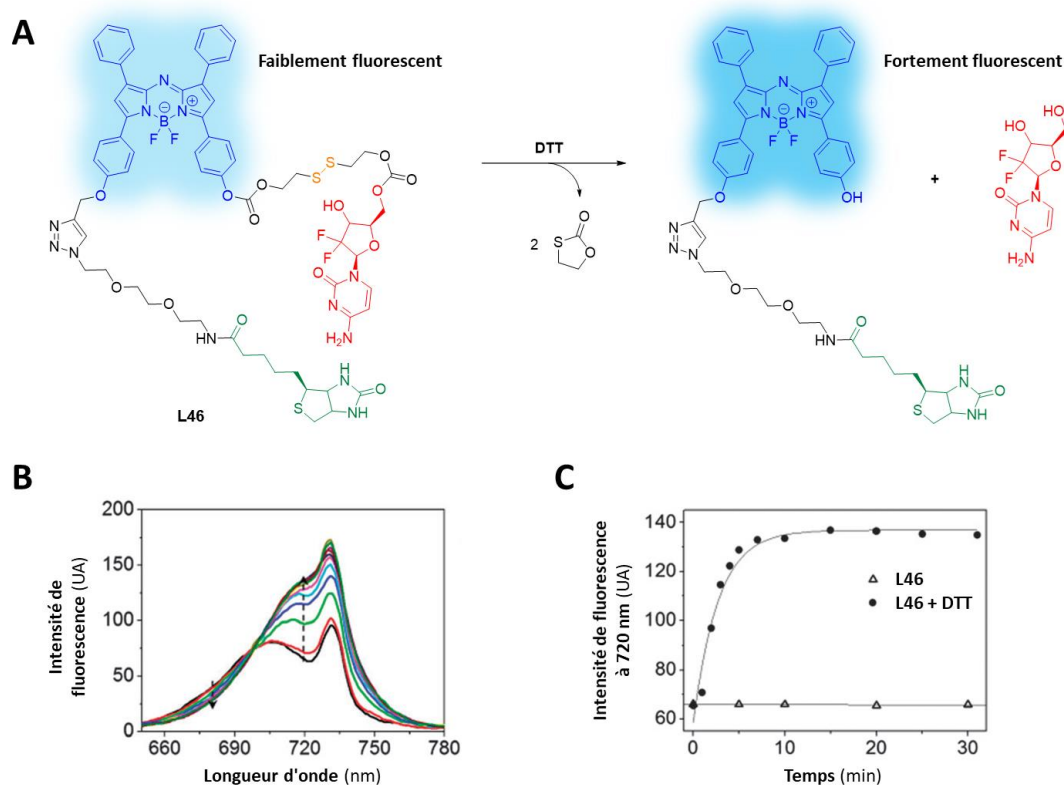
L'équipe de Lee *et al.* a ainsi développé une sonde vectorisée par un peptide RGD, combinant un naphthalimide profluorescent à une prodrogue camptothécine (CPT) par le biais d'un pont disulfure clivable en présence de GSH (**Schéma 19**).<sup>277</sup> La camptothécine et ses dérivés sont des alcaloïdes connus pour avoir une action cytotoxique sur les cellules par action sur la topoisomérase I.<sup>278,279</sup> Cependant, leur forte toxicité est un frein pour la thérapie.<sup>280</sup> Afin de contourner ce problème, une stratégie étudiée aujourd'hui consiste en l'utilisation d'une sonde permettant le transport d'une prodrogue de la camptothécine (non toxique) jusqu'à sa cible, relarguant alors le principe actif.



**Schéma 19.** Action de la GSH sur la sonde **L45** composée d'une prodrogue de la camptothécine (rouge), d'une sonde profluorescente (bleue), d'un vecteur RGD (vert) et d'un pont disulfure (orange) clivable.

Le composé **L45** est supposé être internalisé par endocytose de par la présence du peptide RGD. Les travaux de Lee *et al.* ont ainsi pu montrer que l'action de la GSH est à l'origine du relargage de la camptothécine.

Cependant, les fluorophores utilisés restreignent souvent l'utilisation de ces composés à des études *in vitro*, leur domaine de fluorescence étant situé en deçà de la fenêtre de transparence optique. Certaines équipes se sont alors focalisées sur l'étude de sondes amenant à une émission dans le NIR. L'utilisation de dérivés de cyanines ou encore de dicyanométhylène s'est montrée particulièrement probante, permettant d'atteindre un rapport signal/bruit élevé.<sup>281,282</sup> Certains travaux ont également porté sur l'utilisation de BODIPYs et d'azaBODIPYs pour une utilisation en tant que sonde intelligente.<sup>130,283</sup> Ainsi, en 2013, l'équipe de Kim a développé un dérivé d'azaBODIPY permettant de repérer l'activation de la prodrogue de gemcitabine lors de l'action de la GSH (**Schéma 20**). Dans ce cas, le composé obtenu n'est pas à proprement parler une sonde *off/on*, l'azaBODIPY étant faiblement fluorescent avant relargage de la prodrogue. L'inconvénient est que par rapport à une véritable sonde *off/on*, le contraste est moins marqué, pouvant amener à un marquage moins précis. Pour ce composé, par action du dithiothréitol, l'intensité de fluorescence de l'azaBODIPY double à 720 nm. Cette étude a pu montrer que le composé **L46** est spécifique des cellules tumorales exprimant des récepteurs à biotine et que l'internalisation par endocytose permet un relargage du principe actif.



**Schéma 20.** **A** : Action de la GSH sur la sonde intelligente **L46** composée d'une prodrogue de la gemcitabine (rouge), d'une sonde profluorescente azaBODIPY (bleue), d'un vecteur biotine (vert) et d'un pont disulfure (orange) clivable. **B** : Évolution temporelle de l'intensité de fluorescence lors du traitement de **L46** (10  $\mu$ M) en présence de 5 mM de DTT (analogue de la GSH). **C** : Évolution temporelle de l'intensité de fluorescence à 720 nm de **L46** et de **L46** en présence de DTT. Adapté de Bhuniya *et al.*<sup>130</sup>

Cependant, l'inconvénient majeur à ces composés concerne le manque d'information sur le comportement de la sonde avant relargage du principe actif. En effet, une zone d'ombre persiste à ce niveau, le tandem sonde-prodrogue étant invisible de par l'absence de fluorescence. Les informations de pharmacocinétique ou de biodistribution ne sont alors pas accessibles. C'est pourquoi, certains groupes se sont focalisés ces dernières années sur le développement de théranostiques fluorescents intelligents, pour lesquels un suivi *in situ* est possible à tout instant. De même que pour les théranostiques classiques, il faut garder à l'esprit qu'un théranostique intelligent résultant du couplage entre une sonde et un principe actif présente des caractéristiques pharmacocinétiques qui lui sont propres et qui devront être déterminées. Néanmoins, toutes les stratégies utilisées pour influencer la fluorescence des capteurs pourront être avantageusement exploitées pour la conception d'agents théranostiques intelligents.

### 2.1.3 Vers des théranostiques fluorescents intelligents

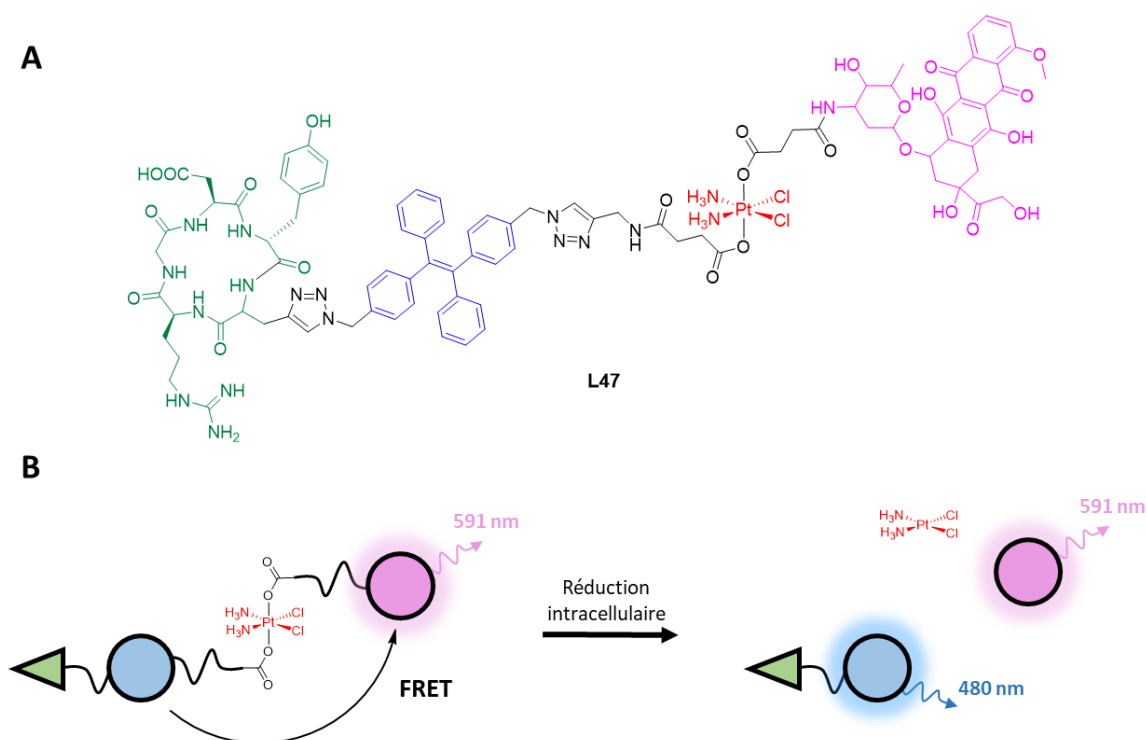
Un intérêt considérable est porté au développement de nouveaux agents thérapeutiques anticancéreux. Les limites des traitements actuels (effets secondaires, inefficacité des traitements chez certains patients...) poussent les laboratoires à tenter d'améliorer les systèmes développés actuellement. Ce travail d'optimisation des thérapies actuelles se heurte au fait que les mécanismes régissant le caractère cytotoxique ne sont pour la plupart que peu voire pas connus. Un travail de compréhension approfondi des mécanismes d'action des principes actifs a été initié depuis une quinzaine d'années par le développement d'agents théranostiques, comme nous avons pu le voir en partie 1.1. Ces travaux ont pu montrer tout l'intérêt de coupler un principe actif à une sonde, permettant dans certains cas de mettre en lumière des mécanismes encore insoupçonnés. Avec l'avènement des théranostiques, de nouveaux questionnements ont vu le jour. Une curiosité particulière est portée sur l'identification du lieu (organelle, cytoplasme...) et du moment où le principe actif est relargué sur sa cible dans le cas d'une prodrogue, mais également sur l'intégrité du théranostique *in vitro* et *in vivo* dans le cas où il n'y a pas besoin d'activation du composé. De telles questions ne peuvent pas être abordées par l'utilisation de théranostiques fluorescents classiques, dont la fluorescence continue ne donne pas d'indications autres que sur le positionnement du fluorophore.

Les théranostiques intelligents visent donc à répondre à cette nouvelle problématique. L'intégration d'une réponse, sous forme d'un changement au niveau du signal de fluorescence émis, à une modification de l'environnement du théranostique (tel que la perte du fragment à visée thérapeutique) peut apporter de nouveaux éléments sur leur comportement *in situ*.

Les dérivés de platine(II) sont les anticancéreux les plus utilisés aujourd'hui.<sup>284</sup> Leur toxicité et effets secondaires sont cependant des freins à leur utilisation et de nombreuses équipes travaillent à leur optimisation. Un intérêt particulier a été porté sur le développement de prodrogues de platine(IV), moins toxiques avant réduction en platine(II), pouvant réduire les effets indésirables de ces anticancéreux et améliorer leur tolérance par les patients.<sup>285</sup> Les mécanismes impliqués dans la réduction de ces complexes ne sont cependant pas élucidés à ce jour et l'utilisation de théranostiques intelligents peut alors permettre d'apporter des éléments de réponse.<sup>286</sup>



Le groupe de Liu a ainsi développé plusieurs systèmes permettant de détecter le lieu et le moment où le complexe de platine(IV) est réduit *in situ* en platine(II).<sup>287-289</sup> L'un de ces théranostiques, basé sur un système incorporant un fluorophore dont l'émission est régie par l'agrégation, s'est révélé particulièrement utile pour suivre l'activation du principe actif dans les cellules.<sup>287</sup> Un système similaire a également permis de visualiser, à la suite de l'action cytotoxique du platine(II), le déclenchement de l'apoptose grâce à l'activation du fluorophore par action de la caspase 3, produite lors de l'apoptose.<sup>288</sup> Un système très élégant a pu être développé par ce même groupe. Le théranostique contenant la prodrogue peut alors être suivi *in situ* par fluorescence, le lieu et moment du relargage du principe actif étant alors marqué par l'activation de la fluorescence d'un second fluorophore. Ce système se base sur l'exploitation de l'effet FRET (**Figure 104**).<sup>289</sup> Le fluorophore jouant le rôle d'accepteur dans le couple FRET est ici la doxorubicine, qui permet de détecter la réduction du complexe de platine, tout en jouant le rôle d'un second agent thérapeutique.

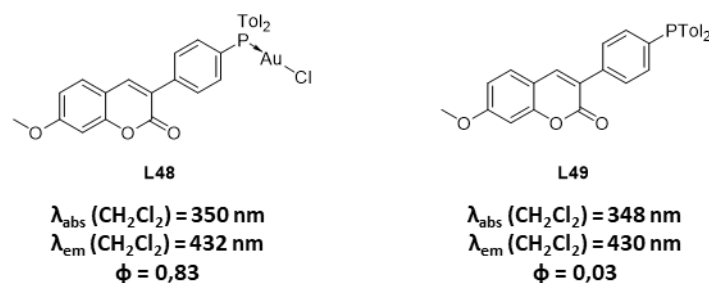


**Figure 104.** A : Théranostique intelligent **L47** composé d'une prodrogue de platine(IV) (rouge), d'une sonde profluorescente tétraphényle (bleue), d'une sonde fluorescente (violette) et d'un vecteur dérivé de RGD (vert). B : Représentation schématique de l'impact de la réduction intracellulaire du platine(IV) en platine(II).

L'intérêt d'un tel système est de révéler la pharmacocinétique du théranostique *in situ*, qui restait alors inconnu dans le cas de sondes *off/on* ne présentant qu'un seul fluorophore.

Au sein de notre équipe, la notion de théranostique intelligent a été abordée par la synthèse et l'étude de coumarines phosphines.<sup>239</sup> Ces travaux ont permis de montrer que la cytotoxicité de ces composés provient du complexe phosphine-or et non d'un produit de dégradation. Afin de déterminer cela, une sonde intelligente type *off/on* a été développée, dont la fluorescence dépend de la liaison P-Au (**Figure 105**). Cette étude a alors pu démontrer que le complexe **L48** reste intact jusqu'à 48 h *in vivo* chez le poisson-zèbre, la forte fluorescence observée et la stabilité de son

intensité étant alors des témoins de l'intégrité de la liaison P-Au. La cytotoxicité de ce composé a pu être évaluée *in vitro* sur lignées de cellules cancéreuses humaines du côlon (SW480 et HCT116) et sur cellules cancéreuses humaines mammaires (MDA-MB-231 et MCF7), révélant des valeurs d'IC<sub>50</sub> selon les lignées étudiées variant entre 30 μM et 50 μM.



**Figure 105.** Coumarine théranostique (**L47**) et sonde décomplexée (**L48**) développées par notre laboratoire.<sup>239</sup>

Cependant, le développement de sondes *off/on* présente un inconvénient majeur qui réside dans le manque d'information sur l'emplacement et l'état de la sonde *in situ* avant activation de la fluorescence. De même, dans le cas d'une sonde *on/off*, il n'est pas possible de faire la différence entre un passage en mode *off* et une éventuelle dégradation de la sonde. Au-delà de ce concept de sonde intelligente, on perçoit alors le besoin de développer des agents thérapeutiques pouvant être suivi à tout instant *in situ* et dont l'intégrité serait renseignée par la sonde qui y est greffée. Il est alors nécessaire de penser à un nouveau type de sondes intelligentes qui répondrait aux lacunes des sondes *on/off* ou *off/on* : les sondes bi(multi)colores. À l'aide d'une plateforme fluorescente capable de changer de longueur d'émission en fonction de son environnement, il serait alors possible de déterminer la pharmacocinétique, la biodistribution du composé, mais aussi et surtout de confirmer – ou non – son intégrité lors de son évolution *in vivo*. À plus long terme, il pourrait être possible de déterminer s'il y a interaction ou non avec certaines enzymes.

Dans l'optique de s'orienter vers ce genre de théranostiques intelligents multicolore, ou plus précisément, de concevoir un système de suivi du relargage d'un principe actif, l'équipe de Zhu a publié en 2016 le composé **L50**, dont la longueur d'onde d'émission est modulée par la présence de la prodrogue de camptothécine (**Figure 106**).<sup>290</sup>

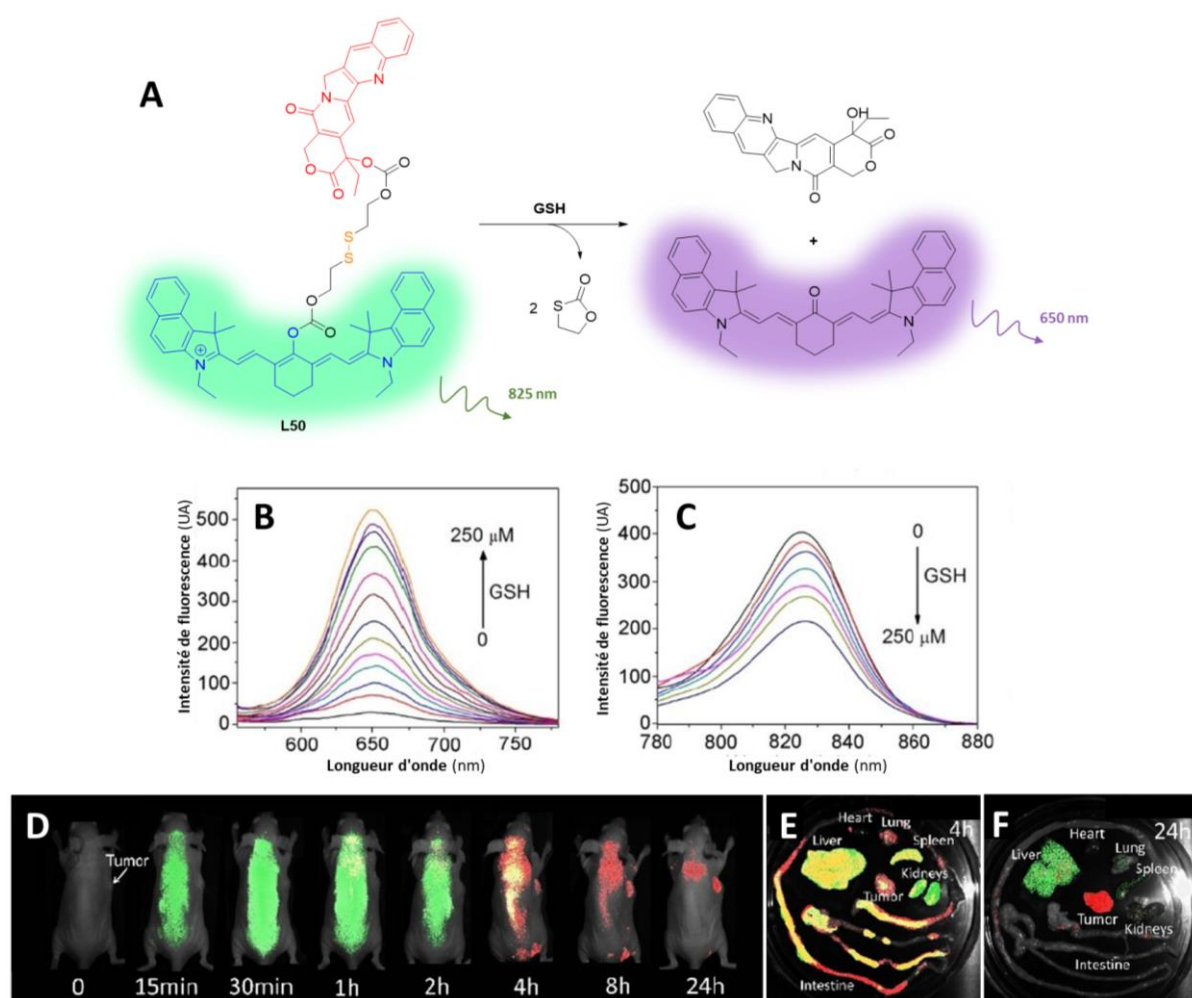
Les propriétés photophysiques du composé ont pu être évaluées et ont montré un comportement dual de la sonde spécifique de l'action de la GSH. Lors de l'ajout de GSH, un déplacement hypsochrome (déplacement vers de plus faibles longueurs d'ondes) du maximum d'émission est noté, l'intensité de fluorescence dans le NIR-I ( $\lambda_{\text{ex}} = 825 \text{ nm}$ ) diminuant et laissant place à l'apparition d'un signal intense à 650 nm. Ceci témoigne alors du relargage du principe actif.

Afin de vectoriser le composé lors des tests *in vivo*, celui-ci est encapsulé au sein de nanoparticules de polyéthylène glycol-acide polylactique (PEG-PLA), dont l'utilisation clinique est approuvée en Corée du Sud.<sup>291</sup> Après une rapide distribution du théranostique dans le corps entier de la souris (15 min), une activation du principe actif est visible 4 h post-injection. Cette activation est réalisée dans tous les organes comme en attestent les études *ex vivo*. La tumeur étant cependant le lieu où l'activation du principe actif a été la plus durable, un signal fluorescent à 650 nm étant mesuré

jusqu'à après 24 h. La forte concentration de GSH au sein des cellules tumorales (certaines études montrant des concentrations jusqu'à dix fois supérieure à celle des cellules normales<sup>292,293</sup>) est probablement à l'origine de cette activation prolongée et intense au sein de la tumeur.

La principale limitation de ce système étant l'activation de la sonde au sein de la totalité des organes, l'équipe de Zhu a ainsi développé par la suite un système multicolore nécessitant à la fois une activation par une variation de pH et par action de la GSH.<sup>294</sup> Ce système de type porte logique a permis de réduire l'activation parasite au sein d'autres organes, permettant une sélectivité plus élevée pour la tumeur.

Les travaux de Zhu mettent en valeur l'intérêt que peuvent avoir les sondes multicolores pour l'étude et la compréhension des mécanismes impliqués dans l'action d'antitumoraux organiques.



**Figure 106.** (A) Théranostique intelligent multicolore **L50** composé d'une prodrogue de camptothécine (rouge), d'une sonde fluorescente cyanine (bleue) et d'un pont disulfure (orange) clivable en présence de GSH. (B, C) Spectres d'émissions lors du titrage d'une solution à 5 μM de **L50** dans un mélange DMSO/PBS (4:6, pH = 7,4) par une solution de GSH (0 à 250 μM) à 37 °C. Les spectres sont réalisés 15 min après ajout de GSH. (D) Distribution *in vivo* des nanoparticules chargées en prodrogue après injection intraveineuse de 5 μmol/kg. La fluorescence en vert indique que la prodrogue est intacte ( $\lambda_{ex} = 750$  nm), une fluorescence rouge témoigne de l'activation du principe actif ( $\lambda_{ex} = 530$  nm). (E, F) Distribution *ex vivo* 4 h et 24 h après injection intraveineuse de la prodrogue. Adapté de Ye *et al.*<sup>290</sup>

À ce jour cependant, aucun théranostique intelligent multicolore dédié à l'étude de principes actifs métalliques n'a été publié. Un véritable intérêt pour de tels composés existe cependant. Ils permettraient alors le suivi d'un principe actif, tout en ayant des informations sur l'intégrité de l'ensemble sonde/principe actif. Apparaît alors ici une véritable nécessité de développer de nouveaux théranostiques dédiés à l'étude du comportement *in vitro* et *in vivo* d'agents thérapeutiques métalliques.

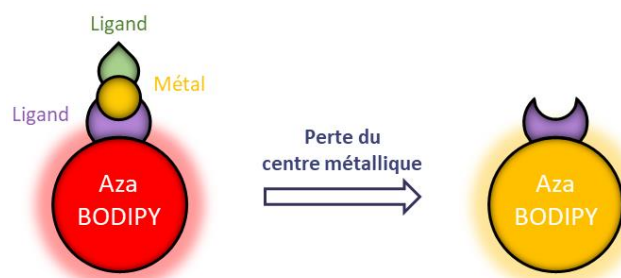
### 2.2 But du projet

Nombre de composés théranostiques ont pu être développés jusqu'à aujourd'hui. Cependant, pour la grande majorité des cas, il n'est pas possible de savoir si, *in situ*, le principe actif est toujours attaché à la sonde ou non. En effet, même si des tests de stabilité en milieu physiologique, sérums... sont réalisés, il est impossible de simuler la complexité et la variété des milieux biologiques, en particulier *in vivo*. Ce point induit donc une incertitude, et c'est avec l'objectif de combler cette lacune que des sondes intelligentes de type *on/off* ont été développées. Dans ce cas, le composé fluorescent suivi *in situ* est alors bien le tandem sonde-principe actif intact. Apparaissent cependant d'autres limitations inhérentes à ce genre de sondes.

Il est en effet impossible de différencier un relargage du principe actif (dans le cas d'une prodrogue), d'une dégradation ou d'une excrétion du composé. Il n'est pas non plus possible de suivre le devenir de la partie thérapeutique une fois que la liaison entre celle-ci et la sonde est rompue. Ce manque d'information quant à la stabilité, l'intégrité et le devenir du théranostique a alors mené à la naissance du concept d'un nouveau type de sonde qui permettrait non seulement de déterminer si le principe actif est relargué, mais également d'être informé à tout moment de l'intégrité de la sonde.

Le concept d'un théranostique intelligent basé sur l'exploitation d'une sonde multicolore réagissant à son environnement répond à cette problématique. Par cette capacité à changer de longueur d'onde d'émission en réponse à une modification environnementale, une telle sonde peut théoriquement permettre, en plus du suivi de la molécule *in vivo*, de renseigner sur l'intégrité et le devenir de la partie thérapeutique.

Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous avons décidé de nous focaliser sur la synthèse d'un théranostique multicolore basé sur un tandem azaBODIPY-complexe métallique, pour lequel une modification de l'environnement du fluorophore induirait un changement significatif du maximum de longueur d'onde d'émission (**Figure 107**).



**Figure 107.** Représentation schématique de l'objectif visé pour le développement d'azaBODIPYs théranostiques métalliques intelligents.

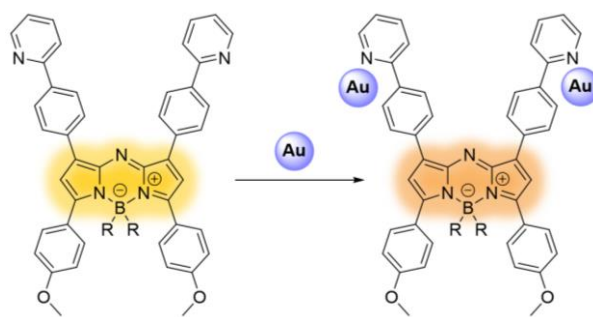
Pour réaliser cela, nous avons ciblé un azaBODIPY porteur de groupements capables de chélater un centre métallique. Afin que la présence du centre métallique puisse avoir une influence significative sur les propriétés photophysiques du fluorophore (permettant un changement de couleur lors de la perte du métal), nous nous sommes intéressés à la synthèse de molécules pour lesquelles le ligand est directement conjugué au cœur azaBODIPY. L'extension du système conjugué du fluorophore, ainsi que l'introduction de groupements d'effets électroniques variés, est à l'origine d'un effet dit « *push-pull* », qui va modifier les propriétés photophysiques de l'azaBODIPY.<sup>295</sup> En ce qui concerne la partie chélatante, nous avons en particulier investigué la 2-phénylpyridine ainsi que la 2,2'-bipyridine qui, comme cela sera plus amplement abordé dans la suite de ce chapitre, sont d'excellents chélatants pour un large panel de centres métalliques. Pour les métaux, nous nous sommes en particulier focalisés sur l'or, le ruthénium, l'iridium et le cuivre, pour lesquels les propriétés thérapeutiques sont bien connues.<sup>218,296–298</sup>

## 2.3 Développement d'azaBODIPYs théranostiques intelligents

### 2.3.1 Cibles moléculaires

Comme cela a été précisé précédemment, nous nous sommes focalisés dans cette partie sur deux types de ligands pour la chélation des métaux : la 2-phénylpyridine et la 2,2'-bipyridine. La 2-phénylpyridine est un ligand intéressant pour l'introduction de métaux, qu'il s'agisse de l'or,<sup>299,300</sup> du ruthénium,<sup>301,302</sup> ou encore du platine.<sup>303,304</sup> De même, la 2,2'-bipyridine est connue pour sa capacité à chélater de nombreux métaux tels que le cuivre, le ruthénium, le platine, l'iridium ou encore l'osmium.<sup>303,305-307</sup>

Nous avons opté initialement pour la chélation de l'or à la 2-phénylpyridine (**Figure 108**). L'intérêt de ce ligand est sa conjugaison directe avec le cœur du fluorophore, pouvant ainsi impacter les propriétés photophysiques du fluorophore lors de la complexation d'un centre métallique.



**Figure 108.** Déplacement bathochrome (vers de plus hautes valeurs de longueur d'onde) du maximum d'émission par complexation de la sonde à l'or.

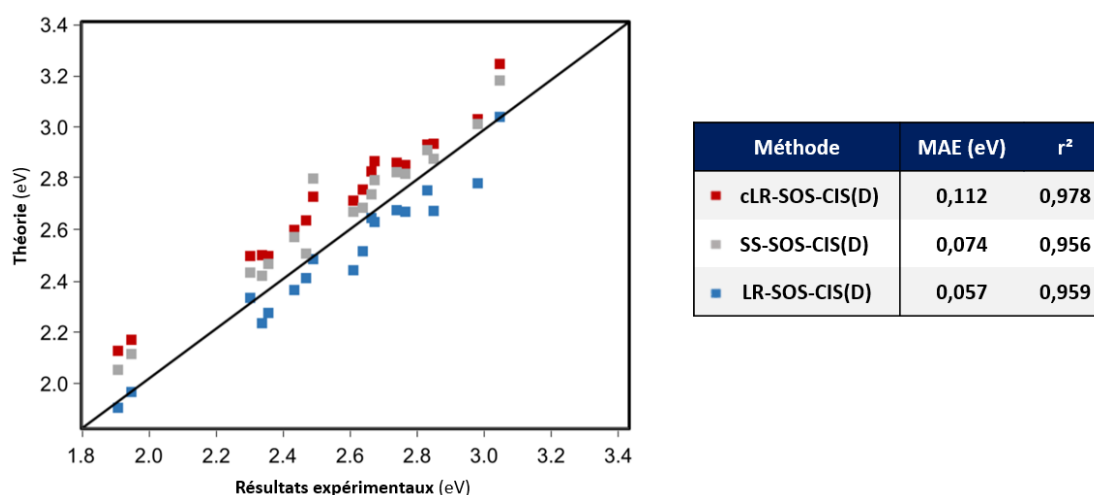
### 2.3.2 Calculs théoriques

Les calculs théoriques ont été réalisés à l'ICMUB par le Pr Fleurat-Lessard, le Dr Ponce-Vargas et Florent Desroches.

L'objectif des calculs théoriques réalisés ici est de déterminer s'il est possible de prédire l'impact de la présence ou non d'un ou plusieurs atomes métalliques sur les propriétés photophysiques du fluorophore. Pour cela, notre objectif a été de synthétiser une petite famille de dérivés d'azaBODIPYs et de comparer leurs propriétés photophysiques expérimentales à celles calculées théoriquement. Dans le cas où les résultats des simulations de chimie quantique seraient en bon accord avec les valeurs expérimentales, nous serions dans la capacité de déterminer quelles molécules pourraient présenter des caractéristiques intéressantes avant même de les avoir synthétisées. Ceci permettrait un gain de temps conséquent au laboratoire, nous permettant de nous consacrer uniquement à la synthèse des molécules ayant donné des résultats probants par les calculs. Dans le cas des travaux présentés ici, l'objectif est de synthétiser des composés dont la perte du ou des centres métalliques situés sur le fluorophore induirait un déplacement du maximum de longueur d'onde en émission de l'ordre de 30 nm. Une première série de composés dont la synthèse a été envisagée au laboratoire ont ainsi été étudiés théoriquement.

Nous avons utilisé la méthode de calcul développée par l'équipe de Jacquemin qui couple deux approches.<sup>308</sup> Dans un premier temps, nous utilisons une approche DFT dépendante du temps (*time-dependant density functional theory* : TD-DFT) dont l'objectif est d'obtenir la géométrie des molécules tout en tenant compte des effets de solvant au niveau excité. Pour cette méthode, plusieurs types d'approches peuvent être utilisées pour modéliser les effets de solvants sur la densité de l'état excité telles LR (*linear response*), cLR (*corrected linear response*) ou encore SS (*state-specific*). Dans le cadre d'études sur des BODIPYs ou azaBODIPYs, ces trois méthodes de traitement du solvant au niveau excité ont été étudiées et leur justesse par rapport aux résultats expérimentaux a été évaluée (**Figure 109**).<sup>308,309</sup>

Cependant, les méthodes TD-DFT ne sont pas adaptées pour traiter une partie de l'énergie d'excitation. Ainsi, dans une deuxième étape, nous utilisons des méthodes plus précises telles que SOS-CIS(D) qui permettent de calculer l'énergie d'excitation plus précisément, ce qui est nécessaire dans le cas de fluorophores.



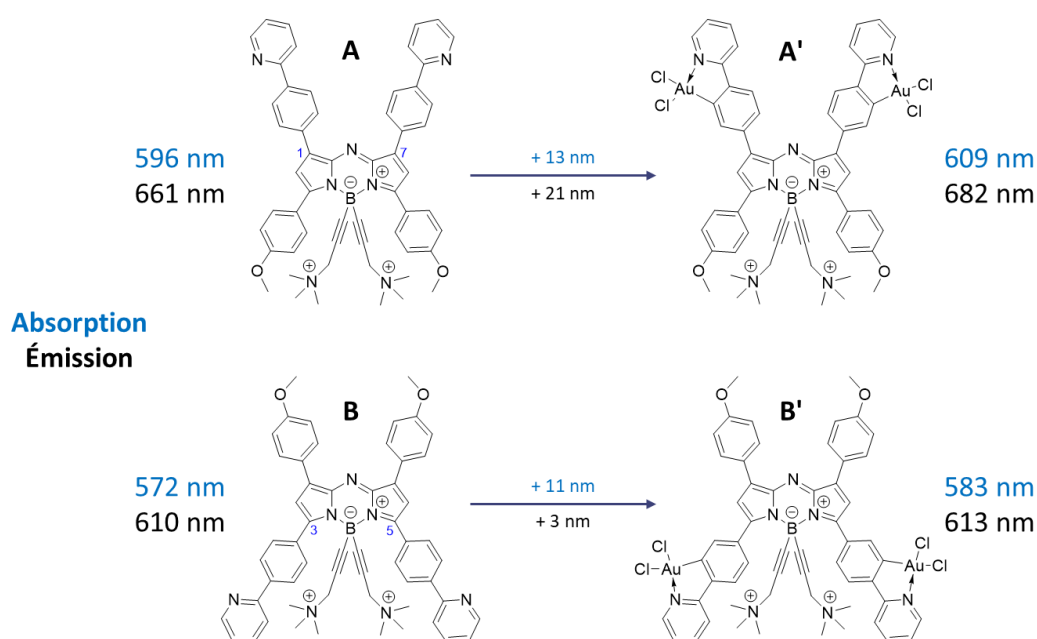
**Figure 109.** Comparaison entre méthodes cLR-SOS-CIS(D), SS-SOS-CIS(D) et LR-SOS-CIS(D) lors d'une étude sur une famille de BODIPYs. La ligne centrale représente une correspondance parfaite entre résultats expérimentaux et théoriques. Adapté de Ponce-Vargas *et al.*<sup>309</sup>

Deux facteurs principaux, permettent de renseigner sur la justesse des résultats avancés par les calculs théoriques. D'une part, la correspondance entre résultats théoriques et expérimentaux est indiquée par la déviation moyenne absolue (MAE) des valeurs calculées par rapport aux résultats expérimentaux (sur le graphe en **Figure 109**, une déviation nulle correspond à un point situé sur la diagonale, témoignant d'une excellente correspondance entre résultats théoriques et expérimentaux). Le second facteur à prendre en compte est la corrélation expérience/théorie traduite par la valeur du coefficient directeur de la droite des valeurs théoriques obtenues.

Les méthodes SS-SOS-CIS(D) et LR-SOS-CIS(D) donnent toutes deux des déviations moyennes absolues faibles de respectivement 0,074 eV et 0,057 eV par rapport aux résultats expérimentaux, ainsi que des corrélations aux résultats expérimentaux, traduites par des valeurs de r<sup>2</sup> de 0,965 et 0,959 respectivement. Ces corrélations sont moins bonnes que pour la méthode cLR-SOS-CIS(D), pour laquelle r<sup>2</sup> = 0,978. Une correction des résultats donnés par cLR-SOS-CIS(D) est cependant

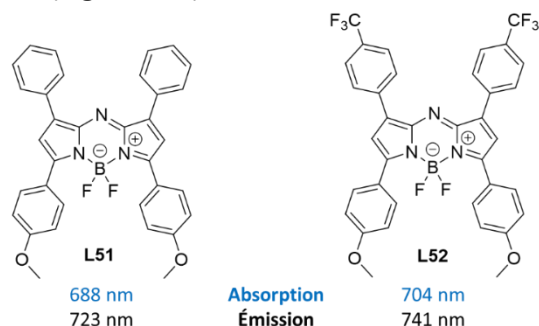
nécessaire afin de compenser la surestimation des valeurs traduite par une MAE de 0,112 eV. Une valeur de MAE proche de 0,1 eV est jugée comme étant particulièrement satisfaisante, les erreurs lors de calculs avec une méthode TD-DFT étant de l'ordre de 0,2-0,3 eV pour des fluorophores.<sup>309</sup> Ainsi, la méthode cLR-SOS-CIS(D) a été choisie pour la réalisation des calculs théoriques présentés dans la suite de ce chapitre.

L'étude s'est portée initialement sur un premier set de fluorophores azaBODIPYs. Nous nous concentrerons ici sur les dérivés comportant un ligand 2-phénylpyridine, qui a été choisi pour ses capacités de complexation de certains métaux. Deux positions du ligand sur le cœur azaBODIPY ont été étudiées afin de déterminer le dérivé présentant potentiellement le plus grand déplacement de fluorescence lors de la métallation (**Figure 110**). Le solvant considéré a été le DMSO.



**Figure 110.** Résultats des calculs théoriques montrant l'impact de la métallation de la 2-phénylpyridine sur les maximums en absorption (bleu) et émission (noir) de deux azaBODIPYs complexés en position 1,7 (A') ou 3,5 (B').

L'écart prononcé de 50 nm entre les maximums d'émission des molécules **A** et **B** est à souligner. Ce phénomène a été reporté en 2014 par Jiao *et al.*, dont les travaux mettent en lumière l'effet bathochrome de l'introduction de groupements aux effets électroniques différents en positions 1,7 et 3,5 du cœur azaBODIPY (**Figure 111**).<sup>295</sup>



**Figure 111.** Maximums en absorption et émission dans le chloroforme des composés **L51** et **L52** décrits par Jiao *et al.*<sup>295</sup> Les composés ont été excités à 670 nm.



De plus, il semble que l'introduction d'un métal sur le composé **B**, dont le ligand se situe en position pyrrolique 3,5, n'a que peu d'impact sur la longueur d'onde maximale d'émission. Il faut cependant garder à l'esprit que ces valeurs comportent des incertitudes, représentées par la valeur de la MAE. Dans le cas de l'étude sur les azaBODIPYs, une incertitude de 11 nm est mesurée. Ainsi, pour la molécule **B**, la MAE est trop élevée pour que des conclusions, à ce stade de l'étude, puissent être tirées.

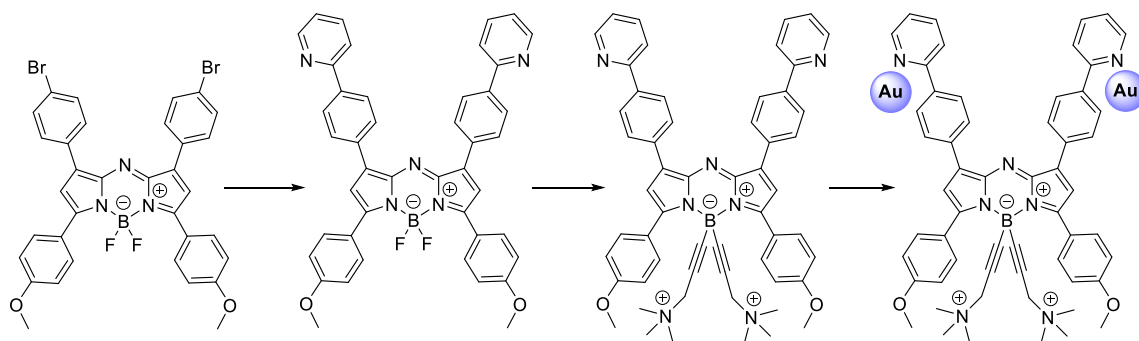
Pour ces deux raisons, la molécule **B** n'a pas été retenue pour la suite de ce projet. En revanche, pour le composé **A**, dont le ligand est situé en position 1,7, un déplacement bathochrome de 21 nm est noté. Ce déplacement en émission peut être exploité pour le développement d'une sonde multicolore, dont la perte du métal serait ainsi clairement marquée.

Les résultats préliminaires apportés par les calculs théoriques nous ont donc orientés vers la synthèse du composé **A**.

### 2.3.3 Synthèse par couplage de Suzuki sur l'azaBODIPY 1,7-(2-bromophényle)

#### Stratégie de synthèse

Nous avons décidé de synthétiser le dérivé de 2-phénylpyridine à partir de l'azaBODIPY 1,7-(2-bromophényle). L'intérêt de ce composé est qu'il présente deux positions bromées pouvant être engagées dans une réaction de couplage permettant la formation du ligand 2-phénylpyridine. L'objectif est ensuite d'améliorer la solubilité du composé par l'introduction de bras hydrosolubilisants sur l'atome de bore. Enfin, la métallation des ligands doit permettre d'obtenir la sonde désirée (**Figure 112**).

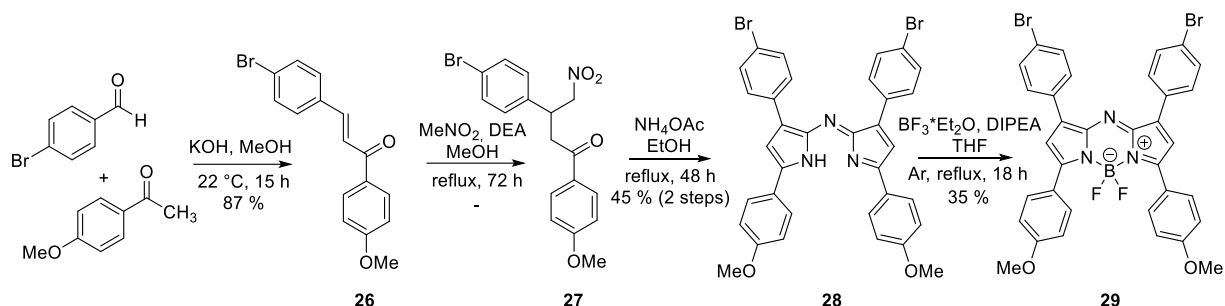


**Figure 112.** Synthèse envisagée pour l'obtention de la sonde intelligente azaBODIPY-or.

#### Synthèse de l'azaBODIPY 1,7-(2-bromophényle)

L'azaBODIPY di-bromé a été synthétisé et décrit par le Dr Pliquett. La synthèse de ce composé est possible à l'échelle du gramme avec un rendement global de 14 %. La synthèse en quatre étapes pour l'obtention du composé **29** est similaire à celle de l'azaBODIPY **4** précédemment décrit (**Schéma 21**). Une première étape de crotonisation en milieu basique nous a permis d'obtenir l'énone **26**. L'addition de Michael a ensuite été réalisée en présence de diéthylamine en tant que base, menant à la formation de **27**, composé non isolé. La formation de l'azadipyrrrométhène **28** a été réalisée dans l'éthanol en présence d'un large excès d'acétate d'ammonium, le composé étant isolé par précipitation. L'introduction du bore a ensuite été réalisée en présence de 12 équivalents

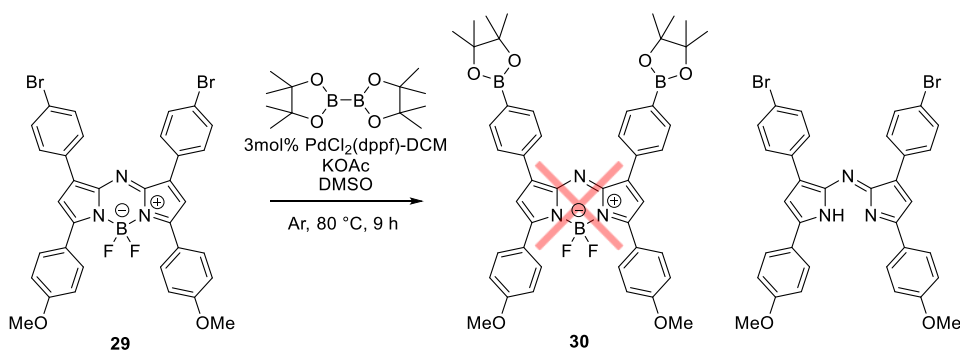
de DIPEA et de 12 équivalents d'éthérate de trifluorure de bore et nous permet, après passage du brut réactionnel sur plug de silice, d'isoler l'azaBODIPY **29**.



**Schéma 21.** Synthèse du précurseur azaBODIPY BF<sub>2</sub> **29**.

### **Introduction d'un ester boronique sur l'azaBODIPY 1,7-(2-bromophényle)**

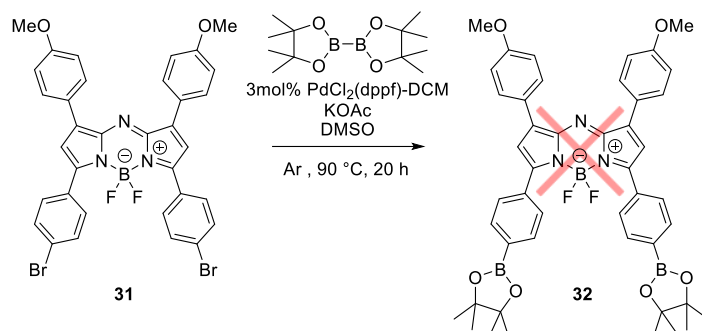
Nous avons tout d'abord décidé d'introduire un ester boronique sur l'azaBODIPY **29**. L'intérêt étant que la synthèse d'un tel dérivé d'azaBODIPY permettrait par la suite de greffer une grande variété de ligands par couplage de Suzuki. Pour cette réaction, nous nous sommes inspirés des travaux de l'équipe de Miyaura qui décrit l'introduction d'un pinacolborane sur un aryle halogéné par catalyse au palladium.<sup>310</sup> Dans notre cas, nous avons tenté d'introduire un ester boronique sur chaque position bromée (**Schéma 22**). Cette réaction a été réalisée en présence de quantités catalytiques de PdCl<sub>2</sub>(dppf)-DCM. Le choix d'une base faible telle KOAc est basé sur l'observation de Ishiyama *et al.* concernant le risque que le produit de la réaction de couplage puisse réagir sur le dérivé bromé lors de l'utilisation d'une base plus forte telle K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.



**Schéma 22.** Tentative d'introduction d'un ester boronique sur l'azaBODIPY **29**.

Le suivi de cette réaction a été réalisé par RP-HPLC-MS et deux observations peuvent être faites. Dès 30 minutes de réaction, nous avons observé l'apparition du dérivé déboré. De plus, après 9 h à 80 °C, une multitude de signaux était alors visible, attribuable au dérivé déboré (majoritaire) et à des produits de dégradation. La conclusion la plus probable pour un tel résultat est que l'instabilité du bore lors de la réaction empêche le couplage d'avoir lieu.

Cette réaction a également été tentée avec deux bromophényles en position 3,5 sur le cœur azaBODIPY, dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment (**Schéma 23**). Le composé **31** utilisé pour cette réaction a été synthétisé par le Dr Pliquet.

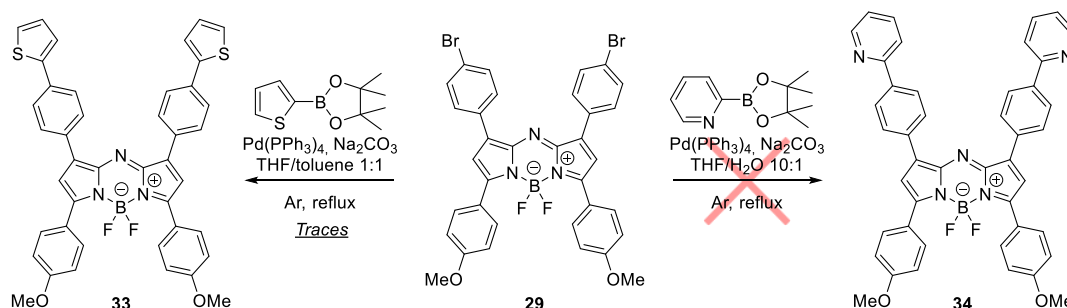


**Schéma 23.** Tentative d'introduction d'un ester boronique sur l'azaBODIPY **31**.

De même, la réactivité des atomes de brome semble très faible et, dans les conditions décrites par Ishiyama *et al.*, seule une déboration partielle du réactif est observée en CCM.

### Réaction d'un ester boronique sur l'azaBODIPY 1,7-(2-bromophényle)

Afin de palier l'obstacle rencontré lors de la tentative d'introduction de l'ester boronique, nous avons tenté une autre approche consistant à faire réagir les positions Ph-Br sur un ester boronique, permettant de substituer les atomes de brome par un autre groupement. Pour cela, nous nous sommes intéressés à deux groupements en particulier, à savoir le 2-thiophène et la 2-pyridine. Les conditions réactionnelles sont tirées des travaux de Khan *et al.* (**Schéma 24**).<sup>311</sup> Dans ce cas, nous avons eu recours à l'utilisation de tétrakis(triphénylphosphine) palladium(0) en tant que catalyseur. Contrairement aux réactions précédentes (**Schéma 22** & **Schéma 23**), il a été possible d'utiliser dans ce cas une base plus forte telle que  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , le produit obtenu suite au couplage ne pouvant pas réagir avec une autre espèce du milieu.



**Schéma 24.** Couplage de Suzuki sur le dérivé **29** pour l'introduction d'un 2-thiophène (gauche) ou d'une 2-pyridine (droite).

Lors de la tentative d'introduction de la 2-pyridine, seule la déboration du réactif **29** a pu être notée dans les conditions réactionnelles étudiées.

L'objectif de l'introduction du 2-thiophène était de vérifier si le résultat obtenu avec la 2-pyridine était similaire. Par un suivi CCM et RP-HPLC-MS, nous avons pu montrer que la réaction mène principalement à la perte de l'atome de bore de l'azaBODIPY **29**, comme cela a été le cas pour la tentative de formation du composé **34**. À la suite d'une purification sur colonne de silice (DCM/pentane (3:7) vers DCM pur), le composé d'intérêt a cependant pu être identifié sous forme de traces (3 mg), avec une pureté inférieure à 90 %. Par RP-HPLC-MS et RMN  $^1\text{H}$ , il nous a été possible d'avancer que le produit obtenu était bien le résultat du couplage de Suzuki (**Figure 113**).

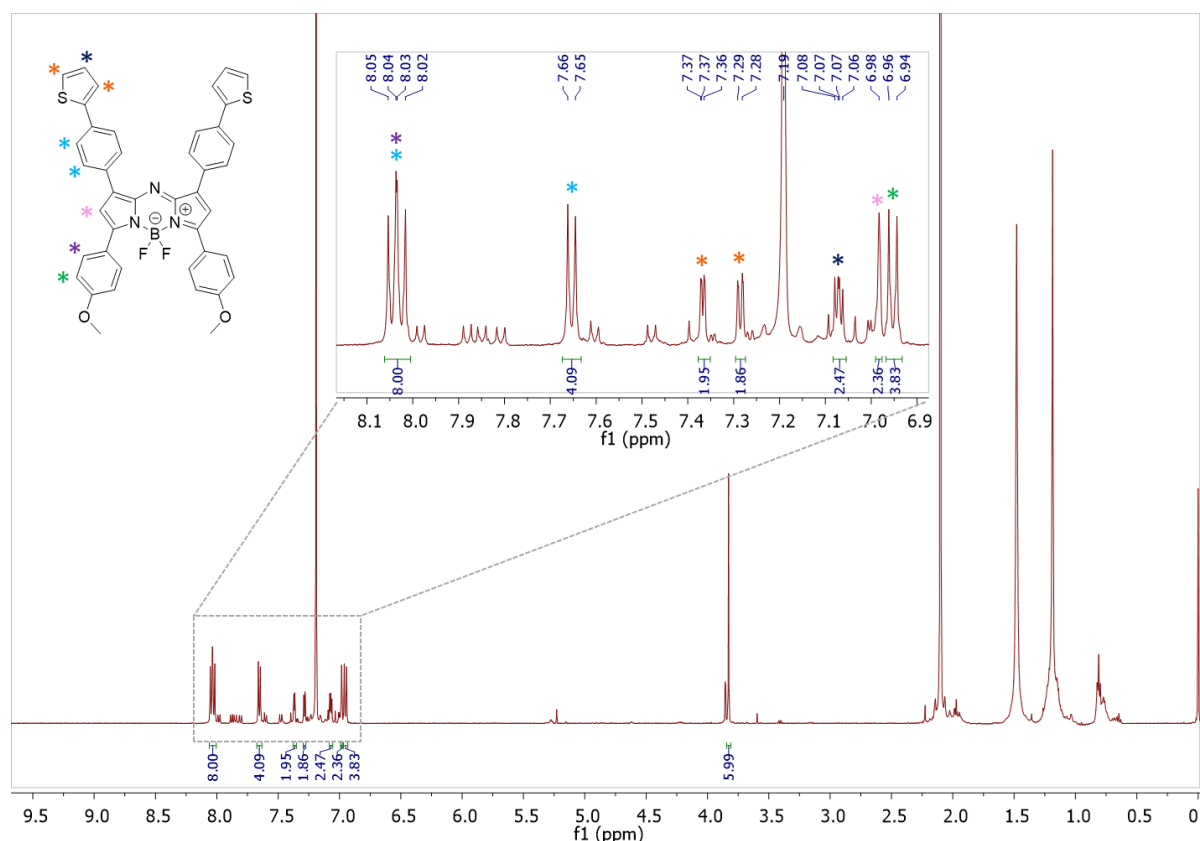


Figure 113. RMN <sup>1</sup>H du composé **33** (non pur) obtenu après colonne chromatographique (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz).

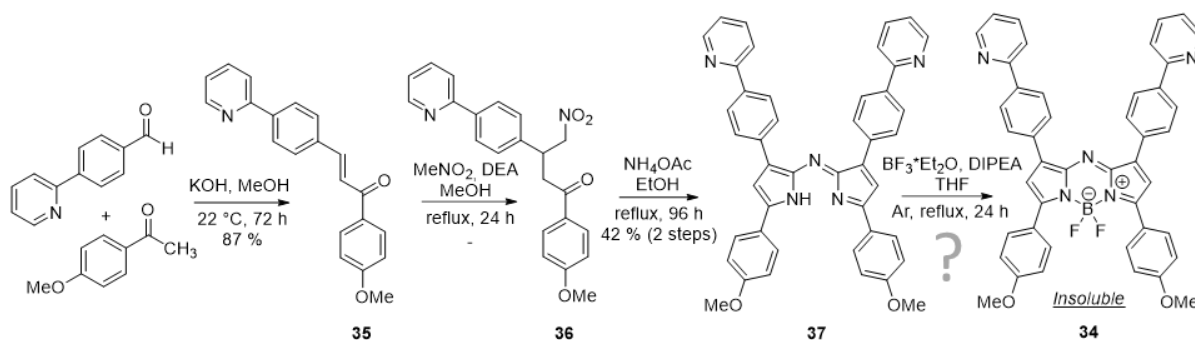
### 2.3.4 Introduction des ligands dès le début de la synthèse

Suite aux échecs des tentatives d'introduction des ligands par couplage de Suzuki sur le cœur azadiapyrrométhène, nous avons décidé d'introduire les ligands dans la synthèse des azadiapyrrométhènes dès le début de leur synthèse. Dans cette optique, deux ligands en particulier ont été étudiés avec d'une part le ligand 2-phénylpyridine et le ligand 2,2'-bipyridine.

#### 2.3.4.1 Synthèse de l'azaBODIPY 1,7-(2-phénylpyridine)

##### Synthèse

Cette synthèse se présente en quatre étapes (Schéma 25). À la suite de la crotonisation, l'addition de Michael du nitrométhane sur l'énone nous a permis de former le composé **36** non isolé. Après 96 h à reflux dans l'éthanol et en présence d'un large excès d'acétate d'ammonium, l'azadiapyrrométhène **37** a été obtenu après précipitation dans le dichlorométhane avec un rendement global pour les deux dernières étapes de 42 %. Cependant, à la suite de la tentative d'introduction de l'atome de bore sur l'azaBODIPY **34**, il n'a pas été possible d'exploiter ni de caractériser le composé qui en résulte, sa solubilité dans les solvants organiques étant particulièrement faible.

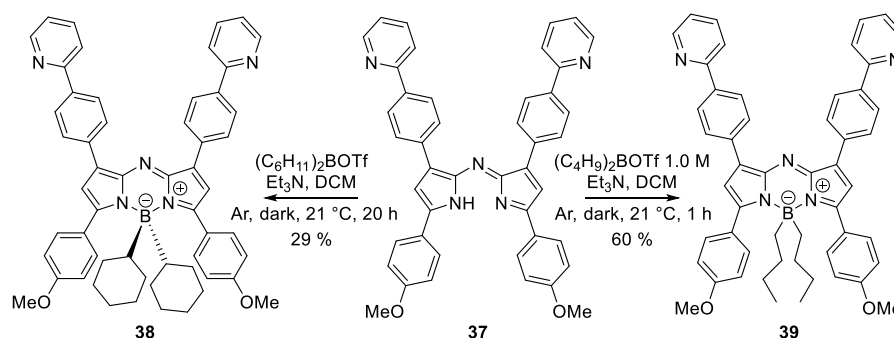


**Schéma 25.** Synthèse de l'azadiopyrométhène 2-phénylpyridine **37**.

Afin de s'affranchir des problèmes de solubilité liés à l'introduction d'un atome de bore porteur de fluorures, nous avons décidé de nous intéresser à deux autres stratégies de boration de l'azadiopyrométhène. Ces deux stratégies comportent l'avantage d'introduire un atome de bore porteur de groupements plus encombrants que des fluorures ce qui, dans notre cas, peut mener à une diminution du *stacking* de l'azaBODIPY obtenu. Ces deux stratégies vont être présentées dans les lignes suivantes.

### Introduction d'un bore BR<sub>2</sub>

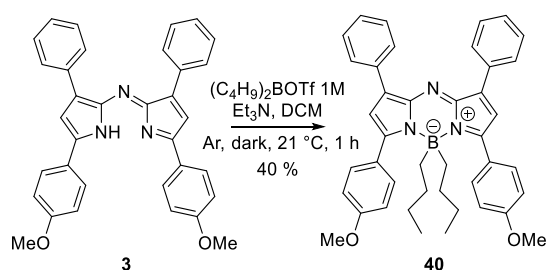
Nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'introduction d'un atome de bore porteur d'alcanes. Deux dérivés commerciaux BR<sub>2</sub> ont été utilisés et ont permis la synthèse de deux nouveaux azaBODIPYs à partir de l'azadiopyrométhène **37** (**Schéma 26**). Les conditions réactionnelles ont été tirées des travaux de Berhe *et al.*, décrivant l'introduction de dibutylbore sur un azadiopyrométhène tétraphényyle.<sup>312</sup> Les conditions réactionnelles sont similaires pour les deux réactions. L'azadiopyrométhène **37** a été solubilisé au préalable dans du dichlorométhane sec en présence de triéthylamine fraîchement distillée, sous atmosphère d'argon. Le triflate de bore (sous forme solide pour (C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>)<sub>2</sub>BOTf et en solution 1,0 M pour (C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>2</sub>BOTf) a ensuite été ajouté et la réaction, protégée de la lumière, a été suivie par CCM. Une purification sur colonne chromatographique nous a permis d'isoler le dérivé boré correspondant. Dans le cas du dibutyle de bore, ce protocole a permis d'obtenir le composé pur avec un rendement de 60 %, ce qui reste cohérent avec les résultats de Berhe *et al.*, qui ont obtenu un rendement de 88 % sur l'azadiopyrométhène tétraphényyle. En revanche, dans le cas du dicyclohexyle de bore, un rendement plus faible de 10 % est à signaler dans les mêmes conditions réactionnelles que celles employées pour la synthèse de l'azaBODIPY **39**. Une augmentation du temps de réaction à 20 h mène à un rendement de 29 %, qui semble être un palier dans les conditions utilisées. Cette différence de rendement entre le dibutyle et le dicyclohexyle de bore peut s'expliquer par un encombrement de l'atome de bore supérieur dans le cas où celui-ci est porteur de deux cyclohexyles, pouvant ainsi perturber la réaction d'introduction du groupement boré au sein de l'azadiopyrométhène.



**Schéma 26.** Introduction de dicyclohexylbore (gauche) et de dibutylbore (droite) sur l'azadipyrométhène **37**.

Ces composés ont pu être caractérisés en HRMS et en RMN, confirmant leur structure. Le déplacement chimique de l'atome de bore est alors respectivement de 0,95 ppm pour **38** et de 2,59 ppm pour **39**. Ces valeurs sont à mettre en comparaison avec le déplacement chimique de l'atome de bore dans le cas d'un azaBODIPY BF<sub>2</sub> de l'ordre de 0 ppm. Une récente publication de Panchavarnam *et al.* concentrée sur l'étude de BODIPYs indique que le signal obtenu en RMN du bore est particulièrement dépendant de la nature des groupements qui y sont liés.<sup>313</sup> Il est ainsi possible d'observer, par rapport au composé BF<sub>2</sub>, un blindage ou un déblindage du signal selon la nature des groupements alcanes ou aryles.

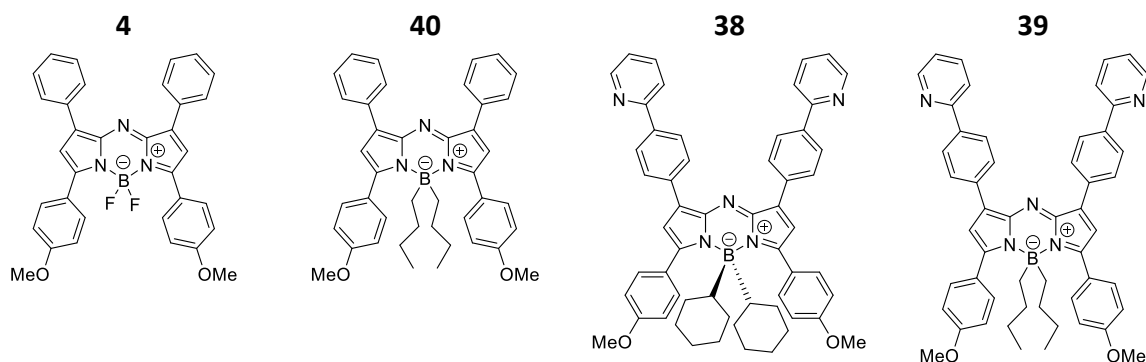
À la suite de la synthèse avec succès de ces dérivés d'azaBODIPYs, nous avons décidé de déterminer leurs propriétés photophysiques, l'un des objectifs principaux étant de déterminer l'influence des groupements alcanes sur l'atome de bore sur la fluorescence (par rapport au groupement BF<sub>2</sub> en particulier). N'ayant cependant pas pu synthétiser le composé **34**, nous ne pouvons pas comparer sa fluorescence à celle des azaBODIPYs **38** et **39** et ainsi déduire l'impact de la présence d'alcanes sur l'atome de bore sur l'intensité de fluorescence. Nous avons donc décidé d'évaluer cela par la synthèse d'un azaBODIPY plus simple, dont la fluorescence est connue pour le dérivé BF<sub>2</sub>, et de comparer les propriétés photophysiques des deux azaBODIPYs. Ainsi, le dérivé **40** a été synthétisé dans les mêmes conditions que celles décrites pour le dérivé **39**, à savoir sous atmosphère inerte, à l'abri de la lumière et à température ambiante (**Schéma 27**). La purification a été réalisée sur colonne chromatographique de silice et a permis d'isoler l'azaBODIPY **40** avec un rendement de 40 %.



**Schéma 27.** Introduction de dibutylbore sur l'azadipyrométhène **3**.

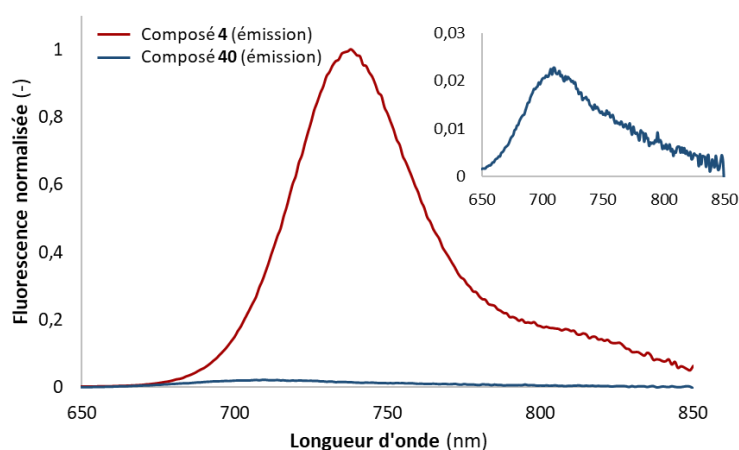
Nous pouvons alors comparer les propriétés photophysiques de **40** avec l'azaBODIPY analogue comportant deux fluors sur l'atome de bore, **4**, et faire ainsi le parallèle avec les propriétés photophysiques de **38** et **39**, tout en gardant en tête que la présence du groupement pyridinyl pour ces deux composés peut avoir un impact non négligeable (**Tableau 13**).

**Tableau 13.** Données photophysiques pour les composés **4**, **38**, **39** et **40** dans le DMSO à 25 °C. La référence utilisée pour le calcul du rendement quantique est l'azaBODIPY **4** dans CHCl<sub>3</sub>.<sup>213</sup>



| Composé   | $\lambda_{\max, \text{absorption}}$<br>(nm) | $\epsilon$<br>(M <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ) | $\lambda_{\max, \text{émission}}$<br>(nm) | $\Phi$<br>(-) | Brillance<br>(M <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ) |
|-----------|---|--|---|---------------|---|
| <b>4</b>  | 702   | 85 000   | 738                                       | 0,30          | 26 000  |
| <b>40</b> | 611   | 46 400   | 713                                       | < 0,01        | -   |
| <b>38</b> | 616   | 29 700   | 729                                       | < 0,01        | -   |
| <b>39</b> | 627   | 46 700   | 724                                       | < 0,01        | -   |

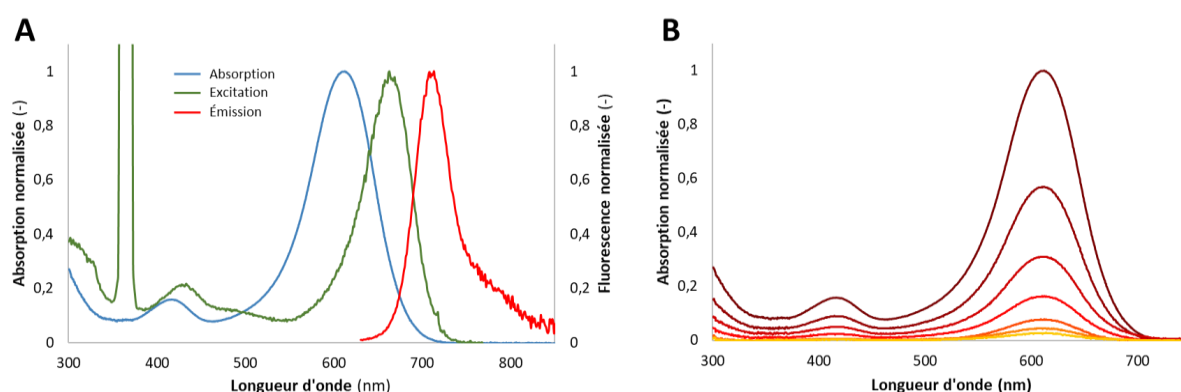
Le principal inconvénient à l'utilisation de dérivés de borane (au-delà de leur stabilité réduite par rapport à des composés BF<sub>2</sub>) est que la liaison BR<sub>2</sub> entraîne une chute drastique du rendement quantique de fluorescence. De manière identique à ce qui a pu être reporté par Berhe *et al.*, les composés **38**, **39** et **40** présentent ainsi des rendements quantiques inférieurs à 1 % (**Figure 114**).



**Figure 114.** Comparaison des spectres d'émission des composés **4** et **40** (normalisés par rapport à **4**). Ces données ont été obtenues dans le DMSO à 25 °C. Les composés ont été excités à 620 nm. L'encart donne le profil du spectre d'émission du composé **40**.

Les valeurs des maximums en absorption et émission sont également en accord avec les valeurs de la littérature pour des composés identiques. Un déplacement hypsochrome important en absorption est observé, le maximum étant situé à 702 nm pour l'azaBODIPY **4**, à comparer avec le maximum du composé **40** à 611 nm. Une tendance similaire, bien que moins importante, est à signaler pour le maximum en émission, une baisse de 25 nm étant visible entre les composés **4** et **40**.

Un point qu'il semble également intéressant de soulever est l'origine de l'écart particulièrement important entre les maximums en absorption et émission (déplacement de Stokes), proche de 100 nm, pour les composés **38**, **39** et **40**. Pour les azaBODIPYs plus « conventionnels », le déplacement de Stokes est de l'ordre de la dizaine à quelques dizaines de nanomètres. Cette classe de composés ayant été, à ce jour, très peu décrite dans la littérature, nous avons tenté de déterminer l'origine de ce déplacement important en absorption, en focalisant notre étude sur le composé **40**. Nous avons tout d'abord remarqué une grande disparité entre le spectre d'absorption et le spectre d'excitation (**Figure 115 - A**). Une éventuelle agrégation en solution a tout d'abord été envisagée pour expliquer un tel phénomène. Cependant, cette hypothèse sous-entend que les mesures effectuées n'ont pas été réalisées dans les limites de la loi de Beer-Lambert. Nous avons pu démontrer ici que ce n'est pas le cas et que pour la cascade de dilution effectuée, la loi de Beer-Lambert était bien respectée. De plus, l'aspect du spectre reste identique, que ce soit pour des concentrations faibles ou élevées, et nous n'observons pas l'apparition d'un second pic à des concentrations plus faibles (**Figure 115 - B**). Une hypothèse envisageable est que l'introduction des groupements alcanes sur l'atome de bore soit à l'origine d'une déformation du cœur azaBODIPY due à une contrainte stérique entre groupes alcane et les cycles aromatiques. Cette déformation diminuant ainsi la conjugaison entre les phényles et le cœur azaBODIPY, le système conjugué de celui-ci s'en retrouve réduit, ce qui pourrait alors expliquer un tel déplacement hypsochrome.



**Figure 115.** **A** : Spectres d'absorption, d'excitation et d'émission du composé **40** dans le DMSO à 25 °C. Les composés ont été excités à 620 nm. **B** : Superposition des spectres d'absorption du composé **40** dans le DMSO à 25 °C pour des concentrations comprises entre 6  $\mu\text{M}$  et 0,09  $\mu\text{M}$ .

Une étude identique a également pu être réalisée dans le dichlorométhane et a mené à des résultats similaires. Ces observations nous poussent donc à penser que ces caractéristiques sont inhérentes aux azaBODIPYs BR<sub>2</sub>. Plusieurs hypothèses peuvent être émises quant à l'origine de ce phénomène. Il est probable que l'introduction d'alcane à la place de fluorures puisse induire un



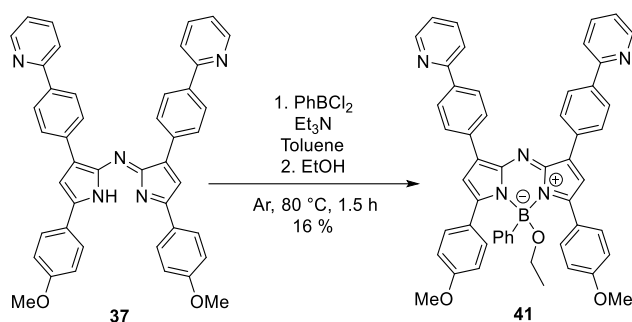
effet électronique et/ou stérique particulier. De plus, la présence de groupements mobiles tels que des alcanes peut être à l'origine d'une dissipation de l'énergie de manière non radiative. Nous pouvons envisager qu'une combinaison de ces différents paramètres soit à l'origine du comportement photophysique des azaBODIPYs BR<sub>2</sub>. Afin de déterminer avec plus de certitude ce point, des études photophysiques poussées (synthèse d'un plus large panel de composés BR<sub>2</sub>, caractérisation photophysique dans divers solvants et à des températures différentes...) seront à l'avenir nécessaires.

Nous noterons également l'aspect large du signal obtenu pour le composé **40** en absorption, qui est peu commun par comparaison avec d'autres azaBODIPYs BF<sub>2</sub>, dont les bandes d'absorption sont généralement plus fines, comme cela a pu être vu tout au long des travaux présentés précédemment dans ce manuscrit. L'hypothèse émise pouvant justifier cette observation rejoint l'idée selon laquelle l'introduction de groupements alcanes induit une torsion de la liaison entre le cœur azaBODIPY et les phényles. La torsion de la liaison peut ainsi être à l'origine de la présence de plusieurs conformères, chacun présentant une conjugaison unique et donc des caractéristiques photophysiques intrinsèques. Ainsi, le spectre d'absorption obtenu pour l'azaBODIPY serait alors la « somme » des spectres des diverses conformations. Le spectre d'excitation serait, quant à lui, dû au seul conformère « plan » de l'azaBODIPY, au système  $\pi$  le plus étendu. Cette conformation est ainsi probablement également responsable de la (faible) fluorescence mesurée.

Bien que le problème de solubilité des composés ait été résolu par l'introduction de groupements BR<sub>2</sub>, les azaBODIPYs obtenus avec le dicyclohexylbore et le dibutylbore présentent une fluorescence trop faible pour être exploitée pour les applications que nous visons. À la suite de ce constat, nous avons décidé de nous intéresser à l'introduction d'un autre dérivé de bore au sein de l'azadipyrométhène, le groupement BPhOEt.

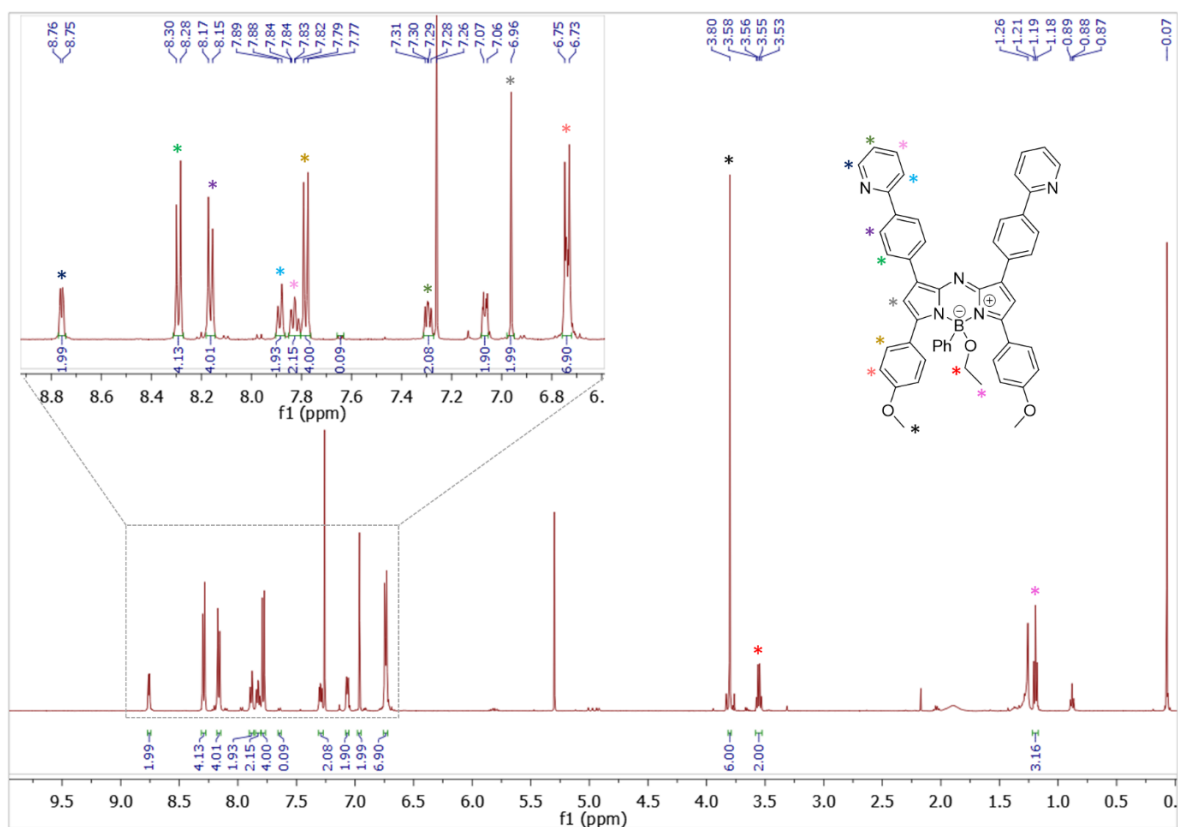
### Introduction d'un bore BPhOEt

Toujours dans l'optique de synthétiser un azaBODIPY fluorescent et à la solubilité avantageuse, nous avons tenté une autre voie de synthèse développée en 2015 par l'équipe de Vicente.<sup>314</sup> Celle-ci implique l'introduction sur un azadipyrométhène d'un chlorure de phénylborane, dont le chlorure est par la suite remplacé *in situ* par un nucléophile. Dans notre cas, nous avons introduit un éthanolate comme nucléophile lors de cette synthèse (**Schéma 28**). L'utilisation de solvants secs pour cette étape a mené uniquement à la déboration de l'intermédiaire réactionnel (supposé être le composé BPhCl) lors de l'ajout du nucléophile. Des solvants RPE non distillés ont donc été utilisés pour cette réaction et ont permis la formation du composé désiré. Une hypothèse pouvant expliquer une telle influence du solvant sur la réaction est que la présence de traces d'eau favorise la réaction, par passage par un intermédiaire de type BPhOH. L'azaBODIPY **41** a été purifié sur colonne chromatographique d'alumine et a permis d'isoler le composé avec un rendement de 16 %.



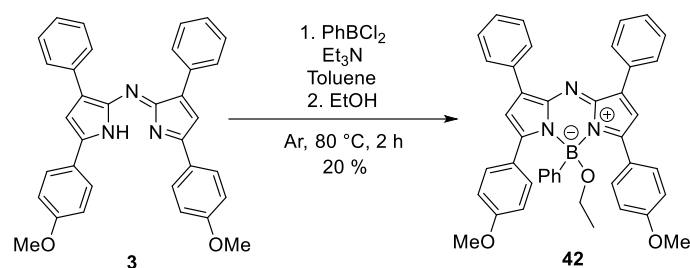
**Schéma 28.** Introduction d'un chlorure de phénylborane sur l'azadiopyrrométhène **37** et substitution du chlorure porté par l'atome de bore par un éthanolate.

L'obtention du composé **41** a été confirmée par analyse HRMS, RP-HPLC-MS et par RMN du proton (**Figure 116**). On soulignera tout particulièrement les signaux correspondant au groupement OEt à 1,19 ppm (CH<sub>3</sub>) et d'un quadruplet à 3,55 ppm (CH<sub>2</sub>). La RMN du bore indique quant à elle un signal large à 2,57 ppm, ce qui est cohérent avec les valeurs avancées dans la publication de l'équipe de Vicente pour des composés de structures similaires.



**Figure 116.** Analyse RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) du composé **41**.

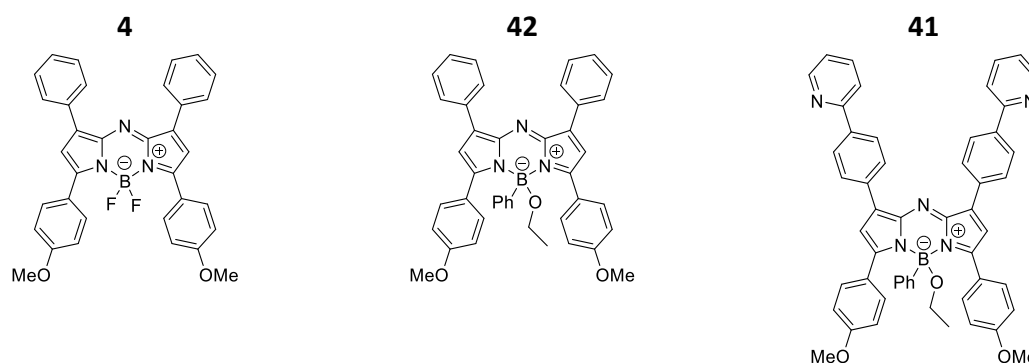
Afin de pouvoir évaluer l'impact sur les propriétés photophysiques de l'introduction du groupement BPhOEt, nous avons donc décidé, comme pour les dérivés BR<sub>2</sub>, de synthétiser un équivalent de **41** pouvant être directement comparé à l'azaBODIPY de référence **4**. Pour cela, la synthèse de l'azaBODIPY **42** a été réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment (**Schéma 29**). Une purification sur colonne chromatographique de silice nous a permis d'obtenir **42** avec un rendement de 20 %, similaire à celui obtenu dans le cas du dérivé 2-phénylpyridine **41**.



**Schéma 29.** Introduction d'un chlorure de phénylborane sur l'azadipyrométhène **3** et substitution du chlorure porté par l'atome de bore par un éthanolate.

Les propriétés photophysiques des composés **41**, **42** et de l'équivalent difluoroborane de ce dernier, **4**, sont données ci-dessous (**Tableau 14**). De par la précipitation du composé **42** dans le DMSO, empêchant l'évaluation de ses propriétés photophysiques, les composés **4**, **41** et **42** ont été étudiés dans le dichlorométhane.

**Tableau 14.** Données photophysiques pour les azaBODIPYs **4**, **41** et **42** dans le DCM à 25 °C. La référence utilisée pour le calcul des rendements quantiques des composés **4**, **41** et **42** est l'azaBODIPY **4** dans  $\text{CHCl}_3$ .<sup>213</sup>



| Composé   | $\lambda_{\text{max, absorption}}$<br>(nm) | $\epsilon$<br>( $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) | $\lambda_{\text{max, émission}}$<br>(nm) | $\Phi$<br>(-) | Brillance<br>( $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) |
|-----------|--|--|--|---------------|---|
| <b>4</b>  | 687  | 74 400   | 721                                      | 0,28          | 21 000  |
| <b>42</b> | 670  | 51 000   | 706                                      | 0,19          | 10 000  |
| <b>41</b> | 685  | 58 000   | 721                                      | 0,21          | 12 000  |

Un duplicat pour la mesure des données photophysiques pour les azaBODIPYs **41** et **42** a été réalisé.

L'introduction d'un bore BPhOEt pour le composé **42** semble induire un déplacement hypsochrome des maximums en émission et absorption par rapport au composé analogue  $\text{BF}_2$  **4**. Un tel comportement a été reporté par Koch *et al.* pour des composés similaires, indiquant dans certains cas des déplacements hypsochromes de l'ordre de 20 nm en absorption et émission, ce qui est le cas ici.<sup>315</sup> L'origine de ce déplacement hypsochrome a été confirmé par l'évaluation de l'écart énergétique entre la LUMO et la HOMO des composé étudiés, dont la valeur augmente lorsque le groupement  $\text{BF}_2$  est remplacé par un groupement BPhOR.

Dans le cas du composé **41**, la présence des 2-phénylpyridines en position 1,7 de l'azaBODIPY implique un déplacement bathochrome des maximums en absorption et émission de l'ordre de 20 nm par comparaison avec le composé **42**.

De manière intéressante, le rendement quantique est quant à lui relativement peu impacté par le changement de groupements sur l'atome de bore, passant ainsi de 28 % pour le dérivé BF<sub>2</sub> **4** dans le DCM à 19 % pour le dérivé BPhOEt **42**. De même, l'azaBODIPY **41** présente un rendement quantique de l'ordre de 20 %, ce qui est en accord avec les résultats observés pour le composé **42**. Ces valeurs de rendements quantiques sont à mettre en comparaison avec les dérivés **38** et **39**, pour lesquels la présence d'un bore porteur d'alcanes induisait une extinction complète de la fluorescence comme nous l'avons vu précédemment.

Pour le coefficient d'absorption molaire des composés **41** et **42**, les valeurs mesurées sont du même ordre de grandeur que pour l'azaBODIPY **4**. Ces valeurs, de l'ordre de 55 000 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>, permettent à ces deux composés de présenter des brillances relativement élevées de 11 000 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>.

Bien que l'introduction d'un BPhOEt à la place du BF<sub>2</sub> au sein de l'azadipyrrrométhène ne semble pas impacter significativement les propriétés photophysiques du composé, un impact sur la solubilité de la molécule dans les solvants organiques est à signaler. En effet, nous n'avons pas pu évaluer les propriétés du composé **42** dans le DMSO de par une solubilité trop faible. En revanche, le composé **41** présentait quant à lui une solubilité totale dans ce solvant. Ces résultats concernant la solubilité des composés synthétisés sont surprenants. Il semble en effet que l'introduction de groupements pyridyl en position para des phényles portés par le cœur azaBODIPY semble améliorer la solubilité en solvant organique. Il est possible qu'une torsion de la molécule par la présence de ces groupements pyridyl induise une plus faible aptitude du composé à réaliser du *π-stacking*, réduisant les risques d'agrégation en solution.

Nous avons donc réussi à obtenir, avec le composé **41**, un azaBODIPY présentant des ligands 2-phénylpyridines aux propriétés photophysiques et à la solubilité avantageuse en milieu organique. Comme nous l'avons vu, l'azaBODIPY **41** est caractérisé par un rendement quantique de 21 % et une brillance de 12 000 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>, ce qui en fait un point de départ d'intérêt pour le développement de sondes intelligentes. De plus, le défaut de solubilité auquel nous nous sommes heurtés lors des différentes tentatives de synthèse de ce dérivé d'azaBODIPY a été résolu par l'introduction d'un atome de bore porteur d'un phényle et d'un alcoolate. Ainsi, le composé **41** obtenu est entièrement soluble dans des solvants tels que le chloroforme ou le dichlorométhane et présente une solubilité plus modérée (mais non problématique pour la réalisation de réactions) dans des solvants tels que le méthanol, l'éthanol ou encore l'acétonitrile.

### 2.3.4.2 Synthèse de l'azaBODIPY 1,7-(2,2'-bipyridine)

Avant de réaliser les tests de complexation sur le composé **41**, nous nous sommes également intéressés à la synthèse d'un azadipyrrrométhène porteur d'un ligand 2,2'-bipyridine.

#### Synthèse

La synthèse de l'azadipyrrrométhène 2,2'-bipyridine est réalisée en quatre étapes, à commencer par la formation du 4'-méthyl-2,2'-bipyridine-4-carboxaldéhyde **43** (Schéma 30). Les conditions de synthèse de l'aldéhyde **43** sont tirées de la littérature.<sup>316</sup> La formation de l'énone a été réalisée en 48 h à température ambiante et le produit a été purifié par filtration et lavé au méthanol froid, permettant d'isoler la chalcone **44** avec un rendement de 71 %. L'addition de Michael a été réalisée à reflux en 40 h en présence de quantités catalytiques de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,005 eq.). Le produit **45** résultant n'a pas été isolé et a directement été impliqué dans l'étape de formation de l'azadipyrrrométhène. Après un reflux de 20 h dans l'éthanol en présence d'un large excès d'acétate d'ammonium, une purification sur colonne chromatographique d'alumine nous a permis d'isoler l'azadipyrrrométhène **46**. Le rendement global pour les trois étapes est de 3 % et s'explique principalement par une réactivité faible et une purification complexe lors de la dernière étape.

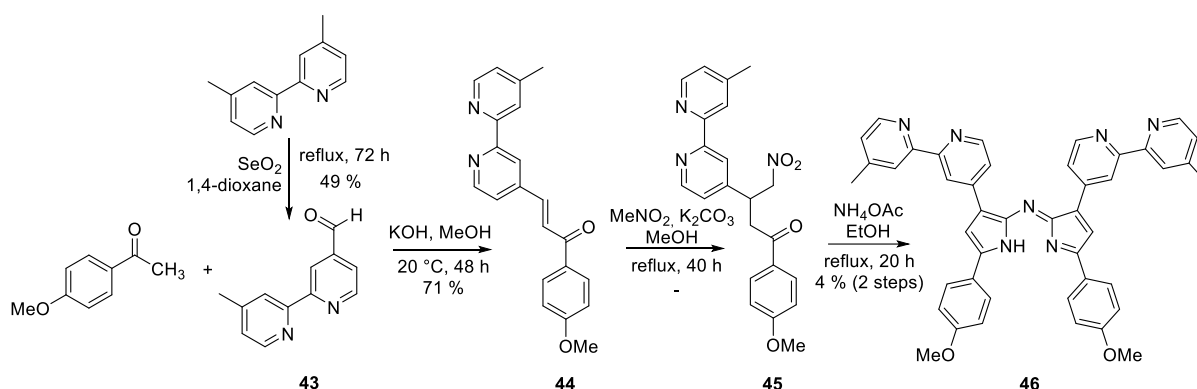
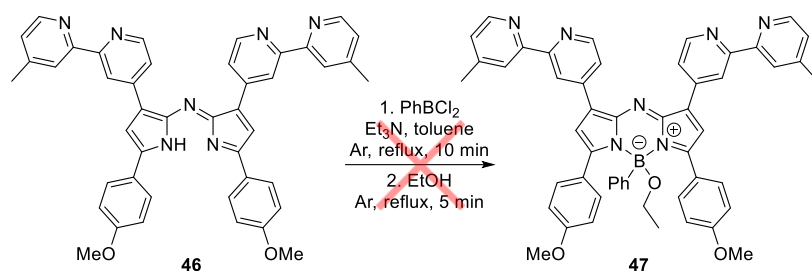


Schéma 30. Synthèse de l'azadipyrrrométhène 2,2'-bipyridine **46**.

#### Boration

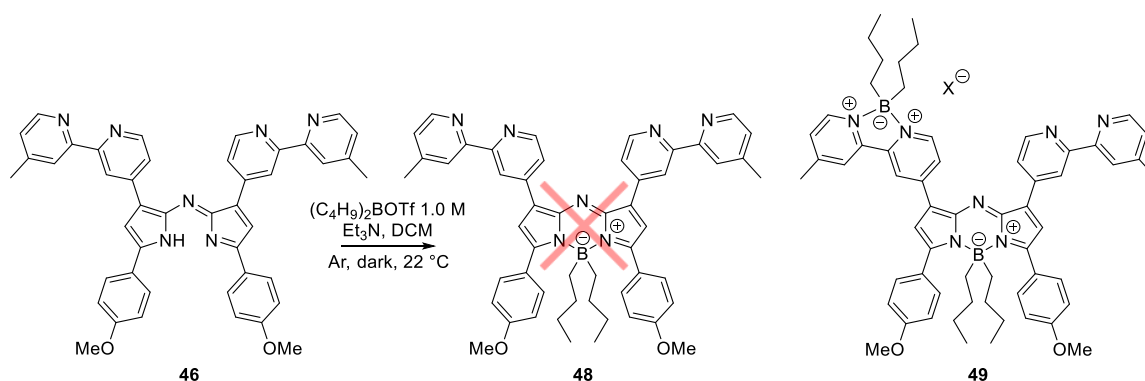
Le composé **46** ayant été obtenu en faible quantité (34 mg), seulement trois tests d'introduction de l'atome de bore ont pu être réalisés. Nous avons opté initialement pour l'introduction d'un groupement BPhOEt qui, d'après notre expérience avec l'azaBODIPY 2-phénylpyridine, permet à la fois d'augmenter considérablement la solubilité de l'azaBODIPY dans les solvants organiques, tout en conservant des propriétés photophysiques intéressantes. Les conditions testées sont similaires à celles utilisées lors de la boration de l'azadipyrrrométhène **37** (Schéma 31). Cependant, dans ces conditions, aucune évolution n'a été notée en CCM ou RP-HPLC-MS. Ceci peut être dû au fait que la présence du ligand bipyridine ait induit une interaction avec le réactif boré, ne permettant pas la formation de l'azaBODIPY correspondant.



**Schéma 31.** Tentative d'introduction d'un chlorure de phénylborane sur l'azadipyrrrométhène **46** et substitution du chlorure porté par l'atome de bore par un éthanolate.

Le rôle joué par la bipyridine vis-à-vis de l'atome de bore a été souligné par deux autres tentatives de boration réalisées en présence de triflate de dibutyle de bore (**Schéma 32**). Une première tentative a été réalisée dans les mêmes conditions utilisées pour la formation des composés **39** et **40**, c'est-à-dire en présence d'un équivalent de triflate de dibutyle de bore à 22 °C dans le dichlorométhane, sous argon et à l'abri de la lumière. Dans ces conditions, un suivi CCM et RP-HPLC-MS n'a pas montré de conversion du réactif après une heure. La réaction a donc été poursuivie mais après 72 h, le constat a été le même.

Une seconde tentative a consisté à introduire initialement un équivalent de triflate de dibutyle de bore, suivi par un autre équivalent après une heure de réaction. Dans ce cas, une consommation quasi-instantanée du réactif a eu lieu, un changement de couleur (bleu vers vert) du milieu réactionnel étant noté. Par CCM, des traces de réactif étant encore visible, 0,8 équivalent du réactif boré ont été ajoutés, menant à l'entière consommation de **46**. Le composé a ensuite été isolé par colonne chromatographique d'alumine. Par MALDI-TOF, le composé isolé a été identifié comme possédant deux groupements  $\text{BBu}_2$ . On suppose alors que l'un des ligands bipyridine (voire les deux) a complexé le bore. Aucune trace de l'azaBODIPY désiré **48** n'est détectée.



**Schéma 32.** Tentative d'introduction de dibutylbore sur l'azadipyrrrométhène **46**.

Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par Narula *et al.* ainsi que Haberecht *et al.* qui indiquent que l'introduction d'un triflate de bore ou d'un halogénure de bore est possible sur une bipyridine dans les conditions que nous avons employé ici.<sup>317,318</sup>

N'ayant pas pu obtenir le dérivé boré de **46**, les tentatives de métallation ont été directement réalisées sur l'azadipyrrrométhène.

### 2.3.5 Métallation et propriétés photophysiques

#### 2.3.5.1 Métallation sur le ligand 2-phénylpyridine

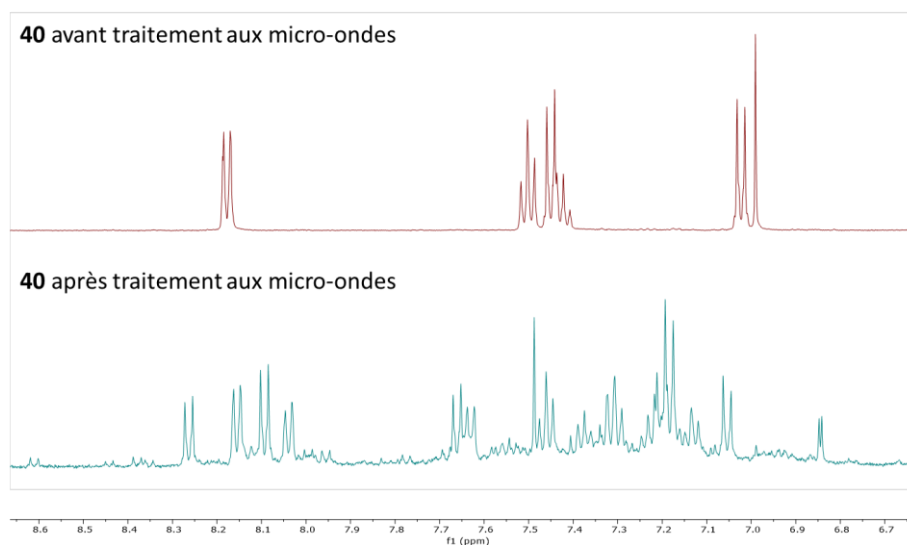
##### Complexe d'or

Une première tentative de complexation a été réalisée avec un complexe d'or(III)  $\text{HAuCl}_4$ . Diverses conditions ont été testées, à la fois sur l'azaBODIPY **38** et l'azaBODIPY **39**, qui ont toutes mené à une perte de l'atome de bore et la non-complexation du ligand au métal (**Tableau 15**). Les conditions de métallation aux micro-ondes ont été inspirées des travaux de Shaw *et al.* et se sont révélées efficaces lors d'un test de complexation de l'or au ligand 2-phénylpyridine.<sup>300</sup>

**Tableau 15.** Conditions réactionnelles testées pour la métallation des azaBODIPYs **38** et **39**. <sup>a</sup> Réaction à 21 °C en présence de 2,2 équivalents de  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  dans le méthanol. <sup>b</sup> Chauffage d'un mélange solide de précurseur et de  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  après mélange au mortier.

| Solvant  | Précurseur | Complexe                                   | Technique                        | Température | Temps   | Résultat          |
|----------|------------|--|----------------------------------|-------------|---------|-------------------|
| Éthanol  | <b>39</b>  | $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ | Micro-ondes                      | 140 °C      | 10 min  | Déboration        |
| Éthanol  | <b>39</b>  | $\text{KAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ | Micro-ondes                      | 100 °C      | 10 min  | Déboration        |
| Méthanol | <b>39</b>  | $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ | Chimie classique <sup>a</sup>    | 21 °C       | 120 min | Aucune conversion |
| -        | <b>39</b>  | $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ | Chauffage à sec <sup>b,319</sup> | 170 °C      | 20 min  | Déboration        |
| Ethanol  | <b>38</b>  | $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ | Micro-ondes                      | 100 °C      | 10 min  | Déboration        |

Dans l'optique de déterminer l'impact du chauffage par irradiation micro-ondes sur l'azaBODIPY, un test de stabilité aux micro-ondes a été réalisé sur l'azaBODIPY **40** (**Figure 117**). 3 mg de ce composé ont été solubilisés dans 3 mL d'éthanol. La solution a ensuite été soumise aux micro-ondes durant 15 minutes à 140 °C.



**Figure 117.** Spectres RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, acétone- $d_6$ ) de l'azaBODIPY **40** avant (haut) et après (bas) traitement aux micro-ondes à 140 °C dans l'éthanol pendant 15 minutes.

Ce test nous a permis de montrer que les micro-ondes mènent à la dégradation du composé initialement pur. À la suite de ce constat, nous avons décidé de ne pas réaliser la métallation aux micro-ondes afin d'éviter toute dégradation.

Une tentative d'introduction d'un complexe d'or(III) en présence de triflate d'argent a également été réalisée sur l'azaBODIPY **41** (Schéma 33). Le triflate d'argent a pour double rôle de remplacer l'un des ligands chlorure du complexe d'or(III) par un ligand triflate plus labile, mais également d'activer  $\text{KAuCl}_4$ , étant un abstracteur de chlore. À reflux dans l'acétonitrile, une entière consommation du réactif a été notée par CCM après 30 minutes. Une purification sur colonne chromatographique d'alumine suivie par une précipitation lente dans un mélange DCM/pentane a permis d'isoler un produit majoritaire. Cependant, ni une analyse RMN ni les analyses en masse exacte ou RP-HPLC-MS n'ont permis de déterminer la nature du composé obtenu.

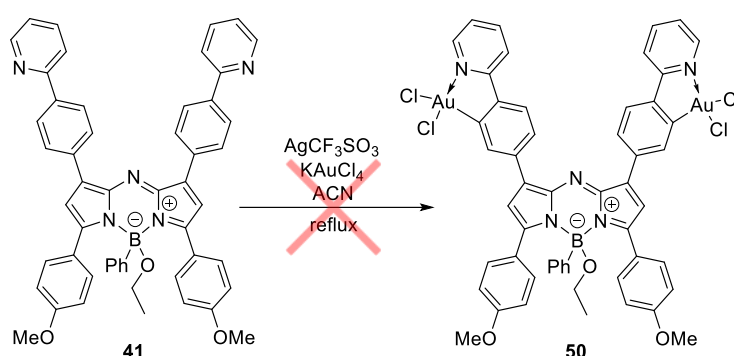


Schéma 33. Tentative de métallation de l'azaBODIPY **41**.

### Complexes de ruthénium

Une complexation à l'aide d'un dimère de ruthénium(II) a également été réalisée (Schéma 34). Pour les conditions réactionnelles, nous nous sommes inspirés des travaux de Li *et al.* qui décrivent la cycloruthénation d'hétérocycles azotés.<sup>301</sup> Sous atmosphère inerte et en présence d'acétate de potassium, une totale conversion a été attestée après 2 h à reflux.

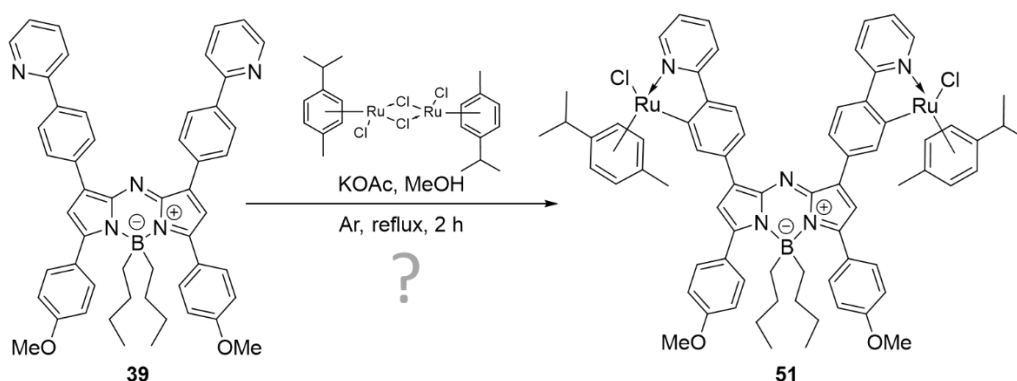
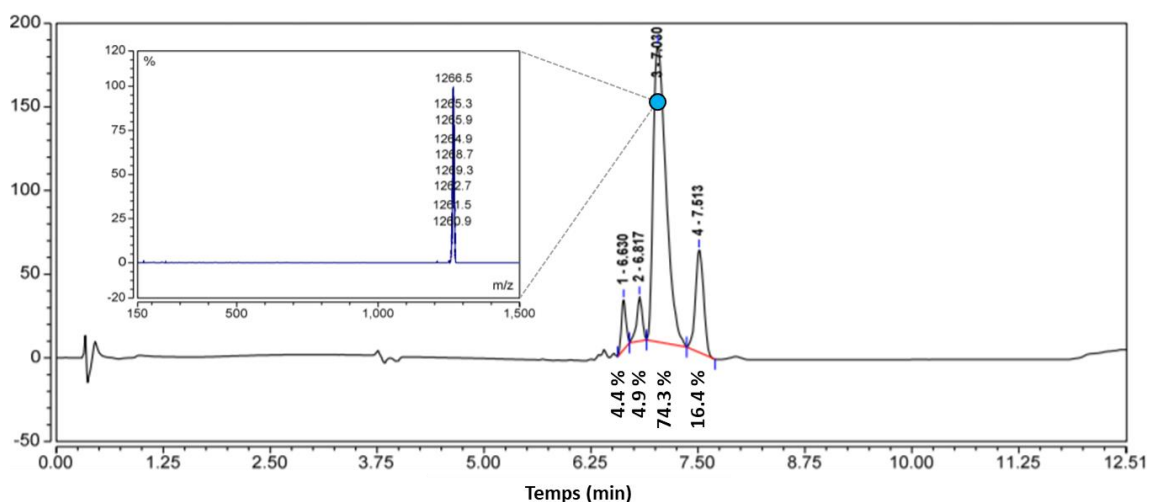


Schéma 34. Tentative de synthèse du complexe de ruthénium(II) **51**.

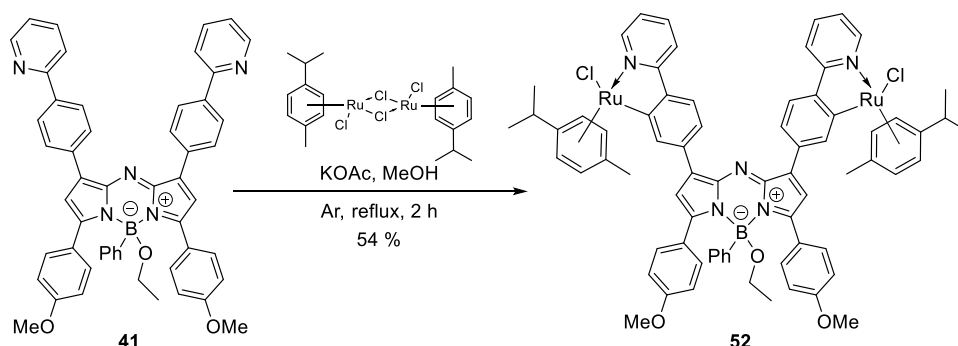
Aucune conclusion quant à la nature du composé n'a cependant pu être tirée, que ce soit par RMN, MALDI ou HRMS. Une analyse par RP-HPLC-MS a indiqué un mélange de composés, avec un composé majoritaire dont la masse correspondait au composé désiré [M-Bu] (Figure 118). Aucune analyse n'a à ce jour pu attester avec certitude de la nature du composé.





**Figure 118.** Chromatogramme RP-HPLC-MS du composé **51** (650 nm, programme d'éluion **B**).

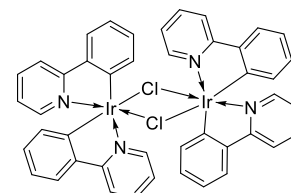
De même que pour la métallation de **39**, nous avons tenté d'introduire un complexe de ruthénium(II) au sein du ligand phénylpyridine de l'azaBODIPY **41**. Les conditions de réaction ont été les mêmes que celles exécutées précédemment (**Schéma 35**). Après 1 h à reflux, un suivi CCM et RP-HPLC-MS a indiqué la formation de deux produits, dont l'un semble correspondre à celui attendu. Aucune évolution n'étant notée après 2 h, le brut réactionnel a été évaporé puis purifié sur colonne chromatographique d'alumine. Le complexe **52** a ainsi été isolé, avec un rendement de 54 %. Une analyse RP-HPLC-MS a indiqué une pureté supérieure à 93 %, ce qui a été confirmé par RMN  $^1\text{H}$ .



**Schéma 35.** Formation du complexe de ruthénium(II) **52**.

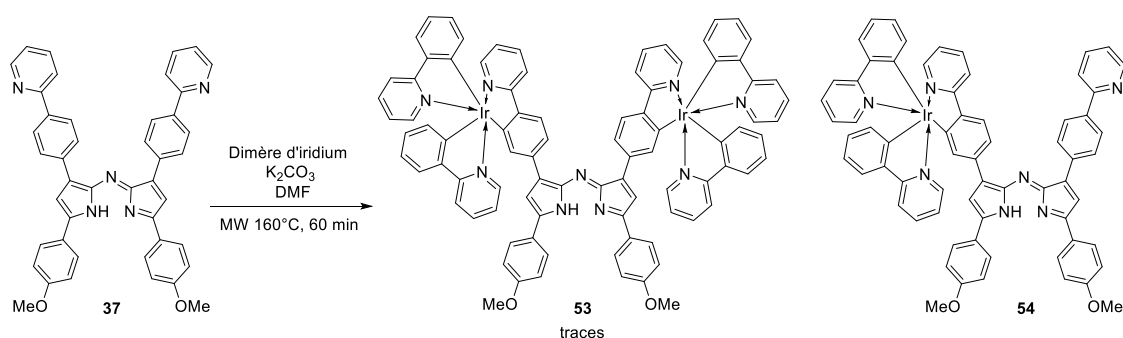
### Complexe d'iridium

Une métallation à l'aide de dichlorotétrakis[2-(2-pyridinyl)phényl]diiridium(III) (**Figure 119**) a également été envisagée. Étant donné les observations précédentes quant à la déboration de l'azaBODIPY lorsqu'il est soumis aux conditions du micro-ondes, nous avons décidé de réaliser la métallation à l'iridium(III) sur l'azadipyrométhène **37**, l'objectif étant d'introduire l'atome de bore par la suite.



**Figure 119.** Dimère d'iridium(III).

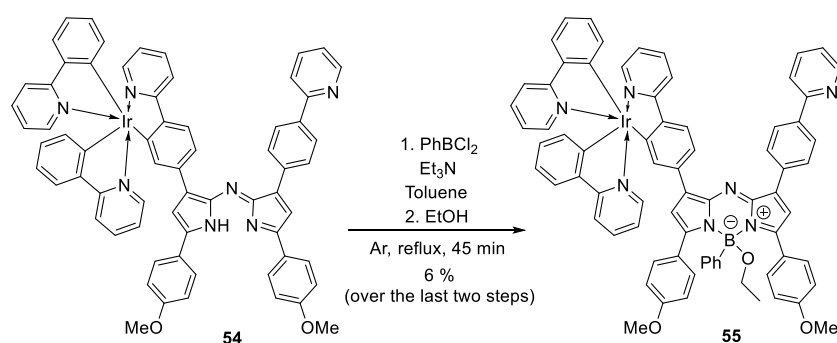
Pour la première étape, nous nous sommes inspirés des conditions de métallation décrites par Thompson *et al.*<sup>320</sup> Dans notre cas, nous avons décidé de réaliser cette manipulation sous micro-ondes avec un chauffage à 160 °C pendant 60 minutes en présence de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (**Schéma 36**).



**Schéma 36.** Formation du complexe d'iridium(III) **54**.

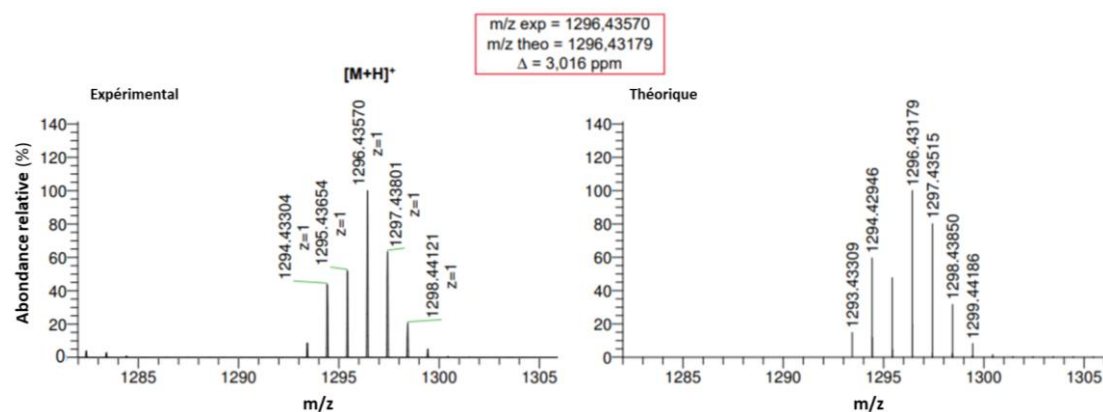
À la suite d'une purification sur colonne d'alumine, une analyse HRMS a révélé la présence d'un seul iridium par cœur azaBODIPY. Le dérivé bis-iridium **53** a pu être observé en masse mais n'a pas pu être isolé. Cependant, le complexe mono-iridium **54** étant insoluble dans la plupart des solvants, nous n'avons pas réalisé de caractérisation autre que la HRMS, et l'avons directement engagé dans l'étape suivante de boration.

Pour cette étape, le complexe **54** est partiellement soluble dans le toluène à chaud (**Schéma 37**). L'introduction d'éthanol a permis la substitution du chlorure porté par l'atome de bore, conduisant à la précipitation de l'azaBODIPY **55**. Une précipitation dans un mélange DCM/pentane a permis d'isoler 5 mg de **55** avec un rendement de 6 % sur les deux dernières étapes. Une pureté supérieure à 92 % a été annoncée par RP-HPLC-MS, ce qui était alors cohérent avec la RMN  $^1H$ .



**Schéma 37.** Introduction d'un chlorure de phénylborane sur l'azadipyrométhène **54** et substitution du chlorure porté par l'atome de bore par un éthanolate.

Une analyse HRMS a confirmé la nature du composé **55** (**Figure 120**).



**Figure 120.** Profils HRMS expérimentaux et théoriques pour l'azaBODIPY **55**.

**Propriétés photophysiques des complexes de 2-phénylpyridine obtenus**

Plusieurs azaBODIPYs contenant le ligand 2-phénylpyridine ont pu être synthétisés. Comme nous l'avons vu précédemment, par manque de solubilité, nous n'avons pas pu synthétiser le dérivé BF<sub>2</sub>. Deux autres dérivés ont cependant été obtenus, à savoir BR<sub>2</sub> et BPhOEt. En ce qui concerne les dérivés BR<sub>2</sub>, aucune des tentatives de synthèse n'a permis d'isoler avec certitude un complexe, ainsi nous ne commenterons ici que les résultats obtenus sur les dérivés BPhOEt.

En ce qui concerne le ligand **41**, deux complexes, l'un de ruthénium, l'autre d'iridium, ont pu être isolés (**Tableau 16**).

**Tableau 16.** Données photophysiques pour le ligand **41** et les complexes **52** et **55** dans le DMSO à 25 °C. La référence utilisée pour le calcul des rendements quantiques est l'azaBODIPY **4** dans CHCl<sub>3</sub>.<sup>213</sup>

**41**

**52**

**55**

| Composé   | $\lambda_{\max, \text{absorption}}$<br>(nm) | $\epsilon$<br>(M <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ) | $\lambda_{\max, \text{émission}}$<br>(nm) | $\Phi$<br>(-) | Brillance<br>(M <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ) |
|-----------|---|--|---|---------------|---|
| <b>41</b> | 700   | 73 400   | 737                                       | 0,26          | 19 000  |
| <b>52</b> | 707   | 61 700   | 735                                       | < 0,01        | -   |
| <b>55</b> | 691   | 12 000   | 733                                       | 0,07          | 800   |

L'introduction d'un complexe de ruthénium au sein du ligand 2-phénylpyridine semble induire une chute drastique du rendement quantique de fluorescence, celle-ci passant de 26 % pour le composé **41** à une valeur inférieure à 1 % pour le complexe **52**. Cette inhibition de la fluorescence peut être imputée à la présence des atomes de ruthénium qui pourraient entraîner un passage à un état triplet non luminescent, par croisement intersystème. Un transfert électronique (de type PET par exemple) ou un phénomène de phosphorescence peuvent également être envisagés. Ce phénomène d'inhibition de la fluorescence d'un BODIPY par la présence d'un atome de ruthénium a pu être décrit lors de précédents travaux au sein de notre laboratoire (voir partie **1.1.3**).<sup>226</sup>

De manière intéressante, le complexe **52** présente un coefficient d'absorption molaire similaire à celui du ligand **41**.

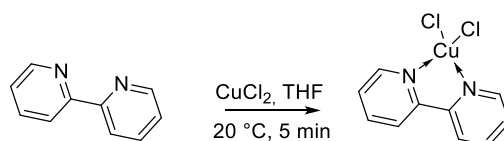
Le complexe mono-iridium **55** présente quant à lui un rendement quantique de l'ordre de 7 % et une brillance 24 fois inférieure à celle du ligand correspondant. De plus, des écarts, bien que faibles, sont notés pour les maximums en longueur d'onde d'absorption et d'émission. Ces résultats ne sont donc pas suffisants pour attribuer un fonctionnement de type multicolore à ce

composé, dont les caractéristiques s'apparentent davantage à une sonde de type *off/on* pour laquelle la perte du centre métallique induirait une augmentation significative de l'intensité de fluorescence.

### 2.3.5.2 Métallation sur le ligand 2,2'-bipyridine

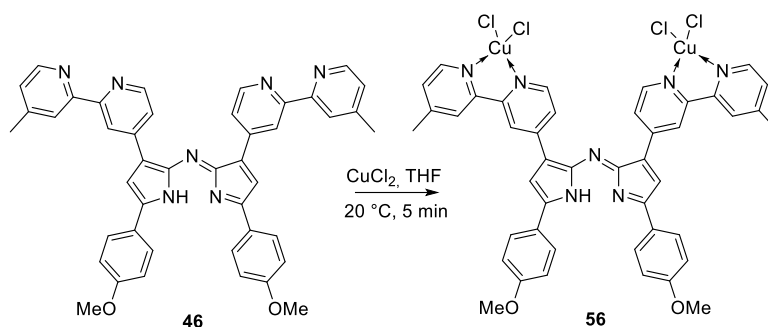
#### Complexe de cuivre

Un test de chélation sur la 2,2'-bipyridine avec du cuivre(II)  $\text{CuCl}_2$  a permis la formation instantanée du complexe correspondant (**Schéma 38**). Un précipité turquoise se forme alors instantanément, comme cela est décrit par Mohr *et al.*<sup>305</sup>



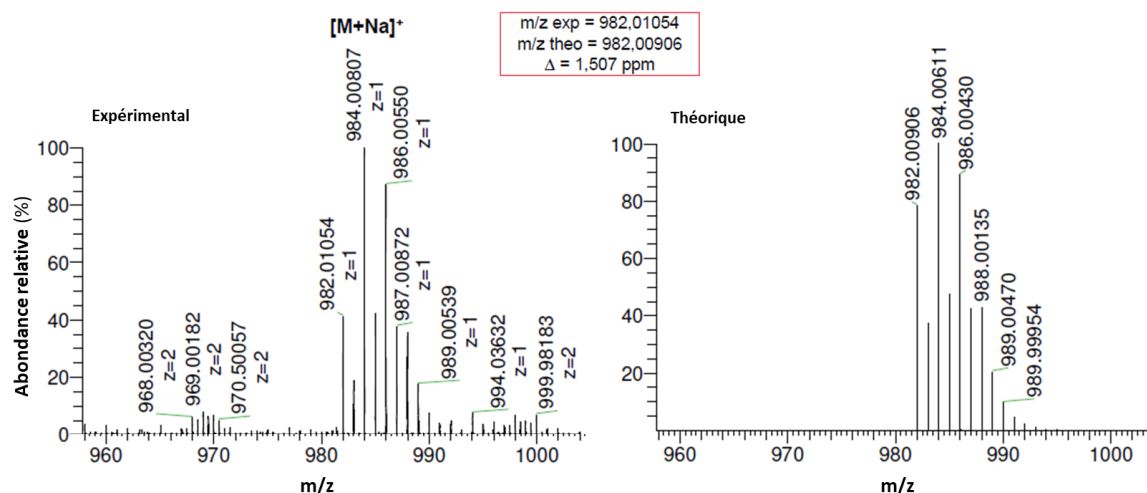
**Schéma 38.** Test de métallation de la 2,2'-bipyridine avec du cuivre(II).

Nous avons ainsi décidé de tenter l'introduction de cuivre(II) au sein du ligand azadipyrométhène **46** dans les mêmes conditions que pour la 2,2'-bipyridine (**Schéma 39**). Une attention particulière doit être portée au fait que des atomes métalliques (tel le cuivre) peuvent être introduits au sein du cœur azadipyrométhène pour former des dimères. La formation de ces dimères requiert l'utilisation de bases, d'un chauffage important et de bons ligands partant sur le centre métallique tels que des acétates, comme cela a pu être décrit par les groupes d'O'Shea, Riede, Hanan ou encore Yaglioglu.<sup>321–324</sup> Dans notre cas, nous avons supposé que les conditions de réactions utilisées ici (20 °C, absence de base) ne permettraient pas l'entrée du métal dans le cœur azaDIPY.



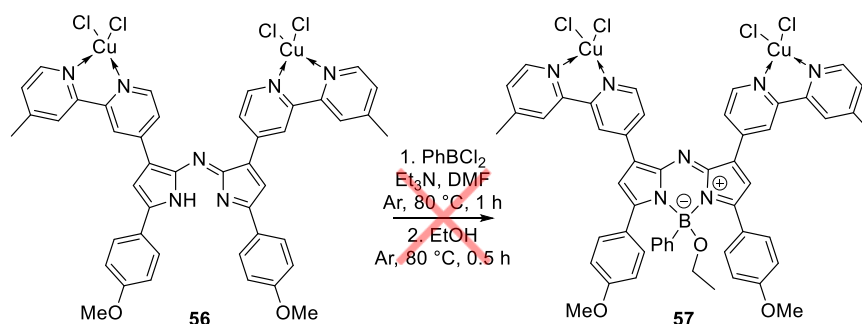
**Schéma 39.** Métallation de l'azadipyrométhène 2,2'-bipyridine **46** avec du cuivre(II).

Un précipité vert s'est formé immédiatement à l'ajout du chlorure de cuivre. Le précipité était alors totalement insoluble dans les solvants organiques à l'exception du DMF. De par cette très faible solubilité, nous n'avons pas pu caractériser le précipité obtenu en RMN. Une analyse HRMS indiquait cependant que le composé obtenu était bien le produit attendu (**Figure 121**). Aucune trace de dérivé trimétallique voire bimétallique (avec un atome de cuivre sur une bipyridine et un atome de cuivre dans le cœur azaDIPY) n'a été décelée, que ce soit par HRMS ou MALDI-TOF.



**Figure 121.** Profils HRMS expérimentaux et théoriques pour le complexe **56**.

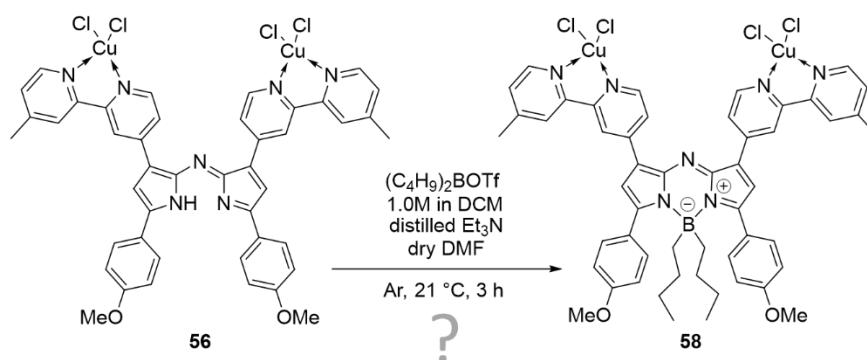
Une première boration sur le complexe **56** a été tentée à l'aide de  $\text{BPhCl}_2$ . Le réactif **56** étant totalement insoluble dans le toluène, la réaction a été réalisée à 80 °C dans le DMF (**Schéma 40**).



**Schéma 40.** Tentative d'introduction d'un chlorure de phénylborane sur l'azadipyrométhène **56** et substitution du chlorure porté par l'atome de bore par un éthanolate.

Dès l'ajout de triéthylamine, le réactif **56** a entièrement précipité. De par le manque de solubilité du brut réactionnel, aucun suivi CCM ou RP-HPLC-MS n'a pu être réalisé. Les analyses de masse n'ayant pas décelé la présence du complexe boré, nous en avons conclu que l'azaBODIPY **57** correspondant n'a pas été formé.

À la suite de ce résultat, nous avons décidé de tenter d'introduire un atome de bore porteur de chaînes alcanes sur l'azadipyrométhène **56**. De même, cette réaction a été réalisée dans le DMF pour permettre de solubiliser le composé **56** (**Schéma 41**). La réaction a été suivie par masse basse résolution et a indiqué la formation de nouvelles espèces non identifiées. Aucune évolution n'étant notée après 3 heures, le milieu réactionnel a été évaporé et un lavage de la poudre (totalement insoluble) obtenue a été réalisé avec du dichlorométhane.



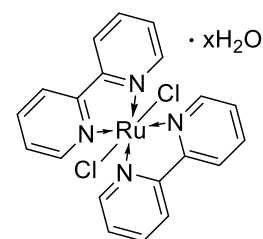
**Schéma 41.** Tentative d'introduction de dibutylbore sur le complexe **56**.

Une analyse HRMS n'a pas indiqué pas la présence du composé attendu. De plus, le cuivre(II) étant paramagnétique, il n'a pas été possible de caractériser ce composé par RMN. En revanche, une analyse par résonance paramagnétique électronique (RPE) a pu être réalisée. Cette technique d'analyse se base, tout comme la RMN, sur la résonance magnétique. Les systèmes contenant des électrons appariés tels que les complexes de cuivre(II), de configuration électronique  $d^9$ , peuvent ainsi être caractérisés par cette méthode. Dans le cas de l'azaBODIPY synthétisé ici, la présence de cuivre(II) dans la structure a pu être confirmée par RPE. En revanche, il n'a pas été possible de déterminer le nombre de centres métalliques par azaBODIPY.

À ce jour, nous n'avons pas pu déterminer la nature exacte du composé obtenu.

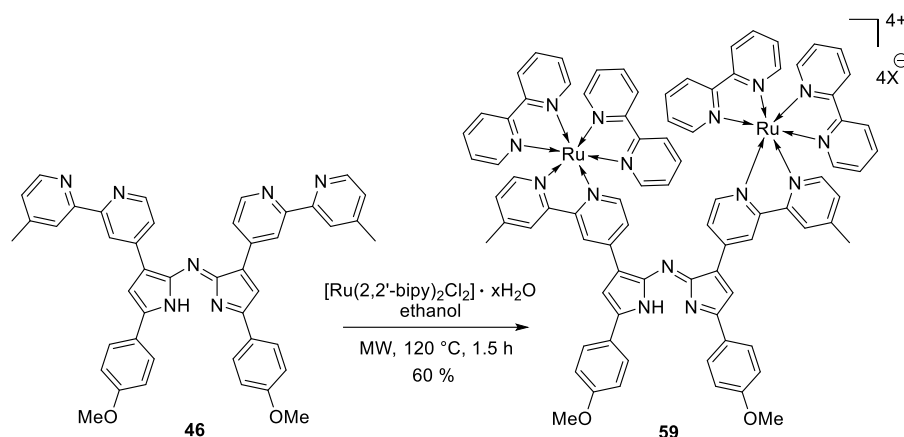
### Complexe de ruthénium

L'introduction d'un complexe de ruthénium sur le ligand 2,2'-bipyridine a dû être réalisée sur l'azadipyrrrométhène, les conditions réactionnelles (température élevée en particulier) pouvant mener à la déboration dans le cas d'un azaBODIPY. Pour cette métallation, nous avons utilisé le complexe de cis-bis(2,2'-bipyridine)dichlororuthénium(II) hydrate (**Figure 122**). Les conditions réactionnelles ont été tirées des travaux de Ramu *et al.* qui décrivent la complexation d'un complexe de  $[Ru(2,2'-bipy)_2Cl_2]$  sur un dérivé de 4,4'-diméthyl-2,2'-dipyridyl dans l'éthanol à reflux.<sup>325</sup> Dans notre cas, nous avons décidé de réaliser cette réaction aux micro-ondes (**Schéma 42**). Après 90 minutes à 120 °C, une analyse RP-HPLC-MS du brut réactionnel a confirmé l'entière consommation de l'azadipyrrrométhène **46**.



**Figure 122.**  $[Ru(2,2'-bipy)_2Cl_2]$  hydrate.

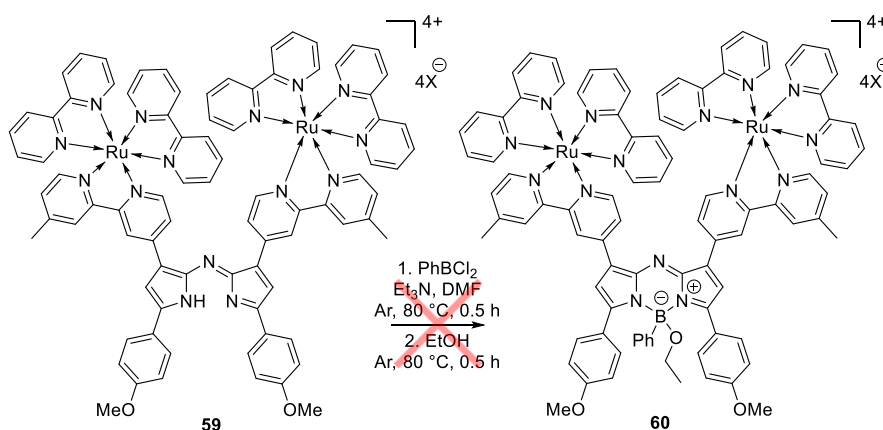
Par purification sur colonne chromatographique d'alumine, il a ainsi été possible d'isoler 20 mg du complexe de ruthénium(II) **59** avec un rendement de 60 %.



**Schéma 42.** Formation du complexe de ruthénium(II) **59**.

Une analyse de masse ainsi qu'une analyse RMN ont confirmé la nature et la pureté du composé **59**.

Nous avons tenté l'introduction d'un éthanolate de phénylborane sur l'azadipyrométhène **59** (**Schéma 43**). L'utilisation de DMF en tant que solvant a été jugée nécessaire pour permettre une solubilisation totale du réactif.



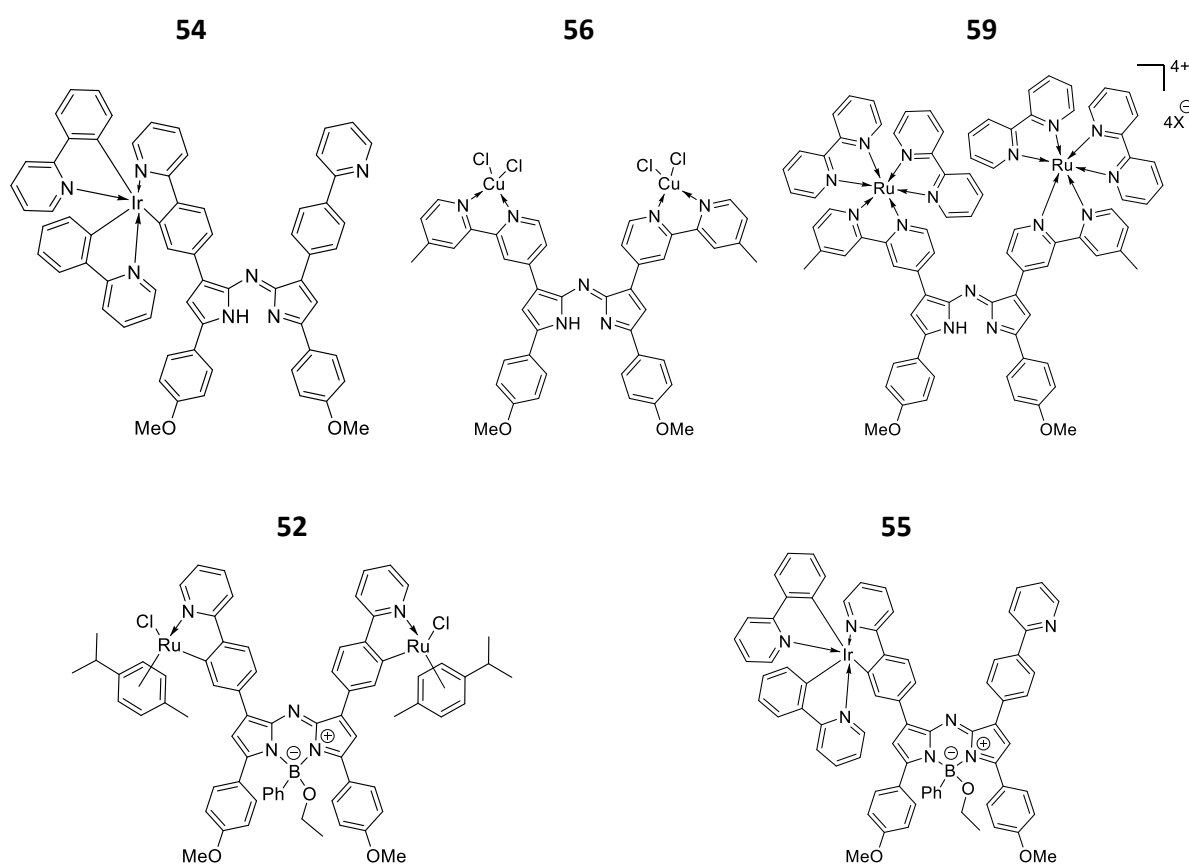
**Schéma 43.** Tentative d'introduction d'un chlorure de phénylborane sur l'azadipyrométhène **59** et substitution du chlorure porté par l'atome de bore par un éthanolate.

Cependant, dans ces conditions aucune évolution du milieu n'a été notée par CCM ou RP-HPLC-MS.

### 2.3.6 Bilan

Deux stratégies pour la synthèse d'azaBODIPY-métaux ont été abordées dans les lignes présentées ci-dessus. La première a été l'introduction des métaux d'intérêt sur l'azaBODIPY. Cependant, cette stratégie ne nous a pas permis, dans certain cas, d'obtenir les composés attendus. C'est pourquoi nous avons également opté pour une seconde stratégie, à savoir la formation du complexe sur l'azadipyrométhène, suivi de la boration en dernière étape.

Ainsi, trois complexes d'azadipyrométhène et deux complexes d'azaBODIPY ont pu être synthétisés et caractérisés avec succès (**Figure 123**). Dans le cas des azadipyrométhènes, deux types de ligands ont été impliqués. D'une part la 2-phénylpyridine, qui a permis la formation d'un mono-complexe d'iridium(III), et la 2,2'-bipyridine, que nous avons pu chélater à du cuivre(II) et du ruthénium(II). Pour les azaBODIPYs, le ligand utilisé pour la chélation du métal a été dans chaque cas la 2-phénylpyridine et a permis l'obtention d'un complexe de bis-ruthénium(II) et d'un complexe de mono-iridium(III).



**Figure 123.** Les trois complexes d'azadipyrométhène **54**, **56** et **59** et les deux complexes d'azaBODIPY **52** et **55** obtenus au cours de ces travaux.



### 3 Conclusions et perspectives

Nous nous sommes intéressés au développement des premiers azaBODIPYs métalliques théranostiques. Le choix de la sonde fluorescente a été dictée par notre décision de synthétiser des composés pouvant être étudiés *in vivo* et nécessitant donc un fluorophore pouvant émettre dans la fenêtre thérapeutique. Une première approche de ce projet s'est focalisée sur la synthèse de théranostiques porteurs de complexes d'or(I). Ainsi, trois nouveaux théranostiques d'or(I) ont été synthétisés et leurs propriétés cytotoxiques ont été évaluées sur lignées cancéreuses.

Cette étude a montré tout le potentiel de cette première génération de théranostiques, dont les valeurs antiprolifératives se sont révélées particulièrement proches de celles de l'auranofine sur les lignées cellulaires testées. L'internalisation des composés sur des cellules MDA-MB-231 et 4T1 a été montrée par imagerie confocale et révèle une accumulation au sein des vésicules. Des études sur souris BALB/c saines ont montré l'absence de toxicité de ces composés pour des concentrations maximales de 0,5 mg/kg.

Les premiers résultats pour ce projet soulèvent plusieurs perspectives. La première d'entre elles est l'étude de l'effet antitumoral sur souris porteuses de tumeurs exogènes. Ces travaux sont actuellement en cours et sont focalisés en particulier sur le composé **20**. Au-delà de cette étude *in vivo*, nous souhaitons également déterminer plus en détail le mécanisme d'action de ces composés vis-à-vis des cellules tumorales. Pour cela, nous envisageons d'étudier leur lieu d'accumulation dans les cellules, l'hypothèse actuelle, suite aux travaux présentés dans ce manuscrit, allant dans le sens d'une accumulation dans l'appareil de Golgi. Un co-marquage spécifique de cette organite en imagerie confocale est par conséquent envisagé. Nous déterminerons également la quantité d'or(I) qui parvient à pénétrer dans les cellules, par un dosage ICP-MS. Ces données nous permettront de nous renseigner sur l'origine de la cytotoxicité du complexe, mais également sur son intégrité *in situ*. En effet, pour ce second point, les sondes développées ne permettent pas de détecter un éventuel relargage du complexe et il peut alors être pertinent de déterminer si, effectivement, le théranostique intact pénètre la cellule. Une perspective à plus long terme concerne le développement de nouveaux azaBODIPYs théranostiques vectorisés. Contrairement aux composés présentés dans ce manuscrit, nous envisageons vectoriser ces molécules par le greffage d'un anticorps à leur structure. Par la suite, une comparaison des résultats *in vitro* et *in vivo* du comportement des sondes non vectorisées et vectorisées nous permettra de mettre en lumière l'importance d'une vectorisation.

Toujours dans l'optique de tracer des agents thérapeutiques métalliques, nous nous sommes également intéressés au développement de sondes intelligentes. L'objectif de ces sondes étant de permettre un suivi à chaque instant de la sonde *in vivo* et d'informer quant à l'intégrité du complexe. Pour cela, nous proposons la synthèse d'un tandem sonde-principe actif pour lequel toute modification apportée au complexe impacterait directement la sonde et plus particulièrement ses propriétés photophysiques. Une diminution/augmentation de l'intensité de fluorescence ou un changement de couleur permettant d'apporter en direct une information sur l'état du complexe.

Ce projet a été mené en parallèle d'une étude théorique, dont l'objectif est *in fine* la mise en place d'un modèle de calcul nous permettant de prédire l'impact de différents groupements ou métaux sur l'azaBODIPY. Ainsi, nous serions en mesure d'évaluer l'intérêt de la synthèse d'une molécule en amont, permettant ainsi de réduire le nombre d'expériences et de synthèses, pour la plupart complexes, à réaliser au laboratoire.

Deux principales stratégies de synthèse ont été abordées. La première a consisté en la synthèse d'un précurseur présentant un groupement bromophényle en position 1,7 du cœur azaBODIPY, permettant ainsi de réaliser des couplages de Suzuki et Sonogashira, l'objectif étant d'entrer un groupement permettant par la suite de chélater un centre métallique. Les tentatives de couplages n'ont cependant pas pu aboutir et nous avons opté pour une stratégie prenant en compte l'introduction des ligands dès le début de la synthèse de l'azaBODIPY. Deux types de ligands ont ainsi été étudiés, la 2-phénylpyridine et la 2,2'-bipyridine. Dans le cas du composé **37**, deux groupements borés ont été introduits dans le cœur azadipyrrrométhène, BBU<sub>2</sub> et BPhOEt, nous permettant ainsi d'augmenter la solubilité du ligand et des complexes dans les solvants organiques. Au jour de la rédaction de ces lignes, le ligand 2,2'-bipyridine n'a pas encore pu être valorisé, bien que deux complexes d'azadipyrrrométhène aient pu être obtenus. Le ligand 2-phénylpyridine a quant à lui pu être complexé par le ruthénium et l'iridium, permettant d'obtenir des sondes au comportement *off/on*. Le mono-complexe d'iridium **55** s'est révélé faiblement fluorescent, avec un rendement quantique de 7 %.

Concernant ce sujet, de nombreuses pistes sont encore à explorer. Nous pouvons tout d'abord revoir la méthode de calcul théorique nous permettant de déterminer quelle synthèse de molécule est à envisager au laboratoire. Des méthodes de calcul (plus coûteuses en temps mais également d'un point de vue économique), pourraient nous permettre d'obtenir des résultats plus fiables. De plus, les calculs théoriques présentés au cours de ce projet semblent indiquer que l'introduction de complexes en position 3,5 du cœur azaBODIPY ne semble pas idéale pour le développement d'une sonde multicolore (faible modification des propriétés photophysiques). Par la réalisation de calculs théoriques complémentaires, voire d'expériences au laboratoire, nous pourrions vérifier ce constat et déterminer plus en détail si l'introduction de centre métalliques en ces positions peut s'avérer intéressant pour notre objectif.

Dans l'optique de poursuivre les travaux abordés dans ce manuscrit, l'objectif sera de se consacrer à la synthèse de ligands dont la fluorescence n'est pas inhibée par l'introduction du bore. L'utilisation d'un groupement BPhOEt semblant être pour cela particulièrement prometteuse. Le ligand 2-phénylpyridine pourra être complexé à d'autres métaux d'intérêt tels que le platine. Pour le ligand 2,2'-bipyridine, du recul devra être pris afin de résoudre le problème de compétition de chélation de l'atome de bore entre le cœur azadipyrrrométhène et le ligand lui-même. Enfin, d'un point de vue plus général, il peut également être envisagé de fonctionnaliser l'azaBODIPY en position 2,6, sujet qui n'a pas été abordé dans ces travaux. Pour cela, nous pouvons envisager l'introduction d'halogènes sur ces positions, suivie d'une réaction de couplage, qui permettrait ainsi d'introduire des ligands pour la chélation de métaux.





---

# **CONCLUSION GÉNÉRALE**

---

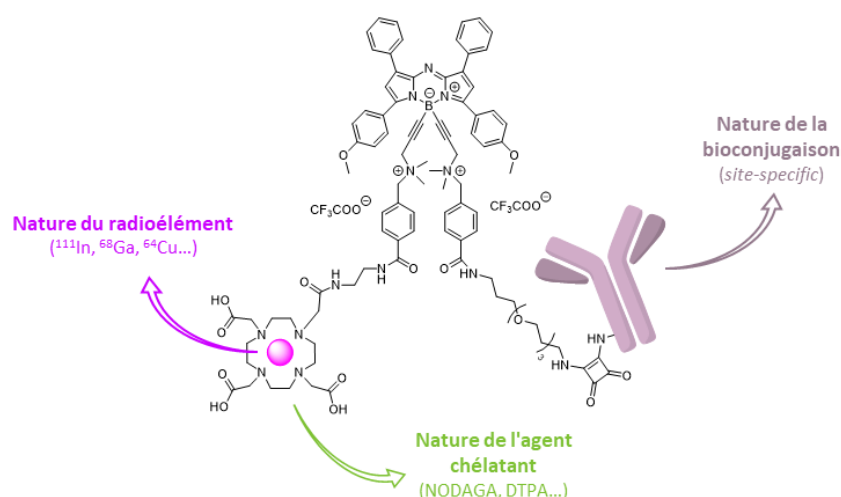


Ces travaux de thèse se sont focalisés sur la synthèse de nouveaux composés fluorescents émettant dans la fenêtre de transparence optique et pouvant être utilisés dans un but de suivi, de diagnostic et/ou de thérapie.

L'imagerie optique est encore, aujourd'hui, souvent considérée comme étant limitée à une utilisation *in vitro*. Cependant, son utilisation en préclinique voire même en clinique connaît actuellement un très fort développement. Le défi actuel pour les chimistes est de concevoir des sondes fluorescentes compatibles pour une telle utilisation. Plus précisément, elles doivent être hydrosolubles, stables d'un point de vue chimique et photophysique, capables d'émettre dans la fenêtre de transparence optique et, si possible, fonctionnalisables.

L'une des utilisations prometteuses de l'imagerie optique en clinique concerne la chirurgie assistée par fluorescence. Dans le premier projet de cette thèse, nous nous sommes focalisés sur la synthèse d'une sonde fluorescente émettant dans le proche infrarouge pouvant être employée en chirurgie assistée par fluorescence. Nous avons fait le choix de développer cette sonde sous forme d'une sonde bimodale vectorisée, alliant la fluorescence (pour la chirurgie) à une imagerie permettant un diagnostic préopératoire telle que la TEP ou la TEMP. Pour cela, un agent chélatant macrocyclique a été couplé à notre plateforme hydrosoluble WazaBY. Le choix du vecteur s'est ensuite porté sur l'anticorps trastuzumab, capable de cibler les cellules cancéreuses surexprimant HER2. Une toxicité faible de la sonde ainsi qu'une forte affinité pour le récepteur HER2 ont pu être soulignés par la réalisation de tests *in vitro*. Suite à la radioméallation à l'indium-111, les tests d'imagerie *in vivo* sur souris ont mené à la preuve de concept de l'utilisation de cette sonde comme agent bimodal, permettant alors un diagnostic préopératoire, suivi par une aide au chirurgien lors de l'ablation de la tumeur. Ces travaux font l'objet d'une publication soumise à la revue *Scientific Reports* sous le titre « *Design and evaluation of a new SPECT/OI bimodal imaging probe based on aza-BODIPY fluorophore: application to cancer diagnostic and fluorescence guided surgery* ».

Par la suite, diverses modifications pourront être apportées afin d'étudier plus en profondeur le potentiel de ces bimodaux. Pour cela, d'autres radioéléments pourront être introduits, ce qui pourra nécessiter l'introduction d'agents chélatants différents. Un autre moyen de bioconjugaison sera également investigué, à savoir une stratégie *site-specific*, permettant de conjuguer de manière plus contrôlée la molécule d'intérêt (sonde bimodale ou théranostique) à l'anticorps (**Figure 124**).



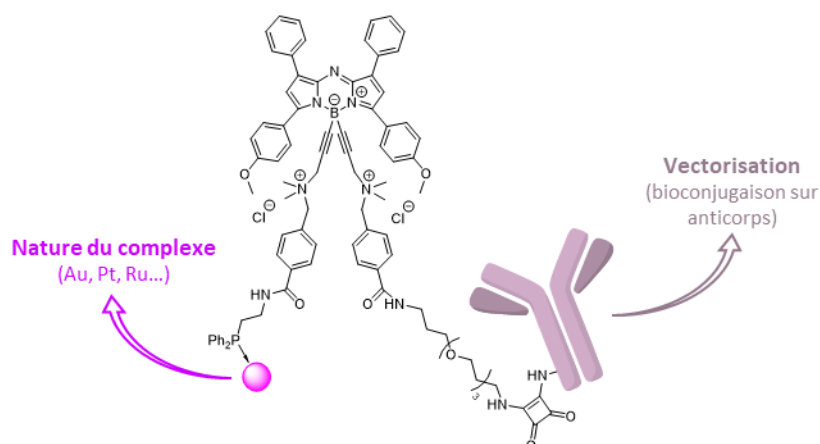
**Figure 124.** Modifications envisagées pour l'obtention de nouvelles sondes bimodales vectorisées.

Au-delà d'une utilisation pour l'imagerie, nous avons choisi d'exploiter la plateforme fluorescente dans une logique de développement de théranostiques. Bien que nombre de complexes à visée thérapeutique à base d'or, de platine ou encore de ruthénium existent aujourd'hui, il reste de nombreuses zones d'ombre quant aux mécanismes d'action qui mènent à la mort des cellules tumorales, la pharmacocinétique et biodistribution de ces composés ou encore leur stabilité. Il est alors difficile de les optimiser afin d'augmenter leur action et spécificité pour la tumeur. C'est dans une optique de répondre à cette problématique que certains principes actifs sont aujourd'hui couplés à une sonde permettant leur suivi.

Le second axe de ces travaux de thèse a donc été le développement de composés théranostiques comportant, d'une part, une fonction fluorescente permettant un suivi par imagerie optique et, d'autre part, un groupement métallique à visée thérapeutique. Une première approche de ce projet a été réalisée par la synthèse de trois composés non vectorisés comportant des complexes d'or(I). Ces composés sont les premiers azaBODIPYs porteurs d'un atome d'or pour une utilisation théranostique. Leurs propriétés antiprolifératives ont été évaluées sur lignées cellulaires cancéreuses 4T1, MDA-MB-231, CT26 et SW480. Des activités similaires à l'auranofine ont ainsi été relevées, soulignant le potentiel de ces nouveaux composés. La toxicité a également été évaluée sur lignée saine HMEC, les théranostiques synthétisés se révélant moins toxiques que l'auranofine. Les résultats de cette étude ont mené à la rédaction d'une publication soumise à la revue scientifique *Journal of Medicinal Chemistry* sous le titre « *Homo-bimetallic gold(I)-based aza-BODIPY complexes: towards in vivo near-infrared optical theranostics* ».

Ces résultats *in vitro* encourageants vont mener à la réalisation de tests *in vivo* sur souris porteuses de tumeurs, qui sont en cours au jour de l'écriture de ces lignes. Ces tests ont pour objectif d'évaluer l'effet du complexe vis-à-vis de la tumeur. Comme cela a été souligné, cette première famille de composés n'a pas impliqué de moyen de vectorisation. Nous envisageons cependant la synthèse d'une seconde génération d'azaBODIPYs pouvant être vectorisés par un anticorps, pouvant permettre ainsi une accumulation dans la tumeur et, nous l'espérons, un effet thérapeutique d'autant plus marqué (**Figure 125**).

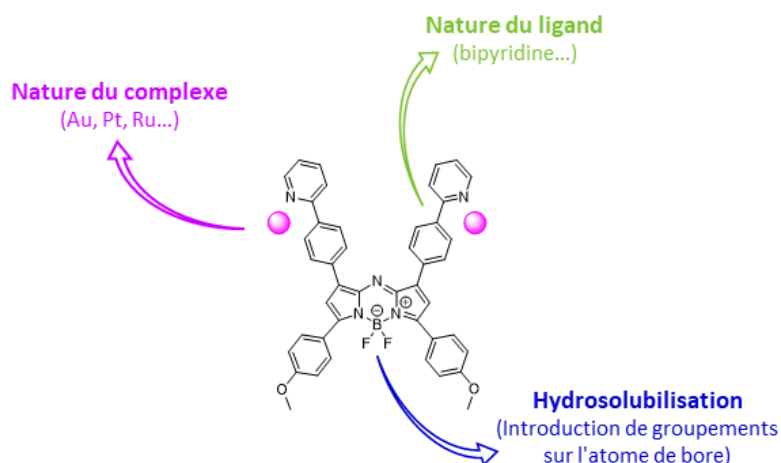




**Figure 125.** Objectif envisagé pour le développement de nouveaux théranostiques vectorisés.

Le troisième projet de ces travaux de thèse a concerné le développement de sondes fluorescentes dites « intelligentes ». Ce projet avait pour but de répondre à la principale lacune des sondes théranostiques classiques. En effet, un théranostique permet de suivre le fragment à visée thérapeutique lorsque celui-ci est effectivement couplé au fluorophore. Cependant, en cas de relargage de ce fragment ou d'une dégradation de la structure, aucune information ne sera apportée permettant d'indiquer de tels phénomènes. Ainsi est apparue l'idée de développer de nouvelles sondes ayant la capacité de répondre à une modification structurale. Cette réponse peut être traduite par une extinction (mode *on/off*) mais également par un changement de couleur (mode multicolore). Les informations ainsi apportées par la sonde peuvent alors permettre d'éclairer certaines zones d'ombre telles le lieu et moment du relargage du principe actif sur sa cible lorsqu'il est question d'une prodrogue. Avec cet objectif, nous avons synthétisé avec succès deux complexes d'azaBODIPYs, pour lesquels le centre métallique, ruthénium pour l'un et iridium pour l'autre, est directement conjugué au cœur du fluorophore. Les premiers résultats ont révélé que le complexe de ruthénium ne présentait aucune fluorescence lorsque le métal était complexé au fluorophore. En revanche, le complexe d'iridium présentait un rendement quantique de 7 % dans le DMSO, à mettre en comparaison avec le rendement quantique de 26 % du ligand. Une chute de brillance d'un rapport 24 est notée lors de l'introduction du métal, phénomène qui pourrait être valorisé pour le développement d'une sonde intelligente *off/on*.

Une première série de complexes ayant pour but d'aboutir à une sonde théranostique intelligente a pu être obtenue au cours de ces travaux de thèse et a montré tout le potentiel – mais également la complexité – de la synthèse de tels composés. La seconde génération d'azaBODIPYs théranostiques intelligents aura pour but de résoudre les limitations dues à la solubilité du fluorophore, mais se focalisera également sur des ligands et des métaux de nature différente (**Figure 126**).



**Figure 126.** Modifications envisagées pour l'obtention d'une nouvelle série de théranostiques intelligents.

En ce qui concerne les sondes multicolores, nous pouvons conclure en soulignant le fait que relever ce défi, comme nous nous y attendions, n'est pas trivial. Il semble ainsi plus aisé d'obtenir un composé au comportement *off/on*, ce qui explique la quasi-inexistence de systèmes capables de répondre à une modification structurale ou environnement par une modification de leurs propriétés photophysiques autre qu'une « simple » activation ou désactivation de leur fluorescence.

Enfin, d'un point de vue plus général, ces travaux de thèse ont permis de mettre en lumière la réactivité propre aux azaBODIPYs, ainsi que les propriétés photophysiques qui en résultent. Ceux-ci présentent un comportement singulier par rapport à leurs analogues BODIPYs. En effet, ces derniers sont aisément fonctionnalisables en leurs positions 3,5, mais également sur la position méso (inexistante dans le cas des azaBODIPYs). Cette fonctionnalisation n'entrave généralement pas les propriétés photophysiques de ces composés qui peuvent alors être utilisés pour des expérimentations *in vitro* voire *in vivo*. Cette caractéristique a pu être soulignée au sein de notre laboratoire par les travaux de thèse du Dr Pliquett. En revanche, l'atome de bore n'est quant à lui que rarement exploité que ce soit pour l'introduction de groupements hydrosolubilisants, de vecteurs ou d'autres groupements d'intérêt. *A contrario*, pour les azaBODIPYs, l'atome de bore est, pour nous, la cible privilégiée pour une éventuelle fonctionnalisation. Au cours de ces travaux de thèse, nous avons pu nous intéresser aux deux cas (fonctionnalisation du bore et fonctionnalisation des positions 1,7). La conclusion qui transparait est que, dans le cas des azaBODIPYs, la fonctionnalisation de l'atome de bore par l'introduction de groupement alcynes peut permettre d'introduire aisément une large variété de groupements sans impacter significativement les propriétés photophysiques du fluorophore. En revanche, un impact sur la fluorescence considérable a pu être noté lors de l'introduction de complexes en position 1,7. C'est pourquoi aujourd'hui, lorsque la fonctionnalisation d'un azaBODIPY est envisagée pour l'introduction de groupements d'intérêt, il est préférable de privilégier la réactivité des fluorures situés sur l'atome de bore. Cette stratégie permet, au-delà de l'amélioration de l'hydrosolubilité, de conserver les caractéristiques optiques uniques de ces fluorophores.





---

# **EXPERIMENTAL SECTION**

---



## 1 Material and methods

Unless stated differently, reactions were carried out in HPLC grade solvents from Carlo Erba under normal atmosphere. Dry solvents were non-stabilized, purchased from Carlo Erba and dried using a MB-SPS-800 (MBraun). All reagents were purchased from Sigma Aldrich, Alfa Aesar or TCI and used as received without further purification. Boc-TOTA was purchased from Iris Biotech GmbH. DO3AtBu-N-(2-aminoethyl)ethanamide and NODAGA-NHS ester were provided by CheMatech. Column chromatography was carried out using alumina gel (Alfa Aesar; aluminum oxide, activated, neutral, Brockmann Grade II) or silica gel (Sigma Aldrich; 40-63  $\mu\text{m}$ , 230-400 mesh 60 Å). Analytical thin-layer chromatography experiment were performed with either Machery-Nagel Alugram Alox N/UV254 aluminum gel (precoated aluminium sheets, 0.2 mm thick) or Merck 60 F254 silica gel (precoated aluminum sheets, 0.2 mm thick). Reactions were monitored by thin-layer chromatography, RP-HPLC-MS and no-lock  $^{31}\text{P}$ -NMR. Microwave reactions were carried out in an Anton Paar Monowave 300.

The humanized anti-HER-2 (Trastuzumab, Herceptin<sup>®</sup>) and chimeric anti-CD20 (Rituximab, Truxima<sup>®</sup>) antibodies were purchased from Roche, France. The reagents used for FPLC were ammonia acetate trace select for the purification step and acid acetic trace select for elution step, both from Sigma Aldrich. All solutions were prepared with ultra-pure water ( $> 18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ ). For biolayer interferometry, the biosensor was coated with biotinylated Human Her2 / ErbB2 Protein His Tag on primary amine labeling with long spacer (Accrobiosystem).

### **NMR spectra**

$^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{11}\text{B}$ ,  $^{19}\text{F}$  and  $^{31}\text{P}$ -NMR were recorded at 300 K (unless stated otherwise) on Bruker spectrometers: Avance Neo 400 MHz equipped with a 5 mm TBO probe, Avance Neo 500 MHz equipped with a 5 mm BBOF iProbe and Avance III HD 600 MHz equipped with a 5 mm BBOF  $\text{N}_2$  cryoprobe. NMR spectroscopy chemical shifts are quoted in parts per million ( $\delta$ ) relative to TMS (for  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ ),  $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$  (for  $^{11}\text{B}$ ),  $\text{CFCl}_3$  (for  $^{19}\text{F}$ ) and 85 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (for  $^{31}\text{P}$ ). For  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  spectra, calibration was made by using residual signals of the partially deuterated solvent summarized in 2010 by Fulmer *et al.*<sup>326</sup> For all other nuclei, SR value obtained after zero-calibration of the corresponding reference was applied. The following abbreviations and their combinations are used: s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quadruplet; quint, quintuplet; m, multiplet; bs, broad signal.

### **Mass spectrometry (MALDI-TOF & HRMS)**

Mass spectra were recorded with a Bruker Daltonics Microflex LRF spectrometer equipped with a  $\text{N}_2$  beam (337 nm) used in the MALDI-TOF reflectron mode (50-3500 Da mass range) for small molecules. Samples were prepared by using dithranol ([1143-38-0], purchased from Sigma-Aldrich) as the matrix and spotted on a MSP 96 MALDI plate.

MALDI samples conditioning: A saturated solution of the matrix was prepared daily. A 1:4 ratio of analyte/matrix was then spotted on the plate by using 10  $\mu\text{L}$  of the matrix solution mixed with 2.5  $\mu\text{L}$  of the analyte solution. The MALDI plate was then transferred in the MALDI chamber after complete drying of the plate. Accurate calibration was achieved by using an appropriate PEG

polymer in the same mass range as the analyte. Internal mass calibration was performed by adding the PEG sample on the same spot as the analyte while external reference was performed by preparing an extra spot on the same plate as the analyte.

High-resolution mass spectrometry analyses were recorded on a LTQ Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Scientific) equipped with an electrospray ionization source (HESI 2). The following source parameters were used. Heater temperature: 50 °C, gas flow: sheath 15 / Aux 10 / Sweep 0, spray voltage: 4 kV, capillary temperature: 275 °C, capillary voltage: 22 V, resolution ( $m/z = 400$ ): 60 000.

Typical conditioning:

A stock solution of the analyte was prepared by dissolving c.a. 1 mg of the analyte in 1 mL of a HPLC-grade solvent chosen from the following list: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH, CH<sub>3</sub>CN, H<sub>2</sub>O, or in RPE-grade DMSO.

For small molecules (MW < 1000 Da) a 1/100 dilution was performed using 10.0 µL of the stock solution completed to 1.0 mL by a HPLC-grade solvent of the following list sorted by order of preference: MeOH, H<sub>2</sub>O, CH<sub>3</sub>CN, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

For high weight molecules (MW > 1000 Da) a 1/10 dilution was performed using 100.0 µL of the stock solution completed to 1.0 mL by a HPLC-grade solvent of the following list sorted by order of preference: MeOH, H<sub>2</sub>O, CH<sub>3</sub>CN, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

The 10<sup>-5</sup> M resulting solution of the analyte was then directly infused into the spectrometer using a 500 µL syringe. The system was rinsed three times between two consecutive analysis with 500 µL of HPLC grade water and/or MeOH. Mass calibration in the 100-2000 Da mass range was operated using the commercially available Pierce LTQ ESI Positive/Negative ion Calibration solutions (ThermoFisher Scientific ref 88322/88324).

Low resolution mass spectra (MS) were recorded on a Bruker Amazon SL spectrometer. Measurements were performed at the "Plateforme d'Analyse Chimique et de Synthèse Moléculaire de l'Université de Bourgogne" (PACSMUB).

### **Analytical RP-HPLC-MS**

RP-HPLC-MS analyses were performed on a Thermo-Dionex Ultimate 3000 instrument (pump + autosampler at 20 °C + column oven at 25 °C) equipped with a diode array detector (Thermo-Dionex DAD 3000-RS) and Thermo Scientific MSQ Plus single quadrupole mass spectrometer.

The corresponding low-resolution mass spectra (LRMS) were recorded with this latter mass spectrometer, with an electrospray (ESI) source (HPLC-MS coupling mode). A Phenomenex Kinetex C<sub>18</sub> column (2.6 µm, 2.1 × 50 mm) was used with two different programs:

**Program A** : CH<sub>3</sub>CN + 0.1 % TFA and H<sub>2</sub>O + 0.1 % aq. formic acid as eluents, flow rate of 0.5 mL/min, linear gradient from 5 % to 100 % [CH<sub>3</sub>CN + 0.1 % TFA] for 5 min, 100 % [CH<sub>3</sub>CN + 0.1 % TFA] for 1.5 min, linear gradient from 100 % to 5 % [CH<sub>3</sub>CN + 0.1 % TFA] for 0.1 min, 5 % [CH<sub>3</sub>CN + 0.1 % TFA] for 2 min.



**Program B** : CH<sub>3</sub>CN + 0.1 % TFA and H<sub>2</sub>O + 0.1 % TFA as eluents, flow rate of 0.5 mL/min, linear gradient from 5 % to 100 % [CH<sub>3</sub>CN + 0.1 % TFA] for 5 min, 100 % [CH<sub>3</sub>CN + 0.1 % TFA] for 5.5 min, linear gradient from 100 % to 5 % [CH<sub>3</sub>CN + 0.1 % TFA] for 0.1 min, 5 % [CH<sub>3</sub>CN + 0.1 % TFA] for 2 min.

UV-visible detection was achieved at 220, 260, 550 and 650 nm (+ DAD in the range 220-800 nm). Low resolution ESI-MS detection in the positive/negative mode (full scan, 150-1500 a.m.u., data type: centroid, needle voltage: 3.0 kV, probe temperature: 350 °C, cone voltage: 75 V and scan time: 1 s).

### **Semi-preparative HPLC-MS**

Semi preparative separations were executed on a HPLC-system from Shimadzu equipped with 2 LC-20AT pumps, a SPD-20A UV/Vis detector, a FRC-10A fraction collector, a SIL-10AP sampler and a CBM-20A control unit. The column was either a Shim-Pack GIST 5 µm C18 10x250 mm column or a Shim-Pack GIST 5 µm C8 10x250 mm column. The mixture used for purification was CH<sub>3</sub>CN + 0.1 % TFA and H<sub>2</sub>O + 0.1 % TFA as eluents and a flow rate of 5 mL/min.

### **Ion chromatography**

Chromatographic analysis was performed using an ion chromatograph Thermo Scientific Dionex ICS 5000 with a conductivity detector CD (Thermo Scientific Dionex) and a conductivity suppressor ASRS-ultra II 4 mm (Thermo Scientific Dionex). TFA was separated using an Ion Pac AS11-HC analytical column (4 µm, 4x250 mm, Thermo Scientific Dionex) and an Ion Pac AS11-HC guard column (4 µm, 4x250 mm, Thermo Scientific Dionex). Chromatographic analysis was recorded with Chromeleon software, 7.2 version. The elution of TFA, Cl<sup>-</sup> and Br<sup>-</sup> was conducted in the following conditions: flow rate: 1.5 mL/min; column temperature: 30 °C; injection volume: 10 µL. Elution: isocratic during 15 min, 90 % eluent A (NaOH 30 mM) / 10 % eluent B (H<sub>2</sub>O, ultra-pure 18.2 MΩ.cm<sup>-1</sup>).

Preparation of reagents, standards and samples: All solutions were prepared in 18.2 MΩ.cm<sup>-1</sup> water. Sodium hydroxide (50 %, w/w, certified grade) and TFA (≥ 99.5 %, optima<sup>®</sup> LC/MS grade) were obtained from Fisher Scientific. A 1000 mg/L TFA standard solution was prepared by weighing. Commercial standard solution at 1000 mg/L were used for chlorine and bromine ions. The mother liquor was diluted to the standard solutions of 1, 2.5, 5 and 10 mg/L before injection. A precisely weighed amount of each compound was diluted in ultra-pure water so that the concentration of TFA fits with the calibration curve. Two different dilutions were performed for each sample. The resulting concentrations of TFA allowed to calculate the mass percentage of TFA contained in each sample. Measurements were performed at the "Plateforme d'Analyse Chimique et de Synthèse Moléculaire de l'Université de Bourgogne" (PACSMUB).

### **Lyophilization**

Lyophilization operations were performed with a Christ Alpha 2-4 LD plus.

### **Determination of LogD (LogP approximation)**

The method was inspired from literature procedures.<sup>327</sup> LogD was determined using a RP-HPLC Thermo-Dionex Ultimate 3000 instrument (pump, autosampler and column oven at 20 °C) equipped with a diode array detector (Thermo-Dionex DAD 3000-RS), with a Phenomenex Kinetex column (2.6 μm C18 100 Å, LC Column 50 x 2.1 mm). An isocratic method was used with an eluent ACN/H<sub>2</sub>O 1:1 containing 0.1 % of formic acid. All solvents used were of HPLC-grade quality. The eluents were mixed beforehand and used in a single-pump isocratic method. Dead time was determined using formamide. Benzoic acid, thymol, naphthalene, diphenyl ether and 2,6-diphenylpyridine were used as standards (1.9 < logD < 4.9). Mean values from three consecutive injections were to determine the logD value, knowing that the capacity factor (k) was calculated with the equation  $k = (t_r - t_0)/t_0$ , in which  $t_r$  was the retention time and  $t_0$  the dead time.

### **Photophysical studies**

UV-Visible absorption spectra of azaBODIPYs **4**, **6**, **9**, **10**, **11**, **12**, **14**, **15**, **20**, **22**, **25** and **35** were recorded on a SAFAS FLX-Xenius spectrometer. UV-Visible absorption spectra of azaBODIPYs **45**, **46**, **47**, **48**, **49**, **59** and **62** were recorded on a Varian Cary 50 scan (single-beam). Data are reported as absorption maximum wavelength ( $[\lambda_{\max}] = \text{nm}$ ) and molar absorption coefficient at the absorption maximum wavelength ( $[\epsilon] = \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). The steady-state fluorescence emission spectra of azaBODIPYs **4**, **6**, **9**, **10**, **11**, **12**, **14**, **15**, **20**, **22**, **25** and **35** were obtained using a SAFAS FLX-Xenius spectrometer. The steady-state fluorescence emission spectra of azaBODIPYs **45**, **46**, **47**, **48**, **49**, **59** and **62** were obtained using a HORIBA Jobin Yvon Fluorolog spectrofluorometer (software FluorEssence). All fluorescence spectra were corrected for apparatus response. Quartz cuvettes (1.5 mL) with a path length of 1 cm were used. The sample concentrations were chosen to obtain a maximum absorbance between 0.3 and 1.0 for UV spectra and between 0.035 and 0.1 at excitation wavelength for quantum yield measurements. Relative quantum efficiencies were obtained by comparing the areas under the corrected emission spectrum. All measurements were performed in DMSO (Sigma Aldrich, spectroscopic grade  $\geq 99.9\%$ ) and PBS at 298 K. AzaBODIPY **4** ( $\Phi = 0.36$  in  $\text{CHCl}_3$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 670 \text{ nm}$ ) was used as the standard. In all quantum yield determinations, correction for the solvent refractive index ( $\eta$ ) was applied [DMSO:  $\eta = 1.477$ ,  $\text{CHCl}_3$ :  $\eta = 1.4459$ , PBS:  $\eta = 1.337$ ]. The following equation was used to calculate the quantum yield of the sample:

$$\Phi_X = \Phi_{\text{ref}} \left( \frac{\text{Grad}_X}{\text{Grad}_{\text{ref}}} \right) \left( \frac{\eta_X^2}{\eta_{\text{ref}}^2} \right)$$

in which indices  $X$  and  $\text{ref}$  refers to the studied compound and the reference compound,  $\Phi$  is the quantum yield,  $\text{Grad}$  is the gradient of the linear graph between the integrated fluorescence intensity versus absorbance at the excitation wavelength, and  $\eta$  is the refraction index of the solvent in which the measure is executed.

### **Biolayer Interferometry**

HER-2-affinity of compound **16** or uncoupled trastuzumab antibodies were determined by Biolayer Interferometry (BLI) on an OctetRed96e instrument (Forte-bio). HER-2 was biotinylated with 5 equivalents of biotin (biotin-PEG4-NHS EZ kit, Pierce) according to the manufacturer's instructions.

In a second step, the streptavidin-coated biosensor was dipped into wells containing biotinylated HER-2. For the trastuzumab-HER-2 interaction: Association and dissociation phases were determined after dipping of the functionalized biosensor into wells containing different concentrations of trastuzumab coupled or not with compound **11** (6.25 to 400 nM) or wells containing PBS respectively. Each  $K_d$  was determined with a 1:1 stoichiometry model using the Octet software (version 3.1, FortéBio, Menlo Park, CA, USA).

### **Cell culture**

Human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 (ATCC® HB-8065™) and human mammary cancer cells subexpressing HER-2 HCC1954 (ATCC® CRL-2338™) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). These cells were cultured in RPMI supplemented with 10 % FBS (Dutcher) and incubated at 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere. All experiments were performed when the cells reached > 80 % confluence.

Mouse and human breast (4T1 and MDA-MB-231 respectively) and colon (CT26 and SW480 respectively) cancer cell lines, were cultured in RPMI supplemented with 10 % heat-inactivated FBS. The primary Human Mammary Epithelial Cells (HMEC, Gibco) were cultured in a complete HuMEC ready medium (Gibco). All the cells were cultured at 37 °C under a humidified atmosphere containing 5 % CO<sub>2</sub>. The cells were detached by trypsin and re-seed at least 1 day before any experiment.

### **Optical imaging & FACS experiment for theranostic compounds**

MDA-MB-231 and 4T1 cells were plated in 4-wells Lab-Tek I Chamber slide (Nunc™, Thermo Scientific) (50 000 cells in 500 µL of culture medium) and incubated overnight in RPMI without red phenol medium at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub>. Uptake experiments were performed by incubating cells with the different theranostic compounds (5 µM) at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub>. For confocal imaging, live cells were scanned by confocal microscopy (Zeiss LMS510 microscope) using a 63x oil immersion objective of 1.2 numerical aperture. Hoechst 33342 was used to label the nucleus (0.5 µM), excited at 405 nm (2-5 %) and its signal was collected from 410 to 499 nm. The theranostic compounds were excited at 633 nm (2 % power) and the signal was collected from 640 to 747 nm. Images were processed with ImageJ software.

Similar protocol was observed for FACS experiment, with a 15 min to 24 h incubation with 5 µM theranostic solution. After washing with PBS, the cells were observed using LSR II (Becton, Dickinson and Company, Pont de Claix, France). Cells were gated to exclude cell debris in the control group, and 50,000 events were recorded in the gate for fluorescence intensity measurement.

### **Flow cytometry for bimodal compounds**

Compound **16** immunoreactivity was evaluated on HCC1954 cells *via* flow cytometry analysis. Cells were harvested, incubated 30 min at 4 °C with 1 µg of compound **16** or a range between 0.001 and 10 µg of this antibody. The staining was achieved after a saturation step of 15 min in FCSB (BD Biosciences-US). The analysis was carried out on a BD FACSCanto™ (BD Biosciences-US). The

median fluorescence intensities were analysed with FlowJo V10 BD software and a standard curve were deduced with the results obtained for each concentration of labelled antibodies.

### **Cytotoxicity assay for bimodal compounds**

HepG2 cells were seeded at the density of  $5 \times 10^3$  cells in 96 well plates (Falcon), cultivated for 48 h before treatments in RPMI 1640 medium (Corning) with 10 % FBS (Dutcher). Cells were then treated with the different compounds at the concentrations given in the text for 36 h in RPMI1640 medium without FBS (200  $\mu$ l per well). Viability was measured using a MTS colorimetric assay (Abcam) following the manufacturer recommendations. Briefly, 20  $\mu$ l of MTS reagent was added into each well and optical density at 490 nm was read using a microplate reader (Spark<sup>®</sup>, Tecan) after 1 h incubation at 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, in the dark.

### **Cytotoxicity assay for theranostic compounds**

$10^5$  cells were seeded in 96-well flat-bottomed microplates (final volume 100  $\mu$ L per well) and incubated for 24 h to allow for cell adherence. 10 mM stock solutions were prepared by dissolving the compounds in DMSO. Fresh medium containing increasing concentrations of the compounds (ranging from 0.01 to 25  $\mu$ M) was added and plates were incubated at 37 °C for 48 h. The cytotoxic activity of compounds and drug references was determined using the MTS assay (Promega<sup>®</sup>). Thereafter, 20  $\mu$ L of MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, Promega, Charbonnieres, France) was added in each wells and absorbance at 490 nm was measured after 3 h incubation at 37 °C. The resulting IC<sub>50</sub> values were calculated using GraphPad Prism 5.0 software. Each treatment was performed in three independent experiments.

### **SPECT/CT/Fluorescence imaging**

All experiments followed the guidelines of the Federation of European Animal Science Associations. All animal experiments were approved by the Ethics Committee of Burgundy University (Dijon, France) and by the Ministry of agriculture and food (France, Apafis number: #15181 et #7830).

Female BALB/c nu/nu mice (8 weeks old, Charles River, France) were grafted by subcutaneous injection of HER2+ breast cancer cells HCC1954 ( $10 \times 10^6$  cells/mouse, ATCC<sup>®</sup> CRL-2338). Five weeks after tumor implantation (tumor volume approximately at 300 mm<sup>3</sup>), tumor bearing-mice were given 25  $\mu$ g of compound **17** (10 MBq) by intravenous injection in the vein tail. Alternatively, to assess the specificity of the targeting in vivo, a group of mice received 25  $\mu$ g of compound **17** (10 MBq) in co-injection with an excess (100x, 2500  $\mu$ g) of cold compound **12**. SPECT/CT dual imaging was performed 24 h, 48 h and 72 h after the injection of the radiolabeled conjugate using a NanoSPECT/CT small animal imaging tomographic  $\gamma$ -camera (Bioscan Inc., Washington, DC). During the procedure mice were anaesthetized with isoflurane (1.5-3 % in air) and positioned in a dedicated cradle. CT and SPECT acquisitions were performed in immediate sequence. CT acquisitions (55 kVp, 34 mAs) were first acquired during 10 min, followed by helical SPECT acquisitions with 90-120 s per projection frame resulting in acquisition times of 45-60 min. Both indium-111 photopeaks (171 and 245 keV) were used with 10 % wide energy windows. After the last image acquisition, animals were euthanized. Blood, tumor, and organs were collected, and

radioactivity was measured with a scintillation  $\gamma$ -counter (PerkinElmer). Data were then converted to percentage of injected dose per gram of tissue (%ID/g). The CT and SPECT reconstructions were performed using image processing software Vivoquant (Invivo). Each scan was then visually interpreted, and 3D regions of interest corresponding to the tumor and whole body were manually drawn in order to determine their radioactivity content. In vivo quantification was obtained by accurate calibration of the NanoSPECT/CT  $\gamma$ -camera. Radioactivity contents from image analysis were expressed in %ID/g and compared to those determined by ex vivo counting.

Immediately after each SPECT/CT imaging, the animals were transferred to an optical imager (Ivis Lumina III, PerkinElmer). The fluorescence signal was monitored using a range of filters and images were processed through the Living Image<sup>®</sup> software (PerkinElmer) for exclusion of background signals (auto-fluorescence, food...). Data were analyzed with the Living Image<sup>®</sup> software. After the last SPECT/CT imaging and before  $\gamma$ -counting, organs were collected and placed in the optical imager for ex vivo fluorescence imaging. 2D ROIs were manually drawn for fluorescence quantification of each organs. Values are reported as radiant efficiencies, allowing direct comparison of images from each experiment.

### **Thioredoxine reductase (TrxRs) activity assay**

TrxRs assays were carried out on CT26 cells incubated during 24 h in RPMI medium containing 10 % FBS with 5  $\mu$ M of azaBODIPY complexes or auranofin. Cells were scratched from the bottom of the dish after a washing step in PBS. Cell pellets were resuspended in 50  $\mu$ l of a lysis buffer CellLytic-M (Sigma-Aldrich) during 15 min, and centrifugated at 16 000 g for 10 min at 4 °C. The supernatants were transferred to 96 well microplates for protein dosage. The protein concentrations in the cell homogenates were determined by the Lowry method thanks to a protein Assay Reagents Package Kit (Bio-Rad). From each homogenate 20  $\mu$ g protein were collected for the TrxRs enzyme activity measurement with a commercially available kit (Sigma-Aldrich). The assay is based on the reduction of 5,5'-dithiobis(2- nitrobenzoic)acid(DTNB) with NADPH to 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) by TrxRs. The yellow color product is measurable at 412 nm by spectrophotometry. The reaction was performed in a working buffer (100 mM potassium phosphate with 10 mM EDTA and 0.24 mM NADPH) in a final volume of 200  $\mu$ l. This reaction was initiated by the addition of 6  $\mu$ l DTNB (39.6 mg/ml) diluted in an assay buffer (6 M guanidine-HCl in 0.2 M Tris-HCl, pH 8.0). The absorbance at 412 nm was measured 18 times within 15 min on a Perkin Elmer Wallac 1420 Victor2 Microplate Reader. The same experiments were performed for each condition with a specific inhibitor of TrxRs. The TrxRs activity rate was calculated from the slope of absorbance at 412 nm versus time after the subtraction of the activity measured in presence of the inhibitor.

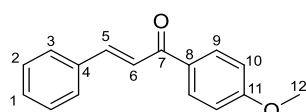
### **In vivo toxicity**

The toxicity was assessed on healthy BALB/c nude mice. The intraperitoneal injection was performed twice a week for each concentration, and the dose was increased weekly up to 0.5 mg/kg. The dose injected was prepared from a stock solution at 10 mM in DMSO diluted in RPMI medium for a total volume of 100  $\mu$ l. During the three weeks of the experiment and one supplementary week, the well-being of the mice was checked and each sign of pain were reported in a scoreboard.

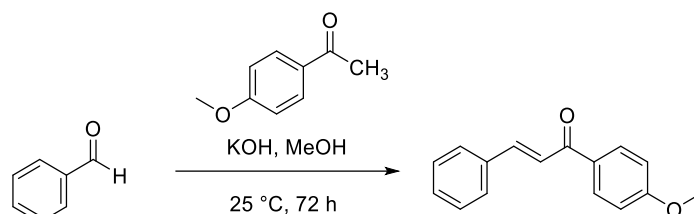
Animals were group housed in solid bottom polycarbonate cages (3-5 animals/cage). The food was provided ad libitum. Animals were also provided with sterilized pure water ad libitum. Environmental controls for the animal room were set to maintain 20-25 °C, a relative humidity of 50-70%, a 12 h light/12 h dark cycle.

## 2 Experimental procedures

### Compound 1



$C_{16}H_{14}O_2$   
 $M = 238.29 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
 White powder  
 Yield = 87 %

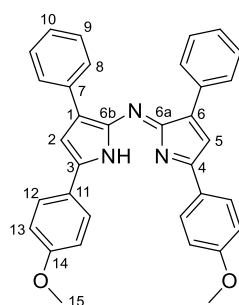


*Compound 1* was synthesized according to a modified reported procedure.  $^1\text{H}$  NMR data are in agreement with literature data.<sup>328</sup>

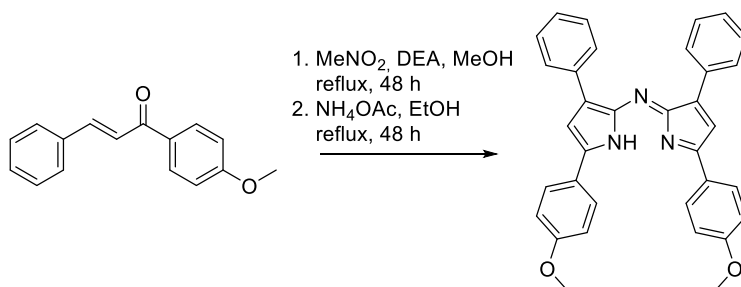
In a round-bottom flask, 4'-methoxyacetophenone (5.66 g, 37.7 mmol, 1 eq.) was introduced into a solution of KOH (5.08 g, 90.5 mmol, 2.4 eq.) in methanol (100 mL). Benzaldehyde (4.00 g, 37.7 mmol, 1 eq.) was then added and the mixture was stirred at 25 °C for 72 h. The precipitate was then filtered, washed with methanol and dried to give **1** as a white powder (7.40 g, 87 %).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.90 (s, 3H, H12), 6.99 (d,  $J_{\text{H10-H9}} = 8.9$  Hz, 2H, H10), 7.39-7.44 (m, 3H, H1 H2), 7.55 (d,  $J_{\text{H6-H5}} = 15.7$  Hz, 1H, H6), 7.62-7.67 (m, 2H, H3), 7.81 (d,  $J_{\text{H5-H6}} = 15.7$  Hz, 1H, H5), 8.05 (d,  $J_{\text{H9-H10}} = 8.8$  Hz, 2H, H9).

Compound **3**



$C_{34}H_{27}N_3O_2$   
 $M = 509.61 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
 Dark violet powder  
 Yield = 48 %



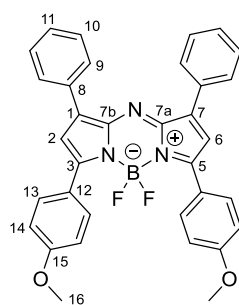
Compound **3** was synthesized according to a modified reported procedure.  $^1\text{H}$  NMR data are in agreement with literature data.<sup>128</sup>

In a round-bottom flask, **1** (7.40 g, 31.1 mmoles, 1 eq.) was introduced into methanol (70 mL). Diethylamine (32 mL, 320 mmoles, 10 eq.) and nitromethane (17 mL, 320 mmoles, 10 eq.) were added to the flask. After stirring under reflux for 48 h, the mixture was dried under reduced pressure and gave a reddish oil that was directly engaged in the next step without further purification.

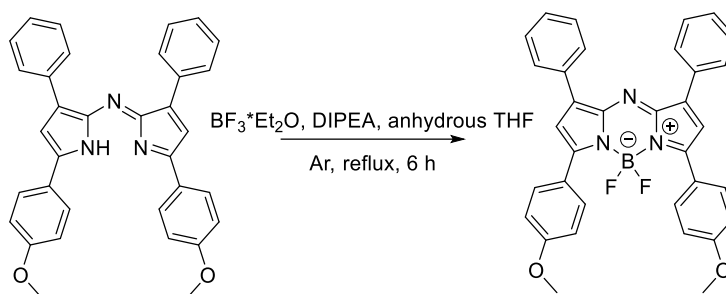
In a round-bottom flask, ammonium acetate (48 g, 620 mmoles) was added to a solution of crude **2** in ethanol (100 mL). The mixture was stirred under reflux for 48 h. The precipitate was filtered, dried under reduced pressure and centrifugated twice in DCM to give with no further purification **3** as a dark violet powder (3.87 g, 48 % over the last two steps).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.90 (s, 6H, H15), 7.06 (d,  $J_{H13-H12} = 8.9 \text{ Hz}$ , 4H, H13), 7.39 (t,  $J_{H10-H9} = 7.3 \text{ Hz}$ , 2H, H10), 7.47 (t,  $J = 7.6 \text{ Hz}$ , 4H, H9), 7.61 (s, 2H, H2, H5), 8.05 (d,  $J_{H12-H13} = 8.8 \text{ Hz}$ , 4H, H12), 8.10 (d,  $J_{H8-H9} = 7.2 \text{ Hz}$ , 4H, H8).



Compound **4**

$C_{34}H_{26}BF_2N_3O_2$   
 $M = 557.41 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
 Dark blue powder  
 Yield = 73 %



Compound **4** was synthesized according to a modified reported procedure.  $^1H$ ,  $^{11}B$  and  $^{19}F$  NMR data are in agreement with literature data.<sup>133,295</sup>

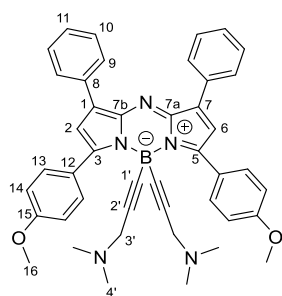
In a round-bottom flask, a solution of **3** (2.00 mg, 3.92  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) and DIPEA (3.5 mL, 20  $\mu\text{mol}$ , 5 eq.) in anhydrous THF (270 mL) was refluxed under argon for 45 minutes. The solution was then allowed to cool down to room temperature, and boron trifluoride etherate (7 mL, 27  $\mu\text{mol}$ , 7 eq.) was added slowly to the flask. The mixture was then heated to reflux again for 2 h. RP-HPLC-MS showed no conversion of the starting material, hence boron trifluoride etherate (65 mL, 247  $\mu\text{mol}$ , 63 eq.) was added slowly at room temperature. The mixture was refluxed again and after 3 h, RP-HPLC-MS showed complete consumption of the starting material. The crude was dried under reduced pressure and centrifuged in methanol four times. The product was obtained after precipitation from a DCM/pentane mixture and gave **4** (1.60 g, 73 %) as a dark blue powder.

$^1H$  NMR (500 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.89 (s, 6H, H16), 7.15 (d,  $J_{H14-H13} = 9.0$  Hz, 4H, H14), 7.48 (d,  $J_{H11-H10} = 7.3$  Hz, 2H, H11), 7.54 (d,  $J = 7.4$  Hz, 4H, H10), 7.62 (s, 2H, H2, H6), 8.15 (m, 8H, H9, H13).

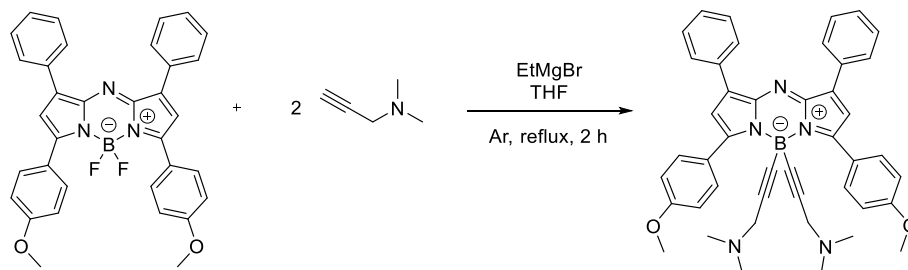
$^{11}B$  NMR (160 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 1.04 (t,  $J_{B-F} = 32.6$  Hz).

$^{19}F$  NMR (470 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = -130.4 (q,  $J_{F-B} = 32.4$  Hz).

## Compound 5



$C_{44}H_{42}BN_5O_2$   
 $M = 683.66 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
 Metallic red powder  
 Yield = 58 %



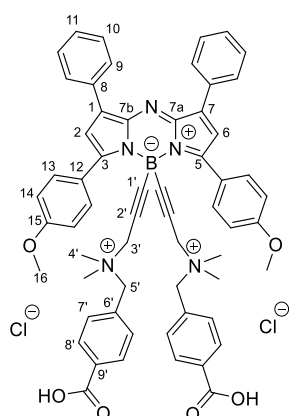
In a round-bottom flask under inert atmosphere, *N,N*-dimethylpropargylamine (0.622 g, 5.91 mmol, 2.2 eq.) was introduced with anhydrous THF (1.5 mL). After addition of a 0.85 M ethylmagnesium bromide solution in THF (7.3 mL, 6.21 mmol, 2.3 eq.), the mixture was stirred at reflux for 45 minutes. After cooling down to room temperature, a solution of **4** (1.5 g, 2.69 mmol, 1 eq.) in 34 mL of anhydrous THF were added to the flask. The mixture was then refluxed again for an hour and the reaction monitored using TLC. Isopropanol (30 mL) was then added and the mixture stirred for 30 minutes. After complete evaporation under reduced pressure, the solid was dissolved in dichloromethane and slowly precipitated using pentane. After centrifugation and evaporation, the solid was treated on a silica column (EtOAc then DCM/MeOH 9:1 to 7:3). After evaporation, **5** was obtained as a grey bluish product (1.07 g, 58 %).

**HRMS (ESI):** calcd for  $C_{44}H_{42}BN_5O_2+H^+$   $[M+H]^+$  684.35043 Da; found 684.35322 Da (error: 4.077 ppm).

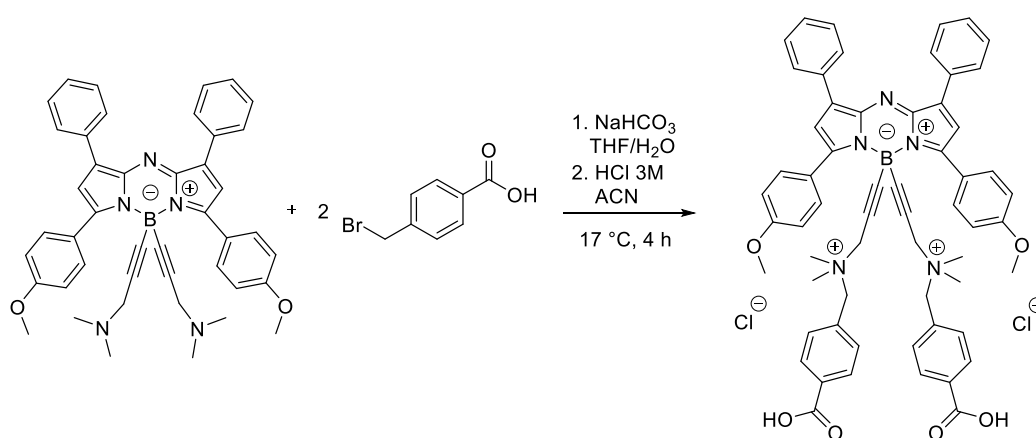
**$^1H$  NMR (500 MHz, TDF):**  $\delta$  (ppm) = 2.22 (s, 12H, H4'), 3.20 (s, 4H, H3'), 3.90 (s, 6H, H16), 7.14 (d,  $J_{H14-H13} = 8.5$  Hz, 4H, H14), 7.29 (s, 2H, H2, H6), 7.38 (t,  $J_{H11-H10} = 7.3$  Hz, 2H, H11), 7.45 (t,  $J_{H10-H11} = 7.5$  Hz, 4H, H10), 8.14 (d,  $J_{H9-H10} = 7.1$  Hz, 4H, H9), 8.47 (d,  $J_{H13-H14} = 8.9$  Hz, 4H, H13).

**$^{11}B$  NMR (193 MHz, TDF):**  $\delta$  (ppm) = -11.83 (s, bs).

## Compound 6



$C_{60}H_{56}BCl_2N_5O_6$   
 $M = 1024.85 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
 Dark green powder  
 Yield = 68 %



In a round-bottom flask, **5** (250 mg, 370  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) was dissolved in THF (35 mL) and deionized water (10 mL). Sodium carbonate (154 mg, 1.83 mmol, 5 eq.) and 4-(bromomethyl)benzoic acid (173 mg, 810  $\mu\text{mol}$ , 2.2 eq.) were then added and the mixture was stirred at 17 °C for 4 h. 4-(bromomethyl)benzoic acid was then removed *via* extraction using diethyl ether and water. The aqueous phase was concentrated under reduced pressure and HCl 3 M was added until precipitation. After centrifugation, the solid was dried under reduced pressure to finally give **6** as a green solid (250 mg, 68 %).

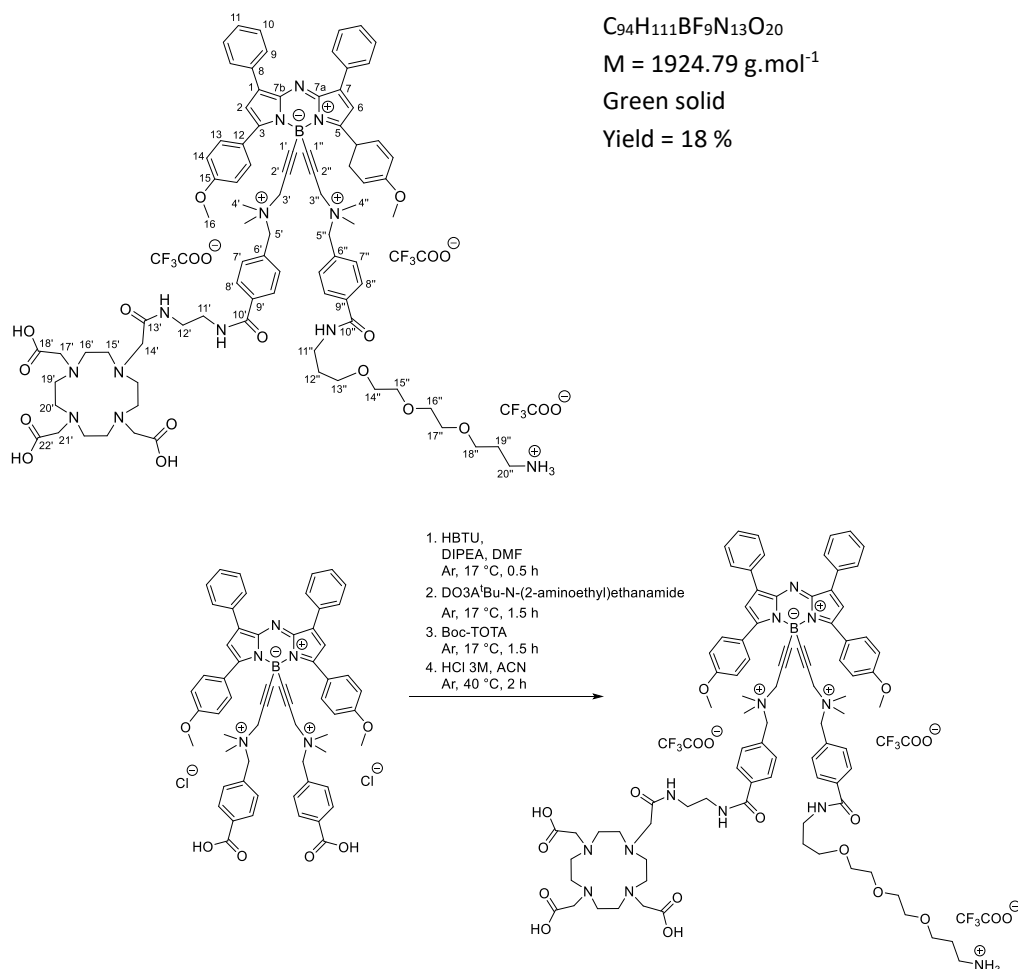
**HRMS (ESI):** calcd for  $C_{60}H_{56}B_1N_5O_6^{2+}$   $[M]^{2+}$  476.71563 Th; found 476.71604 Th (error: 0.860 ppm).

**$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  (ppm) = 2.87 (s, 12H, H4'), 3.83 (s, 6H, H16), 3.95 (s, 4H, H3'), 4.26 (s, 4H, H5'), 7.15 (d,  $J_{H14-H13} = 8.7 \text{ Hz}$ , 4H, H14), 7.43-7.54 (m, 12H, H2, H6, H10, H11, H7'), 8.04 (d,  $J_{H8'-H7'} = 8.0 \text{ Hz}$ , 4H, H8'), 8.15 (d,  $J_{H9-H10} = 7.4 \text{ Hz}$ , 4H, H9), 8.46 (d,  $J_{H13-H14} = 8.7 \text{ Hz}$ , 4H, H13).

**$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  (ppm) = 50.7 (C4'), 55.5 (C3'), 56.2 (C16), 66.7 (C5'), 88.4 (C2'), 115.3 (C14), 121.3, 125.4 (C12), 128.9, 129.7, 129.8 (C10), 130.4 (C9), 130.7, 131.1, 131.5 (C7'), 132.7, 133.4 (C6'), 133.9 (C13), 134.0, 134.1, 134.5, 144.1, 144.2 (C7a, C7b), 159.0 (C3, C5), 163.7 (C15), 168.5.

**$^{11}\text{B}$  NMR (192 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  (ppm) = -12.36 (s, bs).

## Compound 9



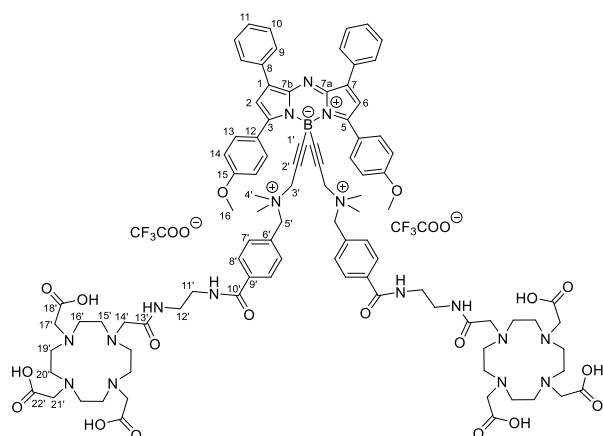
The reaction was carried out in four separate flasks. In the following lines we describe the protocol used for one of those flasks. In a round-bottom flask with an argon atmosphere, **6** (77 mg, 75  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) was dissolved in anhydrous DMF (6 mL). A solution of HBTU (61 mg, 160  $\mu\text{mol}$ , 2.2 eq.) in anhydrous DMF (6 mL) was added under stirring. After addition of DIPEA (99  $\mu\text{L}$ , 570  $\mu\text{mol}$ , 7.5 eq.), the mixture was stirred at 17 °C for 45 minutes. A solution of DO3A<sup>t</sup>Bu-N-(2-aminoethyl)ethanamide (50 mg, 81  $\mu\text{mol}$ , 1.1 eq.) in anhydrous DMF (6 mL) was then added and the reaction monitored by RP-HPLC-MS. Completion of the coupling was reached after 90 minutes of reaction, and Boc-TOTA (26 mg, 81  $\mu\text{mol}$ , 1.1 eq.) in anhydrous DMF (5 mL) was added to the mixture. The coupling was completed after 90 minutes. The crude from all flasks were mixed and after complete evaporation of the solvent under reduced pressure, the solid was solubilized in acetonitrile (160 mL) and HCl 3 M (80 mL) was added. After stirring at 40 °C, a RP-HPLC-MS of the mixture confirmed the complete deprotection after 2 h. After complete evaporation, the solid was solubilized in distilled water (30 mL) and purified using semi-preparative HPLC (20 % to 100 % acetonitrile in water (0.1 % TFA) gradient over 20 minutes, Column: Shim-pack GIS, 5  $\mu\text{m}$  C18, 10x250 mm) and the resulting solid was lyophilized to give **9** as a green solid (104 mg, 18 %).

**HRMS (ESI):** calcd for  $C_{92}H_{110}B_1F_6N_{13}O_{18}^{2+}$   $[M]^{2+}$  791.91886 Th; found 791.91948 Th (error: 0.783 ppm).

$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  (ppm) = 1.57-1.64 (m, 1H), 1.87 (quint,  $J = 6.7$  Hz, 2H, H12'' or H19''), 1.91 (quint,  $J = 5.9$  Hz, 2H, H12'' or H19''), 2.00-2.06 (m, 1H), 2.86 (s, 6H, H4' or H4''), 2.87 (s, 6H, H4' or H4''), 3.09 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.09-3.21 (m, 8H), 3.36 (bs, 4H), 3.36-3.43 (m, 6H), 3.45 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H), 3.48-3.54 (m, 3H), 3.56 (t,  $J = 6.1$  Hz, 3H), 3.59-3.68 (m, 10H), 3.70-3.75 (m, 1H), 3.78-3.81 (m, 6H, H16), 3.82 (bs, 4H), 3.92 (s, 2H, H3' or H3''), 3.93 (s, 2H, H3' or H3''), 4.20-4.26 (m, 4H, H5', H5''), 7.12-7.17 (m, 4H, H14), 7.40-7.52 (m, 12H, H2,

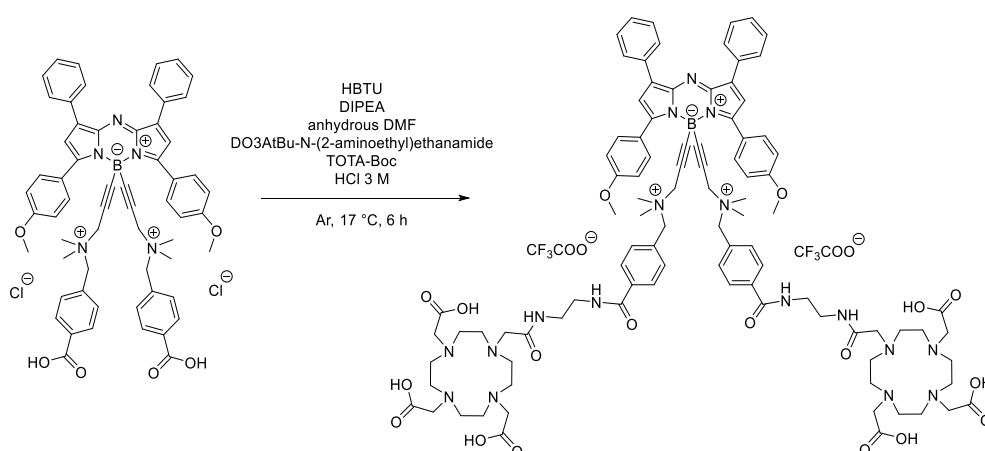
H6, H7', H7'', H10, H11), 7.80-7.85 (m, 2H, H8' or H8''), 7.91-7.96 (m, 2H, H8' or H8''), 8.12-8.17 (m, 4H, H9), 8.45-8.52 (m, 4H, H13).

**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ (ppm) = 23.7, 24.2, 28.1 (C12'' or C19''), 28.5, 30.3, 30.5 (C12'' or C19''), 36.5, 38.6, 40.1, 40.2, 40.6, 50.7 (C4', C4''), 55.6 (C3', C3''), 56.2 (C16), 56.5, 66.9 (C5' or C5''), 67.0 (C5' or C5''), 69.9-71.4 (C<sub>TOTA</sub>), 88.2 (C<sub>alkyne</sub>), 115.3 (C14), 117.2, 119.2, 121.1, 121.2, 125.2 (C12), 129.1 (C8' or C8''), 129.5 (C8' or C8''), 129.8 (C10), 130.4 (C9), 130.7, 131.3, 131.4, 133.4 (C8), 134.0, 133.9, 134.0 (C13), 137.9, 138.1, 143.9, 144.2, 158.9 (C3, C5), 162.5, 162.8, 163.0, 163.1, 163.2, 163.7 (C15), 168.9 (C9' or C9''), 169.1 (C9' or C9'').

Compound **10**

 $C_{100}H_{120}BF_6N_{17}O_{22}$ 
 $M = 2036.96 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 

Green solid

Yield = 20 %



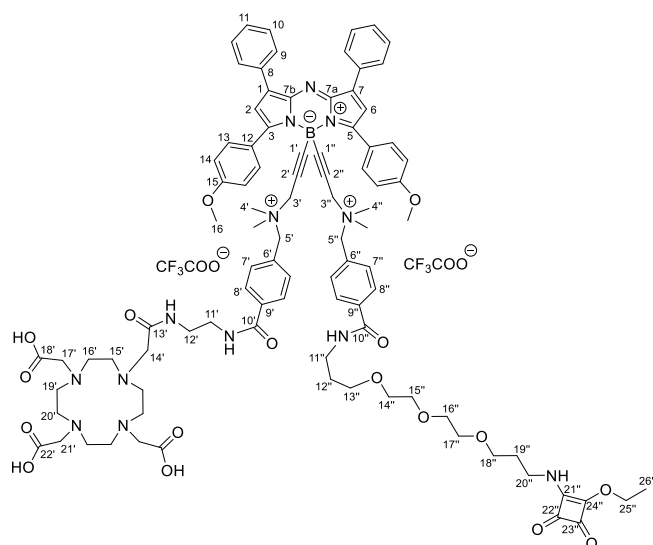
During synthesis of **9**, a by-product of the reaction was also isolated during semi-preparative HPLC purification. The by-product was identified as being the bis-DOTA derivative and after lyophilization, **10** was isolated as a green solid (115 mg, 20 %).

**HRMS (ESI):** calcd for  $C_{96}H_{120}B_1N_{17}O_{18}^{2+}$  [ $M$ ] $^{2+}$  904.95397 Th; found 904.95673 Th (error: 3.050 ppm).

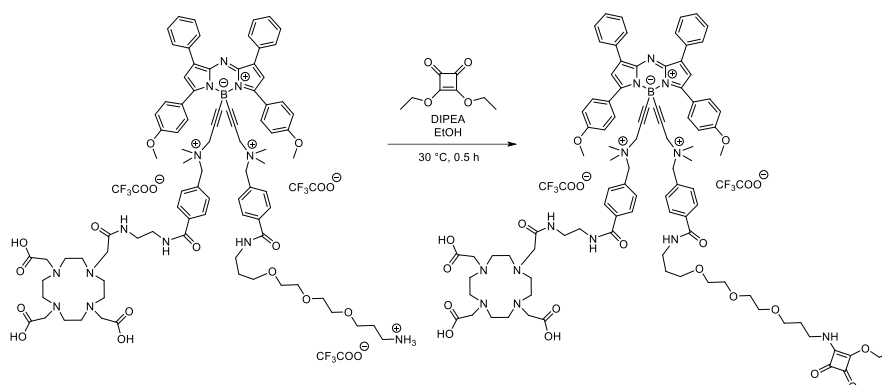
**$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  (ppm) = 1.57-1.64 (m, 1H), 1.87 (quint,  $J = 6.7$  Hz, 2H, H12'' or H19''), 1.91 (quint,  $J = 5.9$  Hz, 2H, H12'' or H19''), 2.00-2.06 (m, 1H), 2.86 (s, 6H, H4' or H4''), 2.87 (s, 6H, H4' or H4''), 3.09 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.09-3.21 (m, 8H), 3.36 (bs, 4H), 3.36-3.43 (m, 6H), 3.45 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H), 3.48-3.54 (m, 3H), 3.56 (t,  $J = 6.1$  Hz, 3H), 3.59-3.68 (m, 10H), 3.70-3.75 (m, 1H), 3.78-3.81 (m, 6H, H16), 3.82 (bs, 4H), 3.92 (s, 2H, H3' or H3''), 3.93 (s, 2H, H3' or H3''), 4.20-4.26 (m, 4H, H5', H5''), 7.12-7.17 (m, 4H, H14), 7.40-7.52 (m, 12H, H2, H6, H7', H7'', H10, H11), 7.80-7.85 (m, 2H, H8' or H8''), 7.91-7.96 (m, 2H, H8' or H8''), 8.12-8.17 (m, 4H, H9), 8.45-8.52 (m, 4H, H13).

**$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  (ppm) = 40.4 (C11' or C12'), 40.5 (C11' or C12'), 50.6 (C4'), 55.6 (C3'), 55.9, 56.2 (C16), 66.9 (C5'), 88.3 (C2'), 115.1, 115.3 (C14), 117.1, 119.0, 121.0, 121.3, 125.3 (C12), 129.3, 129.8 (C10), 130.4 (C9), 130.7, 131.3, 133.4 (C6'), 134.0 (C13), 131.3, 133.4, 134.0, 137.9, 144.0, 144.2, 159.0 (C3), 162.2, 162.4, 162.6, 162.9, 163.7 (C15), 169.2.

**$^{11}\text{B}$  NMR (193 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  (ppm) = -12.77 (s, bs).

Compound **11** (DOTA-azaBODIPY)

$C_{98}H_{114}BF_6N_{13}O_{21}$   
 $M = 1934.86 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
 Green solid  
 Yield = 62 %

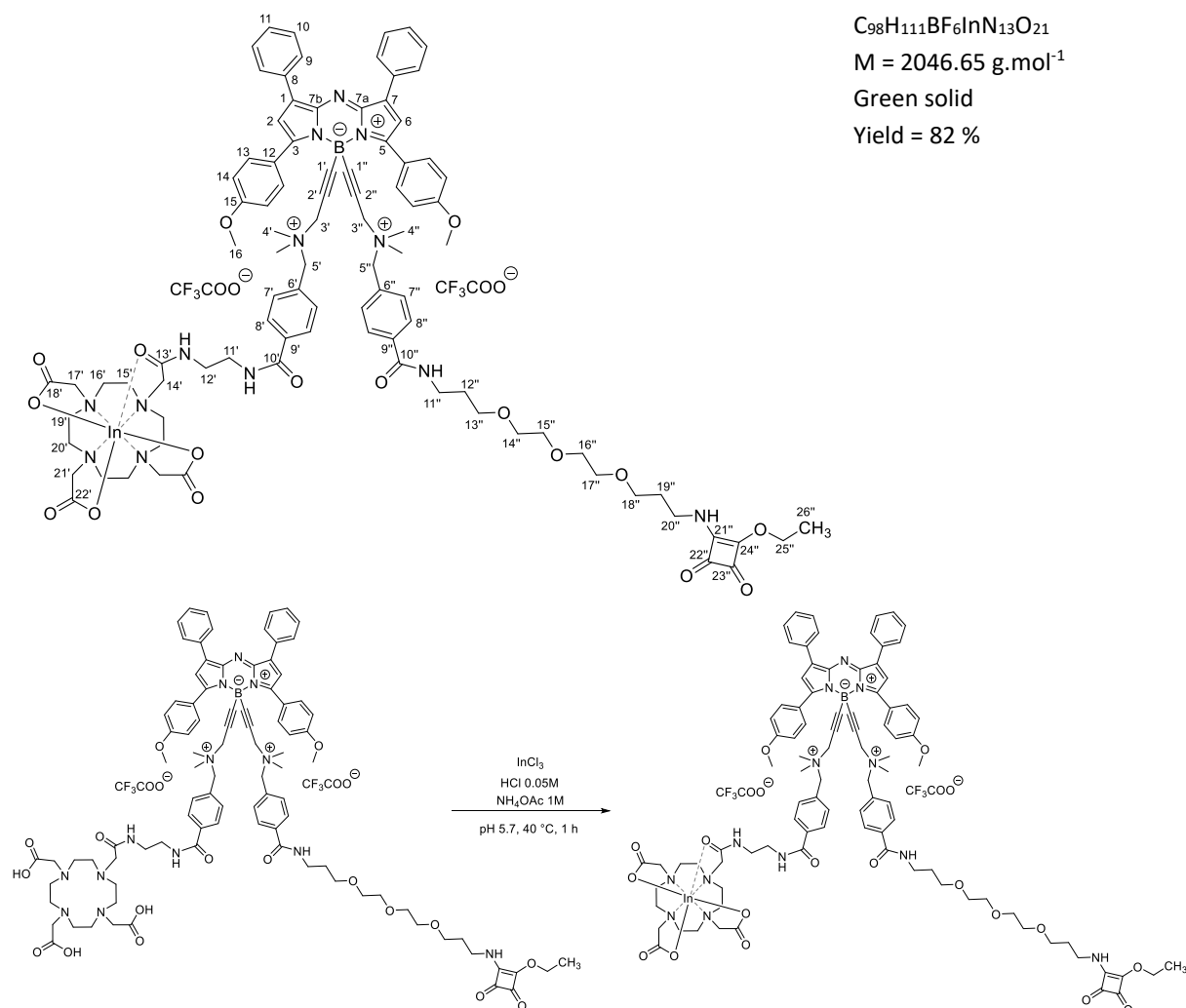


In a round-bottom flask, **9** (16 mg, 8  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) was solubilized in ethanol (11 mL). DIPEA (16  $\mu\text{L}$ , 97  $\mu\text{mol}$ , 12 eq.) and diethyl squarate (14  $\mu\text{L}$ , 97  $\mu\text{mol}$ , 12 eq.) were then introduced. After stirring at 30 °C for 30 minutes, the solvent was removed under reduced pressure and the resulting solid was solubilized in 25 mL of a distilled water/acetonitrile (8/2) mixture. The purification was carried out using a semi-preparative HPLC (20 % to 100 % acetonitrile in water (0.1 % TFA) gradient over 20 minutes, Column: Shim-pack GIS, 5  $\mu\text{m}$  C18, 10x250 mm). After lyophilization, **11** was obtained as a green solid (10 mg, 62 %).

**HRMS (ESI):** calcd for  $C_{94}H_{114}B_1N_{13}O_{17}^{2+}$   $[M]^{2+}$  853.92689 Th; found 853.92875 Th (error: 2.178 ppm).

**$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  (ppm) = 1.23-1.43 (m, 5H, H26''), 1.44-1.54 (m, 1H), 1.54-1.68 (m, 1H), 1.72-1.78 (m, 1H, H12'' or H19''), 1.78-1.83 (m, 1H, H12'' or H19''), 1.83-1.91 (m, 2H), 1.98-2.09 (m, 1H), 2.17-2.42 (m, 2H), 2.86 (s, 12H, H4', H4''), 3.06-3.27 (bs, 7H), 3.36-3.75 (m, 25H), 3.76-3.99 (m, 15H, H16, H3', H3''), 4.17-4.28 (m, 4H, H5', H5''), 4.59-4.69 (m, 2H, H25''), 7.08-7.19 (m, 4H, H14), 7.35-7.58 (m, 12H, H2, H6, H10, H11, H7', H7''), 7.85-7.79 (m, 2H, H8' or H8''), 7.90 (d,  $J = 7.8 \text{ Hz}$ , 2H, H8' or H8''), 8.14 (d,  $J = 7.9 \text{ Hz}$ , 4H, H9), 8.46 (d,  $J = 8.4 \text{ Hz}$ , 4H, H13).

**$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  (ppm) = 14.4, 16.1 (C26''), 17.3, 20.7, 23.7, 24.2, 30.2-43.2 ( $C_{\text{TOTA}}$ ), 50.7 (C4', C4''), 55.3-55.5 (C3', C3''), 56.0, 56.2 (C16), 66.7-66.9 (H5', H5''), 69.1-70.4 ( $C_{\text{TOTA}}$ ,  $C_{\text{DOTA}}$ ), 70.6 (C25''), 71.1-71.6 ( $C_{\text{TOTA}}$ ,  $C_{\text{DOTA}}$ ), 88.3 ( $C_{\text{alkyne}}$ ), 88.4 ( $C_{\text{alkyne}}$ ), 115.3 (C14), 117.2, 119.1, 121.3, 125.4 (C12), 129.1 (C8' or C8''), 129.4 (C8' or C8''), 129.8 (C10), 130.4 (C9), 130.7, 131.3, 133.4 (C8), 134.0 (C13), 137.9, 138.1, 144.0, 144.2, 159.0 (C3, C5), 163.7 (C15), 168.6 (C9' or C9''), 169.2 (C9' or C9''), 174.6, 174.7, 175.7, 177.7, 178.1, 180.0, 184.4, 184.6, 189.9, 190.0.

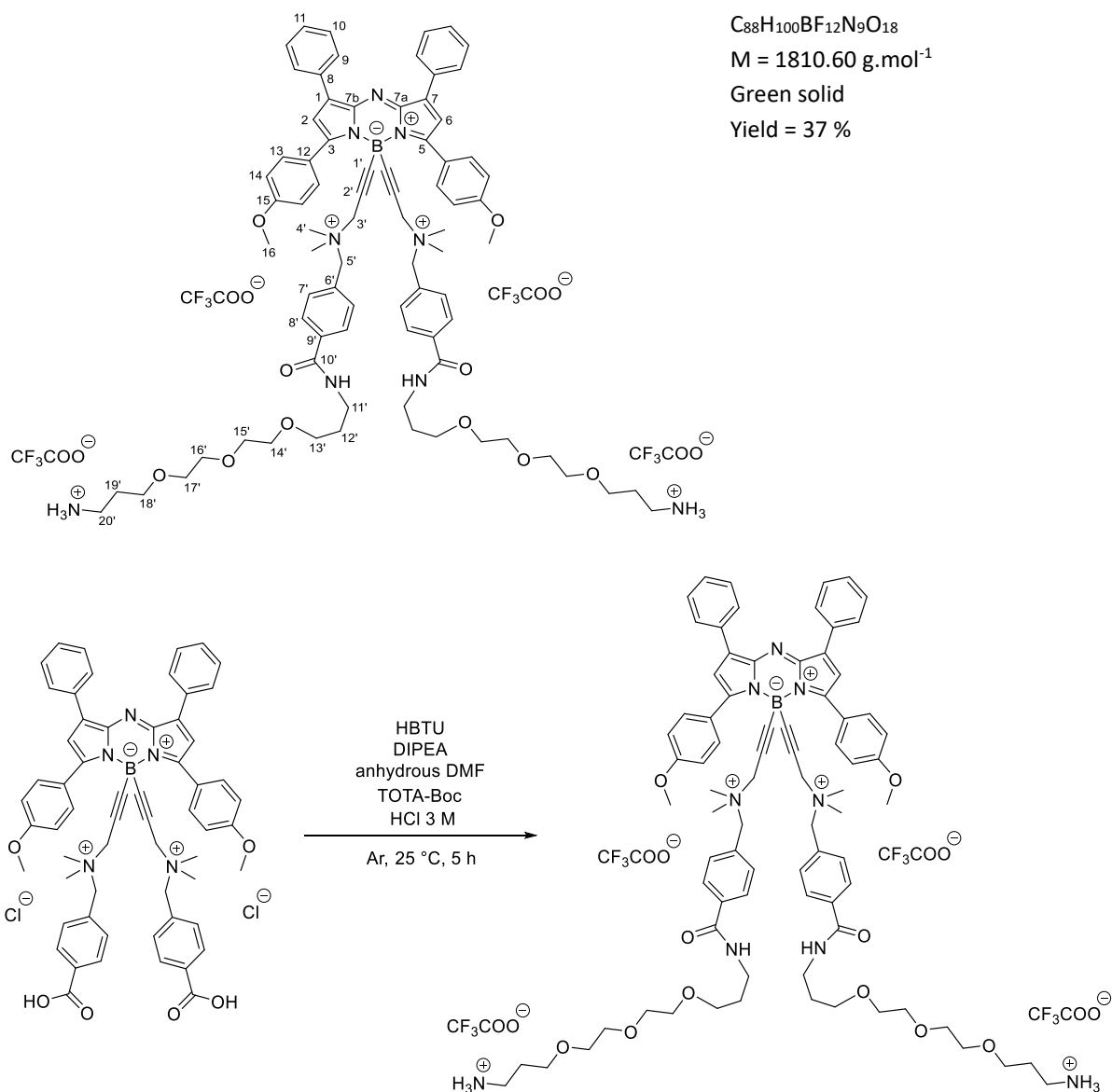
Compound **12**


In a 1.5 mL Eppendorf,  $InCl_3$  (420  $\mu\text{g}$ , 2  $\mu\text{mol}$ , 1.05 eq.) was dissolved in HCl 0.05 M (315  $\mu\text{L}$ ).  $NH_4OAc$  1 M (40  $\mu\text{L}$ ) was added until  $\text{pH} \approx 6$ . **11** (3.47 mg, 1.8  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) in  $H_2O$  (50  $\mu\text{L}$ ) was then added to the previous solution and the reaction was carried out in an Eppendorf ThermoMixer C (40  $^\circ\text{C}$ , 900 rpm, 50 min). After completion acknowledged *via* RP-HPLC-MS, the solution was purified directly on a semi-preparative HPLC (5 % to 100 % acetonitrile in water (0.1 % TFA) gradient over 20 minutes, Column: Shim-pack GIST, 5  $\mu\text{m}$  C8, 10x250 mm) and the resulting product was lyophilized to give **12** as a green solid (3 mg, 82 %).

**HRMS (ESI):** calcd for  $C_{94}H_{111}B_1In_1N_{13}O_{17}^{2+}$  [ $M$ ] $^{2+}$  909.86709 Th; found 909.86880 Th (1.879 ppm).

**$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $CD_3OD$ ):**  $\delta$  (ppm) = 1.30-1.44 (m, 5H, H26''), 1.47-1.54 (m, 1H), 1.58-1.65 (m, 1H), 1.73-1.84 (m, 2H, H12'' or H19''), 1.85-1.89 (quint,  $J = 6.4$  Hz, 2H, H12'' or H19''), 2.01-2.07 (m, 1H), 2.15-2.23 (m, 1H), 2.65-2.80 (m, 8H), 2.86 (s, 6H, H4' or H4''), 2.89 (s, 6H, H4' or H4''), 2.95-3.27 (m, 10H), 3.43-3.74 (m, 24H), 3.79-3.84 (m, 6H, H16), 3.92-3.97 (m, 4H, H3', H3''), 4.18-4.26 (m, 4H, H5', H5''), 4.59-4.69 (m, 2H, H25''), 7.13 (d,  $J = 8.5$  Hz, 4H, H14), 7.42-7.54 (m, 10H, H2, H6, H10, H7', H7''), 7.58 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H, H11), 7.80-7.86 (m, 2H, H8' or H8''), 7.90 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H, H8' or H8''), 8.16 (d,  $J = 6.8$  Hz, 4H, H9), 8.46 (d,  $J = 7.9$  Hz, 4H, H13).



Compound **14**

In a round-bottom flask, **6** (100 mg, 90  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) was dissolved in anhydrous DMF (5 mL) under an argon atmosphere. DIPEA (140  $\mu\text{L}$ , 1.08 mmol, 11 eq.) and a solution of HBTU (87 mg, 230  $\mu\text{mol}$ , 2.4 eq.) dissolved in anhydrous DMF (5 mL) were added to the flask. After stirring for 30 minutes at 25  $^{\circ}\text{C}$ , a solution of Boc-TOTA (74  $\mu\text{L}$ , 230  $\mu\text{mol}$ , 2.4 eq.) in anhydrous DMF (5 mL) was added and the mixture further stirred at 25  $^{\circ}\text{C}$ . Completion of the coupling was monitored using RP-HPLC-MS and after 5 h, HCl 3 M (3 mL) was added and the solvent evaporated under reduced pressure. The solid was dissolved in water and purified using semi-preparative HPLC (20 % to 100 % acetonitrile in water (0.1 % TFA) over 20 minutes, Column: Shim-pack GIS, 5  $\mu\text{m}$  C18, 10x250 mm) and the resulting product was lyophilized to give **14** as a green solid (66 mg, 37 %).

**HRMS (ESI):** calcd for  $C_{80}H_{100}B_1N_9O_{10}^{2+}$   $[M]^{2+}$  678.88376 Th; found 678.88472 Th (error: 1.414 ppm).

**$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  (ppm) = 1.87 (quint,  $J = 6.5$  Hz, 4H, H12'), 1.91 (quint,  $J = 6.1$  Hz, 4H, H19'), 2.86 (s, 12H, H4'), 3.09 (t,  $J_{\text{H}20'-\text{H}19'}$  = 6.4 Hz, 4H, H20'), 3.45 (t,  $J_{\text{H}11'-\text{H}12'}$  = 7.1 Hz, 4H, H11'), 3.56 (t,  $J_{\text{H}13'-\text{H}12'}$  = 6.0 Hz, 4H, H13'), 3.59-3.66 (m, 20H, H14'-H18'), 3.81 (s, 6H, H16), 3.93 (s, 4H, H3'),

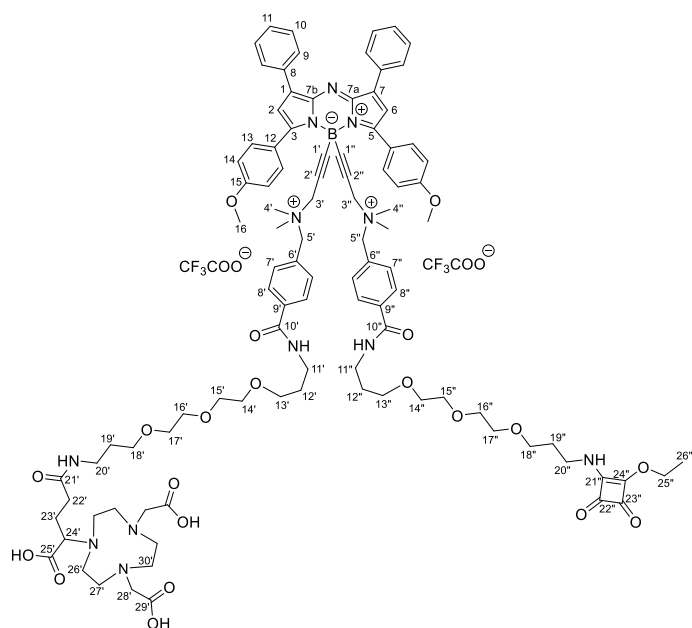
## Experimental section

---

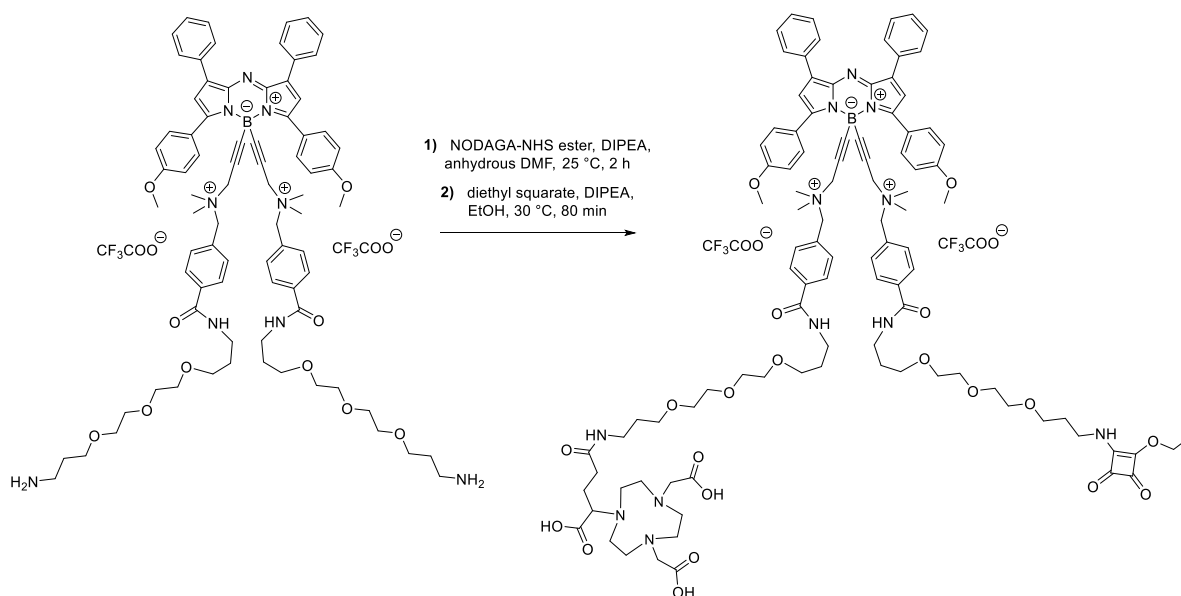
4.22 (s, 4H, H5'), 7.13 (d,  $J_{H14-H13} = 8.9$  Hz, 4H, H14), 7.40-7.51 (m, 12H, H2, H6, H10, H11, H7'), 7.83 (d,  $J_{H8'-H7'} = 8.2$  Hz, 4H, H8'), 8.14 (d,  $J_{H9-H10} = 6.7$  Hz, 4H, H9), 7.83 (d,  $J_{H13-H14} = 8.9$  Hz, 4H, H13).

**$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  (ppm) = 24.2, 28.1 (C19'), 30.5 (C12'), 38.5 (C11'), 40.1 (C20'), 50.7 (C4'), 55.5 (C3'), 56.2 (C16), 66.8 (C5'), 69.9 (C13'), 70.3 (C18'), 71.0, 71.1, 71.4, 88.3 (C2'), 115.3 (C14), 117.3, 119.3, 121.3 (C2, C6), 125.3 (C12), 129.1 (C8'), 129.8 (C10), 130.4 (C9), 130.7 (C11), 131.3 (C6'), 133.4, 134.0 (m, C13, C7'), 138.1 (C7a, C7b), 144.0 (C1/C7 or C8), 144.2 (C1/C7 or C8), 159.0 (C3, C5), 163.0 (d), 163.7 (C15), 168.8 (C10').

**$^{11}\text{B}$  NMR (193 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  (ppm) = -12.63 (s, bs).

Compound **15**

$C_{105}H_{127}BF_6N_{12}O_{24}$   
 $M = 2066.03 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
 Green solid  
 Yield = 15 %



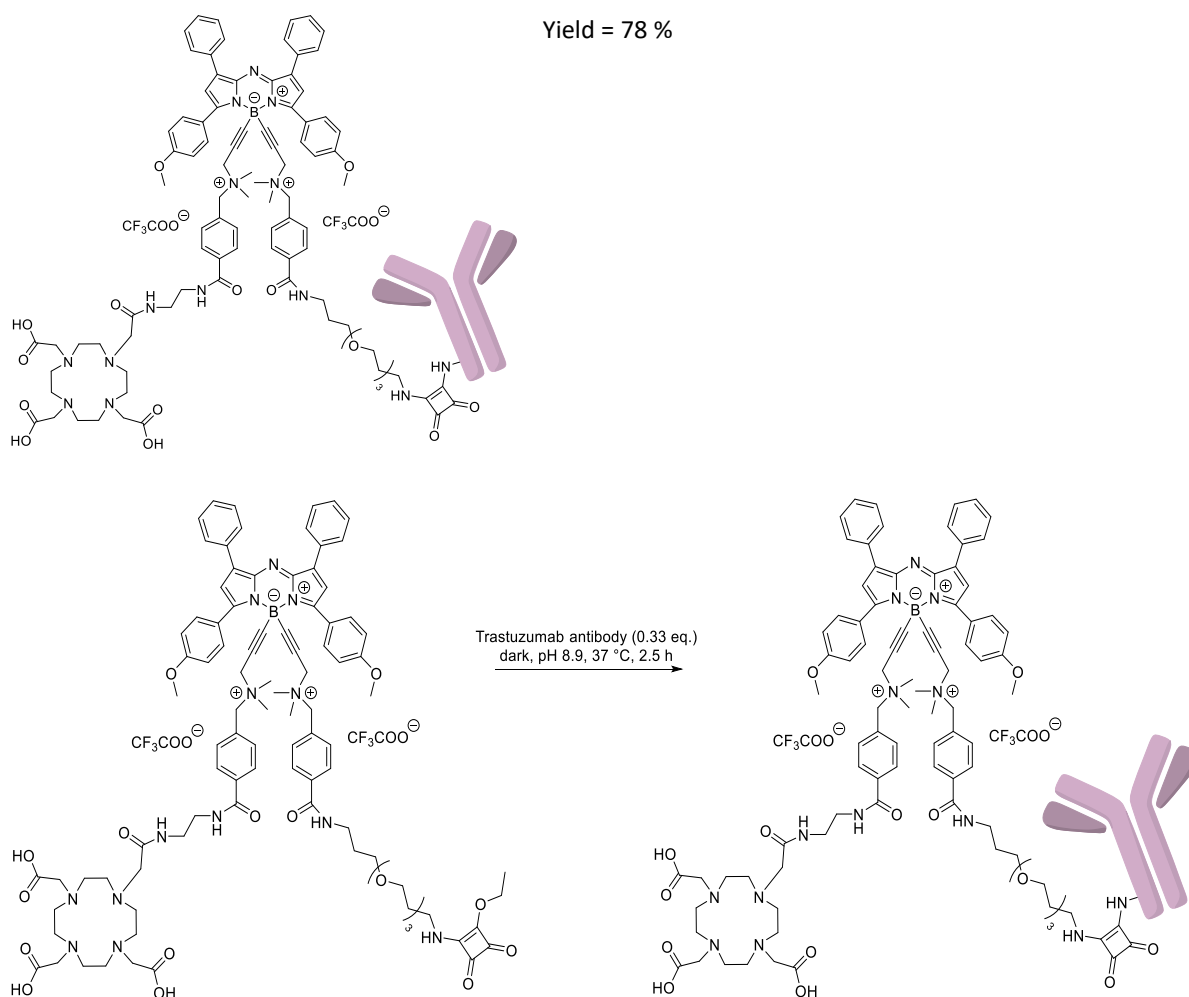
In a round-bottom flask, **14** (140 mg, 68  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) was dissolved in anhydrous DMF (35 mL). Under an inert atmosphere, NODAGA-NHS ester (72 mg, 98  $\mu\text{mol}$ , 1.5 eq.) and DIPEA (89  $\mu\text{L}$ , 508  $\mu\text{mol}$ , 7.5 eq.) were added and the mixture was stirred at 25 °C for 2 hours. After complete evaporation of the solvent, ethanol (120 mL), DIPEA (175  $\mu\text{L}$ , 1.03 mmol, 15 eq.) and diethyl squarate (152  $\mu\text{L}$ , 1.03 mmol, 15 eq.) were added and the solution was stirred at 30 °C for 80 minutes. After complete evaporation of the solvent, the solid was dissolved in water and remaining diethyl squarate was removed from the aqueous phase using diethyl ether. The aqueous layers were collected and the solvent evaporated. The solid crude was dissolved into 20 mL of an acetonitrile/water (3:20) solution and purified using a semi-preparative HPLC (15 % to 100 % acetonitrile in water (0.1 % TFA) gradient over 25 minutes, Column: Shim-pack GIST, 5  $\mu\text{m}$  C8, 10x250 mm). After lyophilization, **15** was obtained as a green solid (23 mg, 15 %).

**HRMS (ESI)**: calcd for  $C_{101}H_{127}B_1N_{12}O_{20}^{2+}$   $[M]^{2+}$  919.46858 Th; found 919.46982 Th (error: 1.349 ppm).

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  (ppm) = 1.36-1.41 (m, 3H, H26''), 1.68-1.79 (m, 4H), 1.79-1.83 (m, 1H), 1.83-1.93 (m, 5H), 1.93-2.00 (m, 1H), 2.04-2.13 (m, 1H), 2.25-2.33 (m, 1H), 2.34-2.42 (m, 2H), 2.87 (s, broad, 12H, H4', H4''), 2.97-3.07 (m, 4H), 3.07-3.16 (m, 5H), 3.16-3.26 (m, 4H), 3.34-3.39 (m, 1H), 3.42-3.49 (m, 10H), 3.49-3.54 (m, 5H), 3.53-3.75 (m, 24H), 3.82 (s, 6H, H16), 3.91-3.96 (m, 4H, H3', H3''), 4.20-4.25 (m, 4H, H5', H5''), 4.59-4.67 (m, 2H, H25''), 7.13 (d,  $J_{H14-H13} = 8.6$  Hz, 4H, H14), 7.41-7.53 (m, 12H, H2, H6, H10, H11, H7', H7''), 7.81-7.83 (m, 4H, H8', H8''), 8.15 (d,  $J_{H9-H10} = 8.1$  Hz, 4H, H9), 8.46 (d,  $J_{H13-H14} = 8.4$  Hz, 4H, H13).

**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  (ppm) = 16.1 (C26''), 16.2, 23.9, 24.2, 26.5, 28.1, 30.2-43.2 (C<sub>TOTAL</sub>), 50.7 (C4', C4''), 55.4 (C3', C3''), 56.2 (C16), 64.9, 65.4, 66.7 (C5', C5''), 69.1, 69.3, 69.8, 70.0, 70.1, 70.2, 70.3, 70.6, 71.1-71.3 (m, overlapping), 71.4-71.6 (m, overlapping), 79.3, 88.4 (C<sub>alkyne</sub>), 115.3 (C14), 117.3, 119.2, 121.2, 121.4, 125.3 (C12), 129.1 (C8', C8''), 129.5, 129.8 (C10), 130.4 (C9), 130.7, 131.3, 133.4 (C8), 134.0 (C13), 138.1, 138.2, 144.0, 144.2, 159.0 (C3, C5), 163.7 (C15), 168.5-168.6 (m, overlapping), 173.3, 174.6, 175.0, 175.1, 176.5, 177.7, 178.1, 184.4, 184.6, 189.9, 190.0.

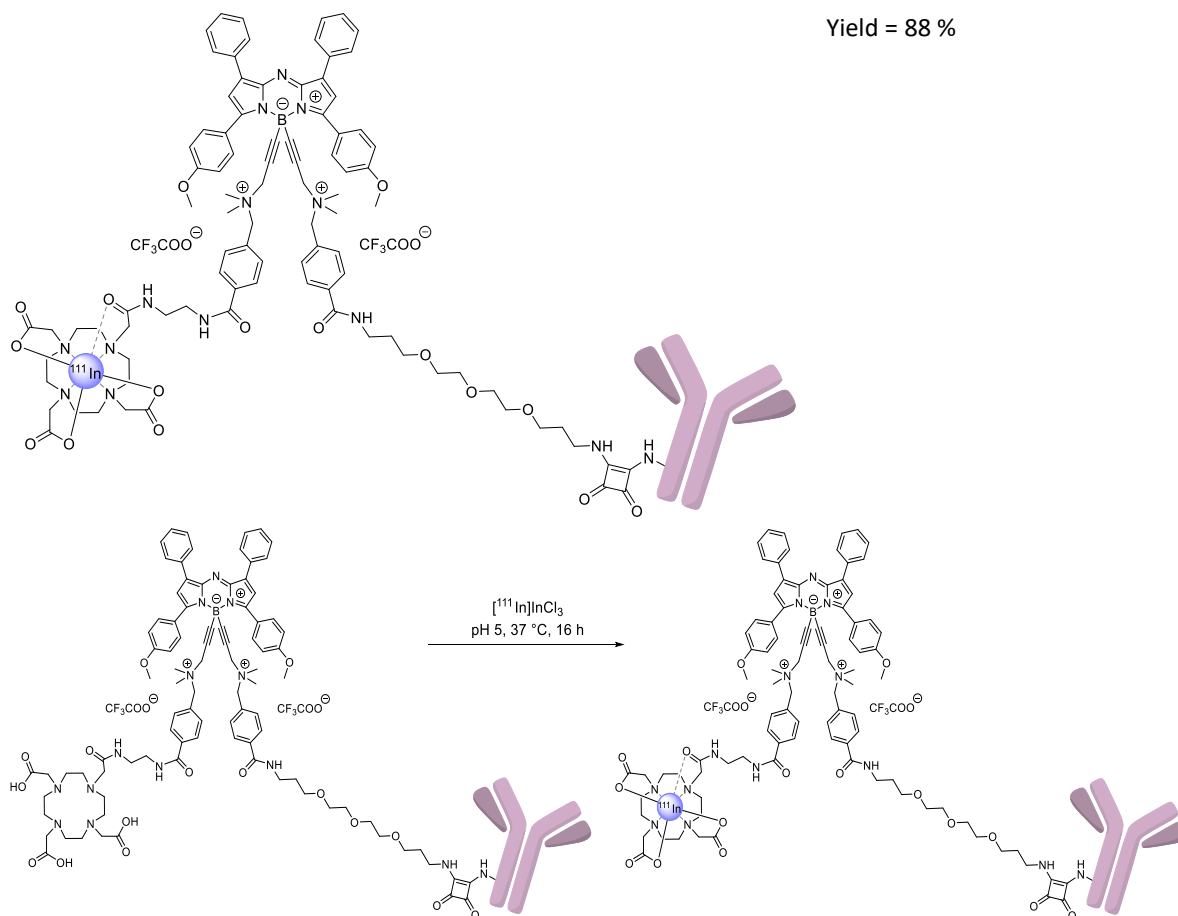
**<sup>11</sup>B NMR (193 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  (ppm) = -12.25 (s, bs).

Compound **16** (DOTA-azaBODIPY-trastuzumab)Bioconjugation

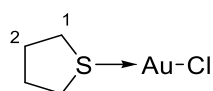
Trastuzumab antibody was purified with a HiTrap™ Desalting column (GE Healthcare) and concentrated up to 10 mg/mL in PBS. Bioconjugation was optimized to get a degree of labeling (DOL) suitable for imaging purpose while avoiding risks of alteration of the antibody. On this account, 3 equivalents of azaBODIPY **11** at 5 mM (DMSO) were added to 10 mg of trastuzumab in NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1 M pH 9 buffer, for a final concentration of antibody of 2 mg/mL. The reaction mixture was then incubated for 2.5 h at 37 °C, protected from light. The free probe was removed by FPLC using a protein A affinity column Hitrap Malselect™ (Ge Healthcare). A solution of acetic acid 25 mM pH 3 was used for elution and ammonium acetate 50 mM pH 9 was added in a final step to obtain a pH 6 solution tolerable for the storage of antibody at 4 °C. The degree of labeling (DOL) was calculated based on absorbance at 280 nm and AUC between 600 and 750 nm. A MALDI-TOF analysis was carried out to confirm this result.

Compound **17** ( $[^{111}\text{In}]\text{In-DOTA-azaBODIPY-trastuzumab}$ )

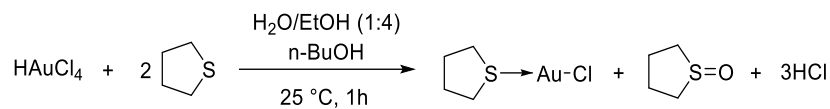
$^{111}\text{In}$  radiometallation



Compound **16** in 0.1 M AcONH<sub>4</sub> pH 5.8 was incubated with  $[^{111}\text{In}]\text{InCl}_3$  in 0.05 M HCl (Curium, France) (600 Mbq/mg of compound **16**). The mixture was adjusted to pH 5 with 1 M AcONH<sub>4</sub> and mixed at 37 °C during 16 h in a Thermomixer®. Unincorporated  $^{111}\text{In}$  was scavenged by addition of a solution of EDTA 0.05 M in 0.1 M AcONH<sub>4</sub> pH 5.6 (1/10th of the reaction volume) and incubated during 15 min.  $^{111}\text{In}$ -EDTA was removed by ultrafiltration using Amicon® Ultra 2 (Merck Millipore) MWCO 30 kDa and radiolabeled antibody was diluted in 0.9 % NaCl prior to injection. The radiolabeling yield and the presence of free  $[^{111}\text{In}]\text{InCl}_3$  in the labeled antibody solution were determined using Instant Thin Layer Chromatography-Silica Gel (ITLC-SG) strips (Agilent). ITLCs were performed before and after ultrafiltration to determine the radiolabeling yield and to assess the absence of free  $^{111}\text{In}$ . 1 µL of each solution was deposited on ITLC-SG strips at 2 cm of the bottom. The eluent (sodium citrate 0.1 M pH 5) was allowed to rise to 10 cm from the bottom of the strips. Compound **17** remained at the application point while free  $^{111}\text{In}$  or  $^{111}\text{In}$ -chelates migrated with solvent front. The strips were then analyzed using an AR-2000  $\gamma$ -radiochromatograph (Eckert & Ziegler, Germany).

Compound **18** ((tth)AuCl)

$C_4H_8AuClS$   
 $M = 320.58 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
 White powder  
 Yield = 80 %

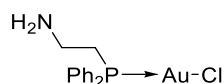


Compound **18** was synthesized according to a modified reported procedure.  $^1H$  NMR data are in agreement with literature data.<sup>329</sup>

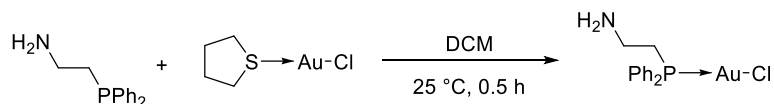
In a Schlenk tube, tetrahydrothiophene (226 mg, 2.55 mmol, 2.1 eq.) were introduced dropwise into a solution of  $HAuCl_4 \cdot nH_2O$  (500 mg, 1.21 mmol, 1 eq.) in a  $H_2O/EtOH$  (0.5 mL/2 mL) mixture. After stirring at 25 °C for an hour, the supernatant was filtered *via* cannula, and the remaining precipitate was washed twice with pentane before being dried under reduced pressure to give **18** (310 mg, 80 %) as a white powder.

$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 2.01-2.35 (m, 4H,  $CH_2$ ), 3.21-3.60 (m, 4H,  $CH_2$ ).

Compound **19** (2-(diphenylphosphino)ethylamine-aurichloride)



$C_{14}H_{16}AuClNP$   
 $M = 461.68 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
 White powder  
 Yield = 85 %



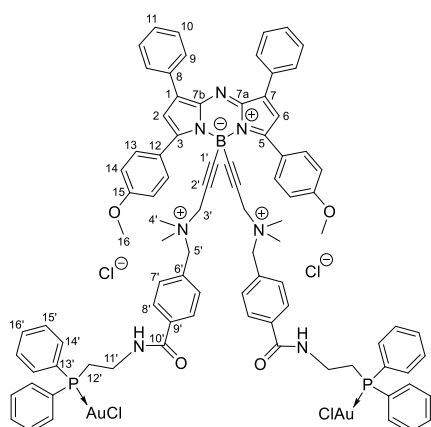
Compound **19** was synthesized according to a modified reported procedure.  $^1H$  and  $^{31}P$  NMR data are in agreement with literature data.<sup>227</sup>

In a Schlenk tube, 2-(diphenylphosphino)ethanamine (466 mg, 2.03 mmoles, 1 eq.) was added to a solution of (tth)AuCl **18** (651 mg, 2.03 mmoles, 1 eq.) in DCM (20 mL). The mixture was stirred at 25 °C for 30 minutes. The solution was concentrated and pentane added, leading to a precipitate, which was dried to give **19** (800 mg, 85 %) as a white solid.

$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 2.68 (td,  $J = 11.0, 7.5$  Hz, 2H,  $CH_2$ -P), 3.07-3.16 (td,  $J = 11.3, 7.6$  Hz, 2H,  $CH_2$ -N), 7.42-7.53 (m, 6H,  $CH^{Ar}_{ortho+para}$ ), 7.64-7.72 (m, 4H,  $CH^{Ar}_{meta}$ ).

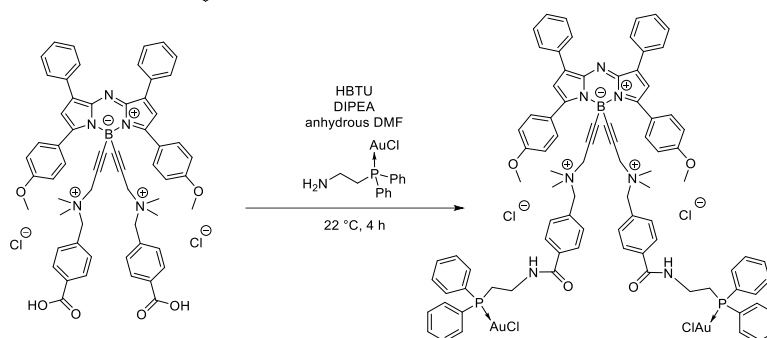
$^{31}P$  NMR (202 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 23.75.



Compound **20**
 $C_{88}H_{84}Au_2BCl_4N_7O_4P_2$ 
 $M = 1912.18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 

Green solid

Yield = 80 %



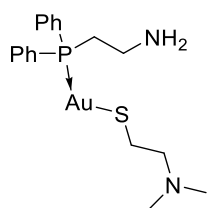
In a round-bottom flask, **6** (45 mg, 40  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) was dissolved in anhydrous DMF (4 mL). A solution of HBTU (34 mg, 89  $\mu\text{mol}$ , 2.05 eq.) in anhydrous DMF (5 mL) was added, followed by an addition of DIPEA (56  $\mu\text{L}$ , 320  $\mu\text{mol}$ , 7.4 eq.). After stirring at 22  $^{\circ}\text{C}$  for 15 minutes, a solution of 2-(diphenylphosphino)ethylamine-aurichloride **19** (42 mg, 90  $\mu\text{mol}$ , 2.05 eq.) in DMF (5 mL) was added to the mixture. After 4 h, TLC confirmed complete conversion of the reagent. The solvents were removed under reduced pressure and the crude was purified on alumina column (DCM to DCM/MeOH 96:4). After removal of the solvents under reduced pressure, the product underwent an ion exchange (Amberlite IRA-410, ACN/water 1:1). The solid was precipitated from DCM using diethyl ether to give **20** (67 mg, 80 %) as a green solid.

**HRMS (ESI):** calcd for  $C_{88}H_{84}Au_2BCl_2N_7O_4P_2\cdot 2HCl^{2+}$   $[M-2HCl]^{2+}$  883.76583 Th; found 883.76766 Th (error: 2.071 ppm).

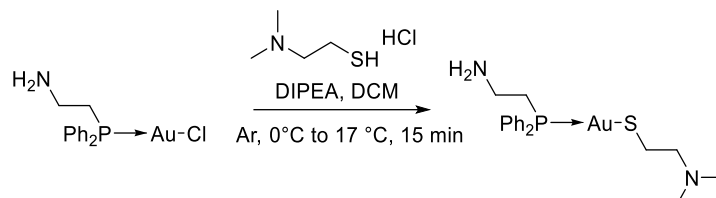
**$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  (ppm) = 2.77 (s, 12H, H4'), 3.04-3.10 (m, 4H, H12'), 3.50-3.56 (m, 4H, H11'), 3.77 (s, 6H, H16), 3.98 (s, 4H, H3'), 4.21 (s, 4H, H5'), 7.14 (d,  $J_{H14-H13} = 8.5 \text{ Hz}$ , 4H, H14), 7.37 (d,  $J_{H7'-H8'} = 8.5 \text{ Hz}$ , 4H, H7'), 7.48 (t,  $J_{H11-H10} = 7.3 \text{ Hz}$ , 2H, H11), 7.52-7.59 (m, 16H, H10, H14', H16'), 7.66 (s, 2H, H2, H6), 7.78 (ddd,  $J = 12.9, 7.5, 1.8 \text{ Hz}$ , 8H, H15'), 7.84 (d,  $J_{H8'-H7'} = 7.9 \text{ Hz}$ , 4H, H8'), 8.17 (d,  $J_{H9-H10} = 7.1 \text{ Hz}$ , 4H, H9), 8.45 (d,  $J_{H13-H14} = 8.5 \text{ Hz}$ , 4H, H13), 8.92 (t,  $J = 5.4 \text{ Hz}$ , 2H, NH).

**$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  (ppm) = 14.0, 15.2, 18.8, 26.3 (d,  $J_{C12'-P} = 37.8 \text{ Hz}$ , C12'), 26.6, 30.4, 34.4, 35.5 (m, C11'), 49.2 (C4'), 53.8 (C3'), 55.6 (C16), 64.8 (C5'), 64.9, 87.1 (C2'), 114.1 (C14), 120.8 (C2, C6), 123.4 (C12), 124.9, 127.8 (C8'), 128.8-129.1 (d,  $J_{C13'-P} = 46.1 \text{ Hz}$ , C13'), 128.9 (C9), 129.3 (C10), 129.4 (d,  $J_{C14'-P} = 11.6 \text{ Hz}$ , C14'), 130.1 (C6'), 131.7 (C8), 132.1 (C16'), 132.3 (C7'), 132.7 (C13), 133.1 (d,  $J_{C15'-P} = 13.1 \text{ Hz}$ , C15'), 135.5 (C9'), 139.2, 141.3 (C1, C7), 142.3 (C7a, C7b), 157.1 (C3, C5), 161.7 (C15), 165.3 (C10').

**$^{31}\text{P}$  NMR (193 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  (ppm) = 24.57.

Compound **21**


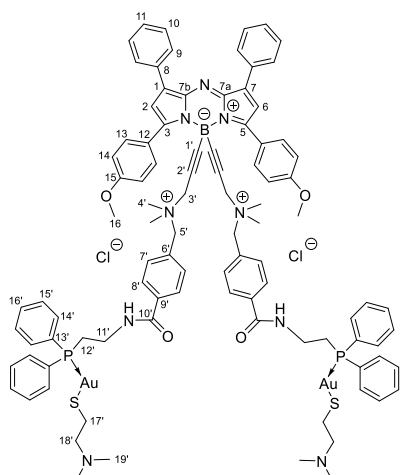
$C_{18}H_{26}AuN_2PS$   
 $M = 530.42 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
 White powder



In a Schlenk tube, 2-(dimethylamino)ethanethiol hydrochloride (15 mg, 0.11 mmoles, 1 eq.) was stirred in anhydrous DCM (2 mL) in presence of DIPEA (184  $\mu\text{L}$ , 1.1 mmoles, 10 eq.) at 17  $^{\circ}\text{C}$  for 15 minutes under an argon atmosphere. In another Schlenk tube, **19** (50 mg, 0.11 mmoles, 1 eq.) was stirred in anhydrous DCM (4 mL) at 0  $^{\circ}\text{C}$  for 5 minutes in the dark, under an argon atmosphere. The content of the first Schlenk was then introduced dropwise to the second Schlenk *via* canula at 0  $^{\circ}\text{C}$  in the dark. The mixture was stirred at 17  $^{\circ}\text{C}$  for 15 minutes under argon. Evaporation gave **21** that was directly engaged in the next reaction without further purification.

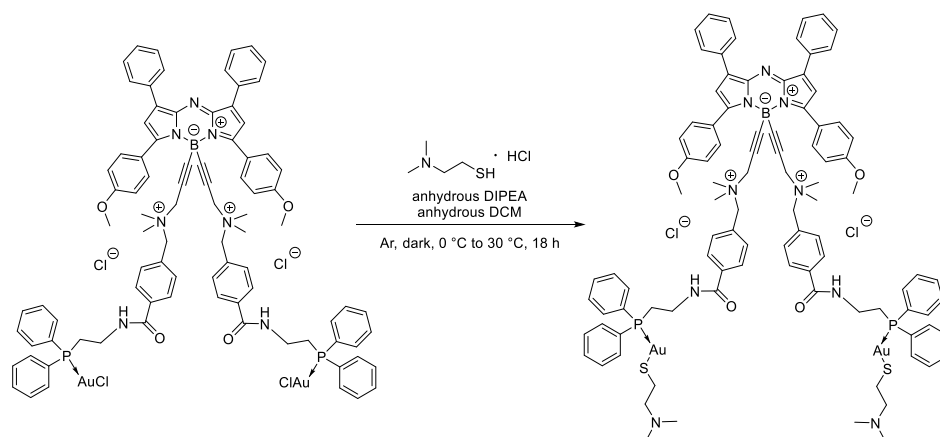
$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 2.90 (s, 6H,  $\text{NCH}_3$ ), 2.99-3.05 (m, 2H), 3.06-3.13 (m, 2H), 3.15-3.19 (m, 2H), 3.20-3.24 (m, 2H), 7.58-7.64 (m, 6H,  $\text{CH}^{\text{Ar}}_{\text{ortho+para}}$ ), 7.76-7.82 (m, 4H,  $\text{CH}^{\text{Ar}}_{\text{meta}}$ ).

$^{31}\text{P NMR}$  (202 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 29.54.

Compound **22**
 $C_{96}H_{104}Au_2BCl_2N_9O_4P_2S_2$ 
 $M = 2049.66 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 

Green solid

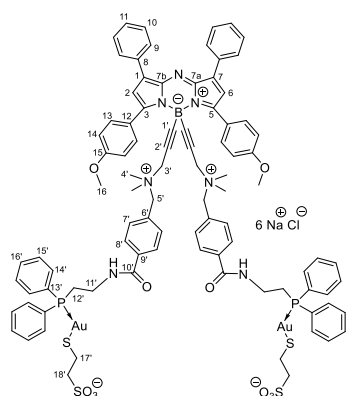
Yield = 67 %



In a Schlenk tube, 2-(dimethylamino)ethanethiol hydrochloride (10 mg, 73  $\mu\text{mol}$ , 2.05 eq.) were solubilized in anhydrous DCM (15 mL) and anhydrous DIPEA (60  $\mu\text{L}$ , 350  $\mu\text{mol}$ , 9.5 eq.) was added. The suspension was stirred in the dark under argon at 20  $^{\circ}\text{C}$  for 10 minutes. In a second Schlenk tube, **20** (70 mg, 35  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) was solubilized in anhydrous DCM (35 mL). The solution was stirred at 0  $^{\circ}\text{C}$  for 5 minutes. The suspension from the first Schlenk tube was then slowly added *via* canula to the second Schlenk tube in the dark at 0  $^{\circ}\text{C}$ . The mixture was then stirred at 20  $^{\circ}\text{C}$  for 16 h. A solution of 2-(dimethylamino)ethanethiol hydrochloride (6 mg, 42  $\mu\text{mol}$ , 1.2 eq.) and anhydrous DIPEA (60  $\mu\text{L}$ , 350  $\mu\text{mol}$ , 9.5 eq.) solubilized in anhydrous DCM (2 mL) was added and the mixture further mixed at 30  $^{\circ}\text{C}$  for 2 hours. After completion confirmed by TLC, the crude was dried under reduced pressure and purified on alumina gel (DCM to DCM/MeOH 97:3). Ion exchange was performed (Amberlite IRA-410, ACN/water 1:1) and after removal of the solvents under reduced pressure, the solid was precipitated from DCM using diethyl ether to give **22** (50 mg, 67 %) as a green solid.

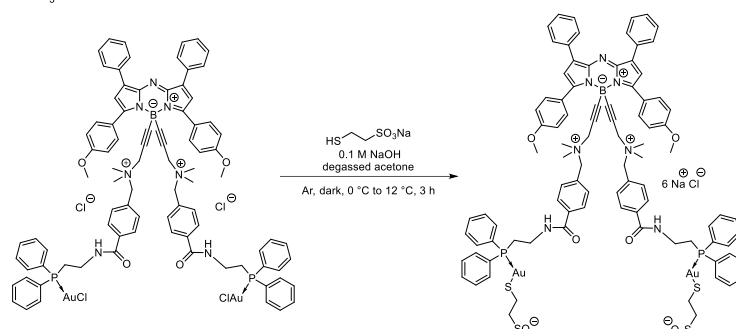
$^1\text{H NMR}$  (600 MHz, 318 K,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 2.45 (t,  $J = 5.5 \text{ Hz}$ , 4H, H17' or H18'), 2.77 (s, 12H, H4'), 2.91 (t,  $J = 7.2 \text{ Hz}$ , 4H, H17' or H18'), 2.98-3.02 (m, 4H, H12'), 3.52-3.58 (m, 4H, H11'), 3.70-3.80 (m, 6H, H15), 3.97 (s, 4H, H3'), 4.19 (s, 4H, H5'), 7.00-8.82 (m, 50H,  $H_{\text{arom}}$ , NH).

$^{31}\text{P NMR}$  (600 MHz, 328 K,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 28.15.

Compound **25**

 $C_{92}H_{92}Au_2BCl_6N_7Na_6O_{10}P_2S_4$ 
 $M = 2401.36 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 

Green solid

Yield = 44 %



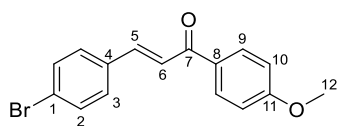
In a Schlenk tube, sodium 2-mercaptoethanesulfonate (5.4 mg, 33  $\mu\text{mol}$ , 2.05 eq.) was suspended in 3.5 mL of degassed acetone and a solution of 0.1 M NaOH (150  $\mu\text{L}$ , 15  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) was added. The suspension was stirred in the dark under argon at 12  $^{\circ}\text{C}$  for 10 minutes. In a second Schlenk tube, **20** (30 mg, 15  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) was solubilized in 4 mL of degassed acetone. The solution was stirred at 0  $^{\circ}\text{C}$  for 5 minutes. The suspension from the first Schlenk tube was then slowly added *via* canula to the second Schlenk tube in the dark and the mixture was then stirred at 12  $^{\circ}\text{C}$  for 3 h. After completion confirmed by  $^{31}\text{P}$  NMR, the crude was dried under reduced pressure, solubilized in a dichloromethane/methanol mixture, then filtrated on cotton to remove uncolored particles. Ion exchange was performed (Amberlite IRA-410, ACN/water 1:1) and  $^{31}\text{P}$  NMR showed complete removal of  $\text{PF}_6^-$  counterions. The product was obtained after complete evaporation to give **25** (15 mg, 44 %) as a green solid.

**HRMS (ESI):** calcd for  $C_{92}H_{92}Au_2BN_7O_{10}P_2S_4 \cdot C_2H_4O_3S_2^{2-}$   $[\text{M} \cdot \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_3\text{S}_2]^{2+}$  954.75375 Th; found 954.751919 Th (error: -1.927 ppm).

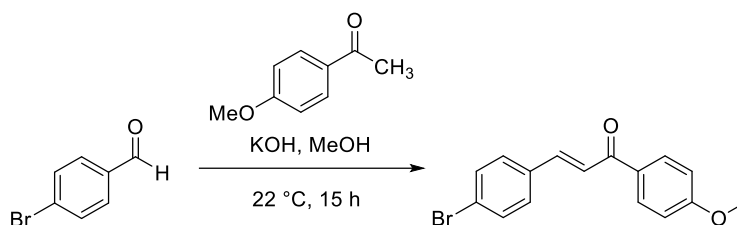
$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 2.68-2.73 (m, 4H, H17' or H18'), 2.77 (s, 12H, H4'), 3.01-3.06 (m, 4H, H17' or H18'), 3.06-3.12 (m, 4H, H12'), 3.52-3.60 (m, 4H, H11'), 3.73 (s, 6H, H16), 4.02 (s, 4H, H3'), 4.22 (s, 4H, H5'), 7.17 (d,  $J_{\text{H14-H13}} = 8.5 \text{ Hz}$ , 4H, H14), 7.44 (d,  $J_{\text{H7'-H8'}} = 7.9 \text{ Hz}$ , 4H, H7'), 7.48-7.57 (m, 18H, H10, H11, H14', H16'), 7.67 (s, 2H, H2, H6), 7.76-7.84 (m, 8H, H15'), 7.91 (d,  $J_{\text{H8'-H7'}} = 7.8 \text{ Hz}$ , 4H, H8'), 8.18 (d,  $J_{\text{H9-H10}} = 7.5 \text{ Hz}$ , 4H, H9), 8.48 (d,  $J_{\text{H13-H14}} = 8.4 \text{ Hz}$ , 4H, H13), 8.98 (s, 2H, NH).

$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 14.0, 16.7, 18.0, 18.8, 19.9, 22.1, 23.8 (C17' or C18'), 26.4-26.6 (m, C12') 28.4-29.1 (m), 30.4, 30.7, 31.3, 32.6, 33.7, 33.9, 35.1, 35.4 (C11'), 48.6, 49.2 (C4'), 51.3, 54.1 (C3'), 54.9, 55.3, 55.7 (C16), 59.7 (C17' or C18'), 64.9 (C5'), 69.8, 87.1 (C2'), 114.2 (C14), 120.8 (C2, C6), 123.4 (C12), 127.8 (C8'), 128.8-129.1 (d,  $J_{\text{C13'-P}} = 50.7 \text{ Hz}$ , C13'), 128.9 (C9), 129.3-129.4 (m, C10, C14'), 129.5, 129.7, 130.0, 130.3 (C6'), 131.7 (C8), 131.8 (C16'), 132.5 (C7'), 132.8 (C13), 133.1, 133.2 (d,  $J_{\text{C15'-P}} = 13.2 \text{ Hz}$ , C15'), 135.5 (C9'), 141.2 (C1, C7), 142.3 (C7a, C7b), 157.1 (C3, C5), 161.7 (C15), 165.3 (C10'), 174.5.

$^{31}\text{P}$  NMR (202 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 25.35.

Compound **26**

$C_{16}H_{13}BrO_2$   
 $M = 317.18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
 Off-white powder  
 Yield = 87 %

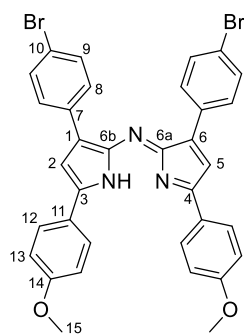


Compound **26** was synthesized according to a reported procedure.  $^1\text{H}$  NMR data are in agreement with literature data.<sup>180</sup>

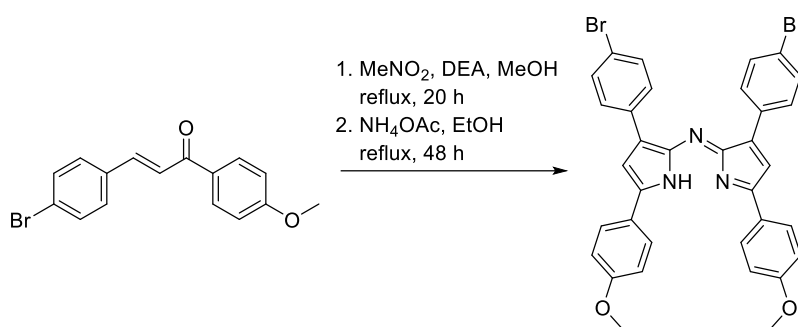
In a round-bottom flask, a solution of KOH (3.59 g, 63.9 mmoles, 2.4 eq.) was added to a solution of 4'-methoxyacetophenone (4.00 g, 26.6 mmoles, 1 eq.) and 4-bromobenzaldehyde (4.93 g, 26.6 mmoles, 1 eq.) in methanol (100 mL). The mixture was stirred at 22 °C for 15 h. After completion confirmed by RP-HPLC-MS, the precipitate was filtered, washed with methanol and dried under reduced pressure to give **26** as an off-white powder (7.31 g, 87 %).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.90 (s, 3H, H12), 6.99 (d,  $J_{\text{H10-H9}} = 8.4 \text{ Hz}$ , 2H, H10), 7.48-7.60 (m, 5H, H3, H6, H2), 7.73 (d,  $J_{\text{H5-H6}} = 15.6 \text{ Hz}$ , 1H, H5), 8.03 (d,  $J_{\text{H9-H10}} = 8.4 \text{ Hz}$ , 2H, H9).

Compound **28**



$C_{34}H_{25}Br_2N_3O_2$   
 $M = 667.40 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
 Blue solid  
 Yield = 45 %

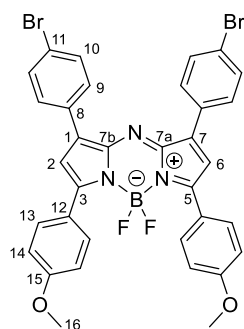


Compound **28** was synthesized according to a reported procedure.  $^1\text{H}$  NMR data are in agreement with literature data.<sup>180</sup>

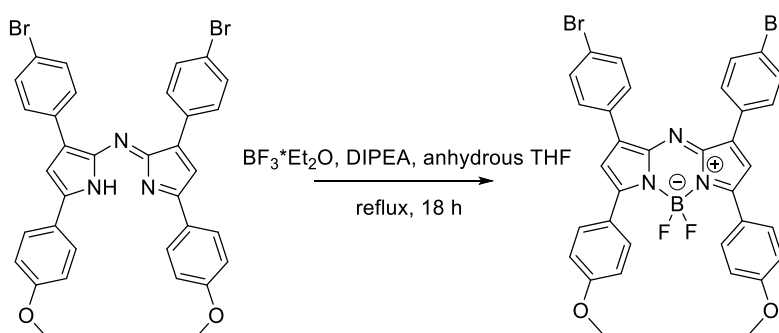
In a round-bottom flask, nitromethane (11 mL, 210 mmoles, 10 eq.) was introduced in a solution of **26** (6.76 g, 21.3 mmoles, 1 eq.) and diethylamine (22 mL, 210 mmoles, 10 eq.) in methanol (150 mL). After stirring under reflux for 20 h, completion of the reaction was confirmed by RP-HPLC-MS. The crude was then dried under reduced pressure and directly engaged in the next step without further purification.

In a round-bottom flask, ammonium acetate (33 g, 130 mmoles) was introduced to a solution of crude **27** in ethanol (130 mL) at 50 °C. After being refluxed for 48 h,  $\frac{3}{4}$  of the solvent were evaporated and the blue precipitate was centrifuged four times in ethanol and dried under reduced pressure to yield **28** (3.2 g, 45 % over the last two steps) as a blue solid.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): = 3.92 (s, 6H, H15), 7.06 (d,  $J_{\text{H}13-\text{H}12} = 8.8 \text{ Hz}$ , 4H, H13), 7.12 (s, 2H, H2, H5), 7.55 (d,  $J_{\text{H}8-\text{H}9} = 8.5 \text{ Hz}$ , 4H, H8), 7.88 (d,  $J_{\text{H}12-\text{H}13} = 8.8 \text{ Hz}$ , 4H, H12), 7.91 (d,  $J_{\text{H}9-\text{H}8} = 8.5 \text{ Hz}$ , 4H, H9).

Compound **29**

$C_{34}H_{24}BBr_2F_2N_3O_2$   
 $M = 715.20 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
 Green solid  
 Yield = 35 %



Compound **29** was synthesized according to a reported procedure.  $^1H$ ,  $^{11}B$  and  $^{19}F$  NMR data are in agreement with literature data.<sup>180</sup>

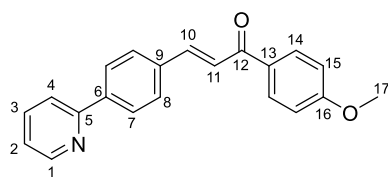
In a round-bottom flask, **28** (3.21 g, 4.81 mmol, 1 eq.) was introduced with anhydrous THF (200 mL). After addition of DIPEA (10 mL, 58 mmol, 12 eq.), the mixture was stirred at 20 °C for 15 minutes.  $BF_3\cdot Et_2O$  (7.3 mL, 58 mmol, 12 eq.) was then added and the mixture stirred under reflux for one hour. Once at room temperature, DIPEA (5 mL, 26 mmol, 6 eq.) and  $BF_3\cdot Et_2O$  (5 mL, 38 mmol, 8 eq.) were added to the mixture which was refluxed for another 17 hours. After completion checked by TLC, the mixture was allowed to cool down to room temperature before being washed with a DCM/HCl 0.5 M (200/150 mL) mixture.  $\frac{3}{4}$  of the organic phase were evaporated and the mixture was purified on a silica plug (DCM as eluent). Evaporation gave **29** as a green solid (1.2 g, 35 %).

$^1H$  NMR (500 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.89 (s, 6H, H16), 7.15 (d,  $J_{H14-H13} = 9.0$  Hz, 4H, H14), 7.67 (s, 2H, H2, H6), 7.80 (d,  $J_{H9-H10} = 8.6$  Hz, 4H, H9), 8.10 (d,  $J_{H10-H9} = 8.6$  Hz, 4H, H10), 8.18 (d,  $J_{H13-H14} = 9.0$  Hz, 4H, H13).

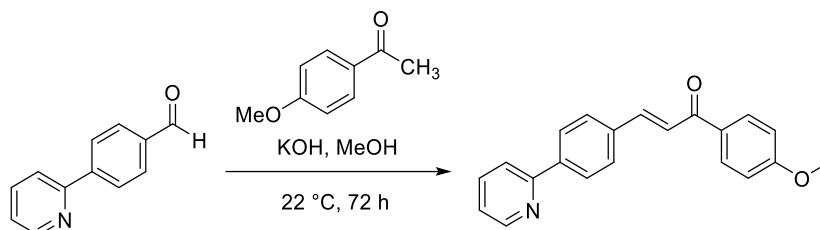
$^{11}B$  NMR (160 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 1.00 (t,  $J = 32.4$  Hz).

$^{19}F$  NMR (470 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = -130.6 (q,  $J = 32.3$  Hz).

Compound **35**



$C_{21}H_{17}NO_2$   
 $M = 315.37 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
 Yellowish powder  
 Yield = 87 %



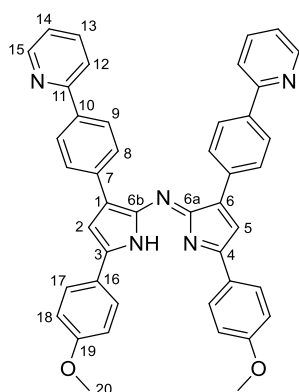
In a round-bottom flask, 4'-methoxyacetophenone (820 mg, 5.46 mmoles, 1 eq.) was introduced into a solution of KOH (735 mg, 13.1 mmoles, 2.4 eq.) in methanol (25 mL). 4-(2-pyridyl)benzaldehyde (1.00 g, 5.46 mmoles, 1 eq.) was then added and the mixture was stirred at 22 °C for 72 h in the dark. The precipitate was then filtered, washed with methanol and dried under reduced pressure to give **35** as a yellowish powder (1.5 g, 87 %).

**HRMS (ESI):** calcd for  $C_{21}H_{17}NO_2+H^+$   $[M+H]^+$  316.13321 Da; found 316.13356 Da (error: 1.107 ppm).

**$^1H$  NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta$  (ppm) = 3.90 (s, 3H, H17), 7.00 (d,  $J_{H15-H14} = 8.9$  Hz, 2H, H15), 7.26-7.28 (m, 1H, H2), 7.61 (d,  $J_{H11-H10} = 15.6$  Hz, 1H, H11), 7.76 (d,  $J_{H8-H7} = 8.4$  Hz, 2H, H8), 7.77-7.79 (m, 2H, H3, H4), 7.85 (d,  $J_{H10-H11} = 15.6$  Hz, 1H, H10), 8.05-8.09 (m, 4H, H7, H14), 8.72 (d,  $J_{H1-H2} = 4.8$  Hz, 1H, H1).

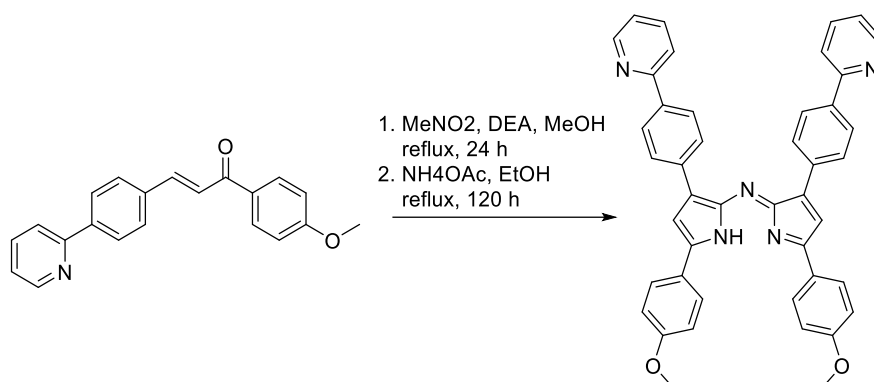
**$^{13}C$  NMR (151 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta$  (ppm) = 55.7 (C17), 114.0 (C15), 120.8 (C4), 122.4 (C11), 122.7 (C2), 127.5 (C7), 129.0 (C8), 131.0 (C14), 131.3 (C13), 135.8 (C9), 137.0 (C3), 141.2 (C6), 143.5 (C10), 150.0 (C1), 156.6 (C5), 163.6 (C16), 188.8 (C12).



Compound **37**
 $C_{44}H_{33}N_5O_2$ 
 $M = 663.78 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 

Dark violet powder

Yield = 42 %

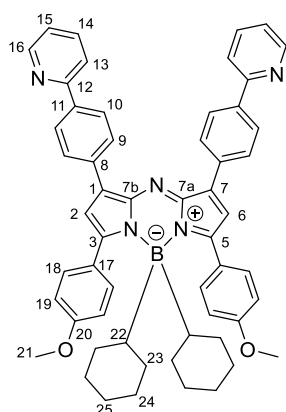


In a round-bottom flask, **35** (3.00 g, 9.51 mmoles, 1 eq.) was introduced into methanol (120 mL). Diethylamine (10 mL, 95 mmoles, 10 eq.) and nitromethane (5 mL, 47 mmoles, 5 eq.) were added to the flask. After stirring under reflux for 20 h, complete consumption of starting material was assessed *via* RP-HPLC-MS. Evaporation gave a reddish oil that was directly engaged in the next step without further purification.

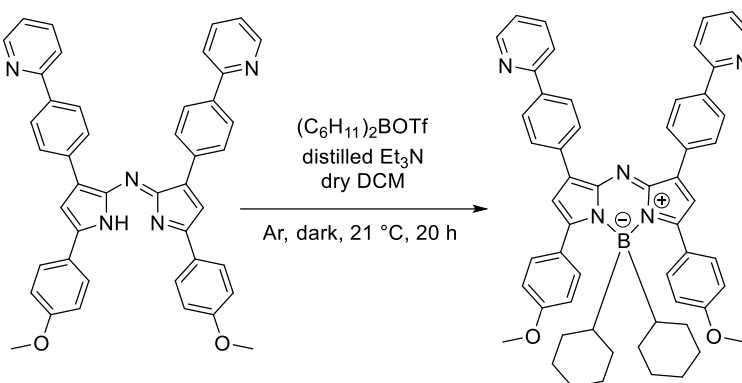
In a round-bottom flask, ammonium acetate (15 g, 200 mmoles) was added to a solution of crude **36** in ethanol (100 mL). The mixture was stirred under reflux for 120 h. The precipitate was filtered, dried under reduced pressure and centrifugated twice in DCM to give with no further purification **37** as a dark violet powder (1.3 g, 42 % over the last two steps).

**HRMS (ESI)**: calcd for  $C_{44}H_{33}N_5O_2 + H^+$   $[M+H]^+$  664.27070 Da; found 664.27074 Da (error: 0.060 ppm).

**$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )**:  $\delta$  (ppm) = 3.91 (s, 6H, H20), 7.24 (d,  $J_{H18-H17} = 8.9$  Hz, 4H, H18), 7.39 (dd,  $J_{H14-H13} = 7.7$  Hz,  $J_{H14-H15} = 4.8$  Hz, 2H, H14), 7.72 (s, 2H, H2, H5), 7.93 (td,  $J_{H13-H14} = 7.7$  Hz,  $J_{H13-H12} = 2.0$  Hz, 2H, H13), 8.06-8.10 (m, 6H, H12, H17), 8.22 (d,  $J = 8.6$  Hz, 4H, H8 or H9), 8.30 (d,  $J = 8.4$  Hz, 4H, H8 or H9), 8.73 (d,  $J_{H15-H14} = 4.6$  Hz, 2H, H15).

Compound **38**


$C_{56}H_{54}BN_5O_2$   
 $M = 839.89 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
 Coppery red powder  
 Yield = 29 %



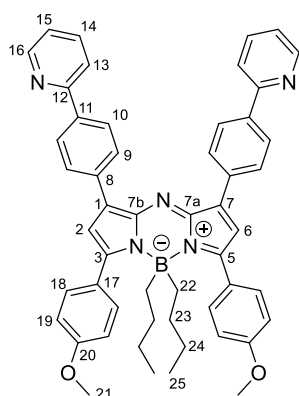
In a schlenk tube, freshly distilled triethylamine (20  $\mu\text{L}$ , 0.15 mmoles, 4 eq.) was added to a solution of **37** (25 mg, 0.04 mmol, 1 eq.) in dry dichloromethane (3 mL).  $(C_6H_{11})_2BOTf$  (12 mg, 0.04 mmol, 1 eq.) was added and the mixture was stirred at 21 °C for 20 h. After evaporation of the solvents under reduced pressure, the crude was purified over silica gel column (EtOAc/heptane 3:7) to yield **38** (9 mg, 29 %) as a metallic red powder.

**HRMS (ESI):** calcd for  $C_{56}H_{54}B_1N_5O_2+H^+$   $[M+H]^+$  840.44433 Da; found 840.44710 Da (error: 3.296 ppm).

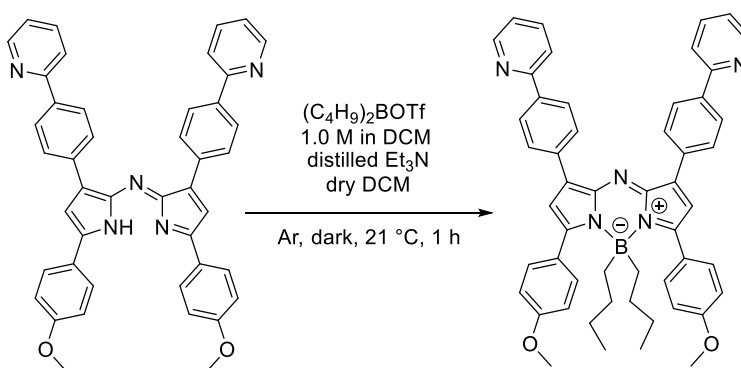
**$^1H$  NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta$  (ppm) = 0.37-0.43 (m, 4H, H25), 0.91-0.95 (m, 2H, H22), 1.13-1.15 (m, 8H, H24), 1.46-1.48 (m, 8H, H23), 3.87 (s, 6H, H21), 6.85 (s, 2H, H2, H6), 6.94 (d,  $J_{H19-H18} = 8.6 \text{ Hz}$ , 4H, H19), 7.24-7.25 (m, 2H, H15), 7.39 (d,  $J_{H18-H19} = 8.6 \text{ Hz}$ , 4H, H18), 7.77 (td,  $J_{H14-H13} = 7.7 \text{ Hz}$ ,  $J_{H14-H15} = 1.8 \text{ Hz}$ , 2H, H14), 7.82 (d,  $J_{H13-H14} = 7.8 \text{ Hz}$ , 2H, H13), 8.10 (d,  $J_{H10-H9} = 8.4 \text{ Hz}$ , 4H, H10), 8.20 (d,  $J_{H9-H10} = 8.5 \text{ Hz}$ , 4H, H9), 8.73 (d,  $J_{H16-H15} = 3.9 \text{ Hz}$ , 2H, H16).

**$^{13}C$  NMR (151 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta$  (ppm) = 14.3, 22.9, 27.4, 28.8 (C23), 29.2 (C25), 29.3 (C24), 29.5, 29.9, 32.0, 55.6 (C21), 113.0 (C19), 120.9 (C13), 122.3 (C2, C6, C15), 127.1 (C10), 128.4 (C17), 129.6 (C9), 131.4 (C18), 133.9 (C8), 136.9 (C11), 139.2 (C1/C7, C14), 144.9 (C7a, C7b), 149.9 (C16), 157.2 (C12), 160.2 (C3/C5 or C20), 160.4 (C3/C5 or C20).

**$^{11}B$  NMR (160 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta$  (ppm) = 0.95 (s, bs).

Compound **39**

$C_{52}H_{50}BN_5O_2$   
 $M = 787.82 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
 Coppery red powder  
 Yield = 60 %



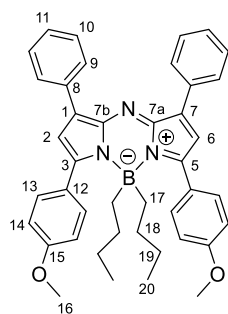
In a schlenk tube, freshly distilled triethylamine (122  $\mu\text{L}$ , 0.904 mmoles, 4 eq.) was added to a solution of **37** (150 mg, 0.226 mmol, 1 eq.) in dry dichloromethane (10 mL).  $(C_4H_9)_2BOTf$  1.0 M in DCM (226  $\mu\text{L}$ , 0.226 mmol, 1 eq.) was added and the mixture was stirred at 21  $^\circ\text{C}$  in the dark for an hour. After evaporation of the solvents under reduced pressure, the crude was purified over alumina gel column (EtOAc/heptane 1:2) and precipitated from a DCM/pentane mixture to yield **39** (110 mg, 60 %) as a metallic red powder.

**HRMS (ESI):** calcd for  $C_{52}H_{50}B_1N_5O_2+H^+$   $[M+H]^+$  788.41303 Da; found 788.41431 Da (error: 1.624 ppm).

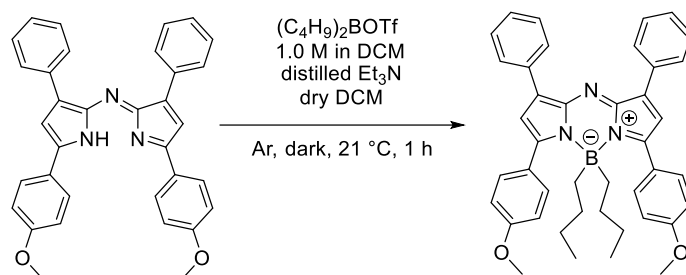
**$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta$  (ppm) = 0.27-0.30 (m, 4H, H22), 0.73 (t,  $J_{H25-H24} = 7.3 \text{ Hz}$ , 6H, H25), 0.90-0.94 (m, 4H, H23), 1.04-1.08 (m, 4H, H24), 3.84 (s, 6H, H21), 6.86 (s, 2H, H2, H6), 6.93 (d,  $J_{H19-H18} = 8.7 \text{ Hz}$ , 4H, H19), 7.27 (ddd,  $J = 7.3 \text{ Hz}$ ,  $J = 4.7 \text{ Hz}$ ,  $J = 1.1 \text{ Hz}$ , 2H, H15), 7.40 (d,  $J_{H18-H19} = 8.6 \text{ Hz}$ , 4H, H18), 7.80 (td,  $J_{H14-H13} = 7.7 \text{ Hz}$ ,  $J_{H14-H15} = 1.8 \text{ Hz}$ , 2H, H14), 7.87 (d,  $J_{H13-H14} = 7.9 \text{ Hz}$ , 2H, H13), 8.16 (d,  $J_{H10-H9} = 8.5 \text{ Hz}$ , 4H, H10), 8.23 (d,  $J_{H9-H10} = 8.5 \text{ Hz}$ , 4H, H9), 8.72 (d,  $J_{H16-H15} = 3.9 \text{ Hz}$ , 2H, H16).

**$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta$  (ppm) = 14.3 (C25), 26.1 (C24), 27.6 (C22), 27.8 (C23), 29.9, 55.5 (C21), 113.2 (C19), 120.7 (C13), 120.9 (C2, C6), 122.4 (C15), 127.0 (C17), 127.2 (C10), 129.5 (C9), 130.2 (C18), 134.0 (C8), 136.9 (C11), 139.3 (C1/C7 or C14), 140.0 (C1/C7 or C14), 144.1 (C7a, C7b), 149.9 (C16), 157.2 (C12), 159.1 (C3, C5), 160.4 (C20).

**$^{11}\text{B}$  NMR (160 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta$  (ppm) = 2.59 (s, bs).

Compound **40**


$C_{42}H_{44}BN_3O_2$   
 $M = 633.64 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
 Coppery red powder  
 Yield = 40 %



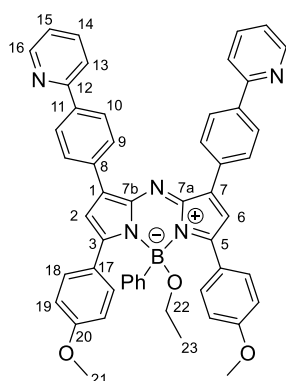
In a schlenk tube, freshly distilled triethylamine (53  $\mu\text{L}$ , 0.390 mmoles, 4 eq.) was added to a solution of **3** (50 mg, 0.0981 mmol, 1 eq.) in dry dichloromethane (3 mL).  $(C_4H_9)_2BOTf$  1.0 M in DCM (98  $\mu\text{L}$ , 0.098 mmol, 1 eq.) was added and the mixture was stirred at 21  $^\circ\text{C}$  for an hour. After evaporation of the solvents under reduced pressure, the crude was purified over silica gel column (DCM/cyclohexane 1:4) to yield **40** (24 mg, 40 %) as a coppery red powder.

**HRMS (ESI):** calcd for  $C_{42}H_{44}BN_3O_2 + Na^+$   $[M+Na]^+$  656.34188 Da; found 656.34442 Da (error: 3.535 ppm).

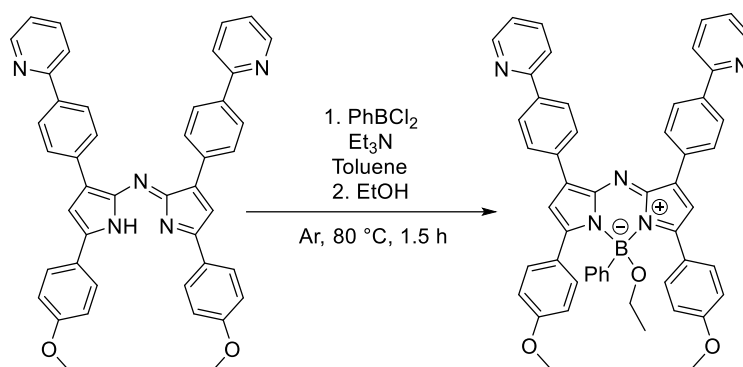
**$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, acetone- $d_6$ ):**  $\delta$  (ppm) = 0.35-0.38 (m, 4H, H17), 0.69 (t,  $J_{H20-H19} = 7.3 \text{ Hz}$ , 6H, H20), 0.90-0.94 (m, 4H, H18), 1.03-1.07 (m, 4H, H19), 3.86 (s, 6H, H16), 6.98 (s, 2H, H2, H6), 7.02 (d,  $J_{H14-H13} = 8.8 \text{ Hz}$ , 4H, H14), 7.40-7.47 (m, 6H, H11, H13), 7.50 (d,  $J_{H10-H9} = 7.7 \text{ Hz}$ , 4H, H10), 8.18 (d,  $J_{H9-H10} = 7.1 \text{ Hz}$ , 4H, H9).

**$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, acetone- $d_6$ ):**  $\delta$  (ppm) = 14.5 (C20), 26.6 (C19), 27.5 (C17), 28.5 (C18), 55.7 (C16), 114.0 (C14), 121.5 (C2, C6), 127.5 (C12), 129.4 (C10), 129.5 (C11), 129.9 (C9), 131.0 (C13), 133.9 (C8), 141.3 (C1, C7), 144.6 (C7a, C7b), 160.1 (C3, C5), 161.6 (C15).

**$^{11}\text{B}$  NMR (160 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta$  (ppm) = 2.01 (s, bs).

Compound **41**

$C_{52}H_{42}BN_5O_3$   
 $M = 795.75 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
 Coppery red powder  
 Yield = 16 %



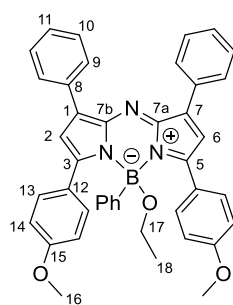
In a round-bottom flask, **37** (40 mg, 60  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) was introduced and an argon atmosphere was established. Successively, toluene (5 mL), triethylamine (41  $\mu\text{L}$ , 300  $\mu\text{mol}$ , 5 eq.) and dichlorophenylborane (39  $\mu\text{L}$ , 300  $\mu\text{mol}$ , 5 eq.) were added to the flask. After heating at 80 °C for 10 minutes, TLC confirmed the entire consumption of the dipyrromethene, and no evolution being noticed after an additional 40 minutes, ethanol (28  $\mu\text{L}$ , 480  $\mu\text{mol}$ , 8 eq.) was added to the mixture. A brown precipitate formed almost immediately, and TLC acknowledged partial consumption of the intermediary compound. After 30 more minutes at 80 °C and 30  $\mu\text{L}$  then 100  $\mu\text{L}$  of ethanol added, no evolution whatsoever was noticed. The mixture was dried under reduced pressure and purified over alumina gel column (DCM/cyclohexane 8:2 to DCM) to give after evaporation **41** (8 mg, 16 %) as a coppery red powder.

**HRMS (ESI):** calcd for  $C_{52}H_{42}B_1N_5O_3+H^+$   $[M+H]^+$  796.34535 Da; found 796.34593 Da (error: 0.728 ppm).

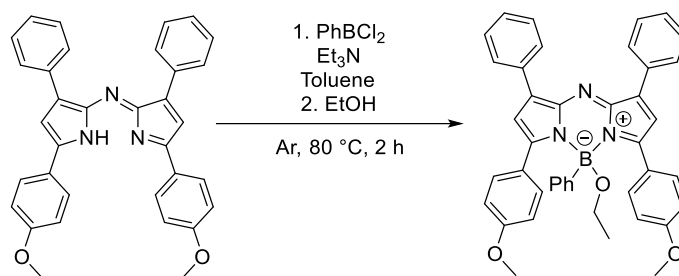
**$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) = 1.19 (t,  $J_{H23-H22} = 7.0 \text{ Hz}$ , 3H, H23), 3.55 (q,  $J_{H22-H23} = 7.0 \text{ Hz}$ , 2H, H22), 3.80 (s, 6H, H21), 6.72-6.76 (m, 7H, H19,  $H_{\text{Ph}}$ ), 6.96 (s, 2H, H2, H6), 7.06-7.08 (m, 2H,  $H_{\text{Ph}}$ ), 7.29 (ddd,  $J = 7.3, 4.9, 1.2 \text{ Hz}$ , 2H, H15), 7.78 (d,  $J_{H18-H19} = 8.9 \text{ Hz}$ , 4H, H18), 7.83 (td,  $J = 8.1, 1.8 \text{ Hz}$ , 2H, H14), 7.89 (d,  $J = 7.9 \text{ Hz}$ , 2H, H13), 8.17 (d,  $J_{H10-H9} = 8.5 \text{ Hz}$ , 4H, H10), 8.29 (d,  $J_{H9-H10} = 8.5 \text{ Hz}$ , 4H, H9), 8.76 (dd,  $J_{H16-H15} = 4.9, 0.8 \text{ Hz}$ , 2H, H16).

**$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) = 17.7, 55.5 (C21), 57.0, 112.7, 113.2 (C19), 113.4, 120.1, 122.8, 125.1, 125.6, 125.8, 125.9, 127.6, 129.7, 131.3, 132.1, 132.2, 132.4 (C18), 132.6, 133.0, 133.3, 145.8 (C7a, C7b), 160.0 (C3, C5), 161.1 (C20).

**$^{11}\text{B}$  NMR (160 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) = 2.42 (s, bs).

Compound **42**


$C_{42}H_{36}BN_3O_3$   
 $M = 641.58 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
 Coppery red powder  
 Yield = 20 %

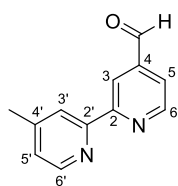


In a round-bottom flask, **3** (40 mg, 79  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) was introduced and an argon atmosphere was established. Successively, toluene (5 mL), triethylamine (53  $\mu\text{L}$ , 400  $\mu\text{mol}$ , 5 eq.) and dichlorophenylborane (51  $\mu\text{L}$ , 400  $\mu\text{mol}$ , 5 eq.) were added to the flask. After heating at 80  $^{\circ}\text{C}$  for 10 minutes, TLC confirmed the entire consumption of the dipyrromethene, and no evolution being noticed after an additional 50 minutes, ethanol (37  $\mu\text{L}$ , 630  $\mu\text{mol}$ , 8 eq.) was added to the mixture. After an hour at 80  $^{\circ}\text{C}$ , TLC acknowledged partial consumption of the intermediary compound. 30  $\mu\text{L}$  of ethanol were added, leading after 5 minutes to complete consumption of the intermediary compound. The mixture was dried under reduced pressure and purified over silica gel column (DCM/cyclohexane 3:1) to give after evaporation **42** (11 mg, 20 %) as a coppery red powder.

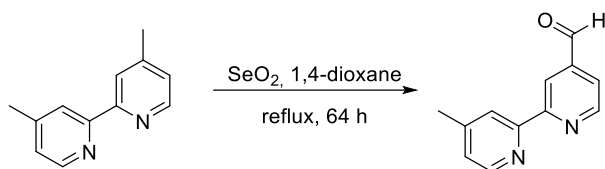
**HRMS (ESI):** calcd for  $C_{42}H_{36}B_1N_3O_3+Na^+$   $[M+Na]^+$  664.27419 Da; found 664.27452 Da (error: 0.497 ppm).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 1.16 (t,  $J_{H18-H17} = 7.0 \text{ Hz}$ , 3H, H18), 3.52 (q,  $J_{H17-H18} = 7.0 \text{ Hz}$ , 2H, H17), 3.79 (s, 6H, H16), 6.71-6.75 (m, 7H, H14,  $H_{Ph}$ ), 6.89 (s, 2H, H2, H6), 7.02-7.06 (m, 2H,  $H_{Ph}$ ), 7.40 (t,  $J_{H11-H10} = 7.2 \text{ Hz}$ , 2H, H11), 7.47 (t,  $J_{H10-H11} = 7.4 \text{ Hz}$ , 4H, H10), 7.77 (d,  $J_{H13-H14} = 8.9 \text{ Hz}$ , 4H, H13), 8.13 (d,  $J_{H9-H10} = 7.0 \text{ Hz}$ , 4H, H9).

$^{11}\text{B NMR}$  (160 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 2.29 (s, bs).

Compound **43** (4'-methyl-[2,2'-bipyridine]-4-carboxaldehyde)

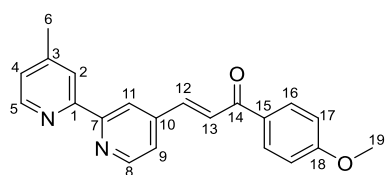
$C_{12}H_{10}N_2O$   
 $M = 198.23 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
 Off-white powder  
 Yield = 49 %



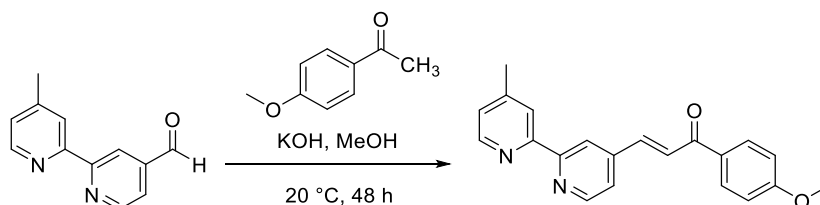
Compound **43** was synthesized according to a reported procedure.  $^1\text{H}$  NMR data are in agreement with literature data.<sup>316</sup>

In a round-bottom flask, 4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridyl (6.0 g, 33 mmol, 1 eq.) were dissolved in 1,4-dioxane (310 mL) by sonication. To this solution was added selenium dioxide (4.34 g, 39 mmol, 1.2 eq.). The reaction mixture was heated at gentle reflux for 64 h and then filtered through Celite while hot. The Celite was washed with 50 mL of EtOH, which were combined with the filtrate; the solvent was removed under reduced pressure. The residue was suspended in a saturated solution of  $\text{NaHCO}_3$  (80 mL) and extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 x 60 mL). The combined organic phases were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , and the  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  was removed under reduced pressure. The solid residue was suspended in an aqueous solution of 0.3 M sodium metabisulfite ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ , 150 mL) and stirred for 0.5 h. The solid was filtered and then suspended again in 70 mL of 0.3 M sodium metabisulfite solution. The suspension was stirred for 0.5 h and filtered. The combined filtrates were washed with ethyl acetate (3 x 50 mL). Solid sodium hydrogen carbonate ( $\text{NaHCO}_3$ , 20.7 g) was added to the  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  solution and the product was extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (25 x 100 mL). The  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and removed under reduced pressure to yield **43** as an off-white solid (3.2 g, 49 %).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 2.48 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7.21 (dd,  $J = 5.2, 1.7$  Hz, 1H,  $\text{H}5'$ ), 7.73 (dd,  $J = 4.9, 1.5$  Hz, 1H,  $\text{H}5$ ), 8.28-8.31 (m, 1H,  $\text{H}3$ ), 8.59 (d,  $J = 5.0$  Hz, 1H,  $\text{H}6'$ ), 8.86 (s, 1H,  $\text{H}3'$ ), 8.90 (d,  $J = 4.9$  Hz, 1H,  $\text{H}6$ ), 10.19 (s, 1H, CHO).

Compound **44**


$C_{21}H_{18}N_2O_2$   
 $M = 330.39 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
 Off-white powder  
 Yield = 71 %



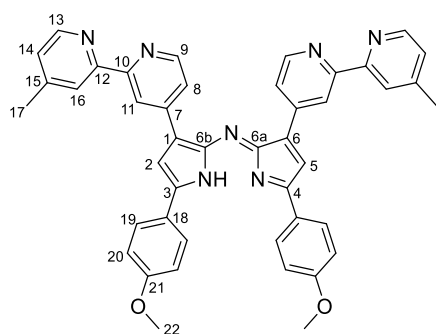
In a round-bottom flask, 4'-methoxyacetophenone (682 mg, 4.54 mmol, 1 eq.) was introduced into a solution of KOH (611 mg, 10.9 mmol, 2.4 eq.) in methanol (18 mL). 4'-methyl-[2,2'-bipyridine]-4-carboxaldehyde **43** (900 mg, 4.54 mmol, 1 eq.) was then added and the mixture was stirred at 20 °C for 48 h. The precipitate was then filtered, washed with cold methanol (0 °C) and dried under reduced pressure to give **44** as an off-white powder (1.07 g, 71 %).

**HRMS (ESI):** calcd for  $C_{21}H_{18}N_2O_2+H^+$   $[M+H]^+$  331.14410 Da; found 331.14408 Da (error: -0.060 ppm).

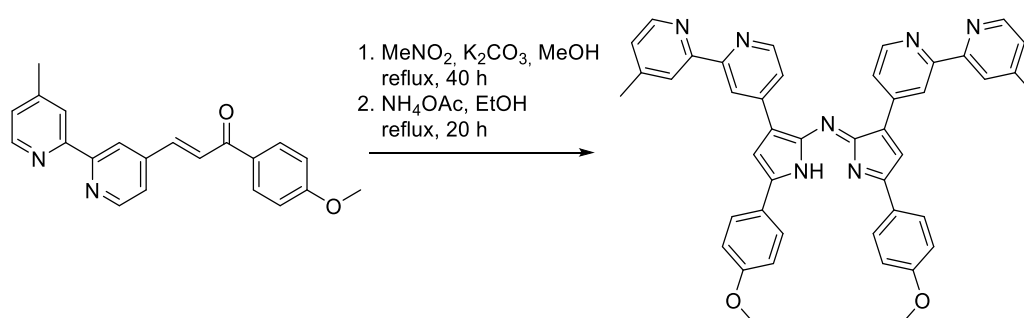
**$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta$  (ppm) = 2.46 (s, 3H, H6), 3.91 (s, 3H, H19), 7.01 (d,  $J_{H17-H16} = 8.9$  Hz, 2H, H17), 7.18 (m, 1H, H4), 7.46 (m, 1H, H9), 7.77 (d,  $J_{H13-H12} = 15.7$  Hz, 1H, H12), 7.82 (d,  $J_{H13-H12} = 15.7$  Hz, 1H, H13), 8.08 (d,  $J_{H16-H17} = 8.9$  Hz, 2H, H16), 8.27 (s, 1H, H2), 8.58 (d,  $J_{H5-H4} = 4.9$  Hz, 1H, H5), 8.64 (s, 1H, H11), 8.73 (d,  $J_{H8-H9} = 5.0$  Hz, 1H, H8).

**$^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta$  (ppm) = 21.4 (C6), 55.7 (C19), 114.1 (C17), 119.1 (C11), 122.3 (C2), 122.7 (C9), 125.2 (C4), 126.3 (C13), 130.7 (C15), 131.2 (C16), 141.1 (C12), 143.5 (C10), 148.5 (C3), 149.2 (C5), 150.1 (C8), 155.6 (C1), 157.3 (C7), 164.0 (C18), 188.3 (C14).



Compound **46**

$C_{44}H_{35}N_7O_2$   
 $M = 693.81 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
 Dark blue powder  
 Yield = 4 %



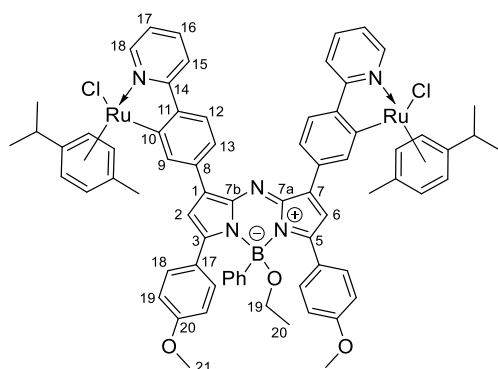
In a round-bottom flask, **44** (1.00 g, 3.03 mmoles, 1 eq.) was introduced into methanol (40 mL).  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (2 mg, 0.02 mmoles, 0.5 % cat.) and nitromethane (8  $\mu\text{L}$ , 15 mmoles, 5 eq.) were added to the flask. After stirring under reflux for 40 h, complete consumption of **44** was assessed *via* RP-HPLC-MS &  $^1\text{H}$  NMR. Drying under reduced pressure gave a yellowish oil that was directly engaged in the next reaction without further purification.

In a round-bottom flask, ammonium acetate (4.6 g, 60 mmoles) was added to a solution of crude **45** in ethanol (30 mL). The mixture was stirred under reflux for 20 h. One third of the solvent was evaporated, the mixture was then cooled to 0 °C before centrifugation. Supernatant were eliminated and the precipitate was suspended in ethanol and centrifuged again twice until the supernatant was no longer brown. The precipitate was dried, and further purified on an alumina gel column (DCM/MeOH 30:1) to yield **46** (34 mg, 4 % over the last two steps) as a dark-blue solid.

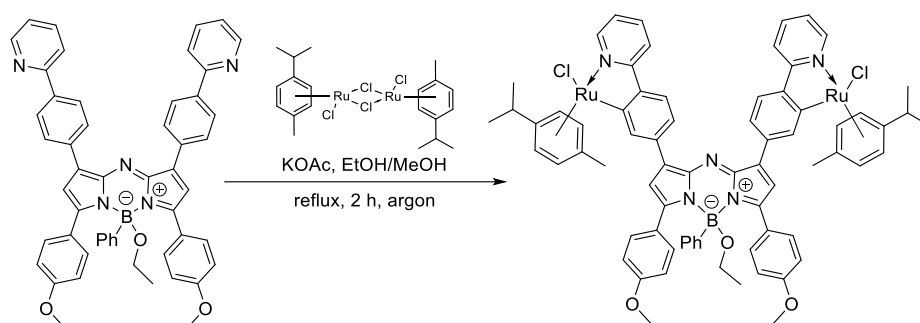
**HRMS (ESI)**: calcd for  $C_{44}H_{35}N_7O_2 + \text{H}^+$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  694.29250 Da; found 694.29154 Da (error: -1.383 ppm).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 2.46 (s, 6H, H17), 3.94 (s, 6H, H22), 7.09 (d,  $J_{\text{H}20-\text{H}19} = 8.8 \text{ Hz}$ , 4H, H20), 7.16 (dd,  $J_{\text{H}14-\text{H}13} = 4.3 \text{ Hz}$ , 1.4 Hz, 2H, H14), 7.41 (s, 2H, H2, H5), 7.93 (d,  $J_{\text{H}19-\text{H}20} = 8.8 \text{ Hz}$ , 4H, H19), 8.09 (dd,  $J_{\text{H}8-\text{H}9} = 5.0 \text{ Hz}$ , 1.7 Hz, 2H, H8), 8.24 (s, 2H, H16), 8.47 (d,  $J_{\text{H}9-\text{H}8} = 5.0 \text{ Hz}$ , 2H, H9), 8.52 (d,  $J_{\text{H}13-\text{H}14} = 4.9 \text{ Hz}$ , 2H, H13), 8.85 (s, 2H, H11).

$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 14.3 (C17), 55.7 (C22), 115.0 (C20), 116.8 (C2, C5), 120.4 (C11), 122.1 (C16), 123.5 (C8), 124.7 (C18), 124.9 (C14), 128.6 (C19), 139.8 (C1), 142.0 (C7), 148.2 (C15), 149.2 (C13), 149.5 (C9), 150.0 (C6a, C6b), 155.0 (C3, C4), 156.2 (C10 or C12), 156.4 (C10 or C12), 161.9 (C21).

Compound **52**


$C_{72}H_{68}BCl_2N_5O_3Ru_2$   
 $M = 1335.22 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
 Dark green powder  
 Yield = 54 %

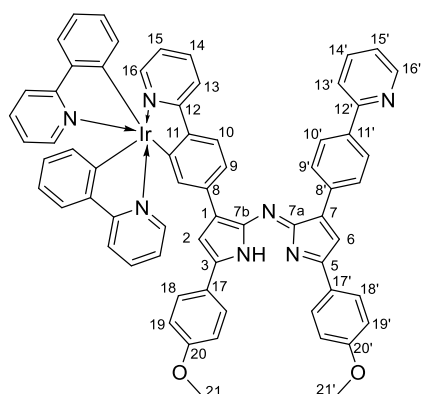


In a Schlenk tube, dichloro(*p*-cymene)ruthenium(II) dimer (7 mg, 11  $\mu\text{mol}$ , 1.05 eq.) and KOAc (4 mg, 40  $\mu\text{mol}$ , 4 eq.) were suspended in ethanol (2 mL) under an argon atmosphere. A suspension of **41** (8 mg, 10  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) in ethanol (2 mL) was introduced and the mixture was refluxed. After 3 h, no consumption of the reagent was noted. Addition of methanol (2 mL) led after 30 minutes to a complete consumption of **41** as confirmed by TLC. After evaporation, the crude was purified over a silica chromatography column (DCM/MeOH 99/1 to pure MeOH). Precipitation from DCM/pentane gave **52** (7 mg, 54 %) as a dark green powder.

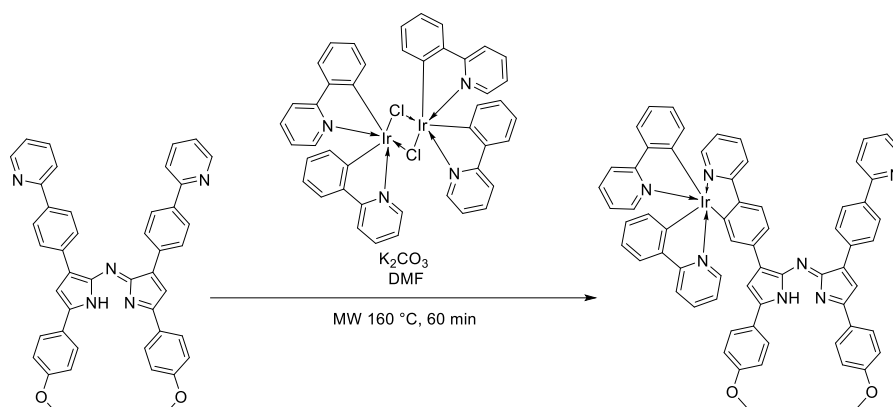
$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 0.67-0.73 (m, 6H,  $^i\text{PrCH}_3$ ), 0.83-0.91 (m, 6H,  $^i\text{PrCH}_3$ ), 1.10-1.31 (m, 7H, H20), 1.88-1.95 (m, 6H, CH<sub>3</sub>), 2.23-2.33 (m, 2H,  $^i\text{PrCH}$ ), 3.51 (m, 2H, H19), 3.79 (s, 6H, H21), 5.07-5.16 (m, 2H), 5.34-5.43 (m, 2H), 5.74-5.88 (m, 4H), 6.67-6.76 (m, 3H), 6.83-6.91 (m, 5H), 6.97-7.08 (m, 2H), 7.21-7.27 (m, 2H), 7.46 (d,  $J = 3.2 \text{ Hz}$ , 1H), 7.51 (d,  $J = 3.8 \text{ Hz}$ , 1H), 7.84-7.90 (m, 2H), 7.97-8.08 (m, 6H), 8.08-8.16 (m, 4H), 8.72-8.76 (m, 2H), 9.36-9.41 (m, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 14.0, 17.6, 18.5, 21.3-21.4 (m), 21.6, 21.8, 22.4-22.5 (m), 30.4, 55.4, 56.4, 113.1, 119.6, 120.2, 122.0, 123.7, 124.6, 125.5, 132.2, 132.5, 137.2, 145.1, 145.3, 155.7, 160.8, 164.1.

$^{11}\text{B NMR}$  (160 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 1.97 (bs).

Compound **54**

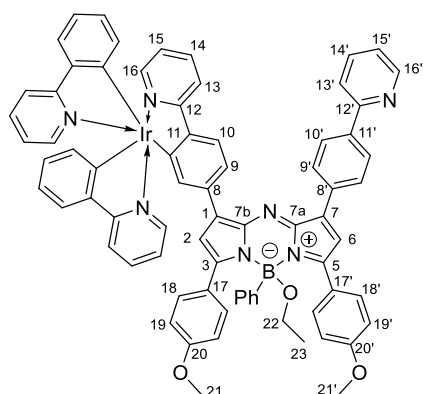
$C_{66}H_{48}IrN_7O_2$   
 $M = 1163.37 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
 Black powder  
 Yield = 13 %



In a 30 mL microwave tube, **37** (50 mg, 75  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) and  $K_2CO_3$  (104 mg, 753  $\mu\text{mol}$ , 10 eq.) in DMF (8 mL) were sonicated for 30 seconds. The iridium dimer (162 mg, 151  $\mu\text{mol}$ , 2 eq.) in DMF (7 mL) was added to the tube which then underwent microwave treatment at 160  $^\circ\text{C}$  for 60 minutes. A blue to green change in color was noted, and the crude was then dried under reduced pressure. Purification over alumina chromatography column (DCM/MeOH 100/0.1) gave **54** (11 mg, 13 %) as a black powder. The compound being highly insoluble in almost all solvents, no further characterization of the compound was carried out.

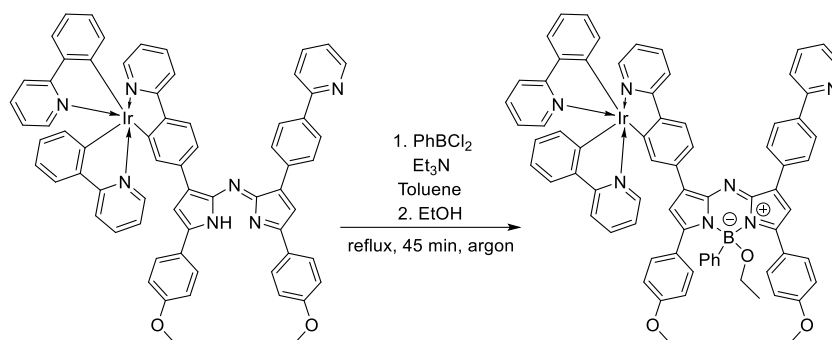
**HRMS (ESI):** calcd for  $C_{66}H_{48}IrN_7O_2+H^+$   $[M+H]^+$  1164.35715 Da; found 1164.35815 Da (error: 0.859 ppm).

## Compound 55


 $C_{74}H_{57}BIrN_7O_3$ 
 $M = 1295.34 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 

Black powder

Yield = 6 % (over the last two steps)



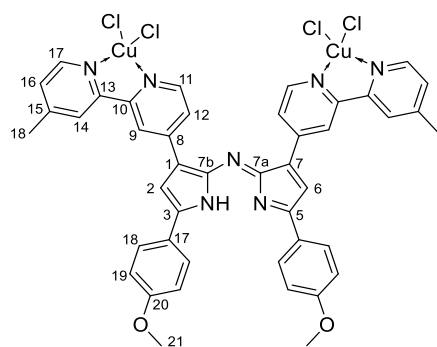
In a round-bottom flask, **54** (11 mg, 7.0  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) was introduced and an argon atmosphere was established. Successively, toluene (2 mL), triethylamine (4  $\mu\text{L}$ , 30  $\mu\text{mol}$ , 5 eq.) and dichlorophenylborane (4  $\mu\text{L}$ , 30  $\mu\text{mol}$ , 5 eq.) were added to the flask. After reflux for 15 minutes, TLC confirmed the entire consumption of the azadipyrromethene, and no evolution being noticed after an additional 15 minutes, ethanol (3  $\mu\text{L}$ , 50  $\mu\text{mol}$ , 8 eq.) was added to the mixture. A brown precipitate formed almost immediately, and TLC acknowledged partial consumption of the intermediary compound. After 15 minutes, the reflux was stopped and the mixture dried under reduced pressure. **55** (5 mg, 6 % over the last two steps) was precipitated from DCM/pentane and dried under reduced pressure.

**HRMS (ESI):** calcd for  $C_{74}H_{57}BIrN_7O_3+H^+$   $[M+H]^+$  1296.43179 Da; found 1296.43570 Da (error: 3.016 ppm).

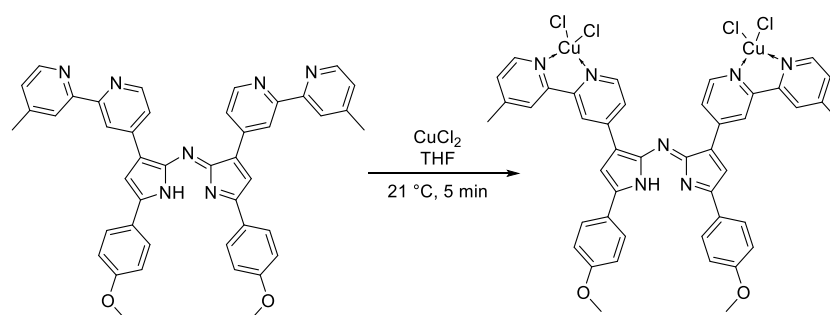
**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 3.78 (s, 3H, H21 or H21'), 3.91 (s, 3H, H21 or H21'), 5.66 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 6.25 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 6.69 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 6.76 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 6.81-6.91 (m, 3H), 7.22 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 7.29-7.35 (m, 5H), 7.37-7.40 (m, 2H), 7.44 (t,  $J = 6.7$  Hz, 1H), 7.52-7.58 (m, 2H), 7.72 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 7.77 (d,  $J = 7.1$  Hz, 6H), 8.00 (t,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 8.05-8.11 (m, 2H), 8.14-8.22 (m, 4H), 8.2 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 8.31-8.34 (m, 1H), 8.37-8.43 (m, 1H), 8.74 (d,  $J = 5.0$  Hz, 1H), 8.77-8.79 (m, 1H), 9.52 (d,  $J = 5.8$  Hz, 1H), 9.79 (d,  $J = 5.9$  Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 11.4, 41.8, 55.8, 56.2, 113.7, 115.6, 118.1, 119.9, 120.5, 122.5, 122.8, 123.3, 124.0, 124.3, 125.3, 127.4, 127.8, 129.4, 129.7, 130.1, 130.4, 130.5, 131.7, 133.1, 134.5, 138.6, 139.7, 143.6, 144.2, 145.8, 151.1, 152.5, 152.6, 154.7, 167.4, 167.8.

## Compound 56

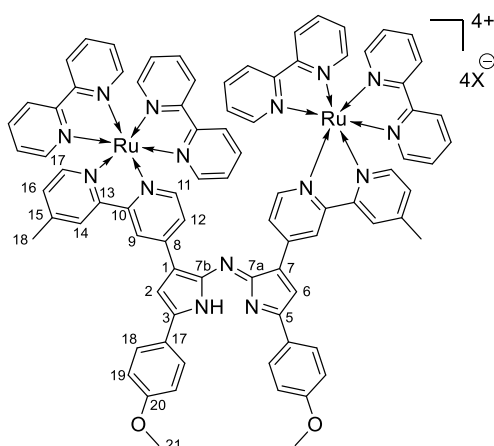


$C_{44}H_{35}Cl_4Cu_2N_7O_2$   
 $M = 962.70 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
Black powder

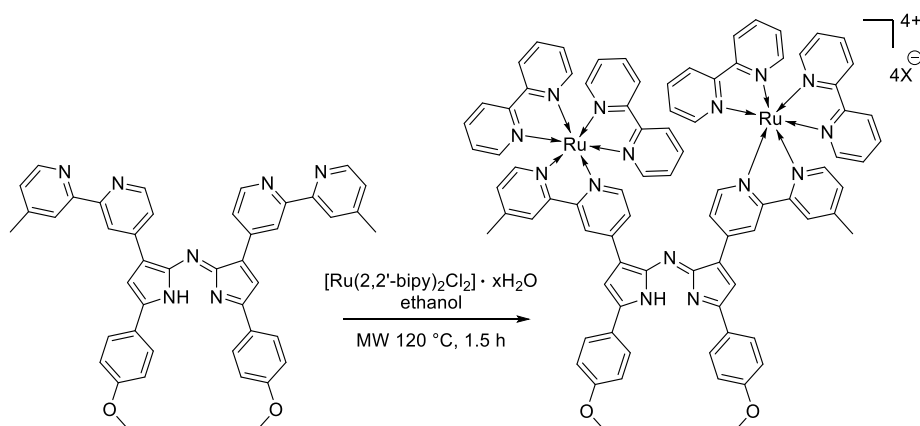


In a round-bottom flask, **46** (15 mg, 20  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) in THF (2 mL) was introduced and partially dissolved by sonication. A solution of  $\text{CuCl}_2$  (6 mg, 40  $\mu\text{mol}$ , 2 eq.) in THF (1.5 mL) was added, immediately leading to the formation of a greenish precipitate. After evaporation, the precipitate was washed in DCM and dried under reduced pressure to give a black powder (16 mg). Due to a complete insolubility in all solvent apart from DMF, only a HRMS analysis could be carried out on this compound.

**HRMS (ESI):** calcd for  $C_{44}H_{35}Cl_4Cu_2N_7O_2 + Na^+$   $[M+Na]^+$  982.00906 Da; found 982.01054 Da (error: 1.507 ppm).

Compound **59**


$C_{84}H_{67}N_{15}O_2Ru_2$   
 $M = 1520.70 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
 Greenish powder  
 Yield = 60 %



In a 10 mL microwave tube, **46** (15 mg, 20  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) and  $[Ru(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$  (30 mg, 60  $\mu\text{mol}$ , 3 eq.) were partially solubilized in ethanol (2 mL). After a microwave treatment at 120 °C for 90 minutes, a RP-HPLC-MS analysis showed entire consumption of the reagent and the crude was then dried under reduced pressure. Purification over an alumina chromatography column gave **59** (20 mg, 60 %) as a dark greenish powder.

**HRMS (ESI):** calcd for  $C_{84}H_{67}N_{15}O_2Ru_2^{4+}$   $[M]^{4+}$  380.34259 Th; found 380.34368 Th (error: 2.866 ppm).

**$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  (ppm) = 2.30 (s, 3H, H18), 2.42 (s, 3H, H18), 3.96 (s, 6H, H21), 7.18-7.25 (m, 5H), 7.39 (d,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 7.43 (t,  $J = 6.7$  Hz, 1H), 7.48 (t, 1H), 7.50-7.56 (m, 5H), 7.58 (t, 1H), 7.60-7.65 (m, 3H), 7.77 (t,  $J = 4.7$  Hz, 2H), 7.80-7.87 (m, 2H), 7.89 (t,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.95 (t,  $J = 5.3$  Hz, 1H), 7.98-8.22 (m, 12H), 8.22-8.30 (m, 2H), 8.59 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 8.67 (t,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 8.68-8.78 (m, 8H), 8.81 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H), 9.24 (s, 1H), 9.27 (s, 1H).

**$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  (ppm) = 21.2, 21.4, 26.9, 28.1, 33.1, 36.6, 56.2, 116.3, 120.5, 122.3, 123.9, 124.0, 124.8, 125.5, 125.6, 125.8, 125.9 (m), 126.4, 126.6, 128.7, 129.1 (m), 129.2, 130.0, 130.2, 130.9, 138.9, 139.1, 139.4, 139.5, 152.3 (m), 157.9, 158.0, 158.5 (m), 164.2, 179.4.







---

## Communications scientifiques

---

### Publications

**A promising family of fluorescent water-soluble aza-BODIPY dyes for *in vivo* molecular imaging.** J. Pliquett, A. Dubois, C. Racœur, N. Mabrouk, S. Amor, R. Lescure, A. Bettaieb, B. Collin, C. Bernhard, F. Denat, P-S. Bellaye, C. Paul, E. Bodio, C. Goze. *Bioconjugate Chemistry*. **2019**.

**Aza-BODIPY platform: toward an efficient water-soluble bimodal imaging probe for MRI and near-infrared fluorescence.** O. Florès, J. Pliquett, L. Abad-Galan, R. Lescure, F. Denat, O. Maury, A. Pallier, P-S. Bellaye, B. Collin, S. Mème, C. Bonnet, E. Bodio, C. Goze. *Inorganic Chemistry*. **2020**.

### Publications en préparation

**Design and evaluation of a new SPECT/OI bimodal imaging probe based on aza-BODIPY fluorophore: application to cancer diagnostic and fluorescence guided surgery.** M. Privat, P-S. Bellaye, R. Lescure, A. Massot, M. Moreau, C. Racœur, F. Denat, A. Bettaieb, B. Collin, E. Bodio, C. Paul, C. Goze. *Soumission prévue à Theranostics*.

**Homo-bimetallic gold(I)-based aza-BODIPY complexes: towards *in vivo* near-infrared optical theranostics.** R. Lescure, M. Privat, J. Pliquett, A. Massot, B. Busser, F. Denat, A. Bettaieb, L. Sancey, C. Paul, C. Goze, E. Bodio. *Soumission prévue à Journal of Medicinal Chemistry*.

### Posters

**Juin 2019** – Journées des Écoles Doctorales, Dijon, France : **Innovative bioconjugatable monomolecular multimodal probes for NIR fluorescence/TEP *in vitro* and *in vivo* imaging of cancers**

- Prix poster de la Société Chimique de France

**Août 2020** – 15<sup>th</sup> European Molecular Imaging Meeting, virtual : **WAZABY platform for the development of bimodal probes and theranostic agents**

- Best poster-pitch in the imaging probes & application category

### Communications orales

**Septembre 2020** – SECO 57, Léon, France : **WAZABY platform for the development of bimodal probes and theranostic agents**

### Communications grand public

**2018-2019** – Programme Expérimentarium visant à promouvoir les rencontres entre les chercheurs et le grand public pour la vulgarisation scientifique. Participation à plusieurs interventions pour la présentation des travaux de thèse (classes de CE2 à Terminale et public adulte)

- Lien URL Expé : [Concevoir des molécules fluorescentes pour une utilisation médicale](#)



---

## Références

---

- (1) Bercovich, E.; Javitt, M. C. Medical Imaging: From Roentgen to the Digital Revolution, and Beyond. *Rambam Maimonides Med. J.* **2018**, *9* (4), e0034. <https://doi.org/10.5041/RMMJ.10355>.
- (2) All Nobel Prizes in Physics <https://www.nobelprize.org/prizes/lists/all-nobel-prizes-in-physics> (accessed Apr 23, 2020).
- (3) Facts on the Nobel Prize in Chemistry <https://www.nobelprize.org/prizes/facts/facts-on-the-nobel-prize-in-chemistry> (accessed Apr 23, 2020).
- (4) Scatliff, J. H.; Morris, P. J. From Röntgen to Magnetic Resonance Imaging: The History of Medical Imaging. *N. C. Med. J.* **2014**, *75* (2), 111–113. <https://doi.org/10.18043/ncm.75.2.111>.
- (5) Zimmerman, D. 'A More Creditable Way': The Discovery of Active Sonar, the Langevin–Chilowsky Patent Dispute and the Royal Commission on Awards to Inventors. *War Hist.* **2018**, *25* (1), 48–68. <https://doi.org/10.1177/0968344516651308>.
- (6) Rowland, R. E. *Radium in Humans: A Review of U.S. Studies*; ANL/ER--3; Argonne National Laboratory (ANL), 1995.
- (7) Niese, S. The Nobel Laureate George de Hevesy (1885-1966) - Universal Genius and Father of Nuclear Medicine. **2018**, *5* (1).
- (8) Dunst, S.; Tomancak, P. Imaging Flies by Fluorescence Microscopy: Principles, Technologies, and Applications. *Genetics* **2019**, *211* (1), 15–34. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.300227>.
- (9) Masters, B. R. The Development of Fluorescence Microscopy. In *Encyclopedia of Life Sciences*; John Wiley & Sons, Ltd, Ed.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2010. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0022093>.
- (10) Renz, M. Fluorescence Microscopy-A Historical and Technical Perspective: Fluorescence Microscopy. *Cytometry A* **2013**, *83* (9), 767–779. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22295>.
- (11) Rusk, N. The Fluorescence Microscope: First Fluorescence Microscope, First Epifluorescence Microscope, The Dichroic Mirror. *Nat. Cell Biol.* **2009**, *11* (S1), S8–S9. <https://doi.org/10.1038/ncb1941>.
- (12) Soldati, G. Sonographic Findings in Pulmonary Diseases. *Radiol. Med. (Torino)* **2006**, *111* (4), 507–515. <https://doi.org/10.1007/s11547-006-0046-z>.
- (13) Fan, X.; Guo, Y.; Wang, L.; Xiong, X.; Zhu, L.; Fang, K. Diagnosis of Prostate Cancer Using Anti-PSMA Aptamer A10-3.2-Oriented Lipid Nanobubbles. *Int. J. Nanomedicine* **2016**, *Volume 11*, 3939–3950. <https://doi.org/10.2147/IJN.S112951>.
- (14) History of the CT Scan - Catalina Imaging. *Mobile CT Rental - Mobile Imaging Rental And Lease*, 2019.
- (15) Gao, Y.; Hernandez, C.; Yuan, H.-X.; Lilly, J.; Kota, P.; Zhou, H.; Wu, H.; Exner, A. A. Ultrasound Molecular Imaging of Ovarian Cancer with CA-125 Targeted Nanobubble Contrast Agents. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2017**, *13* (7), 2159–2168. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.06.001>.
- (16) Heiss, W.-D.; Herholz, K.; Podreka, I.; Neubauer, I.; Pietrzyk, U. Comparison of [<sup>99m</sup>Tc]HMPAO SPECT with [<sup>18</sup>F]Fluoromethane PET in Cerebrovascular Disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **1990**, *10* (5), 687–697. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1990.122>.
- (17) The History of PET [http://www.cerebromente.org.br/n01/pet/pet\\_hist.htm](http://www.cerebromente.org.br/n01/pet/pet_hist.htm) (accessed Apr 23, 2020).
- (18) Barber, T. W.; Hofman, M. S.; Thomson, B. N. J.; Hicks, R. J. The Potential for Induction Peptide Receptor Chemoradionuclide Therapy to Render Inoperable Pancreatic and Duodenal Neuroendocrine Tumours Resectable. *Eur. J. Surg. Oncol. EJSO* **2012**, *38* (1), 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2011.08.129>.
- (19) Matsui, A.; Tanaka, E.; Choi, H. S.; Kianzad, V.; Gioux, S.; Lomnes, S. J.; Frangioni, J. V. Real-Time, near-Infrared, Fluorescence-Guided Identification of the Ureters Using Methylene Blue. *Surgery* **2010**, *148* (1), 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2009.12.003>.

- (20) Moore, G. E.; Peyton, W. T.; French, L. A.; Walker, W. W. The Clinical Use of Fluorescein in Neurosurgery. *J. Neurosurg.* **1948**, *5* (4), 392–398. <https://doi.org/10.3171/jns.1948.5.4.0392>.
- (21) Cutler, M. TRANSILLUMINATION OF THE BREAST: *Ann. Surg.* **1931**, *93* (1), 223–234. <https://doi.org/10.1097/0000658-193101000-00032>.
- (22) Guyer, D. R.; Yannuzzi, L. A.; Slakter, J. S.; Sorenson, J. A.; Hope-Ross, M.; Orlock, D. R. Digital Indocyanine-Green Videoangiography of Occult Choroidal Neovascularization. *Ophthalmology* **1994**, *101* (10), 1727–1737. [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(13\)31433-X](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(13)31433-X).
- (23) Scott, D. J.; Dollery, C. T.; Hill, D. W.; Hodge, J. V.; Fraser, R. Fluorescein Studies of the Retinal Circulation in Diabetics. *Br. J. Ophthalmol.* **1963**, *47* (10), 588–589. <https://doi.org/10.1136/bjo.47.10.588>.
- (24) Weissleder, R.; Pittet, M. J. Imaging in the Era of Molecular Oncology. *Nature* **2008**, *452* (7187), 580–589. <https://doi.org/10.1038/nature06917>.
- (25) Gordon, O.; Ruiz-Bedoya, C. A.; Ordonez, A. A.; Tucker, E. W.; Jain, S. K. Molecular Imaging: A Novel Tool To Visualize Pathogenesis of Infections In Situ. *mBio* **2019**, *10* (5). <https://doi.org/10.1128/mBio.00317-19>.
- (26) Anderson, C. J.; Lewis, J. S. Current Status and Future Challenges for Molecular Imaging. *Philos. Trans. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.* **2017**, *375* (2107), 20170023. <https://doi.org/10.1098/rsta.2017.0023>.
- (27) Pysz, M. A.; Gambhir, S. S.; Willmann, J. K. Molecular Imaging: Current Status and Emerging Strategies. *Clin. Radiol.* **2010**, *65* (7), 500–516. <https://doi.org/10.1016/j.crad.2010.03.011>.
- (28) Singh, B.; Gautam, R.; Kumar, S.; Kumar, B. N. V.; Nongthomba, U.; Nandi, D.; Mukherjee, G.; Santosh, V.; Somasundaram, K.; Umapathy, S. Application of Vibrational Microspectroscopy to Biology and Medicine. *Chem. Biol.* **2012**, *102* (2), 14.
- (29) Law, G.-L.; Wong, W.-T. An Introduction to Molecular Imaging. In *The Chemistry of Molecular Imaging*; Long, N., Wong, W.-T., Eds.; John Wiley & Sons, Inc: Hoboken, NJ, 2014; pp 1–24. <https://doi.org/10.1002/9781118854754.ch1>.
- (30) James, M. L.; Gambhir, S. S. A Molecular Imaging Primer: Modalities, Imaging Agents, and Applications. *Physiol. Rev.* **2012**, *92* (2), 897–965. <https://doi.org/10.1152/physrev.00049.2010>.
- (31) Campbell, S. A Short History of Sonography in Obstetrics and Gynaecology. *Facts Views Vis. ObGyn* **2013**, *5* (3), 213–229.
- (32) Liu, H.; Chen, Y.; Yan, F.; Han, X.; Wu, J.; Liu, X.; Zheng, H. Ultrasound Molecular Imaging of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 Expression for Endometrial Receptivity Evaluation. *Theranostics* **2015**, *5* (2), 206–217. <https://doi.org/10.7150/thno.9847>.
- (33) Willmann, J. K.; Bonomo, L.; Testa, A. C.; Rinaldi, P.; Rindi, G.; Valluru, K. S.; Petrone, G.; Martini, M.; Lutz, A. M.; Gambhir, S. S. Ultrasound Molecular Imaging With BR55 in Patients With Breast and Ovarian Lesions: First-in-Human Results. *J. Clin. Oncol.* **2017**, *35* (19), 2133–2140. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.70.8594>.
- (34) Mortelé, K. J.; Oliva, M.-R.; Ondategui, S.; Ros, P. R.; Silverman, S. G. Universal Use of Nonionic Iodinated Contrast Medium for CT: Evaluation of Safety in a Large Urban Teaching Hospital. *Am. J. Roentgenol.* **2005**, *184* (1), 31–34. <https://doi.org/10.2214/ajr.184.1.01840031>.
- (35) Hallouard, F. Iodinated Blood Pool Contrast Media for Preclinical X-Ray Imaging Applications - A Review. **2010**, 20.
- (36) Mahan, M. M.; Doiron, A. L. Gold Nanoparticles as X-Ray, CT, and Multimodal Imaging Contrast Agents: Formulation, Targeting, and Methodology. *J. Nanomater.* 16.
- (37) Hainfeld, J. F.; Slatkin, D. N.; Focella, T. M.; Smilowitz, H. M. Gold Nanoparticles: A New X-Ray Contrast Agent. *Br. J. Radiol.* **2006**, 6.
- (38) Liu, Y.; Ai, K.; Liu, J.; Yuan, Q.; He, Y.; Lu, L. A High Performance Ytterbium Based Nanoparticulate Contrast Agent for In Vivo XRay Computed Tomography Imaging. *Angew Chem Int Ed* **2012**, 6.
- (39) Cormode, D. P.; Naha, P. C.; Fayad, Z. A. Nanoparticle Contrast Agents for Computed Tomography: A Focus on Micelles. *Contrast Media Mol Imaging* **2014**, 16.
- (40) Lusic, H.; Grinstaff, M. W. X-Ray-Computed Tomography Contrast Agents. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (3), 1641–1666. <https://doi.org/10.1021/cr200358s>.

- (41) Morzycki, A.; Bhatia, A.; Murphy, K. J. Adverse Reactions to Contrast Material: A Canadian Update. *Can. Assoc. Radiol. J.* **2017**, *68* (2), 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.carj.2016.05.006>.
- (42) Meyer, D.; Schaefer, M.; Bonnemain, B. Gd-DOTA, A Potential MRI Contrast Agent Current Status of Physicochemical Knowledge. *Invest. Radiol.* **1988**, *23*, S232.
- (43) Lohrke, J.; Frenzel, T.; Endrikat, J.; Alves, F. C.; Grist, T. M.; Law, M.; Lee, J. M.; Leiner, T.; Li, K.-C.; Nikolaou, K.; Prince, M. R.; Schild, H. H.; Weinreb, J. C.; Yoshikawa, K.; Pietsch, H. 25 Years of Contrast-Enhanced MRI: Developments, Current Challenges and Future Perspectives. *Adv. Ther.* **2016**, *33* (1), 1–28. <https://doi.org/10.1007/s12325-015-0275-4>.
- (44) Granata, V.; Cascella, M.; Fusco, R.; Dell’Aprovola, N.; Catalano, O.; Filice, S.; Schiavone, V.; Izzo, F.; Cuomo, A.; Petrillo, A. Immediate Adverse Reactions to Gadolinium-Based MR Contrast Media: A Retrospective Analysis on 10,608 Examinations. *BioMed Res. Int.* **2016**, *2016*, 3918292. <https://doi.org/10.1155/2016/3918292>.
- (45) Blumgart, H. L.; Yens, O. C. Studies on the Velocity of Blood Flow. *J. Clin. Invest.* **1927**, *4* (1), 13.
- (46) Budinger, T. F.; Jones, T. History of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. In *Comprehensive Biomedical Physics*; Elsevier, 2014; pp 1–37. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53632-7.00101-5>.
- (47) Rahmim, A.; Zaidi, H. PET versus SPECT: Strengths, Limitations and Challenges: *Nucl. Med. Commun.* **2008**, *29* (3), 193–207. <https://doi.org/10.1097/MNM.0b013e3282f3a515>.
- (48) Blower, P. J. A Nuclear Chocolate Box: The Periodic Table of Nuclear Medicine. *Dalton Trans.* **2015**, *44* (11), 4819–4844. <https://doi.org/10.1039/C4DT02846E>.
- (49) Kostelnik, T. I.; Orvig, C. Radioactive Main Group and Rare Earth Metals for Imaging and Therapy. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (2), 902–956. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00294>.
- (50) Peltek, O. O.; Muslimov, A. R.; Zyuzin, M. V.; Timin, A. S. Current Outlook on Radionuclide Delivery Systems: From Design Consideration to Translation into Clinics. *J. Nanobiotechnology* **2019**, *17* (1). <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0524-9>.
- (51) Edem, P. E.; Fonslet, J.; Kjær, A.; Herth, M.; Severin, G. In Vivo Radionuclide Generators for Diagnostics and Therapy. *Bioinorg. Chem. Appl.* **2016**, *2016*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2016/6148357>.
- (52) Arora, A.; Bhagat, N. Insight into the Molecular Imaging of Alzheimer’s Disease. *Int. J. Biomed. Imaging* **2016**, *2016*, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2016/7462014>.
- (53) Qaim, S. M. Nuclear Data for Production and Medical Application of Radionuclides: Present Status and Future Needs. *Nucl. Med. Biol.* **2017**, *44*, 31–49. <https://doi.org/10.1016/j.nuclmedbio.2016.08.016>.
- (54) Aluicio-Sarduy, E.; Ellison, P. A.; Barnhart, T. E.; Cai, W.; Nickles, R. J.; Engle, J. W. PET Radiometals for Antibody Labeling. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2018**, *61* (9), 636–651. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3607>.
- (55) Faulkner, S.; Long, N. J. Radiopharmaceuticals for Imaging and Therapy. *Dalton Trans.* **2011**, *40* (23), 6067. <https://doi.org/10.1039/c1dt90067f>.
- (56) Yeong, C.-H.; Cheng, M.; Ng, K.-H. Therapeutic Radionuclides in Nuclear Medicine: Current and Future Prospects. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **2014**, *15* (10), 845–863. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1400131>.
- (57) Mikolajczak, R.; Meulen, N. P. van der; Lapi, S. E. Radiometals for Imaging and Theranostics, Current Production, and Future Perspectives. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2019**, *62* (10), 615–634. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3770>.
- (58) Pimlott, S. L.; Sutherland, A. Molecular Tracers for the PET and SPECT Imaging of Disease. *Chem Soc Rev* **2011**, *40* (1), 149–162. <https://doi.org/10.1039/B922628C>.
- (59) Melendez-Alafort, L.; Carlo Muzzio, P.; Rosato, A. Optical and Multimodal Peptide-Based Probes for In Vivo Molecular Imaging. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2012**, *12* (5), 476–499. <https://doi.org/10.2174/187152012800617858>.
- (60) Efimov, I. R.; Nikolski, V. P.; Salama, G. Optical Imaging of the Heart. *Circ. Res.* **2004**, *95* (1), 21–33. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000130529.18016.35>.

- (61) Shou, K.; Qu, C.; Sun, Y.; Chen, H.; Chen, S.; Zhang, L.; Xu, H.; Hong, X.; Yu, A.; Cheng, Z. Multifunctional Biomedical Imaging in Physiological and Pathological Conditions Using a NIR-II Probe. *Adv. Funct. Mater.* **2017**, *27* (23), 1700995. <https://doi.org/10.1002/adfm.201700995>.
- (62) Tseng, S.-H.; Bargo, P.; Durkin, A.; Kollias, N. Chromophore Concentrations, Absorption and Scattering Properties of Human Skin in-Vivo. *Opt. Express* **2009**, *17* (17), 14599. <https://doi.org/10.1364/OE.17.014599>.
- (63) Hemmer, E.; Benayas, A.; Légaré, F.; Vetrone, F. Exploiting the Biological Windows: Current Perspectives on Fluorescent Bioprobes Emitting above 1000 Nm. *Nanoscale Horiz.* **2016**, *1* (3), 168–184. <https://doi.org/10.1039/C5NH00073D>.
- (64) Vogel, A.; Venugopalan, V. Mechanisms of Pulsed Laser Ablation of Biological Tissues. *Chem. Rev.* **2003**, *103* (2), 577–644. <https://doi.org/10.1021/cr010379n>.
- (65) Sordillo, L. A.; Pu, Y.; Pratavieira, S.; Budansky, Y.; Alfano, R. R. Deep Optical Imaging of Tissue Using the Second and Third Near-Infrared Spectral Windows. *J. Biomed. Opt.* **2014**, *19* (5), 056004. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.19.5.056004>.
- (66) Sordillo, L. A.; Pratavieira, S.; Pu, Y.; Salas-Ramirez, K.; Shi, L.; Zhang, L.; Budansky, Y.; Alfano, R. R. Third Therapeutic Spectral Window for Deep Tissue Imaging; Alfano, R. R., Demos, S. G., Eds.; San Francisco, California, United States, 2014; p 89400V. <https://doi.org/10.1117/12.2040604>.
- (67) Hemmer, E.; Venkatachalam, N.; Hyodo, H.; Hattori, A.; Ebina, Y.; Kishimoto, H.; Soga, K. Upconverting and NIR Emitting Rare Earth Based Nanostructures for NIR-Bioimaging. *Nanoscale* **2013**, *5* (23), 11339. <https://doi.org/10.1039/c3nr02286b>.
- (68) Diao, S.; Hong, G.; Antaris, A. L.; Blackburn, J. L.; Cheng, K.; Cheng, Z.; Dai, H. Biological Imaging without Autofluorescence in the Second Near-Infrared Region. *Nano Res.* **2015**, *8* (9), 3027–3034. <https://doi.org/10.1007/s12274-015-0808-9>.
- (69) Namihisa, A.; Miwa, H.; Watanabe, H.; Kobayashi, O.; Ogihara, T.; Sato, N. A New Technique: Light-Induced Fluorescence Endoscopy in Combination with Pharmacoscopy. *Gastrointest. Endosc.* **2001**, *53* (3), 0343–0348. <https://doi.org/10.1067/mge.2001.112366>.
- (70) Messmann, H.; Endlicher, E.; Gelbmann, C. M.; Schölmerich, J. Fluorescence Endoscopy and Photodynamic Therapy. *Dig. Liver Dis.* **2002**, *34* (10), 754–761. [https://doi.org/10.1016/S1590-8658\(02\)80028-7](https://doi.org/10.1016/S1590-8658(02)80028-7).
- (71) 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. Intraoperative Tumor-Specific Fluorescence Imaging in Ovarian Cancer by Folate Receptor- $\alpha$  Targeting: First in-Human Results. *Nat. Med.* **2011**, *17* (10), 1315–1319. <https://doi.org/10.1038/nm.2472>.
- (72) Vahrmeijer, A. L.; Hutteman, M.; van der Vorst, J. R.; van de Velde, C. J. H.; Frangioni, J. V. Image-Guided Cancer Surgery Using near-Infrared Fluorescence. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2013**, *10* (9), 507–518. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.123>.
- (73) Chimactiv - Ressources pédagogiques numériques interactives dans l'analyse chimique de milieux complexes <http://chimactiv.agroparistech.fr/fr/bases/fluorescence> (accessed Apr 29, 2020).
- (74) Jaffe, H. H.; Miller, A. L. The Fates of Electronic Excitation Energy. *J. Chem. Educ.* **1966**, *43* (9), 469. <https://doi.org/10.1021/ed043p469>.
- (75) Hochreiter, B.; Pardo-Garcia, A.; Schmid, J. Fluorescent Proteins as Genetically Encoded FRET Biosensors in Life Sciences. *Sensors* **2015**, *15* (10), 26281–26314. <https://doi.org/10.3390/s151026281>.
- (76) Quantum Yields - HORIBA <https://www.horiba.com/us/en/scientific/products/fluorescence-spectroscopy/application-notes/quantum-yields/?Ovly=1> (accessed Apr 29, 2020).
- (77) Nasirzadeh, K.; Nazarian, S.; Gheibi hayat, S. M. Inorganic Nanomaterials: A Brief Overview of the Applications and Developments in Sensing and Drug Delivery. *J. Appl. Biotechnol. Rep.* **2016**, *3*, 395–402.

- (78) Martinić, I.; Eliseeva, S. V.; Petoud, S. Near-Infrared Emitting Probes for Biological Imaging: Organic Fluorophores, Quantum Dots, Fluorescent Proteins, Lanthanide(III) Complexes and Nanomaterials. *J. Lumin.* **2017**, *189*, 19–43. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2016.09.058>.
- (79) Wu, X.; Liu, H.; Liu, J.; Haley, K. N.; Treadway, J. A.; Larson, J. P.; Ge, N.; Peale, F.; Bruchez, M. P. Immunofluorescent Labeling of Cancer Marker Her2 and Other Cellular Targets with Semiconductor Quantum Dots. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21* (1), 41–46. <https://doi.org/10.1038/nbt764>.
- (80) Ghazani, A. A.; Lee, J. A.; Klostranec, J.; Xiang, Q.; Dacosta, R. S.; Wilson, B. C.; Tsao, M. S.; Chan, W. C. W. High Throughput Quantification of Protein Expression of Cancer Antigens in Tissue Microarray Using Quantum Dot Nanocrystals. *Nano Lett.* **2006**, *6* (12), 2881–2886. <https://doi.org/10.1021/nl062111n>.
- (81) Yezhelyev, M. V.; Al-Hajj, A.; Morris, C.; Marcus, A. I.; Liu, T.; Lewis, M.; Cohen, C.; Zrazhevskiy, P.; Simons, J. W.; Rogatko, A.; Nie, S.; Gao, X.; O'Regan, R. M. In Situ Molecular Profiling of Breast Cancer Biomarkers with Multicolor Quantum Dots. *Adv. Mater.* **2007**, *19* (20), 3146–3151. <https://doi.org/10.1002/adma.200701983>.
- (82) Zhao, M.-X.; Zeng, E.-Z. Application of Functional Quantum Dot Nanoparticles as Fluorescence Probes in Cell Labeling and Tumor Diagnostic Imaging. *Nanoscale Res. Lett.* **2015**, *10* (1). <https://doi.org/10.1186/s11671-015-0873-8>.
- (83) Chinnathambi, S.; Shirahata, N. Recent Advances on Fluorescent Biomarkers of Near-Infrared Quantum Dots for *in Vitro* and *in Vivo* Imaging. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2019**, *20* (1), 337–355. <https://doi.org/10.1080/14686996.2019.1590731>.
- (84) Li, K. G.; Chen, J. T.; Bai, S. S.; Wen, X.; Song, S. Y.; Yu, Q.; Li, J.; Wang, Y. Q. Intracellular Oxidative Stress and Cadmium Ions Release Induce Cytotoxicity of Unmodified Cadmium Sulfide Quantum Dots. *Toxicol. In Vitro* **2009**, *23* (6), 1007–1013. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.06.020>.
- (85) Cho, S. J.; Maysinger, D.; Jain, M.; Röder, B.; Hackbarth, S.; Winnik, F. M. Long-Term Exposure to CdTe Quantum Dots Causes Functional Impairments in Live Cells. *Langmuir* **2007**, *23* (4), 1974–1980. <https://doi.org/10.1021/la060093j>.
- (86) Rosen, A. B.; Kelly, D. J.; Schuldt, A. J. T.; Lu, J.; Potapova, I. A.; Doronin, S. V.; Robichaud, K. J.; Robinson, R. B.; Rosen, M. R.; Brink, P. R.; Gaudette, G. R.; Cohen, I. S. Finding Fluorescent Needles in the Cardiac Haystack: Tracking Human Mesenchymal Stem Cells Labeled with Quantum Dots for Quantitative In Vivo Three-Dimensional Fluorescence Analysis: FINDING FLUORESCENT NEEDLES IN THE CARDIAC HAYSTACK: TRACKING HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS LABELED WITH QUANTUM DOTS FOR QUANTITATIVE IN VIVO THREE-DI. *STEM CELLS* **2007**, *25* (8), 2128–2138. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0722>.
- (87) Mukherjee, A.; Shim, Y.; Myong Song, J. Quantum Dot as Probe for Disease Diagnosis and Monitoring. *Biotechnol. J.* **2016**, *11* (1), 31–42. <https://doi.org/10.1002/biot.201500219>.
- (88) Erogbogbo, F.; Yong, K.-T.; Roy, I.; Hu, R.; Law, W.-C.; Zhao, W.; Ding, H.; Wu, F.; Kumar, R.; Swihart, M. T.; Prasad, P. N. *In Vivo* Targeted Cancer Imaging, Sentinel Lymph Node Mapping and Multi-Channel Imaging with Biocompatible Silicon Nanocrystals. *ACS Nano* **2011**, *5* (1), 413–423. <https://doi.org/10.1021/nn1018945>.
- (89) Bünzli, J.-C. G. Lanthanide Luminescence for Biomedical Analyses and Imaging. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (5), 2729–2755. <https://doi.org/10.1021/cr900362e>.
- (90) Gaiduk, M. I.; Grigoryants, V. V.; Mironov, A. F.; Rumyantseva, V. D.; Chissov, V. I.; Sukhin, G. M. Fibre-Laser IR Luminescence Diagnostics of Malignant Tumours Using Rare Earth Porphyrins. **1989**, *7* (1), 15–20.
- (91) Werts, M. H. V.; Hofstraat, J. W.; Geurts, F. A. J.; Verhoeven, J. W. Fluorescein and Eosin as Sensitizing Chromophores in Near-Infrared Luminescent Ytterbium(III), Neodymium(III) and Erbium(III) Chelates. *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *276* (3–4), 196–201. [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(97\)00800-2](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(97)00800-2).
- (92) Huang, W.; Wu, D.; Guo, D.; Zhu, X.; He, C.; Meng, Q.; Duan, C. Efficient Near-Infrared Emission of a Ytterbium(III) Compound with a Green Light Rhodamine Donor. *Dalton Trans.* **2009**, No. 12, 2081. <https://doi.org/10.1039/b820131e>.

- (93) Ziessel, R. F.; Ulrich, G.; Charbonnière, L.; Imbert, D.; Scopelliti, R.; Bünzli, J.-C. G. NIR Lanthanide Luminescence by Energy Transfer from Appended Terpyridine–Boradiazaindacene Dyes. *Chem. - Eur. J.* **2006**, *12* (19), 5060–5067. <https://doi.org/10.1002/chem.200600124>.
- (94) Yi, X.; Bernot, K.; Le Corre, V.; Calvez, G.; Pointillart, F.; Cador, O.; Le Guennic, B.; Jung, J.; Maury, O.; Placide, V.; Guyot, Y.; Roisnel, T.; Daiguebonne, C.; Guillou, O. Unraveling the Crystal Structure of Lanthanide-Murexide Complexes: Use of an Ancient Complexometry Indicator as a Near-Infrared-Emitting Single-Ion Magnet. *Chem. - Eur. J.* **2014**, *20* (6), 1569–1576. <https://doi.org/10.1002/chem.201303833>.
- (95) Villa, I.; Vedda, A.; Cantarelli, I. X.; Pedroni, M.; Piccinelli, F.; Bettinelli, M.; Speghini, A.; Quintanilla, M.; Vetrone, F.; Rocha, U.; Jacinto, C.; Carrasco, E.; Rodríguez, F. S.; Juarranz, Á.; del Rosal, B.; Ortgies, D. H.; Gonzalez, P. H.; Solé, J. G.; García, D. J. 1.3 Mm Emitting SrF<sub>2</sub>:Nd<sup>3+</sup> Nanoparticles for High Contrast in Vivo Imaging in the Second Biological Window. *Nano Res.* **2015**, *8* (2), 649–665. <https://doi.org/10.1007/s12274-014-0549-1>.
- (96) Gross, M. D.; Nelsestuen, G. L.; Kumar, R. Observations on the Binding of Lanthanides and Calcium to Vitamin D-Dependent Chick Intestinal Calcium-Binding Protein. Implications Regarding Calcium-Binding Protein Function. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262* (14), 6539–6545.
- (97) Lavis, L. D.; Raines, R. T. Bright Ideas for Chemical Biology. *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3* (3), 142–155. <https://doi.org/10.1021/cb700248m>.
- (98) Luo, S.; Zhang, E.; Su, Y.; Cheng, T.; Shi, C. A Review of NIR Dyes in Cancer Targeting and Imaging. *Biomaterials* **2011**, *32* (29), 7127–7138. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.06.024>.
- (99) Slooter, M. D.; Janssen, A.; Bemelman, W. A.; Tanis, P. J.; Hompes, R. Currently Available and Experimental Dyes for Intraoperative Near-Infrared Fluorescence Imaging of the Ureters: A Systematic Review. *Tech. Coloproctology* **2019**, *23* (4), 305–313. <https://doi.org/10.1007/s10151-019-01973-4>.
- (100) Debie, P.; Hernot, S. Emerging Fluorescent Molecular Tracers to Guide Intra-Operative Surgical Decision-Making. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00510>.
- (101) Gioux, S.; Choi, H. S.; Frangioni, J. V. Image-Guided Surgery Using Invisible Near-Infrared Light: Fundamentals of Clinical Translation. *Mol. Imaging* **2010**, *9* (5), 7290.2010.00034. <https://doi.org/10.2310/7290.2010.00034>.
- (102) Tynan, C. J.; Clarke, D. T.; Coles, B. C.; Rolfe, D. J.; Martin-Fernandez, M. L.; Webb, S. E. D. Multicolour Single Molecule Imaging in Cells with Near Infra-Red Dyes. *PLoS ONE* **2012**, *7* (4), e36265. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036265>.
- (103) Kobayashi, H.; Ogawa, M.; Alford, R.; Choyke, P. L.; Urano, Y. New Strategies for Fluorescent Probe Design in Medical Diagnostic Imaging. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (5), 2620–2640. <https://doi.org/10.1021/cr900263j>.
- (104) DSouza, A. V.; Lin, H.; Henderson, E. R.; Samkoe, K. S.; Pogue, B. W. Review of Fluorescence Guided Surgery Systems: Identification of Key Performance Capabilities beyond Indocyanine Green Imaging. *J. Biomed. Opt.* **2016**, *21* (8), 080901. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.21.8.080901>.
- (105) Pansare, V. J.; Hejazi, S.; Faenza, W. J.; Prud'homme, R. K. Review of Long-Wavelength Optical and NIR Imaging Materials: Contrast Agents, Fluorophores, and Multifunctional Nano Carriers. *Chem. Mater.* **2012**, *24* (5), 812–827. <https://doi.org/10.1021/cm2028367>.
- (106) Alford, R.; Simpson, H. M.; Duberman, J.; Hill, G. C.; Ogawa, M.; Regino, C.; Kobayashi, H.; Choyke, P. L. Toxicity of Organic Fluorophores Used in Molecular Imaging: Literature Review. *Mol. Imaging* **2009**, *8* (6), 7290.2009.00031. <https://doi.org/10.2310/7290.2009.00031>.
- (107) Umezawa, K.; Citterio, D.; Suzuki, K. A Squaraine-Based Near-Infrared Dye with Bright Fluorescence and Solvatochromic Property. *Chem. Lett.* **2007**, *36* (12), 1424–1425. <https://doi.org/10.1246/cl.2007.1424>.
- (108) Santos, S. C. dos; Moreira, L. M.; Novo, D. L. R.; Santin, L. R. R.; Bianchini, D.; Bonacin, J. A.; Romani, A. P.; Fernandes, A. U.; Baptista, M. S.; de Oliveira, H. P. M. Photophysical Properties of Porphyrin Derivatives: Influence of the Alkyl Chains in Homogeneous and Micro-Heterogeneous



- Systems. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2015**, *19* (08), 920–933. <https://doi.org/10.1142/S1088424615500650>.
- (109) Li, W.; Li, L.; Xiao, H.; Qi, R.; Huang, Y.; Xie, Z.; Jing, X.; Zhang, H. Iodo-BODIPY: A Visible-Light-Driven, Highly Efficient and Photostable Metal-Free Organic Photocatalyst. *RSC Adv.* **2013**, *3* (32), 13417. <https://doi.org/10.1039/c3ra40932e>.
- (110) Cenens, J. Visible Spectroscopy of Methylene Blue on Hectorite, Laponite B, and Barasym in Aqueous Suspension. *Clays Clay Miner.* **1988**, *36* (3), 214–224. <https://doi.org/10.1346/CCMN.1988.0360302>.
- (111) Kubin, R. F.; Fletcher, A. N. Fluorescence Quantum Yields of Some Rhodamine Dyes. *J. Lumin.* **1982**, *27* (4), 455–462. [https://doi.org/10.1016/0022-2313\(82\)90045-X](https://doi.org/10.1016/0022-2313(82)90045-X).
- (112) Kajimoto, Y.; Kuroiwa, T.; Miyatake, S.-I.; Ichioka, T.; Miyashita, M.; Tanaka, H.; Tsuji, M. Use of 5-Aminolevulinic Acid in Fluorescence-Guided Resection of Meningioma with High Risk of Recurrence. *J. Neurosurg.* **2007**, *106* (6), 1070–1074. <https://doi.org/10.3171/jns.2007.106.6.1070>.
- (113) Yoshioka, E.; Chelakkot, V. S.; Licursi, M.; Rutihinda, S. G.; Som, J.; Derwish, L.; King, J. J.; Pongnopparat, T.; Mearow, K.; Larijani, M.; Dorward, A. M.; Hirasawa, K. Enhancement of Cancer-Specific Protoporphyrin IX Fluorescence by Targeting Oncogenic Ras/MEK Pathway. *Theranostics* **2018**, *8* (8), 2134–2146. <https://doi.org/10.7150/thno.22641>.
- (114) Li, D.; Zhang, J.; Chi, C.; Xiao, X.; Wang, J.; Lang, L.; Ali, I.; Niu, G.; Zhang, L.; Tian, J.; Ji, N.; Zhu, Z.; Chen, X. First-in-Human Study of PET and Optical Dual-Modality Image-Guided Surgery in Glioblastoma Using <sup>68</sup>Ga-IRDye800CW-BBN. *Theranostics* **2018**, *8* (9), 2508–2520. <https://doi.org/10.7150/thno.25599>.
- (115) Treibs, A.; Kreuzer, F.-H. Première Synthèse AzaBODIPY (1968). *Justus Liebigs Annalen der Chemie*. 1968, pp 208–223.
- (116) Sola-Llano, R.; Bañuelos, J. Introductory Chapter: BODIPY Dye, an All-in-One Molecular Scaffold for (Bio)Photonics. In *BODIPY Dyes - A Privilege Molecular Scaffold with Tunable Properties*; Bañuelos-Prieto, J., Sola Llano, R., Eds.; IntechOpen, 2019. <https://doi.org/10.5772/intechopen.82682>.
- (117) Boens, N.; Verbelen, B.; Dehaen, W. Postfunctionalization of the BODIPY Core: Synthesis and Spectroscopy: Postfunctionalization of the BODIPY Core. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *2015* (30), 6577–6595. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201500682>.
- (118) Boens, N.; Verbelen, B.; Ortiz, M. J.; Jiao, L.; Dehaen, W. Synthesis of BODIPY Dyes through Postfunctionalization of the Boron Dipyrromethene Core. *Coord. Chem. Rev.* **2019**, *399*, 213024. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.213024>.
- (119) Ulrich, G.; Goze, C.; Guardigli, M.; Roda, A.; Ziessel, R. Pyrromethene Dialkynyl Borane Complexes for “Cascatelle” Energy Transfer and Protein Labeling. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (24), 3694–3698. <https://doi.org/10.1002/anie.200500808>.
- (120) Nguyen, A. L.; Bobadova-Parvanova, P.; Hopfinger, M.; Fronczek, F. R.; Smith, K. M.; Vicente, M. G. H. Synthesis and Reactivity of 4,4-Dialkoxy-BODIPYs: An Experimental and Computational Study. *Inorg. Chem.* **2015**, *54* (7), 3228–3236. <https://doi.org/10.1021/ic502821m>.
- (121) Loudet, A.; Burgess, K. BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (11), 4891–4932. <https://doi.org/10.1021/cr078381n>.
- (122) Swavey, S.; Quinn, J.; Coladipietro, M.; Cox, K. G.; Brennaman, M. K. Tuning the Photophysical Properties of BODIPY Dyes through Extended Aromatic Pyrroles. *RSC Adv.* **2017**, *7* (1), 173–179. <https://doi.org/10.1039/C6RA26331C>.
- (123) Sarma, T.; Panda, P. K.; Setsune, J. Bis-Naphthobipyrrolylmethene Derived BODIPY Complex: An Intense near-Infrared Fluorescent Dye. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (84), 9806. <https://doi.org/10.1039/c3cc44834g>.
- (124) Nakamura, M.; Tahara, H.; Takahashi, K.; Nagata, T.; Uoyama, H.; Kuzuhara, D.; Mori, S.; Okujima, T.; Yamada, H.; Uno, H.  $\pi$ -Fused Bis-BODIPY as a Candidate for NIR Dyes. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (34), 6840. <https://doi.org/10.1039/c2ob25930c>.

- (125) Tao, J.; Sun, D.; Sun, L.; Li, Z.; Fu, B.; Liu, J.; Zhang, L.; Wang, S.; Fang, Y.; Xu, H. Tuning the Photo-Physical Properties of BODIPY Dyes: Effects of 1, 3, 5, 7- Substitution on Their Optical and Electrochemical Behaviours. *Dyes Pigments* **2019**, *168*, 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.04.054>.
- (126) Li, G.; Otsuka, Y.; Matsumiya, T.; Suzuki, T.; Li, J.; Takahashi, M.; Yamada, K. A Straightforward Substitution Strategy to Tune BODIPY Dyes Spanning the Near-Infrared Region via Suzuki–Miyaura Cross-Coupling. *Materials* **2018**, *11* (8), 1297. <https://doi.org/10.3390/ma11081297>.
- (127) Killoran, J.; Allen, L.; Gallagher, J. F.; Gallagher, W. M.; O’Shea, D. F. Synthesis of BF<sub>2</sub> Chelates of Tetraarylazadipyrrromethenes and Evidence for Their Photodynamic Therapeutic Behaviour. *Chem Commun* **2002**, No. 17, 1862–1863. <https://doi.org/10.1039/B204317C>.
- (128) Gorman, A.; Killoran, J.; O’Shea, C.; Kenna, T.; Gallagher, W. M.; O’Shea, D. F. In Vitro Demonstration of the Heavy-Atom Effect for Photodynamic Therapy. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (34), 10619–10631. <https://doi.org/10.1021/ja047649e>.
- (129) Kamkaew, A.; Burgess, K. Aza-BODIPY Dyes with Enhanced Hydrophilicity. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (53), 10664–10667. <https://doi.org/10.1039/C5CC03649F>.
- (130) Bhuniya, S.; Lee, M. H.; Jeon, H. M.; Han, J. H.; Lee, J. H.; Park, N.; Maiti, S.; Kang, C.; Kim, J. S. A Fluorescence off–on Reporter for Real Time Monitoring of Gemcitabine Delivery to the Cancer Cells. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (64), 7141. <https://doi.org/10.1039/c3cc42653j>.
- (131) Gao, M.; Wang, R.; Yu, F.; You, J.; Chen, L. A Near-Infrared Fluorescent Probe for the Detection of Hydrogen Polysulfides Biosynthetic Pathways in Living Cells and in Vivo. *The Analyst* **2015**, *140* (11), 3766–3772. <https://doi.org/10.1039/C4AN02366H>.
- (132) Daly, H. C.; Sampedro, G.; Bon, C.; Wu, D.; Ismail, G.; Cahill, R. A.; O’Shea, D. F. BF<sub>2</sub>-Azadipyrrromethene NIR-Emissive Fluorophores with Research and Clinical Potential. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *135*, 392–400. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.051>.
- (133) Pliquett, J.; Dubois, A.; Racœur, C.; Mabrouk, N.; Amor, S.; Lescure, R.; Bettaïeb, A.; Collin, B.; Bernhard, C.; Denat, F.; Bellaye, P. S.; Paul, C.; Bodio, E.; Goze, C. A Promising Family of Fluorescent Water-Soluble Aza-BODIPY Dyes for *in Vivo* Molecular Imaging. *Bioconjug. Chem.* **2019**, *30* (4), 1061–1066. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00795>.
- (134) Zhao, W.; Carreira, E. M. Conformationally Restricted Aza-Bodipy: A Highly Fluorescent, Stable, Near-Infrared-Absorbing Dye. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (11), 1677–1679. <https://doi.org/10.1002/anie.200461868>.
- (135) Lim, H.; Seo, S.; Pascal, S.; Bellier, Q.; Rigaut, S.; Park, C.; Shin, H.; Maury, O.; Andraud, C.; Kim, E. NIR Electrofluorochromic Properties of Aza-Boron-Dipyrrromethene Dyes. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1). <https://doi.org/10.1038/srep18867>.
- (136) Bai, L.; Sun, P.; Liu, Y.; Zhang, H.; Hu, W.; Zhang, W.; Liu, Z.; Fan, Q.; Li, L.; Huang, W. Novel Aza-BODIPY Based Small Molecular NIR-II Fluorophores for *in Vivo* Imaging. *Chem. Commun.* **2019**, *55* (73), 10920–10923. <https://doi.org/10.1039/C9CC03378E>.
- (137) Hattori, S.; Ohkubo, K.; Urano, Y.; Sunahara, H.; Nagano, T.; Wada, Y.; Tkachenko, N. V.; Lemmetyinen, H.; Fukuzumi, S. Charge Separation in a Nonfluorescent Donor–Acceptor Dyad Derived from Boron Dipyrrromethene Dye, Leading to Photocurrent Generation. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (32), 15368–15375. <https://doi.org/10.1021/jp050952x>.
- (138) Klifout, H.; Stewart, A.; Elkhalfi, M.; He, H. BODIPYs for Dye-Sensitized Solar Cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (46), 39873–39889. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b07688>.
- (139) Yildiz, E. A.; Sevinc, G.; Yaglioglu, H. G.; Hayvali, M. Strategies towards Enhancing the Efficiency of BODIPY Dyes in Dye Sensitized Solar Cells. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **2019**, *375*, 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2019.01.021>.
- (140) Mueller, T.; Gresser, R.; Leo, K.; Riede, M. Organic Solar Cells Based on a Novel Infrared Absorbing Aza-Bodipy Dye. *Sol. Energy Mater. Sol. Cells* **2012**, *99*, 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.solmat.2011.11.006>.
- (141) Squeo, B. M.; Pasini, M. BODIPY Platform: A Tunable Tool for Green to NIR OLEDs. *Supramol. Chem.* **2020**, *32* (1), 56–70. <https://doi.org/10.1080/10610278.2019.1691727>.

- (142) Zampetti, A.; Minotto, A.; Squeo, B. M.; Gregoriou, V. G.; Allard, S.; Scherf, U.; Chochos, C. L.; Cacialli, F. Highly Efficient Solid-State Near-Infrared Organic Light-Emitting Diodes Incorporating A-D-A Dyes Based on  $\alpha,\beta$ -Unsubstituted "BODIPY" Moieties. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01785-2>.
- (143) Marks, D. L.; Bittman, R.; Pagano, R. E. Use of Bodipy-Labeled Sphingolipid and Cholesterol Analogs to Examine Membrane Microdomains in Cells. *Histochem. Cell Biol.* **2008**, *130* (5), 819–832. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0509-5>.
- (144) Yang, Z.; He, Y.; Lee, J.-H.; Park, N.; Suh, M.; Chae, W.-S.; Cao, J.; Peng, X.; Jung, H.; Kang, C.; Kim, J. S. A Self-Calibrating Bipartite Viscosity Sensor for Mitochondria. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (24), 9181–9185. <https://doi.org/10.1021/ja403851p>.
- (145) Franke, J.; Raliski, B.; Boggess, S.; Natesan, D.; Koretsky, E.; Zhang, P.; Kulkarni, R.; Deal, P.; Miller, E. *BODIPY Fluorophores for Membrane Potential Imaging*; preprint; 2019. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.8219057.v1>.
- (146) Rohand, T.; Baruah, M.; Qin, W.; Boens, N.; Dehaen, W. Functionalisation of Fluorescent BODIPY Dyes by Nucleophilic Substitution. *Chem. Commun.* **2006**, *0* (3), 266–268. <https://doi.org/10.1039/B512756D>.
- (147) He, S.-J.; Xie, Y.-W.; Chen, Q.-Y. A NIR-BODIPY Derivative for Sensing Copper(II) in Blood and Mitochondrial Imaging. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2018**, *195*, 210–214. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.01.076>.
- (148) Shandura, M. P.; Yakubovskiy, V. P.; Gerasov, A. O.; Kachkovsky, O. D.; Poronik, Y. M.; Kovtun, Y. P.  $\alpha$ -Polymethine-Substituted Boron Dipyrromethenes - BODIPY-Based NIR Cyanine-Like Dyes. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012* (9), 1825–1834. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201101674>.
- (149) Ni, Y.; Wu, J. Far-Red and near Infrared BODIPY Dyes: Synthesis and Applications for Fluorescent PH Probes and Bio-Imaging. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (23), 3774. <https://doi.org/10.1039/c3ob42554a>.
- (150) Wu, M.; Shu, J. Multimodal Molecular Imaging: Current Status and Future Directions. *Contrast Media Mol. Imaging* **2018**, *2018*, 1382183. <https://doi.org/10.1155/2018/1382183>.
- (151) Workman, R. B.; Coleman, R. E. *PET/CT: Essentials for Clinical Practice*; Springer Science & Business Media, 2006.
- (152) Beyer, T.; Townsend, D. W.; Brun, T.; Kinahan, P.; Charron, M.; Roddy, R.; Jerin, J.; Young, J.; Byars, L.; Nutt, R. A Combined PET/CT Scanner for Clinical Oncology. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **2000**, *41*, 1369–1379.
- (153) Townsend, D. W.; Beyer, T.; Blodgett, T. M. PET/CT Scanners: A Hardware Approach to Image Fusion. *Semin. Nucl. Med.* **2003**, *33* (3), 193–204. <https://doi.org/10.1053/snuc.2003.127314>.
- (154) Hutton, B. F. The Origins of SPECT and SPECT/CT. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2014**, *41* (S1), 3–16. <https://doi.org/10.1007/s00259-013-2606-5>.
- (155) Catana, C.; Wu, Y.; Judenhofer, M. S.; Qi, J.; Pichler, B. J.; Cherry, S. R. Simultaneous Acquisition of Multislice PET and MR Images: Initial Results with a MR-Compatible PET Scanner. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **2006**, *47* (12), 1968–1976.
- (156) Notni, J.; Hermann, P.; Dregely, I.; Wester, H.-J. Convenient Synthesis of  $^{68}\text{Ga}$ -Labeled Gadolinium(III) Complexes: Towards Bimodal Responsive Probes for Functional Imaging with PET/MRI. *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19* (38), 12602–12606. <https://doi.org/10.1002/chem.201302751>.
- (157) Gianolio, E.; Maciocco, L.; Imperio, D.; Giovenzana, G. B.; Simonelli, F.; Abbas, K.; Bisi, G.; Aime, S. Dual MRI-SPECT Agent for PH-Mapping. *Chem Commun* **2011**, *47* (5), 1539–1541. <https://doi.org/10.1039/C0CC03554H>.
- (158) Torres Martin de Rosales, R.; Tavaré, R.; Glaria, A.; Varma, G.; Protti, A.; Blower, P. J.  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Bisphosphonate-Iron Oxide Nanoparticle Conjugates for Dual-Modality Biomedical Imaging. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22* (3), 455–465. <https://doi.org/10.1021/bc100483k>.
- (159) Treves, S. T. *Pediatric Nuclear Medicine and Molecular Imaging*; Springer, 2014.
- (160) Ke, H.; Wang, J.; Tong, S.; Jin, Y.; Wang, S.; Qu, E.; Bao, G.; Dai, Z. Gold Nanoshelled Liquid Perfluorocarbon Magnetic Nanocapsules: A Nanotheranostic Platform for Bimodal

- Ultrasound/Magnetic Resonance Imaging Guided Photothermal Tumor Ablation. *Theranostics* **2013**, 4 (1), 12–23. <https://doi.org/10.7150/thno.7275>.
- (161) Nagaya, T.; Nakamura, Y. A.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. Fluorescence-Guided Surgery. *Front. Oncol.* **2017**, 7. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00314>.
- (162) Zheng, Y.; Yang, H.; Wang, H.; Kang, K.; Zhang, W.; Ma, G.; Du, S. Fluorescence-Guided Surgery in Cancer Treatment: Current Status and Future Perspectives. *Ann. Transl. Med.* **2019**, 7 (S1), S6–S6. <https://doi.org/10.21037/atm.2019.01.26>.
- (163) Mondal, S. B.; Gao, S.; Zhu, N.; Liang, R.; Gruev, V.; Achilefu, S. Real-Time Fluorescence Image-Guided Oncologic Surgery. In *Advances in Cancer Research*; Elsevier, 2014; Vol. 124, pp 171–211. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411638-2.00005-7>.
- (164) Zhao, J.; Chen, J.; Ma, S.; Liu, Q.; Huang, L.; Chen, X.; Lou, K.; Wang, W. Recent Developments in Multimodality Fluorescence Imaging Probes. *Acta Pharm. Sin. B* **2018**, 8 (3), 320–338. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.03.010>.
- (165) Qin, M.-Y.; Yang, X.-Q.; Wang, K.; Zhang, X.-S.; Song, J.-T.; Yao, M.-H.; Yan, D.-M.; Liu, B.; Zhao, Y.-D. In Vivo Cancer Targeting and Fluorescence-CT Dual-Mode Imaging with Nanoprobes Based on Silver Sulfide Quantum Dots and Iodinated Oil. *Nanoscale* **2015**, 7 (46), 19484–19492. <https://doi.org/10.1039/C5NR05620A>.
- (166) Ding, J.; Wang, Y.; Ma, M.; Zhang, Y.; Lu, S.; Jiang, Y.; Qi, C.; Luo, S.; Dong, G.; Wen, S.; An, Y.; Gu, N. CT/Fluorescence Dual-Modal Nanoemulsion Platform for Investigating Atherosclerotic Plaques. *Biomaterials* **2013**, 34 (1), 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.09.025>.
- (167) Zhang, J.; Li, C.; Zhang, X.; Huo, S.; Jin, S.; An, F.-F.; Wang, X.; Xue, X.; Okeke, C. I.; Duan, G.; Guo, F.; Zhang, X.; Hao, J.; Wang, P. C.; Zhang, J.; Liang, X.-J. In Vivo Tumor-Targeted Dual-Modal Fluorescence/CT Imaging Using a Nanoprobe Co-Loaded with an Aggregation-Induced Emission Dye and Gold Nanoparticles. *Biomaterials* **2015**, 42, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.11.053>.
- (168) Xia, H.-X.; Yang, X.-Q.; Song, J.-T.; Chen, J.; Zhang, M.-Z.; Yan, D.-M.; Zhang, L.; Qin, M.-Y.; Bai, L.-Y.; Zhao, Y.-D.; Ma, Z.-Y. Folic Acid-Conjugated Silica-Coated Gold Nanorods and Quantum Dots for Dual-Modality CT and Fluorescence Imaging and Photothermal Therapy. *J. Mater. Chem. B* **2014**, 2 (14), 1945. <https://doi.org/10.1039/c3tb21591a>.
- (169) Liu, Y.; Tian, G.-F.; He, X.-W.; Li, W.-Y.; Zhang, Y.-K. Microwave-Assisted One-Step Rapid Synthesis of near-Infrared Gold Nanoclusters for NIRF/CT Dual-Modal Bioimaging. *J. Mater. Chem. B* **2016**, 4 (7), 1276–1283. <https://doi.org/10.1039/C5TB02322J>.
- (170) Lv, W.; Shen, Y.; Yang, H.; Yang, R.; Cai, W.; Zhang, J.; Yuan, L.; Duan, Y.; Zhang, L. A Novel Bimodal Imaging Agent Targeting HER2 Molecule of Breast Cancer. *J. Immunol. Res.* **2018**, 2018, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2018/6202876>.
- (171) Yang, Y.; Wang, J.; Li, X.; Lin, L.; Yue, X. A near Infrared Fluorescent/Ultrasonic Bimodal Contrast Agent for Imaging Guided PDNA Delivery via Ultrasound Targeted Microbubble Destruction. *RSC Adv.* **2015**, 5 (11), 8404–8414. <https://doi.org/10.1039/C4RA15066J>.
- (172) Hüber, M. M.; Staubli, A. B.; Kustedjo, K.; Gray, M. H. B.; Shih, J.; Fraser, S. E.; Jacobs, R. E.; Meade, T. J. Fluorescently Detectable Magnetic Resonance Imaging Agents. *Bioconjug. Chem.* **1998**, 9 (2), 242–249. <https://doi.org/10.1021/bc970153k>.
- (173) Harrison, V. S. R.; Carney, C. E.; MacRenaris, K. W.; Waters, E. A.; Meade, T. J. Multimeric Near IR–MR Contrast Agent for Multimodal In Vivo Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137 (28), 9108–9116. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b04509>.
- (174) Goswami, L. N.; Khan, A. A.; Jalilatgi, S. S.; Hawthorne, M. F. Synthesis and in Vitro Assessment of a Bifunctional Closomer Probe for Fluorine (<sup>19</sup>F) Magnetic Resonance and Optical Bimodal Cellular Imaging. *Chem Commun* **2014**, 50 (43), 5793–5795. <https://doi.org/10.1039/C4CC02126F>.
- (175) Mishra, A.; Pfeuffer, J.; Mishra, R.; Engelmann, J.; Mishra, A. K.; Ugurbil, K.; Logothetis, N. K. A New Class of Gd-Based DO3A-Ethylamine-Derived Targeted Contrast Agents for MR and Optical Imaging. *Bioconjug. Chem.* **2006**, 17 (3), 773–780. <https://doi.org/10.1021/bc050295b>.

- (176) Wang, Y.; Song, R.; Feng, H.; Guo, K.; Meng, Q.; Chi, H.; Zhang, R.; Zhang, Z. Visualization of Fluoride Ions In Vivo Using a Gadolinium(III)-Coumarin Complex-Based Fluorescence/MRI Dual-Modal Probe. *Sensors* **2016**, *16* (12), 2165. <https://doi.org/10.3390/s16122165>.
- (177) Yamane, T.; Hanaoka, K.; Muramatsu, Y.; Tamura, K.; Adachi, Y.; Miyashita, Y.; Hirata, Y.; Nagano, T. Method for Enhancing Cell Penetration of Gd<sup>3+</sup>-Based MRI Contrast Agents by Conjugation with Hydrophobic Fluorescent Dyes. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22* (11), 2227–2236. <https://doi.org/10.1021/bc200127t>.
- (178) Iwaki, S.; Hokamura, K.; Ogawa, M.; Takehara, Y.; Muramatsu, Y.; Yamane, T.; Hirabayashi, K.; Morimoto, Y.; Hagiwara, K.; Nakahara, K.; Mineno, T.; Terai, T.; Komatsu, T.; Ueno, T.; Tamura, K.; Adachi, Y.; Hirata, Y.; Arita, M.; Arai, H.; Umemura, K.; Nagano, T.; Hanaoka, K. A Design Strategy for Small Molecule-Based Targeted MRI Contrast Agents: Their Application for Detection of Atherosclerotic Plaques. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (43), 8611–8618. <https://doi.org/10.1039/C4OB01270D>.
- (179) Liu, L.; Yuan, Y.; Yang, Y.; McMahan, M. T.; Chen, S.; Zhou, X. A Fluorinated Aza-BODIPY Derivative for NIR Fluorescence/PA/19F MR Tri-Modality in Vivo Imaging. *Chem. Commun.* **2019**, *55* (42), 5851–5854. <https://doi.org/10.1039/C9CC01253B>.
- (180) Florès, O.; Pliquet, J.; Abad Galan, L.; Lescure, R.; Denat, F.; Maury, O.; Pallier, A.; Bellaye, P.-S.; Collin, B.; Mème, S.; Bonnet, C. S.; Bodio, E.; Goze, C. Aza-BODIPY Platform: Toward an Efficient Water-Soluble Bimodal Imaging Probe for MRI and Near-Infrared Fluorescence. *Inorg. Chem.* **2020**, *59* (2), 1306–1314. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b03017>.
- (181) Ranyuk, E.; Lebel, R.; Bérubé-Lauzière, Y.; Klarskov, K.; Lecomte, R.; van Lier, J. E.; Guérin, B. <sup>68</sup>Ga/DOTA- and <sup>64</sup>Cu/NOTA-Phthalocyanine Conjugates as Fluorescent/PET Bimodal Imaging Probes. *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24* (9), 1624–1633. <https://doi.org/10.1021/bc400257u>.
- (182) Pandey, S. K.; Gryshuk, A. L.; Sajjad, M.; Zheng, X.; Chen, Y.; Abouzeid, M. M.; Morgan, J.; Charamisinau, I.; Nabi, H. A.; Oseroff, A.; Pandey, R. K. Multimodality Agents for Tumor Imaging (PET, Fluorescence) and Photodynamic Therapy. A Possible “See and Treat” Approach. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (20), 6286–6295. <https://doi.org/10.1021/jm050427m>.
- (183) Zhang, Z.; Liang, K.; Bloch, S.; Berezin, M.; Achilefu, S. Monomolecular Multimodal Fluorescence-Radioisotope Imaging Agents. *Bioconjug. Chem.* **2005**, *16* (5), 1232–1239. <https://doi.org/10.1021/bc050136s>.
- (184) Vasquez, K. O.; Casavant, C.; Peterson, J. D. Quantitative Whole Body Biodistribution of Fluorescent-Labeled Agents by Non-Invasive Tomographic Imaging. *PLoS ONE* **2011**, *6* (6), e20594. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020594>.
- (185) Tekaiia, F.; Yeramian, E. Evolution of Proteomes: Fundamental Signatures and Global Trends in Amino Acid Compositions. *BMC Genomics* **2006**, *7* (1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-307>.
- (186) Agarwal, P.; Bertozzi, C. R. Site-Specific Antibody–Drug Conjugates: The Nexus of Bioorthogonal Chemistry, Protein Engineering, and Drug Development. *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26* (2), 176–192. <https://doi.org/10.1021/bc5004982>.
- (187) Ahn, S. H.; Boros, E. Nuclear and Optical Bimodal Imaging Probes Using Sequential Assembly: A Perspective. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2018**, *33* (8), 308–315. <https://doi.org/10.1089/cbr.2018.2499>.
- (188) Edwards, W. B.; Xu, B.; Akers, W.; Cheney, P. P.; Liang, K.; Rogers, B. E.; Anderson, C. J.; Achilefu, S. Agonist–Antagonist Dilemma in Molecular Imaging: Evaluation of a Monomolecular Multimodal Imaging Agent for the Somatostatin Receptor. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19* (1), 192–200. <https://doi.org/10.1021/bc700291m>.
- (189) Brand, C.; Abdel-Atti, D.; Zhang, Y.; Carlin, S.; Clardy, S. M.; Keliher, E. J.; Weber, W. A.; Lewis, J. S.; Reiner, T. In Vivo Imaging of GLP-1R with a Targeted Bimodal PET/Fluorescence Imaging Agent. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25* (7), 1323–1330. <https://doi.org/10.1021/bc500178d>.
- (190) Sun, Y.; Ma, X.; Cheng, K.; Wu, B.; Duan, J.; Chen, H.; Bu, L.; Zhang, R.; Hu, X.; Deng, Z.; Xing, L.; Hong, X.; Cheng, Z. Strained Cyclooctyne as a Molecular Platform for Construction of Multimodal

- Imaging Probes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54* (20), 5981–5984. <https://doi.org/10.1002/anie.201500941>.
- (191) Lin, Y.-H.; Dayananda, K.; Chen, C.-Y.; Liu, G.-C.; Luo, T.-Y.; Hsu, H.-S.; Wang, Y.-M. In Vivo MR/Optical Imaging for Gastrin Releasing Peptide Receptor of Prostate Cancer Tumor Using Gd-TTDA-NP-BN-Cy5.5. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19* (3), 1085–1096. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.04.040>.
- (192) Cohen, R.; Stammes, M. A.; de Roos, I. H.; Stigter-van Walsum, M.; Visser, G. W.; van Dongen, G. A. Inert Coupling of IRDye800CW to Monoclonal Antibodies for Clinical Optical Imaging of Tumor Targets. *EJNMMI Res.* **2011**, *1* (1), 31. <https://doi.org/10.1186/2191-219X-1-31>.
- (193) Zhang, Y.; Hong, H.; Severin, G. W.; Engle, J. W.; Yang, Y.; Goel, S.; Liu, G.; Nickles, R. J.; Leigh, B. R.; Barnhart, T. E.; Cai, W. ImmunopET and Near-Infrared Fluorescence Imaging of CD105 Expression Using a Monoclonal Antibody Dual-Labeled with <sup>89</sup>Zr and IRDye 800CW. *Am J Transl Res* **2012**, *4* (3), 333–346.
- (194) Xu, H.; Baidoo, K.; Gunn, A. J.; Boswell, C. A.; Milenic, D. E.; Choyke, P. L.; Brechbiel, M. W. Design, Synthesis, and Characterization of a Dual Modality Positron Emission Tomography and Fluorescence Imaging Agent for Monoclonal Antibody Tumor-Targeted Imaging. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (19), 4759–4765. <https://doi.org/10.1021/jm070657w>.
- (195) Sampath, L.; Kwon, S.; Ke, S.; Wang, W.; Schiff, R.; Mawad, M. E.; Sevcik-Muraca, E. M. Dual-Labeled Trastuzumab-Based Imaging Agent for the Detection of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Overexpression in Breast Cancer. *J. Nucl. Med.* **2007**, *48* (9), 1501–1510. <https://doi.org/10.2967/jnumed.107.042234>.
- (196) Rijpkema, M.; Oyen, W. J.; Bos, D.; Franssen, G. M.; Goldenberg, D. M.; Boerman, O. C. SPECT- and Fluorescence Image-Guided Surgery Using a Dual-Labeled Carcinoembryonic Antigen-Targeting Antibody. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **2014**, *55* (9), 1519–1524. <https://doi.org/10.2967/jnumed.114.142141>.
- (197) Li, Z.; Lin, T.-P.; Liu, S.; Huang, C.-W.; Hudnall, T. W.; Gabbai, F. P.; Conti, P. S. Rapid Aqueous [<sup>18</sup>F]-Labeling of a Bodipy Dye for Positron Emission Tomography/Fluorescence Dual Modality Imaging. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (33), 9324. <https://doi.org/10.1039/c1cc13089g>.
- (198) Hendricks, J. A.; Keliher, E. J.; Wan, D.; Hilderbrand, S. A.; Weissleder, R.; Mazitschek, R. Synthesis of [<sup>18</sup>F]BODIPY: Bifunctional Reporter for Hybrid Optical/Positron Emission Tomography Imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (19), 4603–4606. <https://doi.org/10.1002/anie.201107957>.
- (199) Brizet, B.; Goncalves, V.; Bernhard, C.; Harvey, P. D.; Denat, F.; Goze, C. DMAP-BODIPY Alkynes: A Convenient Tool for Labeling Biomolecules for Bimodal PET-Optical Imaging. *Chem. - Eur. J.* **2014**, *20* (40), 12933–12944. <https://doi.org/10.1002/chem.201402379>.
- (200) Liu, S.; Li, D.; Zhang, Z.; Surya Prakash, G. K.; Conti, P. S.; Li, Z. Efficient Synthesis of Fluorescent-PET Probes Based on [<sup>18</sup>F]BODIPY Dye. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (55), 7371. <https://doi.org/10.1039/c4cc01411a>.
- (201) Paulus, A.; Desai, P.; Carney, B.; Carlucci, G.; Reiner, T.; Brand, C.; Weber, W. A. Development of a Clickable Bimodal Fluorescent/PET Probe for in Vivo Imaging. *EJNMMI Res.* **2015**, *5* (1). <https://doi.org/10.1186/s13550-015-0120-4>.
- (202) Carlucci, G.; Carney, B.; Brand, C.; Kossatz, S.; Irwin, C. P.; Carlin, S. D.; Keliher, E. J.; Weber, W.; Reiner, T. Dual-Modality Optical/PET Imaging of PARP1 in Glioblastoma. *Mol. Imaging Biol.* **2015**, *17* (6), 848–855. <https://doi.org/10.1007/s11307-015-0858-0>.
- (203) Kim, H.; Kim, K.; Son, S.-H.; Choi, J. Y.; Lee, K.-H.; Kim, B.-T.; Byun, Y.; Choe, Y. S. <sup>18</sup>F-Labeled BODIPY Dye: A Potential Prosthetic Group for Brain Hybrid PET/Optical Imaging Agents. *ACS Chem. Neurosci.* **2019**, *10* (3), 1445–1451. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.8b00480>.
- (204) Ono, M.; Watanabe, H.; Ikehata, Y.; Ding, N.; Yoshimura, M.; Sano, K.; Saji, H. Radioiodination of BODIPY and Its Application to a Nuclear and Optical Dual Functional Labeling Agent for Proteins and Peptides. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03419-z>.
- (205) Bernhard, C.; Goze, C.; Rousselin, Y.; Denat, F. First Bodipy-DOTA Derivatives as Probes for Bimodal Imaging. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (43), 8267. <https://doi.org/10.1039/c0cc02749a>.

- (206) Bernhard, C.; Moreau, M.; Lhenry, D.; Goze, C.; Boschetti, F.; Rousselin, Y.; Brunotte, F.; Denat, F. DOTAGA-Anhydride: A Valuable Building Block for the Preparation of DOTA-Like Chelating Agents. *Chem. - Eur. J.* **2012**, *18* (25), 7834–7841. <https://doi.org/10.1002/chem.201200132>.
- (207) Lhenry, D.; Larrouy, M.; Bernhard, C.; Goncalves, V.; Raguin, O.; Provent, P.; Moreau, M.; Collin, B.; Oudot, A.; Vrigneaud, J.-M.; Brunotte, F.; Goze, C.; Denat, F. BODIPY: A Highly Versatile Platform for the Design of Bimodal Imaging Probes. *Chem. - Eur. J.* **2015**, *21* (37), 13091–13099. <https://doi.org/10.1002/chem.201501676>.
- (208) Meimetis, L. G.; Boros, E.; Carlson, J. C.; Ran, C.; Caravan, P.; Weissleder, R. Bioorthogonal Fluorophore Linked DFO—Technology Enabling Facile Chelator Quantification and Multimodal Imaging of Antibodies. *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27* (1), 257–263. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00630>.
- (209) Maindron, N.; Ipuy, M.; Bernhard, C.; Lhenry, D.; Moreau, M.; Carme, S.; Oudot, A.; Collin, B.; Vrigneaud, J.-M.; Provent, P.; Brunotte, F.; Denat, F.; Goze, C. Near-Infrared-Emitting BODIPY-TrisDOTA 111In as a Monomolecular Multifunctional Imaging Probe: From Synthesis to In Vivo Investigations. *Chem. - Eur. J.* **2016**, *22* (36), 12670–12674. <https://doi.org/10.1002/chem.201602886>.
- (210) Price, E. W.; Orvig, C. Matching Chelators to Radiometals for Radiopharmaceuticals. *Chem Soc Rev* **2014**, *43* (1), 260–290. <https://doi.org/10.1039/C3CS60304K>.
- (211) Rogers, M. A. T. 2 : 4-Diarylpyrroles. Part I. Synthesis of 2 : 4-Diarylpyrroles and 2 : 2' : 4 : 4'-Tetra-Arylazadipyrromethines. *J. Chem. Soc. Resumed* **1943**, No. 0, 590–596. <https://doi.org/10.1039/JR9430000590>.
- (212) Ximenis, M.; Bustelo, E.; Algarra, A. G.; Vega, M.; Rotger, C.; Basallote, M. G.; Costa, A. Kinetic Analysis and Mechanism of the Hydrolytic Degradation of Squaramides and Squaramic Acids. *J. Org. Chem.* **2017**, *82* (4), 2160–2170. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.6b02963>.
- (213) Brouwer, A. M. Standards for Photoluminescence Quantum Yield Measurements in Solution (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2011**, *83* (12), 2213–2228. <https://doi.org/10.1351/PAC-REP-10-09-31>.
- (214) Zhong, R. Microfluidic Based Human Blood Plasma Separation. MS, West Virginia University Libraries, 2012. <https://doi.org/10.33915/etd.3349>.
- (215) Kelkar, S. S.; Reineke, T. M. Theranostics: Combining Imaging and Therapy. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22* (10), 1879–1903. <https://doi.org/10.1021/bc200151q>.
- (216) Haute Autorité de Santé. Test compagnon associé à une thérapie ciblée. **2014**.
- (217) Ghosh, S. Cisplatin: The First Metal Based Anticancer Drug. *Bioorganic Chem.* **2019**, *88*, 102925. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.102925>.
- (218) Ndagi, U.; Mhlongo, N.; Soliman, M. E. Metal Complexes in Cancer Therapy - an Update from Drug Design Perspective. *Drug Des. Devel. Ther.* **2017**, *11*, 599–616. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S119488>.
- (219) Patrick, G. An Introduction to Medicinal Chemistry, Fifth Edition. **2013**.
- (220) Johnstone, T. C.; Suntharalingam, K.; Lippard, S. J. Third Row Transition Metals for the Treatment of Cancer. *Philos. Trans. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.* **2015**, *373* (2037), 20140185. <https://doi.org/10.1098/rsta.2014.0185>.
- (221) Wu, S.; Wang, X.; Zhu, C.; Song, Y.; Wang, J.; Li, Y.; Guo, Z. Monofunctional Platinum Complexes Containing a 4-Nitrobenzo-2-Oxa-1,3-Diazole Fluorophore: Distribution in Tumour Cells. *Dalton Trans.* **2011**, *40* (40), 10376. <https://doi.org/10.1039/c1dt10555h>.
- (222) Citta, A.; Schuh, E.; Mohr, F.; Folda, A.; Massimino, M. L.; Bindoli, A.; Casini, A.; Rigobello, M. P. Fluorescent Silver(I) and Gold(I)–N-Heterocyclic Carbene Complexes with Cytotoxic Properties: Mechanistic Insights. *Metallomics* **2013**, *5* (8), 1006. <https://doi.org/10.1039/c3mt20260g>.
- (223) Balasingham, R. G.; Williams, C. F.; Mottram, H. J.; Coogan, M. P.; Pope, S. J. A. Gold(I) Complexes Derived from Alkynyloxy-Substituted Anthraquinones: Syntheses, Luminescence, Preliminary Cytotoxicity, and Cell Imaging Studies. *Organometallics* **2012**, *31* (16), 5835–5843. <https://doi.org/10.1021/om300475y>.

- (224) Bertrand, B.; Almeida, A. de; Burgt, E. P. M. van der; Picquet, M.; Citta, A.; Folda, A.; Rigobello, M. P.; Gendre, P. L.; Bodio, E.; Casini, A. New Gold(I) Organometallic Compounds with Biological Activity in Cancer Cells. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2014**, 2014 (27), 4532–4536. <https://doi.org/10.1002/ejic.201402248>.
- (225) Visbal, R.; Fernández-Moreira, V.; Marzo, I.; Laguna, A.; Gimeno, M. C. Cytotoxicity and Biodistribution Studies of Luminescent Au( I ) and Ag( I ) N-Heterocyclic Carbenes. Searching for New Biological Targets. *Dalton Trans.* **2016**, 45 (38), 15026–15033. <https://doi.org/10.1039/C6DT02878K>.
- (226) Tasan, S.; Zava, O.; Bertrand, B.; Bernhard, C.; Goze, C.; Picquet, M.; Le Gendre, P.; Harvey, P.; Denat, F.; Casini, A.; Bodio, E. BODIPY–Phosphane as a Versatile Tool for Easy Access to New Metal-Based Theranostics. *Dalton Trans* **2013**, 42 (17), 6102–6109. <https://doi.org/10.1039/C2DT32055J>.
- (227) Doulain, P.-E.; Decréau, R.; Racœur, C.; Goncalves, V.; Dubrez, L.; Bettaieb, A.; Le Gendre, P.; Denat, F.; Paul, C.; Goze, C.; Bodio, E. Towards the Elaboration of New Gold-Based Optical Theranostics. *Dalton Trans.* **2015**, 44 (11), 4874–4883. <https://doi.org/10.1039/C4DT02977A>.
- (228) Pliquett, J.; Amor, S.; Ponce-Vargas, M.; Laly, M.; Racœur, C.; Rousselin, Y.; Denat, F.; Bettaieb, A.; Fleurat-Lessard, P.; Paul, C.; Goze, C.; Bodio, E. Design of a Multifunctionalizable BODIPY Platform for the Facile Elaboration of a Large Series of Gold(i)-Based Optical Theranostics. *Dalton Trans. Camb. Engl. 2003* **2018**, 47 (32), 11203–11218. <https://doi.org/10.1039/c8dt02364f>.
- (229) Miller, M. A.; Askevold, B.; Yang, K. S.; Kohler, R. H.; Weissleder, R. Platinum Compounds for High-Resolution In Vivo Cancer Imaging. *ChemMedChem* **2014**, 9 (6), 1131–1135. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201300502>.
- (230) Sun, T.; Guan, X.; Zheng, M.; Jing, X.; Xie, Z. Mitochondria-Localized Fluorescent BODIPY-Platinum Conjugate. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, 6 (4), 430–433. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.5b00041>.
- (231) Paitandi, R. P.; Mukhopadhyay, S.; Singh, R. S.; Sharma, V.; Mobin, S. M.; Pandey, D. S. Anticancer Activity of Iridium(III) Complexes Based on a Pyrazole-Appended Quinoline-Based BODIPY. *Inorg. Chem.* **2017**, 56 (20), 12232–12247. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b01693>.
- (232) Zimbron, J. M.; Passador, K.; Gatin-Fraudet, B.; Bachelet, C.-M.; Plažuk, D.; Chamoreau, L.-M.; Botuha, C.; Thorimbert, S.; Salmain, M. Synthesis, Photophysical Properties, and Living Cell Imaging of Theranostic Half-Sandwich Iridium–4,4-Difluoro-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene (BODIPY) Dyads. *Organometallics* **2017**, 36 (18), 3435–3442. <https://doi.org/10.1021/acs.organomet.7b00250>.
- (233) Millett, A. J.; Habtemariam, A.; Romero-Canelón, I.; Clarkson, G. J.; Sadler, P. J. Contrasting Anticancer Activity of Half-Sandwich Iridium(III) Complexes Bearing Functionally Diverse 2-Phenylpyridine Ligands. *Organometallics* **2015**, 34 (11), 2683–2694. <https://doi.org/10.1021/acs.organomet.5b00097>.
- (234) Köpf, H.; Köpf-Maier, P. Titanocen-dichlorid - das erste Metallocen mit cancerostatischer Wirksamkeit. *Angew. Chem.* **1979**, 91 (6), 509–509. <https://doi.org/10.1002/ange.19790910620>.
- (235) Köpf-Maier, P.; Köpf, H. Tumor Inhibition by Titanocene Dichloride: First Clues to the Mechanism of Action. *Naturwissenschaften* **1980**, 67 (8), 415–416. <https://doi.org/10.1007/BF00405494>.
- (236) Cini, M.; Bradshaw, T. D.; Woodward, S. Using Titanium Complexes to Defeat Cancer: The View from the Shoulders of Titans. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, 46 (4), 1040–1051. <https://doi.org/10.1039/C6CS00860G>.
- (237) Florès, O.; Trommenschlager, A.; Amor, S.; Marques, F.; Silva, F.; Gano, L.; Denat, F.; Campello, M. P. C.; Goze, C.; Bodio, E.; Gendre, P. L. In Vitro and in Vivo Trackable Titanocene-Based Complexes Using Optical Imaging or SPECT. *Dalton Trans.* **2017**, 46 (42), 14548–14555. <https://doi.org/10.1039/C7DT01981E>.
- (238) Kitteringham, E.; Wu, D.; Cheung, S.; Twamley, B.; O’Shea, D. F.; Griffith, D. M. Development of a Novel Carboplatin like Cytoplasmic Trackable near Infrared Fluorophore Conjugate via Strain-



- Promoted Azide Alkyne Cycloaddition. *J. Inorg. Biochem.* **2018**, *182*, 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.02.010>.
- (239) Adolle, A.; Sampaio, C.; Chotard, F.; Richard, P.; Denat, F.; Bettaieb, A.; Le Gendre, P.; Laurens, V.; Goze, C.; Paul, C.; Bodio, E. Anticancer Agents: Does a Phosphonium Behave Like a Gold(I) Phosphine Complex? Let a “Smart” Probe Answer! *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (11), 4521–4528. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00480>.
- (240) Tasan, S.; Licon, C.; Doulain, P.-E.; Michelin, C.; Gros, C. P.; Le Gendre, P.; Harvey, P. D.; Paul, C.; Gaiddon, C.; Bodio, E. Gold–Phosphine–Porphyrin as Potential Metal-Based Theranostics. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2015**, *20* (1), 143–154. <https://doi.org/10.1007/s00775-014-1220-8>.
- (241) Wenzel, M.; de Almeida, A.; Bigaeva, E.; Kavanagh, P.; Picquet, M.; Le Gendre, P.; Bodio, E.; Casini, A. New Luminescent Polynuclear Metal Complexes with Anticancer Properties: Toward Structure–Activity Relationships. *Inorg. Chem.* **2016**, *55* (5), 2544–2557. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b02910>.
- (242) Onodera, T.; Momose, I.; Kawada, M. Potential Anticancer Activity of Auranofin. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2019**, *67* (3), 186–191. <https://doi.org/10.1248/cpb.c18-00767>.
- (243) Keliris, A.; Mamedov, I.; Hagberg, G. E.; Logothetis, N. K.; Scheffler, K.; Engelmann, J. A Smart <sup>19</sup>F and <sup>1</sup>H MRI Probe with Self-Immolative Linker as a Versatile Tool for Detection of Enzymes: <sup>19</sup>F AND <sup>1</sup>H MRI PROBE FOR DETECTION OF ENZYMES. *Contrast Media Mol. Imaging* **2012**, *7* (5), 478–483. <https://doi.org/10.1002/cmml.1470>.
- (244) Wang, X.; Nakamoto, T.; Dulińska-Molak, I.; Kawazoe, N.; Chen, G. Regulating the Stemness of Mesenchymal Stem Cells by Tuning Micropattern Features. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4* (1), 37–45. <https://doi.org/10.1039/C5TB02215K>.
- (245) Cao, F.; Lin, S.; Xie, X.; Ray, P.; Patel, M.; Zhang, X.; Drukker, M.; Dylla, S. J.; Connolly, A. J.; Chen, X.; Weissman, I. L.; Gambhir, S. S.; Wu, J. C. In Vivo Visualization of Embryonic Stem Cell Survival, Proliferation, and Migration After Cardiac Delivery. *Circulation* **2006**, *113* (7), 1005–1014. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.588954>.
- (246) Asanuma, D.; Kobayashi, H.; Nagano, T.; Urano, Y. Fluorescence Imaging of Tumors with “Smart” PH-Activatable Targeted Probes. In *Bioluminescence*; Rich, P. B., Douillet, C., Eds.; Walker, J. M., Series Ed.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2009; Vol. 574, pp 47–62. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-321-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-321-3_5).
- (247) Weissleder, R.; Tung, C.-H.; Mahmood, U.; Bogdanov, A. In Vivo Imaging of Tumors with Protease-Activated near-Infrared Fluorescent Probes. *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17* (4), 375–378. <https://doi.org/10.1038/7933>.
- (248) Hama, Y.; Urano, Y.; Koyama, Y.; Kamiya, M.; Bernardo, M.; Paik, R. S.; Shin, I. S.; Paik, C. H.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. A Target Cell-Specific Activatable Fluorescence Probe for In Vivo Molecular Imaging of Cancer Based on a Self-Quenched Avidin-Rhodamine Conjugate. *Cancer Res.* **2007**, *67* (6), 2791–2799. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3315>.
- (249) Kamiya, M.; Kobayashi, H.; Hama, Y.; Koyama, Y.; Bernardo, M.; Nagano, T.; Choyke, P. L.; Urano, Y. An Enzymatically Activated Fluorescence Probe for Targeted Tumor Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (13), 3918–3929. <https://doi.org/10.1021/ja067710a>.
- (250) Huang, X.; Lee, S.; Chen, X. Design of “Smart” Probes for Optical Imaging of Apoptosis. **2011**, *1* (1), 3–17.
- (251) Wei, H.; Wu, G.; Tian, X.; Liu, Z. Smart Fluorescent Probes for *in Situ* Imaging of Enzyme Activity: Design Strategies and Applications. *Future Med. Chem.* **2018**, *10* (23), 2729–2744. <https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0193>.
- (252) Vedamalai, M.; Wu, S.-P. A BODIPY-Based Highly Selective Fluorescent Chemosensor for Hg<sup>2+</sup> Ions and Its Application in Living Cell Imaging. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012* (6), 1158–1163. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201101623>.
- (253) Liu, S.; Shi, Z.; Xu, W.; Yang, H.; Xi, N.; Liu, X.; Zhao, Q.; Huang, W. A Class of Wavelength-Tunable near-Infrared Aza-BODIPY Dyes and Their Application for Sensing Mercury Ion. *Dyes Pigments* **2014**, *103*, 145–153. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2013.12.004>.

- (254) Baruah, M.; Qin, W.; Vallée, R. A. L.; Beljonne, D.; Rohand, T.; Dehaen, W.; Boens, N. A Highly Potassium-Selective Ratiometric Fluorescent Indicator Based on BODIPY Azacrown Ether Excitable with Visible Light. *Org. Lett.* **2005**, *7* (20), 4377–4380. <https://doi.org/10.1021/ol051603o>.
- (255) Koutaka, H.; Kosuge, J.; Fukasaku, N.; Hirano, T.; Kikuchi, K.; Urano, Y.; Kojima, H.; Nagano, T. A Novel Fluorescent Probe for Zinc Ion Based on Boron Dipyrromethene (BODIPY) Chromophore. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2004**, *52* (6), 700–703. <https://doi.org/10.1248/cpb.52.700>.
- (256) Mei, Y.; Bentley, P. A.; Wang, W. A Selective and Sensitive Chemosensor for Cu<sup>2+</sup> Based on 8-Hydroxyquinoline. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47* (14), 2447–2449. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2006.01.091>.
- (257) Zeng, L.; Miller, E. W.; Pralle, A.; Isacoff, E. Y.; Chang, C. J. A Selective Turn-On Fluorescent Sensor for Imaging Copper in Living Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (1), 10–11. <https://doi.org/10.1021/ja055064u>.
- (258) Wang, J.; Qian, X. A Series of Polyamide Receptor Based PET Fluorescent Sensor Molecules: Positively Cooperative Hg<sup>2+</sup> Ion Binding with High Sensitivity. *Org. Lett.* **2006**, *8* (17), 3721–3724. <https://doi.org/10.1021/ol061297u>.
- (259) Kim, H. J.; Kim, J. S. BODIPY Appended Cone-Calix[4]Arene: Selective Fluorescence Changes upon Ca<sup>2+</sup> Binding. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47* (39), 7051–7055. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2006.07.088>.
- (260) Wu, Y.; Peng, X.; Guo, B.; Fan, J.; Zhang, Z.; Wang, J.; Cui, A.; Gao, Y. Boron Dipyrromethene Fluorophore Based Fluorescence Sensor for the Selective Imaging of Zn(II) in Living Cells. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3* (8), 1387–1392. <https://doi.org/10.1039/B501795E>.
- (261) Martin, V. V.; Rothe, A.; Gee, K. R. Fluorescent Metal Ion Indicators Based on Benzoannelated Crown Systems: A Green Fluorescent Indicator for Intracellular Sodium Ions. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15* (7), 1851–1855. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.02.017>.
- (262) Méallet-Renault, R.; Héroult, A.; Vachon, J.-J.; Pansu, R. B.; Amigoni-Gerbier, S.; Larpent, C. Fluorescent Nanoparticles as Selective Cu(II) Sensors. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2006**, *5* (3), 300–310. <https://doi.org/10.1039/B513215K>.
- (263) Qi, X.; Jun, E. J.; Xu, L.; Kim, S.-J.; Joong Hong, J. S.; Yoon, Y. J.; Yoon, J. New BODIPY Derivatives as OFF–ON Fluorescent Chemosensor and Fluorescent Chemodosimeter for Cu<sup>2+</sup>: Cooperative Selectivity Enhancement toward Cu<sup>2+</sup>. *J. Org. Chem.* **2006**, *71* (7), 2881–2884. <https://doi.org/10.1021/jo052542a>.
- (264) Moon, S. Y.; Cha, N. R.; Kim, Y. H.; Chang, S.-K. New Hg<sup>2+</sup>-Selective Chromo- and Fluoroionophore Based upon 8-Hydroxyquinoline. *J. Org. Chem.* **2004**, *69* (1), 181–183. <https://doi.org/10.1021/jo034713m>.
- (265) Cha, N. R.; Moon, S. Y.; Chang, S.-K. New ON–OFF Type Ca<sup>2+</sup>-Selective Fluoroionophore Having Boron–Dipyrromethene Fluorophores. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* (45), 8265–8268. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2003.09.060>.
- (266) Bricks, J. L.; Kovalchuk, A.; Trieflinger, C.; Nofz, M.; Büschel, M.; Tolmachev, A. I.; Daub, J.; Rurack, K. On the Development of Sensor Molecules That Display FeIII-Amplified Fluorescence. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (39), 13522–13529. <https://doi.org/10.1021/ja050652t>.
- (267) Basarić, N.; Baruah, M.; Qin, W.; Metten, B.; Smet, M.; Dehaen, W.; Boens, N. Synthesis and Spectroscopic Characterisation of BODIPY® Based Fluorescent off–on Indicators with Low Affinity for Calcium. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3* (15), 2755–2761. <https://doi.org/10.1039/B505969K>.
- (268) Li, Q.; Guo, Y.; Chen, Y. BODIPY-Based Fluorescent Sensors with Tunable Binding Ability to Fluoride and Hydrogen Sulfate Anions. *IJC- Vol57A02 Febr. 2018* **2018**.
- (269) Gareis, T.; Huber, C.; Wolfbeis, O. S.; Daub, J. Phenol/Phenolate-Dependent on/off Switching of the Luminescence Of 4,4-Difluoro-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacenes. *Chem. Commun.* **1997**, No. 18, 1717–1718. <https://doi.org/10.1039/A703536E>.
- (270) Bozdemir, O. A.; Guliyev, R.; Buyukcakir, O.; Selcuk, S.; Kolemen, S.; Gulseren, G.; Nalbantoglu, T.; Boyaci, H.; Akkaya, E. U. Selective Manipulation of ICT and PET Processes in Styryl-Bodipy

- Derivatives: Applications in Molecular Logic and Fluorescence Sensing of Metal Ions. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (23), 8029–8036. <https://doi.org/10.1021/ja1008163>.
- (271) Trieflinger, C.; Rurack, K.; Daub, J. “Turn ON/OFF Your LOV Light”: Borondipyromethene–Flavin Dyads as Biomimetic Switches Derived from the LOV Domain. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (15), 2288–2291. <https://doi.org/10.1002/anie.200462377>.
- (272) Golovkova, T. A.; Kozlov, D. V.; Neckers, D. C. Synthesis and Properties of Novel Fluorescent Switches. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (14), 5545–5549. <https://doi.org/10.1021/jo050540k>.
- (273) Baruah, M.; Qin, W.; Basarić, N.; De Borggraeve, W. M.; Boens, N. BODIPY-Based Hydroxyaryl Derivatives as Fluorescent PH Probes. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (10), 4152–4157. <https://doi.org/10.1021/jo0503714>.
- (274) Baki, C. N.; Akkaya, E. U. Boradiazaindacene-Appended Calix[4]Arene: Fluorescence Sensing of PH Near Neutrality. *J. Org. Chem.* **2001**, *66* (4), 1512–1513. <https://doi.org/10.1021/jo005706q>.
- (275) Werner, T.; Huber, C.; Heinl, S.; Kollmannsberger, M.; Daub, J.; Wolfbeis, O. S. Novel Optical PH-Sensor Based on a Boradiazaindacene Derivative. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1997**, *359* (2), 150–154. <https://doi.org/10.1007/s002160050552>.
- (276) Zuo, J.; Pan, H.; Zhang, Y.; Chen, Y.; Wang, H.; Ren, X.-K.; Chen, Z. Near-Infrared Fluorescent Amphiphilic Aza-BODIPY Dye: Synthesis, Solvatochromic Properties, and Selective Detection of Cu<sup>2+</sup>. *Dyes Pigments* **2020**, *183*, 108714. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108714>.
- (277) Lee, M. H.; Kim, J. Y.; Han, J. H.; Bhuniya, S.; Sessler, J. L.; Kang, C.; Kim, J. S. Direct Fluorescence Monitoring of the Delivery and Cellular Uptake of a Cancer-Targeted RGD Peptide-Appended Naphthalimide Theragnostic Prodrug. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (30), 12668–12674. <https://doi.org/10.1021/ja303998y>.
- (278) Martino, E.; Della Volpe, S.; Terribile, E.; Benetti, E.; Sakaj, M.; Centamore, A.; Sala, A.; Collina, S. The Long Story of Camptothecin: From Traditional Medicine to Drugs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27* (4), 701–707. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.12.085>.
- (279) Takimoto, C. H.; Wright, J.; Arbuck, S. G. Clinical Applications of the Camptothecins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.* **1998**, *1400* (1–3), 107–119. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(98\)00130-4](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(98)00130-4).
- (280) Li, F.; Jiang, T.; Li, Q.; Ling, X. Camptothecin (CPT) and Its Derivatives Are Known to Target Topoisomerase I (Top1) as Their Mechanism of Action: Did We Miss Something in CPT Analogue Molecular Targets for Treating Human Disease Such as Cancer? **2017**, *7* (12), 2350–2394.
- (281) Zhang, Y.; Yin, Q.; Yen, J.; Li, J.; Ying, H.; Wang, H.; Hua, Y.; Chaney, E. J.; Boppart, S. A.; Cheng, J. Non-Invasive, Real-Time Reporting Drug Release in Vitro and in Vivo. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (32), 6948–6951. <https://doi.org/10.1039/C4CC09920F>.
- (282) Wu, X.; Sun, X.; Guo, Z.; Tang, J.; Shen, Y.; James, T. D.; Tian, H.; Zhu, W. *In Vivo* and *in Situ* Tracking Cancer Chemotherapy by Highly Photostable NIR Fluorescent Theranostic Prodrug. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (9), 3579–3588. <https://doi.org/10.1021/ja412380j>.
- (283) Liu, Y.; Pei, Q.; Chen, L.; Li, Z.; Xie, Z. Reduction-Responsive Fluorescence off–on BODIPY–Camptothecin Conjugates for Self-Reporting Drug Release. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4* (13), 2332–2337. <https://doi.org/10.1039/C6TB00009F>.
- (284) Kelland, L. The Resurgence of Platinum-Based Cancer Chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7* (8), 573–584. <https://doi.org/10.1038/nrc2167>.
- (285) Wang, D.; Lippard, S. J. Cellular Processing of Platinum Anticancer Drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4* (4), 307–320. <https://doi.org/10.1038/nrd1691>.
- (286) Ong, J. X.; Lim, C. S. Q.; Le, H. V.; Ang, W. H. A Ratiometric Fluorescent Probe for Cisplatin: Investigating the Intracellular Reduction of Platinum(IV) Prodrug Complexes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58* (1), 164–167. <https://doi.org/10.1002/anie.201810361>.
- (287) Yuan, Y.; Chen, Y.; Tang, B. Z.; Liu, B. A Targeted Theranostic Platinum(IV) Prodrug Containing a Luminogen with Aggregation-Induced Emission (AIE) Characteristics for *in Situ* Monitoring of Drug Activation. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (29), 3868. <https://doi.org/10.1039/c3cc49516g>.
- (288) Yuan, Y.; Kwok, R. T. K.; Tang, B. Z.; Liu, B. Targeted Theranostic Platinum(IV) Prodrug with a Built-In Aggregation-Induced Emission Light-Up Apoptosis Sensor for Noninvasive Early

- Evaluation of Its Therapeutic Responses in Situ. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (6), 2546–2554. <https://doi.org/10.1021/ja411811w>.
- (289) Yuan, Y.; Kwok, R. T. K.; Zhang, R.; Tang, B. Z.; Liu, B. Targeted Theranostic Prodrugs Based on an Aggregation-Induced Emission (AIE) Luminogen for Real-Time Dual-Drug Tracking. *Chem Commun* **2014**, *50* (78), 11465–11468. <https://doi.org/10.1039/C4CC05255B>.
- (290) Ye, M.; Wang, X.; Tang, J.; Guo, Z.; Shen, Y.; Tian, H.; Zhu, W.-H. Dual-Channel NIR Activatable Theranostic Prodrug for in Vivo Spatiotemporal Tracking Thiol-Triggered Chemotherapy. *Chem. Sci.* **2016**, *7* (8), 4958–4965. <https://doi.org/10.1039/C6SC00970K>.
- (291) Ahn, H. K.; Jung, M.; Sym, S. J.; Shin, D. B.; Kang, S. M.; Kyung, S. Y.; Park, J.-W.; Jeong, S. H.; Cho, E. K. A Phase II Trial of Cremophor EL-Free Paclitaxel (Genexol-PM) and Gemcitabine in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2014**, *74* (2), 277–282. <https://doi.org/10.1007/s00280-014-2498-5>.
- (292) Yeh, C.-C.; Hou, M.-F.; Wu, S.-H.; Tsai, S.-M.; Lin, S.-K.; Hou, L. A.; Ma, H.; Tsai, L.-Y. A Study of Glutathione Status in the Blood and Tissues of Patients with Breast Cancer. *Cell Biochem. Funct.* **2006**, *24* (6), 555–559. <https://doi.org/10.1002/cbf.1275>.
- (293) Wong, D. Y.-K.; Hsiao, Y.-L.; Poon, C.-K.; Kwan, P.-C.; Chao, S.-Y.; Chou, S.-T.; Yang, C.-S. Glutathione Concentration in Oral Cancer Tissues. *Cancer Lett.* **1994**, *81* (2), 111–116. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(94\)90191-0](https://doi.org/10.1016/0304-3835(94)90191-0).
- (294) Yan, C.; Guo, Z.; Liu, Y.; Shi, P.; Tian, H.; Zhu, W.-H. A Sequence-Activated AND Logic Dual-Channel Fluorescent Probe for Tracking Programmable Drug Release. *Chem. Sci.* **2018**, *9* (29), 6176–6182. <https://doi.org/10.1039/C8SC02079E>.
- (295) Jiao, L.; Wu, Y.; Wang, S.; Hu, X.; Zhang, P.; Yu, C.; Cong, K.; Meng, Q.; Hao, E.; Vicente, M. G. H. Accessing Near-Infrared-Absorbing BF<sub>2</sub>-Azadipyromethenes via a Push–Pull Effect. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (4), 1830–1835. <https://doi.org/10.1021/jo402160b>.
- (296) Bertrand, B.; Williams, M. R. M.; Bochmann, M. Gold(III) Complexes for Antitumor Applications: An Overview. *Chem. – Eur. J.* **2018**, *24* (46), 11840–11851. <https://doi.org/10.1002/chem.201800981>.
- (297) Yeo, C. I.; Ooi, K. K.; Tiekink, E. R. T. Gold-Based Medicine: A Paradigm Shift in Anti-Cancer Therapy? *Mol. Basel Switz.* **2018**, *23* (6). <https://doi.org/10.3390/molecules23061410>.
- (298) Frezza, M.; Hindo, S.; Chen, D.; Davenport, A.; Schmitt, S.; Tomco, D.; Dou, Q. P. Novel Metals and Metal Complexes as Platforms for Cancer Therapy. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16* (16), 1813–1825. <https://doi.org/10.2174/138161210791209009>.
- (299) Fan, D.; Yang, C.-T.; Ranford, J. D.; Vittal, J. J.; Lee, P. F. Synthesis, Characterization, and Biological Activities of 2-Phenylpyridine Gold(III) Complexes with Thiolate Ligands. *Dalton Trans* **2003**, *6*. <https://doi.org/10.1039/B307610E>.
- (300) Shaw, A. P.; Tilset, M.; Heyn, R. H.; Jakobsen, S. Microwave Methods for the Synthesis of Gold(III) Complexes. *J. Coord. Chem.* **2011**, *64* (1), 38–47. <https://doi.org/10.1080/00958972.2010.521818>.
- (301) Li, B.; Darcel, C.; Roisnel, T.; Dixneuf, P. H. Cycloruthenation of Aryl Imines and N-Heteroaryl Benzenes via C–H Bond Activation with Ru(II) and Acetate Partners. *J. Organomet. Chem.* **2015**, *793*, 200–209. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2015.02.050>.
- (302) Maas, G.; Schäffler, L.; Buck, S. Two New Ruthenium(II) Complexes with Cyclometalated 2-Phenylpyridine Ligands. *Z. Für Naturforschung B* **2008**, *63* (8), 977–984. <https://doi.org/10.1515/znb-2008-0810>.
- (303) Kobayashi, M.; Masaoka, S.; Sakai, K. Synthesis, Crystal Structure, Solution and Spectroscopic Properties, and Hydrogen-Evolving Activity of [K(18-Crown-6)][Pt(II)(2-Phenylpyridinato)Cl<sub>2</sub>]. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8* (2), 196–203. <https://doi.org/10.1039/B814939A>.
- (304) Okada, T.; El-Mehasseb, I. M.; Kodaka, M.; Tomohiro, T.; Okamoto, K.; Okuno, H. Mononuclear Platinum(II) Complex with 2-Phenylpyridine Ligands Showing High Cytotoxicity against Mouse Sarcoma 180 Cells Acquiring High Cisplatin Resistance. *J. Med. Chem.* **2001**, *44* (26), 4661–4667. <https://doi.org/10.1021/jm010203d>.

- (305) Mohr, F.; Binfield, S. A.; Fetting, J. C.; Vedernikov, A. N. A Practical, Fast, and High-Yielding Aziridination Procedure Using Simple Cu(II) Complexes Containing N-Donor Pyridine-Based Ligands. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (12), 4833–4839. <https://doi.org/10.1021/jo050485f>.
- (306) Majumdar, P.; Yuan, X.; Li, S.; Le Guennic, B.; Ma, J.; Zhang, C.; Jacquemin, D.; Zhao, J. Cyclometalated Ir(III) Complexes with Styryl-BODIPY Ligands Showing near IR Absorption/Emission: Preparation, Study of Photophysical Properties and Application as Photodynamic/Luminescence Imaging Materials. *J Mater Chem B* **2014**, *2* (19), 2838–2854. <https://doi.org/10.1039/C4TB00284A>.
- (307) Constable; Housecroft. The Early Years of 2,2'-Bipyridine—A Ligand in Its Own Lifetime. *Molecules* **2019**, *24* (21), 3951. <https://doi.org/10.3390/molecules24213951>.
- (308) Chibani, S.; Laurent, A. D.; Le Guennic, B.; Jacquemin, D. Improving the Accuracy of Excited-State Simulations of BODIPY and Aza-BODIPY Dyes with a Joint SOS-CIS(D) and TD-DFT Approach. *J. Chem. Theory Comput.* **2014**, *10* (10), 4574–4582. <https://doi.org/10.1021/ct500655k>.
- (309) Ponce-Vargas, M.; Štefane, B.; Zaborova, E.; Fages, F.; D'Aléo, A.; Jacquemin, D.; Le Guennic, B. Searching for New Borondifluoride  $\beta$ -Diketonate Complexes with Enhanced Absorption/Emission Properties Using Ab Initio Tools. *Dyes Pigments* **2018**, *155*, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.03.022>.
- (310) Ishiyama, T.; Murata, M.; Miyaura, N. Palladium(0)-Catalyzed Cross-Coupling Reaction of Alkoxydiboron with Haloarenes: A Direct Procedure for Arylboronic Esters. *J. Org. Chem.* **1995**, *60* (23), 7508–7510. <https://doi.org/10.1021/jo00128a024>.
- (311) Khan Tamanna K.; Sheokand Preeti; Agarwal Neeraj. Synthesis and Studies of Aza-BODIPY-Based  $\Pi$ -Conjugates for Organic Electronic Applications. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014* (7), 1416–1422. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201301300>.
- (312) Berhe, S. A.; Rodriguez, M. T.; Park, E.; Nesterov, V. N.; Pan, H.; Youngblood, W. J. Optoelectronic Tuning of Organoborylazadipyromethenes via Effective Electronegativity at the Metalloid Center. *Inorg. Chem.* **2014**, *53* (5), 2346–2348. <https://doi.org/10.1021/ic402596u>.
- (313) Panchavarnam, S.; Thorat, K. G.; Ravikanth, M. Synthesis of BR2 Complexes of  $\alpha$ -Pyrrolyl Dipyrins. *Tetrahedron* **2019**, *75* (25), 3371–3381. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2019.04.002>.
- (314) Nguyen, A. L.; Fronczek, F. R.; Smith, K. M.; Vicente, M. G. H. Synthesis of 4,4'-Functionalized BODIPYs from Dipyrins. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56* (46), 6348–6351. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2015.09.119>.
- (315) Koch, A.; Kumar, S.; Ravikanth, M. Synthesis and Properties of B(Ph)(OR) Complexes of Azadipyrrin. *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, *2018* (31), 4277–4283. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201800696>.
- (316) Busche, C.; Comba, P.; Mayboroda, A.; Wadepohl, H. Novel Rull Complexes with Bispidine-Based Bridging Ligands: Luminescence Sensing and Photocatalytic Properties. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2010**, *2010* (8), 1295–1302. <https://doi.org/10.1002/ejic.200901058>.
- (317) Narula, C. K.; Noeth, H. Contribution to the Chemistry of Boron. 150. Competition between Adduct and Cation Formation in Reactions between Diorganylborane Derivatives and Pyridine or Lutidines. *Inorg. Chem.* **1985**, *24* (16), 2532–2539. <https://doi.org/10.1021/ic00210a014>.
- (318) Haberecht, M. C.; Bolte, M.; Lerner, H.-W.; Wagner, M. An Approach Towards Functional Dendrimers Based on the Hydroboration Reaction and Spontaneous Boron-Nitrogen Bond Formation. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, *2005* (21), 4309–4316. <https://doi.org/10.1002/ejic.200500415>.
- (319) Ivanov, M. A.; Puzyk, M. V. Preparation and Optical Properties of Au(III) Phenylpyridinate Complexes. *Russ. J. Gen. Chem.* **2001**, *71* (10), 1660–1661. <https://doi.org/10.1023/A:1013988011701>.
- (320) Tamayo, A. B.; Alleyne, B. D.; Djurovich, P. I.; Lamansky, S.; Tsyba, I.; Ho, N. N.; Bau, R.; Thompson, M. E. Synthesis and Characterization of Facial and Meridional Tris-Cyclometalated Iridium(III) Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (24), 7377–7387. <https://doi.org/10.1021/ja034537z>.

- (321) Palma, A.; Gallagher, J. F.; Müller-Bunz, H.; Wolowska, J.; McInnes, E. J. L.; O'Shea, D. F. Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II) Complexes of Tetraphenylazadipyrromethene. *Dalton Trans* **2009**, No. 2, 273–279. <https://doi.org/10.1039/B811764K>.
- (322) Gresser, R.; Hoyer, A.; Hummert, M.; Hartmann, H.; Leo, K.; Riede, M. Homoleptic Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II) and Hg(II) Complexes of Bis-(Phenyl)-Diisoindol-Aza-Methene. *Dalton Trans.* **2011**, 40 (14), 3476. <https://doi.org/10.1039/c0dt01655a>.
- (323) Bessette, A.; Ferreira, J. G.; Giguère, M.; Bélanger, F.; Désilets, D.; Hanan, G. S. Azadipyrromethene Dye Derivatives in Coordination Chemistry: The Structure–Property Relationship in Homoleptic Metal(II) Complexes. *Inorg. Chem.* **2012**, 51 (22), 12132–12141. <https://doi.org/10.1021/ic300872m>.
- (324) Akhüseyin, E.; Türkmen, O.; Küçüköz, B.; Yılmaz, H.; Karatay, A.; Sevinç, G.; Xu, K.; Hayvali, M.; Yaglioglu, H. G. Two Photon Absorption Properties of Four Coordinated Transition Metal Complexes of Tetraarylazadipyrromethene Compounds. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, 18 (6), 4451–4459. <https://doi.org/10.1039/C5CP06410D>.
- (325) Ramu, V.; Ali, F.; Taye, N.; Garai, B.; Alam, A.; Chattopadhyay, S.; Das, A. New Imaging Reagents for Lipid Dense Regions in Live Cells and the Nucleus in Fixed MCF-7 Cells. *J. Mater. Chem. B* **2015**, 3 (36), 7177–7185. <https://doi.org/10.1039/C5TB01309G>.
- (326) Fulmer, G. R.; Miller, A. J. M.; Sherden, N. H.; Gottlieb, H. E.; Nudelman, A.; Stoltz, B. M.; Bercau, J. E.; Goldberg, K. I. NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist. *Organometallics* **2010**, 29 (9), 2176–2179. <https://doi.org/10.1021/om100106e>.
- (327) Donovan, S. F.; Pescatore, M. C. Method for Measuring the Logarithm of the Octanol–Water Partition Coefficient by Using Short Octadecyl–Poly(Vinyl Alcohol) High-Performance Liquid Chromatography Columns. *J. Chromatogr. A* **2002**, 952 (1–2), 47–61. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00064-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00064-X).
- (328) Schmink, J. R.; Holcomb, J. L.; Leadbeater, N. E. Testing the Validity of Microwave-Interfaced, in Situ Raman Spectroscopy as a Tool for Kinetic Studies. *Org. Lett.* **2009**, 11 (2), 365–368. <https://doi.org/10.1021/ol802594s>.
- (329) Uson, R.; Laguna, A.; Laguna, M.; Briggs, D. A.; Murray, H. H.; Fackler, J. P. (Tetrahydrothiophene)Gold(I) or Gold(III) Complexes. In *Inorganic Syntheses*; Kaesz, H. D., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2007; pp 85–91. <https://doi.org/10.1002/9780470132579.ch17>.









**Titre :** Développement d'azaBODIPYs fonctionnalisables pour la conception de sondes d'imagerie bimodale et d'agents théranostiques

**Mots clés :** Imagerie médicale, imagerie moléculaire, fluorescence proche infrarouge, fluorophore, azaBODIPY, sonde bimodale, TEP/TEMP, théranostique

**Résumé :** L'utilisation *in vivo* de l'imagerie optique est encore aujourd'hui principalement limitée par le manque de sondes capables d'émettre dans le proche infrarouge, où les tissus biologiques sont plus transparents à la lumière. Les travaux présentés dans ce manuscrit abordent l'optimisation et la valorisation d'une plateforme fluorescente hydrosoluble dont les propriétés optiques peuvent permettre une utilisation *in vivo*. Deux applications distinctes ont été envisagées pour cette plateforme WazaBY (**Water-soluble azaBODIPY**) : une utilisation comme sonde bimodale TEP (ou TEMP) et optique, et une utilisation en tant qu'agent théranostique. Lors du premier projet issu de ces travaux de thèse, nous avons pu développer une sonde bimodale TEMP/optique radiométallée par l'indium-111 et vectorisée par un anticorps (trastuzumab). Sur modèles murins porteurs de tumeurs xénogreffées, il a été possible de réaliser une imagerie bimodale optique/TEMP, témoignant d'une très nette

accumulation au sein de la tumeur dès 24 heures après injection. La sonde a également été validée pour la réalisation de chirurgie assistée par fluorescence. Dans le cadre du second projet de cette thèse, une première génération d'agents théranostiques, porteurs de complexes d'or pour la thérapie, ont été synthétisées. L'objectif de ce projet a été de développer une nouvelle entité thérapeutique traçable *in vitro* et *in vivo* par imagerie optique. Les résultats préliminaires *in vitro* ont indiqué une activité antiproliférative des théranostiques sur lignées cellulaires cancéreuses (4T1, MDA-MB-231, CT26 et SW480) voisine de celle de l'auranofine. Dans une seconde partie, nous nous sommes focalisés sur le développement de sondes théranostiques dites « intelligentes », pour lesquelles une modification des propriétés photophysiques est attendu lors du relargage éventuel du centre métallique. Deux molécules ont ainsi pu être synthétisées, chacune présentant un comportement de type *on/off*.

**Title:** Development of fonctionnalizable azaBODIPYs for the conception of theranostic agents and bimodal probes for imaging uses

**Keywords:** Medical imaging, molecular imaging, near infrared fluorescence, fluorophore, azaBODIPY, bimodality probe, PET/SPECT, theranostics

**Abstract:** The *in vivo* use of optical imaging is still limited by the lack of near-infrared emitting probes. This thesis work focuses on the optimization and valorization of a water-soluble fluorescent platform whose optical properties enable an *in vivo* use. Two distinct applications were investigated for this WazaBY (**Water-soluble azaBODIPY**) platform: use as a PET (or SPECT) / optical bimodal probe, and as a theranostic agent. Concerning the first project, we were able to develop a targetted SPECT/optical bimodal probe, which was radiometallated with indium-111. Using xenografted murine models, we were able to show a clear accumulation of the probe in the tumor 24 hours after injection. Moreover, the probe was validated as a contrast agent for fluorescence guided surgery experiment.

The second project of this thesis began by the synthesis of a first generation of gold-based theranostic agents. The goal was to develop a new therapeutic complex, which can be tracked *in vitro* and *in vivo* thanks to optical imaging. *In vitro* preliminary results showed that the theranostics displayed a cytotoxicity comparable to auranofin on the tested cell lines (4T1, MDA-MB-231, CT26 and SW480). A second part of this project focused on the development of « smart » probes for a theranostic use. Those probes are designed to undergo photophysical properties changes, when their metallic centre, responsible for the therapeutic role, is released. Two molecules were synthesized, both displaying an *on/off* behavior.