



HAL
open science

Nouveaux chélates dérivés du cyclam pour des applications en diagnostic et/ou thérapie des cancers

Jonathan Mendy

► **To cite this version:**

Jonathan Mendy. Nouveaux chélates dérivés du cyclam pour des applications en diagnostic et/ou thérapie des cancers. Autre. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2020. Français. NNT : 2020BRES0037 . tel-04313200

HAL Id: tel-04313200

<https://theses.hal.science/tel-04313200>

Submitted on 29 Nov 2023

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

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

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE
DE BRETAGNE OCCIDENTALE

ECOLE DOCTORALE N° 596
Matière Molécules et Matériaux
Spécialité : Chimie Moléculaire et Macromoléculaire

Par

Jonathan MENDY

**Nouveaux chélates dérivés du cyclam pour des applications en diagnostic
et/ou thérapie des cancers**

Thèse présentée et soutenue à Brest, le 21 Juillet 2020

Unité de recherche : UMR CNRS 6521

Rapporteurs avant soutenance :

Anne-Sophie CHAUVIN
Eric BENOIST

Maître d'Enseignement et de Recherche, Ecole Polytechnique de Lausanne
Professeur, Université de Toulouse

Composition du Jury :

Président : Guy ROYAL
Examineurs : Anne-Sophie CHAUVIN
Eric BENOIST
Raphaël TRIPIER

Professeur, Université de Grenoble Alpes
Maître d'Enseignement et de Recherche, Ecole Polytechnique de Lausanne
Professeur, Université de Toulouse
Professeur, Université de Bretagne Occidentale

Dir. de Thèse : Véronique PATINEC
Co. Dir. These : Maryline BEYLER

Maître de Conférences, Université de Bretagne Occidentale
Maître de Conférences, Université de Bretagne Occidentale

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier sincèrement les membres du jury, le Dr Anne-Sophie Chauvin, Maître d'Enseignement et de Recherche à l'École Polytechnique de Lausanne et le Pr Eric Benoist, de l'Institut de Chimie de Toulouse d'avoir accepté de juger ce manuscrit. J'adresse également mes remerciements au Pr Guy Royal, de l'Université Grenoble-Alpes et au Pr Raphaël Tripier, de l'Université de Bretagne Occidentale d'avoir accepté d'examiner ce travail de thèse.

Je tiens également à remercier particulièrement le Dr Véronique Patinec et le Dr Maryline Beyler, mes directrices de thèse. Je suis extrêmement reconnaissant pour votre infinie patience et votre soutien durant ces trois ans. La synthèse de certaines molécules étaient compliquées et vous m'avez secouré quand il le fallait pour que je garde ma motivation. Cela a abouti au développement de belles molécules même si certaines ne « brillent » pas par leur présence. J'ai énormément grandi à vos côtés et pour cela je vous suis énormément reconnaissant.

Je tiens à remercier le Pr. Raphaël Tripier, qui a également su me mobiliser. Tes conseils ont été très importants pour moi, même lorsque tu croulais sous la paperasse administrative, tu trouvais toujours du temps pour répondre à mes questions.

Cette thèse n'aurait pas eu de tels résultats sans les collaborateurs liés au projet ANR SaDAM. Je tiens donc à remercier le Dr Olivier Maury de l'ENS Lyon pour les études photophysiques réalisées mais aussi pour m'avoir accueilli dans son laboratoire pour me former aux études spectroscopiques. Je tiens également à remercier le Dr Cyrille Monnereau et le Dr Margaux Galland qui m'ont formé au fluorimètre et enfin au Dr. Laura Abad Galan pour les études photophysiques réalisées dans le Chapitre 4. Enfin, je voudrais remercier le Pr. Alain Faivre-Chauvet, Anne-Sophie Navarro et Patricia Le Saec du CRCINA de Nantes, pour les études de radiomarquage au $^{64}\text{Cu}^{2+}$.

Ensuite je voudrais remercier l'ensemble de l'équipe MAC, le Dr Helène Bernard et Dr Nathalie le Bris pour leur bonne humeur. Merci à Thibaut, pour ses remarques pertinentes qui m'ont permis de me sortir de situation délicate en synthèse et à Nadège Coca-Colainomane de l'équipe. Merci aux actuels thésards, Gwladys, on se souviendra de ton rire et de ta « marche » dans le couloir du labo, Evan le saumon je te souhaite bon courage pour la potentio, et je vous souhaite à tout les deux bonne chance pour l'écriture de la bible. Et à Marie, Julie et Axia, les polyazamacrocycles sont peut-être tenaces mais lorsqu'on les appréhende de la bonne manière ils peuvent montrer d'incroyables propriétés !

Au tour des derniers docteurs sortis du laboratoire, Laura, le sol de mon appartement se souviendra de ton passage ! Thomas, je me souviendrai de nos soirées, plus les heures passaient moins de vêtements tu avais ! Et enfin, à toi maintenant Amaury, mon boy du labo, mon frère, tu m'as été d'une grande aide au cours de mes premiers mois. Je me souviendrai de nos chants (« The Sound of Silence » pour les mauvais rendements, « J'aime les filles » pour la vaisselle,...). Nos batailles de synthèse m'ont permis de m'améliorer en tant que chimiste. C'est aussi toi qui m'as permis d'avoir la grande team à Brest mais également à Paris. Brest aurait été différent sans toi. Et ça mon gars je m'en souviendrais.

En parlant de Brest, je tiens à remercier Fabien, Johan, Isabella, Max, Juste, Emma, Tommy, Maryanne et Celiste qui m'ont soutenue toutes ces années et qui ont rendu Brest plus agréable ;) Je tiens également à remercier les copains bordelais Marine, Emilie, Laura, Mélodie, Tiff, Aurélien et Tom qui m'ont épaulé lors de mon exode vers le nord !

Enfin je voudrais remercier ma famille, Yanis, Yasmine merci de m'avoir toujours motivé. Merci Cédric c'est grâce à toi que j'ai pu obtenir mon palace brestois.

Enfin cette thèse t'est dédiée Mam, pour tous les sacrifices que tu as concédés pour que je puisse atteindre mon objectif. C'est désormais fait, tu disais être fière de moi. Mais lorsque je regarde derrière moi, je ne vois pas le chemin que j'ai parcouru mais toi, Maman, qui me pousse pour aller plus loin. Le chemin est désormais clos et c'est à mon tour de te supporter. Merci d'avoir toujours cru en moi.

Table des matières

Liste des abréviations.....	12
Introduction générale	14

Chapitre 1

Introduction à la chimie des polyazacycloalcanes

I. Introduction.....	26
1. Stabilité des polyazacycloalcanes.....	26
1.1. Effet chélate	26
1.2. Fonctionnalisation des polyazacycloalcanes.....	27
1.3. Stabilité thermodynamique	28
1.4. Inertie cinétique.....	29
1.5. Inertie face à la réduction pour les complexes de Cu^{2+}	29
II. Les polyazacycloalcanes et le cuivre	30
1. Propriétés du cuivre	30
2. Complexes de Cu^{2+} à base de polyazacycloalcanes.....	31
2.1. Les polyazacycloalcanes <i>N</i> -acétate	31
2.2. Complexes de cuivre(II) dérivés du cyclam	32
2.3. Complexes de cuivre(II) dérivés de cyclams renforcés	33
2.4. Complexes de cuivre(II) dérivés du cyclam <i>cross-bridged</i>	34
3. Exemples d'applications des dérivés de polyazacycloalcanes pour des applications médicales	36
3.1. Chélation-thérapie	36
3.2. L'imagerie nucléaire.....	37
3.2.1. Le cuivre et la tomographie par émission de positons.....	37
III. Les polyazacycloalcanes et les lanthanides.....	38
1. Coordination des lanthanides	38
2. Propriétés magnétiques	39
3. Complexes de lanthanides à base de polyazacycloalcanes.....	40
3.1. Polyazacycloalcanes <i>N</i> -acétate	40
3.2. Ligands dérivés du picolinate	41
4. Propriétés luminescentes.....	44
4.1. L'effet antenne.....	44
4.2. La brillance et le rendement quantique.....	46

4.3. Relaxations non radiatives	46
4.4. Généralités sur la conception de sondes luminescentes à base de Ln ³⁺	47
4.5. Exemples de complexes luminescents	48
5. Applications des sondes luminescentes en imagerie biologique	50
5.1. Dosage homogène fluoroimmunologique	50
5.2. Transfert d'énergie de type Förster (FRET).....	51
5.3. Les chémosenseurs	52
5.4. Vers l'imagerie cellulaire.....	53
IV. Objectifs	55

Chapitre 2

Elaboration d'une sonde à base d'ytterbium(III) pour la microscopie proche infrarouge vers proche infrarouge

I. L'imagerie par fluorescence.....	60
1. Avantages des lanthanides en imagerie optique	61
II. La microscopie à deux photons	62
1. L'absorption à deux photons.....	62
1.1. Principe	63
2. Conception de complexes de lanthanides à deux photons.....	64
2.1. Complexes de lanthanides(III) à deux photons	64
III. Imagerie proche infrarouge vers proche infrarouge	70
1. Cas de l'ion ytterbium(III).....	70
2. Sondes luminescentes à base d'ytterbium(III) pour l'imagerie NIR-vers-NIR	71
IV. Synthèse du complexe d'ytterbium(III)	75
1. Synthèse du picolinate iodé	76
2. Synthèse de l'antenne π-conjuguée.....	76
3. Synthèse du ligand L ₁	79
4. Synthèse du complexe [YbL ₁] ⁺	82
5. Etudes spectroscopiques.....	83
V. Conclusion	86

Chapitre 3

Conception d'une sonde bimodale TEP/Imagerie optique à base de Cu^{2+}

I. Introduction à l'imagerie bimodale	91
II. La Tomographie par émission de positons	92
1. Principe.....	92
1.1. Principaux radioisotopes utilisés en imagerie TEP	92
2. Chélates polyazotés pour la complexation du $^{64}\text{Cu}^{2+}$	94
3. Bionconjugaison des ligands	96
4. Travaux de l'équipe en imagerie TEP	97
III. Sondes bimodales TEP/Imagerie optique	99
IV. Objectif.....	101
V. Synthèse d'une sonde bimodale TEP/Fluorescence	103
1. Synthèse et caractérisation des ligands L_2 et L_3	103
1.1. Protection du cyclam	103
1.2. Synthèse et caractérisation du ligand à base de cyclam L_2	103
1.3. Synthèse et caractérisation du ligand à base de cyclam <i>cross-bridged</i> L_3	107
2. Synthèse des complexes de Cu^{2+}	110
3. Etudes électrochimiques des complexes $[\text{CuL}_2]^+$ et $[\text{CuL}_3]^+$	110
4. Etude des propriétés photophysiques de $[\text{CuL}_2]^+$ et $[\text{CuL}_3]^+$	111
4.1. Caractéristiques UV- Visible	111
4.2. Etude du rendement quantique	112
5. Radiomarquage au $^{64}\text{Cu}^{2+}$	113
6. Etudes en milieu <i>in vitro</i>	114
VI. Vers la C-fonctionnalisation pour une vectorisation plus ciblée	115
1. L'hypoxie tumorale.....	115
2. Les dérivés de nitroimidazole.....	115
3. Synthèse du ligand L_4	116
4. Synthèse d'un agent bifonctionnel chélatant	117

VII. Conclusion	120
-----------------------	-----

Chapitre 4

Elaboration d'une sonde théranostique TEP/PDT à base de Cu²⁺

I. Combiner la thérapie et le diagnostic : la théranostique	123
---	-----

II. La Thérapie Photodynamique (PDT)	124
--	-----

1. Principe physique de la PDT	124
1.1. La PDT de type I.....	124
1.2. La PDT de type II.....	125
2. Les photosensibilisateurs	125
2.1. Photosensibilisateurs de 1 ^{ère} génération	125
2.2 Photosensibilisateurs de 2 ^{ème} génération.....	126
3. La thérapie photodynamique à deux photons	127
4. Exemples de sondes théranostiques à base de PDT	129
4.1. Sondes théranostiques IRM/PDT	129
4.2. Sondes théranostiques TEP/PDT.....	131

III. Elaboration de sondes théranostiques TEP/PDT à deux photons	132
---	-----

IV. Synthèse des ligands L ₅ et L ₆	133
---	-----

1. Synthèse du photosensibilisateur	133
2. Synthèse du ligand L ₅	135
2.1. Synthèse à partir de la voie A.....	136
2.2. Synthèse à partir de la voie B.....	138
3. Synthèse du ligand L ₆	140

V. Caractérisation du [CuL ₆] ⁺	141
--	-----

1. Synthèse du complexe [CuL ₆] ⁺	141
--	-----

VI. Etudes spectroscopiques.....	142
----------------------------------	-----

VII. Conclusion	145
-----------------------	-----

Chapitre 5

Vers la synthèse de nouveaux complexes de gallium(III)

I. Introduction.....	148
1. Propriétés du gallium	148
2. Complexes de gallium à base de polyazacycloalcanes	149
II. Intérêt du gallium en imagerie médicale	150
1. Application du ⁶⁸ Ga en imagerie TEP.....	150
2. Intérêt du ⁶⁸ Ga en imagerie bimodale TEP/Imagerie optique.....	151
III. Elaboration d'une sonde bimodale TEP/Imagerie optique à base de Ga³⁺	153
1. . Objectif	153
2. Synthèse des complexes de gallium(III) modèles.....	154
2.1. Synthèse et caractérisation du complexe [Ga(TE1PA)] ²⁺	154
2.2. Synthèse et caractérisation du complexe [Ga(CB-TE1PA)] ²⁺	156
3. Synthèse des complexes [GaL ₂] ²⁺	157
4. Synthèse et études photophysiques du complexe [ZnL ₂] ⁺	158
IV. Conclusion	160
Conclusion Générale	163
Experimental section.....	169
Références bibliographiques.....	207
Production scientifique	225

Liste des abréviations

A2P : Absorption à deux photons	HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
Abs : Absorption	HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance
AcCl : Chlorure d'acétyle	HRMS : High resolution mass spectrometry
Exc : Excitation	HSAB : Hard and soft acids and bases
Asc : Acide ascorbique	Ln : Lanthanide
Boc : Terbutyloxycarbonyl	ILCT : Intra-Ligand Charge Transfert
CB : Cross-bridged	IO : Imagerie optique
CCM : Chromatographie sur couche mince	IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
CE : Capture électronique	MLCT : Metal-to-Ligand Charge Transfer
CEA : Antigène carcino-embryonnaire	NC : Nombre de coordination
CI : Conversion Interne	NIR : Near Infrared
CIS : Conversion Intersystème	PBS : Tampon phosphate salin
Cyclam : 1,4,8,11-tétraazacyclotétradécane	PET : Photoinduced electron transfert
Cyclen : 1,4,7,10-tétraazacyclododécane	PEG : Polyéthylèneglycol
Eq : Equation	PFA : Paraformaldéhyde
Equiv : Equivalent	PS : Photosensibilisateur
ESI : Electrospray ionisation	PDT : Photodynamic therapy
DBB : Dibromobenzène	RIT : Radioimmunothérapie
DTPA : Acide diéthylène triamine pentaacétique	ROS : Reactive oxygen species
DFT : Density functional theory	RMN : Résonance magnétique nucléaire
DRX : Diffraction des rayons X	S : Singulet
EPR : Enhanced permeability and retention	T : Triplet
FDA : Food and drug administration	Tacn : 1,4,7-triazacyclononane
FDG : 2-fluoro-2-désoxy-D-glucose	TE : Transfert d'énergie
FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfert	S/B : Signal sur bruit
NHE : Normal Hydrogen Electrode	SOD : Superoxide dismutase
GM : Göppert-Mayer	TACN : 1,4,7-triazacyclononane
H ₃ NOTA : Acide 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacétique	TEP : Tomographie par émission de positrons
H ₄ DOTA : Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique	TEMP : Tomographie par émission monophotonique
H ₄ TETA : Acide 1,4,8,11-tétraazacyclotétradécane-1,4,7,11-tétraacétique	TIPS : (triisopropylsilyl)acétylène
	TMS : (triméthylsilyl)acétylène
	UV : Ultra-violet
	Z : Numéro atomique

Introduction générale

L'imagerie médicale rassemble les techniques d'acquisition d'images qui permettent de visualiser l'anatomie et le métabolisme du corps humain en donnant une représentation visuelle d'une zone spécifiquement ciblée. Parmi elles, l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) et la tomodensitométrie, aussi appelée CT-scan (*computerized tomography*) ont largement fait leurs preuves dans le domaine de l'imagerie anatomique permettant d'obtenir des informations sur la structure des organes. Cependant, ces techniques d'imagerie ont des limites car elles ne permettent pas de visualiser des processus au niveau cellulaire et moléculaire contrairement aux méthodes d'imagerie fonctionnelle. Les techniques d'imagerie nucléaire, telles que la Tomographie par Emission de Positons (TEP), la Tomographie par Emission MonoPhotonique (TEMP), ou l'Imagerie Optique (IO) sont couramment utilisées ou étudiées. Ces techniques d'imagerie sont importantes pour la détection de pathologies, telles que le cancer, qui se manifestent d'abord par des changements biochimiques, et non morphologiques.¹ Ces différentes applications emploient souvent des agents d'imagerie à base de métaux de transition ou de lanthanides.

Dans ces agents, le métal doit être complexé par un ligand spécifique avec lequel il a une bonne affinité. Parmi les multiples ligands étudiés, ceux basés sur les polyazacycloalcanes s'avèrent des plus performants pour la conception de sondes pour la quasi-totalité des modalités d'imagerie : en IRM par l'intermédiaire d'agents de contraste à base de Gd^{3+} , ou en imagerie TEP pour la complexation de radiométaux. Dans la littérature, il est connu que ces systèmes moléculaires mènent à des complexes métalliques thermodynamiquement stables et cinétiquement inertes.² Par exemple, les tri- ou tétraazamacrocycles, tels que les dérivés du tacn, cyclen et cyclam, sont réputés pour être des ligands de choix pour de très nombreux cations métalliques (**Figure 1**).^{3,4}

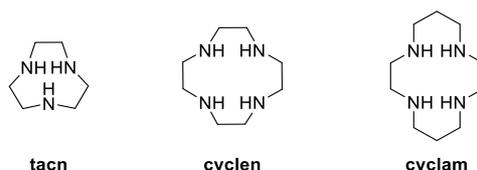


Figure 1- Structure des polyazacycloalcanes.

Afin d'améliorer les propriétés de complexation des polyazacycloalcanes et les rendre plus spécifiques d'un métal donné, les fonctions amines secondaires sont fonctionnalisées par des groupements coordinants (acétate, méthylpyridine, phosphonate,...) permettant d'augmenter les propriétés thermodynamiques ainsi que l'inertie cinétique des complexes formés. Ces différents critères seront abordés au cours du premier chapitre qui permettra de démontrer l'intérêt des polyazamacrocycles pour l'élaboration de complexes thermodynamiquement stables et cinétiquement inertes.

A titre d'exemple, le **H₄DOTA**, un cyclen *N*-fonctionnalisé par quatre groupements acétate, forme avec le Gd³⁺ un complexe très stable ([Gd(DOTA)(H₂O)]⁻, **Figure 2**) utilisé cliniquement comme agent de contraste (Dotarem®) en IRM. Le **H₄DOTA** est également très étudié en médecine nucléaire pour la complexation du ⁶⁴Cu²⁺ et du ⁶⁸Ga³⁺. On le retrouve par exemple greffé sur un anticorps (Daratumumab) pour l'imagerie TEP du myélome multiple (**Figure 2**).⁵

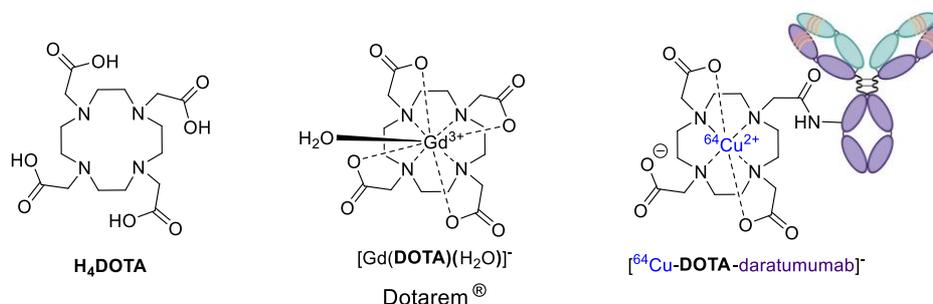


Figure 2 - Structure du **H₄DOTA**, du Dotarem® et du complexe de ⁶⁴Cu²⁺ bioconjugué.

Cependant, bien que le **H₄DOTA** soit très impliqué dans de nombreux tests cliniques pour la complexation d'un grand nombre de métaux d'intérêts en diagnostic ou en thérapie, il apparait que ce ligand ne soit pas le plus adapté à chacun d'eux. A titre d'exemple, il a été démontré que le complexe qu'il forme avec le ⁶⁴Cu²⁺ rencontre des problèmes de stabilité *in vivo*.⁶ Malgré son excellente affinité vis-à-vis des lanthanides, les complexes de lanthanides basés sur le **H₄DOTA** ne trouvent pas d'application en imagerie optique à cause de leurs modestes émissions. La conception de nouveaux ligands adaptés à ces cations métalliques s'avère donc nécessaire.

Dans ce contexte, notre équipe développe depuis de nombreuses années des ligands à base de polyazacycloalcanes *N*-fonctionnalisés par des groupements picolinate pour la complexation de cations métalliques. L'avantage du bras picolinate réside dans l'apport de deux atomes coordonnant, l'atome d'azote contenu dans la pyridine et l'un des deux atomes d'oxygène de la fonction carboxylate, qui compense la diminution de stabilité induite par la *N*-fonctionnalisation des polyazacycloalcanes.

Notre groupe a notamment décrit des chélates de Cu²⁺ à base de cyclam et de son analogue renforcé fonctionnalisés par un bras picolinate (**H₁TE1PA** et **H₁CB-TE1PA**, respectivement) thermodynamiquement stables et cinétiquement inertes.^{7,8} Le radiomarquage au ⁶⁴Cu²⁺ a été réalisé avec le ligand **H₁TE1PA** et le radiocomplexe formé a démontré un excellent comportement *in vitro* ainsi qu'*in vivo*.⁹ Couplé à un anticorps, le **H₁TE1PA** radiomarqué au ⁶⁴Cu²⁺ a permis de réaliser des premières études précliniques en imagerie TEP sur petit animal (**Figure 3**).^{10,11}

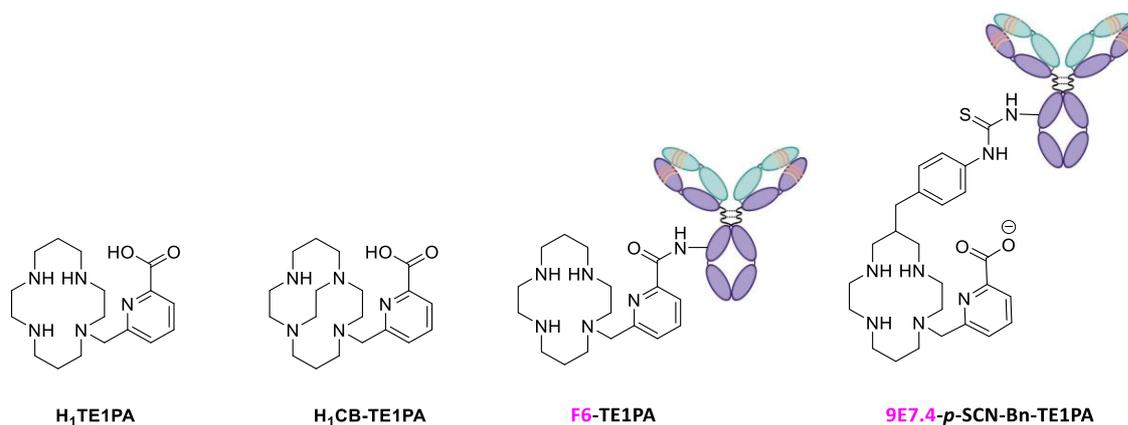


Figure 3 - Structure des ligands **H₁TE1PA** et **H₁CB-TE1PA** et des dérivés bioconjugués **F6-TE1PA** et **9E7.4-p-SCN-Bn-TE1PA**.

En plus de ces exemples, notre groupe a également étudié différentes plateformes macrocycliques di-*N*-fonctionnalisées par des unités picolinate pour la complexation des lanthanides. D'abord étudiés pour des applications en IRM, les complexes octacoordinés [Ln(**CB-TE2PA**)]⁺ (**Figure 4**), basés sur une plateforme cyclam renforcé se distinguent par l'absence de molécule d'eau dans la sphère de coordination du lanthanide. En revanche, les complexes de Tb³⁺ et d'Eu³⁺ ont montré posséder des propriétés intéressantes en luminescence, grâce au transfert d'énergie du picolinate vers le lanthanide. Autre caractéristique notable, le complexe d'Eu³⁺ s'est montré exceptionnellement inerte (aucune dissociation n'est observée après 5 mois dans HCl 2M à température ambiante).¹²

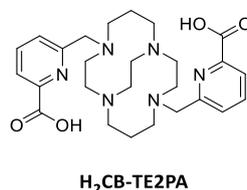


Figure 4 - Structure du ligand **H₂CB-TE2PA** développé par notre équipe.¹²

Cependant, l'efficacité de ces complexes est limitée par leur absorption dans l'UV car, dans cette région spectrale, les tissus biologiques absorbent fortement les rayonnements lumineux. Il existe toutefois une région dans le proche infrarouge (NIR) appelée *fenêtre de transparence biologique*, permettant une imagerie avec une faible autofluorescence, une diffusion de lumière réduite et une pénétration tissulaire élevée.¹⁴ Pour cela, la microscopie de fluorescence à deux photons, ou biphotonique, offre la possibilité de déplacer l'excitation des fluorophores vers la région NIR et a été mise à contribution pour le développement d'entités moléculaires capables d'absorber dans le NIR.¹⁵

Dans ce contexte, notre groupe, en collaboration avec l'équipe du Dr. Olivier Maury a décrit un complexe d'Eu³⁺ à deux photons basé sur le **H₂CB-TE2PA** (**Figure 5**). Cette plateforme macrocyclique est di-*N*-fonctionnalisée par une antenne conjuguée optimisée pour exalter la luminescence de l'Eu³⁺

dans le NIR.¹⁵ Le complexe formé s'avère soluble et stable en milieu biologique avec de bonnes propriétés spectroscopiques à deux photons. De plus, des images de cellules vivantes T24 ont été obtenues suite à une excitation dans le NIR avec une émission du métal dans le rouge. Cependant, afin de réaliser des expériences d'imagerie plus résolues, il est préférable que la sonde optique émette également dans la fenêtre de transparence biologique, c'est-à-dire dans le NIR.

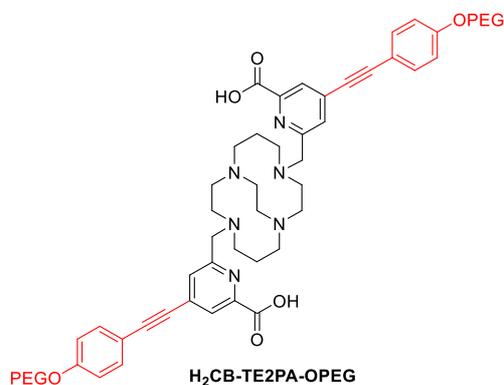


Figure 5 - Structure d'un ligand pour la complexation de l'Eu³⁺ pour la microscopie biphotonique.¹⁵

Afin de répondre à cette problématique, notre équipe s'est intéressée à l'Yb³⁺, connu pour posséder une émission intense entre 960-1060 nm. Ainsi, la première partie des travaux décrits dans ce manuscrit se concentrera sur le développement d'une sonde basée sur le **H₂CB-TE2PA** di-*N*-fonctionnalisée par une antenne π-conjuguée adaptée à la sensibilisation de l'Yb³⁺ (**Figure 6**). La synthèse et les études spectroscopiques du complexe d'Yb³⁺ seront ainsi présentées, de même que les expériences d'imagerie cellulaire dans le proche infrarouge. Ce chapitre permettra d'introduire les aspects de la microscopie à deux photons ainsi que son apport dans l'imagerie optique proche infrarouge-vers-proche infrarouge (NIR-vers-NIR).

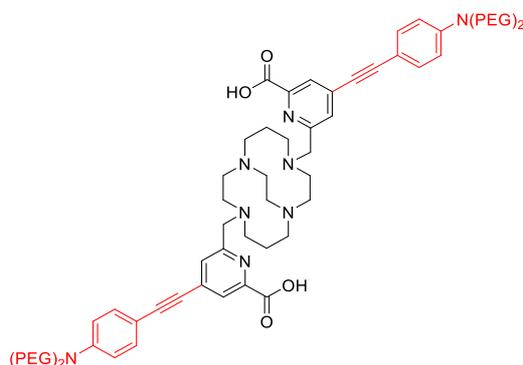


Figure 6 - Structure du ligand ciblé décrit au cours du **Chapitre 2**.

Les techniques d'imagerie médicale actuelles possèdent toutes des limites, en termes de sensibilité ou de résolution, inhérentes aux modalités employées. Ainsi, la recherche se porte maintenant sur la complémentarité de ces outils pour obtenir des agents d'imagerie toujours plus performants dans le

but d'obtenir des images de résolution et de sensibilité plus élevées. Les efforts de recherche se sont concentrés sur la combinaison de techniques d'imagerie moléculaire au sein d'une même sonde pour une application en imagerie bimodale.

Mais aussi, plutôt que de combiner deux modalités d'imagerie, il est possible de combiner une modalité d'imagerie avec une modalité de thérapie. Cette approche dite *théranostique* est un domaine de recherche émergeant qui possède l'avantage de réduire fortement les effets secondaires indésirables pour le patient par comparaison à l'utilisation cumulée de sondes d'imagerie et thérapeutiques distinctes. Afin de répondre à ces problématiques, notre équipe a décidé d'associer différentes modalités d'imagerie et/ou de thérapie autour des dérivés du cyclam monopicolinate.

Dans le domaine de l'imagerie bimodale, notre groupe a entrepris de fonctionnaliser le bras picolinate par l'antenne π -conjuguée, décrite auparavant, pour le développement de sondes bimodales TEP/Imagerie optique à base de métaux de transition (**Figure 7**). Cependant, nous verrons au cours du **Chapitre 3** que la conception de telles entités n'est pas aisée d'une part, d'un point de vue synthétique et d'autre part, d'un point de vue spectroscopique. En effet, les propriétés photophysiques du fluorophore sont très sensibles à la présence d'un métal.

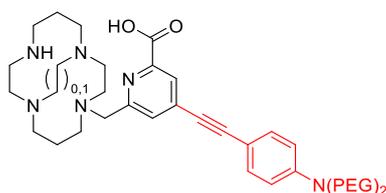


Figure 7 - Structure schématique des ligands ciblés décrits au cours du **Chapitre 3** pour une application en imagerie TEP/Imagerie optique.

Ensuite, suivant la même stratégie que celle décrite précédemment, nous avons utilisé les dérivés de cyclam monopicolinate pour la complexation du Cu^{2+} pour une application en imagerie TEP. Toutefois, les groupements picolinate seront fonctionnalisés par une unité π -conjuguée permettant cette fois la thérapie photodynamique comme démontré par notre collaborateur de l'ENS Lyon pour le développement de sondes théranostiques TEP/PDT (**Figure 8**).¹⁶⁻¹⁸

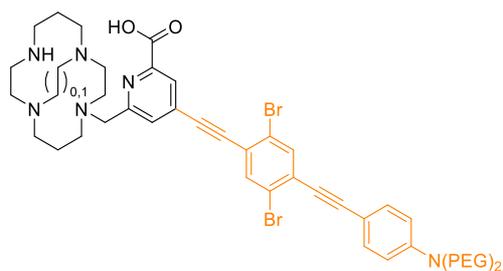


Figure 8 - Structure schématique des ligands ciblés décrits au cours du **Chapitre 4** pour une application théranostique TEP/PDT.

Enfin, le dernier chapitre portera sur la synthèse et l'étude photophysique de nouveaux complexes de gallium(III) en alternative au Cu^{2+} . La conception de tels complexes se base sur les résultats obtenus au cours des **Chapitres 2** et **3** et sera considérée comme une ouverture pour des futures applications en imagerie bimodale TEP/Imagerie optique et en théranostique TEP/PDT.

Chapitre 1

Introduction à la chimie des polyazacycloalcanes

I. Introduction

Le développement de complexes à base de cations métalliques a connu un fort intérêt pour des applications en imagerie médicale. Parmi les principaux métaux étudiés, nous pouvons citer le Gd^{3+} utilisé en imagerie par résonance magnétique (IRM) ou le $^{64}Cu^{2+}$ utilisé en tant que radioisotope pour la tomographie par émission de positons (TEP). Par ailleurs, la plupart des lanthanides sont également exploités en imagerie optique compte tenu de leurs propriétés spectroscopiques uniques qui leur permettent d'émettre dans la gamme de longueurs d'ondes allant du visible (Eu^{3+} , Tb^{3+}) au proche infrarouge (Er^{3+} , Yb^{3+} , Nd^{3+}).

Si ces métaux présentent de nombreux avantages, ils peuvent cependant perturber l'équilibre biologique. Pour éviter cette potentielle toxicité, ils sont administrés sous la forme de chélates. Ainsi pour une utilisation en milieu *in vitro* et *in vivo*, la conception d'un complexe métallique doit respecter le cahier des charges suivant :

- une bonne stabilité thermodynamique, qui témoigne de l'affinité d'un ligand avec un cation métallique spécifique
- une bonne inertie qui témoigne de la capacité d'un complexe à ne pas se dissocier en présence d'autres métaux ou de protéines endogènes

1. Stabilité des polyazacycloalcanes

1.1. Effet chélate

L'utilisation des polyazacycloalcanes pour la complexation de métaux repose sur la remarquable affinité de ces ligands pour les ions métalliques. Les complexes formés se déclinent d'une part par une forte stabilité thermodynamique et d'autre part par une bonne inertie cinétique vis-à-vis de la démétallation. Toutefois, différents facteurs influent sur cette affinité métal-ligand. La taille du macrocycle a, par exemple, un impact important sur la stabilité des complexes.

Hancock et *al.* ont étudié les propriétés de coordination de divers macrocycles en fonction de leur taille.¹⁹ Comme nous l'avons décrit précédemment, le tacn, le cyclen et le cyclam sont trois exemples de plateformes macrocycliques connues pour leurs excellentes propriétés de complexation envers de nombreux métaux de transition, métaux lourds ou lanthanides (**Figure 9**). La cavité macrocyclique augmente avec le nombre de carbone et d'azote, le tacn possède la plus petite cavité et le cyclam la plus grande.

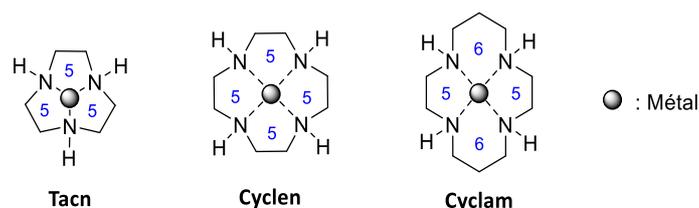


Figure 9 - Exemples de structures polyazamacrocycliques.

Lors de la complexation, le cation métallique se coordine avec les trois ou quatre atomes d'azote du macrocycle pour former des métallocycles. Il en résulte la formation de cycles à 5 chaînons (tacn et cyclen) ou une combinaison de cycles à 5 et 6 chaînons (cyclam), comme illustré sur la **Figure 9**. Ce phénomène est connu sous le nom d'*effet chélate*.

L'augmentation progressive du nombre de métallocycles au sein d'un complexe métallique induit une amélioration de la stabilité. Néanmoins, pour un nombre similaire de métallocycles, la stabilité des complexes dépend également du rayon ionique de l'ion métallique. Hancock *et al.* ont montré que les contraintes stériques au sein du complexe déterminent pour une large part sa stabilité. Ainsi, la contrainte d'un cycle à cinq chaînons est minimisée pour une distance M-N proche de 2,5 Å et un angle de liaison N–M–N voisin de 69°, conditions que seuls les ions volumineux tels que les ions Ln^{3+} sont en mesure de satisfaire. Au contraire, des métallocycles favorables à six chaînons sont obtenus avec une distance de 1,54 Å et un angle de 109,5° correspondant à un environnement plus adaptés aux ions de petites tailles tels que le Cu^{2+} .

1.2. Fonctionnalisation des polyazacycloalcanes

Afin d'améliorer la stabilité et la spécificité des complexes à base de polyazacycloalcanes, ces plateformes peuvent être *N*-fonctionnalisées par différents groupements coordinants. Les bras acétate, méthylphosphonate et amide figurent parmi les plus utilisés (**Figure 10**).³ Notre groupe s'est intéressé à l'apport des groupements picolinate car ils présentent l'intérêt d'être bidentates (**Figure 10**) et permettent notamment la complexation de métaux avec des nombres de coordination élevés.^{7,8,12,20,21} Cependant, les groupements méthylpyridine et méthylthiazole trouvent également leur intérêt pour la complexation de métaux de transition et de lanthanides.^{22,23}

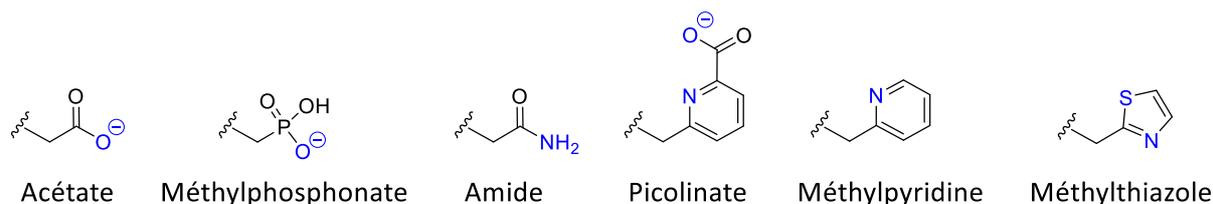


Figure 10 - Exemples de groupements coordinants.

La compréhension des propriétés physico-chimiques des ligands macrocycliques et des complexes associés, au travers des études de stabilité thermodynamique, cinétiques et électrochimiques, est essentielle pour appréhender le comportement des chélates *in vivo*. Ainsi, nous décrirons ici brièvement les critères à respecter pour former des chélates adaptés pour des applications en santé.

1.3. Stabilité thermodynamique

La constante de stabilité des complexes est déterminée par la constante de formation ($\log K_{ML}$), et est dépendante de plusieurs paramètres tels que la basicité globale ou la denticité du ligand. Plus la valeur de $\log K_{ML}$ est élevée, plus l'interaction entre le ligand et le métal est forte et plus le complexe correspondant est stable. Selon le pH, plusieurs espèces peuvent se former (ML, MLH, ML(OH),...). La constante globale de formation ($\log \beta_n$) témoigne de l'affinité métal-ligand (**Tableau 1**). Ces constantes peuvent être déterminées par diverses méthodes de titrages telles que des titrages par spectroscopie UV-Visible, par RMN, ou par potentiométrie.²⁴

Constantes	Equilibres
$K_{ML} = \frac{[ML]}{[M][L]}$	$M + L \xrightleftharpoons{K_{ML}} ML$
$K_{MLH} = \frac{[MLH]}{[ML][H]}$	$ML + H \xrightleftharpoons{K_{MLH}} MLH$
$K_{MLH_n} = \frac{[MLH_n]}{[ML][H]^n}$	$ML + nH \xrightleftharpoons{K_{MLH_n}} MLH_n$
$\beta_n = \frac{[M_m L_l H_h]}{[M]^m [L]^l [H]^h}$	$mM + lL + hH \xrightleftharpoons{\beta} M_m L_l H_h$

Tableau 1 – Constantes de formation aux équilibres de réaction. M = Métal, L = Ligand, H = Proton. Les charges ont été omises pour plus de clarté.

Par ailleurs, comme la complexation métallique dépend du pH, la stabilité thermodynamique dépend donc de la basicité du ligand. À cet égard, la comparaison des affinités d'un même métal avec des ligands ayant des basicités différentes ne peut se faire directement. Leur comparaison est valable uniquement lorsque les ligands sont totalement déprotonés. Pour tenir compte de la basicité globale et comparer les stabilités thermodynamiques entre différents ligands, la constante de stabilité pM qui est fonction de la concentration en métal libre $[M_{libre}^{n+}]$ a été proposée.²⁵ En règle générale, le pM est calculé pour une concentration en cation métallique en présence d'un excès de ligand par rapport à

celle du cation métallique ($[L] = 10^{-5} \text{ M}$; $[M^{n+}] = 10^{-6} \text{ M}$) à pH physiologique (7,4) et suit l'équation suivante :

$$\text{(eq. 1)} \quad \text{pM} = -\log[M_{\text{libre}}^{n+}]$$

1.4. Inertie cinétique

Une inertie cinétique élevée est requise pour éviter le relargage de l'ion métallique par dissociation en milieu biologique. Cela est due à la présence d'enzymes et de cations endogènes (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Na^+ ...) qui entrent en compétition avec le ligand ou le métal par des processus de transchéliation ou transmétallation.²⁶

La transchéliation est étudiée en suivant la dissociation du complexe en présence d'un excès de ligand compétiteur, tandis que la démétallation est évaluée en milieu acide (HCl ou HClO_4), à différentes concentrations et températures où le proton H^+ joue le rôle du métal compétiteur. Plusieurs grandeurs permettent d'estimer l'inertie comme le temps de demi-vie ($t_{1/2}$), qui correspond au temps pour lequel la moitié du complexe s'est dissociée, et la constante de dissociation du complexe (k_{obs}). Ainsi pour une réaction d'ordre 1, le temps de demi-vie $t_{1/2}$ est lié à la constante k_{obs} selon l'équation suivante :

$$\text{(eq. 2)} \quad t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{\text{obs}}}$$

Un complexe inerte est caractérisé par une constante de dissociation faible et un temps de demi-vie important.

1.5. Inertie face à la réduction pour les complexes de Cu^{2+}

Outre la transchéliation et la transmétallation, la réduction du centre métallique constitue une autre voie menant à la perte du métal. En raison de préférences géométriques très différentes du cuivre dans ses deux degrés d'oxydation, les complexes à base de cuivre(II) sont généralement dissociés *in vivo* lorsque le Cu^{2+} est réduit en Cu^+ par la présence d'oxydoréductases (NADPH, superoxydes dismutases) en milieu biologique.²⁷

Il est ainsi connu que le potentiel d'oxydoréduction du couple $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ doit être inférieur au seuil des oxydoréductases se situant dans l'intervalle -0,40 V et +0,40 V. Plus le potentiel de réduction du complexe est inférieur au seuil, moins la réduction du Cu^{2+} en Cu^+ est facile. L'inertie face à la réduction des complexes peut être estimée par voltamétrie cyclique, une technique électrochimique permettant d'étudier le potentiel de réduction d'un cation métallique ainsi que sa réversibilité électrochimique.

Cette technique permet de caractériser les complexes selon leurs comportements électrochimiques. Ils peuvent être réversibles, quasi-réversibles ou irréversibles (**Figure 11**). Un système réversible et quasi-réversible démontrent que le complexe est stable sous la forme Cu^+ , tandis qu'un système irréversible traduit une dissociation de l'ion métallique après réduction du Cu^{2+} .²⁸

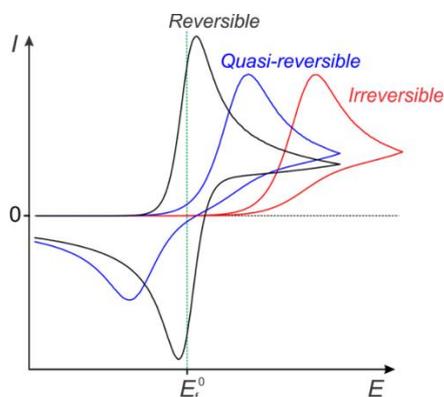


Figure 11 - Comparaison de voltammogrammes cycliques réversible, quasi-réversible et irréversible.

II. Les polyazacycloalcanes et le cuivre

1. Propriétés du cuivre

Le cuivre est un élément faisant partie de la famille des métaux de transition ($Z = 29$, $[\text{Ar}]3d^{10}4s^1$). Dans son état d'oxydation +I, l'ion Cu^+ de configuration d^{10} est diamagnétique et forme des complexes non stabilisés par le champ du ligand. Dans son degré d'oxydation +II, l'ion Cu^{2+} est un métal de configuration d^9 et est considéré comme un acide de Lewis intermédiaire selon la théorie HSAB de Pearson, ce qui lui confère une affinité pour les bases de Lewis intermédiaires comme les amines ou dures telles que les carboxylates. C'est à l'état d'oxydation +II que le cuivre est le plus souvent retrouvé en solution aqueuse avec un nombre de coordination (NC) allant de 4 à 6. Le Cu^{2+} peut former des complexes adoptant une géométrie plan carré/tétraédrique (NC = 4), pyramidale à base carrée/bipyramidale trigonale (NC = 5) ou enfin octaédrique (NC = 6) (**Figure 12**). Ainsi les structures de type triaza- ou tétraazamacrocycliques ont pris une place importante pour l'étude de la complexation du Cu^{2+} en particulier le tacn, le cyclen et le cyclam.³

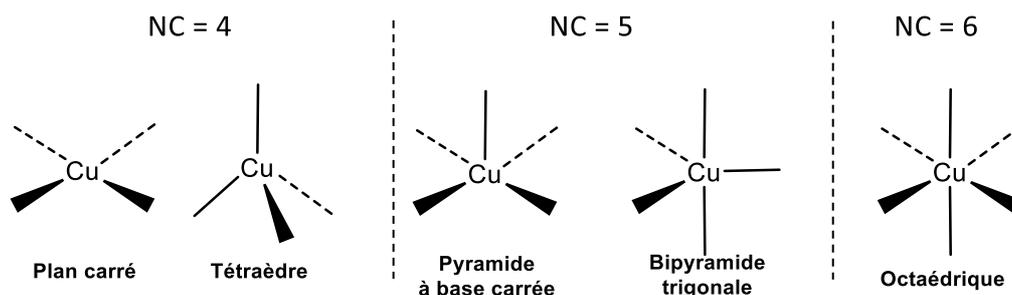


Figure 12 - Les différentes géométries des complexes de cuivre(II).

2. Complexes de Cu^{2+} à base de polyazacycloalcanes

2.1. Les polyazacycloalcanes *N*-acétate

Dans le cadre de la complexation du Cu^{2+} , la plus courante des fonctionnalisations des polyazacycloalcanes est celle de type acétate. Une *N*-alkylation des fonctions amines secondaires du tacn, du cyclen et du cyclam conduit respectivement au H_3NOTA , H_4DOTA et H_4TETA (Figure 13).

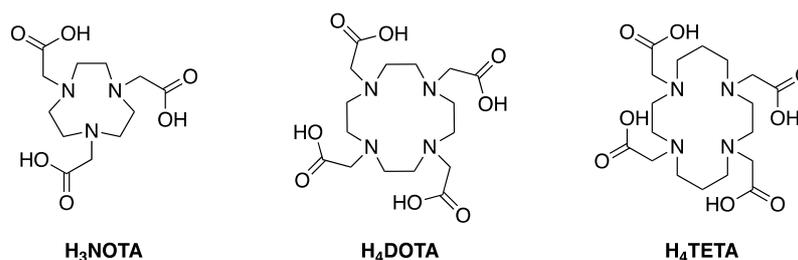


Figure 13 - Structure de H_3NOTA , H_4DOTA et H_4TETA .

Avec des constantes de complexation $\log K_{\text{CuL}}$ comprises entre 21,6 et 22,7, les ligands H_3NOTA , H_4DOTA et H_4TETA forment des complexes de Cu^{2+} possédant des constantes de stabilité thermodynamiques proches (Tableau 2).³ La constante de stabilité pCu du H_3NOTA est de 17,61 contre 15,20 et 14,20 pour les ligands H_4DOTA et H_4TETA (Tableau 2).^{29,30} Ces valeurs montrent que le Cu^{2+} a plus d'affinité pour le H_3NOTA qu'avec les ligands H_4DOTA et H_4TETA .

Les potentiels de réduction des complexes $[\text{Cu}(\text{NOTA})]^-$, $[\text{Cu}(\text{DOTA})]^{2-}$ et $[\text{Cu}(\text{TETA})]^{2-}$ inférieurs à -0,7 V montrent que ces derniers sont difficiles à réduire (Tableau 2).³ Cependant, ces complexes présentent un système électrochimique irréversible après réduction du Cu^{2+} en Cu^+ . Un tel comportement témoigne de l'instabilité des complexes en milieu réducteur. Il est à noter que la dissociation des complexes $[\text{Cu}(\text{NOTA})]^-$, $[\text{Cu}(\text{DOTA})]^{2-}$ et $[\text{Cu}(\text{TETA})]^{2-}$ est quasiment instantanée en milieu acide (HCl 5M, à 30°C ou 90°C, Tableau 2).

Ligand	H ₃ NOTA	H ₄ DOTA	H ₄ TETA
Log K_{CuL}^a	21,6	22,7	21,1
pCu ^b	17,6	15,2	14,2
Inertie cinétique	< 3 min HCl 5 M 30°C	< 3 min (HCl 5 M 90°C)	< 3 min (HCl 5 M, 90°C)
E° vs ENH	-0,70 V	-0,74 V	-0,98 V
Reversibilité	Irréversible	Irréversible	Irréversible
Références	3,31	3,30	3,29

Tableau 2 – Propriétés des complexes de cuivre(II) étudiés dans cette section. ^a $I = 0,10$ M KNO₃ à 25°C. ^b pM = $-\log [M_{libre}^{n+}]$ à pH 7,4 avec $[L] = 10 \times [M^{n+}]_{tot} = 1.10^{-5}$ M.

Il est intéressant de remarquer que les ligands **H₃NOTA**, du **H₄DOTA** et du **H₄TETA** comportent entre 6 à 8 atomes coordinants alors que le Cu²⁺ nécessite seulement 4 à 6 atomes coordinants pour former un complexe stable. Dans le cas du cyclam, l'ajout de bras permettant d'apporter un ou deux sites coordinants pour la complexation du Cu²⁺ a été très étudié laissant une amine supplémentaire pour une future fonctionnalisation avec un vecteur biologique.²⁷ C'est pourquoi les ligands dérivés du cyclam ont été étudiés dans le but d'obtenir des complexes de cuivre(II) plus stables que le **H₄TETA**, afin de répondre aux exigences du milieu biologique.

2.2. Complexes de cuivre(II) dérivés du cyclam

Dans le cadre de la complexation du Cu²⁺, les dérivés de cyclam *N*-fonctionnalisés par des groupements acétate (**H₂TE2A**), phosphonate (**H₂TE2P**) ou par une unité picolinate (**H₁TE1PA**) ont montré des propriétés intéressantes pour ce qui est de la stabilité thermodynamique et cinétique (**Figure 14**).^{32,33}

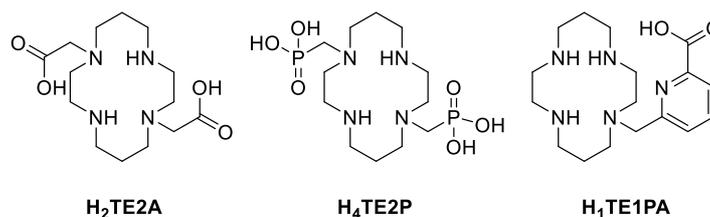


Figure 14 - Structure du **H₄TE2P**, **H₂TE2A** et **H₁TE1PA**.^{32,33}

Par exemple, Pandya et *al.* ont démontré que [Cu(**TE2A**)] est plus inerte que [Cu(**TETA**)]²⁻. La demi-vie du [Cu(**TE2A**)] est de 46,2 min en milieu acide (HCl 5M, 90°C) contre seulement 4,5 min pour le [Cu(**TETA**)]²⁻ dans les mêmes conditions. La fonctionnalisation avec deux groupements acétate, au lieu de quatre, diminue légèrement le potentiel de réduction par comparaison au [Cu(**TETA**)]²⁻ (**Tableau 3**). Le potentiel de réduction de [Cu(**TE2A**)] est évalué à -0,90 V et adopte un caractère irréversible.

Hermann *et al.* ont également démontré que le complexe hexacoordiné $[\text{Cu}(\text{TE2P})]^{2-}$ possédait des propriétés supérieures au $[\text{Cu}(\text{TETA})]^{2-}$. La constante de stabilité est élevée ($\log K_{\text{CuTE2P}} = 26,5$) et est supérieure à celle du $[\text{Cu}(\text{TETA})]^{2-}$ ($\log K_{\text{CuTETA}} = 21,1$) (**Tableau 3**).³³ La demi-vie du $[\text{Cu}(\text{TE2P})]^{2-}$ a également démontré une inertie extrêmement élevée de 7 mois en milieu acide (HClO_4 5M, 25°C). Cependant, le complexe $[\text{Cu}(\text{TE2P})]^{2-}$ a montré un potentiel de réduction de -0,45 V, valeur proche du seuil des potentiels standards des bioréducteurs situés entre -0,40 V et +0,40 V. Il est à noter que le complexe adopte également un caractère irréversible.

Notre équipe a décrit le ligand **H₁TE1PA**, un cyclam fonctionnalisé par un groupement picolinate.⁷ Comme il a été décrit précédemment, ce groupement possède deux atomes coordinants, l'atome d'azote de la pyridine et l'oxygène du carboxylate, permettant de laisser trois amines secondaires libres sur le macrocycle. Cependant, la structure de $[\text{Cu}(\text{TE1PA})]^+$ obtenue par diffraction des rayons X a mis en évidence un complexe de Cu^{2+} pentacoordiné dans lequel seul l'atome d'azote du picolinate est impliqué dans la complexation du cuivre. Les constantes thermodynamiques du complexe $[\text{Cu}(\text{TE1PA})]^+$ se sont révélées élevées ($\log K_{\text{CuTE1PA}} = 25,5$, $\text{pCu} = 18,6$, **Tableau 3**). Le potentiel de réduction du complexe $[\text{Cu}(\text{TE1PA})]^+$ est égal à -1,06 V (vs Fc/Fc^+) et adopte un caractère quasi-réversible.⁷ Ainsi, parmi les complexes décrits, seul le $[\text{Cu}(\text{TE1PA})]^+$ est inerte vis-à-vis de la réduction.

Ligand	H ₂ TE2A	H ₄ TE2P	HTE1PA
Log K_{Cu}	n.d.	26,5 ^a	25,5 ^b
pCu ^c	n.d.	n.d.	18,6
Inertie cinétique	46,2 min (HCl 5 M 90°C)	7 mois (HClO ₄ 5M, 25°C)	2,4 h (HClO ₄ 5M, 25°C)
E° vs ENH	-0,90 V	-0,45 V	-1,05 V (Fc/Fc ⁺)
Reversibilité	Irreversible	Irreversible	Quasi-réversible
Références	32	33	7

Tableau 3 – Propriétés physico-chimiques des complexes de Cu^{2+} dérivés du **H₂TE2A**, **H₄TE2P** et **H₁TE1PA**. ^a $I = 0,10$ M KCl à 25°C. ^b $I = 0,10$ M KNO_3 à 25°C. ^c $\text{pM} = -\log [M_{\text{libre}}^{n+}]$ à pH 7,4 avec $[\text{L}] = 10 \times [M^{n+}]_{\text{tot}} = 1.10^{-5}$ M. n.d. : non déterminé.

Ainsi $[\text{Cu}(\text{TE1PA})]^+$ remplit tous les critères pour une application en imagerie médicale. En effet, l'ajout du groupement picolinate sur le cyclam permet d'avoir un bon compromis en termes de stabilité cinétique thermodynamique et d'inertie vis-à-vis de la réduction.

2.3. Complexes de cuivre(II) dérivés de cyclams renforcés

Les dérivés de cyclam renforcés ont été conçus afin de développer des complexes de Cu^{2+} plus robustes *in vitro* et *in vivo*. La structure macrocyclique du cyclam peut être modifiée en introduisant un chaînon hydrocarboné supplémentaire entre deux atomes d'azote du macrocycle. Ces structures sont dites « renforcées » ou « contraintes » car elles adoptent des conformations plus rigides que le cyclam

(Figure 15). L'insertion d'un pont éthylénique entre deux amines secondaires opposées mène à des macrocycles de type *cross-bridged* (CB).³⁴ L'insertion d'un pont éthylénique entre deux amines secondaires adjacentes conduit à des macrocycles de type *side-bridged* (SB).³⁵ Des variantes de ligands renforcés existent, comme le cyclam fonctionnalisé par un pont propylène sur deux atomes d'azote en *trans* et sont dérivés du *propylene cross-bridged* (PCB) (Figure 15).^{36–38}

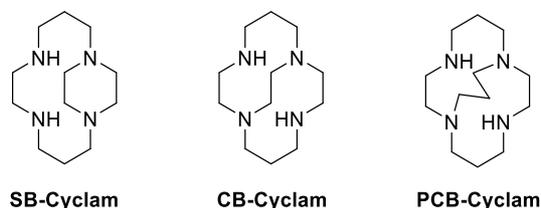


Figure 15 - Structure du SB-Cyclam, CB-Cyclam et PCB-Cyclam.

2.4. Complexes de cuivre(II) dérivés du cyclam *cross-bridged*

Le CB-Cyclam possède une première constante de protonation inhabituellement élevée dû à son caractère « éponge à protons » (Tableau 4).³⁴ Cette caractéristique rend plus difficile la déprotonation du macrocycle et par conséquent la complexation d'un cation métallique en milieu aqueux et à température ambiante. Ainsi les mesures des constantes de stabilité des complexes à base de cyclam *cross-bridged* sont limitées par ce phénomène. La seule valeur disponible est celle du $[\text{Cu}(\text{CB-Cyclam})]^{2+}$ ($\log K_{\text{Cu-CB-cyclam}} = 27,1$) qui est très proche de l'analogue non renforcé ($\log K_{\text{Cu-cyclam}} = 27,2$) où le caractère éponge à protons est moins prononcé.³⁹

Ligand	Cyclam	CB-Cyclam
Log K_1	11,54	12,42
Log K_2	10,53	10,2
Log K_3	2,43	1,39
Log K_4	1,97	n.d.
Log K_{CuL}^a	27,2	27,1
Références	3	3

Tableau 4 - Constantes de protonation du cyclam et CB-cyclam et de stabilité des complexes de Cu^{2+} . $^a I = 0,10 \text{ M}$ KCl à 25°C.

En revanche, l'inertie cinétique du CB-Cyclam est supérieure à celle de son analogue non-renforcé. $[\text{Cu}(\text{CB-cyclam})]^{2+}$ possède une inertie cinétique de 11,8 min en milieu acide (HCl 5M à 90°C) contre 3,8 min pour le complexe $[\text{Cu}(\text{cyclam})]^{2+}$.^{3,40}

Le complexe de Cu^{2+} dérivé du **H₂CB-TE2A** (Figure 16) a également une bonne inertie cinétique, avec une demi-vie de 154 h dans HCl 5M à 90°C (Tableau 5).⁴⁰ Le remplacement des bras acétate par des bras méthylphosphonate (Figure 16) diminue l'inertie cinétique des complexes qu'ils forment avec le

Cu²⁺ avec une demi-vie de 6,8 h et 3,8 h pour [Cu(**CB-TE1A1P**)]⁻ et [Cu(**CB-TE2P**)]²⁻ respectivement (**Tableau 5**).^{41,42}

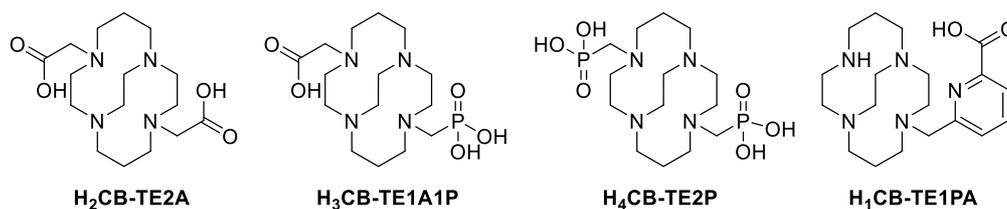


Figure 16 - Structure de **H₂CB-TE2A**, **H₃CB-TE1A1P**, **H₄CB-TE2P** et **H₁CB-TE1PA**.^{8,40,42}

Notre équipe a également décrit un complexe de cuivre(II) dérivé du CB-Cyclam fonctionnalisé par un groupement picolinate, le **H₁CB-TE1PA** (**Figure 16**). Le temps de demi-vie du complexe de Cu²⁺ a été estimé en milieu acide (HClO₄, 5 M, 25°C) à 96 jours, ce qui atteste de l'importante inertie du complexe. A noter que dans ce cas, la constante thermodynamique de stabilité du complexe [Cu(**CB-TE1PA**)]⁺ a pu être déterminée, son pCu est égale à 15,7, ce qui est légèrement inférieur au pCu de [Cu(**TE1PA**)]⁺ (pCu = 18,7) (**Tableau 5**).⁸

Les complexes [Cu(**CB-TE2A**)], [Cu(**CB-TE1A1P**)]⁻, [Cu(**CB-TE2P**)]²⁻ et [Cu(**CB-TE1PA**)]⁺ possèdent des potentiels de réduction se situant entre -0,88 V et -0,70 V les rendant peu sensibles à la réduction. Néanmoins, le complexe [Cu(**CB-TE1A1P**)]⁻ présente un système irréversible traduisant une dissociation du complexe après réduction du Cu²⁺ en Cu⁺ (**Tableau 5**).

Ligand	CB-Cyclam	H ₂ CB-TE2A	H ₃ CB-TE1A1P	H ₄ CB-TE2P	H ₁ CB-TE1PA
Log K _{CuL} ^a	27,1	n.d.	n.d.	n.d.	26,0
pCu ^b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	15,7
Inertie	11,8 min	154 h	6,8 h	3,8 h	96 j
cinétique	(HCl 1 M, 90°C)	(HCl 5 M, 90°C)	(HCl 5 M, 90°C)	(HCl 5 M, 90°C)	(HClO ₄ 5M, 25°C)
E° vs ENH	-0,32 V	-0,88 V	-0,80 V	-0,76 V	-0,70 V
Reversibilité	Réversible	réversible	quasi-réversible	quasi-réversible	quasi-réversible
Références	39,40	40	41	41,42	8

Tableau 5 - Propriétés physico-chimiques des ligands étudiés dans cette section. ^al = 0,10 M KNO₃ à 25°C. ^bpM = -log [M_{libre}ⁿ⁺] à pH 7,4 avec [L] = 10 x [Mⁿ⁺]_{tot} = 1.10⁻⁵ M. n.d. : non déterminé.

Parmi les ligands étudiés dans ce chapitre, les ligands **H₁TE1PA** et **H₁CB-TE1PA**, développés par notre équipe, donnent des complexes de Cu²⁺ thermodynamiquement stables, cinétiquement inertes et résistants vis-à-vis de la réduction. Ces ligands répondent donc au cahier des charges précédemment cité pour une application en imagerie médicale.

3. Exemples d'applications des dérivés de polyazacycloalcane pour des applications médicales

3.1. Chélato-thérapie

Le cuivre est un nutriment métallique essentiel qui est étroitement régulé dans notre corps, car la perte de son homéostasie est liée à des pathologies graves telles que la maladie d'Alzheimer. Par exemple, une implication possible du cuivre dans cette maladie pourrait se faire *via* son interaction avec le peptide β -amyloïde ($A\beta$) dont l'auto-aggrégation est caractéristique de cette maladie neuro-dégénérative. Ainsi, le complexe Cu- $A\beta$ formé induit la production d'espèces radicalaires oxygénées (ROS), en présence d'ascorbate, qui endommagent les cellules saines. La chélato-thérapie consiste à utiliser des ligands capables de retirer le Cu^{2+} du peptide ou d'interagir avec le complexe Cu- $A\beta$ pour en changer les propriétés.⁴³ Dans ce contexte, notre équipe a étudié la cinétique de complexation des ions Cu^{2+} par le cyclam, le **H₁TE1PA** et le **H₂TE2PA** (**Figure 17**) afin d'évaluer la capacité de ces ligands à extraire le cuivre(II) de la plaque amyloïde.

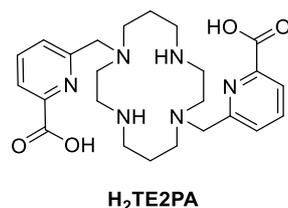


Figure 17 - Structure du **H₂TE2PA**.

Le suivi UV-Visible de la consommation en ascorbate a été réalisé car celle-ci reflète la production de ROS. La consommation en ascorbate diminue lorsque les ligands sont incubés avec le Cu- $A\beta$ (**Figure 18 (a)**), mettant en évidence que le cuivre a été retiré du peptide $A\beta$. Lorsque les ligands sont ajoutés en cours de production de ROS une chute de la consommation en ascorbate est également observée ce qui prouve que les ligands substitués par les groupements picolinate chélatent suffisamment rapidement les ions Cu^{2+} pour stopper la production de ROS (**Figure 18 (b)**).

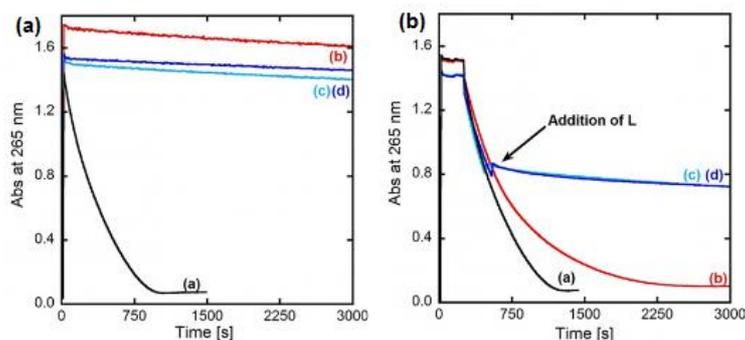


Figure 18 - Cinétiques de consommation de l'ascorbate suivi par UV-Visible à 265 nm. **(Gauche)** : (a) Aβ16 + Cu²⁺ + Asc, (b) Aβ16 + Cu²⁺ + cyclam + Asc, (c) Aβ16 + Cu²⁺ + **HTE1PA** + Asc, (d) Aβ16 + Cu²⁺ + **H₂TE2PA** + Asc. **(Droite)** : (a) Asc + Aβ16 + Cu²⁺, (b) Asc + Aβ16 + Cu²⁺ + cyclam, (c) Asc + Aβ16 + Cu²⁺ + **HTE1PA**, (d) Asc + Aβ16 + Cu²⁺ + **H₂TE2PA**. [L] = [Aβ16] = 12 μM, [Cu²⁺] = 10 μM, [Asc] = 100 μM, [HEPES] = 100 mM, pH 7,1. L = Ligand.

3.2. L'imagerie nucléaire

3.2.1. Le cuivre et la tomographie par émission de positons

La tomographie par émission de positons est un outil très utilisé pour diagnostiquer différentes pathologies telles que le cancer.⁴⁴ Un effort de recherche important a été consacré aux radiométaux tels que le ⁶⁴Cu²⁺ compte tenu de sa demi-vie de 12,7 h qui offre plus de possibilités que le fluor-18 (¹⁸F) actuellement très utilisé en clinique sous la forme du radiopharmaceutique 2-[¹⁸F]fluoro-2-désoxy-D-glucose (¹⁸F-FDG).⁴⁵ On retrouve, par exemple le ⁶⁴Cu²⁺, dans le radiopharmaceutique [⁶⁴Cu-(**DO3A-TATE**)]⁻ pour détecter les tumeurs neuroendocrines. Le **H₃DO3A** est fonctionnalisé par l'octréotate (TATE), un analogue de la somatostatine pour visualiser l'augmentation de l'expression des récepteurs de celle-ci.⁴⁶ Sur la **Figure 19**, l'image obtenue à l'aide d'un TEP-scan, donne des informations anatomiques avec des niveaux de gris correspondant à une différence de densité des tissus. Des lésions pancréatiques peuvent être observées, matérialisées par des tâches plus lumineuses correspondant à une accumulation du radiopharmaceutique.

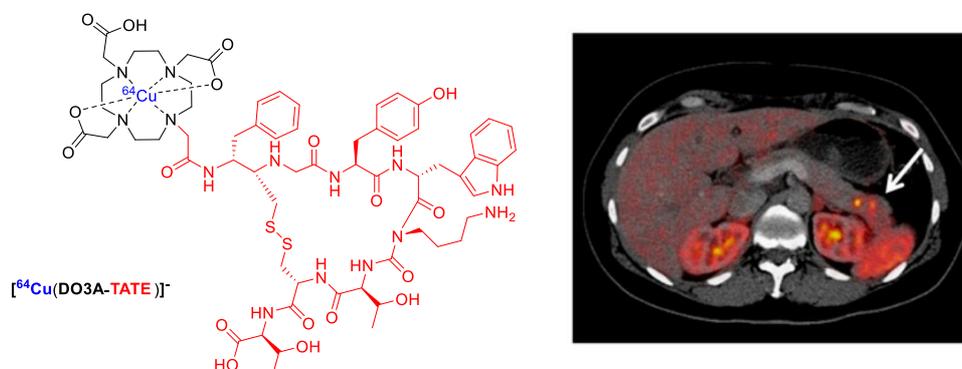


Figure 19 - Structure du [⁶⁴Cu(**DO3A-TATE**)]⁻ et TEP-scan d'une tumeur neuroendocrine pancréatique après marquage au [⁶⁴Cu-(**DO3A-TATE**)]⁻. La flèche blanche indique la localisation de la tumeur.⁴⁶

L'imagerie TEP n'est pas limitée à l'imagerie des cellules cancéreuses. En effet, des études ont permis également l'utilisation de la TEP pour la détection des lésions inflammatoires,⁴⁷ de maladies neurodégénératives⁴⁸ ou cardiovasculaires.⁴⁹ Le principe de l'imagerie TEP sera décrit de manière plus détaillée au cours du **Chapitre 3**.

III. Les polyazacycloalcanes et les lanthanides

De par leur taille et leur configuration électronique, les ions lanthanides trivalents possèdent des propriétés physico-chimiques singulières et différentes des métaux de transition. Cette partie a pour objectif de décrire les propriétés intrinsèques des lanthanides qui serviront à mieux appréhender leur chimie de coordination. L'intérêt des sondes luminescentes en imagerie cellulaire sera également décrit et nous amènera à présenter les attentes auxquelles ces sondes doivent répondre.

1. Coordination des lanthanides

La famille des lanthanides, constituée de 15 éléments, s'étend du lanthane ($Z = 57$) au lutécium ($Z = 71$) et appartient au bloc $4f$ du tableau périodique des éléments. La perte d'électrons de la sous-couche $5d$ et $6s$ conduit à l'ion lanthanide trivalent (Ln(III) ou Ln^{3+}) de configuration électronique $[\text{Xe}]4f^n$ ($n = 0 - 14$) qui est le degré d'oxydation le plus stable. Une diminution progressive du rayon ionique est observée avec l'augmentation du numéro atomique (**Tableau 6**). Cette tendance, également dépendante du nombre de coordination du métal, est connue sous le nom de contraction lanthanidique.⁵⁰

Lanthanide	Z	Symbole	Configuration électronique (Ln)	Configuration électronique (Ln^{3+})	Rayon ionique (Å)
Lanthane	57	La	$[\text{Xe}] 4f^0 5d^1 6s^2$	$[\text{Xe}] 4f^0$	1,16
Cérium	58	Ce	$[\text{Xe}] 4f^1 5d^1 6s^2$	$[\text{Xe}] 4f^1$	1,143
Praséodyme	59	Pr	$[\text{Xe}] 4f^2 5d^0 6s^2$	$[\text{Xe}] 4f^2$	1,126
Néodyme	60	Nd	$[\text{Xe}] 4f^3 5d^0 6s^2$	$[\text{Xe}] 4f^3$	1,109
Prométhium	61	Pm	$[\text{Xe}] 4f^4 5d^0 6s^2$	$[\text{Xe}] 4f^4$	1,092
Samarium	62	Sm	$[\text{Xe}] 4f^5 5d^0 6s^2$	$[\text{Xe}] 4f^5$	1,079
Europium	63	Eu	$[\text{Xe}] 4f^6 5d^0 6s^2$	$[\text{Xe}] 4f^6$	1,066
Gadolinium	64	Gd	$[\text{Xe}] 4f^7 5d^1 6s^2$	$[\text{Xe}] 4f^7$	1,053
Terbium	65	Tb	$[\text{Xe}] 4f^8 5d^0 6s^2$	$[\text{Xe}] 4f^8$	1,040
Dysprosium	66	Dy	$[\text{Xe}] 4f^9 5d^1 6s^2$	$[\text{Xe}] 4f^9$	1,027
Holmium	67	Ho	$[\text{Xe}] 4f^{10} 5d^1 6s^2$	$[\text{Xe}] 4f^{10}$	1,015

Erbium	68	Er	[Xe] 4f ¹¹ 5d ¹ 6s ²	[Xe] 4f ¹¹	1,004
Thulium	69	Tm	[Xe] 4f ¹² 5d ¹ 6s ²	[Xe] 4f ¹²	0,994
Ytterbium	70	Yb	[Xe] 4f ¹³ 5d ⁰ 6s ²	[Xe] 4f ¹³	0,985
Lutécium	71	Lu	[Xe] 4f ¹⁴ 5d ⁰ 6s ²	[Xe] 4f ¹⁴	0,977

Tableau 6 – Caractéristiques des ions lanthanides(III). Z = Numéro atomique.⁵¹

L'interaction Ln-ligand est essentiellement régie par des interactions électrostatiques et stériques. L'organisation des complexes est donc gouvernée par la minimisation de ces interactions sans réelle préférence en termes de nombre de coordination ou de géométrie. Ainsi leur géométrie est difficile à prévoir car l'ion Ln³⁺ complétera sa sphère de coordination en se liant à de petites molécules ou à des anions (eau, chlorure, hydroxyde,...) si le nombre de sites offerts par le ligand est trop faible.⁵² Ainsi, le nombre de coordination le plus fréquemment rencontré des ions Ln³⁺ est de 8 ou 9, mais il peut varier de 6 à 12.⁵¹

En solution, les ions Ln³⁺ du début de la série lanthanidique (La-Nd) adoptent une géométrie de type prismatique trigonale tricapée (TTP) nonacoordinée, qui est progressivement transformée en géométrie antiprismatique carrée (SAP) octacoordinée pour les ions lanthanides de la fin de la série (Tb-Lu) (**Figure 20**).

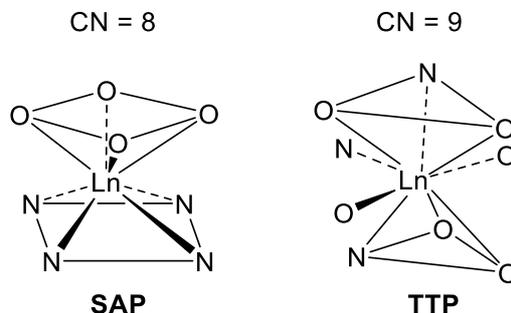


Figure 20 - Géométries des complexes de lanthanides(III) en fonction du nombre de coordination.⁵²

2. Propriétés magnétiques

A l'exception du lanthane et du lutécium, tous les ions lanthanides possèdent des électrons 4f non appariés et sont paramagnétiques. Parmi eux, l'ion Gd³⁺ a été très étudié. En effet, ses 7 électrons non appariés ($S = 7/2$) lui confèrent un moment magnétique élevé. Cette caractéristique fait des complexes de Gd³⁺ des agents de contraste très performants pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM).⁵³ A titre d'exemple, le Dotarem®, complexe de Gd³⁺ dérivé du **H₄DOTA**, est l'un des agents de contraste les plus utilisés en médecine. L'utilisation de l'Eu³⁺ avec ces 6 électrons non appariés a également fait l'objet d'une attention particulière pour le développement d'agents de contraste paraCEST. Par

exemple, Sherry et *al.* ont décrit le complexe $[\text{Eu}(\text{DOTAM-Phen})]^{3+}$ pour la détection d'oxygène singulet par imagerie CEST (**Figure 21**).⁵⁴

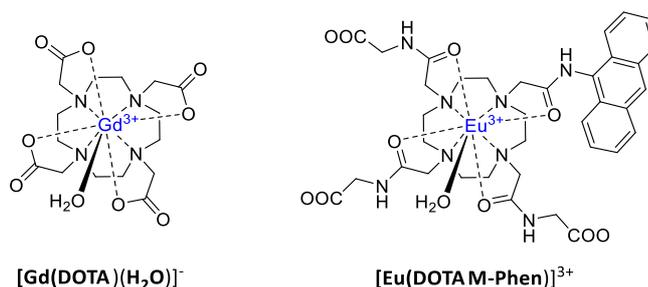


Figure 21 - Structure du Dotarem® et de $[\text{Eu}(\text{DOTAM-Phen})]^{3+}$.^{53,54}

3. Complexes de lanthanides à base de polyazacycloalcanes

3.1. Polyazacycloalcanes *N*-acétate

Selon la théorie HSAB, les ions lanthanides sont des acides durs, ils forment donc des édifices stables préférentiellement avec des ligands contenant des atomes d'oxygène ou d'azote. A l'instar du Cu^{2+} , les polyazacycloalcanes fonctionnalisés par des groupements acétate ont été très étudiés pour des applications en IRM, en médecine nucléaire ou en microscopie de fluorescence.^{4,55,56} Parmi eux, les complexes de Ln^{3+} dérivés du **H₄DOTA** (**Figure 22**) présentent les constantes de stabilité les plus élevées ($\log K_{\text{LnL}} = 22,9\text{-}25,4$) de la littérature.²⁴ D'autres chélates de Ln^{3+} dérivés du **H₃NOTA** ou **H₄TETA** (**Figure 22**), ont également été étudiés même si leur stabilité thermodynamique est plus faible que ceux dérivés du **H₄DOTA**. Les constantes de stabilité thermodynamique de différents complexes de lanthanides sont résumées dans le **Tableau 7**.

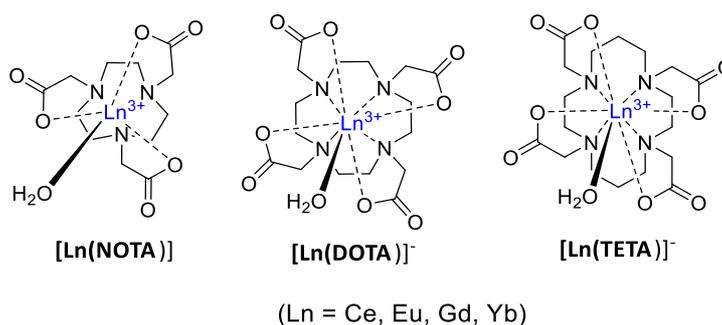


Figure 22 – Structure de $[\text{Ln}(\text{NOTA})]$, $[\text{Ln}(\text{DOTA})]^-$ et $[\text{Ln}(\text{TETA})]^-$.

On peut noter que la stabilité thermodynamique des complexes de Ln^{3+} des dérivés **H₃NOTA**, **H₄DOTA** et **H₄TETA** suit la tendance suivante : **H₃NOTA** ~ **H₄TETA** < **H₄DOTA**. Les complexes $[\text{Ln}(\text{NOTA})]$ et $[\text{Ln}(\text{TETA})]^-$ sont de huit ordres de grandeurs moins stables que les analogues $[\text{Ln}(\text{DOTA})]^-$.⁵⁷ La taille du macrocycle de **H₃NOTA** est trop petite pour être adaptée aux ions Ln^{3+} . **H₄TETA** forme des métallocycles à six chaînons avec les ions métalliques. Ces cycles sont connus pour être stériquement

plus encombrés que les cycles à cinq chaînons, ce qui entraîne une diminution progressive de la stabilité des complexes de Ln^{3+} au fur et à mesure que le rayon ionique augmente.

L'inertie cinétique des complexes $[\text{Gd}(\text{NOTA})]$, $[\text{Gd}(\text{DOTA})]^-$ et $[\text{Gd}(\text{TETA})]^-$ suit la même tendance. A titre d'exemple, le complexe $[\text{Gd}(\text{DOTA})]^-$ possède une constante de dissociation de $5.10^{-10} \text{ s}^{-1}$ et est plus inerte que $[\text{Gd}(\text{NOTA})]$ et $[\text{Gd}(\text{TETA})]^-$ avec des constantes de dissociation de $7,1.10^{-6} \text{ s}^{-1}$ et $8,3.10^{-4} \text{ s}^{-1}$, respectivement.^{58,59}

Ligand	H ₃ NOTA	H ₄ DOTA	H ₄ TETA
Log K_{Ce}^a	13,2	23,4	13,1
pCe ^b	8,6	16,4	7,3
Log K_{Eu}^a	13,9	23,5	14,7
pEu ^b	9,3	16,5	8,7
Log K_{Gd}^a	14,3	24,6	15,8
pGd ^b	9,7	17,6	8,8
Log K_{Yb}^a	15,4	25,0	n.d.
pYb ^b	9,8	18,0	n.d.
Références	57	57	57

Tableau 7 - Constantes de stabilité de complexes de Ln^{3+} dérivés du **H₃NOTA**, **H₄DOTA** et **H₄TETA**. ^a $I = 1,0 \text{ M KCl}$ à 25°C , ^bpM = $-\log [M_{\text{libre}}^{n+}]$ à pH 7,4 calculé avec $[L] = 10 \times [M^{n+}]_{\text{tot}} = 1.10^{-5} \text{ M}$. n.d. : non déterminé.

3.2. Ligands dérivés du picolinate

Bien que les complexes de lanthanides dérivés des ligands **H₃NOTA** et **H₄TETA** présentent des stabilités thermodynamiques et cinétiques inférieures à leurs analogues dérivés du **H₄DOTA**, l'introduction de groupements picolinate sur différentes plateformes macrocycliques (tacn, cyclen, cyclam), a permis de former des complexes de Ln^{3+} plus stables et plus inertes.

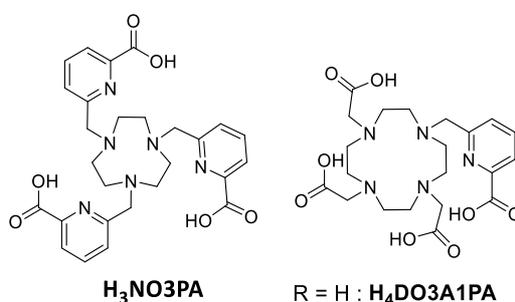


Figure 23 - Structure de **H₃NO3PA** et **H₄DO3A1PA**.^{60,61}

Nonat et *al.* ont décrit le ligand **H₃NO3PA** (**Figure 23**), un tacn fonctionnalisé par trois groupements picolinate. L'apport de ces bras coordinants permet d'obtenir un complexe de Tb³⁺ neutre nonacoordiné avec des constantes de stabilité élevées ($\log K_{TbL} = 17,4$; $pM = 14,9$, **Tableau 8**).⁶²

Platas-Iglesias et *al.* ont décrit des complexes anioniques nonacoordinés d'Eu³⁺ et de Tb³⁺ dérivés du **H₃DOTA** où un groupement acétate a été remplacé par un groupement picolinate (**Figure 23**). L'étude des constantes de stabilité a été réalisée sur le ligand **H₄DO3A1PA** et montre des constantes $\log K_{LnL}$ proches voire similaires à celles des complexes de lanthanides dérivés du **H₄DOTA** (**Tableau 8**).⁶¹

Notre laboratoire a également décrit une série de complexes de Ln³⁺ basés sur un cyclen *trans* di-*N*-substitué par deux groupements picolinate (**H₂DO2PA**) et avec deux substituants méthyle supplémentaires (**H₂MeDO2PA**) (**Figure 24**). Les complexes de Ln³⁺ obtenus sont octacoordinés (Ln = La, Eu, Gd, Tb, Yb, Lu) et cationiques.^{20,63}

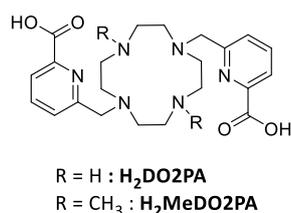


Figure 24 - Structure des ligands **H₂DO2PA** et **H₂MeDO2PA**.^{20,63}

Les constantes de stabilité thermodynamique montrent que les ligands **H₂DO2PA** et **H₂MeDO2PA** ont une bonne affinité avec l'ion Gd³⁺ avec des constantes de stabilité $\log K_{GdL}$ égales à 17,3 et 17,6, respectivement (**Tableau 8**). Cependant, ces valeurs sont en deçà de celles des complexes de Gd³⁺ dérivés du **H₄DOTA** et du **H₄DO3A1PA**.⁶³

Par ailleurs, le complexe [Gd(**MeDO2PA**)]⁺ présente une inertie supérieure au complexe [Gd(**DO2PA**)]⁺ avec des demi-vies égales à 127 h et 10,7 h, respectivement. L'ajout de deux groupements méthyle induit une augmentation de la rigidité et se traduit par une amélioration de l'inertie cinétique du complexe.⁶³

Ligand	H ₃ NOTA	H ₃ NO3PA	H ₄ DOTA	H ₃ DO3A1PA	H ₂ DO2PA	H ₂ MeDO2PA
Log K _{Gd}	14,3 ^b	n.d.	24,6 ^b	23,3 ^b	17,3 ^d	17,6
pGd ^a	9,7	n.d.	17,6	n.d.	n.d.	n.d.
Log K _{Eu}	13,9 ^b	n.d.	23,5 ^b	23,5 ^b	n.d.	n.d.
pEu ^a	9,3	n.d.	16,5	n.d.	n.d.	n.d.
Log K _{Tb}	n.d.	17,4 ^c	24,2 ^b	n.d.	n.d.	n.d.
pTb ^a	n.d.	14,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Références	57	62	24	61	63	63

Tableau 8 – Constantes de stabilité des complexes de Ln³⁺ à base de H₃NOTA, H₃NO3PA, H₃DOTA, H₃DO3A1PA, H₂DO2PA et H₂MeDO2PA. ^apM = -log [M_{libre}ⁿ⁺] à pH 7,4 avec [L] = 10 x [Mⁿ⁺]_{tot} = 1.10⁻⁵ M. ^bI = 0,10 M KCl, ^cI = 1,0 M KCl, ^dI = 0,15 M NaCl. n.d. : non déterminé.

Bien que les dérivés de cyclam ne semblent pas adaptés à la coordination des ions lanthanides Ln³⁺, notre équipe a étudié le ligand **H₂CB-TE2PA**, cyclam renforcé substitué par deux groupements picolinate qui a conduit à des complexes de lanthanides(III) octacoordinés exceptionnellement inertes (**Figure 25**).⁶⁴ Les études d'inertie sur le complexe [Eu(CB-TE2PA)]⁺ ont montré l'absence de dissociation même après 5 mois dans HCl 2M.

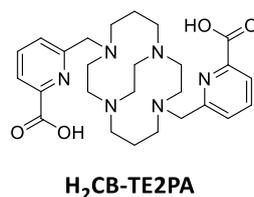


Figure 25 - Structure du ligand H₂CB-TE2PA.⁶⁴

Cependant, la contre-partie d'une excellente inertie cinétique est la difficulté à y insérer les ions Ln³⁺. En effet, le caractère éponge à protons du ligand rend sa déprotonation et l'introduction du cation métallique difficiles. En conséquence, le processus de complexation s'accompagne d'une cinétique de formation très lente. La réaction entre les ions Ln³⁺ (Ln = La, Eu, Gd, Tb et Yb) et le ligand **H₂CB-TE2PA** nécessite des conditions très difficiles (solvants organiques polaires à point d'ébullition élevé, base organique, conditions anhydres, réaction sous micro-ondes) pour former le complexe associé.

Parmi les ligands présentés, les polyazacycloalcanes N-fonctionnalisés par des groupements picolinate possèdent les caractéristiques les plus attrayantes, notamment pour former des complexes de lanthanides(III) très inerte, pour envisager l'élaboration de sondes destinées à une application en imagerie optique.

4. Propriétés luminescentes

Les transitions $f-f$, faisant intervenir des orbitales de même symétrie, sont formellement interdites par les règles de symétrie de Laporte. En conséquence, les transitions $f-f$ apparaissent sous forme de fines raies d'émission de faible intensité et sont caractéristiques de chaque ion Ln^{3+} . A l'exception du lanthane et du lutécium, tous les ions Ln^{3+} sont luminescents et leurs bandes d'émission couvrent une large gamme spectrale allant de l'ultra-violet (Gd^{3+}) au proche infrarouge (Nd^{3+} , Er^{3+} , Yb^{3+}), en passant par le visible (Sm^{3+} , Eu^{3+} , Tb^{3+} , Dy^{3+}) (**Figure 26**). Les ions Ln^{3+} sont également caractérisés par un faible coefficient d'absorption ($\epsilon < 100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et par une durée de vie d'émission très longue due également au caractère interdit des transition $f-f$.⁶⁵

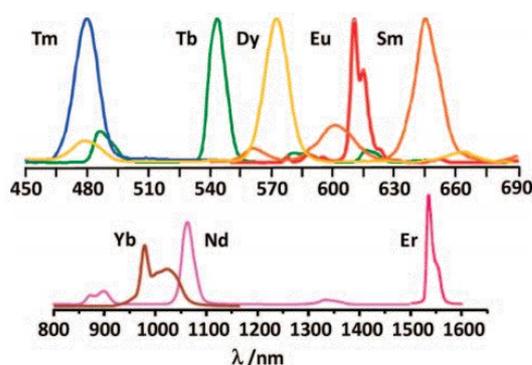


Figure 26 - Spectres d'émission des ions lanthanides en solution.⁶⁵

Du fait de la faible absorption des ions Ln^{3+} , leur excitation directe ne donne pas nécessairement une forte luminescence, à moins d'utiliser une puissance d'excitation considérable au moyen d'un laser. Une alternative consiste à associer l'ion Ln^{3+} à une entité moléculaire capable d'absorber et de transférer efficacement l'énergie aux ions Ln^{3+} *via* un processus de sensibilisation, appelé "*effet d'antenne*", illustré sur la **Figure 27**.

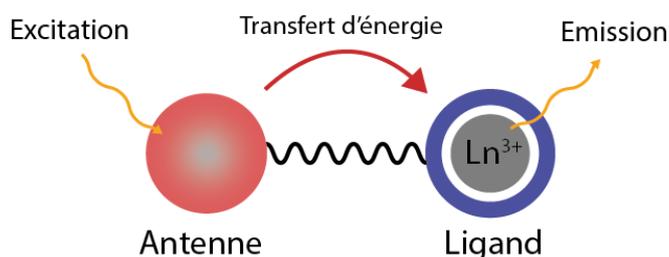


Figure 27 - Schéma du processus de l'effet antenne.

4.1. L'effet antenne

Weissman et *al.* ont d'abord montré qu'il était possible de peupler les états excités des ions lanthanides lorsqu'ils sont coordonnés à des dérivés de phénols ou de β -dicétones.⁶⁶ Ils ont correctement

interprété ce phénomène de transfert d'énergie du ligand à l'ion métallique comme étant un processus de sensibilisation.

Le mécanisme communément accepté du transfert d'énergie de l'antenne vers l'ion Ln^{3+} est celui de Crosby et Whan,⁶⁷ et se déroule généralement en trois étapes:

- Absorption d'un photon par l'antenne
- Transfert d'énergie sur l'ion métallique Ln^{3+}
- Emission centrée sur le métal

Un schéma simplifié des différents mécanismes d'effet antenne est présenté sur la **Figure 28**. Le processus global est assez complexe et implique différentes voies possibles.

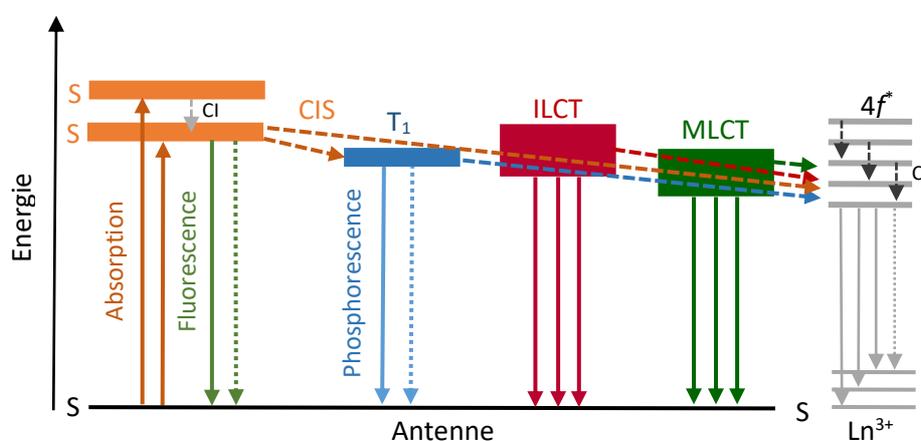


Figure 28 - Illustration des différentes voies de sensibilisation des ions Ln^{3+} par effet d'antenne et des différents processus radiatifs (flèches pleines) et non radiatifs (flèches en pointillé). CI = Conversion Interne, CIS = Conversion Intersystème, S = Singulet, ILCT = Intra-Ligand Charge Transfer, T = Triplet, MLCT = Metal-to-Ligand Charge Transfer.

Initialement, d'après les travaux fondateurs de Crosby et *al.*, le seul mécanisme de transfert d'énergie pris en compte dans la conception des chélates de Ln^{3+} luminescents était celui faisant intervenir l'état triplet de l'antenne.⁶⁷ Toutefois, le développement de ligands capables de sensibiliser les lanthanides *via* le processus ILCT (*Intra-Ligand Charge Transfer*) a connu un essor à partir de 2004 notamment pour des applications en optique non linéaire. Wang et *al.* ont prouvé qu'il était possible de sensibiliser l' Eu^{3+} *via* une antenne présentant un état ILCT, l'état triplet n'intervenant pas dans le processus.⁶⁸ D'autres voies comme le passage par un état MLCT (*Metal-to-Ligand Charge Transfer*) ou la sensibilisation par des métaux de transition ont également été établies.^{69,70}

Le choix de l'antenne est important dans la sensibilisation de l'ion Ln^{3+} . En effet, l'efficacité de l'antenne est liée à l'énergie de son état excité, qui doit être d'au moins 1850 cm^{-1} supérieure au niveau d'émission le moins énergétique de l'ion Ln^{3+} . Un écart énergétique trop faible limite fortement la

luminescence du lanthanide dû à un phénomène de transfert en retour vers le niveau excité de l'antenne.⁵⁰

4.2. La brillance et le rendement quantique

L'intensité de fluorescence ou « brillance » d'une sonde est déterminée par le produit du coefficient d'extinction ε et du rendement quantique ϕ selon l'équation suivante :

$$(eq. 3) \quad B^{(1)} = \varepsilon \cdot \phi$$

Le rendement quantique d'un complexe représente le rapport entre le nombre de photons émis par le lanthanide sur ceux absorbés par l'antenne. Ce paramètre est lié à l'efficacité du croisement intersystème (η_{CIS}), au transfert d'énergie (η_{TE}) entre l'état excité de l'antenne et les niveaux émissifs du lanthanide et au rendement quantique intrinsèque de l'ion métallique (ϕ_{Ln}^{Ln}) (eq. 4). Ce dernier paramètre peut être calculé par le rapport de τ_{obs} sur τ_{rad} (eq. 5) qui correspondent respectivement aux durées de vie de l'état excité et radiatif.^{71,72}

$$(eq. 4) \quad \phi = \eta_{CIS} \times \eta_{TE} \times \phi_{Ln}^{Ln}$$

$$(eq. 5) \quad \phi_{Ln}^{Ln} = \frac{\tau_{obs}}{\tau_{rad}}$$

Il est à noter que plus la valeur τ_{rad} est grande, plus le processus de luminescence est probable et alors l'excès d'énergie accumulé par l'antenne se dissipera plus facilement par la voie radiative. Ainsi, un rendement quantique élevé ne nécessite pas obligatoirement une valeur de τ_{obs} élevée.

4.3. Relaxations non radiatives

Les relaxations non radiatives vibrationnelles liées aux oscillateurs O-H représentent une préoccupation majeure dans la conception de complexes de lanthanides luminescents.⁷³ En solution aqueuse, il est courant que la sphère de coordination d'un métal soit complétée par une ou plusieurs molécules d'eau qui peuvent éteindre la luminescence de l'ion Ln^{3+} . Pour cela, la présence d'oscillateur O-H dans la première ou seconde sphère de coordination du lanthanide doit être minimisée. Afin d'éviter ces relaxations indésirées, les complexes dont la sphère de coordination est saturée sont alors privilégiés.⁷¹

Une relation entre la durée de vie de luminescence dans l'eau et dans l'eau deutérée permet de calculer empiriquement le nombre de molécules d'eau coordonnées au lanthanide. Cette équation développée par Horrocks⁷⁴ et corrigée quelques années plus tard par Beeby⁷⁵ (eq. 6) a été d'une grande utilité pour comprendre la chute de la durée de vie de luminescence des ions Ln^{3+} :

$$(eq. 6) \quad q = A(k_{H_2O} - k_{D_2O} + \alpha)$$

Les valeurs des paramètres A et α dépendent du lanthanide étudié, avec $\alpha = -0, 25 \text{ ms}^{-1}$, $-0,20 \text{ ms}^{-1}$ et $-0,075 \text{ ms}^{-1}$ pour l' Eu^{3+} , le Tb^{3+} et l' Yb^{3+} respectivement et avec $k_{H_2O} = 1/\tau_{\text{obs}(H_2O)}$ et $k_{D_2O} = 1/\tau_{\text{obs}(D_2O)}$. La **Figure 29** permet également de mettre en exergue la sensibilité des ions Ln^{3+} qui émettent dans le proche infrarouge vis-à-vis des oscillateurs OH. A titre d'exemple, seulement trois oscillateurs O-H peuvent éteindre la luminescence de l' Yb^{3+} tandis que six oscillateurs sont nécessaires pour l' Eu^{3+} .

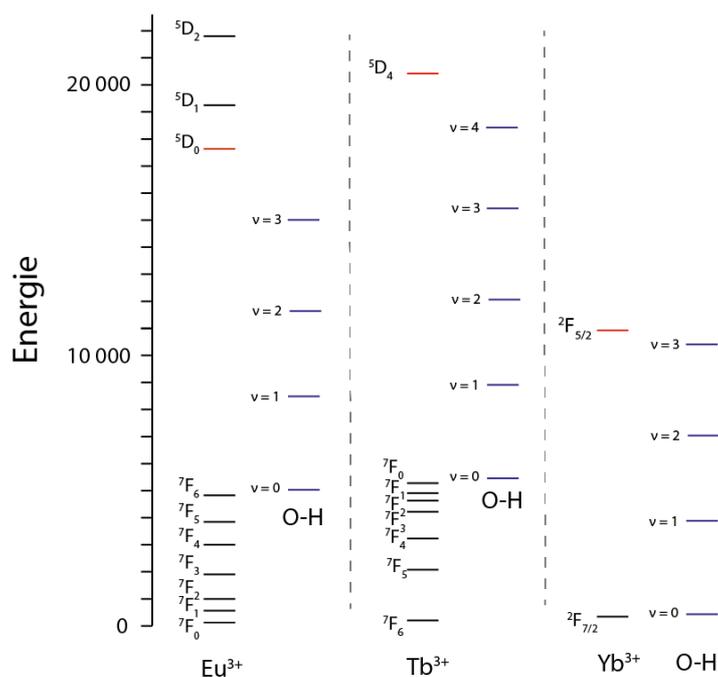


Figure 29 - Comparaison des principaux niveaux luminescents (rouge) de l' Eu^{3+} , du Tb^{3+} et de l' Yb^{3+} et le nombre d'oscillateurs OH (bleu) pour les inhiber.

En résumé, le temps de vie de luminescence et le rendement quantique des lanthanides sont dépendants de l'environnement. Selon le lanthanide, l'extinction de la luminescence par ces vibrateurs est plus ou moins marquée, tout particulièrement pour les émetteurs dans le proche infrarouge qui possèdent un gap énergétique plus faible entre l'état fondamental et le premier état émissif.

4.4. Généralités sur la conception de sondes luminescentes à base de Ln^{3+}

A l'instar des complexes de Cu^{2+} , la conception d'un complexe de lanthanide(III) doit remplir certains critères pour des applications en imagerie optique. Ainsi, quelques lignes directrices peuvent être énoncées en considérant les propriétés optiques et physico-chimiques des lanthanides précédemment exposées

- **Stabilité cinétique et thermodynamique**

Le ligand doit fournir suffisamment d'atomes donneurs pour satisfaire la sphère de coordination du lanthanide permettant d'éviter un relargage en milieu biologique (cf. **Chapitre 1**, page 26).

- **Une sensibilisation efficace du lanthanide**

L'antenne doit avoir une forte absorption. De plus, son état excité doit être plus énergétique d'au moins 1850 cm^{-1} pour que l'effet antenne se produise au risque d'avoir un phénomène de transfert en retour.⁵⁰

- **Minimisation des processus non radiatifs**

Le ligand doit posséder un nombre d'atomes donneurs adéquat pour éviter la coordination de molécule d'eau dans la sphère de coordination du lanthanide, ce qui aurait pour conséquence une extinction de la luminescence.

- **Internalisation en milieu cellulaire**

Pour une application en milieu biologique, la sonde doit s'internaliser en milieu cellulaire. Des récents travaux ont démontré que les complexes monocationiques s'internalisent mieux que leurs analogues neutres.^{76,77}

4.5. Exemples de complexes luminescents

Ainsi, pour obtenir des complexes fortement luminescents, les stratégies suivies consistent à offrir aux lanthanides(III) une saturation de sa sphère de coordination (entre 8 et 10 atomes donneurs selon la taille de l'ion Ln^{3+}), afin d'améliorer la stabilité du complexe et d'empêcher la coordination de molécules de solvant ou d'anions. Pour ce faire, le **H₄DOTA** a été très étudié pour le développement de sondes luminescentes à base de lanthanides. Cela a consisté à remplacer un bras acétate par une antenne permettant d'améliorer les propriétés spectroscopiques des complexes de lanthanides dérivés de **H₄DOTA** au détriment de leur stabilité.

Barigeletti et *al.* ont décrit des complexes d' Eu^{3+} et de Tb^{3+} sensibilisés par un groupement phénanthroline (**Figure 30**). Ce groupement se coordine au lanthanide empêchant la coordination d'une molécule d'eau ($q = 0,0-0,2$). Les rendements quantiques atteignent 21 % pour le complexe $[\text{Eu}(\text{DOTA-Phen})]$ et 11 % pour le complexe $[\text{Tb}(\text{DOTA-Phen})]$ sous excitation dans le visible ($\lambda_{\text{exc}} = 278 \text{ nm}$).⁷⁸

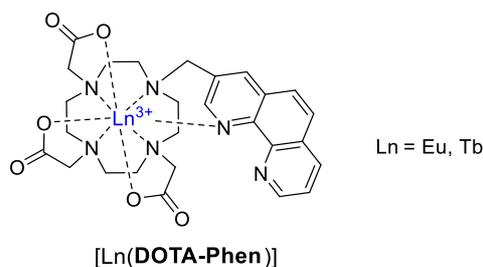


Figure 30 - Structure de [Ln(DOTA-Phen)].⁷⁸

Parker et *al.* ont également décrit des complexes de Tb³⁺ et d'Eu³⁺ dérivés du H₃DOTA fonctionnalisé par une antenne de type 3-pyrazolyl-4-azaxanthone ([Ln(DOTA-PyrAz)], **Figure 31**). L'antenne permet de sensibiliser l'Eu³⁺ et le Tb³⁺ dans le visible ($\lambda_{exc} = 355$ nm). La mesure du nombre d'hydratation a montré l'absence de molécules d'eau dans la sphère de coordination du Tb³⁺, cependant une monohydratation est observée pour le complexe analogue d'Eu³⁺ ($q = 0,73$). La coordination d'une molécule d'eau a un réel impact sur les propriétés spectroscopiques puisque le complexe [Eu(DOTA-PyrAz)] possède un rendement quantique de 1,2 % alors que le complexe de Tb³⁺ possède un rendement quantique élevé de 15%.⁷⁹

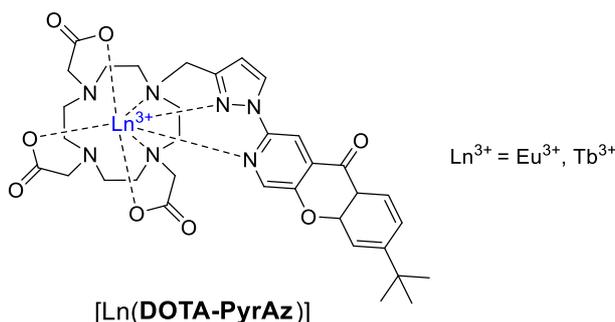


Figure 31 - Structure du [Ln(DOTA-PyrAz)].⁷⁹

Nous avons vu précédemment que les unités picolinate peuvent jouer le rôle d'antenne. En effet, l'étude des propriétés spectroscopiques des complexes montre que les complexes à base de Tb³⁺ dérivés de H₃NO3PA, H₄DO3A1PA et H₄DO3A1PA-OMe ont d'excellents rendements quantiques de fluorescence (entre 56 et 60 %) tandis que ceux à base d'Eu³⁺ ont été évalués à 9 % pour le complexe [Eu(NO3PA)], 24 % pour [Eu(DO3A1PA)]⁻ et 9 % pour [Eu(DO3A1PA-OMe)]⁻ (**Figure 23** et **Figure 24**). Cette dernière valeur montre que l'ajout d'un groupement méthoxy ne permet pas d'améliorer la luminescence de l'Eu³⁺ (**Tableau 9**) et favorise sûrement le phénomène de transfert en retour.^{61,62}

Complexes	λ_{abs} (nm)	ϕ_{H_2O} (%)	τ_{H_2O} (ms)	q
[Eu(NO ₃ PA)]	274	9	1,70	0,0
[Eu(DO3A1PA)] ⁻	275	24	1,06	0,2
[Eu(DO3A1PA-OMe)] ⁻	271	9	1,13	0,1
[Tb(NO ₃ PA)]	274	60	2	0,0
[Tb(DO3A1PA)] ⁻	275	56	2,90	0,1
[Tb(DO3A1PA-OMe)] ⁻	276	58	2,89	0,2

Tableau 9 – Propriétés spectroscopiques des complexes de lanthanides discutés dans cette section.^{61,62}

Pour une application en imagerie optique, notre groupe a étudié les propriétés spectroscopiques des complexes d'Eu³⁺ et de Tb³⁺ à base de **H₂DO2PA** et **H₂MeDO2PA** et **H₂CB-TE2PA** (**Tableau 10**). Par l'intermédiaire de l'équation de Beeby (eq. 6), notre équipe a montré que le ligand **H₂DO2PA** présentent la monohydratation attendue ($q(\text{Eu}) = 1,1$ et $q(\text{Tb}) = 0,6$). Au contraire, le ligand **H₂MeDO2PA** se distingue par l'absence de coordination de molécule d'eau. Ces résultats sont corrélés par les études DFT qui ont montré que l'ajout de groupements méthyle permet de rigidifier la structure et d'exclure toute coordination de molécule d'eau même si les complexes sont octacoordinés.²⁰ Les études par diffraction des rayons X du complexe [Yb(**CB-TE2PA**)]⁺ a permis également de confirmer l'absence de molécule d'eau dans la sphère de coordination du lanthanide compte tenu de la rigidité de la structure du macrocycle apportée par le pont éthylène.⁶⁴

Complexe	λ_{abs} (nm)	τ_{H_2O} (ms)	τ_{D_2O} (ms)	q
[Eu(DO2PA)] ⁺	272	0,26	0,39	1,1
[Tb(DO2PA)] ⁺	272	1,18	1,51	0,6
[Eu(MeDO2PA)] ⁺	272	0,91	1,27	0,0
[Tb(MeDO2PA)] ⁺	272	2,39	2,68	0,0
[Eu(CB-TE2PA)] ⁺	n.d.	0,71	1,15	0,3

Tableau 10 - Propriétés spectroscopiques des complexes de Ln³⁺ dérivés de **H₂DO2PA** et **H₂MeDO2PA** et **H₂CB-TE2PA**.^{20,64}

5. Application des sondes luminescentes en imagerie biologique

5.1. Dosage homogène fluoroimmunologique

L'un des premiers systèmes fluoroimmunologiques basé sur la luminescence des lanthanides est le système DELFIA® (*Dissociation Enhanced Lanthanide Fluoro ImmunoAssay*).⁸⁰ Cette technique utilise un anticorps spécifique marqué à l'aide d'un chélate d'euporium présentant une luminescence faible et permet la reconnaissance de l'analyte. Suite à la fixation de l'anticorps à l'antigène et à un lavage

par une solution de ligand β -dicétone, les ions Eu^{3+} sont dissociés et relargués en milieu acide. Ils forment alors une micelle luminescente qui va permettre de quantifier le biomarqueur à partir de l'intensité de la luminescence (**Figure 32**).

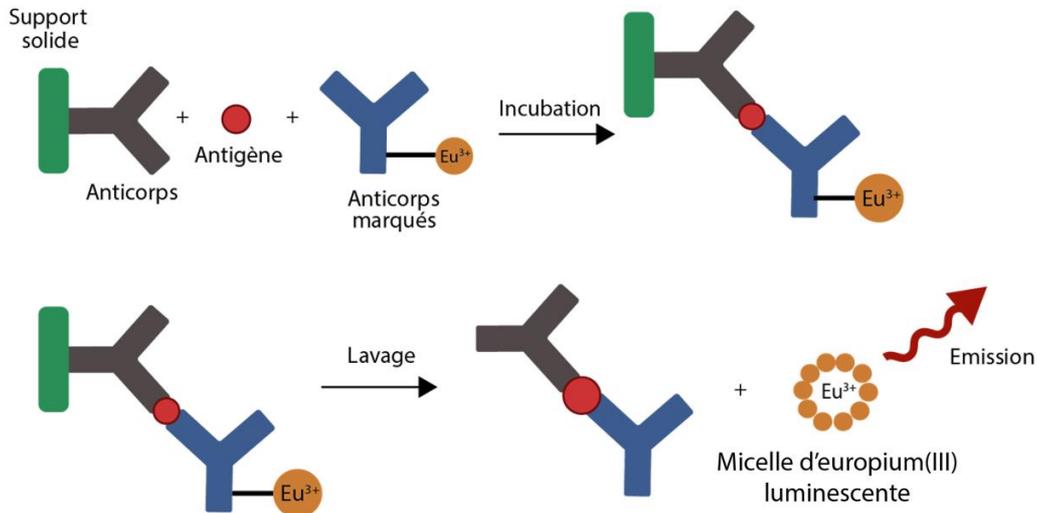


Figure 32 - Principe du dosage DELFIA®.

5.2. Transfert d'énergie de type Förster (FRET)

Le FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) est basé sur le transfert d'énergie de type Förster entre deux fluorophores, un donneur et un accepteur. Si le fluorophore excité (donneur) est suffisamment proche du fluorophore capable d'absorber son excès d'énergie (accepteur), alors l'intensité et la durée de vie de luminescence du donneur sera diminuée et seule l'émission de l'accepteur sera observée (**Figure 33**).

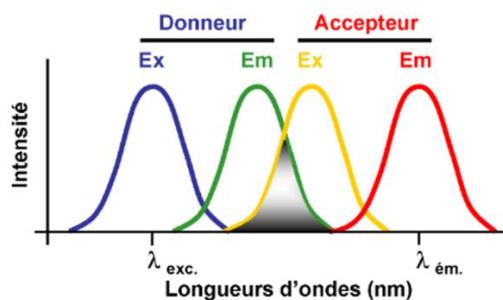


Figure 33 - Recouvrement du spectre d'émission du donneur avec le spectre d'absorption de l'accepteur.

La technique FRET fût développée pour déterminer les distances entre protéines mais est principalement appliquée à l'étude de phénomènes biologiques telles que les interactions entre des protéines ou la détection d'activité enzymatique.⁸¹ Plusieurs entreprises ont développé des kits de dosage basés sur le FRET, PerkinElmer avec le kit LANCE® ou encore CisBio avec l'HTRF®. Les accepteurs

couplés aux complexes de lanthanides sont des fluorophores organiques ou des protéines fluorescentes (**Figure 34**).⁸²

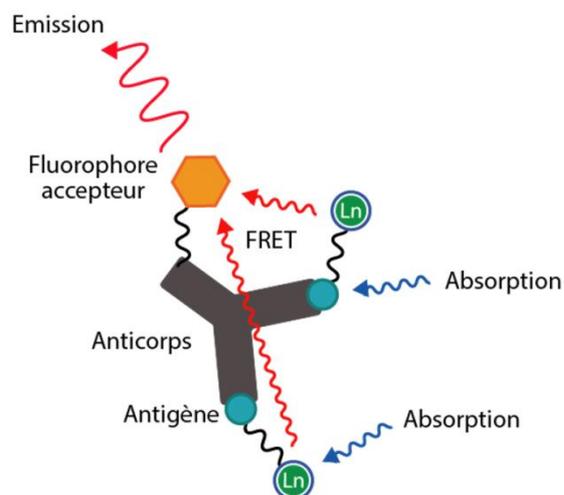


Figure 34 - Application de la FRET pour la reconnaissance antigène-anticorps.

5.3. Les chémosenseurs

Grâce à un design particulier, certains complexes de lanthanides ont été utilisés comme senseurs pour étudier la variation du pH ou la présence d'anions ou de cations dans un milieu. A titre d'exemple, le complexe $[\text{Eu}(\text{DOTAM-Phen})(\text{H}_2\text{O})]^{3+}$ développé par Gunnlaugsson et *al.* voit ses propriétés spectroscopiques modifiées selon le pH (**Figure 35**). A pH acide, la phénanthroline est protonée et va altérer le transfert d'énergie vers l' Eu^{3+} . A pH basique, la déprotonation de l'amide va induire un transfert d'électron photoinduit réduisant l' Eu^{3+} en Eu^{2+} diminuant alors la luminescence du métal central. La luminescence maximale est obtenue entre pH 5 et 7 (**Figure 35**).⁸³

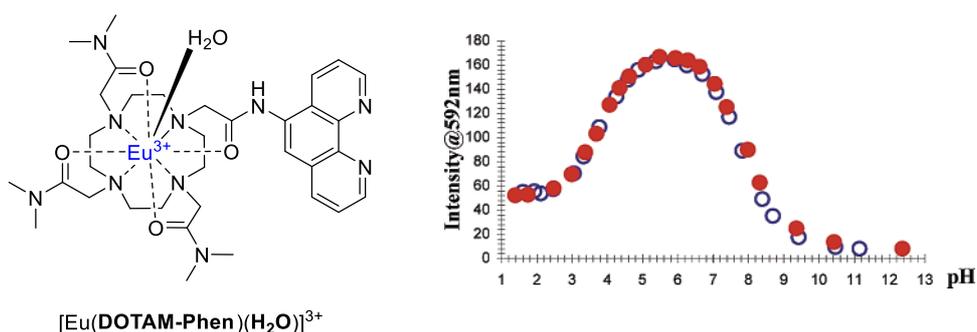


Figure 35 - Structure du chémosenseur $[\text{Eu}(\text{DOTAM-Phen})(\text{H}_2\text{O})]^{3+}$ et graphique représentant la dépendance de la luminescence de l' Eu^{3+} en fonction du pH.⁸³

Parker et *al.* ont décrit les complexes $[\text{Ln}(\text{DOTP-Phen})(\text{H}_2\text{O})]^+$ qui sont des senseurs d'anions ou d'oxygène selon le lanthanide utilisé (**Figure 36**). L' Eu^{3+} , insensible à l'oxygène, voit sa luminescence diminuer en présence d'halogénures. La luminescence du Tb^{3+} est peu sensible aux anions mais est

plus dépendante de la concentration en O₂. L'intensité d'émission va donc varier en fonction de la concentration en O₂.⁸⁴

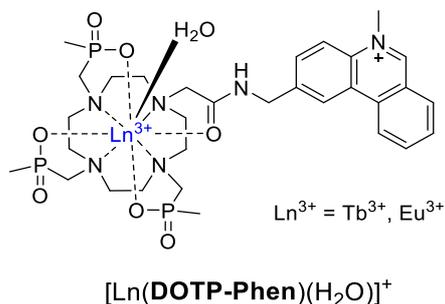


Figure 36 - Structure de $[\text{Ln}(\text{DOTP-Phen})(\text{H}_2\text{O})]^+$.⁸⁴

5.4. Vers l'imagerie cellulaire

Actuellement, les complexes de lanthanides à base de Tb³⁺ et d'Eu³⁺ sont les sondes lumineuses les plus utilisées en imagerie cellulaire. Parker et *al.* ont étudié plus de soixante complexes à base d'Eu³⁺ et de Tb³⁺ avec différentes antennes permettant d'imager de nombreuses lignées cellulaires telles que les fibroblastes de peau de souris (NIH-T3), les ovaires de hamster chinois (CHO) ou des cellules HeLa. Les rendements quantiques des complexes publiés sont de l'ordre de 8 à 21 % pour l'Eu³⁺ et de 15 à 61 % pour le Tb³⁺. Quelques exemples représentatifs sont illustrés sur la **Figure 37**.⁴³⁻⁴⁸

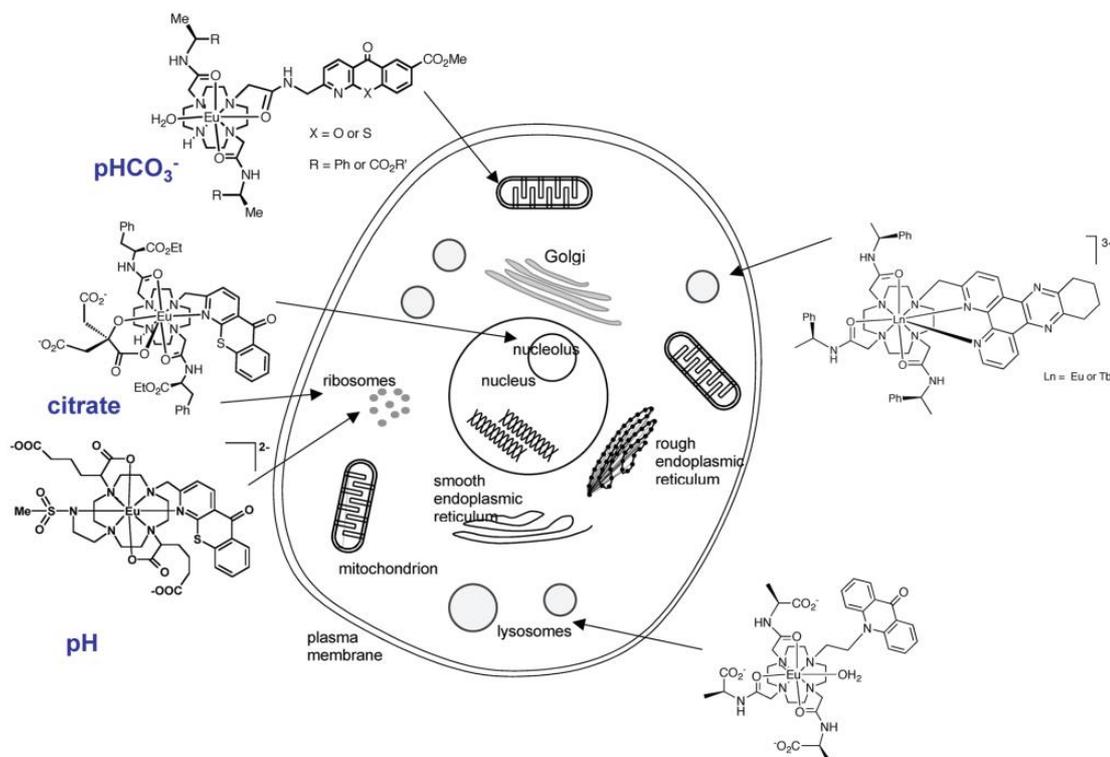


Figure 37 - Schéma représentant différents complexes d'Eu³⁺ et Tb³⁺ ainsi que leur cible pour l'imagerie cellulaire.⁴³⁻⁴⁸

Le groupe de Parker a également développé des sondes qui présentent une brillance supérieure à $30\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.⁹¹⁻⁹³ Ces sondes sont des complexes d' Eu^{3+} à base de tacn fonctionnalisé par des antennes ILCT possédant des longueurs d'ondes d'absorption comprises entre 355 nm et 365 nm. Ces différentes études ont mené au développement de la famille EuroTracker[®] permettant de marquer sélectivement les mitochondries, les lysosomes ou le réticulum endoplasmique (**Figure 38**).⁹¹⁻⁹³

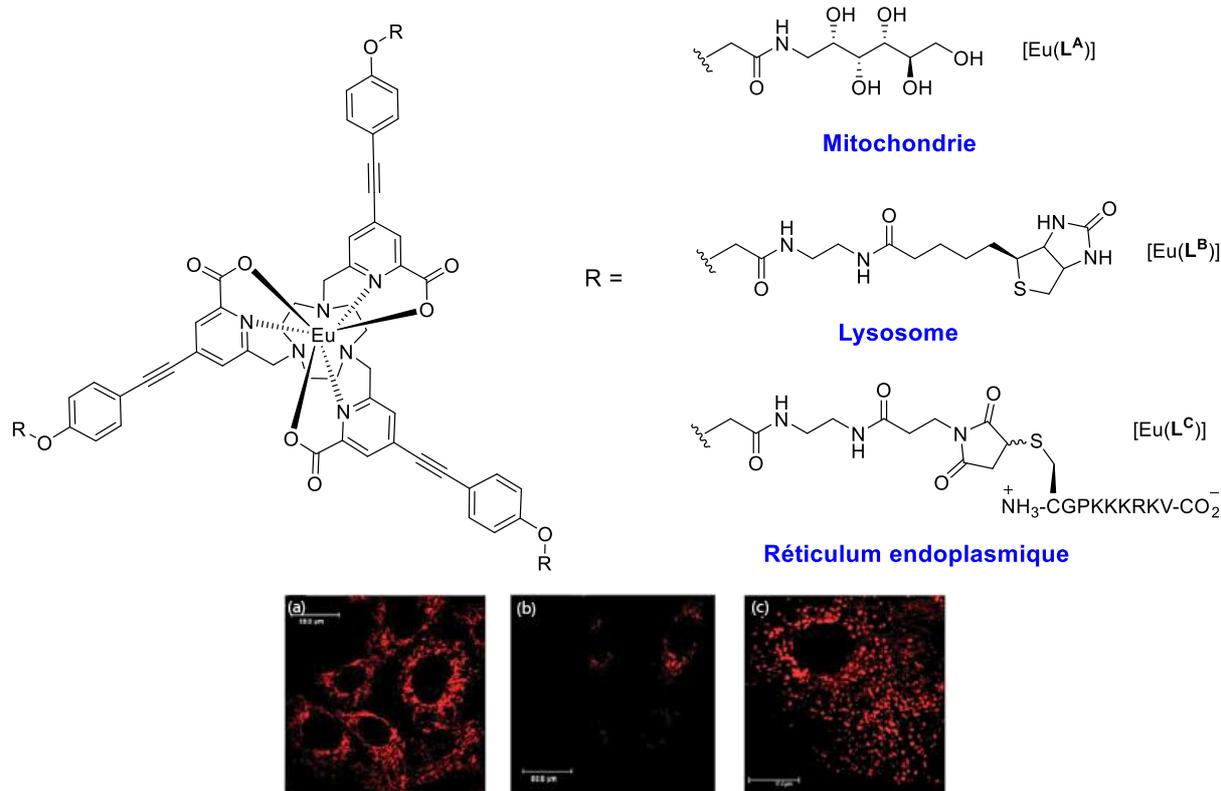


Figure 38 - Exemples de complexes d' Eu^{3+} (EuroTracker[®]) permettant de cibler des organites. (a) Images obtenues par microscopie confocale de mitochondries de cellules NIH-3T3 marquées par $[\text{Eu}(\text{L}^{\text{A}})]$ (b) réticulum endoplasmique de cellules NIH-3T3 marquées par $[\text{Eu}(\text{L}^{\text{B}})]$ et (c) lysosomes de cellules NIH-3T3 marquées par $[\text{Eu}(\text{L}^{\text{C}})]$ ($\lambda_{\text{exc}} = 355\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 605\text{-}720\text{ nm}$).⁹¹⁻⁹³

Cependant, les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission des complexes discutés jusqu'ici ne sont pas idéales pour des applications en imagerie médicale dans un contexte *in vivo*. En effet, la complexité des milieux cellulaires provoque des phénomènes de réflexion, de diffusion et d'absorption dans l'UV-visible, qui sont en compétition avec l'absorption et l'émission des complexes de Tb^{3+} et d' Eu^{3+} .

Un nouvel axe de recherche s'est donc tourné vers le développement d'entités moléculaires absorbant dans le NIR combinées aux lanthanides qui émettent également dans le NIR (Yb^{3+} , Nd^{3+} , Er^{3+}). En revanche, les rendements quantiques en milieu aqueux demeurent nettement plus faibles.⁷¹ Une alternative réside dans la mise au point de ligands permettant de protéger ces lanthanides de

l'environnement extérieur et de concevoir des antennes adaptées pour la luminescence de ces ions lanthanides.¹⁴ Cet axe de travail sera décrit de manière plus détaillée au cours du chapitre suivant.

IV. Objectifs

Ce chapitre a permis de mettre en valeur la capacité des polyazacycloalcanes à former des chélates stables et inertes. Nous avons également vu que la taille des macrocycles et la nature des groupements coordinants permettent de modifier des paramètres physico-chimiques tels que l'inertie cinétique, la stabilité thermodynamique ou l'inertie à la réduction ou encore les propriétés spectroscopiques.

Les complexes de Ln^{3+} dérivés du **H₂CB-TE2PA** ont fait preuve d'une inertie cinétique élevée et ne présentent aucune molécule d'eau dans leur sphère de coordination ce qui est un critère déterminant pour une utilisation en imagerie optique. Cependant, pour une application *in vivo*, les sondes luminescentes à base de lanthanide(III) doivent idéalement absorber et émettre dans le NIR. La fonctionnalisation des groupements picolinate par des antennes ILCT est une méthode de choix pour pouvoir exalter la luminescence des ions lanthanides dans le NIR sans modifier les propriétés de coordination intrinsèques du ligand. Ainsi, le premier objectif de cette thèse est dédié au développement d'une sonde d' Yb^{3+} . Nous verrons au cours du **Chapitre 2** qu'il est possible de sensibiliser les lanthanides dans le NIR *via* la microscopie à deux photons. Nous développerons la synthèse de l'antenne et du ligand ainsi que les études photophysiques du chélate obtenu (**Figure 39**).

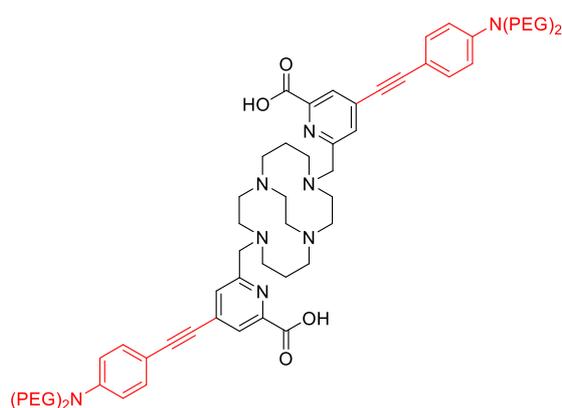


Figure 39 - Structure du ligand pour la complexation de l' Yb^{3+} .

Au cours de ce chapitre bibliographique, nous avons également présenté les polyazacycloalcanes *N*-fonctionnalisés comme des plateformes de choix pour la complexation du Cu^{2+} . Parmi eux, les ligands **H₁TE1PA** et **H₁CB-TE1PA** possèdent les qualités adéquates pour former des complexes de cuivre(II) stables et inertes. Ces ligands ayant déjà démontré leur potentiel pour la complexation du

$^{64}\text{Cu}^{2+}$ pour une utilisation en imagerie TEP, notre objectif est d'associer des fluorophores sur les groupements picolinate pour le développement de sondes bimodales TEP/Imagerie optique. Au cours du **Chapitre 3**, une introduction à l'imagerie TEP et à l'apport de la combinaison TEP/Imagerie optique sera exposée. La synthèse et les études physico-chimiques ainsi que spectroscopiques des complexes de Cu^{2+} seront également décrites (**Figure 40**).

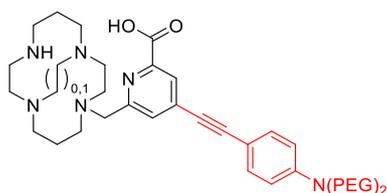


Figure 40 - Structure des ligands pour la complexation du cuivre(II) et la conception de sondes bimodales.

Le groupement π -conjugué lié au picolinate peut être remplacé, par exemple, par une unité dibromobenzène. Celle-ci permet d'accéder à une modalité de thérapie appelée thérapie photodynamique (**Figure 41**). L'objectif de ce travail est d'utiliser les mêmes plateformes macrocycliques cyclam monopicolinate mais où ce dernier est modifié par une entité thérapeutique pour le développement de sondes théranostiques. Au cours du **Chapitre 4**, le principe de la thérapie photodynamique sera exposé et des exemples d'association avec diverses modalités d'imagerie telles que la TEP nous permettra d'explorer l'intérêt de la théranostique. Les synthèses des complexes visés ainsi que les études spectroscopiques seront également décrites.

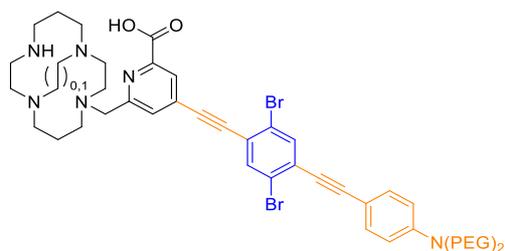


Figure 41 - Structure des ligands, pour la complexation de cuivre(II), décrits au cours du **Chapitre 4**.

Enfin, le dernier chapitre est une ouverture sur l'utilisation d'autres métaux d'intérêts pour l'imagerie TEP, tel que le gallium(III), qui peut se révéler être une alternative intéressante au cuivre(II). La conception de nouvelles sondes bimodales TEP/Imagerie optique à base de gallium(III) sera présentée ainsi que les avantages du gallium(III) en imagerie TEP et bimodale TEP/Imagerie optique.

Chapitre 2

Elaboration d'une sonde à base d'ytterbium(III) pour la
microscopie proche infrarouge-vers-proche infrarouge

I. L'imagerie par fluorescence

L'imagerie par fluorescence *in vivo* utilise traditionnellement des longueurs d'ondes situées dans l'UV. La résolution n'est cependant pas optimale en raison de la diffusion et de l'absorption par les tissus biologiques auxquelles s'ajoute l'interférence importante de l'autofluorescence des tissus (**Figure 42(a)**). L'absorption tissulaire se produit principalement dans la région visible (400 – 600 nm), car la plupart des molécules biologiques présentent une forte absorption dans cette gamme spectrale. Par exemple, la longueur d'onde d'absorption de l'hémoglobine est proche des 600 nm (**Figure 42(b)**).⁷¹

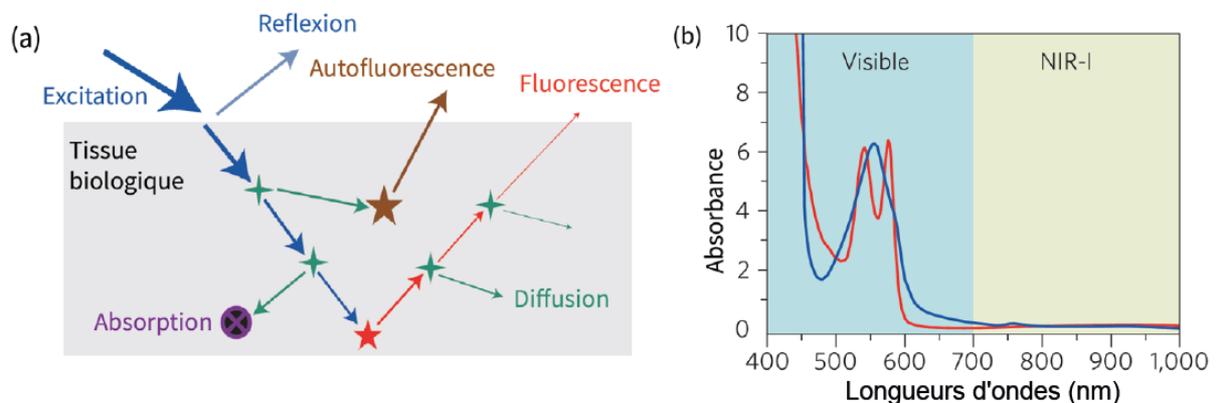


Figure 42 - (a) Illustration des phénomènes qui contribuent à une diminution du rapport signal sur bruit, (b) spectres d'absorption de l'oxyhémoglobine (rouge) et de la désoxyhémoglobine (bleu) pour un trajet de 1 mm dans le sang humain.

La gamme spectrale à cibler doit permettre une imagerie *in vivo* avec une diffusion réduite combinée à une absorption et une autofluorescence minimale (**Figure 42(b)**), offrant un rapport signal sur bruit (S/B) élevé. C'est pour cela que la microscopie dans la région proche infrarouge ou NIR (700-1000 nm) a connu un gain d'intérêt car elle permet une imagerie *in vivo* plus profonde avec un S/B amélioré. Cette gamme spectrale est également appelée *fenêtre de transparence biologique*.⁹⁴

Par conséquent, le défi en imagerie NIR est de développer des sondes absorbant et/ou émettant dans le NIR avec une bonne biocompatibilité, une brillance et une photostabilité élevées. Les sondes à base de lanthanides(III) trouvent ainsi un attrait particulier compte tenu de leurs propriétés spectroscopiques uniques que nous avons décrites au cours du **Chapitre 1**.

1. Avantages des lanthanides en imagerie optique

Des sondes organiques telles que les cyanines qui émettent dans le NIR ont déjà été commercialisées pour des applications biomédicales.^{95,96} Cependant, la microscopie utilisant ces molécules souffre généralement d'une difficulté de différenciation entre excitation et émission due à un faible déplacement de Stokes. De plus, leur sensibilité au photoblanchiment est souvent une limitation majeure pour les expériences d'imagerie optique. Les complexes de Ln^{3+} offrent une alternative intéressante aux fluorophores organiques existants.⁷³

A titre d'exemple, les ions Ln^{3+} possèdent une émission fine comparée aux fluorophores organiques. Cela est dû au fait que les électrons $4f$ sont peu impliqués dans les liaisons avec le ligand. Par conséquent, peu d'états vibrationnels sont accessibles, ce qui génère des bandes étroites avec de faibles déplacements de Stokes. Dans le cas d'un fluorophore organique, de nombreux états vibrationnels sont accessibles et vont avoir tendance à voir leur bande d'absorption s'élargir et générer des déplacements de Stokes plus importants (**Figure 43**).

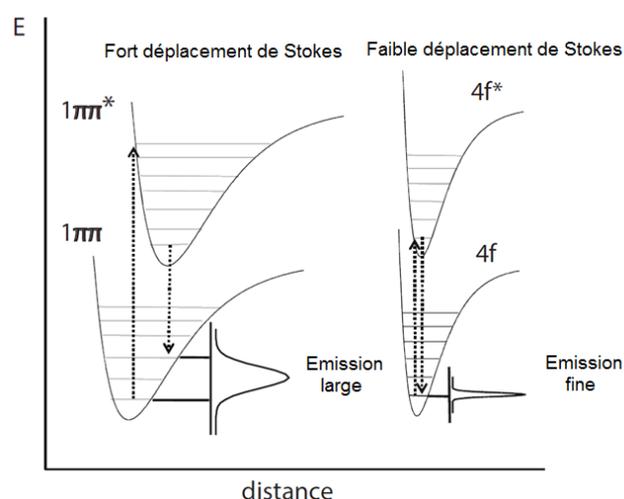


Figure 43 - Diagramme de Morse pour l'émission d'un fluorophore organique (gauche) et d'un ion Ln^{3+} (droite).⁷³

Dans le cadre d'une application en imagerie biologique, la détection du signal doit se faire au-dessus d'un certain niveau de bruit, notamment due à l'autofluorescence du milieu. Le caractère fin de l'émission des ions Ln^{3+} peut être un avantage pour améliorer le rapport signal sur bruit. Cette finesse est un avantage indéniable car à rendement quantique égal, l'intensité du signal de luminescence des lanthanides est plus élevée que celui des fluorophores organiques. Un autre avantage non négligeable est la possibilité de réduire la fenêtre spectrale afin de faciliter la discrimination de plusieurs signaux de luminescence (imagerie multicolore).^{97,98}

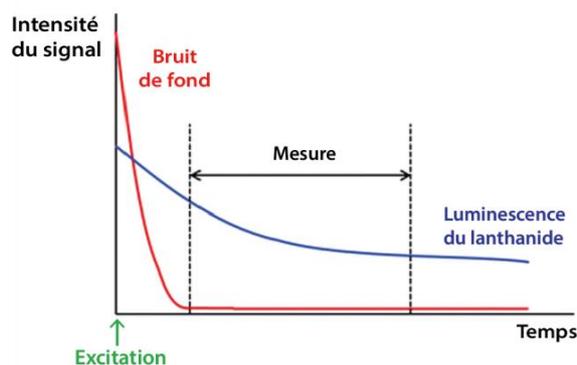


Figure 44 - Illustration du principe de la spectroscopie résolue en temps.⁹⁹

Les ions lanthanides se distinguent également par leur durée de vie de luminescence beaucoup plus longue (de la ns à la ms) que les fluorophores organiques (de la ps à la ns).¹⁰⁰ Les fluorophores endogènes responsables du bruit de fond possèdent une durée de vie courte (de l'ordre de la nanoseconde). Il est donc possible par une résolution temporelle d'éliminer cette fluorescence parasite et de n'observer que la luminescence centrée sur le lanthanide en collectant le signal du lanthanide grâce à des mesures résolues en temps (**Figure 44**).⁹⁹ Enfin, la luminescence des lanthanides est moins sensible à l'oxygène et permet une meilleure photostabilité par rapport aux fluorophores organiques.

Cependant, la plupart des complexes de Ln^{3+} émettant dans la région NIR sont excités dans la région UV, c'est-à-dire hors de la fenêtre de transparence biologique. Une alternative réside dans la mise au point d'antennes capables d'absorber simultanément plusieurs photons de moindre énergie pour permettre une absorption dans le proche infrarouge.¹⁰¹

II. La microscopie à deux photons

1. L'absorption à deux photons

L'absorption à deux photons (A2P), ou absorption biphotonique, est un phénomène d'optique non linéaire, prédit à l'origine par Maria Göppert-Mayer en 1931 durant son doctorat.¹⁰² En 1961, un an seulement après l'invention du laser, Kaiser et Garrett ont observé pour la première fois une conversion ascendante de photons induite par l'absorption à deux photons à partir d'un cristal de $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$.¹⁰³ Depuis, de nombreux matériaux aux propriétés biphotoniques ont été développés.¹⁰⁴

1.1. Principe

L'absorption biphotonique correspond à l'absorption simultanée de deux photons de fréquence identique possédant une énergie deux fois inférieure à celle nécessaire en microscopie à un photon pour provoquer la transition vers un état excité. Généralement, les deux photons ont la même énergie, car la probabilité qu'une molécule absorbe deux photons dépend du carré de l'intensité de la lumière incidente. Ainsi, une transition à deux photons se produit à une longueur d'onde double par rapport à une transition à un photon (**Figure 45**).¹⁰⁵

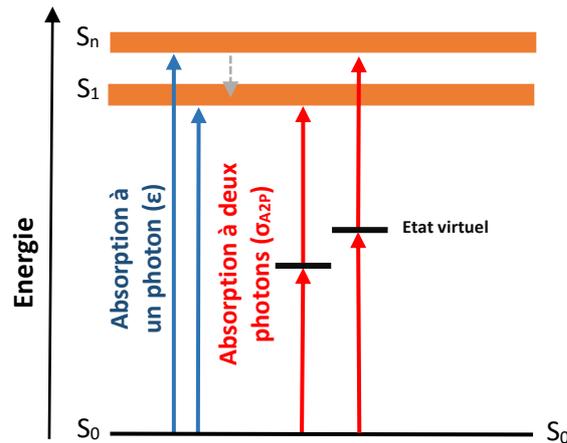


Figure 45 - Diagramme de Jablonski simplifié représentant le processus d'absorption à deux photons.

Un terme important qui permet de quantifier l'absorption à deux photons d'une molécule est la section efficace d'absorption à deux photons (σ_{A2P} , eq. 7). L'unité SI de la section efficace est le $\text{cm}^4 \cdot \text{s}$, mais ce terme est généralement exprimé en Göppert-Mayer (GM) où $1 \text{ GM} = 10^{-50} \text{ cm}^4 \cdot \text{s} \cdot \text{photon}^{-1}$:

$$\text{(eq. 7)} \quad \sigma_{A2P} = \frac{h\nu}{N_0} \alpha_2 = \frac{h\nu}{N_A \cdot c \cdot 10^{-3}} \alpha_2$$

où h est la constante de Planck, ν la fréquence d'un faisceau laser incident, N_0 la concentration moléculaire en cm^{-3} , α_2 le coefficient d'absorption à deux photons, N_A le nombre d'Avogadro et c la concentration de l'échantillon.¹⁴

La brillance à deux photons $B^{(2)}(\lambda)$, exprimée également en GM, permet de quantifier l'intensité de la luminescence à deux photons et est décrite selon l'équation suivante :

$$\text{(eq. 8)} \quad B^{(2)}(\lambda) = \sigma_{A2P}(\lambda) \cdot \phi$$

Une caractéristique clé de la microscopie à deux photons est la limitation de l'excitation à un point focal du laser (**Figure 46 (b)**) et non pas le long du trajet optique (**Figure 46 (a)**). En acquérant des images à des positions équidistantes sur l'axe vertical, une image en volume tridimensionnelle peut

être obtenue. En outre, cette localisation entraîne moins de dommages des tissus dans les régions situées au-dessus et au-dessous du plan focal qui ne sont pas imagées.¹⁰⁶

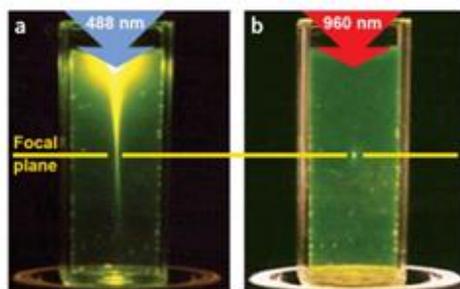


Figure 46 - (a) Excitation à un photon de la fluorescéine à 488 nm. (b) Excitation à deux photons en utilisant un laser pulsé femtoseconde à 960 nm.¹⁰⁶

2. Conception de complexes de lanthanides à deux photons

Comme décrit au cours du **Chapitre 1**, pour une application en imagerie optique, les sondes luminescentes à base de Ln^{3+} doivent remplir les conditions suivantes :

- le ligand doit fournir suffisamment d'atomes donneurs pour satisfaire la sphère de coordination du lanthanide afin d'éviter un relargage *in vivo*
- le ligand doit posséder un nombre adéquat d'atomes donneurs, sinon les molécules de solvant complèteront la sphère de coordination du lanthanide
- permettre l'internalisation dans les cellules vivantes

Mais pour avoir plus précisément une application en microscopie à deux photons, la sonde doit :

- permettre l'absorption simultanée de deux photons et le transfert d'énergie par effet antenne pour exalter la luminescence des ions Ln^{3+}
- avoir une brillance élevée ($\sigma_{A2P} \cdot \Phi$) qui est la conséquence d'une section efficace et d'un rendement quantique élevés

2.1. Complexes de lanthanides(III) à deux photons

La conception de complexes de lanthanides à base de picolinate a été étudiée depuis quelques années pour une utilisation en imagerie à deux photons. Les groupements picolinate introduits au cours du **Chapitre 1**, permettent de sensibiliser les ions lanthanides dans l'UV.^{20,61} Cependant, il est possible de déplacer la longueur d'onde d'absorption de ces complexes par l'extension de son système π -conjugué par une antenne présentant un état à transfert de charge (CT). Ces antennes sont

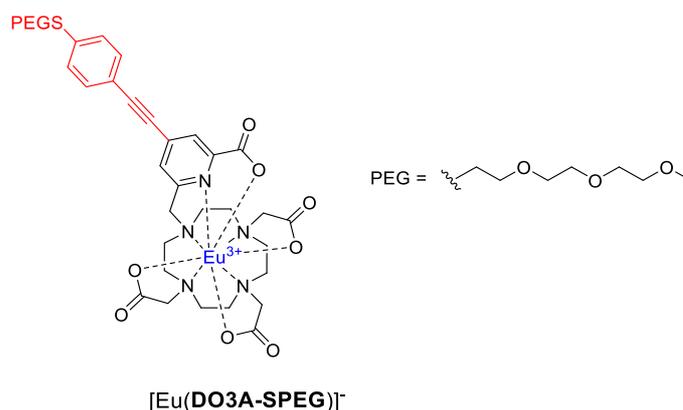


Figure 48 - Structure du complexe [Eu(DO3A-SPEG)]⁻.¹⁰⁸

La tacn fonctionnalisé par trois antennes ILCT a également été exploité pour le développement de sondes luminescentes à deux photons. Au cours du **Chapitre 1**, nous avons décrit une famille de complexes d'Eu³⁺ fortement luminescents (sondes EuroTracker®) décrit par Parker et *al.* Un dérivé de ces complexes est illustré sur la **Figure 49**.¹⁰⁹ Le complexe [Eu(NO3PA-OPEG)] a montré des propriétés à un photon élevées ($\epsilon = 55\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, $\phi = 25\%$, $B^{(1)} = 13\,750\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) ainsi qu'une section efficace égale à 25 GM à 700 nm. Cependant aucune expérience cellulaire en microscopie biphotonique n'a été réalisée à partir de ces sondes.¹¹⁰

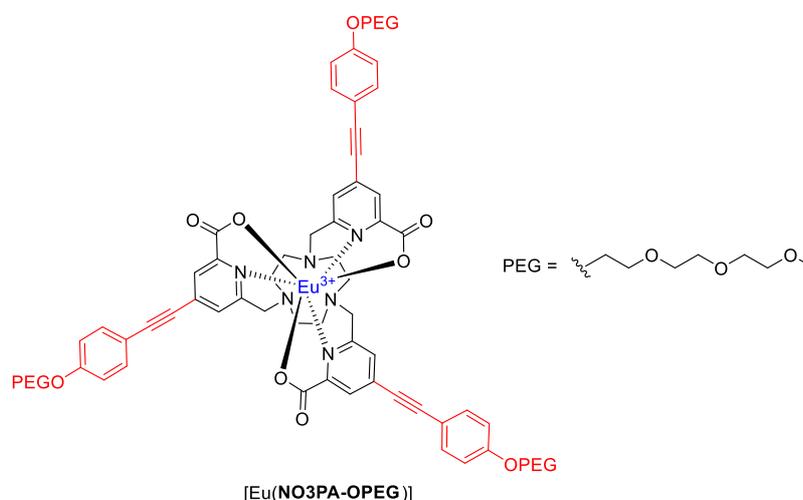


Figure 49 - Structure du complexe d'euprium(III) discuté dans cette section.¹¹⁰

Notre équipe, en collaboration avec l'équipe d'Olivier Maury, a étudié un complexe d'Eu³⁺ monocationique à deux photons dérivé du ligand **H₂MeDO2PA**. Nous avons vu au cours du **Chapitre 1** que l'introduction de groupements méthyle en « *trans* » sur le macrocycle permet une compression stérique au niveau du site de coordination qui exclut la présence d'une molécule d'eau. L'introduction d'antennes π -conjuguées sur l'unité picolinate a été effectuée afin de permettre l'absorption à deux photons (**Figure 50**). Les données spectroscopiques sont résumées dans le **Tableau 11**.

Le complexe $[\text{Eu}(\text{MeDO2PA-OPEG})]^+$ montrent des valeurs de rendement quantique élevées dans les solvants aprotiques ($\phi > 30\%$). Cependant, une chute de la luminescence survient dans les solvants protiques, notamment dans l'eau ($\phi = 1\%$). Afin de vérifier l'éventuelle coordination d'une molécule d'eau, généralement à l'origine de l'extinction de la luminescence, les temps de vie de luminescence dans l'eau et dans l'eau deutérée ont été étudiés et suggèrent la coordination partielle d'une molécule d'eau ($q = 0,56$).¹¹¹

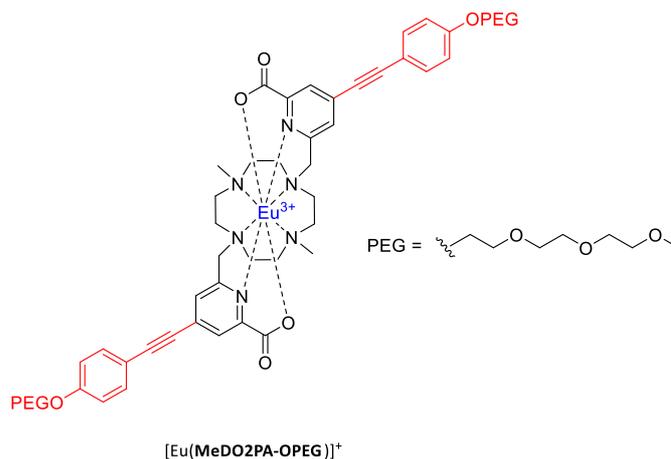


Figure 50 - Structure du complexe $[\text{Eu}(\text{MeDO2PA-OPEG})]^+$.¹¹²

Cependant, les géométries optimisées par DFT obtenues avec un complexe modèle d'yttrium(III) ($[\text{Y}(\text{MeDO2PA-O}(\text{CH}_2)_2\text{OMe})]^+$, **Figure 51**) ne permettent pas de converger vers une structure hydratée stable. Les géométries optimisées montrent que la molécule d'eau est expulsée de la première sphère de coordination, et est liée par liaison hydrogène à l'un des atomes d'oxygène du carbonyle (**Figure 51**, c)) ou à l'atome d'oxygène lié directement au métal (**Figure 51**, d)). Ces résultats sont cohérents avec les calculs DFT réalisés sur les complexes $[\text{Ln}(\text{MeDO2PA})]^+$ où la coordination directe d'une molécule d'eau au lanthanide avait été exclue (cf. **Chapitre 1**, page 48).²⁰

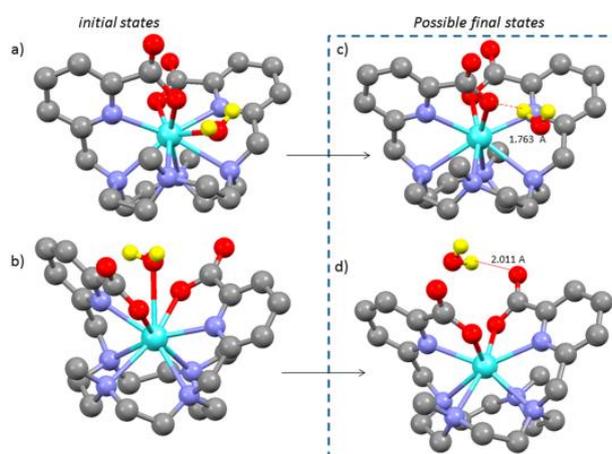


Figure 51 - Géométries optimisées par DFT du complexe $[\text{Y}(\text{MeDO2PA-O}(\text{CH}_2)_2\text{OMe})]^+$.¹¹²

La présence d'une molécule d'eau en seconde sphère de coordination a un impact sur les propriétés spectroscopiques puisqu'elle permet les désexcitations non radiatives *via* les oscillateurs -O-H, d'où le rendement quantique faible ($\phi = 1\%$). La brillance à un photon dans l'eau reste élevée ($B^{(1)} = 40\,500\text{ mol}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) et est nettement améliorée par comparaison au complexe $[\text{Eu}(\text{DO3A-SPEG})]^-$ ($B^{(1)} = 10\,220\text{ mol}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). La section efficace σ_{A2P} a été estimée à 100 GM à 700 nm pour le complexe $[\text{Eu}(\text{MeDO2PA-OPEG})]^+$.¹¹²

Complexe	Solvants	λ_{abs} (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)	τ (ms)	ϕ (%)	q
$[\text{Eu}(\text{MeDO2PA-OPEG})]^+$	CH ₃ CN	339	45 000	1,16	36 ^a	n.d
	CH ₂ Cl ₂	349	43 000	2,03	35 ^a	n.d
	CH ₃ OH	345	47 000	0,67	7 ^b	n.d
	H ₂ O	341	40 500	0,47	1 ^b	0,56

Tableau 11 - Données photophysiques du complexe $[\text{Eu}(\text{MeDO2PA-OPEG})]^+$. ^amesuré sur un point en utilisant la valeur obtenue dans le MeOH comme référence, ^bmesuré en utilisant le bisulfate de quinine ($\phi = 54,6\%$) dans H₂SO₄ 1N comme référence.¹¹² n.d. : non déterminé.

Des études par microscopie à deux photons réalisées sur des cellules vivantes T24 incubées avec le complexe $[\text{Eu}(\text{MeDO2PA-OPEG})]^+$ ont permis d'obtenir des images en microscopie biphotonique et ont montré l'internalisation spontanée par mécanisme d'endocytose (**Figure 52**). De plus, la présence du complexe ne compromet pas la viabilité et la prolifération cellulaire 24 h après incubation.

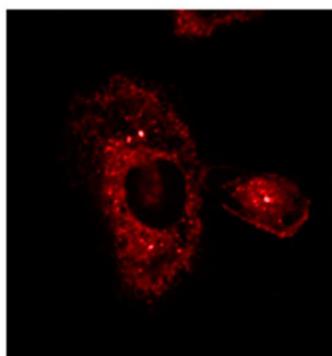


Figure 52 - Image par excitation à deux photons de cellules vivantes T24 après 4h d'incubation avec $[\text{Eu}(\text{MeDO2PA-OPEG})]^+$ ($c = 10^{-5}\text{ M}$, $\lambda_{exc} = 780\text{ nm}$).¹¹²

Ainsi les études d'internalisation se sont révélées prometteuses mais les paramètres photophysiques peuvent être améliorés en protégeant plus efficacement l'ion lanthanide au sein du macrocycle, c'est pourquoi notre équipe a étendu ces travaux à l'étude du ligand **H₂CB-TE2PA**.

Nous avons vu au cours du **Chapitre 1** que ce ligand était plus rigide que **H₂MeDO2PA**, ce qui permettrait de protéger plus efficacement l'ion Ln³⁺ de son environnement extérieur. De plus, le complexe qu'il forme avec l'Eu³⁺ s'est avéré extrêmement inerte (> 5 mois, HCl 2M, 25°C).

Ainsi, les antennes π -conjuguées ont été introduites sur le **H₂CB-TE2PA** pour donner le complexe [Eu(**CB-TE2PA-OPEG**)]⁺ (**Figure 53**).

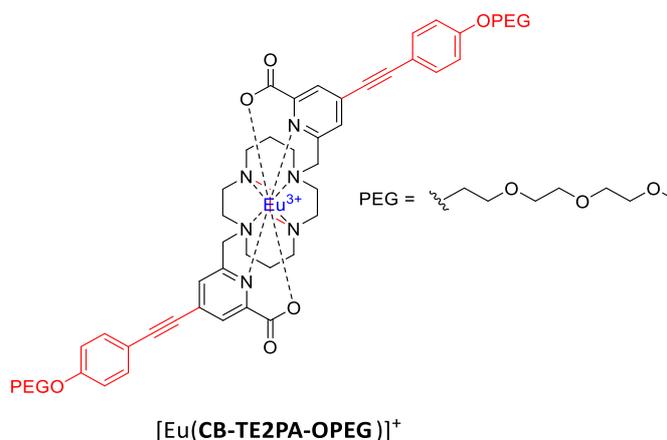


Figure 53 - Structure du complexe [Eu(**CB-TE2PA-OPEG**)]⁺.

Les études réalisées sur le complexe [Eu(**CB-TE2PA-OPEG**)]⁺ confirment l'absence de coordination de molécule d'eau ($q = 0,2$). Cependant, une chute similaire de la luminescence est remarquée lorsque le complexe est étudié dans les solvants protiques (**Tableau 12**). Elle reste toutefois moins marquée que dans le cas du complexe [Eu(**MeDO2PA-OPEG**)]⁺. Le temps de vie de luminescence dans l'eau de 0,55 ms permet d'estimer le rendement quantique à 6 % et une brillance à un photon de 2280 M⁻¹.cm⁻¹. Ainsi, la rigidité plus importante de **H₂CB-TE2PA-OPEG** a permis d'améliorer les propriétés spectroscopiques de la sonde d'Eu³⁺.¹⁵

Complexe	Solvants	λ_{exc} (nm)	ϵ (M ⁻¹ . cm ⁻¹)	τ (ms)	ϕ (%)	q
[Eu(CB-TE2PA-OPEG)] ⁺	DMSO	340	n.d	0,90	45 ^a	n.d
	CH ₃ OH	343	52 000	0,74	25 ^a	n.d
	H ₂ O	339	38 000	0,55	6 ^a	0,2

Tableau 12 - Données photo-physiques du complexe [Eu(**CB-TE2PA-OPEG**)]⁺. ^amesuré en utilisant le bisulfate de quinine ($\phi = 54.6\%$) dans H₂SO₄ 0,5 N comme référence.¹⁵

Des études par microscopie à deux photons réalisées sur des cellules vivantes T24 avec [Eu(**CB-TE2PA-OPEG**)]⁺ ont montré l'accumulation des sondes dans les zones périnucléaires des cellules comme en témoigne la couleur rouge, caractéristique de l'Eu³⁺, autour du noyau (**Figure 54**) suite à une excitation dans le proche infrarouge ($\lambda_{exc} = 780$ nm).

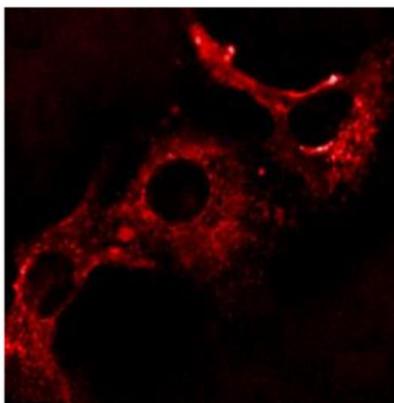


Figure 54 - Image par excitation à deux photons de cellules vivantes T24 marquées au complexe $[\text{Eu}(\text{CB-TE2PA-OPEG})]^+$ ($c = 5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, $\lambda_{\text{exc}} = 780 \text{ nm}$).¹¹²

Ainsi, la sensibilisation à deux photons des complexes d'euprium(III) a mené à des résultats intéressants pour des applications en bio-imagerie biphotonique. Cependant nous avons vu que pour une imagerie *in vivo* dans des conditions optimales, une absorption mais aussi une émission dans la région NIR étaient préférées.

Les sondes à base de lanthanides(III) qui émettent dans la région NIR (Yb^{3+} , Nd^{3+} , Er^{3+}) trouvent ainsi un intérêt, car ces ions présentent les mêmes avantages que ceux émettant dans le visible à savoir des spectres d'émission en bandes fines et des temps de vie de luminescence longs. Les mêmes stratégies sont alors appliquées à la conception de ces complexes, afin de permettre une sensibilisation efficace du lanthanide.

III. Imagerie proche infrarouge vers proche infrarouge

Dans cette partie, nous nous intéressons à l'imagerie en mode proche infrarouge-vers-proche infrarouge (NIR-vers-NIR), et en particulier au potentiel des complexes d'ytterbium(III) pour une telle application. Après avoir discuté des principaux travaux décrits dans la littérature sur l'imagerie en configuration NIR-vers-NIR, nous nous focaliserons sur la conception d'un complexe d'ytterbium(III).

1. Cas de l'ion ytterbium(III)

Parmi les ions Ln^{3+} émettant dans le NIR, l'ytterbium(III) est sans doute le plus prometteur, en raison de rendement quantique d'émission intrinsèque raisonnable. L'ytterbium(III) est un ion caractérisé par une transition ${}^2\text{F}_{7/2} \rightarrow {}^2\text{F}_{5/2}$ dont le gap énergétique est d'environ $10\,250 \text{ cm}^{-1}$. Cette transition fait apparaître 4 massifs entre 960 et 1060 nm et est comprise dans la fenêtre de transparence biologique (Figure 55).

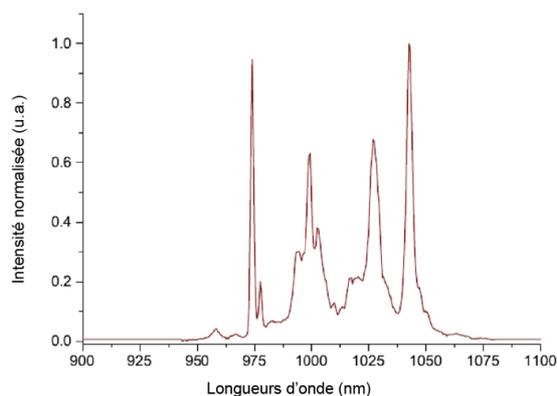


Figure 55 - Spectre d'émission de l'Yb³⁺ adapté de la référence.¹¹³

Pour rappel, les rendements quantiques de luminescence des complexes à base d'Yb³⁺ sont relativement modestes dans les solvants protiques et nécessite pour cela que l'environnement de coordination de l'ion Yb³⁺ soit soigneusement étudié, car la désactivation vibrationnelle de l'état excité de l'Yb³⁺ par des vibrateurs O-H peut limiter leur application (**Figure 56**).

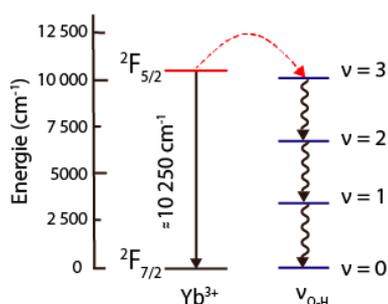


Figure 56 - Représentation schématique de la transition ${}^2F_{5/2} \rightarrow {}^2F_{7/2}$ de l'Yb³⁺ et des vibrateurs O-H.

2. Sondes luminescentes à base d'ytterbium(III) pour l'imagerie NIR-vers-NIR

Le concept de sensibilisation à deux photons de lanthanides émettant dans le NIR avec un complexe d'ytterbium(III) a été décrit en premier par Lakowicz et *al* en 2001.¹¹⁵ En 2011, Wong et *al*. ont développé l'un des premiers complexes d'Yb³⁺ à deux photons. La sonde d'Yb³⁺ est dérivée d'une porphyrine fonctionnalisée par la rhodamine B et en présence d'un ligand de Klaui. La sonde présente une intense émission dans le NIR avec une section efficace à deux photons élevée ($\sigma_{A2P} = 375 \text{ GM}$ à 860 nm) et un rendement quantique égal à 2,5 % dans l'eau (**Figure 57**). Les études biphotoniques ont été réalisées sur des cellules HeLa en utilisant l'émission résiduelle de la rhodamine B dans le visible. En effet, les microscopes biphotoniques commerciaux détectent l'émission des antennes uniquement dans le visible, travaillant ainsi à une longueur d'onde d'excitation plus grande que celle de la détection.¹¹⁴

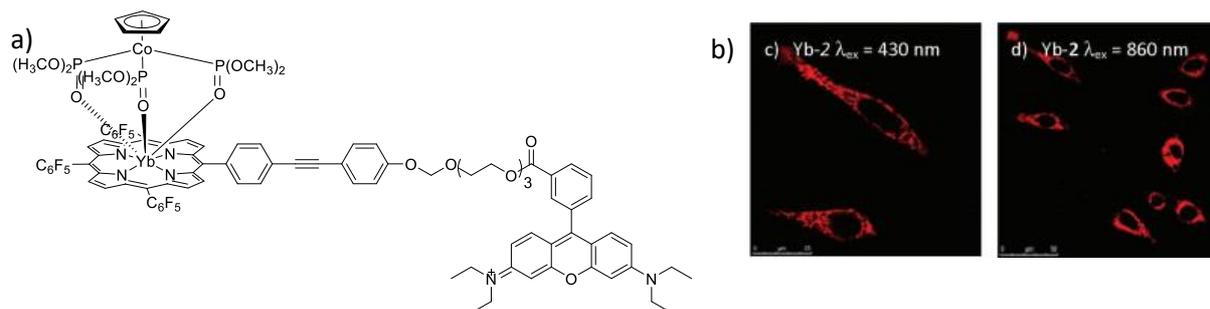


Figure 57 - a) Structure du complexe d' Yb^{3+} conjugué à la rhodamine B et b) images de cellules vivantes HeLa ($\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}800\text{ nm}$) suite à une excitation (1) à un photon ($c = 1.10^{-5}\text{ M}$, $\lambda_{\text{exc}} = 430\text{ nm}$) et (2) à deux photons ($c = 1.10^{-5}\text{ M}$, $\lambda_{\text{exc}} = 860\text{ nm}$).¹¹⁴

En 2012, Maury *et al.* ont mis au point un microscope à deux photons en configuration NIR-vers-NIR et ont utilisé les complexes d'ytterbium(III) $[\text{Yb}(\text{DPA-NPEG})_3]^{3-}$ et $[\text{Yb}(\text{NO3PA-NPEG})]$ comme sondes biphotoniques pour l'imagerie de tissus épais (**Figure 58**). Seul le complexe $[\text{Yb}(\text{NO3PA-NPEG})]$ a été impliqué dans des expériences cellulaires. Suite à une excitation à deux photons à 760 nm avec détection dans la région NIR ($\lambda_{\text{em}} = 1000\text{ nm}$), des images de cerveau de souris ont été obtenues. Cette étude a également mis en évidence la première application concrète des complexes de lanthanide émettant dans le NIR en imagerie tissulaire (**Figure 58**).

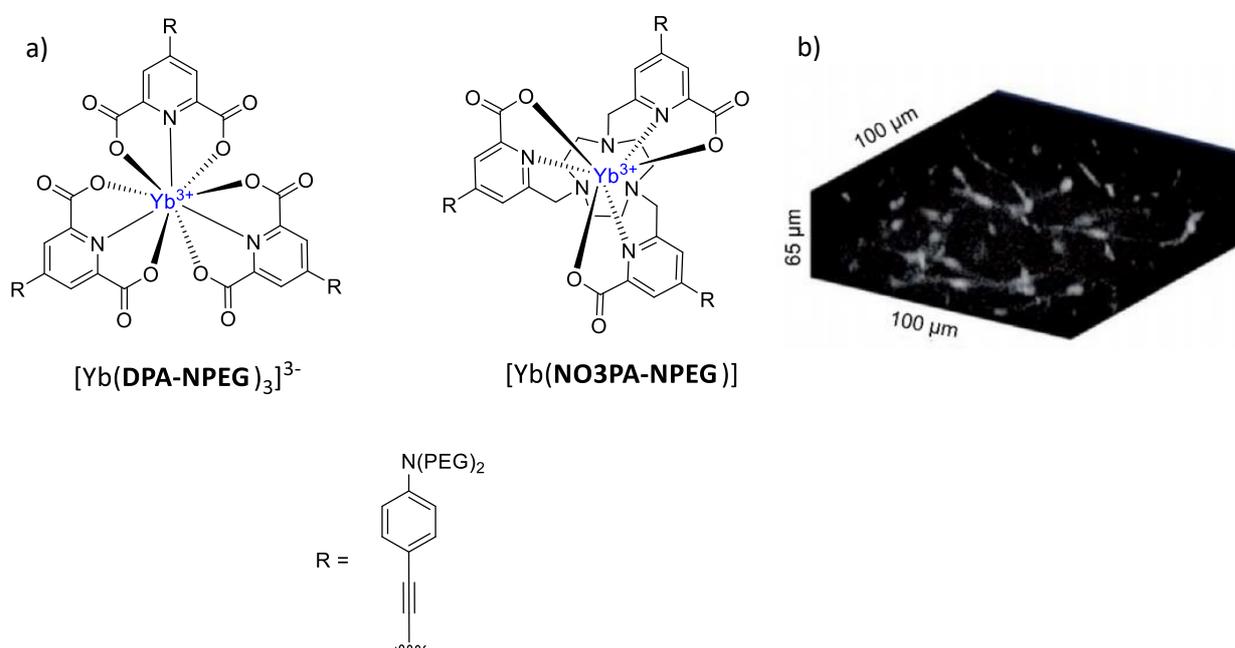


Figure 58 – a) Structure des complexes d' Yb^{3+} et b) imagerie à deux photons ($\lambda_{\text{exc}} = 760\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 1000\text{ nm}$) de cerveaux marqués avec le complexe $[\text{Yb}(\text{NO3PA-NPEG})]$.¹¹⁶

Cependant, le complexe $[\text{Yb}(\text{NO3PA-NPEG})]$ est neutre et n'a pu être internalisé dans les cellules vivantes. Comme il a été décrit précédemment, les sondes comportant des antennes à deux photons et présentant une charge totale neutre ou anionique ont rarement montré une internalisation

spontanée dans des cellules vivantes, et nécessitent donc une perméabilisation.^{109,116–118} D'ailleurs, les résultats obtenus à partir des complexes $[\text{Eu}(\text{MeDO2PA-OPEG})]^+$ et $[\text{Eu}(\text{CB-TE2PA-OPEG})]^+$ nous ont confortés dans l'idée qu'une charge positive est une caractéristique favorable pour l'assimilation des sondes en milieu cellulaire. C'est pourquoi, il a été jugé intéressant d'étudier ces mêmes ligands pour la complexation de l' Yb^{3+} . A noter que la plus petite taille de l'ion Yb^{3+} en comparaison aux ions Eu^{3+} et Tb^{3+} , implique moins de phénomène de coordination de molécules de solvant qui inhibent les propriétés lumineuses du métal.

Notre équipe a décrit un complexe d' Yb^{3+} basé sur le ligand **H₂MeDO2PA**. Une antenne adaptée à la sensibilisation biphotonique de l'ytterbium(III) comprenant cette fois un atome d'azote comme donneur d'électrons a été introduite pour moduler l'état énergétique ILCT. L'antenne a été insérée sur le macrocycle diméthyl cyclen pour former le complexe monocationique $[\text{Yb}(\text{MeDO2PA-NPEG})]^+$ (**Figure 59**).¹¹⁹

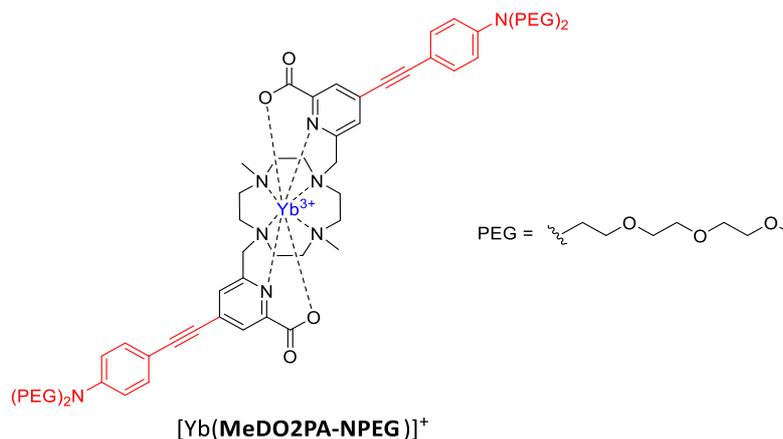


Figure 59 - Structure du complexe d'ytterbium(III) $[\text{Yb}(\text{MeDO2PA-NPEG})]^+$.¹¹⁹

Le spectre d'absorption du complexe $[\text{Yb}(\text{MeDO2PA-NPEG})]^+$ présente une bande large et intense à 410 nm dans un mélange EtOH/MeOH 4/1, attribué à la transition ILCT (**Figure 60**). Une excitation dans cette bande entraîne l'émission dans le proche infrarouge de l'ytterbium(III), due à la transition $^2\text{F}_{5/2} \rightarrow ^2\text{F}_{7/2}$. Cette émission révèle bien les 4 massifs attendus entre 950-1050 nm à 77K. Dans la région visible, une émission résiduelle du ligand peut être observée autour de 550 nm (**Figure 60**) mais celle-ci demeure relativement faible ($\phi < 1\%$), indiquant que le transfert d'énergie est efficace, bien que non total.

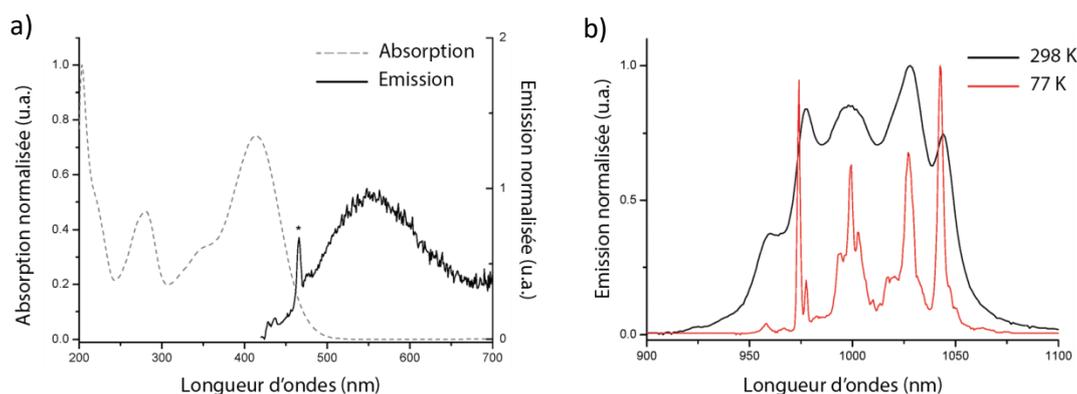


Figure 60 – a) Spectres normalisés d’absorption (pointillé en gris) de $[\text{Yb}(\text{MeDO2PA-NPEG})]^+$ et d’émission résiduelle (trait plein noir) de l’antenne sous excitation à 410 nm. b) Spectres normalisés d’émission de $[\text{Yb}(\text{MeDO2PA-NPEG})]^+$ dans une solution MeOH-EtOH (v:v 4/1) à température ambiante (noir) et à 77 K (rouge) sous excitation à 410 nm.¹¹⁹

Le temps de vie de luminescence du complexe $[\text{Yb}(\text{MeDO2PA-NPEG})]^+$ est élevé dans les solvants aprotiques puis diminue dans les solvant protiques (**Tableau 13**). Toutefois dans l’eau, le temps de vie de luminescence ($\tau = 2,2 \mu\text{s}$) est d’un ordre de grandeur supérieur à celui obtenu pour le complexe $[\text{Yb}(\text{DPA-NPEG})_3]^{3-}$ ($\tau = 0,34 \mu\text{s}$). Le rendement quantique centré sur le métal est modeste et est égal à 0,8 % avec une brillance à un photon $B^{(1)}$ de $638 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. La valeur de la section efficace est estimée à 330 GM dans l’eau. Ces résultats amènent à une brillance à deux photons modeste de 3 GM à 740 nm.

Solvants	$\tau_{\text{H}_2\text{O}}$ (μs)	q
CH_2Cl_2	5,3	-
MeOH	3,4	-
H_2O	2,2	0,2
D_2O	4,8	-

Tableau 13 - Données spectroscopiques du complexe $[\text{Yb}(\text{MeDO2PA-NPEG})]^+$.¹¹⁹

Les expériences de microscopie en configuration NIR-vers-Visible et NIR-vers-NIR ont été réalisées sur des cellules fixées au PFA par excitation à deux photons dans le NIR ($\lambda_{\text{exc}} = 745 \text{ nm}$). La détection a été réalisée dans le visible en tirant profit de l’émission résiduelle de l’antenne (entre 500 et 600 nm) et dans le NIR en exploitant l’émission de la transition ${}^2\text{F}_{5/2} \rightarrow {}^2\text{F}_{7/2}$ de l’ion Yb^{3+} située au-delà de 900 nm. Dès lors, on constate que les images obtenues dans la configuration NIR-vers-NIR (**Figure 61**, (b) et (d)) montrent une qualité d’image presque identique à celles obtenues dans la configuration NIR-vers-Visible (**Figure 61**, (a) et (c)).

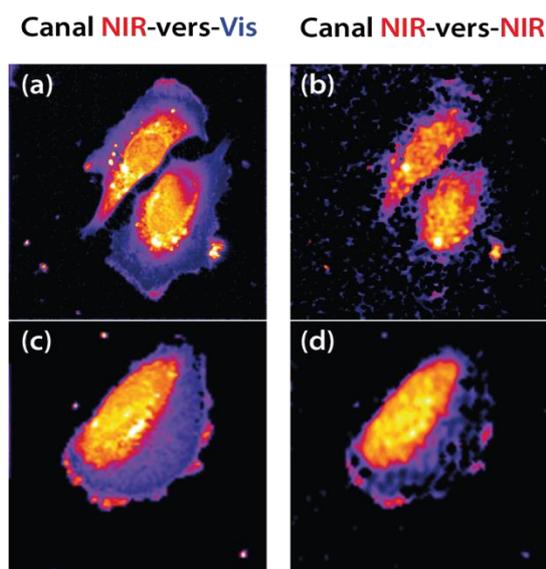


Figure 61 - Images de cellules T24 fixées au PFA marquées avec $[\text{Yb}(\text{MeDO2PA-NPEG})]^+$ ($c = 10^{-5}$ M, $\lambda_{exc} = 760$ nm) par microscopie à balayage en utilisant un montage de microscopie originale pour l'imagerie NIR-vers-NIR. (a) et (c) images obtenues dans le canal visible (<740 nm) ; (b) et (d) images obtenues dans le canal NIR (>840 nm).¹¹⁹

Ces résultats ont démontré l'intérêt des complexes d' Yb^{3+} basés sur des polyazamacrocycles comme sondes NIR-vers-NIR. Cependant la chute de la luminescence dans les solvants protiques du complexe $[\text{Yb}(\text{MeDO2PA-NPEG})]^+$ nous a incités à utiliser une structure plus rigide afin de minimiser les relaxations non radiatives dues à une possible coordination d'une molécule d'eau en seconde sphère. Pour ce faire, nous nous sommes orientés vers un ligand de type cyclam renforcé car, comme présenté précédemment, une nette amélioration des propriétés spectroscopiques a été observée pour le complexe $[\text{Eu}(\text{CB-TE2PA-OPEG})]^+$ par comparaison au complexe $[\text{Eu}(\text{MeDO2PA-OPEG})]^+$.¹²

IV. Synthèse du complexe d'ytterbium(III)

L'objectif de ce travail était de synthétiser un ligand basé sur le cyclam *cross-bridged* qui sera fonctionnalisé par des antennes π -conjuguées adaptées à la sensibilisation de l' Yb^{3+} (**Figure 62**). La synthèse du complexe comprend de nombreuses étapes notamment pour le développement de l'antenne qui a été décrite auparavant dans la littérature.^{117,119,120} Des améliorations ont été apportées et seront décrites au cours de ce chapitre. Ce chapitre présentera également les études spectroscopiques et les études en milieu cellulaire du complexe d'ytterbium(III).

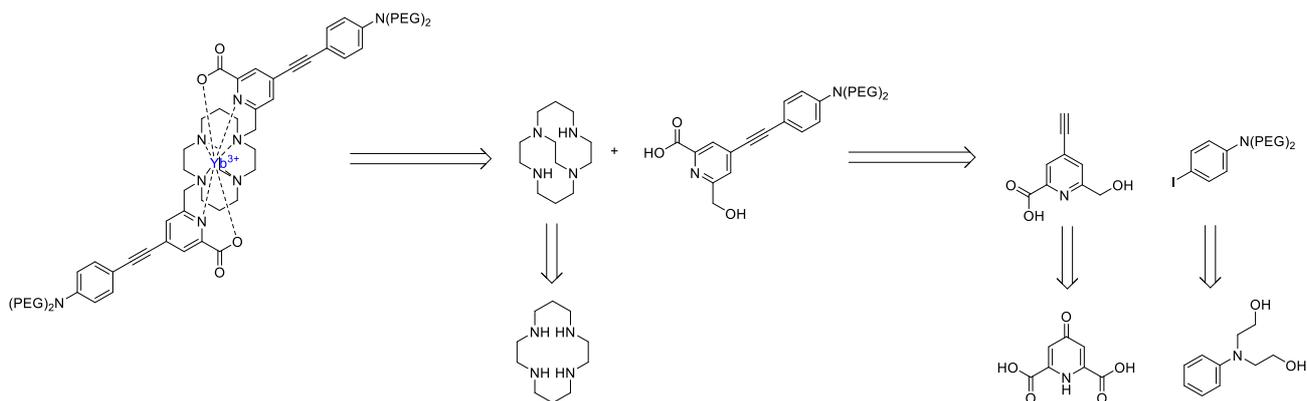


Figure 62 - Schéma rétrosynthétique du complexe d' Yb^{3+} à base de cyclam *cross-bridged*.

1. Synthèse du picolinate iodé

Les produits de départ des divers bras coordinants utilisés au cours de cette thèse ont pour base le picolinate. La **Figure 63** décrit la synthèse de l'ester picolinate iodé **3** à partir de l'acide chélidamique commercial.¹²¹

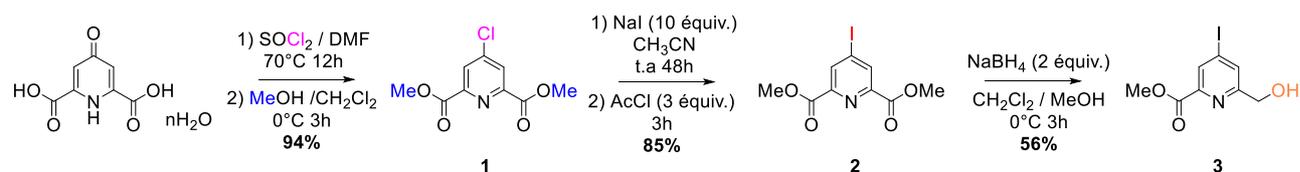


Figure 63 - Synthèse de l'ester picolinate iodé **3**.

La première étape consiste à faire réagir l'acide chélidamique dans le chlorure de thionyle qui entraîne la formation des fonctions chlorure d'acyle correspondantes et la chloration du cycle aromatique. Cet intermédiaire est directement mis à réagir avec le méthanol pour estérifier les fonctions chlorure d'acyle donnant le composé **1** avec 94 % de rendement. Compte tenu de la faible réactivité des aryles chlorés lors des réactions de couplage C-C pallado-assistées, une halogénéation en présence d'un excès d'iodure de sodium et de chlorure d'acétyl permet d'obtenir le diester iodé **2**. La dernière étape est une réduction du composé **2** par action du borohydrure de sodium, donnant majoritairement le produit mono-réduit iodé **3** avec un rendement de 56 % après purification. Ces synthèses peuvent être conduites sur de grandes quantités (≈ 10 g).

2. Synthèse de l'antenne π -conjuguée

La synthèse de l'antenne π -conjuguée est effectuée en 7 étapes et est adaptée d'une procédure décrite dans la littérature par l'équipe du Dr. Maury.^{122,123} La première étape consiste en une iodation de la *N,N*-bis(2-hydroxyéthyl)aniline. Le composé **4** peut-être isolé par purification sur colonne chromatographique pour éliminer l'excès de pyridine mais cela aboutit à des rendements

modestes (entre 31 et 56 %). L'étape de purification sur colonne peut être remplacée par une étape de lavage avec une solution aqueuse de CuSO_4 à 10% permettant d'éliminer les traces de pyridine (**Figure 64**).¹²⁴ Cette méthode permet d'isoler le composé **4** avec un rendement de 86 %.

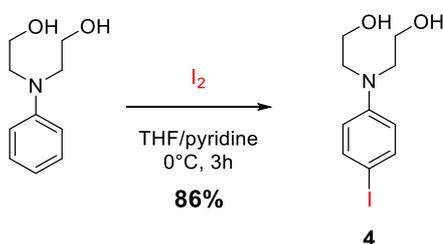


Figure 64 - Synthèse du composé **4**.

En parallèle, le composé **5** a pu être synthétisé par réaction du chlorure de tosylé sur le 2,2-méthoxyéthyléthanol avec un rendement de 88 % (**Figure 65**).

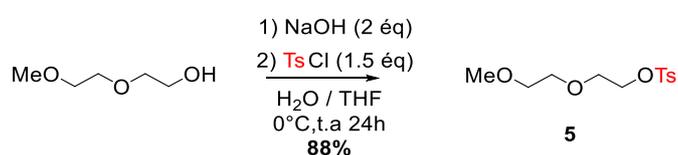


Figure 65 - Synthèse du composé **5**.

La réaction de PEGylation entre le composé **4** et le dérivé tosylé **5** en présence de NaH permet d'obtenir le dérivé iodé **6** avec un rendement de 98 % (**Figure 66**). Le composé **6** est ensuite mis à réagir avec le (triméthylsilyl)acétylène selon un couplage de Sonogashira pour obtenir le produit **7** avec un excellent rendement de 95% après optimisation. L'alcyne obtenu subit une réaction de déprotection du groupement silylé par action du fluorure de tétrabutylammonium (TBAF) avec un rendement de 99 % donnant l'alcyne vrai **8**.

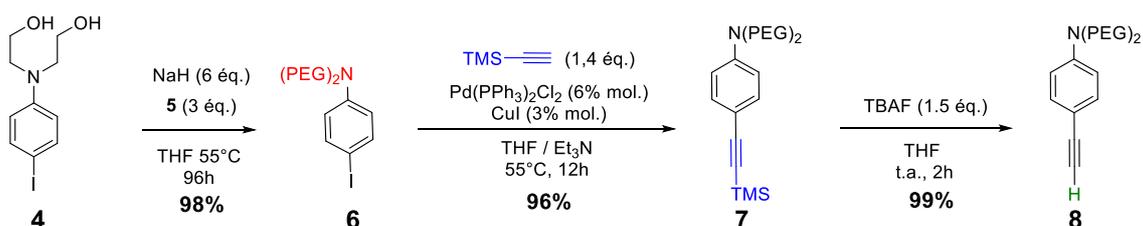


Figure 66 - Synthèse du composé **8**.

Un second couplage de Sonogashira avec le dérivé iodé du picolinate **3** aboutit à la formation de l'antenne **9** (**Figure 67**).

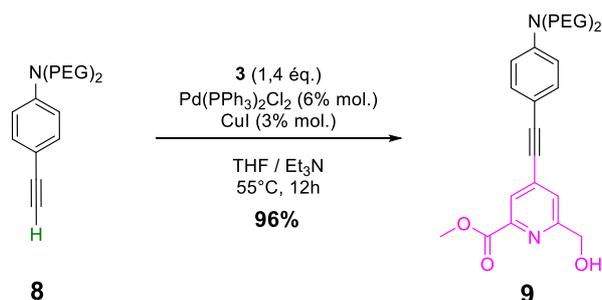


Figure 67 -Synthèse de l'antenne **9**.

Cependant, en employant des conditions usuelles pour cette réaction, la formation du dimère de l'alkyne issu du couplage de Gläser a été remarquée (**Figure 68**). Cette réaction d'homocouplage donne accès à des diynes symétriques à partir d'alcynes terminaux en présence de Cu^+ et de dioxygène.

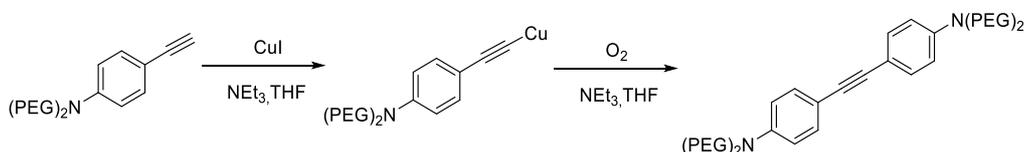


Figure 68 - Formation du diyne.

De nombreuses conditions expérimentales ont été testées pour favoriser la formation du composé **9** et sont présentées dans le **Tableau 14**. La réaction a été réalisée en présence de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4\text{Cl}_2$, de CuI et de NEt_3 . Une amélioration du rendement a été constatée en augmentant la température (Entrées **2**, **Tableau 14**). La réaction a été également étudiée en diminuant le nombre d'équivalents de CuI et en augmentant le nombre d'équivalents en $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (Entrée **3** et **4**). Dans ce cas-là, les meilleurs rendements ont été obtenus selon les conditions de l'entrée **4**. Néanmoins, pour des conditions réactionnelles fixées, le rendement de ce couplage varie entre 56 % et 96 %, probablement en raison des pertes lors de la purification sur colonne chromatographique.

Entrée	Conditions	Solvant	T°C/Temps	Rendements
1	$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4\text{Cl}_2$ (3 mol. %), CuI (6 mol. %)	THF/ Et_3N	t.a./17h	31 %
2	$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4\text{Cl}_2$ (3 mol. %), CuI (6 mol. %)	THF/ Et_3N	55°C/17h	34 % - 61 %
3	$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4\text{Cl}_2$ (3 mol. %), CuI (4 mol. %)	THF/ Et_3N ,	55°C/17h	55 %
4	$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4\text{Cl}_2$ (6 mol. %), CuI (3 mol. %)	THF/ Et_3N ,	55°C/17h	56 % – 96 %

Tableau 14 - Tableau récapitulatif des conditions de la réaction de Sonogashira testées sur l'alkyne terminale **8**.

La dernière étape est une activation de la fonction alcool primaire du composé **9** en fonction mésylate par action du chlorure de mésyle en présence de triéthylamine permettant d'obtenir le dérivé mésylé **10** avec un rendement de 99% (**Figure 69**). L'antenne fluorescente **10** est obtenue avec un rendement global de 76 % en six étapes.

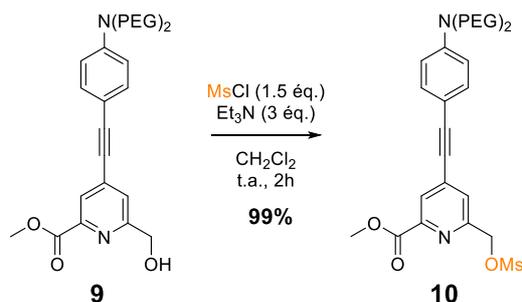


Figure 69 - Synthèse de l'antenne mésylée **10**.

3. Synthèse du ligand L_1

La synthèse du ligand L_1 s'effectue en 6 étapes à partir du cyclam et passe par un intermédiaire clé le cyclam *cross-bridged*. La synthèse du cyclam *cross-bridged* **14** que nous avons reprise a été décrite par Weismann et *al.* en 4 étapes à partir du cyclam (**Figure 70**).³⁴ Après formation du cyclam bisaminal **11**, la di-*N*-alkylation en présence du bromure de benzyle dans l'acétonitrile permet d'obtenir le di-ammonium **12**. Le composé **13** est obtenu par réduction du pont bisaminal en présence de NaBH_4 . La dernière étape est une hydrogénéolyse permettant d'obtenir le cyclam *cross-bridged* **14**.

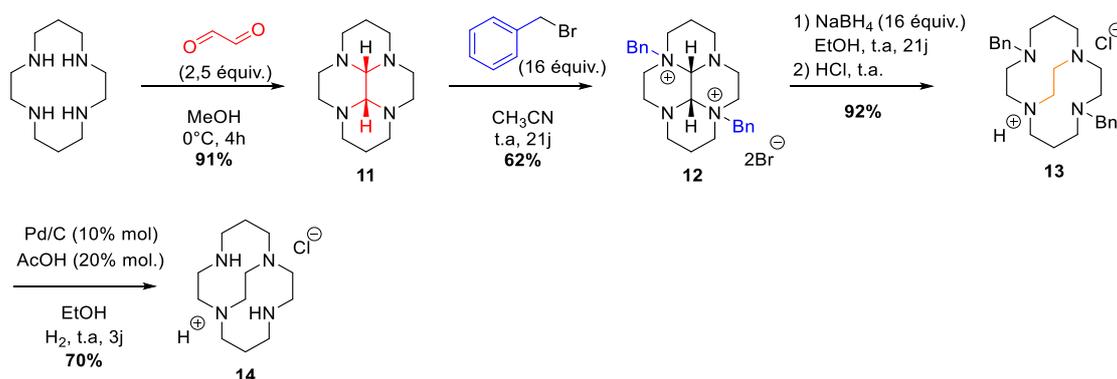


Figure 70 - Synthèse du cyclam renforcé **14**.

La synthèse du ligand L_1 s'effectue en deux étapes, à partir du cyclam renforcé **14** et de l'antenne **10**. La première étape consiste à engager l'antenne **10** dans une réaction $\text{S}_{\text{N}}2$ avec le cyclam *cross-bridged* **14**. Le caractère d'éponge à proton de la plateforme défavorise la deuxième alkylation car le deuxième azote se protone suite à la première alkylation. Les tests de purification ont montré que le composé **16** se dégradait ou s'hydrolysait sur la colonne chromatographique surtout si celle-ci était trop longue. Après plusieurs purifications délicates, le composé **16** est obtenu avec un rendement de 48 % (**Figure 71**).

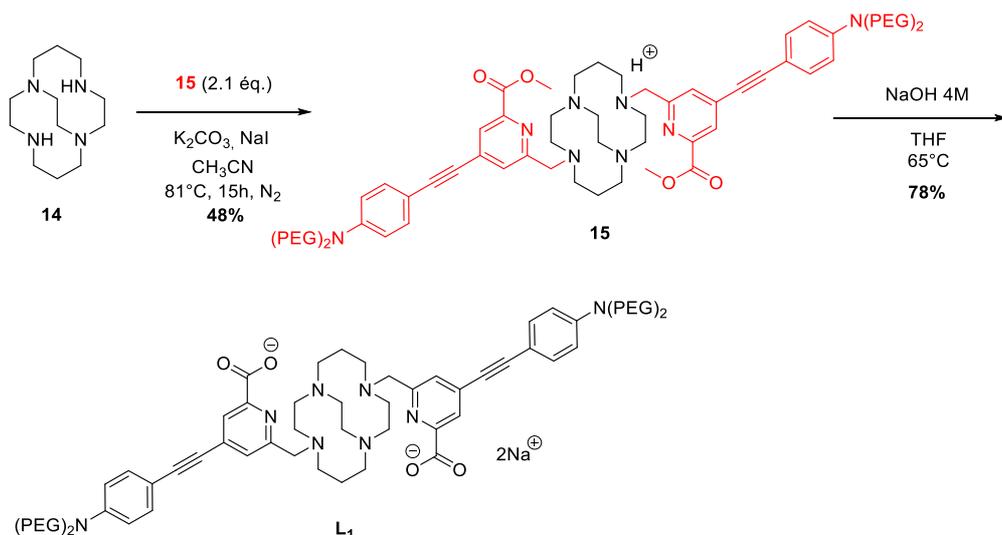


Figure 71 - Synthèse du ligand L_1 .

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C du composé **16** ont été enregistrés dans le CDCl_3 . Le spectre RMN ^1H (Figure 72) montre la présence des signaux 1 et 3 caractéristiques des $-\text{CH}$ du noyau aromatique du picolinate à 7,80 et 7,19 ppm. Les doublets 2 et 4 présents à 7,32 et 6,64 ppm correspondent aux $-\text{CH}$ du noyau aromatique qui porte les chaînes PEG. Le composé **16** étant protonné, les protons du $-\text{CH}_2$ du bras picolinate en position 5 résonnent sous la forme de deux doublets mais résolus à 3,98 et 3,71 ppm. Le groupement CH_3 de l'ester méthylique résonne sous la forme d'un singulet à 3,28 ppm. Les CH_2 des chaînes PEG ne sont pas différenciables et se retrouvent sous la forme d'un multiplet à 3,50 ppm, tandis que les protons des groupements $-\text{CH}_3$ terminaux des chaînes PEG sortent sous la forme d'un singulet à 3,39 ppm. Les signaux correspondants aux protons des groupements $-\text{CH}_2$ du macrocycle sortent entre 1,5 ppm et 4 ppm et sont difficilement attribuables.

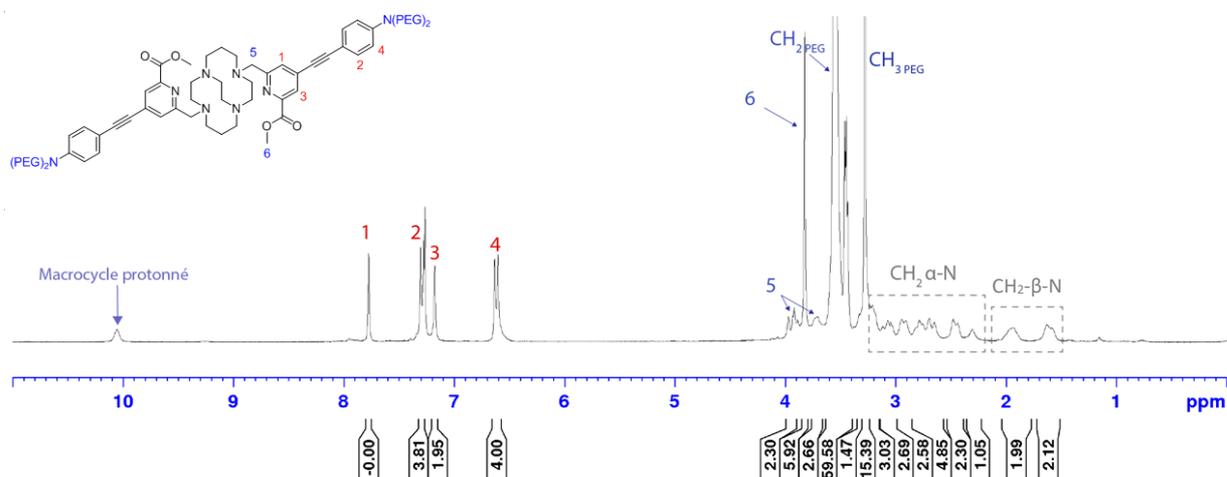
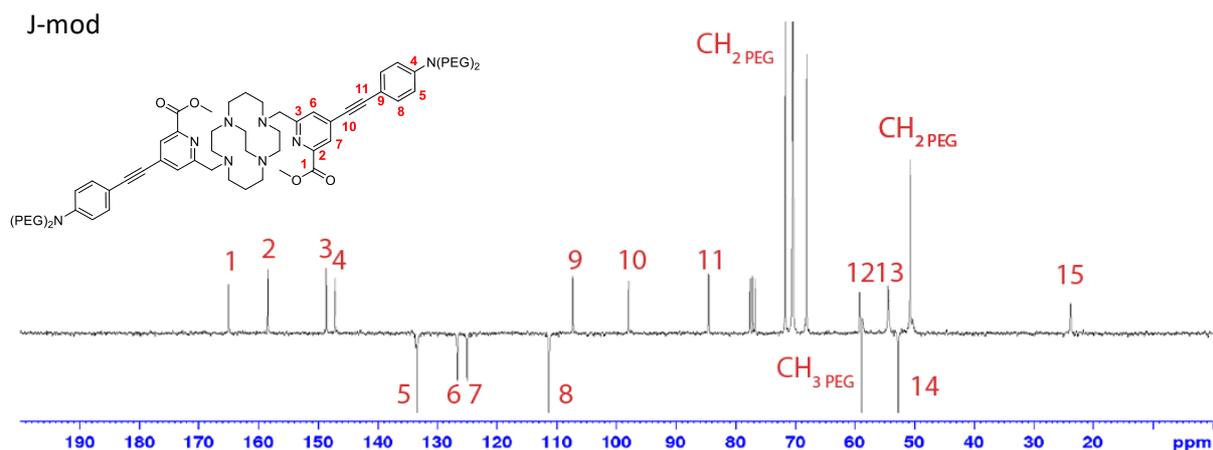


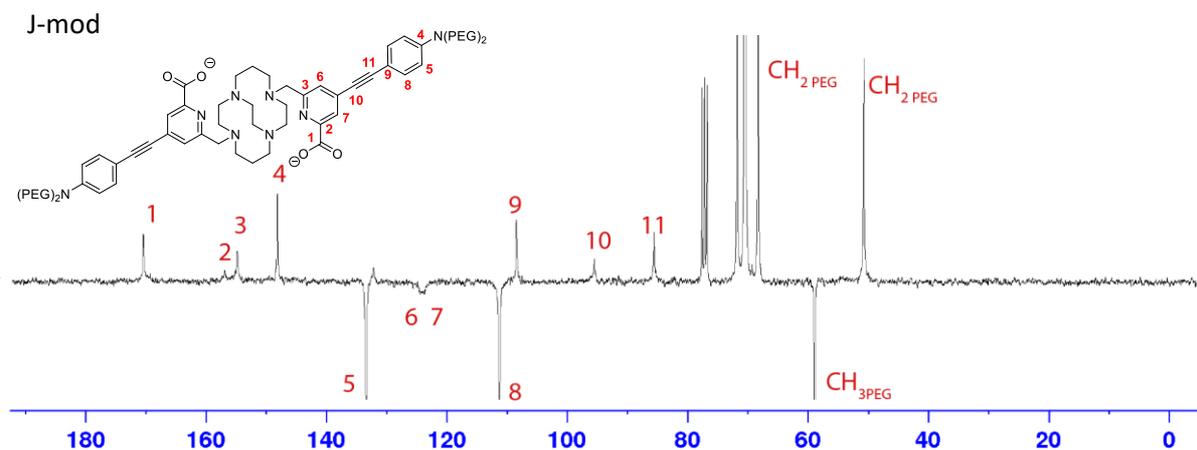
Figure 72 - Spectre RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , 25°C) du composé **15**.

L'étude par RMN ^{13}C en J-modulation confirme l'obtention du composé **15** (Erreur ! Source du renvoi introuvable.). Le carbone quaternaire du groupement carbonyle en position **1** résonne sous la forme d'un pic positif à 165 ppm. Les signaux correspondant aux $-\text{C}_{\text{Ar}}$ du picolinate apparaissent à 158 ppm et 148 ppm (position **2** et **3**). Le pic négatif à 52,7 ppm (position **14**) est caractéristique du groupement $-\text{CH}_3$ de la fonction ester méthylique tandis que le pic situé à 50,7 ppm, correspond aux groupements $-\text{CH}_2$ des chaines PEG. Enfin, le composé **15** étant symétrique, les carbones du macrocycle en β d'azote résonnent sous la forme d'un unique pic positif à 23,8 ppm (position **15**).



L'hydrolyse des esters méthyliques est réalisée en condition basique (NaOH 4M, THF) en raison de la faible stabilité du groupement acétylénique en milieu acide. Le ligand **L₁** est obtenu avec un rendement de 78% après purification sur colonne d'exclusion stérique. Le spectre RMN ^{13}C confirme la structure du ligand **L₁** (Figure 74).

La disparition du pic CH_3 de l'ester méthylique à 52,7 ppm et le déblindage du signal du carbonyle de 165,4 à 173,8 ppm (position **1**) permettent de confirmer l'hydrolyse de la fonction ester méthylique en fonction carboxylate. Les carbones du macrocycle ne sont pas observables.



Toutefois, la caractérisation par masse haute résolution (HRMS-ESI) donne un pic $m/z = 656,3779$ montrant une espèce dichargée $[M+2H]^{2+}$ correspondant au composé attendu (m/z calculé = 656,3779).

4. Synthèse du complexe $[YbL_1]^+$

Nous avons vu au cours du **Chapitre 1** que la métallation du **H₂CB-TE2PA** requérait des conditions drastiques (micro-ondes, solvant à haut point d'ébullition, conditions anhydres,...) compte tenu du caractère éponge à protons du ligand. La synthèse du complexe d' Yb^{3+} basé sur le ligand **L₁** a été réalisée sous micro-ondes (150°C, 250 psi, 300 W) dans le *n*-butanol en utilisant la *N,N*-diisopropyléthylamine (DIPEA) comme base et un excès d' $YbCl_3 \cdot 6H_2O$ (**Figure 75**).

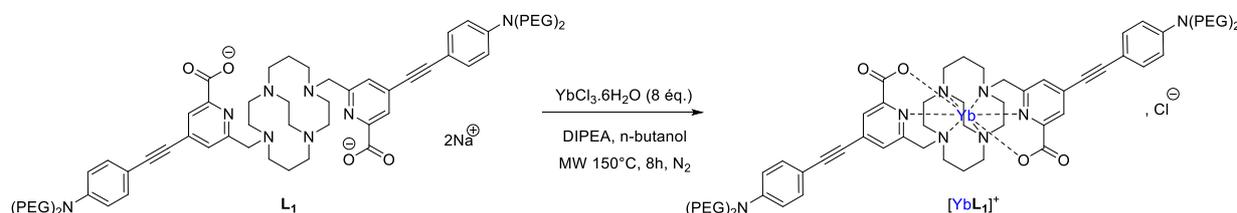


Figure 75 - Synthèse du complexe $[YbL_1]^+$.

Malgré ces conditions réactionnelles, la réaction de complexation n'est pas totale et le produit obtenu nécessite d'être purifié sur HPLC semi-préparative (C₁₈). Le complexe $[YbL_1]^+$ est finalement isolé comme l'atteste le chromatogramme HPLC avec un rendement de 36 % (**Figure 76**).

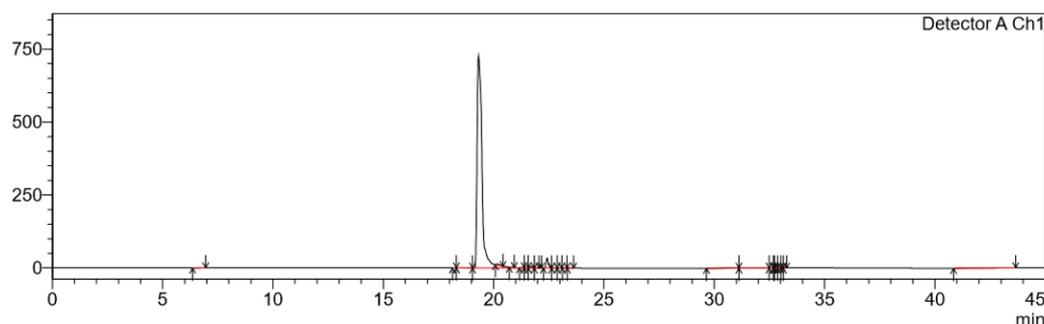


Figure 76 - Spectre analytique post-purification sur HPLC de $[YbL_1]^+$.

Le complexe d' Yb^{3+} étant paramagnétique, la caractérisation par RMN n'est pas possible. Toutefois, la caractérisation par masse haute résolution (HRMS-ESI) nous a permis de prouver l'obtention du complexe avec un pic $[M+H]^{2+}$ à $m/z = 741,8361$ correspondant au composé attendu (m/z calculé = 741,8357).

5. Etudes spectroscopiques

Les études spectroscopiques ont été réalisées en collaboration avec l'équipe du Dr. O. Maury à l'ENS Lyon. Le complexe $[\text{YbL}_1]^+$ a été étudié dans l'eau et dans un mélange méthanol/éthanol à température ambiante et à 77 K.

Le spectre d'absorption du complexe $[\text{YbL}_1]^+$ présente une bande large intense à 387 nm dans l'eau attribuée à la transition ILCT de l'antenne (**Figure 77**). Une excitation dans la bande ICLT à 410 nm entraîne l'émission dans le proche infrarouge de l'ytterbium(III) due à la transition caractéristique ${}^2F_{5/2} \rightarrow {}^2F_{7/2}$ (**Figure 77**, trait plein rouge), située dans la plage 980-1040 nm. Dans la région visible, une émission résiduelle du ligand peut être observée autour de 554 nm (**Figure 77**), indiquant que le transfert d'énergie de l'antenne à l'ion Yb^{3+} n'est pas total.

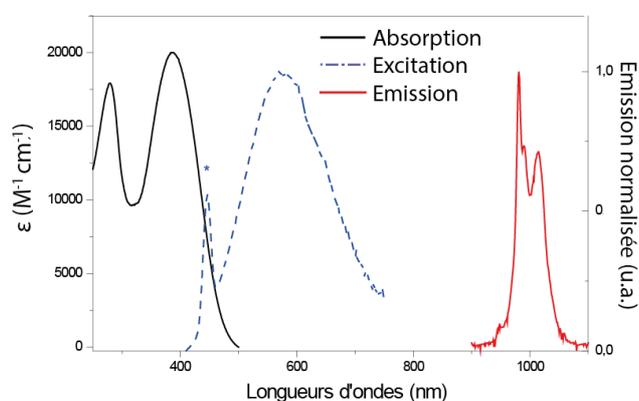


Figure 77 – Spectre d'absorption et d'émission du complexe $[\text{YbL}_1]^+$ dans l'eau à température ambiante. Absorption (trait plein noir), émission résiduelle de la bande ILCT du ligand (pointillés bleus), émission dans la région NIR centrée sur la transition ${}^2F_{5/2} \rightarrow {}^2F_{7/2}$ de l'ion Yb^{3+} .

Le spectre d'émission de $[\text{YbL}_1]^+$ mesuré dans le mélange EtOH/MeOH 4/1 à température ambiante (**Figure 78 (a)**) montre une bande large mal définie entre 950 et 1070 nm. La mesure prise à froid (77 K) permet d'obtenir un spectre d'émission dont les bandes sont affinées (**Figure 78, (b)**) contenant 3 pics principaux. Cependant, l'attribution précise des bandes résultantes de la transition ${}^2F_{5/2} \rightarrow {}^2F_{7/2}$ s'avère difficile.

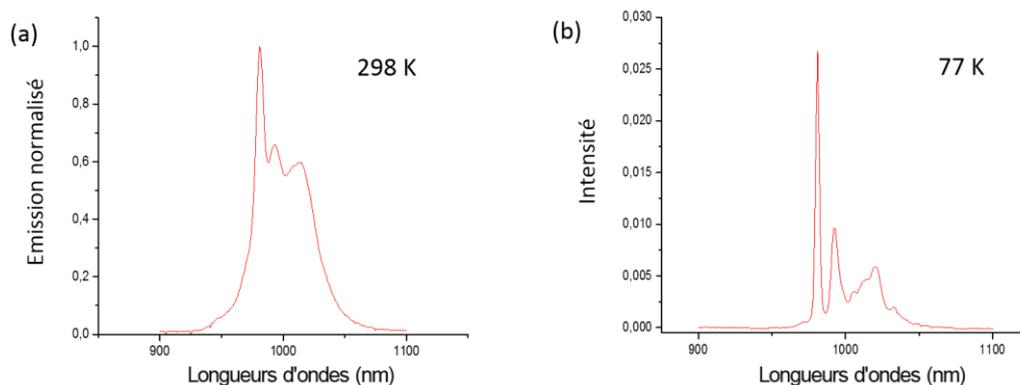


Figure 78 - Spectres d'émission de $[YbL_1]^+$ à (a) 298 K et (b) 77 K dans un mélange EtOH/MeOH 4/1 ($\lambda_{exc} = 410$ nm).

Les durées de vie de luminescence ont été mesurées dans le dichlorométhane, le méthanol, l'eau et l'eau deutérée (**Tableau 15**). Le complexe $[YbL_1]^+$ a une durée de vie de luminescence de 3,3 μs dans l'eau qui est d'un ordre de grandeur supérieur à celle du complexe $[Yb(MeDO2PA-NPEG)]^+$ ($\tau = 2,2 \mu s$),¹¹⁹ mais dans la même gamme que la valeur obtenue pour le complexe analogue de type tacn $[Yb(NO3PA-NPEG)]$ ($\tau = 3 \mu s$).¹¹⁶ Il est à noter que cette durée de vie de 3,3 μs dans l'eau rend le complexe $[YbL_1]^+$ comparable aux meilleurs sondes NIR à base d'ytterbium(III)^{125,126} à l'exception des sondes à base de lanthanides fluorées et/ou deutérées qui possèdent des temps de vie extrêmement longs ($\tau > 18 \mu s$) dans l'eau.^{114,127} L'augmentation de la durée de vie de luminescence en passant de l'eau au méthanol et au dichlorométhane, est en accord avec la diminution du nombre d'oscillateurs O-H (**Tableau 15**).

Solvants	λ_{abs} (nm)	τ_{H_2O} (μs)	ϵ ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)	q
CH ₂ Cl ₂	405	4,8	28 000	n.d.
MeOH	401	3,5	32 000	n.d.
H ₂ O	387	3,3	20 000	0,1
D ₂ O	n.d.	5,3	n.d.	n.d.

Tableau 15 – Données photophysiques du complexe $[YbL_1]^+$ dans différents solvants à température ambiante. n.d. non déterminé.

La durée de vie de luminescence dans l'eau laisse supposer l'absence de molécules d'eau dans la sphère de coordination du lanthanide, ce qui est confirmé par l'équation d'Horrocks et Beeby qui donne pour le complexe $[YbL_1]^+$ un nombre d'hydratation q égal à 0,1. Cependant, la présence de molécules d'eau dans la seconde sphère de coordination du complexe reste envisageable, par formation de liaisons hydrogène *via* l'atome d'oxygène du carboxylate (**Figure 79**). Un comportement similaire avait été auparavant observé avec les complexes d'Eu³⁺ et d'Yb³⁺ également substitués par des antennes à deux photons, menant à une interprétation comparable.^{113,119}

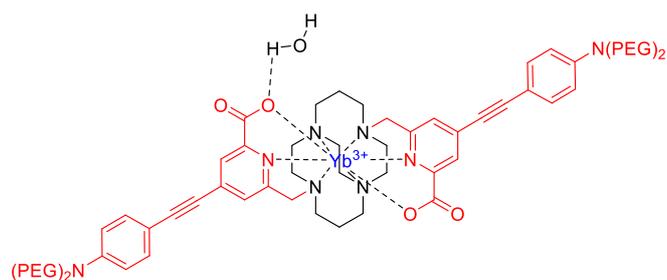


Figure 79 - Illustration proposée de la présence d'une molécule d'eau.

L'efficacité de la luminescence centrée sur le métal peut être estimée par le rapport entre la durée de vie expérimentale (τ_{obs}) et la durée de vie purement radiative (τ_{rad}) de l'ytterbium ($\tau_{\text{rad}} = 0,27$ ms dans le cas de l' Yb^{3+}). Le complexe $[\text{YbL}_1]^+$ présente un rendement quantique de 1,2 % dans l'eau améliorée par comparaison au $[\text{Yb}(\text{MEDO2PA-NPEG})]^+$ ($\phi = 0,8$ %).

Le complexe $[\text{YbL}_1]^+$ a été impliqué dans des expériences de bio-imagerie à deux photons sur cellules HeLa fixées. Une solution de $[\text{YbL}_1]^+$ dans un tampon phosphate a été ajoutée au milieu de culture de cellules HeLa afin d'atteindre une concentration finale de l'ordre de 5 à $10 \cdot 10^{-6}$ mol.L⁻¹. Après 4h d'incubation, une excitation a été effectuée dans le proche infrarouge à 800 nm. La luminescence du complexe $[\text{YbL}_1]^+$ permet d'obtenir des images avec un bon rapport signal sur bruit dans le visible et dans le NIR (**Figure 80**).

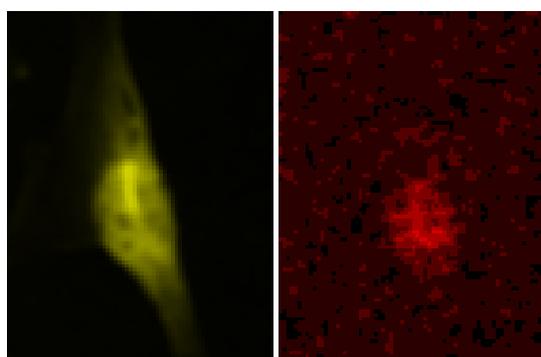


Figure 80 - Microscopie à deux photons de cellules HeLa fixées après 4h incubation avec la sonde $[\text{YbL}_1]^+$ en configuration NIR-vers-visible (gauche) et NIR-vers-NIR (droite) ($c = 5 \cdot 10^{-6}$ M, $\lambda_{\text{exc}} = 800$ nm).

Les études d'imagerie ont montré que le complexe présente une localisation très similaire à celle du complexe $[\text{Yb}(\text{MeDO2PA-OPEG})]^+$, c'est-à-dire une accumulation près de la membrane cytoplasmique et dans les zones périnucléaires du cytosol.

V. Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons discuté des particularités et des avantages de l'imagerie dans la région NIR et de l'intérêt de la microscopie à deux photons pour cibler cet objectif. Nous avons également démontré la pertinence de l'utilisation des lanthanides(III). Parmi eux, l'ytterbium(III) se distingue pour son émission dans la fenêtre de transparence biologique. Dès lors, un aperçu des stratégies permettant d'optimiser la luminescence de ce métal a été donné, en se focalisant sur certains aspects tels que l'utilisation d'antennes ou la protection du lanthanide vis-à-vis de la coordination de molécules d'eau en première ou seconde sphère.

Des travaux antérieurs de notre équipe sur le complexe **H₂CB-TE2PA** ont démontré que le ligand respectait le cahier des charges pour une application en imagerie optique. En effet, les complexes de lanthanides(III) dérivés du ligand **H₂CB-TE2PA** sont extrêmement inertes et donnent l'avantage d'exclure la coordination de molécule d'eau qui entraînerait une extinction de la luminescence.

Dès lors, la synthèse de l'antenne a été réalisée avec de très bons rendements suite à la modification de certains paramètres (température, quantité en catalyseurs) lors des différentes réactions de couplage, ce qui a permis d'améliorer le rendement global de 34 à 77 %. Le ligand **L₁** a ensuite été obtenu en deux étapes à partir du cyclam *cross-bridged*. La complexation de l'ion Yb³⁺ a nécessité d'utiliser des conditions drastiques pour obtenir le complexe [YbL₁]⁺ avec un rendement satisfaisant.

Les études spectroscopiques du complexe [YbL₁]⁺, réalisées au sein du laboratoire du Dr. O. Maury à l'ENS Lyon, ont montré une première amélioration apportée par la rigidité du cyclam *cross-bridged* par comparaison au **H₂MeDO2PA-NPEG**. Le temps de vie de luminescence dans l'eau est égal à 3,3 μs et est comparable aux meilleures sondes NIR décrites dans la littérature. De plus, le complexe présente un rendement quantique intrinsèque de l'ytterbium(III) à 1,2 % contre 0,8 % pour le complexe [Yb(MeDO2PA-NPEG)]⁺. Cependant, une chute du rendement quantique d'une part, et une diminution de la durée de vie de luminescence d'autre part, dans les solvants protiques ont été observées. La présence d'une molécule d'eau dans la seconde sphère de coordination du complexe susceptible d'éteindre la luminescence est l'explication envisagée pour décrire ce phénomène.

Les études d'imagerie cellulaire à deux photons ont été réalisées en configuration NIR-vers-Vis et NIR-vers-NIR. Des images ont été obtenues avec un bon rapport signal sur bruit après internalisation du complexe [YbL₁]⁺ dans les cellules fixées HeLa, avec une localisation dans les zones périnucléaires du cytosol.

L'optimisation du complexe d' Yb^{3+} peut être poursuivie en améliorant d'une part, les propriétés d'internalisation en ajoutant un vecteur biologique et d'autre part, les propriétés spectroscopiques en remplaçant les groupements carboxylate par des groupements phosphinate. En effet, le groupe de Parker a démontré que ce type de groupement permet d'éviter la coordination de molécule d'eau sur l'euporium(III).¹²⁸

Enfin, l'antenne dérivée du picolinate décrite dans ce chapitre présente un intérêt en tant que chromophore pour une utilisation en imagerie optique (**Figure 81**). En effet, les ligands macrocycliques comportant une unité picolinate π -conjuguée sont émissifs en l'absence de métal, et peuvent être associés à une autre modalité pour la conception de sondes bimodales.

Un des axes du laboratoire porte sur le développement de sondes pour la tomographie d'émission de positons (TEP), notamment en associant deux imageries complémentaires telles que la TEP/Imagerie optique. Dans le chapitre qui suit, nous décrivons la conception de sondes bimodales TEP/Imagerie optique ainsi que les études physico-chimiques associées pour démontrer la faisabilité d'une telle sonde.

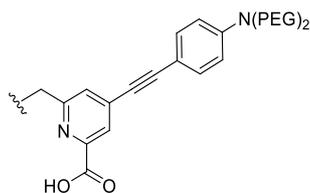


Figure 81 - Structure du chromophore.

Chapitre 3

Conception d'une sonde bimodale TEP/Imagerie
optique à base de Cu^{2+}

I. Introduction à l'imagerie bimodale

L'imagerie médicale permet une vision anatomique du corps humain pour comprendre son fonctionnement dans le but de traiter les maladies. Elle rassemble une grande variété de techniques qui comprend la radiographie, la tomodensitométrie (TDM), l'imagerie par résonance magnétique (IRM), l'imagerie optique (IO), la tomographie par émission monophotonique (TEMP) et la tomographie par émission de positons (TEP), ces deux dernières étant des techniques d'imagerie nucléaire. Ces techniques d'imagerie présentent toutes différents avantages et inconvénients en termes de résolution spatiale, de profondeur de pénétration ou de sensibilité (**Tableau 16**). Afin d'exploiter leurs avantages tout en diminuant leurs défauts, la combinaison de différentes modalités d'imagerie est devenue une stratégie de choix pour établir des diagnostics plus précis. Les combinaisons bimodales développées les plus décrites sont IRM/Imagerie optique, TEP/Imagerie optique, Imagerie nucléaire/TDM et IRM/Imagerie nucléaire.¹²⁹

Techniques	Sensibilité (M)	Résolution spatiale	Pénétration tissulaire	Rayonnement
TEP	Elevée 10^{-11} - 10^{-12}	Faible (5-7 mm)	Elevée	Ionisant
TEMP	Elevée 10^{-10} - 10^{-11}	Faible (8-10 mm)	Elevée	Ionisant
TDM	Faible	Elevée (0,5-1 mm)	Elevée	Ionisant
IRM	Faible 10^{-3} - 10^{-5}	Elevée (1 mm)	Elevée	Non ionisant
IO	Elevée 10^{-9} - 10^{-12}	Elevée 2-20 μ m	Faible	Non ionisant

Tableau 16 - Comparaison de différentes modalités d'imagerie.¹²⁹

A titre d'exemple, l'imagerie TEP est caractérisée par une sensibilité et une pénétration tissulaire élevées mais se distingue par une résolution spatiale faible, ce qui empêche d'analyser l'hétérogénéité des tissus au niveau cellulaire. En revanche, l'imagerie optique dont le principe a été décrit au cours du **Chapitre 2** possède une résolution spatiale et une sensibilité élevées, mais est caractérisée par une faible profondeur de pénétration. Par conséquent, l'intégration de ces deux modalités au sein d'une même sonde permettrait l'obtention de données complémentaires.

Ce travail de thèse a pour objectif le développement de sondes bimodales comportant une unité permettant l'imagerie TEP et une entité pour l'imagerie optique. En effet, comme il l'a été mentionné précédemment, la combinaison TEP/Imagerie optique présente un grand intérêt puisqu'elle permet

d'obtenir à la fois une image avec une excellente résolution, une sensibilité élevée et une pénétration tissulaire appréciable.

Les travaux décrits dans ce chapitre de thèse sont axés sur le développement de nouvelles sondes bimodales TEP/Imagerie optique à base de cyclam monopicolinate. Une première partie sera consacrée à une étude bibliographique qui permettra de situer le contexte du projet. Une deuxième partie décrira les résultats obtenus allant de la synthèse des sondes aux études physico-chimiques et *in vitro*.

II. La Tomographie par émission de positons

1. Principe

La TEP est basée sur l'utilisation d'un atome radioactif, aussi appelé radioisotope, émetteur de positons β^+ . Dans le milieu, ce positon entre en collision avec un électron voisin ce qui les annihile et entraîne l'émission de deux photons gamma γ de même énergie (511 keV), dans deux directions opposées. La trajectoire de ces photons est détectée par des gamma-caméras et permet d'obtenir une image tridimensionnelle de la zone étudiée (**Figure 82**).⁴⁴

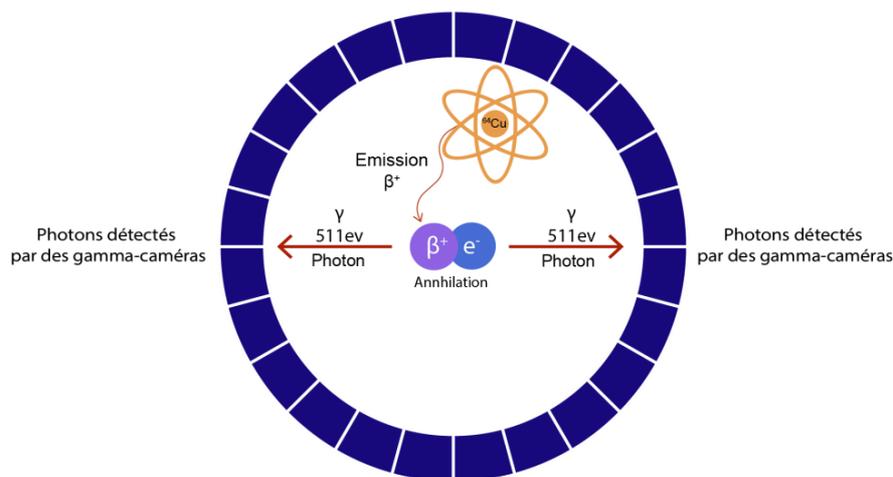


Figure 82 - Principe de l'imagerie TEP.

1.1. Principaux radioisotopes utilisés en imagerie TEP

Il existe une grande variété de radioisotopes qui peuvent être utilisés pour l'imagerie TEP. Certains d'entre eux sont plus couramment étudiés ou employés comme le ^{18}F , le ^{64}Cu , le ^{68}Ga ou le ^{89}Zr . La plupart des isotopes sont produits dans un cyclotron, mais certains d'entre eux, tels que le ^{68}Ga , peuvent être produits à l'aide d'un générateur (**Tableau 17**).

Un radioisotope est caractérisé par plusieurs paramètres :

- Le temps de demi-vie ($t_{1/2}$) : temps nécessaire pour que la moitié des atomes radioactifs se désintègre naturellement.
- Le mode de désintégration : les radioisotopes peuvent combiner plusieurs modes de désintégrations. Un noyau présentant un excès de neutrons subira une désintégration β^- , un noyau présentant un excès de protons se traduira par une désintégration β^+ ou par capture électronique (CE).
- L'énergie du rayonnement (keV) : énergie libérée lors de la désintégration (β^+) d'un radioisotope.

Radioisotope	$t_{1/2}$	Mode de désintégration (%)	Énergie (keV)	Mode de production
^{68}Ga	68 min	β^+ (89 %) CE (11 %)	1880 -	Générateur $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$
^{18}F	109 min	β^+ (97 %) CE (3 %)	634 -	Cyclotron
^{64}Cu	12,7 h	β^+ (19 %) CE (41 %) β^- (40 %)	656 - -	Cyclotron
^{89}Zr	78,5 h	β^+ (23 %) CE (77 %)	903 - -	Cyclotron

Tableau 17 - Liste non exhaustive de radioisotopes utilisés en imagerie TEP.³

Le fluor 18 (^{18}F), avec une demi-vie égale à 109 min, est le radioisotope le plus utilisé en clinique sous la forme du radiopharmaceutique ^{18}F -FDG (2- ^{18}F fluoro-2-désoxy-D-glucose). Ce radiopharmaceutique est un analogue du glucose dans lequel un groupement hydroxyle a été remplacé par un atome de fluor radioactif ^{18}F (**Figure 83**).¹³⁰

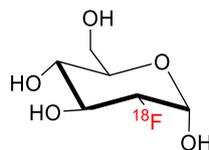


Figure 83 - Structure du ^{18}F -FDG.

Le ^{18}F -FDG est capté par les cellules en utilisant les mêmes récepteurs que ceux du glucose. Le radiotraceur est en effet métabolisé par les cellules très consommatrices en glucose, notamment par les cellules cancéreuses. Toutefois, son utilisation dans le diagnostic de cancers est limitée en

raison de sa forte absorption dans les tissus cérébraux, dans les reins ou la vessie rendant difficile l'imagerie de tumeurs dans ces zones.⁴⁴ Une captation non tumorale (faux positif) provenant de pathologies inflammatoires ou infectieuses est également observée. Enfin, certaines tumeurs (tumeurs carcinoïdes) ont une faible affinité avec le ^{18}F -FDG ce qui peut mener à des mauvaises interprétations (faux négatifs).¹³¹

Afin d'atténuer ces limitations, de nouveaux radiopharmaceutiques ont été développés et sont utilisés en clinique tels que la ^{18}F -FDOPA (L-6- ^{18}F fluoro-3,4-dihydroxyphénylalanine) également approuvée par la FDA pour détecter les tumeurs endocrines ou le ^{18}F -FCH (^{18}F fluorocholine) qui est en cours d'évaluation pour la détection du cancer de la prostate (**Figure 84**).^{132,133}

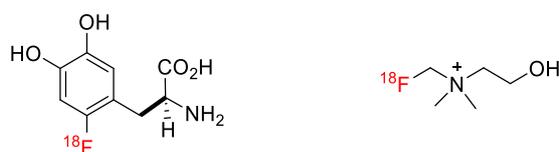


Figure 84 - Structure du ^{18}F -FDOPA et du ^{18}F -FCH.

Compte tenu de la demi-vie du ^{18}F (109 min), la synthèse d'un radiopharmaceutique doit être rapide pour une utilisation optimale en imagerie TEP, ce qui restreint son utilisation à des radiopharmaceutiques dont la biodistribution est rapide. Ainsi, l'utilisation d'autres radiométaux, tels que le cuivre-64 ($^{64}\text{Cu}^{2+}$), en imagerie TEP a connu un gain d'intérêt pour le radiomarquage de biomolécules. Le $^{64}\text{Cu}^{2+}$ possède une demi-vie plus longue de 12,7 h et est de plus en plus impliqué dans le développement de radiopharmaceutiques pour des applications en médecine nucléaire, notamment en imagerie phénotypique dont le principe repose sur l'utilisation d'anticorps pour le ciblage spécifique de tumeurs.³

2. Chélates polyazotés pour la complexation du $^{64}\text{Cu}^{2+}$

Les radiopharmaceutiques à base de radiométaux, comme le $^{64}\text{Cu}^{2+}$, sont formés de plusieurs entités liées entre-elles. Ils sont constitués d'un ligand couplé, directement ou *via* un espaceur, à un vecteur biologique (analogue peptidique, sucre, anticorps,...) ayant une affinité élevée pour le biomarqueur ciblé (**Figure 85**).¹³⁴

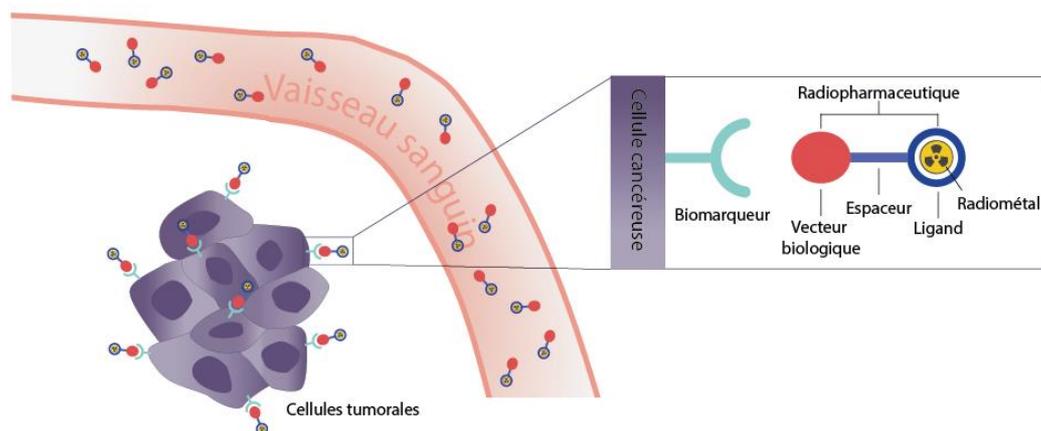


Figure 85 - Illustration d'un radiopharmaceutique et son mode d'action.

Nous avons vu au cours du **Chapitre 1** que l'utilisation de métaux en imagerie médicale nécessite de répondre à certains critères imposés par le milieu biologique. Les complexes métalliques doivent être cinétiquement et thermodynamiquement stables ainsi qu'être inertes vis-à-vis de la réduction (dans le cas du $^{64}\text{Cu}^{2+}$).

De plus, pour une utilisation en imagerie TEP, le chélatant constituant le radiopharmaceutique doit répondre à des critères supplémentaires ¹³⁵ :

- La vitesse de métallation doit être rapide vis-à-vis du temps de demi-vie du radioisotope.
- Posséder une fonction de couplage permettant le greffage sur le vecteur biologique.
- Le radiomarquage doit se réaliser dans des conditions douces (entre 20 et 37°C) afin d'éviter d'endommager le vecteur biologique.

La mise au point de ligands capables de former des radiocomplexes très stables *in vivo* a connu un gain d'intérêt depuis les années 1980, lorsque Meares et *al.* ont démontré qu'un dérivé du **H₄TETA** possédait une meilleure inertie que des chélates polyazotés linéaires dans du sérum humain.¹³⁶ Depuis, de nombreux complexes de $^{64}\text{Cu}^{2+}$ dérivés du cyclam décrits au cours du **Chapitre 1** ont été étudiés.

A l'exception du **H₂CB-TE2A**, les conditions de radiomarquage sont rapides et douces (25-30°C, 15-30 min, **Tableau 18**). Le ligand **H₁TE1PA**, présenté au cours du **Chapitre 1**, a montré un radiomarquage très rapide et quantitatif dans des conditions douces (25°C, 15 min). Des études complémentaires ont permis également de démontrer l'absence de dissociation en milieu sérique après 24 heures d'incubation. Les études de stabilité *in vivo* ont également prouvé l'absence de transchélation *in vivo*.⁹ Le comportement du radiocomplexe s'est ainsi révélé très prometteur pour l'élaboration d'un radiopharmaceutique pour l'imagerie TEP.

	H ₄ TETA	H ₂ TE2A	H ₁ TE1PA	H ₂ CB-TE2A	H ₃ CB-TE1A1P	H ₄ CB-TE2P
Temps	30 min	20 min	15 min	30 min	30 min	30 min
Température	25°C	30°C	25°C	75°C	25°C	25°C
Références	6	32	9	6	137	137

Tableau 18 - Récapitulatif des conditions de radiomarquage.

3. Bioconjugaison des ligands

Dans les radiopharmaceutiques à base de $^{64}\text{Cu}^{2+}$, ce dernier est complexé par un ligand bioconjugué à un vecteur biologique (**Figure 85**). La fonction du ligand la plus utilisée pour réaliser les réactions de conjugaison avec une entité biologique est la fonction acide carboxylique qui est sacrifiée afin de réaliser la réaction de couplage. La fonction acide carboxylique peut être activée en fonction ester succinimide ou ester tétrafluorophényl. Les ligands obtenus peuvent alors réagir avec les amines primaires des résidus lysine (**Figure 86**).¹³⁵

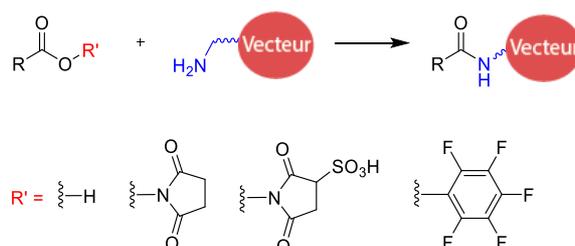


Figure 86 - Bioconjugaison par formation d'une fonction amide.

La fonction isothiocyanate est également très utilisée pour la bioconjugaison de ligands compte tenu de sa bonne réactivité et des excellents rendements qui en découlent.¹¹ Elle mène à la création d'une liaison thiourée très stable *in vivo* après réaction avec une fonction amine primaire d'un résidu lysine portée par la biomolécule (**Figure 87**).



Figure 87 - Bioconjugaison par formation d'une fonction thiourée.

La fonction thiol d'un résidu cystéine peut réagir avec des ligands portant un groupement maléimide par une réaction « click » de type thiol-ène qui conduit à la formation d'une liaison thioéther (**Figure 88**).¹³⁵



Figure 88 - Bioconjugaison par formation d'une fonction thioéther.

Enfin, une réaction de cycloaddition de Huisgen entre un alcyne et un azoture terminal est également une voie étudiée pour coupler le ligand et la biomolécule. La catalyse permet une réaction rapide et quantitative (**Figure 89**).¹³⁵ Toutefois, l'utilisation du cuivre pour catalyser la réaction a longtemps été un problème pour conjuguer des ligands azotés avec une biomolécule. Des méthodes de cycloaddition sans cuivre en utilisant des dérivés de cyclooctine ont été alors développées et ont présentées une cinétique de réaction très rapide.^{138,139}

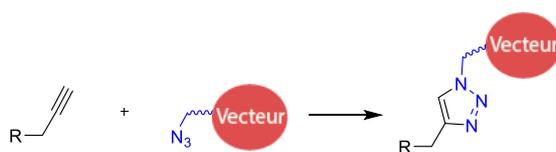


Figure 89 - Réaction de cycloaddition entre un alcyne vrai et un azoture.

4. Travaux de l'équipe en imagerie TEP

Notre équipe a décrit la bioconjugaison du **H₁TE1PA** à l'anticorps F6 pour la détection de l'antigène carcino-embryonnaire (AEC) surexprimé dans le cas du cancer colorectal (LS174T).¹⁰ La fonction acide du bras picolinate du **H₁TE1PA** a été activée pour permettre une réaction de bioconjugaison avec des résidus amines primaires des lysines de l'anticorps qui conduit à la formation d'une fonction amide. Le **H₄DOTA** a été utilisé comme référence pour déterminer le potentiel en imagerie TEP du ligand **H₁TE1PA**. La fonction de greffage du **H₄DOTA** est portée par un atome de carbone du macrocycle cyclen (C-fonctionnalisation) ce qui permet de laisser intacts les bras coordinants du ligand. Ce dernier a été bioconjugué à ce même anticorps *via* une fonction isothiocyanate qui a conduit à la formation d'une fonction thiourée (**Figure 90, a**). Le radiomarquage a pu être réalisé dans des conditions douces (40°C, pH 6,5-7, 25 min) et des images sur petit animal ont été obtenues (**Figure 90, b**)).

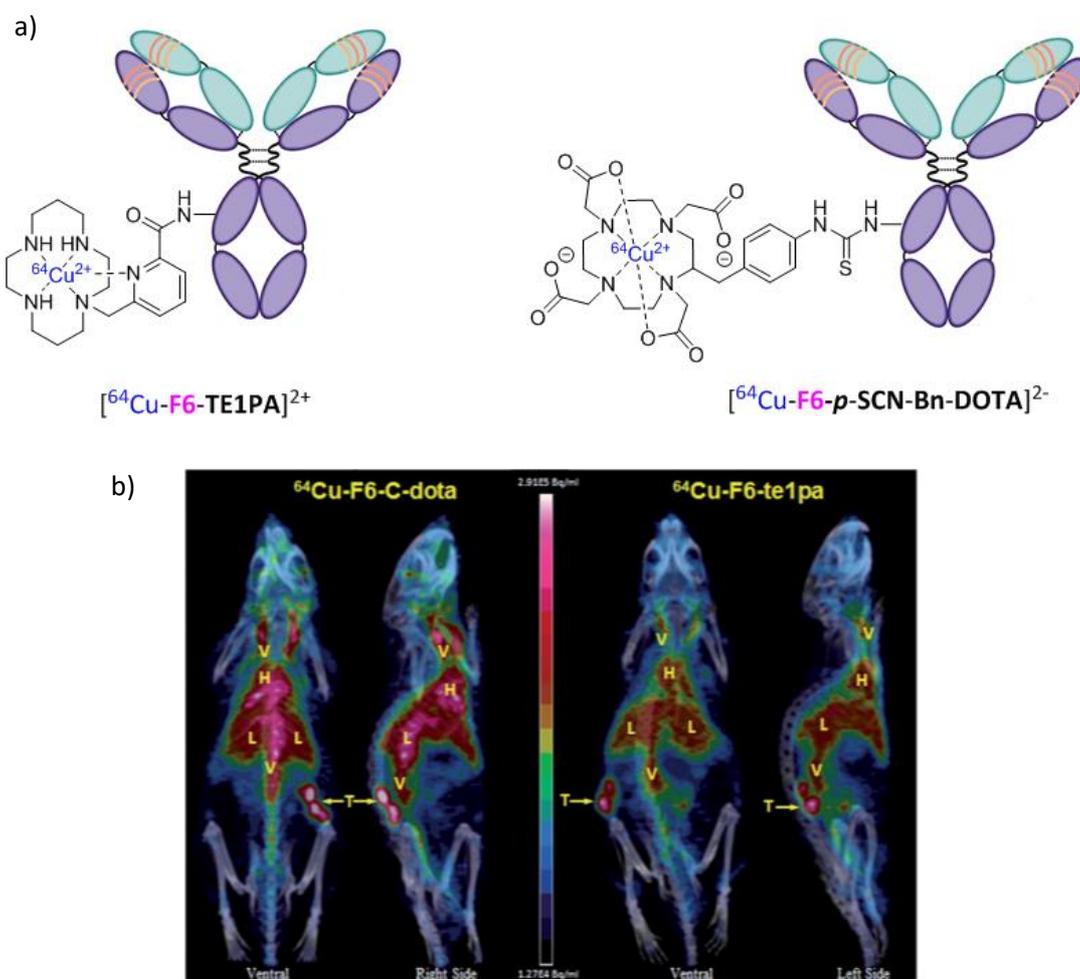


Figure 90 - a) Structure des radiopharmaceutiques étudiés et b) images TEP-scan de souris porteuses d'une tumeur LS174T 24h après injection des radiopharmaceutiques. T = tumeur, V = circulation sanguine, L = foie, H : cœur.¹⁰

L'étude du métabolisme du foie montre que le $[^{64}\text{Cu-F6-TE1PA}]^{2+}$ possède une excellente stabilité vis-à-vis de la transchélation. Cependant, l'analyse de la biodistribution et des images TEP-scan 24 heures après l'injection ne permet pas de conclure sur un meilleur comportement *in vivo* du radiopharmaceutique dérivé de $\text{H}_1\text{TE1PA}$ par rapport à l'analogue du H_4DOTA . L'une des explications avancées est que la bioconjugaison *via* la fonction acide carboxylique du bras picolinate, bien que non coordinante, transforme la fonction acide en amide et modifie la charge globale du complexe.

Afin d'améliorer cette sonde, notre équipe a récemment décrit un analogue du $\text{H}_1\text{TE1PA}$, le *p*-SCN-Bn- TE1PA , possédant, sur un atome de carbone du squelette macrocyclique, une fonction de type phénylisothiocyanate. Elle permet la conjugaison à l'anticorps **9E7.4** pour le ciblage de l'antigène CD138 pour l'imagerie du myélome multiple (**Figure 91**, a)). Le radiomarquage au $^{64}\text{Cu}^{2+}$ a été réalisé dans des conditions douces (40°C, pH 7, 30 min) et la stabilité du radiocomplexe obtenu a été prouvée en milieu compétiteur. L'imagerie TEP réalisée sur petit animal (**Figure 91**, b)) a permis la visualisation

de la tumeur dès 2h après l'injection du radiopharmaceutique, ce qui confirme son affinité pour l'antigène ciblé. Les études menées avec $[^{64}\text{Cu-9E7.4-p-SCN-Bn-TE1PA}]^+$ montrent que le radiopharmaceutique est stable en milieu biologique même après 48h.

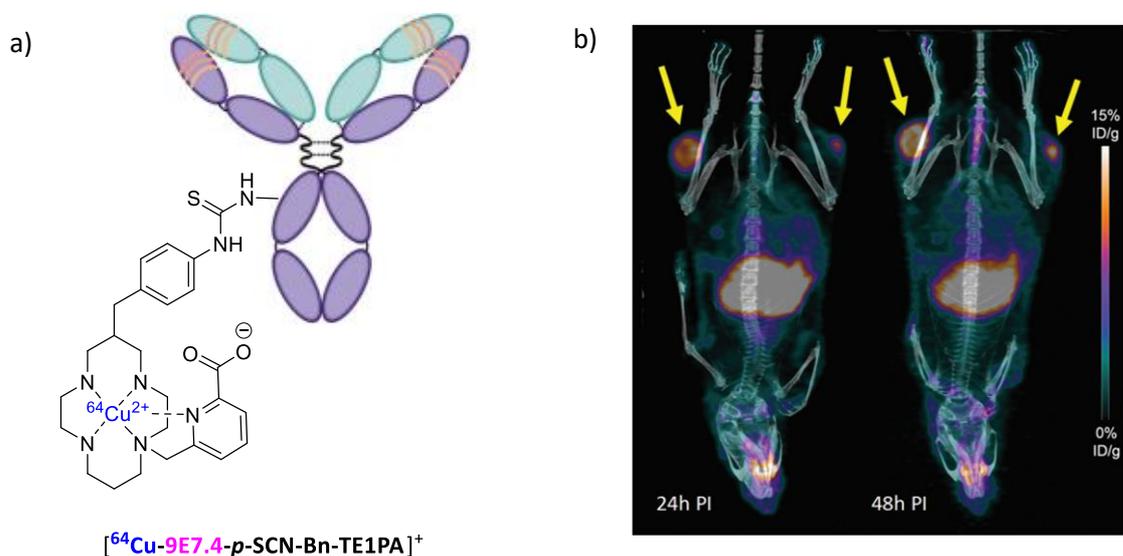


Figure 91 – a) Structure de $[^{64}\text{Cu-9E7.4-p-SCN-Bn-TE1PA}]^+$ et b) images TEP-scan de souris xéno greffée par les cellules 5T33 à 24 h et 48 h après injection du radiopharmaceutique. Les tumeurs sont indiquées par les flèches jaunes.¹¹

III. Sondes bimodales TEP/Imagerie optique

De nombreuses sondes bimodales TEP/Imagerie optique ont été développées au cours de ces dernières années. Elles sont, pour la plupart, à base de nanoparticules ou quantum dots,^{140,141} tandis que le développement de sondes de taille moléculaire reste peu décrit.

A titre d'exemple, Kimura et *al.* ont synthétisé une sonde bimodale de $^{64}\text{Cu}^{2+}$ $[^{64}\text{Cu}(\text{DOTA-Kno-Cys})]^-$. La sonde est basée sur H_4DOTA fonctionnalisé par un peptide (knottin 2.5D), qui contient le tripeptide RGD. Ce motif RGD est connu pour être le site de fixation de certains récepteurs d'adhésion cellulaire tels que les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$, des récepteurs surexprimés par différentes tumeurs cancéreuses (mélanome, cancer du sein ou de la prostate). L'édifice présente une cyanine (Cy5.5) pour permettre l'imagerie par fluorescence (**Figure 93**). Une bonne corrélation entre les deux modalités d'imagerie a été obtenue en réalisant des images jusqu'à 72h après injection du radiopharmaceutique, témoignant une bonne stabilité de la sonde bimodale *in vivo* (**Figure 92**).³⁰

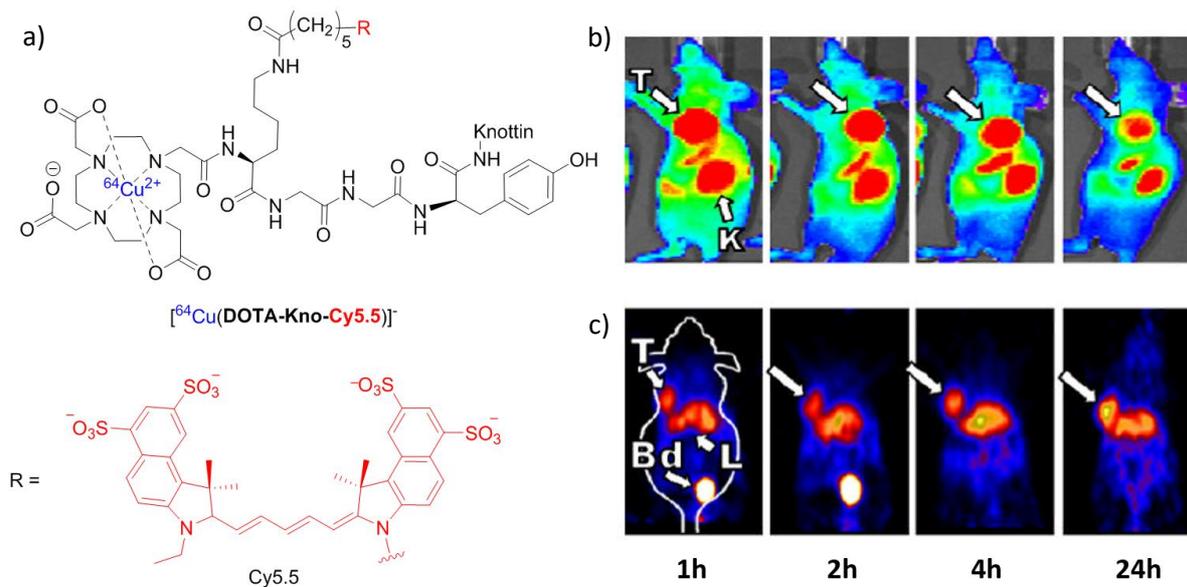


Figure 92 – a) Structure du $[^{64}\text{Cu}(\text{DOTA-Kno-Cys})]^-$ et images obtenues par b) TEP et c) imagerie optique dans le NIR d'une souris xéno greffée par une tumeur U87MG après marquage par la sonde bimodale. T : Tumeur, K : rein, Bd : vessie, L : foie. La flèche blanche indique la position de la tumeur. ³⁰

Cai et *al.* ont étudié une sonde de $^{64}\text{Cu}^{2+}$ dérivée du H_3NOTA , le $p\text{-SCN-Bn-NOTA}$. Ce dernier possède sur un atome de carbone du macrocycle, une fonction de type isothiocyanate permettant la conjugaison à l'anticorps bevacizumab (Bev). Suite à cette conjugaison, le fluorophore IRDye 800 CW a été impliqué à son tour dans une réaction de couplage peptidique avec l'anticorps permettant d'obtenir la sonde bimodale $[^{64}\text{Cu-NOTA-Bev-800CW}]^-$. L'étude a porté sur la bioconjugaison de ce ligand à l'anticorps bevacizumab (Bev) pour l'imagerie du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, une protéine impliquée dans de nombreux cancers, notamment le cancer colorectal. L'imagerie TEP sur petit animal porteur de tumeurs U87MG a révélé une bonne internalisation de $[^{64}\text{Cu-NOTA-Bev-800CW}]^-$ dans les cellules tumorales, corroborée par des études d'imagerie optique *in vivo* (**Figure 93**).¹⁴²

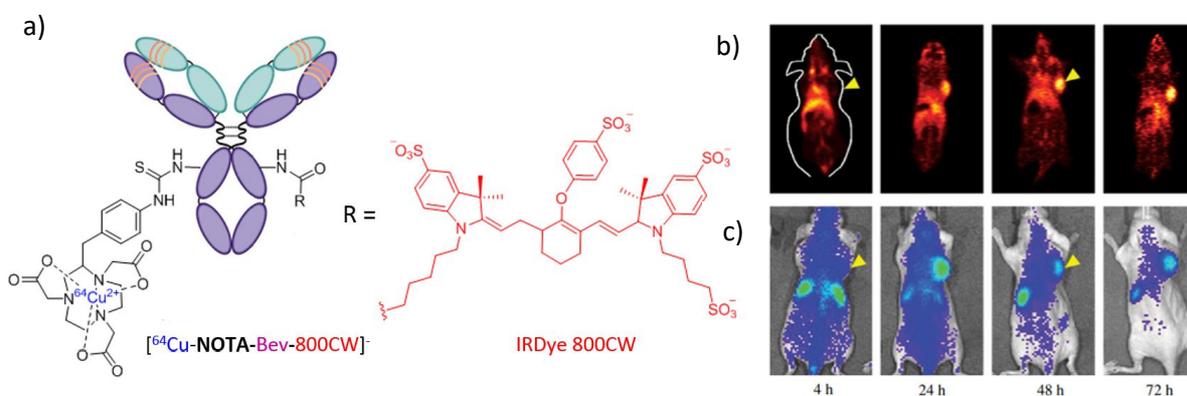


Figure 93 - a) Structure de la sonde bimodale $[^{64}\text{Cu-NOTA-Bev-800CW}]^-$. b) Imagerie TEP et c) imagerie optique d'une souris xéno greffée par une tumeur U87MG à 4h, 24h, 48h et 72h après injection de la sonde bimodale $[^{64}\text{Cu-NOTA-Bev-800CW}]^-$. La flèche jaune indique la localisation de la tumeur. ¹⁴²

Des études combinant TEP et imagerie optique dans le proche infrarouge ont également été réalisées permettant l'imagerie de tumeurs 4T1 chez le petit animal. Pour cela, le **p-SCN-Bn-NOTA** et le fluorophore IRDye800CW ont été bioconjugués à l'anticorps TRC105 afin de cibler la protéine CD105, récepteur surexprimé par les cellules endothéliales vasculaires subissant une angiogénèse. Une bonne corrélation de l'internalisation de la sonde bimodale dans les cellules tumorales 4T1 basée sur l'imagerie TEP et optique a été obtenue, confirmant que l'imagerie dans la région NIR sur petit animal peut donner des informations quantitatives sur la tumeur (**Figure 94**).¹⁴³

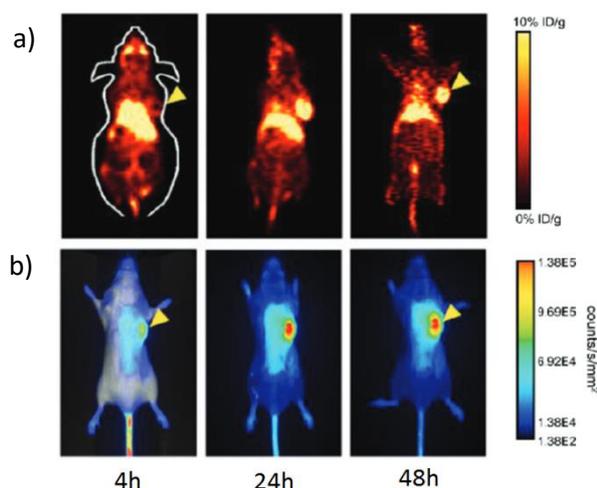


Figure 94 - Imagerie *in vivo* TEP/Imagerie optique de souris porteuses de tumeurs 4T1. a) Images obtenues par imagerie TEP et b) imagerie optique à 4, 24 et 48 h après l'injection de [⁶⁴Cu-NOTA-TRC105-800CW].¹⁴³ La tumeur sont indiquées par les flèches jaunes.

IV. Objectif

Notre projet de recherche s'inscrit dans le cadre d'un financement ANR (ANR SaDAM) pour le développement de sondes, alliant d'une part deux modalités de diagnostic (sondes bimodales) et d'autre part combinant une modalité de diagnostic et de thérapie (sondes théranostiques) que nous décrivons au cours du **Chapitre 4**.

Ce projet regroupe le savoir-faire de trois laboratoires. Notre groupe a démontré l'intérêt des dérivés picolines à base de tacn, cyclen et cyclam pour la complexation du ⁶⁴Cu²⁺ pour des applications en imagerie TEP. Certains de ces composés présentent déjà des résultats positifs *in vivo* chez le petit animal, comme démontré en collaboration avec l'équipe du Pr. Alain Faivre-Chauvet du CRCINA de Nantes, partenaire de l'ANR SaDAM.^{10,11,144} Le groupe du Dr. Olivier Maury, dernier membre du consortium a démontré l'intérêt de la fonctionnalisation de groupements picolinate par des antennes π-conjuguées pour sensibiliser les lanthanides(III) par absorption biphotonique (*cf.* **Chapitre 2**). Leur potentiel de pénétration cellulaire a été décrit et des images de cellules vivantes ont également été obtenues.¹¹⁹

Dans ce travail, les groupements picolinate π -conjugués, qui seront greffés à des plateformes macrocycliques, seront utilisés en tant que fluorophores à part entière. Au sein des macrocycles, un radiométal émetteur de positons β^+ sera inséré pour apporter la modalité d'imagerie TEP (**Figure 95**).

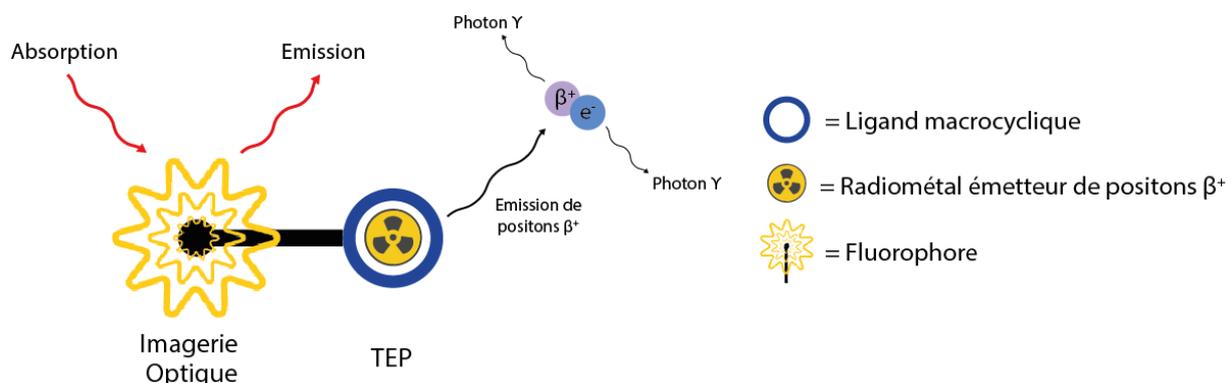


Figure 95 - Illustration de la sonde bimodale.

Au cours des **Chapitres 1** et **3**, nous avons décrit les ligands **H₁TE1PA** et **H₂CB-TE1PA** comme des ligands adaptés pour la complexation du cuivre(II) et donc du cuivre-64. Nous avons alors étudié la possibilité de greffer le fluorophore π -conjugué à base de picolinate sur le cyclam et le cyclam *cross-bridged* pour avoir accès à des dérivés du **H₁TE1PA** et **H₂CB-TE1PA** fluorescents. A noter que la modification du système π -conjugué ne devrait pas modifier les propriétés chélatantes de la plateforme macrocyclique. Les complexes de cuivre(II) obtenus à partir de ces ligands mèneront à des complexes monocationiques ce qui, en plus de la présence de chaînes PEG, devrait améliorer l'internalisation en milieu cellulaire (**Figure 96**).

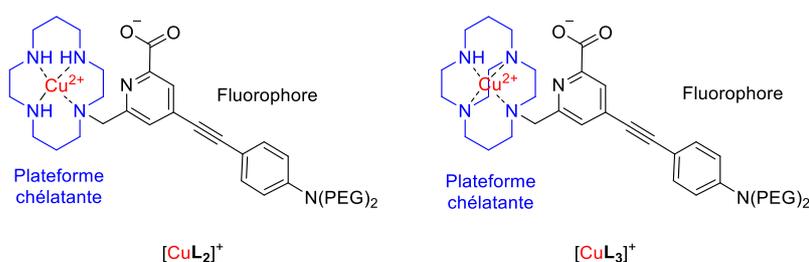


Figure 96 - Présentation des complexes de cuivre(II) cibles $[\text{CuL}_2]^+$ et $[\text{CuL}_3]^+$.

Le chapitre qui suit présentera la synthèse des ligands et des complexes de Cu^{2+} ($[\text{CuL}_2]^+$ et $[\text{CuL}_3]^+$) ainsi que les études électrochimiques afin d'étudier la stabilité des complexes. D'autre part, les résultats des études spectroscopiques des complexes de Cu^{2+} , obtenus dans le cadre d'une mobilité au sein de l'équipe d'Olivier Maury, seront également présentés. Enfin, les études de radiomarquage au $^{64}\text{Cu}^{2+}$ et les essais d'internalisation sur cellules, en collaboration avec l'équipe du Pr. Alain Faivre-Chauvet, seront également décrits. Pour permettre une vectorisation plus ciblée, les travaux préliminaires sur la conception d'une sonde bimodale C-fonctionnalisée pour le ciblage des zones hypoxiques seront présentés en tant qu'ouverture de ce travail.

V. Synthèse d'une sonde bimodale TEP/Fluorescence

1. Synthèse et caractérisation des ligands L₂ et L₃

1.1. Protection du cyclam

Notre équipe a développé des méthodes de protection du cyclam afin d'obtenir des composés tri-protégés permettant une mono-*N*-fonctionnalisation du cyclam par alkylation de la fonction amine secondaire libre. Ainsi, trois des atomes d'azote du cyclam peuvent être protégés par l'introduction d'un groupement phosphoryle.¹⁴⁵ La synthèse fait intervenir une réaction de transamination entre la tris(diméthylamino)phosphine et les fonctions amines du cyclam. En présence de tétrachlorure de carbone et après hydrolyse basique, le composé **16** est obtenu avec un rendement de 64% (Figure 97).

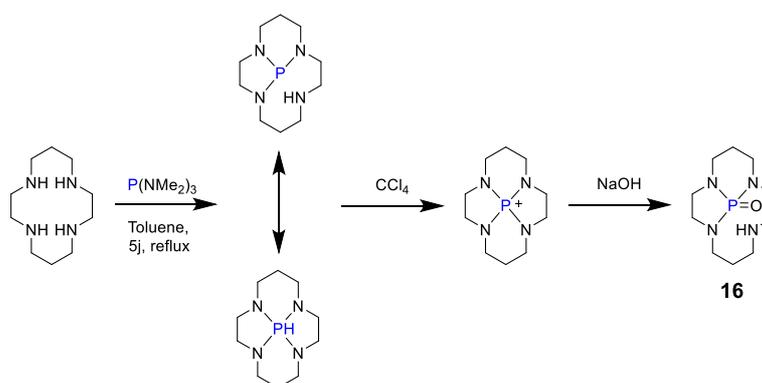


Figure 97 - Synthèse du cyclam phosphorylé **16**.

1.2. Synthèse et caractérisation du ligand à base de cyclam L₂

La synthèse du ligand L₂ s'effectue en deux étapes à partir du composé **16** (Figure 98). La première étape consiste en l'introduction du fluorophore mésylé **10** par une réaction S_N2. Suite à une purification sur colonne chromatographique, le composé **17** est obtenu avec 73% de rendement. Il est à noter que l'hydrolyse du groupement -OMs en fonction -OH a été observée, même si cette réaction a été menée sous atmosphère inerte et avec l'utilisation de solvant sec.

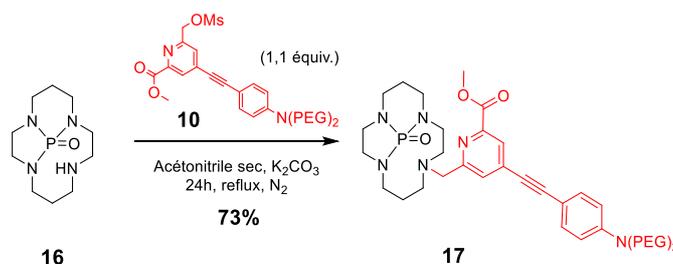


Figure 98 - Synthèse du composé **17**.

Le spectre ^1H RMN enregistré dans le CDCl_3 est représenté sur la **Figure 100**. Dans la zone des protons aromatiques, les deux singulets à 7,92 et 7,88 ppm (position 1 et 2) sont attribués aux protons du groupement picolinate. Les protons équivalents deux à deux du groupement aryle sont représentés par deux doublets à 7,34 et 6,56 ppm (position 3 et 4). Le singulet résonant à 3,89 ppm (position 5) intégrant pour trois protons est caractéristique du groupement méthyle de la fonction ester. Les protons du $-\text{CH}_2$ du groupement picolinate sortent sous la forme de deux signaux (système AB) et se retrouvent respectivement à 3,87 et 3,66 ppm (position 6). Les protons des groupements $-\text{CH}_2$ des chaînes PEG ne sont pas différenciables et se retrouvent sous la forme d'un massif à 3,50 ppm intégrant pour 24 protons. Le massif entre 2,33 et 3,12 ppm, intégrant pour douze protons, correspond au $-\text{CH}_2$ du macrocycle en α de l'atome d'azote du cyclam tandis que le massif entre 1,37 et 1,88 ppm, intégrant pour quatre protons correspond au $-\text{CH}_2$ en β de l'atome d'azote du cyclam.

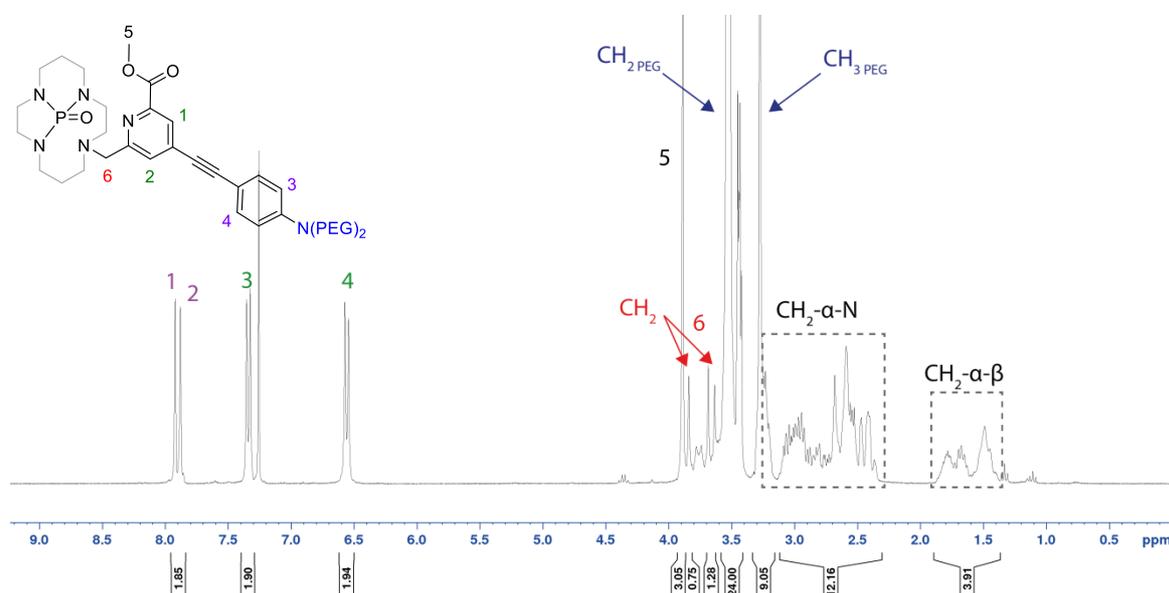


Figure 99 – Spectre ^1H RMN du composé **17** (300 MHz, 298 K, CDCl_3).

Dans le spectre ^{13}C RMN (J-mod) (**Figure 100**), on retrouve les signaux caractéristiques du groupe picolinate dans la région aromatique. Le signal à 165,5 (position 1) correspond au groupement $-\text{CO}$. Les pics 160,8 et 148,4 ppm (position 2 et 3) correspondent aux $-\text{CH}_{\text{ar}}$ en α de l'atome d'azote du picolinate. Le signal à 146,9 ppm (position 4) correspond au $-\text{C}_{\text{ar}}$ qui porte les chaînes PEG. Les pics en position 6 et 9 sont attribués aux $-\text{CH}_{\text{ar}}$ de l'aryle qui porte la chaîne PEG tandis que les signaux en position 7 et 8 correspondent aux $-\text{CH}_{\text{ar}}$ du groupement picolinate. Les carbones de la triple liaison sont représentés par deux pics à 97,4 et 85,2 ppm (position 11 et 12). Ensuite, les signaux situés entre 68,8 et 70,8 ppm sont attribués aux groupement $-\text{CH}_2$ des chaînes PEG. Le pic situé à 60,1 ppm (position 13) est attribué au $-\text{CH}_2$ entre le groupement picolinate et l'atome d'azote de la plateforme macrocyclique. Le carbone du groupement $-\text{CH}_3$ de la chaîne PEG résonne à

58,2 ppm. Les pics positifs qui résonnent entre 41,1 et 52,9 ppm correspondent aux carbones des groupements $-CH_2$ en α des atomes d'azotes du cyclam. Le pic négatif à 52,8 ppm (position 14) est attribué au $-CH_3$ de l'ester méthylique tandis que le pic positif à 52,7 ppm correspond aux carbones du groupement $-CH_2$ de la chaîne PEG. Enfin, les deux pics à 26,3 et 21,9 ppm sont caractéristiques des $-CH_2$ en β des atomes d'azote du cyclam phosphorylé et permet de confirmer la mono-*N*-fonctionnalisation sur la plateforme macrocyclique.

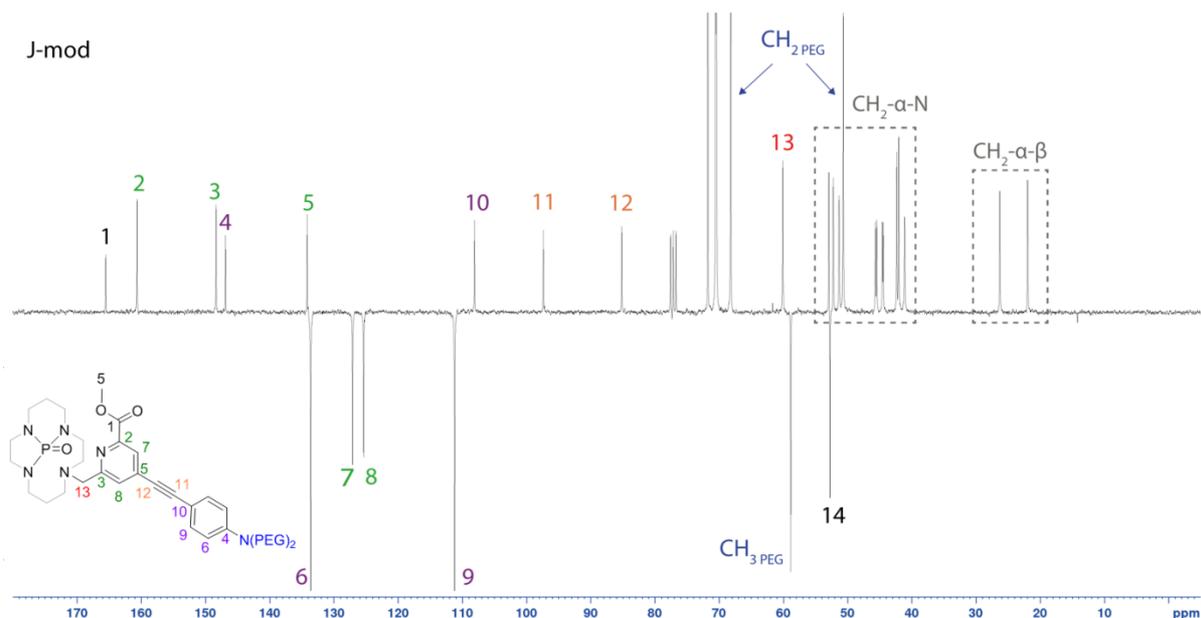


Figure 100 - Spectre ^{13}C RMN (J-mod) du composé **17** (75 MHz, 298 K, $CDCl_3$).

Le spectre ^{31}P RMN indique la présence du phosphore oxydé au sein du cyclam sous la forme d'un seul signal à -25,6 ppm (**Figure 101**).

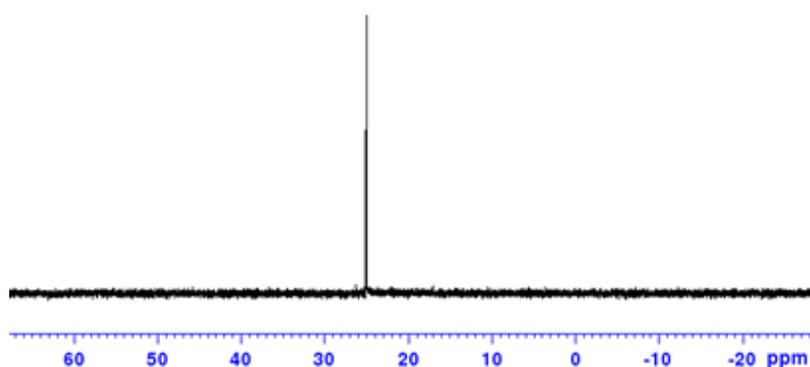


Figure 101 - Spectre ^{31}P RMN du composé **17** (121 MHz, 298 K, $CDCl_3$).

L'étape suivante est la déprotection des groupements ester méthylique et phosphorylé du composé **17**. Compte tenu de la sensibilité des alcynes en milieu acide, nous avons réalisé un premier essai de déprotection en milieu basique. Dans ces conditions, le groupement phosphorylé est toujours présent après traitement (Voie A). Nous avons alors privilégié la déprotection en milieu acide malgré la

sensibilité de l'alcyne (Voie B et C). La déprotection en milieu acide selon les conditions de la voie B (HCl 3M, 14h) ne permet pas de mener au produit désiré. En effet, une dégradation de l'alcyne est observée par RMN ¹H. Toutefois, les conditions plus douces selon la Voie C (HCl 1M, 6h) ont permis d'obtenir le produit attendu avec un rendement de 61% après purification (**Figure 103**). Cependant, ce mode de déprotection reste à optimiser. Une dégradation du fluorophore a été observée par RMN ¹H lorsque l'expérience a été répétée. Une purification sur colonne C18 était donc nécessaire menant à des rendements très faibles. Cette voie de synthèse permet tout de même d'obtenir jusqu'à 250 mg de ligand **L**₂.

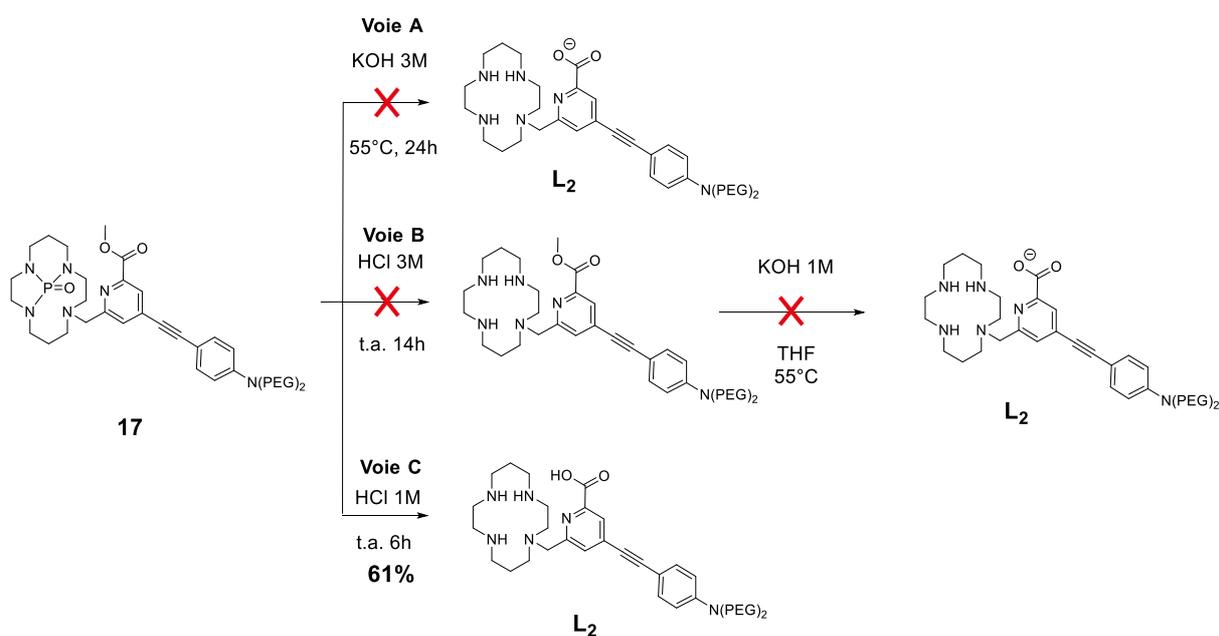


Figure 102 - Voies étudiées pour l'obtention du ligand **L**₂.

L'analyse du spectre RMN ¹³C en J-modulation (**Figure 103**) permet de confirmer la structure du ligand **L**₂. La disparition du pic positif à 52,8 ppm correspondant au groupement -CH₃ de la fonction ester méthylique permet de confirmer la transformation de la fonction ester méthylique en fonction acide carboxylique.

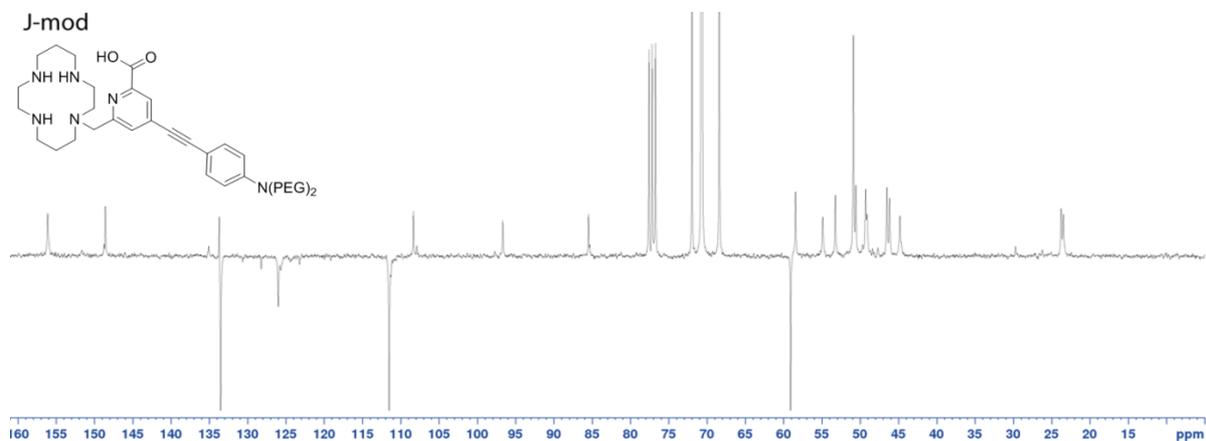


Figure 103 - Spectre RMN ¹³C (J-mod) du ligand **L**₂ (75 MHz, 298 K, CDCl₃).

La caractérisation par masse haute résolution nous a permis de confirmer l'obtention du ligand **L₂** et donne un pic $[M+2H]^{2+}$ à $m/z = 372,2393$ correspondant au composé attendu (m/z calculé = 372,2387).

1.3. Synthèse et caractérisation du ligand à base de cyclam *cross-bridged* **L₃**

La synthèse de l'analogue à base de cyclam *cross-bridged* (CB-Cyclam) est plus simple puisqu'elle ne nécessite pas d'étape de protection. Elle implique l'alkylation directe du CB-Cyclam sur le fluorophore mésylé **10** (Figure 105). Cette étape, menée en l'absence de base, est quasi-univoque. En effet, la propriété d'éponge à protons du cyclam *cross-bridged* entraîne la protonation de la seconde fonction amine secondaire non alkylée, ce qui l'empêche de réagir à son tour. Le produit obtenu nécessite néanmoins une purification par chromatographie sur colonne de silice qui permet d'isoler le composé **18** avec 77% de rendement après optimisation. Il est à noter qu'une hydrolyse du groupement protecteur -OMs est souvent observée par ¹H RMN lorsque ces expériences sont réalisées. L'absence de groupements protecteurs permet d'utiliser les conditions habituelles de saponification (cf. Chapitre 2). Elle consiste en l'hydrolyse de l'ester méthylique du bras picolinate en présence de NaOH 4M pour conduire au ligand **L₃**.

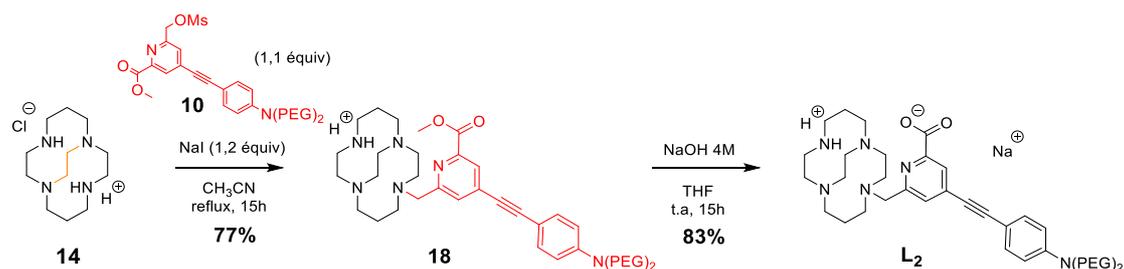


Figure 104 - Synthèse du ligand **L₂**.

Le spectre RMN ¹H, enregistré dans le CDCl₃ (Figure 105) est similaire à celui du composé **17** et permet de confirmer la structure du composé **18**. Les protons aromatiques du groupement picolinate résonnent à 7,94 et 7,39 ppm (position 1 et 2). Les pics à 7,29 et 6,59 ppm (position 3 et 4) correspondent aux protons -CH_{ar} de l'aryle qui porte les chaîne PEG. Le composé **18** étant protoné, les protons du groupement -CH₂ de l'unité picolinate donnent un système AB de deux doublets à 4,06 et 3,33 ppm (position 6) avec une constante de couplage géminée de 13 Hz. Les protons du groupement -CH₂ en α des atomes d'azote du macrocycle résonnent sous la forme d'un massif entre 3,24 et 2,27 ppm tandis que les protons des groupements -CH₂ en β résonnent entre 1,04 et 1,86 ppm.

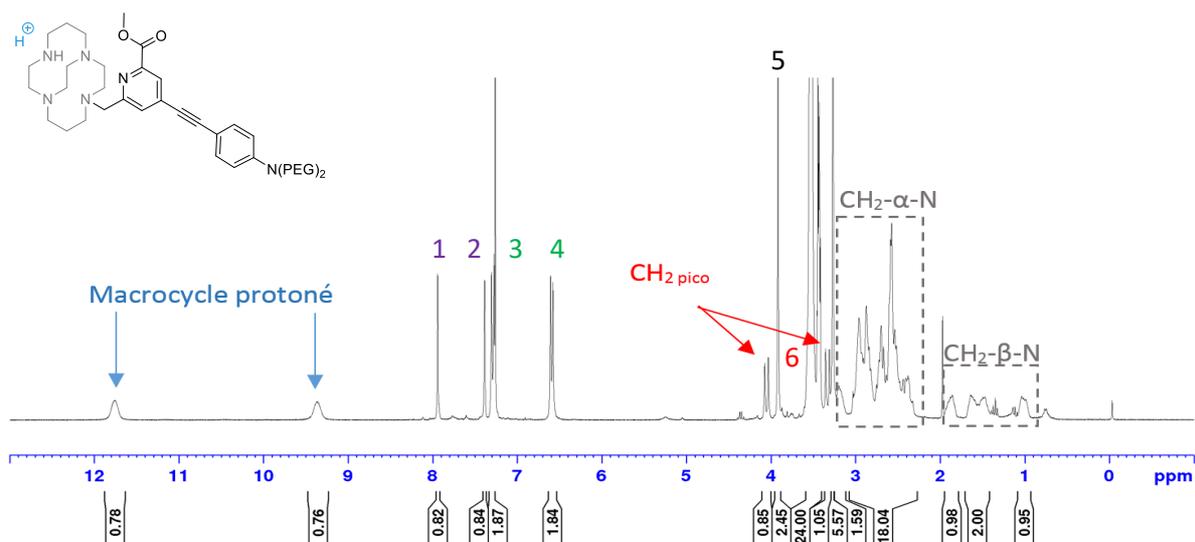


Figure 105 - Spectre ^1H RMN du composé **18** (300 MHz, 298 K, CDCl_3).

Le spectre ^{13}C RMN en J-modulation enregistré dans le CDCl_3 , également similaire au composé **17**, permet de confirmer la structure du composé **18** (Figure 107). Le carbone du groupement $-\text{CH}_2$ du picolinate résonne à 63,8 ppm, ceux des groupements $-\text{CH}_2$ en α des atomes d'azote du CB-Cyclam entre 44,7 et 59,6 ppm. Le pic négatif à 53,3 ppm correspond au $-\text{CH}_3$ de l'ester méthylique du groupement picolinate. Les pics à 21,8 et 26,5 ppm permet de confirmer le produit de mono-alkylation.

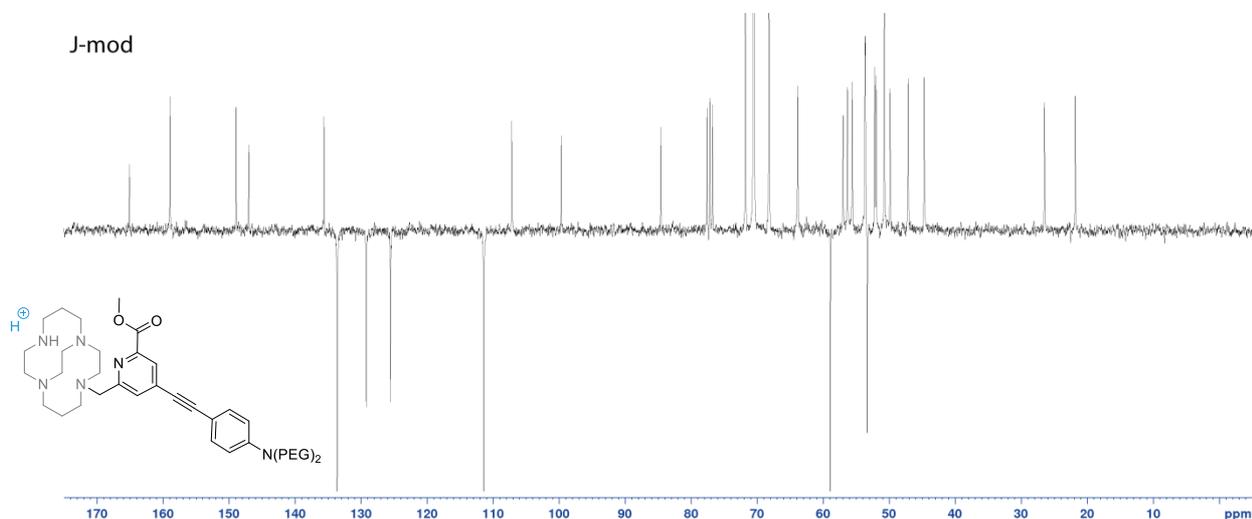


Figure 106 - Spectre RMN ^{13}C du composé **18** (75 MHz, 298 K, CDCl_3).

Enfin, l'hydrolyse du groupement ester méthylique est effectuée en condition basique (NaOH 4M/THF). Le ligand final **L₃** est isolé après purification par dialyse avec un rendement de 83%. Cette voie de synthèse a permis d'obtenir le ligand **L₃** à hauteur de plusieurs centaines de milligramme (≈ 200 mg).

Le spectre ^1H RMN représenté ci-dessous (**Figure 107**), permet de confirmer la structure du ligand par la disparition du singulet qui correspond au groupement $-\text{CH}_3$ de l'ester méthylique. Il est à noter que, même dans ces conditions de saponification, le ligand reste protoné, comme en témoignent les signaux présents à 11,15 et 10,47 ppm. De ce fait, les protons du groupement $-\text{CH}_2$ du groupement picolinate restent diastéréotopiques et résonnent à 3,87 et 3,24 ppm.

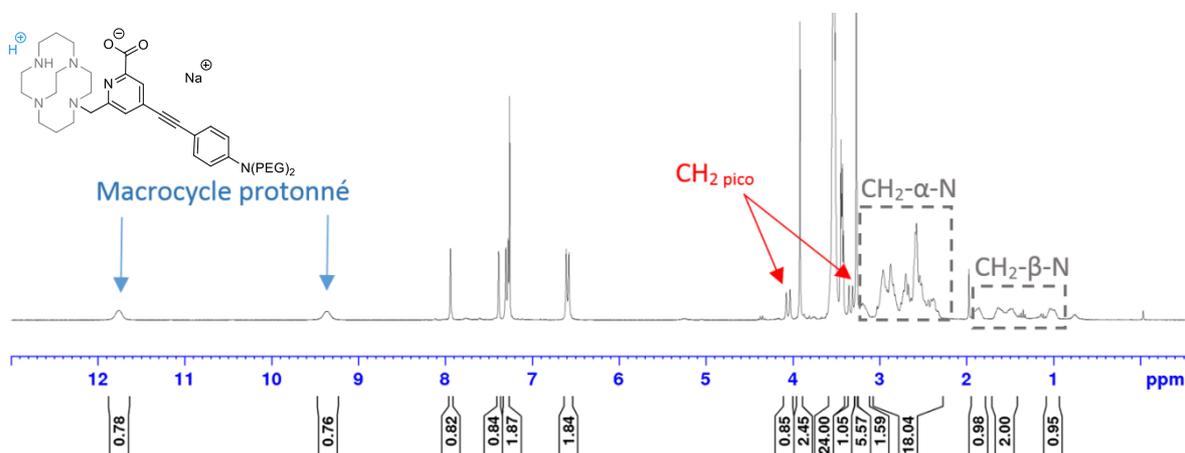


Figure 107 - Spectre RMN ^1H du composé L_3 (300 MHz, 298 K, CDCl_3).

Le spectre RMN ^{13}C enregistré en J-modulation dans le CDCl_3 est représenté ci-après (**Figure 108**). A nouveau, la disparition du pic négatif à 53,3 ppm correspondant au groupement $-\text{CH}_3$ de la fonction ester méthylique témoigne de la saponification de l'ester méthylique en fonction carboxylate.

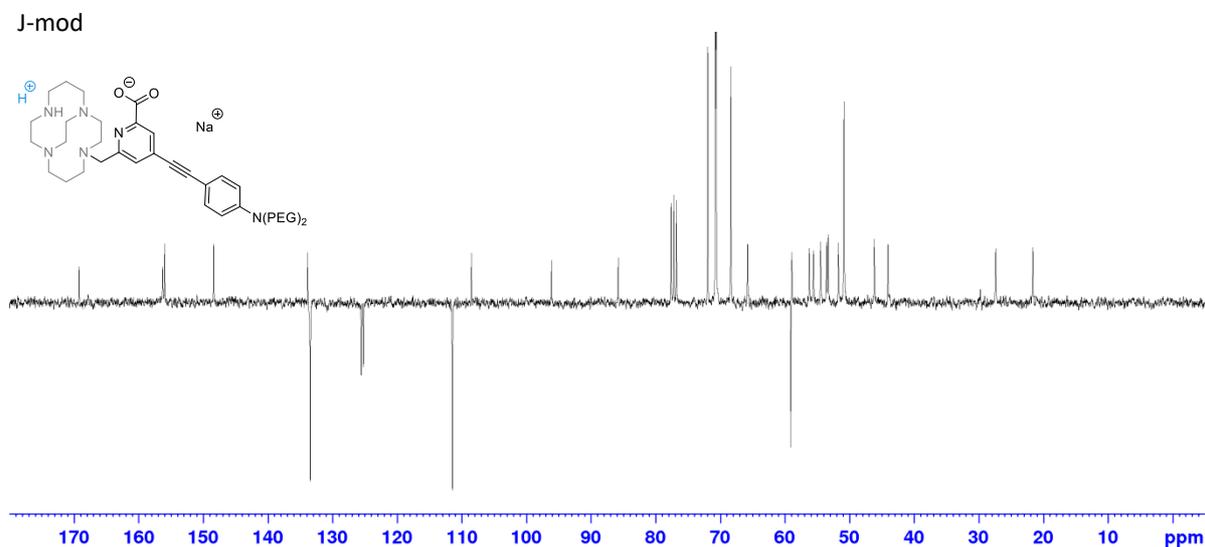
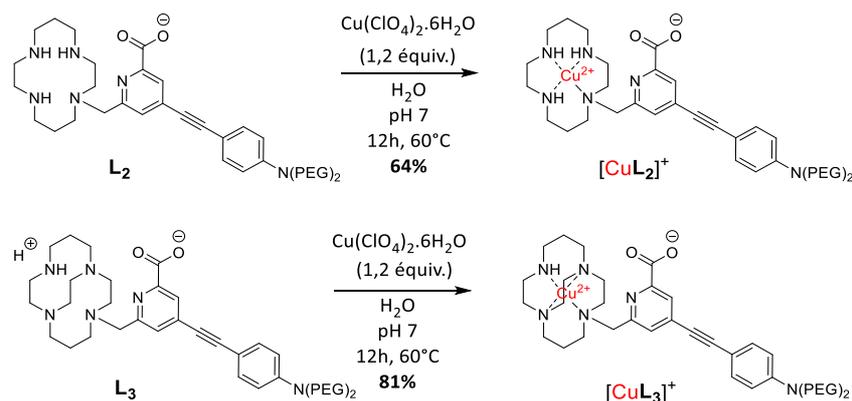


Figure 108 - Spectre RMN ^{13}C du ligand L_3 (75 MHz, 298 K, CDCl_3).

Malgré les difficultés importantes menant à la synthèse des ligands L_2 et L_3 , notamment lors de la purification des différents intermédiaires réactionnels, les composés désirés ont finalement été obtenus en quantité suffisante nous permettant de réaliser la complexation au Cu^{2+} .

2. Synthèse des complexes de Cu^{2+}

Les ligands L_2 et L_3 ont été mis en présence de perchlorate de cuivre(II) hexahydraté (1,2 équiv.) à un pH ajusté à 7 pour former les complexes de Cu^{2+} correspondants (**Figure 109**). Après purification par dialyse, les complexes $[\text{CuL}_2]^+$ et $[\text{CuL}_3]^+$ ont été obtenus sous la forme d'une huile jaune avec un rendement de 64 % et 81%, respectivement. Ces rendements sont justifiés par les purifications réalisées pour éliminer les sels présents dans le milieu.



Les complexes isolés ont été impliqués dans des études électrochimiques et photophysiques qui seront discutées dans la section qui suit.

3. Etudes électrochimiques des complexes $[\text{CuL}_2]^+$ et $[\text{CuL}_3]^+$

Le comportement électrochimique des complexes $[\text{CuL}_2]^+$ et $[\text{CuL}_3]^+$ a été étudié par voltamétrie cyclique dans l'eau à pH neutre, à une concentration de 1 mM (**Figure 110**). L'enregistrement des voltammogrammes a été effectué, avant et après électrolyse aux potentiels de -1,1 et -1 V pour les complexes $[\text{CuL}_2]^+$ et $[\text{CuL}_3]^+$ respectivement afin d'étudier la stabilité du complexe Cu^+ électrogénéré.

Avant électrolyse (**Figure 110, a**), $[\text{CuL}_2]^+$ affiche un pic de réduction à -0,92 V par rapport à Ag/AgCl et un pic d'oxydation à -0,79 V ce qui donne un potentiel standard de -0,86 V vs Ag/AgCl soit -0,64 V vs NHE. Le complexe $[\text{CuL}_2]^+$ adopte un comportement réversible.

Cependant, l'espèce réduite *in situ* obtenue après électrolyse pendant 1h, révèle un comportement irréversible, ce qui signifie que le complexe n'est pas stable sous la forme Cu^+ . En effet, aucun signal correspondant à la réoxydation du Cu^+ en Cu^{2+} n'est observé sur le voltammogramme. Ce phénomène signifie que le complexe est totalement dissocié.

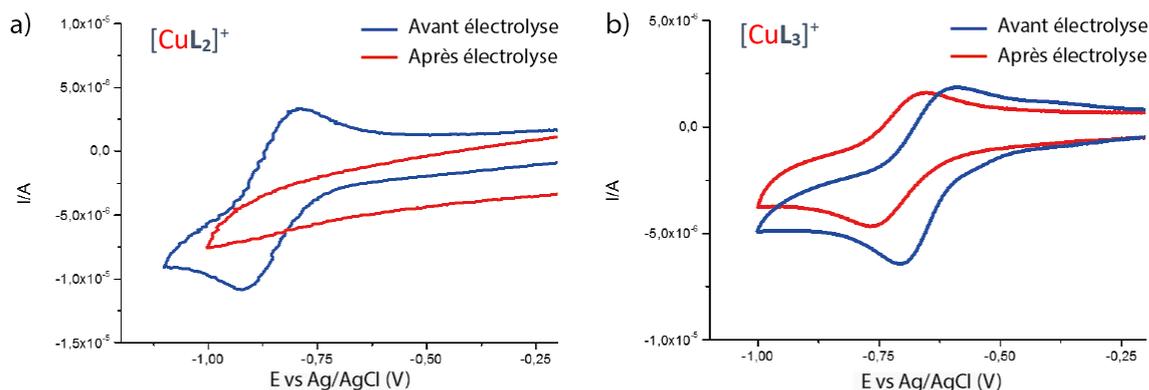


Figure 110 - Voltammogrammes avant électrolyse (bleu) et après électrolyse (rouge) enregistrés à $0,1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ dans une solution $\text{H}_2\text{O}/\text{LiClO}_4$ à pH 7 à a) $-1,1 \text{ V}$ pour le complexe $[\text{CuL}_2]^+$ et b) $-1,0 \text{ V}$ pour le complexe $[\text{CuL}_3]^+$.

Le complexe $[\text{CuL}_3]^+$, étudié dans les mêmes conditions (**Figure 110, b**)), montre un pic de réduction à $-0,70 \text{ V}$ et un pic d'oxydation à $0,59 \text{ V}$ donnant un potentiel standard de $-0,65 \text{ V vs Ag/AgCl}$, soit $-0,43 \text{ V vs NHE}$. Ce complexe adopte également un comportement réversible en voltamétrie cyclique. **Après électrolyse**, $[\text{CuL}_3]^+$ ne se démetalle que partiellement sous la forme Cu^+ . Le complexe apparaît donc plus résistant à la réduction par comparaison au $[\text{CuL}_2]^+$ probablement dû à l'effet cage du cyclam *cross bridged* qui piège le cuivre(I) plus efficacement à l'intérieur de la cavité.

4. Etude des propriétés photophysiques de $[\text{CuL}_2]^+$ et $[\text{CuL}_3]^+$

4.1. Caractéristiques UV-Visible

L'objectif de cette étude est de mesurer les propriétés spectroscopiques des complexes synthétisés. Ces expériences nous permettront d'évaluer le potentiel de ces complexes pour une application en imagerie bimodale TEP/Imagerie optique. Les propriétés photophysiques des ligands L_2 et L_3 et des complexes $[\text{CuL}_2]^+$ et $[\text{CuL}_3]^+$ ont été étudiées dans le dichlorométhane à température ambiante par spectroscopie UV-Visible (**Figure 112**).

Le ligand L_2 présente une bande d'absorption large avec une longueur d'onde maximale d'absorption à 382 nm , correspondant à un transfert de charge du donneur (groupement $-\text{N}(\text{PEG})_2$) au groupement accepteur (groupement picolinate). Suite à une excitation à 365 nm , le ligand L_2 présente une émission large dont le maximum est situé à 486 nm (**Figure 112, a**)). Le complexe $[\text{CuL}_2]^+$ montre également une bande d'absorption large autour de 375 nm . Après excitation à 405 nm , le complexe $[\text{CuL}_2]^+$ possède une émission très faible autour de 520 nm (**Figure 112, b**)).

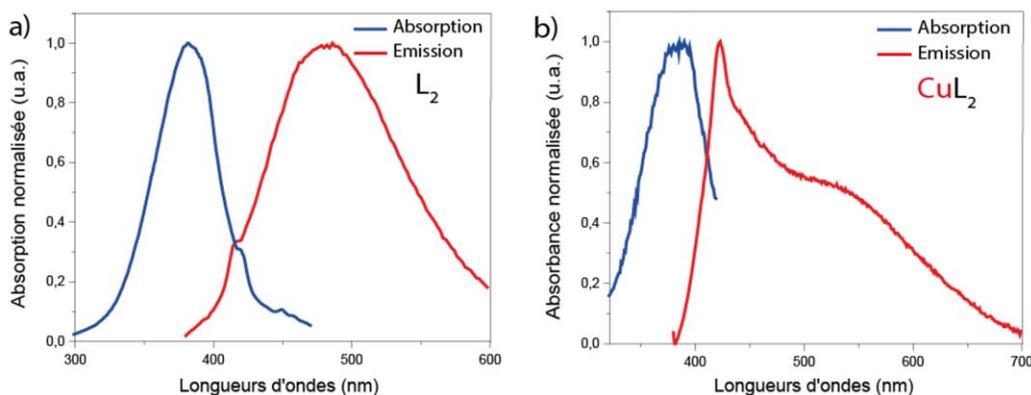


Figure 111 - Spectres d'absorption et d'émission normalisés a) du ligand L_2 et b) du complexe $[CuL_2]^+$ à température ambiante ($\lambda_{exc} = 385$ nm).

Le spectre d'absorption du ligand L_3 présente le même comportement que L_2 et présente une absorption maximale à 365 nm. Suite à une excitation dans le visible à 385 nm, le ligand montre une émission large à 485 nm (**Figure 112, a**). Le complexe $[CuL_3]^+$ présente une bande large d'absorption centrée à 375 nm. Après excitation à 385 nm, le complexe $[CuL_3]^+$ est caractérisé par une émission à 520 nm (**Figure 112, b**).

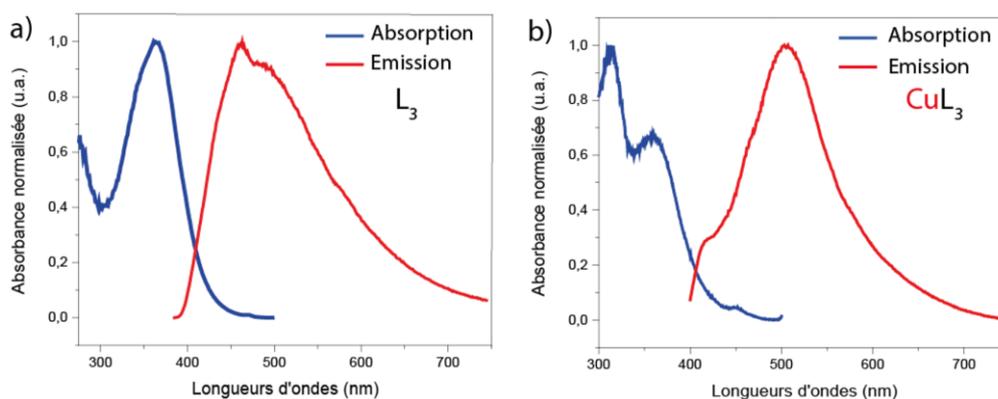


Figure 112 - Spectres d'absorption et d'émission normalisés a) du ligand L_3 et b) du complexe $[CuL_3]^+$ à température ambiante ($\lambda_{exc} = 385$ nm).

4.2. Etude du rendement quantique

Les rendements quantiques de luminescence des ligands et des complexes de Cu^{2+} ont été mesurés dans des solutions diluées (entre 10^{-5} et 10^{-6} mol.L⁻¹) avec une absorbance inférieure à 0,1 en utilisant l'équation suivante (eq. 9):

$$(eq. 9) \quad \frac{\phi_x}{\phi_r} = \frac{A_r(\lambda)}{A_x(\lambda)} \cdot \frac{n_x^2}{n_r^2} \cdot \frac{D_x}{D_r}$$

où A est l'absorbance à la longueur d'onde d'excitation, n l'indice de réfraction et D l'intensité de luminescence intégrée. r et x représentent la référence et l'échantillon respectivement.

Les rendements quantiques des ligands (**L₂** et **L₃**) et des complexes de cuivre(II) (**[CuL₂]⁺** et **[CuL₃]⁺**) ont été étudiés dans le dichlorométhane et sont résumés dans le **Tableau 19**. De façon surprenante, les ligands présentent des rendements quantiques autour de 2%. Ces résultats sont étonnant compte tenu que le même fluorophore est utilisé pour la sensibilisation des lanthanides. L'ajout du cuivre(II) au sein des ligands **L₂** et **L₃** fait chuter le rendement quantique des complexes de cuivre(II) autour de 1%.

Composés	L₂	L₃	[CuL₂]⁺	[CuL₃]⁺
$\phi^{\sigma}(\%)$	1,8	2,9	~1	~1

Tableau 19 - Rendements quantiques de fluorescence des ligands **L₂** et **L₃** et des complexes de cuivre(II) associés dans le dichlorométhane. ^aMesurés en utilisant la Coumarine-153 comme référence ($\phi = 45\%$ dans le méthanol).

Toutefois, la luminescence résiduelle des complexes est suffisante et permet d'envisager des études préliminaires *in vitro*. Ainsi, les ligands ont été radiomarqués au cuivre-64, et les radiocomplexes obtenus impliqués dans des expériences cellulaires.

5. Radiomarquage au ⁶⁴Cu²⁺

Le radiomarquage au ⁶⁴Cu²⁺ a été réalisé dans une solution d'acétate de sodium et de DMSO avec une concentration de 6,3 μ L en ligand pendant 15 minutes à 100°C. Le radiochromatogramme sur couche mince (**Figure 113**), présente la mesure d'émission radioactive après 15 minutes d'incubation. Une mesure de radioémission du complexe **[⁶⁴Cu(CH₃COO)₂]** a été réalisée comme référence (R). La comparaison avec la référence montre que, dans chaque cas, la présence de ⁶⁴Cu libre est observée, ce qui signifie que le radiomarquage n'est pas quantitatif. Après 30 min, seulement 75 % du ⁶⁴Cu²⁺ est complexé par le ligand **L₂** et 84% du ⁶⁴Cu²⁺ dans le cas du ligand **L₃**.

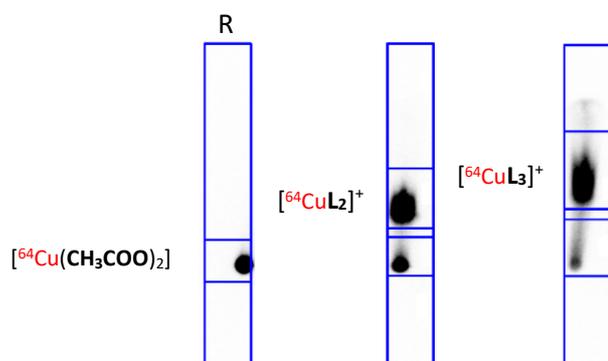


Figure 113 - Radio-CCM des composés **[⁶⁴Cu(CH₃COO)₂]**, **[CuL₂]⁺** et **[CuL₃]⁺** (30 min, 100°C, DMSO). R = Référence.

Les conditions de radiomarquage plus drastiques du ligand **L₂** sont étonnantes, étant donné que le radiomarquage de l'analogue non fonctionnalisé par le fluorophore, **H₁TE1PA**, a été effectué à température ambiante en milieu tamponné avec un rendement de 99%.¹⁴⁶ Nous avons également vu

précédemment que les conditions de radiomarquage des dérivés de CB-Cyclam se réalisent dans des conditions douces.^{44,135} L'hypothèse proposée pour expliquer les rendements plus faibles porte sur la présence des chaînes PEG qui forment des agrégats, ce qui rend difficile le radiomarquage des ligands dans des conditions douces. Des études de radiomarquage dans des conditions moins drastiques sont en cours en prenant en compte le possible effet des chaînes PEG.

6. Etudes en milieu *in vitro*

Les études *in vitro* ont été réalisées sur une lignée cellulaire que l'on retrouve chez des patientes atteintes du cancer du sein (MDA-MB-468). Les tests d'internalisation ont été effectués avec le complexe radiomarqué témoin [Cu(CH₃COO)₂] et le complexe [CuL₂]⁺. Les cellules ont été incubées avec les complexes radiomarqués à une concentration de 1,5 μM pendant 1h30 à 37°C. Le surnageant et les cellules marquées ont été collectés dans des tubes de comptage afin de déterminer par cytométrie de flux le pourcentage de complexe radiomarqué internalisé en milieu cellulaire.

Radiocomplexe	Cellules	Surnageant	Cellules/surnageant (%)	Internalisation cellulaire (%)
[Cu(CH ₃ COO) ₂]	26382	155016	17,0	
	24489	173795	14,0	15,8
	2694	164564	16,3	
[CuL ₂] ⁺	1750	394601	0,4	
	2017	424200	0,5	0,5
	2468	412730	0,6	

Tableau 20 - Comptage des cellules MDA-MB-468 incubées en présence du [Cu(CH₃COO)₂] et du [CuL₂]⁺.

Les résultats résumés dans le **Tableau 20** montrent que le radiocomplexe [Cu(L₂)]⁺ ne s'internalise pas en milieu cellulaire malgré son caractère monocationique. En moyenne, seulement 0,5 % du complexe [CuL₂]⁺ est internalisé en milieu cellulaire. A titre de comparaison, la moyenne d'internalisation du témoin est de 15,8 %. Les hypothèses avancées suggèrent que le ligand empêche l'internalisation en milieu cellulaire ou que le temps d'incubation du ligand avec les cellules MDA-MB-468 n'a pas été assez long.

Des tests supplémentaires sur différentes lignées cellulaires telles que les cellules T24 avec des temps d'incubation plus longs sont en cours d'étude. En effet, des complexes de lanthanides(III) décrits par notre équipe également monocationiques et porteurs de chaînes PEG, ont montré une internalisation sur ce type de lignées cellulaires (*cf.* **Chapitre 2**) après 4h d'incubation.¹¹³ Un autre moyen efficace

d'internaliser cette sonde serait d'ajouter un vecteur biologique permettant de cibler une zone spécifique. Ainsi notre équipe s'est intéressée au ciblage des régions hypoxiques.

VI. Vers la C-fonctionnalisation pour une vectorisation plus ciblée

1. L'hypoxie tumorale

Les régions pauvres en oxygène ou régions hypoxiques sont une caractéristique commune des tumeurs solides, le plus souvent en raison d'un apport sanguin inadéquat avec les besoins en oxygène de la tumeur.¹⁴⁷ Ce phénomène crée un gradient de concentration en oxygène entre les cellules oxygénées (normoxie) et les cellules en situation d'hypoxie. Ainsi, une faible concentration en oxygène conduit les cellules tumorales à stimuler le développement d'une protéine appelé VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et incite les cellules à proliférer en direction du foyer tumoral. Cela a pour conséquence de donner naissance à des occlusions de vaisseaux sanguins favorisant la création de nouvelles zones hypoxiques (**Figure 114**).¹⁴⁸ Ce phénotype tumoral particulièrement agressif favorise la progression et la résistance aux traitements de radio- et chimiothérapies.

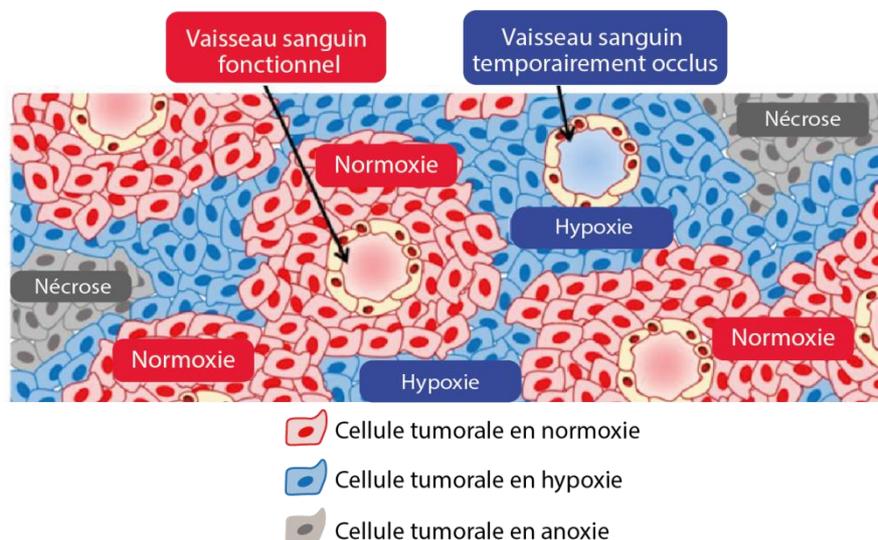


Figure 114 – Représentation des différentes zones d'oxygénation d'une tumeur.

2. Les dérivés de nitroimidazole

Les dérivés de nitroimidazole sont une classe de composés connus pour subir un métabolisme intracellulaire différent selon la disponibilité de l'oxygène dans les tissus, ce qui explique qu'ils ont été très étudiés en tant que traceurs de l'hypoxie des tumeurs (**Figure 115**).¹⁴⁹ Dans les zones hypoxiques, le groupement nitro est réduit par catalyse enzymatique par la nitroréductase. Le radical anion ainsi

formé peut, en l'absence d'oxygène, subir des réductions successives en groupement nitroso et hydroxylamine pour permettre à terme de se lier de manière covalente à une macromolécule (Nu). Cependant, en présence de dioxygène, le radical nitroimidazole transférera spontanément son électron à l'oxygène pour donner le composé de départ.¹⁵⁰

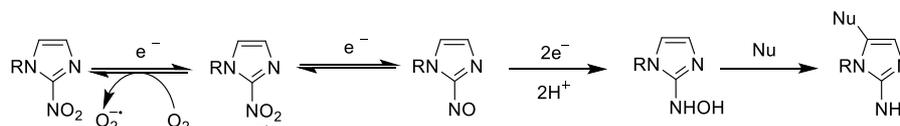


Figure 115 - Réduction du 2-nitroimidazole.

De nombreux radiotraceurs à base de nitroimidazole radiomarcué au ¹⁸F ont été développés tels que le 3-[¹⁸F]fluoro-1-(2-nitro-1-imidazolyl)-2-propanol ([¹⁸F]-FMISO), le [¹⁸F]-arabicoside de fluoroazomycine ([¹⁸F]-FAZA) ou le [¹⁸F]-FHX4. D'autres radiotraceurs sans fonction nitroimidazole, tels que le [⁶⁴Cu]-ATSM, semble être des traceurs prometteurs pour l'imagerie de l'hypoxie grâce à leur perméabilité membranaire élevée et leur faible potentiel redox (**Figure 116**).^{151,152}

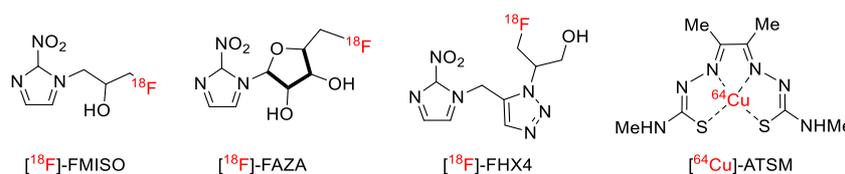


Figure 116 - Structure de radiotraceurs pour l'imagerie TEP de l'hypoxie tumorale.

Cependant, le [⁶⁴Cu]-ATSM est lié à une controverse concernant le mécanisme de l'absorption hypoxique. Ling et *al.* ont démontré que l'absorption de [⁶⁴Cu]-ATSM varie selon le type de lignées de cellules tumorales. Par la suite, Lewis et *al.* ont mis en avant que des réducteurs biologiques, tels que le NADPH, sont responsables de la réduction de Cu²⁺ en Cu⁺ mettant en doute l'utilisation du [⁶⁴Cu]-ATSM comme un traceur d'imagerie d'hypoxie.¹⁵³

3. Synthèse du ligand L₄

Nous avons vu au cours du **Chapitre 1** que le ligand **H₁TE1PA** est adapté pour la complexation du cuivre(II).^{146,154} De plus, la méthode de bioconjugaison par l'intermédiaire d'une fonction isothiocyanate introduit sur le squelette macrocyclique a fait ses preuves dans le cas de l'étude du dérivé du **H₁TE1PA** permettant l'imagerie chez le petit animal.¹¹

Ainsi, la synthèse du ligand décrit dans cette section se base sur les travaux présentés précédemment afin de cibler les cellules hypoxiques. Le ligand **L₄** est un analogue du cyclam picolinate **H₁TE1PA** C-fonctionnalisé par un groupement aniline qui permettra par la suite, l'introduction d'un dérivé du 2-nitroimidazole (**Figure 117**).¹¹

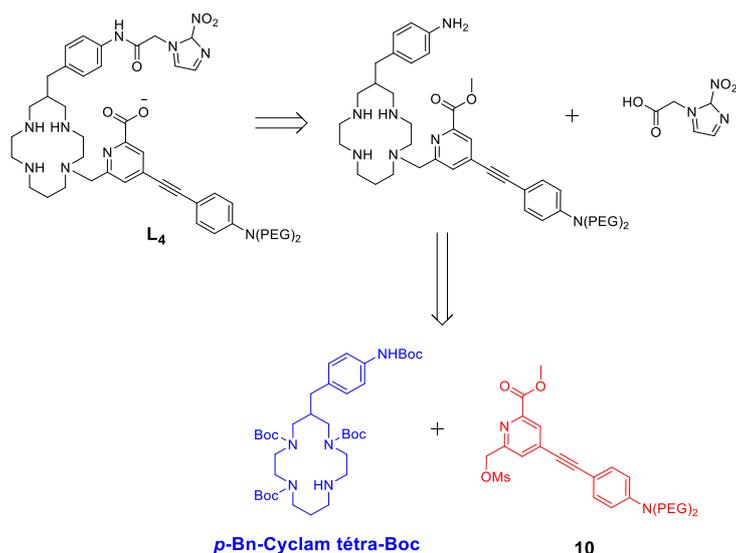


Figure 117 - Schéma rétrosynthétique du ligand **L4**.

La synthèse du ligand **L4** nécessite de réaliser une mono-*N*-alkylation régiospécifique du macrocycle par le fluorophore **10**. La discrimination d'un atome d'azote du macrocycle par l'introduction de groupements Boc apparaît comme un point de départ intéressant à cette voie de synthèse. La préparation de ce réactif étant maîtrisée au sein de notre équipe, le *p*-Bn-Cyclam tétra-Boc a été défini comme le réactif de départ (**Figure 117**).¹¹

4. Synthèse d'un agent bifonctionnel chélatant

La première étape consiste à introduire le fluorophore **10** par une réaction de substitution nucléophile en présence d'une base (K_2CO_3). À l'issue de la réaction, une purification du composé par chromatographie sur colonne d'alumine neutre a été réalisée afin d'obtenir le composé **19** avec un rendement de 28 % (**Figure 118**). La dégradation du composé durant la purification sur colonne chromatographique explique en partie le faible rendement obtenu.

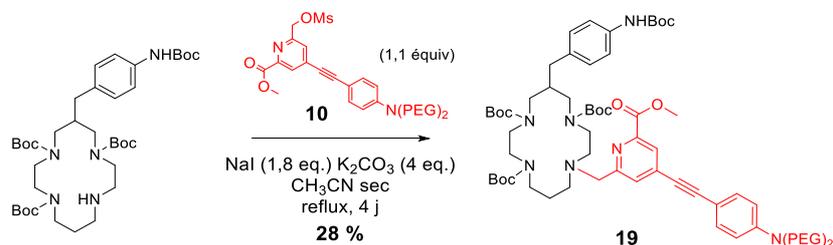


Figure 118 - Synthèse du composé **19**.

La quantité de matière disponible pour ce produit étant faible (50 mg, 40 μ mol), il n'a pas été possible de répéter l'étape de purification pour optimiser les conditions de la chromatographie.

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C ont été enregistrés dans le CD_3CN à 315 K, afin de visualiser les signaux des atomes de carbone du cyclam qui résonnent difficilement à température ambiante. Le spectre présenté ci-après confirme la structure du composé (**Figure 119**). On peut également attribuer les deux signaux à 7,91 ppm et 7,62 ppm (position 1 et 2) aux protons du noyau aromatique du picolinate. Le signal à 7,58 ppm correspond au proton de la fonction carbamate $-\text{NH}\text{Boc}$. Les protons du $\text{CH}_{\text{Ar-PEG}}$ résonnent sous la forme de deux doublets situés à 7,41 et 7,12 ppm (position 3 et 6) et les protons $-\text{CH}_{\text{Ar-PhNH}\text{Boc}}$ sortent sous la forme de deux doublets à 7,30 et 7,15 ppm (position 4 et 5). Les groupements $-\text{Boc}$ donnent une série de quatre singulets entre 1,33 et 1,60 ppm qui correspondent aux $-\text{CH}_3$ des groupements *t*-butyle.

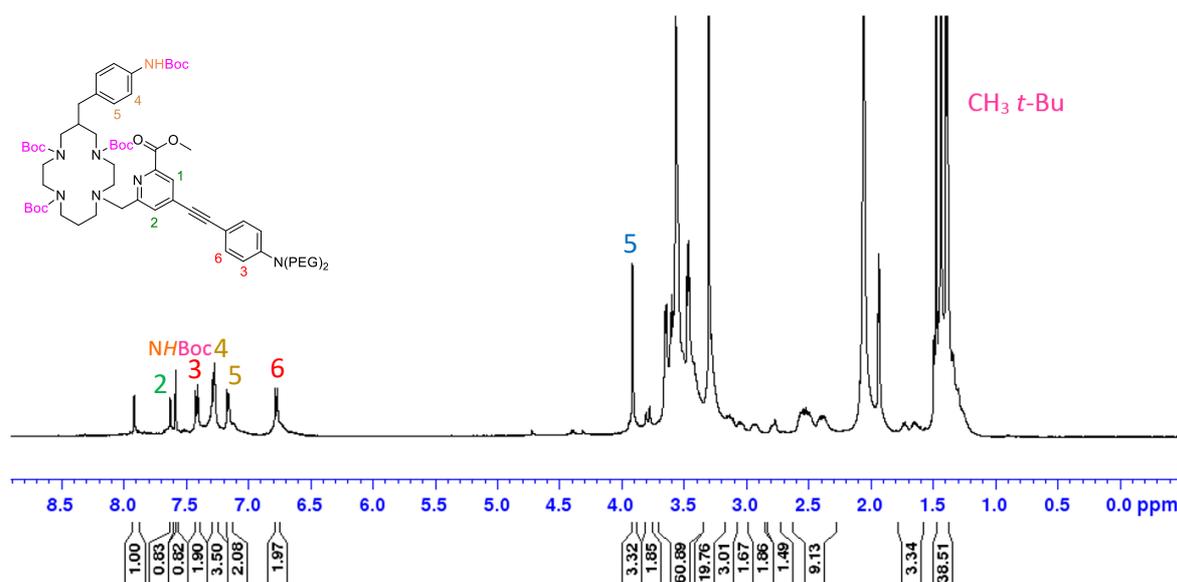


Figure 119 - Spectre RMN ^1H du composé **8** (500 MHz, CD_3CN , 315K).

L'étude par RMN ^{13}C en J-mod confirme l'obtention du composé **19** (**Figure 120**). Les signaux à 157,2, 156,7 et 154,4 ppm correspondent aux **carbonyles** des groupements $-\text{Boc}$. Deux signaux à 138,5 et 136,0 ppm correspondent aux $-\text{CH}_{\text{Ar-PhNH}\text{Boc}}$. Les signaux à 62,4 et 59,2 ppm correspondent respectivement aux $-\text{CH}_2$ et $-\text{CH}_3$ du bras picolinate. Le **carbone asymétrique** situé en β des atomes d'azote du macrocycle résonne à 40,5 ppm. Les signaux correspondant aux **carbones quaternaires** et aux $-\text{CH}_3$ des groupements Boc apparaissent respectivement à 80 ppm et 29 ppm.

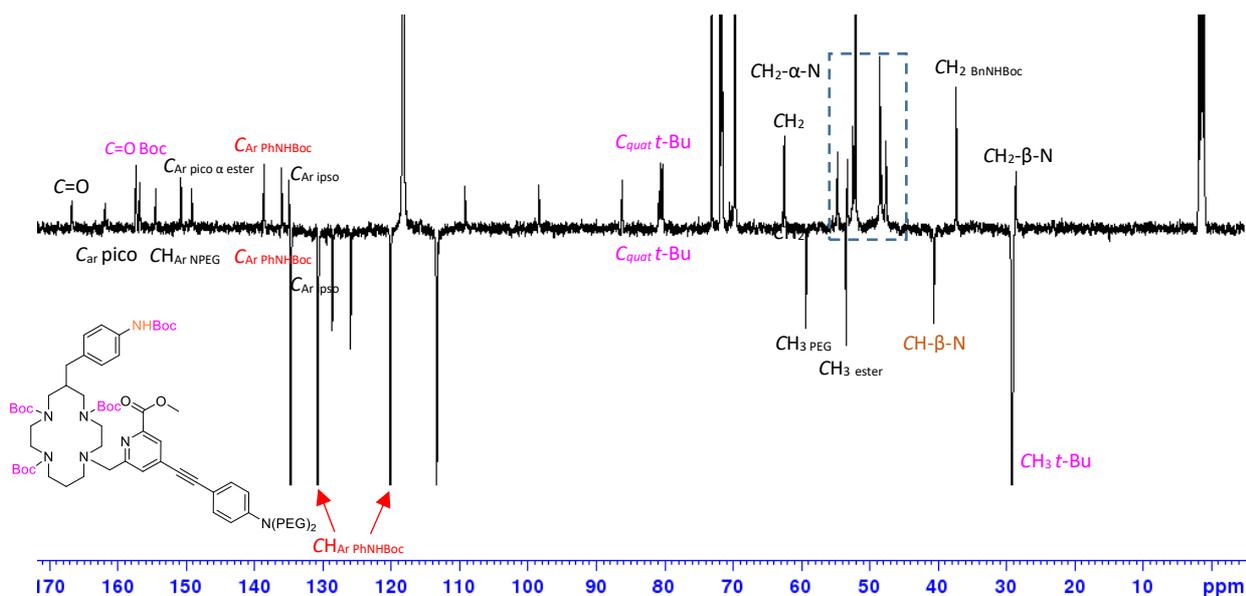


Figure 120 - Spectre RMN ^{13}C du composé **19** (125 MHz, CD_3CN , 315K).

La caractérisation par spectrométrie de masse haute résolution donne le pic de $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ à $m/z = 631,8804$ qui correspond bien au composé attendu (m/z calculé = 631,8803).

Le défi principal de la synthèse du ligand **L₄** est la déprotection des groupements Boc qui se réalise généralement en milieu acide. La synthèse du ligand **L₂**, qui passe par une déprotection en milieu acide, nous a permis de prouver que le fluorophore était résistant dans des conditions de déprotection douce (HCl 1M, t.a.). La déprotection des groupements Boc a été réalisée dans ces mêmes conditions, c'est-à-dire en présence d'une solution d'acide chlorhydrique (1 M) à température ambiante (**Figure 122**).

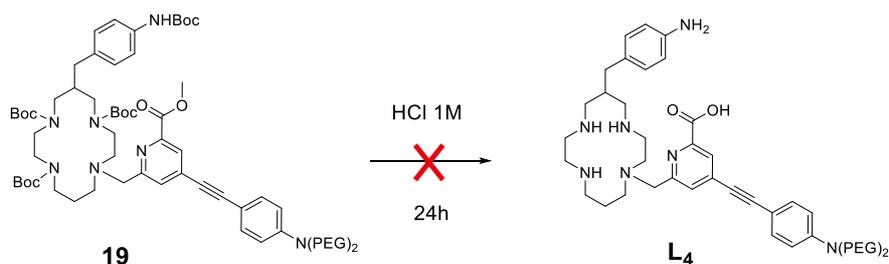


Figure 121 - Voie de synthèse étudiée pour la déprotection des groupements Boc.

Cependant, la déprotection des groupements Boc n'a pas eu lieu après 24h de réaction tandis qu'une dégradation du fluorophore a été observée par suivi RMN ^1H (**Figure 121**). De nouvelles voies de synthèse sont en cours d'étude dans notre groupe afin d'adapter les conditions de déprotection à la nature sensible du fluorophore.

VII. Conclusion

Ce chapitre était consacré à la synthèse de sondes bimodales TEP/Imagerie optique basées sur le cyclam et le CB-Cyclam. Pour ce faire, l'antenne présentée au cours du **Chapitre 2** a été utilisée pour jouer le rôle de fluorophore. La synthèse des ligands **L₂** et **L₃** a été décrite et a permis de mettre en exergue les purifications délicates de ces édifices. Les complexes de cuivre(II) ont pu être obtenus avec des rendements acceptables et ont été caractérisés par des études électrochimiques et spectroscopiques.

Les études par voltamétrie cyclique ont mis en avant que les complexes $[\text{CuL}_2]^+$ et $[\text{CuL}_3]^+$ affichent des voltamogrammes quasi-réversibles avec des potentiels de réduction à -0,72 et -0,50 V respectivement par rapport à l'ENH. Cependant, après électrolyse, les deux complexes s'avèrent instables sous la forme Cu^+ , particulièrement pour le $[\text{CuL}_2]^+$, ce qui pose la question d'une démétallation potentielle en milieu réducteur. Cependant, leurs potentiels de réduction restent assez éloignés du seuil des oxydoréductases se situant dans l'intervalle -0,40 V et +0,40 V.

Les études spectroscopiques des complexes $[\text{CuL}_2]^+$ et $[\text{CuL}_3]^+$ avaient pour objectif d'étudier la compatibilité du fluorophore avec le cuivre(II). Les études menées au sein de l'ENS Lyon ont permis de mettre en évidence la diminution de la luminescence de nos sondes après l'introduction du Cu^{2+} avec des rendements quantiques autour de 1%.

Les études de radiomarquage ont montré que les ligands sont radiomarqués au $^{64}\text{Cu}^{2+}$ avec des rendements radiochimiques acceptables de 75 et 84 % pour les ligands **L₂** et **L₃** respectivement. Finalement, des premiers tests d'internalisation ont été réalisés sur une lignée cellulaire MDA-MB-468 et ont montré une absence d'internalisation du complexe $[\text{CuL}_2]^+$. De ce résultat, plusieurs hypothèses ont été avancées, notamment l'absence de spécificité de la part de la sonde de $^{64}\text{Cu}^{2+}$ ou un trop faible temps d'incubation en présence de la lignée cellulaire.

Afin d'améliorer l'internalisation, un vecteur peut être ajouté à cette sonde. Pour ce faire, nous nous sommes basés sur un cyclam monopicolinate C-fonctionnalisé. Le composé de la première étape a pu être isolé. Toutefois, l'étape de déprotection de ce composé intermédiaire reste à mettre au point, travail qui est en cours au laboratoire.

Nous allons voir que le fluorophore utilisé au cours de ce chapitre peut être modifié pour accéder à de nouvelles propriétés comme des propriétés thérapeutiques permettant cette fois d'avoir au sein d'une même sonde, une entité diagnostique et une unité thérapeutique, donnant accès à une sonde dite *théranostique*.

Chapitre 4

Elaboration d'une sonde théranostique TEP/PDT à base de Cu^{2+}

I. Combiner la thérapie et le diagnostic : la théranostique

Le terme *théranostique* provient de la contraction des mots thérapie et diagnostic. Cette technique est en plein essor dans le domaine de la recherche médicale puisqu'elle permet une détection et un traitement local d'une maladie ciblée par l'utilisation d'une même sonde moléculaire. La structure de ces sondes comprend une modalité d'imagerie et une unité thérapeutique.¹⁵⁵

- La méthode de diagnostic peut reposer sur l'IRM, l'imagerie optique ou sur des techniques de médecine nucléaire (TEP et TEMP). Ces trois méthodes sont très utilisées en clinique puisqu'elles sont toutes non-invasives et ont des résolutions spatiales différentes, ce qui permet d'augmenter leurs champs d'application.
- La fonction thérapeutique peut être quant à elle, reposer sur l'utilisation de radioisotopes émetteurs α ou β^- permettant la radioimmunothérapie (RIT) ou *via* l'utilisation de la thérapie photodynamique (PDT). Contrairement à la RIT qui utilise des radiations ionisantes, la PDT est un processus photo-activable et permet d'irradier la zone à traiter. Ce processus sera décrit de manière plus détaillée dans la section suivante.

Dans le cadre d'une application en théranostique, on peut citer la conception de radiopharmaceutiques combinant des émetteurs γ ou β^+ pour l'imagerie et des émetteurs α ou β^- pour la thérapie. Il existe des paires TEP/RIT particulièrement intéressantes, telle que le couple $^{64}\text{Cu}/^{67}\text{Cu}$ où le ^{64}Cu émet des positons β^+ alors que le ^{67}Cu est un émetteur β^- . Des radiopharmaceutiques à base de cuivre (^{64}Cu -SARTATETM/ ^{67}Cu -SARTATETM) sont entrés en étude clinique Phase II pour le traitement du méningiome.¹⁵⁶ Cependant, le patient est radiocontaminé pendant toute la durée du traitement et si le radionucléide émet un taux élevé de rayons gamma, le patient doit être confiné dans des chambres d'hôpital dédiées.

Ainsi, la PDT apparaît comme une alternative attractive pour explorer de nouvelles méthodologies thérapeutiques, et surtout pour développer de nouvelles techniques théranostiques basées sur des architectures moléculaires. En effet, les édifices moléculaires permettant la PDT peuvent être facilement combinés à des complexes inorganiques pour former des sondes pouvant être utilisées comme agents théranostiques. L'avantage de telles stratégies par rapport à d'autres basées sur l'utilisation de deux complexes métalliques (paires théranostiques) est d'éviter la transchélation et de permettre l'addition de deux modalités par l'intermédiaire d'une seule et unique sonde.

Ce chapitre présentera tout d'abord une partie bibliographique détaillant le principe de la thérapie photodynamique et des exemples pertinents de sondes théranostiques seront décrits. Dans un second

temps, la synthèse de sondes théranostiques sera exposée et les études photophysiques seront également détaillées.

II. La Thérapie Photodynamique (PDT)

1. Principe physique de la PDT

La thérapie photodynamique (PDT) utilise des photosensibilisateurs (PS) qui, sous une longueur d'onde précise, génèrent des espèces oxygénées cytotoxiques.¹⁵⁷ Le principe de fonctionnement est représenté ci-après (**Figure 122**).

Par absorption lumineuse, le PS passe d'un état fondamental S_0 à un état excité S_n qui va être stabilisé par conversion interne à l'état singulet S_1 . Depuis cet état, le photosensibilisateur peut peupler l'état triplet $^3PS^*$ par conversion inter-système. A l'état triplet $^3PS^*$, le PS peut être impliqué dans deux types de réaction photochimique (Type I et II) avec l'oxygène. Les réactions de type I et II peuvent se produire simultanément, cependant, la réaction de type II apparaît majoritairement en PDT antitumorale.^{157,158}

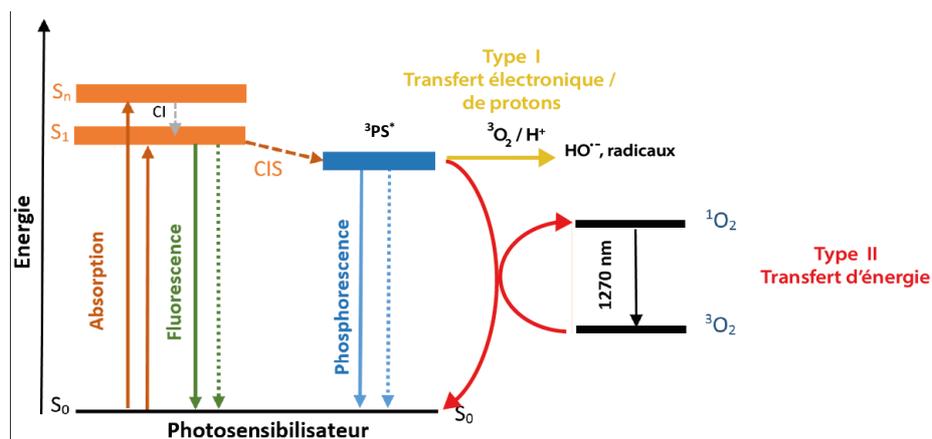


Figure 122 - Diagramme de Jablonski illustrant la génération d'oxygène singulet d'un photosensibilisateur.

1.1. La PDT de type I

Le mécanisme d'action de la PDT de type I est représenté sur la **Figure 123**. Après absorption d'un photon, le PS gagne en énergie et évolue vers un état excité plus énergétique ($^3PS^*$). Cet état triplet peut réagir directement avec différents substrats (molécules, membranes cellulaires, etc...) par le biais d'un transfert électronique, ou d'un transfert de protons. Le transfert d'un électron permet de former des radicaux anioniques tandis que le transfert d'un proton permet de former des radicaux cationiques (i.e S^+). En milieu anoxique, l'état triplet du PS réagit avec l'oxygène moléculaire pour former un radical anionique. Toutes ces espèces radicalaires sont considérées comme réactives vis-à-vis de l'oxygène (ROS) et conduisent, par le biais de réactions chimiques, à la mort cellulaire.

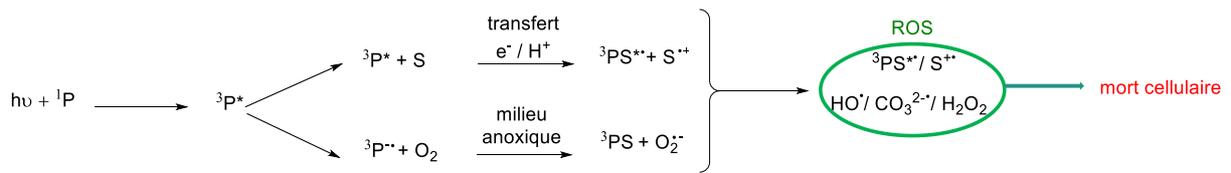


Figure 123 - Mécanisme d'action de la PDT de type I. PS : Photosensibilisateur, S : Substrat.

1.2. La PDT de type II

Ce processus est établi comme le mécanisme majoritaire en PDT. Sous irradiation lumineuse, le chromophore passe d'un état fondamental à un état excité, l'espèce ainsi formée, peut relaxer jusqu'à un état électronique qui peut réagir avec l'oxygène pour générer des espèces oxygénées cytotoxiques selon deux types de mécanisme. Le premier fait intervenir un état triplet du PS et de l'oxygène qui entraîne la formation d'oxygène singulet (1O_2) responsable de la mort cellulaire (Figure 124).



Figure 124 - Mécanisme de la PDT de type II. PS : Photosensibilisateur, S : Substrat

2. Les photosensibilisateurs

2.1. Photosensibilisateurs de 1^{ère} génération

Historiquement, les premiers photosensibilisateurs utilisés en clinique étaient l'hématoporphyrine (Hp) et ses dérivés purifiés (HpD), comme le Photofrin® (Figure 125). Ces entités sont connues comme des photosensibilisateurs de première génération parce qu'elles existent sous forme de mélanges complexes de monomères, dimères et oligomères. Le Photofrin® a été approuvé par la FDA pour le traitement du cancer de l'œsophage et du poumon en 2003.¹⁵⁹

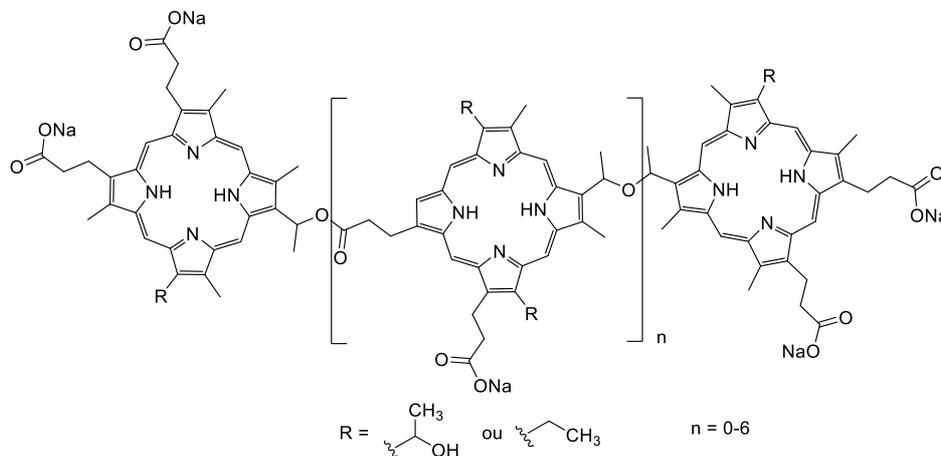


Figure 125 - Structure du Photofrin®.

Le Photofrin[®] a été largement utilisé en PDT car il donne un rendement quantique d'oxygène singulet ϕ_{Δ} élevé égal à 89%. Cependant, la faible absorption dans le rouge rend difficile le traitement des tumeurs profondes à cause du faible coefficient d'extinction molaire ($\epsilon \sim 3000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 630 nm), la sélectivité tumorale associée à une clairance lente induit une photosensibilisation cutanée de plusieurs semaines. L'utilisation des PS de première génération présente donc de nombreux inconvénients qui ont conduit à la définition du PS idéal.

Le photosensibilisateur idéal doit répondre à des critères, déjà évoqués pour certains au cours du **Chapitre 2**, à savoir :

- une faible toxicité dans l'obscurité et photosensibilisation cutanée limitée
- un rendement quantique élevé de génération d'oxygène singulet ϕ_{Δ} élevé
- une forte absorption dans la fenêtre de transparence biologique
- une solubilité en milieu aqueux.

2.2 Photosensibilisateurs de 2^{ème} génération

Afin de se rapprocher des caractéristiques de ce photosensibilisateur idéal, de nouveaux PS, dits de 2^{ème} génération, ont été élaborés. Des photosensibilisateurs issus de chlorines ont été développés car leur absorption est décalée vers le rouge, les chlorines possèdent un coefficient d'absorption élevé ($\epsilon \sim 40\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) par rapport aux dérivés de porphyrines et elles ont un rendement quantique de formation d'oxygène singulet également élevé ($\sim 86\%$). A titre d'exemple, la FDA a approuvé en 1999 l'utilisation du verteporfin (Visudyne[®], $\lambda_{\text{max}} = 690 \text{ nm}$, **Figure 126**) pour la dégénérescence maculaire liée à l'âge.¹⁶⁰ Un autre agent pour la PDT, le *m*THPC (Foscan[®], $\lambda_{\text{max}} = 630 \text{ nm}$, **Figure 126**) a été approuvé pour le traitement du cancer du cou, du sein, de la prostate et du pancréas en Europe.¹⁶⁰

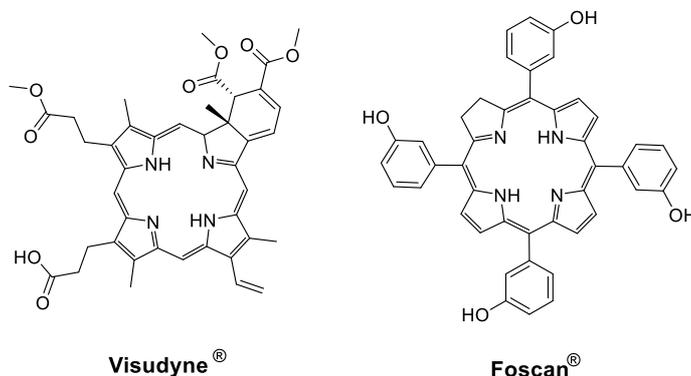


Figure 126 - Structure du Visudyne[®] et du Foscan[®].

Cependant, même si le Foscan® possède une sensibilité cutanée moins importante que le Photofrin®, sa clairance lente (entre 2 à 4 semaines) induit de nombreux effets secondaires lors de son utilisation en clinique.

3. La thérapie photodynamique à deux photons

Nous avons vu au cours du **Chapitre 2** que pour une pénétration de la lumière optimale, il était crucial de cibler la fenêtre thérapeutique située entre 700 et 1000 nm. Cependant, la plupart des PS commerciaux utilisés en clinique sont généralement excités en dehors de cette fenêtre de transparence biologique. Pour devenir un traitement anticancéreux efficace, l'utilisation de l'absorption biphotonique en PDT peut permettre de surmonter ces limitations importantes.

Les premières études à deux photons réalisées sur des PS commerciaux, tels que le Photofrin® ont présenté des propriétés à deux photons plutôt modestes (~ 31 GM).¹⁶¹ Cela a mené à la conception de nouveaux PS sensibles à l'absorption à deux photons. Des études basées sur l'augmentation de la valeur de la section efficace ou de l'efficacité du croisement inter-système ont été réalisées pour permettre une génération d'oxygène singulet élevée.

Anderson et *al.*^{162,163} ont décrit une série de dimères de porphyrines de zinc(II) séparées par un pont butadiyne. Le dérivé de porphyrine P2C2-NMeI (**Figure 127**) possède une valeur de section efficace élevée ($\sigma_{A2P} = 17000$ GM à 916 nm) dans le DMF et un rendement quantique de génération d'oxygène singulet égale à 60% dans le méthanol. Des études à deux photons sur des cellules ovariennes SK-OV-3 incubées avec le PS ou avec le Visudyne® ont été réalisées afin de les comparer. Les expériences réalisées à 920 nm avec P2C2-NMeI ont conduit à 50% de mort cellulaire avec 250 scans alors que le Visudyne® a nécessité deux fois plus de scans, démontrant la supériorité de P2C2-NMeI.

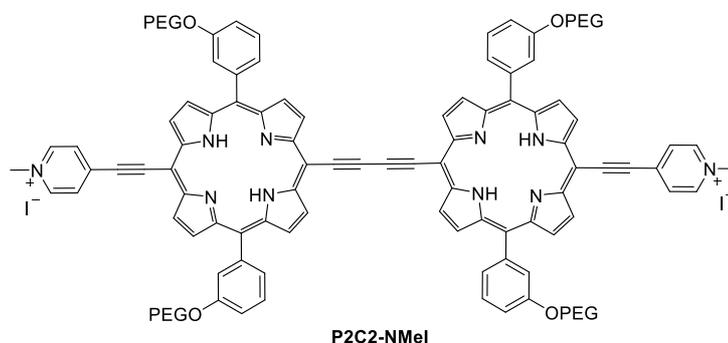


Figure 127 - Structure du **P2C2-NMeI**.

Ce PS a également été utilisé pour traiter la fermeture sélective des vaisseaux sanguins par PDT à deux photons chez le petit animal (**Figure 128**).¹⁶⁴ Anderson et *al.* ont rapporté l'irradiation à deux photons à 920 nm d'une section d'une artère réalisée 15 minutes après l'injection du PS. Après 7 à 12 min d'irradiation, le flux sanguin a été interrompu et l'image après transmission a montré la disparition d'un segment de vaisseau sanguin, indiquant la fermeture de l'artère et sans photodommage sur les vaisseaux sanguins environnants. Dans les mêmes conditions, la fermeture de vaisseaux sanguins n'a pas pu être obtenue avec le Visudyne®. Ce travail représente l'application la plus convaincante de la PDT à deux photons.

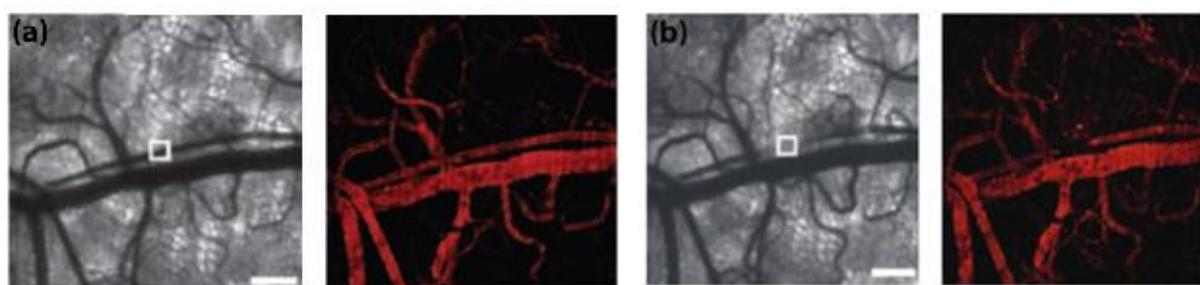


Figure 128 - Vaisseaux sanguins d'une souris vivante après injection du photosensibilisateur P2C2-NMeI. (a) avant irradiation et (b) après excitation à deux photons à 920 nm. Images en noir et blanc : images en transmission; images en couleur : images de fluorescence.¹⁶⁴

Pour augmenter la génération d'oxygène singulet, une autre approche consiste à introduire des atomes lourds, tels que les halogènes, sur des molécules possédant des propriétés d'absorption à deux photons pour améliorer l'efficacité du croisement inter-système. L'équipe de Dr. Olivier Maury a étudié la synthèse de polymères biocompatibles (**Figure 129**), comprenant des chromophores organiques à base de motifs anthracénique (**Anth**) ou dibromobenzénique (**DBB**) pour l'imagerie biphotonique et la PDT.^{165,166} Ces deux chromophores présentent une structure π -conjuguée avec des groupements électro-donneurs terminaux.

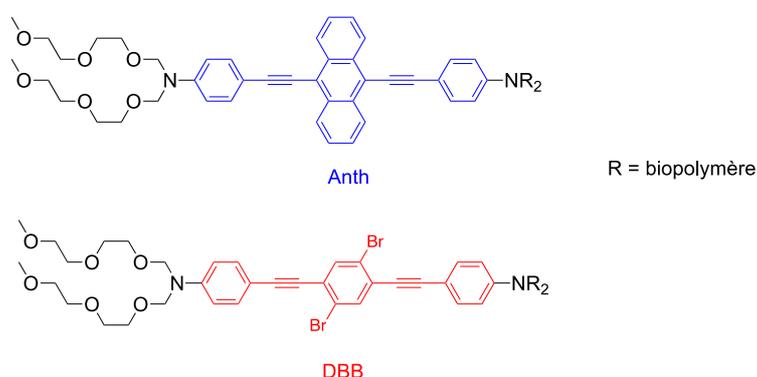


Figure 129 - Structures des chromophores Anth et DBB.

L'irradiation à deux photons des dérivés **DBB** entraîne une probabilité plus importante de couplage inter-système à partir de l'état triplet du PS, permettant d'obtenir une section efficace de 570 GM à 730 nm et une génération d'oxygène singulet à hauteur de 53%.¹⁶

Des études complémentaires ont été réalisées sur le **DBB**. Le PS a été fonctionnalisé par des groupements hydroxyléthylacrylate qui, par polymérisation, permettent de former une micelle qui facilite l'internalisation cellulaire. Dans cette étude, le PS a été incubé en présence d'une lignée cellulaire tumorale BF16-F10 durant 24h. Après photo-activation à 365 nm, le PS induit la mort cellulaire à une concentration minimale en DBB de 6.10^{-6} M. En l'absence de lumière, le PS n'est pas toxique vis-à-vis des cellules (**Figure 130**).¹⁷

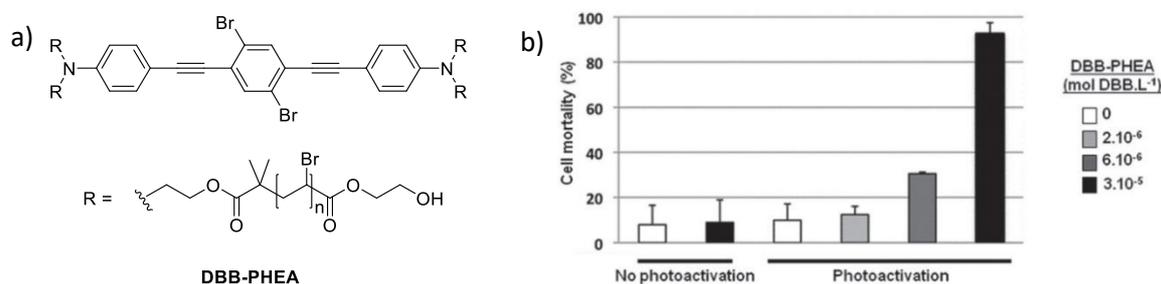


Figure 130 – a) Structure du DBB-PHEA et b) viabilité cellulaire de cellules tumorales BF16-F10 avec ou sans photo-activation à 365 nm.¹⁷

4. Exemples de sondes théranostiques à base de PDT

La plupart des sondes théranostiques sont des nano-objets tels que les nanoparticules,¹⁶⁷ quantum dots,¹⁶⁸ ou encore des polymères.¹⁶⁹ Les sondes théranostiques de taille moléculaire sont dérivées de porphyrines ou de chlorines.

4.1. Sondes théranostiques IRM/PDT

Les sondes théranostiques moléculaires impliquant l'IRM comme fonction d'imagerie et la PDT comme fonction thérapeutique consistent à fixer de manière covalente un complexe de gadolinium(III) au PS *via* un espaceur.

Un des premiers exemples de sonde théranostique IRM/PDT a été décrit par Pandey et *al.* en 2005 (**Figure 131**).¹⁷⁰ La sonde est composée de deux agents de contraste IRM [Gd(DTPA)]⁻ (également connus sous le nom de Magnevist®) qui sont tous deux combinés à un PS dérivé de la chlorophylle. Les tests *in vivo* réalisés sur petits animaux ont montré qu'après 90 jours, 80% des sujets ne présentaient plus de cellules tumorales suite à un traitement de 30 min.

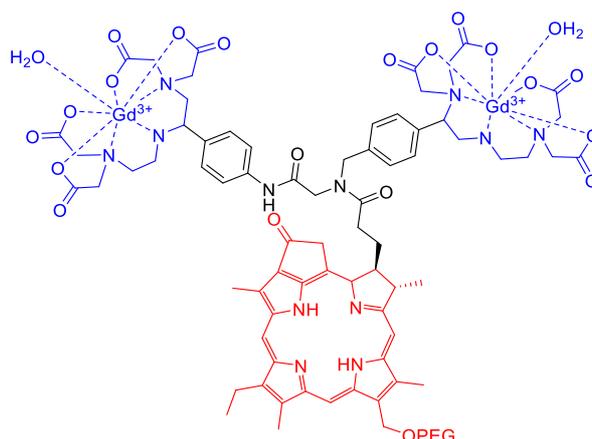


Figure 131 - Sonde théranostique IRM/PDT développé par Pandey et *al.*¹⁷⁰

Heitz et *al.* ont décrit la première sonde théranostique IRM/PDT à deux photons (**Figure 132**). La sonde est formée d'un PS de type dicétopyrrole-porphyrine (DPP-ZnP), pour une utilisation en PDT, fonctionnalisé par un chélate de gadolinium(III) ([Gd(DOTA)]⁻) pour une application en IRM. Le composé a une forte capacité d'absorption à un photon ($\epsilon_{\max} = 41\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ à 667 nm dans l'eau). De bonnes propriétés d'absorption à deux photons, quantifiées par de grandes valeurs de section efficace, ont été mises en évidence en solution avec un maximum de 1000 GM entre 910 et 940 nm. Un effet PDT élevé évalué dans les cellules HeLa a été observé par excitation à un photon à 660 nm causant jusqu'à 70% de mort cellulaire de cellules HeLa tandis qu'un effet PDT à deux photons a été observé à 930 nm (50 % de mort cellulaire).^{171,172}

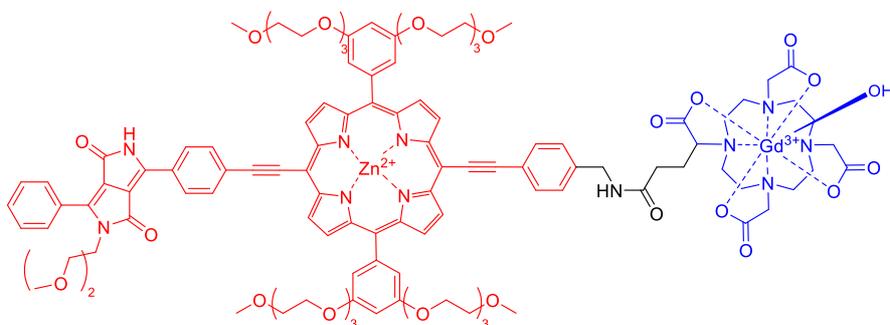


Figure 132 - Sonde théranostique IRM/PDT basée sur le DPP-ZnP.¹⁷³

Plus récemment, Heitz et *al.* ont décrit une sonde théranostique composée d'un dimère de Zn-porphyrine (ZnP-ZnP) lié à deux complexes [Gd(DOTA)]⁻ (**Figure 133**). Ce composé a montré une très forte absorption à deux photons entre 880 et 930 nm ($\sigma \approx 8000\text{ GM}$ dans le DMSO). Suite à un excitation à deux photons à 910 nm, une phototoxicité élevée avec 100% de mort cellulaire est observée.¹⁷⁴

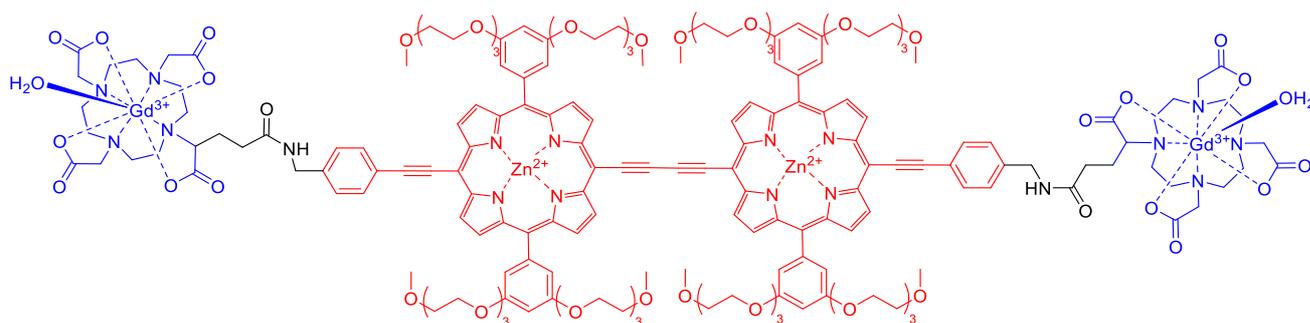


Figure 133 - Sonde théranostique IRM/PDT développée par Heitz et al.¹⁷⁴

4.2. Sondes théranostiques TEP/PDT

L'imagerie TEP a également connu un intérêt particulier pour les applications théranostiques car elle offre une imagerie fonctionnelle plutôt que structurel offerte par l'IRM. Les sondes théranostiques TEP/PDT sont dérivées de PS commerciaux. Par exemple, Entract *et al.* ont combiné les effets thérapeutiques de la porphyrine de Zn^{2+} tout en suivant l'efficacité du traitement par imagerie TEP au ^{18}F (Figure 134).¹⁷⁵

La synthèse de la sonde théranostique se réalise *via* une réaction de chimie click entre un azoture présent sur la porphyrine et un alcyne comportant une chaîne PEG radiomarqué au ^{18}F . Le fragment alcyne est dans un premier temps radiomarqué dans des conditions classiques de radiomarquage au ^{18}F *via* une S_N2 entre un groupement O-tosyl et une source de fluor-18 à 140°C. Une fois le composé radiomarqué, il est engagé dans une étape de chimie click et le composé est obtenu en 15 min. L'activité thérapeutique de cette sonde est évaluée sur une lignée cellulaire de type HT-29 (adénocarcinome du côlon humain). Dans le noir, aucune activité thérapeutique n'est décelée ce qui permet de confirmer l'absence de cytotoxicité de la sonde jusqu'à 0,25 mM. Après irradiation des cellules à plus de 550 nm pendant une heure, 90% des cellules sont mortes pour une concentration de 0,1 mM.

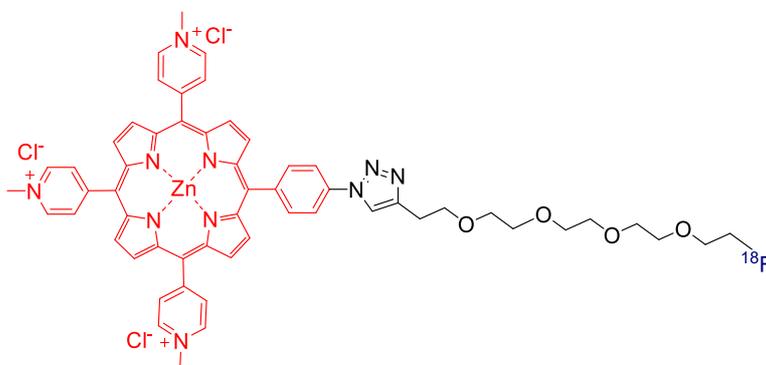


Figure 134 - Sonde TEP/PDT décrite par Entract *et al.*¹⁷⁵

Price *et al.* ont récemment décrit un ligand bispidine radiomarqué au ^{68}Ga conjugué à une porphyrine (Figure 135).¹⁷⁶ Pour évaluer la viabilité de ce système en tant qu'agent théranostique, la cytotoxicité

du conjugué a été étudiée sur une lignée cellulaire de l'adénocarcinome humain (HT-29). Les cellules ont été incubées avec le complexe radiomarqué durant 24h puis irradiées dans le visible (422 nm). Dans ces conditions, plus de 90% de mort cellulaire a été observée à une concentration de 50 μM pour le complexe radiomarqué après irradiation. En absence d'irradiation, le complexe montre une faible cytotoxicité.

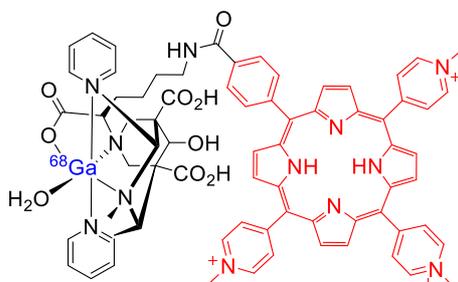


Figure 135 - Structure de la sonde développée par Price et al.¹⁷⁶

III. Elaboration de sondes théranostiques TEP/PDT à deux photons

Les exemples présentés précédemment sont tous constitués de photosensibilisateurs à base de motifs porphyriniques, ce qui rend souvent les synthèses très délicates avec des rendements faibles. De plus, beaucoup de ces sondes théranostiques ne sont activables que dans le visible et donc en dehors de la fenêtre thérapeutique. De plus, il est à noter qu'à ce jour aucune sonde théranostique TEP/PDT à deux photons n'a été décrite dans la littérature.

Ces travaux s'inscrivent dans une dynamique de développement de sondes moléculaires biocompatibles où les deux fonctions (thérapie et diagnostic) sont présentes sur la même entité. L'objectif de ce projet est d'intégrer sur une même plateforme macrocyclique (**Figure 136**) un radiométal pour l'imagerie TEP et un photosensibilisateur permettant la thérapie par la PDT.

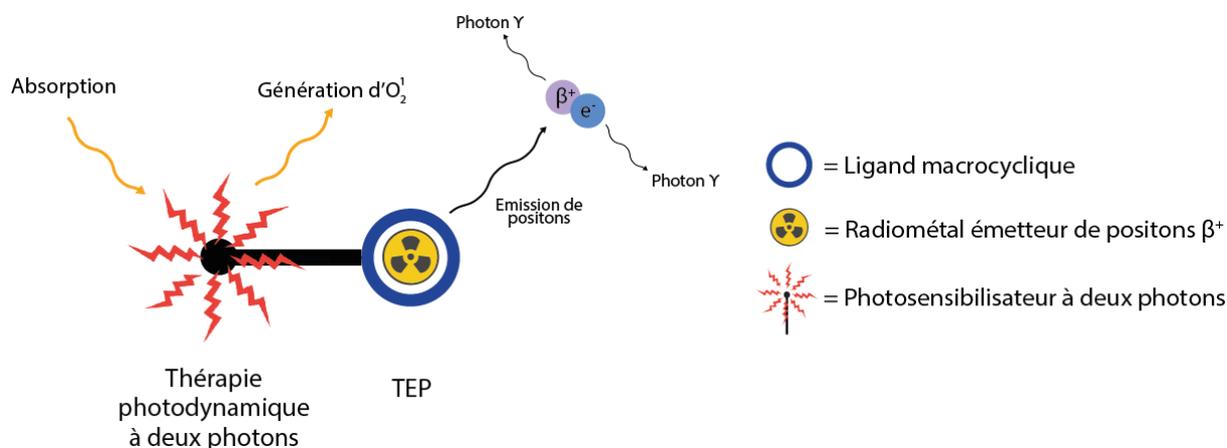


Figure 136 - Représentation générale des sondes théranostiques biocompatibles visées.

Les structures des sondes théranostiques visées sont très similaires aux sondes bimodales décrites au cours du **Chapitre 3**. A nouveau, nous avons alors étudié la possibilité d'intégrer le photosensibilisateur sur le picolinate des ligands **H₁TE1PA** et **H₂CB-TE1PA**, ligands adaptés pour la complexation du ⁶⁴Cu²⁺ (**Figure 137**). Le photosensibilisateur sélectionné est basé sur une chaîne π -conjuguée fonctionnalisée par un groupement hydrosolubilisant. Le choix de ce photosensibilisateur repose sur les travaux de notre collaborateur lyonnais, le Dr. Olivier Maury, décrits précédemment (c.f. **Chapitre 4**, page 126-127).

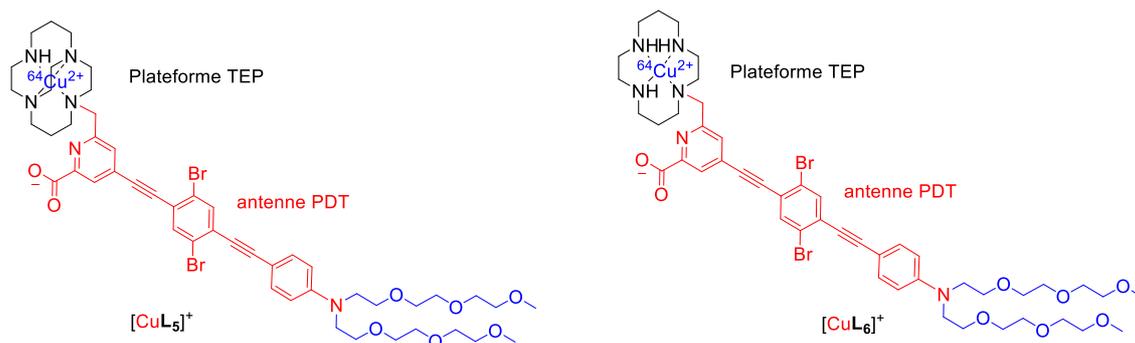


Figure 137 - Présentation des sondes théranostiques TEP/PDT ciblées.

Ce projet est une étroite collaboration entre notre équipe, pour la synthèse des ligands et des complexes, le laboratoire du Dr. Olivier Maury de l'ENS Lyon pour les études photophysiques et le laboratoire du Pr. Alain Faivre-Chauvet du CRCINA de Nantes pour les études biologiques. Ce chapitre est divisé en deux parties : une première partie concerne la synthèse des ligands et des complexes de Cu²⁺ et la seconde section décrit les études photophysiques focalisées sur la mesure de la génération d'oxygène singulet.

IV. Synthèse des ligands L₅ et L₆

1. Synthèse du photosensibilisateur

La synthèse du photosensibilisateur se réalise en sept étapes à partir de la 2,5-dibromoaniline. La première étape est une iodation en position 4 de la 2,5-dibromoaniline en présence du *N*-iodosuccinimide dans le DMSO permettent d'obtenir la 2,5-dibromo-4-iodoaniline (**20**) quantitativement. Le composé **20** est ensuite engagé dans un couplage de Sonogashira avec le (triisopropylsilyl)acétylène en présence de palladium(II) et d'iodure de cuivre(I) afin d'obtenir le composé **21** quantitativement. Le produit **21** est engagé sans purification supplémentaire dans une réaction de Sandmeyer qui permet de former un halogénure d'aryle à partir d'une amine aromatique. L'amine aromatique est diazotée par l'acide nitrique formé *in situ* par l'action du nitrite de sodium et

d'acide acétique pour former le sel de diazonium. L'ajout de l'iodure de potassium permet d'obtenir le dérivé iodé **22** *via* une substitution nucléophile avec un rendement de 64% (**Figure 138**).

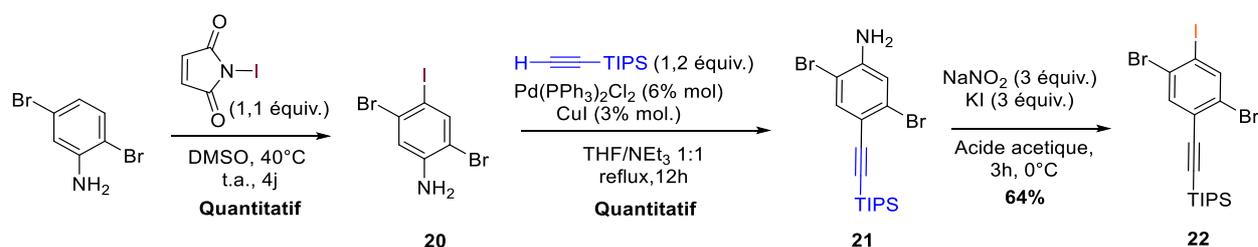


Figure 138 - Synthèse des composés **20**, **21** et **22**.

Le composé **22** est ensuite mis à réagir dans un nouveau couplage de Sonogashira avec l'alcyne vrai dans les conditions usuelles afin d'obtenir le produit attendu **23** avec un rendement de 80% après purification. Le composé **23** est ensuite mis en présence de TBAF afin de retirer le groupement silylé et donner accès quantitativement à l'alcyne terminal **24** (**Figure 139**).

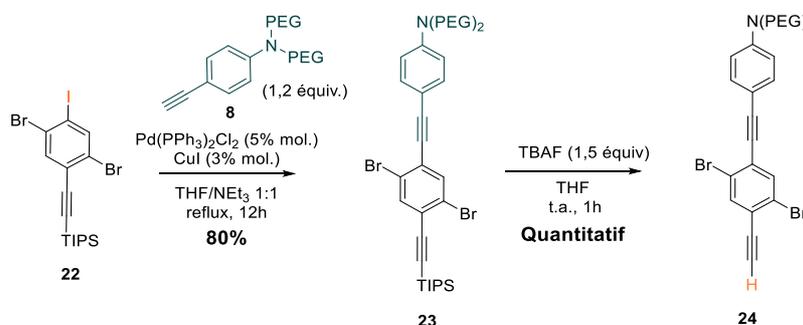


Figure 139 - Synthèse des composés **23** et **24**.

Le composé **24** est ensuite engagé dans un nouveau couplage de Sonogashira en présence du composé **3** (**Figure 140**). Cependant, la formation du dimère de l'alcyne issu du couplage de Gläser est observée (*cf.* Chapitre 2, page 77), en employant les conditions classiques pour cette réaction. Le produit de couplage est obtenu avec des rendements oscillants entre 42 et 58 % (**Entrée 1**). La modification de la charge catalytique en iodure de cuivre(I) n'a pas permis d'observer une amélioration significative du rendement (**Entrée 2**). Néanmoins, les conditions de l'**Entrée 3**, où la charge catalytique en Pd(II) a été légèrement augmentée, ont permis d'améliorer le rendement allant jusqu'à obtenir quantitativement le produit de couplage attendu **25** (**Figure 140**).

Entrée	Conditions	Solvant/base	T°C/Temps	Rendements
1	Pd(PPh ₃) ₄ Cl ₂ (5 mol. %), CuI (2 mol. %)	THF/Et ₃ N,	55°C/17h	42 - 58 %
2	Pd(PPh ₃) ₄ Cl ₂ (5 mol. %), CuI (3 mol. %)	THF/Et ₃ N	55°C/17h	37 - 65 %
3	Pd(PPh ₃) ₄ Cl ₂ (6 mol. %), CuI (3 mol. %)	THF/Et ₃ N,	55°C/17h	71 - 100 %

Tableau 21 - Tableau récapitulatif des conditions de la réaction de Sonogashira testées pour la formation du composé **25**.

La dernière étape est une activation de l'alcool secondaire par le chlorure de mésyle donnant le photosensibilisateur **26** (**Figure 140**), prêt à être greffé sur le macrocycle, est obtenu avec un rendement global de 51 % en 10 étapes. Cette voie de synthèse nous permet d'obtenir le photosensibilisateur à hauteur de plusieurs grammes (≈ 3 g)

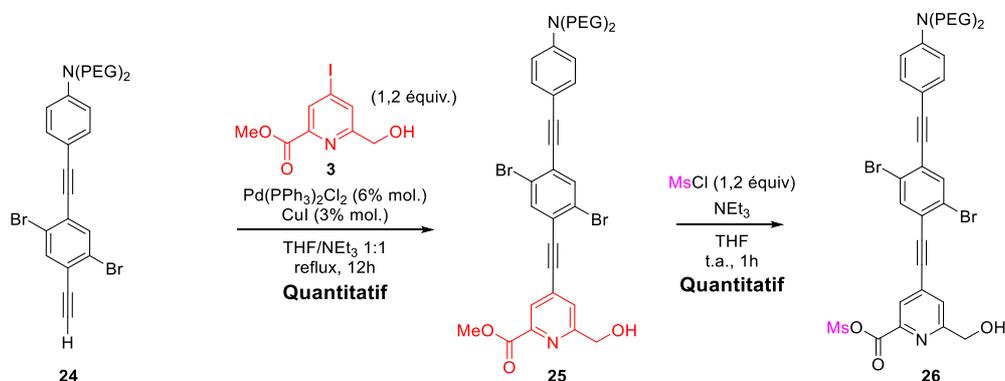


Figure 140 - Synthèses des composés **24**, **25** et du photosensibilisateur **26**.

2. Synthèse du ligand L_5

Deux voies de synthèse ont été envisagées pour obtenir le ligand L_5 , cyclam mono-*N*-fonctionnalisé par le photosensibilisateur. La voie **A** consiste à utiliser les conditions décrites au cours du **Chapitre 3**, permettant de favoriser la mono-*N*-fonctionnalisation du cyclam *via* la triprotection par un groupement phosphoryle et de réaliser par la suite une déprotection en milieu acide pour obtenir le ligand ciblé. La voie **B** consiste à greffer, de façon statistique, le photosensibilisateur sur le cyclam non protégé (**Figure 141**).

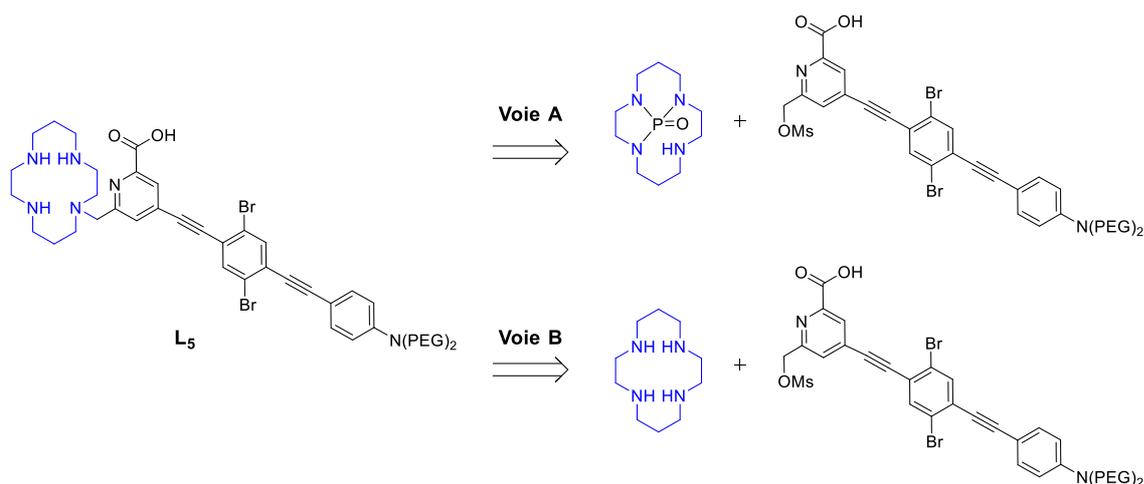


Figure 141 - Voies rétrosynthétiques du ligand L_5 .

2.1. Synthèse à partir de la voie A

Le composé **26** est engagé dans une réaction S_N2 , en présence de K_2CO_3 et de NaI, avec le cyclam triprotégé **16** (Figure 142). Après purification sur colonne chromatographique, le composé **27** a été obtenu avec un rendement de 45%.

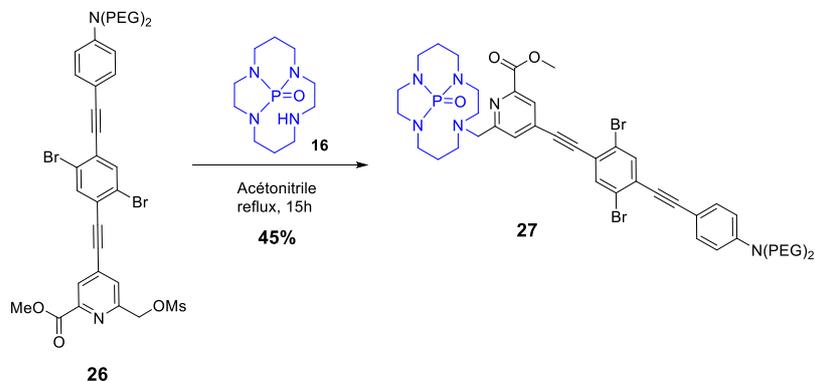


Figure 142 - Synthèse du composé **27**.

Le spectre RMN¹H enregistré dans le $CDCl_3$ est donné ci-après (Figure 143). Dans la zone aromatique, les singulets situés à 8,11 et 8,06 ppm (position **1** et **2**) correspondent au $-CH_{ar}$ se trouvant sur l'unité picolinate. Les singulets résonnants à 7,85 et 7,67 ppm (position **3** et **4**) intègrent pour un proton et correspondent aux $-CH_{ar}$ se trouvant sur l'unité aromatique dibromé. Les protons $-CH_{ar}$ du groupement aryle résonnent sous la forme de deux doublets à 7,35 et 6,63 ppm (position **5** et **6**). Le singulet à 3,96 ppm (position **7**) intégrant pour trois protons est caractéristique du groupement méthyle de la fonction ester méthylique. Les protons du macrocycle en α des atomes d'azote résonnent sous la forme d'un massif mal résolu entre 2,38 et 3,33 ppm. Enfin, les protons du macrocycle en β des atomes d'azote résonnent entre 1,41 et 1,83 ppm sous la forme de massifs également mal résolus.

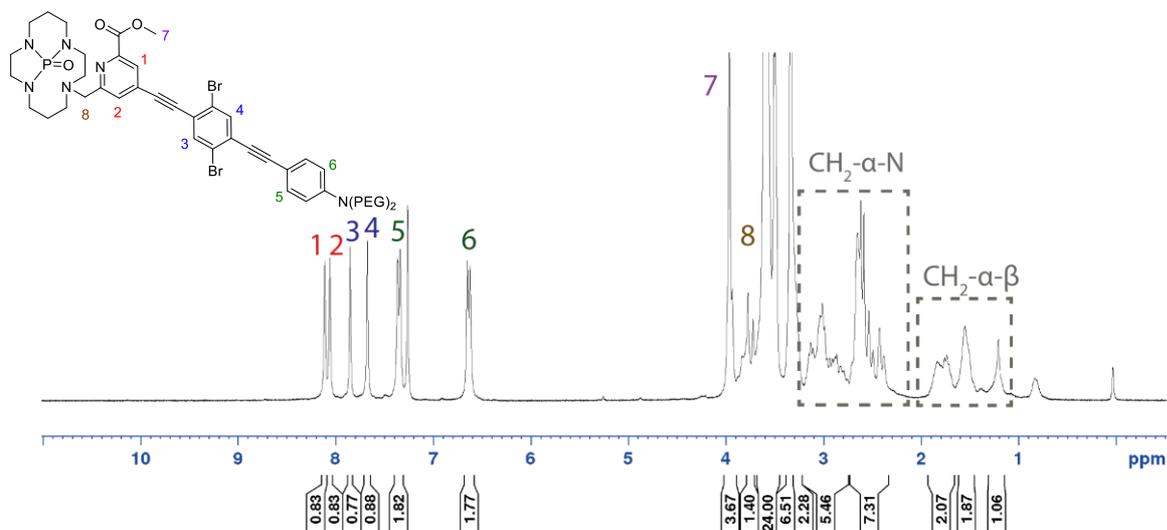


Figure 143 - Spectre RMN 1H du composé **27** (300 MHz, 298 K, $CDCl_3$).

Sur le spectre RMN ^{13}C en J-modulation, représenté sur la **Figure 144**, les pics à 136,6 et 135,3 ppm correspondent aux $-\text{CH}_{\text{ar}}$ se trouvant sur l'unité dibromobenzène (positions 5 et 6). Les signaux correspondant aux $-\text{C}_{\text{ar}}$ de l'unité dibromobenzène résonnent à 128,5 et 123,2 ppm (position 9 et 14) tandis les pics résonnant à 124,3 et 123,9 ppm correspondent aux $-\text{C}_{\text{ar}}$ portant les atomes de brome (position 12 et 13). Les carbones quaternaires des triples liaisons donnent les signaux à 99,5, 92,6, 92,3 et 85,6 ppm (position 17, 18, 19 et 20). Le pic à 60,4 ppm (position 21) correspond au groupement $-\text{CH}_2$ de l'unité picolinate. Le groupement $-\text{CH}_3$ de l'ester méthylique résonne à 53,2 ppm. Enfin, les deux pics à 26,5 et 22,2 ppm sont caractéristiques des $-\text{CH}_2$ en β des atomes d'azote du cyclam phosphorylé et permet de confirmer la mono-alkylation sur la plateforme macrocyclique. Afin de confirmer l'obtention du composé **27**, des séquences en RMN 2D ont été réalisées (COSY, HMQC et HMBC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$) ce qui a permis d'attribuer le déplacement de chaque proton et carbone de la molécule.

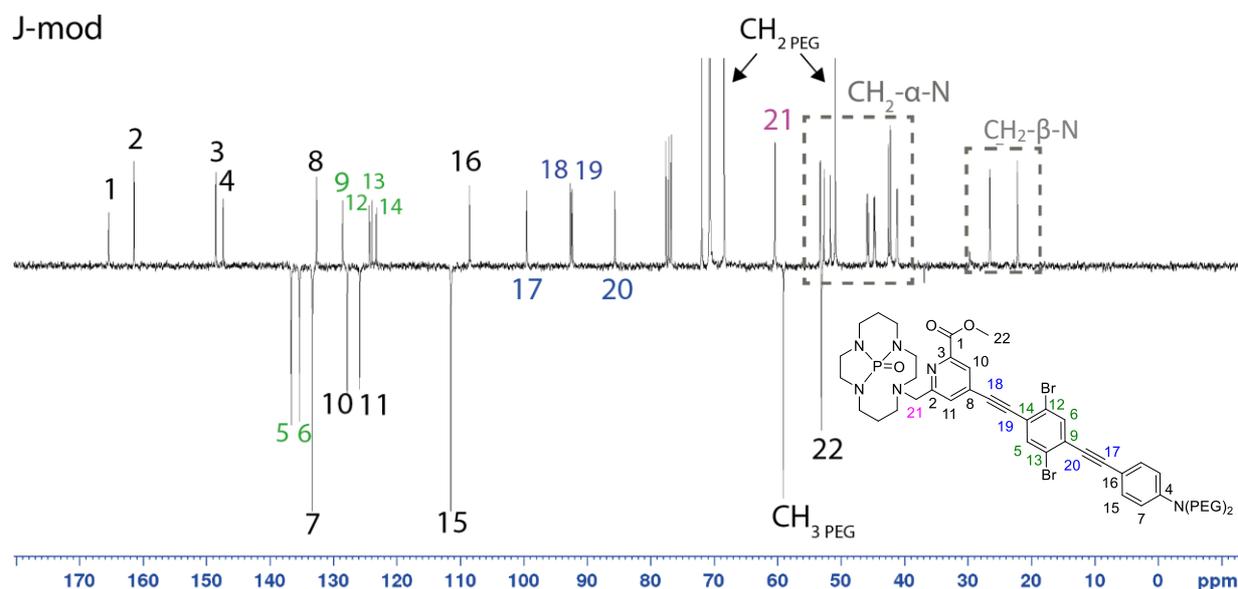


Figure 144 - Spectre RMN ^{13}C du composé **27** (75 MHz, 298 K, CDCl_3).

Deux voies de déprotection ont été étudiées pour retirer le groupement phosphorylé et l'ester méthylique du composé **27** (**Figure 144**). La première voie (Voie A) consiste à utiliser les mêmes conditions de déprotection que celles décrites au cours du **Chapitre 3**. Ces conditions nous avaient permis d'obtenir le ligand **L₂** sans dégrader le fluorophore. Cependant, dans ces conditions (HCl 1M, 25°C) une dégradation du photosensibilisateur a été observée par RMN ^1H . Nous avons alors tenté des essais de déprotection dans des conditions plus diluées (HCl 0,5 M) mais une dégradation similaire du photosensibilisateur est observée. La déprotection du composé **27** réalisée dans l'acide trifluoroacétique (TFA, Voie B) ne permet pas non plus d'obtenir le ligand **L₅**, une dégradation du composé étant aussi constatée.

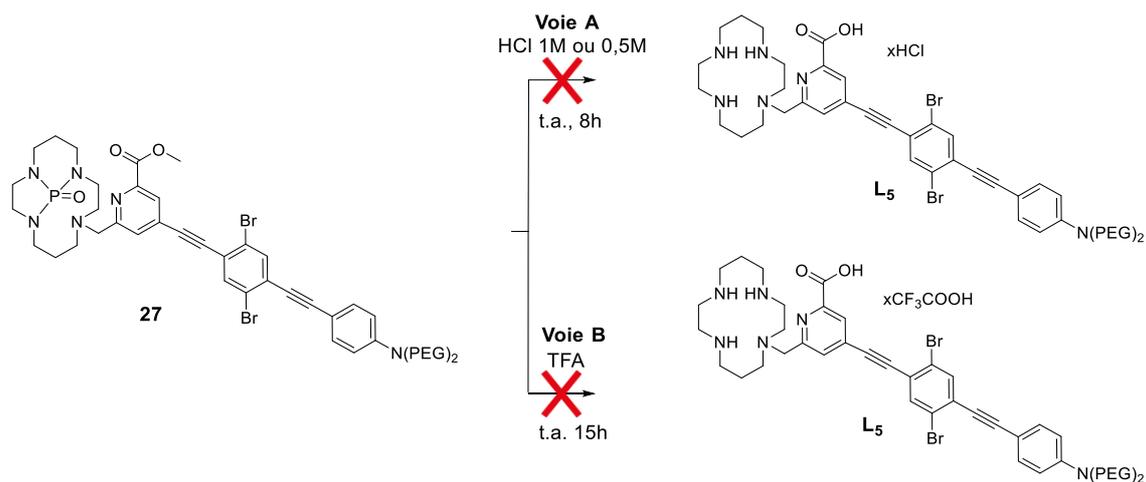


Figure 145 - Déprotection envisagée du composé **27** selon la voie A.

2.2. Synthèse à partir de la voie B

La voie B (Figure 147) consiste en une substitution nucléophile S_N2 du composé **26**, en présence d'un excès de cyclam (5 équiv.) en milieu très dilué pour favoriser la monoalkylation même si on ne peut s'affranchir totalement de la polyalkylation. Suite à de multiples purifications délicates sur colonne chromatographique d'alumine neutre, un produit de mono-alkylation a pu être isolé et des expériences RMN ont pu être réalisées.

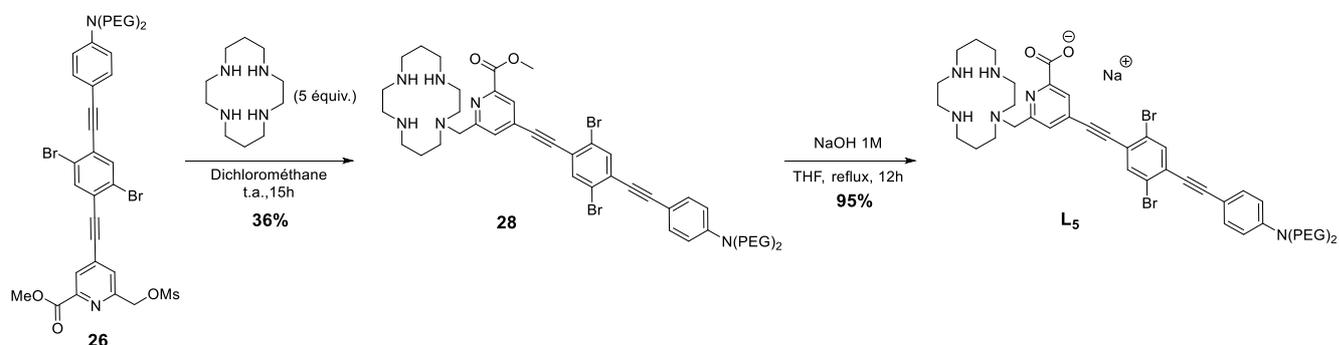


Figure 146 - Synthèse du ligand **L₅** selon la voie B.

Le spectre RMN ^{13}C en J-modulation représenté ci-dessous (Figure 147) est similaire au composé **27** au niveau des signaux de la partie photosensibilisateur (85-170 ppm). Cependant, seulement quatre signaux sur huit sont observables (52,6, 48,2, 47,7 et 44,7 ppm) pour les carbones en α des atomes d'azote. Les deux signaux à 25,4 et 22,4 ppm sont caractéristiques des $-CH_2$ en β des atomes d'azote du cyclam phosphorylé et permet de confirmer l'obtention d'un cyclam mono-fonctionnalisé.

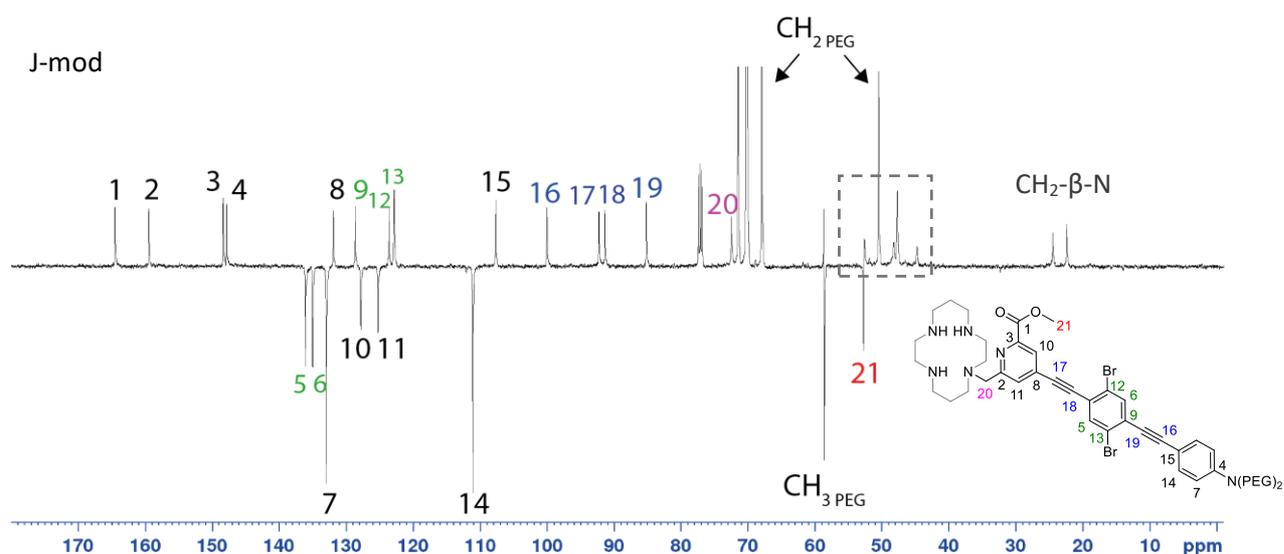


Figure 147 - Spectre RMN ^{13}C du composé **28** (125 MHz, 298 K, CDCl_3).

Cependant, l'analyse HRMS n'a pas permis de confirmer la structure du composé **28**. En effet, le spectre indique une masse m/z égale à 1027,3382 pour une masse m/z attendue du composé égale à 1014,33 soit un différentiel de +13. L'hypothèse établie est la possible réaction du dichlorométhane avec le picolinate *via* deux $\text{S}_{\text{N}}2$ consécutives formant un pont méthylène entre deux unités picolinate. En effet des réactions similaires ont été vus dans la littérature.¹⁷⁷ A noter que la présence de cette adduit supplémentaire aurait dû être observable en RMN ^{13}C . Afin de tenter d'éliminer l'adduit, le composé **28** a été mis en présence d'une solution de HCl 1M. Des expériences MALDI-TOF nous ont permis d'observer le produit désiré mais en présence d'impuretés difficiles à éliminer et n'a donc pas pu être isolé.

L'alkylation avec le photosensibilisateur **26** a alors été réalisée dans l'acétonitrile dans les mêmes conditions que précédemment. Des expériences MALDI-TOF ont pu confirmer, la formation du composé sans la présence de l'adduit, laissant supposer une possible réactivité du dichlorométhane avec le picolinate. Malheureusement, la purification ne permet pas d'isoler le composé **28**.

3. Synthèse du ligand L₆

La synthèse du ligand L₆, cyclam *cross-bridged* fonctionnalisé par le photosensibilisateur, implique l'alkylation du CB-Cyclam par 1,1 équivalent de composé **26**. Pour rappel, la protonation de la fonction amine secondaire non alkylée du CB-Cyclam empêche la seconde alkylation. Le produit obtenu a nécessité une purification par chromatographie sur colonne d'alumine où une dégradation du photosensibilisateur est observée. Néanmoins, le composé **29** a été isolé avec 50% de rendement (**Figure 148**).

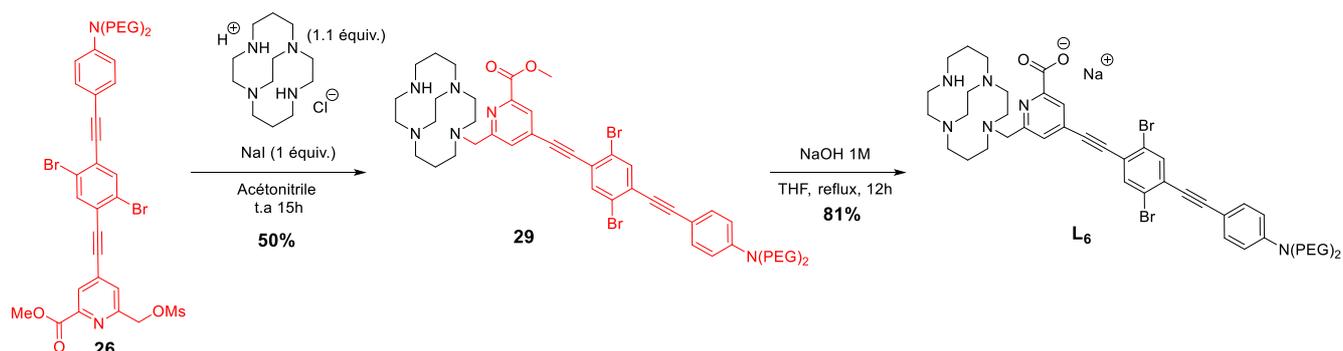


Figure 148 - Synthèse du ligand L₆.

Le spectre ¹³C RMN en J-modulation représenté sur la **Figure 149** est similaire à celui du composé **27**. Le spectre au niveau des signaux de la partie photosensibilisateur (85-170 ppm). Le pic à 63,4 ppm (position **21**) correspond au groupement -CH₂ du picolinate tandis que le signal 52,1 ppm est attribué au méthyle de l'ester méthylique. Les carbones en α des atomes d'azote du CB-Cyclam se situent entre 44,2 et 58,9 ppm tandis que les carbones en β des atomes d'azote résonnent à 27,4 et 21,7 ppm.

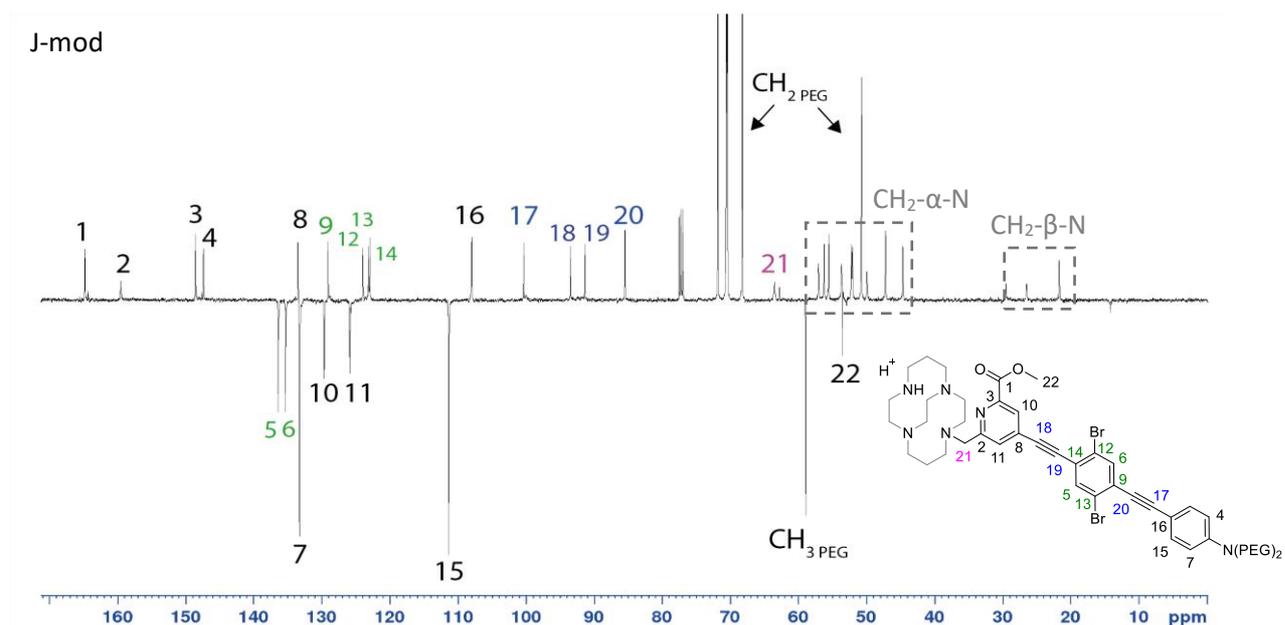


Figure 149 - Spectre ¹³C RMN du composé **29** (125 MHz, 298 K, CDCl₃).

L'hydrolyse du groupement ester méthylique est effectuée en conditions basiques (NaOH 4M/THF) et une purification sur colonne d'exclusion stérique (Sephadex G-15) permet d'isoler le ligand final **L₆** avec un rendement de 81%. Cette voie de synthèse nous a permis d'obtenir le ligand **L₆** à hauteur de plusieurs milligrammes (\approx 200 mg).

Sur le spectre ¹³C RMN représenté ci-dessous (**Figure 150**), la disparition du singulet 52,1 ppm correspondant au groupement -CH₃ de la fonction ester méthylique permet de confirmer la structure du ligand.

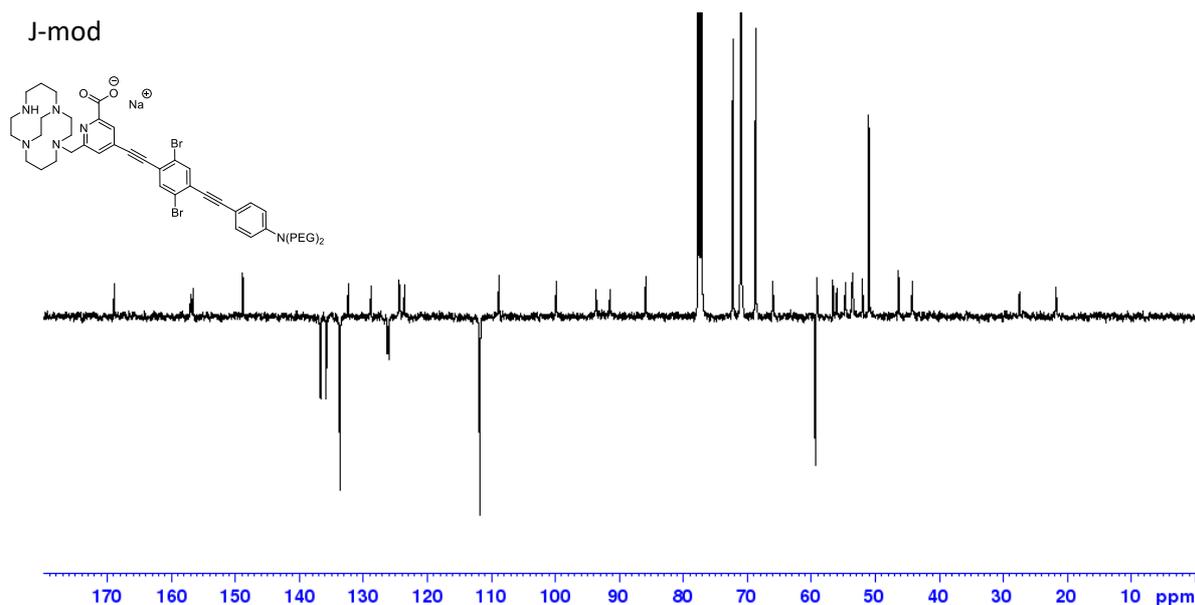


Figure 150 - Spectre ¹³C RMN du ligand **L₆** (300 MHz, 298 K, CDCl₃).

Pour résumer, il a été observé pour le composé **28** la présence d'un adduit +13 par HRMS même si la RMN ne permet pas de constater la présence de cette impureté. Le ligand **L₅** n'a donc pu être isolé avec certitude. Le ligand **L₆** a pu être obtenu isolé et a été impliqué dans la complexation du cuivre(II) afin d'étudier ses propriétés photophysiques, notamment sa capacité à générer de l'oxygène singulet.

V. Caractérisation du [CuL₆]⁺

1. Synthèse du complexe [CuL₆]⁺

Le complexe de cuivre a été obtenu dans l'eau en présence de perchlorate de cuivre(II) à pH 7 à 80°C (**Figure 151**). Afin d'éliminer les sels résiduels, le complexe de cuivre(II) a été dialysé et purifié par HPLC semi-préparative. Cette purification était délicate et mène à la perte d'une quantité non négligeable de produit c'est pourquoi seulement 17 mg du complexe [CuL₆]⁺ a pu être récupéré.

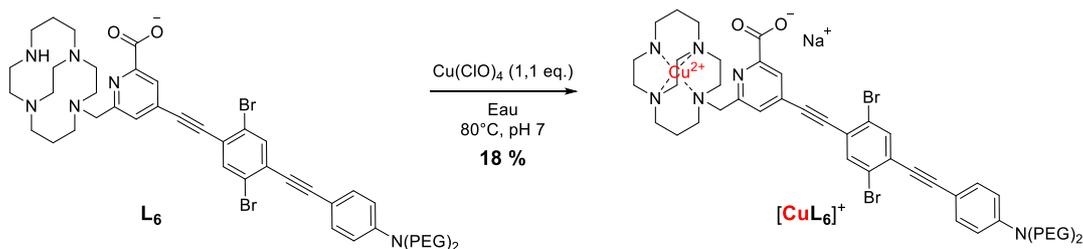


Figure 151 - Synthèse du complexe de cuivre(II) $[\text{CuL}_6]^+$.

Cependant, il a été observé par spectroscopie de masse haute résolution un mélange de complexes constitué du complexe attendu $[\text{CuL}_6]^+$ et d'un complexe de Cu^{2+} sans la fonction carboxylate (**Figure 152**).

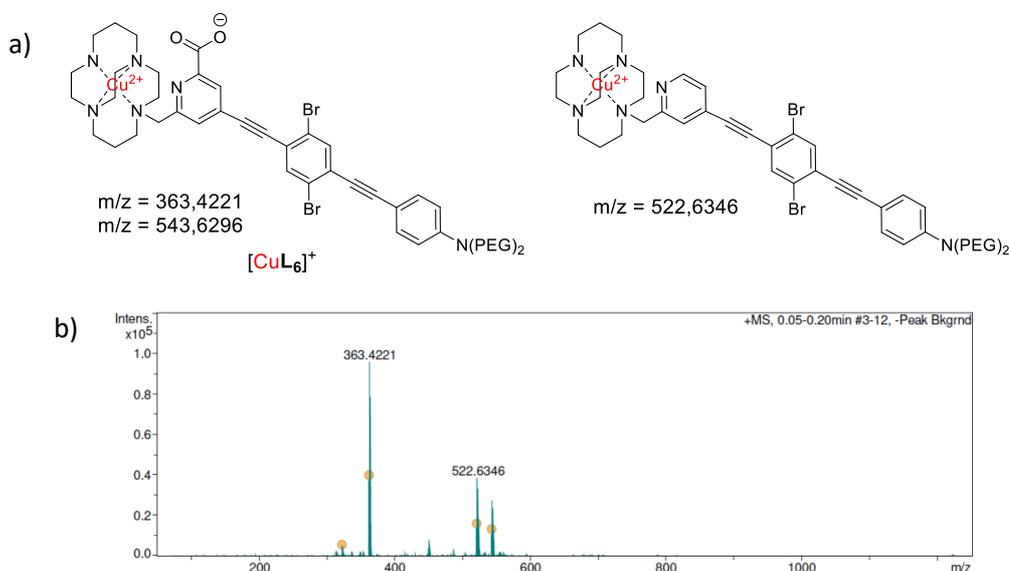


Figure 152 - a) Structure du $[\text{CuL}_6]^+$ et b) spectre HRMS après complexation de L_6 au Cu^{2+} .

La décarboxylation provoquée par la présence du cuivre ou par une fragmentation durant l'analyse en masse sont les deux hypothèses proposées. Une complexation réalisée à température ambiante ne permet cependant pas d'éliminer le problème car le pic à m/z égale à 522,63 est toujours observé. Les spectres de masse obtenus après purification sur HPLC n'apportent pas d'information supplémentaire et ne permettent pas de confirmer si c'est un mélange de complexe de Cu^{2+} ou si la disparition de la fonction carboxylate est provoquée par l'ionisation du spectromètre de masse.

La décarboxylation étant jugée peu probable, les études photophysiques ont été réalisées sur le complexe $[\text{CuL}_6]^+$ et le composé **29** et seront discutées dans la prochaine partie.

VI. Etudes spectroscopiques

Les spectres d'absorption, d'excitation et d'émission du composé ester **29** et du complexe $[\text{CuL}_6]^+$ ont été réalisés dans une solution de dichlorométhane (**Figure 153**).

Le spectre d'absorption du composé **L₆** montre la présence de deux bandes dont les maxima sont situés à 310 et 404 nm. La bande la plus haute en énergie correspond à une transition de type $\pi \rightarrow \pi^*$ tandis que celle de plus basse énergie correspond à un transfert de charge entre le groupement donneur – N(PEG)₂ et le groupement picolinate. Suite à une excitation à 400 nm, le ligand présente une bande d'émission large centrée à 600 nm correspondant à un transfert de charge à l'état excité (**Figure 153**, gauche). Dans le domaine infrarouge, un faible signal centré autour de 1270 nm est observable. Il s'agit de la phosphorescence de l'oxygène singlet généré par le composé **29** suite à une excitation à 400 nm (**Figure 153**, droite). Quatre spectres d'émission ont été mesurés à différentes absorbances (entre 0,01 et 0,1).

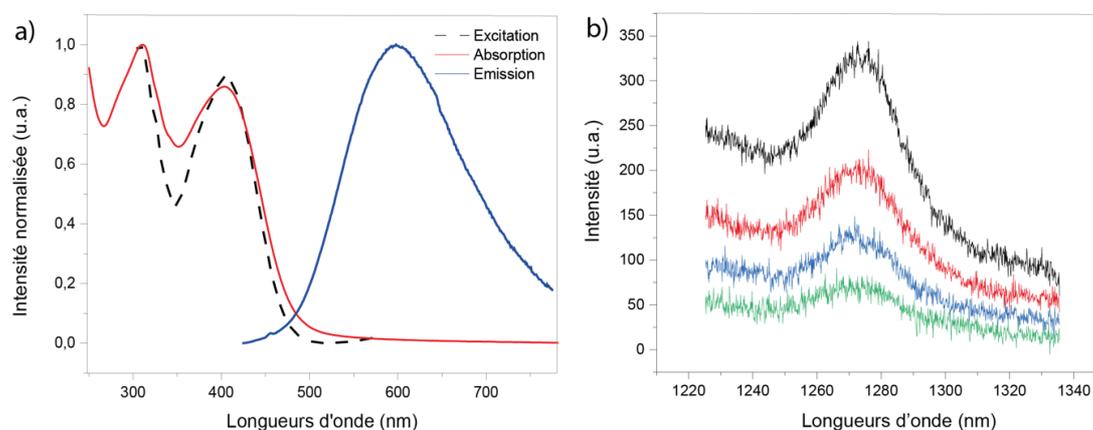


Figure 153 - a) Spectres normalisés d'absorption, d'excitation et d'émission du composé **29** ($\lambda_{exc} = 400$ nm) et b) spectres d'émission résultant de la génération d'oxygène singlet à différents absorbances (entre 0,01 et 0,1) dans l'IR ($\lambda_{exc} = 400$ nm, droite) à température ambiante.

Les rendements quantiques de fluorescence et de génération d'oxygène singlet ont été mesurés dans le dichlorométhane et sont résumés dans le **Tableau 22**. Le composé **29** présente un rendement quantique de fluorescence de 3% et une génération d'oxygène singlet de 14% dans le dichlorométhane. Ainsi le composé **29** se comporte comme un photosensibilisateur pour la PDT.

Cependant, le photosensibilisateur **DBB** vu précédemment (page 128) a un rendement quantique de fluorescence de 25 % et la génération d'oxygène singlet est égale à 53 %. La somme des rendements quantiques ϕ et ϕ_{Δ} permet d'avoir une idée du processus majoritaire de désexcitation. Ainsi le composé **29** se désexcite majoritairement par des processus non-radiatifs ($\phi + \phi_{\Delta} = 17\%$, **Tableau 22**). La possible présence de nombreux oscillateurs O-H et C-H présents sur le macrocycle peut expliquer en partie la cause de cette chute du rendement quantique de la fluorescence et de la génération d'oxygène singlet du composé **29** par rapport au **DBB**.

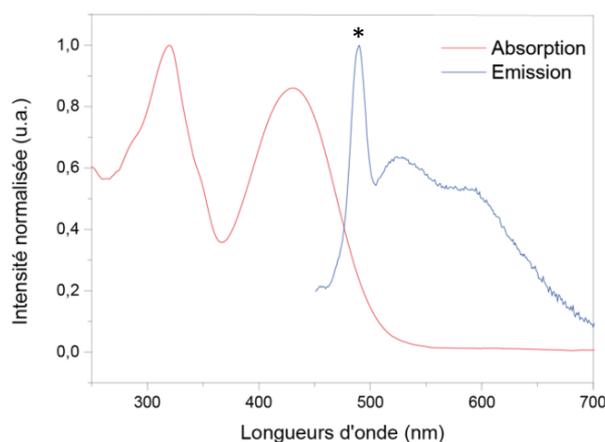


Figure 154 - Spectres normalisés d'absorption (rouge) et d'émission (bleu) du complexe $[\text{CuL}_6]^+$ ($\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$) à température ambiante. *Raman du dichlorométhane.

Le spectre d'absorption du complexe $[\text{CuL}_6]^+$ (**Figure 154**) montre la présence de deux bandes, observées également pour le composé **29**, situées à 320 et 431 nm. Le spectre d'émission montre une bande large autour de 550 nm suite à une excitation dans le visible ($\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$). Cependant, l'intensité du pic Raman à 500 nm par rapport à l'émission du complexe indique probablement une forte extinction de la luminescence due à la présence du Cu^{2+} . L'étude du rendement quantique et de la génération d'oxygène singulet permet de confirmer cette hypothèse. En effet, le complexe $[\text{CuL}_6]^+$ présente un rendement quantique de fluorescence et de génération d'oxygène singulet nuls (**Tableau 22**).

Entrée	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	ϕ (%)	ϕ_{Δ} (%)	$\phi + \phi_{\Delta}$ (%)
Composé 29	310, 404	600	3 ^a	14 ^b	17
$[\text{CuL}_6]^+$	320, 431	550	0 ^a	0 ^b	0
DBB	421	458	25 ^a	53 ^a	78

Tableau 22 - Données spectroscopiques du composé **29** et du complexe $[\text{CuL}_6]^+$ et du **DBB**. ^aMesurés en utilisant la Coumarine-153 comme référence ($\phi = 45 \%$ dans le méthanol (composé **29**) ou $\phi = 45 \%$ dans le chloroforme (**DBB**)). ^bMesurés en utilisant la phénalénone comme référence ($\phi = 95 \%$ dans le dichlorométhane).

Comme observé au cours du **Chapitre 3**, le cuivre(II) inhibe les propriétés spectroscopiques, notamment sur la production d'oxygène singulet, sûrement dû à des phénomènes de transfert d'électron photoinduit (PET). Toutefois, les études spectroscopiques réalisées sur le composé **29** sont prometteuses car ce dernier agit comme un photosensibilisateur. Ainsi, l'étude d'un métal qui n'induit pas de phénomènes de PET et qui possède un isotope émetteur de positons peut être une alternative au Cu^{2+} pour le développement de futures sondes théranostiques TEP/PDT.

VII. Conclusion

Au cours de ce chapitre, le principe de la théranostique a été décrit comme une technique permettant de combiner une modalité de thérapie et de diagnostic au sein d'une même sonde.

Pour la modalité de thérapie, la PDT a été décrite comme un traitement efficace de certaines tumeurs cancéreuses. Cependant, l'excitation des photosensibilisateurs commerciaux actuels est réalisée dans le visible et donc hors de la fenêtre thérapeutique située entre 700 et 1000 nm, ce qui limite leur application aux cancers sous cutanés. La thérapie photodynamique à deux photons semble être une technique de choix pour cibler la fenêtre thérapeutique et accéder au traitement de tumeurs profondes. Notre groupe s'est intéressé à la combinaison du $^{64}\text{Cu}^{2+}$ avec un PS capable de générer de l'oxygène singulet sous excitation à deux photons afin de développer une sonde théranostique TEP/PDT.

La synthèse des sondes à base de cuivre(II) s'est révélée difficile, d'une part par la sensibilité du photosensibilisateur vis-à-vis des différentes conditions expérimentales et purifications, et d'autre part par la difficulté à isoler les ligands et complexes de cuivre(II) associés. Pour la synthèse du ligand L_5 soit sur le cyclam, les deux voies considérées se sont révélées infructueuses. Toutefois, le ligand L_6 basé sur le cyclam renforcé, a pu être obtenu. Un possible mélange de complexes de cuivre(II) a été observé sans pouvoir réellement en déterminer la provenance.

Les études spectroscopiques ont tout de même été réalisées au sein de L'ENS Lyon et a permis de démontrer que le ligand L_6 agit comme un photosensibilisateur avec un rendement quantique de fluorescence de 3 % et de génération d'oxygène singulet égale à 14 %. Cependant, l'ajout du cuivre(II) a eu pour conséquence d'éteindre la luminescence du photosensibilisateur et a fait chuter le rendement quantique de génération d'oxygène singulet à zéro. Cependant, le composé **29** agit comme un photosensibilisateur et un cation métallique différent émetteur de positons peut être utilisé pour une application en théranostique TEP/PDT.

Pour répondre à cette problématique notre groupe a envisagé l'utilisation du gallium(III). Ce travail est en cours d'étude dans notre équipe et fera l'objet d'une ouverture dans le chapitre suivant.

Chapitre 5

Vers la synthèse de nouveaux complexes de gallium(III)

I. Introduction

Le dernier axe de travail a consisté à développer des sondes luminescentes à base de gallium(III). En effet, nous avons vu au cours du **Chapitre 3** et **4** que le Cu^{2+} avait un effet d'extinction de la luminescence sur les différents bras π -conjugués greffés sur le cyclam et le CB-Cyclam. Ces résultats nous ont poussés à étudier une alternative dans un premier temps pour le développement de sondes bimodales TEP/Imagerie optique efficaces.

Bien que les sondes bimodales TEP/Imagerie optique à base de radioisotopes émetteurs de positon comptent de nombreux exemples, la littérature mentionne peu d'applications en imagerie bimodale avec le ^{68}Ga . Le premier volet de ce chapitre décrira les propriétés intrinsèques au gallium(III) ainsi que son utilisation en imagerie TEP et bimodale TEP/Imagerie optique. Le second volet portera sur la synthèse de complexes de gallium(III) dérivés de **H₁TE1PA** et **H₁CB-TE1PA**, ligands utilisés comme modèles pour le développement de sondes bimodales à base de Ga^{3+} .

1. Propriétés du gallium

Le gallium appartient au bloc *p* de la classification périodique avec une configuration électronique $[\text{Ar}]3d^{10}4s^24p^1$. L'état d'oxydation du gallium le plus répandu en solution aqueuse est le degré +III. Ce cation de petite taille (0,47 - 0,62 Å) est un acide de Lewis selon la théorie HSAB.⁵¹ Le Ga^{3+} possède donc une forte affinité avec les sites anioniques donneurs tels que les atomes d'oxygène ou d'azote. Généralement, les ligands développés pour complexer le gallium(III) sont hexadentates et lient le cation selon une géométrie octaédrique distordue.¹⁷⁸

Cependant, ces complexes ont une forte tendance à se démétaller en milieux neutres et basiques pour donner des hydroxydes de gallium(III).⁴⁴ Le diagramme de spéciation représenté sur la **Figure 155** ci-après permet une visualisation plus directe des formes majoritaires en solution en fonction du pH. Dès lors, la conception de ligands et le pH auquel ils sont utilisés doivent être pris en compte.

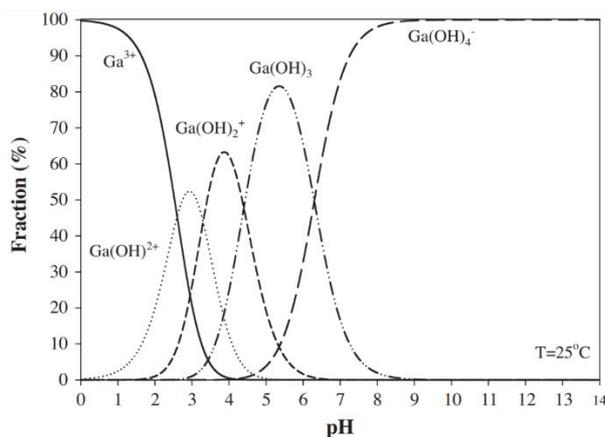


Figure 155 - Diagramme de spéciation des espèces du Ga³⁺ en fonction du pH à 25°C.¹⁷⁹

2. Complexes de gallium à base de polyazacycloalcanes

Les dérivés du tacn, notamment le **H₃NOTA**, se sont révélés former des complexes de Ga³⁺ stables. Le Ga³⁺ se lie au **H₃NOTA** selon une géométrie octaédrique distordue qui est bien adaptée à la taille du métal ainsi qu'à ses préférences en terme de nombre de coordination (CN = 6). La constante thermodynamique de stabilité log K_{ML} du [Ga(**NOTA**)] est égale à 30,98 avec une constante pGa égale à 26,4.⁵ De plus, le [Ga(**NOTA**)] montre une demi-vie élevée en milieu acide (HNO₃ 1M, 6 mois) à température ambiante. Cette stabilité résulte de l'encapsulation efficace du Ga³⁺ et de la protection offerte par les bras acétate permettant de prévenir une possible démétallation *in vitro* ou *in vivo*.⁶ En conséquence, le **H₃NOTA** est décrit comme un standard pour le radiomarquage au ⁶⁸Ga³⁺ qui se réalise dans des conditions douces (température ambiante, 30-60 min, pH 4).⁷ Depuis, plusieurs analogues du **H₃NOTA** ont été décrits avec différents bras pour faciliter le couplage à des vecteurs biologiques ou pour modifier la charge globale du complexe. Notamment, le **H₆NOTP** et **H₆TRAP**, deux ligands dans lesquels des groupements acide phosphonique ou phosphinique respectivement remplacent les bras acétate du **H₃NOTA** (Figure 156).⁸

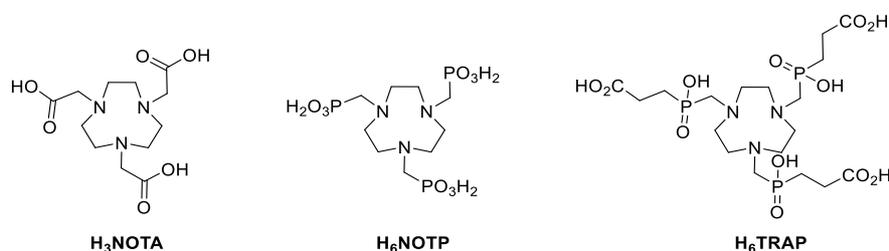


Figure 156 - Exemples de ligands à base de tacn pour la complexation du Ga³⁺.

Comme nous l'avons décrit au cours du **Chapitre 1**, le **H₄DOTA** forme des complexes stables avec une large gamme de métaux dans une variété d'états d'oxydation différents. Les structures cristallines

montrent que le **H₄DOTA** complexe le Ga³⁺ selon une géométrie octaédrique distordue, *via* les quatre atomes d'azote du macrocycle et les deux bras acétate en position *trans*. Il est à noter que le complexe [Ga(**DOTA**)]⁻ a une constante de stabilité pGa nettement inférieure au complexe [Ga(**NOTA**)] (15,2 contre 26,4).⁵ Le [Ga(**DOTA**)]⁻ se distingue également par une demi-vie courte de 12 jours en milieu acide à température ambiante (HNO₃ 1M, 25°C).¹⁸¹ Malgré cette limite, les dérivés du **H₄DOTA** restent les ligands les plus utilisés pour les études cliniques avec le ⁶⁸Ga³⁺ en raison de la large disponibilité de ce chélatant.³

En revanche, peu de données sur les complexes de gallium dérivés du cyclam sont décrites dans la littérature. Clarke et *al.* ont étudié la stabilité d'un complexe de gallium dérivé du **H₄TETA**, le [Ga(**TETA**)]⁻. Ce complexe possède une constante de stabilité thermodynamique plus faible (Log K_{ML} = 19,7 ; pM = 14,1) par comparaison aux complexes présentés ci-dessus.²⁰⁴

II. Intérêt du gallium en imagerie médicale

1. Application du ⁶⁸Ga en imagerie TEP

Le gallium compte 31 isotopes, parmi eux le gallium-68 (⁶⁸Ga) qui est un radioisotope émetteur de positons. Le ⁶⁸Ga³⁺ se désintègre en ⁶⁸Zn²⁺ par émission de positons (89%) et par capture électronique (11%).³ L'énergie de ses positons (1806 KeV) est significativement plus élevée que celle émise par le ¹⁸F et le ⁶⁴Cu (*cf.* **Chapitre 3**), une caractéristique qui conduit à des images TEP avec une résolution plus faible. Bien que cet effet soit significatif en imagerie TEP chez le petit animal, il s'avère négligeable pour une utilisation en hôpital. Le gallium-68 a longtemps été mis en retrait au profit du ¹⁸F ou du ⁶⁴Cu²⁺ compte tenu de sa courte demi-vie (68 min). Toutefois, l'imagerie TEP à base de ⁶⁸Ga a connu un gain d'intérêt grâce à la commercialisation de générateurs germanium-68/gallium-68 (⁶⁸Ge/⁶⁸Ga) dans les années 1990. Cela a permis le développement rapide de radiopharmaceutiques à base de ⁶⁸Ga³⁺ pour les laboratoires de recherche et les hôpitaux n'ayant pas d'accès direct à un cyclotron.⁴⁴ Depuis les années 2000, les travaux autour du ⁶⁸Ga ont notamment montré un intérêt particulier pour le marquage des analogues de la somatostatine, aboutissant à l'élaboration de radiopharmaceutiques permettant la détection et le suivi des tumeurs neuroendocrines.¹⁰ Parmi eux, le [⁶⁸Ga-**DOTA-TATE**] commercialisé sous le nom de NetSpot™ et le [⁶⁸Ga-**DOTA-TOC**] ont été récemment approuvés par la FDA pour imager les tumeurs endocrines, prouvant ainsi l'intérêt du ⁶⁸Ga en imagerie TEP (**Figure 157**).^{11,12}

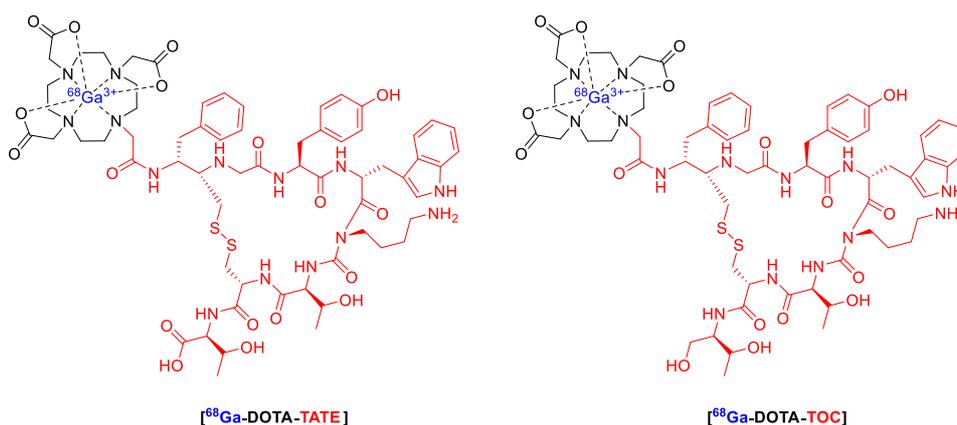


Figure 157 - Structure des radiopharmaceutiques [⁶⁸Ga-DOTA-TATE] et [⁶⁸Ga-DOTA-TOC].

2. Intérêt du ⁶⁸Ga en imagerie bimodale TEP/Imagerie optique

Bien que l'utilisation du ⁶⁸Ga³⁺ en imagerie TEP s'est largement démocratisée, la littérature mentionne peu d'application en imagerie TEP/Imagerie optique. Pourtant, par comparaison au Cu²⁺, le Ga³⁺ possède l'avantage de ne pas être sujet à des phénomènes de PET dû à une configuration plus stable (*d*¹⁰).

A titre d'exemple, Denat et *al.* ont décrit en 2010 une famille de sondes bimodales à base de Cu²⁺ et de Ga³⁺ (**Figure 158**).¹³ La stratégie de synthèse de cette sonde multimodale a consisté à utiliser la *p*-nitrophénylalanine (NPA) sur laquelle ont été introduits successivement le **H₄DOTA**, le BODIPY, et un groupe fonctionnel isothiocyanate pour une future bioconjugaison (**H₄DOTA-NPA-BODIPY**). Des complexes modèles d'In³⁺, de Ga³⁺ et de Cu²⁺ correspondants ont également été synthétisés, afin d'étudier l'influence du métal sur la fluorescence du BODIPY. Des études photophysiques ont révélé que l'In³⁺ et le Ga³⁺ n'avaient quasiment aucune influence sur la fluorescence du BODIPY avec un rendement quantique de fluorescence égale à 48% et 50% respectivement. Toutefois, il a été démontré que le Cu²⁺ éteignait partiellement la fluorescence, par un mécanisme de PET intramoléculaire, entre le BODIPY et le métal, à l'état excité. Le rendement quantique observé pour le complexe de Cu²⁺ était de 21%.¹³ L'utilisation de la même approche synthétique a permis au groupe de synthétiser une famille de sondes bimodales à base de BODIPY avec différents macrocycles.^{14,15}

160, a)). Les études ont montré que la plupart de l'activité radioactive est principalement élevée au niveau du foie et de la tumeur. Des images obtenues par microscopie par fluorescence enregistrées durant une ressection guidée par fluorescence 3,5 h après injection de la sonde bimodale ont démontré la forte accumulation de la sonde dans la tumeur (**Figure 160, b**)). Même si cela n'a pas été mis en avant la plupart du $^{68}\text{Ga}^{3+}$ est désintégré en $^{68}\text{Zn}^{2+}$ et au vu des images, le $^{68}\text{Zn}^{2+}$ ne nuit pas aux propriétés lumineuses du fluorophore.

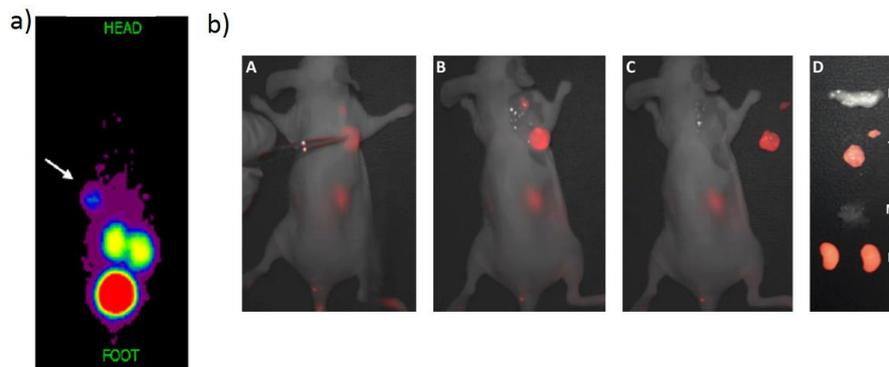


Figure 160 - a) Images TEP d'une souris xénotreffée par une tumeur AsPC-1 40 min post-injection de la sonde [$^{68}\text{Ga}(\text{NODAGA-Ag-Cys5})$]. La tumeur est indiquée avec une flèche blanche. b) Image de dissection d'une souris 3,5h après injection et des organes isolés ($\lambda_{\text{exc}} = 640 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 665 \text{ nm}$). P : pancréas, T : tumeurs, M : muscle, K : reins.¹¹

Ainsi, même après la désintégration en ^{68}Zn , les sondes à base de ^{68}Ga peuvent être utilisées en tant que sondes fluorescentes pour l'ablation d'une tumeur après sa localisation par des expériences d'imagerie TEP et par imagerie optique.

III. Elaboration d'une sonde bimodale TEP/Imagerie optique à base de Ga^{3+}

1. . Objectif

Dans le but de concevoir des sondes bimodales ou théranostiques à base de gallium, notre équipe a entrepris de remplacer le Cu^{2+} par le Ga^{3+} dans les systèmes présentés au cours des **Chapitres 3 et 4** pour de futures applications en imagerie bimodale et théranostique (**Figure 161**). Etant donné que le gallium(III) est très peu étudié avec les dérivés du cyclam, nous avons tout d'abord entrepris d'étudier des modèles plus simples basés sur les ligands **H₁TE1PA** et **H₁CB-TE1PA** décrit au cours du **Chapitre 1**.

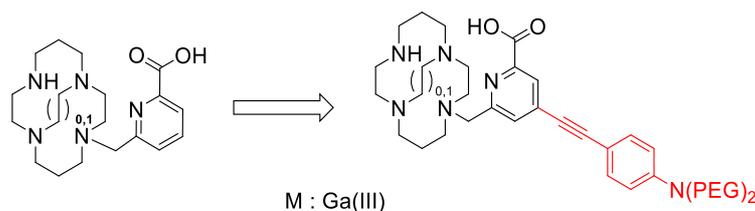


Figure 161 - Structure des ligand pour la complexation du gallium(III) ciblés au cours de ce chapitre.

2. Synthèse des complexes de gallium(III) modèles

La synthèse des complexes $[\text{Ga}(\text{TE1PA})]^{2+}$ et $[\text{Ga}(\text{CB-TE1PA})]^{2+}$ a nécessité la préparation des ligands $\text{H}_1\text{TE1PA}$ et $\text{H}_1\text{CB-TE1PA}$ qui commence par celle du picolinate **32** non fonctionnalisés. Celle-ci s'effectue en trois étapes (Figure 162) à partir de l'acide dipicolinique commercial et est adaptée d'une procédure décrite dans la littérature.¹⁸

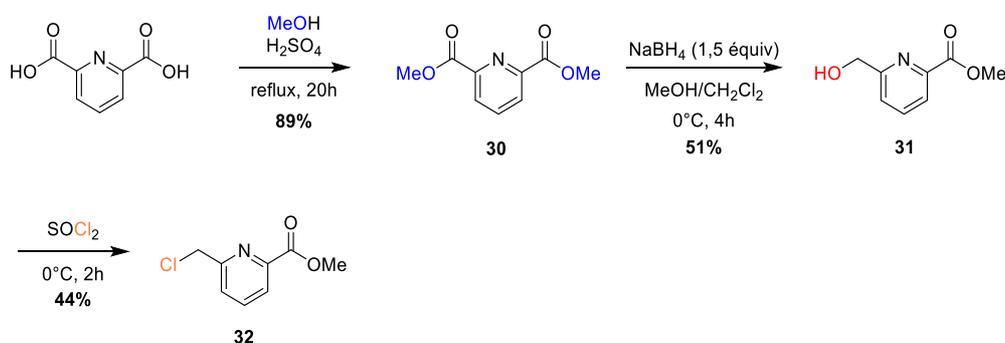


Figure 162 - Synthèse du picolinate chloré **32**.

2.1. Synthèse et caractérisation du complexe $[\text{Ga}(\text{TE1PA})]^{2+}$

La synthèse du complexe $[\text{Ga}(\text{TE1PA})]^{2+}$ comprend trois étapes (Figure 163). Le composé **32** est mis à réagir avec le cyclam tri-protégé **16**, décrit au cours du Chapitre 2, permettant d'obtenir le composé **33** après purification sur colonne chromatographique. L'hydrolyse acide du composé **33** permet la déprotection du phosphoryle et de l'ester méthylique pour obtenir le ligand $\text{H}_1\text{TE1PA}$ sous la forme chlorhydrate.¹⁵⁴ Nous avons vu précédemment que le Ga^{3+} forme facilement des hydroxydes de Ga^{3+} à partir de pH 3-4. Ainsi la complexation du gallium(III) par le ligand $\text{H}_1\text{TE1PA}$ est réalisée à pH 4 à 90°C en présence de nitrate de gallium(III) nonahydraté et permet d'obtenir le complexe $[\text{Ga}(\text{TE1PA})]^{2+}$ quantitativement.

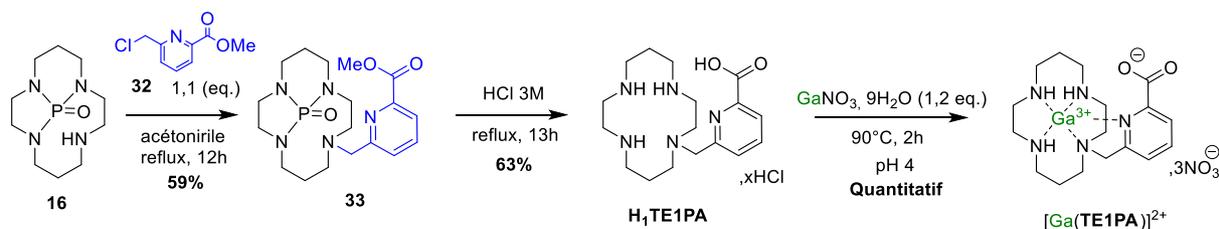


Figure 163 - Synthèse du complexe $[Ga(TE1PA)]^{2+}$.

Le spectre RMN 1H du $[Ga(TE1PA)]^{2+}$, enregistré dans le D_2O , est représenté sur la **Figure 164**. Les trois signaux à 8,67 ppm, 8,47 ppm et 8,16 ppm (position 1, 2 et 3) sont caractéristiques des protons du picolinate. Les deux protons diastéréotopiques du $-CH_2$ du picolinate résonnent sous la forme de deux doublets situés à 5,12 et 4,69 ppm (Système AB, $^2J = 19.4$ Hz) qui prouve que la complexation a été réalisée. Les protons portés par la structure macrocyclique sont également tous diastéréotopiques, et donnent des signaux complexes et mal résolus entre 2,0 et 3,8 ppm. Il est à noter la présence de deux pseudo-singulets larges à 5,62 ppm et les expériences de RMN 2D n'ont pu aboutir à la détermination de ces signaux.

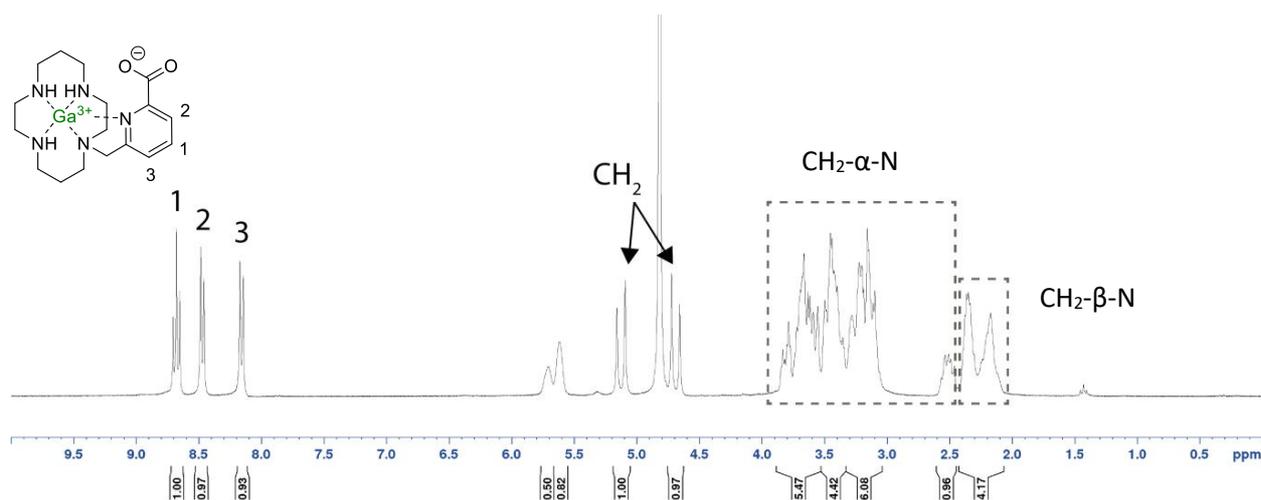


Figure 164 - Spectre RMN 1H de $[Ga(TE1PA)]^{2+}$ (500 MHz, 298 K, D_2O).

L'étude par RMN ^{13}C en J-modulation (**Figure 165**) confirme l'obtention du complexe de gallium(III). Le signal à 168,8 ppm (position 1) correspond au groupement $-CO$. Les signaux caractéristiques du picolinate sont également distinguables entre 127,2 et 153,1 ppm (position 2 à 6). Le signal à 58,4 ppm correspond au $-CH_2$ lié au cyclam (position 7). Les signaux correspondant aux $-CH_2$ en α des atomes d'azote du macrocycle apparaissent entre 38,4 et 62,0 ppm tandis que les $-CH_2$ en β résonnent à 19,2 ppm et 23,6 ppm.

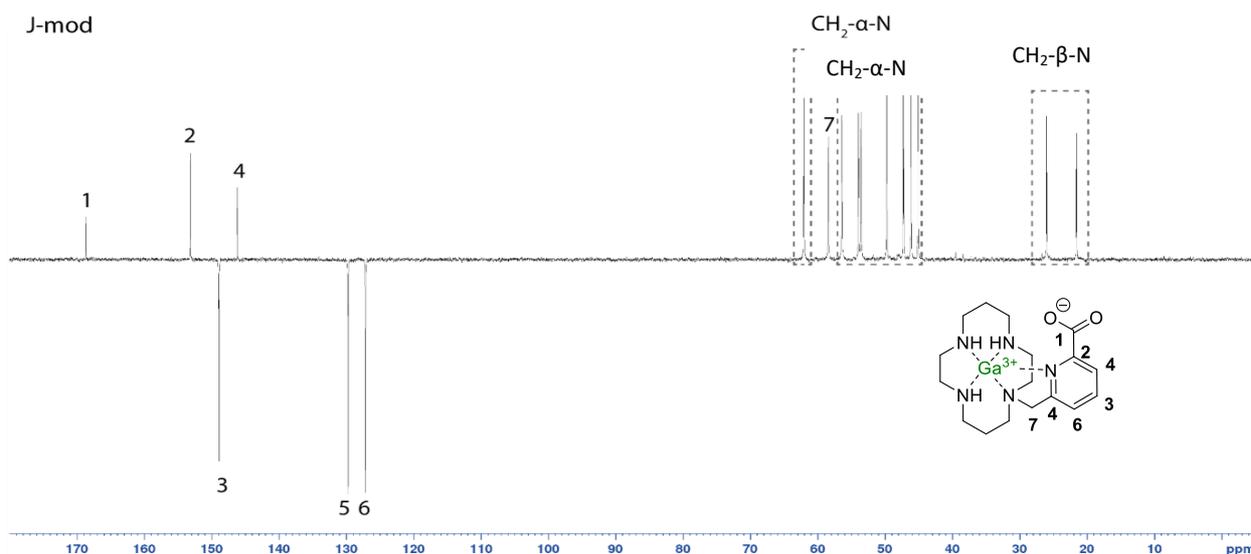


Figure 165 - Spectre RMN ¹³C de [Ga(TE1PA)]²⁺ (125 MHz, 298 K, D₂O).

La caractérisation par masse haute résolution (HRMS ESI) permet de confirmer l'obtention du complexe et donne le pic à [M+H]²⁺ à $m/z = 402,1413$ qui correspond bien au composé attendu (m/z calculé = 402,1415).

2.2. Synthèse et caractérisation du complexe [Ga(CB-TE1PA)]²⁺

La mono-*N*-alkylation du CB-Cyclam avec un groupement picolinate a été décrite par notre équipe.¹⁴ Le composé **32** est mis à réagir avec le CB-Cyclam **14** permettant d'obtenir le composé **34** après purification sur colonne chromatographique. L'hydrolyse acide du composé **34** permet d'obtenir le ligand **H₁CB-TE1PA** sous forme chlorhydrate.¹⁴ Nous avons vu au cours du **Chapitre 2** que la cinétique de complexation de **[H₂CB-TE2PA]⁺** est très lente (cf. **Chapitre 1** et **2**). La complexation de métaux nécessite des conditions drastiques (température élevée, solvants organiques à haut point d'ébullition et base organique). Les tests de complexation de **H₁CB-TE1PA** en présence de nitrate de gallium nonahydraté à pH 3 ou dans le *n*-butanol en présence de triéthylamine n'ont pas permis d'obtenir le complexe de gallium(III) attendu après 15h de réaction à 100°C (**Figure 166**).

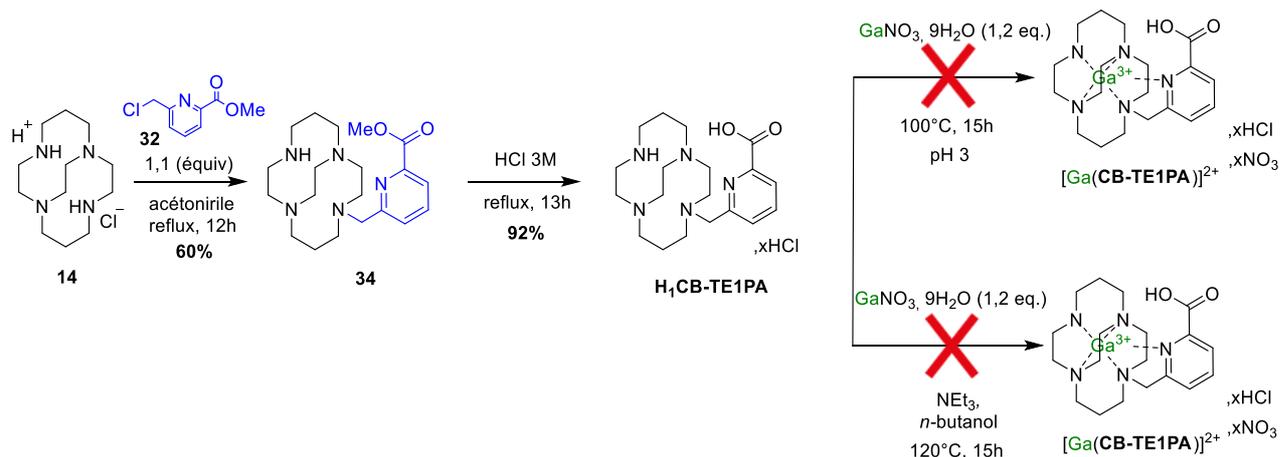


Figure 166 - Voies de synthèse du complexe $[Ga(CB-TE1PA)]^{2+}$.

Toutefois, un complexe de Ga^{3+} basé sur le ligand H_1TE1PA a pu être obtenu. Ce résultat nous a permis de transposer les conditions de métallation au ligand L_2 , ligand décrit au cours du **Chapitre 3**.

3. Synthèse des complexes $[GaL_2]^{2+}$

La synthèse du complexe $[GaL_2]^{2+}$ a été réalisée dans des conditions similaires à celles utilisées ci-dessus pour obtenir $[Ga(TE1PA)]^{2+}$. La complexation a été réalisée dans l'eau en présence de nitrate de gallium(III) nonahydraté à pH 4 à 90°C (**Figure 167**). Pour rappel, le fluorophore décrit au cours du **Chapitre 2** et **3** ne se dégrade pas en conditions acides douces (HCl 1M, 25°C).

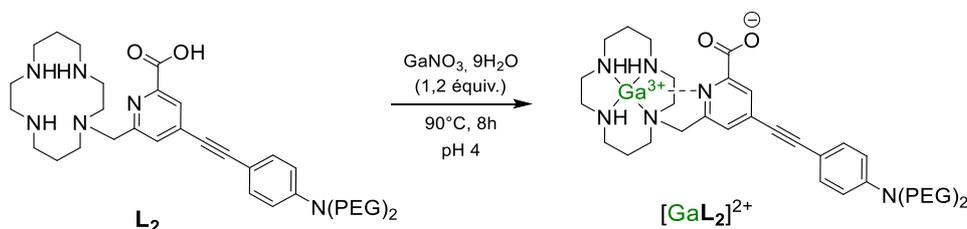


Figure 167 - Synthèse du complexe $[GaL_2]^{2+}$.

La caractérisation par spectrométrie de masse haute résolution permet de confirmer l'absence de ligand libre et montre la formation du complexe de gallium monohydraté. En effet, l'analyse donne le pic $[M+H]^{2+}$ à $m/z = 414,1951$ qui correspond au composé attendu avec une molécule d'eau (m/z calculé = 414,1951). On peut également noter la présence de sous-produits avec un rapport m/z égale de 430,2434 et 452,2257 issue de la dégradation du fluorophore compte tenu de la complexation en milieu acide et à chaud (pH 4, 90°C). La purification du complexe a été entreprise par HPLC afin d'éliminer les impuretés non désirées. Cependant, la séparation s'est avérée difficile. Afin d'éviter la formation d'impuretés issues probablement de la dégradation du fluorophore, une modification des

conditions de métallation du ligand L_2 , telles que la température et le pH sont des voies qui sont en cours d'études.

4. Synthèse et études photophysiques du complexe $[ZnL_2]^+$

Nous avons vu précédemment que le $^{68}Ga^{3+}$ se désintègre en $^{68}Zn^{2+}$ par émission de positon β^+ . Ainsi, nous avons entrepris d'étudier les propriétés photophysiques du complexe $[ZnL_2]^+$ résultant de la désintégration rapide du ^{68}Ga . La réaction de complexation du Zn^{2+} par le ligand L_2 est effectuée dans l'eau à température ambiante avec un pH ajusté à 7 en utilisant 1,2 équivalents de chlorure de zinc(II). Le complexe a été obtenu avec un rendement de 84% (**Figure 168**).

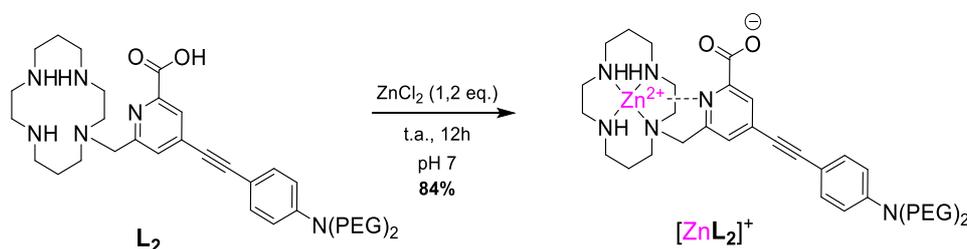


Figure 168 – Structure du complexe $[ZnL_2]^+$.

Les études photophysiques menées sur le complexe $[ZnL_2]^+$ par spectroscopie UV-Visible ont pour objectif de déterminer son rendement quantique (**Figure 169**). Ces études ont fait l'objet d'une mobilité d'une semaine au sein de l'équipe d'Olivier Maury à l'ENS Lyon, et nous a permis de vérifier si le complexe possède des propriétés exploitables pour une application en imagerie optique. Les études ont été réalisées dans du dichlorométhane à température ambiante.

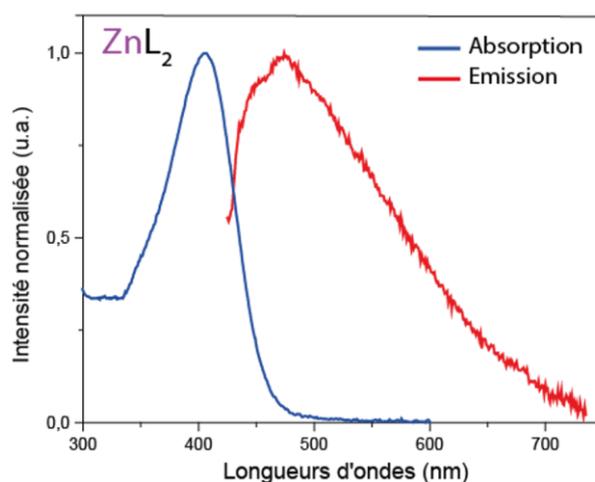


Figure 169 - Spectre d'absorption et d'émission du complexe $[ZnL_2]^+$ à température ambiante dans le dichlorométhane ($\lambda_{exc} = 385$ nm).

Le complexe $[ZnL_2]^+$ est caractérisé par une bande d'absorption centrée à 405 nm due au transfert de charge du donneur vers l'accepteur. Après excitation à 385 nm, le complexe possède une bande

d'émission large située à 474 nm. Comparé au complexe $[\text{CuL}_2]^+$ qui a été décrits au cours du **Chapitre 3**, une nette amélioration du rendement quantique a été observée ($\phi = 3,6 \%$) (**Tableau 23**). La complexation du Zn^{2+} par le ligand L_2 permet également d'observer une amélioration du rendement quantique.

Composés	L_2	$[\text{CuL}_2]^+$	$[\text{ZnL}_2]^+$
$\phi^a(\%)$	1,8	<1	3,6

Tableau 23 - Rendements quantiques de fluorescence des ligands L_2 et des complexes $[\text{CuL}_2]^+$ et $[\text{ZnL}_2]^+$ dans le dichlorométhane. ^aMesurés en utilisant la Coumarine-153 comme référence ($\phi = 45 \%$ dans le méthanol).

L'objectif de ce travail était de synthétiser une sonde bimodale TEP/Imagerie optique à base de Ga^{3+} , cependant le complexe $[\text{GaL}_2]^+$ n'a pu être isolé pur. Un complexe de Zn^{2+} modèle du complexe de $^{68}\text{Zn}^{2+}$, qui sera potentiellement généré *in situ*, a toutefois été synthétisé afin d'évaluer ses propriétés photophysiques. Les études spectroscopiques réalisées sur $[\text{ZnL}_2]^+$ montrent des résultats positifs en termes de propriétés spectroscopiques et laisse présager des résultats similaires lorsque la sonde bimodale à base de gallium(III) sera isolée.

IV. Conclusion

Au cours de ce chapitre nous avons introduit les propriétés du $^{68}\text{Ga}^{3+}$ en tant que radiométal de choix pour l'imagerie TEP. Ce cation métallique a pour avantage par comparaison au Cu^{2+} , d'éviter l'extinction de la luminescence de fluorophores. Ainsi, nous avons entrepris la synthèse du complexe de gallium dérivé du **H₁TE1PA** et du **H₁CBTE1PA** en tant que modèle afin de savoir si ces ligands sont adaptés à l'ion Ga^{3+} . La synthèse de $[\text{Ga}(\text{TE1PA})]^{2+}$ a été réalisée avec un excellent rendement et il a pu être caractérisé par RMN et par spectrométrie de masse haute résolution. Cependant, le complexe $[\text{Ga}(\text{CB-TE1PA})]^{2+}$ n'a pu être obtenu. L'hypothèse avancée est que le caractère contraint de la cage du ligand empêche le Ga^{3+} d'être piégé au sein de la cavité du macrocycle.

Fort de ces résultats, nous avons entrepris la synthèse d'une sonde bimodale de gallium(III) basée sur le ligand **L₂** décrit au cours du **Chapitre 3**. La caractérisation par RMN du proton et par masse haute résolution nous a permis d'observer la présence du complexe de gallium(III) attendu mais également de noter la présence d'impuretés sûrement issues de la dégradation du fluorophore, sous-produits qui n'ont pas pu être éliminés par HPLC. Cependant, ces travaux nous ont permis de prouver que ce ligand est adapté pour le développement d'une future sonde bimodale à base de Ga^{3+} .

Dès lors, nous avons étudié les propriétés spectroscopiques du complexe $[\text{ZnL}_2]^+$. En effet, la désintégration de la sonde à base de $^{68}\text{Ga}^{3+}$ en $^{68}\text{Zn}^{2+}$ donnera une sonde qui reste luminescente permettant de réaliser des expériences d'imagerie optique. Les études menées à l'ENS Lyon ont montré une nette amélioration du rendement quantique ($\phi = 3,6\%$) par comparaison au ligand **L₂** mais également au complexe $[\text{CuL}_2]^+$ décrits au cours du **Chapitre 3** ($< 1\%$).

Les travaux futurs concernant la synthèse d'une sonde bimodale à base de Ga^{3+} passeront par une étude approfondie des conditions expérimentales de complexation qui doivent entrer en adéquation avec la nature sensible du fluorophore. De plus, des études spectroscopiques supplémentaires doivent être réalisées sur le complexe $[\text{GaL}_2]^{2+}$ une fois isolé et sur le complexe de Zn^{2+} pour évaluer leur brillance. Dès lors, ces travaux serviront de fondement pour le développement de sondes théranostiques TEP/PDT à base de Ga^{3+} .

Conclusion Générale

Cette thèse, financée par l'Agence Nationale de la Recherche, s'est inscrite dans un contexte pluridisciplinaire. Les résultats obtenus durant ce travail sont le fruit de la collaboration de plusieurs équipes de recherche ayant des domaines d'expertise complémentaires : l'équipe brestoise (UMR-CNRS 6521) experte dans la synthèse et l'étude des polyazacycloalcanes, l'équipe lyonnaise (UMR 5182) spécialisée dans la synthèse et l'étude de matériaux destinés à la photonique et le laboratoire nantais du CRCINA de renommée internationale en médecine nucléaire.

Durant ces travaux de thèse, nous avons vu que l'utilisation de métaux pour l'imagerie médicale requiert de remplir un cahier des charges bien précis pour éviter le relargage de métaux en milieu biologique. Dès lors, nous avons présenté les polyazacycloalcanes, et notamment les dérivés du cyclam *N*-fonctionnalisés par des groupements picolinate, comme particulièrement adaptés pour la complexation des métaux de transition mais également des lanthanides. Ainsi la conception de nouvelles sondes pour l'imagerie médicale et la thérapie s'appuie sur les travaux antérieurs des dérivés cyclam picolinate décrits au laboratoire.

Une première partie de ce manuscrit a porté sur l'étude d'un complexe de lanthanide cationique et luminescent $[YbL_1]^+$ basé sur un macrocycle di-*N*-fonctionnalisé par une antenne biphotonique (**Figure 170**). Ce travail a mis à profit les propriétés d'absorption à deux photons d'une antenne, la luminescence de Yb^{3+} dans la région NIR et le CB-cyclam qui, par sa structure contrainte, permet de minimiser les relaxations non radiatives. Les études des propriétés photophysiques, menées au sein de l'équipe du Dr. Olivier Maury, ont montré un rendement quantique élevé pour un complexe émettant dans la région NIR ($\phi = 1,2\%$). Les expériences d'imagerie cellulaire dans la région visible et dans la région NIR, permettant également de réaliser l'imagerie dans la configuration NIR-vers-NIR, ont confirmé les potentialités de ce complexe pour des applications en microscopie optique.

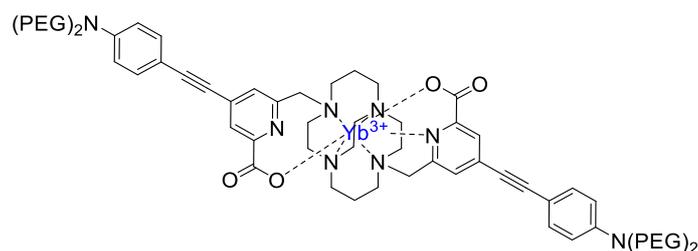


Figure 170 - Structure de la sonde $[YbL_1]^+$.

La seconde partie de ce manuscrit était consacrée à la synthèse et l'étude de sondes bimodales TEP/Imagerie optique basées sur des complexes de Cu^{2+} de cyclams *N*-fonctionnalisés par l'antenne utilisée précédemment (**Figure 171**). Les rendements quantiques des complexes $[CuL_2]^+$ et $[CuL_3]^+$ ont mis en avant les phénomènes d'extinction de la luminescence dues au Cu^{2+} . Des études de radiomarquage et d'internalisation en milieu cellulaire ont été réalisées afin de valider la preuve de

concept de la sonde bimodale. Les études sur cellules montrent que la sonde $[^{64}\text{CuL}_2]^+$ n'a pu être internalisée malgré la présence de chaînes PEG et du caractère cationique du complexe. Dès lors, le développement d'un ligand C-fonctionnalisé a été entrepris pour améliorer l'internalisation de la future sonde mais ce travail n'est pas arrivé à son terme en raison de difficultés synthétiques.

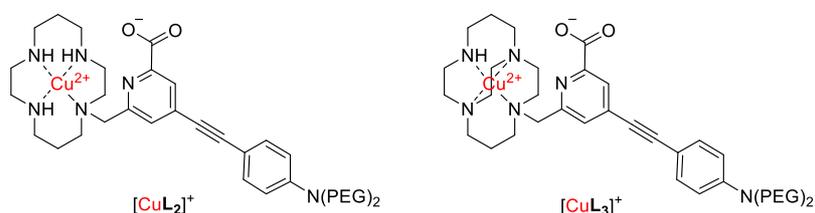


Figure 171 - Structure des complexes $[\text{CuL}_2]^+$ et $[\text{CuL}_3]^+$.

Dans la suite du travail, nous avons choisi de combiner, au sein d'une même sonde, une modalité d'imagerie, la TEP, et une modalité de thérapie de type thérapie photodynamique. Nous avons alors fonctionnalisé le cyclam et le CB-Cyclam par un photosensibilisateur comportant une unité dibromobenzène permettant de générer de l'oxygène singulet cytotoxique.

La synthèse du ligand L_5 s'est montrée compliquée car les déprotections classiques se sont avérées inadaptées au caractère sensible du photosensibilisateur. Les tentatives d'alkylation directe sur le cyclam n'ont pas non plus permis d'obtenir des résultats concrets. La synthèse du ligand L_6 basée sur le CB-cyclam monopicolinate a été réalisée et a conduit au complexe de Cu^{2+} analogue (**Figure 172**). Les études photophysiques ont permis d'observer que, si le ligand possède un rendement quantique d'oxygène singulet appréciable ($\phi_\Delta = 14\%$), après complexation au cuivre(II) celui-ci inhibe les propriétés photophysiques du photosensibilisateur.

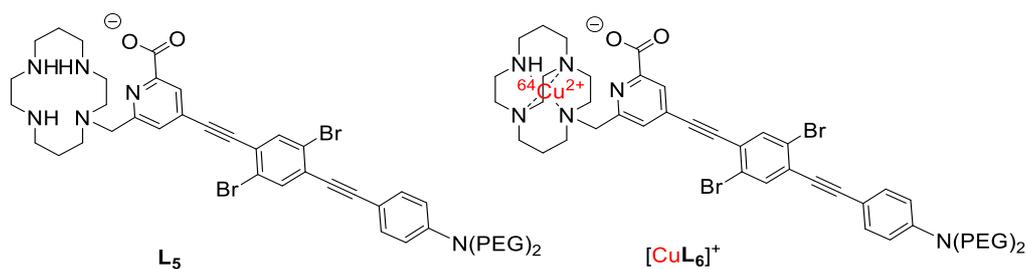


Figure 172 – Structure du ligand L_5 et du complexe $[\text{CuL}_6]^+$.

Suite aux résultats obtenus sur les différents complexes de Cu^{2+} décrits dans ce manuscrit, nous nous sommes orientés vers le Ga^{3+} pour la synthèse des sondes bimodales TEP/Imagerie et théranostiques TEP/PDT. Le cation Ga^{3+} , contrairement au Cu^{2+} , ne donne pas lieu au phénomène de transfert d'électron photoinduit, et son isotope radioactif le $^{68}\text{Ga}^{3+}$ se désintègre rapidement en $^{68}\text{Zn}^{2+}$ dont les complexes offrent souvent des perspectives lumineuses intéressantes.

Dans un premier temps, l'objectif était de déterminer si les ligands dérivés du cyclam monopicolinate étaient adaptés au Ga^{3+} . Parmi ceux étudiés, seul le **H₁TE1PA** s'est montré prometteur (**Figure 173**). La conception d'une sonde bimodale TEP/Fluorescence à base du ligand **L₂**, dérivé du **H₁TE1PA**, a alors été développée mais la dernière étape de purification de la sonde obtenue reste encore à mettre au point (**Figure 173**). Les études photophysiques réalisées sur le complexe de Zn^{2+} analogue ont montré que le complexe $[\text{ZnL}_2]^+$ a un rendement quantique supérieur au ligand libre **L₂** (**Figure 173**). Ce résultat prometteur ouvre la voie pour une future application en imagerie bimodale TEP/Imagerie optique.

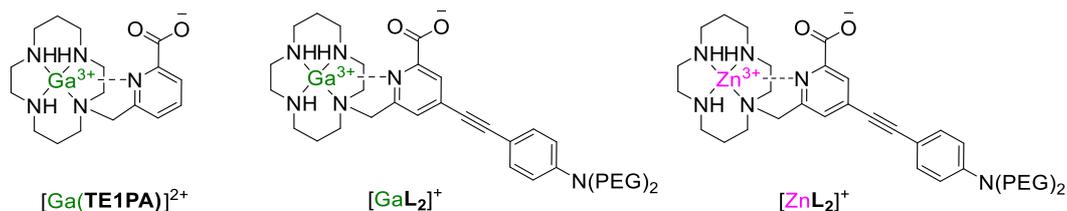


Figure 173 - Structure des complexes $[\text{Ga}(\text{TE1PA})]^{2+}$, $[\text{GaL}_2]^{2+}$ et $[\text{ZnL}_2]^+$.

Ces travaux de thèse, qui ont porté sur le développement de nouveaux chélates de métaux de transition et de lanthanides, montrent l'intérêt d'utiliser les dérivés de cyclam à base de picolinate pour des applications en imagerie médicale et/ou en thérapie. Selon la modalité recherchée – diagnostic ou thérapie – différents groupements π -conjugués ont été ajoutés sur l'unité picolinate et différents cations métalliques insérés dans ces plateformes macrocycliques permettant de cibler des applications spécifiques. Des améliorations des sondes synthétisées seront cependant nécessaires. Les travaux actuellement en cours avec les complexes du Ga^{3+} sont une première approche qui apporteront des premiers éléments de réponse. Une autre réflexion possible pourrait porter sur la nature du bras fluorophore/photosensibilisateur introduit sur le groupement picolinate afin de permettre des synthèses plus facilement accessibles. Enfin, des perspectives possibles communes à l'ensemble des travaux réalisés résident dans l'ajout d'un vecteur biologique pour améliorer l'internalisation pour une vectorisation optimale.

Experimental section

General methods

Reagents and solvents

All the reagents used for the synthesis were purchased from SIGMA-ALDRICH[®], TCI chemicals[®], ACROS ORGANICS[®] and Chematech[®]. Water was purified from a Milli-Q[®] Integral 3 system before use and organic solvents were obtained from a MBraun MB-SPS 800 purification system.

Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

NMR data were recorded at the “Services communs” of the University of Brest. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded with Bruker Avance 500 (500 MHz), Bruker Avance III HD 500 (500 MHz) or Bruker AMX-3 300 (300 MHz) spectrometers. ¹H and ¹³C NMR shifts are reported in ppm and the δ scales are relative to TMS.

Signals are indicated as follows: chemical shift, multiplicity (s, singlet; bs, broad singlet; d, doublet; dd, doublet of doublet; bd; broad doublet; t, triplet; m, multiplet), coupling constants J in Hertz (Hz).

Mass Spectrometry

High-Resolution Mass Spectrometry (HRMS) analyses were performed by Cyril Colas from the Institute of Organic and Analytic Chemistry (ICOA, Orléans) on a HRMS Q-ToF MaXis, sources ESI, APCI, APPI, nano-ESI.

MS/MS analyses were performed by Nelly Kervarec (UBO, Brest) on a MALDI-TOF AuTOFLEX III, source 355 nm UV LASER.

Microwaves synthesis

Microwave reactions were performed using an Anton Paar unit (operating with a maximum microwave output of 300 W (150 °C, maximum pressure 250 psi) in 10 mL sealed tubes over a period of 8h.

High Performance Liquid Chromatography

HPLC were performed on a Prominence Shimadzu HPLC/LCMS-2020 equipped with an UV SPD-20 A detector. The chromatographic system employs an analytic HPLC (VisionHT C18 HL 5 μ m 250 \times 4.6 mm) and a semi-preparative HPLC (VisionHT C18 HL 5 μ m 250 \times 10 mm) with H₂O (0.1% TFA) /CH₃CN as eluent at a flow rate of 5 mL/min and UV detection at 254 and 350 nm.

Electrochemical Experiments

The electrochemical studies were performed in a glovebox (Jacomex) ($O_2 < 1$ ppm, $H_2O < 1$ ppm) with a home-designed 3-electrode cell (WE: glassy carbon, RE: Ag/AgCl/NaCl (3 M), CE: graphite rod). The potential of the cell was controlled by using an AUTOLAB PGSTAT 302 (Ecochemie) potentiostat computer-monitored. The glassy carbon electrode was carefully polished before each voltammetry experiment with a 1 μ m alumina aqueous suspension and ultrasonically rinsed in water and then in acetone. Exhaustive electrolysis was performed with a graphite rod working electrode. The ultrapure (18 M Ω) deoxygenated water was used as received and kept under argon in the glovebox after degassing. Lithium perchlorate (Sigma-Aldrich, 99.99%) was used as a supporting electrolyte in 0.1 M concentration without purification. Experimental redox potential values were recalculated against $E_0(\text{NHE})$ by considering that $E_0(\text{Ag/AgCl/NaCl (3 M)}) = 0.22$ V vs. NHE.

Photophysical measurements (ENS Lyon, Lyon)

Absorption spectra were recorded on a JASCO V-650 spectrophotometer as solutions in spectrophotometric-grade methanol or water (ca. 10^{-5} or 10^{-6} mol.L $^{-1}$). Emission spectra were measured using a Horiba–Jobin–Yvon Fluorolog-3 fluorimeter. Spectra were corrected for both excitation-source light-intensity variation and emission spectral responses. Luminescence lifetimes (σ) were obtained by pulsed excitation with a FL-1040 UP xenon lamp. Luminescence quantum yields, ϕ , were measured with dilute solutions in water or organic solvents with an absorbance of less than 0.1 by using the following equation:

$$\frac{\phi_x}{\phi_r} = \frac{A_r(\lambda)}{A_x(\lambda)} \cdot \frac{n_x^2}{n_r^2} \cdot \frac{D_x}{D_r}$$

in which A is the absorbance at the excitation wavelength (λ), n is the refractive index, and D is the integrated luminescence intensity; r and x stand for reference and sample, respectively. Excitation of reference and sample compounds was performed at the same wavelength. Practically, for each sample, series of measurements were performed with different absorbance ranging from 0.1 to 0.01. Luminescence quantum yield (ϕ) of **YbL₁** was measured in diluted solution and the reference is quinine bisulfate in a 1N aqueous solution of sulfuric acid ($\phi = 54.6\%$). Luminescence quantum yields of **L₂**, **L₃**, **L₆**, [**CuL₂**] $^+$, [**CuL₃**] $^+$ and [**CuL₆**] $^+$ were measured in diluted solutions using the same protocol and was determined by using coumarin-153 as reference ($\phi = 45\%$ in methanol). Singlet oxygen quantum yields ϕ_Δ of **L₆** and [**CuL₆**] $^+$ were measured using the same protocol as fluorescence quantum yield. In the present case, the reference is phenalenone ($\phi_\Delta = 98\%$ in dichloromethane).

General methods

Confocal and two-photon microscopy (ENS Lyon, Lyon)

The two-photon experiments were performed using a LSM710 NLO (Carl Zeiss) confocal laser scanning microscope based on the inverted motorized stand (AxioObserver, Zeiss). The excitation was provided by Ti:Sa femtosecond tunable laser (Chameleon, Ultra II, Coherent) for 2P excitation at 780 or 800 nm in descanned detection mode with the open pinhole.

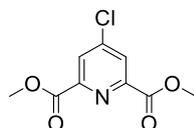
Live cell culture and treatment (Institut Fresnel, Marseille)

T24 human epithelial bladder cancer cell line (ATCC no. HBT-4) was used. T24 cells were cultured in 25 cm² tissue-culture flasks (T25) at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. They were incubated in RPMI 1640 supplemented with 100 µg.mL⁻¹ of penicillin, 100 µg.mL⁻¹ of streptomycin, and 10% of fetal calf serum (complete medium). Cells were grown to near confluence in the culture flasks and then suspended with a solution of 0.05% trypsin–ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; Sigma). Cells were placed on a LabTek I chambered cover glass (Nunc) at low cell density in complete culture medium 24 h before experiments. On the other hand, HeLa cells (Human cervical cancer cell ATCC CCL-2) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco ThermoFisher Scientific), in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37 °C. Cells were loaded at low density onto a glass coverslip in 24 wells plate (Corning) and cultured for 24 h before labelling. Cells were washed twice with PBS, fixed with 3% paraformaldehyde (Thermo Scientific Pierce) for 10 min, washed twice with PBS, and PFA is quenched with 50 mmol.L⁻¹ NH₄Cl for 10 min, washed twice with PBS, permeabilized with PBS-0.1% Triton X-100 for 10 min and washed two times with PBS. In both cases, the staining was performed by addition of a concentrated solution of complex [YbL₁]CF₃COO⁻ (10⁻⁴ mol.L⁻¹) in PBS buffer to the cell culture medium to reach a final concentration of 5-10.10⁻⁶ mol.L⁻¹. The fixed cells are mounted with mounting medium (Southern Biotech).

Radiolabelling with ⁶⁴Cu (CRCINA, Université de Nantes)

⁶⁴CuCl₂ in HCl 0.1 N was added in a ratio 1:1 molar equivalent into acetate 0.1 M pH = 5.5 buffered ligand solution. The reaction mixture was incubated at 100°C for 15 min and then cooled down to room temperature. Then 2 µL of this solution was taken out and deposited on a TLC Geyer Merck. The TLC was eluted in 20% ammonium chloride/methanol solution (1:1). The plate was then removed from the solvent and exposed for 5 min on a storage phosphor plate, and this was revealed using a radiometric phosphor imager Cyclone® Plus (PerkinElmer) and analyzed with the Optiquant® software to obtain a radiochromatogram.

Compound 1



Molecular Weight: 229.62 g.mol⁻¹

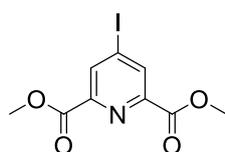
Yield: 94%

Chelidamic acid (10.0 g, 54.6 mmol) was dissolved in thionyl chloride (80 mL) and 3 mL of DMF were added dropwise to solubilize the compound. The reaction mixture was gradually brought to 70°C and let to stir overnight. After cooling down to r.t. the excess of thionyl chloride was removed under vacuo and then the residue was taken up in CH₂Cl₂ (100 mL). The mixture was cooled down to 0°C with an ice bath and MeOH (50 mL) was added dropwise over a period of 30 minutes. Then, the reaction was warmed up to r.t. and the mixture was stirred for 3 hours. After evaporation of the solvents, the residue was dissolved in CH₂Cl₂ (100 mL) and the organic layer was washed with a saturated solution of NaHCO₃ (3 × 50 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and evaporation of the solvent gave compound **1** as an off-white solid (11.8 g, 94%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 298 K): 8.29 (s, 2H), 4.02 (s, 6H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 298 K): 164.2 (C_{C=O}), 149.5 (C_{ar}), 146.9 (C_{ar}), 128.4 (CH_{ar}), 53.6 (CH₃).

Compound 2



Molecular Weight: 229.62 g.mol⁻¹

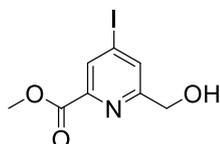
Yield: 85%

To a solution of compound **1** (9.1 g, 39.6 mmol) in acetonitrile (500 mL), NaI was added (59.4 g, 396.3 mmol) and the reaction mixture was stirred at r.t. for 4 days. After that, acetyl chloride (10.3 mL, 133 mmol) was added and the mixture was stirred for 3 hours. The reaction was quenched with a saturated solution of NaHCO₃ (300 mL), then the layers were separated. The organic layer was washed with a saturated solution of Na₂S₂O₃ (2 × 150 mL) and dried over MgSO₄. Evaporation of acetonitrile under vacuum gave the iodinated compound **2** as a yellow solid (10.8 g, 85%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 298 K): 8.68 (s, 2H), 3.99 (s, 6H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , 298 K): 163.8 ($\text{C}_{\text{C=O}}$), 149.5 (C_{ar}), 148.2 (C_{ar}), 137.0 (CH_{ar}), 106.9 (C_{ar}), 53.4 (CH_3).

Compound 3



$\text{C}_9\text{H}_8\text{INO}_4$

Molecular Weight: 293.06 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

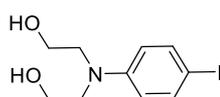
Yield: 56%

Compound **2** (10.8 g, 41.4 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (200 mL) and MeOH (50 mL) and the solution was cooled down to 0°C . NaBH_4 (3.13 g, 82.8 mmol) was added in small fractions and the reaction was monitored by TLC. After 2h, the reaction was quenched with HCl 1M (100 mL) and the solvents were removed under reduced pressure. The pH of the aqueous layer was raised to 7 with a saturated solution of NaHCO_3 and extracted with CH_2Cl_2 (3 x 100 mL). Organic layers were combined, dried over MgSO_4 and evaporated. The crude was purified by column chromatography (SiO_2 , Hexane /AcOEt 8/2 to 1/1) yielding compound **3** as a white solid (7.1 g, 56%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 298 K): 8.36 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 4.81 (s, 2H), 3.99 (s, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , 298 K): 164.1 ($\text{C}_{\text{C=O}}$), 146.8 (C_{ar}), 133.3 (CH_{ar}), 132.7 (CH_{ar}), 107.2 (C_{ar}), 64.0, (CH_2), 53.1 (CH_3).

Compound 4



$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{INO}_2$

Molecular Weight: 307.13 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Yield: 86%

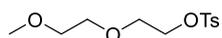
A solution of *N,N*-bis(2-hydroxyethyl)aniline (15.0 g, 82.8 mmol) in THF/pyridine (150/150 mL) was cooled down to 0°C and I_2 (42.0 g, 165.5 mmol) was added. The solution was stirred for one hour at 0°C and then was warmed up to room temperature. Another equivalent of I_2 (21.0 g, 82.8 mmol) was added and the solution was stirred at room temperature for one hour. The solvent was then evaporated and the residue was dissolved in CH_2Cl_2 (3 x 100 mL). The solution was first washed with a saturated solution of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (3 x 100 mL) and then with a solution of CuSO_4 10% to remove the excess of pyridine (5 x 100 mL). The organic layer was dried over MgSO_4 , filtered and evaporated to give a

Experimental Section of Chapter 2

colorless oil. Then crude was precipitated in AcOEt to give compound **4** as an off-white powder (22.0 g, 86%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 298 K): 7.42 (d, 2H, ³J = 6.9 Hz), 6.42 (d, 2H, ³J = 6.9 Hz), 3.75 (m, 4H), 3.47 (t, 4H, ³J = 3.6 Hz), 2.15 (s, 2H).

Compound 5



C₁₂H₁₈O₅S

Molecular Weight: 274.33 g.mol⁻¹

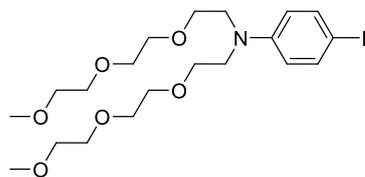
Yield: 88%

2,2-Methoxyethoxyethanol (50 mL, 416 mmol) was dissolved in THF (200 mL) and 100 mL of an aqueous solution of NaOH (30.0 g, 750 mmol) were added dropwise at 0°C. The mixture was stirred at this temperature for one hour before the slow addition of tosyl chloride (79.3 g, 416 mmol) in THF (100 mL). The mixture was stirred at room temperature overnight and the organic solvent was evaporated. The aqueous layer was extracted with Et₂O (3 × 150 mL) and the organic layers were combined, washed with brine (3 × 100 mL), dried over MgSO₄ and filtered. The solvent was then evaporated to give compound **5** as a colorless oil (45 g, 88%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 298 K): 7.79 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H), 7.26 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H), 3.65-3.68 (m, 2H), 4.17-4.14 (m, 2H), 3.54-3.57 (m, 2H), 3.44-3.48 (m, 2H), 3.34 (s, 3H), 2.47 (s, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 298 K): 144.9 (C_{ar}), 133.1 (C_{ar}), 130.3 (CH_{ar}), 127.1 (CH_{ar}), 71.9 (CH₂), 70.8 (CH₂), 69.3 (CH₂), 68.8 (CH₂), 59.1 (CH₃), 21.7 (CH₃).

Compound 6



$C_{20}H_{34}INO_6$

Molecular Weight: 511.40 g.mol⁻¹

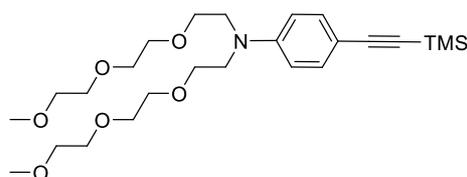
Yield: 98%

To a solution of compound **4** (8.00 g, 26.1 mmol) in THF under nitrogen atmosphere, NaH (2.50 g, 104.2 mmol) was added over a period of 30 min. Then, the mixture was refluxed and stirred for one hour before the dropwise addition of compound **5** (15.0 g, 54.7 mmol) in THF. The reaction was let to stir for 3 days until total consumption of the starting material. Iced water was then added (200mL) and the organic solvent was evaporated under reduced pressure. The aqueous solution was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 100 mL). The organic layers were combined, dried over MgSO₄, filtered and evaporated. The crude oil was purified by flash chromatography (SiO₂, Hexane/AcOEt 7/3 to 0/10) to give compound **6** as a colorless oil (13 g, 98%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 298 K): 7.38 (d, 2H, ³J= 6.9 Hz), 6.46 (d, 2H, ³J= 6.9 Hz), 3.50-3.64 (m, 24H), 3.36 (s, 6H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 298 K): 147.5 (C_{ar}), 137.8 (CH_{ar}), 114.2 (CH_{ar}), 76.6 (C_{ar}), 72.6 (CH₂), 70.8 (CH₂), 70.7 (CH₂), 68.4 (CH₂), 59.13 (CH₂), 51.0 (CH₃).

Compound 7



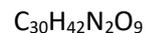
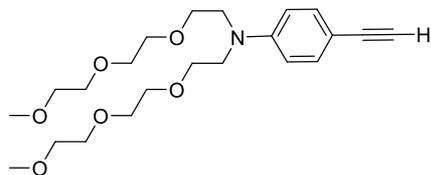
$C_{25}H_{43}NO_6Si$

Molecular Weight: 481.71 g.mol⁻¹

Yield: 96%

A solution of compound **6** (2.90 g, 5.67 mmol) and trimethylsilylacetylene (1.61 mL, 11.3 mmol) was degassed under Ar for 1 hour. Then, CuI (64.8 mg, 0.170 mmol) and Pd(PPh₃)₂Cl₂ (118 mg, 0.340 mmol) were added and the mixture was stirred under Ar overnight at 55°C. The solution was filtered and reduced under reduced pressure, then the residue was taken up in CH₂Cl₂ (50 mL). The organic layer was washed with water (3 x 50mL) and brine (3 x 50mL), dried over MgSO₄ and filtered. After evaporation of the solvent, the residue was purified by flash chromatography (SiO₂, Hexane/AcOEt 1/1 to 0/10) yielding compound **7** as a yellow oil (2.60 g, 96%).

Compound 9



Molecular Weight: 574.67 g.mol⁻¹

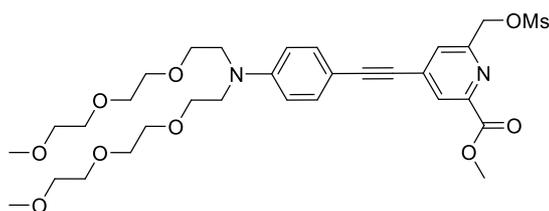
Yield: 96%

A solution of compound **7** (3.95 g, 9.65 mmol) and iodinated compound **3** (2.02 g, 6.90 mmol) was degassed under Ar for 1 hour. Then, CuI (79 mg, 414 μmol) and Pd(PPh₃)₂Cl₂ (45.0 mg, 207 μmol) were added and the mixture was stirred overnight under Ar at 55°C. The solution was filtered, the solvent was reduced under vacuum and the remaining crude residue was dissolved in CH₂Cl₂. The organic layer was washed with water (3 x 50mL) and brine (3 x 50mL), dried over MgSO₄ and filtered. After evaporation of the solvent, the residue was purified by flash chromatography, (SiO₂, AcOEt 100% to AcOEt/MeOH 98:2) yielding compound **9** as a yellow oil (3.80 g, 96%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 298 K): 8.03 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.35 (d, 2H, ³J = 6.9 Hz), 6.53 (d, 2H, ³J = 6.9 Hz), 4.82 (s, 2H), 3.98 (s, 3H), 3.50-3.63 (m, 24H), 3.36 (s, 6H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 298 K): 165.4 (C_{C=O}), 160.6 (C_{ar}), 148.76 (C_{ar}), 147.6 (C_{ar}), 147.0 (C_{ar}), 134.5 (C_{ar}), 133.6 (CH_{ar}), 125.6 (CH_{ar}), 125.0 (CH_{ar}), 111.6 (CH_{ar}), 108.0 (C_{ar}), 97.8 (C_{alk}), 85.1 (C_{alk}), 72.0 (CH₂), 70.8 (CH₂), 70.7 (CH₂), 70.7 (CH₂), 68.4 (CH₂), 64.6 (CH₂), 59.1 (CH₃), 53.0 (CH₃), 51.0 (CH₂).

Compound 10



Molecular Weight: 652.76 g.mol⁻¹

Yield: 99%

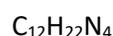
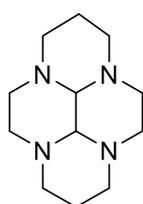
Compound **9** (623 mg, 1.08 mmol) was dissolved in THF (10 mL) and Et₃N (125 μL, 3.25 mmol). A solution of mesyl chloride (452 μL, 1.63 mmol) was added dropwise and the mixture was stirred at room temperature. When all the starting material was consumed (monitored by TLC), the solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in CH₂Cl₂ and washed with an aqueous saturated solution of NH₄Cl (3x10mL) and brine (2 x 10 mL). The desired compound was obtained without further purification (698 mg, 99%).

Experimental Section of Chapter 2

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , 298 K): 8.03 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.35 (d, 2H, $^3J = 6.9$ Hz), 6.53 (d, 2H, $^3J = 6.9$ Hz, CH), 4.82 (s, 2H), 3.98 (s, 3H), 3.50-3.63 (m, 24H), 3.36 (s, 6H), 3.17 (s, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , 298 K): 165.4 ($\text{C}_{\text{C=O}}$), 154.5 (C_{ar}), 148.8 (C_{ar}), 147.6 (C_{ar}), 134.5 (C_{ar}), 133.6 (CH_{ar}), 125.6 (CH_{ar}), 125.0 (CH_{ar}), 111.6 (CH_{ar}), 108.0 (C_{ar}), 97.8 (C_{alk}), 85.1 (C_{alk}), 72.0 (CH_2), 70.8 (CH_2), 71.0 (CH_2), 68.4 (CH_2), 64.6 (CH_2), 59.1 (CH_3), 53.0 (CH_3), 51.0 (CH_2), 38.2 (CH_3)

Compound 11



Molecular Weight: 652.76 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

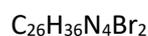
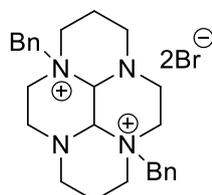
Yield: 89%

A solution of cyclam (2.0 g, 10 mmol) in methanol (100 mL) was cooled down to 0°C . Then, a solution of glyoxal 37% wt. in H_2O (1.2 mL, 25 mmol) was added dropwise. The mixture was stirred overnight at room temperature. The solvent was evaporated and the residue was taken up in diethyl ether. Polymeric adducts were filtered off and the solvent was evaporated once again to yield compound **11** as a yellow oil (2.0 g, 89%).

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 298 K): 3.11-2.43 (m, 2H), 1.9-2.6 (m, 10H), 1.4-1.8 (m, 8H), 0.57 (m, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3 , 298 K): 75.8 (CH_2), 54.8 (CH_2), 53.1 (CH_2), 51.2 (CH_2), 43.5 (CH), 18.4 (CH_2).

Compound 12



Molecular Weight: 564.41 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Yield: 62%

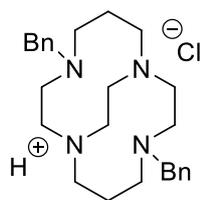
To a solution of cyclam glyoxal **11** (4.50 g, 20.2 mmol) in anhydrous acetonitrile (40 mL) was added a solution of benzyl bromide (39 mL, 334 mmol) in 70 mL of anhydrous acetonitrile. The mixture was stirred for 14 days at room temperature. The precipitate was collected by filtration and washed with acetonitrile (2×20 mL) then dichloromethane (2×50 mL) and dried to give compound **12** as a white powder (7.10 g, 62%).

Experimental Section of Chapter 2

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, D_2O , 298 K): 7.53-7.62 (m, 10H), 5.28 (d, 2H), 4.31-4.45 (m, 2H), 2.70-2.80 (m, 2H), 2.68-3.75 (m, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, D_2O , 298 K): 136 (CH_{ar}), 134.3 (CH_{ar}), 132.3 (CH_{ar}), 127.6 (C_{ar}), 79.7 (CH), 65.3 (CH_2), 54.1 (CH_2), 49.6 (CH_2), 48.9 (CH_2).

Compound 13



$\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{Cl}$

Molecular Weight: 443.08 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

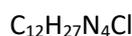
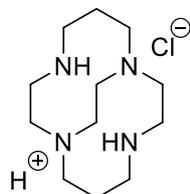
Yield: 92%

NaBH_4 (7.60 g, 200 mmol) was added in small portions over 1 h to a stirred solution of compound **12** (7.10 g, 12.5 mmol) in EtOH 95% (600 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 16 days. Excess of NaBH_4 was then quenched by the slow addition of HCl (3M, 30 mL), and the solvents were removed under reduced pressure. The resulting white solid was dissolved in water (400 mL) and was extracted with chloroform (3 × 250 mL). The combined organic layers were dried over MgSO_4 , filtered and the solvent was removed to yield **13** (5.10 g, 92%).

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, D_2O , 298 K): 7.55-7.65 (m, 10H), 5.28 (d, 2H), 4.40-4.45 (m, 2H), 3.68-3.75 (m, 2H), 2.68-2.83 (m, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, D_2O , 298 K): 130 (CH_{ar}), 129.1 (CH_{ar}), 128.8 (CH_{ar}), 128.1 (CH_{ar}), 126.6 (CH_{ar}), 127.5 (C_{ar}), 60.2 (CH_2), 58.1 (CH_2), 57.9 (CH_2), 57.3 (CH_2), 56.7 (CH_2), 54.6 (CH_2), 54.4 (CH_2), 53.5 (CH_2), 52.2 (CH_2), 50.5 (CH_2), 28.2 (CH_2), 24.3 (CH_2).

Compound 14



Molecular Weight: 262.83 g.mol⁻¹

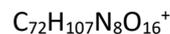
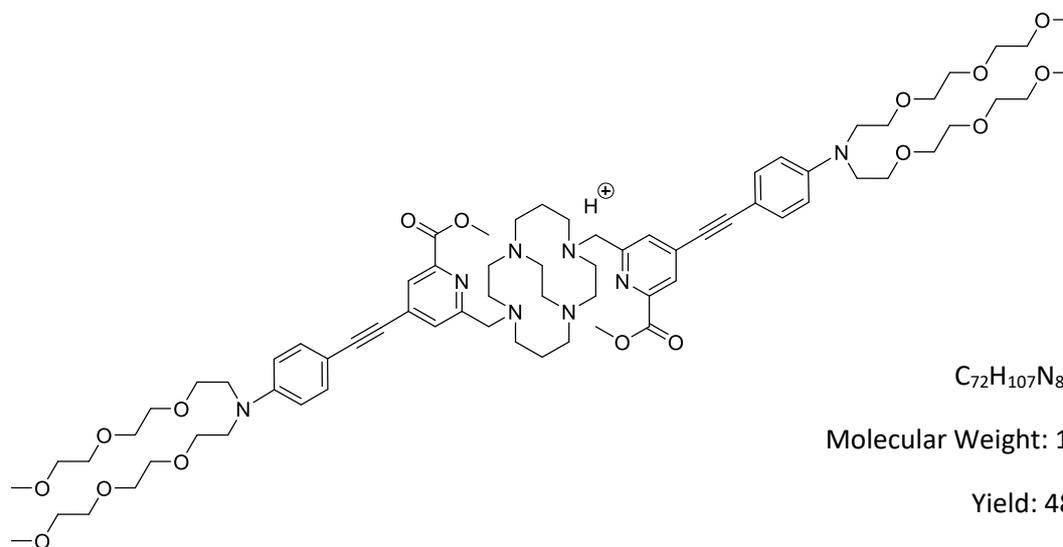
Yield: 70%

Hydrogenolysis of benzyl groups of compound **13** (5.05 g, 9.55 mmol) was carried out with 10% Pd/C (10 mg, 0.1 mmol) in a mixture of ethanol (50 mL) and glacial acetic acid (5 mL). The mixture was purged four times with hydrogen. After 72h, the reaction was stopped. The catalyst was filtered off on celite and the solvents were removed under reduced pressure. The crude product was taken up in dichloromethane and washed with NaOH 4M. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated to give compound **14** as a light yellow oil (2.1 g, 83%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 298 K): 3.56-3.64 (m, 2H), 3.29-3.32 (m, 4H), 3.01-3.17 (m, 6H), 2.98-3.1 (m, 2H), 2.8-2.9 (m, 2H), 2.4-2.6 (m, 4H), 1.98-2.1 (m, 2H), 1.3-1.5 (m, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 298 K): 57.9 (CH₂), 54.1 (CH₂), 52.3 (CH₂), 48.9 (CH₂), 45.5 (CH₂), 24.8 (CH₂).

Compound 15



Molecular Weight: 1340.68 g.mol⁻¹

Yield: 48%

A solution of compound **10** (832 mg, 1.27 mmol) in dry CH₃CN (15 mL) was added to a solution of cross-bridged cyclam **14** (130 mg, 580 μmol), K₂CO₃ (320 mg, 2.32 mmol) and NaI (191 mg, 1.27 mmol) in the same solvent (10 mL). The mixture was stirred at 60°C for 2 days under nitrogen atmosphere. The solution was cooled down to room temperature and K₂CO₃ was filtered off and rinsed with CH₃CN (3 ×

Experimental Section of Chapter 2

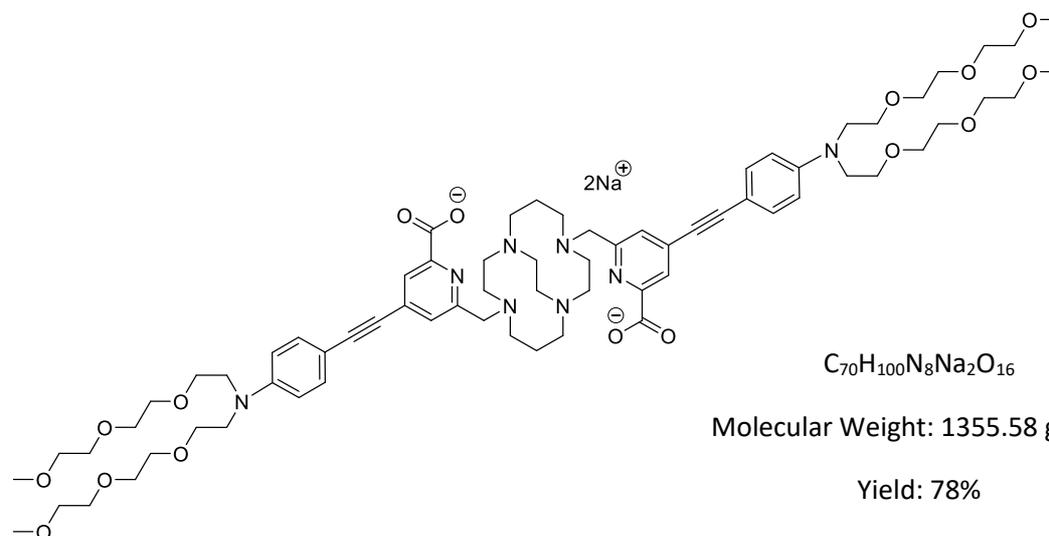
20 mL). The filtrate was evaporated, taken up in CH_2Cl_2 and washed with water (3×20 mL). The organic layer was dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography on aluminum oxide ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 100:0 to 95:5) to give compound **15** as a yellow oil (369 mg, 48 %).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , 298 K): 7.77 (s, 2 H), 7.32 (d, 4 H, $^3J = 9.2$ Hz), 7.18 (s, 2 H), 6.63 (d, 4 H, $^3J = 9.2$ Hz) 3.88-3.97 (m, 2 H), 7.82 (s, 6 H) 3.33-3.71 (m, 60 H), 3.11-3.28 (m, 15 H), 3.04-3.07 (m, 3 H), 2.91-2.94 (m, 3 H), 2.64-2.78 (m, 3 H), 2.65-2.70 (m, 5 H), 2.44-2.48 (m, 2 H) 1.93 (m, 2 H), 1.63 (m, 2 H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , 298K): 165.0 ($\text{C}_{\text{C=O}}$), 158.4 (C_{ar}), 148.7 (C_{ar}), 147.2 (C_{ar}), 133.3 (C_{ar}), 126.6 (CH), 125 (CH_{ar}), 111.4 (CH_{ar}), 107.3 (C_{ar}), 97.9 (C_{alk}), 84.5 (C_{alk}), 71.7 (CH_2), 70.5 (CH_2), 70.4 (CH_2), 70.3 (CH_2), 68.2 (CH_2), 59.2 (CH_2), 58.8 (CH_3), 58.7 (CH_2), 54.4 (CH_2), 52.7 (CH_3), 50.7 (CH_2), 44.0 (CH_3), 23.8 (CH_2).

ESI-HRMS (positive): m/z : 447.2660 [$\text{M}+3\text{H}$] $^{3+}$; calcd. 447.2660 for $\text{C}_{72}\text{H}_{106}\text{N}_8\text{O}_{16} + 3\text{H}^+$.

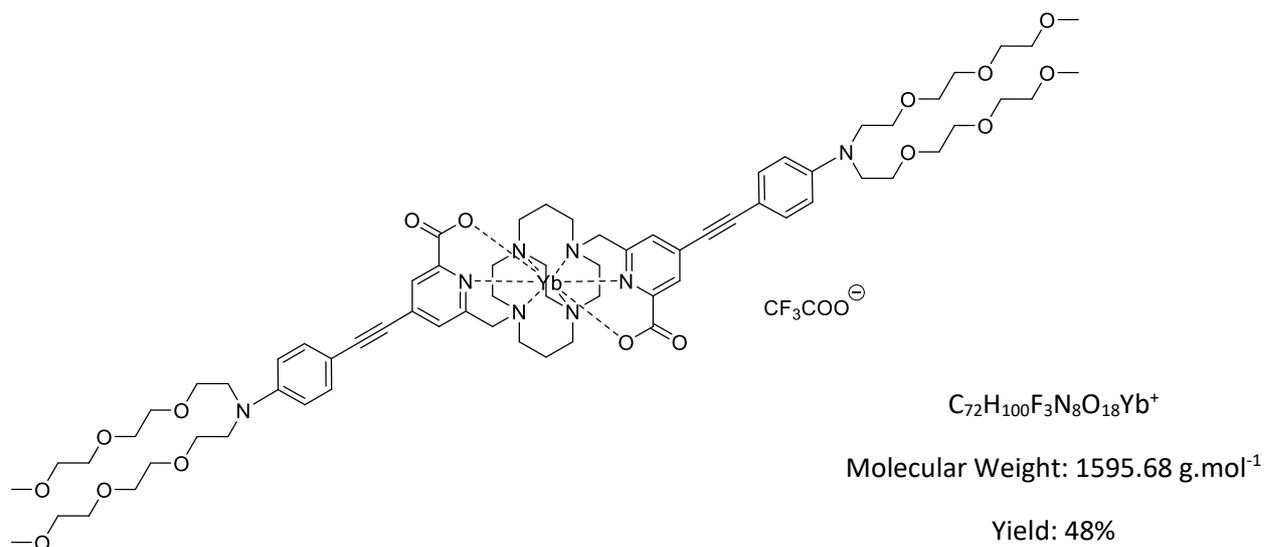
Compound **L**₁



Compound **15** (130 mg, 94.0 μmol) was dissolved in 4 mL of a mixture of THF/MeOH (1/1) and an aqueous solution of NaOH 4 M (3 mL) was added. The mixture was vigorously stirred at reflux for 16 hours. The mixture was cooled down to room temperature, poured into a separating funnel and the organic layer was recovered and concentrated under vacuum. The crude was purified on a size-exclusion chromatography Sephadex LH-20 (eluted with dichloromethane) and concentrated under vacuum to give compound **L**₁ as a yellow oil (103 mg, 78 %).

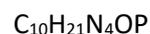
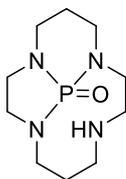
ESI-HRMS (positive): m/z : 437.9209 [$\text{M}+3\text{H}$] $^{3+}$; calcd. 432.9211 for $\text{C}_{70}\text{H}_{102}\text{N}_8\text{O}_{16} + 3\text{H}^+$.

Compound [YbL₁]⁺



Compound **L₁** (58 mg, 44.0 μmol), anhydrous *N,N*-diisopropylamine (71 μL, 376 μmol) and YbCl₃·6H₂O (34 mg, 88 μmol) were dissolved in dry 1-butanol (2 mL). The mixture was placed in the microwave apparatus and subjected to irradiation of maximum 300 W (150 °C, maximum pressure 250 psi) over a period of 8h under nitrogen atmosphere. The crude mixture was concentrated, methanol was added and the residual salts were filtered off. The filtrate was evaporated under reduced pressure and purified by semi-preparative HPLC using the method described in the general methods to give compound [YbL₁]⁺ as a yellow oil. (25 mg, 36 %).

ESI-HRMS (positive): *m/z*: 741.8361 [M+H]²⁺; calcd. 741.8357 for C₇₀H₁₀₀N₈O₁₆Yb⁺ + H⁺.

Compound 16.Molecular Weight: 244.28 g.mol⁻¹

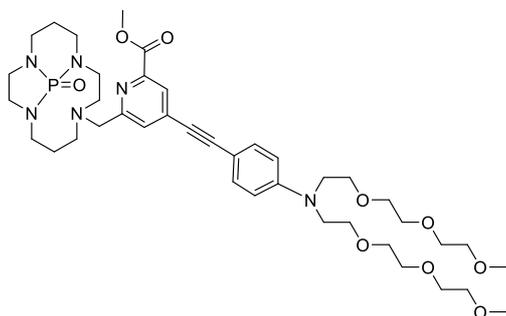
Yield: 64%

Cyclam (2.70 g, 11.9 mmol) in distilled toluene (300 mL) was refluxed in Dean-Stark apparatus under nitrogen with hexamethylphosphoric triamide (2.18 mL, 11.9 mmol). The resulting mixture was refluxed until emission of dimethylamine ceased whose was controlled by tracking color of HCl solution (1 M, 33 mL) in presence of phenolphthalein. After cooling down to room temperature, carbon tetrachloride (20 mL) was added until a white solid appeared. The solvents were removed under reduced pressure and the crude residue was treated with NaOH (4 M, 20 mL). The aqueous layer was extracted with chloroform (3 × 30 mL), the combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and finally concentrated to dryness in vacuo. Acetonitrile was added to precipitate unreacted cyclam whose could be removed by filtration. The filtrate was evaporated under reduced pressure to yield a yellow powder (1.80 g, 64%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 298 K): 3.4-3.5 (m, 2H), 3.4 (m, 2H), 2.8-3.1 (m, 6H), 2.2-2.6 (m, 6H), 1.2-1.4 (m, 4H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 298 K): 51.6 (CH₂), 46.7 (CH₂), 46.6 (CH₂), 46.4 (CH₂), 44.7 (CH₂), 42.7 (CH₂), 42.0 (CH₂), 28.4 (CH₂), 22.3 (CH₂).

³¹P NMR (121 MHz, CDCl₃, 298 K): -25.7.

Compound 17 $C_{40}H_{61}N_6O_9P$ Molecular Weight: 800.93 g.mol⁻¹

Yield: 73%

To a solution of phosphoryl cyclam **16** (130 mg, 0.532 mmol) and compound **6** (382 mg, 0.585 mmol) in distilled acetonitrile (20 mL) was added K_2CO_3 (154 mg, 1.12 mmol). The mixture was stirred at reflux for 12h. After cooling down to room temperature the mixture was filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was dissolved in chloroform and washed with water (3 × 10 mL). The combined organic phases were dried over $MgSO_4$, filtered and the solvent removed under reduced pressure to give a yellow oil corresponding to compound **17** (117 mg, 73%).

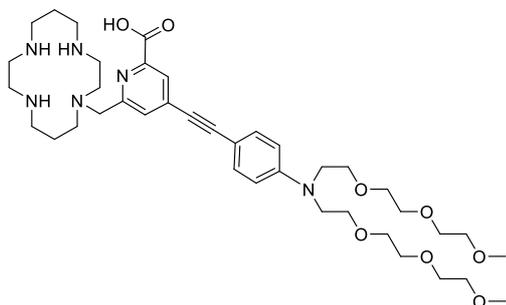
¹H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 298 K): 7.92 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.34 (d, ³J = 9 Hz, 2H), 6.56 (d, ³J = 9 Hz, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.85 (d, ²J = 15 Hz, 1H), 3.66 (d, ²J = 15 Hz, 1H), 3.40-3.58 (m, 24H), 3.27 (s, 6H), 3.18-3.27 (3H), 2.33-3.12 (m, 13H) 1.37-1.88 (m, 4H).

¹³C NMR (75 MHz, $CDCl_3$, 298 K): 165.5 ($C_{C=O}$), 160.8 (C_{ar}), 148.4 (C_{ar}), 146.9 (C_{ar}), 134.2 (C_{ar}), 133.6 (CH_{ar}), 127.2 (CH_{ar}), 125.4 (CH_{ar}), 111.2 (CH_{ar}), 108.1 (C_{ar}), 97.4 (C_{alk}), 85.2 (C_{alk}), 70.8 (CH_2), 70.6 (CH_2), 70.5 (CH_2), 70.4 (CH_2), 68.2 (CH_2), 60.1 (CH_2), 58.9 (CH_3), 52.7 (CH_3), 52.9 (CH_2), 52.2 (CH_2), 51.3 (CH_2), 50.7 (CH_2), 45.7 (CH_2), 45.5 (CH_2), 44.6 (CH_2), 44.5 (CH_2), 42.4 (CH_2), 42.0 (CH_2), 41.1 (CH_2), 27.9 (CH_2), 22.0 (CH_2).

³¹P NMR (121 MHz, $CDCl_3$, 298 K): -24.6.

ESI-HRMS (positive): *m/z*: 801.4305 [$M+H$]⁺; calcd. 801.4310 for $C_{40}H_{62}N_6O_9P + H^+$

Compound L₂


 $C_{39}H_{62}N_6O_8$

 Molecular Weight: 742.96 g.mol⁻¹

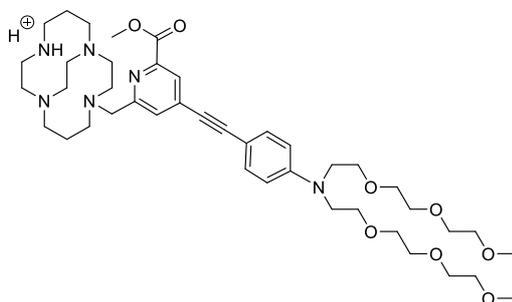
Yield: 61%

Hydrochloric acid (1M, 10 mL) was added to compound **17** (424 mg, 0.529 mmol), and the mixture was stirred at room temperature overnight. The pH was carefully adjusted around 8 with NaOH 4 M. The aqueous mixture was extracted with chloroform (3 × 30 mL), the combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and finally concentrated to dryness in vacuo. Methanol was added to remove the residual salts by filtration. The filtrate was evaporated under reduced pressure, taken up in pure water (1 mL) and purified by dialysis. The solution was evaporated under reduced pressure to yield an orange oil L₂ (252 mg, 61%).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 298 K): 156.1 (C_{ar}), 148.1 (C_{ar}), 133.7 (C_{ar}), 133.5 (CH_{ar}), 126.0 (C_{ar}), 111.5 (C_{ar}), 108.3 (C_{ar}), 96.7 (C_{alk}), 85.5 (C_{alk}), 71.6 (CH₂), 70.4 (CH₂), 67.8 (CH₂), 59.1 (CH₃), 58.4 (CH₂), 54.9 (CH₂), 53.2 (CH₂), 50.6 (CH₂), 50.4 (CH₂), 49.3 (CH₂), 46.5 (CH₂), 46.2 (CH₂), 44.8 (CH₂), 23.5 (CH₂), 22.7 (CH₂).

ESI-HRMS (positive): *m/z*: 372.2393 [M+2H]²⁺; calcd. 372.2387 for C₃₉H₆₂N₆O₈ + 2H⁺

Compound 18


 $C_{42}H_{67}N_6O_8$

 Molecular Weight: 784.03 g.mol⁻¹

Yield: 77%

To a solution of cyclam cross-bridged **14** (280 mg, 1.24 mmol) in distilled acetonitrile (300 mL), a solution of compound **6** (782 mg, 1.36 mmol) in acetonitrile (10 mL) was added and let to stir over a period of 19 hours at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure, the crude product was extracted with chloroform (3 × 30 mL) and washed with water. The combined organic

Experimental Section of Chapter 3

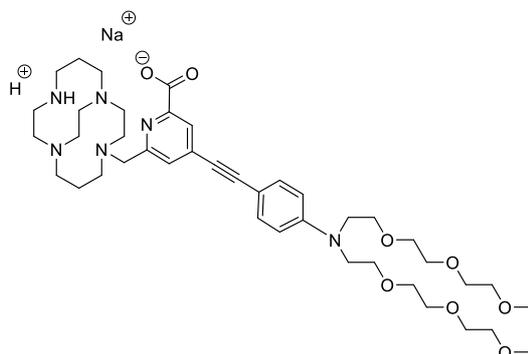
phases were dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure to give a yellow oil corresponding to compound **18** (750 mg, 77 %).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , 298 K) : 11.75 (s, 1H) 9.38 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.29 (d, $^3J=9$ Hz, 2H), 6.59 (d, $^3J=9$ Hz, 2H), 4.05 (d, $^2J=15$ Hz, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.42-3.65 (m, 24H) 3.40-3.60 (m, 2H), 3.33 (d, $^2J=15$ Hz, 1H), 3.26 (s, 6H), 3.12-3.24 (m, 2H), 2.27-3.07 (m, 18H), 1.80-1.85 (m, 1H), 1.41-1.70 (m, 2H), 0.93-1.01 (m, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , 298 K): 165.1 (C_{qt}), 158.9 (C_{qt}), 148.9 (C_{qt}), 147.0 (C_{qt}), 135.6 (C_{qt}), 133.6 (CH), 129.2 (CH), 125.5 (CH), 111.5 (CH), 107.1 (C_{qt}), 99.7 (C_{qt}), 84.6 (C_{qt}), 71.8 (CH_2), 70.6 (CH_2), 70.4 (CH_2), 68.2 (CH_2), 63.8 (CH_2), 58.9 (CH_3), 53.3 (CH_3), 57.0 (CH_2), 56.3 (CH_2), 55.6 (CH_2), 53.7 (CH_2), 53.6 (CH_2), 52.2 (CH_2), 51.9 (CH_2), 50.7 (CH_2), 49.9 (CH_2), 47.1 (CH_2), 44.7 (CH_2), 26.5 (CH_2), 21.8 (CH_2).

ESI-HRMS (positive): m/z : 392.2546 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$; calcd. 392.2544 for $\text{C}_{42}\text{H}_{66}\text{N}_6\text{O}_8 + 2\text{H}^+$

Compound **L**₃



$\text{C}_{41}\text{H}_{64}\text{N}_6\text{NaO}_8$

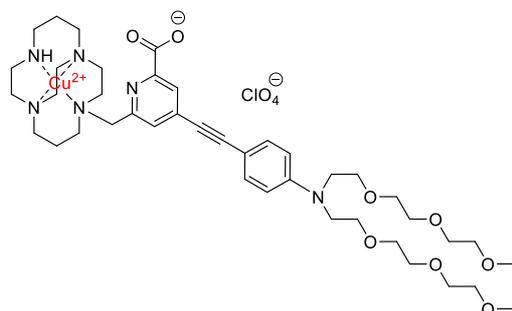
Molecular Weight: 791.99 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Yield: 83%

Sodium hydroxide (4mL, 4M) was added to a solution of compound **18** (100 mg, 120 μmol) in THF (10 mL). The mixture was vigorously stirred at room temperature overnight. The aqueous layer was extracted with chloroform (3 \times 30 mL). The combined organic layers were dried over MgSO_4 , filtered and finally concentrated to dryness in vacuo. Methanol was added to remove the residual salts by filtration. The filtrate was evaporated under reduced pressure. Pure water was added (1 mL) and the crude was purified by dialysis. The solution was concentrated under reduced pressure to yield an orange oil **L**₃ (84 mg, 81%).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , 298 K) : 8.18 (s, 1H), 7.31 (d, $^3J=9$ Hz, 2H), 7.15 (s, 1H), 6.61 (d, $^3J=9$ Hz, 2H), 3.87 (d, $^2J=12.1$ Hz, 1H, CH_2), 3.42-3.66 (m, 24H), 3.33 (s, 6H), 3.23 (d, $^2J=15$ Hz, 1H), 2.24-3.33 (m, 20H), 2.76-1.93 (m, 1H), 1.48-1.65 (m, 1H), 1.28-1.45 (m, 1H), 0.76-0.98 (m, 1H).

Compound [CuL₃]⁺



C₄₁H₆₃ClCuN₆O₁₂

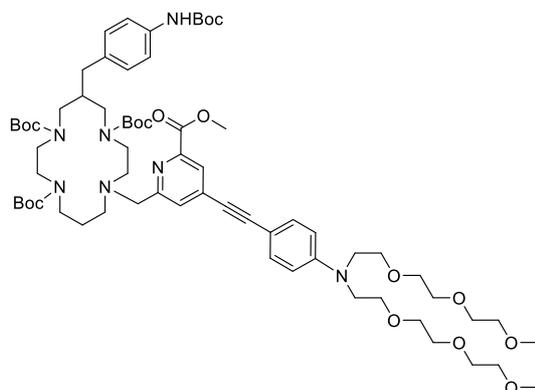
Molecular Weight: 930.98 g.mol⁻¹

Yield: 81%

Cu(ClO₄)₂.6H₂O (10 mg, 0.030 mmol) was added to a solution of L₃ (20 mg, 0.025 mmol) in water (5 mL) and the pH was adjusted to 7 with a solution of NaOH 1M. The solution was let to stir at 60°C overnight. The solution was evaporated and the resulting green solid was dissolved in a minimum amount of dichloromethane to remove the residual salts by filtration. The filtrate was evaporated under reduced pressure and the resulting yellow solid was purified by dialysis to yield [CuL₃]⁺ as a green solid (19 mg, 81%).

ESI-HRMS (positive): 415.7036 [M+H]²⁺; calcd. 415.7035 for C₄₁H₆₂CuN₆O₈⁺ + H⁺

Compound 19



C₆₇H₁₀₃N₇O₁₆

Molecular Weight: 1262.59 g.mol⁻¹

Yield: 28%

A solution of compound **10** (102 mg, 0.156 mmol) in dry CH₃CN (5 mL) was added to a solution of *p*-nitro-Bn-cyclam tetra-Boc (100 mg, 0.141 mmol) in dry CH₃CN (30 mL). K₂CO₃ (78.0 mg, 0.567 mmol) was added and the mixture was heated at reflux for 4 days. After evaporation of the solvent under reduced pressure, the crude product was purified by column chromatography on aluminium oxide (CHCl₃/MeOH 100:0 to 95:5) to afford compound **19** as a yellow oil (50.0 mg, 28%).

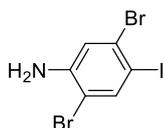
¹³C NMR (125 MHz, CD₃CN, 343 K): 166.7 (C_{C=O}), 161.8 (C_{ar}), 157.3 (C=O), 156.7 (C=O), 154.4 (C=O), 150.7 (C_{ar}), 149.1 (C_{ar}), 146.9 (C_{ar}), 138.5 (C_{ar}), 136.0 (C_{ar}), 134.9 (C_{ar}), 134.7 (CH_{ar}), 130.6 (CH_{ar}), 128.4

Experimental Section of Chapter 3

(CH_{ar}), 125.8 (CH_{ar}), 120.0 (CH_{ar}), 113.3 (CH_{ar}), 109.1 (C_{ar}), 98.2 (C_{alk}), 86.1 (C_{alk}), 73.0 (CH₂), 71.8 (CH₂), 71.5 (CH₂), 71.4 (CH₂), 62.4 (CH₂), 59.2 (CH₃), 54.6 (CH₂), 53.3 (CH₃), 53.1 (CH₂), 52.3 (CH₂), 51.9 (CH₂), 48.4 (CH₂), 48.1 (CH₂), 47.5 (CH₂), 44.5 (CH₂), 42.4 (CH₂), 42.0 (CH₂), 40.5 (CH), 41.1 (CH₂), 29.0 (CH₃), 28.5 (CH₂).

ESI-HRMS (positive): 631.8804 [M+2H]²⁺ calcd. 631.8803 for C₆₇H₁₀₃N₇O₁₆ + 2H⁺

Compound 20



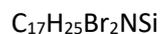
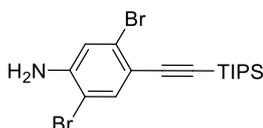
Molecular Weight: 376.82 g.mol⁻¹

Yield: Quantitative

To a solution of 2,5-dibromoaniline (5.00 g, 19.9 mmol) in DMSO (250 mL) was added *N*-iodosuccinimide (4.48 g, 19.9 mmol). The mixture was let to stir for 72h and then 200 mL of water were added. Diethyl ether was added until the white solid dissolved. The aqueous layer was extracted with Et₂O, and the combined organic layers were washed with water and brine. The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and dried giving compound **20** as a brown solid. The product was used in the next step without further purification (7.50 g, quantitative).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 298 K): 7.78 (s, 1H), 7.05 (s, 1H), 4.04 (bs, 2H).

Compound 21



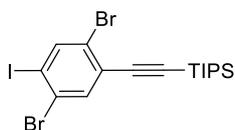
Molecular Weight: 431.29 g.mol⁻¹

Yield: Quantitative

A solution of compound **20** (3.0 g, 8.0 mmol) and TIPS (2.1 mL, 9.5 mmol) in THF/NEt₃ (60 mL/60 mL) was bubbled under argon for 1 hour. Then, CuI (30 mg, 160 μmol) and Pd(PPh₃)₂Cl₂ (56 mg, 80 μmol) were added and the mixture was stirred overnight at 55°C under Ar. A solid was filtered off and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The remaining crude residue was dissolved in CH₂Cl₂. The organic layer was washed with water (3 × 50 mL) and brine (3 × 50 mL), dried over MgSO₄, filtered and evaporated to give compound **21** as a brown solid without further purification (3.40 g, quantitative)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 298 K): 7.54 (s, 1H), 6.94 (s, 1H), 4.26 (s, 2H), 1.09-1.15 (m, 21H).

Compound 22


 $C_{17}H_{23}Br_2Si$

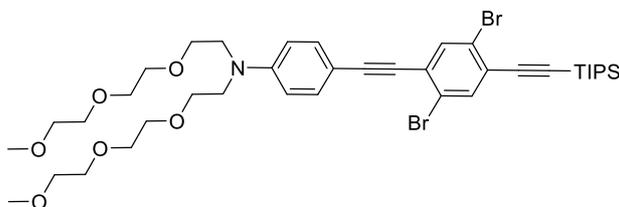
 Molecular Weight: 542.17 g.mol⁻¹

Yield: 64 %

To a solution of compound **21** (800 mg, 1.85 mmol) in glacial acetic acid (20 mL), concentrated sulfuric acid (4 mL) was added and the mixture was cooled down to 0°C. A solution of NaNO₂ (384 mg, 5.56 mmol) in 4 mL of water was added dropwise and the mixture was stirred at 0°C for 1h. A solution of KI (924 mg, 5.56 mmol) in 4 mL of water was added dropwise and the mixture was stirred at room temperature for 1h. A solution of NaOH (4M, 5 mL) was added followed by a saturated solution of Na₂CO₃ until pH 7. The mixture was extracted with dichloromethane and the organic layer was washed with Na₂S₂O₃ and water. The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and dried. The crude was purified by column chromatography on silica eluted with pentane to give compound **22** as a colorless oil (639 mg, 64 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 298 K): 8.08 (s, 1H), 7.72 (s, 1H), 1.11-1.21 (m, 21H).

Compound 23


 $C_{39}H_{57}Br_2NO_6Si$

 Molecular Weight: 823.78 g.mol⁻¹

Yield: 80 %

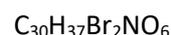
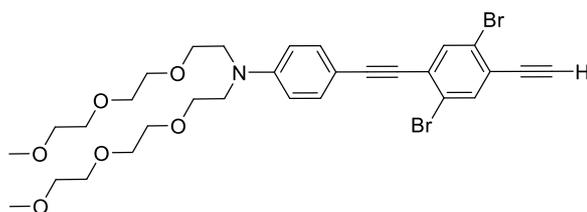
A solution of compound **22** (3.3 g, 6.1 mmol) and alkyne **8** (3.58 g, 9.5 mmol) in THF/NEt₃ (70 mL/70 mL) was bubbled under argon for 1 hour. Then, CuI (34 mg, 0.18 mmol) and Pd(PPh₃)₂Cl₂ (213 mg, 0.05 mmol) were added and the mixture was stirred overnight at 55°C. A solid was filtered off and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The remaining crude residue was dissolved in CH₂Cl₂. The organic layer was washed with water (3 × 50 mL) and brine (3 × 50 mL), dried over MgSO₄, filtered and the solvent was reduced under vacuum. The residue was purified by column chromatography on alumina (CHCl₃/MeOH 100:0 to 99:1) to give compound **23** as a yellow oil (4.0 g, 80%).

Experimental Section of Chapter 4

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , 298 K): 7.68 (s, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.38 (d, $^2J = 9.1$ Hz, 2H), 6.67 (d, $^2J = 9.1$ Hz, 2H), 3.50-3.66 (m, 24H), 3.37 (s, 6H), 1.12-1.16 (m, 21H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz CDCl_3 , 298 K): 148.4 (C_{ar}), 136.5 (CH_{ar}), 135.4 (CH_{ar}), 135.3 (CH_{ar}), 127.5 (C_{ar}), 125.3 (C_{ar}), 123.9 (C_{ar}), 122.9 (C_{ar}), 111.5 (CH_{ar}), 108.7 (C_{alk}), 103.5 (C_{alk}), 98.73 (C_{alk}), 85.7 (C_{alk}), 73.0 (CH_2), 72.0 (CH_2), 70.71 (CH_2), 70.7 (CH_2), 68.4 (CH_2), 59.1 (CH), 50.9 (CH_2), 18.7 (CH_3).

Compound 24



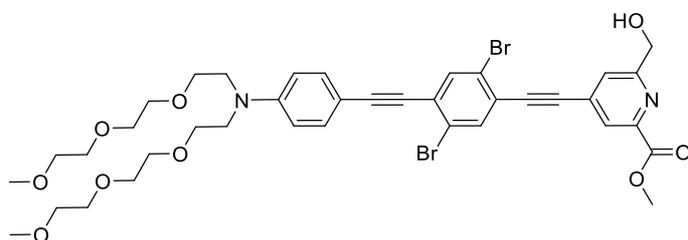
Molecular Weight: 667.44 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Yield: Quantitative

Compound **23** (4.03 g, 4.89 mmol) was dissolved in THF (70 mL) and tetrabutylammonium fluoride (2.12 mL, 7.34 mmol) was added. The mixture was stirred for 2h before evaporation of the solvent. The crude product was dissolved in water (30 mL) and the aqueous solution was extracted with diethyl ether (3 \times 30 mL). Organic layers were combined, washed with brine, dried over MgSO_4 , filtered and evaporated to dryness to give compound **24**. The product was used in the next step without further purification (3.43 g, 100%).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , 298 K): 7.71 (s, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.38 (d, $^2J = 9.1$ Hz, 2H), 6.67 (d, $^2J = 9.1$ Hz, 2H), 3.50-3.66 (m, 24H), 3.46 (s, 1H), 3.37 (s, 6H).

Compound 25

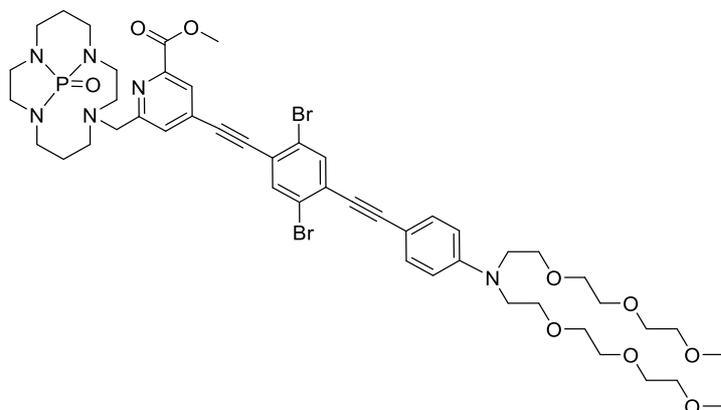


Molecular Weight: 832.58 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Yield: Quantitative

A solution of compound **3** (890 mg, 3.04 mmol) and alkyne **24** (2.84 g, 4.25 mmol) in THF/ NEt_3 (20 mL/20 mL) was bubbled under argon for 1 hour. Then, CuI (17 mg, 911 μmol) and $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (149 mg, 213 μmol) were added and the mixture was stirred overnight at 55°C under Ar. A solid was filtered off and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The remaining crude residue was dissolved in CH_2Cl_2 . The organic layer was washed with NH_4Cl (3 \times 50 mL) and brine (3 \times 50 mL), dried

Compound 27



Molecular Weight: 1058.85 g.mol⁻¹

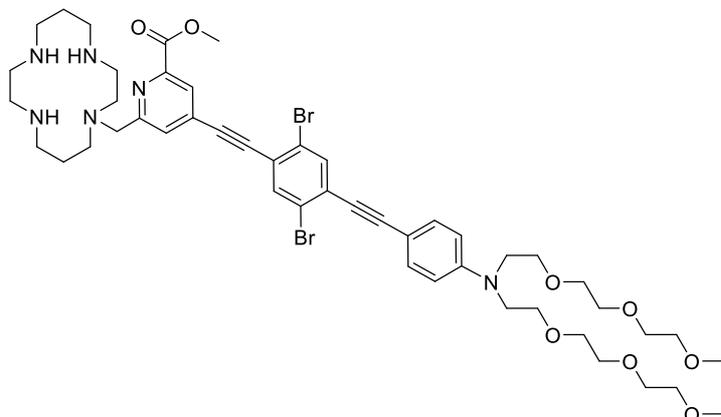
Yield: 45%

To a solution of phosphoryl cyclam **16** (200 mg, 0.819 mmol) and compound **26** (783 mg, 0.860 mmol) in distilled acetonitrile (50 mL) was added K₂CO₃ (226 mg, 1.64 mmol). The mixture was stirred at reflux for 12h. After cooling down to room temperature, the mixture was filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was dissolved in chloroform and washed with water (3 × 10 mL), the combined organic phases were dried over MgSO₄, filtered and the solvent removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on alumina (CHCl₃/MeOH 100:0 to 99:1) to give a yellow oil corresponding to compound **27** (385 mg, 45%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 298 K): 8.11 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.35 (d, ²J= 9 Hz, 2H), 6.63 (d, ²J= 9 Hz, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.93 (d, 1H), 3.75 (d, 1H), 3.44-3.69 (m, 24H), 3.33-2.38 (m, 13H), 3.19 (s, 3H), 1.41-1.83 (m, 4H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 298 K): 165.4 (C_{C=O}), 161.4 (C_{ar}), 148.5 (C_{ar}), 147.3 (C_{ar}), 136.6 (CH_{ar}), 135.2 (CH_{ar}), 133.3 (CH_{ar}), 132.6 (C_{ar}), 128.5 (C_{ar}), 125.5 (CH_{ar}), 127.8 (CH_{ar}), 125.8 (CH_{ar}), 124.3 (C_{ar}), 123.9 (C_{ar}), 123.2 (C_{ar}), 111.5 (CH_{ar}), 108.5 (C_{ar}), 99.5 (C_{alk}), 92.6 (C_{alk}), 92.2 (C_{alk}), 85.6 (C_{alk}), 71.9 (CH₂), 70.7 (CH₂), 70.7 (CH₂), 70.6 (CH₂), 68.4 (CH₂), 61.9 (CH₂), 59.1 (CH₃), 53.2 (CH₂), 53.0 (CH₃), 50.9 (CH₂), 45.7 (CH₂), 44.7 (CH₂), 42.5 (CH₂), 42.2 (CH₂), 41.1 (CH₂), 26.5 (CH₂), 22.2 (CH₂).

³¹P NMR (121 MHz, CDCl₃, 298 K): -25.4.

Compound 28Molecular Weight: 1014.90 g.mol⁻¹

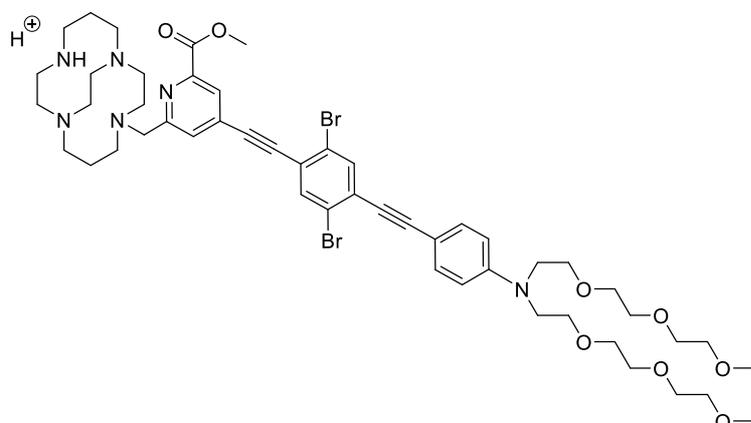
Yield: 36%

To a solution of cyclam (550 mg, 2.75 mmol) in distilled acetonitrile (500 mL), a solution of compound **26** (500 mg, 0.550 mmol) in acetonitrile (10 mL) was added dropwise over a period of 7 hours at room temperature and the mixture was stirred overnight. The solvent was removed under reduced pressure, the crude product was extracted with chloroform (3 × 30 mL) and washed with water. The combined organic phases were dried over MgSO₄ and filtered. After evaporation of the solvent, the residue was purified by column chromatography on alumina eluted with CHCl₃/MeOH (100:0 then 90:10) to give compound **28** as a yellow oil (165 mg, 36%).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 298 K): 8.13 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.40 (d, ²J = 10 Hz, 2H), 6.68 (d, ²J = 10 Hz, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.96 (d, 1H), 3.75 (d, 1H, ³J = 15 Hz), 3.58-3.33 (m, 27H), 3.38 (s, 6H), 2.46-3.38 (m, 18 H), 1.46-1.99 (m, 5H).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 298 K): 165.4 (C_{C=O}), 161.4 (C_{ar}), 148.5 (C_{ar}), 147.4 (C_{ar}), 136.6 (CH_{ar}), 135.3 (CH_{ar}), 133.3 (CH_{ar}), 132.6 (C_{ar}), 128.5 (C_{ar}), 127.8 (CH_{ar}), 125.5 (CH_{ar}), 124.3 (C_{ar}), 123.9 (C_{ar}), 123.2 (C_{ar}), 111.5 (CH_{ar}), 108.5 (C_{ar}), 99.5 (C_{alk}), 92.6 (C_{alk}), 92.2 (C_{alk}), 85.6 (C_{alk}), 72.5 (CH₂), 71.9 (CH₂), 70.7 (CH₂), 70.7 (CH₂), 70.6 (CH₂), 68.4 (CH₂), 61.9 (CH₂), 58.7 (CH₂), 58.6 (CH₃), 52.7 (CH₃), 52.6 (CH₂), 48.2 (CH₂), 47.7 (CH₂), 46.22 (CH₂), 44.7 (CH₂), 24.5 (CH₂), 22.4 (CH₂).

ESI-HRMS: m/z: 342.4509 [M+C+3H]³⁺ calcd. 343.1173 for C₄₈H₆₆Br₂N₆O₈ + C + 3H⁺

Compound 29

 Molecular Weight: 1038.35 g.mol⁻¹

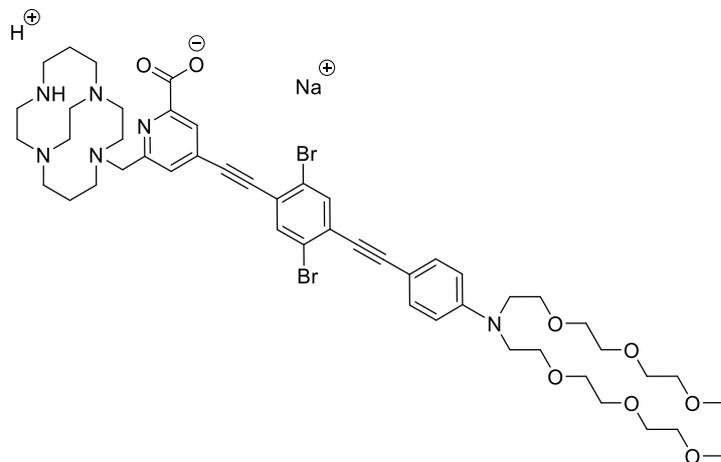
Yield: 50%

To a solution of cross-bridged cyclam **14** (82.6 mg, 1.10 mmol) in distilled acetonitrile (500 mL), a solution of compound **26** (300 mg, 329 μmol) in acetonitrile (10 mL) was added dropwise and the mixture was stirred overnight. The solvent was removed under reduced pressure, the crude product was extracted with chloroform (3 × 30 mL) and washed with water. The combined organic phases were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. After evaporation of the solvent, the residue was purified by column chromatography on alumina (CHCl₃/MeOH 100:0 to 98:2) to give compound **28** as a yellow oil (168 mg, 50%).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 298 K): 8.07 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.36 (d, ²J = 9.1 Hz, 2H), 6.66 (d, ²J = 9.1 Hz, 2H), 4.22 (bd, 1H), 4.19 (s, 3H), 3.61 (bd, 1H), 3.75 (d, ²J = 9.1 Hz, 2H), 3.33-3.58 (m, 26H), 3.38 (s, 6H), 3.19 (m, 1H), 3.07-2.47 (m, 17H), 1.93 (m, 1H), 1.71 (m, 1H), 1.55 (s, 1H).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 298 K): 165.4 (C_{C=O}), 161.4 (C_{ar}), 148.5 (C_{tar}), 147.4 (C_{ar}), 136.6 (CH_{ar}), 135.3 (CH_{ar}), 133.3 (CH_{ar}), 132.6 (C_{ar}), 128.5 (C_{ar}), 127.8 (CH_{ar}), 125.8 (CH_{ar}), 124.3 (C_{ar}), 123.9 (C_{ar}), 123.2 (C_{ar}), 111.5 (CH_{ar}), 108.5 (C_{alk}), 99.5 (C_{alk}), 92.6 (C_{alk}), 92.2 (C_{alk}), 85.6 (C_{alk}), 71.9 (CH₂), 70.8 (CH₂), 70.7 (CH₂), 70.7 (CH₂), 70.6 (CH₂), 68.4 (CH₂), 63.4 (CH₂), 58.8 (CH₃), 57.0 (CH₂), 56.2 (CH₂), 55.5 (CH₂), 53.6 (CH₂), 53.4 (CH₃), 53.4 (CH₃), 52.3 (CH₂), 52.0 (CH₂), 50.7 (CH₂), 49.9 (CH₂), 47.0 (CH₂), 44.6 (CH₂), 26.4 (CH₂), 21.6 (CH₂).

ESI-HRMS: m/z: 347.1219 [M+2H]²⁺ calcd. 347.1228 for C₅₀H₇₁Br₂N₆O₈ + 2H⁺

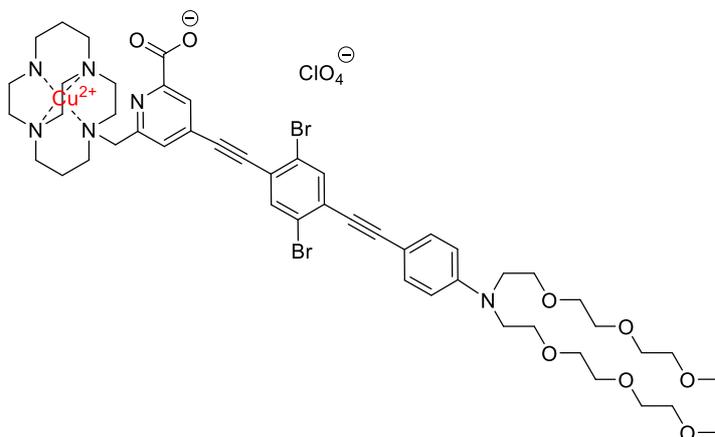
Compound L₅Molecular Weight: 1049.90 g.mol⁻¹

Yield: 81%

Sodium hydroxide (4M, 4mL) was added to a solution of compound **29** (100 mg, 0.97 mmol) in THF (10 mL). The mixture was vigorously stirred at room temperature overnight. The aqueous layer was extracted with chloroform (3 × 30 mL), the combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and finally concentrated to dryness in vacuo. Methanol was added to remove the residual salts by filtration. The filtrate was evaporated under reduced pressure. Pure water was added (1 mL) and the crude was purified by dialysis and by size-exclusion chromatography Sephadex G-15 (eluted with water). The solution was concentrated under reduced pressure to yield **L₅** as an orange oil (83.0 mg, 81%).

ESI-HRMS: m/z: 342.4504 [M+3H]³⁺ calcd. 342.4509 for C₄₉H₆₉Br₂N₆O₈ + 3H⁺

Compound [CuL₅]⁺



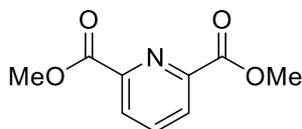
Molecular Weight: 1188.89 g.mol⁻¹

Yield: 18%

Cu(ClO₄)₂·6H₂O (10 mg, 28 μmol) was added to a solution of L₅ (85 mg, 65 μmol) in water (5 mL) and the pH was adjusted to 7 with NaOH 1M. The solution was stirred at 80°C overnight. The solution was evaporated and the resulting green solid was dissolved in a minimum amount of dichloromethane to remove the residual salts by filtration. The filtrate was evaporated under reduced pressure to yield and purified by semi-preparative HPLC using the method described in the general methods to give compound [CuL₅]⁺ as a orange solid (17 mg, 18%).

ESI-HRMS: m/z: 362.7556 [M+2H]²⁺ calcd. 362.7551 for C₄₉H₆₅Br₂CuN₆O₈⁺ + 2H⁺

Compound 30



$C_9H_9NO_4$

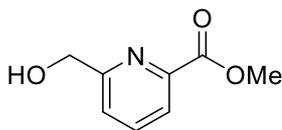
Molecular Weight: 195.17 g.mol⁻¹

Yield: 89%

To a solution of pyridine-2,6-dicarboxylic acid (18.0 g, 108 mmol) in 200 mL of methanol, sulfuric acid (50 mL) was added dropwise. The solution was stirred at 65°C overnight. After cooling down to 0°C, water (300 mL) was added followed by a saturated solution of NaHCO₃ until reach pH 7. The organic layer was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 100 mL) dried over MgSO₄ and filtered. The solution was concentrated under reduced pressure to yield compound **30** (18.6 g, 89%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 298 K): 8.32 (d, ³J= 7.7 Hz, 2H), 7.85 (t, ³J= 7.7 Hz, 1H), 3.96 (s, 6H).

Compound 31



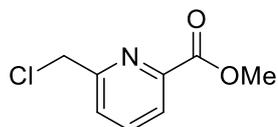
$C_8H_9NO_3$

Molecular Weight: 195.17 g.mol⁻¹

Yield: 51%

To a solution of compound **30** (18.6 g, 95 mmol) in MeOH (300 mL) at 0°C, NaBH₄ (5.40 g, 143 mmol) was added in small portions over a period of 30 min. The mixture was stirred at 0 °C for 4 h and then a solution of HCl 3M was added until pH 5. The solvent was removed under vacuum and a saturated solution of Na₂CO₃ was added until reaching pH 8. The resulting aqueous solution was extracted with CHCl₃ (5 × 100 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO₄, filtered and evaporated to give compound **31** as a white solid (7.90 g, 51%).

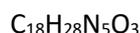
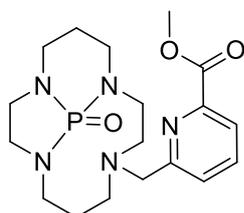
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 298 K): 8.02 (d, ²J= 7.7 Hz, 1H), 7.84 (t, ²J= 7.7 Hz, 1H), 7.53 (d, ²J= 7.7 Hz, 1H), 4.85 (s, 2H), 3.97 (s, 3H), 3.73 (s, 1H).

Compound 32Molecular Weight: 185.61 g.mol⁻¹

Yield: 44%

SOCl₂ (45 mL) was added to compound **31** (8.22g, 49.2 mmol) at 0 °C under argon. The mixture was stirred at 0 °C for 2 h, and the excess of SOCl₂ was evaporated by trap-to-trap distillation. Toluene was added (200 mL) and the organic solution was washed with a saturated solution of NaHCO₃ (2 × 200 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and evaporated. The resulting oily residue was precipitated by addition of diethyl ether to give compound **32** as a pale yellow solid (44%, 4.0 g).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 298 K): 8.09 (d, 1H, ³J = 7.7 Hz), 7.90 (t, 1H, ³J = 7.7 Hz), 7.84 (d, 1H, ³J = 7.7 Hz), 4.79 (s, 2H), 3.99 (s, 3H).

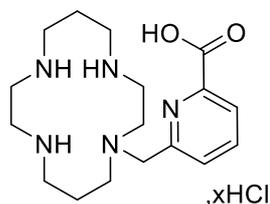
Compound 33Molecular Weight: 393.43 g.mol⁻¹

Yield: 59%

A solution of compound **32** (418 mg, 2.30 mmol) in CH₃CN (60 mL) was added to a solution of compound **16** (500 mg, 2.10 mmol) in dry CH₃CN (400 mL). K₂CO₃ (1.13 g, 8.20 mmol) was added and the mixture was heated to reflux overnight. After filtration and evaporation of the solvent under reduced pressure, the crude product was purified by column chromatography on silica (CHCl₃/MeOH 95:5) to afford compound **33** as a white solid (470 mg, 59%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 298 K): 8.09 (d, 1H, ³J = 7.7 Hz), 7.90 (t, 1H, ³J = 7.7 Hz), 7.84 (d, 1H, ³J = 7.7 Hz), 4.79 (s, 2H), 3.99 (s, 3H), 3.53–3.62 (m, 1H), 3.26–3.38 (m, 1H), 3.00–3.15 (m, 3H), 2.88–2.95 (m, 1H), 2.69–2.82 (m, 2H), 2.52–2.75 (m, 2H), 2.21–2.41 (m, 5H), 2.10 (m, 1H), 1.54–1.67 (m, 1H), 1.45–1.57 (m, 1H), 1.35–1.41 (m, 2H).

Compound **H₁TE1PA**



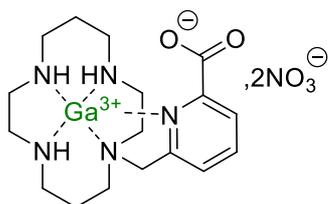
Molecular Weight: 444.83 g.mol⁻¹

Yield: 64% (estimated of the basis of x =4)

Hydrochloric acid (3M, 10 mL) was slowly added to compound **33** (473 mg, 1.2 mmol), and the mixture was stirred and heated at 80 °C overnight. After cooling down to room temperature and solvent evaporation, the residue was dissolved in the minimum amount of water. An anion-exchange resin (DOWEX 1X2-200) was used to give after evaporation under reduced pressure a colorless oil. HCl 12M (5 mL) was added to a solution of the product in absolute ethanol (2 mL). The resulting precipitate was filtered and washed with warm ethanol (10 mL). The solvent was evaporated, and the solid was dried under reduced pressure to give **H₁TE1PA** as its hydrochloride salt (63%, 370 mg).

¹H NMR (300 MHz, D₂O, 298 K): 8.15 (dd, 1H, ³J= 7.5 Hz, ³J= 7.6 Hz), 8.08 (d, 1H, ³J= 7.6 Hz), 7.70 (d, 1H, ³J= 7.5 Hz), 7.70 (d, 1H, ³J= 7.5 Hz), 4.05 (s, 2H), 2.90–3.02 (m, 4H), 3.24–3.48 (m, 6H), 2.94–3.11 (m, 6H), 2.18–2.22 (m, 2H), 1.96–2.00 (m, 2H).

Compound **[Ga(TE1PA)]²⁺**



Molecular Weight: 528.18 g.mol⁻¹

Yield: quantitative

Ga(NO₃)₂·9H₂O (56.3 mg, 0.135 mmol) was added to a solution of **H₁TE1PA.3HCl** (50.0 mg, 112 μmol) in water (5 mL) and the pH was adjusted to 4 with NaOH 1M. The solution was stirred at 100°C overnight. The solvent was evaporated and the resulting off-white solid was dissolved in a minimum amount of water and filtered. The filtrate was evaporated under reduced pressure to yield **[Ga(TE1PA)]³⁺** as an off-white solid (57.0 mg, quantitative).

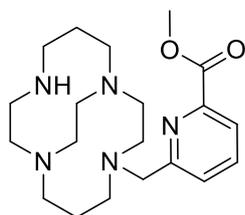
Experimental Section of Chapter 5

¹H NMR (500 MHz, D₂O, 298 K): 8.63 (t, 1H, ³J = 7.8 Hz), 8.43 (d, 1H, ³J = 7.8 Hz), 8.12 (d, 1H, ³J = 7.8 Hz), 5.67 (bs, 1H), 5.57 (bs, 1H), 5.08 (d, 1H, ³J = 19.5 Hz), 4.65 (d, 1H, ³J = 19.5 Hz), 4.79 (s, 2H), 3.99 (s, 3H), 3.81-3.02 (m, 15H), 2.53-2.06 (m, 5H).

¹³C NMR (125 MHz, D₂O, 298 K): 168.7 (C_{qt}), 153.0 (C_{qt}), 148.8 (CH), 146.0 (C_{qt}), 129.6 (CH), 127.0 (CH), 61.9 (CH₂), 58.3 (CH₂), 56.2 (CH₂), 53.8 (CH₂), 53.4 (CH₂), 49.6 (CH₂), 47.2 (CH₂), 46.1 (CH₂), 46.0 (CH₂), 25.9 (CH₂), 21.5 (CH₂).

ESI-HRMS (positive): m/z: 201.575172 [M+H]³⁺ calcd. 201.574388 for C₁₇H₂₆GaN₅O₂ + H⁺

Compound 34



C₂₀H₃₃N₅O₅

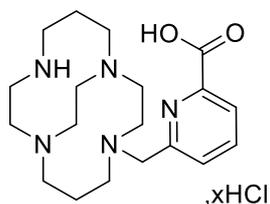
Molecular Weight: 375.52 g·mol⁻¹

Yield: 60%

A solution of compound **32** (271 mg, 1.46 mmol) in CH₃CN (60 mL) was added to a solution of compound **14** (300 mg, 1.30 mmol) in dry CH₃CN (400 mL). The mixture was heated to reflux overnight. After evaporation of the solvent under reduced pressure, the crude product was purified by column chromatography on silica (CHCl₃/MeOH 80:20) to afford compound **34** as a colorless oil (327 mg, 60%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 298 K): 7.94 (d, 1H, ³J = 7.7 Hz), 7.85 (t, 1H, ³J = 7.7 Hz), 7.45 (d, 1H, ³J = 7.7 Hz), 4.00 (d, 1H, ²J = 12.8 Hz), 3.87 (s, 3H), 3.32 (d, 1H, ²J = 12.8 Hz), 3.12–3.22 (m, 1H), 2.93–3.06 (m, 3H), 2.80–2.93 (m, 6H), 2.65–2.79 (m, 3H), 2.30–2.62 (m, 8H), 1.81–1.92 (m, 1H), 1.54–1.70 (m, 1H), 1.41–1.55 (m, 1H), 0.95–1.03 (m, 1H).

Compound **H₁CB-TE1PA**



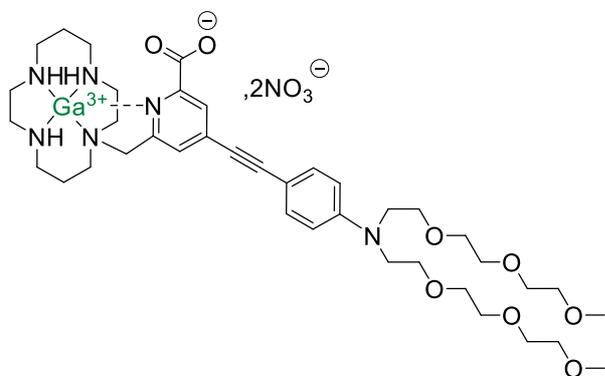
Molecular Weight: 507.32 g.mol⁻¹

Yield: 92% (estimated on the basis of x = 4)

Hydrochloric acid (3M, 3 mL) was slowly added to compound (51.0 mg, 0.136 mmol), and the mixture was stirred and heated at 80 °C overnight. After cooling down to room temperature, the solvent was evaporated to give **H₁CB-TE1PA** as its hydrochloride salt (92%, 65 mg).

¹H NMR (300 MHz, D₂O, 298 K): 8.37 (d, 1H, ³J = 7.7 Hz), 8.12 (t, 1H, ³J = 7.7 Hz), 7.77 (d, 1H, ³J = 7.7 Hz), 4.96 (d, 1H, ²J = 12.8 Hz), 4.16 (d, 1H, ²J = 12.8 Hz), 3.76-2.35 (m, 20H), 2.39-2.35 (m, 2H), 1.73 (d, 1H, ²J = 16.1 Hz), 1.54 (d, 1H, ²J = 16.1 Hz).

Compound [**GaL₂**]²⁺



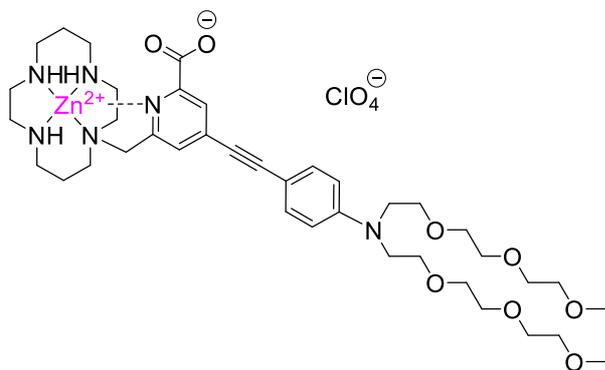
Molecular Weight: 935.68 g.mol⁻¹

Yield: 78%

Ga(NO₃)₂·9H₂O (30 mg, 48 μmol) was added to a solution of **L₂** (30 mg, 040 μmol) in water (5 mL) and the pH was adjusted to 4 with NaOH 1M. The solution was stirred at 100°C for 8h. The solvent was evaporated and the resulting yellow solid was dissolved in a minimum amount of water and filtered. The filtrate was evaporated under reduced pressure and purified by dialysis to yield [**GaL₂**]²⁺ as a yellow solid (28 mg, 78%, purity : 32%).

ESI-HRMS (positive): 827.3997 [M+H⁺+H₂O]³⁺; cald. 827.3828 for C₃₉H₆₂GaN₈O₈ + H⁺ + H₂O

Compound [ZnL₂]⁺



Molecular Weight: 907.79 g.mol⁻¹

Yield: 82%

ZnCl₂ (7.82 mg, 21 μmol) was added to a solution of L₂ (13 mg, 18 μmol) in water (5 mL) and the pH was adjusted to 7 with NaOH 1M. The solution was stirred at 100°C for 8h. The solvent was evaporated and the resulting yellow solid was dissolved in a minimum amount of water and filtered. The filtrate was evaporated under reduced pressure and purified by dialysis to yield [ZnL₂]⁺ as a yellow solid (82%, 13 mg).

MALDI-TOF (positive): 808.334 [M+2H]³⁺; calcd. for C₃₉H₆₁N₆O₈Zn⁺

Références bibliographiques

- (1) Weissleder, R.; Pittet, M. J. Imaging in the Era of Molecular Oncology. *Nature* **2008**, *452* (7187), 580–589.
- (2) Wadas, T. J.; Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Anderson, C. J. Coordinating Radiometals of Copper, Gallium, Indium, Yttrium, and Zirconium for PET and SPECT Imaging of Disease. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (5), 2858–2902.
- (3) Wadas, T. J.; Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Anderson, C. J. Coordinating Radiometals of Copper, Gallium, Indium, Yttrium, and Zirconium for PET and SPECT Imaging of Disease. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (5), 2858–2902.
- (4) Bünzli, J.-C. G. On the Design of Highly Luminescent Lanthanide Complexes. *Coord. Chem. Rev.* **2015**, *293–294*, 19–47.
- (5) Caserta, E.; Chea, J.; Minnix, M.; Poku, E. K.; Viola, D.; Vonderfecht, S.; Yazaki, P.; Crow, D.; Khalife, J.; Sanchez, J. F.; Palmer, J. M.; Hui, S.; Carlesso, N.; Keats, J.; Kim, Y.; Buettner, R.; Marcucci, G.; Rosen, S.; Shively, J.; Colcher, D.; Krishnan, A.; Pichiorri, F. Copper 64–Labeled Daratumumab as a PET/CT Imaging Tracer for Multiple Myeloma. *Blood* **2018**, *131* (7), 741–745.
- (6) Boswell, C. A.; Sun, X.; Niu, W.; Weisman, G. R.; Wong, E. H.; Rheingold, A. L.; Anderson, C. J. Comparative in Vivo Stability of Copper-64-Labeled Cross-Bridged and Conventional Tetraazamacrocyclic Complexes. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (6), 1465–1474.
- (7) Lima, L. M. P.; Esteban-Gómez, D.; Delgado, R.; Platas-Iglesias, C.; Tripier, R. Monopicolinate Cyclen and Cyclam Derivatives for Stable Copper(II) Complexation. *Inorg. Chem.* **2012**, *51* (12), 6916–6927.
- (8) Lima, L. M. P.; Halime, Z.; Marion, R.; Camus, N.; Delgado, R.; Platas-Iglesias, C.; Tripier, R. Monopicolinate Cross-Bridged Cyclam Combining Very Fast Complexation with Very High Stability and Inertness of Its Copper(II) Complex. *Inorg. Chem.* **2014**, *53* (10), 5269–5279.
- (9) Frindel, M.; Camus, N.; Rauscher, A.; Bourgeois, M.; Alliot, C.; Barré, L.; Gestin, J.-F.; Tripier, R.; Faivre-Chauvet, A. Radiolabeling of HTE1PA: A New Monopicolinate Cyclam Derivative for Cu-64 Phenotypic Imaging. In Vitro and in Vivo Stability Studies in Mice. *Nucl. Med. Biol.* **2014**, *41*, e49–e57.
- (10) Frindel, M.; Saëc, P. L.; Beyler, M.; Navarro, A.-S.; Saï-Maurel, C.; Alliot, C.; Chérel, M.; Gestin, J.-F.; Faivre-Chauvet, A.; Tripier, R. Cyclam Te1pa for 64 Cu PET Imaging. Bioconjugation to Antibody, Radiolabeling and Preclinical Application in Xenografted Colorectal Cancer. *RSC Adv.* **2017**, *7* (15), 9272–9283.
- (11) Bihan, T. L.; Navarro, A.-S.; Bris, N. L.; Saëc, P. L.; Gouard, S.; Haddad, F.; Gestin, J.-F.; Chérel, M.; Faivre-Chauvet, A.; Tripier, R. Synthesis of C-Functionalized TE1PA and Comparison with Its Analogues. An Example of Bioconjugation on 9E7.4 MAb for Multiple Myeloma 64Cu-PET Imaging. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16* (23), 4261–4271.
- (12) Rodríguez-Rodríguez, A.; Esteban-Gómez, D.; Tripier, R.; Tircsó, G.; Garda, Z.; Tóth, I.; de Blas, A.; Rodríguez-Blas, T.; Platas-Iglesias, C. Lanthanide(III) Complexes with a Reinforced

- Cyclam Ligand Show Unprecedented Kinetic Inertness. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (52), 17954–17957.
- (13) Hong, G.; Antaris, A. L.; Dai, H. Near-Infrared Fluorophores for Biomedical Imaging. *Nat. Biomed. Eng.* **2017**, *1* (1), 1–22.
- (14) Andraud, C.; Maury, O. Lanthanide Complexes for Nonlinear Optics: From Fundamental Aspects to Applications. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2009**, *2009* (29–30), 4357–4371.
- (15) Mendy, J.; Thy Bui, A.; Roux, A.; Mulatier, J.-C.; Curton, D.; Duperray, A.; Grichine, A.; Guyot, Y.; Bresselet, S.; Riobé, F.; Andraud, C.; Le Guennic, B.; Patinec, V.; Tripier, Pr. R.; Beyler, M.; Maury, O. Cationic Biphotonic Lanthanide Luminescent Bioprobes Based on Functionalized Cross-Bridged Cyclam Macrocycles. *ChemPhysChem* **2020**, *21* (10), 1036–1043.
- (16) Gallavardin, T.; Maurin, M.; Marotte, S.; Simon, T.; Gabudean, A.-M.; Bretonnière, Y.; Lindgren, M.; Lerouge, F.; Baldeck, P. L.; Stéphan, O.; Leverrier, Y.; Marvel, J.; Parola, S.; Maury, O.; Andraud, C. Photodynamic Therapy and Two-Photon Bio-Imaging Applications of Hydrophobic Chromophores through Amphiphilic Polymer Delivery. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, *10* (7), 1216–1225.
- (17) Monnereau, C.; Marotte, S.; Lanoë, P.-H.; Maury, O.; Baldeck, P. L.; Kreher, D.; Favier, A.; Charreyre, M.-T.; Marvel, J.; Leverrier, Y.; Andraud, C. Water-Soluble Chromophores with Star-Shaped Oligomeric Arms: Synthesis, Spectroscopic Studies and First Results in Bio-Imaging and Cell Death Induction. *New J. Chem.* **2012**, *36* (11), 2328–2333.
- (18) Gallavardin, T.; Maurin, M.; Marotte, S.; Simon, T.; Gabudean, A.-M.; Bretonnière, Y.; Lindgren, M.; Lerouge, F.; Baldeck, P. L.; Stéphan, O.; Leverrier, Y.; Marvel, J.; Parola, S.; Maury, O.; Andraud, C. Photodynamic Therapy and Two-Photon Bio-Imaging Applications of Hydrophobic Chromophores through Amphiphilic Polymer Delivery. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, *10* (7), 1216–1225.
- (19) Hancock, R. D.; Martell, A. E. Ligand Design for Selective Complexation of Metal Ions in Aqueous Solution. *Chem. Rev.* **1989**, *89* (8), 1875–1914.
- (20) Rodríguez-Rodríguez, A.; Esteban-Gómez, D.; de Blas, A.; Rodríguez-Blas, T.; Fekete, M.; Botta, M.; Tripier, R.; Platas-Iglesias, C. Lanthanide(III) Complexes with Ligands Derived from a Cyclen Framework Containing Pyridinecarboxylate Pendants. The Effect of Steric Hindrance on the Hydration Number. *Inorg. Chem.* **2012**, *51* (4), 2509–2521.
- (21) Lima, L. M. P.; Beyler, M.; Delgado, R.; Platas-Iglesias, C.; Tripier, R. Investigating the Complexation of the Pb²⁺/Bi³⁺ Pair with Dipicolinate Cyclen Ligands. *Inorg. Chem.* **2015**, *54* (14), 7045–7057.
- (22) Guillou, A.; Lima, L. M. P.; Roger, M.; Esteban-Gómez, D.; Delgado, R.; Platas-Iglesias, C.; Patinec, V.; Tripier, R. 1,4,7-Triazacyclononane-Based Bifunctional Picolinate Ligands for Efficient Copper Complexation. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, *2017* (18), 2435–2443.

- (23) Guillou, A.; Lima, L. M. P.; Esteban-Gómez, D.; Le Poul, N.; Bartholomä, M. D.; Platas-Iglesias, C.; Delgado, R.; Patinec, V.; Tripier, R. Methylthiazolyl Tacn Ligands for Copper Complexation and Their Bifunctional Chelating Agent Derivatives for Bioconjugation and Copper-64 Radiolabeling: An Example with Bombesin. *Inorg. Chem.* **2019**, *58* (4), 2669–2685.
- (24) Chang, C. A. Chapter 297 - Lanthanide Macrocyclic Complexes: Structure, Thermodynamics, Kinetics, and Applications. In *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths*; Bünzli, J.-C. G., Pecharsky, V. K., Eds.; Including Actinides; Elsevier, 2017; Vol. 51, pp 169–299.
- (25) Harris, W. R.; Raymond, K. N.; Weitzel, F. L. Ferric Ion Sequestering Agents. 6. The Spectrophotometric and Potentiometric Evaluation of Sulfonated Triccatecholate Ligands. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103* (10), 2667–2675. <https://doi.org/10.1021/ja00400a030>.
- (26) Hider, R. C.; Ma, Y. CHAPTER 2: Basic Principles of Metal Chelation and Chelator Design. In *Metal Chelation in Medicine*; 2016; pp 24–55.
- (27) Wadas, T. J.; Wong, E. H.; Anderson, G. R. W.; C. J. Copper Chelation Chemistry and its Role in Copper Radiopharmaceuticals. *Current Pharmaceutical Design.* **2007**, *13* (1),
- (28) Elgrishi, N.; Rountree, K. J.; McCarthy, B. D.; Rountree, E. S.; Eisenhart, T. T.; Dempsey, J. L. A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *J. Chem. Educ.* **2018**, *95* (2), 197–206.
- (29) Lima, L. M. P.; Delgado, R.; Drew, M. G. B.; Brandão, P.; Félix, V. Cyclam Derivatives Containing Three Acetate Pendant Arms: Synthesis, Acid–Base, Metal Complexation and Structural Studies. *Dalton Trans.* **2008**, No. 46, 6593–6608.
- (30) Lima, L. M. P.; Esteves, C. V.; Delgado, R.; Hermann, P.; Kotek, J.; Ševčíková, R.; Lubal, P. Tris(Phosphonomethyl) Cyclen Derivatives: Synthesis, Acid–Base Properties and Complexation Studies with Cu²⁺ and Zn²⁺ Ions. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, *2012* (15), 2533–2547.
- (31) Riedo, T. J.; Kaden, T. A. Metal Complexes with Macrocyclic Ligands. XIII. The Complexation of Cu²⁺ with Triazacycloalkanes. *Helv. Chim. Acta* **1979**, *62* (4), 1089–1096.
- (32) Pandya, D. N.; Kim, J. Y.; Park, J. C.; Lee, H.; Phapale, P. B.; Kwak, W.; Choi, T. H.; Cheon, G. J.; Yoon, Y.-R.; Yoo, J. Revival of TE2A; a Better Chelate for Cu(II) Ions than TETA? *Chem. Commun.* **2010**, *46* (20), 3517–3519.
- (33) Kotek, J.; Lubal, P.; Hermann, P.; Čisářová, I.; Lukeš, I.; Godula, T.; Svobodová, I.; Táborský, P.; Havel, J. High Thermodynamic Stability and Extraordinary Kinetic Inertness of Copper(II) Complexes with 1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecane-1,8-Bis(Methylphosphonic Acid): Example of a Rare Isomerism between Kinetically Inert Penta- and Hexacoordinated Copper(II) Complexes. *Chem. – Eur. J.* **2003**, *9* (1), 233–248.
- (34) Weisman, G. R.; Rogers, M. E.; Wong, E. H.; Jasinski, J. P.; Paight, E. S. Cross-Bridged Cyclam. Protonation and Lithium Cation (Li⁺) Complexation in a Diamond-Lattice Cleft. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112* (23), 8604–8605.
- (35) Wainwright, K. P. Bridging Alkylation of Saturated Polyaza Macrocycles: A Means for Imparting Structural Rigidity. *Inorg. Chem.* **1980**, *19* (5), 1396–1398.

- (36) Pandya, D. N.; Dale, A. V.; Kim, J. Y.; Lee, H.; Ha, Y. S.; An, G. I.; Yoo, J. New Macrobicyclic Chelator for the Development of Ultrastable ^{64}Cu -Radiolabeled Bioconjugate. *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23* (3), 330–335.
- (37) Bhatt, N.; Soni, N.; Ha, Y. S.; Lee, W.; Pandya, D. N.; Sarkar, S.; Kim, J. Y.; Lee, H.; Kim, S. H.; An, G. I.; Yoo, J. Phosphonate Pendant Armed Propylene Cross-Bridged Cyclam: Synthesis and Evaluation as a Chelator for Cu-64. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6* (11), 1162–1166.
- (38) Ferdani, R.; Stigers, D. J.; Fiamengo, A. L.; Wei, L.; Li, B. T. Y.; Golen, J. A.; Rheingold, A. L.; Weisman, G. R.; Wong, E. H.; Anderson, C. J. Synthesis, Cu(II) Complexation, ^{64}Cu -Labeling and Biological Evaluation of Cross-Bridged Cyclam Chelators with Phosphonate Pendant Arms. *Dalton Trans.* **2012**, *41* (7), 1938–1950.
- (39) Sun, X.; Wuest, M.; Weisman, G. R.; Wong, E. H.; Reed, D. P.; Boswell, C. A.; Motekaitis, R.; Martell, A. E.; Welch, M. J.; Anderson, C. J. Radiolabeling and In Vivo Behavior of Copper-64-Labeled Cross-Bridged Cyclam Ligands. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (2), 469–477.
- (40) Woodin, K. S.; Heroux, K. J.; Boswell, C. A.; Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Niu, W.; Tomellini, S. A.; Anderson, C. J.; Zakharov, L. N.; Rheingold, A. L. Kinetic Inertness and Electrochemical Behavior of Copper(II) Tetraazamacrocyclic Complexes: Possible Implications for in Vivo Stability. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, *2005* (23), 4829–4833.
- (41) Ferdani, R.; Stigers, D. J.; Fiamengo, A. L.; Wei, L.; Li, B. T. Y.; Golen, J. A.; Rheingold, A. L.; Weisman, G. R.; Wong, E. H.; Anderson, C. J. Synthesis, Cu(II) Complexation, ^{64}Cu -Labeling and Biological Evaluation of Cross-Bridged Cyclam Chelators with Phosphonate Pendant Arms. *Dalton Trans.* **2012**, *41* (7), 1938–1950.
- (42) Stigers, D. J.; Ferdani, R.; Weisman, G. R.; Wong, E. H.; Anderson, C. J.; Golen, J. A.; Moore, C.; Rheingold, A. L. A New Phosphonate Pendant-Armed Cross-Bridged Tetraamine Chelator Accelerates Copper(II) Binding for Radiopharmaceutical Applications. *Dalton Trans.* **2010**, *39* (7), 1699–1701.
- (43) Esmieu, C.; Guettas, D.; Conte-Daban, A.; Sabater, L.; Faller, P.; Hureau, C. Copper-Targeting Approaches in Alzheimer's Disease: How To Improve the Fallouts Obtained from in Vitro Studies. *Inorg. Chem.* **2019**, *58* (20), 13509–13527.
- (44) Lewis, J. S.; Windhorst, A. D.; Zeglis, B.; *Radiopharmaceutical Chemistry*. Eds.; Springer International Publishing, **2019**.
- (45) Treglia, G.; Sadeghi, R.; Del Sole, A.; Giovanella, L. Diagnostic Performance of PET/CT with Tracers Other than F-18-FDG in Oncology: An Evidence-Based Review. *Clin. Transl. Oncol.* **2014**, *16* (9), 770–775.
- (46) Pfeifer, A.; Knigge, U.; Mortensen, J.; Oturai, P.; Berthelsen, A. K.; Loft, A.; Binderup, T.; Rasmussen, P.; Elema, D.; Klausen, T. L.; Holm, S.; Benzon, E. von; Højgaard, L.; Kjaer, A. Clinical PET of Neuroendocrine Tumors Using ^{64}Cu -DOTATATE: First-in-Humans Study. *J. Nucl. Med.* **2012**, *53* (8), 1207–1215.

- (47) Locke, L. W.; Chordia, M. D.; Zhang, Y.; Kundu, B.; Kennedy, D.; Landseadel, J.; Xiao, L.; Fairchild, K. D.; Berr, S. S.; Linden, J.; Pan, D. A Novel Neutrophil-Specific PET Imaging Agent: CFLFLFK-PEG-64Cu. *J. Nucl. Med.* **2009**, *50* (5), 790–797.
- (48) Kas, A.; Migliaccio, R.; Tavitian, B. A Future for PET Imaging in Alzheimer's Disease. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2020**, *47* (2), 231–234.
- (49) Bravo, P. E.; Di Carli, M. F.; Dorbala, S. Role of PET to Evaluate Coronary Microvascular Dysfunction in Non-Ischemic Cardiomyopathies. *Heart Fail. Rev.* **2017**, *22* (4), 455–464.
- (50) Armelao, L.; Quici, S.; Barigelletti, F.; Accorsi, G.; Bottaro, G.; Cavazzini, M.; Tondello, E. Design of Luminescent Lanthanide Complexes: From Molecules to Highly Efficient Photo-Emitting Materials. *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254* (5), 487–505.
- (51) Shannon, R. D. Revised Effective Ionic Radii and Systematic Studies of Interatomic Distances in Halides and Chalcogenides. *Acta Crystallogr. Sect. A* **1976**, *32* (5), 751–767.
- (52) Nielsen, L. G.; Junker, A. K. R.; Sørensen, T. J. Composed in the F-Block: Solution Structure and Function of Kinetically Inert Lanthanide(III) Complexes. *Dalton Trans.* **2018**, *47* (31), 10360–10376.
- (53) Wahsner, J.; Gale, E. M.; Rodríguez-Rodríguez, A.; Caravan, P. Chemistry of MRI Contrast Agents: Current Challenges and New Frontiers. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (2), 957–1057.
- (54) Song, B.; Wu, Y.; Yu, M.; Zhao, P.; Zhou, C.; Kiefer, G. E.; Sherry, A. D. A Europium(III)-Based PARACEST Agent for Sensing Singlet Oxygen by MRI. *Dalton Trans.* **2013**, *42* (22), 8066–8069.
- (55) Hermann, P.; Kotek, J.; Kubíček, V.; Lukeš, I. Gadolinium(III) Complexes as MRI Contrast Agents: Ligand Design and Properties of the Complexes. *Dalton Trans.* **2008**, No. 23, 3027–3047.
- (56) Baum R. P.; Singh A.; Benesova, M.; Vermeulen C.; Gnesin S.; Köster U.; Johnston K.; Müller D., Senftleben S.; Kulkarni H. R.; Türler A.; Schibli R.; Prior J. O.; van der Meulen N. P.; Müller C.; Clinical evaluation of the radiolanthanide terbium-152: first-in-human PET/CT with 152 Tb-DOTATOC. *Dalton Trans.* **2017**, *46*, 14638-14646.
- (57) Tirscó, G.; Kovács, Z.; Sherry, A. D. Equilibrium and Formation/Dissociation Kinetics of Some LnIII-PCTA Complexes. *Inorg. Chem.* **2006**, *45* (23), 9269–9280.
- (58) Tirscó, G.; Kovács, Z.; Sherry, A. D. Equilibrium and Formation/Dissociation Kinetics of Some LnIII-PCTA Complexes. *Inorg. Chem.* **2006**, *45* (23), 9269–9280.
- (59) Sherry, A. D.; Caravan, P.; Lenkinski, R. Primer on gadolinium chemistry. *Journal of Magnetic Resonance Imaging.* **2009**, *30* (6), 1240-1248.
- (60) Nonat, A.; Gateau, C.; Fries, P. H.; Mazzanti, M. Lanthanide Complexes of a Picolinate Ligand Derived from 1,4,7-Triazacyclononane with Potential Application in Magnetic Resonance Imaging and Time-Resolved Luminescence Imaging. *Chem. – Eur. J.* **2006**, *12* (27), 7133–7150.
- (61) Regueiro-Figueroa, M.; Bensenane, B.; Ruscsák, E.; Esteban-Gómez, D.; Charbonnière, L. J.; Tirscó, G.; Tóth, I.; Blas, A. de; Rodríguez-Blas, T.; Platas-Iglesias, C. Lanthanide DOTA-like

- Complexes Containing a Picolinate Pendant: Structural Entry for the Design of Ln(III)-Based Luminescent Probes. *Inorg. Chem.* **2011**, *50* (9), 4125–4141.
- (62) theses.fr – Aline Nonat, Complexes de lanthanides (III) pour le développement de nouvelles sondes magnétiques et luminescentes
- (63) Rodríguez-Rodríguez, A.; Garda, Z.; Ruscák, E.; Esteban-Gómez, D.; Blas, A. de; Rodríguez-Blas, T.; Lima, L. M. P.; Beyler, M.; Tripier, R.; Tircsó, G.; Platas-Iglesias, C. Stable Mn²⁺, Cu²⁺ and Ln³⁺ Complexes with Cyclen-Based Ligands Functionalized with Picolinate Pendant Arms. *Dalton Trans.* **2015**, *44* (11), 5017–5031.
- (64) Rodríguez-Rodríguez, A.; Esteban-Gómez, D.; Tripier, R.; Tircsó, G.; Garda, Z.; Tóth, I.; de Blas, A.; Rodríguez-Blas, T.; Platas-Iglesias, C. Lanthanide(III) Complexes with a Reinforced Cyclam Ligand Show Unprecedented Kinetic Inertness. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (52), 17954–17957.
- (65) Bünzli, J.-C. G. Lanthanide Luminescence for Biomedical Analyses and Imaging. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (5), 2729–2755. e.
- (66) Weissman, S. I. Intramolecular Energy Transfer The Fluorescence of Complexes of Europium. *J. Chem. Phys.* **1942**, *10* (4), 214–217. <https://doi.org/10.1063/1.1723709>.
- (67) Crosby, G. A.; Whan, R. E.; Alire, R. M. Intramolecular Energy Transfer in Rare Earth Chelates. Role of the Triplet State. *J. Chem. Phys.* **1961**, *34* (3), 743–748.
- (68) Yang, C.; Fu, L.-M.; Wang, Y.; Zhang, J.-P.; Wong, W.-T.; Ai, X.-C.; Qiao, Y.-F.; Zou, B.-S.; Gui, L.-L. A Highly Luminescent Europium Complex Showing Visible-Light-Sensitized Red Emission: Direct Observation of the Singlet Pathway. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43* (38), 5010–5013.
- (69) Ward, M. D. Mechanisms of Sensitization of Lanthanide(III)-Based Luminescence in Transition Metal/Lanthanide and Anthracene/Lanthanide Dyads. *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254* (21), 2634–2642.
- (70) Hasegawa, Y.; Kitagawa, Y.; Nakanishi, T. Effective Photosensitized, Electrosensitized, and Mechanosensitized Luminescence of Lanthanide Complexes. *NPG Asia Mater.* **2018**, *10* (4), 52–70. <https://doi.org/10.1038/s41427-018-0012-y>.
- (71) Ning, Y.; Zhu, M.; Zhang, J.-L. Near-Infrared (NIR) Lanthanide Molecular Probes for Bioimaging and Biosensing. *Coord. Chem. Rev.* **2019**, *399*, 213028.
- (72) Bünzli, J.-C. G.; Chauvin, A.-S.; Kim, H. K.; Deiters, E.; Eliseeva, S. V. Lanthanide Luminescence Efficiency in Eight- and Nine-Coordinate Complexes: Role of the Radiative Lifetime. *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254* (21), 2623–2633.
- (73) Bünzli, J.-C. G.; Eliseeva, S. V. Basics of Lanthanide Photophysics. In *Lanthanide Luminescence: Photophysical, Analytical and Biological Aspects*; Hänninen, P., Härmä, H., Eds.; Springer Series on Fluorescence; Springer: Berlin, Heidelberg, 2011; pp 1–45.

- (74) Supkowski, R. M.; Horrocks, W. DeW. On the Determination of the Number of Water Molecules, q , Coordinated to Europium(III) Ions in Solution from Luminescence Decay Lifetimes. *Inorganica Chim. Acta* **2002**, *340*, 44–48.
- (75) Beeby, A.; Clarkson, I. M.; Dickins, R. S.; Faulkner, S.; Parker, D.; Royle, L.; Sousa, A. S. de; Williams, J. A. G.; Woods, M. Non-Radiative Deactivation of the Excited States of Europium, Terbium and Ytterbium Complexes by Proximate Energy-Matched OH, NH and CH Oscillators: An Improved Luminescence Method for Establishing Solution Hydration States. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1999**, No. 3, 493–504.
- (76) Liang, Z.; Chan, C.-F.; Liu, Y.; Wong, W.-T.; Lee, C.-S.; Law, G.-L.; Wong, K.-L. The Effects of the Increasing Number of the Same Chromophore on Photosensitization of Water-Soluble Cyclen-Based Europium Complexes with Potential for Biological Applications. *RSC Adv.* **2015**, *5* (18), 13347–13356.
- (77) Butler, S. J.; McMahon, B. K.; Pal, R.; Parker, D.; Walton, J. W. Bright Mono-Aqua Europium Complexes Based on Triazacyclononane That Bind Anions Reversibly and Permeate Cells Efficiently. *Chem. – Eur. J.* **2013**, *19* (29), 9511–9517.
- (78) Quici, S.; Marzanni, G.; Cavazzini, M.; Anelli, P. L.; Botta, M.; Gianolio, E.; Accorsi, G.; Armaroli, N.; Barigelletti, F. Highly Luminescent Eu³⁺ and Tb³⁺ Macrocyclic Complexes Bearing an Appended Phenanthroline Chromophore. *Inorg. Chem.* **2002**, *41* (10), 2777–2784.
- (79) Montgomery, C. P.; New, E. J.; Palsson, L. O.; Parker, D.; Batsanov, A. S.; Lamarque, L. Emissive and Cell-Permeable 3-Pyridyl- and 3-Pyrazolyl-4-Azaxanthone Lanthanide Complexes and Their Behaviour in Cellulo. *Helv. Chim. Acta* **2009**, *92* (11), 2186–2213.
- (80) Hemmilä, I.; Dakubu, S.; Mukkala, V.-M.; Siitari, H.; Lövgren, T. Europium as a Label in Time-Resolved Immunofluorometric Assays. *Anal. Biochem.* **1984**, *137* (2), 335–343.
- (81) Rainey, K. H.; Patterson, G. H. Photoswitching FRET to Monitor Protein–Protein Interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2019**, *116* (3), 864–873.
- (82) Hildebrandt, D. G.; Geibler D., Lanthanide Complexes in FRET Applications. *Current Inorganic Chemistry.* **2011**, *1*, 17-35.
- (83) Gunnlaugsson, T.; Leonard, J. P.; Sénéchal, K.; Harte, A. J. PH Responsive Eu(III)–Phenanthroline Supramolecular Conjugate: Novel “Off–On–Off” Luminescent Signaling in the Physiological PH Range. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (40), 12062–12063.
- (84) Parker, D.; Senanayake, P. K.; Williams, J. A. G. Luminescent Sensors for PH, PO₂, Halide and Hydroxide Ions Using Phenanthridine as a Photosensitiser in Macrocyclic Europium and Terbium Complexes. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1998**, No. 10, 2129–2140.
- (85) Poole, R. A.; Montgomery, C. P.; New, E. J.; Congreve, A.; Parker, D.; Botta, M. Identification of Emissive Lanthanide Complexes Suitable for Cellular Imaging That Resist Quenching by Endogenous Anti-Oxidants. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5* (13), 2055–2062.

- (86) Frias, J. C.; Bobba, G.; Cann, M. J.; Hutchison, C. J.; Parker, D. Luminescent Nonacoordinate Cationic Lanthanide Complexes as Potential Cellular Imaging and Reactive Probes. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1* (6), 905–907.
- (87) A. Poole, R.; Bobba, G.; J. Cann, M.; Frias, J.-C.; Parker, D.; D. Peacock, R. Synthesis and Characterisation of Highly Emissive and Kinetically Stable Lanthanide Complexes Suitable for Usage ‘in Cellulo.’ *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3* (6), 1013–1024.
- (88) Yu, J.; Parker, D.; Pal, R.; Poole, R. A.; Cann, M. J. A Europium Complex That Selectively Stains Nucleoli of Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (7), 2294–2299.
- (89) Montgomery, C. P.; Parker, D.; Lamarque, L. Effective and Efficient Sensitisation of Terbium Luminescence at 355 Nm with Cell Permeable Pyrazoyl-1-Azaxanthone Macrocyclic Complexes. *Chem. Commun.* **2007**, No. 37, 3841–3843.
- (90) Montgomery, C. P.; New, E. J.; Palsson, L. O.; Parker, D.; Batsanov, A. S.; Lamarque, L. Emissive and Cell-Permeable 3-Pyridyl- and 3-Pyrazoyl-4-Azaxanthone Lanthanide Complexes and Their Behaviour in Cellulo. *Helv. Chim. Acta* **2009**, *92* (11), 2186–2213.
- (91) Poole, R. A.; Bobba, G.; Cann, M. J.; Frias, J.-C.; Parker, D.; Peacock, R. D. Synthesis and Characterisation of Highly Emissive and Kinetically Stable Lanthanide Complexes Suitable for Usage ‘in Cellulo.’ *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3* (6), 1013–1024.
- (92) Butler, S. J.; Lamarque, L.; Pal, R.; Parker, D. EuroTracker Dyes: Highly Emissive Europium Complexes as Alternative Organelle Stains for Live Cell Imaging. *Chem. Sci.* **2014**, *5* (5), 1750–1756.
- (93) Butler, S. J.; Delbianco, M.; Lamarque, L.; McMahon, B. K.; Neil, E. R.; Pal, R.; Parker, D.; Walton, J. W.; Zwier, J. M. EuroTracker® Dyes: Design, Synthesis, Structure and Photophysical Properties of Very Bright Europium Complexes and Their Use in Bioassays and Cellular Optical Imaging. *Dalton Trans.* **2015**, *44* (11), 4791–4803.
- (94) Jin, G.-Q.; Ning, Y.; Geng, J.-X.; Jiang, Z.-F.; Wang, Y.; Zhang, J.-L. Joining the Journey to near Infrared (NIR) Imaging: The Emerging Role of Lanthanides in the Designing of Molecular Probes. *Inorg. Chem. Front.* **2020**, *7* (2), 289–299.
- (95) Ishizawa, T.; Fukushima, N.; Shibahara, J.; Masuda, K.; Tamura, S.; Aoki, T.; Hasegawa, K.; Beck, Y.; Fukayama, M.; Kokudo, N. Real-Time Identification of Liver Cancers by Using Indocyanine Green Fluorescent Imaging. *Cancer* **2009**, *115* (11), 2491–2504.
- (96) Gila-Bohórquez, A.; Gómez-Mencheró, J.; García-Moreno, J. L.; Suárez-Grau, J. M.; Guadalajara-Jurado, J. F. Utility of Indocyanine Green for Intra-Operative Localization of Ureter in Complex Colo-Rectal Surgery. *Cir. Esp. Engl. Ed.* **2019**, *97* (4), 233–234..
- (97) Charbonnière, L. J.; Weibel, N.; Estournes, C.; Leuvrey, C.; Ziessel, R. Spatial and Temporal Discrimination of Silica Particles Functionalised with Luminescent Lanthanide Markers Using Time-Resolved Luminescence Microscopy. *New J. Chem.* **2004**, *28* (7), 777–781. (98) Jiang, H.; Wang, G.; Zhang, W.; Liu, X.; Ye, Z.; Jin, D.; Yuan, J.; Liu, Z. Preparation and Time-Resolved

- Luminescence Bioassay Application of Multicolor Luminescent Lanthanide Nanoparticles. *J. Fluoresc.* **2010**, *20* (1), 321–328.
- (99) Bünzli, J.-C. G.; Piguet, C. Taking Advantage of Luminescent Lanthanide Ions. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34* (12), 1048–1077.
- (100) Horrocks, W. D.; Sudnick, D. R. Time-Resolved Europium(III) Excitation Spectroscopy: A Luminescence Probe of Metal Ion Binding Sites. *Science* **1979**, *206* (4423), 1194–1196.
- (101) Comby, S.; Tuck, S. A.; Truman, L. K.; Kotova, O.; Gunnlaugsson, T. New Trick for an Old Ligand! The Sensing of Zn(II) Using a Lanthanide Based Ternary Yb(III)-Cyclen-8-Hydroxyquinoline System As a Dual Emissive Probe for Displacement Assay. *Inorg. Chem.* **2012**, *51* (19), 10158–10168.
- (102) Göppert-Mayer M.; Elementary processes with two quantum transitions - Göppert-Mayer - 2009 - *Annalen der Physik*.
- (103) Kaiser W.; Garrett G. B.; Two-Photon Excitation in CaF₂: Eu²⁺. *Phys. Rev. Lett.* **1961**, *7*, 229.
- (104) Pawlicki, M.; Collins, H. A.; Denning, R. G.; Anderson, H. L. Two-Photon Absorption and the Design of Two-Photon Dyes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (18), 3244–3266.
- (105) So, P. T. C.; Dong, C. Y.; Masters, B. R.; Berland, K. M. Two-Photon Excitation Fluorescence Microscopy. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2000**, *2* (1), 399–429.
- (106) Zipfel, W. R.; Williams, R. M.; Webb, W. W. Nonlinear Magic: Multiphoton Microscopy in the Biosciences. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21* (11), 1369–1377.
- (107) Picot, A.; D'Aléo, A.; Baldeck, P. L.; Grichine, A.; Duperray, A.; Andraud, C.; Maury, O. Long-Lived Two-Photon Excited Luminescence of Water-Soluble Europium Complex: Applications in Biological Imaging Using Two-Photon Scanning Microscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (5), 1532–1533.
- (108) D'Aléo, A.; Allali, M.; Picot, A.; Baldeck, P. L.; Toupet, L.; Andraud, C.; Maury, O. Sensitization of Eu(III) luminescence by donor-phenylethynyl-functionalized DTPA and DO3A macrocycles. *Compte Rendus Chimie.* **2010**, *13* (6-7), 681-690.
- (109) Walton, J. W.; Bourdolle, A.; Butler, S. J.; Soulie, M.; Delbianco, M.; McMahon, B. K.; Pal, R.; Puschmann, H.; Zwier, J. M.; Lamarque, L.; Maury, O.; Andraud, C.; Parker, D. Very Bright Europium Complexes That Stain Cellular Mitochondria. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (16), 1600–1602.
- (110) Bui, N. A. T. Luminescence de Complexes de Lanthanide Par Effet d'antenne à Deux Photons : Vers l'imagerie Fonctionnelle. thesis, Lyon, **2016**.
- (111) Supkowski, R. M.; Horrocks, W. DeW. On the Determination of the Number of Water Molecules, q, Coordinated to Europium(III) Ions in Solution from Luminescence Decay Lifetimes. *Inorganica Chim. Acta* **2002**, *340*, 44–48.

- (112) Bui, A. T.; Beyler, M.; Liao, Y.-Y.; Grichine, A.; Duperray, A.; Mulatier, J.-C.; Guennic, B. L.; Andraud, C.; Maury, O.; Tripier, R. Cationic Two-Photon Lanthanide Bioprobes Able to Accumulate in Live Cells. *Inorg. Chem.* **2016**, *55* (14), 7020–7025.
- (113) Bui, A. T.; Beyler, M.; Liao, Y.-Y.; Grichine, A.; Duperray, A.; Mulatier, J.-C.; Guennic, B. L.; Andraud, C.; Maury, O.; Tripier, R. Cationic Two-Photon Lanthanide Bioprobes Able to Accumulate in Live Cells. *Inorg. Chem.* **2016**, *55* (14), 7020–7025.
- (114) Zhang, T.; Zhu, X.; Cheng, C. C. W.; Kwok, W.-M.; Tam, H.-L.; Hao, J.; Kwong, D. W. J.; Wong, W.-K.; Wong, K.-L. Water-Soluble Mitochondria-Specific Ytterbium Complex with Impressive NIR Emission. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (50), 20120–20122.
- (115) Piszczek, G.; Maliwal, B. P.; Gryczynski, I.; Dattelbaum, J.; Lakowicz, J. R. Multiphoton Ligand-Enhanced Excitation of Lanthanides. *J. Fluoresc.* **2001**, *11* (2), 101–107.
- (116) D'Aléo, A.; Bourdolle, A.; Brustlein, S.; Fauquier, T.; Grichine, A.; Duperray, A.; Baldeck, P. L.; Andraud, C.; Brasselet, S.; Maury, O. Ytterbium-Based Bioprobes for Near-Infrared Two-Photon Scanning Laser Microscopy Imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (27), 6622–6625.
- (117) Picot, A.; D'Aléo, A.; Baldeck, P. L.; Grichine, A.; Duperray, A.; Andraud, C.; Maury, O. Long-Lived Two-Photon Excited Luminescence of Water-Soluble Europium Complex: Applications in Biological Imaging Using Two-Photon Scanning Microscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (5), 1532–1533.
- (118) Placide, V.; Bui, A. T.; Grichine, A.; Duperray, A.; Pitrat, D.; Andraud, C.; Maury, O. Two-Photon Multiplexing Bio-Imaging Using a Combination of Eu- and Tb-Bioprobes. *Dalton Trans.* **2015**, *44* (11), 4918–4924.
- (119) Bui, A. T.; Beyler, M.; Grichine, A.; Duperray, A.; Mulatier, J.-C.; Guyot, Y.; Andraud, C.; Tripier, R.; Brasselet, S.; Maury, O. Near Infrared Two Photon Imaging Using a Bright Cationic Yb(III) Bioprobe Spontaneously Internalized into Live Cells. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (44), 6005–6008.
- (120) Bourdolle, A.; Allali, M.; Mulatier, J.-C.; Le Guennic, B.; Zwier, J. M.; Baldeck, P. L.; Bünzli, J.-C. G.; Andraud, C.; Lamarque, L.; Maury, O. Modulating the Photophysical Properties of Azamacrocyclic Europium Complexes with Charge-Transfer Antenna Chromophores. *Inorg. Chem.* **2011**, *50* (11), 4987–4999.
- (121) Bourdolle, A.; Allali, M.; Mulatier, J.-C.; Le Guennic, B.; Zwier, J. M.; Baldeck, P. L.; Bünzli, J.-C. G.; Andraud, C.; Lamarque, L.; Maury, O. Modulating the Photophysical Properties of Azamacrocyclic Europium Complexes with Charge-Transfer Antenna Chromophores. *Inorg. Chem.* **2011**, *50* (11), 4987–4999.
- (122) D'Aléo, A.; Picot, A.; Baldeck, P. L.; Andraud, C.; Maury, O. Design of Dipicolinic Acid Ligands for the Two-Photon Sensitized Luminescence of Europium Complexes with Optimized Cross-Sections. *Inorg. Chem.* **2008**, *47* (22), 10269–10279.

- (123) Monnereau, C.; Blart, E.; Odobel, F. A Cheap and Efficient Method for Selective Para-Iodination of Aniline Derivatives. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46* (32), 5421–5423.
- (124) Bensoussan, C.; Rival, N.; Hanquet, G.; Colobert, F.; Reymond, S.; Cossy, J. Iron-Catalyzed Cross-Coupling between C-Bromo Mannopyranoside Derivatives and a Vinyl Grignard Reagent: Toward the Synthesis of the C31–C52 Fragment of Amphidinol 3. *Tetrahedron* **2013**, *69* (36), 7759–7770.
- (125) Moore, E. G.; Xu, J.; Dodani, S. C.; Jocher, C. J.; D'Aléo, A.; Seitz, M.; Raymond, K. N. 1-Methyl-3-Hydroxy-Pyridin-2-One Complexes of Near Infra-Red Emitting Lanthanides: Efficient Sensitization of Yb(III) and Nd(III) in Aqueous Solution. *Inorg. Chem.* **2010**, *49* (9), 4156–4166.
- (126) Comby, S.; Imbert, D.; Vandevyver, C.; Bünzli, J.-C. Novel Strategy for the Design of 8-Hydroxyquinolate-Based Lanthanide Bioprobes That Emit in the Near Infrared Range. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13* (3), 936–944.
- (127) Ning, Y.; Tang, J.; Liu, Y.-W.; Jing, J.; Sun, Y.; Zhang, J.-L. Highly Luminescent, Biocompatible Ytterbium(III) Complexes as near-Infrared Fluorophores for Living Cell Imaging. *Chem. Sci.* **2018**, *9* (15), 3742–3753.
- (128) Butler, S. J.; Delbianco, M.; Lamarque, L.; McMahon, B. K.; Neil, E. R.; Pal, R.; Parker, D.; Walton, J. W.; Zwier, J. M. EuroTracker® Dyes: Design, Synthesis, Structure and Photophysical Properties of Very Bright Europium Complexes and Their Use in Bioassays and Cellular Optical Imaging. *Dalton Trans.* **2015**, *44* (11), 4791–4803.
- (129) 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.
- (130) Le Bars, D. Fluorine-18 and Medical Imaging: Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography. *J. Fluor. Chem.* **2006**, *127* (11), 1488–1493.
- (131) Chang, J. M.; Lee, H. J.; Goo, J. M.; Lee, H.-Y.; Lee, J. J.; Chung, J.-K.; Im, J.-G. False Positive and False Negative FDG-PET Scans in Various Thoracic Diseases. *Korean J. Radiol.* **2006**, *7* (1), 57–69.
- (132) Santhanam, P.; Taïeb, D. Role of ¹⁸F-FDOPA PET/CT Imaging in Endocrinology. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **2014**, *81* (6), 789–798.
- (133) Buddhist Tzu Chi General Hospital. *Comparative Evaluation of Metastatic Lesions From Prostate Carcinoma With ¹⁸F-NaF and ¹⁸F-Fluorocholine PET/CT*; Clinical trial registration NCT04340765; clinicaltrials.gov, 2020.
- (134) Britz-Cunningham, S. H.; Adelstein, S. J. Molecular Targeting with Radionuclides: State of the Science. *J. Nucl. Med.* **2003**, *44* (12), 1945–1961.
- (135) Price, E. W.; Orvig, C. Matching Chelators to Radiometals for Radiopharmaceuticals. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *43* (1), 260–290.

- (136) Moi, M. K.; Meares, C. F.; McCall, M. J.; Cole, W. C.; DeNardo, S. J. Copper Chelates as Probes of Biological Systems: Stable Copper Complexes with a Macrocyclic Bifunctional Chelating Agent. *Anal. Biochem.* **1985**, *148* (1), 249–253.
- (137) Ferdani, R.; J. Stigers, D.; L. Fiamengo, A.; Wei, L.; Y. Li, B. T.; A. Golen, J.; L. Rheingold, A.; R. Weisman, G.; H. Wong, E.; J. Anderson, C. Synthesis, Cu(II) Complexation, ⁶⁴Cu-Labeling and Biological Evaluation of Cross-Bridged Cyclam Chelators with Phosphonate Pendant Arms. *Dalton Trans.* **2012**, *41* (7), 1938–1950.
- (138) Ning, X.; Guo, J.; Wolfert, M. A.; Boons, G.-J. Visualizing Metabolically Labeled Glycoconjugates of Living Cells by Copper-Free and Fast Huisgen Cycloadditions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (12), 2253–2255.
- (139) Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (46), 15046–15047.
- (140) 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.
- (141) Seibold, U.; Wängler, B.; Schirmacher, R.; Wängler, C. Bimodal Imaging Probes for Combined PET and OI: Recent Developments and Future Directions for Hybrid Agent Development <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/153741/> (accessed Feb 24, 2020).
- (142) Zhang, Y.; Hong, H.; Engle, J. W.; Yang, Y.; Barnhart, T. E.; Cai, W. Positron Emission Tomography and Near-Infrared Fluorescence Imaging of Vascular Endothelial Growth Factor with Dual-Labeled Bevacizumab. *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2011**, *2* (1), 1–13.
- (143) Zhang, Y.; Hong, H.; Engle, J. W.; Yang, Y.; Theuer, C. P.; Barnhart, T. E.; Cai, W. Positron Emission Tomography and Optical Imaging of Tumor CD105 Expression with a Dual-Labeled Monoclonal Antibody. *Mol. Pharm.* **2012**, *9* (3), 645–653. <https://doi.org/10.1021/mp200592m>.
- (144) Halime, Z.; Frindel, M.; Camus, N.; Orain, P.-Y.; Lacombe, M.; Chérel, M.; Gestin, J.-F.; Faivre-Chauvet, A.; Tripier, R. New Synthesis of Phenyl-Isothiocyanate C-Functionalised Cyclams. Bioconjugation and ⁶⁴Cu Phenotypic PET Imaging Studies of Multiple Myeloma with the Te2a Derivative. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (46), 11302–11314.
- (145) Filali, A.; Yaouanc, J.-J.; Handel, H. Stoichiometric Mono N-Functionalization of Tetraazamacrocycles via Phosphoryl-Protected Intermediates. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30* (5), 560–561.
- (146) Frindel, M.; Camus, N.; Rauscher, A.; Bourgeois, M.; Alliot, C.; Barré, L.; Gestin, J.-F.; Tripier, R.; Faivre-Chauvet, A. Radiolabeling of HTE1PA: A New Monopicolinate Cyclam Derivative for Cu-64 Phenotypic Imaging. In Vitro and in Vivo Stability Studies in Mice. *Nucl. Med. Biol.* **2014**, *41*, e49–e57.

- (147) McKeown, S. R. Defining Normoxia, Physoxia and Hypoxia in Tumours—Implications for Treatment Response. *Br. J. Radiol.* **2014**, *87* (1035), 20130676.
- (148) Horsman, M. R.; Mortensen, L. S.; Petersen, J. B.; Busk, M.; Overgaard, J. Imaging Hypoxia to Improve Radiotherapy Outcome. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2012**, *9* (12), 674–687.
- (149) McDonald, P. C.; Winum, J.-Y.; Supuran, C. T.; Dedhar, S. Recent Developments in Targeting Carbonic Anhydrase IX for Cancer Therapeutics. *Oncotarget* **2012**, *3* (1), 84–97.
- (150) Kizaka-Kondoh, S.; Konse-Nagasawa, H. Significance of Nitroimidazole Compounds and Hypoxia-Inducible Factor-1 for Imaging Tumor Hypoxia. *Cancer Sci.* **2009**, *100* (8), 1366–1373.
- (151) van Loon, J.; Janssen, M. H. M.; Öllers, M.; Aerts, H. J. W. L.; Dubois, L.; Hochstenbag, M.; Dingemans, A.-M. C.; Lalisang, R.; Brans, B.; Windhorst, B.; van Dongen, G. A.; Kolb, H.; Zhang, J.; De Ruyscher, D.; Lambin, P. PET Imaging of Hypoxia Using [18F]HX4: A Phase I Trial. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2010**, *37* (9), 1663–1668.
- (152) Fleming, I. N.; Manavaki, R.; Blower, P. J.; West, C.; Williams, K. J.; Harris, A. L.; Domarkas, J.; Lord, S.; Baldry, C.; Gilbert, F. J. Imaging Tumour Hypoxia with Positron Emission Tomography. *Br. J. Cancer* **2015**, *112* (2), 238–250.
- (153) Vävere, A. L.; Lewis, J. S. Examining the Relationship between Cu-ATSM Hypoxia Selectivity and Fatty Acid Synthase Expression in Human Prostate Cancer Cell Lines. *Nucl. Med. Biol.* **2008**, *35* (3), 273–279. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2007.11.012>.
- (154) Lima, L. M. P.; Esteban-Gómez, D.; Delgado, R.; Platas-Iglesias, C.; Tripier, R. Monopicolinate Cyclen and Cyclam Derivatives for Stable Copper(II) Complexation. *Inorg. Chem.* **2012**, *51* (12), 6916–6927.
- (155) Kelkar, S. S.; Reineke, T. M. Theranostics: Combining Imaging and Therapy. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22* (10), 1879–1903.
- (156) Peptide Receptor Radionuclide Therapy Administered to Participants With Meningioma With ⁶⁷Cu-SARTATE™ - Full Text View - ClinicalTrials.gov <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03936426> (accessed Apr 6, 2020).
- (157) Plaetzer, K.; Krammer, B.; Berlanda, J.; Berr, F.; Kiesslich, T. Photophysics and Photochemistry of Photodynamic Therapy: Fundamental Aspects. *Lasers Med. Sci.* **2009**, *24* (2), 259–268.
- (158) Benov, L. Photodynamic Therapy: Current Status and Future Directions. *Med. Princ. Pract.* **2015**, *24* (Suppl. 1), 14–28.
- (159) Usuda, J.; Kato, H.; Okunaka, T.; Furukawa, K.; Tsutsui, H.; Yamada, K.; Suga, Y.; Honda, H.; Nagatsuka, Y.; Ohira, T.; Tsuboi, M.; Hirano, T. Photodynamic Therapy (PDT) for Lung Cancers. *J. Thorac. Oncol.* **2006**, *1* (5), 489–493.
- (160) Patrice, T.; Rousset, N.; Bourré, L.; Thibaud, S. Sensitizers in Photodynamic Therapy. In *Photodynamic Therapy*; 2003; pp 59–80.

- (161) Khurana, M.; Collins, H. A.; Karotki, A.; Anderson, H. L.; Cramb, D. T.; Wilson, B. C. Quantitative In Vitro Demonstration of Two-Photon Photodynamic Therapy Using Photofrin® and Visudyne®. *Photochem. Photobiol.* **2007**, *83* (6), 1441–1448.
- (162) Balaz, M.; Collins, H. A.; Dahlstedt, E.; Anderson, H. L. Synthesis of Hydrophilic Conjugated Porphyrin Dimers for One-Photon and Two-Photon Photodynamic Therapy at NIR Wavelengths. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7* (5), 874–888.
- (163) Dahlstedt, E.; Collins, H. A.; Balaz, M.; Kuimova, M. K.; Khurana, M.; Wilson, B. C.; Phillips, D.; Anderson, H. L. One- and Two-Photon Activated Phototoxicity of Conjugated Porphyrin Dimers with High Two-Photon Absorption Cross Sections. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7* (5), 897–904.
- (164) Collins, H. A.; Khurana, M.; Moriyama, E. H.; Mariampillai, A.; Dahlstedt, E.; Balaz, M.; Kuimova, M. K.; Drobizhev, M.; Yang, V. X. D.; Phillips, D.; Rebane, A.; Wilson, B. C.; Anderson, H. L. Blood-Vessel Closure Using Photosensitizers Engineered for Two-Photon Excitation. *Nat. Photonics* **2008**, *2* (7), 420–424.
- (165) Gallavardin, T.; Maurin, M.; Marotte, S.; Simon, T.; Gabudean, A.-M.; Bretonnière, Y.; Lindgren, M.; Lerouge, F.; Baldeck, P. L.; Stéphan, O.; Leverrier, Y.; Marvel, J.; Parola, S.; Maury, O.; Andraud, C. Photodynamic Therapy and Two-Photon Bio-Imaging Applications of Hydrophobic Chromophores through Amphiphilic Polymer Delivery. *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* **2011**, *10* (7), 1216–1225.
- (166) Cepraga, C.; Gallavardin, T.; Marotte, S.; Lanoe, P.-H.; Mulatier, J.-C.; Lerouge, F.; Parola, S.; Lindgren, M.; Baldeck, P.; Marvel, J.; Maury, O.; Monnereau, C.; Favier, A.; Andraud, C.; Leverrier, Y.; Charreyre, M.-T. Biocompatible Well-Defined Chromophore-Polymer Conjugates for Photodynamic Therapy and Two-Photon Imaging. *Polym. Chem.* **2013**, *4*, 61–67.
- (167) Lee, S.-M.; Park, H.; Choi, J.-W.; Park, Y. N.; Yun, C.-O.; Yoo, K.-H. Multifunctional Nanoparticles for Targeted Chemophotothermal Treatment of Cancer Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (33), 7581–7586.
- (168) Tripathi, S. K.; Kaur, G.; Khurana, R. K.; Kapoor, S.; Singh, B. Quantum Dots and Their Potential Role in Cancer Theranostics. *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* **2015**, *32* (6).
- (169) Ma, Y.; Mou, Q.; Wang, D.; Zhu, X.; Yan, D. Dendritic Polymers for Theranostics. *Theranostics* **2016**, *6* (7), 930–947.
- (170) Li, G.; Slansky, A.; Dobhal, M. P.; Goswami, L. N.; Graham, A.; Chen, Y.; Kanter, P.; Alberico, R. A.; Spornyak, J.; Morgan, J.; Mazurchuk, R.; Oseroff, A.; Grossman, Z.; Pandey, R. K. Chlorophyll-a Analogues Conjugated with Aminobenzyl-DTPA as Potential Bifunctional Agents for Magnetic Resonance Imaging and Photodynamic Therapy. *Bioconjug. Chem.* **2005**, *16* (1), 32–42.
- (171) Alam, M. M.; Bolze, F.; Daniel, C.; Flamigni, L.; Gourlaouen, C.; Heitz, V.; Jenni, S.; Schmitt, J.; Sour, A.; Ventura, B. π -Extended Diketopyrrolopyrrole–Porphyrin Arrays: One- and Two-

- Photon Photophysical Investigations and Theoretical Studies. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18* (31), 21954–21965.
- (172) Schmitt, J.; Heitz, V.; Sour, A.; Bolze, F.; Ftouni, H.; Nicoud, J.-F.; Flamigni, L.; Ventura, B. Diketopyrrolopyrrole-Porphyrin Conjugates with High Two-Photon Absorption and Singlet Oxygen Generation for Two-Photon Photodynamic Therapy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54* (1), 169–173.
- (173) Schmitt, J.; Heitz, V.; Sour, A.; Bolze, F.; Kessler, P.; Flamigni, L.; Ventura, B.; Bonnet, C. S.; Tóth, É. A Theranostic Agent Combining a Two-Photon-Absorbing Photosensitizer for Photodynamic Therapy and a Gadolinium(III) Complex for MRI Detection. *Chem. – Eur. J.* **2016**, *22* (8), 2775–2786.
- (174) Schmitt, J.; Jenni, S.; Sour, A.; Heitz, V.; Bolze, F.; Pallier, A.; Bonnet, C. S.; Tóth, É.; Ventura, B. A Porphyrin Dimer–GdDOTA Conjugate as a Theranostic Agent for One- and Two-Photon Photodynamic Therapy and MRI. *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29* (11), 3726–3738.
- (175) Entract, G. M.; Bryden, F.; Domarkas, J.; Savoie, H.; Allott, L.; Archibald, S. J.; Cawthorne, C.; Boyle, R. W. Development of PDT/PET Theranostics: Synthesis and Biological Evaluation of an ¹⁸F-Radiolabeled Water-Soluble Porphyrin. *Mol. Pharm.* **2015**, *12* (12), 4414–4423.
- (176) Price, T.; Yap, S.; Gillet, R.; Savoie, H.; Charbonnière, L.; Boyle, R.; Nonat, A.; Stasiuk, G. J. Evaluation of a Bispidine-Based Chelator for Gallium-68 and of the Porphyrin Conjugate as PET/PDT Theranostic Agent. *Chem. – Eur. J.* *n/a* (n/a).
- (177) Rudine, A. B.; Walter, M. G.; Wamser, C. C. Reaction of Dichloromethane with Pyridine Derivatives under Ambient Conditions. *J. Org. Chem.* **2010**, *75* (12), 4292–4295.
- (178) Bandoli, G.; Dolmella, A.; Tisato, F.; Porchia, M.; Refosco, F. Mononuclear Six-Coordinated Ga(III) Complexes: A Comprehensive Survey. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253* (1), 56–77.
- (179) Luong, H. V. T.; Liu, J. C. Flotation Separation of Gallium from Aqueous Solution – Effects of Chemical Speciation and Solubility. *Sep. Purif. Technol.* **2014**, *132*, 115–119.
- (180) Sun, Y.; Anderson, C. J.; Pajeau, T. S.; Reichert, D. E.; Hancock, R. D.; Motekaitis, R. J.; Martell, A. E.; Welch, M. J. Indium(III) and Gallium(III) Complexes of Bis(Aminoethanethiol) Ligands with Different Denticities: Stabilities, Molecular Modeling, and in Vivo Behavior. *J. Med. Chem.* **1996**, *39* (2), 458–470.
- (181) Kubíček, V.; Havlíčková, J.; Kotek, J.; Tircsó, G.; Hermann, P.; Tóth, É.; Lukeš, I. Gallium(III) Complexes of DOTA and DOTA–Monoamide: Kinetic and Thermodynamic Studies. *Inorg. Chem.* **2010**, *49* (23), 10960–10969.
- (182) Clarke, E. T.; Martell, A. E. Stabilities of Trivalent Metal Ion Complexes of the Tetraacetate Derivatives of 12-, 13- and 14-Membered Tetraazamacrocycles. *Inorganica Chim. Acta* **1991**, *190* (1), 37–46.
- (183) Ambrosini, V.; Campana, D.; Tomassetti, P.; Grassetto, G.; Rubello, D.; Fanti, S. PET/CT with ⁶⁸Gallium-DOTA-Peptides in NET: An Overview. *Eur. J. Radiol.* **2011**, *80* (2), e116–e119.

- (184) FDA approves first gallium ^{68}Ga -Dotatate radiopharmaceutical tracer for PET imaging of neuroendocrine tumors <https://appliedradiology.com/articles/fda-approves-first-gallium-68ga-dotatate-radiopharmaceutical-tracer-for-pet-imaging-of-neuroendocrine-tumors>
- (185) Another Neuroendocrine Tumor Imaging Agent Approved by FDA <https://netrf.org/2019/08/22/gallium-68-dotatoc-approved-by-fda/>
- (186) Bernhard, C.; Goze, C.; Rousselin, Y.; Denat, F. First Bodipy–DOTA Derivatives as Probes for Bimodal Imaging. *Chem. Commun.* **2009**, *46* (43), 8267–8269.
- (187) 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.
- (188) 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.
- (189) Zhang, H.; Desai, P.; Koike, Y.; Houghton, J.; Carlin, S.; Tandon, N.; Touijer, K.; Weber, W. A. Dual-Modality Imaging of Prostate Cancer with a Fluorescent and Radiogallium-Labeled Gastrin-Releasing Peptide Receptor Antagonist. *J. Nucl. Med.* **2017**, *58* (1), 29–35.
- (190) Renard, E.; Dancer, P.-A.; Portal, C.; Denat, F.; Prignon, A.; Goncalves, V. Design of Bimodal Ligands of Neurotensin Receptor 1 for Positron Emission Tomography Imaging and Fluorescence-Guided Surgery of Pancreatic Cancer. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (5), 2426–2433.
- (191) Mato-Iglesias, M.; Roca-Sabio, A.; Pálinkás, Z.; Esteban-Gómez, D.; Platas-Iglesias, C.; Tóth, É.; de Blas, A.; Rodríguez-Blas, T. Lanthanide Complexes Based on a 1,7-Diaza-12-Crown-4 Platform Containing Picolinate Pendants: A New Structural Entry for the Design of Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents. *Inorg. Chem.* **2008**, *47* (17), 7840–7851.

Production scientifique

Publication

Cationic Biphotonic Lanthanide Luminescent Bioprobes Based on Functionalized Cross-Bridged Cyclam Macrocycles.

J. Mendy, A.T. Bui, A. Roux, J.C. Mulatier, D. Curton, A. Duperray, A. Grichine, Y. Guyot, S. Brasselet, François Riobé, C. Andraud, B. Le Guennic, V. Patinec, R. Tripier, M. Beyler and O. Maury, *ChemPhysChem*, **2020**, *21*, 1036-1043.

Communications par affiche

New PET/PDT Theranostic Agents Based on Monopicolinate Cyclams

Journées Scientifiques 2017 de la Société Chimique de France, Section Bretagne Pays de Loire, 2-5 Mai 2017, Le Mans

New PET/PDT Theranostic Agents Based on Monopicolinate Cyclams

6^{èmes} journées du Groupe Polyamines, GPOL 2017, Roscoff, 10-12 juillet 2017

New Copper(II) Complexes Based On Monopicolinate Cyclam: Towards PET/PDT Applications

Le Studium, Orléans, 11-13 Décembre 2017

Nouveaux Complexes de Cu(II) à Base de Cyclam Fonctionnalisés pour des Applications Multimodales TEP/Imagerie Optique et TEP/PDT

Journées de Chimie de Coordination, 8-9 Février 2018

Communications orales

New picolinate cross-bridged Yb(III) complex for two-photon microscopy

Krutyn, Pologne, IKSS Summer School, Mai 2018

Picolinate based cyclam derivatives for applications in optical imaging and PET/Optical Imaging

Cancéropole Grand Ouest, Le Bono, 26-29 Septembre 2018

Picolinate based cyclam derivatives for applications in optical imaging and PET/IO

Journée de l'Ecole Doctorale, Rennes, 29 Octobre 2018

Titre : Nouveaux chélates dérivés du cyclam pour des applications en diagnostic et/ou thérapie des cancers

Mots clés : polyazamacrocycle, cyclam, complexe de coordination, microscopie biphotonique, imagerie bimodale, théranostique

Résumé : Le travail de thèse a consisté au développement de chélates dérivés du cyclam *N*-fonctionnalisés par des groupements picolinate π -étendus donnant accès à des complexes luminescents pour des applications en imagerie médicale et/ou en thérapie. Pour une application en microscopie biphotonique, un complexe d' Yb^{3+} basé sur le cyclam renforcé substitué par deux unités picolinate π -étendues a été synthétisé. La présence simultanée d'un ion lanthanide émettant dans le NIR et d'une antenne permettant l'absorption à deux photons, a donné lieu à des images cellulaires par microscopie biphotonique dans le canal NIR-vers-NIR.

Les propriétés luminescentes des antennes picolinate π -conjuguées ont également été mises à profit pour le développement de sondes bimodales TEP/imagerie optique. Des ligands à base de cyclam ont été fonctionnalisés par un fluorophore picolinate et ont servi à la complexation du Cu^{2+} qui

possède un isotope émetteur β^+ . Si le radiomarquage des ligands au $^{64}\text{Cu}^{2+}$ a pu être réalisé, les études spectroscopiques des complexes de Cu^{2+} ont montré que le métal inhibe les propriétés luminescentes du fluorophore. Toutefois, des études préliminaires montrent que le Ga^{3+} , possédant également un isotope émetteur β^+ , s'avère être une alternative pertinente au Cu^{2+} . Enfin, la substitution du système π -conjugué par une unité dibromobenzène permet d'avoir accès à un photosensibilisateur capable de générer de l'oxygène singulet cytotoxique pour une application en thérapie photodynamique (PDT). Ce type de photosensibilisateur peut lui aussi être introduit sur l'entité picolinate des dérivés du cyclam donnant accès à des chélates de Cu^{2+} pour une application en théranostique TEP/PDT. A nouveau, l'influence du métal sur les propriétés photophysiques des complexes a pu être mise en avant.

Title: New cyclam-based chelate derivatives for cancer diagnostic and/or therapeutic applications

Keywords: polyazamacrocycle, cyclam, coordination complex, two-photon microscopy, bimodal imaging, theranostic

Abstract : The work consisted in the development of chelates based on π -extended picolinate cyclam derivatives giving access to luminescent complexes for applications in medical imaging and/or therapy. For a specific use for biphotonic microscopy, an Yb^{3+} reinforced cyclam complex functionalized by two π -extended picolinate units has been synthesized. The simultaneous presence of a lanthanide ion emitting in the NIR and an antenna allowing two-photon absorption, gave rise to cellular images recorded in the NIR-to-NIR channel. The luminescent properties of π -extended picolinate antennas have also been used for the development of bimodal PET/optical imaging probes. Cyclam-based ligands have been functionalized with a picolinate fluorophore and have been used for the complexation of Cu^{2+} which has a β^+ -emitting isotope. If the radiolabeling of the ligands with $^{64}\text{Cu}^{2+}$ could be carried out,

spectroscopic studies of the Cu^{2+} complexes demonstrated that the metal inhibits the luminescent properties of the fluorophore. However, preliminary studies have shown that Ga^{3+} , which also has a β^+ -emitting isotope, may be a relevant alternative to Cu^{2+} .

Finally, the substitution of the π -conjugated system by the incorporation of a dibromobenzene unit gives access to a photosensitizer capable of generating cytotoxic singlet oxygen for a use in photodynamic therapy (PDT). This type of photosensitizer can also be introduced on the picolinate moiety to give Cu^{2+} chelates for an application in TEP/PDT theranostic. Again, the influence of the metal center on the photophysical properties of the resulting complex could be highlighted.