



HAL
open science

Conception et validation préclinique de nanoparticules multimodales pour l'imagerie des cancers de la prostate

Axel Cordonnier

► **To cite this version:**

Axel Cordonnier. Conception et validation préclinique de nanoparticules multimodales pour l'imagerie des cancers de la prostate. Cancer. Université Clermont Auvergne, 2021. Français. NNT : 2021UC-FAC129 . tel-04676087

HAL Id: tel-04676087

<https://theses.hal.science/tel-04676087>

Submitted on 23 Aug 2024

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.

UNIVERSITÉ CLERMONT AUVERGNE

Année : 2021

N°

Ecole doctorale
des sciences de la vie, santé, agronomie et environnement

Thèse

Présentée pour obtenir le grade de

Docteur d'université

Spécialité : sciences du médicament

Soutenue le 12.10.2021

Par

Axel CORDONNIER

Conception et validation préclinique de nanoparticules multimodales pour l'imagerie des cancers de la prostate

Rapporteurs : Dr. DELVILLE, Marie-Hélène, DR CNRS, Université de Bordeaux
Pr. MENU, Marie-Joëlle, PU, Université de Toulouse
Pr. ROUX, Stéphane, PU, Université de Franche-Comté

Examinatrice : Dr. THOMAS, Eloïse, MCU, Université de Lyon 1

Directeur de thèse : Pr. CHEZAL, Jean-Michel, PU, Université Clermont Auvergne

Co-directeurs : Dr. BOYER, Damien, MCU, Université Clermont Auvergne
Dr. MIOT-NOIRAULT, Elisabeth, MCU, Université Clermont Auvergne

Président du jury : Pr. ROUX, Stéphane, PU, Université de Franche-Comté

Imagerie Moléculaire et Stratégies
Théranostiques (IMoST)
Université Clermont Auvergne
INSERM, UMR 1240

Matériaux Inorganiques (MI), Matériaux
Luminescents (ML)
Université Clermont Auvergne
CNRS, UMR 6296

UNIVERSITÉ CLERMONT AUVERGNE

Année : 2021

N°

Ecole doctorale
des sciences de la vie, santé, agronomie et environnement

Thèse

Présentée pour obtenir le grade de

Docteur d'université

Spécialité : sciences du médicament

Soutenue le 12.10.2021

Par

Axel CORDONNIER

Conception et validation préclinique de nanoparticules multimodales pour l'imagerie des cancers de la prostate

Rapporteurs : Dr. DELVILLE, Marie-Hélène, DR CNRS, Université de Bordeaux
Pr. MENU, Marie-Joëlle, PU, Université de Toulouse
Pr. ROUX, Stéphane, PU, Université de Franche-Comté

Examinatrice : Dr. THOMAS, Eloïse, MCU, Université de Lyon 1

Directeur de thèse : Pr. CHEZAL, Jean-Michel, PU, Université Clermont Auvergne

Co-directeurs : Dr. BOYER, Damien, MCU, Université Clermont Auvergne
Dr. MIOT-NOIRAULT, Elisabeth, MCU, Université Clermont Auvergne

Président du jury : Pr. ROUX, Stéphane, PU, Université de Franche-Comté

Imagerie Moléculaire et Stratégies
Théranostiques (IMoST)
Université Clermont Auvergne
INSERM, UMR 1240

Matériaux Inorganiques (MI), Matériaux
Luminescents (ML)
Université Clermont Auvergne
CNRS, UMR 6296

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer mes plus vifs remerciements à mes trois directeurs de thèse, le Pr. **Jean-Michel Chezal**, le Dr. **Elisabeth Miot-Noirault** et le Dr. **Damien Boyer** pour la confiance qu'ils m'ont accordé dans la réalisation de ce projet. Scientifiquement, j'ai appris énormément à vos côtés, et sans votre assistance ce projet n'aurait pas pu aboutir à de tels résultats.

J'adresse toute ma gratitude au Dr. **Marie-Hélène DELVILLE**, au Pr. **Marie-Joëlle MENU** et au Pr. **Stéphane ROUX** d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je souhaite également remercier le Dr. **Eloïse THOMAS** d'avoir accepté d'être examinatrice de cette thèse.

Jean-Michel, merci pour ces quelques années passées ensemble. Toutes les difficultés rencontrées tout au long de ce projet m'ont énormément appris, notamment grâce à ta vision des choses toujours très pertinente. Je me rappelle quand tu m'as proposé ce sujet, et que je t'ai répondu « il est impossible pour une seule personne de le mener à bien en 3 ans ». J'ai eu une chance inestimable de toujours t'avoir eu à mes côtés. Tu as élaboré la plupart des voies de synthèses et tu as apporté beaucoup sur ce projet, y compris dans des domaines qui ne sont pas les tiens (que ça soit les nanoparticules ou la biologie). J'ai appris énormément à tes côtés.

Damien, merci pour tous ces moments d'échanges, scientifiques ou non, qui nous ont permis d'apprendre à nous connaître. Le déroulement de ces travaux a été très compliqué et source de beaucoup de frustrations. Nos nombreuses discussions nous ont fort heureusement permis de surmonter un bon nombre de problèmes antérieurs non résolus... Je n'oublie pas non plus que grâce à votre idée nous avons pu développer cette synthèse one-pot qui nous a fait gagner un temps considérable sur ce projet.

Elisabeth, il était convenu au début de ces travaux qu'on travaillerait beaucoup ensemble. Malheureusement, tous nos déboires successifs ne nous ont accordé que trop peu de temps, ce que je regrette. J'ai tout de même pris beaucoup de plaisir à travailler à tes côtés, notamment sur les quelques essais *in vivo* que nous avons eu la chance de réaliser.

Merci à tous ceux qui m'ont aidé à rédiger ce manuscrit, ceux qui l'ont relu et corrigé, en plus de mes directeurs de thèse : **Aurélié Maisonial-Besset**, **Audrey Serre**, **Jean-Baptiste Bequignat** et **Jean-Jacques Youte**.

Merci également à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à ces travaux, dans l'ordre alphabétique : Sophie Besse, Arnaud Briat, Françoise Degoul, Laurent Guy, Rachid Mahiou, Aurélié Maisonial-Besset, Benoit Maunit, Leslie Mazuel, Mercedes Quintana, Sébastien Tarrit, Rodolphe Valleix et Magali Vivier.

Merci également à tous les permanents que j'ai pu côtoyer toutes ces années, et avec qui j'ai passé d'excellents moments : Laurent, Ariane, Damien, Federico, Vincent, Emmanuel, Nancy, Valérie et Daniel.

Merci à toutes les personnes que j'ai pu côtoyer au sein de l'unité : Hussein, Roxane, Jean-Baptiste, Solène, Florent, Elise, Aurélie, Jacques, Audrey, Ludivine, Tiffany et Jean-Jacques pour tous ces bons moments passés ensemble, dans et hors du labo. Petite mention spéciale pour Rodolphe sans qui je serais encore en train d'essayer de synthétiser des nanoparticules.

Merci à tous mes amis, les Stéphanois (Frank, Quentin, Loïc, Antoine, Nicolas, Pierre, Benjamin), les clermontois (Alice, Vérane, Edwige, Quentin, Loïc, Nicolas, Sébastien, Jérémy, Maxime) et les fourminaires (Vladimir, Galien, Stéphane, Antoine, François) qui m'ont tous soutenu tout au long de cette thèse et tout au long de mes études.

Enfin, un immense merci à mes grands-parents, mes parents, mes frères et sœurs et Marie-Laure qui ont toujours été là pour moi et qui m'ont motivé à faire toutes ces études.

Une pensée également à ceux que j'ai pu oublier, et aux autres.

Table des matières

Liste des abréviations	19
Introduction	23
BIBLIOGRAPHIE.....	27
Chapitre 1. Le cancer de la prostate.....	29
1.1. La prostate.....	29
1.1.1. Anatomie	29
1.1.2. Topographie.....	30
1.1.3. Anatomie fonctionnelle	30
1.2. Épidémiologie	31
1.2.1. Incidence.....	31
1.2.2. Mortalité.....	32
1.2.3. Facteurs de risque/facteurs de protection	32
1.3. Physiopathologie.....	33
1.3.1. Histologie du CaP	33
1.3.2. La transformation cancéreuse	33
1.3.1. Localisation des zones tumorales au sein du tissu prostatique.....	34
1.3.2. Symptômes cliniques	34
1.4. Description des principales méthodes d'imagerie médicale	34
1.4.1. L'échographie	34
1.4.2. L'IRM.....	35
1.4.3. Le scanner	35
1.4.4. La scintigraphie	35
1.5. Diagnostic	36
1.5.1. Le toucher rectal	36
1.5.2. Le PSA	36
1.5.3. Le PSMA (Prostate Specific Membrane Antigen).....	39
1.5.1. Utilisation de l'IRM pour le diagnostic.....	40
1.5.2. Biopsie	41
1.5.3. En conclusion	43
1.6. Pronostic.....	43
1.6.1. Le score de Gleason	43
1.6.2. Score de Gleason 2016 (score ISUP)	44
1.6.3. Bilan d'extension	45
1.6.4. La classification TNM (Tumor Node Metastasis)	49
1.6.5. La classification de D'Amico.....	49
1.7. Traitements	50
1.7.1. Les traitements passifs	50
1.7.2. La prostatectomie totale (PT)	50
1.7.3. La radiothérapie.....	52
1.7.4. L'HIFU (Ultrasons Focalisés à Haute Intensité).....	53
1.7.5. La cryothérapie	53
1.7.6. L'hormonothérapie.....	53

1.7.7.	Les antinéoplasiques cytostatiques	55
1.7.8.	Le chlorure de radium-223	56
1.7.9.	L'estramustine	56
1.7.10.	Les médicaments anti-ostéolytiques	56
1.8.	Suivi post-traitement.....	57
Chapitre 2.	<i>L'imagerie per-opératoire</i>	58
2.1.	Introduction.....	58
2.2.	La détection radioactive per-opératoire	59
2.2.1.	Les détecteurs.....	59
2.2.2.	Les radiopharmaceutiques développés pour la radiodétection per-opératoire	62
2.3.	L'imagerie optique appliquée à la chirurgie anticancéreuse	62
2.3.1.	Les appareils dédiés à l'imagerie optique.....	63
2.3.2.	Éléments clés pour le développement d'une sonde fluorescente dédiée à l'imagerie per-opératoire	67
2.3.3.	Les médicaments fluorescents en imagerie per-opératoire.....	69
2.3.1.	Les fluorophores organiques en développement	74
2.4.	Vers une double détection imagerie optique/radioactive	78
2.5.	Exemples de traceurs utilisés pour l'imagerie bimodale per-opératoire en cancérologie	79
2.6.	Exemples spécifiques au CaP	80
Chapitre 3.	<i>Les nanoparticules à conversion ascendante (UCNPs) : généralités, synthèses et applications en imagerie médicale</i>	84
3.1.	Généralités	84
3.1.1.	Les nanoparticules organiques	85
3.1.2.	Les nanoparticules inorganiques	88
3.2.	Les nanoparticules à conversion ascendante : propriétés optiques	92
3.2.1.	La down-conversion.....	94
3.2.2.	L'upconversion.....	94
3.2.3.	Les avantages des UCNPs	97
3.2.4.	La matrice NaYF ₄	97
3.2.5.	Le co-dopage ytterbium/thulium	98
3.2.6.	Amélioration des propriétés optiques des UCNPs.....	99
3.3.	Principales voies de synthèse des UCNPs	100
3.3.1.	Synthèses hydrothermales	101
3.3.2.	Synthèses par décomposition thermique.....	102
3.3.3.	Synthèses par coprécipitation	102
3.4.	Hydrophilisation.....	103
3.4.1.	Synthèse d'une coquille de silice	103
3.4.2.	Hydrophilisation par interactions ligand-ligand	104
3.4.3.	Oxydation des ligands de surface	105
3.4.4.	Élimination des ligands	105
3.4.5.	Échange de ligands	106

3.5.	Prérequis des NPs pour leurs applications en pharmacologie.....	107
3.5.1.	Administration	107
3.5.2.	Distribution	107
3.5.3.	Métabolisation/excrétion des NPs	114
3.6.	Toxicité des UCNPs.....	118
3.7.	Exemples d'applications des UCNPs pour l'imagerie <i>in vivo</i>	119
OBJECTIFS		123
RÉSULTATS ET DISCUSSION		131
Chapitre 1. Synthèses et caractérisations de nanoparticules de formulation		
NaYF₄:Yb_{0,20},Tm_{0,02}@NaYF₄ pour l'upconversion		133
1.1.	Première approche de synthèse des UCNPs en deux étapes.....	133
1.1.1.	Synthèse des cœurs	133
1.1.2.	Synthèse des UCNPs cœur/coquille.....	135
1.2.	Deuxième approche de synthèse	136
1.2.1.	La synthèse « one-pot ».....	136
1.2.2.	Caractérisation des UCNPs après synthèse « one-pot ».....	139
1.2.3.	Validation du nouveau procédé de synthèse	140
Chapitre 2. Accès aux polyéthylènes glycols bifonctionnalisés		143
2.1.	Synthèse des dérivés PEGs phosphate L1 et L2	143
2.1.1.	Synthèse des ligands L1 et L2, voie 1	143
2.1.2.	Synthèse des ligands L1 et L2, voie 2	144
2.1.3.	Synthèse des ligands L3 et L4	146
2.2.	Synthèse des ligands PEGs bis- et tétra-phosphonate L(5-L12)	147
2.2.1.	Synthèse des précurseurs PEGs ester de NHS 6a et 6b	147
2.2.2.	Synthèse du précurseur bis-phosphonate aliphatique 9.TFA.....	148
2.2.3.	Synthèse des précurseurs bis-phosphonates aromatiques 14 et 14.TFA.....	149
2.2.4.	Synthèse du précurseur tétra-phosphonate aliphatique 22	151
2.2.5.	Synthèse du précurseur tétra-phosphonate aromatique 24.TFA.....	152
2.2.6.	Accès aux PEGs bis- et tétra-phosphonate L(5-12).....	153
Chapitre 3. Accès aux dérivés ADIBO-KuE(1-4)		156
3.1.	Accès à l'ADIBO non substitué 31.....	156
3.2.	Synthèse des précurseurs de couplage 35, 39, 41 et 49	157
3.2.1.	Synthèse de l'ADIBO propylamine 35	157
3.2.2.	Synthèse de l'ADIBO acide 39.....	159
3.2.3.	Synthèse de l'ADIBO maléimide 41	160
3.2.4.	Synthèse de l'ADIBO-PEG ₄ -CONHS 49	160
3.3.	Accès au ligand du PSMA (KuE) et analogues.....	162
3.3.1.	Synthèse du précurseur 51	162
3.3.2.	Synthèse du dérivé KuE-thiol 54.....	163
3.4.	Synthèse des conjugués ADIBO-KuE	163
3.4.1.	Synthèse du conjugué ADIBO-KuE1	163

3.4.2.	Synthèse du conjugué ADIBO-KuE2	168
3.4.3.	Synthèse des conjugués ADIBO-KuE3 et ADIBO-KuE4	169
Chapitre 4.	Hydrophilisation des UCNPs, caractérisations structurales et études de stabilité	172
4.1.	Protocole d'échange de ligands	172
4.2.	Choix du ligand d'hydrophilisation	174
4.3.	Synthèse du ligand azoture tétra-phosphonate L13	179
Chapitre 5.	: Radiomarquages du ligand IBA-KuE et du dérivé IBA-ADIBO.....	181
5.1.	Synthèse des références froides.....	183
5.1.1.	Synthèse du composé 67	183
5.1.2.	Synthèse du composé 70	184
5.1.3.	Accès aux dérivés stannylés.....	184
5.2.	Radiomarquage du ligand IBA-KuE 67 et de l'ADIBO-KuE 70.....	185
Chapitre 6.	Quantification des groupements azotures après hydrophilisation des UCNPs	188
6.1.	Calcul de la masse molaire des UCNPs.....	188
6.2.	Analyses thermogravimétriques	189
6.3.	Les analyses ICP-OES	192
6.4.	Dosage des azotures par un ligand ADIBO radioiodé.....	193
Chapitre 7.	Études in vitro	196
7.1.	Études de compétition des conjugués ADIBO-KuE	196
7.2.	Couplage des dérivés de l'ADIBO aux UCNPs	198
7.3.	Études de cytotoxicité	200
7.4.	Études d'inhibition compétitive des UCNPs@KuE(2-4).....	201
7.5.	Études de CMF des UCNPs@KuE(2-4)	202
7.6.	Radiomarquage des UCNPs et étude de captation cellulaire	203
Chapitre 8.	Étude in vivo.....	205
CONCLUSION ET PERSPECTIVES		209
ANNEXES	215	
Annexe I.	Synthèse des nanoparticules NaYF₄:Yb_{0,20},Tm_{0,02}@NaYF₄.....	217
Annexe II.	Analyses des UCNPs.....	219
Annexe III.	Synthèses chimiques	221
Annexe IV.	Protocoles de synthèses.....	223
Annexe V.	Caractérisation par RMN ¹H et ¹³C du composé ADIBO-KuE3.....	304

Annexe VI.	<i>Hydrophilisation des UCNPs</i>	309
Annexe VII.	<i>Synthèses radiochimiques</i>	310
Annexe VIII.	<i>Couplage des ligands sur les UCNPs</i>	311
Annexe IX.	<i>Études in vitro</i>	312
Annexe X.	<i>Etudes in vivo</i>	314
Résumé	316	
Abstract	316	

Liste des abréviations

%DI/g : pourcentage de dose injectée par gramme
5-ALA : acide 5-aminolévulinique
Ac : anticorps
ACN : acétonitrile
ADIBO : azadibenzocyclooctyne
AMM : autorisation de mise sur le marché
AO : acide oléique
ATG : analyses de thermogravimétrie
ATR : réflectance totale atténuée
Bn : benzyle
Boc : *tert*-butoxycarbonyle
BODIPY : 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène
CaP : cancer de la prostate
CAT : chloramine-T
CBZ : carboxybenzyle
CCAFU : comité de cancérologie de l'association française d'urologie
CCM : chromatographie sur couche mince
CLHP : chromatographie liquide haute performance
CMF : cytométrie en flux
DCC : dicyclohexylcarbodiimide
DGE : diglycidyl éther
 D_h : diamètre hydrodynamique
DHB : acide 2,5-dihydroxybenzoïque
DIPEA : *N,N*-diisopropyléthylamine
DLS : diffusion dynamique de la lumière
DMF : *N,N*-diméthylformamide
DMSO : diméthylsulfoxyde
DRX : diffraction des rayons X
DS : down-shifting
DSC : carbonate de *N,N'*-disuccinimidyle
EDCI.HCl : chlorhydrate de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique
EPR : enhanced permeability and retention
éq. : équivalent
ERSPC : european randomized study of screening for prostate cancer
ESI-MS : spectrométrie de masse en ionisation électrospray
FDA : food and drug administration
FDG : 2-désoxy-2-fluoro-D-glucose
FITC : isothiocyanate de fluorescéine

Liste des abréviations

FR : récepteur au folate
FSH : follicle stimulating hormone
FTIR : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
GnRH : hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires
HBP : hypertrophie bénigne de la prostate
HIFU : ultrasons focalisés à haute intensité
HOBt : 1-hydroxybenzotriazole
HRMS : spectrométrie de masse haute résolution
ICG : vert d'indocyanine
ICP-MS : spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif
ICP-OES : spectrométrie d'émission optique à plasma à couplage inductif
IMF : intensité moyenne de fluorescence
IR : infrarouge
IRM : imagerie par résonance magnétique
ISO : organisation internationale de standardisation
ISUP : international society of urological pathology
iTLC : instant thin layer chromatography
i.v. : intraveineux(se)
KuE : lysine-urée-glutamate
LAH : aluminohydrure de lithium
LH : luteinizing hormone
LH-RH : luteinizing hormone-releasing hormone
Ln : lanthanide
MALDI-TOF : matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight
mCPBA : acide métachloroperbenzoïque
MET : microscopie électronique à transmission
MM_{moy} : masse molaire moyenne
NHS : *N*-hydroxysuccinimide
NIR : proche infrarouge
NP : nanoparticule
ODE : 1-octadécène
p.i. : post-injection
PAA : acide polyacrylique
Pd/C : palladium sur charbon
PDI : indice de polydispersité
PEG : polyéthylène glycol
PLCO : prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial
PMAO : poly(maleic anhydride-1-octadecene)
PMPA : acide 2-(phosphonométhyl)pentandioïque
PPIX : protoporphyrine IX
ppm : partie par million

Liste des abréviations

PSA : antigène spécifique de la prostate
PSCA : antigène des cellules souches prostatiques
PSMA : antigène membranaire spécifique de la prostate
PT : prostatectomie totale
QC : quantum-cutting
RE : terre rare
RGD : arginine-glycine-aspartate
RMN : résonance magnétique nucléaire
SAXS : diffusion des rayons X aux petits angles
SPAAC : strain promoted alkyne azide cycloaddition
SRE : système réticulo-endothélial
t.a. : température ambiante
 t_0 : temps initial
 $t_{1/2}$: temps de demi-vie
TDM : tomodensitométrie
TEA : triéthylamine
TEMP : tomographie par émission monophotonique
TEP : tomographie par émission de positons
TFA : acide trifluoroacétique
THF : tétrahydrofurane
TMSBr : bromotriméthylsilane
TNM : tumor, node, metastasis
TR : toucher rectal
UC : upconversion
UCNP : nanoparticule à upconversion
US : ultrasons
UV : ultraviolet
VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

Introduction

Avec presque 10 millions de nouveaux cas estimés en 2018 dans le monde, nombre en constante augmentation en raison de la croissance démographique et du vieillissement de la population, le cancer demeure un problème de santé publique majeur. Chez l'homme, le cancer de la prostate (CaP) se classe respectivement en deuxième et cinquième position en termes d'incidence et de mortalité.¹

Afin de pouvoir traiter au mieux un cancer, il est essentiel de le diagnostiquer au plus tôt. En effet, les cancers peu développés nécessitent en général des approches thérapeutiques moins lourdes et plus efficaces. Comme pour la plupart des cancers, la stratégie thérapeutique pour le CaP s'appuie essentiellement sur la chirurgie, et plus spécifiquement sur la prostatectomie totale (PT).² Bien que la délinéation tumorale soit réalisée sur la base d'imageries préopératoires de plus en plus perfectionnées, cette approche se heurte à la difficulté d'éliminer l'ensemble des foyers tumoraux tout en préservant les tissus sains environnants. Lorsque l'ablation tumorale n'est pas totale, cela peut engendrer une rechute, tandis qu'une chirurgie trop étendue peut être source de comorbidités telles que des dysfonctions urinaires ou sexuelles.

Ainsi, une méthode proposée pour lutter contre ces limites repose sur la détection en temps réel des foyers tumoraux par le chirurgien, on parle alors d'imagerie/détection per-opératoire. Dans cet objectif, deux approches semblent prometteuses : la détection radioactive et/ou la détection optique dans le proche infrarouge (NIR). L'avantage de la détection radioactive réside dans sa haute sensibilité mais présente l'inconvénient d'avoir une faible résolution spatiale. À l'inverse, la détection optique NIR présente une forte résolution spatiale mais une faible pénétration tissulaire.

Dans ce contexte, les nanomatériaux luminescents offrent la possibilité d'associer ces deux méthodes de détection au sein d'une même sonde. Parmi ces nano-objets, les nanoparticules pour l'upconversion (UCNPs) sont particulièrement prometteuses car elles permettent, en fonction de leur composition, d'effectuer de la conversion NIR-NIR, gamme de longueurs d'ondes la plus adaptée à une utilisation *in vivo* (faibles absorption et autofluorescence tissulaires dans le NIR). Outre ces propriétés de fluorescence, les UCNPs présentent également l'avantage d'être des plateformes multifonctionnelles. De ce fait, il est tout à fait envisageable de fonctionnaliser en surface ces dernières avec des groupements

¹ https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=&key=total&sex=1&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0&population_group_globocan_id=#collapse-group-0-4

² Rozet, F. ; Hennequin, C. ; Beauval, J. B. ; Beuzeboc, P. ; Cormier, L. ; Fromont-Hankard, G. ; Mongiat-Artus, P. ; Ploussard, G. ; Mathieu, R. ; Brureau, L. ; Ouzzane, A. ; Azria, D. ; Brenot-Rossi, I. ; Cancel-Tassin, G. ; Cussenot, O. ; Rebillard, X. ; Leuret, T. ; Soulié, M. ; Renard-Penna, R. ; Méjean, A. Recommandations françaises du comité de cancérologie de l'AFU - Actualisation 2018-2020 : cancer de la prostate. *Prog. En Urol.* **2018**, 28:S79-S130.

INTRODUCTION

prosthétiques radiomarqués et des ligands de reconnaissance des cellules cancéreuses cibles pour améliorer leur spécificité. De telles structures pourraient permettre, *in fine*, de réaliser une double détection per-opératoire basée sur l'imagerie optique et la détection radioactive, et ainsi réduire la présence de marges positives et le risque de récurrence.

La première partie de ce manuscrit comporte une étude bibliographique décomposée en trois chapitres. Le premier traite du cancer de la prostate dans son ensemble, du diagnostic au traitement. Le deuxième chapitre est axé sur les principes de la détection per-opératoire (radioactive et optique) et leurs applications actuelles et en devenir. Enfin, un troisième chapitre est consacré, après une brève introduction sur les nanoparticules (NPs), aux UCNPs et à leurs propriétés physico-chimiques et biologiques.

La deuxième partie reporte en détail les résultats expérimentaux obtenus durant cette thèse visant à accéder à des UCNPs vectorisées vers l'antigène membranaire spécifique de la prostate (PSMA) et radiomarquées pour l'imagerie per-opératoire NIR et la détection radioactive du CaP. Ces travaux ont notamment porté sur i) la synthèse et les caractérisations physico-chimiques d'UCNPs cœur/coquille de formulation NaYF₄ co-dopées avec des terres rares (ytterbium, thulium), ii) leur hydrophilisation au moyen de divers ligands pégylés phosphorés, iii) leur fonctionnalisation de surface par chimie bioorthogonale en vue d'un ciblage actif des cellules tumorales prostatiques, iv) leur radiomarquage par l'iode-125 et v) la validation *in vitro* de leur capacité à cibler spécifiquement les cellules cancéreuses surexprimant le PSMA complétée *in vivo* par une étude préliminaire de biodistribution chez l'animal.

Une troisième partie conclut sur l'ensemble de ces travaux de thèse suivie, en annexe, des protocoles expérimentaux détaillés des synthèses et évaluations biologiques.

Cette thèse a été financée par le CHU Gabriel Montpied dans le cadre d'un internat de pharmacie et a été réalisée en cotutelle entre les équipes « targets and tools for imaging and therapy (TATOO) » de l'UMR 1240 IMoST (INSERM, UCA) et « matériaux inorganiques (MI) » de l'UMR 6296 ICCF (CNRS, UCA, SIGMA Clermont). L'équipe TATOO, rattachée à l'ITMO « Technologies pour la Santé » et au Cancéropôle CLARA vise à développer de nouveaux outils pour le diagnostic et le traitement des pathologies cancéreuses. L'équipe MI élabore des matériaux innovants à des fins de stockage et de gestion de l'énergie, d'éclairage écoénergétique, de dépollution ou encore d'imagerie.

Ce projet a également bénéficié d'un financement par le Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes dans le cadre du projet structurant CAP (Cancer Auvergne Prostate).

Publication

- Publication dans le Journal of Materials Chemistry B : A. Cordonnier, D. Boyer, S. Besse, R. Valleix, R. Mahiou, M. Quintana, A. Briat, M. Benbakkar, F. Penaul-Llorca, A. Maisonial-Besset, B. Maunit, S. Tarrit, M. Vivier, T. Witkowski, L. Mazuel, F. Degoul, E. Miot-Noirault, J-M. Chezal. Synthesis and *in vitro* preliminary evaluation of prostate-specific membrane antigen targeted upconversion nanoparticles as a step towards radio/fluorescence-guided surgery of prostate cancer. *J. Mater Chem. B*, **2021**, 9:7423-7434.

Communications orales

- A. Cordonnier, J-M. Chezal, S. Besse, A. Briat, F. Degoul, R. Mahiou, A. Maisonial-Besset, B. Maunit, L. Mazuel, M. Quintana, M. Vivier, E. Miot-Noirault, D. Boyer. Conception et validation préclinique de nanoparticules multimodales pour l'imagerie des cancers de la prostate. *Journée sol-gel et chimie liquide Auvergne Rhône-Alpes*, Saint-Etienne. **5 Avril 2018**.
- A. Cordonnier, D. Boyer, S. Besse, A. Briat, F. Degoul, R. Mahiou, A. Maisonial-Besset, B. Maunit, L. Mazuel, M. Quintana, M. Vivier, E. Miot-Noirault, J-M. Chezal. Synthesis and biological evaluations of PSMA-targeted NIR UCNPs for multimodal imaging of prostate cancer. *Nanomedicine international conference*, Lisbonne – Portugal. **23-25 Octobre 2019**.

Communications affichées

- A. Cordonnier, D. Boyer, S. Besse, A. Briat, F. Degoul, R. Mahiou, A. Maisonial-Besset, B. Maunit, L. Mazuel, M. Quintana, M. Vivier, E. Miot-Noirault, J-M. Chezal. Développement de nanoparticules multimodales pour l'imagerie optique et scintigraphique des cancers de la prostate. *Journée de l'école doctorale SVSAE*, Clermont Ferrand. **23-24 Mai 2019**.
- A. Cordonnier, J-M. Chezal, S. Besse, A. Briat, F. Degoul, R. Mahiou, A. Maisonial-Besset, B. Maunit, L. Mazuel, M. Quintana, M. Vivier, E. Miot-Noirault, D. Boyer. Preliminary evaluations of PSMA-targeted NIR upconverting nanoparticles for dual scintigraphic/fluorescence-guided surgery in prostate cancer. *SFNano – C'Nano joint meeting*, Dijon. **10-12 Décembre 2019**.

Encadrement de stage

Florent Magot : master 1^{ère} année Sciences du médicament, Université Clermont Auvergne. Sujet : développement de nanoparticules luminescentes pour l'imagerie optique et scintigraphique des cancers de la prostate. Durée : 8 semaines, **Mai-Juillet 2019**.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1. Le cancer de la prostate

1.1. La prostate

1.1.1. Anatomie

La prostate est la plus grande glande accessoire du système reproductif masculin.³ Elle sécrète un fluide qui compose en partie le liquide séminal. Elle mesure en moyenne 40 mm de largeur à la base, 20 mm d'épaisseur et 30 mm de hauteur, pour un poids d'environ 20 g. Cette glande est située dans la cavité pelvienne, en arrière de la symphyse pubienne, en avant du rectum et en dessous de la vessie. Elle entoure l'urètre proximal à la sortie de la vessie. Elle a une forme de châtaigne avec une base supérieure et un apex inférieur (Figure 1, gauche).

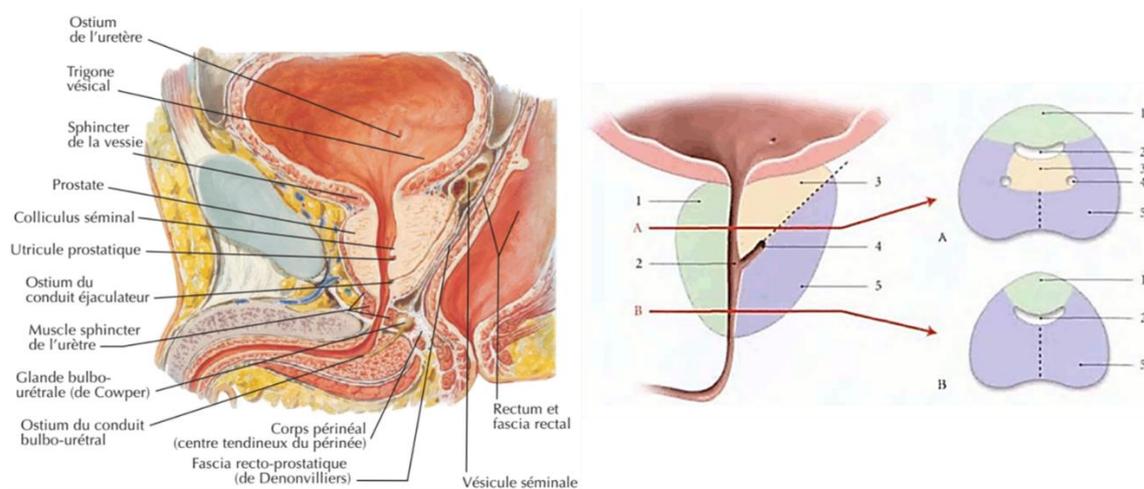


Figure 1 : gauche : coupe anatomique sagittale de la prostate et des vésicules séminales. Droite : coupe anatomique sagittale de la prostate (gauche) et coupes anatomiques axiales (A et B) : 1. isthme (zone centrale) ; 2. urètre prostatique ; 3. lobe moyen (zone de transition) ; 4. conduit éjaculateur ; 5. lobes latéraux (zone périphérique)^{3e,3h}

La prostate est constituée d'une capsule, de glandes prostatiques (66% du volume) et d'un stroma myo-élastique (33% du volume).

- La capsule est un tissu conjonctif épais et riche en fibres musculaires lisses (couche interne) et en fibres de collagène (couche externe).
- Les glandes prostatiques sont au nombre de 30 à 50 et de type tubulo-alvéolaires. Elles s'ouvrent dans l'urètre prostatique, subissent l'influence des androgènes et sont réparties dans les trois lobes principaux : central, de transition et périphérique (Figure 1, droite).

³ (a) Mac Neal, J. E. The zonal anatomy of the prostate. *The Prostate* **1981**, 2(1):35-49. (b) Wendell-Smith, C. Terminology of the prostate and related structures. *Clin. Anat.* **2000**, 13(3):207-213. (c) Amin, M.; Khalid, A.; Tazeen, N.; Yasoob, M. Zonal anatomy of prostate. *Ann. King. Edw. Med. Univ.* **2011**, 16(3):138-142. (d) Bhavsar, A.; Verma, S. Anatomic imaging of the prostate. *Bio. Med. Res. Int.* **2014**, Vol. 2014:1-9. (e) Kamina, P. Anatomie clinique : Tome 4, Organes urinaires et génitaux, pelvis, coupes du tronc. Maloine ; 2^{ème} édition ; **2008**, 191-199. (f) Wendum, D. Anatomie pathologique. Elsevier Masson ; **2013**, 142-149. (g) Kierszenbaum, A. L. ; Validire, P. ; Validire-Charpy, P. Histologie et biologie cellulaire : une introduction à l'anatomie pathologique. De Boeck ; 1^{ère} édition ; **2006**, 558-561. (h) Netter, F. Atlas d'anatomie humaine. Maloine, 2^{ème} édition ; **1999**, 358.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1. Le cancer de la prostate

- Le stroma est constitué par de nombreux faisceaux musculaires lisses entremêlés de tissu conjonctif. Il est sensible aux œstrogènes.

1.1.2. Topographie

La prostate est divisée en quatre parties, à savoir un isthme et trois lobes : un lobe moyen, un lobe droit et un lobe gauche (Figure 1, droite) :

- L'isthme (ou zone centrale) est localisé à la base de la prostate. Il est situé en avant de l'urètre.
- Le lobe moyen (ou zone de transition) représente 25% du parenchyme glandulaire de la prostate. Il est riche en tissu fibro-élastique et entoure l'urètre supra-colliculaire. C'est la zone où siège principalement l'hypertrophie bénigne de la prostate (HBP). Il est sensible aux œstrogènes.
- Les lobes droit et gauche (ou zone périphérique) représentent quant à eux environ 70% des glandes prostatiques. Ils sont situés en arrière des conduits déférents, de chaque côté et en dessous du lobe moyen. Ces lobes, sensibles aux androgènes, sont les sièges principaux des cancers de la prostate (CaP).

Chaque zone étant constituée de cellules d'origines embryologiques différentes, elles développent une susceptibilité propre aux diverses pathologies. L'isthme provient des canaux de Wolff tandis que les lobes moyen, droit et gauche, proviennent du sinus urogénital. On retrouve dans ces trois derniers lobes la majorité des adénocarcinomes (95%).

1.1.3. Anatomie fonctionnelle

1.1.3.1. Rôle principal : le liquide prostatique

La prostate sécrète un liquide qui représente environ un tiers du volume du sperme et sa sécrétion continue (0,5 à 2 mL/24 h) s'élimine en partie avec les urines mictionnelles. Sa sécrétion joue un rôle dans l'activation des spermatozoïdes. Il s'agit d'un liquide laiteux, légèrement acide, qui contient entre autres des prostaglandines, des enzymes protéolytiques (e.g. fibrinolysine favorisant la pénétration des spermatozoïdes dans la glaire cervicale), un antigène prostatique spécifique (i.e. Prostate Specific Antigen (PSA), qui a pour rôle de fluidifier le sperme afin de faciliter la mobilité des spermatozoïdes), ainsi que des éléments nutritifs pour les gamètes.⁴

1.1.3.2. Au cours des rapports

Au cours de la phase d'émission, le sperme s'accumule dans l'urètre prostatique qui se dilate, et lors de l'éjaculation les fibres musculaires lisses de la prostate (ainsi que celles de l'urètre, des glandes séminales et des muscles périnéaux) permettent l'expulsion.

⁴ Marieb, E. Human anatomy and physiology. De Boeck; 4th edition; 1998, 1043.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1. Le cancer de la prostate

1.1.3.3. Rôle dans la miction

En situation physiologique, la prostate n'a qu'un rôle accessoire dans la miction. Il n'en est pas de même en situation pathologique. En effet, du fait de sa structure fibro-musculaire et glandulaire mais aussi de sa localisation, entourant l'urètre, l'augmentation de son volume peut entraîner des troubles mictionnels (notamment dans le cas de l'HBP).

1.2. Épidémiologie

1.2.1. Incidence

En 2018, le CaP était le deuxième cancer le plus fréquent chez l'homme après le cancer du poumon avec une incidence mondiale supérieure à 1,25 millions de cas.⁵ Toutefois, de très fortes disparités géographiques ont été observées en lien avec le niveau de richesse des pays considérés, les plus forts taux d'incidence étant retrouvés au sein des pays développés.⁶ Cet écart peut être directement corrélé à l'espérance de vie, l'âge médian de diagnostic de ce cancer avoisinant en effet les 70 ans.

En France, le CaP était chez l'homme en 2018 au premier rang des cancers concernant l'incidence (près de 65 000 nouveau cas), très largement devant les cancers du poumon, du colon et de la vessie (cf. Figure 2).⁷

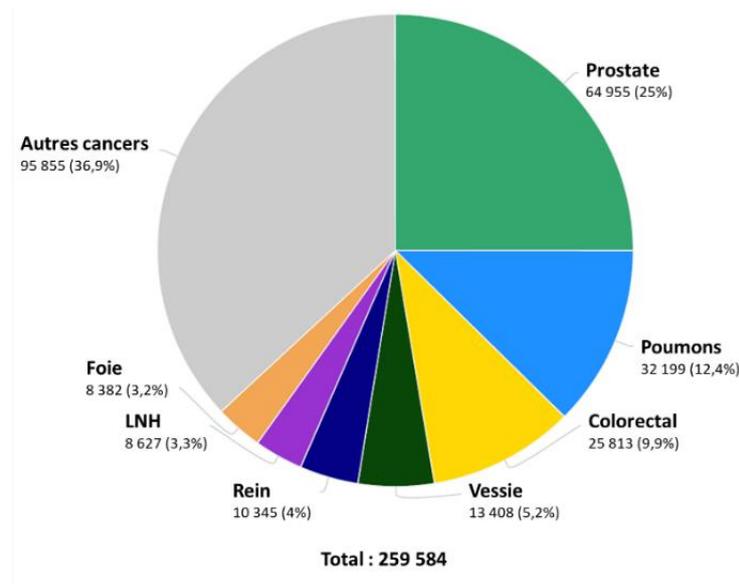


Figure 2 : estimation du nombre de cancers diagnostiqués en France en 2018 chez l'homme (LNH : lymphome non hodgkinien)⁷

⁵ Prashanth, R. Epidemiology of prostate cancer. *World J. Oncol.* **2019**, 10(2):63-89.

⁶ Global burden of disease cancer collaboration. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015. A systematic analysis for the global burden disease study. *JAMA Oncol.* **2017**, 3(4):524-548.

⁷ https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=250&key=total&sex=1&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0&population_group_globocan_id=#collapse-by_country

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1. Le cancer de la prostate

L'incidence du CaP a quasi doublé au niveau mondial au cours des trois dernières décennies. Cette augmentation a été plus importante au sein des pays développés. Ainsi en France, l'incidence du CaP a été multipliée par environ 4,5 entre 1980 et 2008 avant de nettement chuter.⁸ La phase ascendante ne doit pas être considérée comme une situation épidémique mais est, en réalité, la conséquence directe de deux facteurs : d'une part, l'amélioration constante à partir des années 1980 des méthodes de diagnostic et d'autre part, la mise en place de campagnes de dépistage à grande échelle. La diminution de l'incidence depuis 2008 peut s'expliquer par l'évolution des recommandations, préconisant désormais un dépistage ciblé plutôt que systématique.⁹

1.2.2. Mortalité

Au niveau mondial, le CaP est la cinquième cause de décès par cancer chez l'homme. Les disparités géographiques observées en matière d'incidence ne sont pas superposables en ce qui concerne la mortalité due à cette pathologie. Selon une étude récente, les taux de mortalité les plus importants en 2018 étaient retrouvés en Amérique centrale (10,7 pour 100 000), dans l'ensemble de l'Australie et de la Nouvelle Zélande (10,2 pour 100 000) et en Europe de l'Ouest (10,1 pour 100 000). Les taux les plus bas se situaient en Asie centrale, de l'est ou du sud-est (3,3, 4,7 et 5,4 pour 100 000 respectivement) et en Afrique du Nord (5,8 pour 100 000).¹⁰ Après une augmentation régulière du taux de mortalité de 1975 au milieu des années 90, les décès liés au CaP sont en recul dans une large majorité des pays. Cette inflexion est à mettre au crédit des progrès scientifiques réalisés ces trente dernières années pour améliorer la prise en charge diagnostique et thérapeutique des patients atteints de ce cancer.

1.2.3. Facteurs de risque/facteurs de protection

Le risque de déclarer un CaP augmente avec l'âge. Ainsi, 85% des cas diagnostiqués le sont après 65 ans.¹¹ Les risques de développer cette pathologie sont également doublés si un parent au premier degré est lui-même touché, et augmente avec le nombre de personnes atteintes dans la famille proche.¹² La majorité des cas héréditaires sont d'origine polygénique (95%), avec des centaines de gènes impliqués. Les cas monogéniques, quant à eux, portent principalement sur des mutations des gènes BRCA2, BRCA1 ou HOXB13.²

En dehors de ces facteurs de risques avérés, plusieurs causes ethniques et/ou environnementales ont été avancées. Une étude épidémiologique portant sur 215 251

items=10&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0&population_group_globocan_id=#collapse-by_country

⁹ Herget, K. A.; Patel, D. P.; Hanson, H. A.; Sweeney, C.; Lowrance, W. T. Recent decline in prostate cancer incidence in the United States, by age, stage, and Gleason score. *Cancer Medicine* **2015**, 5(1):136-141.

¹⁰ Rawla, P. Epidemiology of prostate cancer. *World J. Oncol.* **2019**, 10(2):63-89.

¹¹ Grönberg, H. Prostate cancer epidemiology. *Lancet* **2003**, 361(9360):859-864.

¹² Goh, C. L.; Schumacher, F. R.; Easton, D.; Muir, K.; Henderson, B.; Kote-Jarai, Z.; Eeles, R. A. Genetic variants associated with predisposition to prostate cancer and potential clinical implications. *J. Intern. Med.* **2012**, 271(4):353-365.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1. Le cancer de la prostate

hommes a relevé que, lorsqu'une personne immigré dans un pays, sa probabilité de développer un CaP tend vers celle des habitants du pays d'accueil.¹³ Cette étude tendrait donc à écarter le facteur ethnique. Afin d'identifier des facteurs de risques ou de protection, un certain nombre d'éléments environnementaux ont également été étudiés, tels que la cigarette, l'alcool, le diabète, l'activité sportive ou encore l'obésité.¹⁴ Toutefois, les analyses statistiques ne permettent pas de conclure à un impact de ces derniers sur l'incidence du CaP.

1.3. Physiopathologie

1.3.1. Histologie du CaP

Le CaP est histologiquement un adénocarcinome dans environ 95% des cas.³ Les cellules épithéliales touchées sont principalement des cellules luminales. Les autres types de CaP, moins fréquents, regroupent le carcinome à cellules squameuses, le carcinome à petites cellules ou le sarcome prostatique.

1.3.2. La transformation cancéreuse

Actuellement, il existe deux hypothèses concernant l'origine de ce cancer : soit la présence d'une cellule progénitrice cancéreuse entraînant une dysrégulation de la différenciation cellulaire (modèle cellules souches), soit de multiples changements génétiques et/ou épigénétiques au sein de la même cellule (modèle stochastique).¹⁵

- Dans le premier modèle, la cellule initialement transformée est une cellule souche qui donnera par la suite naissance à des cellules épithéliales ayant un caractère cancéreux.
- Dans le modèle stochastique, une cellule saine subit une mutation favorisant un oncogène ou inactivant un gène suppresseur de tumeur. Les mitoses ultérieures de ces cellules produisent alors des cellules conservant ce potentiel de propagation tumorale. Une hétérogénéité est alors générée par l'apparition de mutations ultérieures dans les cellules filles. Ces mutations donneront lieu à des champs de cancérisation multifocaux composés de tumeurs primaires de phénotypes variés.

Ces deux mécanismes n'étant pas exclusifs, on peut imaginer une association de ceux-ci expliquant en partie les phénomènes de résistance aux traitements ciblés.

¹³ https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2012-04/rapport_dorientation_-_cancer_de_la_prostate_2012-04-03_16-39-9_898.pdf

¹⁴ Leitzmann, M.; Rohrmann, S. Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates. *Clin. Epidemiol.* **2012**, *4*:1-11.

¹⁵ Packer, J. R.; Maitland, N. J. The molecular and cellular origin of human prostate cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell. Res.* **2016**, *1863*(6, Part A):1238-1260.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1. Le cancer de la prostate

Concernant le CaP, il a été montré que les infections et inflammations chroniques de la prostate favorisent la transformation des cellules prostatiques en cellules tumorales,¹⁶ tandis que les hypertrophies bénignes n'évoluent que rarement en cancers.¹⁵

1.3.1. Localisation des zones tumorales au sein du tissu prostatique

Les zones principalement touchées par cette pathologie sont par ordre d'importance la zone périphérique (90% des cas) puis la zone de transition (< 10% des cas).³ Les tumeurs prostatiques sont le plus souvent dépendantes des androgènes, qui auront pour effet de stimuler la synthèse de PSA (qui aura son intérêt en diagnostic comme décrit au paragraphe 1.5.2). Comme tous les cancers, celui-ci peut donner des métastases, d'abord localisées (ganglions pelviens) puis, en l'absence de traitement, plus éloignées. Les principaux organes touchés sont alors par ordre de prévalence : les os (84,4%), les ganglions lymphatiques distants (10,6%), le foie (10,2%) et le thorax (9,1%).¹⁷

Lors du diagnostic initial, 15 à 20% des patients atteints de CaP présentent un stade métastatique. À souligner que la moitié de ces stades avancées sont diagnostiqués chez des sujets âgés de plus de 75 ans.¹⁸

1.3.2. Symptômes cliniques

Le CaP est la plupart du temps asymptomatique, et sa découverte est donc le plus souvent fortuite.¹⁹ Cependant, dans le cas de cancers avancés ou métastatiques, des signes cliniques peuvent apparaître tels qu'une pollakiurie (ou au contraire des troubles obstructifs), une hématurie, des troubles de l'érection voire des signes neurologiques ou des douleurs osseuses.

1.4. Description des principales méthodes d'imagerie médicale

1.4.1. L'échographie

Cette méthode d'imagerie utilise les ultrasons (US) à l'instar du sonar. Bien que largement utilisée pour déterminer le volume prostatique, elle est peu sensible et spécifique pour la détection des CaP et ne sera donc abordée que succinctement dans ce chapitre.

¹⁶ Sfanos, K. S.; De Marzo, A. M. Prostate cancer and inflammation: the evidence. *Histopathology* **2012**, 60(1):199-215.

¹⁷ Gandaglia, G.; Abdollah, F.; Schiffmann, J.; Trudeau, V.; Shariat, S. F.; Kim, S. P.; Perrotte, P.; Montorsi, F.; Briganti, A.; Trinh, Q. D.; Karakiewicz, P. I.; Sun, M. Distribution of metastatic sites in patients with prostate cancer: a population-based analysis. *Prostate* **2014**, 74(2):210-216.

¹⁸ Scosyrev, E.; Messing, E. M.; Mohile, S.; Golijanin, D.; Wu, G. Prostate cancer in the elderly: frequency of advanced disease at presentation and disease-specific mortality. *Cancer* **2012**, 118(12):3062-3070.

¹⁹ <http://www.urofrance.org/congres-et-formations/formation-initiale/referentiel-du-college/tumeurs-de-la-prostate.html>

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1. Le cancer de la prostate

1.4.2. L'IRM

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une technique d'imagerie utilisant les propriétés magnétiques des atomes, principalement l'hydrogène, majoritairement présent dans le corps humain sous forme d'eau. Elle permet d'obtenir des images anatomiques en 3 dimensions avec un contraste tissulaire spontané de très bonne qualité la plupart du temps (dans les autres cas on peut avoir recours à des produits de contraste de la famille des chélates de gadolinium par exemple). Cette technique est non invasive et ses contre-indications sont limitées (comme par exemple la présence d'un pacemaker).

Lors de cet examen, le patient est placé au sein d'un aimant source d'un champ magnétique dirigé selon l'axe longitudinal. Cet aimant va orienter les moments magnétiques oscillants des protons présents dans l'organisme selon ce même axe (dans un sens parallèle ou antiparallèle). Dans un deuxième temps, une onde de radiofréquence est appliquée dans le plan transversal, conduisant à la résonance ou basculement dans le plan de cet axe des différents moments magnétiques. À l'arrêt de cette onde, le retour à l'état initial des moments magnétiques nucléaires est traduit en intensité et en fréquence, base du signal IRM.

On distingue deux types de signaux IRM : le signal pondéré T1 et le signal pondéré T2. Lors du retour à l'équilibre (relaxation), le signal pondéré T1 mesure le temps que les moments magnétiques nucléaires mettent à s'aligner selon l'axe du champ magnétique initial ; inversement le signal pondéré T2 mesure le temps nécessaire pour que les moments magnétiques se déphasent du plan transversal. L'exploitation des différences de temps de relaxation liées à l'environnement proche du proton considéré (densité protonique, agitation, température), permettent d'étendre la portée de ces examens à l'essentiel des tissus et viscères de l'organisme.

1.4.3. Le scanner

Le scanner (ou tomodensitométrie, TDM) est une technique d'imagerie utilisant l'émission de rayons X. Cette méthode, limitée initialement à des acquisitions planaires, est aujourd'hui réalisée en 3 dimensions (tomographie) grâce à des lits se déplaçant à travers un anneau rotatif contenant plusieurs tubes à rayons X.

1.4.4. La scintigraphie

La scintigraphie (tomographie par émission monophotonique ou TEMP / tomographie par émission de positons ou TEP) est un examen nécessitant l'utilisation de radiopharmaceutiques émetteurs directs ou indirects de rayonnements gammas. Ces radiopharmaceutiques sont composés d'un radionucléide associé généralement à un vecteur déterminant pour l'application visée. Contrairement aux méthodes d'imagerie anatomique telles que l'IRM ou le scanner, la scintigraphie donnera accès à des informations dynamiques ou fonctionnelles.

La TEMP utilise des radionucléides émetteurs de photons γ , le plus utilisé en clinique étant à ce jour le technétium-99m (^{99m}Tc , $t_{1/2} = 6,01$ heures).

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1. Le cancer de la prostate

La TEP utilise des émetteurs de positons (β^+) et permet d'obtenir des images résolutive et quantifiables. Le radionucléide émetteur β^+ le plus courant en clinique est le fluor-18 (^{18}F , $t_{1/2} = 1,83$ heures).

1.5. Diagnostic

La suspicion d'un CaP est basée sur un examen clinique, le toucher rectal (TR), et un examen biologique, le dosage sérique du PSA. S'en suit, en fonction des résultats, une biopsie permettant de statuer sur le caractère cancéreux ou non de l'affection et, le cas échéant, de déterminer son grade. En effet, une augmentation du volume prostatique ou du PSA sérique peut être induite par d'autres pathologies prostatiques (notamment l'HBP ou les prostatites – bactériennes ou non bactériennes).

L'ensemble des données acquises lors de ces examens permet alors de définir l'attitude thérapeutique à adopter.²

1.5.1. Le toucher rectal

Le premier élément pouvant faire suspecter un CaP est le TR.²⁰ Il s'agit d'un examen clinique durant lequel le médecin recherche une induration, une irrégularité, un nodule voire une augmentation de volume de la prostate qui conduiront à poursuivre plus en avant les investigations. La limite du TR est qu'il ne permet de faire suspecter un cancer que lorsque les zones périphériques de la prostate sont touchées. Toutefois, malgré une sensibilité de 81% et une spécificité de 40%,²¹ il reste l'examen essentiel dans la démarche du diagnostic du CaP.

1.5.2. Le PSA

1.5.2.1. Définition et intérêt clinique

Le PSA est une glycoprotéine de type sérine protéase (aussi appelée kallikréine 3) sécrétée exclusivement par les cellules épithéliales de la prostate, ce qui en fait un marqueur sérique spécifique de cet organe, et il a pour but de liquéfier et de fluidifier le sperme. Son intérêt dans le dépistage du CaP est connu depuis longtemps et son dosage est courant dans cette indication.²² Au niveau sanguin, le PSA est retrouvé sous forme libre et sous forme complexé à des enzymes (α -1-antichymotrypsine et α -2-macroglobuline entre autres).²³

²⁰ <http://www.urologie-sante.fr/sites/default/files/fileadmin/medias/journee-prostate/2006/toucher-rectal.pdf>

²¹ Walsh, A. L.; Considine, S. W.; Thomas, A. Z.; Lynch, T. H.; Manecksha, R. P. Digital rectal examination in primary care is important for early detection of prostate cancer: a retrospective cohort analysis study. *Br. J. Gen. Pract.* **2014**, 64(629):e783-787.

²² Catalona, W. J.; Smith, D. S.; Ratliff, T. L.; Dodds, K. M.; Coplen, D. E.; Yuan, J. J. J.; Petros, J. A.; Andriole, G. L. Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* **1991**, 324(17):1156-1161.

²³ Stenman, U. H.; Leinonen, J.; Alfthan, H.; Rannikko, S.; Tuhkanen, K.; Alfthan, O. A complex between prostate-specific antigen and α 1-antichymotrypsin is the major form of prostate-specific antigen in serum of patients with prostatic cancer: assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer. *Cancer Res.* **1991**, 51(1):222-226.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1. Le cancer de la prostate

Le PSA complexé est le PSA actif, le PSA libre est le PSA inactif. Ce dernier peut exister sous différentes formes, le BPSA (Benign PSA, exprimé dans la zone de transition de la prostate, plutôt associé à l'HBP), l'iPSA (intact PSA, identique au PSA mais enzymatiquement inactif) et le [-7]proPSA (i.e. proPSA, retrouvé dans la zone périphérique, associé au CaP). Le PSA est synthétisé sous forme de préproPSA converti en [-7]proPSA, lui-même clivé par la suite par la kallikréine 2 pour donner le PSA. Ce [-7]proPSA intermédiaire peut être mal clivé et donner du [-5]proPSA, du [-4]proPSA ou du [-2]proPSA qui correspondent au PSA libre retrouvé dans le CaP.

Il n'existe pas de valeur « normale » de concentration de PSA dans le sang, son dosage présentant une variabilité importante entre individus mais également chez un même sujet et sur une période plus ou moins éloignée.²⁴ En effet, le PSA sanguin est notamment sensible aux quantités d'androgènes, à un éventuel massage prostatique, à l'éjaculation ou au volume de la prostate. C'est pourquoi ce dosage est perfectible et a pour principale utilité de guider la conduite diagnostique du praticien. Ainsi, il est communément admis qu'une valeur de PSA supérieure à 4 ng/mL est suspecte et peut justifier la réalisation d'une biopsie.²⁵

1.5.2.2. Dépistage et mesure du PSA

Selon les dernières recommandations du comité de cancérologie de l'association française d'urologie (CCAFU), la période de diagnostic précoce doit s'étendre de 50 à 75 ans sans facteur de risque, et à partir de 45 ans si un ou plusieurs facteurs de risque sont présents (antécédents familiaux, origine africaine ou afro-caribéenne).²

Afin d'évaluer l'impact du dosage systématique du PSA sur la mortalité spécifique du CaP, deux études randomisées ont été menées. L'étude PLCO (Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian cancer screening trial), réalisée aux États-Unis, a recruté plus de 75 000 hommes âgés de 55 à 74 ans.^{26,27} Ceux-ci ont été divisés aléatoirement en deux groupes, contrôle et interventionnel. Tandis que les hommes du groupe contrôle suivaient leur parcours de soin habituel, ceux enrôlés dans le groupe interventionnel subissaient six dosages du PSA ainsi qu'un TR par an. Cette étude a montré qu'un dépistage systématique du CaP, comparativement à un parcours de soin classique, n'apporte aucun bénéfice sur la mortalité

²⁴ Roehrborn, C.G.; Pickens, G. J.; Carmody, T. Variability of repeated serum prostate-specific antigen (psa) measurements within less than 90 days in a well-defined patient population. *Urology* **1996**, 47(1):59-66.

²⁵ https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2013-07/referentieleps_format2clic_kc_prostate_vfinale.pdf

²⁶ Gohagan, J. K.; Prorok, P. C.; Hayes, R. B.; Kramer, B. S. The prostate, lung, colorectal and ovarian (PLCO) cancer screening trial of the national cancer institute: history, organization, and status. *Control Clin. Trials*. **2000**, 21(6):251S-272S.

²⁷ Andriole, G.L.; Crawford, E. D.; Grubb III, R. L.; Buys, S. S.; Chia, D.; Church, T. R.; Fouad, M. N.; Isaacs, C.; Kvale, P. A.; Rding, D. J.; Weissfeld, J. L.; Yokochi, L. A.; O'Brien, B.; Ragard, L. R.; Clapp, J. D.; Rathmell, J. M.; Riley, T. L.; Hsing, A. W.; Izmirlian, G.; Pinsky, P. F.; Kramer, B. S.; Miller, A. B.; Gohagan, J. K.; Prorok, P. C. Prostate cancer screening in the randomized prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial: mortality results after 13 years of Follow-up. *J. Natl. Cancer. Inst.* **2012**, 104(2):125-132.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1. Le cancer de la prostate

spécifique.²⁸ Les résultats de ces travaux restent toutefois à nuancer notamment en raison d'une contamination forte du groupe contrôle (i.e. proche de 90%). En effet, une majorité des hommes du groupe témoin ont eu, lors de leur parcours de soins, plus de dosages du PSA que ceux du groupe interventionnel.

En Europe, l'étude ERSPC (European Randomized study of Screening for Prostate Cancer)²⁹ a recruté plus de 150 000 hommes de 55 à 69 ans repartis comme précédemment aléatoirement en groupes interventionnel (dépistage actif) et contrôle. Les résultats ont montré une plus grande incidence du CaP dans le groupe interventionnel par rapport au groupe contrôle sur la base des biopsies. De plus, cette étude a permis de mettre en évidence une amélioration de la survie spécifique de 21% à 13 ans pour le groupe interventionnel vs contrôle.

Compte tenu des résultats contradictoires issus de ces deux études, l'association européenne d'urologie ne préconise pas à ce jour de dépistage systématique chez les hommes.³⁰ Il en est de même pour le CCAFU, qui recommande un dépistage du CaP au cas par cas dans le cadre du diagnostic précoce. Ce dernier s'adresse aux hommes de 50 à 75 ans ayant une espérance de vie supérieure à 15 ans. Au-delà de 75 ans, le TR est le seul examen recommandé afin de ne pas priver un patient d'un éventuel diagnostic de CaP qui se manifesterait cliniquement.²

1.5.2.1. Indicateurs basés sur le dosage sérique du PSA et ses dérivés

Des travaux ont également mis en évidence l'intérêt potentiel du dosage sérique du pPSA ou du (-2)pPSA, en complément du dosage du PSA total et de l'examen clinique. Le Prostate Health Index (PHI) est un paramètre calculé à partir des dosages du PSA total, du PSA libre et du (-2)pPSA. Cet index a montré la meilleure fiabilité avec une limite fixée à 63,9, pour laquelle sont retrouvées une sensibilité et une spécificité respectives de 72,8% et de 73,1% (Figure 3).³¹ Cet indicateur a un niveau de preuve élevé dans la discrimination des tumeurs indolentes et

²⁸ Grubb, R. L.; Pinsky, P.; Prorok, P. C.; Andriole, G. L. Screening for cancer: lessons learned from the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer screening trial. *Eur. Urol.* **2015**, 68(4):545-546.

²⁹ Hugosson, J.; Roobol, M. J.; Månsson, M.; Tammela, T. L. J.; Zappa, M.; Nelen, V.; Kwiatkowski, M.; Lujan, M.; Carlsson, S. V.; Talala, K. M.; Lilja, H.; Denis, L. J.; Recker, F.; Paez, A.; Puliti, D.; Villers, A.; Rebillard, X.; Kilpeläinen, T. P.; Stenman, U. H.; Godtman, R. A.; Kollberg, K. S.; Moss, S. M.; Kujala, P.; Taari, K.; Huber, A.; van der Kwast, T.; Heijnsdijk, E. A.; Bangma, C.; De Koning, H. J.; Schröder, F. H.; Auvinen, A. A 16-yr follow-up of the European randomized study of screening for prostate cancer. *Eur. Urol.* **2019**, 76 (1):43-51.

³⁰ Mottet, N.; Bellmunt, J.; Bolla, M.; Briers, E.; Cumberbatch, M. G.; De Santis, M.; Fossati, N.; Gross, T.; Henry, A. M.; Joniau, S.; Lam, T. B.; Mason, M. D.; Matveev, V. B.; Moldovan, P. C.; van den Bergh, R. C. N.; van den Broeck, T.; van der Poel, H. G.; van der Kwast, T. H.; Rouvière, O.; Schoots, I. G.; Wiegel, T.; Cornford, P. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on prostate cancer. Part 1: screening, diagnosis, and local treatment with curative intent. *Eur. Urol.* **2017**, 71(4):618-629.

³¹ Lazzeri, M.; Lughezzani, G.; Haese, A.; McNicholas, T.; de la Taille, A.; Buffi, N. M.; Cardone, P.; Hurle, R.; Casale, P.; Bini, V.; Redorta, J. P.; Greafen, M.; Guazzoni, G. Clinical performance of prostate health index in men with tPSA>10 ng/mL; results from a multicentric European study. *Urol. Oncol.* **2016**, 34(9):415.e13-415.e19.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1. Le cancer de la prostate

agressives, ainsi que pour la sélection des patients candidats à une biopsie prostatique, une surveillance active ou une prostatectomie totale (PT).³²

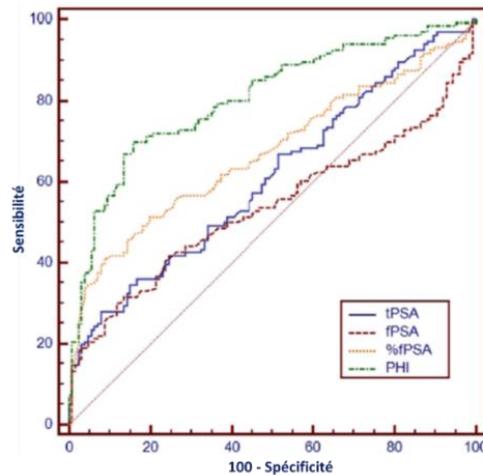


Figure 3 : courbe ROC (Receiver Operating Characteristic) montrant la précision de divers indicateurs (PSA total (tPSA), PSA libre (fPSA), pourcentage de PSA libre (%fPSA), prostate health index (PHI)) chez les hommes ayant un taux sanguin de PSA > 10 ng/mL³¹

Le 4Kscore est quant à lui un test biologique calculé selon un algorithme basé sur i) les dosages sanguins des différentes formes du PSA (i.e. PSA libre, PSA intact, PSA total) et de la kallikréine humaine 2, ii) l'âge du patient et iii) le résultat du TR. Il permet d'établir une probabilité d'avoir un cancer agressif, et ceci afin de limiter le nombre de biopsies.³³ A l'instar du PHI, le 4Kscore permet d'affiner la sélection des patients nécessitant une biopsie prostatique avec une sensibilité et une spécificité respectivement de 87% et 71% pour la détection de CaP cliniquement significatifs.³⁴

1.5.3. Le PSMA (Prostate Specific Membrane Antigen)

L'antigène membranaire spécifique de la prostate (PSMA) est une protéine identifiée il y a une trentaine d'années comme marqueur des cellules épithéliales prostatiques.³⁵ Il s'agit d'une glutamate carboxypeptidase transmembranaire de 750 acides aminés, exprimée au niveau de l'épithélium prostatique, de l'intestin grêle, des cellules tubulaires rénales et des glandes salivaires. Elle est surexprimée par les cellules cancéreuses prostatiques, d'un facteur

³² Salman, J. W.; Schoots, I. G.; Carlsson, S. V.; Jenster, G.; Roobol, M. J. Prostate specific antigen as a tumor marker in prostate cancer: biochemical and clinical aspects. *Adv. Exp. Med Biol.* **2015**, 867:93-114.

³³ Lamy, P. J.; Allory, Y.; Gauchez, A. S.; Asselain, B.; Beuzeboc, P.; de Cremoux, P.; Fontugne, J.; Georges, A.; Hennequin, C.; Lehmann-Che, J.; Massard, C.; Millet, I.; Murez, T.; Schlageter, M. H.; Rouvière, O.; Kassab-Chahmi, D.; Rozet, F.; Descotes, J. L.; Rébillard, X. Prognostic biomarkers used for localised prostate cancer management: a systematic review. *Eur. Urol. Focus.* **2018**, 4(6):790-803.

³⁴ Verbeek, J. F. M.; Bangma, C. H.; Kweldam, C. F.; van der Kwast, T. H.; Kümmerlin, I. P.; van Leenders, G. J. L. H.; Roobol, M. J. Reducing unnecessary biopsies while detecting clinically significant prostate cancer including cribriform growth with the ERSPC Rotterdam risk calculator and 4Kscore. *Urol. Oncol.* **2019**, 37(2):138-144.

³⁵ Horoszewicz, J. S.; Kawinski, E.; Murphy, G. P. Monoclonal antibodies to a new antigenic marker in epithelial prostatic cells and serum of prostatic cancer patients. *Anticancer Res.* **1987**, 7(5B):927-935.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1. Le cancer de la prostate

100 à 1000 fois supérieur au niveau basal des cellules prostatiques saines (cf. Figure 4a et 3b), mais aussi lors de la néovascularisation de différentes tumeurs (cf. Figure 4c et 3d).^{36,37}

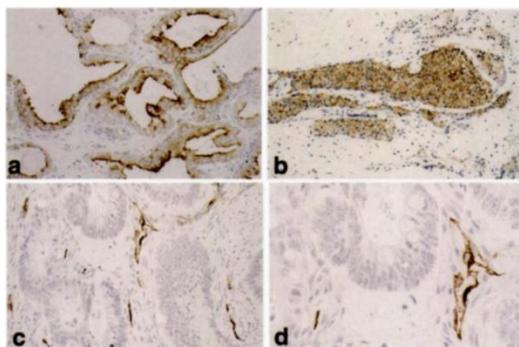


Figure 4 : expression du PSMA par marquage immunohistochimique d'un tissu cancéreux prostatique a) bien différencié ou b) peu différencié. (c,d) Adénocarcinome du colon montrant la présence de PSMA dans les réseaux néo-vasculaires³⁶

La découverte du PSMA et de sa surexpression aux seins des tissus tumoraux a permis de développer divers ligands de reconnaissance (ligands organiques, anticorps et dérivés).

1.5.1. Utilisation de l'IRM pour le diagnostic

Le problème soulevé par le surdiagnostic et le surtraitement du CaP pourrait être limité grâce à l'utilisation de l'IRM multiparamétrique (IRM-MP), susceptible de discriminer les cancers à hauts risques des cancers à évolution lente.³⁸ L'IRM-MP consiste à réaliser une IRM pondérée en T2 associée à une IRM de diffusion et une IRM dynamique avec injection de produit de contraste.^{39,40} Les résultats de l'IRM-MP sont décrits suivant deux scores, un score objectif (PIRADS, Prostate Imaging Reporting And Data System) et un score subjectif (Likert). Le score PIRADS, validé par l'ESUR (European Society of Urogenital Radiology) en 2012,⁴¹ est établi à partir des lésions trouvées à l'IRM (soit des lésions de plus de 0,5 cm³ de volume), gradées de 1 à 5 points pour chaque technique d'IRM. Il est donc donné sur 15 points. Un score inférieur à 9 semble ne pas être lié à une lésion cancéreuse. En France, le CCAFU recommande de réaliser des biopsies ciblées sur lésions détectées à l'IRM en plus des biopsies systématiques pour des scores PIRADS supérieurs à 3. A ce score est associé le score Likert. Ce dernier est subjectif et donné par le radiologue en fonction des images IRM-MP. Il s'agit d'une échelle de suspicion, allant de 1 à 5, le score de 1 étant censé indiquer une prostate peu

³⁶ Osborne, J. R.; Akhtar, N. H.; Vallabhajosula, S.; Anand, A.; Deh, K.; Tagawa, S. T. Prostate specific membrane antigen-based imaging. *Urol. Oncol.* **2013**, 31(2):144-154.

³⁷ Haffner, M. C.; Kronberger, I. E.; Ross, J. S.; Sheehan, C. E.; Zitt, M.; Mühlmann, G.; Öfner, D.; Zelger, B.; Ensinger, C.; Yang, X. J.; Geley, S.; Margreiter, R.; Bander, N. H. Prostate-specific membrane antigen expression in the neovasculature of gastric and colorectal cancers. *Hum. Pathol.* **2009**, 40(12):1754-1761.

³⁸ Arrivé, L.; Miquel, A.; Monnier-Cholley, L.; Rocher, L.; Tourabi, A. C. Imagerie médicale pour le clinicien. Issy-les-Moulineaux: Elsevier Masson; **2012**, 15-20.

³⁹ Boesen, L. Multiparametric MRI in detection and staging of prostate cancer. *Dan. Med. J.* **2017**, 64(2).

⁴⁰ Shukla-Dave, A.; Hricak, H. Role of MRI in prostate cancer detection. *NMR Biomed.* **2014**, 27(1):16-24.

⁴¹ Portalez, D.; Mozer, P.; Cornud, F.; Renard-Penna, R.; Misrai, V.; Thoulouzan, M.; Malavaud, B. Validation of the european society of urogenital radiology scoring system for prostate cancer diagnosis on multiparametric magnetic resonance imaging in a cohort of repeat biopsy patients. *Eur. Urol.* **2012**, 62(6):986-996.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1. Le cancer de la prostate

suspecte, et le score 5 une prostate très suspecte. Un score supérieur ou égal à 3 devrait indiquer la réalisation d'une biopsie.⁴²

Concernant l'IRM-MP, l'étude PROMIS (PROstate Magnetic resonance Imaging Study) a eu pour but de discriminer plus efficacement les patients nécessitant une biopsie afin de limiter cette pratique souvent inutile et non exempte de morbidités. Dans le cadre de cette étude, une biopsie cartographiée trans-périnéale guidée par ultrasons (méthode décrite dans le paragraphe 1.5.2), d'une sensibilité de 95% pour la détection des CaP,⁴³ a servi de référence pour comparer la biopsie échoguidée et l'IRM-MP. Les résultats montrent des meilleures sensibilité et valeur prédictive négative (93% vs 48% ; 89% vs 74% respectivement) de l'IRM-MP par rapport à la biopsie échoguidée, avec toutefois des valeurs de spécificité et des valeurs prédictives positives plus faibles (41% vs 96% ; 51% vs 90%).⁴⁴

1.5.2. Biopsie

À la suite du TR, du dosage du PSA et compte tenu de l'âge du patient, une biopsie peut être recommandée. La biopsie ne sera indiquée que chez des patients ayant une espérance de vie au moins égale à 10 ans. En effet, pour les patients fragiles et/ou âgés, le rapport bénéfique/risque peut ne plus être en faveur d'un traitement curatif, découlant donc sur une abstention thérapeutique ou sur un traitement palliatif.⁴⁵

La biopsie peut être réalisée selon deux voies d'approches : la voie trans-périnéale et la voie transrectale (cf. Figure 5).

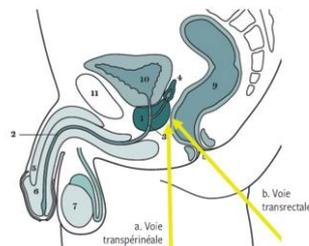


Figure 5 : schéma des voies d'abord chirurgicales pour les biopsies prostatiques. 1. prostate ; 2. urètre ; 3. urètre prostatique ; 4. vésicules séminales ; 5. corps caverneux ; 6. corps spongieux ; 7. testicules ; 8. anus ; 9. rectum ; 10. vessie ; 11. pubis⁴⁶

⁴² Renard-Penna, R.; Mozer, P.; Cornud, F.; Barry-DeLongchamps, N.; Bruguère, E.; Portalez, D.; Malavaud, B. Prostate imaging reporting and data system and Likert scoring system: multiparametric MR imaging validation study to screen Patients for initial biopsy. *Radiology* **2015**, 275(2):458-468.

⁴³ El-ShaterBosaily, A.; Parker, C.; Brown, L. C.; Gabe, R.; Hindley, R. G.; Kaplan, R.; Emberton, M.; Ahmed, H. U. PROMIS - Prostate MR imaging study: A paired validating cohort study evaluating the role of multi-parametric MRI in men with clinical suspicion of prostate cancer. *Contemp. Clin. Trials* **2015**, 42:26-40.

⁴⁴ Ahmed, H. U.; El-Shater Bosaily, A.; Brown, L. C.; Gabe, R.; Kaplan, R.; Parmar, M. K.; Collaco-Moraes, Y.; Ward, K.; Hindley, R. G.; Freeman, A.; Kirkham, A. P.; Oldroyd, R.; Parker, C.; Emberton, M.; the PROMIS study group. Diagnostic accuracy of multi-parametric MRI and TRUS biopsy in prostate cancer (PROMIS): a paired validating confirmatory study. *Lancet* **2017**, 389:815-822.

⁴⁵ https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1623737/fr/detection-precoce-du-cancer-de-la-prostate.

⁴⁶ Burruni, R. ; Cerantola, Y. ; Meuwly, J. Y. ; Tawadros, T. ; Jichlinski, P. ; Valerio, M. Biopsies de la prostate en 2015 : quelle biopsie pour quel patient ? *Rev. Med. Suisse* **2015**, 11:2288-2292.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1. Le cancer de la prostate

Selon les recommandations, la biopsie est réalisée par guidage échographique transrectal après anesthésie locale (plus rarement générale).^{47,48} Le nombre de prélèvements biopsiques est dépendant du volume prostatique ainsi que des données récoltées lors du dosage du PSA, du TR et de l'imagerie effectués en amont. Il est toutefois recommandé de réaliser 12 prélèvements semi-aléatoires. Ces derniers sont faits en médial et en latéral de la base, du milieu et de l'apex de la prostate.^{2,47} Si des anomalies sont relevées lors de l'examen clinique ou de l'IRM, des prélèvements supplémentaires seront effectués dans les zones correspondantes (cf. Figure 6).

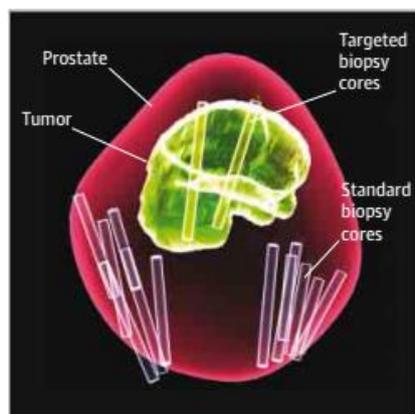


Figure 6 : reconstitution 3D de la prostate après une IRM indiquant les contours de la prostate (rouge) et de la tumeur (vert), les régions de biopsie avec le schéma standard (violet) et les biopsies supplémentaires dirigées (jaune)⁴⁹

La biopsie peut également être effectuée sous forme de cartographie trans-périnéale guidée par US. Dans ce cas, des prélèvements biopsiques sont réalisés tous les 5 mm de façon quasi exhaustive, sur tout le volume de la prostate, sachant que les lésions inférieures à 5 mm³ sont considérées comme à très faibles risques. Il s'agit d'un cas particulier, intéressant en cas de suspicion forte de CaP et de première série de biopsies négatives, ou bien dans le cadre de thérapies focales afin de mieux cartographier la prostate.

La biopsie va apporter deux informations essentielles dans la suite de la prise en charge médicale des patients, à savoir : l'existence ou non de cellules cancéreuses au sein de la prostate et, le cas échéant, le stade d'évolution du cancer. Cette stadification donnera lieu à l'établissement d'un score histo-pronostique appelé score de Gleason (cf. paragraphes 1.6.1 et 1.6.2) qui conditionnera la prise en charge thérapeutique du patient.

⁴⁷ Ouzzane, A. ; Coloby, P. ; Mignard, J-P. ; Allegre, J-P. ; Soulie, M. ; Rebillard, X. ; Salomon, L. ; Villers, A. Recommandations pour la bonne pratique des biopsies prostatiques. *Prog. en Urol.* **2011**, 21(1):18-28.

⁴⁸ <http://uroweb.org/guideline/prostate-cancer/#6>.

⁴⁹ Siddiqui, M.; Rais-Bahrami, S.; Turkbey, B.; George, A. K.; Rothwax, J.; Shakir, N.; Okoro, C.; Raskolnikov, D.; Parnes, H. L.; Marston Linehan, W.; Merino, M. J.; Simon, R. M.; Choke, P. L.; Wood, B. J.; Pinto, P. A. Comparison of MR/ultrasound fusion-guided biopsy with ultrasound-guided biopsy for the diagnosis of prostate cancer. *JAMA* **2015**, 313(4):390-397.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1. Le cancer de la prostate

1.5.3. En conclusion

Une problématique essentielle dans la démarche diagnostique du CaP est le risque de surdiagnostic et donc de surtraitement. La biopsie étant le seul moyen d'établir de façon formelle un diagnostic de CaP, il convient d'orienter au mieux les patients vers cet examen. C'est ici que demeure toute la difficulté de la prise en charge des patients dans leur parcours de soin, étant donné la faible sensibilité du dosage du PSA ainsi que la limite précédemment évoquée de l'examen par TR ou IRM-MP.

1.6. Pronostic

1.6.1. Le score de Gleason

La classification du CaP repose sur un score histo-pronostique proposé par Donald F. Gleason en 1966.^{50,51} Celui-ci consiste à évaluer l'histologie des glandes prostatiques, classées en 5 catégories : du grade 1, qui correspond à des glandes histologiquement normales, au grade 5, associé à des glandes composées de cellules indifférenciées plus ou moins nécrosées (cf. Figure 7).

Les glandes de grade 1 sont bien différenciées, de tailles uniformes et regroupées en acini circulaires.

Le grade 2 correspond à des glandes différenciées et regroupées en masses moins uniformes que celles retrouvées dans le grade 1 mais toujours majoritairement circulaires. Les bordures sont moins bien définies que celles du grade 1.

Dans ces deux grades, les glandes sont en général séparées par une épaisseur de stroma moins importante que leur diamètre. Ces grades sont peu retrouvés chez les patients car les glandes correspondantes sont essentiellement représentatives de prostates saines, cas peu fréquent lorsqu'une biopsie est indiquée.

Le grade 3 est celui le plus fréquemment retrouvé dans les biopsies de CaP. Ici, les glandes sont de tailles petites à moyennes, de formes et d'espacements irréguliers, et sont en général séparées par une épaisseur de stroma plus grande que leur diamètre.

Le grade 4 est un haut grade de malignité composé de glandes comportant des masses infiltrantes de cellules épithéliales malignes, ayant une croissance en corde, en chaîne ou en lambeaux. Les arrangements cellulaires peuvent être de type cribriforme, papillaire ou sous forme de micro-acini. Ce grade est retrouvé la plupart du temps associé à un grade 3.

⁵⁰ (a) Gleason, D. F. The pathobiology of prostate cancer. Part 1. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum. Pathol.* **1992**, 23(3):273-279. (b) Humphrey, P. A. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Mod. Pathol.* **2004**, 17(3):292-306. (c) Kryvenko, O. N.; Epstein, J. I. Prostate cancer grading: a decade after the 2005 modified Gleason grading system. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2016**, 140(10):1140-1152.

⁵¹ Gleason, D. F. Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother. Rep.* **1966**, 50(3):125-128.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1. Le cancer de la prostate

Le grade 5 est composé de cellules majoritairement indifférenciées au milieu desquelles se trouvent des cellules nécrosées. Ce grade est la plupart du temps retrouvé associé à un grade 3 (les associations 5+4 et 5+5 étant beaucoup plus rares et donnant lieu à des manifestations métastatiques locales ou à distance).

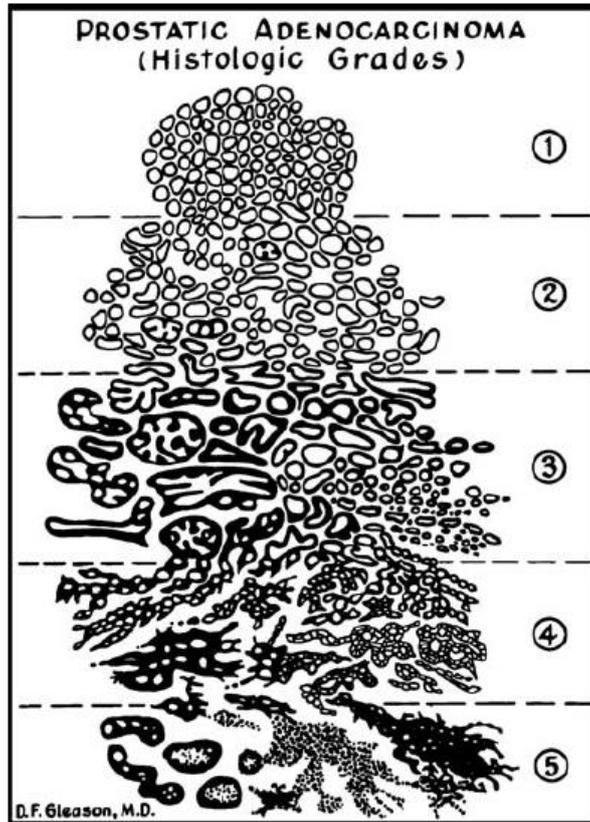


Figure 7 : schéma standardisé d'adénocarcinomes prostatiques (modèle histologique) en fonction du grade selon D. F. Gleason^{50b}

Le score de Gleason est présenté sous forme d'addition, le premier chiffre correspondant à la population cellulaire la plus représentée au sein de l'échantillon récolté et le deuxième à la population ayant le grade le plus élevé. Ce score correspond donc au résultat de cette addition, étendu sur une échelle fermée allant de 2 à 10.

1.6.2. Score de Gleason 2016 (score ISUP)

Bien que le score de Gleason ait été plusieurs fois modifié depuis sa création, une nouvelle classification vient récemment d'être acceptée par l'organisation mondiale de la santé en 2016⁵² suite au congrès de l'International Society of Urological Pathology (ISUP) de 2014.⁵³

⁵² Humphrey, P. A.; Moch, H.; Cubilla, A. L.; Ulbright, T. M.; Reuter, V. E. The 2016 WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs-Part B: prostate and bladder tumours. *Eur. Urol.* **2016**, 70(1):106-119.

⁵³ Epstein, J. I.; Egevad, L.; Amin, M. B.; Delahunt, B.; Srigley, J. R.; Humphrey, P. A. The 2014 international society of urological pathology (ISUP) consensus conference on gleason grading of prostatic carcinoma: definition of grading patterns and proposal for a new grading system. *Am. J. Surg. Pathol.* **2016**, 40(2):244-252.

BIBLIOGRAPHIE
Chapitre 1. Le cancer de la prostate

Désormais le score de Gleason est exprimé en groupes tels que décrits dans le Tableau I ci-après :

Tableau I : nouvelle classification des CaP : score ISUP

Groupe	Score de Gleason
1	≤ 6
2	$3 + 4 = 7$
3	$4 + 3 = 7$
4	$4 + 4 ; 3 + 5 ; 5 + 3 = 8$
5	9 - 10

Cette nouvelle classification permet d'avoir une approche plus rassurante face aux patients présentant des scores allant de 2 à 6, qui sont désormais réunis au sein du groupe 1, stade le moins avancé de la pathologie. Concernant les scores de Gleason de 7, la présence majoritaire d'un stade avancé (4, premier chiffre du score) par rapport à un stade plus précoce (3, deuxième chiffre du score) est de moins bon pronostic qu'inversement, d'où la différenciation entre le groupe 2 et le groupe 3.

Toutefois, l'interprétation subjective des résultats laisse place à une proportion importante de surdiagnostics (estimée à 28% aux Etats-Unis et à environ 50% en Europe selon l'étude ERSPC⁵⁴) et donc de surtraitements (d'où l'intérêt de mieux guider les patients nécessitant une biopsie prostatique). À noter que dans la suite de ce manuscrit, seul le score ISUP sera utilisé.

1.6.3. Bilan d'extension

Le bilan d'extension est indispensable pour définir la prise en charge thérapeutique du patient : il permet la stadification du cancer, en tenant compte de la tumeur primitive, des éventuelles atteintes ganglionnaires voire de la présence ou non de métastases.^{2,19,25}

⁵⁴ Alberts, A. R.; Schoots, I. G.; Roobol, M. J. Prostate-specific antigen-based prostate cancer screening: past and future. *Int. J. Urol.* **2015**, 22(6):524-532.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1. Le cancer de la prostate

1.6.3.1. Bilan ganglionnaire

Le scanner et l'IRM

L'IRM est recommandée en première intention pour le bilan ganglionnaire local des CaP, bien que sa fiabilité soit équivalente au scanner (sensibilité de 42% et 39% respectivement, spécificité de 82% pour les deux méthodes).⁵⁵

La tomographie par émission de positons (TEP)

Le radiopharmaceutique le plus couramment utilisé en médecine nucléaire est le [¹⁸F]fluorodésoxyglucose ([¹⁸F]FDG). Ce dernier est un traceur des transporteurs de glucose, fréquemment surexprimés au sein des cellules cancéreuses. La TEP au [¹⁸F]FDG est donc largement utilisée à tous les stades du diagnostic et pour une très large variété de cancers. Toutefois, en raison du faible métabolisme glucidique des cellules tumorales prostatiques, le CaP fait exception et le [¹⁸F]FDG n'a pas d'indication dans cette pathologie. Le seul radiopharmaceutique ayant reçu l'AMM en France à ce jour pour cette pathologie est la [¹⁸F]fluorométhylcholine. La choline est un précurseur de la synthèse des phospholipides (via la phosphorylation par la choline kinase), composants essentiels des membranes cellulaires. Les cellules cancéreuses de la prostate présentant une suractivation de la choline kinase, il en résulte une accumulation de la [¹⁸F]fluorométhylcholine en leur sein, faisant de ce radiotraceur un marqueur de la prolifération cellulaire. Ce radiopharmaceutique peut être utilisé pour la stadification initiale du CaP chez les patients à haut risque d'envahissement ganglionnaire mais, du fait d'une faible sensibilité (49,2%), ne peut pas se substituer au curage ganglionnaire.⁵⁶

Le curage ganglionnaire

Le curage ganglionnaire est une technique chirurgicale qui consiste à exciser les ganglions drainant la zone potentiellement cancéreuse. Une analyse anatomo-pathologique permettra à posteriori d'évaluer leur envahissement.

Dans le cas d'un CaP, il est indiqué chez les patients à risques intermédiaire et élevé (classification de D'Amico, cf. paragraphe 1.6.5). Il s'effectue au niveau des ganglions inguinaux et peut être réalisé selon deux modalités : le curage limité (territoire ilio-obturateur) ou le curage étendu (curage ilio-obturateur bilatéral, curage iliaque externe et interne bilatéral). Le curage étendu (comportant au moins 10 ganglions) est la méthode de

⁵⁵ Salomon, L. ; Peyromaure, M. ; Fromont, G. ; Rozet, F. ; Eiss, D. ; Bastide, C. ; Beuzeboc, P. ; Gachignard, N. ; Cormier, L. ; Hennequin, C. ; Mongiat-Artus, P. ; Soulié, M. ; le sous-comité prostate du CCAFU. Le curage ganglionnaire dans le cancer de la prostate : une mise au point du comité de cancérologie de l'association française d'urologie. *Prog. En. Urol.* **2012**, 22(9):510-519.

⁵⁶ Evangelista, L.; Guttilla, A.; Zattoni, F.; Carlo Muzzio, P.; Zattoni, F. Utility of choline positron emission tomography/computed tomography for lymph node involvement identification in intermediate- to high-risk prostate cancer: a systematic literature review and meta-analysis. *Eur. Urol.* **2013**, 63(6):1040-1048.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1. Le cancer de la prostate

stadification de référence pour le CaP. Selon les recommandations actuelles, il est réalisé au cours de la PT.⁵⁵

1.6.3.2. Bilan métastatique

Scintigraphie osseuse

Compte tenu de la localisation majoritaire des métastases prostatiques au niveau du squelette, un des principaux examens réalisés lors du bilan d'extension du CaP est la scintigraphie osseuse. Cette analyse consiste en une imagerie TEMP utilisant des radiopharmaceutiques qui ciblent spécifiquement les mécanismes de remodelage osseux, associés aux métastases ostéocondensantes et ostéolytiques. Les radiotraceurs les plus fréquemment utilisés pour cette application sont composés d'un vecteur bis-phosphonate radiomarké par le technétium-99m (e.g. acide [^{99m}Tc]Tc-diphosphonopropanedicarboxylique – Teceos®, [^{99m}Tc]Tc-oxidronate ou [^{99m}Tc]Tc-hydroxyméthylène diphosphonate de sodium – Technescan®, Osteocis®).⁵⁷

Selon les recommandations du CCAFU 2020, cet examen doit faire partie du bilan d'extension indiqué chez les patients à risque intermédiaire et élevé de D'Amico (cf. paragraphe 1.6.5). Il est également recommandé chez les patients symptomatiques (douleurs osseuses par exemple).

La TEP

Il existe à ce jour deux radiopharmaceutiques ayant l'autorisation de mise sur le marché (AMM) dans le cadre du dépistage des métastases osseuses consécutives à un CaP : le [¹⁸F]NaF chez les patients ayant un CaP établi⁵⁸ ; la [¹⁸F]fluorométhylcholine pour la recherche de récurrence loco-régionale ou métastatique en cas d'augmentation du PSA d'étiologie inconnue (récurrence occulte).⁵⁹ Ce dernier a également l'AMM pour la stadification initiale chez les patients à haut risque de D'Amico.⁶⁰ Dans le cadre de la recherche de métastases osseuses, la [¹⁸F]fluorométhylcholine a des valeurs de sensibilité et de spécificité très satisfaisantes, respectivement de 89% et de 98%.⁶¹ Il existe également pour cette molécule un équivalent radiomarké au carbone-11, la [¹¹C]choline, approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) mais indisponible en France.

Un autre radiopharmaceutique, la [¹⁸F]fluciclovine (ou [¹⁸F]FACBC), a été approuvé par la FDA en mai 2016⁶² et par le Comité des médicaments à usage humain de l'Agence européenne

⁵⁷ Husson, M. C. Médicaments radiopharmaceutiques et dispositifs médicaux implantables radioactifs. CNHIM ; 3^e édition ; **2015**.

⁵⁸ <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0231471.htm>

⁵⁹ https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/evamed/CT-14874_FLUOROCHOLINE_CIS_BIO_INTERNATIONAL_PIS_INS_Avis2_CT14874.pdf

⁶⁰ <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0198621.htm>

⁶¹ Guo, Y.; Wang, L.; Hu, J.; Feng, D.; Xu, L. Diagnostic performance of choline PET/CT for the detection of bone metastasis in prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Plos one* **2018**, 13(9):e0203400.

⁶² <https://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm503920.htm>

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1. Le cancer de la prostate

du médicament en mars 2017 pour le diagnostic du CaP (rechute après traitement). Le [¹⁸F]FACBC est un acide aminé non-naturel, internalisé dans les cellules par des transporteurs d'acide aminés (LAT-1, ASCT2) surexprimés par les cellules cancéreuses prostatiques.⁶³ Enfin, le Dkfz-PSMA-11 (inhibiteur du substrat *N*-acétylaspartylglutamate des PSMA) marqué au gallium-68 (i.e. [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11), encore en phase clinique (61 études en cours, source ClinicalTrials.gov), a reçu une autorisation temporaire d'utilisation en France pour le diagnostic de rechutes du CaP (loco-régionales ou métastatiques) avec augmentation du taux sérique de PSA.⁶⁴ Il est également indiqué en cas d'examen TEP négatif réalisé avec la [¹⁸F]fluorométhylcholine (cf. Figure 8).

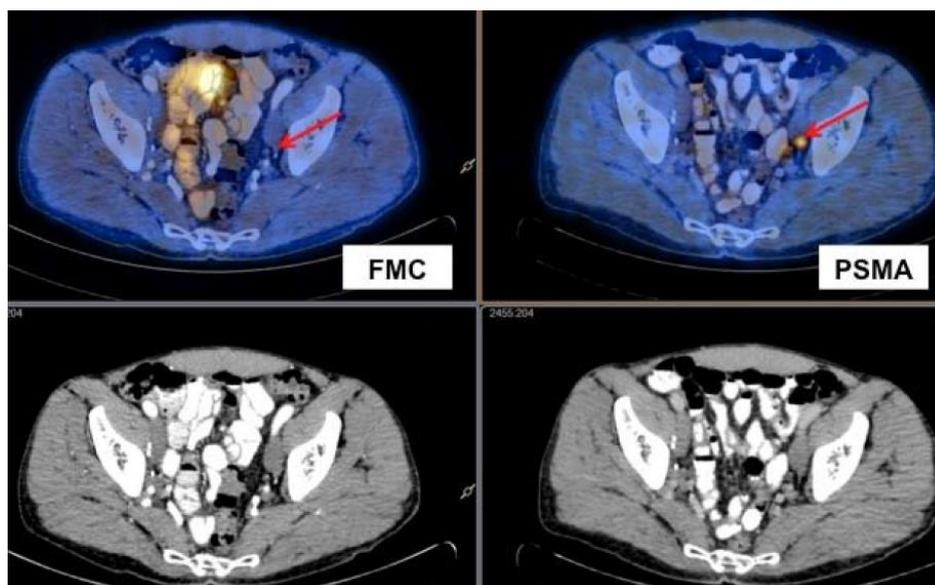


Figure 8 : imagerie TEP/CT (haut) et TDM (bas) d'un patient de 62 ans après injection de [¹⁸F]fluorométhylcholine (gauche) ou de [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 (droite)⁶⁵

L'exemple présenté ci-avant révèle une meilleure sensibilité pour le vecteur [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 comparativement à la [¹⁸F]fluorométhylcholine, notamment dans le cadre de l'imagerie scintigraphique corps entier lors de la recherche de récurrences loco-régionales de CaP. Ces structures suscitent donc beaucoup d'intérêt, et de nombreux autres ligands radiomarqués du PSMA sont en cours d'étude,⁶⁶ dont un analogue du [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11

⁶³ <https://ansm.sante.fr/S-informer/Travaux-de-l-Agence-Europeenne-des-Medicaments-EMA-Comite-des-medicaments-a-usage-humain-CHMP/Avis-favorable-pour-l-octroi-d-une-AMM-pour-six-nouveaux-medicaments-retour-sur-la-reunion-de-mars-2017-du-CHMP-Point-d-Information>

⁶⁴ <https://www.ansm.sante.fr/Activites/Autorisations-temporaires-d-utilisation-ATU/Referentiel-des-ATU-nominatives/Referentiel-des-ATU-nominatives/PSMA-11-10-g-poudre-pour-solution-injectable>

⁶⁵ Morigi, J. J.; Stricker, P.; van Leeuwen, P.; Tang, R.; Ho, B.; Nguyen, Q.; Hruby, G.; Fogarty, G.; Jagavkar, R.; Kneebone, A.; Hickey, A.; Fantì, S.; Tarlinton, L.; Emmett, L. Prospective comparison of the detection rate of ¹⁸F-Fluoromethylcholine and ⁶⁸Ga-PSMA-HBED PET/CT in men with prostate cancer with rising PSA post curative treatment, being considered for targeted therapy. *J. Nuc. Med.* **2015**, 56(8):1185-1190.

⁶⁶ Werner, R. A.; Derlin, T.; Lapa, C.; Sheikbahaie, S.; Higuchi, T.; Giesel, F. L.; Behr, S.; Drzezga, A.; Kimura, H.; Buck, A. K.; Bengel, F. M.; Pomper, M. G.; Gorin, M. A.; Rowe, S. P. ¹⁸F-labeled, PSMA-targeted radiotracers: leveraging the advantages of radiofluorination for prostate cancer molecular imaging. *Theranostics* **2020**, 10(1):1-16.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1. Le cancer de la prostate

marqué au fluor-18 (le [¹⁸F]DCFPyl) dans la détection des cancers primaires, des rechutes et des métastases locales ou à distance.

L'IRM

L'IRM de diffusion corps entier peut également être utilisée dans le bilan métastatique ganglionnaire ou osseux du CaP. L'avantage de cette technique réside dans sa sensibilité supérieure à celle de la TEP/TDM à la [¹⁸F]fluorométhylcholine (i.e. 97% vs 91%) bien que sa spécificité soit légèrement plus faible (i.e. 95% vs 99%).⁶⁷

1.6.4. La classification TNM (Tumor Node Metastasis)

La classification TNM, établie en fonction des analyses précédemment citées, permet d'évaluer l'extension d'un cancer.² Cette classification tient compte de trois facteurs : la tumeur (tumeur : T), les ganglions régionaux (node : N) et les métastases (métastases : M). Ce type de classification existe pour chaque type de cancer, et concernant le CaP il se définit comme suit :

Facteur tumeur : cinq catégories principales :

- T0 : tumeur non retrouvée
- T1 : tumeur non palpable au TR ni visible en imagerie
- T2 : tumeur limitée à la prostate
- T3 : tumeur étendue au-delà de la capsule
- T4 : tumeur atteignant d'autres structures que les vésicules séminales

Facteur ganglions : deux catégories principales :

- N0 : pas d'atteinte des ganglions régionaux
- N1 : atteinte ganglionnaire régionale

Facteur métastases : deux catégories principales :

- M0 : pas de métastase à distance
- M1 : présence de métastases à distance

1.6.5. La classification de D'Amico

Cette classification est un outil pronostique important qui permet d'estimer le risque de progression après traitement chez les patients présentant des tumeurs localisées. Elle tient compte du dosage du PSA, du score de Gleason et de la classification TNM.

La classification de D'Amico permet de regrouper les différents CaP en trois catégories :

⁶⁷ Shen, G.; Deng, H.; Hu, S.; Jia, Z. Comparison of choline-PET/CT, MRI, SPECT, and bone scintigraphy in the diagnosis of bone metastases in patients with prostate cancer: a meta-analysis. *Skeletal Radiol.* **2014**, 43(11):1503-1513.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1. Le cancer de la prostate

- Cancers à faible risque : score de Gleason ≤ 6 (groupe 1) **et** PSA ≤ 10 ng/mL **et** stade clinique inférieur ou égal à T1c (découverte de la tumeur sur biopsie prostatique) ou T2a (atteinte de la moitié d'un lobe ou moins).
- Cancers à risque intermédiaire : score de Gleason = 7 (groupes 2 ou 3) **ou** PSA compris entre 10 et 20 ng/mL **ou** stade clinique T2b (tumeur atteignant plus de la moitié d'un lobe mais un seul lobe atteint).
- Cancers à risque élevé : score de Gleason supérieur à 7 (groupes 4 ou 5) **ou** PSA ≥ 20 ng/mL **ou** stade clinique au moins T2c (tumeur atteignant les deux lobes).

1.7. Traitements

Les traitements des CaP sont directement liés au stade histologique de la tumeur ainsi qu'à la classification de D'Amico,^{25,52,68} allant de la simple surveillance au traitement chirurgical et/ou médicamenteux. Le but du traitement est alors en priorité de détruire la tumeur, ou en cas d'échec, de limiter l'évolution de la pathologie et d'améliorer la qualité de vie des patients (traitement palliatif).

1.7.1. Les traitements passifs

1.7.1.1. La surveillance active

La surveillance active vise à différer l'utilisation de thérapies lourdes et non exemptes de morbidités, sans pour autant compromettre la survie globale des patients.⁴⁸ Selon les recommandations de l'association européenne d'urologie, la surveillance active s'adresse aux patients à bas risque ayant une espérance de vie estimée supérieure à 10 ans. Plus précisément, les patients concernés chez les moins de 70 ans doivent avoir un score ISUP de 1, un taux de PSA inférieur à 10 ng/mL ainsi qu'un stade tumoral T1c ou T2a au plus. Les prérequis sont identiques chez les patients de plus de 70 ans sauf pour le score ISUP qui est étendu aux grades 2 et 3.⁶⁹

1.7.1.2. L'abstention-surveillance (ou attente vigilante)

L'attente vigilante est une démarche de prise en charge palliative qui consiste à traiter les symptômes afin de maintenir une bonne qualité de vie chez les patients, soit présentant d'importantes comorbidités, soit considérés comme incurables (stade multi-métastatique), soit dont l'espérance de vie estimée est inférieure à 10 ans.

1.7.2. La prostatectomie totale (PT)

Le traitement chirurgical de référence, notamment pour les CaP localisés, est la PT. Il n'y a pas d'âge seuil afin de procéder à cette chirurgie, toutefois le gain de survie globale n'est présent que pour des patients ayant une espérance de vie au moins égale à 10 ans. Le but de

⁶⁸ (a) http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2010-09/ald_30_gp_prostate_web_2010-09-28_10-51-52_20.pdf. (b) https://uroweb.org/wp-content/uploads/09-Prostate-Cancer_LR.pdf.

⁶⁹ Klotz, L.; Zhang, L.; Lam, A.; Nam, R.; Mamedov, A.; Loblaw, A. Clinical results of long-term follow-up of a large, active surveillance, cohort with localized prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* **2010**, 28(1):126-131.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1. Le cancer de la prostate

ce traitement est d'exciser totalement la glande prostatique, les vésicules séminales et de réaliser un curage ganglionnaire, le tout en préservant les fonctions de continence et d'érection chez les patients qui en font la demande. La préservation n'est pas recommandée en cas de cancer à risque élevé. Cette opération peut être réalisée par voie rétropubienne (PTR) ou par approches mini-invasives (prostatectomie totale par laparoscopie, prostatectomie totale par laparoscopie robot-assistée).

Outre ces effets indésirables notables, on retrouve également un nombre non négligeable de rechutes biologiques après PT, dont la cause repose essentiellement sur la présence de marges chirurgicales positives (compris entre 5 et 30% pour un cancer localisé, et entre 17 et 65% pour un cancer localement avancé).⁷⁰ Les rechutes biologiques ont un taux estimé entre 21% à 37%.⁷¹ La marge chirurgicale positive, définie comme la présence de foyers tumoraux en marge du tissu réséqué, est visualisée après exérèse de la pièce opératoire colorée à l'encre de chine pour délimiter son contour, et analyse anatomo-pathologique (cf. Figure 9).

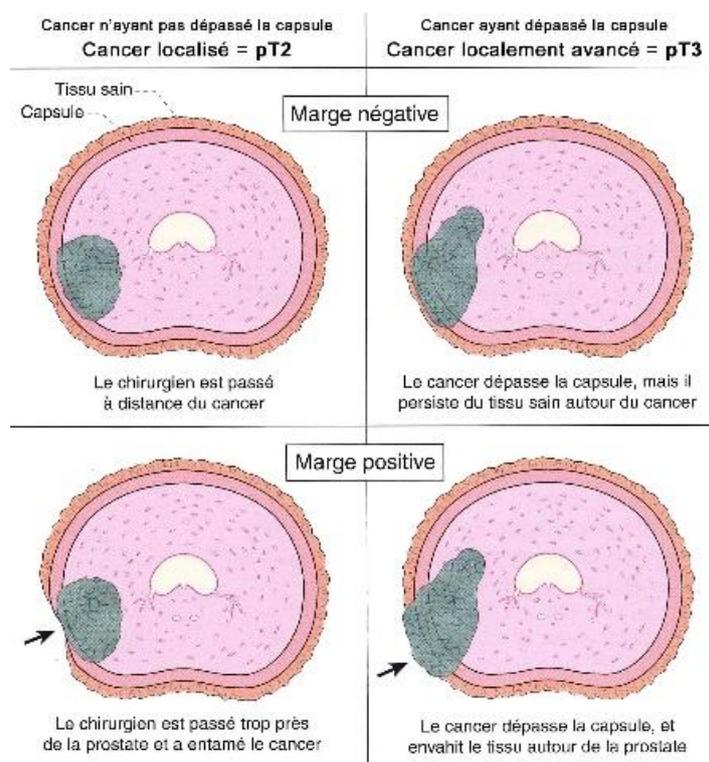


Figure 9 : représentation schématique d'une coupe de prostate colorée à l'encre de chine révélant les marges chirurgicales⁷²

La présence de ces marges positives est due à deux facteurs principaux : i) pour des raisons de préservations nerveuses, le chirurgien peut involontairement conserver une partie

⁷⁰ Koskas, Y.; Lannes, F.; Branger, N.; Guisiano, S.; Guibert, N.; Pignot, G.; Walz, J.; Rossi, D.; Bastide, C. Extent of positive surgical margins following radical prostatectomy: impact on biochemical recurrence with long-term follow-up. *BMC urol.*, **2019**, 19:37

⁷¹ Chapin, B. F.; Nguyen, J. N.; Achim, M. F.; Navai, N.; Williams, S. B.; Prokhorova, I. N.; Wang, X.; Li Ning Tapia, E. M.; Davis, J. W.; Troncoso, P. Positive margin length and highest Gleason grade of tumor at the margin predict for biochemical recurrence after radical prostatectomy in patients with organ-confined prostate cancer. *Prostate Cancer and Prostatic Dis.* **2018**, 21(2):221-227.

⁷² <http://www.cancer-de-la-prostate.fr/comprendre-cancer-prostate/guerison-cancer-prostate.html>

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1. Le cancer de la prostate

de la prostate contenant des foyers tumoraux ; ii) le cancer a dépassé la capsule prostatique et la totalité de la tumeur ne peut pas être excisée. Néanmoins, la présence de marges positives à la PT n'est pas le seul critère pronostique de récurrences biologiques. Il faut considérer entre autres la taille de la marge, le caractère focal ou étendu à plusieurs zones de la pièce opératoire ou le grade histologique des cellules tumorales retrouvées au niveau de la marge (Gleason ≥ 4).⁷³

Toutefois, si la présence de marges positives augmente le risque de rechutes biologiques, ces dernières n'ont pas d'impact à ce jour sur le taux de mortalité spécifique.^{74,75}

1.7.3. La radiothérapie

La radiothérapie est une méthode thérapeutique consistant à exploiter les rayonnements ionisants pour détruire les cellules cancéreuses.⁷⁶ La radiothérapie est divisée en trois grandes familles : la curiethérapie (ou brachythérapie), la radiothérapie interne vectorisée et la radiothérapie externe.

La curiethérapie consiste en l'implantation de radionucléides (émetteurs de rayons X) directement au sein du tissu tumoral. En ce qui concerne le CaP, le radionucléide le plus souvent utilisé est l'iode-125 ($t_{1/2} = 59,4$ jours) qui présente un bas débit de dose.² Cette méthode thérapeutique peut être utilisée seule dans le cas de patients à faibles risques de D'Amico, présentant un taux de PSA inférieur à 15 ng/mL et sans extension extra-prostatique visible en IRM.

La radiothérapie interne vectorisée consiste à administrer au patient, par voie entérale ou parentérale, un radiopharmaceutique dirigé vers un tissu tumoral cible. Une fois concentré dans les tumeurs, ce radiotraceur, comportant un radionucléide émetteur de particules β^- ou α très énergétiques, est susceptible de détruire les cellules cancéreuses. La vectorisation peut être réalisée via l'utilisation d'un anticorps, d'un peptide, d'un ligand de synthèse, ou tout simplement par tropisme naturel du radionucléide seul pour sa cible.

Enfin, la radiothérapie externe utilise des rayonnements ionisants, essentiellement des rayons X, mais également des particules, des atomes (protons, ions carbone) qui seront dirigés spécifiquement vers la zone tumorale à traiter. La dose habituellement utilisée pour le traitement du CaP est de 66 Gy (par fractions de 1,8 à 2 Gy).² L'évolution des appareils de radiothérapie permet de traiter des zones centrées sur la prostate, les vésicules séminales et

⁷³ Preisser, F.; Coxilha, G.; Heinze, A.; Oh, S.; Chun, F. K-H.; Sauter, G.; Pompe, R. S.; Huland, H.; Graefen, M.; Tilki, D. Impact of positive surgical margin length and Gleason grade at the margin on biochemical recurrence in patients with organ-confined prostate cancer. *Prostate* **2019**, 79(16):1832-1836.

⁷⁴ Stephenson, A. J.; Eggener, S. E.; Hernandez, A. V.; Klein, E. A.; Kattan, M. W.; Wood Jr. D. P.; Rabah, D. M.; Eastham, J. A.; Scardino, P. T. Do margins matter? The influence of positive surgical margins on prostate cancer-specific mortality. *Eur. Urol.* **2014**, 65(4):675-680.

⁷⁵ Kvåle, R.; Myklebust, T. Å.; Fosså, S. D.; Aas, K.; Ekanger, C.; Helle, S. I.; Honoré, A.; Møller, B. Impact of positive surgical margins on secondary treatment, palliative radiotherapy and prostate cancer-specific mortality. A population-based study of 13198 patients. *Prostate* **2019**, 79(16):1852-1860.

⁷⁶ Gross, E. Radiothérapie conformationnelle du cancer de prostate. *Prog. en Urol.* **2011**, 21(11):801-807.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1. Le cancer de la prostate

éventuellement les aires ganglionnaires pelviennes. Actuellement, cette approche thérapeutique est présente à tous les stades des CaP. Parmi les cancers à faible risque, la radiothérapie externe seule peut être utilisée au même titre que la PT. Concernant les cancers à risque intermédiaire, la radiothérapie externe est généralement associée à une hormonothérapie de courte durée (6 mois) ou à la chirurgie.² Les cancers à haut risque sont quant à eux traités le plus souvent par une association de radiothérapie et d'un minimum de 18 mois d'hormonothérapie.

1.7.4. L'HIFU (Ultrasons Focalisés à Haute Intensité)

Le principe de cette méthode curative est d'induire une hausse rapide et intense de la température (> 65 °C) sur la totalité de la prostate via l'utilisation d'US de haute intensité afin de provoquer une nécrose des tissus par coagulation.^{68b,77} Cette approche est limitée aux cancers localisés de la prostate ainsi qu'aux récidives locales après un traitement par radiothérapie externe. La durée du traitement est également relativement longue (comprise entre 1 et 3 heures en fonction du volume à traiter).⁷⁸

1.7.5. La cryothérapie

À l'opposé de l'HIFU, la cryothérapie consiste à appliquer au niveau des tissus cancéreux une température de -40 °C pour stimuler la rupture des membranes cellulaires, la dénaturation protéique et l'apoptose (via des microthromboses vasculaires). Le faible recul sur cette technique ne permet de proposer ce traitement que pour les cancers localisés et lorsque les autres alternatives thérapeutiques sont contre-indiquées ou épuisées (e.g. rattrapage suite à la radiothérapie).

1.7.6. L'hormonothérapie

L'hormonothérapie (chez des patients ayant un cancer localement avancé ou métastatique) consiste à diminuer la testostérone circulante, ceci dans le but de limiter au maximum la croissance tumorale.

1.7.6.1. Les analogues de la LH-RH (*Luteinizing Hormone-Releasing Hormone*)

En situation physiologique, cette hormone hypothalamique, également appelée hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires (GnRH), entraîne la libération de deux hormones hypophysaires (la Luteinizing Hormone ou LH et la Follicle Stimulating Hormone ou FSH) qui stimulent la synthèse et le relargage de la testostérone par les gonades masculines. Cette stimulation hypophysaire va entraîner, via un rétrocontrôle négatif, l'inhibition de la

⁷⁷ <http://www.urofrance.org/nc/lurologie-grandpublic/fiches-patient/resultats-de-la-recherche/html/hifu-traitement-du-cancer-de-la-prostate-par-ultrasons-focalises-de-haute-intensite.html>

⁷⁸ Rebillard, X. ; Davin, J. L. ; Soulie, M. Traitement par HIFU du cancer de la prostate : revue de la littérature et indications de traitement. *Prog. Urol.* **2003**, 13:1428-1456.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1. Le cancer de la prostate

GnRH et, *in fine*, la diminution de la sécrétion de testostérone (cf. Figure 10).

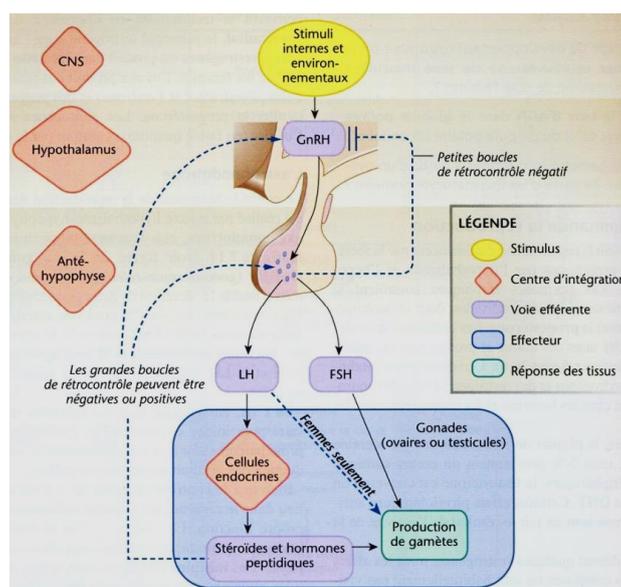


Figure 10 : représentation schématique de l'action de la GnRH (CNS : système nerveux central)

Parmi ces analogues, on retrouve la goséreline, la leuproréline et la triptoréline qui vont, comme indiqué précédemment, entraîner une castration chimique. Dans un premier temps, la stimulation de la GnRH va conduire à une augmentation de la testostéronémie (effet « flare-up »), qui doit être contrôlée par des anti-androgènes. Cette castration chimique est réversible 4 semaines après l'arrêt du traitement.

Ces médicaments sont indiqués en première intention dans le cas de CaP localement avancés ou métastatiques en monothérapie, mais aussi en traitement adjuvant à la radiothérapie externe pour les cancers localement avancés.

1.7.6.2. Le dégarélix

Ce médicament dispose d'une AMM dans le cadre des CaP avancés et hormono-dépendants. Il agit en inhibant directement la GnRH et constitue donc une alternative thérapeutique à l'utilisation des analogues de cette hormone précédemment citée dans le paragraphe 1.7.6.1.

1.7.6.3. Le diéthylstilbestrol

Cet œstrogène de synthèse est indiqué dans le traitement des CaP hormono-dépendants, avancés ou métastatiques. Son indication est limitée aux patients âgés chez qui la chimiothérapie n'est pas indiquée et en cas de cancer en évolution après blocage androgénique complet. Son utilisation est toutefois freinée par ses effets indésirables graves (notamment thromboses pouvant entraîner infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral ou embolie pulmonaire).

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1. Le cancer de la prostate

1.7.6.4. Les anti-androgènes

Parmi ces médicaments, on retrouve deux anti-androgènes non stéroïdiens (bicalutamide, nilutamide) ainsi qu'un progestatif de synthèse (acétate de cyprotérone). Ils sont indiqués en association avec l'hormonothérapie afin de contrôler l'effet « flare-up » de ces traitements.

L'utilisation de cette classe médicamenteuse en monothérapie n'est pas recommandée. En effet, une méta-analyse a comparé la castration chimique ou chirurgicale à l'utilisation d'anti-androgènes seuls et a conclu à la moindre efficacité de ces derniers en monothérapie, tant en termes de survie globale que de survie sans progression.⁷⁹ De plus, les effets indésirables nombreux des anti-androgènes (douleurs thoraciques, gynécomastie) entraînent une quantité non négligeable d'arrêts de traitements.

1.7.6.5. Les anti-androgènes des cancers hormono-résistants

Ces anti-androgènes ont l'AMM dans deux indications : chez les patients ayant un cancer métastatique ou hormono-résistant chez qui la maladie a progressé sous docétaxel (en association à une corticothérapie) ; chez les patients peu symptomatiques pour lesquels la suppression androgénique a échoué et pour qui la chimiothérapie n'est pas encore indiquée. Parmi ces anti-androgènes, on retrouve l'acétate d'abiratérone (qui inhibe la 17 α -hydroxylase et ainsi la synthèse des androgènes) et l'enzalutamide (qui agit sur la voie de signalisation des récepteurs androgènes par inhibition de la liaison aux récepteurs de la translocation nucléaire et de la fixation à l'ADN).

1.7.7. Les antinéoplasiques cytostatiques

1.7.7.1. Le docétaxel

Ce taxane antimitotique est indiqué dans le traitement du CaP métastatique hormono-résistant, associé à une corticothérapie. Il agit en inhibant la dépolymérisation de la tubuline et est indiqué en première intention lorsqu'une chimiothérapie est nécessaire. La chimiothérapie du CaP concerne les patients symptomatiques ayant une espérance de vie estimée supérieure à 10 ans, présentant des métastases à distance (notamment osseuses) et en cas d'échappement à un traitement hormonal de première ligne (cancers de la prostate résistants à la castration). Cet échappement, évalué par dosage du PSA, est établi lorsque surviennent deux augmentations successives du PSA comparativement à la référence antérieure.²

⁷⁹ Kunath, F.; Grobe, H. R.; Rücker, G.; Motschall, E.; Antes, G.; Dahm, P.; Wullich, B.; Meerpohl, J. J. Non-steroidal antiandrogen monotherapy compared with luteinizing hormone-releasing hormone agonists or surgical castration monotherapy for advanced prostate cancer: a Cochrane systematic review. *BJU Int.* **2015**, 116(1):30-36.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1. Le cancer de la prostate

1.7.7.2. *Le cabazitaxel*

De façon similaire au docétaxel, le cabazitaxel (taxane semi-synthétique) favorise la polymérisation de la tubuline en microtubules et inhibe leur dépolymérisation. Ceci entraîne la stabilisation des microtubules et un effet antiméiotique en bloquant les cellules en interphase du cycle cellulaire. Cette chimiothérapie, indiquée pour le traitement du CaP métastatique hormono-résistant, est utilisée en cas de progression de la maladie sous docétaxel et sous réserve de tolérance au cabazitaxel.

1.7.7.3. *La mitoxantrone*

Cet antinéoplasique appartient à la famille des anthraquinones. C'est un agent intercalant de l'ADN qui, associé à une corticothérapie, est indiqué comme traitement palliatif dans le cadre des CaP hormono-résistants. Il n'a pas d'impact sur la survie globale mais réduit significativement la douleur et améliore la qualité de vie des patients.⁸⁰

1.7.8. *Le chlorure de radium-223*

Le ²²³Ra ($t_{1/2} = 11,4$ jours) est un métal alcalino-terreux émetteur α qui, par ses propriétés proches du calcium (élément alcalino-terreux également), va préférentiellement se fixer au sein du tissu osseux en renouvellement ou touché par une lésion tumorale ostéocondensante. Il dispose de l'AMM chez les patients présentant des métastases osseuses symptomatiques et en l'absence de métastases viscérales (Xofigo®). Le fort tropisme du [²²³Ra]RaCl₂ pour les lésions osseuses, induit, par l'émission localisée de rayonnements α de transfert d'énergie linéique élevé, des cassures doubles brins de l'ADN non seulement des cellules tumorales mais également des ostéoblastes et ostéoclastes voisins. Le [²²³Ra]RaCl₂ administré par voie intraveineuse présente également une faible toxicité médullaire (thrombopénies de l'ordre de 4%).²

1.7.9. *L'estramustine*

Cette substance active, qui combine un œstrogène et un agent alkylant, est indiquée dans le traitement du CaP hormono-résistant mais ne doit pas être utilisée en première intention (effets indésirables hématologiques importants, notamment thrombo-emboliques).

1.7.10. *Les médicaments anti-ostéolytiques*

La prescription d'un traitement anti-ostéolytique est recommandée lors du diagnostic de la résistance à la castration du cancer de la prostate.

1.7.10.1. *Les bis-phosphonates*

Deux médicaments de cette classe thérapeutique sont utilisés, l'acide clodronique et l'acide zolédronique. Ils ont une activité anti-ostéoclastique et inhibent donc l'ostéolyse. Ils

⁸⁰ Culine, S. Place de la mitoxantrone dans la prise en charge du cancer de prostate métastatique hormono-indépendant. *Prog. Urol.* **2002**, 1202:31-36.

sont utilisés afin de diminuer les complications squelettiques (consécutives aux traitements hormonaux) ainsi que les douleurs osseuses (dues notamment aux métastases).

1.7.10.2. Le dénosumab

L'interaction du ligand RANK-L à son récepteur RANK au niveau des ostéoclastes entraîne leur différenciation et leur activation. Le dénosumab est un anticorps monoclonal dirigé contre ce ligand qui permet, en bloquant l'interaction RANK/RANK-L, d'inhiber la formation et l'activation des ostéoclastes, et ainsi la résorption osseuse. Il est utilisé dans le traitement du CaP pour prévenir les événements osseux consécutifs à la présence de métastases.

1.8. Suivi post-traitement

Le suivi après traitement (PT, radiothérapie) repose essentiellement sur le TR et le dosage du PSA.² Après une PT, la récurrence biologique est définie comme une augmentation du PSA entre deux dosages successifs et une concentration sérique supérieure à 0,2 ng/mL. Dans le cas d'un traitement autre que la PT (radiothérapie, curiethérapie), la récurrence biologique est définie comme un taux de PSA supérieur de 2 ng/mL au nadir.

En cas de récurrence biologique, la méthode d'imagerie de référence est l'IRM, et notamment l'IRM multiparamétrique. Cet examen peut être complété par une TDM ou une scintigraphie. Concernant la scintigraphie, la TEP à la [¹⁸F]fluorométhylcholine est recommandée pour des taux de PSA supérieurs à 2 ng/mL, tandis que le [⁶⁸Ga]Ga-PSMA sera réservé aux taux inférieurs (meilleure sensibilité).⁸¹

⁸¹ Evangelista, L.; Briganti, A.; Fanti, S.; Joniau, S.; Reske, S.; Schiavina, R.; Stief, C.; Thalmann, G. N.; Picchio, M. New clinical indications for ¹⁸F/¹¹C-choline, new tracers for positron emission tomography and a promising hybrid device for prostate cancer staging: a systematic review of the literature. *Eur. Urol.* **2016**, 70(1):161-175.

Chapitre 2. L'imagerie per-opératoire

2.1. Introduction

L'imagerie per-opératoire tient une place de plus en plus importante au sein de la chirurgie, qui demeure encore une des armes les plus efficaces pour traiter les cancers aux stades précoces. Grâce aux avancées technologiques, les méthodes d'imagerie anatomique (US, TDM, IRM) et/ou fonctionnelle (TEMP, TEP) permettent désormais pour une grande majorité des tumeurs solides de définir avec précision les foyers tumoraux susceptibles d'être excisés. Lorsqu'elle est réalisée, le but de la chirurgie est l'ablation totale des cellules cancéreuses tout en évitant au maximum d'endommager les tissus sains. Toutefois, malgré l'utilisation de méthodes d'imagerie anté-opératoire toujours plus performantes, le chirurgien peut être confronté à des difficultés pour apprécier visuellement et en temps réel les limites entre tissus sains et cancéreux. Par exemple, dans le cas d'une chirurgie trop large, des structures saines environnantes peuvent être touchées (nerfs, vaisseaux, organes) et être à l'origine de comorbidités importantes, et inversement une exérèse trop limitée augmente le risque de marges positives et donc de rechutes.

Face à ces difficultés, des stratégies originales ont été mises en œuvre afin d'assister le chirurgien via l'administration de sondes fluorescentes et/ou radioactives, vectorisées ou non, susceptibles de se concentrer dans les zones d'intérêt. Afin de pouvoir détecter ces sondes lors de l'exérèse tumorale, divers outils ont été développés pour réaliser, soit de l'imagerie, soit de la détection radioactive per-opératoire.⁸²

L'imagerie optique, très sensible mais peu résolutive, est limitée à une profondeur superficielle de tissus dépendante des longueurs d'ondes utilisées. La détection radioactive, quant à elle, est très résolutive mais soulève le problème de la radioprotection des personnels soignants et des patients. Plusieurs études de dosimétrie ont été réalisées afin d'estimer la dose reçue lors d'opérations utilisant la détection radioactive avec des radionucléides émetteurs γ (^{99m}Tc)⁸³ ou β^+ (^{18}F).^{84,85} Ces études démontrent que malgré l'exposition aux rayonnements, cette approche peut être utilisée au bloc opératoire, ce qui est le cas pour la détection du ganglion sentinelle (notamment dans le cadre du cancer du sein⁸⁶). Toutefois, bien que la détection radioactive per-opératoire soit plus sensible que l'imagerie optique,

⁸² Orosco, R. K.; Tsien, R. Y.; Nguyen, Q. T. Fluorescence imaging in surgery. *IEEE Rev. Biomed. Eng.* **2013**, 6:178-187.

⁸³ Klausen, T. L.; Chakera, Z. H.; Friis, E.; Rank, F.; Hesse, B.; Holm, S. Radiation doses to staff involved in sentinel node operations for breast cancer. *Clin. Physiol. Funct. Imaging* **2005**, 25(4):196-202.

⁸⁴ Andersen, P. A.; Chakera, A. H.; Klausen, T. L.; Binderup, T.; Grossjohann, H. S.; Friis, E.; Palnaes Hansen, C.; Schmidt, G.; Kjaer, A.; Hesse, B. Radiation exposure to surgical staff during F-18-FDG-guided cancer surgery. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2008**, 35(3):624-629.

⁸⁵ Povoski, S. P.; Sarikaya, I.; White, W. C.; Marsh, S. G.; Hall, N. C.; Hinkle, G. H.; Martin Jr., E. W.; Knopp, M. V. Comprehensive evaluation of occupational radiation exposure to intraoperative and perioperative personnel from ^{18}F -FDG radioguided surgical procedures. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2008**, 35(11):2025-2034.

⁸⁶ https://www.has-sante.fr/plugins/ModuleXitiKLEE/types/FileDocument/doXiti.jsp?id=c_927249.

cette dernière permet, à moindre coût et sans exposition des personnels aux radiations, de visualiser en temps réel les zones à exciser.⁸⁷ Chacune de ces approches présente donc des inconvénients, qu'il est possible de pallier en les associant, notamment grâce à des structures dédiées (e.g. vecteur associé à une structure radiomarquée et fluorescente).

2.2. La détection radioactive per-opératoire

2.2.1. Les détecteurs

La performance des sondes de détection radioactives dépend de plusieurs facteurs, inhérents au radionucléide utilisé ainsi qu'aux technologies embarquées (collimateurs, blindages, dispositifs de détection...).

L'utilisation de radionucléides émetteurs γ permet d'obtenir des détections en profondeur grâce à la forte pénétration tissulaire de ces rayonnements (> 10 cm). L'inconvénient de cette forte sensibilité, en cas de fixation non spécifique du radiotraceur, est l'intensité du bruit de fond engendré. Ce dernier peut toutefois être réduit par l'utilisation de collimateurs. Dans le cas des particules β^+ , qui s'annihilent après un parcours dans la matière compris entre 1 et 3 mm, la quantité de rayonnements γ émis au sein d'organes à haut métabolisme (cœur, cerveau, vessie) peut fortement contaminer l'image obtenue avec des détecteurs γ .⁸⁸ Ainsi, des outils permettant de détecter les particules β^+ en s'affranchissant du bruit de fond généré par les rayonnements γ ont été développés, mais ceux-ci sont limités à une détection de surface.⁸⁹

Concernant les détecteurs, un des paramètres les plus importants est leur sensibilité. En effet, ces approches radioguidées apportent des informations complémentaires à l'imagerie scintigraphique anté-opératoire, notamment pour la détection de lésions inframillimétriques non visibles par cette dernière.

2.2.1.1. Les détecteurs γ

Il existe deux types de détecteurs γ développés pour la chirurgie radioguidée, composés soit d'un semi-conducteur soit d'un détecteur à scintillation couplé à un photomultiplicateur.⁹⁰ Les semi-conducteurs utilisés dans les sondes sont en général de composition CdTe ou CdZnTe, tandis que les sondes à scintillation sont composées de cristaux dopés au thallium, de type NaI(Tl) ou CsI(Tl). Le type de détecteur choisi pour une sonde

⁸⁷ Olson, M. T.; Ly, Q. P.; Mohs, A. M. Fluorescence guidance in surgical oncology: challenges, opportunities, and translation. *Mol. Imaging Biol.* **2019**, 21(2):200-218.

⁸⁸ Sajedi, S.; Sabet, H.; Choi, H. S. Intraoperative biophotonic imaging systems for image-guided interventions. *Nanophotonics* **2019**, 8(1):99-116.

⁸⁹ Piert, M.; Burian, M.; Meisetschläger, G.; Stein, H. J.; Ziegler, S.; Nährig, J.; Picchio, M.; Buck, A.; Siewert, J. R.; Schwaiger, M. Positron detection for the intraoperative localisation of cancer deposits. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2007**, 34(10):1534-1544.

⁹⁰ van Oosterom, M. N.; Rietbergen, D. D. D.; Welling, M. M.; van der Poel, H. G.; Maurer, T.; van Leeuwen, F. W. B. Recent advances in nuclear and hybrid detection modalities for image-guided surgery. *Expert Rev. Med. Devices* **2019**, 16(8):711-734.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 2. L'imagerie per-opératoire

dépend de l'application visée : les détecteurs à semi-conducteurs peuvent être de petite taille, donc utilisables dans le cadre d'une laparoscopie, et ont une résolution élevée pour les photons d'énergie moyenne (< 200 keV) ; les détecteurs à scintillation sont plutôt utilisés dans le cadre d'une détection de surfaces larges et/ou de photons d'énergie élevée.⁸⁸

L'ajout d'un collimateur est également indispensable devant un détecteur du fait de la forte pénétration tissulaire des photons γ . Celui-ci a pour but de discriminer spatialement la provenance des émissions radioactives en absorbant les rayonnements non dirigés vers la sonde. De fait, les collimateurs sont composés de matériaux denses capables d'arrêter les émissions γ , en général le plomb ou le tungstène, bien que d'autres matériaux puissent également être utilisés (or, alliage platine-iridium).⁹¹

Les détecteurs γ sont utilisés en chirurgie per-opératoire depuis de nombreuses années, et ont montré leur efficacité dans la détection des ganglions sentinelles difficilement détectables par les méthodes d'imagerie corps entier. Ils sont notamment utilisés dans le cadre des cancers du sein, des mélanomes ou des cancers gynécologiques en complément de la lymphoscintigraphie.⁹²

2.2.1.2. Les détecteurs β^+

L'apparition des photomultiplicateurs en silicium (SiPM) a été mise à profit afin de développer des sondes hybrides permettant la détection des rayonnements γ et des particules β^+ . Un des premiers détecteurs développé en ce sens est constitué d'un cristal à scintillation de lutécium dopé au cérium ($\text{Lu}_{1,8}\text{Y}_{0,2}\text{SiO}_5\text{:Ce}$; LYSO:Ce) associé à un détecteur à scintillation d'iodure de césium dopé par du thallium (CsI:Tl, cf. Figure 11).⁹³

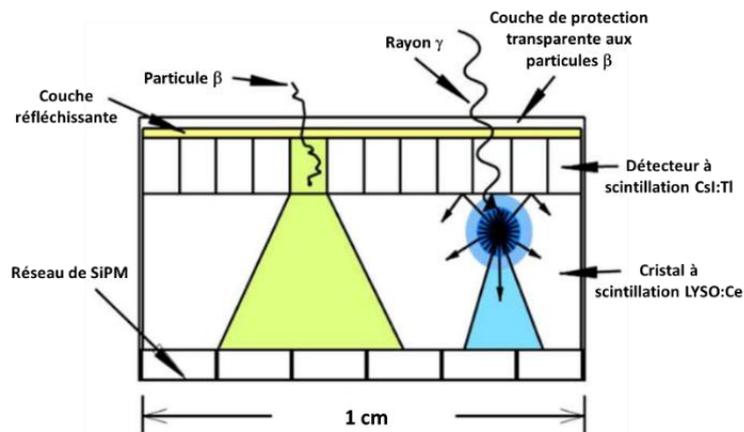


Figure 11 : principe de la sonde hybride CsI:Tl-LYSO-Ce⁹³

⁹¹ Heller, S.; Zanzonico, P. Nuclear probes and intraoperative gamma cameras. *Semin. Nucl. Med.* **2011**, 41(3):166-181.

⁹² Vidal-Sicart, S.; Paredes, P.; Zanón, G.; Pahisa, J.; Martínez-Román, S.; Caparrós, X.; Vilalta, A.; Rull, R.; Pons, F. Added value of intraoperative real-time imaging in searches for difficult-to-locate sentinel nodes. *J. Nucl. Med.* **2010**, 51(8):1219-1225.

⁹³ Sabet, H.; Stack Jr., B. C.; Nagarkar, V. V. A hand-held, intra-operative positron imaging probe for surgical applications. *IEEE Trans. Nucl. Sci.* **2015**, 62(5):1927-1934.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 2. L'imagerie per-opératoire

La couche de CsI:Tl, épaisse de 400 μm , permet de détecter plus de 95% des positons du [^{18}F]FDG. Ce détecteur présente de plus l'avantage d'avoir un rendement lumineux élevé de 53 photons/keV comparativement aux scintillateurs plastiques (≈ 10 photons/keV). La faible épaisseur de la couche de CsI:Tl permet de plus d'entrevoir la production de sondes de petite taille, plus facilement utilisable en per-opératoire. Le cristal à scintillation LYSO:Ce détecte quant à lui les photons γ de 511 keV. Les temps de déclin de luminescence des scintillateurs CsI:Tl et LYSO:Ce étant très éloignés (i.e. 1 000 ns et 40 ns respectivement), ils permettent ainsi de discriminer les particules β^+ des photons γ , et ainsi d'atténuer le bruit de fond.

La sonde représentée en Figure 12 présente une surface de détection de 20 mm², et est recouverte d'une feuille empêchant l'absorption de la lumière, et donc la pollution du signal obtenu. Celle-ci a montré une sensibilité élevée vis-à-vis des positons et une très faible contamination par les photons γ ($< 3,5\%$ de la radioactivité détectée).



Figure 12 : sonde de détection des particules β^+ ⁸⁹

La preuve de concept de ce type d'approche per-opératoire a été réalisée pour la première fois chez l'Homme avec cette sonde en 2007.⁸⁹ Après injection de [^{18}F]FDG avant anesthésie et chirurgie (cancers digestifs, de la thyroïde, du sein, colorectaux, de la peau) chez 17 patients, la majorité des tissus cancéreux visualisés lors des examens préopératoires ($> 94\%$) ont pu être détectés pendant la chirurgie, avec des ratio signal/bruit variant de 1,34/1 à 17,2/1. Cette sonde présente toutefois quelques limites, comme un diamètre important (16 mm) la rendant inutilisable pour des approches endoscopiques, ou encore une sensibilité atténuée par l'ajout d'un film de latex protecteur. L'avantage de pouvoir détecter des radiotraceurs β^+ à de très faibles concentrations a entraîné le développement d'autres

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 2. L'imagerie per-opératoire

prototypes miniaturisés utilisables en laparoscopie, mais leur utilisation reste malgré tout limitée à une détection de surface.^{94,95}

2.2.2. Les radiopharmaceutiques développés pour la radiodétection per-opératoire

Le premier radiopharmaceutique émetteur γ utilisé pour la détection per-opératoire des ganglions sentinelles sont des nanocolloïdes de technétium-99m (Nanocis®). Il a démontré son utilité dans le cadre du cancer du pénis pour la détection des ganglions sentinelles (lymphoscintigraphie) avant que son utilisation soit étendue au cancer du sein et au mélanome.⁹⁶ À ce jour, aucun radiopharmaceutique émetteur β^+ n'est recommandé pour la radiodétection per-opératoire.

2.3. L'imagerie optique appliquée à la chirurgie anticancéreuse

Les sondes fluorescentes destinées à des applications *in vivo* ont en général des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission appartenant au domaine du visible ou du proche infra-rouge (NIR, défini dans une gamme de longueurs d'onde de 780 nm à 2,5 μm), et plus rarement dans l'ultraviolet (UV). En effet, chez les mammifères, le chromophore le plus abondant est l'hémoglobine qui présente une forte absorbance pour des longueurs d'onde inférieures à 600 nm. L'eau quant à elle, possède plusieurs pics d'absorbance, soit faibles à 970 nm et 1200 nm, soit intenses à 1450 nm et 1800 nm. D'autres chromophores comme la mélanine, ou les protéines en général, présentent de fortes absorbances entre 200 et 650 nm, ce qui rend l'utilisation de cette fenêtre de longueurs d'ondes délicate pour une approche per-opératoire (cf. Figure 13).

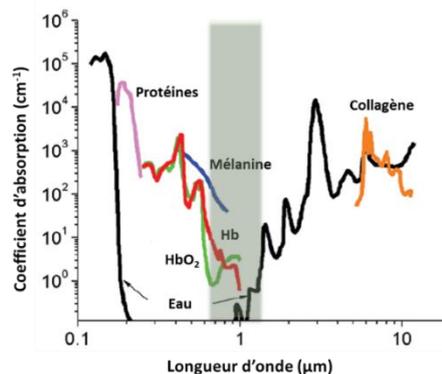


Figure 13 : coefficients d'absorption des principaux chromophores tissulaires (100 nm-10 μm). En gris est représentée la fenêtre de faible absorption des tissus⁹⁷

⁹⁴ Liyanaarachchi, M. R.; Shimazoe, K.; Takahashi, H.; Kobayashi, E.; Nakagawa, K.; Sakuma, I. Prototype detector for intraoperative PET-laparoscope system with a multi-layer movable detector. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., A* **2020**, 958;162788.

⁹⁵ Spadola, S.; Verdier, M. A.; Pinot, L.; Esnault, C.; Dinu, N.; Charon, Y.; Duval, M. A.; Ménard, L. Design optimization and performances of an intraoperative positron imaging probe for radioguided cancer surgery. *J. Instrum.* **2016**, 11(12):P12019.

⁹⁶ Mariani, G.; Giuliano, A. E.; Strauss, W. H. Radioguided surgery: a comprehensive team approach. Springer; 1st édition; **2007**, 72-73.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 2. L'imagerie per-opératoire

L'autofluorescence tissulaire est également un frein à l'utilisation de certains chromophores pour une application per-opératoire (cf. Figure 14).

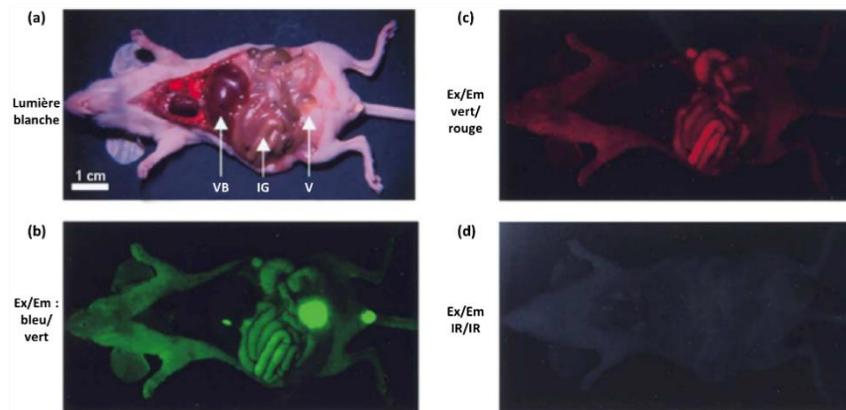


Figure 14 : autofluorescence des organes chez une souris ex vivo : a) sous lumière blanche ; b) sous excitation dans le bleu ($\lambda_{exc} = 460-500 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 505-560 \text{ nm}$) ; c) sous excitation dans le vert ($\lambda_{exc} = 525-555 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 590-650 \text{ nm}$) ; d) sous excitation NIR ($\lambda_{exc} = 725-775 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 790-830 \text{ nm}$) (VB : vésicule biliaire ; IG : intestin grêle ; V : vessie)⁹⁸

Sous excitation lumineuse, certaines structures biologiques présentes dans les organismes vivants (mélanine, hémoglobine etc.) émettent un signal de fluorescence, tout particulièrement pour les basses longueurs d'ondes (400-700 nm). Une excitation dans le NIR (essentiellement entre 650 et 1450 nm)⁹⁷ apporte certains avantages sur le visible, caractérisés par une meilleure pénétration des photons, ainsi que de moindres diffusion et autofluorescence tissulaires.⁹⁸

2.3.1. Les appareils dédiés à l'imagerie optique

Les appareils commercialisés dédiés à l'imagerie optique per-opératoire (cf. Figure 15) sont composés d'une source d'excitation lumineuse, de récepteurs optiques associés à des filtres d'émission, et de logiciels de traitements couplés à un disque de stockage de données.

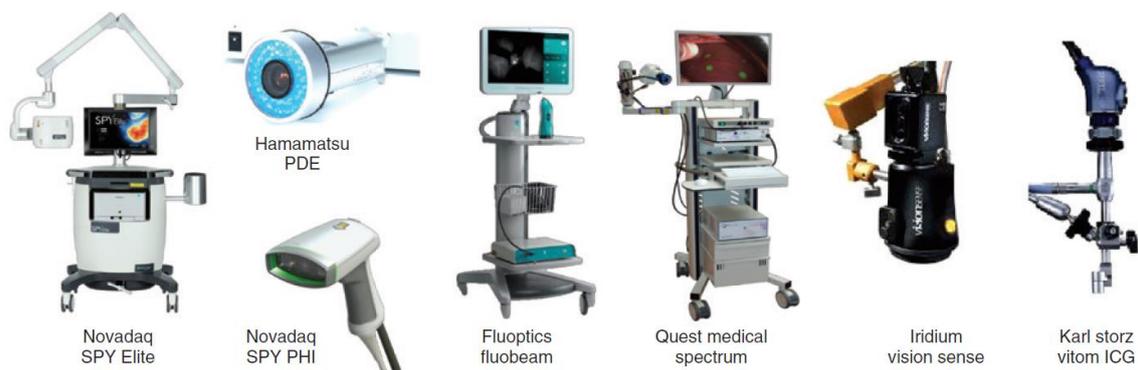


Figure 15 : exemples d'appareils commercialisés pour l'imagerie optique per-opératoire⁸⁸

⁹⁷ Pansare, V. J.; Hejazi, S.; Faenza, W. J.; Prud'homme, R. K. Review of long-wavelength optical and NIR imaging materials: contrast agents, fluorophores, and multifunctional nano carriers. *Chem. Mater.* **2012**, 24(5):812-827.

⁹⁸ Quek, C. H.; Leong, K. W. Near-infrared fluorescent nanoprobe for *in vivo* optical imaging. *Nanomaterials* **2012**, 2(2):92-112.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 2. L'imagerie per-opératoire

Ces appareils sont indispensables pour détecter les composés fluorescents non visibles à l'œil nu, soit à cause d'une faible concentration, soit à cause de leur longueur d'onde d'émission (i.e. NIR).

2.3.1.1. *La source d'excitation*

Il existe différentes sources d'excitation qui ne sont pas toutes équivalentes en termes de qualité. Parmi elles, les diodes laser et les lampes à large bande (lampes à mercure de 200 et 600 nm, lampes à xénon de 220 à 750 nm, lampes à tungstène de 350 à 2500 nm) additionnées d'un filtre sont les plus couramment utilisées. Toutefois ces dernières tendent à être supplantées par les diodes électroluminescentes (LED) qui possèdent un spectre d'émission plus étroit tout en étant faiblement émettrices de chaleur.⁸⁸

Les diodes laser sont les sources les plus efficaces en termes de discrimination spatiale et spectrale. Elles ont une largeur de bande d'émission très fine, ce qui permet de filtrer au maximum la lumière d'excitation par les récepteurs optiques. Elles présentent l'avantage de pouvoir exciter des fluorophores à faible concentration, sous réserve d'augmenter l'énergie délivrée. Ceci pose toutefois deux problèmes : la durée de vie de la diode laser et la sécurité quant à la limite d'exposition des patients, notamment concernant la peau et les yeux (le cas échéant). Les diodes laser ont tendance à chauffer en cours d'utilisation ce qui, en plus de diminuer leur efficacité, diminue également leur durée de vie. De plus, la largeur du faisceau est si petite qu'il est nécessaire d'adapter un expanseur afin de couvrir une surface d'exposition suffisante pour une application per-opératoire.⁸⁸

Les LED présentent quant à elles un bon compromis par rapport aux lampes à large bande et aux diodes laser, en termes d'efficacité, de discrimination spectrale et de prix. Elles peuvent être disposées en panneaux afin d'élargir la zone d'excitation lumineuse. La limite des LED concerne principalement les fluorophores à faible déplacement de Stokes. Dans ce cas, la lumière d'excitation peut fuiter jusqu'au filtre d'émission, et ainsi perturber le signal transmis et diminuer le ratio signal/bruit. Afin de limiter l'interaction de la source lumineuse avec la lumière émise, il est ainsi nécessaire de rajouter à la LED un filtre d'excitation.⁹⁹

2.3.1.2. *Champ de vue et filtres d'émission*

Les récepteurs optiques utilisés doivent être les plus sensibles possibles afin d'augmenter la distance entre ceux-ci et la zone opératoire. Le but ici est d'obtenir un outil n'interférant pas avec l'opération tout en proposant un champ visuel suffisant. Parmi les appareillages d'imagerie per-opératoire approuvés par la FDA, la distance de travail pour une chirurgie ouverte est en général comprise entre 20 cm et 60 cm pour un champ de vue allant jusqu'à 14x20 cm².⁸⁸

⁹⁹ Dsouza, A. V.; Lin, H.; Henderson, E. R.; Samkoe, K. S.; Pogue, B. W. Review of fluorescence guided surgery systems: identification of key performance capabilities beyond indocyanine green imaging. *J. Biomed. Opt.* **2016**, 21(8):080901.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 2. L'imagerie per-opératoire

Concernant les filtres d'émission, ils jouent un rôle essentiel dans le rendu des images, tant en termes de contraste que de sensibilité. Ces filtres dépendront du composé fluorescent utilisé et également de la lumière ambiante qui peut diminuer le ratio signal sur bruit de fond.

2.3.1.3. Les capteurs d'images

Les capteurs d'images sont des dispositifs permettant la transformation du signal électromagnétique émis par le fluorophore en signal électrique pour fournir une image numérique. Les capteurs les plus répandus pour l'imagerie de fluorescence sont les dispositifs à transfert de charges (CCD). Ces derniers fournissent des images à haute résolution et sont d'un excellent rapport qualité/coût. Toutefois, ils présentent quelques inconvénients tels que la nécessité d'être refroidis, afin de diminuer le bruit de fond de l'image par les électrons parasites, un faible rendement quantique dans la zone du NIR et un temps d'acquisition long.⁹⁹

Il existe deux dispositifs à transfert de charges dérivés de la CCD standard qui sont plus sensibles et possèdent de meilleurs gains : les CCD à multiplication d'électrons (EMCCD) et les CCD intensifiées (ICCD). L'amélioration du gain des EMCCD et des ICCD leur permet de détecter des émissions très faibles, en revanche elles présentent un bruit de fond parasite plus important, ce qui diminue la qualité des images obtenues.

Enfin, les CMOS (complementary metal oxide semi-conductor) ont une résolution importante, un temps d'acquisition rapide, une sensibilité et un rendement quantique élevés avec un faible bruit parasite. Cette technologie reste toutefois très onéreuse, ce qui explique qu'un seul appareil approuvé par la FDA (SOLARIS®) soit à ce jour doté de ce capteur.

2.3.1.4. La superposition d'images

Pour une utilisation en per-opératoire, le chirurgien doit pouvoir visualiser en temps réel les rayonnements émis en lumière blanche et fluorescente. Nous pouvons citer en exemple : le FLARE® (fluorescence assisted resection and exploration),¹⁰⁰ qui est équipé de trois CCDs à l'intérieur d'une seule camera. Cette caméra est composée de miroirs dichroïques et de filtres permettant, à partir de la même émission lumineuse, de superposer différentes longueurs d'ondes d'émission, en l'occurrence pour cet appareil : 800 nm, 700 nm et lumière blanche. De plus, un module permet de superposer ces trois images en temps réel (cf. Figure 16).

¹⁰⁰ <http://www.curadel.com/rp1/>

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 2. L'imagerie per-opératoire

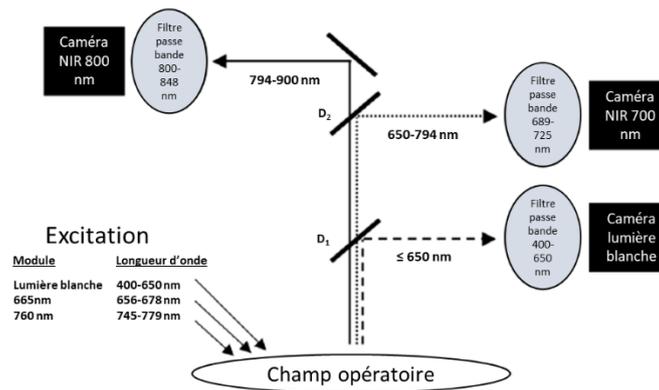


Figure 16 : système d'imagerie FLARE® (D₁ : miroir dichroïque 680 nm, D₂ : miroir dichroïque 770 nm)¹⁰¹

Ce type d'imageur permet d'acquérir simultanément des images issues de deux longueurs d'ondes d'émission différentes, superposées à l'image en lumière blanche. À titre d'exemple, sur la Figure 17 est représentée l'image d'un mésentère de cochon Yorkshire après injection i.v. de bleu de méthylène et d'un complexe ICG:HSA (HSA : sérum albumine humaine) dans le parenchyme du colon. Les couleurs ne respectent pas les longueurs d'ondes d'émission.

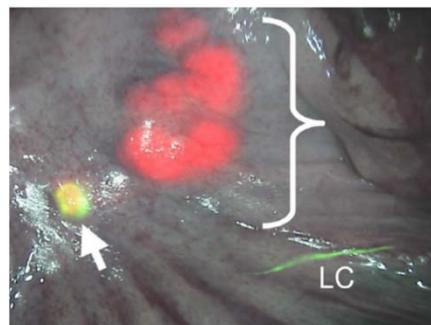


Figure 17 : images superposées en lumière blanche, à 700 nm (accolade : ganglions lymphatiques méésentériques) et 800 nm (flèche : ganglion sentinelle ; vert : chaîne lymphatique – LC) d'un mésentère de cochon Yorkshire après injections : a) i.v. de bleu de méthylène et b) de complexe ICG:HSA dans le parenchyme du colon¹⁰¹

Le bleu de méthylène permet de visualiser tous les ganglions lymphatiques méésentériques (700 nm, coloration rouge), et le complexe ICG:HSA permet de détecter le ganglion sentinelle (superposition des colorations rouge et verte). La coloration verte (800 nm) correspond à la chaîne lymphatique.

2.3.1.5. Impact de la lumière des salles d'opération sur la détection optique

Une difficulté technique est toutefois à prendre en compte, notamment dans le cas des chirurgies ouvertes : la lumière utilisée au sein des salles d'opération qui peut interférer avec les lumières d'excitation ou d'émission des composés fluorescents. L'utilisation de tels outils

¹⁰¹ Troyan, S. L.; Kianzad, V.; Gibbs-Strauss, S. L.; Gioux, S.; Matsui, A.; Oketokoun, R.; Ngo, L.; Khamene, A.; Azar, F.; Frangioni, J. V. The FLARE™ intraoperative near-infrared fluorescence imaging system: a first-in-human clinical trial in breast cancer sentinel lymph node mapping. *Ann. Surg. Oncol.* **2009**, 16(10):2943-2952.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 2. L'imagerie per-opératoire

est difficilement concevable si les chirurgies doivent se passer dans l'obscurité pour obtenir un ratio signal/bruit suffisant pour générer des images de fluorescence de qualité. Un comparatif a été réalisé concernant les luminaires les plus utilisés en chirurgie (cf. Figure 18), à savoir les lampes à tungstène, les lampes halogènes, les lampes fluorescentes compactes (LFC) ou encore les LED.

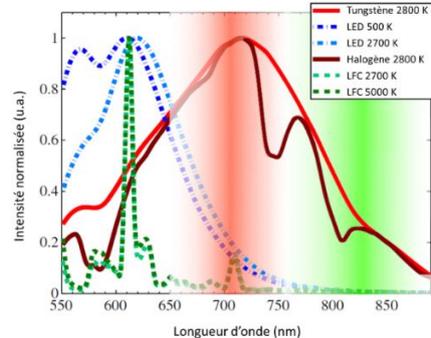


Figure 18 : spectres d'émission de sources lumineuses utilisées en chirurgie⁹⁹

On s'aperçoit aisément que certains luminaires peuvent interférer avec une émission fluorescente dans le NIR (i.e. lampe à tungstène 2800 K, lampe halogène 2800 K) et seraient donc à proscrire afin d'améliorer l'efficacité de ce type d'imagerie. Une autre possibilité afin d'augmenter le ratio signal/bruit serait d'utiliser une lumière pulsée, d'une puissance supérieure à celle utilisée pour l'irradiation en continue, comme source d'excitation des fluorophores.¹⁰²

2.3.2. Éléments clés pour le développement d'une sonde fluorescente dédiée à l'imagerie per-opératoire

De nombreux paramètres sont à considérer en vue de l'utilisation d'une sonde fluorescente pour l'imagerie per-opératoire : ceux-ci sont liés aux propriétés physiques (longueurs d'ondes d'excitation et d'émission, rendement quantique etc.) et/ou pharmacologiques du fluorophore utilisé.

2.3.2.1. Les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission

Les longueurs d'ondes de la lumière incidente et de la lumière transmise doivent pouvoir traverser une épaisseur maximale de tissu. Pour cela, la lumière utilisée doit être comprise entre 700 nm et 900 nm. En dessous de 700 nm, la diffusion tissulaire est trop importante et ne permet pas d'obtenir une pénétration suffisante (quelques centaines de micromètres seulement). Au-dessus de 900 nm, l'eau présente un pic d'absorption diminuant l'efficacité de la transmission lumineuse.¹⁰³ Il est enfin préférable que le recouvrement des spectres d'absorption et d'émission du fluorophore soit minimal, afin d'éviter l'atténuation du signal

¹⁰² Sexton, K.; Davis, S. C.; McClatchy III, D.; Valdes, P. A.; Kanick, S. C.; Paulsen, K. D.; Roberts, D. W.; Pogue, B. W. Pulsed-light imaging for fluorescence guided surgery under normal room lighting. *Opt. Lett.* **2013**, 38(17):3249-3252.

¹⁰³ te Velde, E. A.; Veerman, T.; Subramaniam, V.; Ruers, T. The use of fluorescent dyes and probes in surgical oncology. *Eur. J. Surg. Oncol.* **2010**, 36(1):6-15.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 2. L'imagerie per-opératoire

d'émission par la lumière excitatrice, et un écart supérieur à 30 nm entre ces deux valeurs est considéré comme suffisant.¹⁰⁴

2.3.2.2. Le coefficient d'extinction molaire et le rendement quantique

Le coefficient d'extinction molaire est une valeur mesurant la capacité d'un composé à absorber la lumière. Elle est définie par la formule $\varepsilon = \frac{A}{CL}$ où A est l'absorbance, C la concentration molaire, et L la longueur du trajet optique. Plus cette valeur est élevée, plus le fluorophore absorbe la lumière d'excitation, après quoi le rendement quantique définira l'efficacité de la transmission lumineuse du fluorophore.

Le rendement quantique est défini par le ratio du nombre de photons émis rapporté au nombre de photons absorbés, et est donc compris entre 0 (0%) et 1 (100%). On considère qu'un composé est fluorescent lorsque son rendement quantique est supérieur à 10%. Un fluorophore dédié à l'imagerie se doit donc d'avoir le rendement quantique le plus élevé possible.

2.3.2.3. Le photoblanchiment

Une limite fréquente concernant les fluorophores est le photoblanchiment (cf. Figure 19).¹⁰⁵

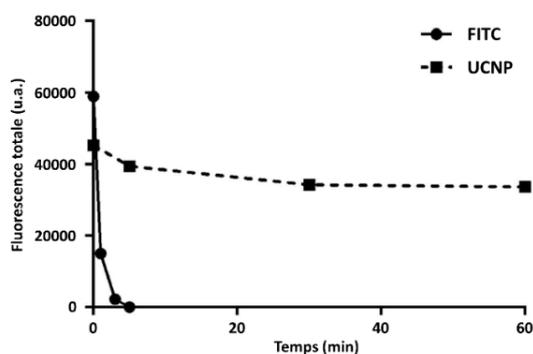


Figure 19 : comparaison de la fluorescence du FITC ($\lambda_{exc} = 473$ nm) et d'UCNPs ($\lambda_{exc} = 980$ nm) conjuguées à la streptavidine sur des cellules DU145 sous irradiation continue (FITC : isothiocyanate de fluorescéine ; UCNP : nanoparticule à upconversion)¹⁰⁵

L'exemple présenté ci-avant compare l'émission de fluorescence d'UCNPs à celle de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) sous irradiation continue à leur longueur d'onde d'excitation maximale respective. Il apparaît que l'excitation continue des UCNPs ne semble pas affecter leurs propriétés de fluorescence. Inversement, la perte de fluorescence du FITC est quasi-totale après seulement 3 minutes d'excitation continue : on parle alors de

¹⁰⁴ Zhang, R. R.; Schroeder, A. B.; Grudzinski, J. J.; Rosenthal, E. L.; Warram, J. M.; Pinchuk, A. N.; Eliceiri, K. W.; Kuo, J. S.; Weichert, J. P. Beyond the margins: real-time detection of cancer using targeted fluorophores. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2017**, 14(6):347-364.

¹⁰⁵ Shi, Y.; Shi, B.; Everest Dass, A. V.; Lu, Y.; Sayyadi, N.; Kautto, L.; Willows, R. D.; Chung, R.; Piper, J.; Nevalainen, H.; Walsh, B.; Jin, D.; Packer, N. H. Stable upconversion nanohybrid particles for specific prostate cancer cell immunodetection. *Sci. Rep.* **2016**, 6:37533.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 2. L'imagerie per-opératoire

photoblanchiment. Ce phénomène est consécutif à la dégradation du fluorophore dans les conditions d'expérience (température, rayonnements, radicaux libres, adsorption de protéines plasmatiques en surface du composé, etc.). Sachant qu'une sonde per-opératoire sera soumise à des temps d'irradiation prolongés, sa photostabilité sera un élément déterminant à prendre en considération.

2.3.3. Les médicaments fluorescents en imagerie per-opératoire

Actuellement, trois composés ont l'AMM pour une application en chirurgie per-opératoire : le vert d'indocyanine, le bleu de méthylène et l'acide 5-aminolévulinique.

Parmi les autres fluorophores couramment utilisés en imagerie NIR pré-clinique, on retrouve les squarènes, les bore-dipyrrométhènes (BODIPY®), les rhodamines et les porphyrines. Ces composés, qui ne seront pas abordés plus avant ici, ont été développés tant pour élargir la gamme de longueurs d'ondes d'excitation et d'émission disponibles, dont les conversions NIR/NIR, que pour limiter les phénomènes de photoblanchiment.

2.3.3.1. Le vert d'indocyanine (ICG)

Ce fluorophore (cf. Figure 20) a obtenu l'AMM en France en 2003 et est indiqué :

- Pour l'angiographie oculaire, entre autres dans le cadre de la dégénérescence maculaire liée à l'âge ;
- Dans la détermination du débit sanguin hépatique ;
- Dans la mesure du volume sanguin et du débit cardiaque.¹⁰⁶

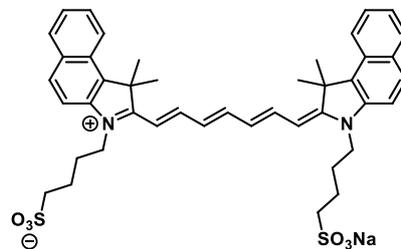


Figure 20 : structure du vert d'indocyanine

L'ICG est un fluorophore qui sous excitation à 805 nm, réémet dans le NIR à 835 nm. Après administration intraveineuse (i.v.), il se lie aux protéines plasmatiques puis est capté par les hépatocytes et est enfin éliminé par voie biliaire avec un temps de demi-vie plasmatique court (3,4 minutes chez le sujet sain).

En tenant compte de ses propriétés pharmacocinétiques, notamment son élimination par voie hépato-biliaire, l'ICG a été étudié pour la cholangiographie per-opératoire de patients

¹⁰⁶ https://www.vidal.fr/Medicament/infracyanine_25_mg_10_ml_pdre_solv_p_sol_inj-20459-indications.htm

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 2. L'imagerie per-opératoire

présentant un carcinome hépatocellulaire. Lors de cet examen, les cliniciens ont pu observer une accumulation forte de cette sonde au sein des foyers tumoraux.¹⁰⁷

À titre d'exemple, il a été montré l'aide apportée par l'ICG lors de la chirurgie de métastases hépatiques chez des patients atteints d'un cancer colorectal (cf. Figure 21).¹⁰⁸

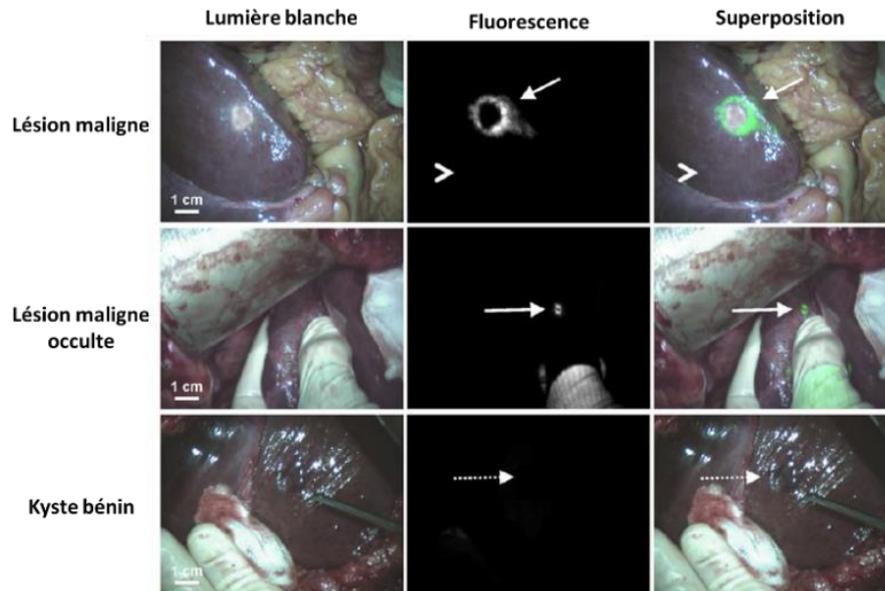


Figure 21 : images per-opératoires de métastases hépatiques chez un patient atteint d'un cancer colorectal, en lumière blanche, en fluorescence et les deux superposées. Flèche pleine : métastase ; symbole > : tissu sain ; flèche pointillée : kyste bénin. La fluorescence des métastases sous forme d'anneau s'expliquerait par une probable dysfonction de l'excrétion biliaire des tissus sains comprimés autour de la tumeur.¹⁰⁸

Le but de cette étude était d'évaluer l'impact de la fluorescence per-opératoire pour la détection des métastases hépatiques en complément de l'imagerie anté-opératoire. Bien que la fluorescence per-opératoire présente une sensibilité similaire à la tomographie anté-opératoire (73% et 75% respectivement sur un total de 97 lésions métastatiques), elle demeure largement inférieure aux approches de palpation et d'US per-opératoires (95%).

Une autre étude a montré des résultats prometteurs chez 3 patientes atteintes d'un mélanome choroïdien métastatique.¹⁰⁹ Alors que seule une métastase hépatique avait été détectée chez ces 3 patientes lors des imageries anté-opératoires par TDM, TEP et US, des métastases occultes ont pu être visualisées lors de l'ablation chirurgicale grâce à l'utilisation de l'imagerie de fluorescence par l'ICG (cf. Figure 22).

¹⁰⁷ 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.

¹⁰⁸ van der Vorst, J. R.; Schaafsma, B. E.; Hutteman, M.; Verbeek, F. P. R.; Liefers, G.-J.; Hartgrink, H. H.; Smit, V. T. H. B. M.; Löwik, C. W. G. M.; van de Velde, C. J. H.; Frangioni, J. V.; Vahrmeijer, A. L. Near-infrared fluorescence-guided resection of colorectal liver metastases. *Cancer* **2013**, 119(18):3411-3418.

¹⁰⁹ Tummers, Q. R. J. G.; Verbeek, F. P. R.; Prevo, H. A. J. M.; Braat, A. E.; Baeten, C. I. M.; Frangioni, J. V.; van de Velde, C. J. H.; Vahrmeijer, A. L. First experience on laparoscopic near-infrared fluorescence imaging of hepatic uveal melanoma metastases using indocyanine green. *Surg. Innov.* **2015**, 22(1):20-25.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 2. L'imagerie per-opératoire

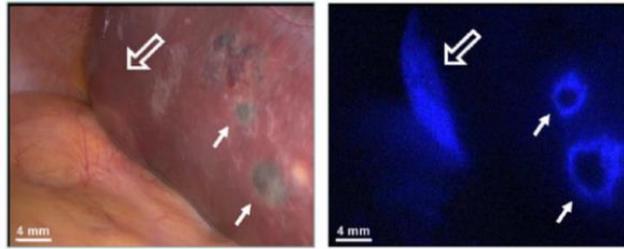


Figure 22 : image en spectre visible (gauche) et en fluorescence (droite) de métastases hépatiques d'un mélanome choroidien 24 h après l'injection de l'ICG. Flèche ouverte : métastase connue avant la chirurgie ; flèches pleines : métastases occultes¹⁰⁹

Cette étude illustre l'intérêt de coupler la chirurgie à l'imagerie de fluorescence afin de détecter en temps réel les métastases occultes et pour différencier celles-ci des kystes bénins, et ainsi améliorer la sensibilité et la spécificité de l'acte chirurgical.

Ce fluorophore a également été étudié en association avec l'imagerie scintigraphique pour la détection des ganglions sentinelles chez des patientes atteintes d'un cancer de la vulve.¹¹⁰ Verbeek *et al.* ont comparé l'utilisation de l'ICG seul à l'ICG couplé à un nanocolloïde radiomarqué au technétium-99m.¹¹¹ L'étude conclut que l'utilisation de ce type de dérivés radioactifs et fluorescents peut apporter un avantage non négligeable pour la détection per-opératoire des ganglions sentinelles après lymphoscintigraphie (75% pour l'ICG seul vs 83% pour l'ICG couplé au nanocolloïde radiomarqué). Ceci pourrait par extension permettre d'optimiser le curage ganglionnaire réduisant *de facto* le temps nécessaire à l'opération et les comorbidités associées.

2.3.3.2. Le bleu de méthylène

Le bleu de méthylène est un fluorophore qui, sous excitation à 665 nm, émet à 686 nm.¹¹² Ce fluorophore a obtenu l'AMM en 2011 dans le traitement des méthémoglobiniémies et en 2012 en tant qu'antiseptique pour le traitement des irritations conjonctivales non infectieuses (cf. Figure 23).¹¹³

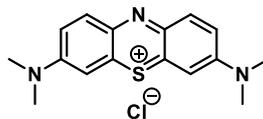


Figure 23 : structure du bleu de méthylène

-
- ¹¹⁰ Verbeek, F. P. R.; Tummers, Q. R. J. G.; Rietbergen, D. D. D.; Peters, A. A. W.; Schaafsma, B. E.; van de Velde, C. J. H.; Frangioni, J. V.; van Leeuwen, F. W. B.; Gaarenstroom, K. N.; Vahrmeijer, A. L. Sentinel lymph node biopsy in vulvar cancer using combined radioactive and fluorescence guidance. *Int. J. Gynecol. Cancer* **2015**, 25(6):1086-1093.
- ¹¹¹ Schaafsma, B. E.; Verbeek, F. P. R.; Peters, A. A. W.; van der Vorst, J. R.; de Kroon, C. D.; van Poelgeest, M. I. E.; Trimbos, J. B. M. Z.; van de Velde, C. J. H.; Frangioni, J. V.; Vahrmeijer, A. L.; Gaarenstroom, K. N. Near-infrared fluorescence sentinel lymph node biopsy in vulvar cancer: a randomised comparison of lymphatic tracers. *BJOG*. **2013**, 120(6):758-764.
- ¹¹² Selvam, S.; Sarkar, I. Bile salt induced solubilization of methylene blue: study on methylene blue fluorescence properties and molecular mechanics calculation. *J. Pharm. Anal.* **2017**, 7(1):71-75.
- ¹¹³ https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2011-08/chlorure_de_methylthionium_proveblue_-_ct-_10943.pdf

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 2. L'imagerie per-opératoire

Il a également été montré que le bleu de méthylène se fixe entre autres sur les glandes parathyroïdes après injection i.v. Cette accumulation non spécifique a été exploitée lors de parathyroïdectomies (cf. Figure 24).¹¹⁴

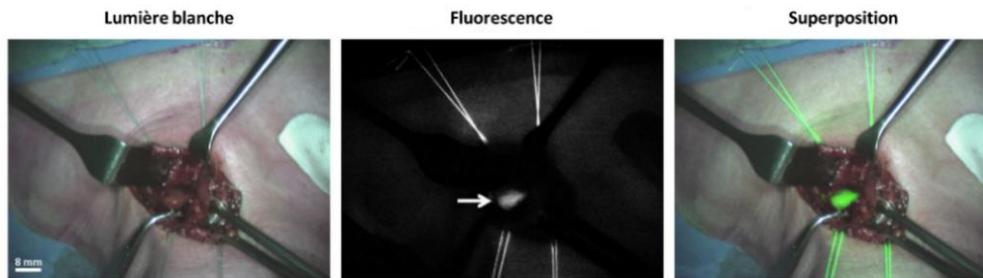


Figure 24 : images per-opératoires d'un adénome parathyroïdien après injection de bleu de méthylène¹¹⁴

L'utilisation du bleu de méthylène dans cette étude a fait suite à une imagerie TEMP corps entier ($[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -sestamibi) et/ou à une détection locale par US. L'injection de bleu de méthylène a été réalisée immédiatement après anesthésie, et le temps moyen de détection de la fluorescence a été de 77 minutes. Lors de cette étude, toutes les masses présentant de la fluorescence se sont avérées cancéreuses.

Par ailleurs, ce fluorophore a été étudié pour l'imagerie de structures non cancéreuses lors d'opérations colorectales, par exemple pour la visualisation des uretères, zones à l'origine de plaies iatrogènes (estimées entre 0,3 et 1,5% de ces opérations) (cf. Figure 25).¹¹⁵

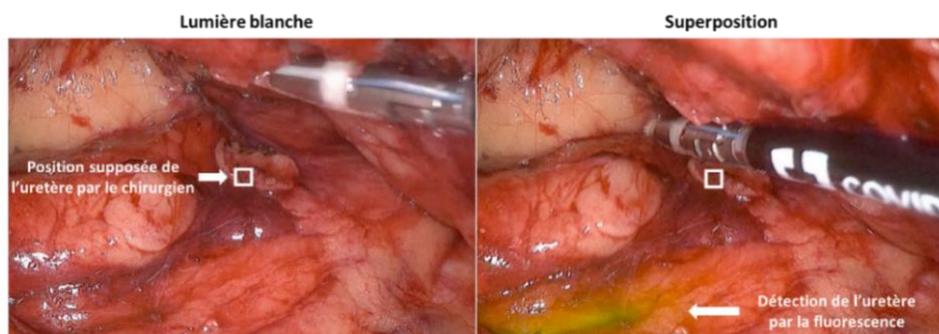


Figure 25 : image en lumière blanche (gauche) : le carré désigne la zone où le chirurgien estime l'uretère gauche ; image superposée lumière blanche et fluorescente (droite)¹¹⁵

Le bleu de méthylène a également fait l'objet d'études cliniques pour la détection de ganglions sentinelles dans diverses pathologies cancéreuses (cancers de l'œsophage, gastrique, colorectal etc.).¹¹⁶

¹¹⁴ Tummers, Q. R. J. G.; Schepers, A.; Hamming, J. F.; Kievit, J.; Frangioni, J. V.; van de Velde, C. J. H.; Vahrmeijer, A. L. Intraoperative guidance in parathyroid surgery using near-infrared fluorescence imaging and low-dose methylene blue. *Surgery* **2015**, 158(5):1323-1330.

¹¹⁵ Barnes, T. G.; Hompes, R.; Birks, J.; Nortensen, N. J.; Jones, O.; Lindsey, I.; Guy, R.; George, B.; Cunningham, C.; Yeung, T. M. Methylene blue fluorescence of the ureter during colorectal surgery. *Surg. Endosc.* **2018**, 32(9):4036-4043.

¹¹⁶ van Manen, L.; Handgraaf, H. J. M.; Diana, M.; Dijkstra, J.; Ishizawa, T.; Vahrmeijer, A. L.; Mieog, J. S. D. A practical guide for the use of indocyanine green and methylene blue in fluorescence-guided abdominal surgery. *J. Surg. Oncol.* **2018**, 118(2):283-300.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 2. L'imagerie per-opératoire

2.3.3.3. L'acide 5-aminolévulinique

L'acide 5-aminolévulinique (5-ALA) est un intermédiaire clef lors de la biosynthèse de la protoporphyrine IX (PPIX) fluorescente, précurseur de l'hème, qui s'accumule dans les mitochondries (cf. Figure 26).

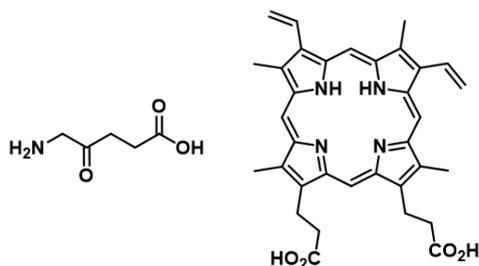


Figure 26 : structures de l'acide 5-aminolévulinique (gauche) et de la protoporphyrine IX (droite)

Sous excitation dans le bleu entre 375 et 440 nm, la PPIX émet dans le rouge à deux longueurs d'ondes : 635 et 705 nm. Le 5-ALA a reçu l'AMM notamment pour son utilisation en urologie après injection intra-vésicale pour la détection de tissu malin (par accumulation intracellulaire au niveau des tumeurs de la paroi de la vessie) et en neurochirurgie pour l'imagerie per-opératoire des gliomes malins (par dégradation de la barrière hématoencéphalique le cas échéant).

Une étude clinique de phase III, chez des patients suspectés de présenter un gliome malin, a cherché à montrer l'intérêt de la chirurgie guidée par la fluorescence au 5-ALA vs chirurgie seule pour la résection complète de la tumeur.¹¹⁷ Les critères d'efficacité ont été établis sur les résultats IRM obtenus après opération ainsi qu'en tenant compte de la survie sans progression des patients. Cette étude a conduit à une amélioration de la survie sans progression à 6 mois (41% vs 21%), estompée à partir du 9^{ème} mois après l'opération, pour les patients traités sous imagerie de fluorescence comparativement au groupe contrôle. De plus, la complétion de la chirurgie estimée par IRM post-opératoire a été de 65% chez les patients dont la chirurgie a été réalisée avec le 5-ALA, et de 36% chez les patients dont la chirurgie a été réalisée en lumière blanche.

Les principales limites de ce médicament reposent d'une part sur les réactions phototoxiques qu'il peut engendrer, et d'autre part sur la longueur d'onde d'excitation mise en jeu (pour rappel 400 à 410 nm), qui est fortement absorbée par l'hémoglobine.¹¹⁸ De plus, il ne s'accumule dans les cellules malignes que pour les gliomes de stades avancés (stades III et IV). Malgré ces limites, il possède l'AMM depuis 2007 pour l'imagerie per-opératoire des gliomes malins de hauts grades.

¹¹⁷ Stummer, W.; Pichlmeier, U.; Meinel, T.; Wiestler, O. D.; Zanella, F.; Reulen, H.-J.; ALA-Glioma Study Group. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol.* **2006**, 7(5):392-401.

¹¹⁸ Stepp, H.; Stummer, W. 5-ALA in the management of malignant glioma. *Lasers Surg. Med.* **2018**, 50(5):399-419.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 2. L'imagerie per-opératoire

À travers les exemples précédemment cités, il ressort que l'utilisation de sondes fluorescentes lors de la chirurgie peut être un atout majeur pour améliorer la prise en charge des patients en permettant notamment une meilleure détection des tumeurs et des métastases, tout en améliorant l'ablation des lésions cancéreuses. Toutefois, ces trois fluorophores présentent plusieurs inconvénients qui restreignent leur utilisation : des plages d'excitation/émission non optimales ainsi qu'une faible photostabilité. De plus, sous leur forme native, ils ne permettent de cibler que quelques rares types cellulaires.¹¹⁹

2.3.1. Les fluorophores organiques en développement

Différentes sondes ont été développées pour répondre aux exigences de l'imagerie per-opératoire dans le NIR tout en améliorant leur stabilité et leur hydrophilie. De plus, des stratégies de vectorisation active ont également été mises en œuvre afin d'élargir leurs champs d'application (cf. Figure 27).⁹⁸

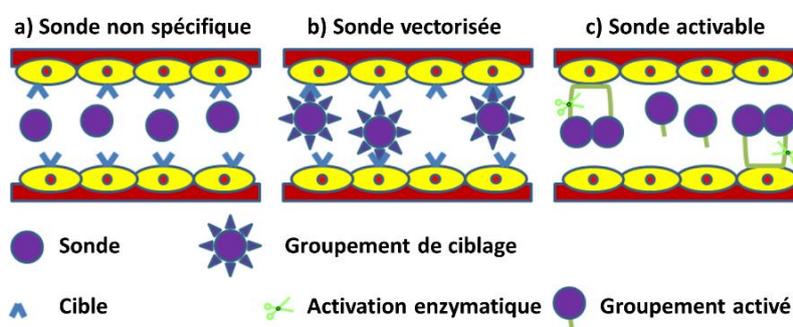


Figure 27 : modes de ciblage de la fluorescence. a) passif ; b) vectorisée ; c) non fluorescent avant activation⁹⁸

Concernant ce dernier point, deux stratégies sont possibles : l'adressage du fluorophore après conjugaison de ce dernier avec un ligand spécifique de la cible visée (récepteur, protéine etc.) ; le déclenchement de la fluorescence dans des conditions particulières, par exemple après clivage enzymatique spécifique.⁹⁸

2.3.1.1. Les cyanines

Les cyanines sont des fluorophores synthétiques composés de deux centres azotés liés par des groupements polyméthines (motif $-(CH=CH)-$) (cf. Figure 28). Ils représentent la famille de fluorophores la plus aboutie en termes de développement.⁹⁸

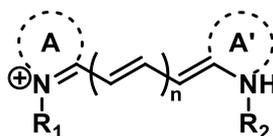


Figure 28 : structure générale des cyanines. A et A' sont deux bases hétéroaromatiques quaternisées⁹⁸

Ils présentent des coefficients d'extinction molaires élevés ($> 120\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et une faible toxicité. La différence entre les différents membres réside dans leurs longueurs d'ondes

¹¹⁹ Hong, G.; Antaris, A. L.; Dai, H. Near-infrared fluorophores for biomedical imaging. *Nature Biomedical Engineering* **2017**, 1(1):0010.

BIBLIOGRAPHIE
Chapitre 2. L'imagerie per-opératoire

d'excitation et d'émission comme par exemple pour les cyanines 5.5 ($\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 675/694$ nm dans le rouge), 7 ($\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 747/774$ nm dans le rouge lointain) et 7.5 ($\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 788/808$ nm dans le NIR), dépendante notamment de la longueur de la chaîne polyméthine.⁹⁸

Ces fluorophores, largement utilisés pour des applications *in vitro*, présentent toutefois certaines limites pour le développement de sondes per-opératoires, comme une faible photostabilité, une solubilité en milieu aqueux limitée conduisant à forte concentration à des phénomènes d'agrégation, ou de faibles rendements quantiques (ne dépassant pas les 30%).⁹⁷

Afin d'atténuer ces limites, différentes modifications structurales ont été apportées, telles que l'addition d'une ou plusieurs fonctions acide sulfonique ou carboxylique, qui permettent d'améliorer la solubilité de ces composés en milieu aqueux ainsi que leur coefficient d'extinction molaire et leur rendement quantique.

Par exemple, l'IR-800CW ($\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 786/800$ nm) ou son dérivé zwitterionique, le ZW800-1 ($\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 772/788$ nm) présentent une photostabilité, un coefficient d'extinction molaire et un rendement quantique plus élevés que le vert d'indocyanine.¹⁰⁴

L'IR-800CW a notamment été étudié pour la chirurgie du glioblastome multiforme.¹²⁰ Dans cet exemple, le neurotransmetteur bombésine (BBN, dont le récepteur joue un rôle dans le développement des glioblastomes) couplé à l'IR-800CW a été radiomarqué au gallium-68. L'utilisation de la radioactivité a permis d'associer à l'IRM, l'imagerie TEP en préopératoire afin de mieux appréhender les limites des tumeurs, tandis que la fluorescence a été utilisée pour guider la chirurgie (cf. Figure 29).

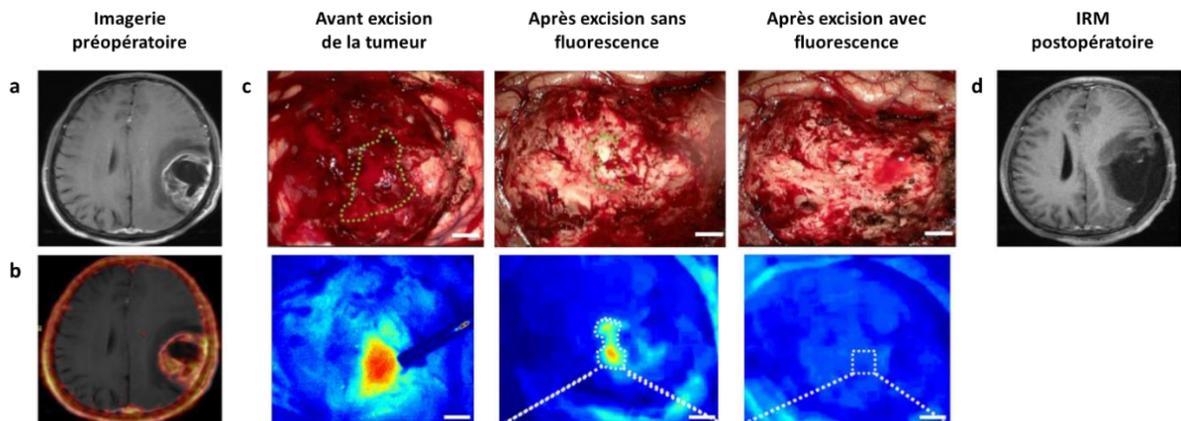


Figure 29 : a : image d'IRM préopératoire ; b : image préopératoire superposée de l'IRM et de la TEP au gallium-68 ; c : suivi peropératoire en lumière blanche et en fluorescence d'un glioblastome multiforme (tumeur entourée en vert) ; d : image d'IRM postopératoire ; barre d'échelle : 5 mm, anesthésie 2 heures après injection de ^{68}Ga -IR-800CW-BBN¹²⁰

Lors de cette étude, la précision de l'imagerie de fluorescence a été évaluée à 95,2%, avec une sensibilité de 93,3% et une spécificité de 100%. La très bonne corrélation entre les données de fluorescence obtenues en per-opératoire et les images TEP/IRM préopératoires

¹²⁰ Li, D.; Zhang, J.; Chi, C.; Xiao, X.; Wang, J.; Lang, L.; Ali, I.; Niu, G.; Zhang, L.; Tian, J.; Ji, N.; Zhu, Z.; Chen, X. First-in-human study of PET and optical dual-modality image-guided surgery in glioblastoma using ^{68}Ga -IRDye800CW-BBN. *Theranostics* **2018**, 8(9):2508-2520.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 2. L'imagerie per-opératoire

aurait tendance à diminuer l'intérêt de l'IRM per-opératoire, méthode coûteuse et chronophage (estimée à environ 1 heure par opération).

2.3.1.2. Les squaraines

Ces structures sont dérivées de l'acide squarique et sont caractérisées par la présence de plusieurs groupements aromatiques conjugués. Dans cette famille de composés, plusieurs ont montré des propriétés intéressantes notamment en termes de coefficient d'extinction molaire et de rendement quantique (cf. Figure 30) parmi lesquelles des dérivés halogénés¹²¹ et des dérivés de type rotaxane¹²² (où un macrocycle forme un anneau entourant le squaraine mais non lié de façon covalente à ce dernier).

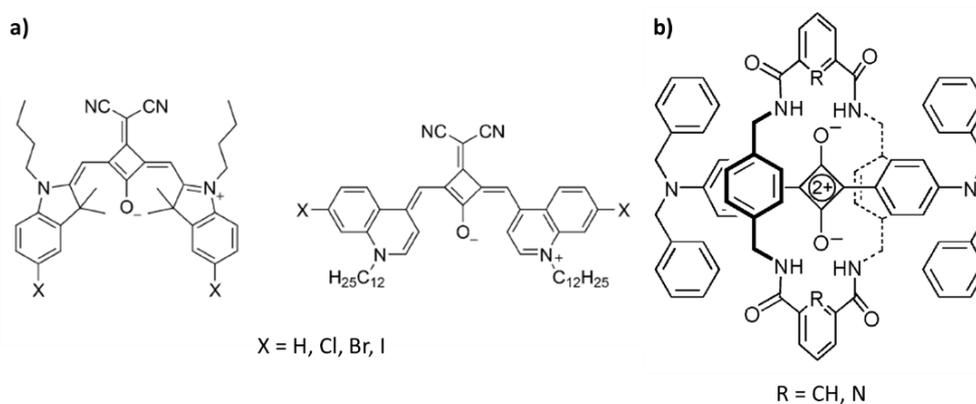


Figure 30 : structures de dérivés squaraines (a) et rotaxanes (b)

Si les rotaxanes ont des longueurs d'ondes maximales d'absorption et d'émission dans le visible ($\lambda_{exc\ max} \approx 650\ nm$; $\lambda_{em\ max} \approx 670\ nm$), ils présentent des rendements quantiques pouvant aller jusqu'à 58%. Les dérivés halogénés sont eux excités dans le NIR ($870\ nm < \lambda_{exc\ max} < 900\ nm$) et réémettent entre 890 nm et 922 nm. Bien qu'ils présentent des coefficients d'extinction molaire supérieurs à $200\ 000\ L.mol^{-1}.cm^{-1}$ ils possèdent un rendement quantique faible (compris entre 10% et 17%). La principale limite de ces composés est leur faible photostabilité en milieu aqueux.

2.3.1.3. Les bore-dipyrométhènes

Les BODIPY® sont des structures dérivées du 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène (cf. Figure 31) qui présentent des propriétés de fluorescence remarquables, avec notamment un coefficient d'extinction molaire élevé ($> 100\ 000\ L.mol^{-1}.cm^{-1}$) et des rendements quantiques généralement supérieurs à 70%.¹²³

¹²¹ Mayerhöffer, U.; Fimmel, B.; Würthner, F. Bright near-infrared fluorophores based on squaraines by unexpected halogen effects. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, 51(1):164-167.

¹²² Arunkumar, E.; Forbes, C. C.; Noll, B. C.; Smith, B. D. Squaraine-derived rotaxanes: sterically protected fluorescent near-IR dyes. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127(10):3288-3289.

¹²³ Ulrich, G.; Ziessel, R.; Harriman, A. The chemistry of fluorescent bodipy dyes: versatility unsurpassed. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, 47(7):1184-1201.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 2. L'imagerie per-opératoire



Figure 31 : structure générale d'un BODIPY

La principale limite de ces composés, pour une application *in vivo*, réside dans leur importante lipophilie.

2.3.1.4. Les rhodamines

Les rhodamines sont des fluorophores dérivés des xanthènes. Elles présentent l'avantage d'être hydrosolubles et photostables, ce qui a engendré des études *in vitro* et *in vivo*, notamment à partir de dérivés silylés.^{124,125} Dans cette grande famille de fluorophores, la rhodamine silylée conventionnelle (Si-rhodamine, cf. Figure 32) présente par exemple une émission à 660 nm après excitation à 646 nm.

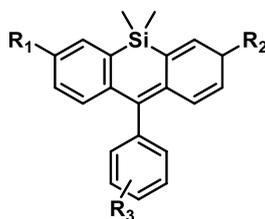


Figure 32 : squelette général des rhodamines silylées

Certaines modifications structurales, comme l'augmentation de la taille du système conjugué, ont permis d'obtenir des rhodamines émettant jusqu'à 740 nm après excitation à 721 nm. Pour ces composés silylés, le rendement quantique n'est toutefois pas très élevé (5%). Une autre limite à l'utilisation des rhodamines pour une application per-opératoire est le faible nombre de dérivés hydrosolubles disponibles pour la fluorescence dans le NIR.¹²⁶

2.3.1.5. Les porphyrines

Les porphyrines sont des molécules polycycliques largement répandues dans le monde vivant, entrant notamment dans la composition de l'hémoglobine des globules rouges. Les porphyrines possèdent un spectre d'absorption large, couvrant une gamme de longueurs d'ondes de l'UV au NIR (cf. Figure 33).

¹²⁴ Longmire, M.; Ogawa, M.; Hama, Y.; Kosaka, N.; Regino, C. A. S.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. Determination of optimal rhodamine fluorophore for *in vivo* optical imaging. *Bioconjug. Chem.* **2008**, 19(8):1735-1742.

¹²⁵ Koide, Y.; Urano, Y.; Hanaoka, K.; Piao, W.; Kusakabe, M.; Saito, N.; Terai, T.; Okabe, T.; Nagano, T. Development of NIR fluorescent dyes based on Si-rhodamine for *in vivo* imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134(11):5029-5031.

¹²⁶ Wang, L.; Du, W.; Hu, Z.; Uvdal, K.; Li, L.; Huang, W. Hybrid rhodamine fluorophores in the visible-NIR region for biological imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, 58(40):14026-14043.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 2. L'imagerie per-opératoire

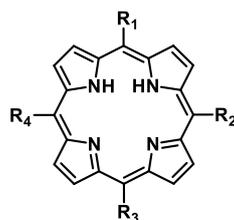


Figure 33 : structure générale d'une porphyrine conventionnelle

Leur structure leur permet de chélater des métaux, entre autres des radiométaux (comme par exemple le cuivre-64) ouvrant des applications en imagerie bimodale (optique/scintigraphique).¹²⁷ Elles peuvent enfin, du fait de leurs propriétés d'absorption, être utilisées en thérapie photodynamique ou photothermale.¹²⁸

Toutefois, ces molécules présentent un certain nombre de limites pour une application *in vivo*, étant pour la plupart potentiellement phototoxiques.

2.4. Vers une double détection imagerie optique/radioactive

Les approches d'imagerie optique et de radiodétection per-opératoires permettent d'ores et déjà d'améliorer significativement la prise en charge chirurgicale des patients, particulièrement en oncologie. De nombreuses études sont en cours afin d'améliorer les appareillages et sondes radioactives/fluorescentes utilisés. Afin de combiner les avantages de ces deux techniques, de nouveaux appareils permettant une double détection optique/radioactive ont vu le jour conjointement à l'émergence des traceurs hybrides associés (cf. Figure 34).^{129,130,131}

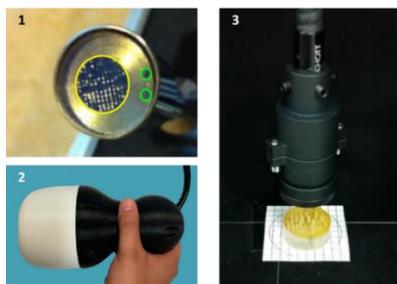


Figure 34 : exemples de systèmes permettant chacun de réaliser une double détection optique/radioactive^{129,130,131}

¹²⁷ Luo, D.; Goel, S.; Liu, H. J.; Carter, K. A.; Jiang, D.; Geng, J.; Kuttyreff, C. J.; Engle, J. W.; Huang, W. C.; Shao, S.; Fang, C.; Weibo, C.; Lovell, J. F. Intrabilayer ⁶⁴Cu labelling of photoactivatable, doxorubicin-loaded stealth liposomes. *ACS Nano* **2017**, 11(12):12482-12491.

¹²⁸ Tsolekile, N.; Nelana, S.; Oluwafemi, O. S. Porphyrin as diagnostic and therapeutic agent. *Molecules* **2019**, 24(14):E2669.

¹²⁹ van den Berg, N. S.; Simon, H.; Kleinjan, G. H.; Engelen, T.; Bunschoten, A.; Welling, M. M.; Tijink, B. M.; Horenblas, S.; Chambron, J.; van Leeuwen, F. W. B. First-in-human evaluation of a hybrid modality that allows combined radio- and (near-infrared) fluorescence tracing during surgery. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2015**, 42(11):1639-1647.

¹³⁰ Kang, H. G.; Lee, H. Y.; Kim, K. M.; Song, S. H.; Hong, G. C.; Hong, S. J. A feasibility study of an integrated NIR/gamma/visible imaging system for endoscopic sentinel lymph node mapping. *Med. Phys.* **2017**, 44(1):227-239.

¹³¹ Lees, J. E.; Bugby, S. L.; Alqahtani, M. S.; Jambi, L. K.; Dawood, N. S.; McKnight, W. R.; Ng, A. H.; Perkins, A. C. A multimodality hybrid gamma-optical camera for intraoperative imaging. *Sensors* **2017**, 17(3):554.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 2. L'imagerie per-opératoire

Ces appareils sont dotés d'une sonde de détection γ , d'un laser ($\lambda_{\text{exc}} = 740-785 \text{ nm}$) et d'un filtre d'émission NIR ($\lambda_{\text{em}} = 780-820 \text{ ou } > 810 \text{ nm}$). Le seul appareil disponible actuellement pour un usage clinique (Figure 34, image 1) a été testé notamment pour la détection des ganglions sentinelles.^{129,132,133} Les premières études ont été réalisées *ex vivo* sur 150 prélèvements de ganglions sentinelles de cancers de la tête et du cou, de la prostate ou du pénis. Sur l'ensemble de ces échantillons, tous les ganglions étaient radioactifs, et la sensibilité de la fluorescence était de 98,9%. En parallèle, l'équipe de van den Berg *et al.*¹²⁹ a également testé ce système en per-opératoire chez 9 patients (2 cancers de la tête et du cou, 7 cancers du pénis) pour un total de 20 ganglions, tous détectés à la fois par la radioactivité et par la fluorescence.

2.5. Exemples de traceurs utilisés pour l'imagerie bimodale per-opératoire en cancérologie

Parmi les traceurs étudiés pour l'imagerie bimodale per-opératoire, nous pouvons citer des nanocolloïdes de technétium-99m couplés à de l'ICG pour la détection des ganglions sentinelles dans le cadre de CaP.¹³⁴ Dans cet exemple, le radiopharmaceutique est injecté dans la prostate 3 heures avant l'intervention chirurgicale, permettant ainsi de réaliser une imagerie corps entier (TEMP/TDM) anté-opératoire (15 minutes et 2 heures après injection) et de bénéficier de la présence de celui-ci pendant l'opération. Cette étude a montré l'avantage d'associer les deux types de détections qui pallient les limites de chacune. En effet, la radiodétection per-opératoire est limitée par le bruit de fond radioactif provenant de la zone d'injection et par sa résolution spatiale, rendant difficile l'appréhension de la profondeur du signal émis, nettement améliorée ici par l'imagerie optique.

D'autres structures ont été développées, utilisant par exemple l'IR-800CW associé au girentuximab (anticorps (Ac) anti-anhydrase carbonique IX), le tout radiomarké avec de l'indium-111 pour l'imagerie TEMP/TDM et le suivi per-opératoire en temps réel du carcinome rénal (cf. Figure 35).¹³⁵

¹³² Kleinjan, G. H.; van Werkhoven, E.; van den Berg, N. S.; Karakullukcu, M. B.; Zijlmans, H. J. M. A. A.; van der Hage, J. A.; van de Wiel, B. A.; Buckle, T.; Klop, W. M. C.; Horenblas, S.; Valdés Olmos, R. A.; van der Poel, H. G.; van Leeuwen, F. W. B. The best of both worlds: a hybrid approach for optimal pre- and intraoperative identification of sentinel lymph nodes. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2018**, 45(11):1915-1925.

¹³³ Vidal-Sicart, S.; Seva, A.; Campos, F.; Sánchez, N.; Alonso, I.; Pahisa, J.; Caparrós, X.; Perissinotti, A.; Paredes, P.; van Leeuwen, F. W. Clinical use of an opto-nuclear probe for hybrid sentinel node biopsy guidance: first results. *Int. J. Comput. Assist. Radiol. Surg.* **2019**, 14(2):409-416.

¹³⁴ van der Poel, H. G.; Buckle, T.; Brouwer, O. R.; Valdés Olmos, R. A.; van Leeuwen, F. W. B. Intraoperative laparoscopic fluorescence guidance to the sentinel lymph node in prostate cancer patients: clinical proof of concept of an integrated functional imaging approach using a multimodal tracer. *Eur. Urol.* **2011**, 60(4):826-833.

¹³⁵ Hekman, M. C.; Rijpkema, M.; Muselaers, C. H.; Oosterwijk, E.; Van de Kaa, C. A. H.; Boerman, O. C.; Oyen, W. J.; Langenhuisen, J. F.; Mulders, P. F. Tumor-targeted dual-modality imaging to improve intraoperative visualization of clear cell renal cell carcinoma: a first in man study. *Theranostics* **2018**, 8(8):2161-2170.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 2. L'imagerie per-opératoire

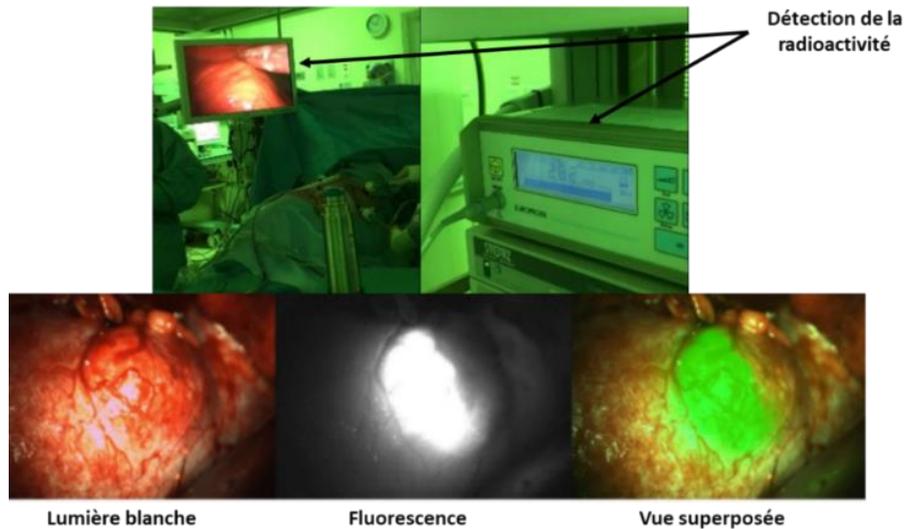


Figure 35 : imageries per-opératoires guidées par la fluorescence et la radioactivité d'un carcinome rénal¹³⁵

L'utilisation d'un Ac a imposé une injection différée par rapport à la chirurgie en raison de la distribution lente de ces biomolécules. Dans cet exemple, l'injection a été réalisée par voie i.v. une semaine avant la chirurgie. Bien que ces travaux aient été limités par le manque d'outils laparoscopiques dédiés à l'imagerie optique, cette double détection s'est avérée être profitable, notamment dans la recherche de marges positives après l'ablation des tumeurs chez les 15 patients concernés.

2.6. Exemples spécifiques au CaP

L'imagerie per-opératoire dans le cadre du CaP a d'abord été réalisée pour la détection des ganglions sentinelles. L'utilisation i.v. de sondes radiomarquées, éliminées généralement par voie rénale, étant contre-indiquées pour ce cancer en raison de la proximité anatomique entre la vessie et la prostate, celles-ci sont administrées localement. Cette approche apporte la possibilité de détecter les ganglions sentinelles en per-opératoire afin d'alléger l'acte chirurgical et d'éviter un curage total, source de comorbidités importantes. Une méta-analyse a été réalisée en ce sens en comparant le curage ganglionnaire étendu (servant de référence) à la biopsie des ganglions sentinelles, faisant ressortir des sensibilité et spécificité de 95% et 100% respectivement pour cette dernière.¹³⁶ Cette approche n'est toutefois pas recommandée dans le cadre du CaP à cause d'une proportion importante de faux négatif (estimée à 20%) attribuée au mauvais drainage lymphatique consécutif à l'oblitération de ces

¹³⁶ Wit, E. M. K.; Acar, C.; Grivas, N.; Yuan, C.; Horenblas, S.; Liedberg, F.; Valdes Olmos, R. A.; van Leeuwen, F. W. B.; van den Berg, N. S.; Winter, A.; Wawroschek, F.; Hruby, S.; Janetschek, G.; Vidal-Sicart, S.; MacLennan, S.; Lam, T. B.; van der Poel, H. G. Sentinel node procedure in prostate cancer: a systematic review to assess diagnostic accuracy. *Eur. Urol.* **2017**, 71(4):596-605.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 2. L'imagerie per-opératoire

structures.¹³⁷ Ainsi, les recommandations du CCAFU restent à ce jour de réaliser un curage étendu pour les CaP de risques intermédiaires et élevés (classification de D'Amico).²

Plus récemment, et dans le but de réduire les marges chirurgicales positives lors des prostatectomies, différentes sondes fluorescentes ont été étudiées. Les travaux les plus aboutis concernent un Ac monoclonal recombinant, le MDX1201 dirigé contre l'épitope extracellulaire du PSMA et conjugué à un fluorophore organique, l'Alexa Fluor 488. Cet immunoconjugué fait actuellement l'objet d'une étude clinique de phase I (NCT02048150)¹³⁸ dont l'objectif est de déterminer la dose optimale permettant de visualiser les foyers tumoraux lors d'une prostatectomie laparoscopique robot-assistée.

Au niveau pré-clinique, on retrouve par exemple le minibody A11 couplé à l'IR-800CW (fluorophore dérivé des cyanines, $\lambda_{exc} = 786$, $\lambda_{em} = 800$ nm).¹³⁹ Ce fragment d'anticorps, qui cible spécifiquement l'antigène des cellules souches prostatiques (PSCA), surexprimé dans plus de 80% des CaP, a été évalué sur modèles murins pour la détection des cellules tumorales prostatiques primaires et des métastases ganglionnaires.

Après injection de l'immunoconjugué 48 heures avant opération chez 20 souris porteuses de tumeurs prostatiques humaines, randomisées en deux groupes (chirurgie en lumière blanche, groupe 1, ou chirurgie en lumière blanche suivie par une chirurgie guidée par la fluorescence, groupe 2), une efficacité supérieure de l'ablation tumorale assistée par fluorescence a été mise en évidence.

Un suivi de 70 jours a été réalisé afin de comparer la survie des souris de ces deux groupes (cf. Figure 36).

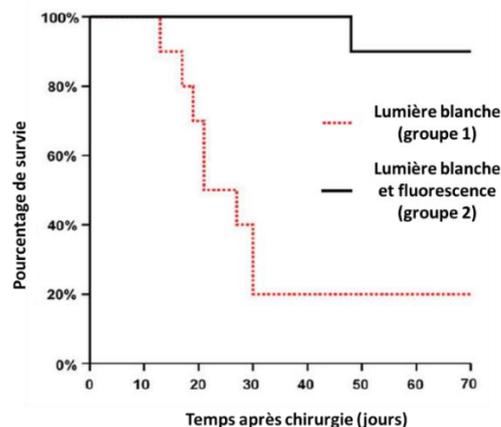


Figure 36 : suivi de la survie des souris sur 70 jours après chirurgie pour les groupes 1 et 2¹³⁹

¹³⁷ Munbauhal, G.; Seisen, T.; Gomez, F.; Peyronnet, B.; Cussenot, O.; Shariat, S. F.; Rouprêt, M. Current perspectives of sentinel lymph node dissection at the time of radical surgery for prostate cancer. *Cancer Treat. Rev.* **2016**, 50:228-239.

¹³⁸ Tringale, K. R.; Pang, J.; Nguyen, Q. T. Image-guided surgery in cancer: a strategy to reduce incidence of positive surgical margins. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **2018**, 10(3):e1412.

¹³⁹ Zhang, M.; Kobayashi, N.; Zettlitz, K. A.; Kono, E. A.; Yamashiro, J.; Tsai, W. T. K.; Jiang, A. K.; Tran, C. P.; Wang, C.; Guan, J.; Wu, A. M.; Reiter, R. E. Near-infrared-dye labeled anti-prostate stem cell antigen minibody enables real-time fluorescence imaging and targeted surgery in translational mouse models. *Clin. Cancer Res.* **2019**, 25(1):188-200.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 2. L'imagerie per-opératoire

Cette étude a conduit à une médiane de survie de 24 jours pour les souris opérées sous lumière blanche, tandis que 90% des souris réopérées avec l'aide de la fluorescence étaient encore vivantes 70 jours post-opération.

Un autre exemple porte sur l'utilisation du cys-diabody 2B13 A2, ciblant spécifiquement le PSCA, et couplé à la cyanine 5.¹⁴⁰ L'utilisation d'un diabody dans cette étude apporte un avantage non négligeable par rapport au minibody cité précédemment, à savoir une fixation tumorale rapide, ce qui réduit *de facto* l'intervalle de temps entre l'injection et la chirurgie (6 heures vs 48 heures pour le minibody). Afin d'améliorer le bien-être animal, les souris xénotransplantées ayant reçu l'immunoconjugué ont été sacrifiées avant excision de la tumeur réalisée sous lumière blanche. La fluorescence résiduelle a alors été évaluée via un système d'imagerie optique *in vivo* (cf. Figure 37).

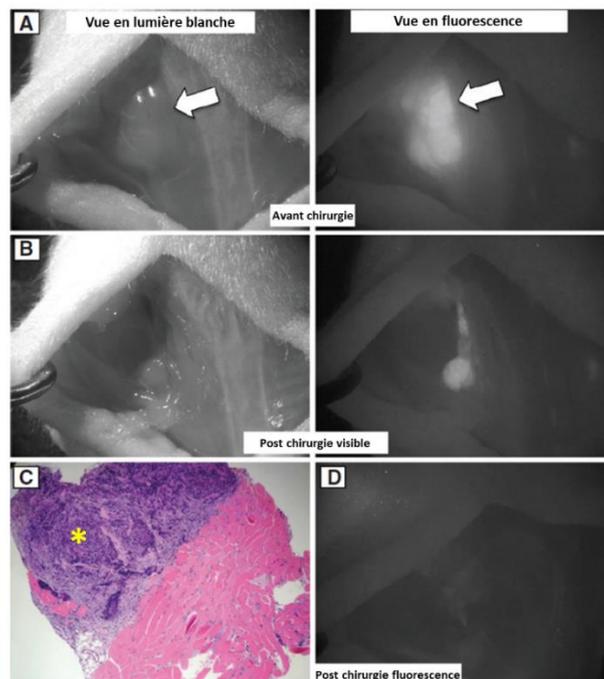


Figure 37 : A) images de la tumeur avant chirurgie (flèche blanche : tumeur) ; B) images des résidus tumoraux après chirurgie en lumière blanche ; C) coupe histologique du résidu fluorescent réséqué par fluorescence (l'étoile représente la zone tumorale) ; D) image fluorescente après double chirurgie¹⁴⁰

Cette étude a révélé la présence de marges positives se traduisant par une fluorescence résiduelle au niveau de la zone prélevée chez 80% des animaux. Une excision plus large a alors été réalisée, cette fois-ci guidée par la fluorescence ($\lambda_{exc} = 620-660$ nm, $\lambda_{em} = 700-750$ nm), et s'est révélée plus efficace. En effet, tous les échantillons fluorescents prélevés après la seconde chirurgie étaient, après analyses histologiques, cancéreux.

¹⁴⁰ Sonn, G. A.; Behesnilian, A. S.; Jiang, Z. K.; Zettlitz, K. A.; Lepin, E. J.; Bentolila, L. A.; Knowles, S. M.; Lawrence, D.; Wu, A. M.; Reiter, R. E. Fluorescent image-guided surgery with an anti-prostate stem cell antigen (PSCA) diabody enables targeted resection of mouse prostate cancer xenografts in real time. *Clin. Cancer Res.* **2016**, 22(6):1403-1412.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 2. L'imagerie per-opératoire

D'autres vecteurs non-protéiques, notamment des petites molécules spécifiques du PSMA, ont été évalués. Ces ligands ont par exemple été couplés à des fluorophores organiques (cyanine 5.5, IR-800CW) et étudiés *in vitro* et *in vivo* sur des modèles de souris porteuses de tumeurs prostatiques.¹⁴¹ Les études *in vitro* de captation cellulaire ont montré un ciblage spécifique sur les cellules surexprimant le PSMA, observations confirmées *in vivo*. Toutefois, des différences en termes de profil de biodistribution ont été observées en lien avec les différences structurales des deux conjugués, le plus hydrophobe (i.e. cyanine 5.5) ayant un temps de rétention tumorale plus important que son analogue plus hydrophile (i.e. IR-800CW).

En conclusion, les différentes approches citées précédemment démontrent l'intérêt thérapeutique en oncologie de l'utilisation de sondes fluorescentes, radiomarquées ou non, pour assister le geste chirurgical. Ces travaux mettent en exergue l'importance d'un ciblage spécifique ainsi que la nécessité d'utiliser des fluorophores stables et possédant des longueurs d'ondes adaptées à l'imagerie *in vivo*.

¹⁴¹ Wang, X.; Huang, S. S.; Heston, W. D. W.; Guo, H.; Wang, B. C.; Basilion, J. P. Development of targeted near-infrared imaging agents for prostate cancer. *Mol. Cancer Ther.* **2014**, 13(11):2595-2606.

Chapitre 3. Les nanoparticules à conversion ascendante (UCNPs) : généralités, synthèses et applications en imagerie médicale

3.1. Généralités

Le comité européen de normalisation¹⁴² et l'organisation internationale de standardisation (ISO)¹⁴³ définissent un nanomatériau comme un « matériau comportant toute dimension externe à l'échelle nanométrique ou une structure interne ou en surface à l'échelle nanométrique », l'échelle nanométrique étant définie comme un spectre de dimensions d'environ 1 nm à 100 nm. Une NP est définie quant à elle comme un nano-objet ayant au moins une de ses dimensions à l'échelle nanométrique (dans la limite où le rapport entre la longueur du plus grand et du plus petit axe ne dépasse pas 3). Si une dimension du nano-objet diffère d'un facteur supérieur à 3 par rapport aux deux autres, on parle de nanofibres. Si deux dimensions du nano-objet diffèrent de la troisième d'un facteur supérieur à 3, on parle de nanoplaquettes. Concernant ces deux dernières catégories de nano-objets, il n'est pas nécessaire que la ou les dimension(s) les plus grandes soient à l'échelle nanométrique (cf. Figure 38).

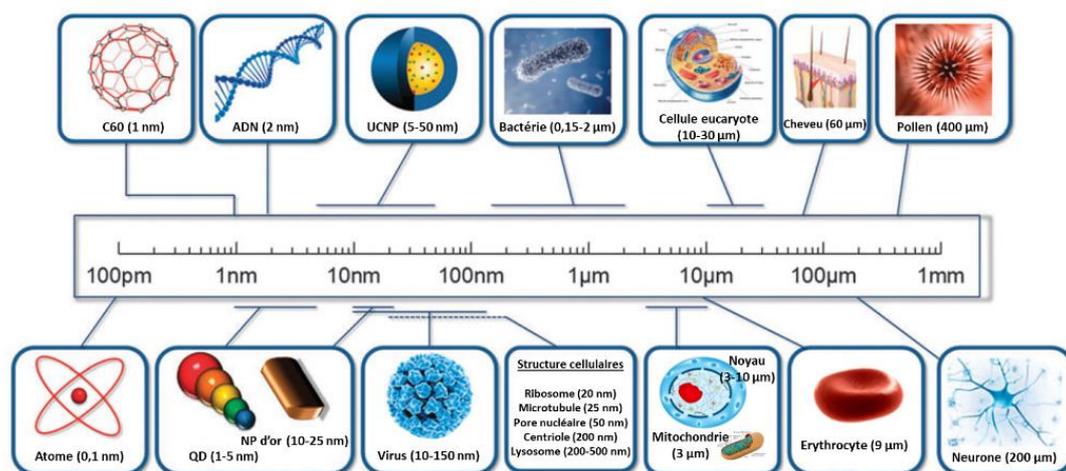


Figure 38 : tailles de différentes catégories de nanoparticules comparativement à diverses structures cellulaires ou organismes (C60 : fullerène ; QD : quantum dot ; NP : nanoparticule ; UCNP : nanoparticule à upconversion)¹⁴⁴

Une des propriétés communes aux nano-objets est leur grande surface spécifique, c'est à dire un rapport surface/volume élevé. En effet, pour une unité de masse constante, plus la taille des particules qui la compose est petite, plus leur nombre ainsi que la proportion d'atomes présentés en surface augmentent (cf. Figure 39).

¹⁴² Rauscher, H.; Roebben, G.; Amenta, V.; Boix Sanfeliu, A.; Calzolari, L.; Emons, H.; Gaillard, C.; Gibson, N.; Linsinger, T.; Mech, A.; Quiros Pseudo, L.; Rasmussen, K.; Riego Sintes, J.; Sokull-Klüttgen, B.; Stamm, H. Toward a review of the EC recommendation for a definition of the term "nanomaterial", Part 1: compilation of information concerning the experience with the definition. *JRC scientific and policy reports*. **2014**.

¹⁴³ Norme ISO/TS 80004-4:2011. **2011-2012**.

¹⁴⁴ Gnach, A.; Lipinski, T.; Bednarkiewicz, A.; Rybka, J.; Capobianco, J. A. Upconverting nanoparticles: assessing the toxicity. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44:1561-1584.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 3. Les nanoparticules à conversion ascendante

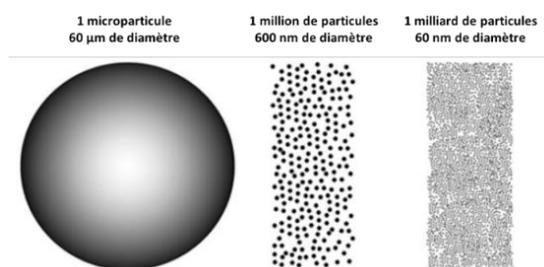


Figure 39 : comparaison, à masse identique, du nombre de particules selon leur diamètre

Les NPs peuvent être classifiées selon leur nature chimique, en deux grandes catégories : les NPs organiques et les NPs inorganiques. De plus, chacune de ces catégories peut inclure des NPs dites hybrides ou nano-composites organiques-inorganiques. Seules les nanoparticules à upconversion seront décrites dans ce manuscrit.

3.1.1. Les nanoparticules organiques

3.1.1.1. Les micelles

Ces NPs,¹⁴⁵ de taille comprise entre 10 et 100 nm,¹⁴⁶ sont composées de polymères amphiphiles et sont obtenues pour des concentrations de ces derniers supérieures à leur concentration micellaire critique. Cette dernière est la concentration minimum en tensioactifs au-dessus de laquelle les micelles se forment spontanément. En fonction du milieu, il est ainsi possible d'accéder à des micelles hydrophiles possédant un cœur hydrophobe ou des micelles dites inverses présentant un caractère lipophile à leur surface (cf. Figure 40).

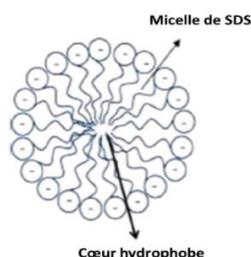


Figure 40 : représentation d'une micelle de laurylsulfate de sodium (SDS) dotée d'un cœur hydrophobe et d'une surface hydrophile comportant des charges négatives (extrémités sulfates)¹⁴⁷

Les micelles ont entre autres été étudiées pour l'imagerie NIR et la thérapie photodynamique par ciblage des lysosomes.¹⁴⁸ Dans cet exemple, des nanomicelles, fonctionnalisées par un aptamère ciblant les cellules MDA-MB-231 (lignée cellulaire de cancer

¹⁴⁵ Li, Z.; Tan, S.; Li, S.; Shen, Q.; Wang, K. Cancer drug delivery in the nano era: an overview and perspectives (review). *Onc. Rep.* **2017**, 38(2):611-624.

¹⁴⁶ Ulbrich, K.; Holá, K.; Šubr, V.; Bakandritsos, A.; Tuček, J. Targeted drug delivery with polymers and magnetic nanoparticles: covalent and noncovalent approaches, release control, and clinical studies. *Chem. Rev.* **2016**, 116(9):5338-5431.

¹⁴⁷ Shah, A.; Shahzad, S.; Munir, A.; Nadagouda, M. N.; Shahzada Khan, G.; Farhan Shams, D.; Dionysiou, D. D.; Ali Rana, U. Micelles as soil and water decontamination agents. *Chem. Rev.* **2016**, 116(10):6042-6074.

¹⁴⁸ Tian, J.; Ding, L.; Ju, H.; Yang, Y.; Li, X.; Shen, Z.; Zhu, Z.; Yu, J. S.; Yang, C. J. A multifunctional nanomicelle for real-time targeted imaging and precise near-infrared cancer therapy. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, 53(36):9544-9549.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 3. Les nanoparticules à conversion ascendante

du sein) et contenant un photosensibilisateur et un fluorophore perdant sa fluorescence à pH ≥ 7 , ont été administrées à des souris xéno greffées par cette lignée. Après distribution et internalisation des nanomicelles au sein des cellules tumorales, les tumeurs ont été irradiées à 808 nm. Sous irradiation, le photosensibilisateur contenu dans les endolysosomes génère des espèces réactives de l'oxygène qui dégrade ces derniers, libérant dans le cytoplasme les enzymes lysosomales et conduisant à la mort des cellules, phénomène visualisé par l'extinction progressive de la fluorescence.

3.1.1.2. Les liposomes et les polymersomes

Les liposomes sont formés d'un cœur hydrophile entouré d'une bicouche hydrophobe composée de phospholipides (cf. Figure 41, gauche).¹⁴⁹ Leur taille est en général comprise entre 20 et 100 nm.¹⁵⁰ Ils sont largement utilisés en cosmétique mais également en pharmacologie pour la conception de vaccins, de thérapies géniques ou anticancéreuses, avec notamment le premier liposome commercialisé en 1996 contenant de la doxorubicine pour le traitement des cancers du sein et de l'ovaire (CAELYX®).

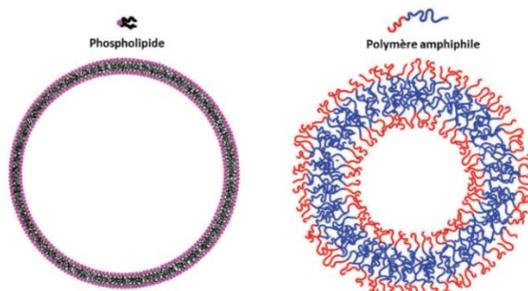


Figure 41 : représentations schématiques de la structure d'un liposome (gauche) et d'un polymersome (droite)¹⁵¹

Les polymersomes sont basés sur le même principe que les liposomes, à ceci près qu'ils ne sont pas composés de phospholipides (masse moléculaire comprise entre 100 et 1000 g/mol), mais de polymères amphiphiles (masse moléculaire comprise entre 1000 et 10000 g/mol).¹⁵¹ Ainsi, comparativement aux liposomes, les polymersomes possèdent une membrane plus épaisse (3 à 5 nm versus 5 à 50 nm, cf. Figure 41 droite), moins perméable et plus résistante aux phénomènes d'hydrolyse ou d'oxydation. À titre d'exemple, des liposomes thermosensibles ont été utilisés pour la délivrance ciblée d'une chimiothérapie anticancéreuse à base de doxorubicine.¹⁵² La fluorescence de cette substance active a permis de réaliser des études de biodistribution chez des souris nude BALB/c porteuses de tumeurs de carcinome pulmonaire de Lewis.

¹⁴⁹ Lila, A. S. A.; Ishida, T. Liposomal delivery systems: design optimization and current applications. *Biol. Pharm. Bull.* **2017**, 40(1):1-10.

¹⁵⁰ Oku, N. Polymeric drugs and drug delivery systems. *American Chemical Society* **1991**, 24-33.

¹⁵¹ Rideau, E.; Dimova, R.; Schwille, P.; Wurm, F. R.; Landfester, K. Liposomes and polymersomes: a comparative review towards cell mimicking. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, 47(23):8572-8610.

¹⁵² Motamarry, A.; Negussie, A. H.; Rossman, C.; Small, J.; Wolfe, A. M.; Wood, B. J.; Haemmerich, D. Real-time fluorescence imaging for visualization and drug uptake prediction during drug delivery by thermosensitive liposomes. *Int. J. Hyperther.* **2019**, 36(1):817-826.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 3. Les nanoparticules à conversion ascendante

3.1.1.3. Les dendrimères

Les dendrimères sont des structures polymériques quasiment sphériques dont les ramifications, comme leur nom l'indique, rappellent les branches d'un arbre. Comparativement aux polymères linéaires, les dendrimères possèdent une distribution de taille monomodale car leur croissance est contrôlée tout le long du processus de synthèse. À chaque étape de ramification (ou génération), le nombre d'extrémités est doublé, augmentant de fait le volume ainsi que le nombre de fonctions présentées en surface.

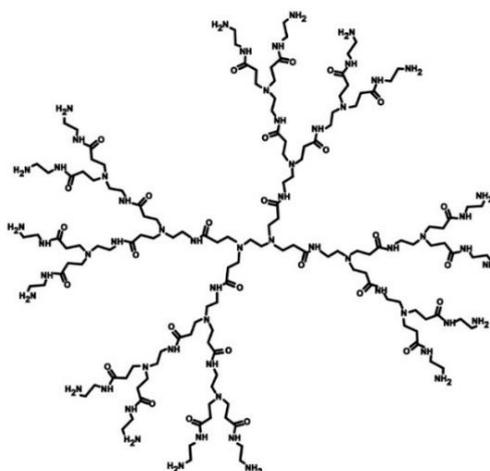


Figure 42 : représentation d'un dendrimère commercial (polyamidoamine (PAMAM) de deuxième génération)¹⁵³

Contrairement aux polymères linéaires, cette croissance exponentielle est toutefois limitée par l'apparition de contraintes stériques dépeintes par De Gennes, P. G. et al.¹⁵⁴ Bien que ces structures aient été décrites pour la première fois en 1978,¹⁵⁵ leur potentiel pour des applications médicales n'est pleinement étudié que depuis ces deux dernières décennies (transport de substance active, hydrophilisation de NPs etc.).¹⁵⁶ Les dendrimères ont par exemple été utilisés comme sondes moléculaires de pH sur des lignées cellulaires HeLa après conjugaison à différents fluorophores (coumarine, fluorescéine, vert Oregon, rhodamine rouge).¹⁵⁶

En résumé, les structures précédemment citées (micelles, liposomes, dendrimères) doivent être fonctionnalisées avec des fluorophores (organiques, inorganiques) pour des applications d'imagerie optique car elles ne présentent pas de propriétés de fluorescence intrinsèque. Également, leur hydrophilie et leur faible toxicité pourront être mises à profit pour la conception de NPs hybrides fluorescentes.¹⁵⁷

¹⁵³ <http://www.dendritech.com/pamam.html>

¹⁵⁴ De Gennes, P.G.; Hervet, H. Statistics of starburst polymers. *J. Phys. Lett.* **1983**, 44(9):351-360.

¹⁵⁵ Buhleier, E.; Wehner, W.; Vögtle, F. "Cascade"- and "nonskid-chain-like" syntheses of molecular cavity topologies. *Synthesis* **1978**, 02:155-158.

¹⁵⁶ Kalhapure, R. S.; Kathiravan, M. K.; Akamanchi, K. G.; Govender, T. Dendrimers - from organic synthesis to pharmaceutical applications: an update. *Pharm. Dev. Technol.* **2015**, 20(1):22-40.

¹⁵⁷ Wolfbeis, O. S. An overview of nanoparticles commonly used in fluorescent bioimaging. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44(14):4743-4768.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 3. Les nanoparticules à conversion ascendante

3.1.2. Les nanoparticules inorganiques

3.1.2.1. Les nanoparticules métalliques

Cette catégorie de NPs englobe une très large variété de composés caractérisés en fonction des métaux les constituants (e.g. or, platine, aluminium, cuivre, palladium etc.) et de la présence ou non d'une composante organique (metal-organic frameworks, MOF). À l'instar des NPs d'or, citées ici en exemple, les NPs métalliques peuvent être obtenues sous des formes très diverses : nanosphères (diamètre variant de quelques nanomètres à une centaine de nanomètres), nanocoquilles (diamètre d'environ une centaine de nanomètres – constituées en général d'un cœur de silice), nanobâtonnets ou encore nanocages (cf. Figure 43) présentant chacune des propriétés physico-chimiques propres.¹⁵⁸

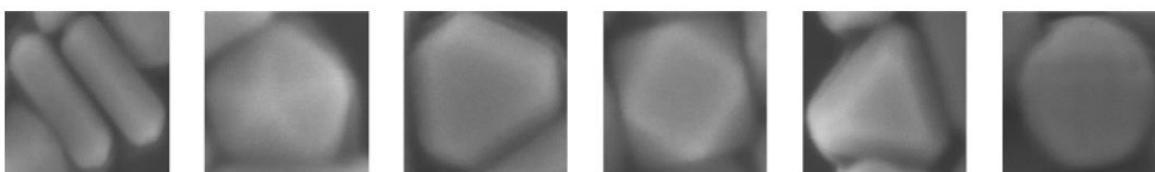


Figure 43 : images de MET de nanoparticules d'or de différentes formes¹⁵⁹

Leurs applications, dépendantes de leurs propriétés physico-chimiques, couvrent des domaines très variés tels que la catalyse, l'absorption de gaz, les encres, la conception de biocapteurs ou d'éléments électroniques, le traitement de surface, l'optique etc. À titre d'exemple, les propriétés de luminescence des NPs d'or ont été mises à profit pour l'imagerie *in vivo* de tumeurs HeLa et MDA-MB-45 chez la souris nude BALB/c.¹⁶⁰

3.1.2.2. Les nanoparticules carbonées

Il existe plusieurs types de NPs carbonées, caractérisées par l'hybridation des carbones les composant (sp^2 ou sp^3) et par leur forme.

Les fullerènes : ce sont des cages dont la plus connue et la plus stable est constituée de 60 atomes de carbones hybridés en sp^2 . Il s'agit de la troisième forme allotropique découverte du carbone.^{161,162}

¹⁵⁸ Zhang, X. Gold nanoparticles: recent advances in the biomedical applications. *Cell Biochem. Biophys.* **2015**, 72(3):771-775.

¹⁵⁹ Chen, M.; He, Y.; Liu, X.; Zhu, J.; Liu, R. Synthesis and optical properties of size-controlled gold nanoparticles. *Powder Technol.* **2017**, 311:25-33.

¹⁶⁰ Wu, X.; He, X.; Wang, K.; Xie, C.; Zhou, B.; Qing, Z. Ultrasmall near-infrared gold nanoclusters for tumor fluorescence imaging *in vivo*. *Nanoscale* **2010**, 2(10):2244-2249.

¹⁶¹ Chen, Z.; Ma, L.; Liu, Y.; Chen, C. Applications of functionalized fullerenes in tumor theranostics. *Theranostics* **2012**, 2(3):238-250.

¹⁶² Dellinger, A.; Zhou, Z.; Connor, J.; Madhankumar, A. B.; Pamujula, S.; Sayes, C. M.; Kepley, C. L. Application of fullerenes in nanomedicine: an update. *Nanomedicine* **2013**, 8(7):1191-1208.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 3. Les nanoparticules à conversion ascendante

Le graphène (ou nanofeuillets de carbone) : ce sont des structures planaires d'un atome d'épaisseur constituées de carbones hybridés sp^2 assemblés sous forme de nids d'abeilles (cf. Figure 44).¹⁶³

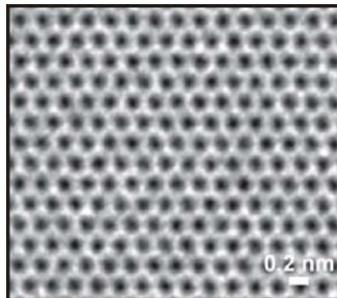


Figure 44 : image de MET haute résolution d'une monocouche de graphène (les atomes apparaissent en blanc)¹⁶⁴

Les nanotubes de carbone : il en existe deux types principaux : les nanotubes mono et multicouches (cf. Figure 45). Le diamètre de ces nanotubes peut varier d'un nanomètre à quelques centaines de nanomètres.¹⁶⁵

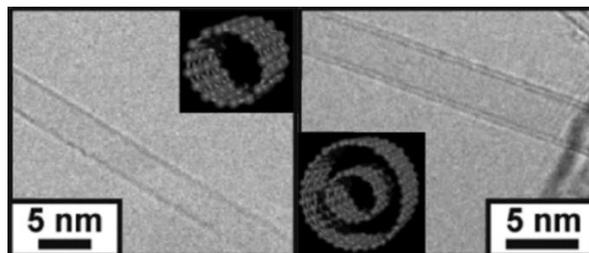


Figure 45 : image de MET de nanotubes de carbone monocouche (gauche) et bicouche (droite)¹⁶⁶

Bien que récemment découvertes, les NPs carbonées sont d'ores et déjà exploitées dans de nombreux domaines. En plus d'une utilisation comme antioxydants, constituants de cellules photovoltaïques ou encore pour le stockage de l'hydrogène, les propriétés de fluorescence sous irradiation UV de NPs de carbones creuses ont par exemple été étudiées après internalisation non spécifique sur des lignées tumorales mammaires MCF-7.¹⁶⁷

¹⁶³ Teradal, N. L.; Jelinek, R. Carbon nanomaterials in biological studies and biomedicine. *Adv. Healthc. Mater.* **2017**, 6(17).

¹⁶⁴ Meyer, J. C.; Kisielowski, C.; Erni, R.; Rossell, M. D.; Crommie, M. F.; Zettl, A. Direct imaging of lattice atoms and topological defects in graphene membranes. *Nano Lett.* **2008**, 8(11):3582-3586.

¹⁶⁵ Sanginario, A.; Miccoli, B.; Demarchi, D. Carbon nanotubes as an effective opportunity for cancer diagnosis and treatment. *Biosensors* **2017**, 7(1):9.

¹⁶⁶ Georgakilas, V.; Perman, J. A.; Tucek, J.; Zboril, R. Broad family of carbon nanoallotropes: classification, chemistry, and applications of fullerenes, carbon dots, nanotubes, graphene, nanodiamonds, and combined superstructures. *Chem. Rev.* **2015**, 115(11):4744-4822.

¹⁶⁷ Gong, X.; Hu, Q.; Paau, M. C.; Zhang, Y.; Shuang, S.; Dong, C.; Choi, M. M. F. Red-green-blue fluorescent hollow carbon nanoparticles isolated from chromatographic fractions for cellular imaging. *Nanoscale* **2014**, 6(14):8162-8170.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 3. Les nanoparticules à conversion ascendante

3.1.2.3. Les nanoparticules semi-conductrices (Quantum Dots - QDs)

Les quantum dots (QDs) sont des nanocristaux de semi-conducteurs (CdSe, CdS, CdTe, InP etc.) d'une taille contrôlée comprise entre 2 et 10 nm.¹⁶⁸ Sous excitation UV-visible, l'émission lumineuse des QDs suit l'évolution de leur taille : plus ils sont petits, plus la longueur d'onde d'émission est courte, et *vice-versa* (cf. Figure 46). Ils permettent ainsi de couvrir une large plage d'émission allant de l'UV au NIR (325 à 2500 nm) selon leur composition et leur taille.



Figure 46 : émissions de QDs cœur/coquille InP/ZnS sous excitation UV ($\lambda_{exc} = 365 \text{ nm}$)

Les QDs, notamment à base de cadmium, possèdent une forte stabilité chimique ainsi que des rendements quantiques élevés.¹⁶⁹ Ces propriétés remarquables expliquent leur très large utilisation pour la conception de panneaux photovoltaïques ou de diodes électroluminescentes (light-emitting diodes, LED). La toxicité élevée du cadmium étant un frein à une utilisation chez l'Homme, d'autres QDs ont été développés (InP, QDs dopés au manganèse : Mn-ZnS, Mn-ZnSe, ou dopés au cuivre : Cu-InZnS etc.), entre autres pour l'imagerie cellulaire.¹⁷⁰

3.1.2.4. Les nanoparticules d'oxydes métalliques

Il existe de nombreux types de NPs d'oxydes métalliques, composées soit de métaux de transition (e.g. titane, fer etc.), soit de métalloïdes (e.g. silicium) qui, en fonction de leur composition et de leur taille, possèdent des propriétés spécifiques. Par exemple, certaines particules d'oxydes métalliques présentent une excellente conductance électrique (e.g. WO_3 , In_2O_3), rendue possible par la microstructure et les propriétés électroniques intrinsèques du matériau (transport électronique, énergie de gap etc.). D'autres oxydes métalliques comme le SnO_2 , grâce à des interactions interatomiques (adsorption, chimisorption etc.), possèdent une affinité sélective avec des ions ou molécules d'intérêt (CO , NO_2 , H_2S , H_2 , éthanol etc.) permettant leur détection même s'ils sont présents en quantité infinitésimale (< ppb

¹⁶⁸ Xu, G.; Zeng, S.; Zhang, B.; Swihart, M. T.; Yong, K. T.; Prasad, P. N. New generation cadmium-free quantum dots for biophotonics and nanomedicine. *Chem. Rev.* **2016**, 116(19):12234-12327.

¹⁶⁹ Matea, C. T.; Mocan, T.; Tabaran, F.; Pop, T.; Mosteanu, O.; Puia, C.; Iancu, C.; Mocan, L. Quantum dots in vivo imaging, drug delivery and sensor applications. *Int. J. Nanomedicine* **2017**, 12:5421-5431.

¹⁷⁰ Maity, A. R.; Palmal, S.; Basiruddin, S. K.; Karan, N. S.; Sarkar, S.; Pradhan, N.; Jana, N. R. Doped semiconductor nanocrystal based fluorescent cellular imaging probes. *Nanoscale* **2013**, 5(12):5506-5513.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 3. Les nanoparticules à conversion ascendante

(mm^3/m^3).¹⁷¹ Mettant à profit leurs propriétés magnétiques, des NPs d'oxyde de fer ont été fonctionnalisées en surface par des fluorophores et/ou des radionucléides à des fins d'imagerie multimodale combinant l'IRM à l'imagerie optique et/ou scintigraphique.^{172,173} Enfin, les nanoparticules de silice, en particulier de silice mésoporeuse synthétisées à partir d'oxydes de silice, ont été largement étudiées pour des applications biologiques, notamment dans le cadre du cancer.¹⁷⁴ Celles-ci sont recouvertes de groupements silanols en surface, les rendant aisément fonctionnalisables. Elles ont donc été étudiées, à la fois pour une application diagnostique (par vectorisation passive ou active) que thérapeutique (délivrance ciblée de substances actives).

3.1.2.5. Les nanoparticules de fluorures

Les NPs de fluorures sont une grande famille de NPs englobant entre autres les fluorures de lanthanides (LnF_3 , Ln : lanthanide) et les fluorures alcalins / alcalino-terreux (LiF , CaF_2).¹⁷⁵ Elles présentent des propriétés physico-chimiques spécifiques parmi lesquelles nous pouvons citer une transparence optique dans un large domaine de longueurs d'ondes (200 nm – 6 μm), une résistance à l'humidité, une conductivité thermique élevée et des propriétés magnétiques particulières. Elles présentent également une photo-stabilité élevée, des temps de luminescence longs et des bandes d'émission fines lorsqu'elles sont activées par des ions émetteurs tels que les ions de terres rares.¹⁷⁶

Les NPs de fluorures ont été étudiées pour des applications en thérapie photodynamique ou en diagnostic (IRM), mais également, grâce à leurs propriétés optiques, en imagerie de fluorescence per-opératoire. La modulation de leur composition, notamment en termes de dopage, permet de réaliser de la conversion ascendante ou upconversion, point développé plus en détail dans la suite de ce manuscrit.

En résumé, chaque famille de NPs présente ses avantages et inconvénients, et le choix des NPs utilisées sera dépendant de l'application envisagée (imagerie, thérapie etc.). Pour une application en imagerie de fluorescence per-opératoire, les nanoparticules à upconversion semblent être particulièrement prometteuses, de par leurs longueurs d'ondes d'excitation et d'émission dans le NIR et leur photo-stabilité élevée. Le Tableau II suivant reprend les

¹⁷¹ Chavali, M. S.; Nikolova, M. P. Metal oxide nanoparticles and their applications in nanotechnology. *SN Appl. Sci.* **2019**, 1:607-637.

¹⁷² Xie, J.; Chen K.; Huang, J.; Lee, S.; Wang, J.; Gao, J.; Li, X.; Chen, X. PET/NIRF/MRI triple functional iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* **2010**, 31(11):3016-3022.

¹⁷³ Qiao, R.; Esser, L.; Fu, C.; Zhang, C.; Hu, J.; Ramírez-García, P.; Li, Y.; Quinn, J. F.; Whittaker, M. R.; Whittaker, A. K.; Davis, T. P. Bioconjugation and fluorescence labelling of iron oxide nanoparticles grafted with bromomaleimide-terminal polymers. *Biomacromolecules* **2018**, 19(11):4423-4429.

¹⁷⁴ Yang, Y.; Yu, C. Advances in silica based nanoparticles for targeted cancer therapy. *Nanomedicine* **2016**, 12(2):317-332.

¹⁷⁵ Fedorov, P. P.; Luginina, A. A.; Kuznetsov, S. V.; Osiko, V. V. Nanofluorides. *J. Fluor. Chem.* **2011**, 132(12):1012-1039.

¹⁷⁶ Shukla, A. K. Nanoparticles in medicine. Springer; 1st edition; **2020**, 135-137.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 3. Les nanoparticules à conversion ascendante

principales propriétés physico-chimiques et optiques de chaque famille de NPs inorganiques présentée précédemment comparativement aux fluorophores organiques.

Tableau II : récapitulatif des propriétés physiques des grandes familles de NPs comparativement aux fluorophores organiques (UCNPs : nanoparticules à upconversion)

Matériaux	Taille	Gamme de λ_{exc} et λ_{em}	Rendement quantique	Photostabilité	Temps de déclin de fluorescence
Fluorophore organique	< 1 nm (protéines \approx 4 nm)	De l'UV au NIR	Variable	Faible	< 10 ns
NPs dopées avec des fluorophores organiques et oxydes	2 – 200 nm	De l'UV au NIR	Variable	Moyenne	< 10 ns
NPs métalliques (Or, Ag etc.)	\approx 20 nm	500 – 680 nm	< 20 %	Élevée	> 100 ns
NPs carbonées	> 60 nm	330 – 700 nm	\approx 100 %	Élevée	10 – 20 ns
QDs	2 – 10 nm	330 – 700 nm	10 – 90 %	Élevée	> 10 ns
UCNPs	20 – 50 nm	350 – NIR	Variable	Élevée	> 100 ms

3.2. Les nanoparticules à conversion ascendante : propriétés optiques

Les UCNPs sont des NPs inorganiques dopées par des ions de RE. Les RE sont des éléments métalliques composés de l'yttrium, du scandium et des lanthanides (Ln). Ces derniers sont une famille de 15 éléments de la sixième période du tableau périodique de configuration électronique $[Xe] 4f^n 6s^2 5p^6 5d^{0-1}$ ($0 < n < 14$). Les Ln présentent des caractéristiques communes, comme le fait d'être tous (à l'exception du lanthane et du lutécium) plus ou moins paramagnétiques, ce qui ouvre des champs d'application dans le domaine de l'imagerie médicale en tant par exemple qu'agents de contraste pour l'IRM (e.g. gadolinium).

L'état d'oxydation le plus commun et le plus stable pour la plupart des ions Ln est le degré +III, exception faite des ions Ce^{4+} , Tb^{4+} , Eu^{2+} et Yb^{2+} . Le nombre quantique principal élevé de la couche f des lanthanides ($n = 4$, $l = 3$) leur confère un nombre important de termes spectroscopiques, dont la position énergétique est pratiquement indépendante de la nature et de la structure cristalline du matériau dans lequel ces ions sont insérés. Cette propriété caractéristique est due au fait que la couche f est écrantée par les deux couches externes remplies $6s^2$ et $5p^6$.

Pour toutes ces raisons, les ions lanthanides possèdent des propriétés remarquables telles qu'une discrimination spectrale Stokes/anti-Stokes (émission à plus grande longueur d'onde que l'excitation / émission à plus courte longueur d'onde que l'excitation) aisée, une bonne photostabilité, des temps de luminescence élevés (de l'ordre de quelques microsecondes à quelques millisecondes) et des raies d'émissions spectralement fines. La luminescence par upconversion (UC) ou anti-Stokes des ions Ln, due au remplissage séquentiel de leurs niveaux électroniques localisés à plus haute énergie que l'énergie de la source

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 3. Les nanoparticules à conversion ascendante

excitatrice (émission à plus courte longueur d'onde que l'excitation), sera traitée plus en détail dans le paragraphe 3.2.2.

Les UCNPs à base d'ions de RE¹⁷⁷ possèdent des propriétés de luminescence très intéressantes comme une durée du déclin de fluorescence élevée ou encore une absence de sensibilité au photoblanchiment ainsi qu'au phénomène de scintillement. Selon la composition et l'architecture (cœur-coquille ou multi-coquilles par exemple) des UCNPs, une excitation laser dans le NIR peut produire une émission allant du NIR à l'ultraviolet. De plus, l'excitation de ces UCNPs dans le NIR offre deux avantages notables : une pénétration tissulaire plus importante (exemple du tissu cutané, cf. Figure 47)¹⁷⁸ ainsi qu'une puissance d'excitation laser continue faible ($2 \cdot 10^{-2}$ – $1 \cdot 10^{-1}$ W/cm²) tout en minimisant l'autofluorescence provenant des tissus, qui est prépondérante sous excitation UV-Visible.

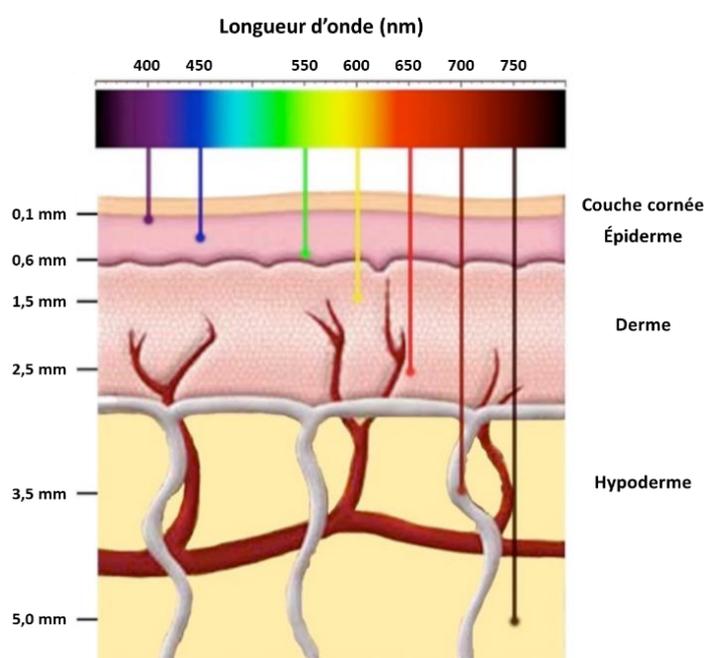


Figure 47 : profondeur de pénétration de la lumière à travers la peau en fonction de la longueur d'onde¹⁷⁸

Ces UCNPs ont donc suscité un intérêt certain, tant dans le domaine diagnostique (imagerie optique ou magnétique) que thérapeutique (thérapie photodynamique et photothermale).¹⁷⁹ Comme pour toutes les NPs, le double avantage représenté par la surface spécifique élevée et la multi-fonctionnalisation ouvre des champs prometteurs pour le ciblage actif de ces nano-objets, propriété recherchée afin d'atteindre des contrastes tissus cibles/tissus non-cibles élevés, que ce soit en imagerie optique seule ou en combinaison avec des méthodes de détection complémentaires (hybrides optique / TEMP, TEP ou IRM).

¹⁷⁷ Dong, H.; Du, S. R.; Zheng, X. Y.; Lyu, G. M.; Sun, L-D.; Li, L. D.; Zhang, P. Z.; Zhang, C.; Yan, C. H. Lanthanide nanoparticles: from design toward bioimaging and therapy. *Chem. Rev.* **2015**, 115(19):10725-10815.

¹⁷⁸ Wang, J.; Liu, G.; Leung, K. C. F.; Loffroy, R.; Lu, P. X.; Wang, Y. X. J. Opportunities and challenges of fluorescent carbon dots in translational optical imaging. *Curr. Pharm. Des.* **2015**, 21(37):5401-5416.

¹⁷⁹ Chen, G.; Qiu, H.; Prasad, P. N.; Chen, X. Upconversion nanoparticles: design, nanochemistry, and applications in theranostics. *Chem. Rev.* **2014**, 114(10):5161-5214.

Avant d'aborder les compositions et caractéristiques des UCNPs, leurs principales voies de synthèse et leurs potentiels d'application dans le domaine de l'imagerie médicale, il semblait opportun de revenir sur les mécanismes optiques fondamentaux que sont : la down conversion (ou conversion Stokes) et l'UC (ou conversion anti-Stokes).

3.2.1. La down-conversion

La down-conversion correspond à l'émission d'un photon d'énergie plus basse que le photon absorbé. En pratique, un atome (ou une molécule) excité dans l'UV ou le visible réémettra respectivement dans le visible ou l'infrarouge (IR).

Cette conversion peut être divisée en deux mécanismes :

- Le down-shifting (DS), où un photon de haute énergie est absorbé par un atome puis va être réémis avec une plus faible énergie. La différence est dissipée par des relaxations non-radiatives par phonons (cf. Figure 48 gauche).
- Le quantum-cutting (QC). Selon ce mécanisme, un photon de haute énergie est absorbé par un atome qui, après relaxation, émet successivement deux photons de plus basses énergies que le photon incident (cf. Figure 48 centre).

3.2.2. L'upconversion

L'UC correspond au phénomène inverse de la down-conversion à savoir que l'énergie du photon émis sera supérieure à celle du photon absorbé (cf. Figure 48 droite).¹⁸⁰

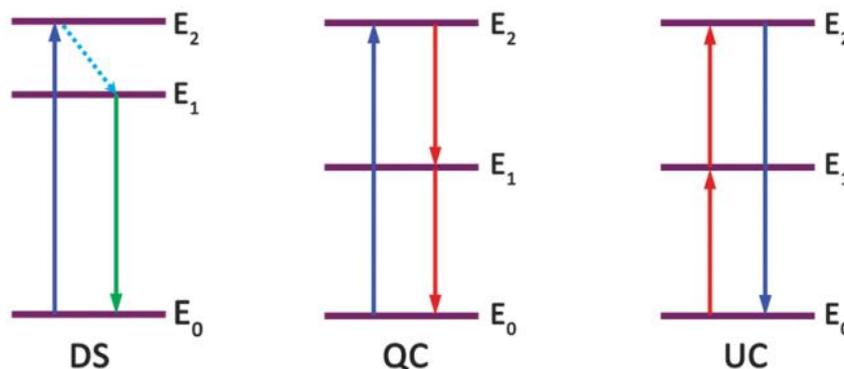


Figure 48 : représentation des mécanismes de down-shifting (gauche), quantum-cutting (centre) et UC (droite)¹⁸¹

Ce processus, contrairement aux autres, est non linéaire et nécessite l'absorption de plusieurs photons de basse énergie selon trois mécanismes possibles : l'absorption dans l'état excité, l'avalanche de photons ou l'upconversion par transfert d'énergie.

¹⁸⁰ (a) Auzel, F. Up-conversion and anti-Stokes processes with f and d ions in solids. *Chem. Rev.* **2004**, 104:139-173. (b) Wang, M.; Abbineni, G.; Clevenger, A.; Mao, C.; Xu, S. Upconversion nanoparticles: synthesis, surface modification, and biological applications. *Nanomedicine* **2011**, 7(6):710-729. (c) Chen, J.; Zhao, X. Up-conversion nanomaterials: synthesis, mechanism, and applications in sensing. *Sensors* **2012**, 12:2414-2435.

¹⁸¹ Dong, H.; Sun, L. D.; Yan, C. H. Energy transfer in lanthanide upconversion studies for extended optical applications. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44:1608-1634.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 3. Les nanoparticules à conversion ascendante

3.2.2.1. L'absorption dans l'état excité (ESA)

Ce mode d'excitation est un mécanisme en deux étapes ne mettant en jeu qu'un seul ion (cf. Figure 49).

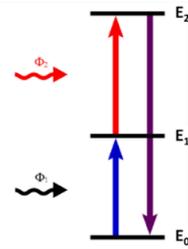


Figure 49 : représentation du mécanisme d'absorption dans l'état excité (Φ : photons incidents)^{180b}

Lors de l'excitation, l'électron va atteindre un niveau d'énergie intermédiaire E_1 puis, après absorption d'un deuxième photon, un palier supérieur E_2 . Après désexcitation, le retour à l'état initial va libérer un photon d'énergie supérieure à celui absorbé.

3.2.2.2. L'avalanche de photons (PA)

Ce mécanisme implique également l'absorption séquentielle de plusieurs photons. Un premier photon va exciter un électron à un état E_2 . Après transfert d'énergie à un autre électron de l'état initial E_0 et désexcitation du premier à un état E_1 , deux électrons vont se retrouver à cet état intermédiaire E_1 . L'absorption d'un deuxième photon par ces électrons va les exciter à un état E_2 . Le transfert d'énergie de cet état E_2 avec des électrons à l'état initial E_0 va permettre d'exciter deux électrons supplémentaires à l'état E_1 (cf. Figure 50).

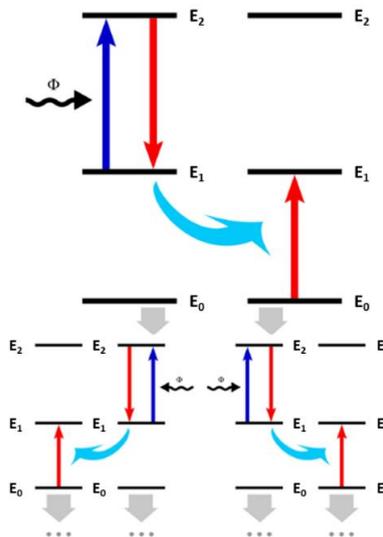


Figure 50 : représentation du phénomène d'avalanche de photons (Φ : photons incidents)^{180b}

En répétant cette opération, un nombre important d'électrons se retrouve à l'état excité E_1 servant de réservoir. Ces électrons, excités à l'état E_2 , peuvent retourner à l'état initial, produisant ainsi une émission d'énergie supérieure à l'énergie d'excitation. Cependant, ce mécanisme est lent et nécessite une énergie d'excitation élevée.

BIBLIOGRAPHIE

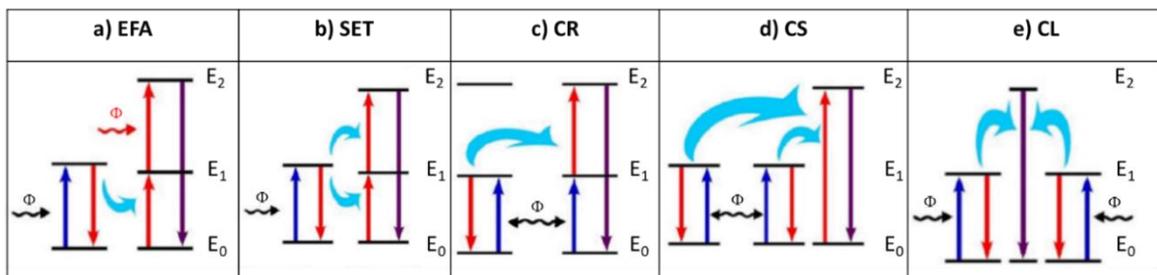
Chapitre 3. Les nanoparticules à conversion ascendante

3.2.2.3. L'upconversion par transfert d'énergie (ETU)

Ce mécanisme implique l'absorption de plusieurs photons ainsi que la présence d'au moins deux ions : un ion sensibilisateur et un ion activateur. Ce phénomène peut être décomposé en cinq processus :

- Transfert d'énergie suivi d'un transfert dans l'état excité (EFA, cf. Tableau IIIa). L'ion sensibilisateur transfère son énergie à l'ion activateur et l'excite à un niveau d'énergie E_1 . S'en suit l'absorption d'un photon par l'ion activateur excité jusqu'à un niveau d'énergie E_2 , qui aboutira à l'UC suite au retour à l'état initial E_0 .
- Transferts d'énergie successifs (SET, cf. Tableau IIIb) : l'ion sensibilisateur transfère son énergie à l'ion activateur par deux fois, pour l'exciter à l'état E_1 puis E_2 respectivement, et aboutir ainsi à l'UC. Ici, l'ion sensibilisateur est le seul à pouvoir être excité par la lumière incidente.
- Relaxation croisée entre deux ions identiques (CR, cf. Tableau IIIc) : l'excitation par la lumière incidente des ions activateur et sensibilisateur à un niveau E_1 est suivie par la désexcitation de l'ion sensibilisateur transférant son énergie vers l'ion activateur lui permettant ainsi d'accéder au niveau E_2 .
- Sensibilisation coopérative (CS, cf. Tableau III d) : ici deux ions sensibilisateurs identiques sont excités à un niveau E_1 et transfèrent simultanément leur énergie à l'ion activateur lui permettant d'occuper le niveau d'énergie supérieur E_2 .
- Luminescence coopérative (CL, cf. Tableau IIIe) : ce mécanisme fait intervenir deux ions, jouant le rôle de sensibilisateur et d'activateur, excités à un état E_1 qui vont produire une émission supérieure après désexcitation coopérative (et retour à l'état initial E_0). Dans ce cas, l'état émetteur n'est pas un état stationnaire du système mais, par comparaison avec la spectroscopie d'absorption à deux photons, un état virtuel.

Tableau III : les différents types d'ETU (Φ : photons incidents)^{180b}



En résumé, les mécanismes de transfert d'énergie susceptibles d'être mis en œuvre sont très divers : transfert d'énergie, transfert d'énergie successifs, relaxation croisée, sensibilisation coopérative, luminescence coopérative. Ce sont les sections efficaces de chacun des processus, propres à chaque type d'UCNP, qui permettront d'identifier précisément les canaux d'absorption et de désexcitation radiative conduisant au phénomène d'UC.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 3. Les nanoparticules à conversion ascendante

3.2.3. Les avantages des UCNPs

Les UCNPs sont obtenues par dopage d'une matrice cristalline par des ions de RE. L'une des familles d'UCNPs les plus étudiées est issue des fluorures de type $\text{Na}(\text{Y}, \text{Lu}, \text{Gd})\text{F}_4:\text{Ln}^{3+}$ ($\text{Ln} = \text{Yb}, \text{Er}, \text{Tm}, \text{Nd}, \text{Ho}, \text{Eu}, \text{Tb}$ etc.). Ces particules possèdent une grande stabilité chimique et des tailles variant de quelques nm à quelques centaines de nm. L'avantage des UCNPs de fluorures réside dans leurs faibles fréquences de phonons, autorisant d'importants taux de relaxations radiatives, et leur potentialité à accommoder divers ions de RE permettant ainsi de moduler les longueurs d'onde d'excitation et d'émission dans tout le domaine UV-Visible-IR (cf. Figure 51).

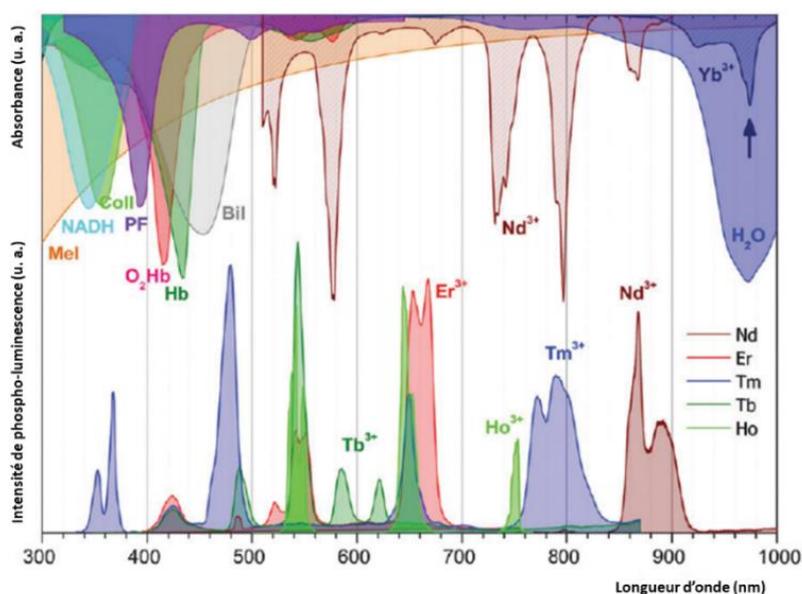


Figure 51 : superposition spectrale entre les bandes d'absorption de chromophores endogènes ou exogènes (axe supérieur, Mel : mélanine ; NADH : nicotinamide adénine dinucléotide ; Coll : collagène ; PF : photofrin® ; O₂Hb : hémoglobine oxygénée ; Hb : hémoglobine ; Bil : bilirubine) et les spectres d'absorption de l'ion Yb³⁺ et Nd³⁺ (axe supérieur) et les spectres d'émission des ions Nd³⁺, Tm³⁺, Er³⁺, Ho³⁺, Tb³⁺ (axe inférieur). La flèche indique la longueur d'onde d'excitation de l'ion sensibilisateur Yb³⁺ (980 nm). Les proportions ne sont pas respectées.¹⁴⁴

Enfin, elles présentent la plus forte section efficace d'UC comparativement aux autres NPs inorganiques (comme les UCNPs d'oxydes de gadolinium¹⁸² et/ou de vanadates¹⁸³). Par souci de concision, les chapitres suivants seront centrés autant que faire se peut sur les NPs possédant une matrice de fluorures d'yttrium co-dopées par Yb³⁺/Tm³⁺, cœur de nos travaux.

3.2.4. La matrice NaYF₄

Afin d'aboutir à des phénomènes d'UC, les Ln doivent être incorporés dans des matrices adaptées. Plusieurs compositions de matrices ont été décrites, comme des oxysulfures

¹⁸² Passuello, T.; Piccinelli, F.; Pedroni, M.; Bettinelli, M.; Mangiarini, F.; Naccache, R.; Vetrone, F.; Capobianco, J. A.; Speghini, A. White light upconversion of nanocrystalline Er/Tm/Yb doped tetragonal Gd₄O₃F₆. *Opt. Mater.* **2011**, 33(4):643-646.

¹⁸³ Mahalingam, V.; Hazra, C.; Naccache, R.; Vetrone, F.; Capobianco, J. A. Enhancing the color purity of the green upconversion emission from Er³⁺/Yb³⁺-doped GdVO₄ nanocrystals *via* tuning of the sensitizer concentration. *J. Mater. Chem. C* **2013**, 1:6536-6540.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 3. Les nanoparticules à conversion ascendante

($\text{La}_2\text{O}_2\text{S}$) ou des fluorures (NaYF_4 , LiLuF_4 , NaGdF_4). Il s'avère que la matrice de fluorure d'yttrium (NaYF_4), retenue dans le cadre de nos travaux, possède une faible énergie de phonons qui permet, *in fine*, de minimiser la perte d'énergie consécutive à une relaxation non radiative, et donc d'améliorer l'efficacité du processus d'UC.

Les matrices de fluorures d'yttrium existent sous deux formes cristallines : cubique et hexagonale (cf. Figure 52). La matrice de phase hexagonale permet d'accéder à des NPs possédant des rendements d'UC plus importantes que pour la phase cubique.¹⁸⁴

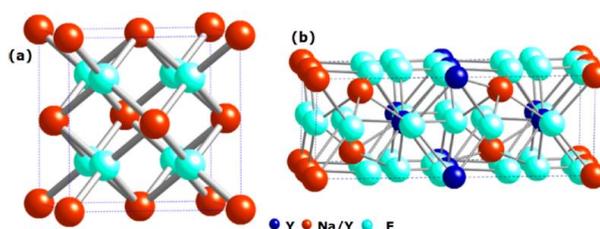


Figure 52 : structures cristallines de la matrice NaYF_4 a) phase cubique et b) phase hexagonale¹⁸⁵

Cette spécificité est due au fait que dans la phase hexagonale, deux sites de symétries basses (C_{3v} et C_{3h}) proches cristallographiquement sont disponibles pour le dopage, alors que dans la phase cubique il n'en existe qu'un seul.

3.2.5. Le co-dopage ytterbium/thulium

L'utilisation d'ions co-dopants d'ytterbium (sensibilisateur) et de thulium (activateur) trivalents (i.e. Yb^{3+} , Tm^{3+}) dans une matrice de fluorure d'yttrium, permet sous excitation à 980 nm d'aboutir à un phénomène d'UC avec émission principale dans le NIR à 802 nm (cf. Figure 53).

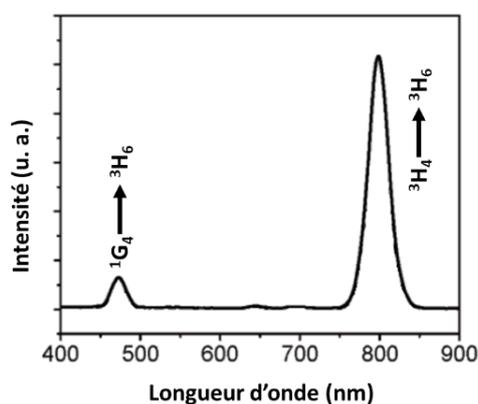


Figure 53 : spectre de fluorescence par upconversion d'UCNPs $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Tm}@\text{NaYF}_4$ ($\lambda_{exc} = 980 \text{ nm}$)¹⁸⁶

¹⁸⁴ Liu, C.; Wang, H.; Li, X.; Chen, D. Monodisperse, size-tunable and highly efficient $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb},\text{Er}(\text{Tm})$ up-conversion luminescent nanospheres: controllable synthesis and their surface modifications. *J. Mater. Chem.* **2009**, 19:3546-3553.

¹⁸⁵ Saha, S.; Pala, R. G. S.; Sivakumar, S. Catalyzing cubic-to-hexagonal phase transition in NaYF_4 via ligand enhanced surface ordering. *Cryst. Growth Des.* **2018**, 18(9):5080-5088.

¹⁸⁶ Yi, G. S.; Chow, G. M. Water-soluble $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Er}(\text{Tm})/\text{NaYF}_4/\text{polymer}$ core/shell/shell nanoparticles with significant enhancement of upconversion fluorescence. *Chem. Mater.* **2017**, 19(3):341-343.

Ce phénomène d'UC, conduisant à une émission principale à 802 nm, est un mécanisme à deux photons. Dans un premier temps, l'ion Tm^{3+} est excité à son niveau $^3\text{H}_5$ qui, après désexcitation non radiative au niveau $^3\text{F}_4$, va être réexcité aux niveaux $^3\text{F}_{2,3}$. Une désexcitation non radiative au niveau d'énergie $^3\text{H}_4$ va alors être à l'origine, après retour à l'état fondamental $^3\text{H}_6$, de l'émission à 802 nm (cf. Figure 54).

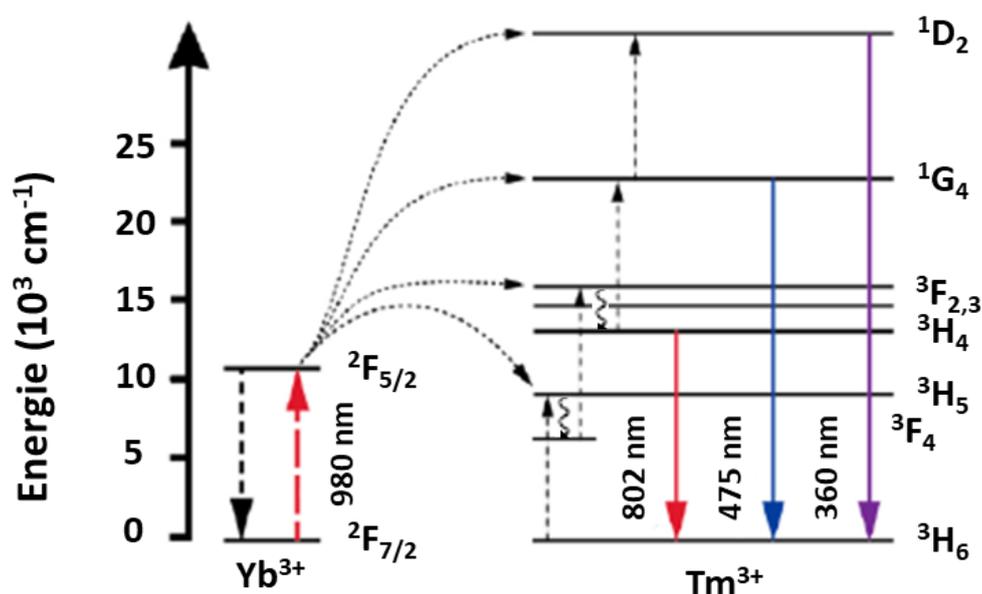


Figure 54 : diagramme de Dieke des ions Yb^{3+} et Tm^{3+} dans la matrice NaYF_4 ¹⁸⁷

Au sein de cette matrice NaYF_4 dopée par les ions Yb^{3+} et Tm^{3+} , sont également retrouvés des mécanismes d'UC impliquant 3, 4 voire 5 photons à l'origine d'émissions à des longueurs d'ondes plus courtes, comme par exemple dans le bleu à 475 nm ou dans l'ultraviolet à 360 nm.¹⁸⁸

3.2.6. Amélioration des propriétés optiques des UCNPs

Il a été observé qu'une diminution de la taille des UCNPs impacte négativement leurs propriétés de luminescence. Ce phénomène est dû au quenching, ou extinction de la fluorescence par désexcitation non radiative, lié à la proximité entre les molécules de solvants et/ou de ligands de surface et les ions dopants excités.¹⁸⁸ En effet, plus la taille des UCNPs est réduite, plus leur surface spécifique augmente et plus un nombre important d'ions dopants se retrouve exposé à leur surface. Une solution « simple » pour limiter cette extinction est de

¹⁸⁷ Wilhelm, S. Perspectives for upconverting nanoparticles. *ACS Nano* **2017**, 11(11):10644-10653.

¹⁸⁸ Qiu, H.; Yang, C.; Shao, W.; Damasco, J.; Wang, X.; Ågren, H.; Prasad, P. N.; Chen, G. Enhanced up-conversion luminescence in $\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ -codoped fluoride active core/active shell/inert shell nanoparticles through directed energy migration. *Nanomaterials* **2014**, 4(1):55-68.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 3. Les nanoparticules à conversion ascendante

rajouter autour des UCNPs une coquille inorganique non dopée (cf. Figure 55).^{189,190}

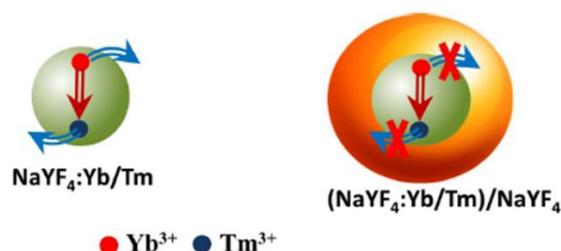


Figure 55 : représentation des phénomènes de quenching de surface. À gauche : UCNP NaYF₄:Yb/Tm sans coquille. À droite : UCNP cœur-coquille NaYF₄:Yb/Tm@NaYF₄. Flèche rouge : transfert d'énergie de l'ion Yb³⁺ à l'ion Tm³⁺. Flèche bleue : quenching de surface.¹⁸⁸

Cette stratégie a été largement décrite avec diverses variantes :

- Soit la synthèse d'une coquille non dopée de même composition que le cœur¹⁹¹ ;
- Soit la synthèse d'une coquille non dopée de composition différente de celle du cœur. Par exemple : la synthèse d'une coquille de NaGdF₄ autour de NPs de fluorures d'yttrium dopées par des RE, ayant pour fonction de limiter les phénomènes de désexcitation non radiatifs tout en offrant une nouvelle possibilité de visualisation de ces NPs par IRM^{192,193} ;
- Soit la synthèse d'une coquille faiblement dopée par des RE ;
- Soit la combinaison des modalités précédentes à travers la synthèse de NPs multicouches.^{188,194}

3.3. Principales voies de synthèse des UCNPs

De nombreuses stratégies de synthèse ont été développées pour accéder aux UCNPs. Celles-ci peuvent être regroupées en deux grandes catégories : les synthèses dites « top-

¹⁸⁹ Chen, G.; Yang, C.; Prasad, P. N. Nanophotonics and nanochemistry: controlling the excitation dynamics for frequency up- and down-conversion in lanthanide-doped nanoparticles. *Acc. Chem. Res.* **2013**, 46(7):1474-1486.

¹⁹⁰ Kang, N.; Zhao, J.; Zhou, Y.; Ai, C.; Wang, X.; Ren, L. Enhanced up-conversion luminescence intensity of core-shell NaYF₄ nanocrystals guided by morphological control. *Nanotechnology* **2019**, 30(10):105701.

¹⁹¹ Francolon, N.; Boyer, D.; Leccia, F.; Jouberton, E. Walter, A.; Bordeianu, C.; Parat, A.; Felder-Flesch, D.; Begin-Colin, S.; Miot-Noirault, E.; Chezal, J. M.; Mahiou, R. Preparation of core/shell NaYF₄:Yb,Tm@dendrons nanoparticles with enhanced up-conversion luminescence for in vivo imaging. *Nanomedicine* **2016**, 12(7):2107-2113.

¹⁹² Dong, C.; Korinek, A.; Blasiak, B.; Tomanek, B.; van Veggel, F. C. J. M. Cation exchange: a facile method to make NaYF₄:Yb,Tm-NaGdF₄ core-shell nanoparticles with a thin, tunable, and uniform shell. *Chem. Mater.* **2012**, 24(7):1297-1305.

¹⁹³ Liu, J. N.; Bu, W.; Pan, L. M.; Zhang, S.; Chen, F.; Zhou, L.; Zhao, K. L.; Peng, W.; Shi, J. Simultaneous nuclear imaging and intranuclear drug delivery by nuclear-targeted multifunctional upconversion nanoprobe. *Biomaterials* **2012**, 33(29):7282-7290.

¹⁹⁴ (a) Wu, F.; Liu, X.; Kong, X.; Zhang, Y.; Tu, L.; Liu, K.; Song, S.; Zhang, H. The real role of active-shell in enhancing the luminescence of lanthanides doped nanomaterials. *Applied Physics Letters* **2013**, 102(24):243104. (b) Shen, J-W.; Yang, C-X.; Dong, L-X.; Sun, H-R.; Gao, K.; Yan, X-P. Incorporation of computed tomography and magnetic resonance imaging function into NaYF₄:Yb/Tm up-conversion nanoparticles for in vivo trimodal bioimaging. *Anal. Chem.* **2013**, 85(24):12166-12172.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 3. Les nanoparticules à conversion ascendante

down » (ou méthode descendante), qui consistent à fragmenter des entités jusqu'à l'échelle nanométrique, et les synthèses « bottom-up » (méthode ascendante), qui sont basées sur le développement de NPs à partir d'atomes ou de molécules.^{179,195,196,197} Seules les synthèses « bottom-up », qui permettent un contrôle plus précis de la taille et de la morphologie des UCNPs (caractéristiques dont dépendent les propriétés de luminescence) seront brièvement décrites ci-après.

3.3.1. Synthèses hydrothermales

Les synthèses hydrothermales se déroulent à hautes pression et température au sein d'autoclaves. Ces conditions sont telles que les solvants atteignent un état critique ou supercritique, favorisant les réactions entre précurseurs. La méthode la plus utilisée pour ces approches est la synthèse triphasique liquide-solide-solution¹⁹⁸ (cf. Figure 56).

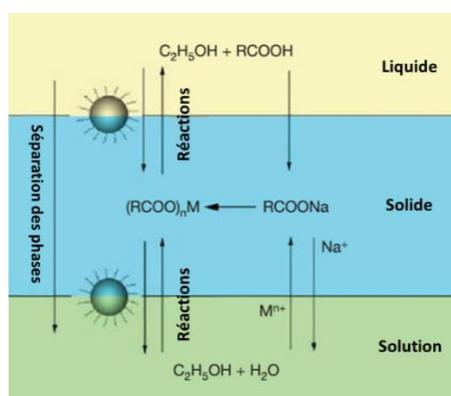


Figure 56 : représentation schématique d'une synthèse « liquide-solide-solution »¹⁹⁸

Cette méthode de synthèse est basée sur des processus de transferts à l'interface des trois phases à savoir : la phase solide, composée de linoléate de sodium, la phase liquide, constituée d'un mélange d'acide linoléique et d'éthanol, et la solution contenant les ions de RE dans un mélange eau/éthanol.

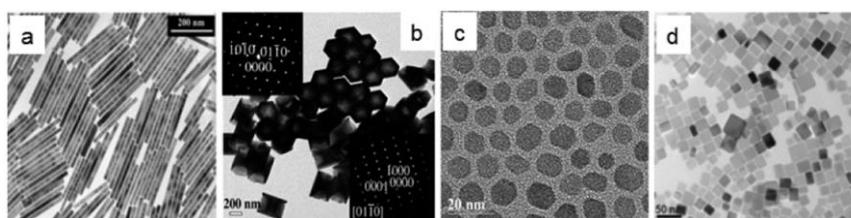


Figure 57 : images de microscopie électronique à transmission (MET) de NPs de composition NaYF₄ (a-b), LaF₃ (c), KMnF₃ (d) obtenues après synthèse par voie hydrothermale¹⁹⁶

¹⁹⁵ Arole, V. M.; Munde, S. V. Fabrication of nanomaterials by top-down and bottom-up approaches - an overview. *J. Adv. Appl. Sci. Technol.* **2014**, 1(2):89-93.

¹⁹⁶ Zhou, J.; Liu, Q.; Feng, W.; Sun, Y.; Li, F. Upconversion luminescent materials: advances and applications. *Chem. Rev.* **2015**, 115(1):395-465.

¹⁹⁷ Chen, G.; Roy, I.; Yang, C.; Prasad, P. N. Nanochemistry and nanomedicine for nanoparticle-based diagnostics and therapy. *Chem. Rev.* **2016**, 116(5):2826-2885.

¹⁹⁸ Wang, X.; Zhuang, J.; Peng, Q.; Li, Y. A general strategy for nanocrystal synthesis. *Nature* **2005**, 437(7055):121-124.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 3. Les nanoparticules à conversion ascendante

Les synthèses hydrothermales permettent d'obtenir des NPs cristallisées et de morphologies relativement homogènes et contrôlées (cf. Figure 57). Une des principales limites de cette voie d'accès réside dans le prix des équipements dédiés (autoclave).

3.3.2. Synthèses par décomposition thermique

Ce procédé d'obtention des UCNPs consiste à décomposer un mélange de RE, en général sous forme de trifluoroacétate, à température élevée dans un solvant à haut point d'ébullition. Le solvant de réaction le plus couramment utilisé est un mélange de 1-octadécène (ODE, point d'ébullition 315 °C) et d'un ou plusieurs ligands de coordination. Ces derniers peuvent être de l'acide oléique (AO), de l'oléylamine voire de l'oxyde de trioctylphosphine, et auront pour rôle : de solubiliser les RE dans le milieu, de contrôler la croissance des NPs et de recouvrir *in fine* la surface de celles-ci après synthèse, les rendant ainsi hydrophobes tout en limitant les phénomènes d'agrégation. Cette approche permet d'obtenir des NPs cristallisées et de distribution de tailles très homogène. Une illustration est donnée dans la Figure 58 pour l'obtention de nanoplaquettes triangulaires de LaF_3 ¹⁹⁹ ou encore de NPs de fluorures d'yttrium sous leurs deux formes cristallines (α , cubique et β , hexagonale), dopées ou non par des RE.²⁰⁰

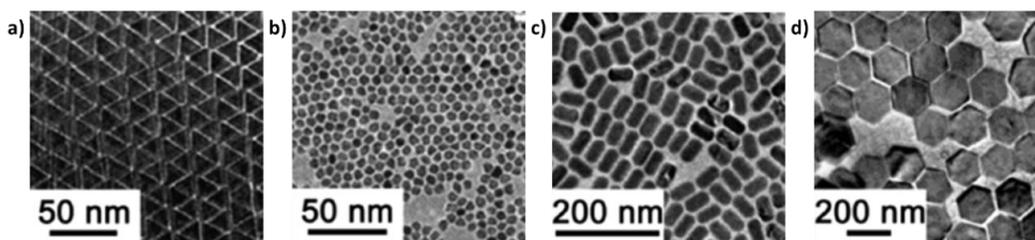


Figure 58 : images MET a) de nanoplaquettes de LaF_3 , b) de NPs de type NaYF_4 cubique ou c) hexagonales, d) de NPs de NaYF_4 co-dopées avec de l'yttrium et de l'erbium¹⁷⁷

Toutefois, il existe deux limites à cette voie d'accès : le coût des précurseurs et la génération de déchets fluoro-carbonés toxiques et dangereux. Pour pallier ces problèmes, des synthèses par coprécipitation ont été développées.

3.3.3. Synthèses par coprécipitation

Ce type de synthèse est simple à mettre en œuvre et peu coûteux. Il consiste à faire précipiter différents ions de RE dans un milieu aqueux ou organique. Les synthèses en milieu aqueux mettent en œuvre des ions Ln^{3+} (sous forme de précurseurs nitrés ou chlorés) en présence d'une source de fluor (e.g. fluorure de sodium ou d'ammonium) et si nécessaire de sodium (e.g. soude) en cas d'utilisation du fluorure d'ammonium. Les synthèses en milieu organique, quant à elles, utilisent des chlorures de Ln, et les sources de sodium et de fluor sont respectivement la soude et le fluorure d'ammonium.

¹⁹⁹ Zhang, Y. W.; Sun, X.; Si, R.; You, L. P.; Yan, C. H. Single-crystalline and monodisperse LaF_3 triangular nanoplates from a single-source precursor. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127(10):3260-3261.

²⁰⁰ Mai, H. X.; Zhang, Y. W.; Si, R.; Yan, Z. G.; Sun, L. D.; You, L. P.; Yan, C. H. High-quality sodium rare-earth fluoride nanocrystals: controlled synthesis and optical properties. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128(19):6426-6436.

À titre d'exemple de synthèses en milieu aqueux, nous pouvons citer les travaux de Yi, G. *et al.* portant sur l'obtention d'UCNPs de type NaYF₄:Yb,Er de tailles homogènes et contrôlées.²⁰¹ Cette synthèse utilise des chlorures de Ln solubilisés dans des solutions aqueuses d'acide chlorhydrique, de fluorure de sodium et d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA). Le ratio molaire entre l'EDTA et les Ln permet d'assurer un contrôle strict de la taille des UCNPs ainsi synthétisées, allant de 37 à 166 nm. En raison de la faible cristallinité des NPs synthétisées en milieu aqueux, un recuit à 600 °C est nécessaire afin d'augmenter l'émission de ces UCNPs, quasi nulle après synthèse.

La coprécipitation en milieu organique de RE, en général des chlorures, est une approche similaire à la thermolyse. Les solvants les plus fréquemment retrouvés lors de ces synthèses sont l'ODE en présence d'AO ou d'oléylamine (voire les deux), tandis que les sources de fluorures et de sodium, comme vu précédemment, sont respectivement le fluorure d'ammonium et la soude.

3.4. Hydrophilisation

Comparativement à la voie hydrothermale, les synthèses par coprécipitation permettent de s'affranchir des précurseurs organométalliques, et ainsi de limiter la formation de déchets toxiques tout en accédant à des UCNPs cristallisées et de tailles mieux contrôlées. Ces derniers critères étant cruciaux pour des applications biomédicales, les voies de synthèses par coprécipitation se sont progressivement imposées bien qu'elles nécessitent une étape supplémentaire d'hydrophilisation, dont les principales stratégies de mise en œuvre sont décrites ci-après.^{180b,180c,196,202,204}

3.4.1. Synthèse d'une coquille de silice

Cette approche consiste à rajouter une coquille hydrophile autour des nano-objets. Ces coquilles de silice sont reconnues pour être biocompatibles et non toxiques, ce qui présente un avantage non négligeable pour des applications biologiques. À noter que cette silanisation de surface peut être réalisée sur des NPs hydrophiles ou hydrophobes. Dans ce dernier cas, l'enrobage est réalisé via une méthode de microémulsion inversée. Les NPs hydrophobes, en suspension dans le cyclohexane, sont mises en réaction dans un mélange d'ammoniaque, de surfactant (souvent de l'Igepal CO-520) et d'orthosilicate de tétraéthyle. Cette voie de synthèse permet, en fonction des quantités mises en jeu et du temps de réaction, de contrôler

l'épaisseur de la couche de silice autour des NPs (souvent de l'ordre de 5 nm) (cf. Figure 59).

²⁰¹ Yi, G.; Lu, H.; Zhao, S.; Ge, Y.; Yang, W.; Chen, D.; Guo, L. H. Synthesis, characterization, and biological application of size-controlled nanocrystalline NaYF₄:Yb,Er infrared-to-visible up-conversion phosphors. *Nano Lett.* **2004**, 4(11):2191-2196.

²⁰² DaCosta, M. V.; Doughan, S.; Han, Y.; Krull, U. J. Lanthanide upconversion nanoparticles and applications in bioassays and bioimaging: a review. *Anal. Chim. Acta* **2014**, 832:1-33.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 3. Les nanoparticules à conversion ascendante

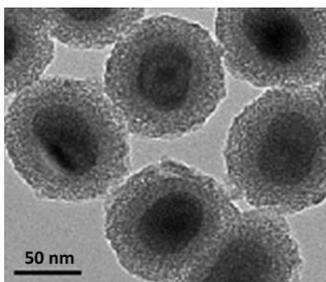


Figure 59 : image MET de nanocristaux de NaYF_4 enrobés d'une coquille de silice mésoporeuse²⁰³

Cette méthode présente également l'avantage de pouvoir moduler les groupements de surface (e.g. -SH, $-\text{NH}_2$, ou $-\text{COOH}$) et ainsi les fonctionnalisations ultérieures par ajout respectif, lors de la silanisation ou dans un second temps, de (3-mercaptopropyl)triméthoxysilane, de (3-aminopropyl)triéthoxysilane ou d'acide maléique.

3.4.2. Hydrophilisation par interactions ligand-ligand

Cette méthode consiste à enrober les AO présents en surface des NPs par des polymères amphiphiles.

Une première voie de synthèse utilise les interactions électrostatiques entre composés de charges opposées. Par exemple, les NPs peuvent être hydrophilisées par enrobages successifs consistant à alterner des couches de poly(hydrochlorure d'allylamine) et de polystyrène sulfonate.

Une autre voie d'accès met en jeu des attractions hydrophobe-hydrophobe via l'utilisation de surfactants tels que l'acide polyacrylique (PAA), le bromure de cétrimonium voire des phospholipides (cf. Figure 60).

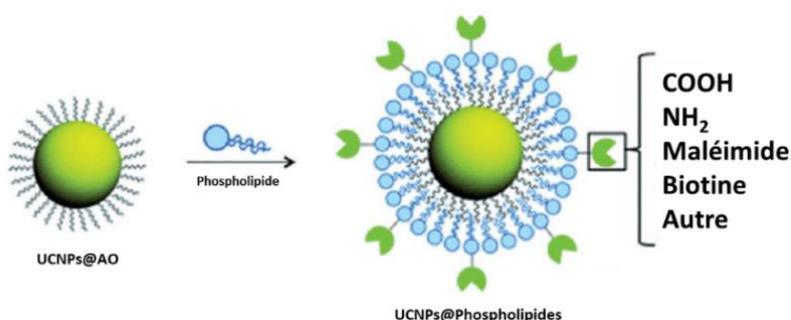


Figure 60 : hydrophilisation par des surfactants de type phospholipides. L'extrémité hydrophile des phospholipides peut être fonctionnalisée ultérieurement avec divers groupements (acide carboxylique, amine etc.)²⁰⁴

Enfin, une méthode d'encapsulation des AO par des dérivés d'oligosaccharides de type α -cyclodextrine (α -CD) a été développée (cf. Figure 61).

²⁰³ Gnanasammandhan, M. K.; Idris, N. M.; Bansal, A.; Huang, K.; Zhang, Y. Near-IR photoactivation using mesoporous silica-coated $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er/Tm}$ upconversion nanoparticles. *Nat. Protoc.* **2016**, 11(4):688-713.

²⁰⁴ Chen, C.; Li, C.; Shi, Z. Current advances in lanthanide-doped upconversion nanostructures for detection and bioapplication. *Adv. Sci.* **2016**, 3(10):1600029.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 3. Les nanoparticules à conversion ascendante

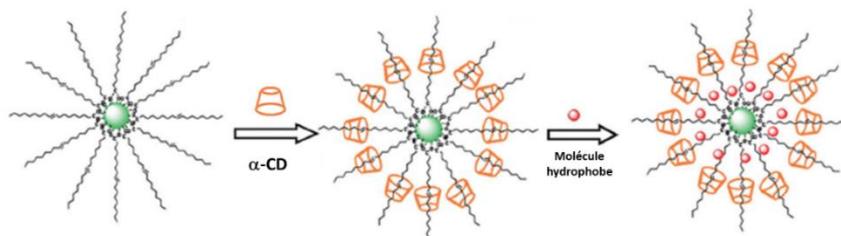


Figure 61 : hydrophilisation par encapsulation des acides oléiques par des α -cyclodextrines²⁰⁴

La présence des cyclodextrines augmente l'hydrophilie des NPs tout en créant des « poches » hydrophobes à proximité de la surface inorganique, « poches » pouvant piéger des molécules lipophiles à des fins d'imagerie ou de thérapie.

3.4.3. Oxydation des ligands de surface

Cette stratégie est basée sur le clivage oxydatif des insaturations présentes sur les ligands de surface hydrophobes, en général l'AO. La méthode la plus courante consiste en une oxydation de Lemieux-Von Rudloff, utilisant du permanganate de potassium en quantité catalytique et du périodate de sodium. Cette oxydation conduit à la formation d'acides azélaïques, plus courts que les AO, et présentant à la surface des NPs des fonctions acides carboxyliques hydrophiles et aisément fonctionnalisables (cf. Figure 62).

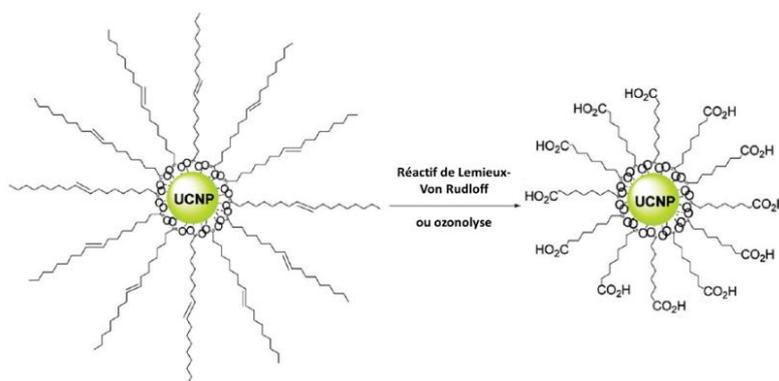


Figure 62 : hydrophilisation par oxydation des ligands de surface²⁰⁴

Les UCNPs obtenues selon cette approche présentent une émission de fluorescence faiblement altérée par l'hydrophilisation mais leur stabilité en milieu aqueux reste faible.

3.4.4. Elimination des ligands

Cette méthode d'hydrophilisation consiste à supprimer les oléates présents en surface des UCNPs. Pour ce faire, les NPs sont traitées par une solution aqueuse d'acide chlorhydrique jusqu'à atteindre un pH inférieur à 4, valeur pour laquelle les fonctions carboxylates des oléates se protonent. Ainsi, après élimination de l'AO par extraction avec un solvant aprotique apolaire (e.g. éther diéthylique), les NPs sont hydrophilisées par coordination des ions de surface avec les atomes d'oxygène de l'eau (cf. Figure 63). Une autre méthode utilisant le tétrafluoroborate de nitrosyle a également été décrite avec remplacement des AO par les anions BF_4^- .

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 3. Les nanoparticules à conversion ascendante

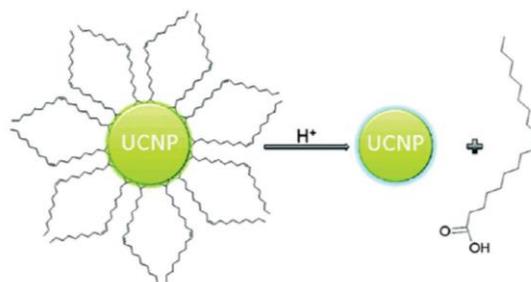


Figure 63 : hydrophilisation par élimination des ligands de surface²⁰⁴

Les NPs ainsi hydrophilisées présentent une stabilité importante dans l'eau, pouvant atteindre plusieurs mois sans agrégation.²⁰⁵ Un autre avantage de cette approche réside dans la facilité de couplage de molécules en surface des NPs via l'utilisation de ligands de coordination (fonctions acide carboxylique, amine, thiol, phosphate, phosphonate ou alcool).

3.4.5. Échange de ligands

La méthode d'échange de ligands est de loin la plus répandue pour l'hydrophilisation des NPs. Elle consiste à substituer les oléates de surface par des ligands hydrophiles possédant une force de coordination avec les ions de RE supérieure. Parmi les ligands étudiés, nous pouvons citer les PAA (cf. Figure 64), les polyéthylène glycols (PEGs) phosphates ou phosphonates, l'acide mercaptopropionique, les poly(amidoamine) etc. Ces réactions d'échange de ligands n'ont en général que très peu d'impact sur les propriétés physiques (structure cristalline, taille, morphologie) des UCNPs.

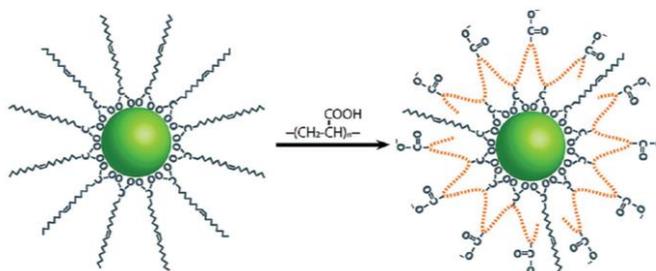


Figure 64 : hydrophilisation par échange de ligands avec de l'acide polyacrylique²⁰⁶

La limite de cette voie d'hydrophilisation par échange de ligands réside dans la stabilité des UCNPs formées dans les milieux aqueux riches en sels (tampons, milieux de cultures). Par exemple, les sels de phosphates peuvent déplacer les ligands d'hydrophilisation liés de façon non covalente à la surface des NPs et conduire à leur agrégation.

Pour conclure ce paragraphe, bien que l'échange de ligands et la silanisation soient les deux méthodes les plus fréquemment décrites dans la littérature, toutes possèdent leurs

²⁰⁵ Dong, A.; Ye, X.; Chen, J.; Kang, Y.; Gordon, T.; Kikkawa, J. M.; Murray, C. B. A generalized ligand-exchange strategy enabling sequential surface functionalization of colloidal nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133(4):998-1006.

²⁰⁶ Zhang, T.; Ge, J.; Hu, Y.; Yin, Y. A general approach for transferring hydrophobic nanocrystals into water. *Nano Lett.* **2007**, 7(10):3203-3207.

avantages et inconvénients. Le choix de la stratégie d'hydrophilisation devra donc être adaptée au cas par cas en tenant compte des contraintes relatives aux applications visées (encapsulation de molécules hydrophobes, fonctionnalisation post-échange etc.).

3.5. Prérequis des NPs pour leurs applications en pharmacologie

Lors du développement de NPs susceptibles d'être administrées chez l'Homme à des fins diagnostiques, il est nécessaire dès les phases précliniques d'évaluer un certain nombre de paramètres pharmacologiques. Sur le volet pharmacocinétique, ces études portent sur la voie d'administration des NPs, leur distribution au sein de l'organisme, leur métabolisation et enfin leur élimination. Sur le volet pharmacodynamique, il sera important d'étudier les interactions entre les NPs et leur cible physiologique (interactions ligand-récepteur, internalisation etc.) mais également leur toxicité.²⁰⁷ Ces prérequis sont communs à toute substance active, aussi traiterons-nous plus en détails dans les paragraphes qui suivent des particularités propres aux nano-objets.

3.5.1. Administration

À l'instar de n'importe quelle substance active, les NPs peuvent être administrées par voie entérale ou parentérale.²⁰⁸ Toutefois, la voie d'abord la plus rencontrée demeure la voie i.v..²⁰⁹ Ce mode d'administration permet en effet d'occulter les barrières physiques, telles que la barrière intestinale, pulmonaire ou cutanée, difficilement franchissables par les NPs.

3.5.2. Distribution

La distribution des NPs est fortement dépendante de leurs propriétés physiques, comme leur taille, leur charge en surface ou encore leur forme. Également, leur stabilité en milieu biologique sera déterminante, car dès leur injection, le changement d'environnement subi en termes de pH, de force ionique ou encore de température, pourrait entraîner leur agrégation. Pour remplir leur fonction, les NPs devront également atteindre leur cible biologique par distribution passive et/ou active.

3.5.2.1. Le ciblage passif

En cancérologie, le ciblage passif des foyers tumoraux par les NPs est essentiellement dû à un phénomène connu sous le nom de « Enhanced Permeability and Retention » (EPR).²¹⁰ Pour croître, les cellules tumorales sécrètent des facteurs d'angiogenèse (e.g. angiogénine), entraînant une sur-vascularisation des foyers tumoraux, avec toutefois un faible

²⁰⁷ Choi, H. S.; Frangioni, J. V. Nanoparticles for biomedical imaging: fundamentals of clinical translation. *Mol. Imaging* **2010**, 9(6):291-310.

²⁰⁸ Raza, K.; Kumar, P.; Kumar, N.; Malik, R. Pharmacokinetics and biodistribution of the nanoparticles. *Adv. Nanomedicine Deliv. Ther. Nucleic acids* **2017**, 165-186.

²⁰⁹ Yuan, D.; He, H.; Wu, Y.; Fan, J.; Cao, Y. Physiologically based pharmacokinetic modelling of nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* **2019**, 108(1):58-72.

²¹⁰ Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T.; Matsumura, Y.; Hori, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J. Control Release* **2000**, 65(1-2):271-284.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 3. Les nanoparticules à conversion ascendante

développement du réseau lymphatique.²¹¹ Cette croissance s'accompagne de la libération de nombreux facteurs tels que la bradykinine, le monoxyde d'azote, le peroxy-nitrite ou le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). Ce dernier entraîne une augmentation de la perméabilité des néovaisseaux créés, avec la présence de pores dont la taille est comprise entre 100 et 4700 nm. Ce développement anarchique de la vascularisation tumorale a pour conséquence une diffusion lente des macromolécules au sein des tumeurs solides avec toutefois une forte rétention en raison du faible drainage lymphatique, tandis que les petites molécules circulent quant à elles plus librement mais sont rapidement éliminées (cf. Figure 65). Ainsi pour maximiser l'effet EPR tout en limitant les éliminations rénale et hépatique (cf. paragraphes 3.5.3.1 et 3.5.3.2), la taille optimale des NPs semble devoir être comprise entre 10 et 100 nm.²¹²

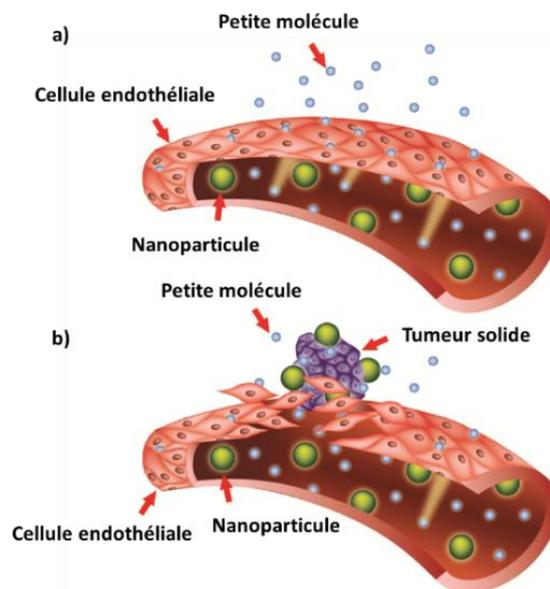


Figure 65 : effet EPR et ciblage passif des tumeurs a) vaisseau normal, b) vaisseau tumoral²¹³

Néanmoins, selon une méta-analyse récente issue de données précliniques, l'effet EPR ne serait responsable que d'une faible accumulation des NPs au sein du tissu tumoral, de l'ordre de 0,7% de la dose administrée.²¹⁴ Il faut également tenir compte que les modèles tumoraux utilisés lors de ces études sont loin de refléter la réalité clinique en termes de vascularisation, de croissance tumorale, d'hypoxie, de matrices extracellulaires, de stroma etc., sans évoquer la forte hétérogénéité tumorale retrouvée entre patients atteints d'une même pathologie. Plusieurs stratégies ont donc été envisagées afin d'améliorer le ciblage passif par effet EPR. Parmi elles, une piste prometteuse consiste à « normaliser » la vascularisation tumorale par

²¹¹ Matsumura, Y.; Maeda, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* **1986**, 46(12 Pt 1):6387-6392.

²¹² Cheng, Z.; Zaki, A. A.; Hui, J. Z.; Muzykantov, V. R.; Tsourkas, A. Multifunctional nanoparticles: cost versus benefit of adding targeting and imaging capabilities. *Science* **2012**, 338(6109):903-910.

²¹³ Bozzuto, G.; Molinari, A. Liposomes as nanomedical devices. *Int. J. Nanomedicine* **2015**, 10:975-999.

²¹⁴ Wilhelm, S.; Tavares, A. J.; Dai, Q.; Ohta, S.; Audet, J.; Dvorak, H. F.; Chan, W. C. W. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nat. Rev. Mater.* **2016**, 1:16014.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 3. Les nanoparticules à conversion ascendante

des traitements adjuvants anti-angiogéniques. Dans ce cadre peuvent être utilisés : des inhibiteurs de TGF- β , qui permettent d'augmenter la perfusion tissulaire et la taille des pores vasculaires tout en diminuant la pression interstitielle, ou encore le paclitaxel qui induit une augmentation de l'apoptose (diminution de la pression vasculaire) ainsi qu'une sous-régulation de l'expression de VEGF (normalisation du réseau vasculaire tumoral).²¹⁵

3.5.2.2. Le ciblage actif

Par opposition au ciblage passif, le ciblage actif consiste à coupler en surface des nano-objets un vecteur spécifique (molécule de synthèse, peptides, anticorps et dérivés etc.) d'une cible (sur)exprimée au sein du tissu tumoral.²¹⁶

Les critères à remplir pour un adressage spécifique efficace sont au nombre de trois :

- La cible doit être surexprimée au niveau tumoral, avec pas ou peu d'expression dans les tissus sains ;
- La cible doit être accessible et si possible distribuée de façon homogène dans tout le tissu tumoral ;
- Le couplage résultant de la reconnaissance ligand-récepteur doit si possible conduire à une internalisation voire une accumulation au sein des cellules visées.

Pour assurer un ciblage actif des tissus tumoraux, seront visés des antigènes surexprimés, comparativement aux tissus sains, en surface des membranes des cellules cancéreuses ou au sein du stroma (cellules de l'endothélium tumoral, matrice extracellulaire etc.) (cf. Figure 66).

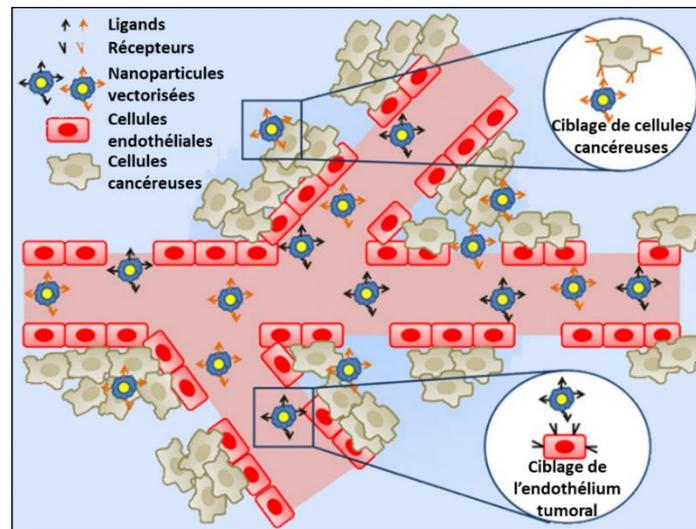


Figure 66 : principe du ciblage actif²¹⁷

²¹⁵ Danhier, F. To exploit the tumor microenvironment: since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? *J. Control Release* **2016**, 244(Pt A):108-121.

²¹⁶ Lammers, T.; Kiessling, F.; Hennink, W. E.; Storm, G. Drug targeting to tumors: principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. *J. Control. Release* **2012**, 161-2):175-187.

²¹⁷ Yingchoncharoen, P.; Kalinowski, D. S.; Richardson, D. R. Lipid-based drug delivery systems in cancer therapy: what is available and what is yet to come. *Pharmacol. Rev.* **2016**, 68(3):701-787.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 3. Les nanoparticules à conversion ascendante

Parmi les cibles étudiées, on retrouve par exemple au niveau des cellules tumorales l'antigène carcino-embryonnaire, les récepteurs à la transferrine, au folate, au facteur de croissance épidermique, aux intégrines (e.g. $\alpha_v\beta_3$) etc. ; au niveau de l'endothélium vasculaire le VEGF, la protéine d'adhésion aux cellules vasculaires 1 (VCAM-1) ; au niveau de la matrice extracellulaire les métalloprotéases matricielles, les glycosaminoglycanes etc.^{218,219}

3.5.2.1. Cas particulier : franchissement de la barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est une barrière physiologique composée d'astrocytes (jouant le rôle de protecteurs et de source de nutriments pour les neurones), de péricytes (recouvrant la membrane basale et indispensables pour la néovascularisation) et d'une membrane basale.²²⁰ Les cellules épithéliales recouvrant la lame basale sont essentiellement (mais pas exclusivement) liées par des jonctions serrées. Ainsi, la BHE ne laisse passer aisément que certains composés, comme l'eau, des gaz ou encore certaines substances liposolubles. Il est donc difficile pour les NPs hydrosolubles de la traverser. Des stratégies pour contourner cette limitation existent, comme l'ajout en surface des NPs de surfactants (par exemple le polysorbate 80) qui conduisent à l'adsorption de protéines sériques spécifiques à leur surface, favorisant l'internalisation des NPs dans les cellules endothéliales, et ainsi le passage de la BHE. Toutefois, le passage des NPs au-delà de la BHE soulève la problématique de leur neurotoxicité par accumulation au sein du cerveau.²²⁰ Enfin, la charge globale des NPs est à prendre en considération car il a été montré que les NPs chargées positivement (contrairement aux NPs neutres ou négatives) perméabiliseraient la BHE, entraînant une neurotoxicité importante.²²¹

3.5.2.2. Internalisation cellulaire

Plusieurs facteurs régissent les phénomènes d'adhésion, d'internalisation et de devenir des NPs aux seins des cellules, que ce soit en raison des mécanismes cellulaires mis en jeu, ou des propriétés physico-chimiques propres à chaque type de NPs (taille, charge, composition de surface...).

Mécanismes d'internalisation cellulaire des NPs

En l'absence de stratégies de vectorisation active, les NPs peuvent être internalisées au sein des cellules, soit par diffusion passive, soit selon des voies de transport mettant en œuvre des mécanismes membranaires spécifiques appelés endocytoses. Ces derniers englobent la

²¹⁸ Danhier, F.; Feron, O.; Pr at, V. To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J. Control. Release* **2010**, 148(2):135-146.

²¹⁹ Peyrode, C.; Weber, V.; Voissier , A.; Maisonia-Besset, A.; Vidal, A.; Auzeloux, P.; Gaumet, V.; Borel, M.; Dauplat, M. M.; Quintana, M.; Degoul, F.; R dini, F.; Chezal, J. M.; Miot-Noirault, E. Proteoglycans as target for an innovative therapeutic approach in chondrosarcoma: preclinical proof of concept. *Mol. Cancer Ther.* **2016**, 15(11):2575-2585.

²²⁰ Engelhardt, B. Development of the blood-brain barrier. *Cell Tissue Res.* **2003**, 314(1):119-129.

²²¹ Lockman, P. R.; Koziara, J. M.; Mumper, R. J.; Allen, D. D. Nanoparticle surface charge alter blood-brain barrier integrity and permeability. *J. Drug Target.* **2004**, 12(9-10):635-641.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 3. Les nanoparticules à conversion ascendante

phagocytose et les différentes pinocytoses (i.e. endocytoses clathrine-dépendante, clathrine-indépendante ou cavéoline-dépendante, macropinocytose) (cf. Figure 67).

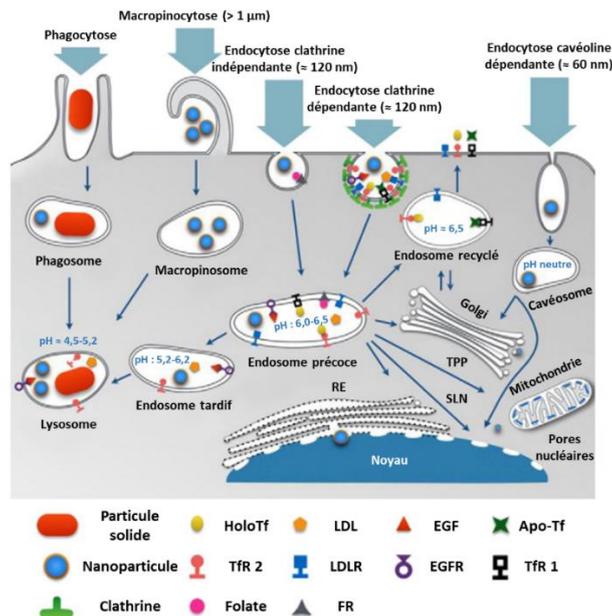


Figure 67 : représentation des différents types d'internalisation cellulaire de NPs. RE : réticulum endoplasmique ; SLN : signal de localisation nucléaire, TPP : cation triphenylphosphonium²²²

La phagocytose est un mécanisme retrouvé dans de nombreux types cellulaires : fibroblastes, cellules épithéliales, polynucléaires basophiles, polynucléaires éosinophiles, et également les phagocytes, famille composée des macrophages, des monocytes, des polynucléaires neutrophiles et des cellules dendritiques. Ce mécanisme découle généralement de l'opsonisation en surface des composés considérés (ici les NPs) par des immunoglobulines ou des protéines du complément, appelées aussi opsonines. Ces molécules sont alors reconnues par les phagocytes, via la formation de liaisons ligand-récepteur. Il s'en suit l'évagination de la membrane plasmique par assemblage de filaments d'actine puis l'internalisation des NPs au sein d'organelles d'un diamètre supérieur à 250 nm, les phagosomes.

La clathrine et la cavéoline sont des protéines composantes des membranes cellulaires qui, après assemblage et association à d'autres protéines et phospholipides membranaires, entraînent une invagination (appelée cavéole pour la cavéoline) de la membrane plasmique suivie de la formation d'une vésicule susceptible de piéger les NPs en leur sein. Après détachement de la membrane plasmique, notamment par une mécano-enzyme, la dynamine, ces vésicules sont libérées dans le cytosol. L'activation de ce type d'endocytoses peut être récepteur dépendant (clathrine, cavéoline) ou indépendant (clathrine). La macropinocytose concerne quant à elle un mécanisme non spécifique dans lequel l'évagination de la membrane plasmique par réarrangement de filaments d'actine forme une vésicule, appelée

²²² Yameen, B.; Choi, W. I.; Vilos, C.; Swami, A.; Shi, J.; Farokhzad, O. C. Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting. *J. Control. Release* **2014**, 190:485-499.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 3. Les nanoparticules à conversion ascendante

macropinosome, pouvant atteindre 10 μm de diamètre. Ce mécanisme permet donc à une grande quantité de milieu extracellulaire, dont des NPs, d'être internalisée.

L'internalisation cellulaire des NPs peut également être favorisée par l'ajout de ligands de reconnaissance à leur surface, ciblant des récepteurs surexprimés par les cellules visées.^{223,224} Parmi les antigènes les plus fréquemment étudiés, nous pouvons citer les récepteurs à l'acide folique, à la transferrine, au facteur de croissance épidermique, aux intégrines ou bien encore le PSMA.²¹⁵

Après endocytose, les vésicules peuvent fusionner avec des endosomes, qui pourront alors : i) soit être redirigés vers la membrane plasmique (exocytose) ou d'autres compartiments cellulaires (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi), ii) soit interagir avec des lysosomes (endolysosome), ce qui aura pour conséquence l'hydrolyse de leur contenu. Un exemple est donné Figure 68 pour les endocytoses clathrine ou cavéoline dépendantes.

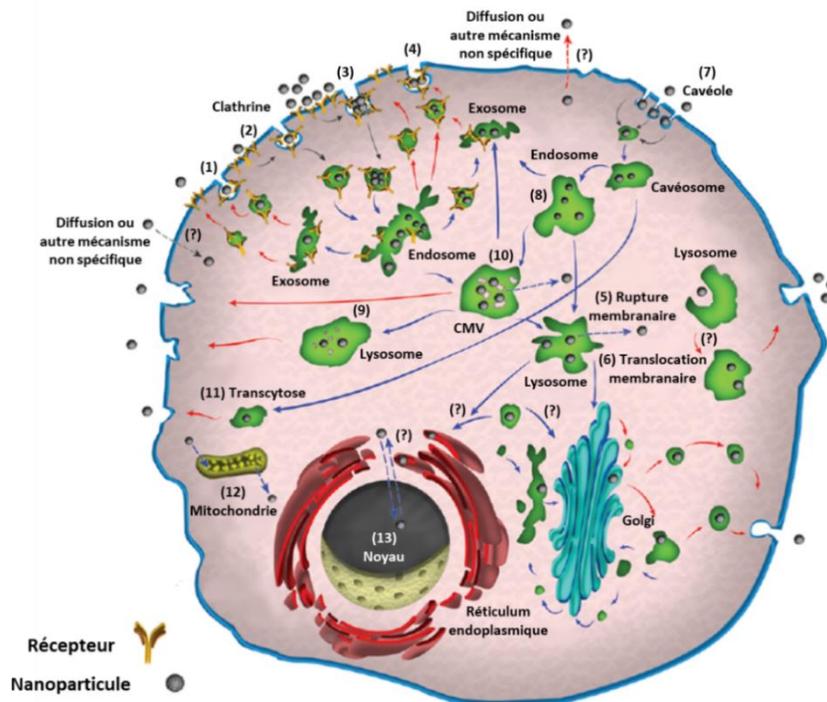


Figure 68 : représentation de l'endocytose des NPs (flèches grises), leur trafic intracellulaire (flèches bleues) et leur exocytose (flèches rouges). Les points d'interrogation représentent des mécanismes inconnus²²⁹

Après endocytose, les vésicules formées peuvent être exocytées par transcytose (11) ou fusionner avec un endosome (8), donnant naissance à un endosome précoce. Celui-ci a plusieurs devenir : l'exocytose par des vésicules (1, 4), ou l'évolution en endosome tardif (ou corps multivésiculaire, CMV) par acidification de son milieu (10). Bien que celui-ci puisse

²²³ Alexis, F.; Rhee, J. W.; Richie, J. P.; Radovic-Moreno, A. F.; Langer, R.; Farokhzad, O. C. New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. *Urol. Oncol.* **2008**, 26(1):74-85.

²²⁴ Rosenblum, D.; Joshi, N.; Tao, W.; Karp, J. M.; Peer, D. Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics. *Nat. Commun.* **2018**, 9(1):1410.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 3. Les nanoparticules à conversion ascendante

également être exocyté, il fusionne en général avec un lysosome qui, après dégradation, va libérer son contenu dans le milieu extracellulaire (9). Il arrive toutefois que des NPs diffusent passivement à travers la membrane cellulaire ou d'autres organites (mitochondrie, noyau, Golgi), évitant ainsi la dégradation lysosomale.

Particularités liées aux propriétés physico-chimiques des NPs

L'impact de la taille des NPs sur les phénomènes d'internalisation cellulaire médiés par le ciblage de récepteurs membranaires a fait l'objet d'une étude de modélisation réalisée par l'équipe de Yuan, H. et al.²²⁵ En partant de différents postulats (NPs sphériques, densité de récepteurs fixes), l'internalisation cellulaire par endocytose semble être maximale pour des diamètres variant de 30 à 60 nm. En effet, lorsque le diamètre des NPs est inférieur à 30 nm ou supérieur à 60 nm, le nombre de liaisons ligand-récepteur pouvant être réalisé par une seule et même NP, pour une unité de surface membranaire donnée, est insuffisant pour déclencher le phénomène d'internalisation (cf. Figure 69).²²⁶ Cet effet a été démontré expérimentalement avec des NPs d'or et d'argent sur des cellules SKBR-3,²²⁷ et également avec des NPs de silice non vectorisées sur des lignées cellules HeLa.²²⁸

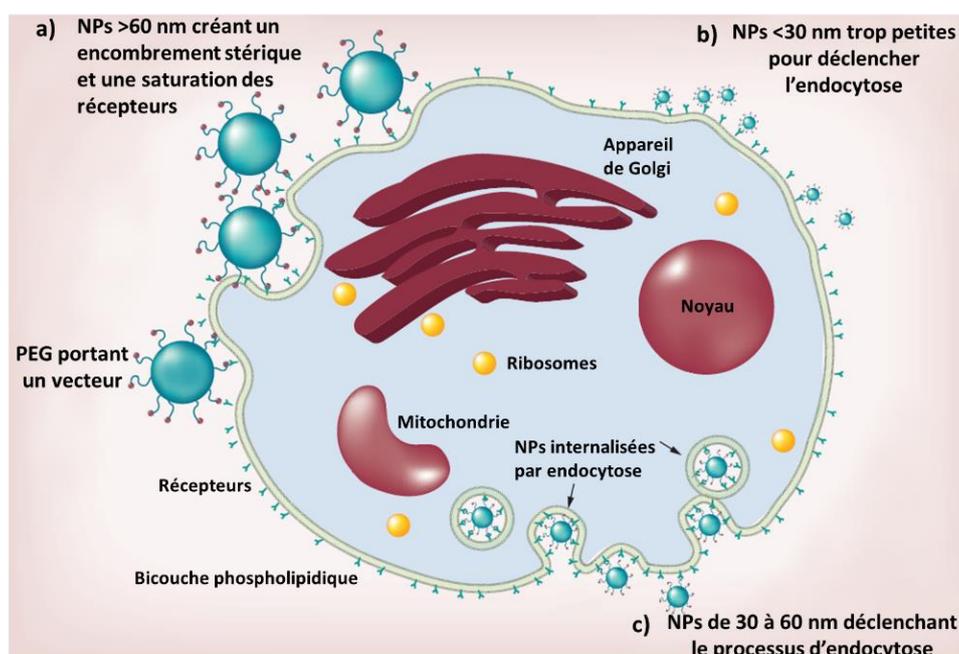


Figure 69 : impact de la taille des NPs sur l'internalisation par endocytose à récepteur. a) NPs de taille >60 nm ; b) NPs de taille <30 nm ; c) NPs de taille comprise entre 30 et 60 nm²²⁶

²²⁵ Yuan, H.; Li, J.; Bao, G.; Zhang, S. Variable nanoparticle-cell adhesion strength regulates cellular uptake. *Phys. Rev. Lett.* **2010**, 105(13):138101.

²²⁶ Hoshyar, N.; Gray, S.; Han, H.; Bao, G. The effect of nanoparticle size on *in vivo* pharmacokinetics and cellular interaction. *Nanomedicine (Lond)*. **2016**, 11(6):673-692.

²²⁷ Jiang, W.; Kim, B. Y. S.; Rutka, J. T.; Chan, W. C. W. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nat. Nanotechnol.* **2008**, 3(3):145-150.

²²⁸ Lu, F.; Wu, S. H.; Hung, Y.; Mou, C. Y. Size effect on cell uptake in well-suspended, uniform mesoporous silica nanoparticles. *Small* **2009**, 5(12):1408-1413.

Concernant la forme, plusieurs études ont montré que les NPs sphériques sont internalisées plus rapidement que les NPs en bâtonnets,²²⁹ que ce soit sur des cellules HeLa,²³⁰ des fibroblastes ou des lignées de tumeurs cérébrales.²³¹ Toutefois cette observation doit être pondérée pour le transport des NPs à travers la paroi intestinale. En effet, il a pu être mis en évidence une meilleure internalisation de NPs en bâtonnets ou nanodisques vs sphériques, sur des cocultures de lignées de cancer colorectal (Caco-2/HT-29).²³² Cet effet peut être expliqué par la plus grande surface de contact entre les NPs de type nano-bâtonnets ou nanodisques avec les cellules, augmentant ainsi les interactions cellulaires et accélérant le déclenchement du processus d'internalisation dans ces lignées.

La charge des NPs joue également un rôle prépondérant lors de l'internalisation. Il a en effet été démontré que les NPs chargées positivement conduisaient à une plus forte endocytose comparativement aux NPs neutres ou chargées négativement.²²⁶ Ceci est dû à la composition de la matrice extracellulaire et de la membrane basale des cellules eucaryotes, où sont retrouvés notamment de nombreux protéoglycanes et glycosaminoglycanes qui apportent une densité de charge négative, augmentant ainsi les interactions électrostatiques avec les particules cationiques. À noter toutefois que les NPs chargées positivement sont susceptibles d'induire une réponse immunitaire plus importante.²⁰⁸

3.5.3. Métabolisation/excrétion des NPs

Le temps de demi-vie des NPs au sein d'un organisme est directement lié aux processus de métabolisation et/ou d'excrétion mis en œuvre par ce dernier.²³³ Les NPs inorganiques sont généralement considérées comme résistantes aux processus de métabolisation hépatique.²³⁴ Toutefois, la forte acidité retrouvée au sein des lysosomes peut contribuer à leur dégradation. Ce phénomène conduit alors à la libération d'ions métalliques qui, s'ils ne sont pas rapidement pris en charge par des métalloprotéines, peuvent potentiellement être toxiques pour différents compartiments cellulaires (lysosomes, mitochondries, réticulum endoplasmique) et conduire, par cascade, à la libération d'espèces réactives de l'oxygène susceptible de créer

²²⁹ Behzadi, S.; Serpooshan, V.; Tao, W.; Hamaly, M. A.; Alkawareek, M. Y.; Dreaden, E. C.; Brown, D.; Alkilany, A. M.; Farokhzad, O. C.; Mahmoudi, M. Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, 46(14):4218-4244.

²³⁰ Chithrani, B. D.; Ghazani, A. A.; Chan, W. C. W. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett.* **2006**, 6(4):662-668.

²³¹ Chithrani, B. D.; Chan, W. C. W. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett.* **2007**, 7(6):1542-1550.

²³² Banerjee, A.; Qi, J.; Gogoi, R.; Wong, J.; Mitragotri, S. Role of nanoparticle size, shape and surface chemistry in oral drug delivery. *J. Control Release* **2016**, 28(238):176-185.

²³³ Kang, H.; Mintri, S.; Menon, A. V.; Lee, H. Y.; Choi, H. S.; Kim, J. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicology of theranostic nanoparticles. *Nanoscale* **2015**, 7(45):18848-18862.

²³⁴ Li, M.; Al-Jamal, K. T.; Kostarelos, K.; Reineke, J. Physiologically based pharmacokinetic modelling of nanoparticles. *ACS Nano* **2010**, 4(11):6303-6317.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 3. Les nanoparticules à conversion ascendante

entre autres des dommages à l'ADN.²³⁵ Dans ce paragraphe, les différentes voies d'excrétion/métabolisme couramment rencontrées pour les NPs seront évoquées.

3.5.3.1. La clairance rénale

Au niveau rénal, la capacité des néphrons à éliminer les particules exogènes dépend de leurs caractéristiques physico-chimiques : taille, charge et forme.²³⁶ Il a ainsi été montré que cette voie d'élimination concerne essentiellement les particules de moins de 5,5 nm. Toutefois, cette observation n'est valable que pour les NPs de forme sphérique. En effet, des nanotubes de carbone d'un diamètre de 1 nm mais de longueur comprise entre 100 et 500 nm peuvent également être éliminés par filtration glomérulaire (cf. Figure 70).²³⁷

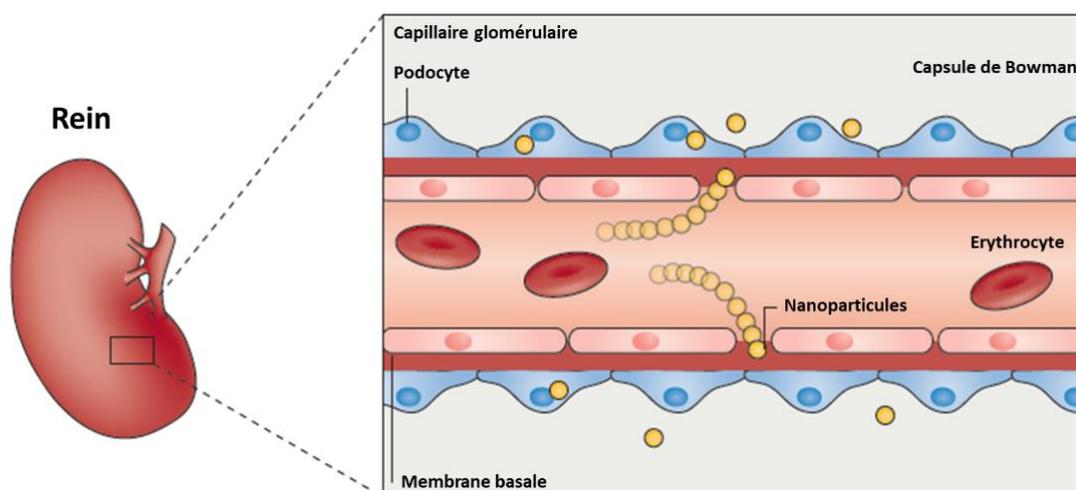


Figure 70 : mécanisme d'élimination rénale des NPs²¹⁴

Enfin, les NPs chargées positivement présentent une meilleure clairance rénale que des NPs neutres ou chargées négativement, en raison des interactions électrostatiques vis à vis de la membrane basale glomérulaire chargée négativement.²³⁸

3.5.3.2. La clairance hépatique

La clairance hépatique des NPs fait intervenir deux mécanismes d'élimination distincts, l'un impliquant les hépatocytes et l'autre le système réticulo-endothélial (SRE).^{239,240}

²³⁵ Panzarini, E.; Mariano, S.; Carata, E.; Mura, F.; Rossi, M.; Dini, L. Intracellular transport of silver and gold nanoparticles and biological responses: an update. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, 19(5):1305.

²³⁶ Von Roemeling, C.; Jiang, W.; Chan, C. K.; Weissman, I. L.; Kim, B. Y. S. Breaking down the barriers to precision cancer nanomedicine. *Trends Biotechnol.* **2017**, 35(2):159-171.

²³⁷ Ruggiero, A.; Villa, C. H.; Bander, E.; Rey, D. A.; Bergkvist, M.; Batt, C. A.; Manova-Todorova, K.; Deen, W. M.; Scheinberg, D. A.; McDevitt, M. R. Paradoxical glomerular filtration of carbon nanotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2010**, 107(27):12369-12374.

²³⁸ Choi, H. S.; Liu, W.; Misra, P.; Tanaka, E.; Zimmer, J. P.; Ipe, B. I.; Bawendi, M. G.; Frangioni, J. V. Renal clearance of quantum dots. *Nat. Biotechnol.* **2007**, 25(10):1165-1170.

²³⁹ Longmire, M.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats. *Nanomedicine (Lond).* **2008**, 3(5):703-717.

²⁴⁰ Kuntz, E.; Kuntz, H. D. *Hepatology: principles and practice: history, morphology, biochemistry, diagnostics, clinic, therapy.* Springer. 2nd edition; **2006**, 20-22; 52-66.

Les hépatocytes

Les hépatocytes représentent plus de 60% du nombre total de cellules composant le foie et environ 80% du volume de cet organe. Le foie est l'organe par excellence de détoxification de l'organisme, soit par des voies substances-spécifiques (e.g. métabolisme de l'alcool ou cycle de l'urée), soit par des voies d'oxydation non spécifiques (e.g. biotransformations par le cytochrome P450). Après endocytose et métabolisation des xénobiotiques par les hépatocytes, les métabolites sont éliminés soit par les reins (pour les métabolites de faible taille et hydrophiles), soit dans la bile et les fèces (pour les métabolites hydrophobes). Concernant les NPs, il est supposé qu'elles soient éliminées par vidange des lysosomes les contenant dans les canaux biliaires, avant d'atteindre la bile puis le petit intestin.²⁴¹ L'élimination par les hépatocytes, plus longue que par les reins, peut durer de quelques heures à quelques semaines.

Le système réticulo-endothélial

Le SRE, ou système phagocytaire mononucléaire,²³⁶ est un élément essentiel de l'organisme pour lutter contre les pathogènes. Il joue un rôle prépondérant dans la clairance des NPs, notamment pour celles qui ne peuvent pas être éliminées par filtration glomérulaire. Le SRE correspond à un ensemble de cellules situées à 90% dans le foie (cellules de Kupffer), mais aussi dans la rate et dans la moelle osseuse. Une fois les NPs reconnues par les cellules de Kupffer, probablement dérivées des monocytes, les mécanismes de l'immunité innée vont être déclenchés, ce qui conduira à la libération de cytokines en cascade induisant inflammation, recrutement de polynucléaires neutrophiles et de macrophages puis activation du système du complément, ce dernier ayant pour principale conséquence l'opsonisation des NPs (cf. Figure 71). Ce phénomène d'opsonisation accélère la phagocytose des fragments/particules opsonisés par les globules blancs. Ces fragments/particules seront alors soit éliminés par lyse intra-cellulaire, soit piégés au sein de ces cellules. Le temps d'élimination par le SRE est très long, compris entre quelques heures et quelques mois.²⁰⁹ Si les NPs ne sont pas biodégradables, cela peut entraîner la fusion des macrophages et la formation de capsules fibreuses, induisant une réaction inflammatoire prolongée. Une telle accumulation pourrait, sur le long terme et en fonction de la composition des NPs, provoquer le développement de cellules malignes (phénomène identifié pour des NPs de cobalt ou de nickel).²⁴²

²⁴¹ Zhang, Y. N.; Poon, W.; Tavares, A. J.; McGilvray, I. D.; Chan, W. C. W. Nanoparticle-liver interactions: cellular uptake and hepatobiliary elimination. *J. Control Release* **2016**, 240:332-348.

²⁴² Hansen, T.; Clermont, G.; Alves, A.; Eloy, R.; Brochhausen, C.; Boutrand, J. P.; Gatti, A. M.; Kirkpatrick, C. J. Biological tolerance of different materials in bulk and nanoparticulate form in a rat model: sarcoma development by nanoparticles. *J. R. Soc. Interface* **2006**, 3(11):767-775.

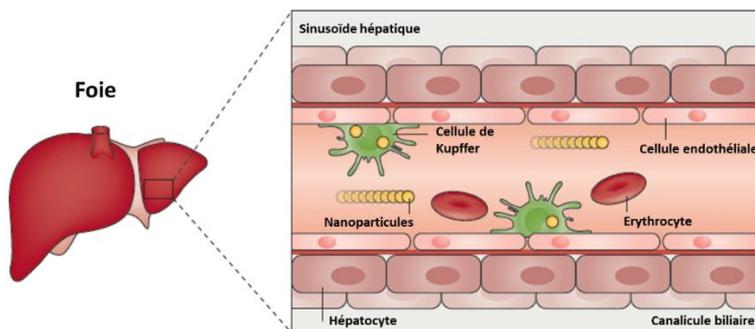


Figure 71 : représentation des mécanismes d'élimination mis en jeu lors de la clairance hépatique des NPs²¹⁴

Ainsi, il semble indispensable pour des applications médicales que les NPs utilisées soient le plus faiblement possible reconnues par le SRE, afin de réduire l'induction d'une réponse immunitaire, tout en leur permettant de circuler plus librement dans les réseaux sanguins et/ou lymphatiques. Les principales stratégies en ce sens, dites de furtivité, consistent à modifier la surface des NPs par des ligands biocompatibles, non-immunogènes et hydrophiles tels que des poloxamères, des PEGs, des polysaccharides etc.

À titre d'exemple, nous pouvons citer les travaux de Generalova, A. N. *et al.* portant sur le dosage sérique d'UCNPs cœur/coquille de composition $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Tm}@/\text{NaYF}_4$ hydrophilisées selon deux procédés : soit par un copolymère d'ODE et d'anhydride maléique (PMAO) seul, soit associé à un PEG-diglycidyl éther (PEG-DGE) à deux concentrations différentes (0,1 mg/mL et 0,6 mg/mL). Cette différence de concentration permet de faire varier l'espacement entre les extrémités de chaque PEG en surface (cf. Figure 72).²⁴³

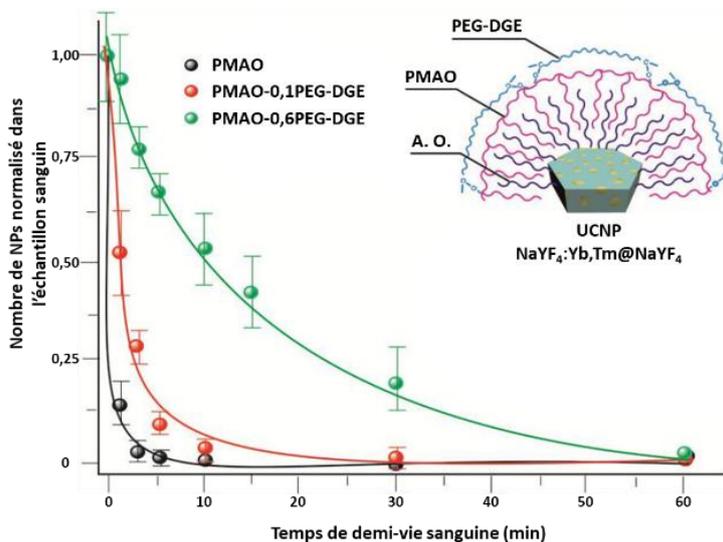


Figure 72 : nombre d'UCNPs normalisé dans le prélèvement sanguin des souris après injection i.v. en fonction du temps²⁴³

Les dosages sanguins, réalisés par fluorescence chez des souris BALB/c après injection i.v. des UCNPs (75 nm, 150 μL à 1 g/L dans le PBS), permettent de conclure que le temps de

²⁴³ Generalova, A. N.; Chichkov, B. N.; Khaydukov, E. V. Multicomponent nanocrystals with anti-Stokes luminescence as contrast agents for modern imaging techniques. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2017**, 245:1-19.

circulation des UCNPs est d'autant plus grand que la quantité de PEGs en surface, polymères non-immunogènes, est élevée.

3.6. Toxicité des UCNPs

Nous ne pouvons clore ce chapitre sans évoquer les problèmes de toxicité, fréquemment cités lorsque l'on traite de l'utilisation des NPs à des fins médicales. Par soucis de simplification, seule la toxicité des UCNPs sera ici abordée.

Si l'on se réfère à une revue récente portant sur plus de 200 publications,¹⁴⁴ les UCNPs présentent *in vitro* une faible cytotoxicité, avec une survie cellulaire presque toujours supérieure à 85% jusqu'à 72 heures. Toutefois, ces données demeurent limitées : i) par la variété des UCNPs étudiées, en termes de composition (fluorure d'yttrium, fluorure de lanthane, oxyde de gadolinium etc.), de taille (8 à 100 nm) ou d'hydrophilisation, mais aussi ii) par les lignées cellulaires testées (HeLa, cellules hépatiques, ostéosarcomes etc.).

Concernant la toxicité *in vivo*, nous pouvons citer à titre d'exemple les travaux réalisés par l'équipe de Xiong, L. *et al.* portant sur l'administration à des souris Kunming saines d'UCNPs@PAA (11,5 nm) de composition NaYF₄:Yb,Tm.²⁴⁴ Une demi-heure après injection des UCNPs (15 mg/kg), un signal intense de fluorescence a été détecté dans le foie et la rate, et dans une moindre mesure dans les poumons et les reins. La présence des UCNPs dans le foie et la rate a pu être visualisée par imagerie d'UC jusqu'à 21 jours post-injection (p.i.), après quoi seule une fixation intestinale était visible par cet examen. Cette étude a été poussée jusqu'à 4 mois p.i., temps pour lequel aucun phénomène d'UC n'a pu être retrouvé au sein des organes prélevés. Également, aucune différence comportementale et histologique (cœur, foie, poumons, sang), à l'exception d'une légère hyperplasie de la rate, n'a été observée chez les souris traitées vs témoins. Ces résultats indiquent une élimination principalement hépatobiliaire de ces UCNPs sur modèle murin, associée à une faible toxicité.

Une autre étude réalisée sur des UCNPs de même composition mais de diamètre supérieur (NaYF₄:Yb,Tm, 30 nm, 20 mg/kg) a montré chez des souris nude des résultats de distribution similaires.²⁴⁵ Lors de ces travaux, deux méthodes d'hydrophilisation (PAA, PEG) ont également été étudiées avec un net avantage en termes d'augmentation de la demi-vie plasmatique pour les NPs recouvertes de PEGs. Enfin des analyses histologique et sanguine (éléments figurés, enzymes hépatiques – ASAT, ALAT, PAL – urée) n'ont pas permis de mettre en évidence une différence significative entre groupes contrôle et traité.

Les organes des souris ont, pour les deux études, été digérés puis analysés par spectrométrie d'émission optique à plasma à couplage inductif (ICP-OES). Si pour les UCNPs@PAA de 11,5 nm, l'yttrium n'est plus détectable après 115 jours dans tous les organes

²⁴⁴ Xiong, L.; Yang, T.; Yang, Y.; Xu, C.; Li, F. Long-term *in vivo* biodistribution imaging and toxicity of polyacrylic acid-coated upconversion nanophosphors. *Biomaterials* **2010**, 31(27):7078-7085.

²⁴⁵ Cheng, L.; Yang, K.; Shao, M.; Lu, X.; Liu, Z. *In vivo* pharmacokinetics, long-term biodistribution and toxicology study of functionalized upconversion nanoparticles in mice. *Nanomedicine (Lond)*. **2011**, 6(8):1327-1340.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 3. Les nanoparticules à conversion ascendante

analysés,²⁴⁴ des proportions importantes d'yttrium pour les UCNPs de 30 nm ont été retrouvées (UCNPs@PAA et UCNPs@PEG) après 3 mois dans le foie et la rate (>30% et 200% DI/g respectivement) malgré l'absence de fluorescence par UC.²⁴⁵ Ces résultats peuvent être expliqués par la différence de taille des UCNPs entre les deux études.

Dans le cadre d'une application en cancérologie, la faible toxicité aiguë des UCNPs serait donc en faveur de leur utilisation. Néanmoins, la toxicité à long terme est peu documentée et mériterait, compte tenu des données précédemment évoquées, d'être approfondie. Enfin, il est utile de rappeler que chaque type d'UCNPs ainsi que leurs métabolites auront un profil pharmacocinétique unique dans l'organisme. La toxicité associée ne peut donc être raisonnablement appréhendée qu'au cas par cas et non sur la base d'*a priori* ou en généralisant à une famille les propriétés d'un de ses membres.

3.7. Exemples d'applications des UCNPs pour l'imagerie *in vivo*

Les avantages ainsi décrits, découlant entre autres de l'utilisation du NIR (en termes d'irradiation continue et de ratio signal/bruit élevé), d'une fonctionnalisation aisée et d'une toxicité *a priori* faible chez l'animal, font des UCNPs des outils prometteurs pour le développement de sondes dédiées à l'imagerie per-opératoire (imagerie optique). Cette utilisation peut être étendue à des applications multimodales associant l'imagerie de fluorescence à des méthodes d'imagerie anatomique ou fonctionnelle complémentaires (TDM, IRM, TEMP, TEP).^{179,180b}

Les premières UCNPs utilisées pour une application d'imagerie de fluorescence *in vivo* étaient de composition $Y_2O_3:Yb/Er$ (154 ± 40 nm). Celles-ci, après excitation à 980 nm, émettent principalement dans le rouge autour de 660 nm. Cette étude a permis de faire la preuve de concept qu'une détection *in vivo* des NPs par UC chez un ver nématode (*C. elegans*) pouvait être réalisée sans induire d'effets secondaires notables, que ce soit en raison de la puissance du laser utilisée ou de la toxicité éventuelle des UCNPs. Toutefois, et comme évoqué précédemment, cette longueur d'onde de 660 nm n'est pas optimale pour une application chez l'Homme.

En continuité de ces travaux, des UCNPs de composition $NaYF_4:Yb,Tm$ (200 μ L, 2 mg/mL, 20 nm) permettant cette fois-ci des conversions NIR-NIR (980 nm – 800 nm) ont été administrées chez des souris BALB/c.²⁴⁶ Les images *in vivo* et *ex vivo* obtenues 2 heures p.i. après excitation à 975 nm, démontrent que les UCNPs $NaYF_4:Yb,Tm$ peuvent être aisément détectées même lorsqu'elles se situent dans les tissus profonds (cf. Figure 73).

²⁴⁶ Nyk, M.; Kumar, R.; Ohulchanskyy, T. Y.; Bergey, E. J.; Prasad, P. N. High contrast *in vitro* and *in vivo* photoluminescence bioimaging using near infrared to near infrared up-conversion in Tm^{3+} and Yb^{3+} doped fluoride nanophosphors. *Nano Lett.* **2008**, 8(11):3834-3838.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 3. Les nanoparticules à conversion ascendante

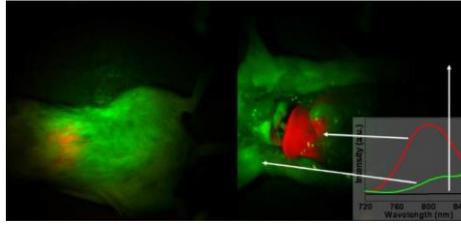


Figure 73 : imagerie de fluorescence corps entier d'une souris BALB/c, 2 heures après injection i.v. d'UCNPs sous excitation à 975 nm, in vivo (gauche) ou ex vivo (droite). La couleur rouge correspond à la luminescence des UCNPs (présentes essentiellement dans le foie et la rate), le vert et le noir correspondent au bruit de fond (spectre de luminescence dans l'encart)²⁴⁶

Afin de cibler spécifiquement des pathologies cancéreuses, des UCNPs de type NaYF₄:Yb,Er et NaYF₄:Yb,Er,Tm ont été fonctionnalisées à leur surface par divers ligands de reconnaissance parmi lesquels : l'acide folique²⁴⁷ (dont les récepteurs sont surexprimés dans divers cancers, tels que le FR α dans les cancers ovariens²⁴⁸ ou le FR β dans certaines leucémies²⁴⁹ ; FR : récepteur au folate) ou le peptide RGD²⁵⁰ (Arginine-Glycine-Aspartate – reconnaissant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ surexprimés dans de nombreux cancers²⁵¹).

À titre d'exemples, sont donnés dans la Figure 74 les résultats de deux études portant sur la spécificité du ciblage d'UCNPs vectorisées sur modèles tumoraux murins. Les images d'UC ont été réalisées par irradiation laser ($\lambda_{exc} = 980$ nm, puissance = 80-120 mW/cm²) dirigée vers les zones d'intérêt, à savoir la tumeur et les organes d'élimination à différents temps p.i.

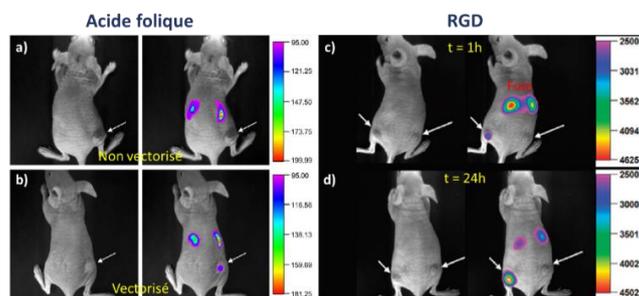


Figure 74 : (a,b) images de phospho-luminescence ($\lambda_{exc} = 980$ nm) 24 h p.i. d'UCNPs vectorisées (bas) ou non (haut) avec de l'acide folique chez des souris porteuses de tumeur HeLa (flèche blanche) ; (c,d) images de phospho-luminescence ($\lambda_{exc} = 980$ nm) d'UCNPs fonctionnalisées avec un peptide RGD 1 h (haut) et 24 h (bas) p.i. chez des souris porteuses de tumeurs U87MG (intégrine $\alpha_v\beta_3^+$) (patte gauche, flèche courte) et MCF-7 (intégrine $\alpha_v\beta_3^-$) (patte droite, flèche longue)¹⁷⁹

À gauche, les images d'UC obtenues chez des souris nude porteuses de tumeur HeLa (FR⁺) 24 heures après injection d'UCNPs allongées (NaYF₄:Yb,Er, 20x20-40 nm, 100 μ g/souris)

²⁴⁷ Xiong, L. Q.; Chen, Z. G.; Yu, M. X.; Li, F. Y.; Liu, C.; Huang, C. H. Synthesis, characterization, and *in vivo* targeted imaging of amine-functionalized rare-earth up-converting nanophosphors. *Biomaterials* **2009**, 30(29):5592-5600.

²⁴⁸ Vergote, I. B.; Marth, C.; Coleman, R. L. Role of the folate receptor in ovarian cancer treatment: evidence, mechanism, and clinical implications. *Cancer Metastasis Rev.* **2015**, 34(1):41-52.

²⁴⁹ Ross, J. F.; Wang, H.; Behm, F. G.; Mathew, P.; Wu, M.; Booth, R.; Ratnam, M. Folate receptor type β is a neutrophilic lineage marker and is differentially expressed in myeloid leukemia. *Cancer* **1999**, 85(2):348-357.

²⁵⁰ Xiong, L.; Chen, Z.; Tian, Q.; Cao, T.; Xu, C.; Li, F. High contract upconversion luminescence targeted imaging *in vivo* using peptide-labeled nanophosphors. *Anal. Chem.* **2009**, 81(21):8687-8694.

²⁵¹ Desgrosellier, J. S.; Cheresch, D. A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer* **2015**, 10(1):9-22.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 3. Les nanoparticules à conversion ascendante

fonctionnalisées ou non avec de l'acide folique (FA). À droite, les images d'UC réalisées *in vivo* 1 heure et 24 heures après injection d'UCNPs sphériques ($\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}$, 14 nm, injection de 50 μg /souris) fonctionnalisées par le peptide RGD chez des souris nude porteuses simultanément de tumeurs U87MG (patte gauche, surexprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$) et MCF-7 (patte droite, exprimant peu l'intégrine $\alpha_v\beta_3$). Ces deux exemples illustrent l'efficacité d'une stratégie de vectorisation active des UCNPs avec des maximums de captation tumorale atteints 24 heures p.i., données qualitatives confirmées *ex vivo* après dosage par ICP-OES de la concentration en yttrium présente au sein des tumeurs (30% DI/g pour les UCNPs@FA, 6% DI/g pour les UCNPs@RGD).

Comme évoqué précédemment, les UCNPs offrent la possibilité, en fonction de leurs compositions (cœur, coquille(s), fonctionnalisation post-hydrophilisation etc.), d'associer plusieurs modalités d'imagerie (optique, magnétique, scintigraphique) pouvant être complémentaires entre elles. Ainsi, l'IRM ou les méthodes scintigraphiques permettent en oncologie de réaliser un bilan d'extension corps entier et atraumatique, tandis que l'imagerie optique, du fait de sa pénétration tissulaire limitée, sera quant à elle réservée à la localisation et à l'excision des tumeurs en conditions per-opératoires.

À titre d'exemple, une étude préclinique associant fluorescence et IRM a été réalisée chez des souris SD porteuses de tumeurs mammaires (Walker-256), après injection intra-tumorale d'UCNPs non vectorisées ($\text{NaYF}_4:\text{Er,Yb,Gd}@\text{NaYF}_4:\text{Tm/Yb}@\text{NaGdF}_4@\text{SiO}_2$; 0,3 mM Gd^{3+} ; $\lambda_{\text{exc}} = 980 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em max}} = 652 \text{ nm}$ – cf. Figure 75).²⁵²

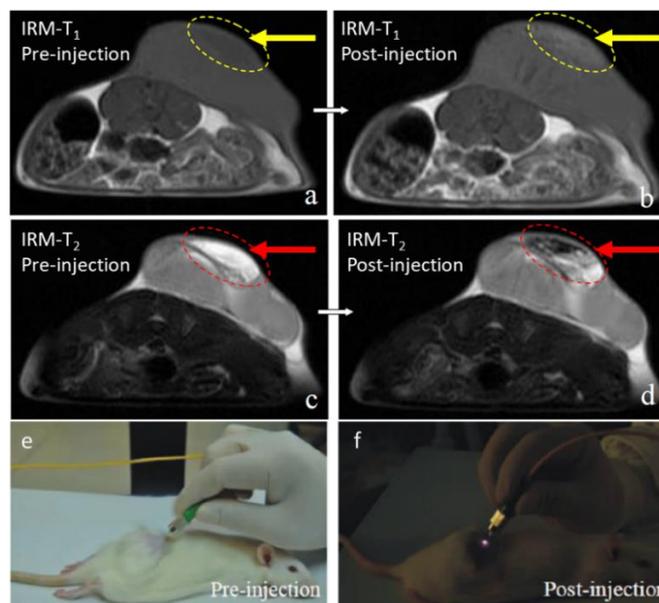


Figure 75 : imagerie bimodale *in vivo* chez une souris SD porteuse de tumeur Walker-256. a) IRM-T1, pré-injection ; b) IRM-T1, post-injection ; c) IRM-T2, pré-injection ; d) IRM-T2, post-injection ; imagerie optique : e) pré-injection ; f) post-injection. Les flèches indiquent le point d'injection des UCNPs²⁵²

²⁵² Chen, F.; Bu, W.; Zhang, S.; Liu, X.; Liu, J.; Xing, H.; Xiao, Q.; Zhou, L.; Peng, W.; Wang, L.; Shi, J. Positive and negative lattice shielding effects co-existing in Gd (III) ion doped bifunctional upconversion nanoprobles. *Adv. Funct. Mater.* **2011**, 21(22):4285-4294.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 3. Les nanoparticules à conversion ascendante

Les différences d'images IRM-T₁ et T₂ pré- et post-injection montrent, pour ces deux modalités, une augmentation du contraste IRM à proximité du site d'injection « zones cerclées en pointillés) attribuable à la présence des UCNPs. Le signal optique émis par les UCNPs dans le rouge est également très intense au niveau de la tumeur implantée en sous-cutanée. Cette étude préliminaire permet d'envisager l'utilisation de ce type d'UCNPs comme sonde pour l'imagerie bimodale IRM/UC.

D'autres approches multimodales ont été décrites associant cette fois ci les imageries optique et scintigraphique (TEMP). À titre d'exemple, une équipe a développé des UCNPs de composition NaLuF₄:Yb,Tm@NaGdF₄, hydrophilisées avec des citrates et radiomarquées au samarium-153 ($t_{1/2} = 1,93$ jours), pouvant être utilisées en imageries optique et TEMP, mais également en TDM et en IRM.²⁵³ Ces UCNPs (21 nm) non vectorisées ont été injectées par voie i.v. chez des souris porteuses de carcinome épidermoïde humain KB afin d'imager la néovascularisation tumorale (cf. Figure 76).

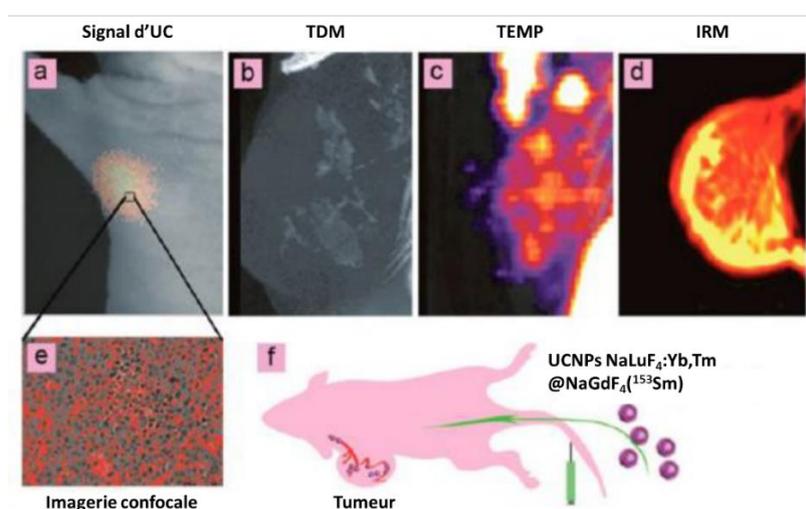


Figure 76 : imagerie tétramodale sur des souris nude porteuses de tumeurs KB, 1 h p.i. (200 µg, 148 MBq). a) Image optique d'upconversion ; b) image TDM ; c) image TEMP ; d) image IRM ; e) image d'upconversion en microscopie confocale ; f) représentation schématique de l'imagerie de l'angiogenèse tumorale après injection i.v. des UCNPs²⁵³

Les images TEMP et TDM réalisées suggèrent une distribution préférentielle des UCNPs au niveau des vaisseaux tumoraux. Cette dernière, quantifiée par TEMP, a pu être évaluée à 1,7% de la dose injectée dans la tumeur à 1 heure après injection. Ces résultats sont toutefois en contradiction avec les images obtenues par IRM, ces dernières montrant un signal intense dans la zone périphérique de la tumeur. Cette différence peut être expliquée par la faible sensibilité de cette technique, le signal IRM pondéré en T₁ des UCNPs étant bien inférieur à celui émis par les tissus sains, comme par exemple les tissus adipeux. L'imagerie d'UC, quant-à-elle, indique une accumulation préférentielle des NPs au sein de la tumeur. Toutefois, la faible résolution spatiale de cette approche ne permet pas d'accéder à leur distribution dans les différents compartiments tumoraux.

²⁵³ Sun, Y.; Zhu, X.; Peng, J.; Li, F. Core-shell lanthanide upconversion nanophosphors as four-modal probes for tumor angiogenesis imaging. *ACS Nano* **2013**, 7(12):11290-11300.

OBJECTIFS

OBJECTIFS

Comme exposé dans le chapitre 1.1, la prostatectomie totale est un acte chirurgical lourd non dénué de comorbidités (dysfonctions urinaires ou érectiles), et conduit à un nombre non négligeable de marges positives (pour rappel entre 5 et 65% en fonction du stade du CaP). Ainsi, il paraît important, sinon nécessaire, de proposer de nouvelles stratégies permettant d'améliorer cet acte chirurgical qui demeure essentiel.

Le but de ce projet de thèse a été de développer des UCNPs radiomarquées capables de cibler spécifiquement le PSMA et susceptibles d'être utilisées comme sonde NIR et radioactive afin de combiner en conditions per-opératoires l'imagerie de fluorescence et la détection radioactive. Les UCNPs choisies dans ce cadre sont des NPs composées d'une matrice de NaYF₄ co-dopées par des ions de RE (i.e. ytterbium et thulium). Ces dernières ont été sélectionnées en raison de leurs propriétés optiques lorsqu'elles sont associées (conversions NIR-NIR, $\lambda_{exc} = 980 \text{ nm} - \lambda_{em} = 800 \text{ nm}$) et introduites à hauteur respective de 20% et 2% sur la base de recherches bibliographiques. De plus, ces UCNPs ont été enrobées par une coquille non dopée de NaYF₄ afin d'augmenter leur émission de fluorescence.

Résumé des travaux antérieurs

La synthèse de ces UCNPs, développée lors de travaux antérieurs réalisés au sein de l'équipe MI de l'ICCF (thèse de Nadège Francolon), a permis d'aboutir à des NPs de forme cristalline hexagonale afin d'améliorer l'efficacité du processus d'UC.²⁵⁴ La méthode de synthèse retenue a été la décomposition thermique, ou thermolyse, qui présente l'avantage de produire des UCNPs de haute cristallinité et de tailles contrôlées.

Les UCNPs ainsi synthétisées avaient un diamètre de 20 à 25 nm allant jusqu'à 22 x 32 nm après une deuxième étape d'enrobage par une coquille non dopée. Les UCNPs cœurs étaient d'aspect quasi-sphérique tandis que les cœurs/coquilles présentaient une forme oblongue (cf. Figure 77). Cette évolution de la morphologie a été attribuée au désaccord de maille entre le cœur et la coquille, conduisant à la croissance de la coquille dans une direction cristalline privilégiée.^{254,255}

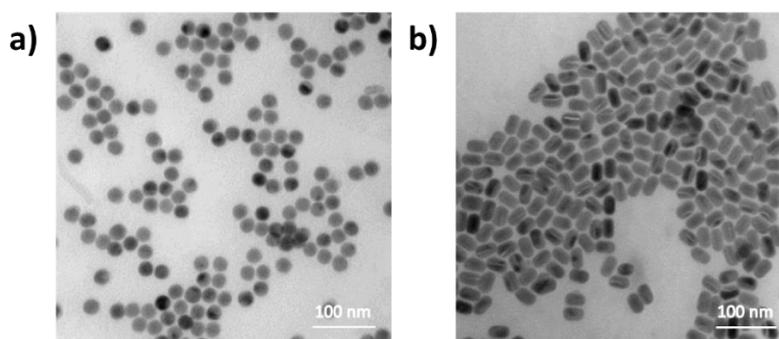


Figure 77 : exemples d'images MET des UCNPs a) cœur et b) cœur/coquille

²⁵⁴ Francolon, N. Elaboration et caractérisation de nanoparticules luminescentes par upconversion pour l'imagerie médicale. Thèse de doctorat de l'Université Blaise Pascal, décembre **2015**.

²⁵⁵ Peng, H. Y.; Ding, B. B.; Ma, Y. C.; Sun, S. Q.; Tao, W.; Guo, Y. C.; Guo, H. C.; Yang, X. Z.; Qian, H. Q. Sequential growth of sandwiched NaYF₄:Yb/Er@NaYF₄:Yb@NaNdF₄:Yb core-shell-shell nanoparticles for photodynamic therapy. *Appl. Surf. Sci.* **2015**, 357(Part B):2408-2414.

OBJECTIFS

La présence d'une coquille de NaYF_4 non-dopée autour des UCNPs a permis d'améliorer leurs propriétés optiques par diminution des phénomènes d'extinction de fluorescence de surface. Ainsi, une augmentation de l'intensité de fluorescence à 800 nm d'un facteur 8 comparativement aux UCNPs cœur a été observée.

Ces UCNPs ont ensuite été hydrophilisées via une méthode d'échange de ligands avec deux types de molécules hydrophiles : un polyéthylène glycol (PEG) phosphate ($750 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) et un dendron bis-phosphonate. Ces deux dérivés échangent l'AO présent en surface des UCNPs grâce aux groupements phosphorés ayant une affinité plus forte pour les RE que la fonction acide carboxylique des AO. Les UCNPs@PEG présentaient une faible stabilité dans l'eau (<1 h). Les UCNPs@dendron, quant à elles, se sont révélées plus stables et ont pu être analysées par DLS avec un diamètre hydrodynamique (D_h) moyen de 24 nm.

La cytotoxicité des UCNPs hydrophilisées avec les deux types de ligands a alors été étudiée sur une lignée cellulaire de cancer prostatique (LNCaP). Quelles que soient les concentrations étudiées (50 à 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), les UCNPs@PEG et les UCNPs@dendron ont entraîné un taux négligeable de mort cellulaire comparativement aux cellules témoins. De plus, ces UCNPs présentaient en microscopie hyperspectrale une très faible capacité d'internalisation sur lignée LNCaP, sans doute en raison d'une agglomération des NPs dans le milieu extracellulaire (cf. Figure 78).

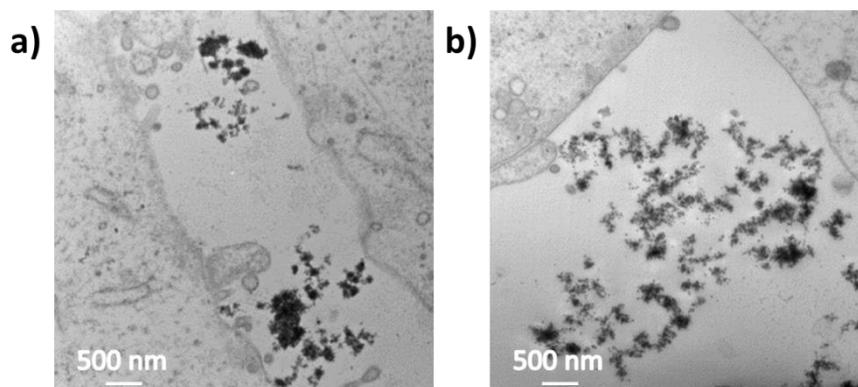


Figure 78 : images MET de coupes cellulaires LNCaP après 8 h d'exposition aux a) UCNPs@PEG et b) UCNPs@dendron

Dans le but d'étudier *in vivo* les profils de biodistribution des UCNPs par imagerie de fluorescence par UC, l'appareillage disponible au laboratoire IMoST (i.e. IVIS Spectrum, PerkinElmer) a dû être modifié avec l'autorisation du constructeur. Ainsi, une diode laser à 980 nm a été installée dans le système d'imagerie *in vivo*, associée à un extenseur du faisceau afin d'élargir la surface d'excitation (cf. Figure 79). De plus, un filtre passe bande à 975 nm a été associé à la diode laser et un filtre coupe-bande (ou notch, 960 – 1000 nm) a été placé devant la caméra afin de diminuer le bruit de fond engendré par la source d'excitation. Dans ces conditions, la zone d'excitation est restreinte à un diamètre n'excédant pas 16 mm et ne permet donc pas de réaliser des imageries corps entier chez la souris. De plus, le laser ne pouvant pas être disposé de façon verticale, la zone imagée ne peut pas être irradiée de façon parfaitement homogène, excluant de fait la possibilité de réaliser des analyses quantitatives.

OBJECTIFS

Enfin, la puissance du laser d'excitation à 980 nm a dû être maintenue inférieure à 100 mW/cm² afin de limiter une éventuelle élévation de la température des tissus et organes irradiés.

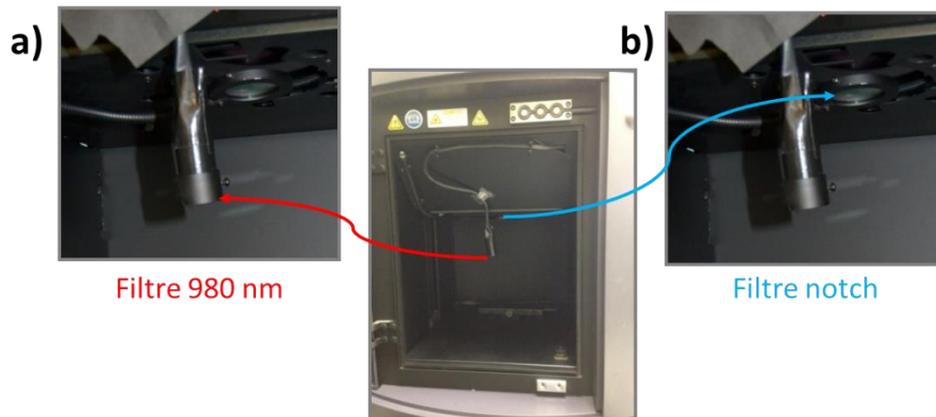


Figure 79 : photos du système IVIS après ajout a) d'une diode laser à 980 nm associée à un filtre 975 nm et b) d'un filtre notch centré à 980 nm

Des études de biodistribution ont été réalisées pour les UCNPs@dendron, présentant la meilleure stabilité dans l'eau, chez des souris saines et des souris porteuses de tumeurs de mélanome. Dans un premier temps, l'étude sur souris saines a permis de confirmer que les UCNPs dendronisées pouvaient être visualisées *in vivo* grâce au système mis en place, après injection sous cutanée ou intramusculaire de faibles quantités de NPs (20 et 50 µg respectivement, puissance laser = 70 mW/cm², cf. Figure 80).

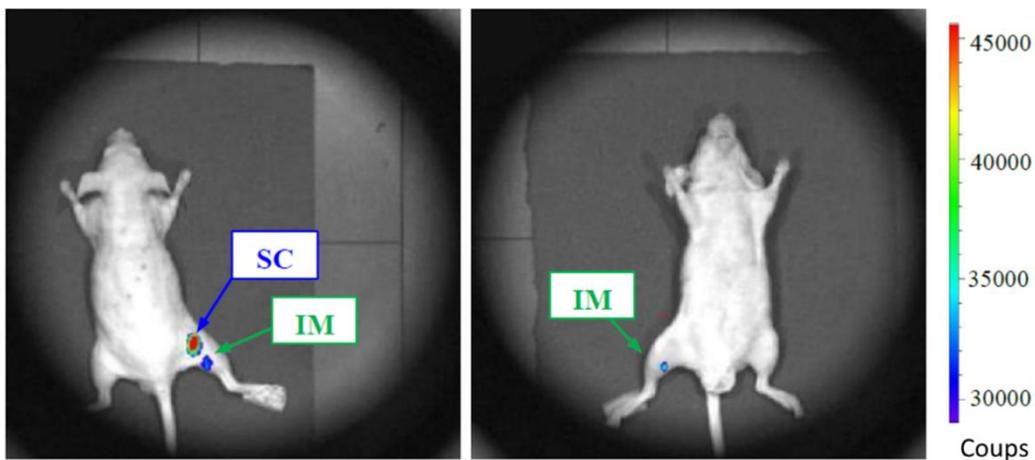


Figure 80 : images de fluorescence *in vivo* chez une souris nude après injection de 20 µg et 50 µg d'UCNPs par voie sous cutanée (SC) et intramusculaire (IM) respectivement (puissance laser = 70 mW/cm²)

Enfin, les UCNPs administrées ont présenté un profil d'élimination principalement hépatique et splénique, comme reporté dans la littérature pour ce type de particules. Une fixation pulmonaire a également été mise en évidence, probablement consécutive à l'agrégation des NPs après injection. En outre, aucune toxicité (augmentation du poids des souris normal, pas d'effets indésirables macroscopique de type douleur, troubles

OBJECTIFS

comportementaux, décès) après injection intraveineuse des UCNPs@dendron n'a pu être mise en évidence lors de cette étude (suivi sur 7 jours).

Objectifs des travaux doctoraux

Les travaux de recherche réalisés lors de cette précédente thèse nous ont donc conduit à poursuivre plus avant l'étude des UCNPs cœur/coquille NaYF₄:Yb_{0,20},Tm_{0,02}@NaYF₄ (abrégées UCNPs par la suite) comme support de sondes multimodales pour l'imagerie per-opératoire des cancers de la prostate. En effet, ces dernières possèdent des propriétés optiques en accord avec une utilisation biologique (λ_{exc} et λ_{em} dans la fenêtre de faible absorption des tissus biologiques). Elles sont également facilement détectables *in vivo* à des concentrations et excitations laser faibles (< 100 mW/cm²) et semblent exemptes de toxicité.

Néanmoins, la nature du ligand d'hydrophilisation semble être un paramètre critique, non seulement pour assurer la solubilité mais également la stabilité des UCNPs en milieux aqueux. Par ailleurs, ces ligands doivent être aisément fonctionnalisables en vue d'un radiomarquage et d'une vectorisation active vers les cellules tumorales prostatiques.

Dans ce but, nos travaux de recherche ont consisté en : (1) la synthèse des UCNPs cœur/coquille précédemment développées, (2) leur hydrophilisation par divers ligands pégylés et l'étude de leur stabilité dans divers milieux aqueux, (3) leur fonctionnalisation par des vecteurs spécifiques du PSMA et/ou des sondes radiomarquées, (4) leurs études *in vitro* sur lignées cellulaires et (5) leurs études *in vivo* chez l'animal (cf. Figure 81).

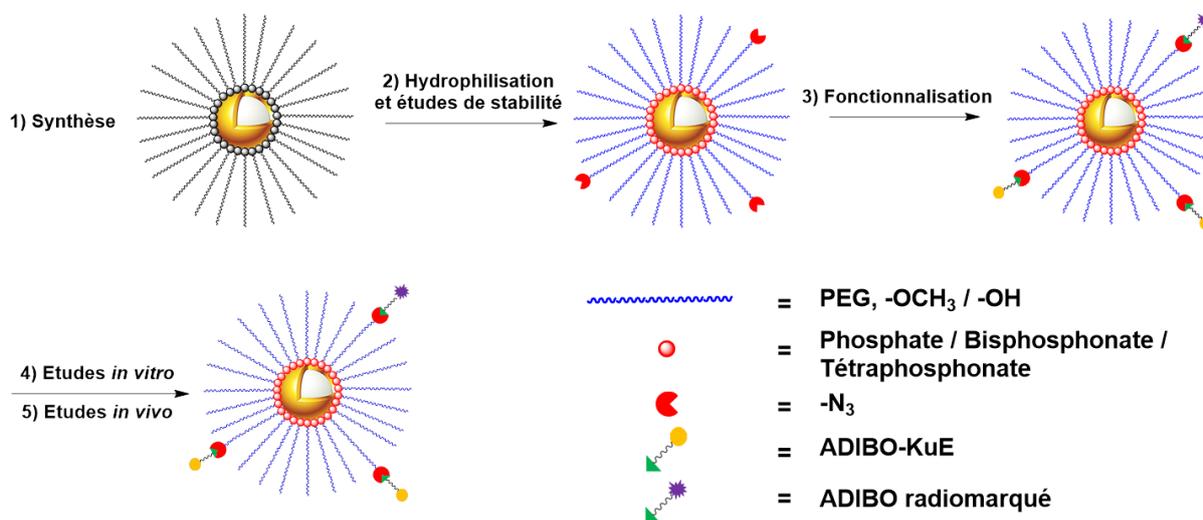


Figure 81 : objectif de développement des UCNPs étudiées pour ce projet de thèse

Comme évoqué dans le Chapitre 3, l'hydrophilisation des UCNPs peut être réalisée via l'utilisation de ligands bifonctionnels de type PEGs. Ces derniers sont en effet connus pour leur faible toxicité, leur synthèse aisée et leur utilisation pour l'hydrophilisation des NPs est

OBJECTIFS

également très référencée.^{256,257} Toutefois, la longueur du polymère ainsi que la fonction d'ancrage en surface des NPs semblent être des paramètres déterminants pour assurer une stabilité colloïdale optimale en milieux biologiques.^{258,259}

Ainsi, plusieurs types de PEGs ont été envisagés variant par leur longueur (21 ou 44 unités oligomériques, soit 1000 ou 2000 g.mol⁻¹), leur fonction d'accroche aux UCNPs (i.e. phosphate, bis- et tétra-phosphonate) et leur extrémité hydrophile présentée à l'extérieur des UCNPs après échange (méthoxyle et hydroxyle). Afin de choisir le ligand apportant la meilleure stabilité en milieux biologiques, le diamètre des UCNPs ainsi hydrophilisées sera évalué par une analyse de diffusion dynamique de la lumière (DLS) en fonction du temps et de différents milieux aqueux. Après avoir déterminé le PEG présentant les meilleures caractéristiques, un dérivé de celui-ci possédant un groupement azoture à son extrémité sera synthétisé.

La fonction azoture permettra d'introduire en surface des UCNPs un ligand de reconnaissance du PSMA ainsi qu'un groupement prosthétique radiomarqué. Ce couplage sera réalisé par une réaction de type SPAAC (strain promoted alkyne azide cycloaddition), bioorthogonale, qui présente les avantages d'être non catalysée, spécifique, rapide, irréversible et biocompatible (i.e. compatible en milieu aqueux).²⁶⁰ Elle nécessitera d'associer un alcyne contraint, dans le cadre de notre projet l'azadibenzocyclooctyne (ADIBO), soit à un ligand du PSMA (de type lysine-urée-glutamate – KuE) soit à une molécule radiomarquée à l'iode-125. Le ligand du PSMA de type KuE a été choisi car ses dérivés sont très étudiés et à l'origine du développement de nouveaux radiopharmaceutiques utilisables pour le diagnostic ou le traitement des CaP.²⁶¹ De plus, la constante d'inhibition de ces dérivés vis-à-vis du PSMA est faible (< 10 nM).²⁶² L'iode-125, émetteur γ (E = 35,5 keV) facilement détectable *in vitro* et *in vivo*, a été sélectionné pour réaliser une première preuve de concept préclinique car il présente de nombreux avantages en termes de coût et d'accessibilité, de période ($t_{1/2}$ = 59,4 j) et de débit de dose.

Plusieurs conjugués ADIBO-KuE seront synthétisés et évalués *in vitro* sur leur capacité à cibler spécifiquement le PSMA. En cas de succès, ces derniers seront conjugués aux UCNPs par

²⁵⁶ Jokerst, J. V.; Lobovkina, T.; Zare, R. N.; Gambhir, S. S. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine (Lond)*. **2011**, 6(4):715-728.

²⁵⁷ Boyer, J. C.; Manseau, M. P.; Murray, J. I.; van Veggel, F. C. J. M. Surface modification of upconverting NaYF₄ nanoparticles with PEG-phosphate ligands for NIR (800 nm) biolabeling within the biological window. *Langmuir* **2010**, 26(2):1157-1164.

²⁵⁸ Cao, P.; Tong, L.; Hou, Y.; sedl, G.; Guerin, G.; Winnik, M. A.; Nitz, M. Improving lanthanide nanocrystal colloidal stability in competitive aqueous buffer solutions using multivalent PEG-phosphonate ligands. *Langmuir* **2012**, 28(35):12861-12870.

²⁵⁹ Sedlmeier, A.; Gorris, H. H. Surface modification and characterization of photon-upconverting nanoparticles for bioanalytical applications. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44(6):1526-1560.

²⁶⁰ Yoon, H. Y.; Koo, H.; Kim, K.; Kwon, I. C. Molecular imaging based on metabolic glycoengineering and bioorthogonal click chemistry. *Biomaterials* **2017**, 132:38-36.

²⁶¹ Wüstemann, T.; Haberkorn, U.; Babich, J.; Mier, W. Targeting prostate cancer: prostate-specific membrane antigen based diagnosis and therapy. *Med. Res. Rev.* **2019**, 39(1):40-69.

²⁶² Zhou, J.; Neale, J. H.; Pomper, M. G.; Kozikowski, A. P. NAAG peptidase inhibitors and their potential for diagnosis and therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, 4(12):1015-1026.

OBJECTIFS

chimie SPAAC et en modulant leur densité de surface. Ces variations permettront d'étudier *in vitro* l'impact du nombre de ligands de reconnaissance du PSMA présents en surface des UCNPs sur la reconnaissance NP/récepteur. La cytotoxicité des UCNPs vectorisées sera évaluée sur des lignées cellulaires exprimant ou non le PSMA. Si les UCNPs fonctionnalisées s'avèrent non toxiques, leur affinité pour les récepteurs du PSMA sera étudiée sur lignées PSMA+/- par inhibition compétitive, cytométrie en flux (CMF) et captation cellulaire.

Enfin, en cas de résultats positifs, une étude de biodistribution sur des souris porteuses de xénogreffes de tumeurs humaines de prostate sera réalisée sur les UCNPs radiomarquées et vectorisées ou non par le conjugué ADIBO-KuE présentant les meilleurs résultats *in vitro*. Ceci permettra d'évaluer la pharmacocinétique des UCNPs tant *in vivo* par imageries SPECT-CT et optique qu'*ex vivo* après prélèvements et comptage de la radioactivité dans les tissus et organes prélevés, et ainsi compléter pleinement la preuve de concept de cette approche d'imagerie bimodale pour les opérations de prostatectomie totale.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 1. Synthèses et caractérisations de nanoparticules de formulation $\text{NaYF}_4:\text{Yb}_{0,20},\text{Tm}_{0,02}@\text{NaYF}_4$ pour l'upconversion

1.1. Première approche de synthèse des UCNPs en deux étapes

Comme évoqué dans la partie objectifs, des NPs de fluorures mixtes d'yttrium et de sodium dopées avec de l'ytterbium et du thulium dans des proportions molaires définies (0,20 et 0,02 respectivement) ont été employées comme UCNPs pour ce projet. Les nanocristaux de NaYF_4 ont été élaborés selon un procédé de synthèse par décomposition thermique (voie ascendante ou bottom-up) dans un mélange de solvants constitué d'AO (surfactant coordonnant) et d'ODE (solvant apolaire non-coordinant à haut point d'ébullition, $T_{\text{eb}} = 315 \text{ }^\circ\text{C}$).

1.1.1. Synthèse des cœurs

L'obtention des cœurs fluorescents d'UCNPs fait suite aux travaux doctoraux réalisés par Nadège Francolon au sein de l'équipe MI de l'ICCF.²⁵⁴ Les précurseurs de RE sont des chlorures, et les sources de sodium et de fluor sont respectivement la soude et le fluorure d'ammonium. Le montage ainsi que la méthode de synthèse ont été repris des travaux antérieurs (cf. Figure 82).



Figure 82 : premier montage de synthèse des UCNPs

La synthèse se déroule en deux étapes successives : la solubilisation des précurseurs puis la croissance des UCNPs à plus haute température. Dans un premier temps, les chlorures de RE YCl_3 (0,78 mmol, 0,78 éq.), YbCl_3 (0,20 mmol, 0,20 éq.) et TmCl_3 (0,02 mmol, 0,02 éq.) sont ajoutés à un mélange d'AO (6 mL) et d'ODE (15 mL). Le milieu réactionnel est chauffé à $160 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 30 minutes afin de solubiliser les RE en formant les oléates correspondants ($\text{RE}(\text{AO})_3$). Après retour à température ambiante, une solution de soude (2,5 mmol, 2,5 éq.) et de fluorure d'ammonium (4 mmol, 4 éq.) dans le méthanol (10 mL) est lentement ajoutée à la réaction. La solution est alors agitée à température ambiante pendant 15 minutes puis est

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 1. Synthèses et caractérisations des UCNPs

portée à 145 °C à l'air ambiant jusqu'à évaporation totale du méthanol. Enfin, le milieu réactionnel est porté à 300 °C sous flux d'argon pendant 1 heure.

Après retour à température ambiante, les NPs sont précipitées par ajout d'éthanol (20 mL), puis le mélange est transféré dans un tube en téflon avant d'être centrifugé (10 978 g, 22 °C, 4 min). Après élimination du surnageant, le culot est lavé par 20 mL d'un mélange cyclohexane/éthanol (1/1, v/v), centrifugé, et cette étape est répétée une fois supplémentaire. Le culot est enfin récupéré puis séché à l'étuve à 80 °C afin d'évaporer les traces résiduelles de solvants.

Cette procédure conduit à une faible reproductibilité des synthèses avec notamment des lots très inégaux en termes de taille (de 20 à 60 nm), de forme (oblongue ou hexagonale) ou encore de structure cristalline (cubique ou hexagonale). Ainsi sur 56 synthèses réalisées, environ 45 lots se sont révélés inhomogènes (cf. Figure 83).

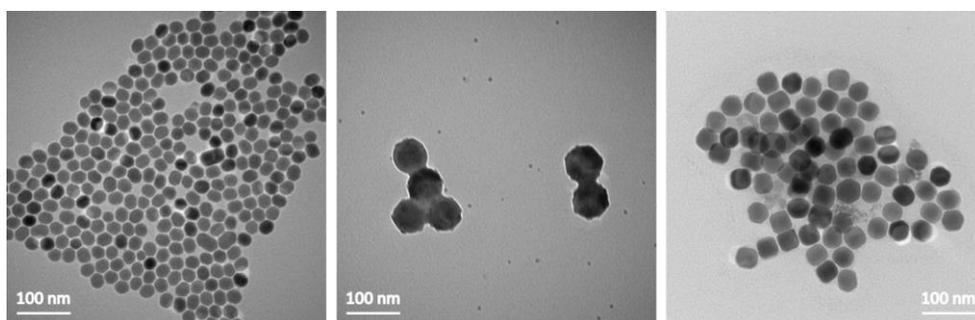


Figure 83 : images MET de trois lots d'UCNPs cœur après synthèse via le premier protocole

Les lots d'UCNPs validés en MET ont également été analysés par diffraction des rayons X (DRX). Bien que la plupart des échantillons étaient conformes en termes de cristallisation de NaYF₄ en phase hexagonale, certains diffractogrammes des rayons X sur poudre indiquaient clairement la présence d'une impureté minoritaire. Cette dernière a pu être identifiée comme étant du chlorure de sodium (cf. Figure 84a) dont la présence a été imputée à une mauvaise purification des lots synthétisés.

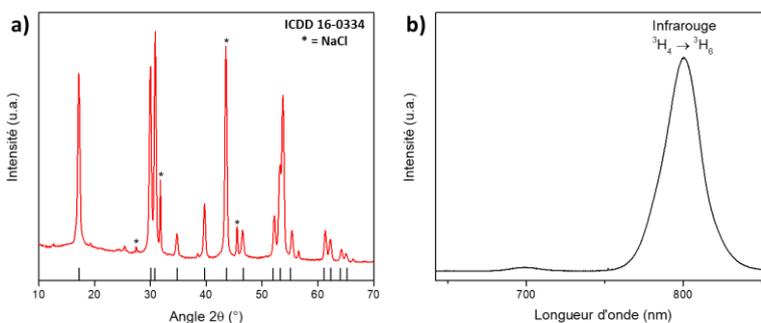


Figure 84 : a) diffractogramme RX (poudre) et b) spectre de fluorescence (1 mg/mL – cyclohexane – $\lambda_{exc} = 980$ nm) d'UCNPs de formule NaYF₄:Yb,Tm

Par ailleurs, le spectre d'émission a été enregistré sous excitation à 980 nm afin de confirmer le mécanisme de fluorescence par UC et donc la présence d'une transition relative

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 1. Synthèses et caractérisations des UCNPs

aux ions Tm^{3+} à 800 nm avant de procéder à la croissance de la coquille. Ces spectres indiquent l'existence d'un mécanisme d'UC efficace pour les différents lots de cœurs synthétisés (cf. Figure 84b).

Malgré les difficultés liées à la reproductibilité des synthèses, les lots conformes après analyse ont été engagés dans l'étape suivante, à savoir la synthèse d'une coquille composée de $NaYF_4$ sensée améliorer l'efficacité de fluorescence des UCNPs par diminution du quenching de surface.

1.1.2. Synthèse des UCNPs cœur/coquille

Le protocole de synthèse des coquilles est comparable à celui des cœurs et utilise le même montage.

Comme précédemment, le YCl_3 (0,25 mmol, 1 éq.) est solubilisé dans un mélange d'AO et d'ODE (6 et 15 mL respectivement) à 145 °C pendant 1 heure. Après retour à 80 °C sous flux d'argon, une solution de 90 mg d'UCNPs cœur dans le cyclohexane (20 mL) est ajoutée au milieu réactionnel. Le tout est chauffé à 120 °C jusqu'à évaporation totale du cyclohexane. Après retour à température ambiante est ajoutée lentement une solution de soude (625 μ mol, 2,5 éq.) et de fluorure d'ammonium (1 mmol, 4 éq.) dans le méthanol (10 mL), puis le milieu réactionnel est agité pendant 15 minutes et chauffé à 145 °C jusqu'à évaporation totale du méthanol. La solution est alors placée sous flux d'argon puis est chauffée à 310 °C pendant 1 heure 30 minutes. Après retour à température ambiante, les UCNPs cœur/coquille sont alors précipitées puis purifiées de la même manière que pour les cœurs (centrifugation, lavages par un mélange cyclohexane/éthanol puis séchage à l'étuve).

De façon similaire à la synthèse des cœurs, cette approche conduit à une faible reproductibilité pour l'obtention de lots homogènes. Les analyses de diffraction de rayons X et de photoluminescence ont toutefois fait ressortir des résultats encourageants, à savoir une matrice cristalline hexagonale et la conservation des propriétés d'UC après synthèse de la coquille.

Les images de microscopie électronique mettent en évidence une croissance des UCNPs dans une direction préférentielle, aboutissant à des particules ovoïdes, résultats également observés lors des travaux antérieurs à cette thèse (cf. Figure 85).

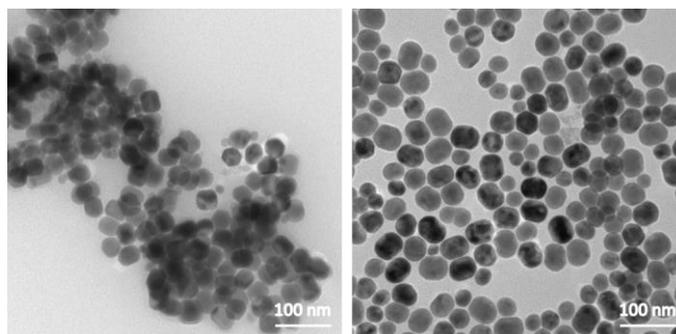


Figure 85 : images MET des UCNPs cœur/coquille obtenues selon la première approche de synthèse

Néanmoins, l'analyse de ces mêmes images rend compte d'une forte inhomogénéité en termes de taille et de forme associée selon les cas à une agglomération des UCNPs produites. Ainsi, à travers cette première approche de synthèse, aucun lot cœur/coquille correct n'a pu être obtenu malgré 11 essais de production.

Tenant compte de ces éléments, et sachant que l'enchaînement des deux étapes de synthèse nécessitait environ 12 à 13 heures de temps, la méthodologie a été modifiée afin d'aboutir à des synthèses plus courtes, reproductibles et fournissant des lots d'UCNPs homogènes et de bonne qualité.

1.2. Deuxième approche de synthèse

1.2.1. La synthèse « one-pot »

Chaque étape de synthèse a donc été réévaluée grâce à une recherche bibliographique soulevant un premier problème majeur : les synthèses décrites pour accéder à ce type d'UCNPs bien que similaires mettent en jeu des modes opératoires expérimentaux très divers. Par exemple, certaines équipes utilisent des chlorures de RE hydratés, la solubilisation des RE peut être réalisée à l'air ambiant ou sous vide, les ratios AO/ODE peuvent varier (2/5, 1/1, v/v), de même que les cinétiques de montées en température (10 °C, 13 °C ou 20 °C/min).^{258,263,264} Cette recherche s'est heurtée à une autre limite : le manque d'informations pratiques et détaillées au sein des protocoles décrits.

Fort heureusement, nous avons pu nous appuyer sur les résultats de deux articles récents publiés dans la revue « Nature Protocols » décrivant de façon très claire les différentes étapes de synthèse d'UCNPs cœur/coquille similaires aux nôtres ainsi que les précautions expérimentales à prendre pour limiter les problèmes de reproductibilité rencontrés.^{203,265}

Un premier problème a pu rapidement être identifié, à savoir notre montage de synthèse. Celui-ci ne permettait pas d'avoir un contrôle suffisamment précis de la température ni de l'humidité contenue dans le milieu réactionnel, deux facteurs pouvant expliquer la variabilité entre les synthèses. En effet, la présence d'humidité dans le milieu réactionnel a un effet négatif sur le contrôle de la croissance cristalline des UCNPs, et la température doit être contrôlée précisément afin d'obtenir la phase cristalline hexagonale désirée et une taille d'UCNPs reproductible d'une synthèse à l'autre. Le montage réactionnel a donc été modifié comme illustré Figure 86 en retirant l'agitation mécanique. En effet, cet équipement ne permettait pas de rendre hermétique le réacteur, ce qui imposait la mise en place d'un flux d'argon continu qui conduisait à une évaporation partielle ou totale des solvants à 300 °C.

²⁶³ Li, Z.; Zhang, Y. An efficient and user-friendly method for the synthesis of hexagonal-phase NaYF₄:Yb,Er/Tm nanocrystals with controllable shape and upconversion fluorescence. *Nanotechnology* **2008**, 19(34):345606.

²⁶⁴ Jiang, G.; Pichaandi, J.; Johnson, N. J. J.; Burke, R. D.; van Veggel, F. C. J. M. An effective polymer cross-linking strategy to obtain stable dispersions of upconverting NaYF₄ nanoparticles in buffers and biological growth media for biolabeling applications. *Langmuir* **2012**, 28(6):3239-3247.

²⁶⁵ Wang, F.; Deng, R.; Liu, X. Preparation of core-shell NaGdF₄ nanoparticles doped with luminescent lanthanide ions to be used as upconversion-based probes. *Nature protocols* **2014**, 9(7):1634-1644.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 1. Synthèses et caractérisations des UCNPs

Également, le thermocouple à l'origine du contrôle de la température a été reparamétré afin de mieux contrôler les cinétiques ascendantes (10 °C/min) ainsi que la précision de la température lors de chaque plateau (± 2 °C).

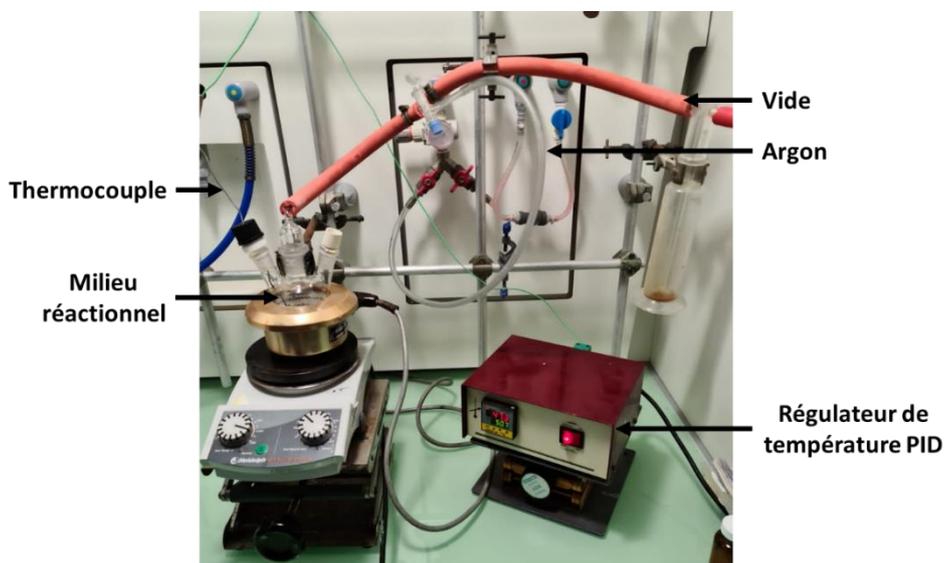


Figure 86 : deuxième montage de synthèse des UCNPs

Une deuxième piste permettant d'expliquer le manque de reproductibilité observé concernait la présence possible au sein du réacteur de fluorure de sodium. En effet, la formation de ce sel peut modifier les quantités mises en jeu dans la réaction et entraîner une augmentation de la taille des UCNPs au sein du lot. Le fluorure de sodium pouvant se former dès le mélange des solutions méthanoliques de soude et de fluorure d'ammonium, cette préparation a été réalisée extemporanément et avant ajout au milieu réactionnel.

La procédure de purification des UCNPs a également été modifiée afin d'éliminer plus efficacement les solvants de synthèse. Ainsi, avant précipitation par l'éthanol et centrifugation, les UCNPs ont été vortexées dans le cyclohexane afin de mieux solubiliser les traces de solvants résiduels. Enfin, les NPs ont été conservées en suspension dans le cyclohexane en fin de purification pour limiter leur agrégation lors du séchage.

Par ailleurs, le protocole de synthèse des coquilles a également été modifié en s'inspirant de la synthèse « one-pot » des QDs cœur/coquille.²⁶⁶ Ainsi, la formation de la coquille a été réalisée à la suite de la synthèse des cœurs, dans le même mélange réactionnel, sans étape de purification intermédiaire.

En tenant compte de l'ensemble de ces éléments auxquels s'ajoute la modification des temps de réaction aux différentes températures palier (inspirée du protocole de l'équipe de Gnanasammandhan *et al.*²⁰³), un nouveau protocole de synthèse a été élaboré comme suit :

²⁶⁶ Mekis, I.; Talapin, D. V.; Kornowski, A.; Haase, M.; Weller, H. One-pot synthesis of highly luminescent CdSe/CdS core-shell nanocrystals via organometallic and "greened" chemical approaches. *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107(30):7454-7462.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 1. Synthèses et caractérisations des UCNPs

Le mélange initial (chlorures de RE dans le mélange AO/ODE) est chauffé à l'air ambiant à 150 °C pendant 30 minutes. En parallèle, une solution de soude (2,5 mmol, 2,5 éq.) dans le méthanol (10 mL) et une solution de fluorure d'ammonium (4 mmol, 4 éq.) dans le méthanol (10 mL) sont préparées extemporanément et séparément. Après retour à température ambiante, les solutions sont mélangées puis ajoutées rapidement au milieu réactionnel. La solution est alors agitée à 110 °C pendant 20 minutes, puis à la même température sous vide pendant 10 minutes afin d'évaporer les traces de méthanol et d'humidité résiduelles. Le milieu réactionnel est alors placé sous atmosphère inerte grâce à des cycles vide/argon, avant d'être chauffé à 302 °C pendant 1 heure.

Cette température de 302 °C a été choisie en tenant compte des valeurs d'incertitude du thermocouple, afin de maintenir le milieu réactionnel à une température strictement supérieure à 300 °C et ainsi favoriser la cristallisation des UCNPs sous forme hexagonale.

Après production des cœurs et retour à température ambiante, du YCl_3 (0,57 mmol, 0,57 éq.) est ajouté au milieu réactionnel, et est solubilisé à 150 °C pendant 30 minutes. Cette quantité a été calculée d'après les travaux précédents en estimant que l'ensemble des réactifs a été consommé durant la première étape de synthèse.

Après retour à température ambiante, un mélange d'une solution de soude (1,43 mmol, 1,43 éq.) dans le méthanol (5 mL) et d'une solution de fluorure d'ammonium (2,29 mmol, 2,29 éq.) dans le méthanol (5 mL) est rapidement ajouté au milieu réactionnel. La suite du protocole est identique à la synthèse des cœurs, à l'exception du temps de croissance de la coquille à 302 °C (1 heure 30 minutes).

Après retour à température ambiante, les UCNPs obtenues sont vortexées, précipitées par ajout d'éthanol (20 mL) puis centrifugées (6 666 g, 22 °C, 10 min). Le surnageant est éliminé, le culot est suspendu dans le cyclohexane (20 mL) avant d'être vortexé puis les UCNPs sont de nouveau précipitées par ajout d'éthanol (20 mL), processus reproduit une fois supplémentaire afin d'éliminer les traces de solvants de synthèse résiduels. Enfin, le culot de centrifugation contenant les UCNPs est suspendu dans le cyclohexane (20 mL) puis centrifugé (999 g, 22 °C, 5 min) dans le but de précipiter les agglomérats et les sels, et garder les UCNPs en suspension. Ces dernières sont alors stockées en suspension dans le cyclohexane, et ont une stabilité estimée en DLS supérieure à plusieurs mois.

Outre la bonne reproductibilité des lots, cette nouvelle synthèse « one-pot » présente également deux avantages non négligeables : le temps de synthèse et la quantité d'UCNPs produites. Ainsi, une synthèse de NPs cœur/coquille « one-pot » dure environ 9 heures pour produire 180 à 200 mg de produit final, et est donc réalisable lors d'une journée de travail. Pour rappel, l'approche en deux étapes nécessitait deux journées de travail pour des lots de plus faible quantité (environ 90 mg).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 1. Synthèses et caractérisations des UCNPs

1.2.2. Caractérisation des UCNPs après synthèse « one-pot »

Les UCNPs ainsi synthétisées ont été caractérisées par DRX et MET, auxquelles se sont rajoutées des analyses de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) et de diffusion dynamique de la lumière (DLS).

Comme illustré Figure 87, et pour l'ensemble des lots analysés, les UCNPs obtenues selon la méthode « one-pot » ne contiennent plus de chlorure de sodium et cristallisent en phase hexagonale avec un haut degré de cristallinité.

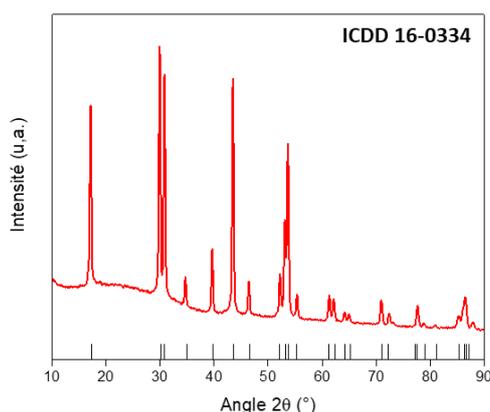


Figure 87 : exemple de diffractogramme X (poudre) d'UCNPs cœur/coquille obtenues selon la méthode « one-pot »

Cette voie de synthèse originale permet d'accéder, pour chaque lot synthétisé, à des NPs cœur/coquille présentant un diamètre estimé par MET et par SAXS à 30 nm (cf. Figure 88). Ce nouveau protocole impacte également la morphologie des UCNPs, évoluant de NPs oblongues vers des NPs quasi-sphériques. La variation morphologique a été linéaire au fur et à mesure des améliorations apportées au protocole de synthèse. Ainsi, les premiers lots validés (en termes d'homogénéité et de cristallinité) ont été utilisés pour un certain nombre de caractérisations, notamment pour la mise au point de l'hydrophilisation (cf. Chapitre 4).

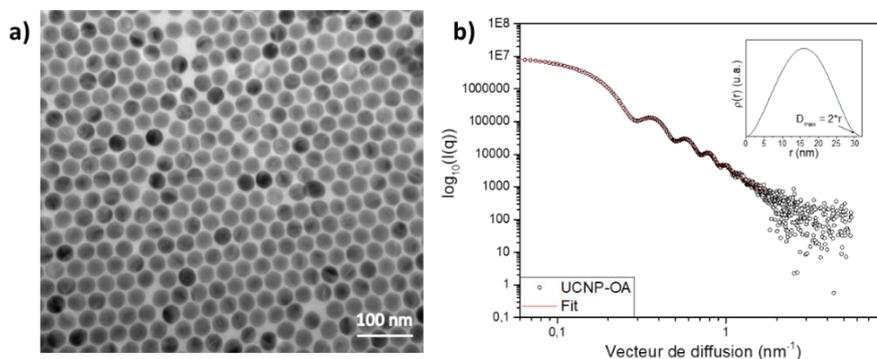


Figure 88 : a) image MET d'UCNPs cœur/coquille NaYF₄:Yb,Tm@NaYF₄ après synthèse « one-pot » et b) analyse SAXS du même lot d'UCNPs

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 1. Synthèses et caractérisations des UCNPs

La méthode SAXS permet d'analyser un nombre de NPs beaucoup plus important qu'en MET, d'un facteur supérieur à un million. Cette analyse est de surcroît réalisée en solution et non après évaporation des échantillons ce qui, comme nous l'avons vu, peut conduire à leur agglomération. Ceci permet d'obtenir, à partir d'un modèle simple de particules sphériques sans interactions, une taille moyenne dans l'échantillon très précise de $30,0 \pm 1,0$ nm (contre $28,9 \pm 1,4$ nm en MET). Les oscillations visibles sur le graphique signifient que l'échantillon est homogène en taille et en forme, homogénéité confirmée par les images MET.

La validation de l'homogénéité des lots d'UCNPs en termes de taille a également été réalisée grâce à des analyses de DLS (cf. Figure 89).

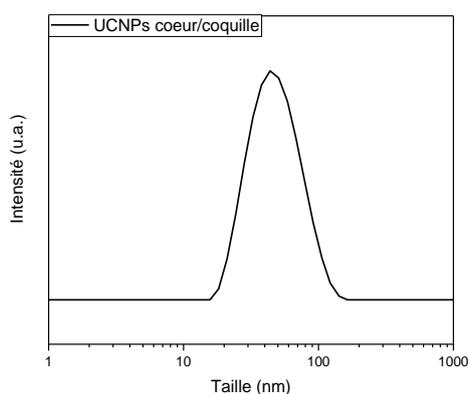


Figure 89 : distribution en intensité (DLS) d'une suspension d'UCNPs dans le cyclohexane obtenues selon la méthode « one-pot »

En complément du SAXS et du MET, cette dernière analyse de DLS permet d'estimer le D_h moyen des particules en suspension, et tient donc compte de l'enveloppe organique et de la couche de solvatation à leur surface. La DLS conduit ainsi à des valeurs de diamètre plus importantes, dans le cas présent 44,2 nm, avec un indice de polydispersité (PDI) de 0,192.²⁶⁷

1.2.3. Validation du nouveau procédé de synthèse

Deux analyses ont été réalisées afin de comparer les protocoles de synthèse en deux étapes et « one-pot » en termes d'intensité de fluorescence et de composition élémentaire : l'étude des spectres d'émissions des UCNPs et la spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif (ICP-MS).

Pour pouvoir réaliser cette comparaison, plusieurs lots d'UCNPs ont été synthétisés en deux temps et ont été validés par MET, SAXS et DLS. La synthèse de ces UCNPs a été basée sur les travaux antérieurs réalisés au laboratoire concernant les quantités de réactifs mises en

²⁶⁷ L'indice de polydispersité, dont les valeurs sont comprises entre 0 et 1, reflète l'homogénéité de l'échantillon. Une valeur inférieure à 0,500 permet de considérer un lot comme étant homogène.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 1. Synthèses et caractérisations des UCNPs

jeux tout en apportant les améliorations pratiques décrites en 1.2.1 (cf. Figure 90).

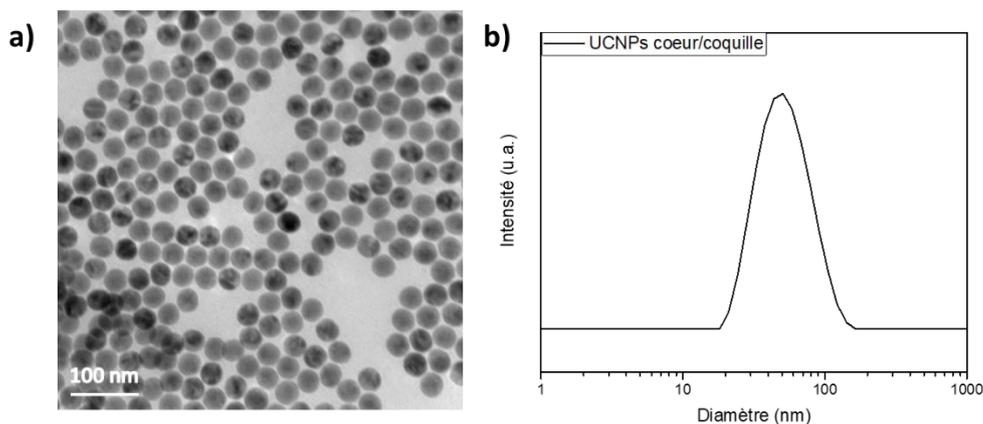


Figure 90 : a) image MET d'UCNPs cœur/coquille $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Tm}@\text{NaYF}_4$ après synthèse en deux temps et b) spectre DLS du même lot d'UCNPs

Les lots synthétisés en deux temps conduisent à des UCNPs quasi-sphériques de $30,3 \pm 1,5$ nm (MET) et de phase cristalline hexagonale. Ces mêmes lots ont un D_h de 38,9 nm en DLS et sont homogènes en taille (PDI = 0,159). Ces résultats sont similaires à l'approche « one-pot », confirmant ainsi l'intérêt des modifications expérimentales apportées à l'ancien protocole.

La composition des UCNPs a été étudiée en ICP-MS, analyse qui permet de quantifier les principaux éléments chimiques présents dans notre échantillon, en l'occurrence l'yttrium, l'ytterbium et le thulium. Les NPs ont été séchées sous pression réduite puis minéralisées dans de l'acide nitrique concentré (400 μL) à 100 °C pendant une nuit dans un flacon serti. Les solutions ont ensuite été diluées dans l'eau déionisée (qsp 10 mL) puis analysées.

Tableau IV : quantification du pourcentage molaire de ^{89}Y , ^{174}Yb et ^{169}Tm des UCNPs cœur/coquille selon les deux protocoles de synthèse

Élément	Synthèse en deux étapes (%mol)	Synthèse one-pot (%mol)
^{89}Y	$86,8 \pm 0,2$	$86,6 \pm 0,3$
^{174}Yb	$11,9 \pm 0,1$	$12,4 \pm 0,3$
^{169}Tm	$1,30 \pm 0,03$	$1,00 \pm 0,03$

Les résultats présentés dans le Tableau IV montrent une composition élémentaire quasi identique des UCNPs cœur/coquille quelle que soit la voie de synthèse considérée.

Enfin, une étude de photoluminescence a été réalisée sur des solutions d'UCNPs dans le cyclohexane en enregistrant les spectres d'émission sous excitation IR (cf. Figure 91). Après séchage et pesée, les UCNPs ont été reprises dans le cyclohexane à une concentration fixe de

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 1. Synthèses et caractérisations des UCNPs

1 mg/mL puis placées dans un bain à US afin d'obtenir une dispersion homogène pour chaque lot.

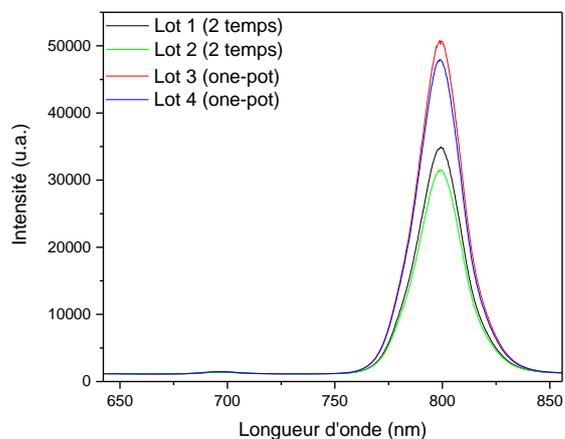


Figure 91 : spectres d'émissions sous excitation à 980 nm d'UCNPs cœur/coquille $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Tm}@\text{NaYF}_4$ selon les deux protocoles de synthèse ($n = 2$)

Cette étude a fait ressortir une bonne reproductibilité des synthèses en termes d'intensité de fluorescence. De plus, une légère amélioration de celle-ci a été observée avec l'approche one-pot.

L'ensemble de ces analyses a permis de valider définitivement l'approche « one-pot » pour la synthèse des UCNPs de type cœur/coquille. Cette synthèse réalisée en une journée présente une bonne reproductibilité en termes de quantité (180 à 200 mg), de cristallinité, et de diamètre (28-34 nm) (24 lots validés sur 35 synthétisés).

Chapitre 2. Accès aux polyéthylènes glycols bifonctionnalisés

Comme évoqué dans la partie objectif, plusieurs types de chaînes PEGs linéaires bifonctionnalisées ont été synthétisés en vue d'étudier la stabilité des NPs hydrophilisées après déplacement des AO. Les modifications structurales étudiées ont porté tant sur la masse moléculaire moyenne du polymère (i.e. 1000 vs 2000 g.mol⁻¹) que sur la nature de la fonction présente à l'extrémité d'ancrage : groupement phosphate, bis-phosphonate ou tétra-phosphonate (Figure 92, groupement R₂). De plus, afin d'étudier l'impact de l'extrémité des PEGs présentée en surface des NPs, les PEGs phosphate ont été synthétisés avec une fonction terminale hydroxyle ou méthoxyle. Selon l'extrémité d'ancrage retenue, un PEG équivalent sera synthétisé avec un appendice compatible avec la chimie bioorthogonale (i.e. azoture, cf. Figure 92, groupement R₁).

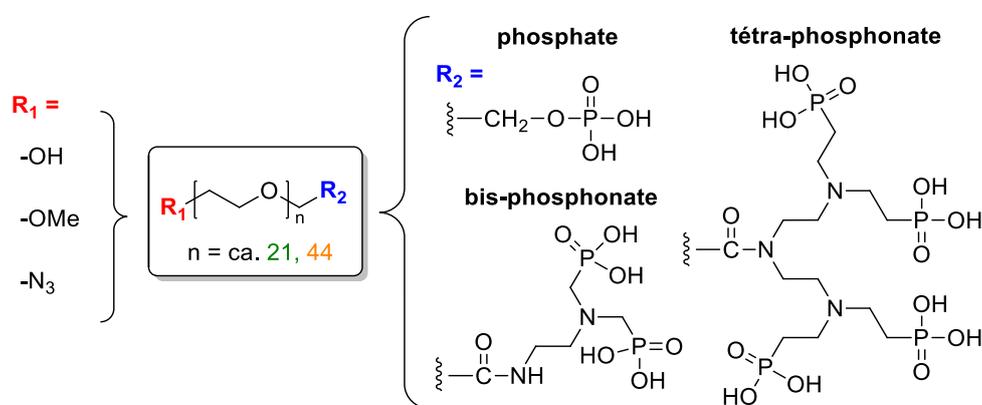


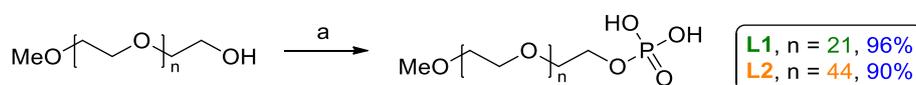
Figure 92 : schéma des différents dérivés PEGs envisagés

2.1. Synthèse des dérivés PEGs phosphate L1 et L2

2.1.1. Synthèse des ligands L1 et L2, voie 1

La première approche pour obtenir ces composés est inspirée d'un protocole de Boyer *et al.*²⁵⁷ consistant à introduire le groupement phosphate via l'utilisation de trichlorure de phosphore (POCl₃) à partir des PEGs commerciaux mono-fonctionnalisés en partie terminale par une fonction méthoxyle.

Suivant cette procédure, les précurseurs pégylés commerciaux ont été traités par du POCl₃ dans le tétrahydrofurane anhydre à 55 °C pendant 6 heures suivi par une hydrolyse pendant 1 heure à température ambiante. Cette réaction conduit aux composés L1 et L2 correspondant respectivement aux PEGs 1000 et 2000 méthoxy/phosphate avec des rendements compris entre 90 et 96% (cf. Figure 93).



Réactifs et conditions : a) (i) POCl₃, THF, 0°C puis 55 °C, 6 h, (ii) H₂O, t.a., 1 h

Figure 93 : première voie d'accès aux dérivés PEGs-phosphate L1 et L2

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 2. Accès aux polyéthylènes glycols bifonctionnalisés

Toutefois, malgré de bons rendements et des spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN – ^1H , ^{13}C , ^{31}P) en accord avec les structures désirées, les analyses des spectres de masse MALDI-TOF (désorption-ionisation laser assistée par matrice couplé à un spectromètre de masse à temps de vol) ont révélé que les échantillons étudiés (exemple du composé **L1**, Figure 94), étaient contaminés par des impuretés qui n'ont pas pu être identifiées.

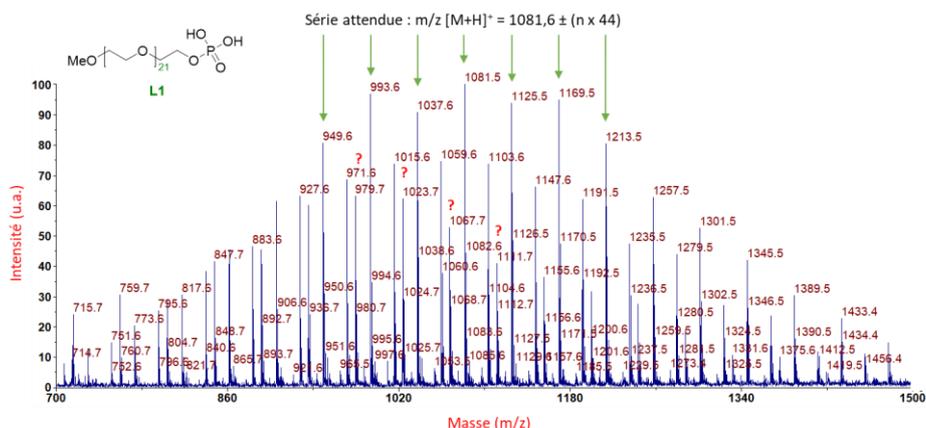
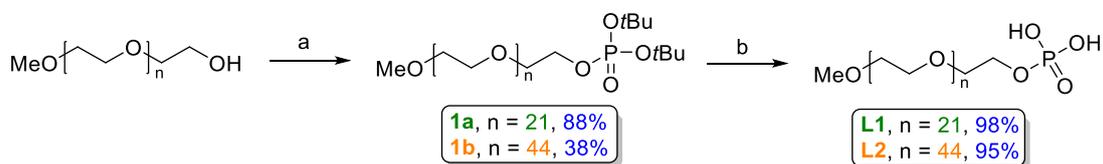


Figure 94 : spectre de masse MALDI-TOF du composé **L1** (les flèches vertes indiquent la série attendue)

Compte tenu des résultats d'analyses de masse, la synthèse des ligands phosphates a été reconsidérée afin d'améliorer leur pureté. Cette dernière est en effet un facteur crucial pour la reproductibilité des synthèses et *in fine* pour la stabilité des UCNPs hydrophilisées.

2.1.2. Synthèse des ligands **L1** et **L2**, voie 2

Une approche de synthèse alternative a donc été développée consistant, dans un premier temps, à accéder aux ligands désirés porteurs d'une fonction phosphate protégée sous forme de diester et pouvant être purifiés par chromatographie sur colonne puis, dans un second temps, à déprotéger cette fonction dans des conditions douces afin de minimiser la formation de sous-produits indésirés, difficilement séparables de l'acide phosphorique péglé (cf. Figure 95).



Réactifs et conditions : a) (i) *N,N*-diisopropylphosphoramidite de di-*tert*-butyle, tétrazole, CH_2Cl_2 , -5 à -10 °C puis t.a., 3 h, (ii) mCPBA, CH_2Cl_2 , -40 °C puis t.a., 1 h ; b) HCl 1,43-3 N/ Et_2O , 0 °C à t.a., 30 min

Figure 95 : deuxième voie d'accès aux composés MeO-PEGs-phosphate **L1** et **L2**

Les composés phosphates di-protégés ont été obtenus en traitant les MeO-PEGs-OH commerciaux par le *N,N*-diisopropylphosphoramidite de di-*tert*-butyle en présence de tétrazole dans le dichlorométhane pendant 45 minutes à 3 heures (respectivement pour les PEGs 1000 et 2000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Après ce laps de temps, le phosphite intermédiaire (non isolé) est

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 2. Accès aux polyéthylènes glycols bifonctionnalisés

oxydé à -40 °C par l'acide métachloroperbenzoïque (mCPBA) pour conduire, après purification, aux esters intermédiaires **1a** et **1b** (cf. Figure 95).²⁶⁸ Les analyses par RMN ¹H, ¹³C, et ³¹P sont en accord avec les structures attendues. Toutefois, ces esters n'ont pas pu être caractérisés par MALDI-TOF en raison de leur instabilité dans les conditions d'analyse (cf. Figure 96).

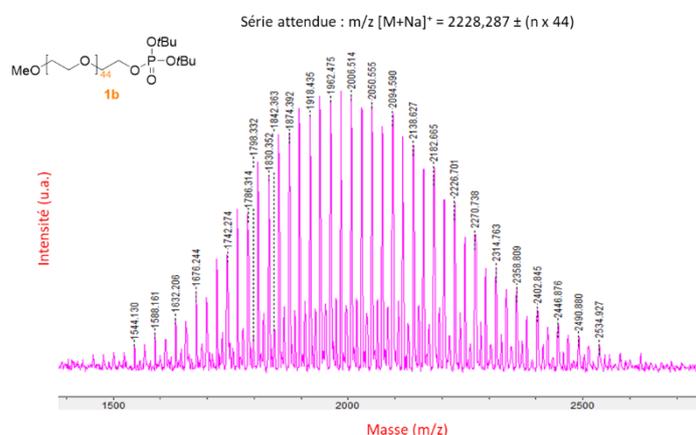


Figure 96 : spectre de masse MALDI-TOF du composé **1b** : la série attendue n'est pas retrouvée

Les esters phosphoniques sont alors hydrolysés par une solution anhydre d'acide chlorhydrique 2 N dans l'éther diéthylique pendant 30 à 45 minutes pour conduire aux composés **L1** et **L2** correspondants. Les acides phosphoriques ainsi synthétisés ont été identifiés par spectrométrie RMN (¹H, ¹³C, ³¹P) et par analyses MALDI-TOF (spectre de masse de l'ion $[M+H]^+$ 2050 avec une distribution des pics correspondant à des unités de répétition du polymère). Concernant ce dernier point, l'analyse de masse a confirmé l'absence des séries parasites précédemment identifiées lors de la première voie de synthèse (cf. Figure 97).

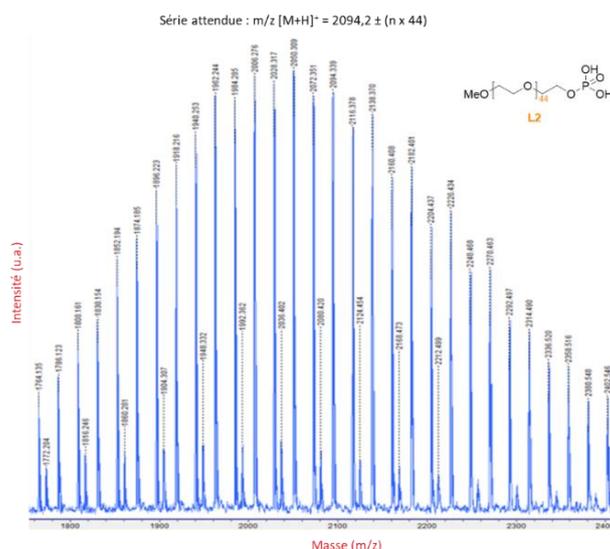


Figure 97 : spectre de masse MALDI-TOF du composé **L2**. La série minoritaire correspond à la référence (MeO-PEG₂₀₀₀-OH commercial). La série majoritaire contient deux séries correspondant à l'adduit protoné et à l'adduit sodique du composé **L2**

²⁶⁸ Kruger, R. G.; Lu, W.; Oberthür, M.; Tao, J.; Kahne, D.; Walsh, C. T. Tailoring of glycopeptide scaffolds by the acyltransferases from the teicoplanin and A-40,926 biosynthetic operons. *Chem. Biol.* **2005**, 12(1):131-140.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

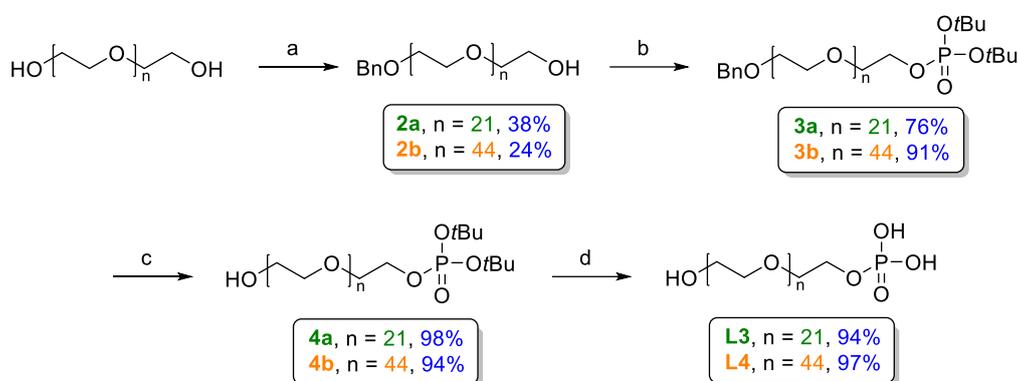
Chapitre 2. Accès aux polyéthylènes glycols bifonctionnalisés

Cette approche nous a permis d'obtenir les produits souhaités avec des rendements globaux sur 2 étapes de 86% et 36% respectivement pour les PEGs 1000 et 2000 méthoxy/phosphate.

2.1.3. Synthèse des ligands L3 et L4

Comme évoqué précédemment, après avoir optimisé l'accès aux PEGs-phosphate (extrémité méthoxyle), notre attention s'est portée sur la synthèse de leurs équivalents présentant une extrémité hydroxyle afin d'étudier l'effet de ces groupements sur la stabilité des UCNPs après hydrophilisation.

La synthèse des ligands L3 et L4 s'est déroulée en 4 étapes comme décrit dans la Figure 98 ci-après :



Réactifs et conditions : a) (i) NaH 60%, THF, -5 °C, 5 min, (ii) BnBr, -5 °C puis t.a., 3-5 h ; b) (i) *N,N*-diisopropylphosphoramidite de di-*tert*-butyle, tétrazole, CH₂Cl₂, -5 °C puis t.a., 2 h, (ii) mCPBA, CH₂Cl₂, -40 à -78 °C puis t.a., 1 h ; c) Pd/C 10 %, MeOH, t.a., 16 h ; d) HCl 1,43 N/Et₂O, 0 °C puis t.a., 30 min

Figure 98 : voie d'accès aux dérivés HO-PEGs-phosphate L3 et L4

La première étape a consisté à mono-benzyle les PEGs diol commerciaux en présence d'un léger défaut de bromure de benzyle et d'hydrure de sodium (0,8 éq.) à température ambiante selon le protocole décrit par Zhang, B. *et al.* pour un PEG 3140 g.mol⁻¹.²⁶⁹ Cette réaction conduit après purification sur colonne aux PEGs **2a** et **2b** (1000 et 2000 g.mol⁻¹) avec des rendements respectifs de 38% et 24%.

L'accès aux composés phosphates di-protégés **3a** et **3b** a été réalisé de façon similaire au protocole décrit pour les composés **1a** et **1b** à partir des alcools **2a** et **2b**. Ainsi, le traitement de ces derniers par le *N,N*-diisopropylphosphoramidite de di-*tert*-butyle en présence de tétrazole, suivi de l'oxydation de l'intermédiaire phosphite, permet d'obtenir les PEGs di-ester de *tert*-butyle **3a** et **3b** avec des rendements respectifs de 76% et 91%.

²⁶⁹ Zhang B.; Zhang H.; Myers B.; Elupula R.; Jayawickramarajah J.; Grayson S. Determination of polyethylene glycol end group functionalities by combination of selective reactions and characterization by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2014**, 816:28-40.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 2. Accès aux polyéthylènes glycols bifonctionnalisés

Une étape d'hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon à 10% permet de déprotéger les fonctions alcools pour conduire aux précurseurs **4a** et **4b** avec des rendements respectifs sans purification de 98% et 94%. Comme précédemment, la validation des composés a été réalisée uniquement sur la base des spectres RMN ^1H , ^{13}C et ^{31}P , les résultats MALDI-TOF n'étant pas interprétables.

Enfin, l'étape de déprotection de la fonction phosphorique en présence d'une solution d'acide chlorhydrique 1,43 N dans l'éther diéthylique conduit aux ligands **L3** et **L4** avec des rendements globaux respectifs sur 4 étapes de 27% et 20%.

2.2. Synthèse des ligands PEGs bis- et tétra-phosphonate L(5-L12)

Une synthèse convergente a été mise au point afin d'obtenir les dérivés PEGs-bis- et tétra-phosphonate L(5-L12) en un minimum d'étapes (cf. Figure 99).

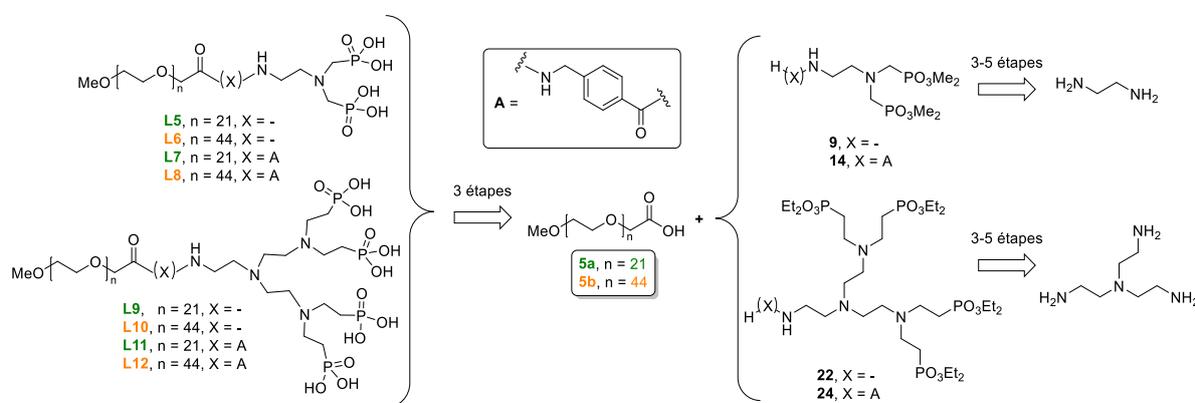
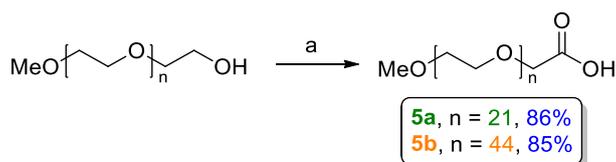


Figure 99 : schéma rétrosynthétique de l'accès aux ligands PEGs-bis- et tétra-phosphonate L(5-12)

Cette approche repose sur le couplage peptidique entre d'une part, les esters activés pégylés des acides **5a** et **5b**, obtenus en deux étapes à partir des MeO-PEGs-OH commerciaux, et d'autre part, les différentes amines aliphatiques (**9.TFA** et **22.TFA**) ou aromatiques (**14.TFA** et **24.TFA**), fonctionnalisées par deux ou quatre fonctions esters de phosphonate, elles-mêmes obtenues respectivement à partir de l'éthylène-1,2-diamine ou de la tris(2-aminoéthyl)amine commerciale.

2.2.1. Synthèse des précurseurs PEGs ester de NHS **6a** et **6b**

Les composés PEGs acide ont été obtenus par oxydation directe de l'extrémité alcool (cf. Figure 100) :



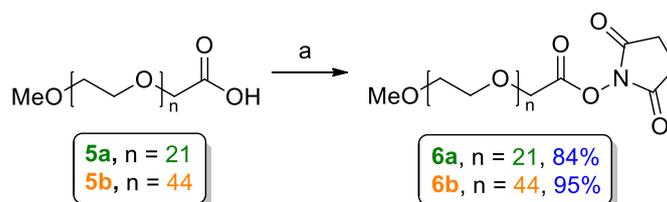
Réactifs et conditions : a) (i) Réactif de Jones, acétone, 0 °C à t.a., 3 h-3 h 30, (ii) *i*-PrOH, 15 min-4 h

Figure 100 : voie d'accès aux PEGs-CO₂H **5a** et **5b**

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 2. Accès aux polyéthylènes glycols bifonctionnalisés

Les MeO-PEGs-OH de départ ont été solubilisés dans l'acétone à 0 °C avant ajout du réactif de Jones (solution d'oxyde de chrome (III) dans un mélange d'eau déionisée et d'acide sulfurique concentré). Cette oxydation a permis d'obtenir les dérivés acides correspondants avec des rendements en moyenne supérieurs à 70% après filtration du milieu réactionnel et lavage du filtrat par une solution aqueuse d'acide chlorhydrique diluée (1 N).²⁷⁰ La structure des composés **5a** et **5b** ainsi obtenus, non purifiés, a été confirmée par spectrométrie RMN ¹H et ¹³C ainsi que MALDI-TOF.



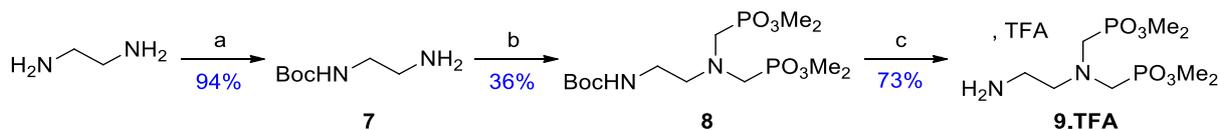
Réactifs et conditions : a) NHS, EDCI.HCl, CH₂Cl₂, t.a., 19 h-27 h

Figure 101 : synthèse des esters de NHS **6a** et **6b**

Les PEGs acide ont enfin été mis en réaction, après co-évaporation au toluène, avec du *N*-hydroxysuccinimide (NHS) en présence de chlorhydrate de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDCI.HCl) dans le dichlorométhane anhydre afin d'accéder aux ester activés correspondants **6a** et **6b** (cf. Figure 101). Ces derniers, sujets à l'hydrolyse, ont été engagés dans l'étape suivante immédiatement après synthèse.

2.2.2. Synthèse du précurseur bis-phosphonate aliphatique **9.TFA**

L'accès au précurseur bis-phosphonate aliphatique a été réalisé en trois étapes à partir de l'éthylène-1,2-diamine incluant : la mono-protection d'une des deux fonctions amines par un groupement *tert*-butoxycarbonyle (Boc) suivi d'une dialkylation de l'amine primaire libre par un méthyl phosphonate, et enfin une hydrolyse acide du carbamate de *tert*-butyle (cf. Figure 102).



Réactifs et conditions : a) Boc₂O, CH₂Cl₂, t.a., 24 h ; b) (i) HCOH 35% aq., THF, t.a., 20 min, (ii) HPO₃Me₂, reflux, 16 h ; c) CH₂Cl₂, TFA, 0 °C, 4 h 30

Figure 102 : synthèse de l'amine bis-phosphonate **9.TFA**

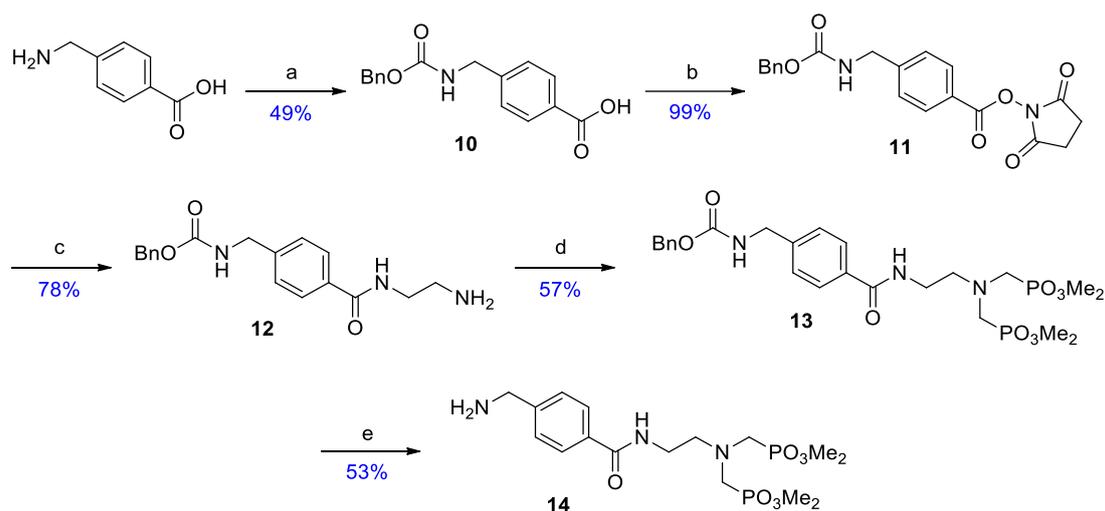
La mono-protection de l'éthylène-1,2-diamine est réalisée dans le dichlorométhane à température ambiante en utilisant un large excès d'amine par rapport au Boc₂O (10/1 éq.

²⁷⁰ Benjamin, C. J.; Wright, K. J.; Hyun, S. H.; Krynski, K.; Yu, G.; Bajaj, R.; Guo, F.; Stauffacher, C. V.; Jiand, W.; Thompson, D. H. Nonfouling NTA-PEG-based TEM grid coatings for selective capture of histidine-tagged protein targets from cell lysates. *Langmuir* **2016**, 32,(2):551-559.

respectivement).²⁷¹ Cet intermédiaire, non purifié, est alors soumis à une double réaction de Kabachnik-Fields. Cette dernière consiste à traiter une solution de la diamine **7** dans le tétrahydrofurane par un excès de formaldéhyde (2,5 éq.) puis, après formation des imines intermédiaires, à ajouter du diméthylphosphite et chauffer le milieu réactionnel à reflux une nuit. Après purification par chromatographie sur colonne, le bis-phosphonate **8** est obtenu avec un rendement modéré de 36% et une pureté ne dépassant pas 85% en RMN ³¹P.²⁵⁸ Enfin, une dernière étape de déprotection de l'amine par une solution diluée d'acide trifluoroacétique (TFA) dans le dichlorométhane à 0 °C (1/2, v/v) pendant 6 heures conduit au composé **9.TFA** sous forme de sel de TFA. La pureté de ce composé, dépendante de celle de son précurseur **8**, a été estimée à 85% après analyse RMN ³¹P.

2.2.3. Synthèse des précurseurs bis-phosphonates aromatiques **14** et **14.TFA**

Afin d'étudier l'influence sur la stabilité des UCNP's hydrophilisées d'un espaceur aryle, introduit entre la chaîne pégylée et les fonctions phosphonates, un acide benzoïque para-substitué par un résidu aminométhyle a été couplé à l'éthylène-1,2-diamine bis-phosphonate **9.TFA** selon le schéma réactionnel décrit dans la Figure 103.



Réactifs et conditions : a) ClCO₂Bn, NaOH 2 N aq., THF, 0 °C à t.a., 18 h ; b) DCC, NHS, THF, t.a., 48 h ; c) éthylène-1,2-diamine, THF, t.a., 4 h ; d) (i) HCOH 35% aq., THF, t.a., 20 min (ii) HPO₃Me₂, reflux, 17 h ; e) H₂, Pd/C 5%, MeOH, t.a., 72 h

Figure 103 : première voie d'accès au précurseur bis-phosphonate aromatique **14**

La première approche développée a consisté à protéger l'amine primaire de l'acide 4-(aminométhyl)benzoïque par un groupement carboxybenzyle (CBZ) pour conduire au carbamate **10**.²⁷² Après activation de l'acide sous forme d'ester de NHS **11** puis couplage à l'éthylène-1,2-diamine, l'amine primaire **12** a été convertie en bis-phosphonate **13** selon le

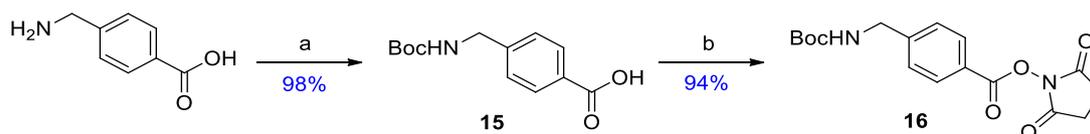
²⁷¹ Grate, J. W.; Mo, K. F.; Daily, M. D. Triazine based sequence defined polymers with side chain diversity and backbone-backbone interaction motifs. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55(12):3925-3930.

²⁷² Bonnet, M.; Chan D.; Giaccia, A.; Hay, M. P.; Lai E., Razorenova, O.; Sun, C.; Tabibiazar, R.; Yen, P. W. Substituted benzamides and their uses. WO2012051117, **2012**.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 2. Accès aux polyéthylènes glycols bifonctionnalisés

mode opératoire développé pour le composé **8**. La dernière étape a consisté à déprotéger l'amine par hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon actif (5% Pd). Après 72 heures, la réaction ne semblant plus évoluer en suivi par chromatographie sur couche mince (CCM), le milieu réactionnel a été filtré sur PTFE 0,20 μm pour conduire à l'amine **14** avec un rendement modéré de 53%. Cette amine s'avérant instable, ce qui en partie pourrait expliquer le faible rendement observé, cette voie de synthèse a été abandonnée au profit d'une approche similaire utilisant le groupement Boc en lieu et place du CBZ pour protéger la fonction benzylamine (cf. Figure 104).

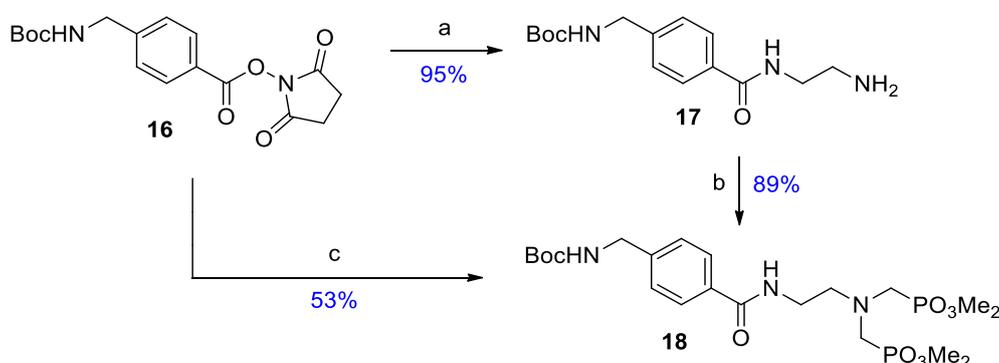


Réactifs et conditions : a) (i) Boc_2O , NaOH, H_2O , acétone, t.a., 30 h, (ii) acide citrique 10% aq. ; b) DCC, NHS, THF, t.a., 22 h

Figure 104 : synthèse du précurseur ester de NHS **16**

Lors de cette deuxième approche, la protection de l'amine primaire sous forme de carbamate de *tert*-butyle a été réalisée dans un mélange d'eau déionisée et d'acétone en présence de Boc_2O pendant 30 heures. L'acide **15** ainsi obtenu a ensuite été activé par le NHS dans le tétrahydrofurane anhydre pour conduire au composé **16**.

Deux approches décrites dans la Figure 105 ont alors été explorées pour accéder à l'amine protégée bis-phosphonate **18** :



Réactifs et conditions : a) éthylène-1,2-diamine, THF, t.a., 1 h ; b) (i) HCOH 35% aq., THF, t.a., 20 min, (ii) HPO_3Me_2 , reflux, 18 h, (iii) HPO_3Me_2 , reflux, 5 h ; c) DMF, DIPEA, **9.TFA**, t.a., 17 h

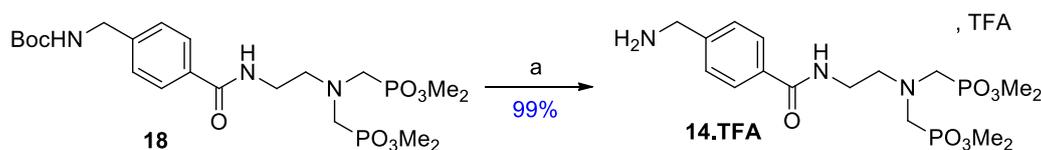
Figure 105 : voies d'accès au précurseur bis-phosphonate aromatique **18**

La première approche de synthèse du composé **18** a été basée sur la voie précédemment développée pour accéder au précurseur benzylé, à savoir le couplage de l'éthylène-1,2-diamine sur l'ester activé **16** suivi de l'introduction des deux fonctions phosphonates par réaction de Kabachnik-Fields sur l'amine primaire libre. La seconde approche, plus courte, consiste en un couplage peptidique direct entre l'ester activé **16** et l'amine bis-phosphonate **9.TFA**. La première approche a été préférée, présentant un rendement global de 85% en 2 étapes contre 53% pour la deuxième. Cette dernière présente un faible rendement

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 2. Accès aux polyéthylènes glycols bifonctionnalisés

probablement en raison de la pureté moyenne de l'intermédiaire **9.TFA**, qui pour rappel s'établissait à 85%.



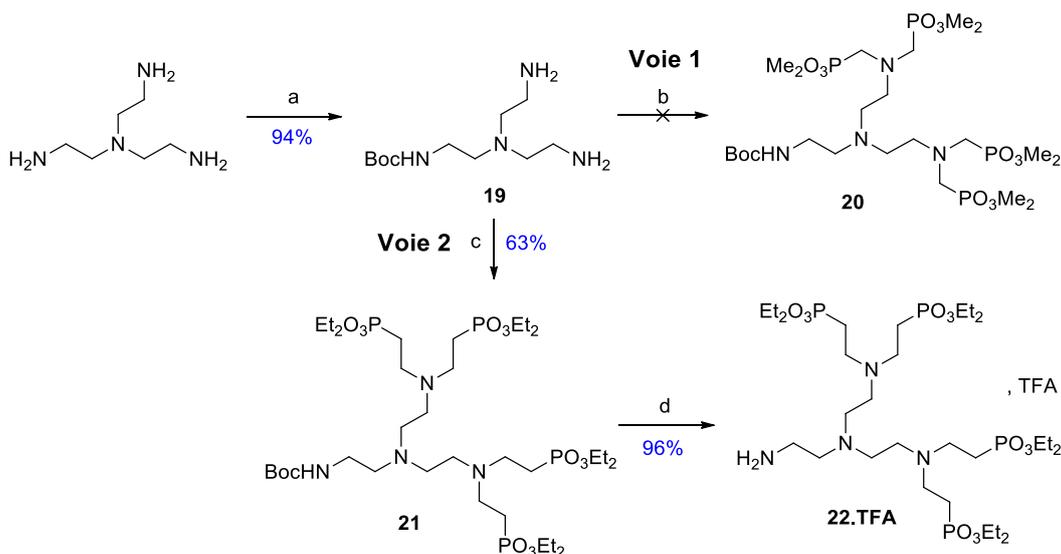
Réactifs et conditions : a) CH₂Cl₂, TFA, 0 °C, 2 h 30

Figure 106 : synthèse du précurseur bis-phosphonate aromatique **14.TFA**

Le composé **18** ainsi obtenu a enfin été déprotégé par une solution diluée de TFA dans le dichlorométhane (1/2, v/v) à 0 °C pendant 2,5 heures pour conduire au composé **14.TFA** sous forme de sel de TFA (cf. Figure 106 ci-avant).

2.2.4. Synthèse du précurseur tétra-phosphonate aliphatique **22**

L'accès au précurseur tétra-phosphonate aliphatique **22.TFA** a été initialement envisagé en 3 étapes à partir de la *tris*(2-aminoéthyl)amine commerciale en s'inspirant de la voie d'accès au dérivé bis-phosphonate **9.TFA** à savoir : la mono-protection par un groupement Boc de la triamine, suivi de l'introduction des groupements méthylphosphonates sur les deux fonctions amines primaires libres puis clivage du *tert*-butylcarbamate (cf. Figure 107, voie 1).



Réactifs et conditions : a) Boc₂O, CHCl₃, 0 °C à t.a., 28 h ; b) (i) HCOH 35% aq., THF, t.a., 20 min, (ii) HPO₃Me₂, reflux, 18 h, (iii) HCOH 35% aq., reflux, 5 h ; c) vinylphosphonate de diéthyle, H₂O, t.a., 11 j ; d) CH₂Cl₂, TFA, 0 °C, 3 h

Figure 107 : synthèse du précurseur tétra-phosphonate **22.TFA**

La réaction de mono-protection de la *tris*(2-aminoéthyl)amine par un groupement Boc a été réalisée dans des conditions similaires à celles utilisées pour l'obtention du composé **7**, à savoir en milieu dilué dans le chloroforme et en grand excès d'amine de départ (10 éq.).²⁷³

²⁷³ Tai, W.; Mo, R.; Lu, Y.; Jiang, T.; Gu, Z. Folding graft polymer with pendant drug segments for co-delivery of anticancer drugs. *Biomaterials* **2014**, 35(25):7194-7203.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

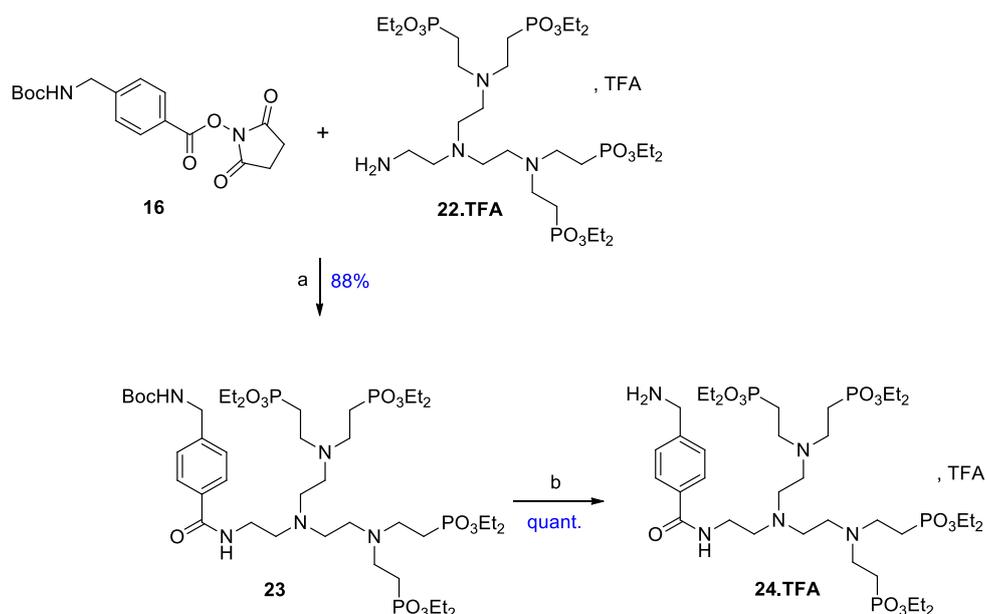
Chapitre 2. Accès aux polyéthylènes glycols bifonctionnalisés

L'amine **19** a ensuite été soumise à une réaction de Kabachnik-Fields de façon similaire aux composés **7**, **12** et **17**. Malheureusement cette réaction n'a pas permis d'accéder à l'intermédiaire **20** souhaité en raison de la formation de nombreux produits qui n'ont pas pu être correctement isolés et caractérisés.

Cette voie de synthèse a donc été reconsidérée afin d'introduire les groupements alkylphosphonates sur les amines primaires par une réaction d'aza-Michaël (cf. Figure 107, voie 2). Cette dernière a consisté à traiter l'amine mono-protégée **19** par du vinylphosphonate de diéthyle dans l'eau pendant 11 jours à température ambiante selon le protocole de Matveeva *et al.*²⁷⁴ Le précurseur aliphatique tétra-phosphonate **22.TFA** a ensuite été obtenu avec un excellent rendement de 96% après déprotection du composé **21** par une solution diluée de TFA dans le dichlorométhane (1/2, v/v) à 0 °C pendant 3 heures.

2.2.5. Synthèse du précurseur tétra-phosphonate aromatique **24.TFA**

La réaction d'aza-Michaël étant longue (> 10 jours), l'accès au synthon tétra-phosphonate aromatique a été réalisée par couplage peptidique entre l'ester aromatique activé **16** et l'amine **22.TFA** (cf. Figure 108).



Réactifs et conditions : a) DIPEA, DMF, t.a., 20 h ; b) CH₂Cl₂, TFA, 0 °C, 3 h

Figure 108 : synthèse du précurseur aromatique tétra-phosphonate **24.TFA**

Les composés **16** et **22.TFA** ont été mis en réaction dans le *N,N*-diméthylformamide (DMF) anhydre en présence de *N,N*-diisopropyléthylamine (DIPEA) à température ambiante pendant 20 heures. Le composé **23** obtenu a ensuite été déprotégé par une solution diluée de TFA dans le dichlorométhane (1/2, v/v) à 0 °C pendant 3 heures pour conduire à l'amine **24.TFA** désirée sous forme de sel de TFA.

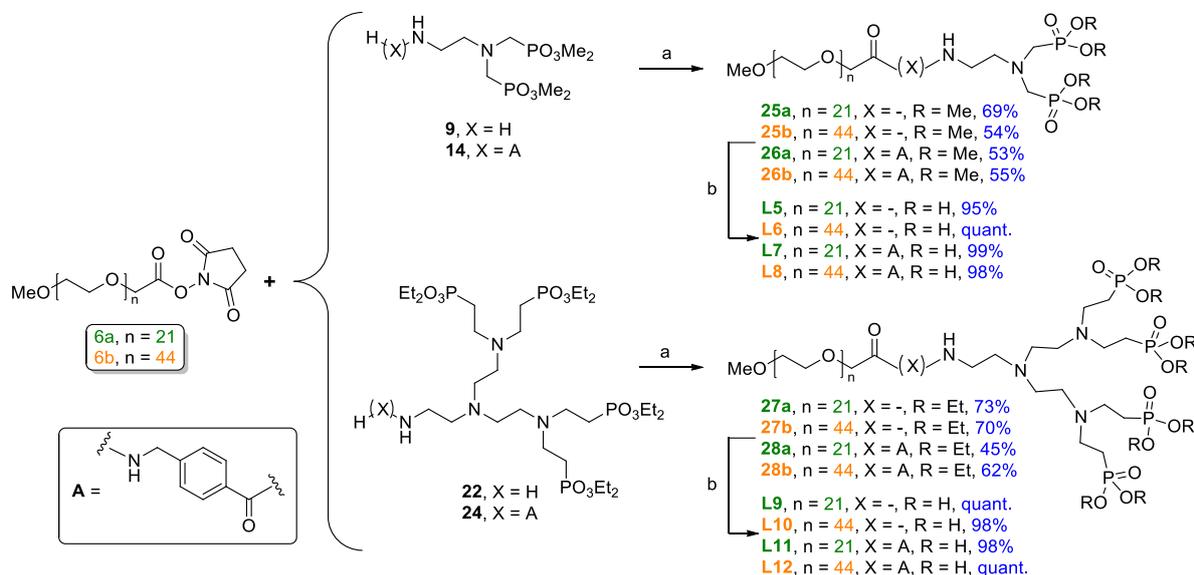
²⁷⁴ Matveeva, E. V.; Petrovskii, P. V.; Odinets, I. L. Efficient synthesis of racemic b-aminophosphonates via aza-Michael reaction in water. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49(42):6129-6133.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 2. Accès aux polyéthylènes glycols bifonctionnalisés

2.2.6. Accès aux PEGs bis- et tétra-phosphonate L(5-12)

L'étape suivante a consisté à coupler les synthons aminés bis- et tétra-phosphonate aux esters activés pégylés, puis à déprotéger les fonctions acides phosphoniques pour accéder aux différents ligands d'hydrophilisation souhaités (cf. Figure 109) :



Réactifs et conditions : a) DMF, DIPEA, t.a., 16 h-96 h ; b) (i) CH₂Cl₂, TMSBr, 0 °C à t.a., 17 h-24 h, (ii) MeOH, t.a., 1 h-8 h

Figure 109 : couplage peptidique entre les différents précurseurs bis- et tétra-phosphonates **9.TFA**, **14.TFA**, **22.TFA** et **24.TFA** et les MeO-PEGs-CONHS **6a** et **6b**

La première étape décrite dans la Figure 109 a reposé sur un couplage peptidique entre l'ester de NHS de chaque PEG (1000 et 2000 g.mol⁻¹, **6a** et **6b**) et l'amine primaire de chaque précurseur, bis- ou tétra-phosphonate, comportant ou non un groupement aryle (**9.TFA**, **14.TFA**, **22.TFA** et **24.TFA**).

Les rendements de synthèse ont été très variables et principalement dépendants de la pureté des amines primaires mises en réaction pour les couplages. Par exemple, l'amine **9.TFA** d'une pureté proche de 85% d'après la RMN ³¹P conduit à des rendements en ligands pégylés inférieurs à l'amine **22.TFA** obtenue quant à elle avec une pureté estimée en ³¹P RMN supérieure à 98%. Un autre élément concerne les difficultés de purification chromatographique rencontrées pour les dérivés comportant une chaîne pégylée 2000, ces derniers ayant tendance à être retenus sur colonne, rendant difficile l'obtention de conditions optimales de séparation.

Tous ces composés ont ensuite été déprotégés suivant une réaction en deux étapes « one-pot » consistant à convertir dans un premier temps les esters d'alkyle phosphonates en esters silylés, puis dans un second temps, à cliver ces derniers par méthanolyse. Cette réaction de déprotection réalisée dans des conditions douces a permis d'accéder, sans étape de purification chromatographique, aux ligands **L5** à **L12** souhaités avec d'excellents rendements (95% – quant.) et puretés chimiques (exemple du composé **L9**, Figure 110a ci-après).

RÉSULTATS ET DISCUSSION
Chapitre 2. Accès aux polyéthylènes glycols bifonctionnalisés

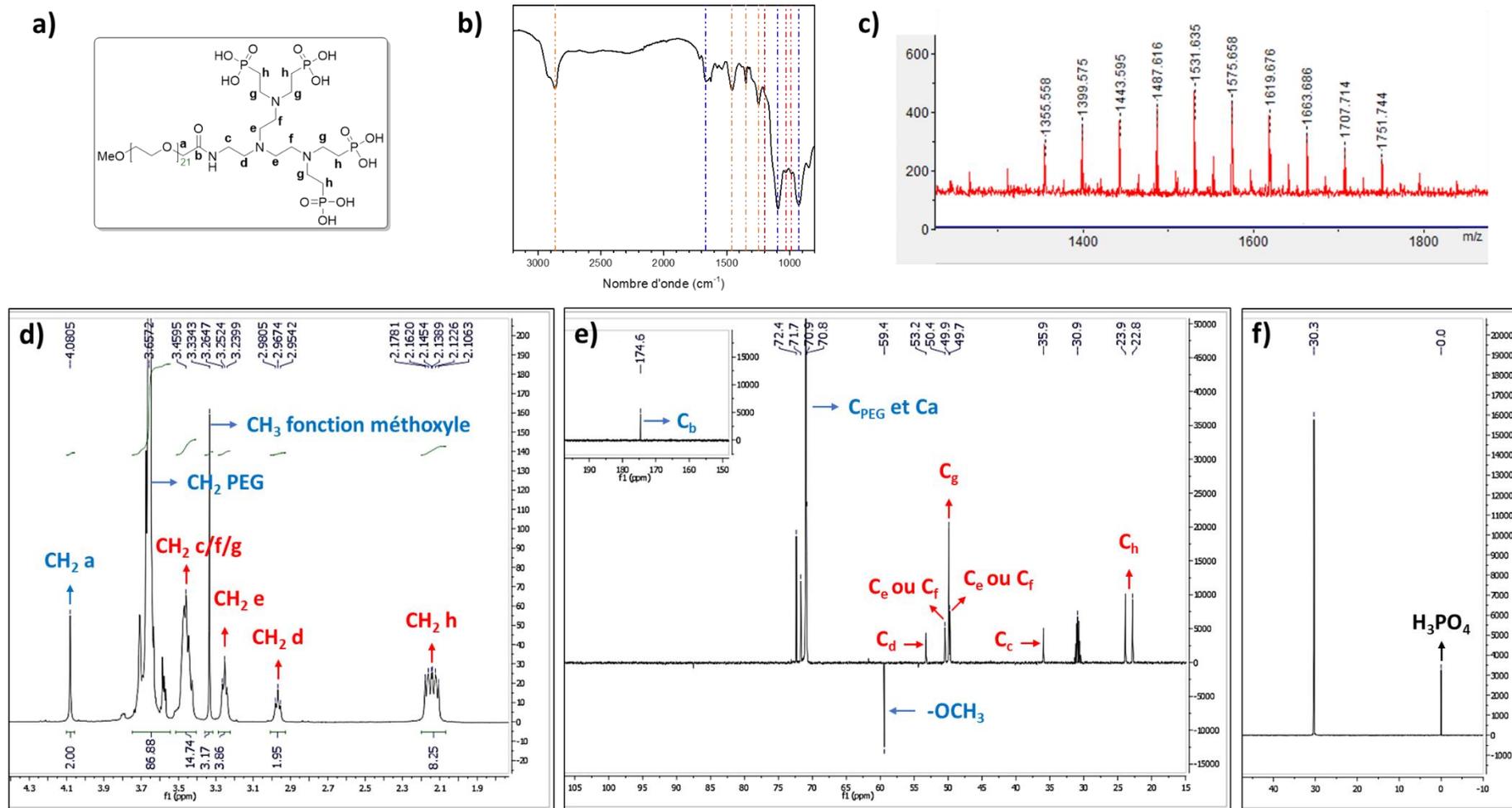


Figure 110 : a) molécule **L9**, b) spectre FTIR, c) spectre MALDI-TOF, d) spectre RMN ^1H (500,12 MHz), e) spectre RMN ^{13}C (125,76 MHz, global + agrandissement) et f) spectre ^{31}P (202,6 MHz)

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 2. Accès aux polyéthylènes glycols bifonctionnalisés

L'analyse du spectre FTIR (Figure 110b) présente des vibrations caractéristiques de la liaison amide à 1668 cm^{-1} et des liaisons C-O et C-C à 1093 cm^{-1} et 927 cm^{-1} (lignes pointillées bleues), et les vibrations des groupements méthylènes à 2866 cm^{-1} , 1456 cm^{-1} , 1346 cm^{-1} et 1245 cm^{-1} (lignes pointillées oranges). Ces bandes caractéristiques sont retrouvées pour tous les ligands PEGs synthétisés, ainsi que les vibrations des liaisons P=O (épaulement à environ 1200 cm^{-1}) et P-OH (1049 cm^{-1} et 974 cm^{-1}) (lignes pointillées rouges).

L'analyse MALDI-TOF (Figure 110c) fait ressortir deux populations pour ce composé. La population majoritaire correspond à l'adduit protoné, tandis que la population minoritaire représente l'adduit sodique du ligand. Ce résultat a été retrouvé pour tous les autres ligands.

Certains signaux caractéristiques en RMN sont retrouvés pour l'ensemble des ligands PEGs-tétra-phosphonate, avec notamment en RMN ^1H (Figure 110d) :

- Un singulet à 4,08 ppm, intégrant deux protons (bleu), attribué aux protons portés par le carbone en alpha de la liaison amide.
- Un singulet à 3,33 ppm, intégrant 3 protons (magenta), attribué à la fonction méthoxyle terminale.
- Un multiplet à 2,14 ppm, intégrant huit protons (rouge), attribué aux protons portés par les carbones en alpha des fonctions acide tétra-phosphonique.

et en RMN ^{13}C (Figure 110e) :

- Un signal à 174,6 ppm correspondant au carbone (vert) de la fonction amide.
- Un signal à 59,4 ppm correspondant au carbone (magenta) de la fonction méthoxyle.
- Un doublet à 23,4 ppm correspondant au couplage $^1J_{\text{C-P}} = 133\text{ Hz}$ des quatre carbones (rouge) en alpha des fonctions acide tétra-phosphonique.

L'analyse des spectres ^{31}P a fait ressortir pour tous les dérivés une pureté supérieure à 99% (cf. exemple Figure 110f). Le signal à 0,0 ppm représente la référence acide phosphorique.

Pour conclure cette partie, nous avons pu accéder aux différents ligands d'hydrophilisation souhaités avec d'excellentes puretés et des rendements globaux (calculés à partir de la plus longue séquence linéaire) sur 5 à 7 étapes compris entre 16 et 42% pour les PEGs 1000 et entre 13% et 42% pour les PEGs 2000. Ces rendements ont été suffisants pour obtenir les quantités de matière requises pour les études d'échange de ligands et de stabilité des UCNPs hydrophilisées.

Chapitre 3. Accès aux dérivés ADIBO-KuE(1-4)

Comme évoqué précédemment, différents conjugués associant l'ADIBO au ligand du PSMA (i.e. résidu KuE) ont été développés dans le but d'étudier l'influence, vis-à-vis de la reconnaissance au récepteur prostatique, de l'espaceur introduit entre ces deux entités. Notre choix s'est porté sur les molécules **ADIBO-KuE(1-4)** présentées dans la Figure 111 ci-après :

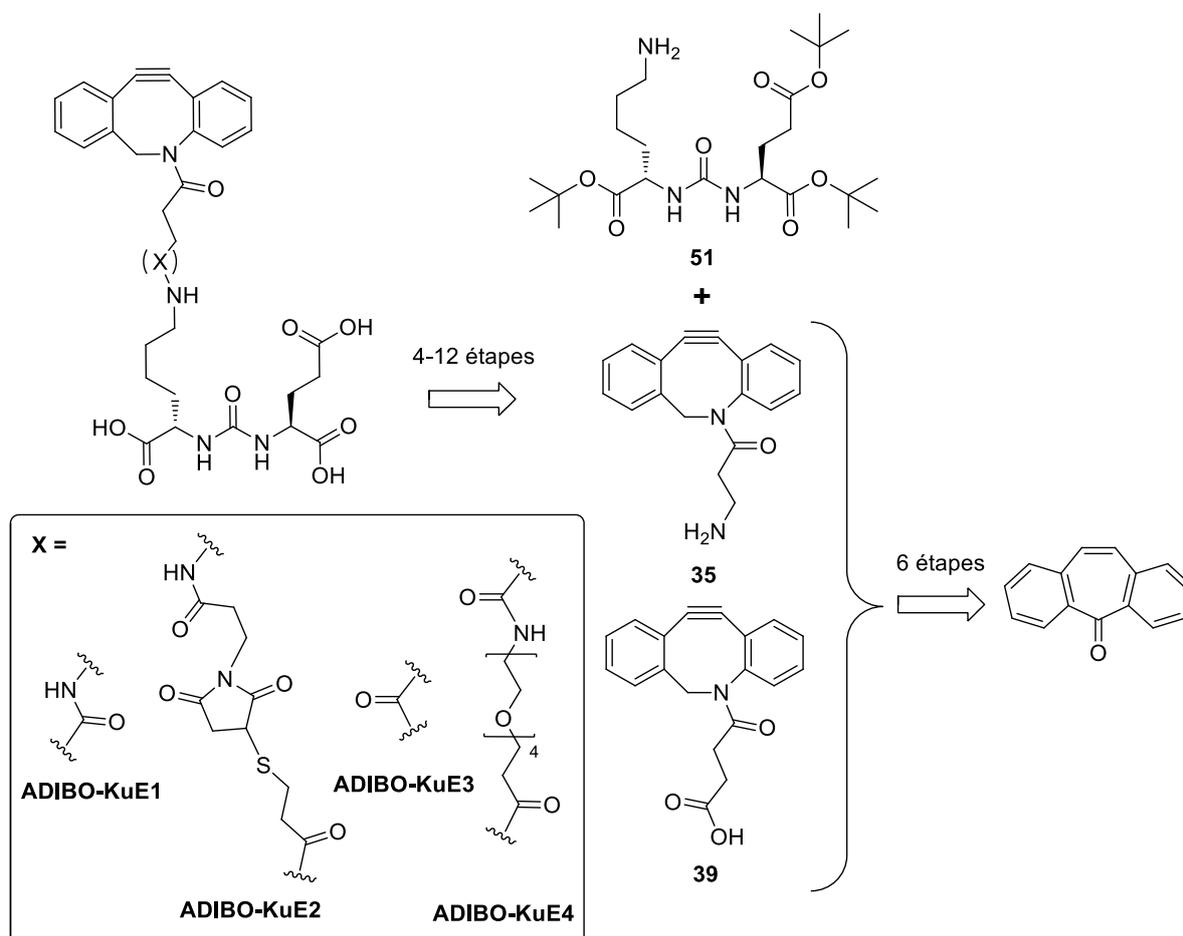


Figure 111 : schéma rétrosynthétique des différents conjugués **ADIBO-KuE** envisagés **ADIBO-KuE1**, **ADIBO-KuE2**, **ADIBO-KuE3** et **ADIBO-KuE4**

Ces différents conjugués ont été synthétisés à partir du composé KuE protégé **51** et des intermédiaires ADIBO-amine **35** et ADIBO-acide carboxylique **39**. Ces derniers ont été obtenus à partir de la dibenzosubérone commerciale en 6 étapes.

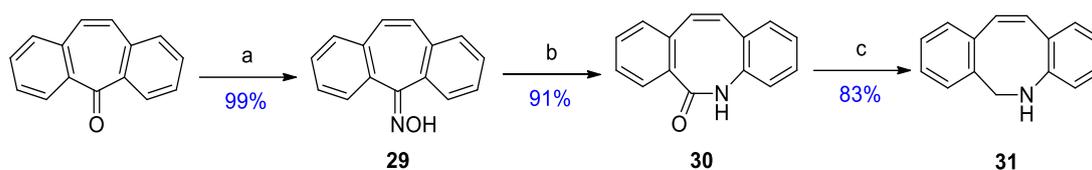
3.1. Accès à l'ADIBO non substitué **31**

L'accès aux synthons clés comportant un ADIBO *N*-fonctionnalisé a nécessité au préalable la synthèse du précurseur commun **31**, obtenu selon la méthode décrite par

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 3. Accès aux dérivés ADIBO-KuE(1-4)

Chadwick *et al.*²⁷⁵ en 3 étapes à partir de la dibenzosubérénone (cf. Figure 112).



Réactifs et conditions : a) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, pyridine, reflux, 15 h ; b) Réactif d'Eaton, 100 °C, 1 h ; c) LAH 4 M, Et_2O , reflux, 20 h

Figure 112 : synthèse de l'azacyclooctène **31**

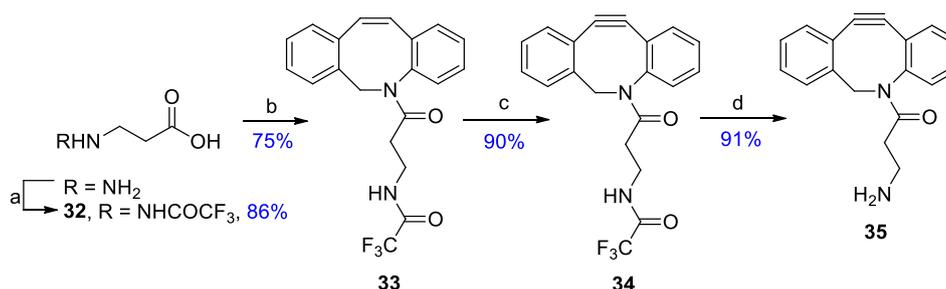
L'oxime **29** est obtenue après action de l'hydroxylamine sur la dibenzosubérénone dans la pyridine à reflux. S'en suit un réarrangement de Beckmann en présence du réactif d'Eaton (hémipentaoxyde de phosphore dans l'acide méthanesulfonique) pour conduire au lactame **30** qui est finalement réduit en amine par l'aluminohydrure de lithium (LAH) dans l'éther diéthylique anhydre.²⁷⁶ L'amine **31** est ainsi obtenue avec un rendement global sur trois étapes de 75%.

3.2. Synthèse des précurseurs de couplage **35**, **39**, **41** et **49**

L'amine **31** obtenue précédemment a ensuite servi de base à la synthèse des ADIBO **35** et **41** ainsi que **39** et **49** *N*-fonctionnalisés respectivement par des bras 3-oxopropylamine et acide 3-oxopropylcarboxylique. Les voies d'accès à ces composés ont été reprises des travaux de Kuzmin *et al.*²⁷⁶ avec quelques légères modifications.

3.2.1. Synthèse de l'ADIBO propylamine **35**

L'obtention du dérivé 3-oxopropylamine a été réalisée en 4 étapes à partir de l'azacyclooctène **31** et de la β -alanine. La β -alanine a d'abord été protégée sur sa fonction amine primaire par un groupement trifluoroacétyl puis couplée, après activation sous forme de chlorure d'acyle, à l'amine **31**. Après conversion de la fonction alcène en alcyne, la fonction amine portée par la chaîne alkyle a finalement été déprotégée (cf. Figure 113).



Réactifs et conditions : a) $\text{F}_3\text{CCO}_2\text{Et}$, TEA, MeOH, t.a., 20 h ; b) (i) $(\text{COCl})_2$, CH_2Cl_2 , DMF, 0 °C, 2 h puis t.a., 2 h, (ii) CH_2Cl_2 , **31**, pyridine, t.a., 1 h ; c) (i) Br_2 , CH_2Cl_2 , 0 °C, 2 h, (ii) *tert*-BuOK, THF, -40 °C à 0 °C, 5 h, (iii) *tert*-BuOK, 0 °C, 45 min ; d) K_2CO_3 , MeOH, H_2O , t.a., 24 h

Figure 113 : synthèse de l'ADIBO amine **35**

²⁷⁵ Chadwick, R. C.; Van Gyzen, S.; Liogier, S.; Adronov, A. Scalable synthesis of strained cyclooctyne derivatives. *Synthesis* **2014**, 46, 669-677.

²⁷⁶ Kuzmin, A.; Poloukhine, A.; Wolfert, M. A.; Popik, V. V. Surface functionalization using catalyst-free azide-alkyne cycloaddition. *Bioconjugate Chem.* **2010**, 21(11):2076-2085.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 3. Accès aux dérivés ADIBO-KuE(1-4)

La première étape de protection de la β -alanine a été réalisée dans le méthanol en milieu basique et en présence de trifluoroacétate d'éthyle, puis l'amide **32** obtenu a été purifié par recristallisation.²⁷⁷ À noter que cette réaction d'aminolyse a été réalisée à température ambiante car favorisée par la présence du groupement trifluorométhyle en alpha du carbonyle. Après synthèse du chlorure d'acyle correspondant (non isolé), obtenu par réaction avec le chlorure d'oxalyle catalysée par du DMF, une étape d'acylation de l'ADIBO amine **31** en présence de pyridine a permis d'accéder au dérivé **33**.

L'azacyclooctène **33** a ensuite été traité par du dibrome dans le dichlorométhane à 0 °C pendant 1 heure pour conduire à l'intermédiaire dibromé correspondant.²⁷⁵ Le suivi de cette étape est primordial pour la purification du produit final. En effet, l'alcène et l'alcyne ont des rapports frontaux presque identiques en CCM ($R_f = 0,21$). Ainsi la consommation de l'alcène **33** lors de cette première étape doit être complète. Pour se faire, un suivi par RMN ^1H a été réalisé permettant de visualiser la disparition totale des deux doublets caractéristiques des protons de l'alcène du composé **33** à 6,57 ppm et 6,80 ppm (Figure 114).

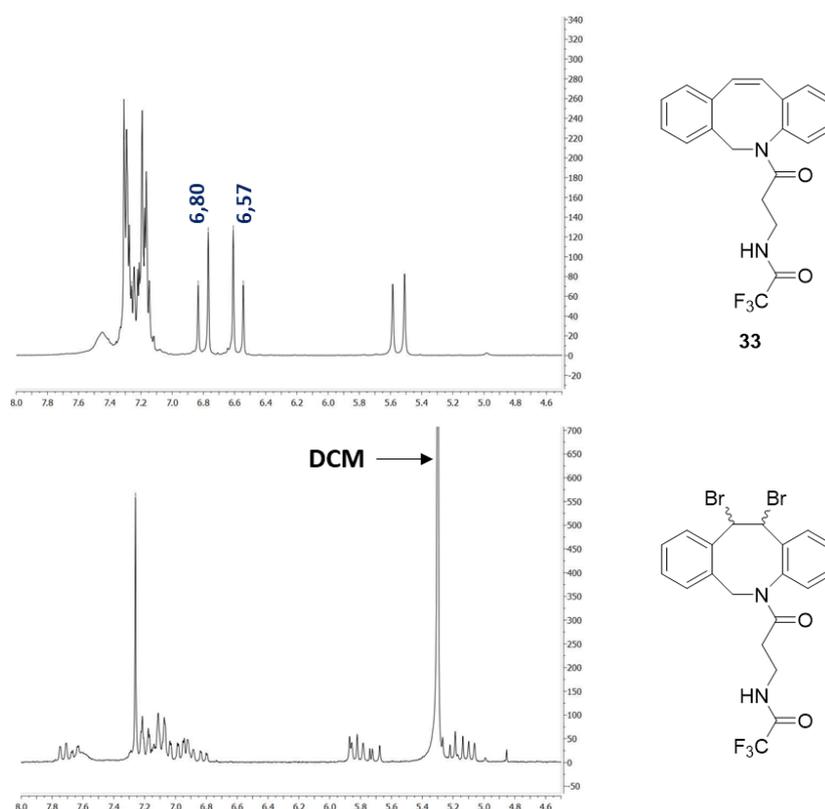


Figure 114 : exemple de suivi par RMN ^1H dans le CDCl_3 de la disparition des signaux caractéristiques des protons éthyléniques du composé **33** lors de la réaction de dibromation

²⁷⁷ Clark, J. S.; Hodgson, P. B.; Goldsmith, M. D.; Street, L. J. Rearrangement of ammonium ylides produced by intramolecular reaction of catalytically generated metal carbenoids. Part 1. Synthesis of cyclic amines. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2001**, 24:3312-3324.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

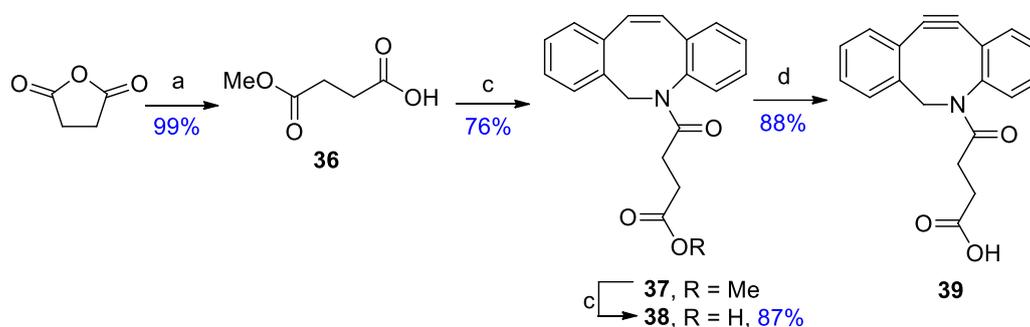
Chapitre 3. Accès aux dérivés ADIBO-KuE(1-4)

Après évaporation du mélange réactionnel en maintenant la température du bain inférieure à 35 °C, les dérivés dibromés non purifiés et instables ont été directement traités par du *tert*-butylate de potassium dans le tétrahydrofurane anhydre pour conduire, après une di-déhydrobromation, à l'azacyclooctyne désiré **34**.

Ce dernier a enfin été mis en réaction dans un mélange d'eau et de méthanol en présence de K₂CO₃ afin de déprotéger l'amine terminale. Le composé **35** est ainsi obtenu après purification avec un rendement de 91%.

3.2.2. Synthèse de l'ADIBO acide **39**

Le dérivé ADIBO acide **39** a été obtenu suivant une approche similaire à celle développée pour le composé **35** (cf. Figure 115), à partir d'un acide succinique mono-protégé sous forme d'ester méthylique.



Réactifs et conditions : a) CH₃ONa, MeOH, reflux, 1 h 30 ; b) (i) (COCl)₂, CH₂Cl₂, DMF, t.a., 3 h, (ii) CH₂Cl₂, **31**, TEA, 0 °C à t.a., 2 h ; c) LiOH, H₂O, MeOH, reflux, 18 h ; d) (i) Br₂, CH₂Cl₂, 0 °C, 2 h, (ii) *tert*-BuOK, THF, -40 °C, 1 h 30

Figure 115 : synthèse de l'ADIBO acide **39**

Dans un premier temps, l'acide succinique a été mono-protégé sous forme d'ester méthylique via le traitement de l'anhydride succinique par une solution méthanolique contenant une quantité catalytique de méthylate de sodium.²⁷⁸ L'acide **36** ainsi obtenu a été traité, comme précédemment décrit pour la β-alanine *N*-protégée, par du chlorure d'oxalyle en présence de DMF pour conduire au chlorure d'acyle (non isolé) correspondant, avant acylation de l'amine secondaire de l'ADIBO **31**.²⁷⁹ L'ester **37** ainsi formé a ensuite été déprotégé par saponification en présence d'hydroxyde de lithium dans le méthanol à reflux pour conduire, après acidification, à l'acide carboxylique **38**. Ce dernier a enfin été mis en réaction, dans un premier temps, avec du dibrome, puis avec le *tert*-butylate de potassium selon la même approche de dibromation/élimination décrite pour la synthèse du composé **34**, pour conduire à l'azacyclooctyne **39**.

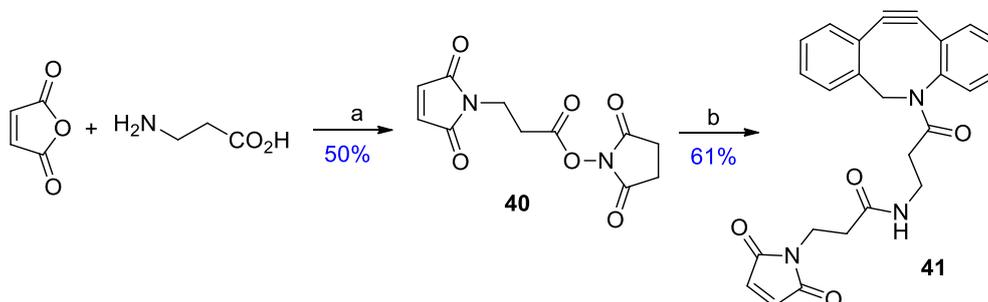
²⁷⁸ Von Wantoch Rekowski, M.; Kumar, V.; Zhou, Z.; Moschner, J.; Marazioti, A.; Bantzi, M.; Spyroulias, G. A.; van den Akker, F.; Giannis, A.; Papapetropoulos, A. Insights into soluble guanylyl cyclase activation derived from improved heme-mimetics. *J. Med. Chem.* **2013**, 56(21):8948-8952.

²⁷⁹ Hubbard, T. A.; Brown, A. J.; Bell, I. A. W.; Cockroft, S. L. The limit of intramolecular bonding. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138(46):15114-15117.

RÉSULTATS ET DISCUSSION
Chapitre 3. Accès aux dérivés ADIBO-KuE(1-4)

3.2.3. Synthèse de l'ADIBO maléimide **41**

Le troisième synthon ADIBO, fonctionnalisé par un groupement maléimide, a été obtenu en deux étapes à partir du précurseur **35** (cf. Figure 116).



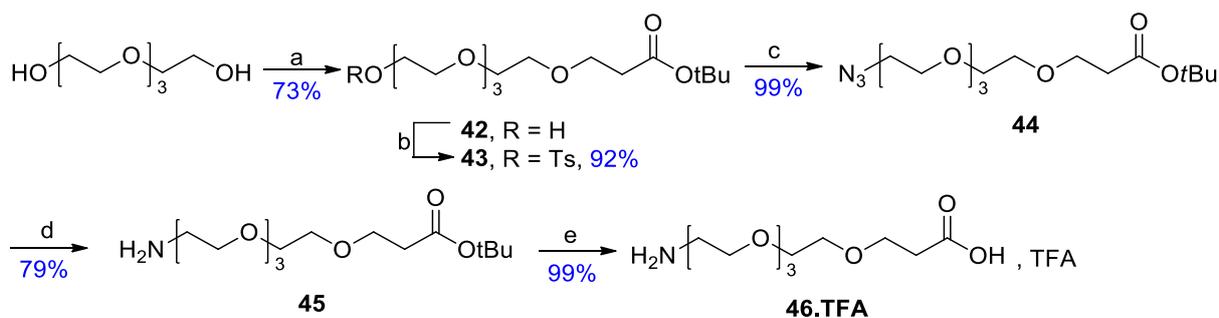
Réactifs et conditions : a) (i) DMF, 70 °C, 2 h ; (ii) NHS, DCC, 0 °C à t.a., 18 h ; b) **35**, DIPEA, ACN, t.a., 1 h 30

Figure 116 : synthèse de l'ADIBO maléimide **41**

La première étape, tirée des travaux de Magano J. *et al.*,²⁸⁰ a consisté à faire réagir la β -alanine sur l'anhydride maléique dans le DMF à 70 °C pendant 2 heures pour former le précurseur acide 3-maléimidopropanoïque, non isolé, qui a ensuite été converti en ester de NHS **40**. Ce dérivé a alors été couplé à l'ADIBO amine **35** en présence de DIPEA pour conduire, après purification, à l'ADIBO maléimide **41** désiré avec un rendement global sur deux étapes de 31%.

3.2.4. Synthèse de l'ADIBO-PEG₄-CONHS **49**

L'obtention de ce dernier intermédiaire a nécessité au préalable l'élaboration d'un dérivé amino-PEG₄-CO₂H suivant la voie de synthèse décrite ci-après dans la Figure 117.



Réactifs et conditions : a) (i) NaH 60%, acrylate de *tert*-butyle, THF, t.a., 20 h, (ii) AcOH, H₂O, t.a., 20 min ; b) TsCl, pyridine, 0 °C, 2 h, puis 4 °C, 60 h ; c) NaN₃, DMF, t.a., 24 h puis 55 °C, 1 h 30 ; d) PPh₃, Et₂O, H₂O, t.a., 13 h ; e) CH₂Cl₂, anisole, TFA, t.a., 24 h

Figure 117 : synthèse du dérivé aminoacide pégylé **46.TFA**

²⁸⁰ Magano, J.; Conway, B. G.; Farrand, D.; Lovdahl, M.; Maloney, M. T.; Pozzo, M. J.; Teixeira, J. J.; Rizzo, J.; Tumelty, D. Scalable and cost-effective synthesis of a linker for bioconjugation with a peptide and a monoclonal antibody. *Synthesis* **2014**, 46(10):1399-1406.

RÉSULTATS ET DISCUSSION
Chapitre 3. Accès aux dérivés ADIBO-KuE(1-4)

La première étape a consisté en une addition de Michaël de l'acrylate de *tert*-butyle sur le tétraéthylène glycol en présence d'une quantité catalytique d'hydrure de sodium.²⁸¹ Après purification, l'alcool **42** a ensuite été activé sous forme d'ester de l'acide *para*-toluènesulfonique en présence de chlorure de tosylo et de pyridine. Après substitution nucléophile du tosylo du composé **43** par de l'azoture de sodium, la fonction azide du dérivé **44** a été réduite en présence de triphénylphosphine et d'eau selon la réaction de Staudinger. La fonction acide de l'ester de *tert*-butyle **45** a enfin été déprotégée par un mélange d'une solution de TFA dans le dichlorométhane (1/2, v/v) et d'anisole pour conduire, après lyophilisation, à l'acide aminé **46.TFA** sous forme de sel.

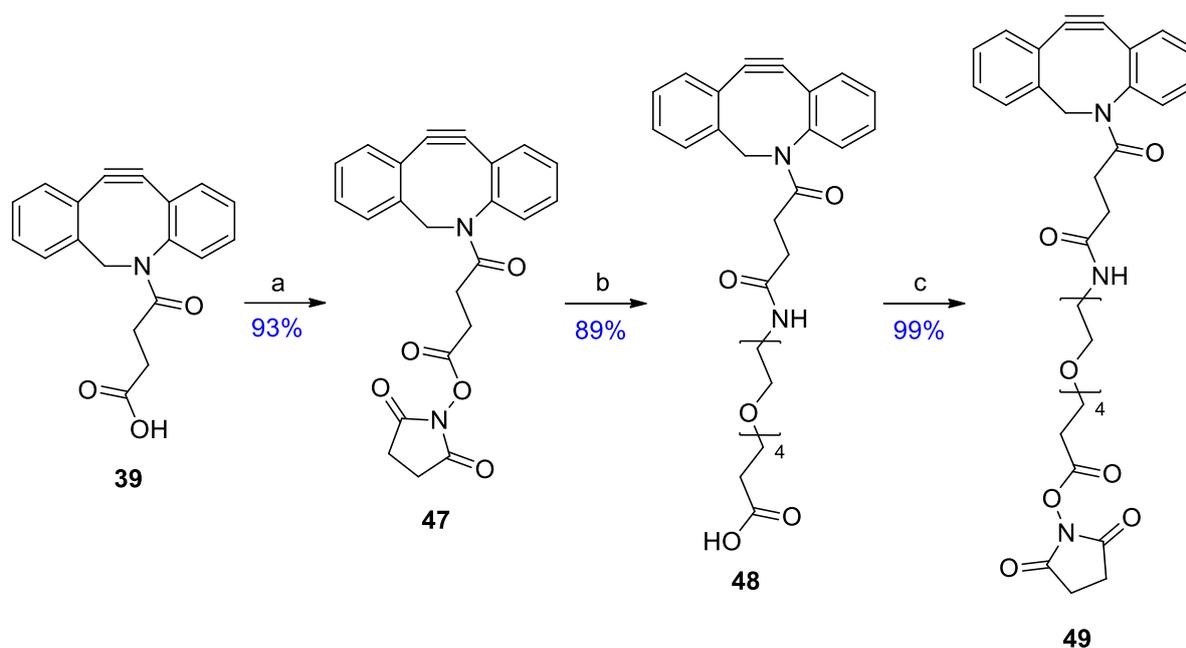


Figure 118 : synthèse de l'ADIBO-PEG₄-CONHS **49**

En parallèle, l'acide **39** a été mis en réaction avec de l'EDCI.HCl en présence du NHS pour conduire, après purification, à l'ester activé **47** (cf. Figure 118 ci-avant).²⁸² Ce composé a alors été traité avec l'acide aminé pégylé **46.TFA** dans le DMF en présence de DIPEA pendant 24 heures. L'acide pégylé **48** a enfin été mis en réaction dans le dichlorométhane en présence de NHS et d'EDCI.HCl pour conduire, sans purification, au quatrième synthon ADIBO **49** désiré. À noter que ce composé, instable, doit être engagé rapidement après obtention dans suivante l'étape.

²⁸¹ Yacob, Z.; Nan, A.; Liebsher, J. Proline-functionalized magnetic core-shell nanoparticles as efficient and recyclable organocatalysts for aldol reactions. *Adv. Synth. Catal.* **2012**, 354(17):3259-3264.

²⁸² Campbell-Verduyn, L. S.; Mirfeizi, L.; Schoonen, A. K.; Dierckx, R. A.; Elsinga, P. H.; Feringa, B. L. Strain promoted copper-free "Click" chemistry for ¹⁸F-radiolabeling of bombesin. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50(47):11117-11120.

RÉSULTATS ET DISCUSSION
Chapitre 3. Accès aux dérivés ADIBO-KuE(1-4)

3.3. Accès au ligand du PSMA (KuE) et analogues

De manière à avoir diverses options de couplage entre l'ADIBO et le ligand KuE, deux dérivés de ce dernier ont été synthétisés, l'amine **51** pouvant être couplée à des esters ou carbamates activés ainsi que le thiol **54** pouvant réagir avec un résidu maléimide (cf. Figure 119).

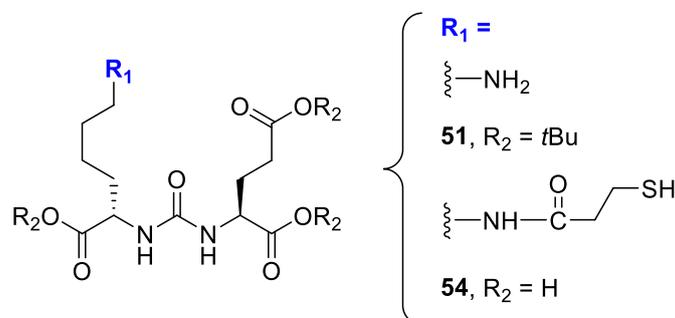
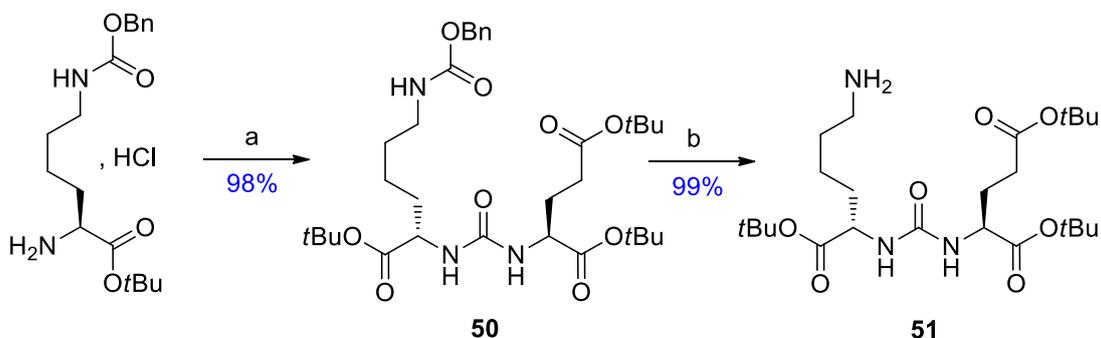


Figure 119 : schéma des dérivés KuE envisagés

3.3.1. Synthèse du précurseur **51**

Ce dérivé du KuE, dont l'ensemble des fonctions acides carboxyliques sont protégées sous forme d'ester de *tert*-butyle, est un intermédiaire clef dans la synthèse des différents conjugués **ADIBO-KuE** envisagés. La première étape pour accéder au composé **51** a consisté à coupler le L-glutamate de di-*tert*-butyle avec l'ester de *tert*-butyle de la L-lysine, dont l'amine portée par le carbone ϵ est mono-protégée sous forme de CBZ, en présence de triphosgène d'après un protocole de Mc Enaney *et al.* (cf. Figure 120).²⁸³



Réactifs et conditions : a) (i) TEA, triphosgène, CH₂Cl₂, -78 °C à t.a., 30 min, (ii) Ester de *tert*-butyle de la N ϵ -CBZ-L-lysine, TEA, t.a., 20 h ; b) MeOH, H₂, Pd/C 10%, t.a., 24 h

Figure 120 : synthèse du ligand KuE triprotégé **51**

Dans un premier temps, le glutamate a été mis en réaction avec de la triéthylamine (TEA) et du triphosgène à -78 °C pour former l'isocyanate correspondant. La lysine N-CBZ a alors été ajoutée au milieu réactionnel après retour à température ambiante pour conduire au dérivé

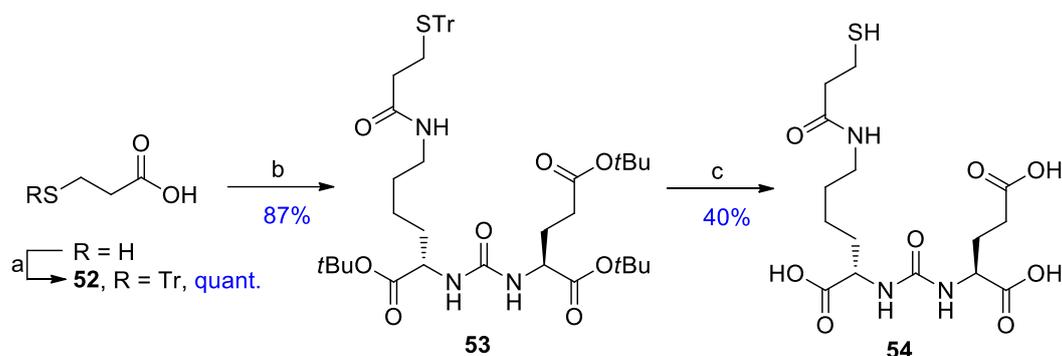
²⁸³ McEnaney, P. J.; Fitzgerald, K. J.; Zhang, A. X.; Douglas Jr, E. F.; Shan, W.; Balog, A.; Kolesnikova, M. D.; Spiegel, D. A. Chemically synthesized molecules with the targeting and effector functions of antibodies. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136(52):18034-18043.

RÉSULTATS ET DISCUSSION
Chapitre 3. Accès aux dérivés ADIBO-KuE(1-4)

50. Après purification, l'amine a été déprotégée par hydrogénation pallado-catalysée pendant une nuit pour conduire après purification au précurseur commun **51**.

3.3.2. Synthèse du dérivé KuE-thiol **54**

La fonction thiol a été introduite par couplage peptidique de l'acide 3-(tritylthio)propanoïque sur l'amine du dérivé **51** (cf. Figure 121).



Réactifs et conditions : a) TrCl, CH₂Cl₂, t.a., 15 h ; b) **51**, HOBt, DIPEA, EDCI.HCl, DMF, -10 °C à t.a., 22 h ; c) CH₂Cl₂, TFA, *i*-Pr₃SiH, 0 °C à t.a., 19 h

Figure 121 : synthèse du thiol **54**

Dans un premier temps, l'acide 3-mercaptopropionique a été protégé sur sa fonction thiol sous forme de trityle par substitution nucléophile de type S_N1 du chlorure de trityle.²⁷⁰ L'acide **52** ainsi obtenu a été mis en réaction dans le DMF (pour des raisons de solubilité) avec de l'hydroxybenzotriazole (HOBt), de la DIPEA et de l'EDCI.HCl pour conduire par couplage peptidique à l'amide **53** avec un rendement de 87%. Ce dernier a enfin été déprotégé par une solution de TFA dans le dichlorométhane (1/4, v/v) en présence de triisopropylsilane pendant 19 heures puis purifié directement par chromatographie liquide haute performance (CLHP) préparative pour aboutir, après lyophilisation, au composé **54** avec un rendement de 40%.²⁸⁴

3.4. Synthèse des conjugués ADIBO-KuE

Cette étape a consisté à associer les différents synthons ADIBO et KuE préalablement développés.

3.4.1. Synthèse du conjugué ADIBO-KuE1

La première stratégie de conjugaison a consisté à coupler l'ADIBO amine **35** au ligand du PSMA triprotégé **51** via la formation d'une liaison urée puis à hydrolyser les fonctions esters de *tert*-butyle.

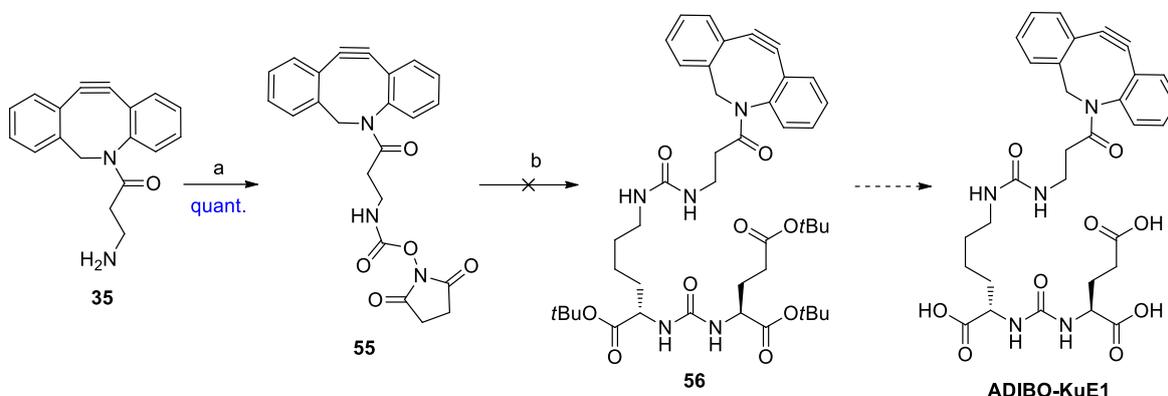
²⁸⁴ Mukai, T.; Namba, S.; Arano, Y.; Ono, M.; Fujioka, Y.; Uehara, T.; Ogawa, K.; Konishi, J.; Saji, H. Synthesis and evaluation of a monoreactive DOTA derivative for indium-111-based residualizing label to estimate protein pharmacokinetics. *J. Pharma. Pharmacol.* **2002**, 54(8):1073-1081.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 3. Accès aux dérivés ADIBO-KuE(1-4)

3.4.1.1. Première voie de synthèse de l'ADIBO-KuE1

Ce couplage a été envisagé en trois temps, consistant tout d'abord en la synthèse d'un carbamate activé à partir de l'ADIBO amine **35**, suivie de la condensation de ce dernier sur l'amine **51** puis de la déprotection des fonctions acides du résidu KuE (cf. Figure 122).

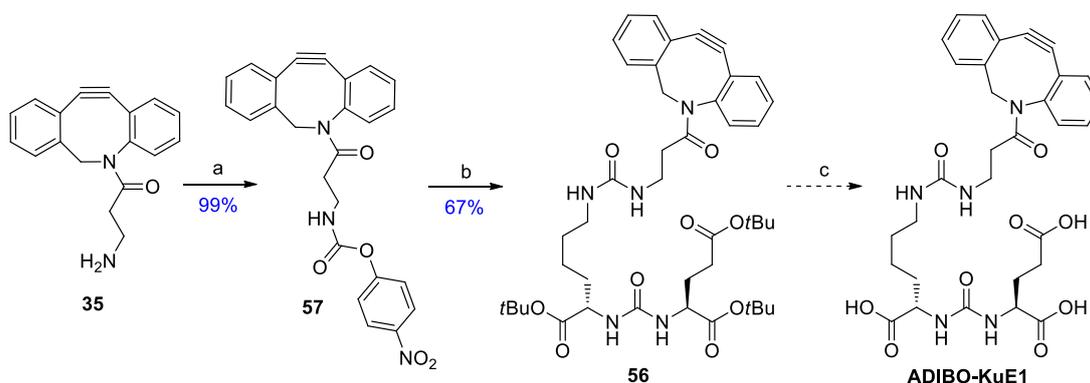


Réactifs et conditions : a) carbonate de *N,N'*-disuccinimidyde, TEA, THF, t.a., 4 h ; b) **51**, CH₂Cl₂, DIPEA, t.a., 4 h

Figure 122 : première voie d'accès au conjugué ADIBO-KuE1

Le composé **35** a été mis en réaction avec le carbonate de *N,N'*-disuccinimidyle dans le tétrahydrofurane anhydre en présence de TEA à température ambiante pendant 4 heures. Après traitement du milieu réactionnel, le carbamate de NHS **55** obtenu, non purifié et instable, a alors été engagé directement dans l'étape suivante de couplage à l'amine **51**. Cette réaction a été réalisée dans le dichlorométhane anhydre en présence de DIPEA à température ambiante. Toutefois, après 4 heures de réaction et bien que le carbamate ait été consommé, le composé **56** n'a pu être isolé. Ceci peut s'expliquer par la faible stabilité du précurseur **55** associé à un manque de précautions lors de son utilisation.

Une autre voie d'accès a été réalisée en parallèle, mettant en jeu cette fois-ci un carbamate de *p*-nitrophényle (cf. Figure 123).



Réactifs et conditions : a) chloroformiate de *p*-nitrophényle, TEA, CH₂Cl₂, 0 °C, 1 h 30 ; b) CH₂Cl₂, DIPEA, **51**, t.a., 6 h ; c) CH₂Cl₂, TFA, t.a., 24 h, ou CH₂Cl₂, H₂SO₄, t.a., 18 h, ou SiO₂, toluène, reflux, 4 h, ou CH₂Cl₂, H₃PO₄ 85% aq., t.a., 28 h

Figure 123 : deuxième voie d'accès au conjugué ADIBO-KuE1

RÉSULTATS ET DISCUSSION
Chapitre 3. Accès aux dérivés ADIBO-KuE(1-4)

L'ADIBO propylamine **35** a été mis en réaction avec le chloroformiate de *p*-nitrophényle dans le dichlorométhane en présence de TEA à 0 °C pendant 1 heure 30 minutes. Après extraction avec une solution aqueuse de bicarbonate de sodium, le carbamate activé **57**, instable, a été rapidement engagé sans purification dans l'étape de couplage à l'amine **51**. Cette réaction a été réalisée à température ambiante dans le dichlorométhane et en présence de DIPEA pour conduire, après purification sur colonne, à l'urée **56** avec un rendement de 67%.

La dernière étape consistait en la déprotection des fonctions acides carboxyliques du résidu KuE. Une première méthode étudiée, précédemment utilisée avec succès, a consisté à traiter la molécule **56** par une solution de TFA dans le dichlorométhane (1/4, v/v). Après 24 heures à température ambiante, le milieu réactionnel a été évaporé sous pression réduite puis le résidu a été analysé en RMN ¹H dans le méthanol deutéré. Cette analyse semblait indiquer la présence du produit attendu. Toutefois après trituration du précipité dans l'éther diéthylique, seul un composé polyaromatique, de couleur rouge, a pu être isolé.

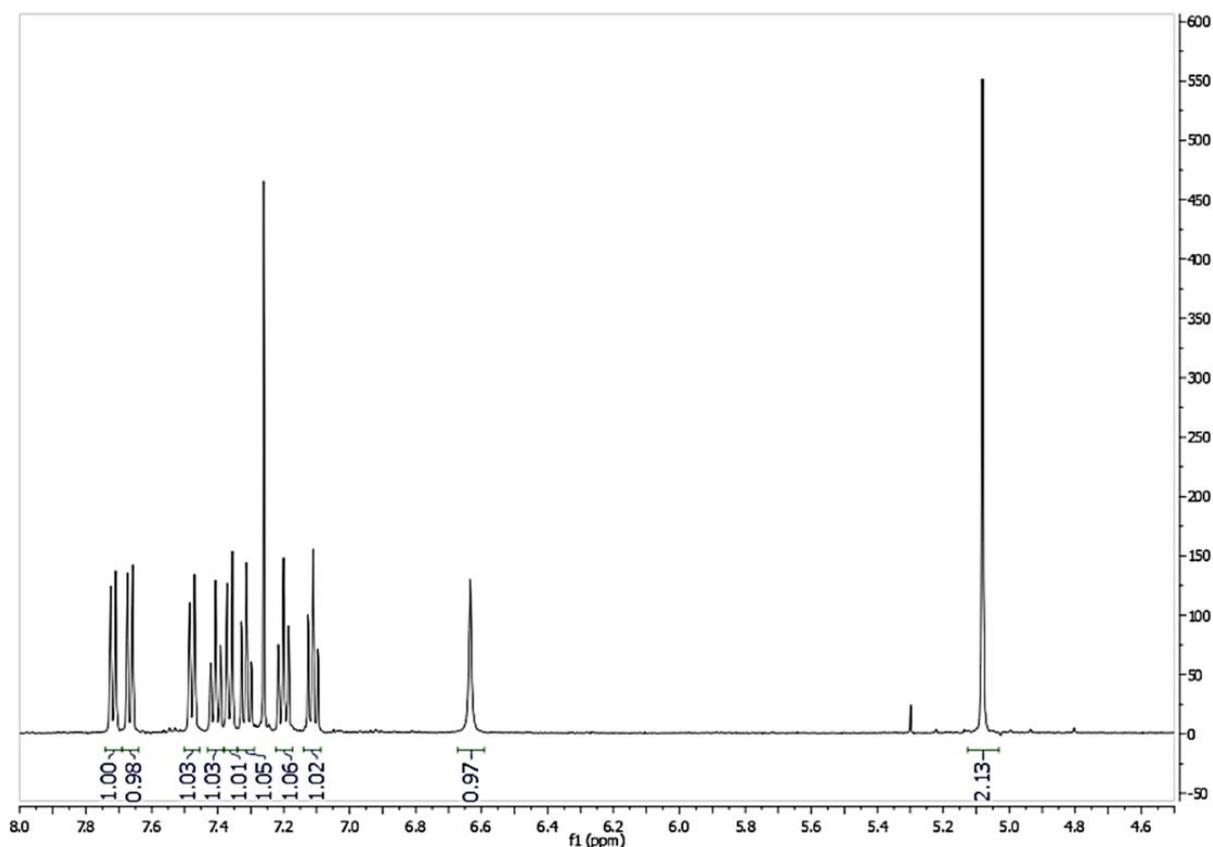


Figure 124 : spectre ¹H RMN dans le CDCl₃ du produit de dégradation du composé **56**

En tenant compte notamment de l'analyse RMN ¹H (cf. Figure 124), ce composé a pu être identifié comme étant le 6*H*-isoindolo[2,1-*a*]indole **56a** résultant d'une dégradation

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 3. Accès aux dérivés ADIBO-KuE(1-4)

importante du composé de départ par cyclisation de type 5-endo-dig (cf. Figure 125).^{285,286}

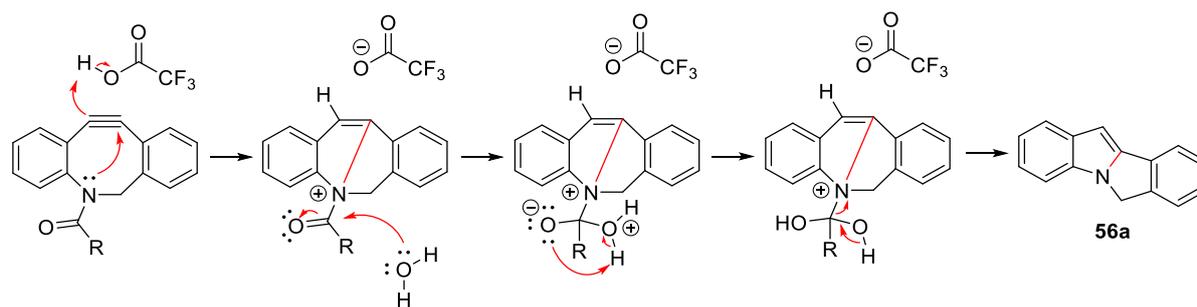


Figure 125 : mécanisme proposé de la formation du produit secondaire isolé **56a** après traitement acide de l'ADIBO **56**

Un mécanisme possible consiste en l'attaque du doublet non liant de l'azote de la fonction amide tertiaire sur le carbone sp de l'alcyne contraint, rendu extrêmement réactif en milieu acide. S'en suit, lors du traitement de la réaction, une hydrolyse de la fonction amidium conduisant au dérivé tétracyclique **56a**, après élimination de la chaîne alkyle sous forme d'acide carboxylique.

Face à ce problème, des méthodes de déprotection d'ester de *tert*-butyle alternatives ont été évaluées. Des premiers essais ont été réalisés dans le dichlorométhane à température ambiante en présence soit d'acide sulfurique concentré²⁸⁷ soit d'une solution aqueuse d'acide phosphorique à 85%.²⁸⁸ Observant dans les deux cas en suivi CCM la formation prépondérante de la structure polycyclique **56a**, une dernière approche, dans des conditions moins acides, a alors été entreprise. Elle consista à traiter le composé **56** par de la silice à reflux du toluène pendant 4 heures suivant le protocole décrit par Jackson R. W.²⁸⁹ Malgré ces conditions plus douces, une fois encore la formation du composé issu du réarrangement de la structure ADIBO a pu être majoritairement observée.

3.4.1.2. Deuxième voie de synthèse de l'ADIBO-KuE1

La déprotection des fonctions acides du résidu KuE après couplage à l'ADIBO ne semblant pas être possible sans dégrader la structure, une autre approche a été développée. Elle a

²⁸⁵ Chigrinova, M.; McKay, C. S.; Beaulieu, L. P. B.; Udachin, K. A.; Beauchemin, A. M.; Pezacki, J. P. Reattangements and addition reactions of biaryl cyclooctynones and the implications to copper-free click chemistry. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11(21):3436-3441.

²⁸⁶ Debets, M. F.; van Berkel, S. S.; Schoffelen, S.; Rutjes, F. P. J. T.; van Hest, J. C. M.; van Delft, F. L. Azadibenzocyclooctynes for fast and efficient enzyme PEGylation via copper-free (3+2) cycloaddition. *Chem. Commun.* **2010**, 46(1):97-99.

²⁸⁷ Strazzolini, P.; Misuri, N.; Polese, P. Efficient cleavage of carboxylic *tert*-butyl and 1-adamantyl esters, and *N*-Boc-amines using H₂SO₄ in CH₂Cl₂. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46(12):2075-2078.

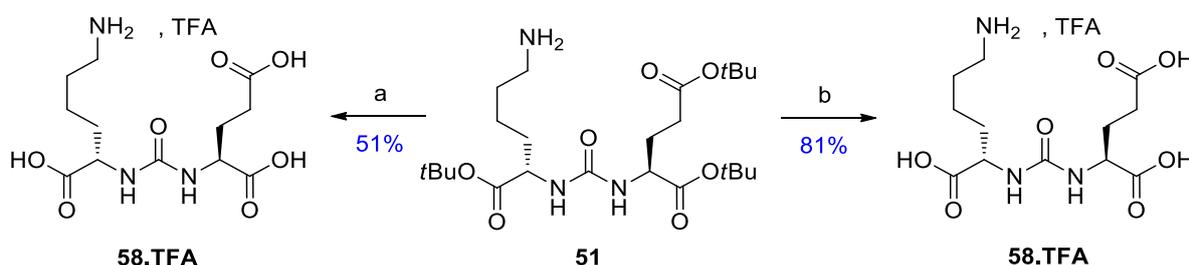
²⁸⁸ Li, B.; Berliner, M.; Buzon, R.; Chiu, C. K. F.; Colgan, S. T.; Kaneko, T.; Keene, N.; Kissel, W.; Le, T.; Leeman, K. R.; Marquez, B.; Morris, R.; Newell, L.; Wunderwald, S.; Witt, M.; Weaver, J.; Zhang, Z.; Zhang, Z. Aqueous phosphoric acid as a mild reagent for deprotection of *tert*-butyl carbamates, esters, and ethers. *J. Org. Chem.* **2006**, 71(24):9045-9050.

²⁸⁹ Jackson, R. W. A mild and selective method for the cleavage of *tert*-butyl esters. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42(31):5163-5165.

RÉSULTATS ET DISCUSSION
Chapitre 3. Accès aux dérivés ADIBO-KuE(1-4)

consisté à déprotéger en amont le ligand du PSMA **51** puis à coupler ce dernier aux dérivés de l'ADIBO comportant un carbamate ou un acide carboxylique activé.

Le clivage des fonctions esters du dérivé KuE **51** a été réalisé à température ambiante au moyen d'une solution de TFA dans le dichlorométhane (1/3, v/v).²⁹⁰ Après évaporation du milieu réactionnel, le résidu a pu être purifié par CLHP préparative pour conduire au triacide **58.TFA** avec un rendement de 51% (cf. Figure 126). Ce rendement modéré pour ce type de réaction est dû probablement soit à une déprotection incomplète d'une des trois fonctions acides carboxyliques, soit à l'alkylation de l'amine primaire par un résidu *tert*-butyle, comme le suivi par RMN ¹H et ¹³C de l'avancement de la réaction a semblé le suggérer.



Réactifs et conditions : a) CH₂Cl₂, TFA, t.a., 20 h ; b) anisole, TFA, -10 °C à t.a., 20 h

Figure 126 : synthèse du ligand KuE **58.TFA**

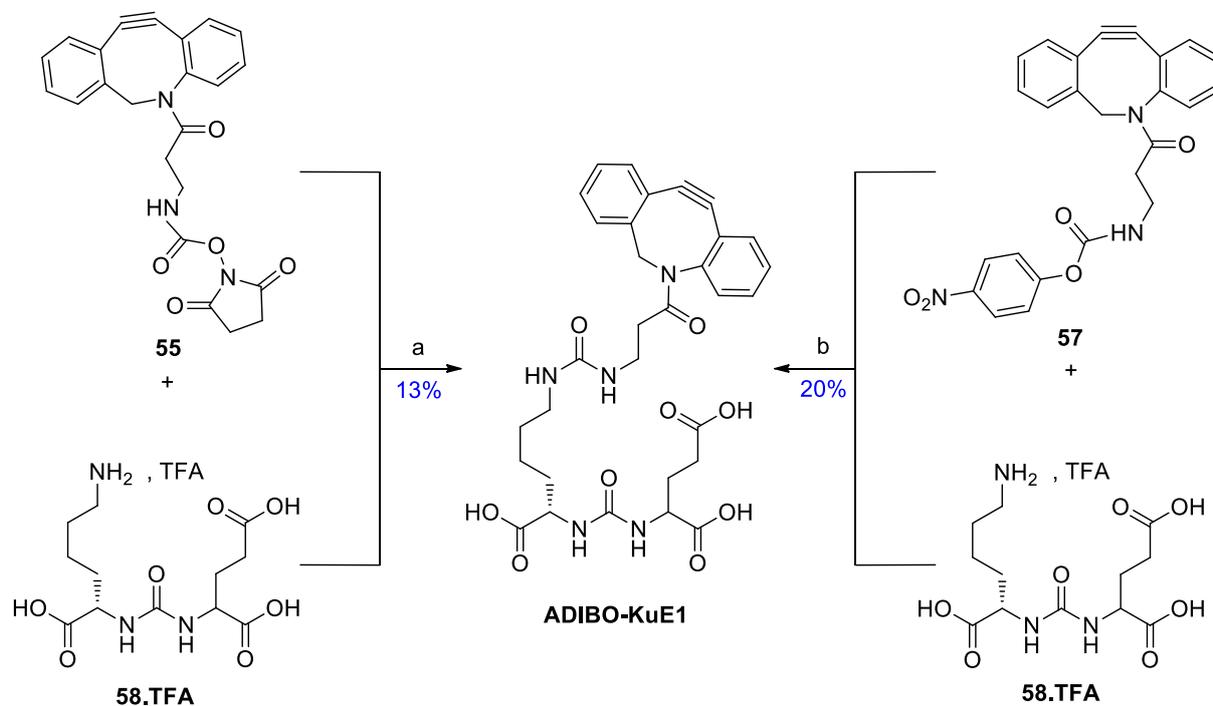
Inspiré des travaux de Mukai, T. *et al.*²⁸⁴ portant sur le clivage des esters de *tert*-butyle d'un dérivé du DOTA, le composé **51** a été mis en solution dans le TFA en présence d'anisole (cf. Figure 126). L'anisole permet ici de piéger les carbocations de *tert*-butyle libérés lors de la déprotection. Suivant cette procédure, le composé désiré **58.TFA** a été obtenu sous forme de sel de TFA après CLHP préparative et lyophilisation avec un rendement nettement amélioré de 81%.

Le composé **58.TFA** a alors été mis en réaction avec le carbamate de *p*-nitrophényle **57** dans le DMSO anhydre et en présence de DIPEA. Après 4 heures d'agitation à température ambiante, le milieu réactionnel a été neutralisé par ajout de TFA puis purifié par CLHP préparative pour conduire après lyophilisation au conjugué **ADIBO-KuE1** avec un rendement de 20%, et un rendement global à partir de la dibenzosubérénone de 9,1% en 8 étapes.

²⁹⁰ Maresca, K. P.; Hillier, S. M.; Femia, F. J.; Keith, D.; Barone, C.; Joyal, J. L.; Zimmerman, C. N.; Kozikowski, A. P.; Barrett, J. A.; Eckelman, W. C.; Babich, J. W. A series of halogenated heterodimeric inhibitors of prostate specific membrane antigen (PSMA) as radiolabelled probes for targeting prostate cancer. *J. Med. Chem.* **2009**, 52(2):347-357.

RÉSULTATS ET DISCUSSION
Chapitre 3. Accès aux dérivés ADIBO-KuE(1-4)

Notons que ce composé a également été obtenu à partir de l'amine **58.TFA** et du carbamate de NHS **55** dans le DMF en présence de DIPEA, mais avec un rendement plus faible (13%, cf. Figure 127).



Réactifs et conditions : a) DMF, DIPEA, t.a., 5 j ; b) DMSO, DIPEA, t.a., 4 h

Figure 127 : synthèse du conjugué ADIBO-KuE1

Toutefois, une dégradation rapide de ce conjugué dès la collecte des fractions après CLHP, a pu être visualisée (virage de la couleur des fractions vers le rouge). Après lyophilisation, la présence de traces de l'impureté *6H*-isoindolo[2,1-*a*]indole **56a** a pu être confirmée en CLHP analytique. Cette dégradation des lyophilisats qui augmente avec le temps, a été imputée, d'après les résultats obtenus précédemment lors des essais de déprotection, à la présence de TFA provenant de l'éluant utilisé pour la CLHP (mélange eau/acétonitrile, 0,1% TFA). En tenant compte de ces observations, chaque tube récolté contenant le produit désiré a été immédiatement neutralisé avant lyophilisation par ajout d'une faible quantité d'ammoniaque. Les conjugués ainsi obtenus sous forme de sels d'ammonium peuvent être conservés plusieurs mois à l'abri de l'humidité et à 4 °C.

3.4.2. Synthèse du conjugué ADIBO-KuE2

Le conjugué **ADIBO-KuE2** a été obtenu par une addition de thio-Michaël entre l'ADIBO porteur de la fonction maléimide **41** et le ligand KuE porteur de la fonction thiol **54** dans le

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 3. Accès aux dérivés ADIBO-KuE(1-4)

le milieu réactionnel directement purifié par CLHP préparative pour conduire aux deux conjugués **ADIBO-KuE3** et **ADIBO-KuE4** avec des rendements respectifs de 63% (rendement global de 25,5% en 8 étapes à partir de la dibenzosubérénone) et 62% (rendement global de 22,1% en 10 étapes à partir de la dibenzosubérénone).

Tous les dérivés **ADIBO-KuE** ont été caractérisés par analyses FTIR, spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) et spectrométries RMN mono (^1H , ^{13}C) et bi-dimensionnelles (HSQC, HMBC, COSY). L'analyse des spectres RMN s'est avérée être complexe, notamment du fait de la présence de rotamères, résultant de la nouvelle liaison amide créée entre l'ADIBO et le KuE (cf. Figure 130, exemple de spectre RMN ^1H du composé **ADIBO-KuE3**).

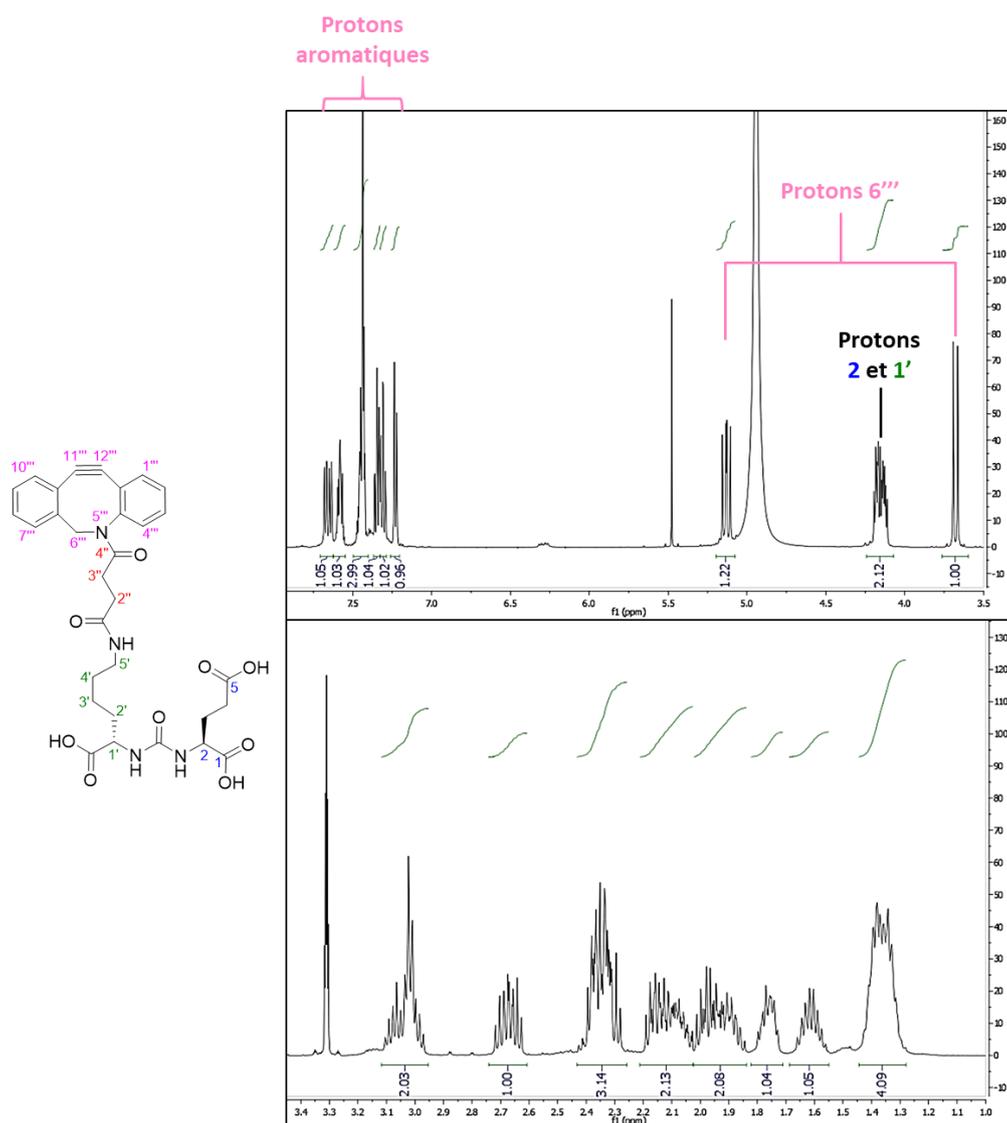


Figure 130 : exemple de spectre RMN ^1H du composé **ADIBO-KuE3**

Certains signaux caractéristiques en RMN ^1H sont retrouvés pour l'ensemble des conjugués **ADIBO-KuE**, notamment :

RÉSULTATS ET DISCUSSION
Chapitre 3. Accès aux dérivés ADIBO-KuE(1-4)

- Huit protons aromatiques attribués aux carbones benzéniques (1''' à 4'', 7''' à 10''').
- Un doublet (dédoublé) à 5,13 ppm et un doublet à 3,68 ppm intégrant chacun pour un proton, caractéristiques des deux protons portés par le carbone sp³ 6''' du cycle azacyclooctyne.
- Un multiplet à 4,15 ppm intégrant deux protons correspondants aux protons portés par les carbones asymétriques 2 et 1' du ligand KuE.

Ces protons ont servi de base à la caractérisation du composé **ADIBO-KuE3** donné en exemple Annexe X.

De plus, en tenant compte i) des difficultés de synthèse rencontrées pour accéder au conjugué **ADIBO-KuE1** (instabilité du précurseur carbamate, rendement de synthèse faible) et ii) de sa similarité de structure avec l'amide **ADIBO-KuE3**, le composé **ADIBO-KuE1** a été écarté pour la suite du projet.

Chapitre 4. Hydrophilisation des UCNPs, caractérisations structurales et études de stabilité

4.1. Protocole d'échange de ligands

Comme présenté dans la partie bibliographique, la synthèse des UCNPs par thermolyse en milieu organique conduit à des NPs hydrophobes. Il est donc nécessaire, en vue des applications biologiques, de remplacer les molécules d'AO en surface par des ligands hydrophiles.

Plusieurs méthodes d'échanges de ligands et de purifications sont décrites dans la littérature. Le déplacement de ligands est généralement réalisé dans l'éthanol, le tétrahydrofurane ou le chloroforme à des températures variant de 25 à 70 °C en fonction du solvant, le plus souvent pendant une nuit.^{258,264} La purification est quant à elle réalisée soit par dialyse soit par filtration centrifuge.^{257,259,291} Dans notre cas, la première méthode évaluée a été reprise des travaux doctoraux précédents à partir du ligand **L1**. La quantité de ligands utilisée pour l'échange a été établie à dix fois la masse d'UCNPs mises en réaction. Comme indiqué précédemment, les UCNPs@AO en solution dans le cyclohexane ont été soumises aux US pendant 30 minutes, filtrées sur PTFE 0,2 µm puis évaporées sous pression réduite. Les NPs ont ensuite été reprises dans l'éthanol (5 mL) le plus rapidement possible après pesée, puis le ligand **L1** a été ajouté et le milieu réactionnel a été agité à 70 °C pendant une nuit en flacon scellé. Après retour à température ambiante, le mélange a été transféré dans une membrane de dialyse (porosité 50 kDa), dilué par 10 mL d'eau déionisée, puis dialysé pendant 36 heures en changeant le bain toutes les 18 heures (3 litres d'eau déionisée par bain). De façon surprenante, ce protocole conduit à une agglomération des UCNPs dans la membrane de dialyse (cf. Figure 131).



Figure 131 : agglomération des UCNPs@**L1** après 36 h de dialyse

Cette voie de purification des UCNPs après échange de ligands a donc été écartée au profit d'une méthode en deux temps consistant en premier lieu à chasser par centrifugation l'AO déplacé, puis à éliminer l'excès de PEGs présent dans le milieu réactionnel par filtration centrifuge sur membrane 30 kDa (AMICON).

²⁹¹ Zhao, G.; Tong, L.; Cao, P.; Nitz, M.; Winnik, M. A. Functional PEG-PAMAM-tetraphosphonate capped NaLnF₄ nanoparticles and their colloidal stability in phosphate buffer. *Langmuir* **2014**, 30(23):6980-6989.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 4. Hydrophilisation des UCNPs, caractérisations structurales et études de stabilité

Dans un premier temps, le milieu réactionnel (5 mL) est transféré dans un tube en téflon, rincé avec de l'éthanol (2 x 5 mL), puis la solution est diluée par ajout de cyclohexane (40 mL). Après centrifugation (7 499 g, 22 °C, 40 min), le résidu est repris dans l'éthanol (5 mL), dilué par du cyclohexane (40 mL), puis centrifugé avec les mêmes paramètres que précédemment. Cette étape a pour but d'éliminer les molécules d'AO libérées après échange de ligands. Le résidu est ensuite séché sous flux d'argon puis repris rapidement dans de l'eau déionisée et transféré dans un tube AMICON (30 kDa, 15 mL). Ce dernier est complété à 15 mL avec de l'eau déionisée avant d'être centrifugé (4 000 g, 20 °C, 15 min) et cette étape est reproduite une fois supplémentaire. Le but de cette seconde étape est d'éliminer l'excès de ligands d'hydrophilisation. Le reliquat est enfin repris dans de l'eau déionisée pour atteindre une concentration théorique de 10 mg/mL (i.e. en considérant une perte négligeable lors des étapes de purification). Une partie de ces UCNPs est ensuite lyophilisée afin de corriger cette concentration.

Cette méthode de purification a permis d'obtenir des suspensions de NPs homogènes analysables en DLS. Anticipant une possible instabilité des groupements azotures lors de l'hydrophilisation à 70 °C, la méthode d'échanges de ligands a également été revue. Après plusieurs essais faisant varier le solvant, le temps et la température, notre choix, basé sur les résultats de stabilité par DLS (cf. exemple Figure 132) et les analyses FTIR (cf. Figure 134), s'est porté sur le tétrahydrofurane anhydre à 40 °C pendant une nuit. Le milieu réactionnel a été purifié comme précédemment.

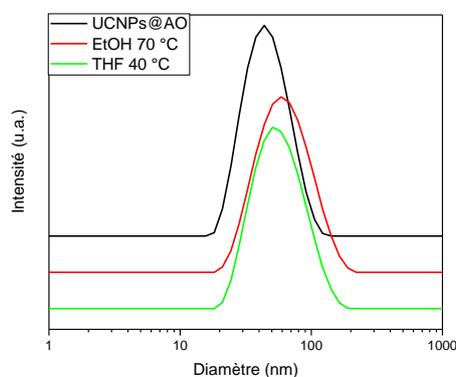


Figure 132 : comparaison du diamètre hydrodynamique par DLS des UCNPs@AO et des UCNPs@L1 obtenues selon les deux protocoles d'échange de ligands

Le lot hydrophobe initial était composé de NPs oblongues (27 x 33 nm en MET) pour un diamètre moyen en DLS de 42,8 nm (PDI = 0,180, cf. Figure 132). La taille moyenne obtenue en DLS après échange de ligands dans l'éthanol à 70 °C ou le tétrahydrofurane à 40 °C a été respectivement de 56,9 nm (PDI = 0,215) et 54,4 nm (PDI = 0,222). Quelles que soient les conditions réactionnelles, le diamètre moyen des UCNPs augmente après hydrophilisation en raison de la différence de taille entre ligands hydrophobes et pégylés. En considérant la relation approximative $L = \frac{D_h - D_{TEM}}{2}$ où D_h est le diamètre hydrodynamique et D_{TEM} est le diamètre déterminé en MET, la longueur du PEG peut être estimée à environ 12 nm, valeur

Chapitre 4. Hydrophilisation des UCNP, caractérisations structurales et études de stabilité

légèrement supérieure à celle trouvée dans la littérature (≈ 9 nm pour la chaîne étendue d'un PEG₁₀₀₀, soit sa longueur maximale).²⁹² Cette différence s'explique principalement par le calcul du D_h basé sur un modèle de NPs sphériques et non oblongues.

4.2. Choix du ligand d'hydrophilisation

Disposant d'un protocole d'hydrophilisation et de purification éprouvé, nous nous sommes alors intéressés à l'influence, en termes de stabilité colloïdale, de la fonction terminale du polymère hydrophile greffé en surface des UCNP après échange (i.e. -OMe ou -OH). Pour cette étude, la fonction d'ancrage a été gardée constante (i.e. phosphate), et le lot d'UCNP@AO initial identique à celui utilisé pour adapter la méthode d'échange de ligands (i.e. NPs oblongues de 27 x 33 nm). La stabilité des UCNP hydrophilisées a été étudiée par DLS dans l'eau déionisée. Les analyses ont été réalisées le plus rapidement possible après purification, dilution et filtration sur PTFE 0,20 μm (cf. Figure 133).

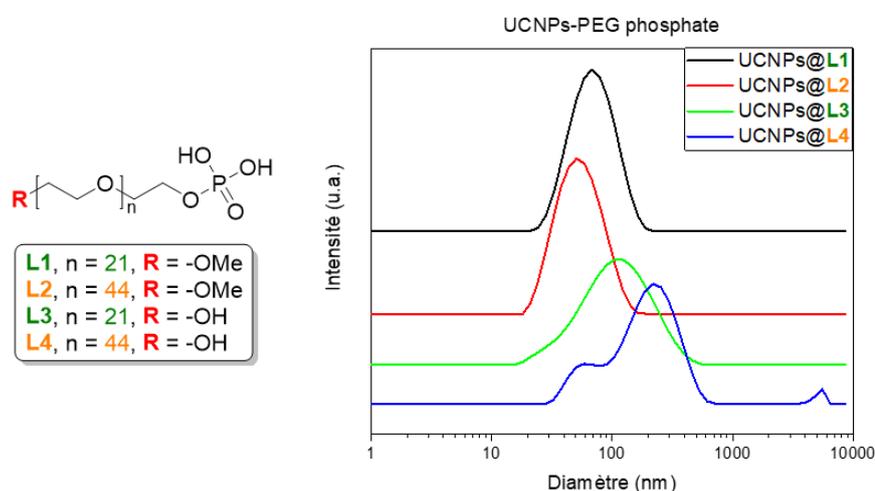


Figure 133 : spectre DLS dans l'eau déionisée des UCNP hydrophilisées par des ligands PEGs-phosphate

L'étude DLS a montré pour les UCNP@L1 et UCNP@L2 (PEGs-phosphate extrémité -OMe) un diamètre moyen de 62,9 nm et de 49,1 nm, respectivement pour les PEGs 1000 et 2000 (PDI < 0,150). Le D_h des UCNP@L1, bien que légèrement supérieur, est homogène avec celui obtenu lors de la mise au point de la méthode d'échange. De plus, le D_h des UCNP@L2 permet de calculer une longueur de PEG d'environ 9,5 nm, valeur inférieure à ce qui est décrit dans la littérature (≈ 17 nm pour la chaîne étendue), ce qui peut s'expliquer par un repliement de la chaîne PEG sur elle-même. Par ailleurs, concernant les UCNP@L3 et UCNP@L4 (PEGs-phosphate extrémité -OH), le diamètre moyen observé a été de 89,6 nm et de 157 nm respectivement. Ces valeurs élevées indiquent un début d'agglomération des NPs immédiatement après filtration. L'ensemble de ces résultats montre une stabilité colloïdale

²⁹² Anderson, R.; Buscall, R.; Eldridge, R.; Mulvaney, P.; Scales, P. Concentrated aqueous synthesis of nanoparticles using comb-graft copolymer stabilisers: the effect of stabiliser architecture. *RSC Adv.* **2014**, 4(87):46876-46886.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 4. Hydrophilisation des UCNP, caractérisations structurales et études de stabilité

plus élevée concernant les PEGs-phosphate extrémité -OMe comparativement aux PEGs-phosphate extrémité -OH.

Le groupement -OMe ayant été choisi, les groupements d'accroche phosphates des PEGs ont été substitués par des fonctions bis- ou tétra-phosphonates (comportant ou non un espaceur aryle). La présence des PEGs en surface des NPs obtenues après échange par les ligands **L(5-12)** a été confirmée par analyse FTIR après lyophilisation des UCNP@**L(5-12)** purifiées (cf. Figure 134).

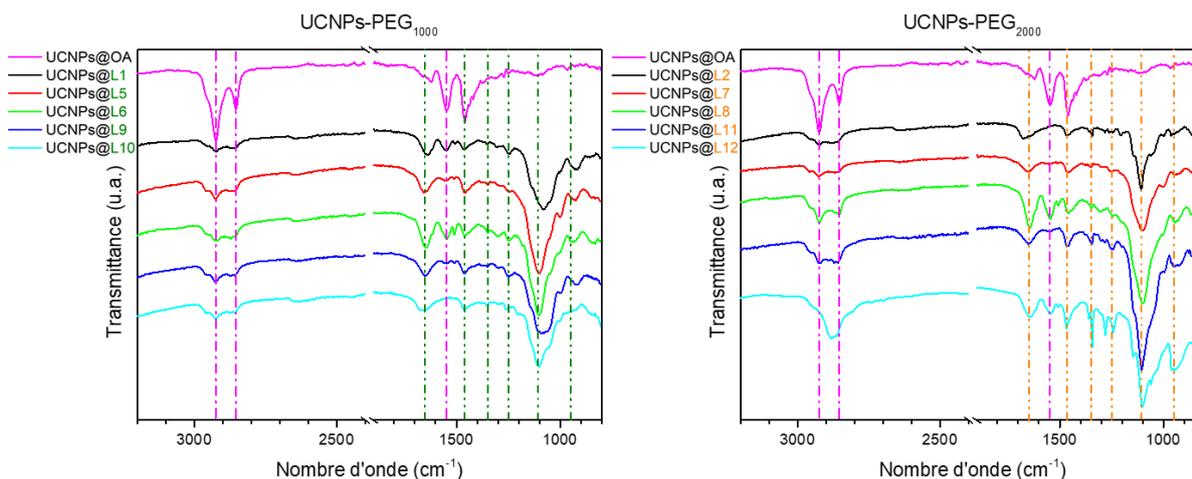


Figure 134 : spectres FTIR des différentes UCNP hydrophilisées

La courbe magenta représente les UCNP hydrophobes recouvertes d'AO. Les bandes caractéristiques de ce ligand correspondent aux vibrations des groupements méthylènes à 2923 et 2854 cm^{-1} , et à celles d'élongation de la liaison C=O, à 1546 cm^{-1} , représentées avec des lignes pointillées magenta.

Ces bandes ne sont plus visibles après hydrophilisation à l'exception des UCNP échangées par des PEGs possédant un groupement aryle (vibrations des liaisons C=C). Sur les spectres IR obtenus (lignes pointillées olive – UCNP@PEG₁₀₀₀, orange – UCNP@PEG₂₀₀₀) apparaissent également des vibrations caractéristiques de ces groupements PEGs. Parmi celles-ci, sont présentes les vibrations de valence des groupements méthylènes (3000-2850 cm^{-1} ; 1460 cm^{-1} ; 1341 cm^{-1} ; 1250-1240 cm^{-1} ; 960-940 cm^{-1}), les vibrations des liaisons C–O et C–C (1100-1080 cm^{-1}) ainsi que les vibrations des liaisons C=O des groupements amides (1650 cm^{-1}). Toutefois, les vibrations des liaisons P–O et P=O (1100-940 cm^{-1} ; 1140-960 cm^{-1}) sont difficiles à discerner à cause de l'intensité très supérieure des signaux caractéristiques des chaînes pégylées.

La stabilité des UCNP@**L(5-12)** dans l'eau déionisée a ensuite été évaluée par DLS sur une période de 7 jours (cf. Figure 135).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 4. Hydrophilisation des UCNP, caractérisations structurales et études de stabilité

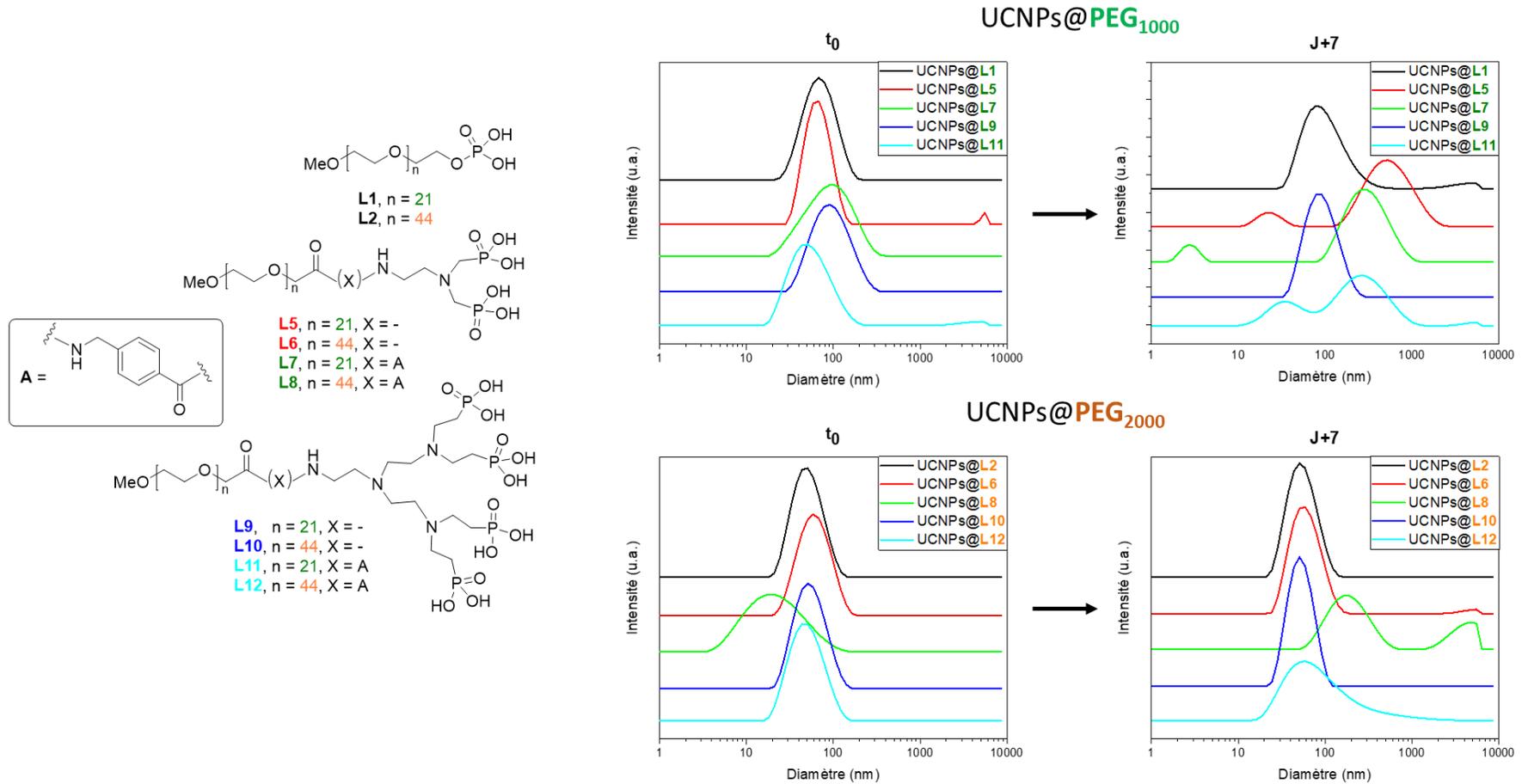


Figure 135 : suivi par DLS dans l'eau déionisée de la stabilité des UCNP hydrophilisées

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 4. Hydrophilisation des UCNPs, caractérisations structurales et études de stabilité

Dans le cadre de cette étude, les UCNPs@AO précurseurs étaient sphériques avec un D_{MET} de 29 ± 1 nm et un D_h de 45,3 nm (PDI = 0,158). Lors des analyses par DLS initiales (t_0), une seule population d'UCNPs pour chaque PEG considéré a été observée. Toutefois, ces populations présentaient dès la filtration (t_0) des D_h variables en fonction de la taille du polymère, de l'espaceur ou de la fonction d'ancrage.

Ainsi, la présence d'un groupement aryle semble avoir un effet négatif sur la stabilité des UCNPs bis-phosphonates (cf. UCNPs@L7 et UCNPs@L8, courbes vertes). Concernant leurs homologues tétra-phosphonates (cf. UCNPs@L11 et UCNPs@L12, courbes turquoise), cette tendance n'est visible qu'après une semaine. Toutes les UCNPs hydrophilisées avec des PEG comportant un espaceur aryle présentent également un PDI élevé, témoin de l'inhomogénéité des suspensions, et par extension de l'agglomération de ces UCNPs (cf. Tableau V).

Tableau V : résumé des analyses DLS pour les UCNPs hydrophilisées

N° ligand	UCNPs@PEG ₁₀₀₀ Taille (nm)/PDI		N° ligand	UCNPs@PEG ₂₀₀₀ Taille (nm)/PDI	
	J ₀	J ₇		J ₀	J ₇
L1	62,9/0,134	90,0/0,233	L2	46,7/0,136	50,9/0,133
L5	71,4/0,207	329/0,309	L6	54,8/0,141	57,1/0,162
L7	75,4/0,226	307/0,246	L8	141/0,448	94,9/1,000
L9	84,0/0,169	84,5/0,137	L10	50,1/0,141	49,3/0,086
L11	49,7/0,221	105/0,590	L12	52,1/0,256	62,9/0,355

Également, les UCNPs hydrophilisées avec des PEG₁₀₀₀ présentent des D_h plus élevés comparativement à leurs analogues PEG₂₀₀₀ suggérant une meilleure stabilité de ces dernières, avec des moyennes de tailles quasi invariables à 7 jours d'intervalle dans l'eau déionisée (exception faite des UCNPs@L8 comportant un espaceur aryle). Concernant les UCNPs@PEG₁₀₀₀, seules celles hydrophilisées par le ligand L9 ont présenté une stabilité convenable, avec toutefois un D_h bien plus élevé qu'attendu (i.e. 84 nm vs \approx 50 nm en considérant une longueur maximale de PEG de 9 nm).

À la lumière de ces résultats, les PEG₂₀₀₀ ne portant pas d'espaceur aryle (L2, L6 et L10) ont été choisis pour la suite des études de stabilité, notamment dans le PBS. Il est en effet connu que les sels de phosphates présents à haute concentration dans ce milieu (> 2 g/L) interfèrent avec les groupements phosphates ou phosphonates utilisés comme fonctions

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 4. Hydrophilisation des UCNP, caractérisations structurales et études de stabilité

d'ancrage en surface des UCNP, provoquant ainsi leur agrégation.²⁶⁴

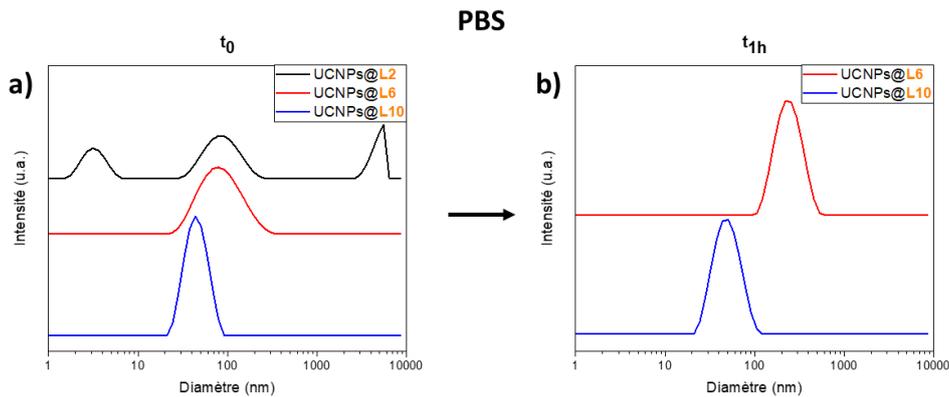


Figure 136 : suivi par DLS de la stabilité dans le PBS des UCNP@L2, @L6 et @L10 a) à t_0 et b) à t_{1h}

Comme illustré dans la Figure 136, les UCNP@L2 s'agglomèrent immédiatement après filtration ($D_h = 245$ nm, PDI = 0,336, cf. Figure 136a). Les UCNP@L6 et UCNP@L10 présentent quant à elles un diamètre cohérent avec les résultats obtenus dans l'eau déionisée ($D_h = 67,3$ nm, PDI = 0,289 et $D_h = 42,8$ nm, PDI = 0,057 respectivement). Toutefois, après 1 heure, la moyenne de taille des UCNP@L6 (fonctionnalisées par des PEGs porteurs d'un groupement bis-phosphonate) augmente jusqu'à 207 nm (PDI = 0,165) contre 46,2 nm (PDI = 0,086) pour les UCNP@L10 (cf. Figure 136b). L'étude de stabilité a été complétée jusqu'à 6 heures pour les UCNP@L10, aboutissant à un diamètre de 60,7 nm (PDI = 0,146).

Ces résultats ont confirmé les informations recueillies dans la littérature, à savoir que l'augmentation du nombre de fonctions chélatantes au sein d'un même ligand d'hydrophilisation stabilise l'ancrage de ce dernier en surface des NPs avec comme ordre de stabilité décroissante : tétra-phosphonate > bis-phosphonate > phosphate.^{258,291}

Ces études ont conduit à sélectionner le ligand PEG₂₀₀₀ L10 portant un groupement d'ancrage tétra-phosphonate sans espaceur aryle pour la suite des études. Celui-ci a fait l'objet, après hydrophilisation des UCNP, d'un suivi dans une solution saline (NaCl 0,9%) et dans les milieux de culture cellulaire utilisés pour les études *in vitro* (MEM, RPMI).

UCNP@L10

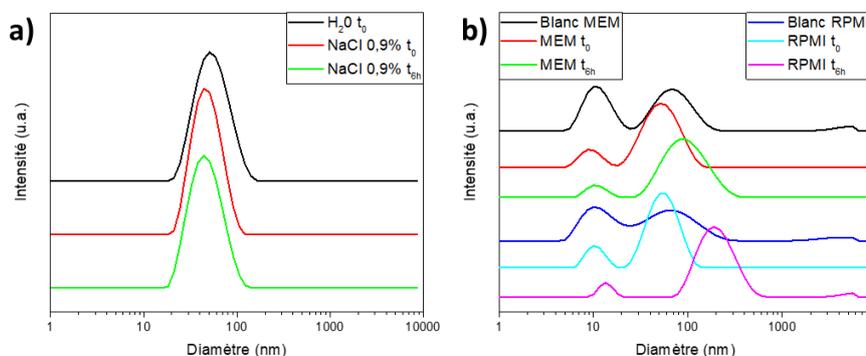


Figure 137 : suivi par DLS de la stabilité des UCNP@L10 dans a) une solution saline et b) des milieux de culture cellulaire

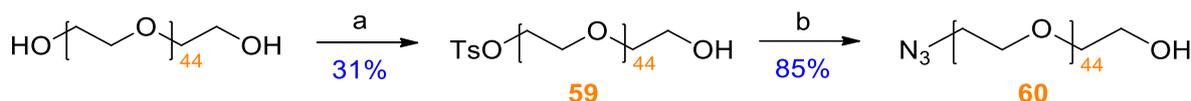
Chapitre 4. Hydrophilisation des UCNPs, caractérisations structurales et études de stabilité

Les UCNPs@L10 présentent une bonne stabilité en DLS dans la solution saline avec une évolution du D_h de 43,8 nm (PDI = 0,126) à 43,1 nm (PDI = 0,152) sur 6 heures (cf. Figure 137a). L'étude dans les milieux de culture a été quant à elle limitée en raison de leur composition. En effet, ces milieux sont colorés, ce qui entraîne une absorption partielle du faisceau incident utilisé pour la mesure de la taille des UCNPs ($\lambda = 633$ nm), et leur filtration conduit à la formation de mousses dans la cuve d'analyse. Comme illustré Figure 137b, ces caractéristiques entraînent l'apparition de pics d'intensité à environ 12 et 55 nm sur l'acquisition des blancs et un PDI élevé pour ces échantillons (PDI > 0,450, courbes noire et bleue). Après ajout des UCNPs@L10 dans les milieux MEM ou RPMI, le pic à 56,1 ou 57,4 nm (respectivement) devient majoritaire, et le PDI diminue en conséquence (< 0,320). Après 6 heures, le pic majoritaire est décalé vers des diamètres plus importants (91,3 nm, PDI = 0,332 et 190,1 nm, PDI = 0,478, respectivement pour les milieux MEM et RPMI). Ces résultats étant difficilement interprétables en raison de l'hétérogénéité des milieux, de l'absorption du faisceau ou bien encore de la présence de pics parasites, les UCNPs@L10 ont été considérées comme stables en milieux biologiques compte tenu des résultats obtenus dans l'eau, la solution saline et surtout dans le PBS.

Afin de fonctionnaliser les UCNPs en surface par des ligands de reconnaissance du PSMA et/ou des sondes radioactives ou fluorescentes, l'équivalent du ligand L10 porteur d'un groupement azoture en lieu et place du résidu méthoxyle a donc été synthétisé.

4.3. Synthèse du ligand azoture tétra-phosphonate L13

L'accès au ligand azoture tétra-phosphonate L13 a été envisagé en suivant une voie de synthèse similaire à celle développée pour le ligand L10. Cette approche a nécessité au préalable la synthèse en deux étapes du dérivé N₃-PEG₂₀₀₀-OH 60 (cf. Figure 138).



Réactifs et conditions : a) CH₂Cl₂, TsCl, TEA, 0 °C, 2 h ; b) DMF, NaN₃, 90 °C, 18 h

Figure 138 : synthèse du composé 60

La première étape a consisté à activer sélectivement une des deux fonctions alcools du PEG₂₀₀₀-diol sous forme d'ester de l'acide *para*-toluènesulfonique en présence de chlorure de tosyloxy et de TEA pour conduire au composé 59 avec un rendement de 31%.²⁹³ Dans un deuxième temps, après purification du précurseur tosylé sur colonne d'alumine, le groupement azoture a été introduit en lieu et place du tosyle par réaction de S_N2 via l'utilisation d'azoture de sodium dans le DMF à 90 °C pendant 18 heures.²⁹⁴ Le PEG

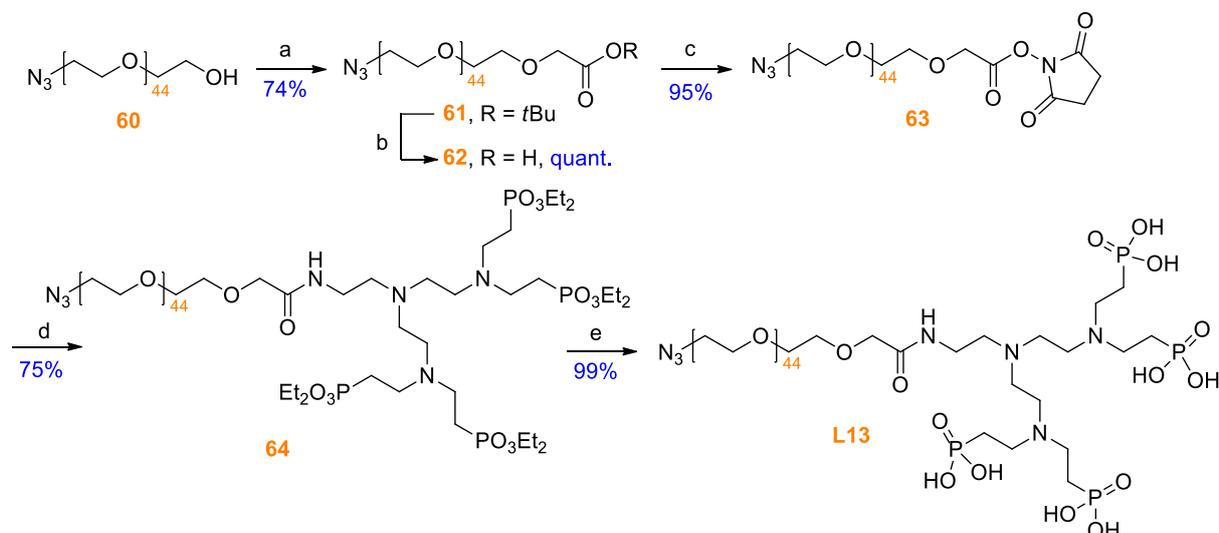
²⁹³ Harris J.; Struck E.; Case M.; Paley M. Synthesis and characterization of poly(ethyleneglycol) derivatives. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **1984**, 22(2):341-352.

²⁹⁴ Mahou R.; Wandrey C. Versatile route to synthesize heterobifunctional poly(ethyleneglycol) of variable functionality for subsequent pegylation. *Polymers* **2012**, 4(1):561-589.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 4. Hydrophilisation des UCNPs, caractérisations structurales et études de stabilité

azoture/alcool **59** a été ainsi obtenu après précipitation dans l'éther diéthylique avec un rendement de 85%.



Réactifs et conditions : a) (i) THF, NaH 60%, 0 °C, 3 h, (ii) BrCH₂CO₂tBu, 50 °C, 24 h ; b) HCl 2 N aq., reflux, 1 h 15 ; c) CH₂Cl₂, NHS, EDCI.HCl, t.a., 18 h ; d) **22.TFA**, DMF, DIPEA, t.a., 16 h ; e) (i) CH₂Cl₂, TMSBr, 0 °C à t.a., 16 h, (ii) MeOH, t.a., 1 h

Figure 139 : voie d'accès au ligand **L13**

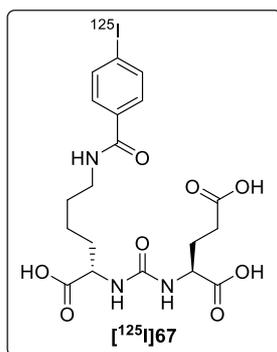
Du fait de l'incompatibilité de la fonction azoture portée par le composé **60** avec le réactif de Jones, la voie d'accès au précurseur acide carboxylique a été modifiée pour une approche en deux étapes décrite Figure 139.

La première étape a consisté à réaliser une éthérisation de l'extrémité alcool du N₃-PEG₂₀₀₀-OH **60** avec du 2-bromoacétate de *tert*-butyle. L'alcool terminal a d'abord été déprotoné par l'hydruide de sodium, puis l'alcoolate formé a été mis en présence de 2-bromoacétate de *tert*-butyle pour conduire à l'ester **61** avec un rendement de 74%.

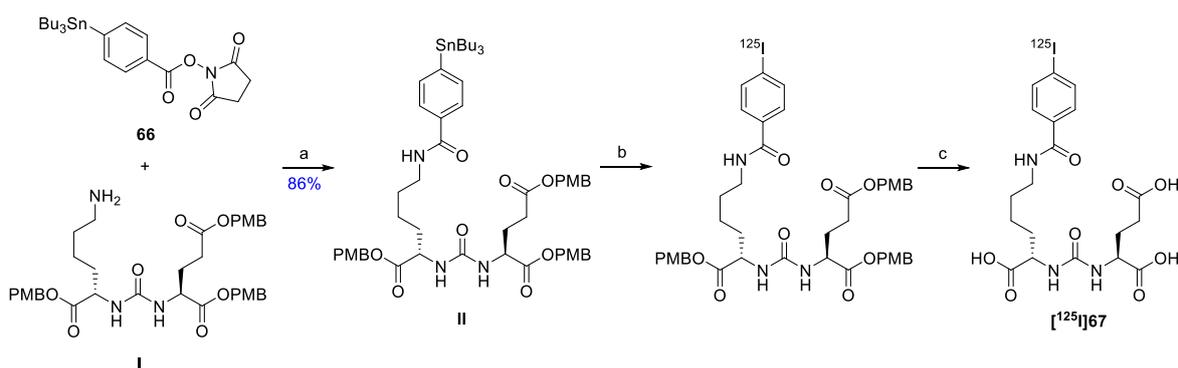
Dans un deuxième temps, la fonction acide carboxylique du composé **61** a été déprotégée par une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 2 N à reflux pendant 1 heure. L'acide **62** ainsi obtenu a alors été activé sous forme d'ester de NHS **63** puis, étant instable, rapidement mis en réaction avec le précurseur tétra-phosphonate **22.TFA** dans le DMF anhydre en présence de DIPEA pendant 18 heures pour conduire au composé **64** après purification sur colonne d'alumine. Ce dernier a enfin été déprotégé par transestérification, en présence de bromure de triméthylsilane, puis méthanolyse pour donner accès au ligand désiré **L13**.

Chapitre 5. : Radiomarquages du ligand IBA-KuE et du dérivé IBA-ADIBO

Afin de valider *in vitro* l'affinité pour le PSMA des dérivés **ADIBO-KuE** et **UCNPs@KuE** obtenus, il a été nécessaire au préalable de synthétiser un inhibiteur de référence du PSMA radiomarqué. Notre choix s'est porté sur le conjugué **IBA-KuE 67** radiomarqué à l'iode-125 (cf. Figure 140).

Figure 140 : composé $[^{125}\text{I}]67$

Le ligand **67** présente en effet une faible constante d'inhibition (i.e. $0,010 \pm 0,003$ nM) et son analogue radioiodé $[^{125}\text{I}]67$ peut être aisément obtenu en deux étapes consistant en une substitution électrophile aromatique (SE_{Ar}) par $[^{125}\text{I}]^+$ du précurseur stannique **II**, lui-même synthétisé par couplage du 4-tributylstannylbenzoate de *N*-succinimidyle (**66**) avec le dérivé KuE triprotégé **I**, suivi d'une déprotection *in situ* des fonctions acides en présence de TFA (cf. Figure 141), comme décrit par Chen *et al.*²⁹⁵ Selon cette voie d'accès, le composé $[^{125}\text{I}]67$ est obtenu avec un rendement radiochimique variant de 65 à 80% et une activité molaire supérieure à 25,9 GBq/ μmol .



Réactifs et conditions : a) CH_2Cl_2 , TEA, t.a., 2 h ; b) MeOH, NCS, AcOH, $[^{125}\text{I}]\text{NaI}$, t.a., 20 min ; c) TFA, anisol, t.a., 5 min

Figure 141 : synthèse du composé $[^{125}\text{I}]67$ selon Chen *et al.*²⁹⁵

²⁹⁵ Chen, Y.; Foss, C. A.; Byun, Y.; Nimmagadda, S.; Pullambhatla, M.; Fox, J. J.; Castanares, M.; Lupold, S. E.; Babich, J. W.; Mease, R. C.; Pomper, M. G. Radiohalogenated prostate-specific membrane antigen (PSMA)-based ureas as imaging agents for prostate cancer. *J. Med. Chem.* **2008**, 51(24):7933-7943.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 5. Radiomarquages du ligand IBA-KuE et du dérivé IBA-ADIBO

Anticipant que cette dernière étape de déprotection, réalisée sur le brut réactionnel, pouvait être susceptible de provoquer une hydrodéstannylation conduisant à un analogue déhalogéné difficilement séparable, une voie d'accès alternative au ligand [¹²⁵I]67 a été mise en oeuvre. Notre stratégie a consisté à coupler le résidu KuE 58.TFA à l'ester activé de l'acide 4-[¹²⁵I]iodobenzoïque (plus communément appelé 4-[¹²⁵I]SIB, [¹²⁵I]65), lui-même obtenu par radioiododéstannylation du précurseur tributylstannane 66 correspondant (cf. Figure 142).

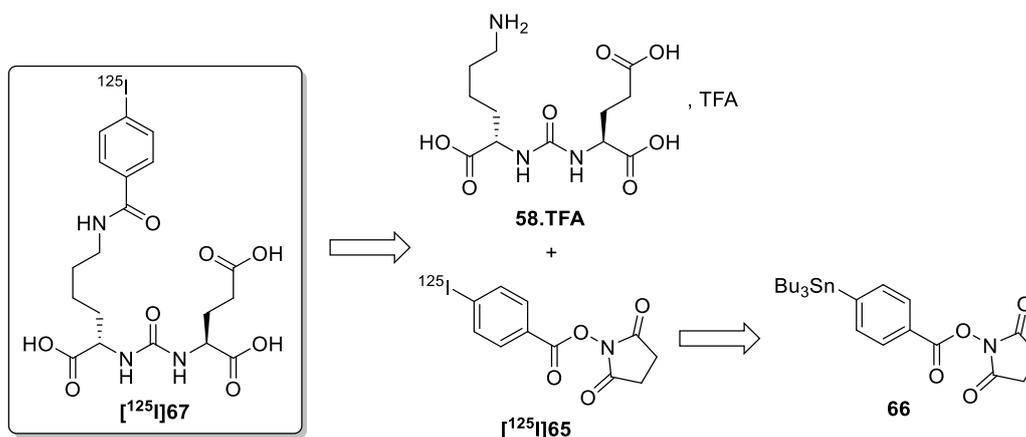


Figure 142 : schéma rétrosynthétique envisagé pour accéder au conjugué [¹²⁵I]67

Souhaitant développer des nanoparticules bimodales combinant l'imagerie de fluorescence à la détection radioactive, un radiomarquage des UCNPs a été planifié. Parmi les différentes stratégies possibles, nous avons opté pour l'utilisation d'un groupement prosthétique radioiodé dérivé de l'ADIBO [¹²⁵I]70 (cf. Figure 143) mettant ainsi à profit la présence de fonctions azotures en surface des UCNPs hydrophilisées. Le choix de l'iode-125 a été quant à lui basé sur les éléments suivants :

- Son temps de demi-vie ($t_{1/2} = 59,4$ jours) permet de réaliser des études de biodistribution sur plusieurs semaines (les UCNPs peuvent avoir un temps d'élimination supérieur à plusieurs semaines).^{207,241}
- Il est faiblement irradiant et son émission gamma (35,5 keV) permet de réaliser une imagerie TEMP chez le petit animal (gardant ici à l'esprit que l'iode-125 peut-être aisément remplacé par son radioisotope, l'iode-123 ($t_{1/2} = 13,2$ heures / 159,0 keV), plus adapté à une utilisation clinique).
- Il est enfin aisément disponible et d'un coût modéré.

Comme précédemment, nous avons opté pour une stratégie en deux étapes consistant dans un premier temps en la préparation d'un SIB radioidé (i.e. 4-[¹²⁵I]SIB, [¹²⁵I]68) à partir du précurseur tributylstannane 69, qui, une fois purifié, sera couplé à l'ADIBO amine 35, précurseur utilisé au chapitre 3.4 pour la conception des ligands ADIBO-KuE1-4. Cette stratégie a été préférée à un éventuel marquage directe par SE_{Ar} d'un précurseur ADIBO stannylé aux vues de la forte réactivité de la fonction alcynes contraint. La position de radioiodation en méta du groupement benzamide a quant à elle été choisie pour tenir compte

de la faible stabilité *in vivo* des dérivés 2 et 4-radioiodobenzamides.

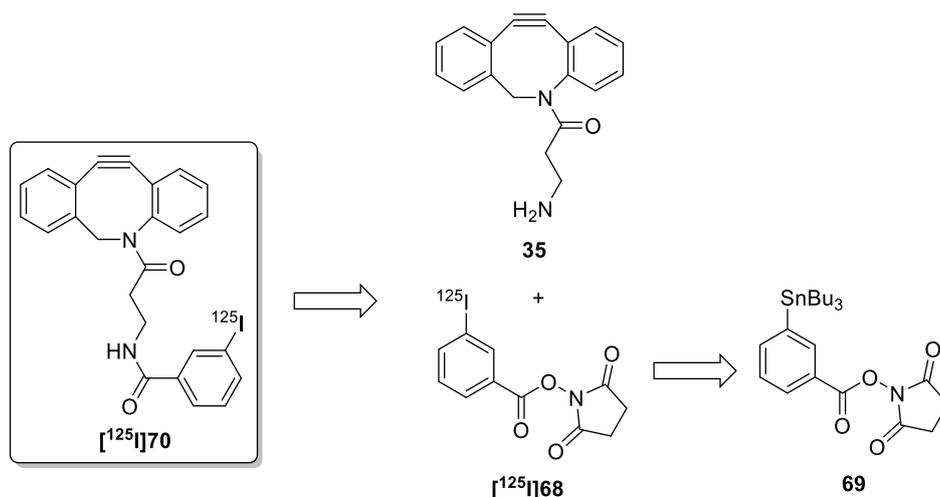


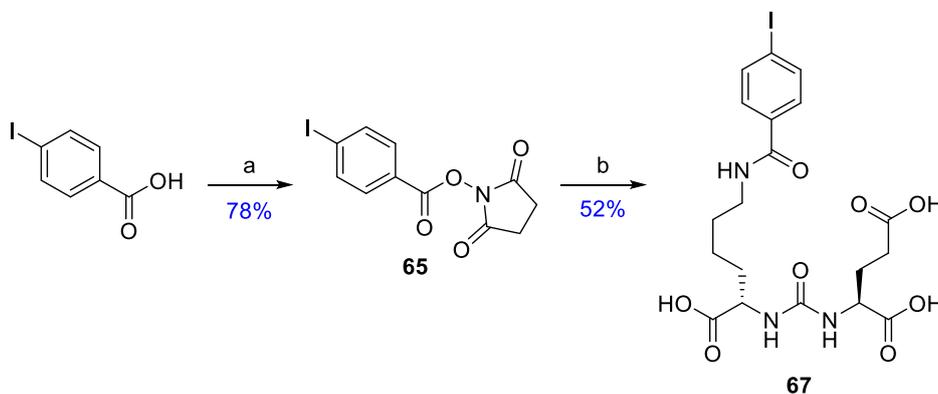
Figure 143 : schéma rétrosynthétique envisagé pour accéder au conjugué $[^{125}\text{I}]70$

5.1. Synthèse des références froides

En vue de réaliser les contrôles de pureté des produits radiomarqués obtenus par CLHP mais également de déterminer leur activité molaire, les références non radiomarquées correspondantes (ou dites « froides ») ont été synthétisées.

5.1.1. Synthèse du composé 67

Le composé iodé **67** a été obtenu en deux étapes à partir de l'acide 4-iodobenzoïque avec un rendement global de 41% sur deux étapes (cf. Figure 144).



Réactifs et conditions : a) CH_2Cl_2 , NHS, EDCI.HCl, t.a., 2 h 30 ; b) DMF, DIPEA, **58.TFA**, t.a., 25 h

Figure 144 : synthèse du composé 67

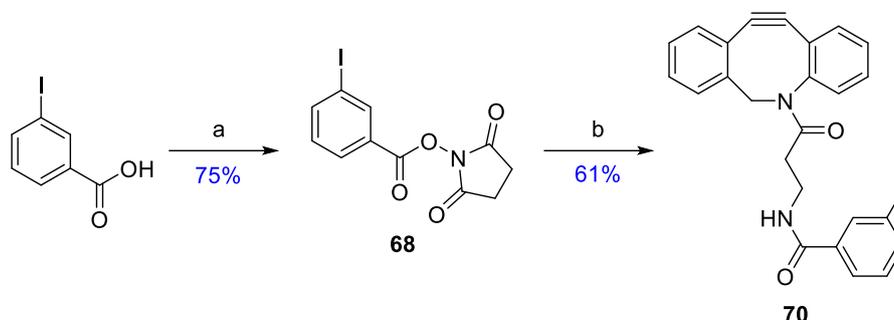
La première étape a consisté à activer la fonction acide carboxylique de l'acide 4-iodobenzoïque en traitant ce dernier par le NHS en présence d'EDCI.HCl. Cette réaction a permis d'accéder au composé **65** avec un rendement de 78%. Ce dernier a alors été mis en réaction avec le composé **58.TFA** dans le DMF en présence d'un excès de DIPEA pour conduire après couplage peptidique au composé **67** avec un rendement modéré de 52%.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 5. Radiomarquages du ligand IBA-KuE et du dérivé IBA-ADIBO

5.1.2. Synthèse du composé 70

Le dérivé ADIBO iodé **70** a été obtenu à partir de l'acide 3-iodobenzoïque suivant une approche de synthèse similaire à celle mise en œuvre pour accéder au composé **67** (i.e. activation de la fonction acide puis couplage peptidique), avec un rendement global de 46% sur 2 étapes (cf. Figure 145).



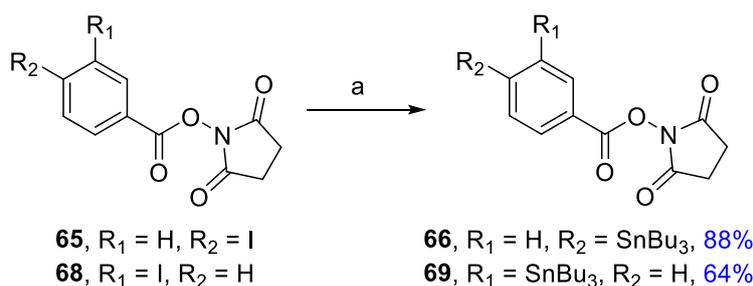
Réactifs et conditions : a) ACN, pyridine, DSC, t.a., 6 h ; b) DMF, DIPEA, **35**, t.a., 24 h

Figure 145 : synthèse du composé **70**

L'acide 3-iodobenzoïque a d'abord été activé par le carbonate de *N,N'*-disuccinimidyle (DSC) dans l'acétonitrile (ACN) pour conduire au composé **68** avec un rendement de 75%.²⁹⁶ Dans un deuxième temps, l'intermédiaire **68** a été couplé à l'ADIBO **35** par couplage peptidique dans le DMF et en présence de DIPEA pendant 24 heures pour obtenir le composé **70** avec un rendement de 61%.

5.1.3. Accès aux dérivés stannylés

Les précurseurs de radiomarquage stannylés **66** et **69** ont été obtenus à partir des précurseurs iodés 4-SIB **65** et 3-SIB **68** selon des conditions réactionnelles similaires (cf. Figure 146).



Réactifs et conditions : a) toluène, Sn₂Bu₆, Pd(PPh₃)₄, reflux, 5 h-6 h 30

Figure 146 : synthèse des précurseurs stannanes **66** et **69**

²⁹⁶ Koziorowski, J.; Henssen, C.; Weinreich, R. A new convenient route to radioiodinated N-succinimidyl 3- and 4-iodobenzoate, two reagents for radioiodination of proteins. *Appl. Radiat. Isot.* **1998**, 49(8):955-958.

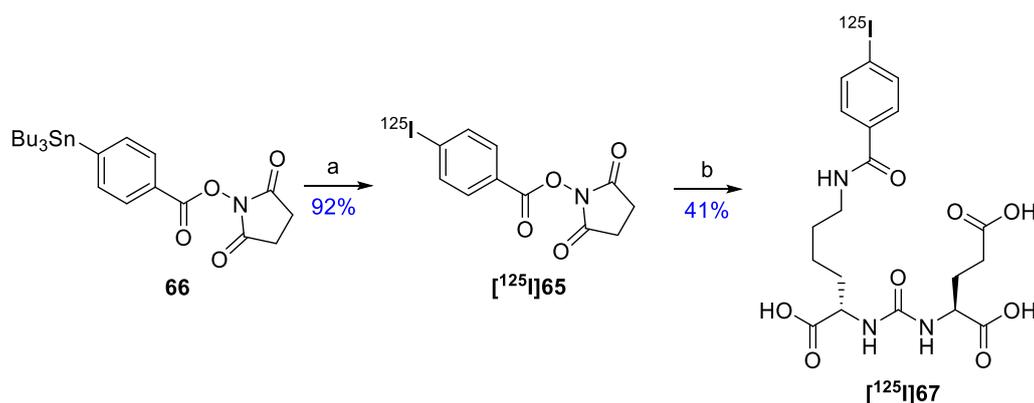
RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 5. Radiomarquages du ligand IBA-KuE et du dérivé IBA-ADIBO

En pratique, les aryles iodés **65** et **68** ont été traité par l'hexabutyldiétain en présence d'une quantité catalytique de (tétrakistriphénylphosphine)palladium (0) à reflux du toluène afin de conduire aux dérivés stannylés **66** et **69** avec des rendements respectifs de 88 et 64%.

5.2. Radiomarquage du ligand IBA-KuE **67** et de l'ADIBO-KuE **70**

La radioiodation du composé **66** a été réalisée par SE_{Ar} à température ambiante et en milieu faiblement acide. Pour ce faire, la solution commerciale d'iodure de sodium ($[^{125}I]NaI$) dans la soude à 10^{-5} M a été acidifiée par ajout d'acide acétique puis traitée par un agent oxydant doux, ici la chloramine-T (CAT) pour former in situ les ions $[^{125}I]I^+$ (cf. Figure 147).



Réactifs et conditions : a) MeOH, CAT, AcOH, $[^{125}I]NaI$, t.a., 15 min ; b) DMSO, DIPEA, **58.TFA**, t.a., 1 h

Figure 147 : radiosynthèse du composé $[^{125}I]67$

Après 15 minutes à température ambiante, le milieu réactionnel a été purifié par CLHP semi-préparative. La fraction isolée a été diluée par de l'eau avant d'être extraite en phase solide afin d'éliminer les sels et concentrer le produit dans un solvant volatil. Pour ce faire, la fraction diluée a été déposée sur une cartouche Sep-Pak C₁₈. Une cartouche Chromafix® dry (Na₂SO₄) a alors été adaptée à la Sep-Pack avant élution par de l'ACN (2 mL). Après évaporation de l'éluât sous un courant d'argon à 40 °C, l'intermédiaire $[^{125}I]65$ est obtenu avec un rendement radiochimique de 92% et une pureté radiochimique supérieure à 98%.

Ce composé a ensuite été repris dans le DMSO anhydre auquel ont été ajoutés successivement une solution du composé **58.TFA** dans le DMSO anhydre puis un excès de DIPEA. Après 1 heure de réaction, le milieu réactionnel a été purifié par CLHP semi-préparative et la fraction d'intérêt extraite en phase solide selon le mode opératoire développé pour $[^{125}I]65$. L'éluât a enfin été évaporé sous courant d'argon à 40 °C pour conduire au ligand du PSMA $[^{125}I]67$, obtenu avec un rendement radiochimique de 36% en deux étapes, une pureté radiochimique supérieure à 99% et une activité molaire variant de 2,2 à 21,7 GBq.μmol⁻¹ sur cinq radiosynthèses.

A chaque étape le produit radiomarqué a été contrôlé par CLHP, seul, afin de calculer son activité spécifique, et en co-injection avec l'équivalent non radiomarqué afin de contrôler sa pureté (cf. Figure 148). A noter que la différence de 0,40 min de temps de rétention entre les

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 5. Radiomarquages du ligand IBA-KuE et du dérivé IBA-ADIBO

chromatogrammes UV-CLHP et radio-CLHP est due au montage en série des détecteurs (UV et radioactivité).

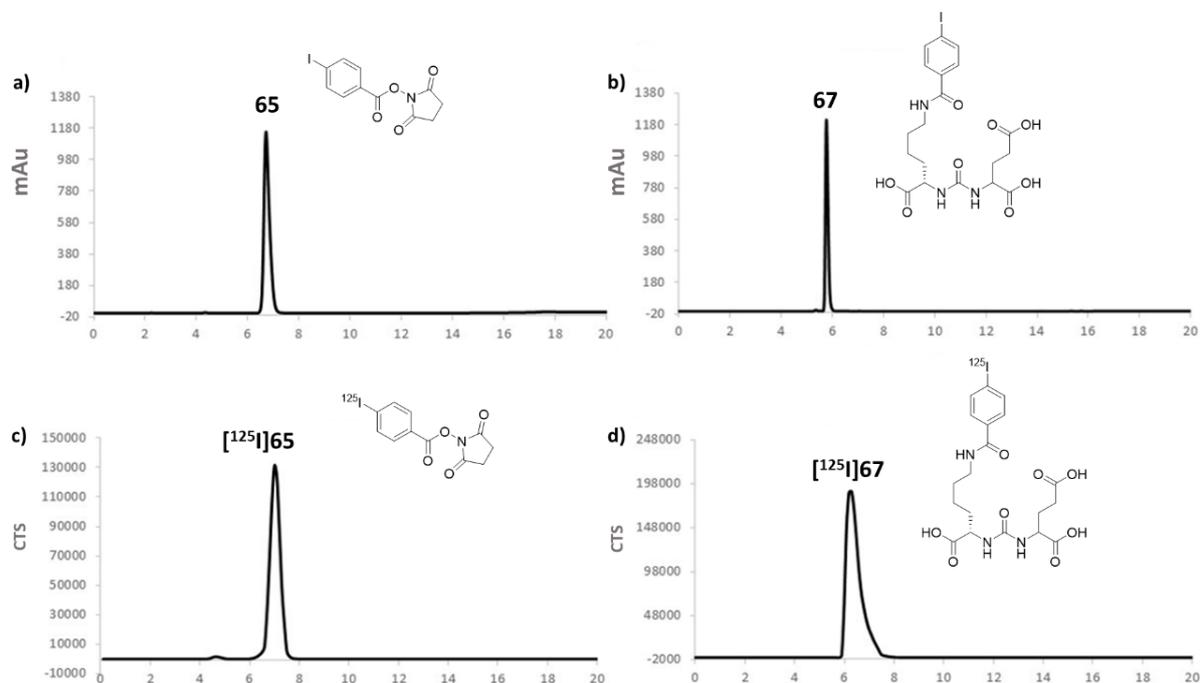
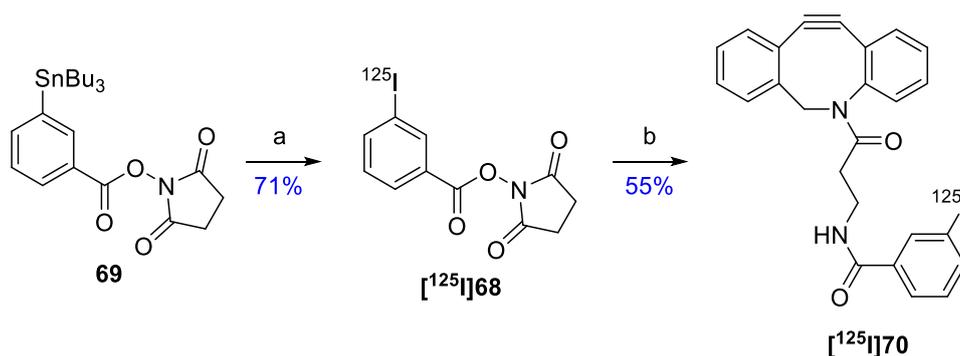


Figure 148 : chromatogrammes d'absorbance UV des références froides a) **65** ($\lambda = 268$ nm) et b) **67** ($\lambda = 250$ nm) ; radiochromatogrammes des composés c) $[^{125}\text{I}]65$ et d) $[^{125}\text{I}]67$ obtenus après purification et formulation

Le radiomarquage du dérivé ADIBO **70** a été réalisé selon un mode opératoire similaire à celui décrit pour l'obtention du radiotracteur $[^{125}\text{I}]67$ comprenant la radioiodation par SE_{Ar} de 3-tributylstannylbenzoate de succinimidyle (**69**) suivi, après purification par CLHP, d'un couplage à l'ADIBO amine **35** (cf. Figure 149).



Réactifs et conditions : a) MeOH, CAT, AcOH, $[^{125}\text{I}]\text{NaI}$, t.a., 15 min ; b) DMSO, DIPEA, **35**, t.a., 1 h 30

Figure 149 : radiosynthèse du composé $[^{125}\text{I}]70$

Le composé $[^{125}\text{I}]70$ a ainsi été obtenu avec un rendement radiochimique de 39% sur deux étapes, une pureté radiochimique supérieure à 99% et une activité molaire variant de 2,4 à

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 5. Radiomarquages du ligand IBA-KuE et du dérivé IBA-ADIBO

56,2 GBq.μmol⁻¹ sur 8 radiosynthèses (cf. Figure 150).

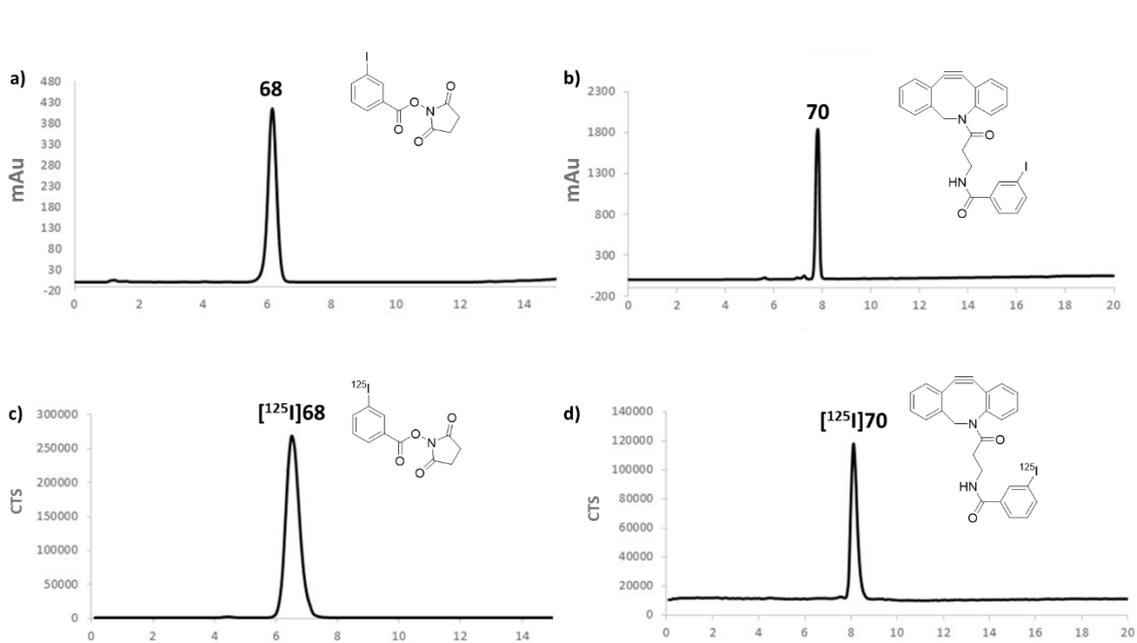


Figure 150 : chromatogrammes d'absorbance UV des références froides a) **68** ($\lambda = 232$ nm) et b) **70** ($\lambda = 240$ nm) ; radiochromatogrammes des composés c) [¹²⁵I]**68** et d) [¹²⁵I]**70** obtenus après purification et formulation

Chapitre 6. Quantification des groupements azotures après hydrophilisation des UCNPs

Dans le but d'évaluer l'incidence sur la reconnaissance de l'antigène du nombre de ligands du PSMA présent en surface des UCNPs, deux proportions de groupements azotures (i.e. 10 et 100%) en surface des UCNPs ont été étudiées. Les UCNPs hydrophilisées ainsi que leurs précurseurs hydrophobes ont au préalable fait l'objet de diverses analyses afin d'estimer tant la quantité de ligands présents à leur surface que le nombre de groupements azotures disponibles pour le couplage aux différents conjugués ADIBO-KuE et/ou groupements prosthétiques fluorescents ou radiomarqués. Dans ce but, des analyses par thermogravimétrie, ICP-OES (spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif) et quantification en présence d'un ligand radiomarqué ont été réalisées.

6.1. Calcul de la masse molaire des UCNPs

Les calculs utilisés pour estimer le nombre de groupements azotures présents en surface des UCNPs dépendent essentiellement de la masse molaire des NPs. Celle-ci a été estimée grâce à des calculs théoriques décrits dans la littérature.²⁹⁷

Pour ces calculs, les NPs ont été considérées comme sphériques, avec un volume (V_{UCNP}) :

Équation 1 : calcul du volume d'une UCNP

$$V_{UCNP} = \frac{4}{3} \pi r^3$$

où r est le rayon calculé d'après les images MET. Ce volume permet de déterminer le nombre d'unités cristallines hexagonales ($uN_{hexagonale}$) contenues dans chaque UCNP selon l'équation :

Équation 2 : calcul du nombre d'unités cristallines par UCNP

$$uN_{hexagonale} = \frac{V_{UCNP}}{uV_{hexagonale}}$$

où $uV_{hexagonale}$ est le volume d'une unité de maille hexagonale. Ce dernier est obtenu selon l'équation :

Équation 3 : calcul du volume d'une unité cristalline

$$uV_{hexagonale} = \frac{2\sqrt{3}}{4} a_h^2 * c_h$$

²⁹⁷ Mackenzie, L. E.; Goode, J. A.; Vakurov, A.; Nampi, P. P.; Saha, S.; Jose, G.; Millner, P. A. The theoretical molecular weight of NaYF₄:RE upconversion nanoparticles. *Sci. Rep.* **2018**, 8(1):1106.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 6. Quantification des groupements azotures après hydrophilisation des UCNPs

où a_h et c_h sont les paramètres de maille d'une UCNP de composition $\text{NaYF}_4:\text{Yb}_{0,20}\text{Er}_{0,02}$ selon Cao *et al.*²⁹⁸

Ces valeurs permettent, après calcul de la masse moléculaire moyenne d'une unité ($uMM_{\text{hexagonale}}$, Équation 4), d'accéder à la masse molaire moyenne théorique d'une NP (MM_{moy}) selon :

Équation 4 : calcul de la masse molaire d'une unité cristalline

$$uMM_{\text{hexagonale}} = (1,5 * MM_{\text{Na}}) + (6 * MM_{\text{F}}) + (1,5 * 0,78 * MM_{\text{Y}}) + (1,5 * 0,20 * MM_{\text{Yb}}) + (1,5 * 0,02 * MM_{\text{Tm}})$$

Ainsi, la masse molaire théorique d'une UCNP est calculée selon la formule :

Équation 5 : calcul de la masse molaire d'une UCNP cœur dopée

$$MM_{\text{moy, coeur}} = uMM_{\text{hexagonale}} * uN_{\text{hexagonale}}$$

Ces calculs permettent d'estimer une MM_{moy} pour une NP cœur dopée par les RE. Afin de considérer la coquille non dopée, le raisonnement décrit dans l'exemple suivant a été adopté : soit un lot d'UCNPs cœur/coquille de 30 nm de diamètre, avec un cœur dopé ($\text{Yb}_{0,20}$, $\text{Tm}_{0,02}$) estimé à 23 nm de diamètre, la $MM_{\text{moy, coeur/coquille}}$ de l'UCNP peut être calculée selon la formule :

Équation 6 : calcul de la masse molaire d'une UCNP cœur/coquille

$$MM_{\text{moy, coeur/coquille}} = MM_{\text{coeur}} + MM_{\text{coquille non dopée}}$$

où la masse molaire de la coquille non dopée a été calculée en retirant la MM d'une UCNP de 23 nm non dopée à la MM d'une UCNP de 30 nm de diamètre également non dopée.

En suivant ce raisonnement, la $MM_{\text{moy, coeur/coquille}}$ de l'UCNP décrite dans cet exemple est d'environ 38,531 MDa. À titre de comparaison, la MM_{moy} d'une NP entièrement dopée de 30 nm serait de 40,519 MDa.

Pour la suite de cette étude, un diamètre moyen de 23 nm du cœur dopé des UCNPs a été appliqué quelques soient les variations du diamètre externe des lots d'UCNPs cœur/coquille considérées. Cette valeur a été estimée d'après les synthèses en deux temps réalisées pour accéder aux UCNPs (seconde voie de synthèse).

6.2. Analyses thermogravimétriques

L'analyse de thermogravimétrie (ATG) consiste à mesurer une variation de masse en fonction de la température et du temps. Les lots d'UCNPs sont chauffés, et l'écart de masse obtenu est imputé à la quantité de ligands organiques présents dans ces échantillons, soit dans le cas présent les AO ou les ligands pégylés. Les échantillons sont ainsi chauffés sous air jusqu'à 800 °C (10 °C/min) tout en mesurant en continu la perte de masse. Cette analyse d'ATG

²⁹⁸ Cao, T.; Yang, T.; Gao, Y.; Yang, Y.; Hu, H.; Li, F. Water-soluble $\text{NaYF}_4:\text{Yb}/\text{Er}$ upconversion nanophosphors: synthesis, characteristics and application in bioimaging. *Inorg. Chem. Commun.* **2010**, 13(3):392-394.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 6. Quantification des groupements azotures après hydrophilisation des UCNPs

a permis de calculer notamment le nombre de ligands AO en surface des UCNPs hydrophobes (cf. Figure 151).

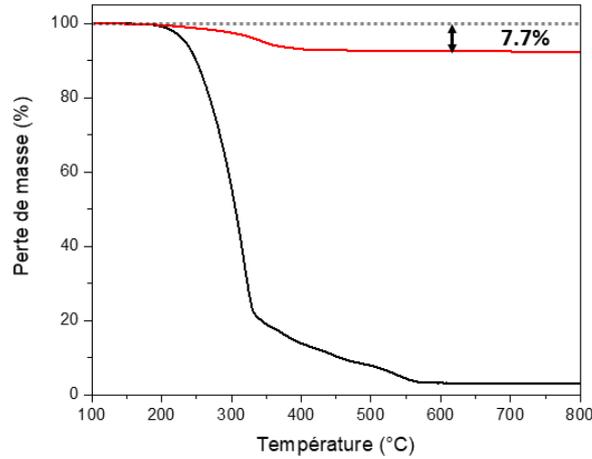


Figure 151 : profil de l'analyse TGA des UCNPs@AO. La courbe noire correspond à la perte de masse d'un échantillon d'acide oléique et la courbe rouge à la perte de masse de l'échantillon d'UCNPs@AO

Un échantillon d'AO pur, étudié dans les mêmes conditions, a permis de pondérer le résultat obtenu sur les lots d'UCNPs@AO par l'équation :

Équation 7 : correction du pourcentage de masse des ligands de surface déterminé par ATG

$$w_{l,r} = \frac{w_l}{1 - w_r}$$

où w_l est la fraction de ligands obtenue sur l'analyse ATG des UCNPs et w_r est le résidu du ligand pur. Le nombre de ligands ρ_l organiques a alors été calculé selon la formule :

Équation 8 : calcul du nombre de ligands de surface par UCNP

$$\rho_l = \frac{w_{l,r} * N_{Av}}{M_{w,l}} \cdot \frac{m_{UCNP}}{(1 - w_{l,r}) * S_{UCNP}}$$

où N_{Av} est le nombre d'Avogadro, $M_{w,l}$ est la masse moléculaire du ligand (282,46 g.mol⁻¹ pour l'AO), m_{UCNP} est la masse d'une UCNP, calculée à partir de son volume (V_{UCNP}) et de sa masse volumique (ρ), et S_{UCNP} est la surface d'une UCNP. La masse volumique ρ des UCNPs a été évaluée à 4,59 g/cm³ grâce à l'équation :

Équation 9 : estimation de la masse volumique d'une UCNP

$$\rho = \frac{M * N'}{N_{Av} * c_h * \frac{\sqrt{3}}{2} * a_h^2}$$

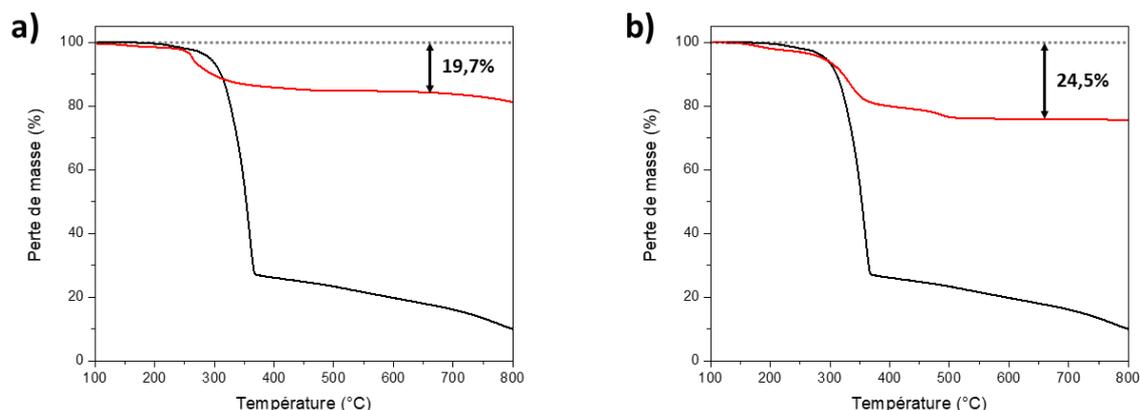
où M est la masse molaire de l'ensemble des matériaux composants les UCNPs, N' le nombre d'unités par cristal, N_{Av} le nombre d'Avogadro, et a_h et c_h les paramètres de maille.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 6. Quantification des groupements azotures après hydrophilisation des UCNPs

Ces calculs ont permis d'estimer une densité de 4,31 AO par nm² pour un lot d'UCNPs@AO de 30,6 nm. Cette valeur est cohérente avec les données issues de la littérature avec par exemple un nombre estimé de 5,9 AO/nm² à la surface d'UCNPs NaYF₄ de 22,0 nm.²⁹⁹

Cette analyse a également été réalisée sur les lots d'UCNPs hydrophilisées avec 10 et 100% de PEG-azotures (cf. Figure 152).



La méthode de calcul a été identique et a permis d'estimer la présence respective de 1,54 et 1,92 PEG/nm² pour les UCNPs@N₃ 10 et 100%.

Tableau VI : récapitulatif des résultats d'ATG sur les UCNPs@N₃(10 et 100%)

UCNPs@N ₃ (%)	Diamètre des UCNPs (nm)	Proportion de ligands (%)	Proportion corrigée* (%)	Densité (ligands/nm ²)
10%	30,6 ± 0,3	19,7 ± 1,2	22,2 ± 1,2	1,54 ± 0,11
100%	28,9 ± 1,4	24,5 ± 0,8	27,6 ± 0,8	1,92 ± 0,08

*proportion corrigée selon l'Équation 7 après analyse ATG d'un échantillon pur de **L13**

La densité de ligands calculée pour ces différentes UCNPs est du même ordre que celle retrouvée dans la littérature pour des UCNPs de 17 ou 23 nm de diamètre (i.e. 1,7 et 2,0 ligands/nm² respectivement).²⁹⁹ Sachant qu'une partie non négligeable d'AO peut rester en surface des UCNPs après l'étape d'hydrophilisation, des analyses complémentaires d'ICP-OES ont été réalisées.

²⁹⁹ Tong, L.; Lu, E.; Pichaandi, J.; Cao, P.; Nitz, M.; Winnik, M. A. Quantification of surface ligands on NaYF₄ nanoparticles by three independent analytical techniques. *Chem. Mater.* **2015**, 27(13):4899-4910.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 6. Quantification des groupements azotures après hydrophilisation des UCNPs

6.3. Les analyses ICP-OES

Les analyses d'ICP-OES permettent de quantifier des éléments tels que l'yttrium et le phosphore présents dans les lots d'UCNPs hydrophilisées. Le dosage du ^{89}Y , connaissant son abondance au sein des UCNPs cœur/coquille, donne accès à la masse d'UCNPs analysées. D'un autre côté, le dosage du ^{31}P permet de déterminer la masse de ligands pégylés présente dans l'échantillon. Les UCNPs étudiées en ICP-OES ont été préparées de la même façon que celles analysées par ICP-MS, à savoir que chaque échantillon d'UCNPs a été minéralisé dans l'acide nitrique à 100 °C pendant une nuit puis dilué dans l'eau déionisée (qsp 10 mL).

La quantification de l'yttrium a permis de calculer une masse précise de NPs pour les échantillons d'UCNP@N₃(10%) et d'UCNP@N₃(100%) étudiées (n = 3 pour chaque échantillon). Les calculs présentés ci-avant permettent d'estimer une MM pour l'ensemble de l'yttrium, de l'ytterbium et du thulium dans les UCNPs cœur/coquille. Sachant, d'après les analyses d'ICP-MS, que l'yttrium représente 86,8% des terres rares des UCNPs cœur/coquille dopées (cf. paragraphe 1.2.3), la MM d'yttrium dans ces lots a été estimée respectivement à 16,8 MDa et 15,0 MDa, et a permis de calculer une masse moyenne d'UCNPs par échantillon de 2,00 mg et de 2,17 mg pour ceux-ci.

D'autre part, sachant que chaque ligand pégylé comporte quatre fonctions phosphonates, la quantité de phosphore dosée a permis de calculer la masse de ligands pégylés m_{PEG} présente dans les échantillons par l'équation :

Équation 10 : calcul de la masse de ligands pégylés présents dans un échantillon analysé par ICP-OES

$$m_{\text{PEG}} = MM_{\text{moy,PEG}} * \frac{MM_{\text{P}} * x}{4}$$

où $MM_{\text{moy,PEG}}$ est la masse molaire moyenne des PEGs utilisés pour l'hydrophilisation (soit $\approx 2600 \text{ g.mol}^{-1}$), MM_{P} est la masse molaire atomique du phosphore et x le quantité de phosphore dosée.

De façon similaire au calcul réalisé pour l'ATG, la densité de ligands présente en surface des UCNPs a été estimée en ICP-OES et selon l'équation 8 à 0,88 et 1,69 PEG/nm² respectivement pour les UCNPs@N₃ 10 et 100% (cf. Tableau VII).

Tableau VII : récapitulatif des résultats d'ICP-OES

UCNPs@N ₃ (%)	Diamètre UCNPs (nm)	Masse pesée (mg)	MM _{moy} du ^{89}Y (MDa)	m_{UCNP} (mg)	m_{PEG} (mg)	Densité (ligands/nm ²)
10%	30,6 ± 0,3	2,5 ± 0,1	16,8	1,72 ± 0,1	0,279 ± 0,02	0,88 ± 0,03
100%	28,9 ± 1,4	2,5 ± 0,1	15,0	1,62 ± 0,2	0,546 ± 0,02	1,69 ± 0,04

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 6. Quantification des groupements azotures après hydrophilisation des UCNPs

Il est important de noter que la masse des échantillons analysées, telle que déterminée par ICP-OES, présente un écart non négligeable avec la masse pesée ($\approx 20\%$). L'interprétation de cet écart est délicate, et plusieurs pistes ont été envisagées, comme la présence d'eau dans l'échantillon ou encore l'échange incomplet des AO lors de l'étape d'hydrophilisation, sans qu'aucune n'ait pu être validée. De plus, la densité de ligands en surface des UCNPs_(100%) calculée suite à l'analyse d'ICP-OES est similaire à celle obtenue par l'analyse d'ATG. Cette correspondance, non retrouvée pour les UCNPs_(10%), pourrait s'expliquer par une élimination moins efficace des AO échangés lors de leur hydrophilisation. Ainsi, les AO contribueraient à surestimer le nombre de ligands de surface suite à l'analyse d'ATG et à le sous-estimer suite à l'analyse d'ICP-OES.

6.4. Dosage des azotures par un ligand ADIBO radioiodé

Le dosage des azotures par le ligand ADIBO radioiodé [¹²⁵I]**70** a eu pour but de quantifier le nombre d'azotures fonctionnels en surface des UCNPs (i.e. pouvant donner lieu à une réaction SPAAC). Dans un premier temps, les UCNPs hydrophiles (10% et 100% d'azotures, 100 μg) ont été mises en réaction dans l'eau à 37 °C pendant une nuit avec des quantités croissantes du conjugué ADIBO-CO₂H **39** (i.e. 100-1500 pmol pour les UCNPs@N_{3(10%)} ; 1 à 12 nmol pour les UCNPs@N_{3(100%)}). Les plages de quantités de matière utilisées ont été basées sur une densité de ligands moyenne établie à 1,3 ligands/nm² (soit respectivement 754 pmol et 7,84 nmol pour les UCNPs@N₃ 10 et 100%). Dans un second temps, après retour à température ambiante, les milieux réactionnels ont été traités avec le ligand radioactif [¹²⁵I]**70** (74-150 kBq) puis chauffés à 37 °C pendant 1 heure 30 minutes.

Après ce laps de temps, un aliquote de chaque milieu réactionnel a été déposé sur une plaque iTLC, éluée par de l'acétone puis analysée par un lecteur de plaques radioactives miniGITA dual (Elysia-Raytest). Dans ces conditions, le composé [¹²⁵I]**70** ainsi que tous ses produits de dégradation migrent en front de solvant ($R_f = 1$) tandis que les UCNPs radiomarquées demeurent au point de dépôt ($R_f = 0$). Un exemple de radio-chromatogramme obtenu suivant cette procédure est donné Figure 153a. Cette étude a permis d'établir une droite de dosage donnant accès à la quantité maximale d'ADIBO-CO₂H **39** pouvant réagir avec les fonctions azotures présentes dans l'échantillon. Un exemple de courbe de dosage est donné Figure 153b pour les UCNPs@N_{3(100%)}. La valeur au point d'intersection avec l'axe des abscisses (5557 pmol) correspond à la quantité maximale de groupements azotures fonctionnels présents dans 100 μg d'UCNPs.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 6. Quantification des groupements azotures après hydrophilisation des UCNPs

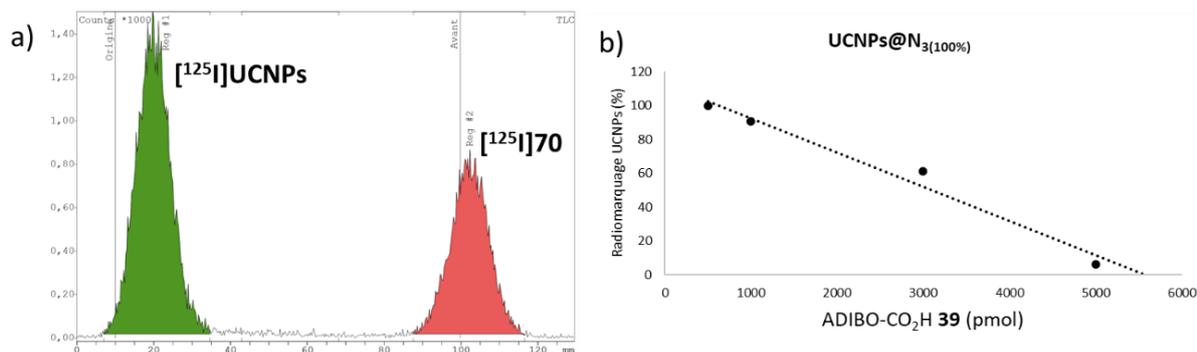


Figure 153 : a) exemple de radio-chromatogrammes obtenu après élution à l'acétone des UCNPs@N₃(100%) traitées successivement par 3 nmol du composé **39** puis 150 kBq du composé [¹²⁵I]**70** et b) courbe de dosage des fonctions azotures obtenue pour les UCNPs@N₃(100%)

La mise en réaction successive du composé **39** en défaut (3 nmol, cf. Figure 153a) puis [¹²⁵I]**70** révèle un marquage partiel des UCNPs après 1 heure 30 minutes de réaction à 37 °C (AUC verte). Inversement, lorsque le composé **39** est mis en réaction en excès, le composé [¹²⁵I]**70** est principalement retrouvé en front de solvant, témoignant de la saturation des azotures présents par le ligand froid. Cette étude a permis de déterminer la présence respective de 754 pmol et 5,56 nmol d'azotures dans 100 µg d'UCNPs@N₃ 10 et 100%, soit une densité de ligands en surface des UCNPs de 1,30 et 0,92 ligand/nm². Notons ici que la densité de 1,30 ligand/nm² obtenue pour les UCNPs@N₃(10%) a été calculée en estimant que la proportion molaire en dérivés pégylés **L13/L10** de 10/90 utilisée lors de l'étape d'hydrophilisation était retrouvée en surface des UCNPs@N₃(10%). Ce pourcentage a pu être corrigé en utilisant les densités de ligands obtenues par les méthodes précédentes de dosage par TGA et ICP-OES (i.e. 1,54 et 0,88/nm² respectivement). En appliquant cette correction, des pourcentages respectifs en ligands azotures de 8,8% et 13,8%, cohérent avec les 10% théoriques, ont été obtenus.

Tableau VIII : récapitulatif des résultats de dosage par le composé [¹²⁵I]**70**

UCNPs@N ₃ (%)	Diamètre UCNPs (nm)	Quantité d'azotures calculée (pmol)	Quantité d'azotures déterminée (pmol)	Densité (ligands/nm ²)
10%	30,6 ± 0,3	754	754 ± 20	1,30 ± 0,05
100%	28,9 ± 1,4	7 844	5 557 ± 9	0,92 ± 0,01

Pour les UCNPs@N₃(100%), un écart important est observé entre les résultats issus des analyses ICP-OES ou TGA comparativement au dosage des ligands azotures par la méthode radioactive. Si les deux premières méthodes sont basées sur des analyses physiques, la stratégie employée pour réaliser le dosage par [¹²⁵I]**70** implique une réaction chimique dont la cinétique peut être compromise par la présence d'un encombrement stérique, notamment

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 6. Quantification des groupements azotures après hydrophilisation des UCNPs

lors de la première étape du dosage consistant à condenser le ligand froid **39** aux fonctions azoture présentes en surface des UCNPs.

Un résumé des valeurs de densité de ligands obtenues en fonction de la méthode d'analyse et du pourcentage de ligand azoture en surface des UCNPs est donné ci-dessous (cf. Tableau IX).

Tableau IX : récapitulatif de la quantification du nombre de ligands de surface selon les trois méthodes de dosage

UCNPs@N ₃ (%)	Diamètre UCNPs (nm) calculée	MM _{moy} (MDa)	Densité de ligands (ligand/nm ²)		
			TGA	ICP-AES	Radiomarquage
10%	30,6 ± 0,3	40,789	1,54 ± 0,11	0,88 ± 0,03	1,30 ± 0,05
100%	28,9 ± 1,4	34,619	1,92 ± 0,08	1,69 ± 0,04	0,92 ± 0,01

En combinant les résultats issus de ces différentes analyses, la densité de ligand d'hydrophilisation a été fixée pour la suite des études à une valeur moyenne de 1,3 ligand/nm².

Chapitre 7. Études in vitro

Comme exposé dans la partie objectifs, la capacité de reconnaissance des différents conjugués **ADIBO-KuE** pour le PSMA a été évaluée avant couplage aux UCNPs.

7.1. Études de compétition des conjugués **ADIBO-KuE**

Cette étude a été réalisée sur la lignée LNCaP-Luc (exprimant fortement le PSMA) et a consisté à quantifier le déplacement du radioligand [¹²⁵I]67 lié au PSMA en présence des conjugués **ADIBO-KuE(2-4)** ou de l'acide 2-(phosphonométhyl)pentandioïque (PMPA), inhibiteur de référence de cet antigène qui présente une constante d'inhibition de $0,28 \pm 0,08$ nM.³⁰⁰ Plus précisément, l'affinité pour le PSMA de chaque conjugué **ADIBO-KuE** a été évaluée en déterminant la concentration de molécule nécessaire pour inhiber 50% de la fixation de la molécule [¹²⁵I]67 à l'antigène membranaire. À cette fin, des cellules ont été incubées en présence d'une concentration fixe du composé [¹²⁵I]67 (0,45 nM) et des concentrations croissantes de chaque ligand étudié.

Les cellules LNCaP-Luc ont étéensemencées dans du milieu RPMI 1640 supplémenté en sérum de veau fœtal (10%) et en gentamycine (4 µg/mL) dans des plaques 24 puits à hauteur de 150 000 cellules par puits puis incubées à 37 °C (5% CO₂) pendant 24 h. Après élimination du milieu de culture, un mélange du composé [¹²⁵I]67 (0,45 nM, 18,5 kBq) et de chaque conjugué **ADIBO-KuE** ou du PMPA en concentrations croissantes (5 concentrations testées comprises entre 1 nM et 10 µM dans un tampon composé de milieu RPMI 1640 supplémenté à 0,5% en albumine de sérum bovin) a été ajouté au tapis cellulaire puis les cellules ont été incubées à 37 °C (5% CO₂) pendant 1 h. Le surnageant a été alors éliminé puis les cellules ont été successivement rincées avec le tampon, lysées avec du tampon RIPA, puis du PBS puis l'activité résiduelle a été mesurée au moyen d'un compteur gamma 1480 Wizard (Perkin Elmer). L'activité mesurée a alors été exprimée en % de dose incubée (% DI).

³⁰⁰ Jackson, P. F.; Cole, D. C.; Slusher, B. S.; Stetz, S. L.; Ross, L. E.; Donzanti, B. A.; Trainor, D. A. Design, synthesis, and biological activity of a potent inhibitor of the neuropeptidase *N*-acetylated α -linked acidic dipeptidase. *J. Med. Chem.* **1996**, 39(2):619-622.

RÉSULTATS ET DISCUSSION
Chapitre 7. Études in vitro

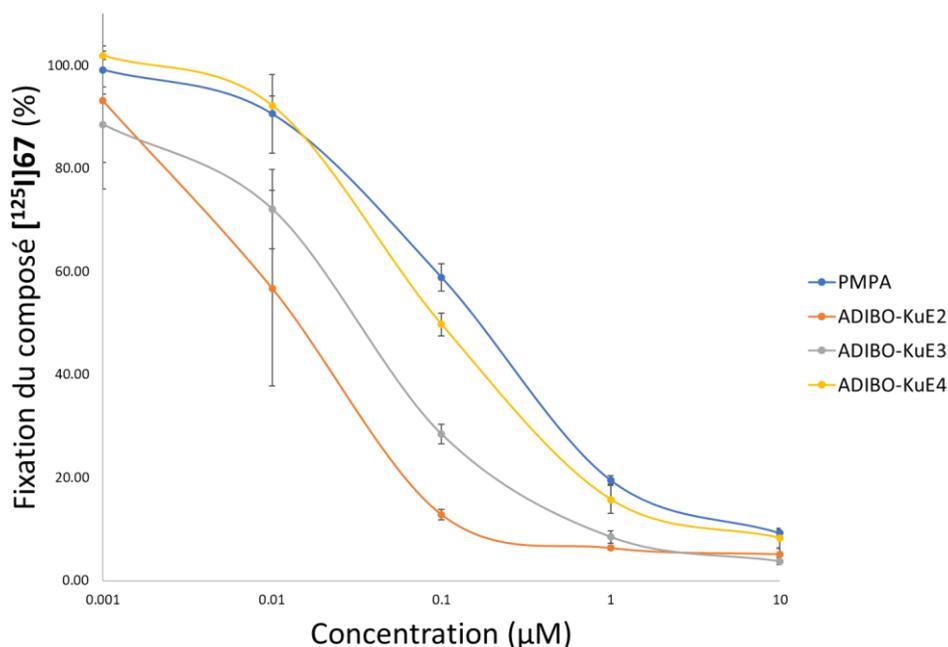
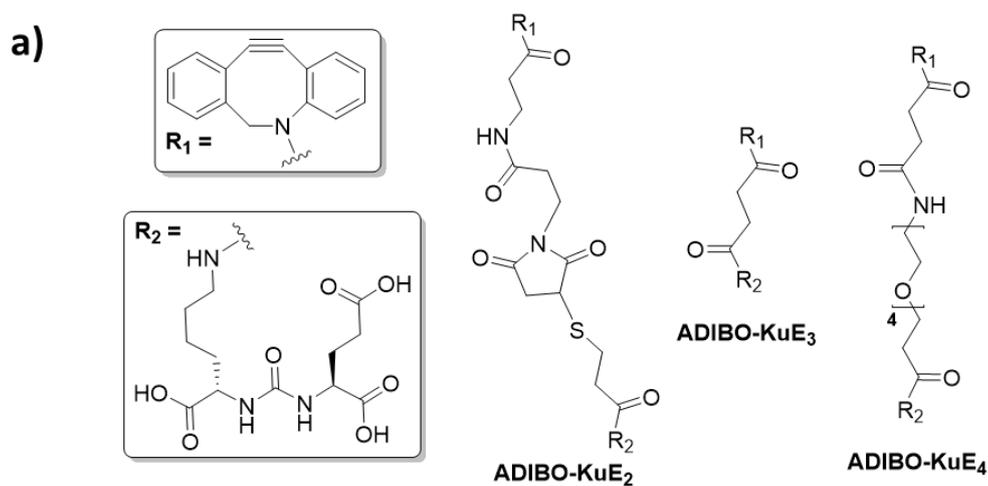


Figure 154 : affinité relative de chaque conjugué **ADIBO-KuE** et du PMPA pour les membranes cellulaires LnCAP-Luc en présence d'une quantité fixe du composé [¹²⁵I]67

Les courbes ainsi obtenues (cf. Figure 154) ont permis de déterminer une valeur de CI_{50} pour la référence PMPA ainsi que pour les différents conjugués **ADIBO-KuE** (cf. Figure 155 ci-après).



b)

Composé	CI_{50} (nM)
ADIBO-KuE2	16 ± 12
ADIBO-KuE3	32 ± 41
ADIBO-KuE4	135 ± 90
PMPA	238 ± 0,03

Figure 155 : a) structure des conjugués **ADIBO-KuE** étudiés et b) concentrations inhibitrices 50 calculées pour chaque conjugué **ADIBO-KuE** comparativement au PMPA

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 7. Études *in vitro*

Il ressort des valeurs de Cl_{50} obtenues pour les composés **ADIBO-KuE(2-4)** comparativement au PMPA que l'addition d'un groupement ADIBO au vecteur KuE n'altère pas la capacité de ce dernier à se lier au PSMA. Il semble toutefois que l'introduction d'un espaceur pégylé a un impact négatif sur la reconnaissance.

Ayant validé lors de cette étude préliminaire la capacité des différents conjugués **ADIBO-KuE** synthétisés à se lier *in vitro* au PSMA, ces derniers ont été engagés dans l'étape suivante consistant à fonctionnaliser en surface les UCNPs@N₃.

7.2. Couplage des dérivés de l'ADIBO aux UCNPs

Afin d'étudier le ciblage actif des UCNPs par le ligand KuE, les conjugués **ADIBO-KuE(2-4)** ont été couplées aux UCNPs@N₃ par réaction SPAAC. Sachant qu'après couplage des dérivés **ADIBO-KuE**, les UCNPs présenteront des fonctions acides carboxyliques en surface, l'intermédiaire ADIBO-CO₂H **39** a également été conjugué aux lots d'UCNPs@N₃ afin de servir de témoin négatif.

Le couplage des dérivés ADIBO aux UCNPs@N₃ a été réalisé selon le mode opératoire général suivant :

Les dérivés de l'ADIBO dilués dans un solvant adéquat (100 nmol/ μ L) ont été ajoutés à une solution aqueuse d'UCNP@N₃ (10 mg/mL). Les conjugués **ADIBO-KuE** ont été dilués dans l'eau déionisée, tandis que le composé **39** plus lipophile a été dilué dans le DMSO. Afin de saturer l'ensemble des positions disponibles en surface des UCNPs, les dérivés d'ADIBO ont été mis en réaction en excès par rapport à la quantité d'azotures présents, valeur estimée par le calcul (5 éq. pour les UCNPs@N_{3(10%)}, 2 éq. pour les UCNPs@N_{3(100%)}).

Après incubation dans une étuve à 37 °C pendant une nuit et retour à température ambiante, le milieu réactionnel a été déposé sur une colonne d'exclusion de taille (Sephadex G-25, PD10) éluée par de l'eau déionisée. Un aliquote de chaque fraction a été déposé sur une plaque de silice révélée au réactif de Dragendorff. Ce dernier entraîne une coloration orangée en présence de dérivés pégylés et donc d'UCNPs hydrophilisées. Les fractions de tête positives au révélateur ont alors été réunies puis transférées dans un tube AMICON Ultra-15 (cutoff : 30 kDa) complété à 15 mL avec du sérum physiologique avant d'être centrifugé (4 000 g, 15 min). Cette dernière étape a été reproduite deux fois afin d'éliminer la totalité des conjugués **ADIBO-KuE** mis en excès lors de la réaction de couplage.

Les UCNPs ont enfin été formulées dans le sérum physiologique à une concentration théorique de 10 mg/mL. Plusieurs aliquotes de cette solution mère ont été réalisés, dont un

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 7. Études *in vitro*

destiné aux analyses DLS (cf. Figure 156) et un autre lyophilisé afin de corriger après pesée la concentration initialement estimée.

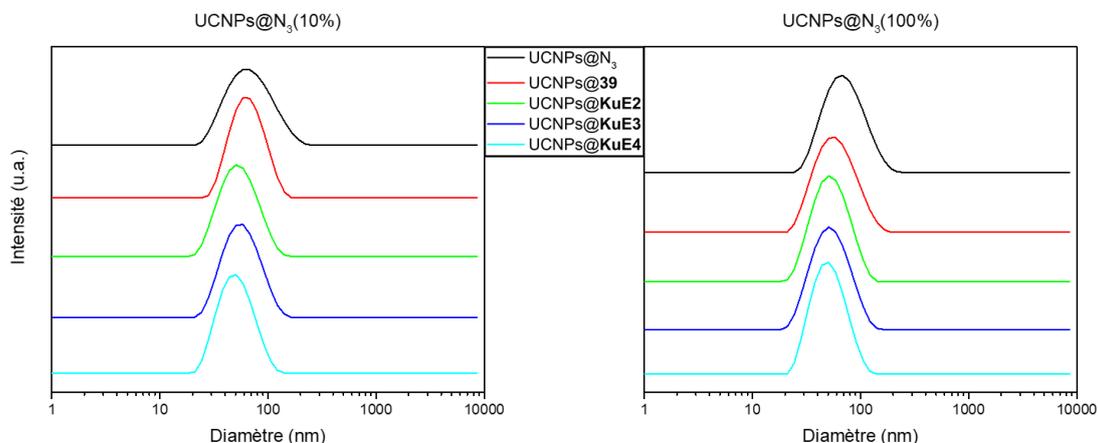


Figure 156 : spectres DLS dans l'eau déionisée des UCNPs@KuE(2-4) et UCNPs@39 après couplage SPAAC aux UCNPs@N₃ 10% (gauche) et 100% (droite) dont les spectres DLS sont donnés à titre de comparaison

Les spectres DLS ainsi que les PDI obtenus ont permis de confirmer l'homogénéité en termes de taille des lots obtenus avec des diamètres moyens compris entre 62 et 77,5 nm pour les UCNPs_(10%) et entre 47 et 54,5 nm pour les UCNPs_(100%) (cf. Tableau X).

Tableau X : analyses DLS des UCNPs@N₃ et UCNPs conjuguées aux dérivés de l'ADIBO

UCNPs@ligand	N ₃ (10%)		N ₃ (100%)	
	Taille (nm)	PDI	Taille (nm)	PDI
UCNPs@N ₃	61,3	0,155	65,3	0,155
UCNPs@KuE2	77,3	0,21	49,3	0,11
UCNPs@KuE3	70,7	0,27	48,8	0,12
UCNPs@KuE4	62,3	0,30	47,5	0,11
UCNPs@39	74,9	0,19	54,3	0,15

Bien que le diamètre des UCNPs avant et après fonctionnalisation demeure proche, les UCNPs présentant une fonctionnalisation de surface à 100% voient leur taille nettement diminuer probablement en raison d'une augmentation de leur hydrophilie. Cet effet peut être corrélé à la présence des groupements acide carboxylique, portés par les résidus KuE et 39 et déprotonés à pH physiologique, effet qui pourrait être renforcé pour le ligand **ADIBO-KuE4** par la présence de l'espaceur pégylé.

RÉSULTATS ET DISCUSSION
Chapitre 7. Études in vitro

7.3. Études de cytotoxicité

Un prérequis incontournable avant une quelconque application biologique est de connaître la toxicité des composés étudiés. Celle-ci a été évaluée, pour toutes les UCNPs finales, par un test de cytotoxicité sur deux lignées cellulaires humaines de tumeurs de prostate exprimant la luciférase : PC3-Luc (PSMA négatives), LNCaP-Luc (PSMA positives) et une lignée de fibroblastes humains.

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 24 puits à hauteur de 30 000 cellules par puits et incubées à 37 °C (5% CO₂). Après 48 heures, les milieux de cultures ont été remplacés par des milieux frais contenant les UCNPs en concentrations croissantes (1,2 µg/mL à 1,2 mg/mL pour les UCNPs@N₃(10%) et 1,7 µg/mL à 1,7 mg/mL pour les UCNPs@N₃(100%)), puis les cellules ont été incubées à 37 °C (5% CO₂) pendant 24 heures (cf. Figure 157). L'étude a été réalisée en triplicata.

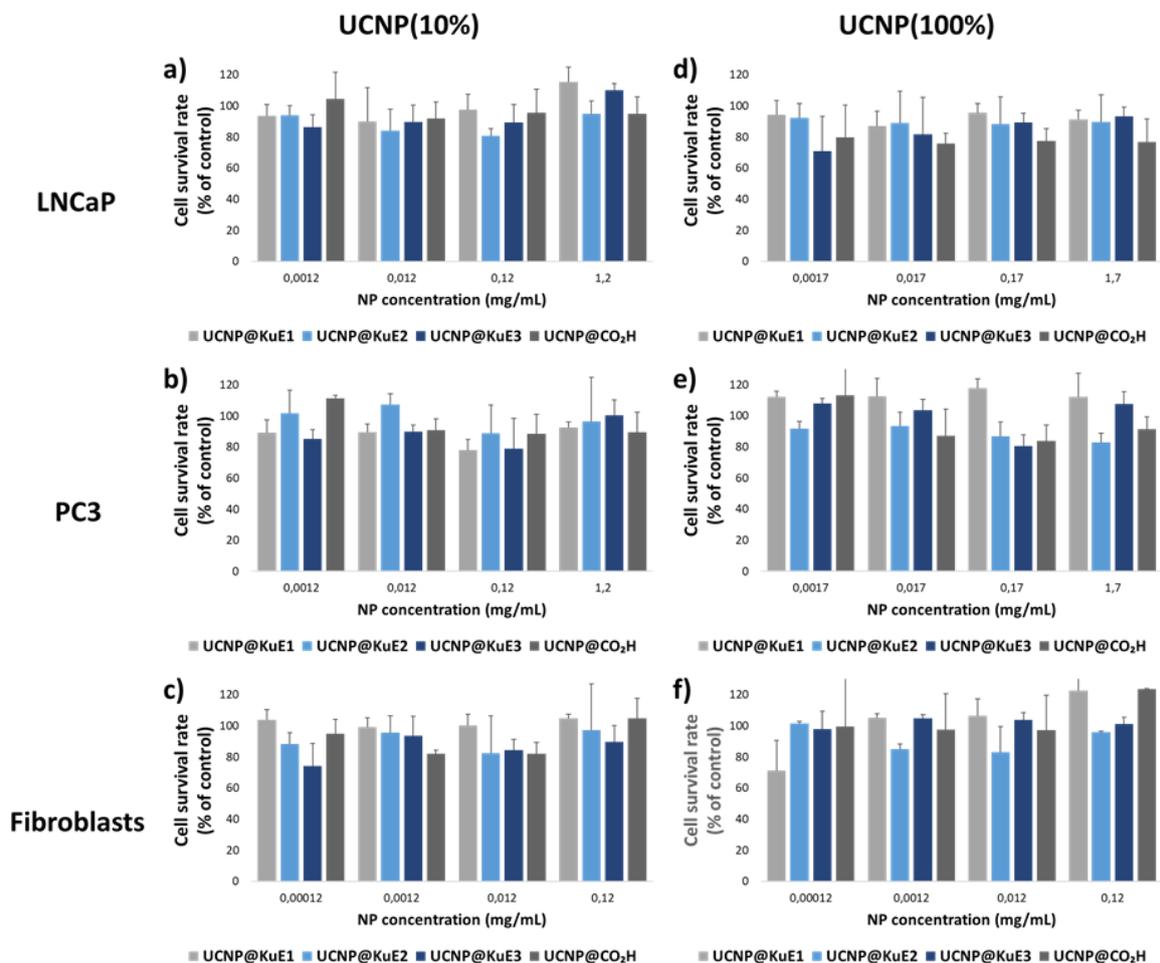


Figure 157 : survie cellulaire après 24 h d'incubation à 37 °C en présence de concentrations croissantes d'UCNPs@ligand(10% et 100%) sur cellules LNCaP-Luc (a et d), PC3-Luc (b et e) et fibroblastes (c et f)

Ces études ont révélé une quasi-innocuité des UCNPs *in vitro* sur les 3 lignées cellulaires étudiées avec une survie globale supérieure à 80% après 24 heures d'incubation. Ce résultat a été retrouvé aussi bien avec les UCNPs@KuE(10%) que les UCNPs@KuE(100%), et ce pour toutes les concentrations étudiées.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 7. Études *in vitro*

Afin d'étudier la capacité de ciblage des UCNPs fonctionnalisées par le ligand du PSMA, des études *in vitro* d'inhibition compétitive et de cytométrie en flux (CMF) ont été entreprises.

7.4. Études d'inhibition compétitive des UCNPs@KuE(2-4)

Ces études ont été réalisées dans les mêmes conditions que pour les ligands seuls, à savoir sur lignée LNCaP-Luc incubée pendant 1 heure en présence de concentrations croissantes d'UCNPs et en utilisant comme témoin de référence le PMPA (cf. Tableau XI). La gamme de concentrations d'UCNPs étudiée (i.e. de 0,1 µg/mL à 1,0 mg/mL) a été extrapolée à partir i) des données issues de la première étude d'inhibition compétitive sur les ligands seuls et ii) des calculs présentés paragraphe 6.1. L'étude a été réalisée en triplicata.

Tableau XI : concentrations inhibitrices 50 des UCNPs fonctionnalisées

	Fraction de ligands en surface (%)	CI_{50}	
		nM	µg/mL
UCNPs@ KuE2	10	1,74 ± 0,84	93,0 ± 45,0
	100	0,37 ± 0,04	17,0 ± 2,0
UCNPs@ KuE3	10	1,80 ± 0,69	96,0 ± 37,0
	100	0,60 ± 0,09	28,0 ± 4,0
UCNPs@ KuE4	10	7,95 ± 0,58	425,0 ± 31,0
	100	3,73 ± 0,52	173,0 ± 24,0
PMPA		238 ± 43	

Les quantités de matières d'UCNPs ont été calculées sur la base des pesées réalisées après lyophilisation et en utilisant les équations présentées au paragraphe 7.2 précédent. Ces résultats montrent tout d'abord l'intérêt de l'utilisation des UCNPs comme plateformes multifonctionnelles. En effet, pour les deux densités de fonctionnalisation par les ligands KuE en surface des UCNPs considérés (i.e. 10 et 100%), les valeurs de CI_{50} obtenues demeurent inférieures à celles des ligands seuls (pour rappel 16, 32 et 135 nM respectivement pour les conjugués **ADIBO-KuE(2-4)**). De plus, l'augmentation du nombre de ligands en surface des UCNPs semble corrélérer avec une diminution de la CI_{50} bien que cette corrélation ne soit pas linéaire. Enfin, la tendance relevée sur les ligands seuls, en termes d'efficacité de reconnaissance du PSMA comparativement à l'espaceur présent entre les groupements ADIBO et KuE, a été retrouvée pour les UCNPs fonctionnalisées, avec des valeurs de CI_{50} nettement inférieures pour les NPs associées aux dérivés **ADIBO-KuE2** et **3** comparativement au conjugué **ADIBO-KuE4**. Toutefois, la possibilité d'une dissociation du ligand d'hydrophilisation porteur du vecteur ciblant le PSMA, lié de façon non covalente à la surface des UCNPs, ne pouvant être écartée, des études complémentaires de CMF ont alors été entreprises.

7.5. Études de CMF des UCNPs@KuE(2-4)

La CMF consiste à analyser la diffusion de la lumière émise par un ou plusieurs lasers lorsqu'elle traverse un flux contenant les cellules à étudier renseignant en premier lieu sur la taille et la granularité de celles-ci. Ces mêmes lasers peuvent également être utilisés pour détecter des biomarqueurs membranaires spécifiques après couplage de sondes fluorescentes. Toutefois, le/les lasers utilisés en routine sont inadaptés pour l'UC. La synthèse des UCNPs fonctionnalisées a donc dû être modifiée pour répondre à ces contraintes techniques. En tirant avantage de la souplesse offerte par la chimie SPAAC, une faible quantité d'un dérivé ADIBO-PEG₄-fluorescéine commercial (dénommé par la suite ADIBO-FL) (0,5 mol%, $\lambda_{exc} = 492 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 517 \text{ nm}$) a été ajouté aux ligands **ADIBO-KuE(2-4)** ou ADIBO-CO₂H **39** lors de l'étape ultime de fonctionnalisation des UCNPs, réalisée dans les mêmes conditions que décrites en 7.2. Un des intérêts majeurs de cette stratégie réside dans le fait que la sonde fluorescente est liée à la surface des UCNPs indépendamment des différents conjugués **ADIBO-KuE**. Il ne peut donc pas y avoir de détection d'un ciblage spécifique par cette méthode sans association du fluorophore **et** du vecteur KuE aux NPs.

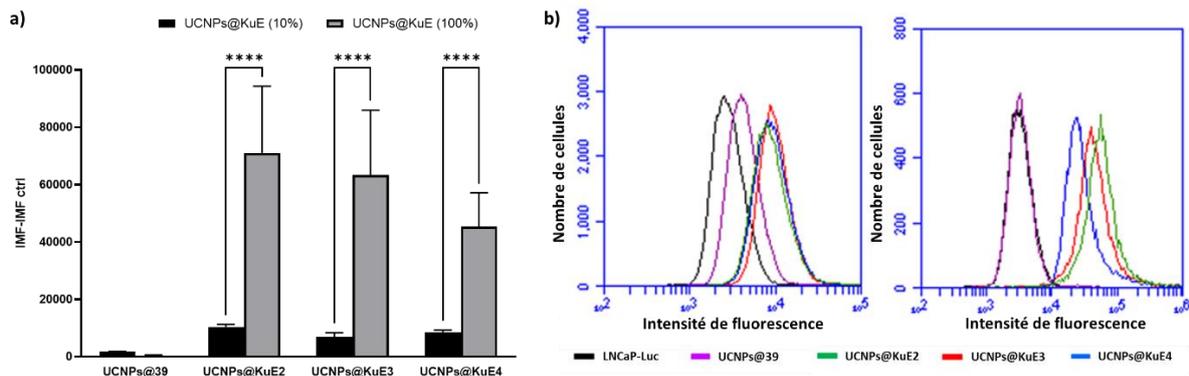


Figure 158 : a) comparaison de l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) après mise en présence des UCNPs@N₃(10 et 100%) fonctionnalisées avec les dérivés **ADIBO-KuE(2-4)** et **39** sur les cellules LNCaP-Luc et b) exemples d'histogrammes obtenus pour chaque analyse CMF

Les études de CMF ont été réalisées après incubation à 4 °C de 120 µg d'UCNPs (1,2 mg/mL) sur des cellules LNCaP-Luc (50 000 cellules). Après 30 minutes, les cellules ont été lavées 3 fois, centrifugées, suspendues dans un mélange de PBS et de sérum de veau fœtal (98/2) puis analysées par CMF. Comme indiqué dans la Figure 158, les cellules mises en présence des UCNPs@**39** présentent une intensité moyenne de fluorescence (IMF) proche du bruit de fond, contrairement aux cellules incubées avec les UCNPs fonctionnalisées par les ligands **ADIBO-KuE(2-4)** pour lesquelles des IMF, pour certaines intenses, ont pu être détectées. En particulier, l'utilisation des UCNPs@**KuE**_(100%) entraîne une augmentation significative de l'IMF comparativement aux UCNPs@**KuE**_(10%) ($p < 0,001$).

Ces résultats corroborent ceux obtenus lors de l'étude de compétition, à savoir une meilleure affinité pour le PSMA des UCNPs@**KuE**_(100%) par rapport aux UCNPs@**KuE**_(10%) ainsi qu'une moindre efficacité de ciblage du conjugué portant un espaceur PEG₄ (**ADIBO-KuE4**). L'ensemble de ces études nous a conduit à sélectionner les UCNPs@**KuE2**_(10 et 100%) pour les

études de captation cellulaire et de biodistribution *in vivo* après radiomarquage par l'iode-125.

7.6. Radiomarquage des UCNPs et étude de captation cellulaire

Préalablement à l'étude de biodistribution, une étude de captation cellulaire a été réalisée avec les UCNPs@**KuE2** et UCNPs@**39** (contrôle négatif) radiomarquées par le composé [¹²⁵I]**70**.

La stratégie de radiomarquage des UCNPs s'est inspirée de celle mise en œuvre au paragraphe 7.2 avec une légère modification dans l'ordre d'addition des sondes ADIBO et ce afin d'augmenter le rendement radiochimique. Ainsi, dans un flacon contenant une solution d'UCNPs dans l'eau déionisée (10 mg/mL) a été ajoutée dans un premier temps une solution du composé [¹²⁵I]**70** à haute activité spécifique (2,39-56,2 GBq. μmol^{-1}) dans le DMSO (≈ 740 kBq/mg UCNPs). Le flacon a été scellé et déposé dans un bain à 37 °C pendant 30 minutes. Après retour à température ambiante, le flacon a été desserti puis une solution de conjugué **ADIBO-KuE2** dans l'eau déionisée (1 nmol/ μL) ou du composé **39** dans le DMSO (1 nmol/ μL) a été ajoutée au milieu réactionnel. Le flacon a alors été serti puis déposé dans un bain à 37 °C pendant une nuit.

Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel a été déposé sur une colonne d'exclusion de taille de type PD10 avant que celle-ci soit éluée par de l'eau déionisée. Les fractions collectées ont été comptées et analysées par iTLC (éluant : acétone). Les fractions d'intérêt ont été rassemblées puis transférées dans un tube AMICON (cutoff : 30 kDa, 15 mL) complété à 15 mL avec du sérum physiologique avant d'être centrifugé (4 000 g, 15 min). Cette étape a été reproduite deux fois supplémentaires avant que le résidu ne soit dilué dans le sérum physiologique à hauteur de 1,5 mL. La concentration finale a été estimée après pesée d'un lot lyophilisé issu d'une réaction réalisée en parallèle avec le composé **39** et en l'absence de radioactivité. La pureté radiochimique des [¹²⁵I]UCNPs avant et après purification a été contrôlée par iTLC (cf. Figure 159 ci-après).

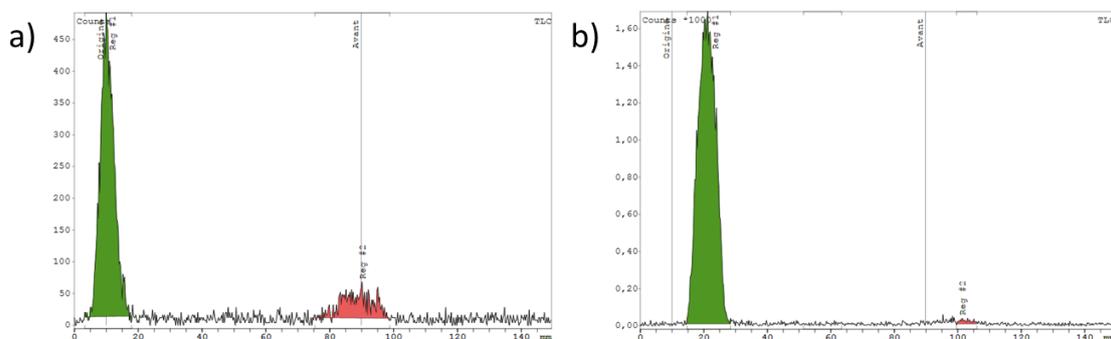


Figure 159 : exemples de radio-chromatogrammes des iTLC obtenus a) avant et b) après purification des UCNPs@**39**_(10%) radiomarquées par [¹²⁵I]**70**

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 7. Études in vitro

Ainsi, les [¹²⁵I]UCNPs@**KuE2**_(10 et 100%) ainsi que les [¹²⁵I]UCNPs@**39** ont été obtenues avec des rendements radiochimiques variant de 78 à 83% et une pureté radiochimique supérieure à 99%. De plus, un contrôle iTLC des NPs radiomarquées après une semaine de conservation à température ambiante n'a pas permis de mettre en évidence une éventuelle radiodéiodation fréquemment rencontrée pour les traceurs radioiodés.

Les cellules LNCaP-Luc (150 000 cellules) ont alors été incubées en présence des [¹²⁵I]UCNPs@**KuE2**_(10 et 100%) et des [¹²⁵I]UCNPs@**39**_(10 et 100%) (18,5 kBq) à 37 °C (5% CO₂). Après 1 heure d'incubation, les cellules ont été rincées avec du PBS froid et mises en présence de trypsine pendant 2 minutes. Après centrifugation, l'activité présente dans les culots cellulaires et le surnageant a été comptée. Cette étude a fait ressortir une très faible captation cellulaire pour les UCNPs@**KuE2**_(10%) et [¹²⁵I]UCNPs@**39** (3,2 ± 0,9% vs 2,2 ± 0,9%). En revanche, les UCNPs@**KuE2**_(100%) ont présenté des valeurs de fixation/internalisation cellulaire de l'ordre de 21,0 ± 7,8%. Ce résultat confirme un ciblage actif des cellules PSMA+ très largement supérieure pour les UCNPs@**KuE2**_(100%) par rapport aux UCNPs@**KuE2**_(10%) comme précédemment observée lors des tests de compétition inhibitrice et de CMF.

Chapitre 8. Étude in vivo

Dans le but de compléter et appuyer les résultats obtenus *in vitro*, ainsi que d'établir la preuve de concept d'une approche bimodale pour l'imagerie des cancers de la prostate, une étude de biodistribution a été réalisée. Cette étude, préliminaire, a été réalisée avec les UCNPs@KuE2_(10%) et les UCNPs@39_(10%) sur des souris NMRI nude mâles porteurs de xénogreffes de tumeurs LNCaP-Luc. Faute de temps, elle n'a pas pu être réalisée sur leurs homologues fonctionnalisés à 100%.

L'étude de biodistribution a été réalisée 71 jours après l'inoculation sous cutanée au niveau du flanc des cellules tumorales (1.10^7 cellules suspendues dans un mélange PBS/Matrigel®, 1/1, v/v) aboutissant à des tumeurs d'environ 500 mm³. Les UCNPs utilisées pour cette étude ($30,6 \pm 0,3$ nm selon la TEM), fonctionnalisées soit avec le ligand **ADIBO-KuE2** soit avec la molécule **39**, ont été radiomarquées avec l'iode-125 suivant le protocole décrit au paragraphe 7.6. Les [¹²⁵I]UCNPs ainsi obtenues ont été formulées dans une solution de sérum physiologique à 31,5 MBq/mL puis injectées en i.v. dans la queue des souris (390 ± 60 kBq par animal) distribuées aléatoirement en 5 groupes (3 souris par groupe). La distribution a été déterminée 5 minutes, 1 heure, 3 heures, 24 heures et 48 heures post injection. Les souris ont été sacrifiées par asphyxie au dioxyde de carbone, la tumeur et des organes et fluide d'intérêt ont été prélevés, pesés, puis leur activité radioactive a été mesurée au moyen d'un compteur gamma 1480 Wizard. Les résultats exprimés en %DI/g, sauf pour la thyroïde pour laquelle les résultats sont exprimés en %DI par organe, sont donnés Tableau XII ci-après.

Tableau XII : biodistribution des [¹²⁵I]UCNPs après injection i.v. dans la queue de souris xénogreffées avec des cellules LNCaP-Luc. Les valeurs données sont les pourcentages moyens de dose injectée par gramme d'organe (n = 3). *Moyenne de dose injectée

	UCNPs@39	UCNPs@KuE2	UCNPs@39	UCNPs@KuE2	UCNPs@39	UCNPs@KuE2	UCNPs@39	UCNPs@KuE2	UCNPs@39	UCNPs@KuE2
	5 min		1 h		3 h		24 h		48 h	
Tumeur	0,95 ± 0,71	0,42 ± 0,22	0,60 ± 0,43	0,56 ± 0,33	0,48 ± 0,34	0,34 ± 0,07	0,35 ± 0,15	0,20 ± 0,07	0,49 ± 0,19	0,29 ± 0,02
Poumons	8,63 ± 1,50	4,15 ± 1,19	2,72 ± 2,27	1,98 ± 1,84	0,83 ± 0,53	0,95 ± 0,11	0,32 ± 0,02	0,60 ± 0,47	0,44 ± 0,23	0,59 ± 0,14
Rate	5,12 ± 1,00	3,48 ± 0,88	12,8 ± 10,6	14,2 ± 11,2	13,3 ± 16,4	13,2 ± 1,37	16,0 ± 0,48	20,0 ± 18,7	19,9 ± 10,6	13,8 ± 3,50
Reins	5,45 ± 0,97	3,13 ± 0,40	1,41 ± 1,68	1,54 ± 1,15	0,98 ± 0,63	0,98 ± 0,15	0,84 ± 0,11	1,28 ± 1,08	0,70 ± 0,18	0,61 ± 0,09
Estomac	1,15 ± 0,51	0,51 ± 0,09	1,69 ± 1,22	0,33 ± 0,18	0,46 ± 0,48	0,22 ± 0,08	0,30 ± 0,13	0,28 ± 0,09	0,28 ± 0,08	0,19 ± 0,03
Foie	8,01 ± 1,78	4,60 ± 1,25	15,2 ± 13,8	13,9 ± 10,4	12,0 ± 13,3	15,6 ± 9,84	21,6 ± 2,06	17,5 ± 5,66	14,5 ± 1,96	13,9 ± 2,56
Cœur	3,92 ± 0,84	3,85 ± 0,67	1,84 ± 1,32	1,14 ± 0,88	0,54 ± 0,23	0,54 ± 0,03	0,19 ± 0,03	0,26 ± 0,17	0,17 ± 0,05	0,22 ± 0,05
Intestins	1,01 ± 0,17	0,70 ± 0,04	0,93 ± 0,82	0,59 ± 0,55	0,69 ± 0,68	0,35 ± 0,06	0,74 ± 0,17	0,35 ± 0,21	0,66 ± 0,23	0,24 ± 0,05
Cerveau	0,79 ± 0,30	0,57 ± 0,07	0,27 ± 0,23	0,12 ± 0,09	0,06 ± 0,04	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,03	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,01
Thyroïde*	0,12 ± 0,01	0,22 ± 0,10	0,11 ± 0,07	0,04 ± 0,04	0,03 ± 0,02	0,02 ± 0,00	0,06 ± 0,02	0,06 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,03
Glandes salivaires	2,01 ± 0,08	1,49 ± 0,47	0,92 ± 0,66	0,53 ± 0,39	0,35 ± 0,19	0,29 ± 0,10	0,21 ± 0,06	0,16 ± 0,04	0,14 ± 0,013	0,21 ± 0,06
Muscle	0,38 ± 0,03	0,29 ± 0,02	0,31 ± 0,23	0,26 ± 0,12	0,12 ± 0,04	0,14 ± 0,06	0,09 ± 0,04	0,05 ± 0,02	0,17 ± 0,18	0,08 ± 0,04
Prostate	1,56 ± 1,42	0,60 ± 0,23	1,23 ± 0,65	1,49 ± 1,18	0,45 ± 0,32	1,02 ± 0,62	0,19 ± 0,15	0,12 ± 0,08	0,08 ± 0,07	0,26 ± 0,35
Os	1,10 ± 0,23	0,86 ± 0,11	1,37 ± 1,09	0,85 ± 0,54	1,08 ± 1,06	0,98 ± 0,14	1,09 ± 0,30	0,80 ± 0,71	1,05 ± 0,73	0,76 ± 0,26
Vessie	1,12 ± 0,51	0,72 ± 0,15	4,80 ± 4,24	18,1 ± 14,3	4,92 ± 7,21	27,4 ± 7,22	1,06 ± 0,62	0,36 ± 0,39	1,07 ± 0,06	0,21 ± 0,09
Sang	17,1 ± 1,12	15,1 ± 3,61	8,42 ± 7,19	3,83 ± 3,91	1,38 ± 0,70	1,04 ± 0,10	0,04 ± 0,03	0,07 ± 0,06	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,01
Queue	2,19 ± 1,02	6,40 ± 7,32	11,8 ± 17,1	9,87 ± 13,1	16,5 ± 13,3	21,8 ± 12,2	0,97 ± 0,70	4,02 ± 2,46	1,15 ± 1,42	1,10 ± 0,51

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 8. Étude *in vivo*

Aucun signe de déiodation *in vivo* des UCNPs radioiodées n'a pu être mis en évidence, comme en témoigne le faible pourcentage de radioactivité détecté au sein de la thyroïde pour tous les temps étudiés. Au temps précoce de 5 minutes après injection, les deux types d'UCNPs (UCNPs@**39**_(10%) et UCNPs@**KuE2**_(10%) respectivement) se sont avérées être présentes majoritairement dans le sang ($17,1 \pm 1,12$ et $15,1 \pm 3,61$ %DI/g d'organe), les poumons ($8,63 \pm 1,50$ et $4,15 \pm 1,19$ %DI/g), le foie ($8,01 \pm 1,78$ et $4,60 \pm 1,25$ %DI/g), les reins ($5,45 \pm 0,97$ et $3,13 \pm 0,40$ %DI/g) et la rate ($5,12 \pm 1,00$ et $3,48 \pm 0,88$ %DI/g). Après 48 heures, seuls le foie ($14,5 \pm 1,96$ et $13,9 \pm 2,56$ %DI/g) et la rate ($19,9 \pm 10,6$ et $13,8 \pm 3,50$ %DI/g) ont révélé une accumulation de la radioactivité.

Cette observation est cohérente avec les données de la littérature pour des UCNPs similaires.¹⁴⁴ De plus, la présence des UCNPs au sein du compartiment circulant pendant près de 3 heures tend à confirmer la furtivité et la stabilité importante de ces UCNPs. La faible quantité de radioactivité retrouvée au niveau de la tumeur pour les UCNPs vectorisées à tous les temps de l'étude ($0,42 \pm 0,22$ %DI/g, $0,56 \pm 0,33$ %DI/g, $0,34 \pm 0,07$ %DI/g, $0,20 \pm 0,07$ %DI/g, $0,29 \pm 0,02$ %DI/g, à 5 minutes, 1 heure, 3 heures, 24 heures et 48 heures respectivement) semble indiquer une vectorisation active et/ou passive par effet EPR limitée. Cette observation est appuyée par des ratio tumeur/sang largement inférieurs à 1 : 0,028, 0,146 et 0,327 à 5 minutes, 1 heure et 3 heures respectivement.

Une différence entre les deux types d'UCNPs peut toutefois être soulevée, à savoir que les UCNPs@**KuE2**_(10%) semblent être fortement et rapidement éliminées par voie rénale comme en témoignent les valeurs retrouvées au niveau de la vessie ($18,1 \pm 14,3$ %DI/g à 1 heure p.i. et $27,4 \pm 7,22$ %DI/g à 3 heures p.i.) comparativement aux UCNPs@**39** ($4,80 \pm 4,24$ %DI/g à 1 heure p.i. et $4,92 \pm 7,21$ %DI/g à 3 heures p.i.). Bien que les écarts types soient importants, cette tendance pourrait s'expliquer par une différence d'hydrophilie entre ces deux types d'UCNPs, le composé **39** étant probablement plus hydrophobe que le ligand **KuE2**.

Enfin, les valeurs variables obtenues dans la queue révèlent une hétérogénéité des injections. Cela n'affecte néanmoins pas les données de distribution, dans la mesure où l'activité résiduelle au point d'injection a été retranchée pour chaque valeur donnée.

Le signal fluorescent par UC de certains organes prélevés a pu être analysé en imagerie optique (IVIS Spectrum®) en parallèle de l'étude de biodistribution pour les UCNPs@**KuE2**_(10%). En raison de contraintes techniques, seuls les organes prélevés aux temps $t = 5$ minutes, 1 heure et 3 heures ont pu être étudiés (cf. Figure 160 ci-après).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 8. Étude *in vivo*

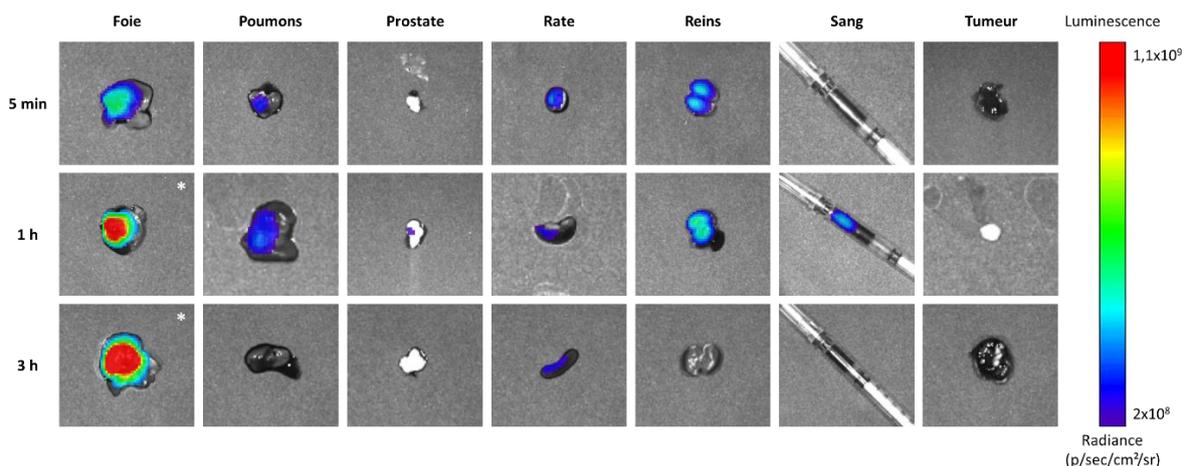


Figure 160 : images de fluorescence des organes prélevés 5 min, 1 h et 3 h après injection de 390 kBq d'UCNPs@KuE2 chez des souris xénogreffées avec des cellules LNCaP-Luc (puissance laser : 75 mW/cm²). *Image saturée

Les images de fluorescence présentées ci-avant Figure 160, bien que non quantifiables, confirment les résultats observés lors de la précédente étude, à savoir que les UCNPs ont tendance à s'accumuler essentiellement dans le foie, dont les images de fluorescence sont rapidement saturées comparativement aux autres organes à puissance laser égale. Il est apparu après 3 heures que seuls le foie et la rate semblaient encore contenir des UCNPs. De plus, les images d'UC réalisées sur les reins et le sang tendent à confirmer les résultats obtenus lors de l'étude de biodistribution, à savoir une élimination partiellement rénale et une furtivité moyennement longue.

Bien que les résultats de cette étude de biodistribution n'aient pas été à la hauteur de nos attentes en termes de ciblage tumoral, l'essentiel des UCNPs étant retrouvées au sein du foie après phagocytose par les cellules de Kupffer (système réticulo-endothélial) et de la rate pour les UCNPs non éliminées par voie rénale, de nombreux points positifs ont été relevés. En premier lieu, et comme le reflètent les valeurs faibles d'activité radioactive retrouvées au sein de la thyroïde lors des études de biodistribution, les [¹²⁵I]UCNPs synthétisées ont présenté *in vivo* une stabilité radiochimique très élevée validant la stratégie de radiomarquage mise en œuvre. Également, une distribution sanguine élevée pendant plus de 3 heures, associée à une faible captation pulmonaire et une élimination rénale élevée ont été observées, confirmant ici aussi une stabilité renforcée des UCNPs synthétisées lors de ce projet comparativement à celles précédemment obtenues au laboratoire pour lesquelles une forte accumulation dans les poumons avait été observée (Bibliographie, paragraphe 3.6, Objectifs).^{244,254} Enfin, et bien que peu d'organes aient pu être analysés par fluorescence d'UC, les résultats sont cohérents avec les données de distribution de la radioactivité, indiquant notamment un temps de distribution sanguine relativement long ainsi qu'une élimination hépatique majoritaire.

***CONCLUSION ET
PERSPECTIVES***

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les travaux présentés dans ce manuscrit avaient pour objectif principal de concevoir des UCNPs biocompatibles et fonctionnalisables en surface par des ligands de reconnaissance du PSMA afin d'envisager de futures études biologiques concernant leur capacité à cibler cet antigène surexprimé par les cellules tumorales prostatiques.

La première partie de ce travail de thèse a été consacrée à synthétiser des UCNPs cœur/coquille dopées par l'ytterbium et le thulium selon les protocoles précédemment développés au laboratoire. Face aux nombreux problèmes de reproductibilité rencontrés, une méthode alternative de synthèse des UCNPs selon une procédure « one-pot » a été élaborée. Les différents paramètres expérimentaux ont également été optimisés à travers la réalisation d'un nombre important de synthèses pilotes. Ces améliorations ont permis de produire avec une bonne reproductibilité des lots d'UCNPs homogènes en termes de taille, de morphologie et de cristallinité.

La deuxième partie de ces travaux de thèse a consisté à synthétiser douze ligands d'hydrophilisation des UCNPs, variant par leur longueur de chaîne, leur fonction d'accroche en surface des NPs (phosphate, bis- ou tétra-phosphonate) ainsi que leur extrémité (hydroxyle ou méthoxyle) (cf. Figure 161).

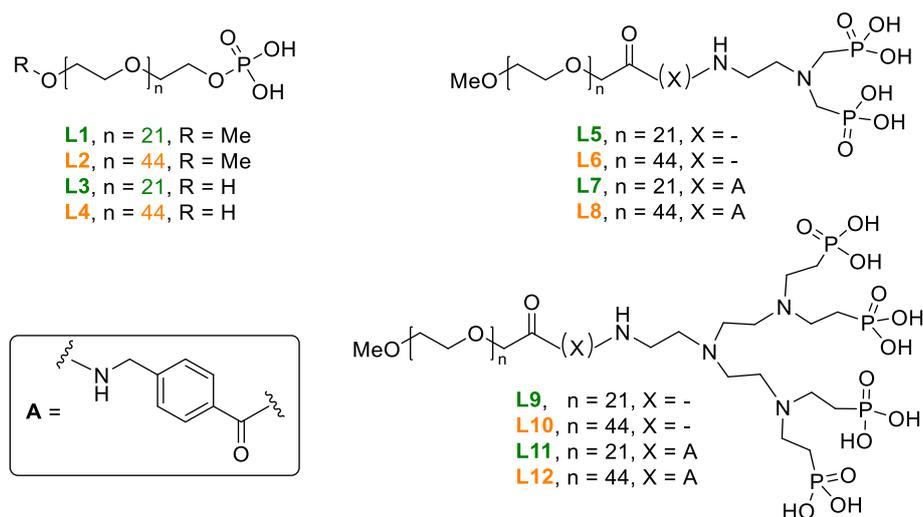


Figure 161 : structures des douze dérivés pégylés utilisés pour l'hydrophilisation des UCNPs

Dans un deuxième temps, quatre vecteurs de reconnaissance du PSMA conjugués à l'ADIBO (i.e. **ADIBO-KuE(1-4)**), ont été développés en vue d'être couplés par chimie SPAAC en surface des UCNPs hydrophilisées. La première voie de synthèse, consistant à déprotéger en dernière étape les fonctions acides carboxyliques du résidu KuE, s'est heurtée à une instabilité inattendue des conjugués, quelles que soient les conditions mises en œuvre. Une voie alternative a alors été développée consistant à déprotéger les fonctions acides des ligands du PSMA avant couplage aux dérivés ADIBO. Cette stratégie a permis d'accéder aux conjugués

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

ADIBO-KuE(1-4) désirés avec des rendements globaux (9% à 26% en 8 à 10 étapes) autorisant une production à large échelle (plusieurs grammes) de chaque ligand (cf. Figure 162).

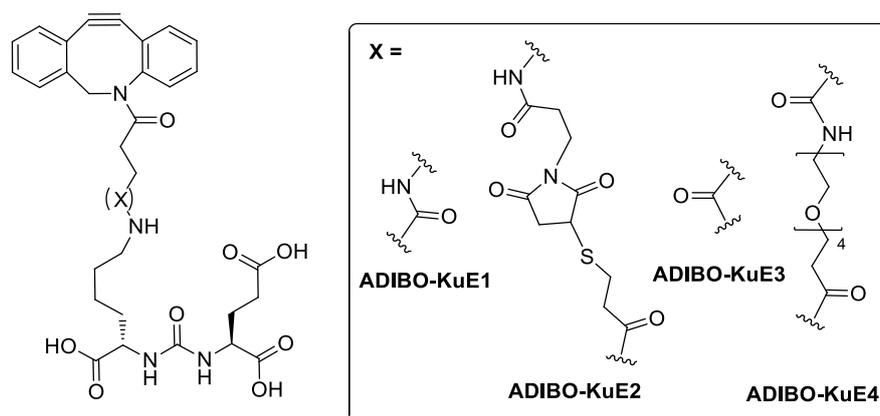


Figure 162 : structures des quatre conjugués **ADIBO-KuE** synthétisés pour le ciblage du PSMA

Après avoir mis au point les conditions d'hydrophilisation et de purification des UCNP@L(1-12), une étude de leur stabilité par DLS dans divers milieux biologiques a été réalisée. Une première évaluation dans l'eau déionisée a mis en évidence une faible stabilité des UCNP hydrophilisées par des PEGs-phosphate présentant une extrémité hydroxyle comparativement à leurs analogues méthoxyles. Également, et en accord avec les données retrouvées dans la littérature, une stabilité des UCNP hydrophilisées, d'une part proportionnelle au nombre de fonctions d'ancrage portées par les ligands pégylés, et d'autre part à la taille du polymère, a été mise en évidence dans ce même milieu. Ces études de stabilité élargies au PBS, à une solution saline de NaCl 0,9% et à deux milieux de culture (RPMI, MEM) ont conduit à sélectionner le dérivé pégylé tétra-phosphonate **L10** comme ligand d'hydrophilisation pour la suite des travaux. Un analogue de ce ligand portant une extrémité azoture a alors été synthétisé avec succès dans le but de réaliser des couplages par chimie bioorthogonale SPAAC avec les dérivés **ADIBO-KuE** obtenus auparavant.

Dans un troisième temps, des UCNP comportant en théorie 10 et 100% de fonctions azotures à leur surface ont été synthétisés. Le nombre de ligands d'hydrophilisation et de fonctions azotures réellement présents par unité de surface pour ces deux types d'UCNP a alors été évalué expérimentalement par ATG, ICP-OES et dosage radioactif par le ligand ADIBO [¹²⁵I]**70**. Ces résultats ont permis d'établir une valeur moyenne de densité de ligands par unité de surface de 1,3 ligand/nm² tout en confirmant l'efficacité de la fonctionnalisation de surface par des groupements azotures dans des ordre de grandeur proches de ceux initialement attendus.

Les conjugués **ADIBO-KuE** ont ensuite été couplés par chimie SPAAC aux UCNP@N₃(10 ou 100%) précédentes puis leur cytotoxicité a été étudiée sur différentes lignées humaines tumorales (LNCaP-Luc, PC3-Luc) et saine (fibroblastes). À la suite de ces travaux démontrant la faible toxicité des UCNP fonctionnalisées, des études d'inhibition compétitive et de CMF ont été entreprises afin d'évaluer *in vitro* leur capacité de ciblage du PSMA. Il ressort de ces premières expériences que la densité de ligands KuE présentés en surface des UCNP semble

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

être un facteur clef de la reconnaissance UCNPs@KuE / antigène, l'espaceur introduit entre la fonction ADIBO et le ligand KuE jouant un rôle secondaire. Fort de ces résultats, les UCNPs@**KuE2** ont été sélectionnées puis radiomarquées par l'iode-125 en vue d'études de biodistribution chez l'animal. Au préalable, l'impact de la stratégie de radiomarquage sur la vectorisation a été analysé par captation cellulaire sur la lignée LNCaP-Luc. Il ressort de cette étude que seules les [¹²⁵I]UCNPs@**KuE2**_(100%) présentent une captation cellulaire notable après 1 heure d'incubation (> 20%) tandis que les [¹²⁵I]UCNPs@**KuE2**_(10%) ainsi que les homologues non vectorisées [¹²⁵I]UCNPs@**39**_(10 et 100%) se fixent faiblement aux cellules LNCaP-Luc. Ces données sont cohérentes avec celles retrouvées pour les UCNPs non-radiomarquées.

Par manque de temps et en raison des contraintes sanitaires, seule une première étude de biodistribution portant sur les UCNPs@**KuE2**_(10%) a pu être réalisée comparativement aux UCNPs@**39**_(10%) utilisées comme contrôle négatif. Bien que cette étude n'ait pas montré de différence significative entre les deux types d'UCNPs utilisées vis-à-vis de la biodistribution, des résultats encourageants ont été observés. Les UCNPs vectorisées ont ainsi été retrouvées majoritairement dans le foie (principal organe d'élimination de ces nano-objets), et d'une façon plus modérée au sein de la rate et des poumons. De façon plus surprenante, compte tenu de leur taille et de leur morphologie, une élimination rénale importante a été relevée. De plus, le temps de circulation sanguine d'environ 3 heures semble indiquer que les UCNPs synthétisées présentent une importante hydrophilie et furtivité. Les données de biodistribution associées aux premières images d'upconversion, laisse entrevoir la possibilité de réaliser une imagerie bimodale des cancers de la prostate combinant la scintigraphie corps entier à l'imagerie d'UC et la détection radioactive en conditions per-opératoires, sous réserve, compte tenu des données *in vitro*, d'utiliser les UCNPs@**KuE2**_(100%).

En élargissant les retombées potentielles de ces travaux, il est raisonnable de penser que l'approche méthodologique développée lors de ce projet pourraient être transposée aisément à diverses UCNPs@OA. L'utilisation de la chimie SPAAC est ici aussi un atout majeur car elle permet d'envisager une multitude de combinaison par modulation, tant du ligand de reconnaissance (ouvrant la voie au ciblage actif de diverses pathologies, cancéreuses ou non) que du groupement prosthétique radiomarqué (permettant en fonction du radionucléide utilisé d'accéder à la détection radioactive per-opératoire, aux imagerie TEMP, TEP voire à la radiothérapie interne vectorisée).

ANNEXES

Annexe I. Synthèse des nanoparticules NaYF₄:Yb_{0,20},Tm_{0,02}@NaYF₄

Synthèse du cœur NaY_{0,78}F₄:Yb_{0,20},Tm_{0,02}

Dans un tricol de 100 mL muni d'un barreau aimanté sont additionnés successivement le chlorure d'yttrium (152,3 mg, 0,78 mmol, 0,78 éq.), le chlorure d'ytterbium (55,9 mg, 0,20 mmol, 0,20 éq.), le chlorure de thulium (5,5 mg, 0,02 mmol, 0,02 éq.), l'acide oléique (6 mL) puis le 1-octadécène (15 mL).

La solution est agitée à 150 °C pendant 30 min (10 °C/min). Après retour à 60 °C est ajouté un mélange d'une solution méthanolique de soude (100 mg, 2,5 mmol, 2,5 éq., 10 mL) et d'une solution méthanolique de fluorure d'ammonium (148 mg, 4,0 mmol, 4 éq., 10 mL) préparé extemporanément. La solution est chauffée à 110 °C pendant 20 min (10 °C/min) puis à la même température sous vide pendant 10 min. Après 3 cycles vide/argon, le milieu réactionnel est porté à 302 °C pendant 1 h (10 °C/min).

Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est transféré dans un tube en téflon de 50 mL, rincé avec du cyclohexane (5 mL) puis les UCNPs sont précipitées par ajout d'éthanol (30 mL), vortexées puis centrifugées (6666 g, 10 min, 22 °C). Après élimination du surnageant, le culot est suspendu dans le cyclohexane (20 mL) et les UCNPs sont précipitées par ajout d'éthanol (20 mL), vortexées puis centrifugées (6666 g, 10 min, 22 °C) et l'opération est reproduite une fois supplémentaire. Le résidu est repris dans le cyclohexane (20 mL), vortexé puis centrifugé (999 g, 5 min, 22 °C).

Le surnageant contenant les UCNPs est pipeté dans un flacon en verre et conservé à température ambiante.

Synthèse de la coquille NaY_{0,78}F₄:Yb_{0,20},Tm_{0,02}@NaYF₄

Dans un tricol de 100 mL muni d'un barreau aimanté sont additionnés successivement le chlorure d'yttrium (48,8 mg, 0,25 mmol, 1 éq.), l'acide oléique (6 mL) puis le 1-octadécène (15 mL).

La solution est agitée à 150 °C pendant 30 min (10 °C/min). Après retour à 60 °C est ajoutée une solution d'UCNPs NaY_{0,78}F₄:Yb_{0,20}Tm_{0,02} (90 mg) dans le cyclohexane (15 mL) préalablement passées aux US 30 min. Le milieu réactionnel est chauffé à 110 °C pendant 8 min (10 °C/min).

Après retour à 50 °C est ajouté un mélange d'une solution méthanolique de soude (25 mg, 625 µmol, 2,5 éq., 10 mL) et d'une solution méthanolique de fluorure d'ammonium (37 mg, 1 mmol, 4 éq., 10 mL) préparé extemporanément. La solution est chauffée à 110 °C pendant 20 min (10 °C/min) puis à la même température sous vide pendant 10 min. Après 3 cycles vide/argon, le milieu réactionnel est porté à 302 °C pendant 1 h 30 (10 °C/min).

Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est transféré dans un tube en téflon de 50 mL, rincé avec du cyclohexane (5 mL) puis les UCNPs sont précipitées par ajout d'éthanol (30 mL), vortexées puis centrifugées (6666 g, 10 min, 22 °C). Après élimination du surnageant, le culot est suspendu dans le cyclohexane (20 mL) et les UCNPs sont précipitées par ajout d'éthanol (20 mL), vortexées puis centrifugées (6666 g, 10 min, 22 °C) et l'opération est reproduite une fois supplémentaire. Le résidu est repris dans le cyclohexane (20 mL), vortexé puis centrifugé (999 g, 5 min, 22 °C).

Le surnageant contenant les UCNPs est pipeté dans un flacon en verre et conservé à température ambiante.

Synthèse one-pot des UCNPs cœur/coquille NaY_{0,78}F₄:Yb_{0,20},Tm_{0,02}@NaYF₄

Dans un tricol de 100 mL muni d'un barreau aimanté sont additionnés successivement le chlorure d'yttrium (152,3 mg, 0,78 mmol, 0,78 éq.), le chlorure d'ytterbium (55,9 mg, 0,20 mmol, 0,20 éq.), le chlorure de thulium (5,5 mg, 0,02 mmol, 0,02 éq.), l'acide oléique (6 mL) puis le 1-octadécène (15 mL).

La solution est agitée à 150 °C pendant 30 min (10 °C/min). Après retour à 60 °C est ajouté un mélange d'une solution méthanolique de soude (100 mg, 2,5 mmol, 2,5 éq., 10 mL) et d'une solution méthanolique de fluorure d'ammonium (148 mg, 4,0 mmol, 4 éq., 10 mL) préparé extemporanément. La solution est chauffée à 110 °C pendant 20 min (10 °C/min) puis à la même température sous vide pendant 10 min. Après 3 cycles vide/argon, le milieu réactionnel est porté à 302 °C pendant 1 h (10 °C/min).

Après retour à 60 °C est ajouté le chlorure d'yttrium (111,9 mg, 0,57 mmol, 0,57 éq.) puis la solution est chauffée à 150 °C pendant 30 min (10 °C/min). Après retour à 60 °C est ajouté un mélange d'une solution méthanolique de soude (57,3 mg, 1,43 mmol, 1,43 éq., 10 mL) et d'une solution méthanolique de fluorure d'ammonium (84,8 mg, 2,3 mmol, 2,3 éq., 10 mL) préparé extemporanément. La solution est chauffée à 110 °C pendant 20 min (10 °C/min) puis à la même température sous vide pendant 10 min. Après 3 cycles vide/argon, le milieu réactionnel est porté à 302 °C pendant 1 h 30 (10 °C/min).

Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est transféré dans un tube en téflon de 50 mL, rincé avec du cyclohexane (5 mL) puis les UCNPs sont précipitées par ajout d'éthanol (30 mL), vortexées puis centrifugées (6666 g, 10 min, 22 °C). Après élimination du surnageant, le culot est suspendu dans le cyclohexane (20 mL) et les UCNPs sont précipitées par ajout d'éthanol (20 mL), vortexées puis centrifugées (6666 g, 10 min, 22 °C) et l'opération est reproduite une fois supplémentaire. Le résidu est repris dans le cyclohexane (20 mL), vortexé puis centrifugé (999 g, 5 min, 22 °C).

Le surnageant contenant les UCNPs est pipeté dans un flacon en verre et conservé à température ambiante.

Annexe II. Analyses des UCNPs

Lorsqu'un séchage est nécessaire (réalisation d'une pesée, changement de solvant), les UCNPs sont reprises le plus rapidement possible dans un solvant adéquat après séchage afin de limiter leur agglomération.

Les analyses de microscopie électronique à transmission (MET) ont été réalisées sur un MET Hitachi (H-7650) à une accélération de 80 kV associé à une caméra Hamamatsu placée en position latérale. Avant analyse, chaque échantillon (10 μ L, 1 mg/mL) a été déposé sur une membrane de Carbone-Formvar en cuivre et évaporé à température ambiante.

Les diffractogrammes sur poudre par diffraction des rayons X ont été obtenus à température ambiante sur un diffractomètre X'Pert pro (Panalytical) avec une anode au cuivre ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). Les acquisitions ont été effectuées entre 10° et 90° en 2θ .

Les spectres IR des UCNPs ont été enregistrés de 4000 à 440 cm^{-1} sur un spectrophotomètre FTIR Nicolet 5700 avec réflectance totale atténuée (ATR) (Fisher Scientific).

Les analyses de diffractions de rayons X aux petits angles (SAXS) ont été réalisées sur une plateforme de diffusion à rayons X placée sur un goniomètre (Empyrean Nano edition, Malvern Panalytical) avec une anode au cuivre. Les acquisitions ont été effectuées entre $-0,11^\circ$ et 8° en 2θ . Chaque échantillon (1 mg/mL) a été placé dans un capillaire en quartz (diamètre 1 mm) flambé pour éliminer les traces d'humidité. Pour chaque analyse, une acquisition a été réalisée avec le solvant pur afin d'en soustraire le bruit de fond.

Les analyses de DLS ont été effectuées sur un appareil Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical). Avant chaque analyse DLS, chaque lot utilisé (1 mg/mL) est déposé dans un bain à US pendant 30 min puis filtré sur un filtre PTFE de $0,20 \mu\text{m}$ préalablement humidifié avec le solvant correspondant. Les analyses ont été effectuées à 20°C à un angle de 173° et un laser à 633 nm .

Les analyses de thermogravimétrie (ATG) ont été réalisées sur échantillons évaporés sous pression réduite ou lyophilisés sur un appareil SETSYS Evolution TG-ATD DSC. Les UCNPs ont été chauffées à 100°C ($10^\circ \text{C}/\text{min}$), maintenues à 100°C pendant 30 min puis chauffées à 800°C ($10^\circ \text{C}/\text{min}$).

Les échantillons d'analyse d'ICP-MS et d'ICP-OES ont été préparés par minéralisation des UCNPs (20 μ L d'une solution à 10 mg/mL dans l'eau) dans une solution aqueuse concentrée d'acide nitrique à 65% à 100°C pendant une nuit. Après centrifugation (400 g, 2 min), les culots ont été dilués dans l'eau milli-Q (qsp 10 mL) pour conduire à une solution mère.

Les analyses d'ICP-MS ont été réalisées avec un appareil NexION 350D ICP-MS (PerkinElmer, France) pour les isotopes ^{89}Y , ^{174}Yb , ^{169}Tm . Chaque échantillon de solution mère a nécessité une dilution (1/1000 minimum) et a été analysé en triplicata. La calibration a été

ANNEXE II. Analyses des UCNPs

réalisée sur des solutions de 0,20 à 20 ng/mL de chaque isotope recherché à partir de solutions stocks à 1000 mg/L (TraceCERT, Sigma Aldrich, France).

Les spectres d'émission par UC ont été enregistrés en utilisant une diode laser CNI FC-980-5,2W et un monochromateur TRIAX 550 Jobin-Yvon/Horiba équipé d'une caméra CCD refroidie à l'azote liquide.

Annexe III. Synthèses chimiques

Tous les réactifs et solvants commerciaux ont été obtenus chez les fournisseurs suivants : Sigma Aldrich, Acros Organics, ABX, Fisher Scientific, Carlo Erba Reagents et Alfa Aesar et ont été utilisés sans aucune autre purification. Le tétrahydrofurane anhydre a été produit à partir du système de purification de solvant Pure Solv™ (Sigma-Aldrich) équipé d'une colonne d'alumine. Le dichlorométhane anhydre a été distillé sur hydrure de calcium avant usage. Les polyéthylène glycols 1000 (masse molaire moyenne – $MM_{moy} = 950-1050$) et 2000 ($MM_{moy} = 1900-2200$) ont été achetés chez Sigma Aldrich tandis que les PEGs monométhyl éther 1000 ($MM_{moy} = 950-1050$) et 2000 ($MM_{moy} = 2000$) ont été obtenus chez TCI et Sigma Aldrich respectivement.

Les chromatographies sur couche minces (CCM) ont été réalisées sur des plaques de silice 60 Å (60 F₂₅₄, SDS ou Macherey-Nagel) ou d'alumine (60 F₂₅₄, type E, Merck) éluées par le mélange de solvants adéquat. Le développement des plaques a été réalisé sous lumière UV (254 nm) et/ou en utilisant un révélateur approprié : la ninhydrine à 0,5% dans l'éthanol ; l'acide phosphomolybdique à 10% dans l'éthanol ; le réactif de Dragendorff.

Les chromatographies sur colonne ont été réalisées sur phase stationnaire de silice 60 Å, 35-70 µm (Merck ou SDS) ou d'alumine neutre 90 standardisé 63-200 µm (Merck).

La purification par chromatographie liquide haute performance préparative a été réalisée sur un appareil Combiflash EZprep (Teledyne ISCO) équipé d'un détecteur UV/visible et muni d'une colonne C₁₈ (100 Å, 5 µm, 250 x 20 mm). Le débit a été maintenu constant à 15 mL.min⁻¹ pour des longueurs d'onde de détection choisies en fonction des composés à purifier entre 210, 220 et/ou 254 nm.

Les points de fusion ont été mesurés sur un appareil capillaire IA9100 (Bibby Scientific).

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été enregistrés au moyen d'un spectromètre Bruker AM 200 (4,5 T) (¹H : 200,13 MHz ; ¹³C : 50,32 MHz) ou d'un spectromètre Bruker DRX 500 (¹H : 500,32 MHz ; ¹³C : 125,76 MHz ; ³¹P : 202,6 MHz) (Bruker Biospin SAS). Les déplacements chimiques (δ) sont donnés en parties par millions (ppm) en se servant du signal résiduel du solvant comme référence en RMN ¹H et ¹³C. Pour les acquisitions en RMN ³¹P, la calibration a été réalisée grâce au signal d'une solution d'acide phosphorique (0 ppm) à 1% dans le D₂O, placée dans un tube coaxial. Les valeurs de constantes de couplage (*J*) ont été données en Hz. Les multiplicités ont été notées : s (singulet), se (singulet élargi), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), sx (sextuplet), m (multiplet), dd (doublet dédoublé), td (triplet dédoublé), ddd (doublet dédoublé dédoublé). Les analyses des spectres monodimensionnels RMN ¹H et ¹³C ont été confortées dans certains cas par des analyses 2D de type ¹H-¹H COSY (correlation spectroscopy) ou ¹H-¹³C HSQC (heteronuclear single quantum coherence).

ANNEXE III. Synthèses chimiques

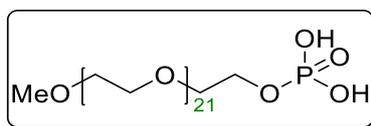
Les spectres IR ont été enregistrés de 4000 à 440 cm^{-1} sur un spectrophotomètre FTIR Nicolet IS10 avec réflectance totale atténuée (ATR) (Fisher Scientific).

Les spectres de masse ont été obtenus sur un spectromètre de masse haute résolution (HRMS) en mode positif (Waters® Micromass® Q-Tof micro™) ou par ionisation électrospray (ESI-MS) sur un spectromètre Esquire (Bruker).

Les analyses de désorption-ionisation laser assistée par matrice couplé à une spectromètre de masse à temps de vol (MALDI-TOF) ont été enregistrées sur un appareil MALDI-TOF/TOF Autoflex Speed (Bruker Daltonics). Les solutions stock de PEGs ont été préparées dans le méthanol (50 mg/mL). Les échantillons ont été analysés à trois concentrations (5, 1, 0,15 mg/mL) dans un mélange méthanol/eau (4/1, v/v). La matrice était composée d'une solution d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB, >99%, Sigma Aldrich) dans l'eau (10 mg/mL). La solution de DHB a été mélangée avec un ratio de 9/1, v/v à une solution d'agent cationisant composé d'iodure de sodium à 20 mg/mL dans l'eau. Sur la plaque cible, ont été ajoutés successivement chaque échantillon (1 μL) puis le mélange de la matrice et de l'agent cationisant (0,5 μL). Les acquisitions ont été réalisées en mode d'ionisation positif. Les spectres sont moyennés sur 4000 acquisitions sur une gamme de 400 à 3500 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Chaque acquisition dispose d'un étalon interne composé du PEG 1000 ou 2000 diol ou des PEG 1000 ou 2000 monométhyle éther.

Annexe IV. Protocoles de synthèses

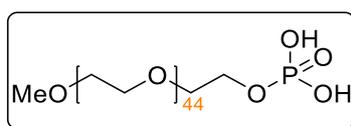
Accès aux dérivés PEGs phosphate (voie 1)

Synthèse du α -méthyl- ω -phosphonooxy-poly(oxyéthane-1,2-diyl)₍₁₀₀₀₎ (L1)Ce composé a été obtenu selon un protocole de synthèse adapté de Boyer, J.C. *et al.*²⁵⁷

Une solution de α -méthyl- ω -hydroxy-poly(oxyéthane-1,2-diyl)₍₁₀₀₀₎ (18,5 g, 18,5 mmol, 1 éq.) dans le toluène anhydre (250 mL) est séchée sous argon une nuit par distillation azéotropique au moyen d'un Dean-Stark. Après retour à température ambiante, la solution est évaporée sous vide puis le résidu est repris sous argon dans le tétrahydrofurane anhydre (60 mL). Du trichlorure de phosphore est ajouté à 0 °C goutte à goutte (1,72 mL, 18,4 mmol, 1 éq.) puis la solution est agitée sous léger courant d'argon à 55 °C (température interne) pendant 6 h. Après retour à température ambiante, est ajoutée lentement de l'eau déionisée glacée (5 mL) puis la solution est agitée à température ambiante pendant 1 h. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite puis le résidu est séché sous vide poussé (pompe à palettes) à 70 °C pendant une nuit pour conduire au composé L1 (19,2 g, 17,8 mmol).

Aspect : cire jaunâtre

Rendement : 96%

Synthèse du α -méthyl- ω -phosphonooxy-poly(oxyéthane-1,2-diyl)₍₂₀₀₀₎ (L2)Ce composé a été obtenu selon un protocole de synthèse adapté de Boyer, J.C. *et al.*²⁵⁷

Une solution de α -méthyl- ω -hydroxy-poly(oxyéthane-1,2-diyl)₍₂₀₀₀₎ (37,0 g, 18,5 mmol, 1 éq.) dans le toluène anhydre (250 mL) est séchée sous argon une nuit par distillation azéotropique au moyen d'un Dean-Stark. Après retour à température ambiante, la solution est évaporée puis le résidu est repris sous argon dans le tétrahydrofurane anhydre (70 mL). À cette solution est ajoutée goutte à goutte du trichlorure de phosphore (1,73 mL, 18,5 mmol, 1 éq.) puis le milieu réactionnel est chauffé sous agitation à 55 °C (température interne) sous léger courant d'argon pendant 6 h. Après retour à température ambiante, est ajoutée lentement de l'eau déionisée glacée (5 mL) puis la solution est agitée à température ambiante pendant 1 h. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite puis le résidu est séché sous vide poussé (pompe à palettes) 70 °C pendant une nuit pour conduire au composé L2 (34,7 g, 16,6 mmol).

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

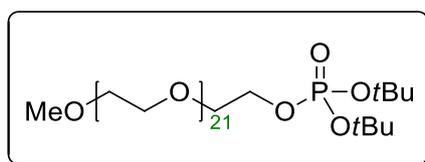
Aspect : cire orange

Rendement : 90%

Accès aux dérivés PEGs phosphate (voie 2)

Synthèse du α -méthyl- ω -(di-*tert*-butoxyphosphoryl)oxy-poly(oxyéthane-1,2-diyl)₍₁₀₀₀₎ (**1a**)

Ce composé a été obtenu selon un protocole de synthèse adapté de Kruger, R.G. *et al.*²⁶⁸



À une solution de α -méthyl- ω -hydroxy-poly(oxyéthane-1,2-diyl)₍₁₀₀₀₎ (712 mg, 711 μ mol, 1 éq.) dans le toluène anhydre (10 mL) est ajoutée sous argon une solution de tétrazole 0,45 M dans l'acétonitrile anhydre (6,33 mL, 2,85 mmol, 4 éq.). La solution est évaporée sous pression réduite. Le résidu est coévaporé avec du toluène anhydre (10 mL) avant d'être repris sous argon par du dichlorométhane anhydre (10 mL). À cette solution, portée à -5 °C, est ajouté le *N,N*-diisopropylphosphoramidite de di-*tert*-butyle (450 μ L, 1,43 mmol, 2 éq.). Après retour à température ambiante, la solution est agitée pendant 3 h puis est portée à -40 °C avant ajout d'une solution d'acide *m*-chloroperbenzoïque (246 mg, 1,43 mmol, 2 éq.) dans le dichlorométhane anhydre (10 mL). Le milieu réactionnel est porté à température ambiante et agité pendant 1 h. La réaction est stoppée par addition d'une solution aqueuse de sulfite de sodium à 10% (5 mL). Après décantation, la phase organique est lavée successivement par une solution aqueuse saturée de bicarbonate de sodium (2 x 10 mL) puis par une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (10 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur colonne d'alumine éluée par un mélange dichlorométhane/éthanol (98/2, v/v) pour conduire au composé **1a** (746 mg, 625 μ mol).

Aspect : cire blanchâtre

Rendement : 88%

R_f (Al₂O₃, dichlorométhane/éthanol, 98/2, v/v) : 0,23

RMN ¹H (500,13 MHz, CDCl₃) δ 1,39 (s, 18H), 3,28 (s, 3H), 3,45 (m, 2H), 3,50-3,65 (m, ca. 82H), 3,60 (t, 2H, $J = 5,3$ Hz), 3,98 (m, 2H)

RMN ¹³C (125,76 MHz, CDCl₃) δ 29,7 (d, 6C, ³ $J_{C-P} = 4,3$ Hz), 58,9, 65,6 (d, 1C, ³ $J_{C-P} = 6,4$ Hz), 70,0 (d, 1C, ² $J_{C-P} = 8,1$ Hz), 70,35-70,60 (m, ca. 41C), 71,8, 82,1 (d, 2C, ² $J_{C-P} = 7,4$ Hz)

RMN ³¹P (202,6 MHz, CDCl₃) δ -9,7

IR (ATR, cm⁻¹) ν 3000-2700, 1466, 1359, 1279, 1241, 1145, 1105, 1061, 1039, 992, 960

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

ambiante, la solution est agitée pendant 30 min puis évaporée sous pression réduite pour conduire au composé **L1** (923 mg, 854 μmol).

Aspect : cire blanchâtre

Rendement : 98%

RMN ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) δ 3,33 (s, 3H), 3,50 (m, 2H), 3,50-3,70 (m, ca. 84H), 4,12 (m, 2H), 9,02 (se, 2H)

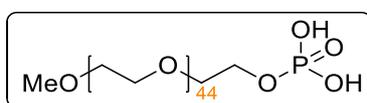
RMN ^{13}C (125,76 MHz, CDCl_3) δ 59,0, 66,0 (d, 1C, $^3J_{\text{C-P}} = 4,4$ Hz), 70,2-70,6 (m, ca. 42C), 72,0

RMN ^{31}P (202,6 MHz, CDCl_3) δ 1,1

IR (ATR, cm^{-1}) ν 3000-2700, 1466, 1343, 1279, 1241, 1101, 947

MALDI-TOF m/z calculée pour $\text{C}_{45}\text{H}_{93}\text{KO}_{26}\text{P}$ $[\text{M}+\text{K}]^+$: 1119,533, trouvée : 1119,539

Synthèse du α -méthyl- ω -phosphonooxy-poly(oxyéthane-1,2-diyl) $_{(2000)}$ (**L2**)



L'ester **1b** (2,27 g, 1,03 mmol) est traité sous argon à 0 °C par une solution d'acide chlorhydrique 1,43 N dans l'éther diéthylique anhydre (25 mL). Après retour à température ambiante, la solution est agitée pendant 30 min puis évaporée sous pression réduite pour conduire au composé **L2** (2,05 g, 979 μmol).

Aspect : cire jaunâtre

Rendement : 95%

RMN ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) δ 3,25 (s, 3H), 3,42 (m, 2H), 3,45-3,65 (m, ca. 176H), 4,04 (m, 2H), 9,72 (m, 2H)

RMN ^{13}C (125,76 MHz, CDCl_3) δ 58,8, 65,6 (d, 1C, $^3J_{\text{C-P}} = 4,8$ Hz), 69,9 (d, 1C, $^2J_{\text{C-P}} = 6,1$ Hz), 70,0-70,6 (m, ca. 87C), 71,7

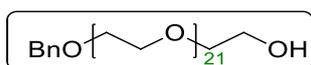
RMN ^{31}P (202,6 MHz, CDCl_3) δ 1,2

IR (ATR, cm^{-1}) ν 3000-2700, 1467, 1342, 1279, 1241, 1147, 1109, 1061, 963

MALDI-TOF m/z calculée pour $\text{C}_{91}\text{H}_{186}\text{O}_{49}\text{P}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 2094,180, trouvée : 2094,339

Synthèse du α -benzyl- ω -hydroxy-poly(oxyéthane-1,2-diyl) $_{(1000)}$ (**2a**)

Ce composé a été obtenu selon un protocole de synthèse adapté de Zhang B. *et al.*²⁶⁹



Le PEG $_{(1000)}$ diol (5,20 g, 5,20 mmol, 1 éq.) est coévaporé par du toluène anhydre (2 x 25 mL) avant d'être repris sous argon dans le tétrahydrofurane anhydre (50 mL). À cette solution portée à -5 °C sont ajoutés successivement l'hydrure de sodium à 60% dans l'huile minérale (170 mg, 4,25 mmol, 0,8 éq.) puis, après 5 min, le bromure de benzyle (509 μL ,

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

4,26 mmol, 0,8 éq.). Après retour à température ambiante la solution est agitée pendant 5 h. Le milieu réactionnel est dilué par ajout de méthanol (20 mL) puis évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans le dichlorométhane (40 mL) puis lavé par de l'eau déionisée (2 x 30 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporé sous pression réduite. Le résidu est purifié sur colonne d'alumine éluée par un mélange dichlorométhane/méthanol (98/2, v/v) pour conduire au composé **2a** (2,12 g, 1,97 mmol).

Aspect : cire blanchâtre

Rendement : 38%

R_f (Al₂O₃, dichlorométhane/méthanol, 98/2, v/v) : 0,20

RMN ¹H (200,13 MHz, CDCl₃) δ 2,83 (se, 1H), 3,30-3,70 (m, ca. 88H), 4,43 (se, 2H), 7,19 (m, 5H)

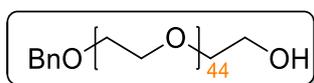
RMN ¹³C (125,76 MHz, CDCl₃) δ 61,8, 69,5, 70,4, 70,55-70,75 (m, ca. 40C), 72,6, 73,3, 127,6, 127,7 (2C), 128,4 (2C), 138,4

IR (ATR, cm⁻¹) ν 3671, 3050-2950, 2950-2800, 1466, 1454, 1406, 1383, 1343, 1279, 1242, 1147, 1108, 1066, 1058, 963

MALDI-TOF *m/z* calculée pour C₅₁H₉₆NaO₂₃ [M+Na]⁺ : 1099,624, trouvée : 1099,845

Synthèse du α-benzyl-ω-hydroxy-poly(oxyéthane-1,2-diyl)₍₂₀₀₀₎ (**2b**)

Ce composé a été obtenu selon un protocole de synthèse adapté de Zhang B. *et al.*²⁶⁹



Le PEG₍₂₀₀₀₎ diol (10,0 g, 5,00 mmol, 1 éq.) est coévaporé par du toluène anhydre (2 x 25 mL) avant d'être repris sous argon par le tétrahydrofurane anhydre (50 mL). À cette solution, portée à 0 °C sont ajoutés successivement l'hydrure de sodium dans l'huile minérale à 60% (172 mg, 4,30 mmol, 0,9 éq.) puis, après 15 min, le bromure de benzyle (480 μL, 4,01 mmol, 0,8 éq.). Après retour à température ambiante la solution est agitée pendant 3 h. Le milieu réactionnel est dilué par ajout de méthanol (20 mL) puis évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans le dichlorométhane (80 mL) puis lavé par de l'eau déionisée (3 x 60 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié sur colonne d'alumine éluée par un mélange dichlorométhane/méthanol (99/1, v/v) pour conduire au composé **2b** (2,55 g, 1,22 mmol).

Aspect : cire jaunâtre

Rendement : 24%

R_f (Al₂O₃, dichlorométhane/méthanol, 99/1, v/v) : 0,20

RMN ¹H (200,13 MHz, CDCl₃) δ 2,68 (m, 1H), 3,40-3,90 (m, ca. 180H), 4,55 (s, 2H), 7,31 (m, 5H)

RMN ¹³C (125,76 MHz, CDCl₃) δ 61,2, 69,1, 70,0, 70,05-70,40 (m, ca. 86C), 72,2, 72,8, 127,1, 127,3 (2C), 127,9 (2C), 138,0

IR (ATR, cm⁻¹) ν 2883, 1466, 1359, 1341, 1279, 1241, 1147, 1098, 1060, 959

MALDI-TOF *m/z* calculée pour C₉₇H₁₈₈NaO₄₆ [M+Na]⁺ : 2112,226, trouvée : 2112,038

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

réduite pour conduire au composé **4a** (1,42 g, 1,20 mmol). Ce dernier est engagé dans l'étape réactionnelle suivante sans purification.

Aspect : cire blanchâtre

Rendement : 98%

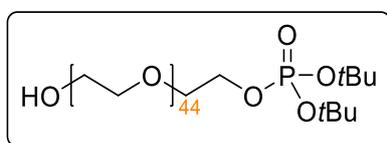
RMN ¹H (500,13 MHz, CDCl₃) δ 1,28 (s, 18H), 3,08 (se, 1H), 3,35-3,55 (m, ca. 86H), 3,87 (m, 2H)

RMN ¹³C (125,76 MHz, CDCl₃) δ 29,4 (d, 6C, ³J_{C-P} = 4,3 Hz), 61,1, 65,3 (d, 1C, ³J_{C-P} = 6,4 Hz), 69,7 (d, 1C, ²J_{C-P} = 8,0 Hz), 70,0-70,3 (m, ca. 40C), 72,2, 81,7 (d, 2C, ²J_{C-P} = 7,4 Hz)

RMN ³¹P (202,6 MHz, CDCl₃) δ 9,8

IR (ATR, cm⁻¹) ν 2871, 1466, 1371, 1343, 1243, 1106, 1039, 994, 963

Synthèse du α-(di-*tert*-butoxyphosphoryl)-ω-hydroxy-poly(oxyéthane-1,2-diyl)₍₂₀₀₀₎ (**4b**)



À une solution du composé benzylé **3b** (1,93 g, 845 μmol) dans le méthanol (40 mL) est ajouté du palladium sur charbon à 10% (193 mg). La suspension est hydrogénée à température ambiante pendant 16 h. La suspension est filtrée sur célite 545 puis évaporée sous pression réduite pour conduire au composé **4b** (1,74 g, 794 μmol). Ce dernier est engagé dans l'étape réactionnelle suivante sans purification.

Aspect : cire blanchâtre

Rendement : 94%

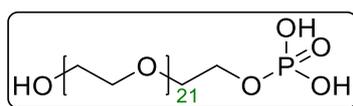
RMN ¹H (200,13 MHz, CDCl₃) δ 1,47 (s, 18H), 3,50-3,80 (m, ca. 178H), 4,07 (m, 2H)

RMN ¹³C (125,76 MHz, CDCl₃) δ 29,9 (d, 6C, ³J_{C-P} = 4,3 Hz), 61,7, 65,7 (d, 1C, ³J_{C-P} = 6,4 Hz), 70,2 (d, 1C, ²J_{C-P} = 8,0 Hz), 70,4, 70,45-70,75 (m, ca. 85C), 72,6, 82,3 (d, 2C, ²J_{C-P} = 7,4 Hz)

RMN ³¹P (202,6 MHz, CDCl₃) δ 9,7

IR (ATR, cm⁻¹) ν 2883, 1466, 1359, 1341, 1279, 1240, 1147, 1102, 1060, 1000, 957

Synthèse du α-phosphono-ω-hydroxy-poly(oxyéthane-1,2-diyl)₍₁₀₀₀₎ (**L3**)



L'ester **4a** (800 mg, 678 μmol) est traité sous argon à 0 °C par une solution d'acide chlorhydrique 1,43 N dans l'éther diéthylique anhydre (1,0 mL). Après retour à température ambiante, la solution est agitée pendant 30 min puis évaporée sous pression réduite pour conduire au composé **L3** (680 mg, 637 μmol).

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

Aspect : cire blanchâtre

Rendement : 94%

RMN ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) δ 3,20-3,80 (m, ca. 86H), 4,04 (m, 2H), 6,80-7,80 (m, 2H)

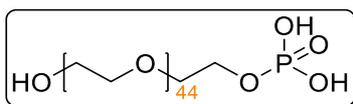
RMN ^{13}C (125,76 MHz, CDCl_3) δ 65,7, 70,2, 70,4 (m, ca. 41C), 72,4

RMN ^{31}P (202,6 MHz, CDCl_3) δ 0,5

IR (ATR, cm^{-1}) ν 2878, 1720, 1466, 1342, 1279, 1240, 1144, 1104, 1060

MALDI-TOF m/z calculée pour $\text{C}_{44}\text{H}_{91}\text{NaO}_{26}\text{P}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1089,543, trouvée : 1089,667

Synthèse du α -phosphono- ω -hydroxy-poly(oxyéthane-1,2-diyl) $_{(2000)}$ (**L4**)



L'ester **4b** (480 mg, 219 μmol) est traité sous argon à 0 °C par une solution d'acide chlorhydrique 1,43 N dans l'éther diéthylique anhydre (5,0 mL). Après retour à température ambiante, la solution est agitée pendant 30 min puis évaporée sous pression réduite pour conduire au composé **L4** (443 mg, 213 μmol).

Aspect : cire jaunâtre

Rendement : 97%

RMN ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) δ 3,20-3,90 (m, ca. 178H), 4,07 (m, 2H)

RMN ^{13}C (125,76 MHz, CDCl_3) δ 61,5, 70,2, 70,30-70,60 (m, ca. 87C), 72,4

RMN ^{31}P (202,6 MHz, CDCl_3) δ 0,9

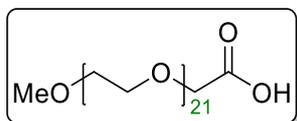
IR (ATR, cm^{-1}) ν 2884, 1466, 1360, 1341, 1279, 1240, 1146, 1105, 1060, 959

MALDI-TOF m/z calculée pour $\text{C}_{90}\text{H}_{183}\text{NaO}_{49}\text{P}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 2102,146, trouvée : 2102,615

Accès aux dérivés PEGs ester de NHS

Synthèse du α -méthyl- ω -(carboxyméthyl)oxo-poly(oxyéthane-1,2-diyl) $_{(1000)}$ (**5a**)

Ce composé a été obtenu selon le protocole de synthèse décrit par Benjamin, C. J. *et al.*²⁷⁰



À une solution de α -méthyl- ω -hydroxy-poly(oxyéthane-1,2-diyl) $_{(1000)}$ (10,0 g, 10,0 mmol, 1 éq.) dans l'acétone (250 mL) agitée pendant 10 min puis portée à 0 °C est ajouté goutte à goutte le réactif de Jones à 1,25 M (32 mL, 40,0 mmol, 4 éq.). Après retour à température ambiante, la solution est agitée pendant 3 h. La réaction est alors stoppée par ajout d'isopropanol (15 mL) puis le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 4 h. Le précipité formé est filtré puis rincé par de l'acétone (2 x 40 mL). L'acétone du filtrat est évaporée sous pression réduite puis du dichlorométhane est ajouté (150 mL). Après décantation, la phase organique est lavée successivement par une solution aqueuse d'acide

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

chlorhydrique à 1 N (3 x 40 mL) puis par une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (40 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée sous pression réduite. La cire obtenue est placée au dessiccateur sous vide à 25 °C pendant une nuit. Le composé **5a** obtenu (8,77 g, 8,64 mmol) est engagé dans l'étape réactionnelle suivante sans purification.

Aspect : cire blanche

Rendement : 86%

RMN ¹H (500,13 MHz, CDCl₃) δ 3,36 (s, 3H), 3,52 (m, 2H), 3,56-3,66 (m, ca. 80H), 3,66-3,70 (m, 2H), 4,05 (s, 2H)

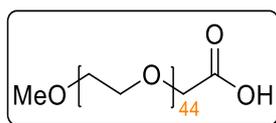
RMN ¹³C (125,76 MHz, CDCl₃) δ 59,1, 69,0, 70,5, 70,60-70,80 (m, ca. 39C), 71,3, 72,0, 171,8

IR (ATR, cm⁻¹) ν 2869, 1743, 1466, 1344, 1281, 1242, 1097, 947, 842

MALDI-TOF *m/z* calculée pour C₄₅H₉₀KO₂₄ [M+K]⁺ : 1053,546, trouvée : 1053,620

Synthèse du α-méthyl-ω-(carboxyméthyl)oxo-poly(oxyéthane-1,2-diyl)₍₂₀₀₀₎ (**5b**)

Ce composé a été obtenu selon le protocole de synthèse décrit par Benjamin, C.J. *et al.*²⁷⁰



À une solution de α-méthyl-ω-hydroxy-poly(oxyéthane-1,2-diyl)₍₂₀₀₀₎ (20,0 g, 10,0 mmol, 1 éq.) dans l'acétone (250 mL) agitée pendant 10 min puis portée à 0 °C est ajouté goutte à goutte le réactif de Jones à 1,25 M (32 mL, 40,0 mmol, 4 éq.) sur 20 min. Après retour à température ambiante, la solution est agitée pendant 3 h 30. La réaction est alors stoppée par ajout d'isopropanol (25 mL) puis le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 15 min. Le précipité formé est filtré puis rincé par de l'acétone (2 x 60 mL). L'acétone du filtrat est évaporée sous pression réduite puis du dichlorométhane est ajouté (150 mL). Après décantation, la phase organique est lavée successivement par une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 1 N (3 x 60 mL) puis par une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (60 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée sous pression réduite pour conduire au composé **5b** (17,2 g, 8,48 mmol), engagé dans l'étape réactionnelle suivante sans purification.

Aspect : cire blanche

Rendement brut : 85%

RMN ¹H (500,13 MHz, CDCl₃) δ 3,36 (s, 3H), 3,53 (m, 2H), 3,55-3,70 (m, ca. 172H), 3,73 (m, 2H), 4,14 (s, 2H)

RMN ¹³C (125,76 MHz, CDCl₃) δ 59,1, 69,0, 70,40-70,80 (m, ca. 86C), 71,4, 72,0, 171,7

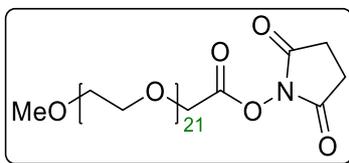
IR (ATR, cm⁻¹) ν 2883, 1748, 1466, 1359, 1340, 1279, 1240, 1146, 1104, 1060, 947

MALDI-TOF *m/z* calculée pour C₉₁H₁₈₂NaO₄₇ [M+Na]⁺ : 2050,175, trouvée : 2050,470

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

Synthèse du α -méthyl- ω -(2-(succinimidyl)oxy)-2-oxoéthoxy)-poly(oxyéthane-1,2-diyl)₍₁₀₀₀₎ (6a)

Ce composé a été obtenu selon un protocole de synthèse adapté de Benjamin, C. J. *et al.*²⁷⁰



Une solution d'acide **5a** (529 mg, 521 μ mol, 1 éq.) dans le toluène anhydre (10 mL) est évaporée sous pression réduite. Le résidu est repris sous argon dans le dichlorométhane anhydre (10 mL) puis sont ajoutés successivement le *N*-hydroxysuccinimide (90 mg, 782 μ mol, 1,5 éq.) et le chlorure de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (152 mg, 793 μ mol, 1,5 éq.). La solution est agitée pendant 27 h. Le milieu réactionnel est dilué par du dichlorométhane (10 mL) puis lavé successivement par une solution aqueuse d'acide citrique à 5% (2 x 20 mL), une solution aqueuse de bicarbonate de sodium à 5% (2 x 20 mL) et une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (2 x 20 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée sous pression réduite pour conduire au composé **6a** (486 mg, 437 μ mol) engagé dans l'étape réactionnelle suivante sans purification.

Aspect : cire blanche

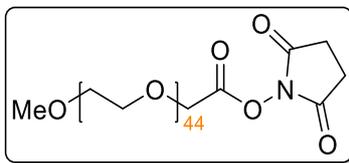
Rendement brut : 84%

RMN ¹H (500,13 MHz, CDCl₃) δ 2,84 (s, 4H), 3,36 (s, 3H), 3,57-3,75 (m, ca. 84H), 4,51 (s, 2H)

RMN ¹³C (125,76 MHz, CDCl₃) δ 25,7 (2C), 59,1, 66,6, 70,50-70,80 (m, ca. 40C), 71,4, 72,0, 166,1, 168,9 (2C)

Synthèse du α -méthyl- ω -(2-(succinimidyl)oxy)-2-oxoéthoxy)-poly(oxyéthane-1,2-diyl)₍₂₀₀₀₎ (6b)

Ce composé a été obtenu selon un protocole de synthèse adapté de Benjamin, C. J. *et al.*²⁷⁰



Une solution d'acide **5b** (983 mg, 485 μ mol, 1 éq.) dans le toluène anhydre (10 mL) est évaporée sous pression réduite. Le résidu est repris sous argon dans le dichlorométhane anhydre (10 mL) puis sont ajoutés successivement le *N*-hydroxysuccinimide (84 mg, 730 μ mol, 1,5 éq.) et le chlorure de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (141 mg, 735 μ mol, 1,5 éq.). La solution est agitée pendant 19 h. Le milieu réactionnel est dilué par du dichlorométhane (10 mL) puis lavé successivement par une solution aqueuse d'acide citrique à 5% (2 x 20 mL), une solution aqueuse de bicarbonate de sodium à 5% (2 x 20 mL) et une

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (2 x 20 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée sous pression réduite pour conduire au composé **6b** (984 mg, 463 μmol) engagé dans l'étape réactionnelle suivante sans purification.

Aspect : cire blanche

Rendement brut : 95%

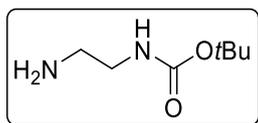
RMN ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) δ 2,85 (s, 4H), 3,37 (s, 3H), 3,50-3,75 (m, ca. 174H), 3,78 (m, 2H), 4,51 (s, 2H)

RMN ^{13}C (125,76 MHz, CDCl_3) δ 25,7 (2C), 59,2, 66,7, 70,60-70,80 (m, ca. 86C), 71,5, 72,1, 166,1, 168,9 (2C)

Accès au précurseur bis-phosphonate aliphatique

Synthèse du (2-aminoéthyl)carbamate de *tert*-butyle (**7**)

Ce composé a été obtenu selon un protocole de synthèse adapté de Grate, J. W. *et al.*²⁷¹



À une solution d'éthylène-1,2-diamine (27,0 mL, 404 mmol, 1 éq.) dans le dichlorométhane (300 mL) est ajoutée goutte à goutte sur 2 h 30 une solution de di-carbonate de di-*tert*-butyle (8,86 g, 40,6 mmol, 0,1 éq.) dans le dichlorométhane (200 mL). La solution est agitée à température ambiante pendant 24 h. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite et le résidu est repris par une solution aqueuse saturée de bicarbonate de sodium (100 mL). Après extraction par du dichlorométhane (3 x 100 mL), les phases organiques sont regroupées, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées puis évaporées sous pression réduite pour conduire au composé **7** (6,09 g, 38,0 mmol).

Aspect : huile jaune

Rendement : 94%

RMN ^1H (200,13 MHz, CDCl_3) δ 1,21 (s, 2H), 1,38 (s, 9H), 2,73 (t, 2H, $J = 5,9$ Hz), 3,11 (q, 2H, $J = 5,9$ Hz), 5,09 (se, 1H)

RMN ^{13}C (50,32 MHz, CDCl_3) δ 28,4 (3C), 41,9, 43,4, 79,1, 156,3

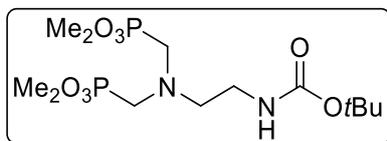
IR (ATR, cm^{-1}) ν 3358, 2976, 2933, 2880, 1683, 1525, 1455, 1391, 1365, 1271, 1249, 1165

HRMS m/z calculée pour $\text{C}_7\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 161,1285, trouvée : 161,1285

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

Synthèse du (2-(bis((diméthoxyphosphoryl)méthyl)amino)éthyl)carbamate de *tert*-butyle (**8**)

Ce composé a été obtenu selon un protocole de synthèse adapté de Cao, P. *et al.*²⁵⁸



À une solution d'amine **7** (1,46 g, 9,11 mmol, 1 éq.) dans le tétrahydrofurane (75 mL) est ajoutée une solution aqueuse de formaldéhyde à 35% (1,81 mL, 22,8 mmol, 2,5 éq.). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 20 min avant ajout de diméthylphosphite (4,18 mL, 45,6 mmol, 5 éq.). La solution est agitée à reflux pendant 16 h. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite et le résidu est purifié sur colonne de silice éluée par un mélange acétate d'éthyle/éthanol (85/15, v/v) pour conduire au composé **8** (1,33 g, 3,29 mmol).

Aspect : huile incolore

Rendement : 36% (pureté estimée par RMN ³¹P à 85%)

R_f (SiO₂, acétate d'éthyle/éthanol, 95/5, v/v) : 0,28

RMN ¹H (200,13 MHz, CDCl₃) δ 1,40 (s, 9H), 2,88 (t, 2H, *J* = 5,5 Hz), 3,16 (d, 4H, ²J_{H-P} = 8,3 Hz), 3,20 (m, 2H), 3,76 (d, 12H, ³J_{H-P} = 10,5 Hz), 5,28 (s, 1H)

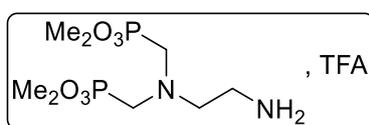
RMN ¹³C (50,32 MHz, CDCl₃) δ 28,5 (3C), 38,6, 49,5 (dd, 2C, ¹J_{C-P} = 158 Hz, ³J_{C-P} = 6,3 Hz), 52,9 (m, 4C), 56,0 (t, 1C, ³J = 6,6 Hz), 79,0, 156,3

RMN ³¹P (202,6 MHz, CDCl₃) δ 26,9

IR (ATR, cm⁻¹) ν 3400-3150, 3150-2750, 1686, 1634, 1532, 1270, 1250, 1140, 1020, 976

HRMS *m/z* calculée pour C₁₃H₃₁N₂O₈P₂ [M+H]⁺ : 405,1550, trouvée : 405,1553

Synthèse du trifluoroacétate de (((2-aminoéthyl)azanediyl)bis(méthylène))bis(phosphonate) de tétraméthyle (**9.TFA**)



À une solution du carbamate de *tert*-butyle **8** (170 mg, 420 μmol) dans le dichlorométhane anhydre (1 mL) portée à 0 °C est ajouté sous argon l'acide trifluoroacétique (500 μL). La solution est agitée à 0 °C pendant 4 h 30. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite puis coévaporé par du dichlorométhane (2 x 5 mL) pour conduire au composé **9.TFA** (163 mg, 306 μmol).

Aspect : huile incolore

Rendement : 73% (pureté estimée par RMN ³¹P à 85%)

RMN ¹H (200,13 MHz, CDCl₃) δ 3,13 (brs, 4H), 3,24 (d, 4H, ²J_{H-P} = 7,7 Hz), 4,79 (d, 12H, ²J_{H-P} = 10,8 Hz), 7,48 (se, 3H)

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

RMN ^{13}C (50,32 MHz, CDCl_3) δ 38,2, 49,3 (dd, 2C, $^1J_{\text{C-P}} = 159,5$ Hz, $^3J_{\text{C-P}} = 5,0$ Hz), 53,6 (m, 4C), 53,8, 115,3 (q, 2C, $^1J_{\text{C-F}} = 286,4$ Hz), 160,3 (q, 2C, $^2J_{\text{C-F}} = 40,0$ Hz)

RMN ^{31}P (202,6 MHz, CDCl_3) δ 27,5

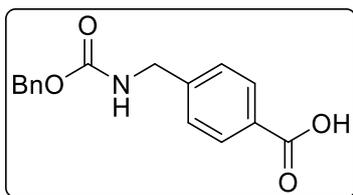
IR (ATR, cm^{-1}) ν 3200-2750, 1772, 1672, 1457, 1146, 1028

HRMS m/z calculée pour $\text{C}_8\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_6\text{P}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 305,1026, trouvée : 305,1026

Accès au précurseur bis-phosphonate aromatique (voie 1)

Synthèse de l'acide 4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)méthyl)benzoïque (10)

Ce composé a été obtenu selon le protocole de synthèse décrit par Bonnet L. *et al.*²⁷²



À une solution d'acide 4-(aminométhyl)benzoïque (5,00 g, 33,1 mmol, 1 éq.) dans un mélange composé de tétrahydrofurane (16,5 mL) et d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 2 N (16,5 mL, 33 mmol, 1 éq.) sont ajoutés simultanément à 0 °C le chloroformiate de benzyle (5,15 mL, 36,1 mmol, 1,1 éq.) et une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium 2 N (16,5 mL, 33 mmol, 1 éq.). Le milieu réactionnel est porté à température ambiante et agité pendant 18 h. Le tétrahydrofurane est évaporé sous pression réduite puis le pH de la solution est porté à 2-3 par ajout d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 2 N. La solution est refroidie à 0 °C et le solide formé est filtré puis lavé successivement par de l'eau déionisée (100 mL), de l'éthanol (25 mL) et de l'éther diéthylique (50 mL). Ce dernier est placé au dessiccateur sous vide à 40 °C pendant une nuit pour conduire au composé **10** (4,60 g, 16,1 mmol).

Aspect : solide blanc

Rendement : 49%

Point de fusion : 188-190 °C (Litt.²⁷² : 190-192 °C)

RMN ^1H (200,13 MHz, DMSO-d_6) δ 4,27 (d, 2H, $J = 6,1$ Hz), 5,05 (s, 2H), 7,36 (m, 7H), 7,89 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz)

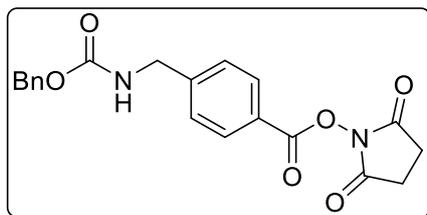
RMN ^{13}C (50,32 MHz, DMSO-d_6) δ 44,0, 66,0, 127,5 (2C), 128,2 (2C), 128,4, 128,9 (2C), 129,7, 129,9 (2C), 137,4, 145,3, 157,0, 167,8

IR (ATR, cm^{-1}) ν 3309, 2963, 2885, 2840, 2695, 2555, 2472, 1682, 1611, 1525, 1429, 1321, 1291, 1247, 1127, 1053, 943

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

Synthèse du 4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)méthyl)benzoate de succinimidyle (**11**)

Ce composé a été obtenu selon un protocole de synthèse adapté de Garlich J. R. *et al.*³⁰¹



À une solution d'acide **10** (1,00 g, 3,51 mmol, 1 éq.) dans le tétrahydrofurane anhydre (10 mL) sont ajoutés successivement sous argon le *N*-hydroxysuccinimide (444 mg, 3,86 mmol, 1,1 éq.) et une solution de dicyclohexylcarbodiimide (796 mg, 3,86 mmol, 1,1 éq.) dans le dichlorométhane anhydre (4 mL). La solution est agitée à température ambiante pendant 48 h. Le milieu réactionnel est porté à 0 °C puis filtré et rincé par du dichlorométhane (2 x 3 mL). Le filtrat est évaporé sous pression réduite pour conduire au composé **11** (1,33 g, 3,48 mmol).

Aspect : huile visqueuse qui précipite avec le temps

Rendement : 99%

Point de fusion : 134-137 °C

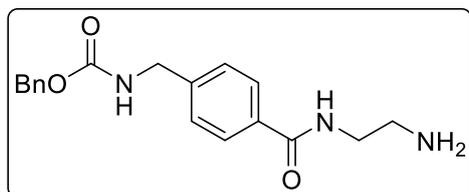
RMN ¹H (200,13 MHz, CDCl₃) δ 2,90 (s, 4H), 4,47 (d, 2H, *J* = 6,1 Hz), 5,16 (m, 3H), 7,36 (m, 7H), 8,09 (d, 2H, *J* = 8,2 Hz)

RMN ¹³C (50,32 MHz, CDCl₃) δ 25,6 (2C), 44,5, 66,9, 123,8, 127,5 (2C), 128,1 (2C), 128,2 (2C), 128,5, 130,7 (2C), 136,3, 146,4, 156,6, 161,6, 169,5 (2C)

IR (ATR, cm⁻¹) ν 3307, 2933, 1766, 1735, 1708, 1683, 1543, 1421, 1362, 1284, 1257, 1197, 1178, 1145, 1065, 1044, 1024, 998, 971

Synthèse du 4-((2-aminoéthyl)carbamoyle)benzylcarbamate de benzyle (**12**)

Ce composé a été obtenu selon un protocole de synthèse adapté de Garlich J. R. *et al.*³⁰¹

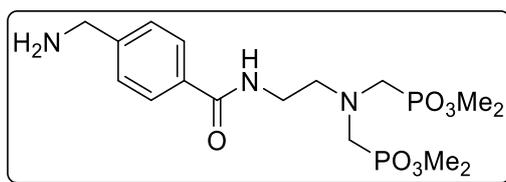


À une solution de l'ester activé **11** (2,68 g, 7,01 mmol, 1 éq.) dans le tétrahydrofurane anhydre (30 mL) est ajoutée sous argon l'éthylène-1,2-diamine (4,70 mL, 70,3 mmol, 10 éq.). La solution est agitée à température ambiante pendant 4 h. Le milieu réactionnel est filtré puis évaporé sous pression réduite. Le résidu est purifié sur colonne d'alumine éluée par un mélange dichlorométhane/éthanol/ammoniaque (80/20/1, v/v/v) pour conduire au composé **12** (1,79 g, 5,47 mmol).

³⁰¹ Garlich, J. R.; Durden, D. L.; Brannon-Pepas, L.; Smith, T. C. Bone targeting of biodegradable drug-containing nanoparticles. WO2004089345, **2004**.

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

Synthèse du (((2-(4-(aminométhyl)benzamido)éthyl)azanediyl)bis(méthylène))bis(phosphonate) de tétraméthyle (**14**)



À une solution du carbamate de benzyle **13** (293 mg, 513 μmol) dans le méthanol (7 mL) est ajouté le palladium sur charbon à 5% (60 mg). La suspension est hydrogénée à température ambiante pendant 72 h. Le milieu réactionnel est filtré sur un filtre PTFE 0,45 micron et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu est purifié sur colonne d'alumine éluée par un mélange dichlorométhane/éthanol/ammoniaque (95/5/0,2, v/v/v) pour conduire au composé **14** (120 mg, 274 μmol).

Aspect : huile incolore

Rendement : 53%

R_f (Al₂O₃, dichlorométhane/éthanol/ammoniaque, 80/20/0,2, v/v/v) : 0,49

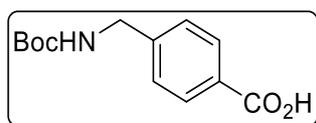
RMN ¹H (200,13 MHz, CDCl₃) δ 2,80 (se, 2H), 2,96 (t, 2H, $J = 5,0$ Hz), 3,09 (d, 4H, $^2J_{\text{H-P}} = 8,5$ Hz), 3,42 (m, 2H), 3,65 (d, 12H, $^2J_{\text{H-P}} = 10,6$ Hz), 3,82 (s, 2H), 7,30 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz), 7,86 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz), 7,91 (t, 1H, $J = 4,7$ Hz)

RMN ¹³C (50,32 MHz, CDCl₃) δ 38,2, 45,9, 49,6 (dd, 2C, $^1J_{\text{C-P}} = 160,0$ Hz, $^3J_{\text{C-P}} = 7,4$ Hz), 52,7 (4C), 55,5 (t, 1C, $^2J_{\text{C-P}} = 6,0$ Hz), 126,9 (2C), 127,4 (2C), 132,8, 146,1, 167,1

Accès au précurseur bis-phosphonate aromatique (voie 2)

Synthèse de l'acide 4-(((*tert*-butoxycarbonyl)amino)méthyl) benzoïque (**15**)

Ce composé a été obtenu selon le protocole de synthèse décrit par Aurelio, L. *et al.*³⁰²



À une solution d'acide 4-(aminométhyl)benzoïque (5,0 g, 33,1 mmol, 1 éq.) dans un mélange d'eau déionisée (100 mL) et d'acétone (100 mL) sont ajoutés successivement le dicarbonate de di-*tert*-butyle (7,20 g, 33,0 mmol, 1 éq.) et l'hydroxyde de sodium (1,32 g, 33,0 mmol, 1 éq.). La solution est agitée à température ambiante pendant 30 h. L'acétone est évaporée sous pression réduite puis la phase aqueuse est extraite par de l'éther diéthylique (2 x 50 mL). De l'acétate d'éthyle (100 mL) est ajouté à la phase aqueuse, puis après une

³⁰² Aurelio, L.; Scullino, C.; Pitman, M.; Sexton, A.; Oliver, V.; Davies, L.; Rebello, R.; Furic, L.; Creek, D. J.; Pitson, S.; Flynn, B. L. From sphingosine kinase to dihydroceramide desaturase: a structure-activity relationship (SAR) study of the enzyme inhibitory and anticancer activity of 4-((4-(4-chlorophenyl)thiazol-2-ylamino)phenol (SKI-II). *J. Med. Chem.* **2016**, 59(3):965-984.

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

agitation vigoureuse, le milieu est acidifié par une solution aqueuse d'acide citrique à 10% jusqu'à pH 3-4. Après décantation, la phase aqueuse est extraite par de l'acétate d'éthyle (50 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées et évaporées sous pression réduite pour conduire au composé **15** (8,11 g, 32,3 mmol).

Aspect : solide blanc

Rendement : 98%

Point de fusion : 167-169 °C (Litt.³⁰³ : 167-168 °C)

RMN ¹H (200,13 MHz, CDCl₃) δ 1,47 (s, 9H), 4,40 (d, 2H, *J* = 5,7 Hz), 4,95 (m, 1H), 7,38 (d, 2H, *J* = 8,3 Hz), 8,07 (d, 2H, *J* = 8,3 Hz)

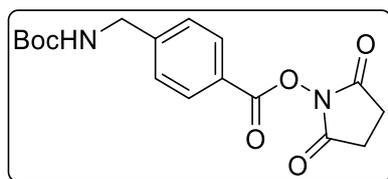
RMN ¹³C (50,32 MHz, DMSO-d₆) δ 28,3 (3C), 43,3, 78,1, 127,0 (2C), 129,2, 129,4 (2C), 145,4, 155,9, 167,3

IR (ATR, cm⁻¹) ν 3354, 3000-2750, 2700-2300, 1682, 1506, 1429, 1321, 1292, 1242, 1165, 1121, 1051, 942

HRMS *m/z* calculée pour C₁₃H₁₇NNaO₄ [M+Na]⁺ : 274,1050, trouvée : 274,1054

Synthèse du 4-(((*tert*-butoxycarbonyl)amino)méthyl) benzoate de succinimidyle (**16**)

Ce composé a été obtenu selon un protocole de synthèse adapté de Garlich, J. R. *et al.*³⁰¹



À une solution d'acide **15** (10,5 g, 41,8 mmol, 1 éq.) dans le tétrahydrofurane anhydre (100 mL) sont ajoutés successivement sous argon le *N*-hydroxysuccinimide (5,40 g, 46,9 mmol, 1,1 éq.) et une solution de dicyclohexylcarbodiimide (9,55 g, 46,3 mmol, 1,1 éq.) dans le dichlorométhane anhydre (30 mL). La solution est agitée à température ambiante pendant 22 h. Le milieu réactionnel est filtré puis évaporé sous pression réduite. Le résidu est purifié sur colonne de silice éluée par un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (4/6, v/v) pour conduire au composé **16** (13,7 g, 39,3 mmol).

Aspect : solide blanc

Rendement : 94%

R_f (SiO₂, cyclohexane/acétate d'éthyle, 30/70, v/v) : 0,72

Point de fusion : 154-155 °C

RMN ¹H (200,13 MHz, CDCl₃) δ 1,45 (s, 9H), 2,89 (s, 4H), 4,38 (d, 2H, *J* = 5,6 Hz), 5,06 (m, 1H), 7,40 (d, 2H, *J* = 8,3 Hz), 8,07 (d, 2H, *J* = 8,3 Hz)

³⁰³ Erdelyi, M.; Varedian, M.; Sköld, C.; Niklasson, I. B.; Nurbo, J.; Persson, A.; Bergquist, J.; Gogoll, A. Chemistry and folding of photomodulable peptides - stilbene and thioaurone-type candidates for conformational switches. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6(23):4356-4373.

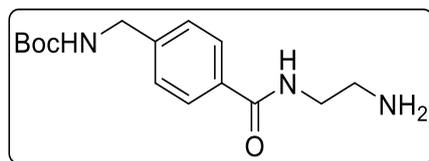
ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

RMN ¹³C (50,32 MHz, CDCl₃) δ 25,8 (2C), 28,4 (3C), 44,3, 80,0, 124,0, 127,6 (2C), 131,0 (2C), 146,9, 156,0, 161,7, 169,4 (2C)

IR (ATR, cm⁻¹) ν 3449, 2985, 2936, 1759, 1735, 1705, 1497, 1236, 1214, 1184, 1166, 1072, 995

HRMS *m/z* calculée pour C₁₇H₂₀N₂NaO₆ [M+Na]⁺ : 371,1214, trouvée : 371,1217

Synthèse du 4-((2-aminoéthyl)carbamoyl)benzylcarbamate de *tert*-butyle (**17**)



À une solution d'ester activé **16** (1,73 g, 4,97 mmol, 1 éq.) dans le tétrahydrofurane anhydre (25 mL) est ajoutée sous argon l'éthylène-1,2-diamine (3,32 mL, 49,7 mmol, 10 éq.). La solution est agitée à température ambiante pendant 1 h. Le milieu réactionnel est filtré puis rincé par du tétrahydrofurane (2 x 10 mL). Le filtrat est évaporé puis le résidu est purifié sur colonne d'alumine éluée par un mélange dichlorométhane/éthanol/ammoniaque (80/20/0,2, v/v/v) pour conduire au composé **17** (1,38 g, 4,70 mmol).

Aspect : solide blanc

Rendement : 95%

R_f (Al₂O₃, dichlorométhane/éthanol/ammoniaque, 80/20/0,2, v/v/v) : 0,10

Point de fusion : 136-137 °C

RMN ¹H (200,13 MHz, CDCl₃) δ 1,46 (s, 9H), 2,94 (t, 2H, *J* = 6,0 Hz), 3,50 (q, 2H, *J* = 5,8 Hz), 4,35 (d, 2H, *J* = 6,0 Hz), 4,92 (brs, 1H), 6,71 (brs, 1H), 7,33 (d, 2H, *J* = 8,1 Hz), 7,75 (d, 2H, *J* = 8,1 Hz)

RMN ¹³C (50,32 MHz, DMSO-*d*₆) δ 28,3 (3C), 41,3, 43,0, 43,2, 78,0, 126,7 (2C), 127,3 (2C), 133,2, 143,4, 155,9, 166,3

IR (ATR, cm⁻¹) ν 3273, 2968, 2929, 2857, 2827, 1682, 1650, 1572, 1545, 1364, 1286, 1250, 1171, 933

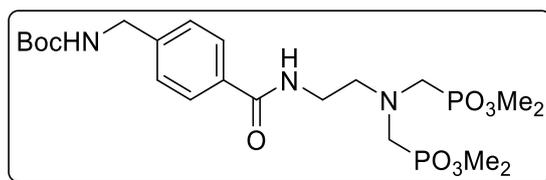
HRMS *m/z* calculée pour C₁₅H₂₄N₃O₃ [M+H]⁺ : 294,1812, trouvée : 294,1815

Synthèse du 4-((2-(bis((diméthoxyphosphoryl)méthyl)amino)éthyl)carbamoyl)benzylcarbamate de *tert*-butyle (**18**)

Première voie d'accès

Ce composé a été obtenu selon un protocole de synthèse adapté de Cao, P. *et al.*²⁵⁸

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses



À une solution du carbamate de *tert*-butyle **17** (377 mg, 1,29 mmol, 1 éq.) dans le tétrahydrofurane (15 mL) est ajoutée une solution aqueuse de formaldéhyde à 35% (255 μ L, 3,21 mmol, 2,5 éq.). La solution est agitée à température ambiante pendant 20 min avant ajout de diméthylphosphite (350 μ L, 3,82 mmol, 3 éq.). La solution est agitée à reflux pendant 18 h. Après retour à température ambiante, du diméthylphosphite est de nouveau ajouté au milieu réactionnel (120 μ L, 1,31 mmol, 1 éq.) et la solution est agitée à reflux pendant 5 h. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite et le résidu est purifié sur colonne de silice éluée par un mélange dichlorométhane/éthanol (90/10, v/v) pour conduire au composé **18** (619 mg, 1,15 mmol).

Aspect : huile incolore

Rendement : 89%

Deuxième voie d'accès

À une solution de l'amine **9.TFA** (1,26 g, 2,37 mmol, 1 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (5 mL) sont ajoutés successivement la *N,N*-diisopropyléthylamine (2,90 mL, 16,7 mmol, 7 éq.) et l'ester activé **16** (832 mg, 2,39 mmol, 1 éq.). La solution est agitée à température ambiante pendant 17 h. Le milieu réactionnel est dilué par ajout de dichlorométhane (30 mL) et d'eau déionisée (30 mL) puis, après décantation, la phase aqueuse est extraite par du dichlorométhane (30 mL). Les phases organiques sont réunies, lavées par une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (2 x 30 mL), séchées sur sulfate de magnésium, filtrées puis évaporées sous pression réduite. Le résidu est purifié sur colonne de silice éluée par un mélange dichlorométhane/méthanol (95/5, v/v) pour conduire au composé **18** (675 mg, 1,26 mmol).

Aspect : huile incolore

Rendement : 53%

R_f (Al_2O_3 , dichlorométhane/éthanol, 90/10, v/v) : 0,45

RMN ^1H (200,13 MHz, CDCl_3) δ 1,38 (s, 9H), 2,98 (se, 2H), 3,12 (d, 4H, $^2J_{\text{H-P}} = 8,8$ Hz), 3,44 (m, 2H), 3,66 (d, 12H, $^3J_{\text{H-P}} = 10,3$ Hz), 4,26 (se, 2H), 7,26 (d, 2H, $J = 7,9$ Hz), 7,86 (d, 2H, $J = 7,9$ Hz), 8,01 (m, 1H)

RMN ^{13}C (50,32 MHz, CDCl_3) δ 28,3 (3C), 38,2, 44,2, 49,5 (d, 2C, $^1J_{\text{C-P}} = 159,8$ Hz), 52,7 (4C), 55,5, 79,5, 127,1 (2C), 127,5 (2C), 133,0, 142,5, 156,0, 167,1

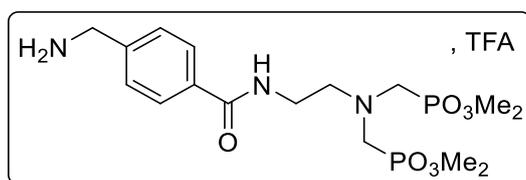
RMN ^{31}P (202,6 MHz, CDCl_3) δ 27,1

IR (ATR, cm^{-1}) ν 3460-3200, 3200-2700, 1648, 1536, 1505, 1454, 1392, 1366, 1218, 1165, 1024

HRMS m/z calculée pour $\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_9\text{P}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 538,2078, trouvée : 538,2079

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

Synthèse du trifluoroacétate de (((2-(4-(aminométhyl)benzamido)éthyl)azanediyl)bis(méthylène))bis(phosphonate) de tétraméthyle (**14.TFA**)



À une solution de carbamate de *tert*-butyle **18** (0,96 g , 1,79 mmol) dans le dichlorométhane anhydre (5 mL) portée à 0 °C est ajouté sous argon de l'acide trifluoroacétique (2,5 mL). La solution est agitée à 0 °C pendant 2 h 30. Le milieu réactionnel est porté à température ambiante puis évaporé sous pression réduite. Le résidu est coévaporé par du dichlorométhane (2 x 10 mL) pour conduire au composé **14.TFA** (1,18 g, 1,77 mmol).

Aspect : huile incolore

Rendement : 99%

RMN ¹H (200,13 MHz, CDCl₃) δ 3,08 (se, 2H), 3,26 (d, 4H, ²J_{H-P} = 9,3 Hz), 3,53 (m, 2H), 3,73 (d, 12H, ³J_{H-P} = 10,8 Hz), 4,17 (se, 2H), 7,43 (d, 2H, J = 7,0 Hz), 7,75 (d, 2H, J = 7,0 Hz), 8,04 (m, 3H)

RMN ¹³C (50,32 MHz, CDCl₃) δ 38,3, 43,6, 49,6 (dd, 2C, ¹J_{C-P} = 161,4 Hz, ³J_{C-P} = 7,7 Hz), 53,6 (d, 4C, ²J_{C-P} = 7,7 Hz), 55,7 (m, 1C), 115,2 (q, 2C, ¹J_{C-F} = 285,9 Hz), 128,0 (2C), 129,4 (2C), 133,9, 136,3, 160,1 (q, 2C, ²J_{C-F} = 40,4 Hz), 168,8

RMN ³¹P (202,6 MHz, CDCl₃) δ 26,5

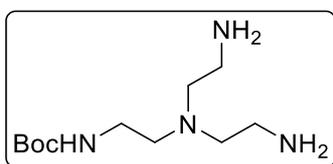
IR (ATR, cm⁻¹) ν 3200-2750, 1776, 1633, 1549, 1509, 1454, 1317, 1143, 1030

HRMS *m/z* calculée pour C₁₆H₃₀N₃O₇P₂ [M+H]⁺ : 438,1553, trouvée : 438,1550

Accès au précurseur tétra-phosphonate aliphatique

Synthèse du (2-(bis(2-aminoéthyl)amino)éthyl)carbamate de *tert*-butyle (**19**)

Ce composé a été obtenu selon un protocole de synthèse adapté de Tai, W. *et al.*²⁷³



À une solution de *tris*(2-aminoéthyl)amine (13,40 g, 91,6 mmol, 10 éq.) dans le chloroforme (600 mL) portée à 0 °C est ajoutée goutte à goutte sur une période de 2 h une solution de dicarbonate de di-*tert*-butyle (2,00 g, 9,16 mmol, 1 éq.) dans le chloroforme (100 mL). Après retour à température ambiante, la solution est agitée pendant 28 h. De l'eau déionisée (30 mL) est ajoutée au milieu réactionnel. Après 15 min d'agitation, la solution est décantée et la phase aqueuse est extraite par du chloroforme (2 x 60 mL). Les phases

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

organiques sont réunies, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées puis évaporées sous pression réduite. Le résidu est purifié sur colonne d'alumine éluée par un mélange dichlorométhane/éthanol/ammoniaque (90/10/0,2, v/v/v) pour conduire au composé **19** (2,11 g, 8,57 mmol).

Aspect : huile jaunâtre

Rendement : 94%

R_f (Al₂O₃, dichlorométhane/éthanol/ammoniaque, 90/10/0,2, v/v/v) : 0,11

RMN ¹H (500,13 MHz, CDCl₃) δ 1,26 (s, 9H), 2,35 (t, 4H, J = 6,0 Hz), 2,38 (t, 2H, J = 6,1 Hz), 2,57 (t, 4H, J = 6,0 Hz), 3,00 (m, 2H), 5,51 (se, 1H)

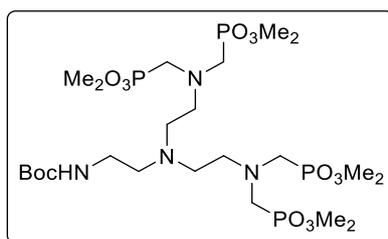
RMN ¹³C (125,76 MHz, CDCl₃) δ 28,2 (3C), 38,6, 39,6 (2C), 53,8, 57,2 (2C), 78,6, 156,0

IR (ATR, cm⁻¹) ν 3500-3150, 3150-2650, 1682, 1519, 1455, 1364, 1278, 1249, 1168

HRMS m/z calculée pour C₁₁H₂₇N₄O₂ [M+H]⁺ : 247,2129, trouvée : 247,2134

Synthèse du (2-(bis(2-(bis(2-(diméthoxyphosphoryl)méthyl)amino)éthyl)amino)éthyl)carbamate de *tert*-butyle (**20**)

Ce composé a été obtenu selon un protocole de synthèse adapté de Cao, P. *et al.*²⁵⁸

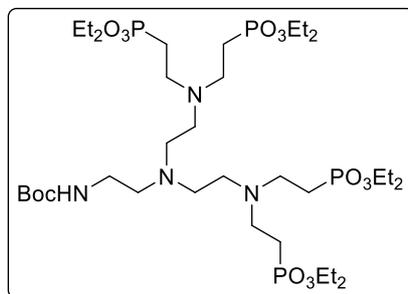


À une solution de diamine **19** (0,90 g, 3,65 mmol, 1 éq.) dans le tétrahydrofurane (15 mL) est ajoutée une solution aqueuse de formaldéhyde à 35% (1,45 mL, 18,3 mmol, 5 éq.). La solution est agitée à température ambiante pendant 20 min avant ajout de diméthylphosphite (2,70 mL, 29, 2 mmol, 8 éq.). La solution est agitée à reflux pendant 18 h. Après retour à température ambiante, une solution aqueuse de formaldéhyde à 35% est ajoutée de nouveau au milieu réactionnel (580 µL, 7,32 mmol, 2 éq.) et la solution est agitée à reflux pendant 5 h. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite et le résidu est purifié sur colonne de silice éluée par un mélange acétate d'éthyle/éthanol (90/10, v/v). Le composé **20** n'a pas pu être isolé.

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

Synthèse du (2-(bis(2-(bis(2-(diéthoxyphosphoryl)éthyl)amino)éthyl)amino)éthyl)carbamate de *tert*-butyle (**21**)

Ce composé a été obtenu selon un protocole de synthèse adapté de Matveeva, E. V. et *al.*²⁷⁴



À une solution de diamine **19** (378 mg, 1,53 mmol, 1 éq.) dans l'eau déionisée (3 mL) est ajouté du vinylphosphonate de diéthyle (0,91 mL, 6,11 mmol, 4 éq.). La solution est agitée à température ambiante pendant 11 j. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite et le résidu est purifié sur colonne de silice éluée par un mélange dichlorométhane/éthanol/triéthylamine (80/20/0,1, v/v/v) pour conduire au composé **21** (0,87 g, 0,96 mmol).

Aspect : huile incolore

Rendement : 63%

Rf (Al₂O₃, dichlorométhane/éthanol/triéthylamine (80/20/0,1, v/v/v) : 0,10

RMN ¹H (200,13 MHz, CDCl₃) δ 1,30 (t, 24H, *J* = 7,1 Hz), 1,42 (s, 9H), 1,90 (m, 8H), 2,45 (t, 4H, *J* = 6,9 Hz), 2,54 (m, 6H), 2,74 (m, 8H), 3,07 (m, 2H), 4,07 (m, 16H), 6,29 (se, 1H)

RMN ¹³C (125,76 MHz, CDCl₃) δ 16,6 (d, 8C, ³*J*_{C-P} = 6,0 Hz), 22,6 (d, 4C, ¹*J*_{C-P} = 137,5 Hz), 28,6 (3C), 39,2, 46,6 (4C), 51,2 (2C), 52,4 (2C), 52,5, 61,6 (d, 8C, ²*J*_{C-P} = 6,4 Hz), 78,8, 156,3

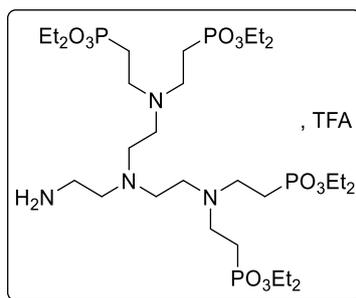
RMN ³¹P (202,6 MHz, CDCl₃) δ 30,3

IR (ATR, cm⁻¹) ν 3600-3100, 3050-2700, 1706, 1521, 1445, 1391, 1265, 1232, 1164, 1097, 1022, 955

HRMS *m/z* calculée pour C₃₅H₇₉N₄O₁₄P₄ [M+H]⁺ : 903,4543, trouvée : 903,4550

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

Synthèse du trifluoroacétate de (((((2-aminoéthyl)azanediy)bis(éthane-2,1-diyl))bis(azanetriyl))tetrakis(éthane-2,1-diyl))tetrakis(phosphonate) d'octaéthyle (**22.TFA**)



À une solution de carbamate de *tert*-butyle **21** (1,01 g, 1,12 mmol) dans le dichlorométhane anhydre (5 mL) portée à 0 °C est ajouté, goutte à goutte et sous argon, l'acide trifluoroacétique (2,5 mL). La solution est agitée à 0 °C pendant 3 h. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite pour conduire au composé **22.TFA** (1,34 g, 1,07 mmol) engagé dans l'étape réactionnelle suivante sans étape de purification.

Aspect : huile jaune

Rendement : 96%

RMN ¹H (500,13 MHz, CDCl₃) δ 1,33 (t, 24H, *J* = 7,1 Hz), 2,35 (m, 8H), 2,97 (m, 2H), 3,06 (t, 4H, *J* = 6,7 Hz), 3,26 (se, 2H), 3,47 (m, 12H), 4,15 (td, 16H, ²*J*_{H-P} = 15,4 Hz, 7,1 Hz), 7,53 (m, 3H)

RMN ¹³C (125,76 MHz, CDCl₃) δ 16,0 (d, 8C, ³*J*_{C-P} = 6,0 Hz), 20,1 (d, 4C, ¹*J*_{C-P} = 143,0 Hz), 37,4, 47,5 (4C), 47,8 (2C), 50,3 (2C), 51,0, 64,2 (d, 8C, ²*J*_{C-P} = 6,9 Hz), 115,3 (q, ¹*J*_{C-F} = 287,0 Hz), 160,7 (q, ²*J*_{C-F} = 40,1 Hz)

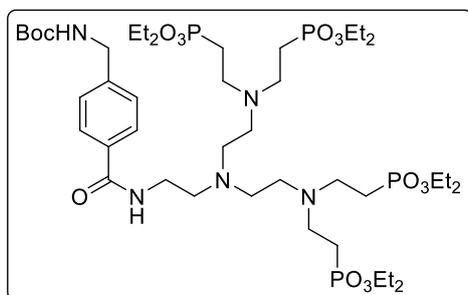
RMN ³¹P (202,6 MHz, CDCl₃) δ 25,0

IR (ATR, cm⁻¹) ν 2990, 1773, 1672, 1157, 1022, 973

HRMS *m/z* calculée pour C₃₀H₇₁N₄O₁₂P₄ [M+H]⁺ : 803,4014, trouvée : 803,4006

Accès au précurseur tétra-phosphonate aromatique

Synthèse du (4-((2-(bis(2-(bis(2-(diéthoxyphosphoryl)éthyl)amino)éthyl)amino)éthyl)carbamoyl)benzyl)carbamate de *tert*-butyle (**23**)



À une solution d'amine **22.TFA** (4,22 g, 3,35 mmol, 1 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (2 mL) sont ajoutés successivement sous argon la *N,N*-diisopropyléthylamine

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

(3,90 mL, 22,4 mmol, 6,7 éq.) et une solution d'ester activé **16** (790,0 mg, 2,27 mmol, 0,68 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (4 mL). La solution est agitée à température ambiante pendant 20 h. Le milieu réactionnel est dilué par du dichlorométhane (30 mL) et d'eau déionisée (30 mL). Après décantation, la phase aqueuse est extraite par du dichlorométhane (30 mL) puis les phases organiques sont réunies et lavées par une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (2 x 30 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié sur colonne d'alumine éluée par du dichlorométhane puis par un mélange dichlorométhane/éthanol/ammoniaque (95/5/0,2, v/v/v) pour conduire au composé **23** (2,07 g, 2,00 mmol).

Aspect : huile jaune

Rendement : 88%

Rf (Al₂O₃, dichlorométhane/éthanol/ammoniaque, 95/5/0,2, v/v/v) : 0,39

RMN ¹H (500,13 MHz, CDCl₃) δ 1,29 (t, 24H, *J* = 7,1 Hz), 1,44 (s, 9H), 1,78 (m, 8H), 2,46 (t, 4H, *J* = 6,3 Hz), 2,58 (t, 4H, *J* = 6,3 Hz), 2,66 (t, 2H, *J* = 5,2 Hz), 2,72 (m, 8H), 3,44 (m, 2H), 3,95-4,15 (m, 16H), 4,33 (d, 2H, *J* = 5,5 Hz), 5,59 (se, 1H), 7,32 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz), 7,55 (se, 1H), 7,75 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz)

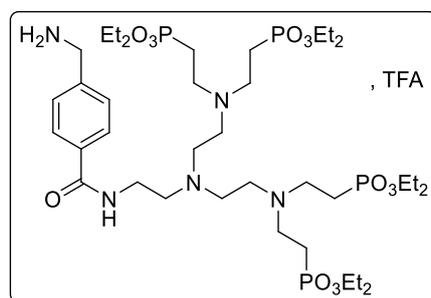
RMN ¹³C (125,76 MHz, CDCl₃) δ 16,6 (d, 8C, *J* = 6,0 Hz), 23,0 (d, 4C, ¹*J*_{C-P} = 137,7 Hz), 28,5 (3C), 38,1, 44,6, 46,7 (4C), 51,1 (2C), 52,7 (2C), 52,9, 61,7 (d, 8C, *J* = 6,5 Hz), 79,4, 127,4 (2C), 127,8 (2C), 134,2, 142,5, 156,2, 167,4

RMN ³¹P (202,6 MHz, CDCl₃) δ 30,1

IR (ATR, cm⁻¹) ν 3296, 2979, 1709, 1649, 1537, 1391, 1365, 1227, 1164, 1097, 1021, 954

HRMS *m/z* calculée pour C₄₃H₈₆N₅O₁₅P₄ [M+H]⁺ : 1036,5065, trouvée : 1036,5059

Synthèse du trifluoroacétate de (((((2-(4-(aminométhyl)benzamido)éthyl)azanediyl)bis(éthane-2,1-diyl))bis(azanetriyl))tetrakis(éthane-2,1-diyl))tetrakis(phosphonate) d'octaéthyle (**24.TFA**)



À une solution de carbamate de *tert*-butyle **23** (541 mg, 522 μmol) dans le dichlorométhane anhydre (5 mL) portée à 0 °C est ajouté, goutte à goutte et sous argon, l'acide trifluoroacétique (2,5 mL). La solution est agitée à 0 °C pendant 3 h. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite pour conduire au composé **24.TFA** (726 mg, 522 μmol) engagé dans l'étape réactionnelle suivante sans étape de purification.

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

Aspect : huile jaune

Rendement : quant.

RMN ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) δ 1,31 (t, 24H, $J = 7,1$ Hz), 2,31 (m, 8H), 3,38 (m, 2H), 3,50 (m, 8H), 3,69 (m, 4H), 3,74 (m, 6H), 4,13 (quint, 16H, $J = 7,1$ Hz), 4,20 (m, 2H), 7,43 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz), 7,75 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz), 7,83 (se, 3H), 8,25 (m, 1H)

RMN ^{13}C (125,76 MHz, CDCl_3) δ 15,9 (d, 8C, $^3J_{\text{C-P}} = 6,0$ Hz), 20,2 (d, 4C, $^1J_{\text{C-P}} = 142,9$ Hz), 36,1, 43,8, 47,8 (4C), 48,5 (2C), 48,9 (2C), 54,3, 64,2 (d, 8C, $^2J_{\text{C-P}} = 6,9$ Hz), 115,3 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 287,0$ Hz), 128,2 (2C), 129,5 (2C), 133,0, 136,6, 160,7 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 40,2$ Hz), 170,1

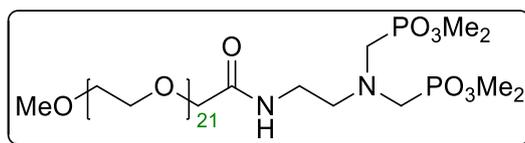
RMN ^{31}P (202,6 MHz, CDCl_3) δ 24,7

IR (ATR, cm^{-1}) ν 2990, 1771, 1668, 1557, 1395, 1147, 1019, 972

HRMS m/z calculée pour $\text{C}_{38}\text{H}_{78}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 936,4541, trouvée : 936,4548

Couplage et déprotection des PEGs-bis- et tétra-phosphonate

Synthèse du α -méthyl- ω -(2-((2-(bis((diméthoxyphosphoryl)méthyl)amino)éthyl)amino)-2-oxoéthoxy)-poly(oxyéthane-1,2-diyl) $_{(1000)}$ (**25a**)



À une solution d'ester activé **6a** (700 mg, 629 μmol , 1 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (1 mL) est ajoutée sous argon une solution de trifluoroacétate d'amine **9.TFA** (355 mg, 667 μmol , 1,1 éq.) et de *N,N*-diisopropyléthylamine (548 μL , 3,15 mmol, 5 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (1 mL). Après 22 h d'agitation à température ambiante, du dichlorométhane (15 mL) puis de l'eau déionisée (15 mL) sont ajoutés au milieu réactionnel. Après décantation, la phase aqueuse est extraite par du dichlorométhane (15 mL). Les phases organiques sont regroupées puis sont lavées par une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (2 x 15 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié sur colonne d'alumine éluée par un mélange acétate d'éthyle/éthanol (90/10, v/v) pour conduire au composé **25a** (562 mg, 432 μmol).

Aspect : cire blanche

Rendement : 69%

R_f (Al_2O_3 , acétate d'éthyle/éthanol, 90/10, v/v) : 0,26

RMN ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) δ 2,93 (t, 2H, $J = 6,0$ Hz), 3,17 (d, 4H, $^2J_{\text{H-P}} = 8,4$ Hz), 3,35 (s, 3H), 3,36 (q, 2H, $J = 6,0$ Hz), 3,52 (m, 2H), 3,57-3,64 (m, ca. 80H), 3,65 (m, 2H), 3,75 (d, 12H, $^3J_{\text{H-P}} = 10,6$ Hz), 3,97 (s, 2H), 7,34 (m, 1H)

RMN ^{13}C (50,32 MHz, CDCl_3) δ 36,7, 49,3 (dd, 2C, $^1J_{\text{C-P}} = 157,3$ Hz, $^3J_{\text{C-P}} = 6,1$ Hz), 52,5 (m, 4C), 55,6 (t, 1C, $^3J_{\text{H-P}} = 6,9$ Hz), 58,9, 69,50-71,00 (m, ca. 42C), 71,8, 169,9

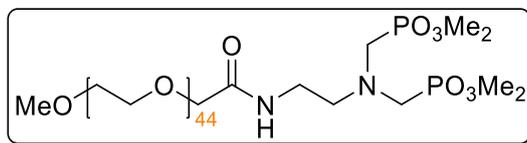
RMN ^{31}P (202,6 MHz, CDCl_3) δ 29,4

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

IR (ATR, cm^{-1}) ν 3324, 2870, 1668, 1537, 1449, 1348, 1242, 1087, 1042

MALDI-TOF m/z calculée pour $\text{C}_{53}\text{H}_{110}\text{N}_2\text{NaO}_{29}\text{P}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1323,657, trouvée : 1323,945

Synthèse du α -méthyl- ω -(2-((2-(bis((diméthoxyphosphoryl)méthyl)amino)éthyl)amino)-2-oxoéthoxy)-poly(oxyéthane-1,2-diyl)₍₂₀₀₀₎ (**25b**)



À une solution d'amine **9.TFA** (710 mg, 1,33 μmol , 1 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (2 mL) sont ajoutés successivement sous argon la *N,N*-diisopropyléthylamine (1,75 mL, 10,0 mmol, 7,5 éq.) et une solution d'ester activé **6b** (1,93 g, 908 μmol , 0,7 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (5 mL). La solution est agitée à température ambiante pendant 96 h. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite puis le résidu est repris dans le dichlorométhane (120 mL) puis est lavé successivement par de l'eau déionisée (2 x 80 mL) puis par une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (2 x 80 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié sur colonne d'alumine éluée par un mélange dichlorométhane/méthanol (100/0 puis 95/5, v/v) pour conduire au composé **25b** (1,13 g, 489 μmol).

Aspect : solide marron

Rendement : 54%

R_f (Al_2O_3 , dichlorométhane/méthanol, 95/5, v/v) : 0,12

RMN ^1H (200,13 MHz, CDCl_3) δ 2,84 (t, 2H, $J = 5,3$ Hz), 3,08 (d, 4H, $^2J_{\text{H-P}} = 8,7$ Hz), 3,15-3,35 (m, 5H), 3,35-3,62 (m, ca. 176H), 3,65 (d, 12H, $^3J_{\text{H-P}} = 10,6$ Hz), 3,89 (s, 2H), 7,27 (m, 1H)

RMN ^{13}C (50,32 MHz, CDCl_3) δ 36,6, 49,3 (dd, 2C, $^1J_{\text{C-P}} = 157,5$ Hz, $^3J_{\text{C-P}} = 6,1$ Hz), 52,5 (m, 4C), 55,6 (t, 1C, $^3J_{\text{C-P}} = 6,5$ Hz), 58,9, 69,50-71,50 (m, ca. 88C), 71,8, 169,9

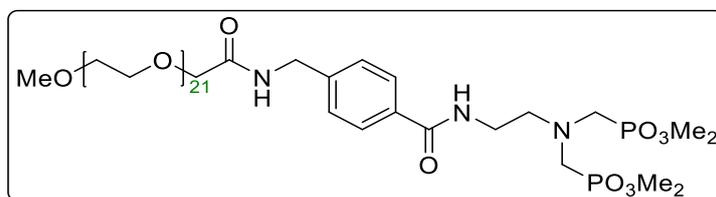
RMN ^{31}P (202,6 MHz, CDCl_3) δ 26,1

IR (ATR, cm^{-1}) ν 2884, 1672, 1466, 1359, 1341, 1279, 1240, 1146, 1103, 1060, 1010, 957

MALDI-TOF m/z calculée pour $\text{C}_{99}\text{H}_{202}\text{N}_2\text{NaO}_{52}\text{P}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 2336,260, trouvée : 2336,676

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

Synthèse du α -méthyl- ω -(2-((4-((2-bis((diméthoxyphosphoryl)méthyl)amino)éthyl)carbamoyle)benzyl)amino)-2-oxoéthoxy)-poly(oxyéthane-1,2-diyl)₍₁₀₀₀₎ (**26a**)



À une solution d'ester activé **6a** (780 mg, 1,17 mmol, 1 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (2 mL) est ajoutée sous argon une solution d'amine **14.TFA** (1,03 g, 926 μ mol, 0,8 éq.) et de *N,N*-diisopropyléthylamine (1,55 mL, 8,90 mmol, 7,5 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (5 mL). La solution est agitée à température ambiante pendant 96 h. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite puis le résidu est repris dans le dichlorométhane (60 mL). La solution est lavée successivement par de l'eau déionisée (2 x 40 mL) puis par une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (2 x 40 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié sur colonne d'alumine éluée par un mélange dichlorométhane/méthanol (100/0 puis 95/5, v/v) pour conduire au composé **26a** (709 mg, 494 μ mol).

Aspect : cire blanche

Rendement : 53%

R_f (Al_2O_3 , dichlorométhane/méthanol, 95/5, v/v) : 0,17

RMN ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) δ 3,03 (t, 2H, $J = 5,1$ Hz), 3,16 (d, 4H, $^2J_{\text{H-P}} = 8,3$ Hz), 3,36 (s, 3H), 3,50-3,61 (m, 12H), 3,61-3,69 (m, ca., 72H), 2,72 (m, 2H), 3,72 (d, 12H, $^3J_{\text{H-P}} = 10,6$ Hz), 4,05 (s, 2H), 4,51 (d, 2H, $J = 6,2$ Hz), 7,34 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz), 7,52 (t, 1H, $J = 6,0$ Hz), 7,94 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz), 7,99 (m, 1H)

RMN ^{13}C (125,76 MHz, CDCl_3) δ 38,5, 42,4, 49,8 (dd, 2C, $^1J_{\text{C-P}} = 160,0$ Hz, $^3J_{\text{C-P}} = 7,3$ Hz), 52,9 (m, 4C), 55,7 (t, 1C, $^3J_{\text{C-P}} = 6,0$ Hz), 59,1, 70,3, 70,50-70,80 (ca. 40C), 71,2, 72,0, 127,6 (2C), 127,7 (2C), 133,4, 141,8, 167,0, 170,3

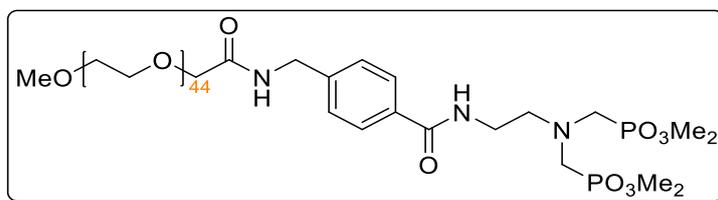
RMN ^{31}P (202,6 MHz, CDCl_3) δ 29,6

IR (ATR, cm^{-1}) ν 3323, 3000-2750, 1625, 1539, 1449, 1344, 1308, 1279, 1241, 1108, 1045

MALDI-TOF m/z calculée pour $\text{C}_{61}\text{H}_{117}\text{N}_3\text{NaO}_{30}\text{P}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1456,709, trouvée : 1456,922

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

Synthèse du α -méthyl- ω -(2-((4-((2-(bis((diméthoxyphosphoryl)méthyl)amino)éthyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-oxoéthoxy)-poly(oxyéthane-1,2-diyl)₍₂₀₀₀₎ (**26b**)



À une solution d'amine **14.TFA** (780 mg, 1,17 mmol, 1 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (2 mL) sont ajoutées successivement sous argon la *N,N*-diisopropyléthylamine (1,55 mL, 8,90 mmol, 7,5 éq.) et une solution d'ester activé **6b** (1,93 g, 908 μ mol, 0,8 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (5 mL). La solution est agitée à température ambiante pendant 96 h. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite puis le résidu est repris dans le dichlorométhane (120 mL). La solution est lavée successivement par de l'eau déionisée (2 x 80 mL) puis par une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (2 x 80 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié sur colonne d'alumine éluée par un mélange dichlorométhane/méthanol (100/0 puis 95/5, v/v) pour conduire au composé **26b** (1,22 g, 498 μ mol).

Aspect : cire jaunâtre

Rendement : 55%

R_f (Al_2O_3 , dichlorométhane/méthanol, 95/5, v/v) : 0,14

RMN ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) δ 3,01 (m, 2H), 3,14 (d, 4H, $^2J_{\text{H-P}} = 8,4$ Hz), 3,34 (s, 3H), 3,40-3,80 (m, ca. 178H), 3,70 (d, 12H, $^3J_{\text{H-P}} = 10,6$ Hz), 4,03 (s, 2H), 4,49 (d, 2H, $J = 6,1$ Hz), 7,32 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz), 7,56 (m, 1H), 7,91 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz), 7,97 (m, 1H)

RMN ^{13}C (125,76 MHz, CDCl_3) δ 49,1 (dd, 2C, $^1J_{\text{C-P}} = 160,0$ Hz, $^3J_{\text{C-P}} = 7,5$ Hz), 52,8 (m, 4C), 55,6 (t, $^3J_{\text{C-P}} = 6,4$ Hz), 59,1, 70,2, 70,30-70,60 (m, ca. 88C), 71,1, 72,0, 127,5 (2C), 127,6 (2C), 133,3, 141,8, 167,0, 170,2

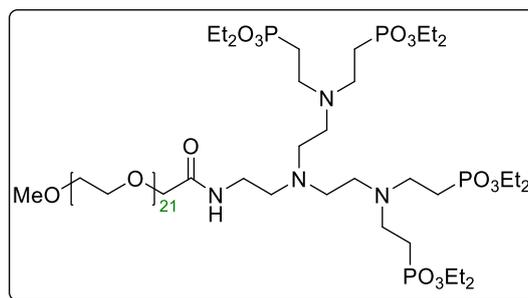
RMN ^{31}P (202,6 MHz, CDCl_3) δ 29,6

IR (ATR, cm^{-1}) ν 2884, 1656, 1538, 1466, 1359, 1341, 1279, 1240, 1146, 1104, 1060, 1028, 959

MALDI-TOF m/z calculée pour $\text{C}_{107}\text{H}_{209}\text{N}_3\text{NaO}_{53}\text{P}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 2469,312, trouvée : 2469,612

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

Synthèse du α -méthyl- ω -(2-((bis(2-(bis((diéthoxyphosphoryl)éthyl)amino)éthyl)amino)éthyl)amino-2-oxoéthoxy)-poly(oxyéthane-1,2-diyl)₍₁₀₀₀₎ (**27a**)



À une solution d'amine **22.TFA** (1,08 g, 858 μ mol, 1 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (2,0 mL) sont ajoutés successivement, goutte à goutte et sous argon, la *N,N*-diisopropyléthylamine (1,15 mL, 6,60 mmol, 7,7 éq.) et une solution d'ester activé **6a** (540 mg, 486 μ mol, 0,6 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (5 mL). La solution est agitée à température ambiante pendant 16 h. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite puis le résidu est repris dans le dichlorométhane (60 mL). La solution est lavée successivement par de l'eau déionisée (2 x 40 mL) puis par une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (2 x 40 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié sur colonne d'alumine éluée par un mélange dichlorométhane/méthanol (100/0 puis 95/5, v/v) pour conduire au composé **27a** (639 mg, 355 μ mol).

Aspect : huile jaune

Rendement : 73%

Rf (Al₂O₃, dichlorométhane/méthanol, 95/5, v/v) : 0,17

RMN ¹H (500,13 MHz, CDCl₃) δ 1,29 (t, 24H, *J* = 7,1 Hz), 1,86 (m, 8H), 2,45 (m, 4H), 2,55 (m, 6H), 2,73 (m, 8H), 3,27 (q, 2H, *J* = 6,0 Hz), 3,34 (s, 3H), 3,51 (m, 2H), 3,55-3,70 (m, ca. 82H), 3,96 (s, 2H), 4,07 (m, 16H), 7,05 (se, 1H)

RMN ¹³C (125,76 MHz, CDCl₃) δ 16,6 (d, 8C, ³*J*_{C-P} = 6,0 Hz), 23,3 (d, 4C, ¹*J*_{C-P} = 137,5 Hz), 36,9, 46,9 (4C), 51,4 (2C), 53,0 (2C), 53,7, 59,1, 61,6 (d, 8C, ²*J*_{C-P} = 6,4 Hz), 70,5, 70,60-70,75 (m, ca. 40C), 70,9, 72,0, 169,8

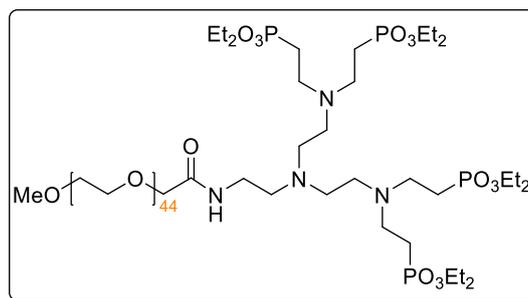
RMN ³¹P (202,6 MHz, CDCl₃) δ 30,3

IR (ATR, cm⁻¹) ν 2950-2700, 1675, 1529, 1448, 1390, 1348, 1241, 1098, 1051, 1024, 951

MALDI-TOF *m/z* calculée pour C₇₅H₁₅₈N₄NaO₃₅P₄ [M+Na]⁺ : 1821,956, trouvée : 1821,746

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

Synthèse du α -méthyl- ω -(2-((bis(2-(bis((diéthoxyphosphoryl)éthyl)amino)éthyl)amino)éthyl)amino-2-oxoéthoxy)-poly(oxyéthane-1,2-diyl)₍₂₀₀₀₎ (**27b**)



À une solution d'amine **22.TFA** (960 mg, 763 μ mol, 1 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (1 mL) sont ajoutés successivement, goutte à goutte et sous argon, la *N,N*-diisopropyléthylamine (1,0 mL, 5,74 mmol, 7,5 éq.) et une solution d'ester activé **6b** (477 mg, 224 μ mol, 0,30 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (3 mL). La solution est agitée à température ambiante pendant 20 h. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite puis le résidu est repris dans le dichlorométhane (40 mL). La solution est lavée successivement par de l'eau déionisée (2 x 40 mL) puis par une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (2 x 40 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié sur colonne d'alumine éluée par un mélange dichlorométhane/méthanol (98/2, v/v) pour conduire au composé **27b** (442 mg, 157 μ mol).

Aspect : cire jaune

Rendement : 70%

Rf (dichlorométhane/méthanol, 98/2, v/v) : 0,14

RMN ¹H (500,13 MHz, CDCl₃) δ 1,31 (t, 24H, *J* = 7,1 Hz), 1,80-1,95 (m, 8H), 2,42-2,62 (m, 3H), 2,53-2,60 (m, 5H), 2,70-2,80 (m, 8H), 3,29 (q, 2H, *J* = 6,2 Hz), 3,36 (s, 3H), 3,53 (m, 2H), 3,55-3,74 (m, ca. 176H), 3,98 (s, 2H), 4,08 (m, 16H), 7,07 (t, 1H, *J* = 5,3 Hz)

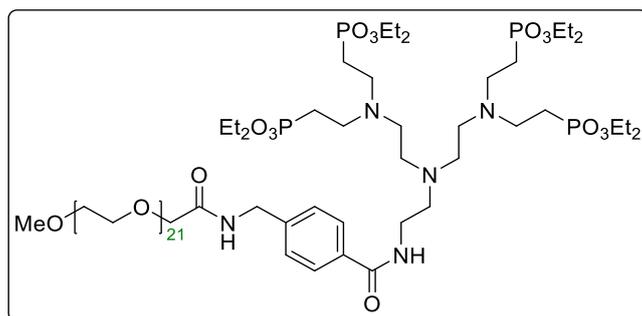
RMN ¹³C (125,76 MHz, CDCl₃) δ 16,6 (d, 8C, ³*J*_{C-P} = 6,0 Hz), 23,3 (d, 4C, ¹*J*_{C-P} = 137,5 Hz), 37,0, 46,9 (4C), 51,5 (2C), 53,0 (2C), 53,7, 59,1, 61,7 (d, 8C, ²*J*_{C-P} = 6,4 Hz), 70,5, 70,60-70,80 (m, ca. 86C), 70,9, 72,0, 169,8

RMN ³¹P (202,6 MHz, CDCl₃) δ 30,4

IR (ATR, cm⁻¹) ν 2883, 1671, 1533, 1466, 1359, 1342, 1279, 1241, 1144, 1106, 1059, 1027, 957
MALDI-TOF *m/z* calculée pour C₁₂₁H₂₅₀N₄NaO₅₈P₄ [M+Na]⁺ : 2834,558, trouvée : 2834,793

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

Synthèse du α -méthyl- ω -((2-((4-((bis(2-(bis((diéthoxyphosphoryl)éthyl)amino)éthyl)amino)éthyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-oxoéthoxy)-poly(oxyéthane-1,2-diyl)₍₁₀₀₀₎ (**28a**)



À une solution d'amine **24.TFA** (1,36 g, 905 μ mol, 1 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (2 mL) sont ajoutés successivement, goutte à goutte et sous argon, la *N,N*-diisopropyléthylamine (1,50 mL, 8,6 mmol, 9,5 éq.) et une solution d'ester activé **6a** (832 mg, 748 μ mol, 0,8 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (5 mL). La solution est agitée à température ambiante pendant 16 h. Le milieu réactionnel est dilué par ajout de dichlorométhane (20 mL) et d'eau déionisée (20 mL). Après décantation, la phase aqueuse est extraite par du dichlorométhane (20 mL). Les phases organiques réunies sont lavées par une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (2 x 20 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié sur colonne d'alumine éluée par un mélange dichlorométhane/méthanol (100/0 puis 95/5, v/v) pour conduire au composé **28a** (656 mg, 339 μ mol).

Aspect : cire jaune

Rendement : 45%

R_f (Al₂O₃, dichlorométhane/méthanol, 95/5, v/v) : 0,23

RMN ¹H (500,13 MHz, CDCl₃) δ 1,29 (t, 24H, *J* = 7,1 Hz), 1,83 (m, 8H), 2,48 (t, 4H, *J* = 7,3 Hz), 2,59 (t, 4H, *J* = 6,3 Hz), 2,68 (t, 2H, *J* = 5,9 Hz), 2,74 (m, 8H), 3,35 (s, 3H), 3,44 (q, 2H, *J* = 5,7 Hz), 3,50-3,70 (m, ca. 84H), 4,05 (m, 18H), 4,50 (d, 2H, *J* = 6,1 Hz), 7,32 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz), 7,47 (t, 1H, *J* = 5,0 Hz), 7,52 (t, 1H, *J* = 6,0 Hz), 7,76 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz)

RMN ¹³C (125,76 MHz, CDCl₃) δ 16,6 (d, 8C, ³J_{C-P} = 6,0 Hz), 23,1 (d, 4C, ¹J_{C-P} = 137,9 Hz), 38,0, 42,4, 46,7 (4C), 51,1 (2C), 52,7 (2C), 53,1, 59,1, 61,7 (d, 8C, ²J_{C-P} = 6,4 Hz), 70,3, 70,50-70,80 (m, ca. 40C), 71,2, 72,0, 127,5 (2C), 127,7 (2C), 134,0, 141,8, 167,2, 170,2

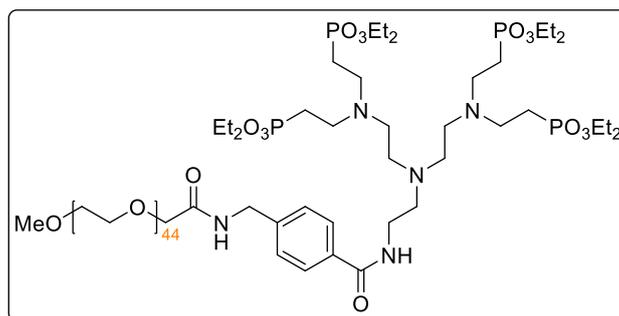
RMN ³¹P (202,6 MHz, CDCl₃) δ 30,3

IR (ATR, cm⁻¹) ν 2876, 1656, 1537, 1466, 1342, 1279, 1240, 1144, 1104, 1055, 1024, 954

MALDI-TOF *m/z* calculée pour C₈₃H₁₆₆N₅O₃₆P₄ [M+H]⁺ : 1933,026, trouvée : 1932,891

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

Synthèse du α -méthyl- ω -((2-((4-((bis(2-(bis((diéthoxyphosphoryl)éthyl)amino)éthyl)amino)éthyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-oxoéthoxy)-poly(oxyéthane-1,2-diyl)₍₂₀₀₀₎ (**28b**)



À une solution d'amine **24.TFA** (1,33 g, 880 μ mol, 1 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (1 mL) sont ajoutés successivement, goutte à goutte et sous argon, la *N,N*-diisopropyléthylamine (1,15 mL, 6,60 mmol, 7,5 éq.) et une solution d'ester activé **6b** (477 mg, 224 μ mol, 0,25 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (2 mL). La solution est agitée à température ambiante pendant 19 h. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite puis le résidu est repris dans le dichlorométhane (40 mL). La solution est lavée successivement par de l'eau déionisée (2 x 40 mL) puis par une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (2 x 40 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié sur colonne d'alumine éluée par un mélange dichlorométhane/méthanol (98/2, v/v) pour conduire au composé **28b** (410 mg, 139 μ mol).

Aspect : cire blanchâtre

Rendement : 62%

R_f (Al₂O₃, dichlorométhane/méthanol (98/2, v/v)) : 0,11

RMN ¹H (500,13 MHz, CDCl₃) δ 1,29 (t, 24H, *J* = 7,1 Hz), 1,78-1,88 (m, 8H), 2,48 (m, 4H), 2,59 (m, 4H), 2,68 (t, 2H, *J* = 5,9 Hz), 2,74 (q, 8H, *J* = 8,1 Hz), 3,36 (s, 3H), 3,46 (m, 2H), 3,50-3,72 (m, ca. 176H), 3,99-4,12 (m, 18H), 4,50 (d, 2H, *J* = 6,1 Hz), 7,33 (d, 2H, *J* = 8,2 Hz), 7,50 (t, 1H, *J* = 5,0 Hz), 7,57 (t, 1H, *J* = 6,0 Hz), 7,77 (d, 2H, *J* = 8,2 Hz)

RMN ¹³C (125,76 MHz, CDCl₃) δ 16,6 (d, 8C, ³J_{C-P} = 6,0 Hz), 23,1 (d, 4C, ¹J_{C-P} = 137,6 Hz), 38,0, 42,4, 46,7 (4C), 51,1 (2C), 52,7 (2C), 53,2, 59,1, 61,7 (d, 8C, ²J_{C-P} = 6,5 Hz), 70,3, 70,50-70,75 (m, ca. 86C), 71,2, 72,0, 127,5 (2C), 127,7 (2C), 134,0, 141,9, 167,2, 170,2

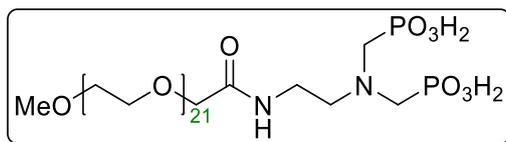
RMN ³¹P (202,6 MHz, CDCl₃) δ 30,2

IR (ATR, cm⁻¹) ν 2885, 1656, 1466, 1341, 1279, 1240, 1147, 1104, 1059, 1026, 957

MALDI-TOF *m/z* calculée pour C₁₂₉H₂₅₇N₅NaO₅₉P₄ [M+Na]⁺ : 2967,611, trouvée : 2967,464

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

Synthèse du α -méthyl- ω -(2-((2-(bis((phosphono)méthyl)amino)éthyl)amino)-2-oxoéthoxy)-poly(oxyéthane-1,2-diyl)₍₁₀₀₀₎ (L5)



À une solution d'ester **25a** (800 mg, 615 μ mol, 1 éq.) dans le dichlorométhane anhydre (35 mL) portée à 0 °C est ajouté sous argon le bromotriméthylsilane (650 μ L, 4,93 mmol, 8 éq.). La solution est agitée en revenant lentement à température ambiante pendant 24 h. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite puis le résidu est repris dans le méthanol (20 mL) et la solution est agitée à température ambiante pendant 8 h. Après évaporation sous pression réduite, le résidu obtenu est trituré dans l'éther diéthylique anhydre (3 x 10 mL). Le précipité formé est séché sous pression réduite pour conduire au composé **L5** (729 mg, 585 μ mol).

Aspect : cire blanche

Rendement : 95%

RMN ¹H (500,13 MHz, D₂O) δ 3,39 (s, 3H), 3,63 (m, 2H), 3,65-3,80 (m, ca. 90H), 4,15 (s, 2H)

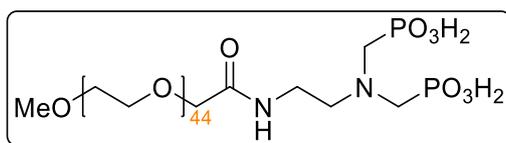
RMN ¹³C (125,76 MHz, D₂O/acetone-*d*₆, 95/5, v/v) δ 35,8, 53,1 (d, 2C, ¹J_{C-P} = 136,5 Hz), 58,3, 59,4, 61,8, 69,0, 70,60-71,30 (m, ca. 37C), 71,5, 71,7, 72,4, 73,1, 175,4

RMN ³¹P (202,6 MHz, D₂O) δ 7,0

IR (ATR, cm⁻¹) ν 3323, 3000-2750, 1624, 1567, 1449, 1344, 1242, 1087

MALDI-TOF *m/z* calculée pour C₄₉H₁₀₂N₂NaO₂₉P₂ [M+Na]⁺ : 1267,594, trouvée : 1267,819

Synthèse du α -méthyl- ω -(2-((2-(bis((phosphono)méthyl)amino)éthyl)amino)-2-oxoéthoxy)-poly(oxyéthane-1,2-diyl)₍₂₀₀₀₎ (L6)



À une solution d'ester **25b** (319 mg, 138 μ mol, 1 éq.) dans le dichlorométhane anhydre (2 mL) portée à 0 °C est ajouté sous argon le bromotriméthylsilane (150 μ L, 1,14 mmol, 8 éq.). La solution est agitée en revenant lentement à température ambiante pendant 18 h. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite puis le résidu est repris dans le méthanol (5 mL) et la solution est agitée à température ambiante pendant 2 h. Après évaporation sous pression réduite, le résidu est trituré dans l'éther diéthylique anhydre (3 x 5 mL). Le précipité formé est séché sous pression réduite pour conduire au composé **L6** (312 mg, 138 μ mol).

Aspect : solide marron

Rendement : quant.

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

RMN ^1H (500,13 MHz, D_2O) δ 3,28 (s, 3H), 3,40-3,80 (m, ca. 184H), 4,04 (s, 2H)

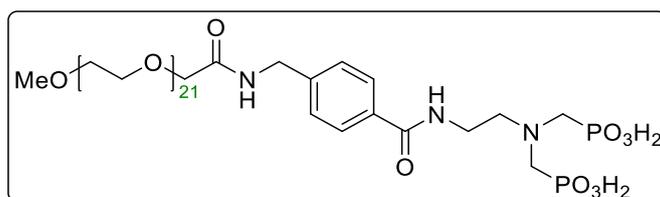
RMN ^{13}C (125,76 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{acetone-}d_6$, 95/5, v/v) δ 35,8 (2C), 53,0 (d, 2C, $^1J_{\text{C-P}} = 134,5$ Hz, $^3J_{\text{C-P}} = 3,7$ Hz), 58,3, 59,4, 61,7, 69,0, 70,50-71,30 (m, ca. 82C), 71,5, 71,7, 72,4, 73,1, 175,3

RMN ^{31}P (202,6 MHz, D_2O) δ 7,1

IR (ATR, cm^{-1}) ν 2882, 1466, 1342, 1279, 1241, 1146, 1101, 1060, 946

MALDI-TOF m/z calculée pour $\text{C}_{95}\text{H}_{194}\text{N}_2\text{NaO}_{52}\text{P}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 2280,197, trouvée : 2280,221

Synthèse du α -méthyl- ω -(2-((4-((2-(bis((phosphono)méthyl)amino)éthyl)carbamoyle)benzyl)amino)-2-oxoéthoxy)-poly(oxyéthane-1,2-diyl)₍₁₀₀₀₎ (**L7**)



À une solution d'ester **26a** (709 mg, 494 μmol , 1 éq.) dans le dichlorométhane anhydre (3 mL) portée à 0 °C est ajouté sous argon le bromotriméthylsilane (530 μL , 4,02 mmol, 8 éq.). La solution est agitée en revenant lentement à température ambiante pendant 18 h. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite puis le résidu est repris dans le méthanol (10 mL) et la solution est agitée à température ambiante pendant 1 h. Après évaporation sous pression réduite, le résidu obtenu est trituré dans l'éther diéthylique (3 x 10 mL). Le précipité formé est séché sous pression réduite pour conduire au composé **L7** (678 mg, 492 μmol).

Aspect : cire blanche

Rendement : 99%

RMN ^1H (500,13 MHz, D_2O) δ 3,36 (s, 3H), 3,55-3,72 (m, ca. 86H), 3,76 (m, 2H), 3,83 (m, 4H), 4,14 (s, 2H), 4,51 (s, 2H), 7,43 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz), 7,79 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz)

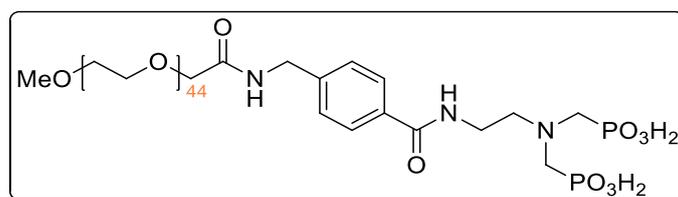
RMN ^{13}C (125,76 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{acetone-}d_6$, 95/5, v/v) δ 36,7, 43,4, 53,0 (dd, 2C, $^1J_{\text{C-P}} = 138,1$ Hz, $^3J_{\text{C-P}} = 2,5$ Hz), 58,5, 59,4, 70,50-71,50 (m, ca. 41C), 71,8, 72,4, 128,8 (2C), 129,1 (2C), 132,9, 143,9, 172,1, 173,8

RMN ^{31}P (202,6 MHz, D_2O) δ 7,2

IR (ATR, cm^{-1}) ν 3323, 2877, 1627, 1549, 1448, 1401, 1343, 1279, 1242, 1201, 1106, 946

MALDI-TOF m/z calculée pour $\text{C}_{57}\text{H}_{111}\text{N}_3\text{O}_{30}\text{P}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1378,664, trouvée : 1378,830

Synthèse du α -méthyl- ω -(2-((4-((2-(bis((phosphono)méthyl)amino)éthyl)carbamoyle)benzyl)amino)-2-oxoéthoxy)-poly(oxyéthane-1,2-diyl)₍₂₀₀₀₎ (**L8**)



À une solution d'ester **26b** (1,22 g, 498 μmol , 1 éq.) dans le dichlorométhane anhydre

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

(5 mL) portée à 0 °C est ajouté sous argon le bromotriméthylsilane (590 µL, 4,02 mmol, 8 éq.). La solution est agitée en revenant lentement à température ambiante pendant 18 h. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite puis le résidu est repris dans le méthanol (10 mL) et la solution est agitée à température ambiante pendant 1 h. Après évaporation sous pression réduite, le résidu obtenu est trituré dans l'éther diéthylique (3 x 10 mL). Le précipité formé est séché sous pression réduite pour conduire au composé **L8** (1,17 mg, 489 µmol).

Aspect : solide marron

Rendement : 98%

RMN ¹H (500,13 MHz, D₂O) δ 3,36 (s, 3H), 3,55-3,75 (m, ca. 184H), 3,76 (m, 2H), 3,83 (m, 4H), 4,14 (s, 2H), 4,51 (s, 2H), 7,42 (d, 2H, J = 8,0 Hz), 7,79 (d, 2H, J = 8,0 Hz)

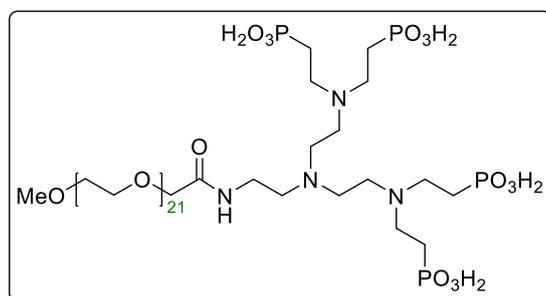
RMN ¹³C (125,76 MHz, D₂O/acetone-*d*₆, 95/5, v/v) δ 36,6, 43,5, 52,8 (d, 2C, ¹J_{C-P} = 136,8 Hz), 58,0, 59,4, 61,8, 69,30-69,90 (m, ca. 85C), 71,9, 72,4, 73,2, 128,8 (2C), 129,2 (2C), 133,1, 143,9, 172,2, 173,9

RMN ³¹P (202,6 MHz, D₂O) δ 7,3

IR (ATR, cm⁻¹) ν 2881, 1680-1610, 1548, 1466, 1342, 1279, 1241, 1145, 1100, 1060, 959

MALDI-TOF *m/z* calculée pour C₁₀₃H₂₀₁N₃NaO₅₃P₂ [M+Na]⁺ : 2413,250, trouvée : 2413,808

Synthèse du α-méthyl-ω-(2-((bis(2-(bis((phosphono)éthyl)amino)éthyl)amino)éthyl)amino-2-oxoéthoxy)-poly(oxyéthane-1,2-diyl)₍₁₀₀₀₎ (**L9**)



À une solution d'ester **27a** (862 mg, 479 µmol, 1 éq.) dans le dichlorométhane anhydre (5 mL) portée à 0 °C est ajouté sous argon le bromotriéthylsilane (1,01 mL, 7,65 mmol, 16 éq.). La solution est agitée en revenant lentement à température ambiante pendant 17 h. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite puis le résidu est repris dans le méthanol (5 mL) et la solution est agitée à température ambiante pendant 1 h 20. Après évaporation sous pression réduite, le résidu obtenu est trituré dans l'éther diéthylique (3 x 10 mL). Le précipité formé est séché sous pression réduite pour conduire au composé **L9** (754 mg, 476 µmol).

Aspect : solide jaunâtre

Rendement : quant.

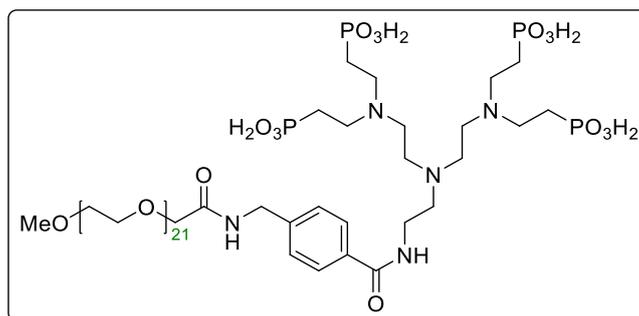
RMN ¹H (500,13 MHz, D₂O) δ 2,10-2,20 (m, 8H), 2,97 (t, 2H, J = 6,6 Hz), 3,25 (t, 4H, J = 6,2 Hz), 3,33 (s, 3H), 3,40-3,55 (m, 14H), 3,58 (m, 2H), 3,60-3,75 (m, ca. 82H), 4,08 (s, 2H)

RMN ¹³C (125,76 MHz, D₂O/acetone-*d*₆, 95/5, v/v) δ 23,3 (d, 4C, ¹J_{C-P} = 133,1 Hz), 35,9, 49,7 (2C), 49,9 (4C), 50,4 (2C), 53,2, 59,4, 70,75-71,10 (m, ca. 41C), 71,7, 72,4, 174,6

RMN ³¹P (202,6 MHz, D₂O) δ 30,3

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

Synthèse du α -méthyl- ω -((2-((4-((bis(2-(bis((phosphono)éthyl)amino)éthyl)amino)éthyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-oxoéthoxy)-poly(oxyéthane-1,2-diyl)₍₁₀₀₀₎ (**L11**)



À une d'ester **28a** (473 mg, 245 μ mol, 1 éq.) dans le dichlorométhane anhydre (5 mL) portée à 0 °C est ajouté sous argon le bromotriéthylsilane (516 μ L, 3,91 mmol, 16 éq.). La solution est agitée en revenant lentement à température ambiante pendant 19 h. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite puis le résidu est repris dans le méthanol (5 mL) et la solution est agitée à température ambiante pendant 1 h. Après évaporation sous pression réduite, le résidu obtenu est trituré dans l'éther diéthylique (2 x 5 mL). Le précipité formé est séché sous pression réduite pour conduire au composé **L11** (410 mg, 240 μ mol).

Aspect : poudre orangée

Rendement : 98%

RMN ¹H (500,13 MHz, D₂O) δ 2,10 (m, 8H), 3,01 (t, 2H, $J = 6,2$ Hz), 3,22 (t, 4H, $J = 6,2$ Hz), 3,36 (s, 3H), 3,37-3,52 (m, 14H), 3,55-3,80 (m, ca. 84H), 4,15 (s, 2H), 4,52 (s, 2H), 7,44 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz), 7,79 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz)

RMN ¹³C (125,76 MHz, D₂O/acétone, 9/1, v/v) δ 23,3 (d, 4C, $^1J_{C-P} = 133,3$ Hz), 37,0, 43,4, 49,8 (4C), 49,9 (2C), 50,4 (2C), 53,7, 59,4, 70,70-71,10 (m, ca. 41C), 71,8, 72,3, 128,9 (2C), 129,0 (2C), 133,0, 143,9, 171,4, 173,8

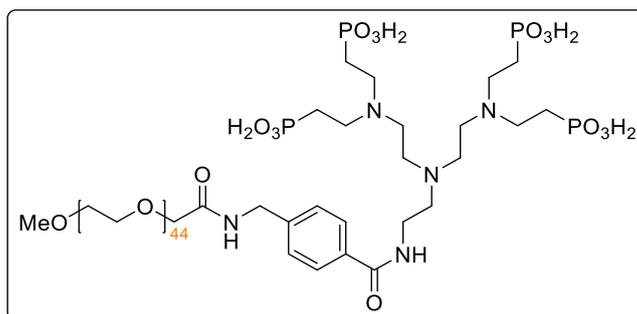
RMN ³¹P (202,6 MHz, D₂O) δ 19,2

IR (ATR, cm⁻¹) ν 3050-2750, 1674, 1530, 1466, 1343, 1240, 1101, 1024, 953

MALDI-TOF m/z calculée pour C₆₇H₁₃₄N₅O₃₆P₄ [M+H]⁺ : 1708,776, trouvée : 1708,514

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

Synthèse du α -méthyl- ω -((2-((4-((bis(2-(bis((phosphono)éthyl)amino)éthyl)amino)éthyl)carbamoyl)benzyl)amino)-2-oxoéthoxy)-poly(oxyéthane-1,2-diyl)₍₂₀₀₀₎ (L12)



À une solution d'ester **28b** (436 mg, 148 μ mol, 1 éq.) dans le dichlorométhane anhydre (5 mL) portée à 0 °C est ajouté sous argon le bromotriméthylsilane (310 μ L, 2,35 mmol, 16 éq.). La solution est agitée en revenant lentement à température ambiante pendant 24 h. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite puis le résidu est repris dans le méthanol (15 mL) et la solution est agitée à température ambiante pendant 1 h. Après évaporation sous pression réduite, le résidu obtenu est trituré dans l'éther diéthylique (3 x 5 mL). Le précipité formé est séché sous pression réduite pour conduire au composé **L12** (404 mg, 146 μ mol).

Aspect : solide blanc cassé

Rendement : quant.

RMN ¹H (500,13 MHz, D₂O) δ 2,11 (m, 8H), 3,03 (t, 2H, $J = 6,4$ Hz), 3,24 (t, 4H, $J = 6,4$ Hz), 3,36 (s, 3H), 3,40-3,52 (m, 12H), 3,54 (m, 2H), 3,56-3,80 (m, ca. 176H), 4,15 (s, 2H), 4,52 (s, 2H), 7,44 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz), 7,79 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz)

RMN ¹³C (125,76 MHz, D₂O/acétone, 9/1, v/v) δ 23,3 (d, 4C, $^1J_{C-P} = 133,0$ Hz), 37,1, 43,4, 49,8 (4C), 49,9 (2C), 50,7 (2C), 53,5, 59,4, 70,50-71,50 (m, ca. 87C), 71,8, 72,3, 128,9 (2C), 129,0 (2C), 133,1, 143,9, 171,5, 173,9

RMN ³¹P (202,6 MHz, D₂O) δ 19,2

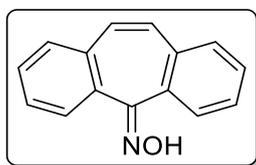
IR (ATR, cm⁻¹) ν 3000-2750, 1644, 1545, 1466, 1359, 1341, 1279, 1241, 1146, 1101, 1060, 946

MALDI-TOF m/z calculée pour C₁₁₃H₂₂₅N₅NaO₅₉P₄ [M+H]⁺ : 2743,361, trouvée : 2743,337

Accès à l'ADIBO-NH₂

Synthèse du 5H-dibenzo[*a,d*]cyclohepten-5-one oxime (**29**)

Ce composé a été obtenu selon le protocole de synthèse décrit par Chadwick, R. C. *et al.*²⁷⁵



À une solution de chlorhydrate d'hydroxylamine (84,2 g, 1,21 mol, 5 éq.) dans l'éthanol absolu (500 mL) sont ajoutés successivement sous argon la pyridine anhydre (130 mL) et la dibenzosubérénone (50,0 g, 242 mmol, 1 éq.). La solution est chauffée à reflux sous agitation pendant 15 h. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans de l'eau déionisée (800 mL) et trituré jusqu'à précipitation. Le précipité est filtré, lavé par de l'eau désionisée (3 x 200 mL) et séché au dessiccateur sous vide une nuit à 40 °C pour conduire au composé **29** (52,9 g, 239 mmol).

Aspect : solide orangé

Rendement : 99%

Point de fusion : 189-191 °C (Litt.²⁸² : 187 °C)

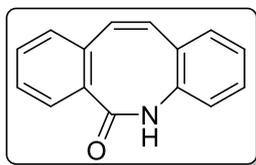
RMN ¹H (200,13 MHz, CDCl₃) δ 6,92 (s, 2H), 7,30-7,50 (m, 6H), 7,55-7,70 (m, 1H), 7,68 (m, 1H), 9,42 (se, 1H)

RMN ¹³C (50,32 MHz, CDCl₃) δ 127,7, 127,8, 128,9, 129,0 (2C), 129,1, 129,2, 129,5, 130,5, 130,6, 130,8, 133,8, 134,6, 135,4, 156,4

ESI-MS m/z calculée pour C₁₅H₁₂NO [M+H]⁺ : 222,09, trouvée : 222,00

Synthèse de la dibenzo[*b,f*]azocine-6(5H)-one (**30**)

Ce composé a été obtenu selon le protocole de synthèse décrit par Chadwick, R. C. *et al.*²⁷⁵



La cétone **29** (33,0 g, 149 mmol) est ajouté par fraction sous argon au réactif d'Eaton (200 mL). Le milieu réactionnel est chauffé à 100 °C sous agitation pendant 1 h. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est versé lentement dans de l'eau déionisée glacée (1 L). Le précipité formé est filtré, lavé successivement avec de l'eau déionisée (3 x 200 mL) et de l'acétate d'éthyle (2 x 200 mL) puis séché au dessiccateur sous vide une nuit à 40 °C pour conduire au composé **30** (29,9 g, 135 mmol).

Aspect : solide orangé

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

Rendement : 91%

Point de fusion : 263-265 °C (Litt.³⁰⁴ : 263-264 °C)

RMN ¹H (200,13 MHz, DMSO-d₆) δ 6,89 et 7,01 (2H, *J* = 11,6 Hz, système AB), 7,10-7,40 (m, 8H), 9,88 (se, 1H)

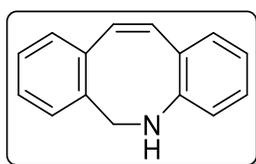
RMN ¹³C (50,32 MHz, DMSO-d₆) δ 126,2, 126,4, 127,4, 127,8 (2C), 128,1, 129,0 (2C), 130,2, 132,7, 133,5, 134,5, 136,2, 136,3, 171,8

IR (ATR, cm⁻¹) ν 3167, 3026, 1640, 1491, 1395, 1380

ESI-MS *m/z* calculée pour C₁₅H₁₂NO [M+H]⁺ : 222,09, trouvée : 222,00

Synthèse du 5,6-dihydrodibenzo[*b,f*]azocine (31)

Ce composé a été obtenu selon le protocole de synthèse décrit par Kuzmin, A. *et al.*²⁷⁶



À une solution de lactame **30** (8,28 g, 37,4 mmol, 1 éq.) dans l'éther diéthylique anhydre (100 mL) est ajoutée sous argon une solution d'aluminohydru de lithium 4 M dans l'éther diéthylique (35 mL, 140 mmol, 3,7 éq.). La solution est agitée à reflux pendant 20 h. Après retour à température ambiante, de l'eau déionisée (40 mL) est ajoutée goutte à goutte au milieu réactionnel jusqu'à la fin de l'évolution de gaz (**attention réaction exothermique**). Le précipité inorganique formé est filtré puis lavé avec de l'éther diéthylique (2 x 150 mL). Le filtrat est séché sur sulfate de magnésium, filtré et évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice éluée par un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (70/30, v/v) pour conduire au composé **31** (6,47 g, 31,2 mmol).

Aspect : solide gris

Rendement : 83%

R_f (SiO₂, cyclohexane/acétate d'éthyle, 70/30, v/v) : 0,86

Point de fusion : 107-109 °C (Litt.³⁰⁴ : 109-109 °C)

RMN ¹H (200,13 MHz, CDCl₃) δ 4,29 (se, 1H), 4,59 (s, 2H), 6,36 (d, 1H, *J* = 13 Hz), 6,47 (d, 1H, *J* = 7,9 Hz), 6,55 (d, 1H, *J* = 13 Hz), 6,60 (t, 1H, *J* = 7,5 Hz), 6,89 (t, 1H, *J* = 7,5 Hz), 6,97 (d, 1H, *J* = 7,5 Hz), 7,23 (m, 4H)

RMN ¹³C (50,32 MHz, CDCl₃) δ 49,5, 117,7, 117,9, 121,7, 127,4 (2C), 127,6, 128,0, 128,9, 130,1, 132,7, 134,7, 138,1, 139,2, 147,1

IR (ATR, cm⁻¹) ν 3400, 3049, 2918, 1597, 1493, 1450, 1333, 1270

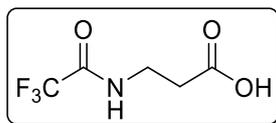
ESI-MS *m/z* calculée pour C₁₅H₁₄N [M+H]⁺ : 208,11, trouvée : 208,02

³⁰⁴ Squibb, E. R. 5-(Substituted amino-lower alkylene)-5,6-dihydrodibenz[*b,f*]azocines. US Patent 3514443, 1970.

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

Synthèse de l'acide 3-(*N*-(trifluoroacétyl)amino)propanoïque (**32**)

Ce composé a été obtenu selon un protocole de synthèse adapté de Clark, J. S. *et al.*²⁷⁷



À une solution de β -alanine (8,91 g, 100 mmol, 1 éq.) dans le méthanol anhydre (45 mL) sont ajoutés successivement sous argon la triéthylamine (13,9 mL, 100 mmol, 1 éq.) et le trifluoroacétate d'éthyle (15,0 mL, 126 mmol, 1,3 éq.). La solution est agitée à température ambiante pendant 20 h. Une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 2 N (170 mL) est alors ajoutée au milieu réactionnel puis le mélange est extrait par de l'éther diéthylique (2 x 150 mL). Les phases organiques sont regroupées, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le précipité est purifié par recristallisation (cyclohexane/éther diéthylique) pour conduire au composé **32** (15,9 g, 85,7 mmol).

Aspect : solide blanc

Rendement : 86%

Point de fusion : 122 °C (Litt.³⁰⁵ : 118-120 °C)

RMN ¹H (200,13 MHz, CD₃OD) δ 2,58 (t, 2H, $J = 6,8$ Hz), 3,53 (t, 2H, $J = 6,8$ Hz)

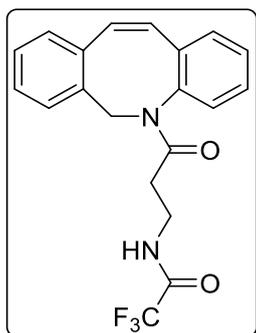
RMN ¹³C (50,32 MHz, CD₃OD) δ 33,8, 36,8, 117,4 (q, $^1J_{C-F} = 286,5$ Hz), 159,0 (q, $^2J_{C-F} = 37,7$ Hz), 174,7

IR (ATR, cm⁻¹) ν 3296, 3110, 2800-3000, 1697, 1562, 1439, 1314, 1292, 1161

ESI-MS m/z calculée pour C₅H₇F₃NO₃ [M+H]⁺ : 186,04, trouvée : 183,95

Synthèse du *N*-(3-(trifluoroacétamido)propanoyl)-5,6-dihydrodibenzo[*b,f*]azocine (**33**)

Ce composé a été obtenu selon un protocole de synthèse adapté de Kuzmin, A. *et al.*²⁷⁶



À une solution d'acide **32** (10,0 g, 54,2 mmol, 1,25 éq.) dans le dichlorométhane anhydre (200 mL) portée à 0 °C sont ajoutés successivement sous argon le chlorure d'oxalyle (23,0 mL, 271 mmol, 6,25 éq.) et quelques gouttes de *N,N*-diméthylformamide anhydre. La solution est

³⁰⁵ Osman, S.; Hoagland, P.; Dooley, C.J. The mass spectra of ω -amino acid derivatives. The role of ω -activation in production of ions upon electron-impact. *Org. Mass Spectrom.* **1973**, 7(9):1083-1090.

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

agitée à 0 °C pendant 2 h, puis après retour à température ambiante pendant 2 h supplémentaires. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite et le résidu est repris sous argon dans le dichlorométhane anhydre (100 mL). Cette solution est alors ajoutée lentement sous argon à une solution d'amine **31** (9,00 g, 43,4 mmol, 1 éq.) dans un mélange de pyridine anhydre (10,5 mL) et de dichlorométhane anhydre (120 mL). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 1 h. La solution est lavée par de l'eau déionisée (2 x 120 mL) et la phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice éluée par un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (50/50, v/v) pour conduire au composé **33** (12,2 g, 32,7 mmol).

Aspect : solide blanchâtre

Rendement : 75%

R_f (SiO₂, cyclohexane/acétate d'éthyle, 50/50, v/v) : 0,58

Point de fusion : 110-112 °C

RMN ¹H (200,13 MHz, CDCl₃) δ 2,04 (m, 1H), 2,28 (m, 1H), 3,48 (m, 2H), 4,29 (d, 1H, J = 15,2 Hz), 5,53 (d, 1H, J = 15,2 Hz), 6,56 (d, 1H, J = 12,9 Hz), 6,78 (d, 1H, J = 12,9 Hz), 7,00-7,50 (m, 7H), 7,53 (se, 1H)

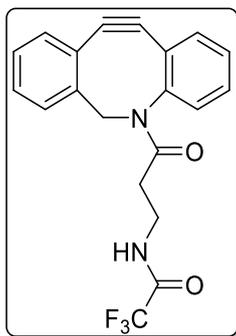
RMN ¹³C (50,32 MHz, CDCl₃) δ 33,2, 35,4, 54,1, 115,7 (q, ¹J_{C-F} = 287,8 Hz), 126,7, 126,9, 127,2, 127,6, 128,3, 128,6, 129,7, 130,7, 132,0, 132,5, 133,9, 135,2, 136,0, 139,6, 156,7 (q, ²J_{C-F} = 36,7 Hz), 170,6

IR (ATR, cm⁻¹) ν 3253, 3104, 2929, 1717, 1693, 1663, 1567, 1497, 1439, 1410, 1316, 1200-1100

ESI-MS m/z calculée pour C₂₀H₁₈F₃N₂O₂ [M+H]⁺ : 375,13, trouvée : 375,08

Synthèse du *N*-(3-(trifluoroacétamido)propanoyl)-5,6-dihydro-11,12-didéhydrodibenzo [*b,f*]azocine (**34**)

Ce composé a été obtenu selon un protocole de synthèse adapté de Chadwick, R. C. *et al.*²⁷⁵



À une solution de cyclooctène **33** (2,00 g, 5,34 mmol, 1 éq.) dans le dichlorométhane anhydre (80 mL) portée à 0 °C est ajouté sous argon le dibrome (0,83 mL, 16,2 mmol, 3 éq.). La solution est agitée à 0 °C pendant 2 h. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est lavé successivement par une solution aqueuse de bisulfite de sodium à 5% (3 x 25 mL) puis de l'eau déionisée (25 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

magnésium, filtrée et évaporée sous pression réduite (température du bain pour l'évaporation < 35 °C). Le résidu est repris sous argon dans le tétrahydrofurane anhydre (60 mL) et porté à -40 °C. Une solution de *tert*-butylate de potassium dans le tétrahydrofurane anhydre 1 M (13,4 mL, 13,4 mmol, 2,5 éq.) est ajoutée lentement au milieu réactionnel. La solution est alors portée lentement à 0 °C sur une période de 5 h. Le suivi RMN ¹H n'indiquant plus d'avancement de la réaction, une solution de *tert*-butylate de potassium dans le tétrahydrofurane anhydre 1 M (2,70 mL, 2,70 mmol, 0,5 éq.) est de nouveau ajoutée sous argon au milieu réactionnel puis la solution est agitée à 0 °C pendant 45 min. Après retour à température ambiante, la solution est diluée par de l'acétate d'éthyle (80 mL) et lavée successivement par une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 5% (80 mL) et de l'eau déionisée (2 x 60 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice éluée par un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (70/30, v/v) pour conduire au composé **34** (1,80 g, 4,83 mmol).

Aspect : solide ocre

Rendement : 90%

R_f (SiO₂, cyclohexane/acétate d'éthyle, 70/30, v/v) : 0,21

Point de fusion : 177-179 °C

RMN ¹H (200,13 MHz, CDCl₃) δ 2,03 (ddd, 1H, *J* = 17,0, 6,8, 3,4 Hz), 2,58 (ddd, 1H, *J* = 17,0, 8,3, 4,0 Hz), 3,34 (m, 1H), 3,54 (m, 1H), 3,78 (d, 1H, *J* = 13,9 Hz), 5,19 (d, 1H, *J* = 13,9 Hz), 7,20-7,50 (m, 7H), 7,72 (d, 1H, *J* = 6,9 Hz)

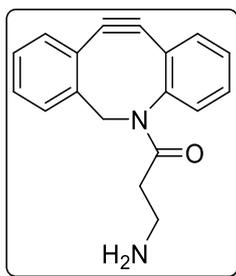
RMN ¹³C (50,32 MHz, CDCl₃) δ 34,0, 35,7, 55,7, 107,4, 115,1, 115,8 (q, ¹J_{C-F} = 287,7 Hz), 122,8, 122,9, 125,8, 127,4, 128,0, 128,5, 128,7, 128,8, 129,0, 132,1, 147,8, 150,7, 157,0 (q, ²J_{C-F} = 37 Hz), 171,7

IR (ATR, cm⁻¹) ν 3270, 3087, 3000-2800, 1717, 1634, 1557, 1435, 1408, 1207, 1174, 1160-1100

ESI-MS *m/z* calculée pour C₂₀H₁₆F₃N₂O₂ [M+H]⁺ : 373,12, trouvée : 373,06

Synthèse du *N*-(3-aminopropionyl)-5,6-dihydro-11,12-didéhydrodibenzo[*b,f*]azocine (**35**)

Ce composé a été obtenu selon un protocole de synthèse adapté de Kuzmin, A. *et al.*²⁷⁶



À une solution de trifluoroacétamide **34** (1,89 g, 5,07 mmol, 1 éq.) dans le méthanol (28 mL) est ajoutée une solution de carbonate de potassium (1,40 g, 10,1 mmol, 2 éq.) dans l'eau déionisée (14 mL). La solution est agitée à température ambiante pendant 24 h. De l'eau

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

déionisée est ajoutée au milieu réactionnel (9 mL) avant d'être extrait par du dichlorométhane (3 x 80 mL). Les phases organiques sont regroupées, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice éluee par un mélange dichlorométhane/éthanol/ammoniaque (90/10/1, v/v/v) pour conduire au composé **35** (1,28 g, 4,63 mmol).

Aspect : solide beige

Rendement : 91%

Point de fusion : 103-105 °C

R_f (SiO₂, dichlorométhane/éthanol/ammoniaque, 90/10/1, v/v/v) : 0,17

RMN ¹H (200,13 MHz, CDCl₃) δ 1,29 (se, 2H), 1,96 (dt, 1H, J = 15,8, 6,2 Hz), 2,41 (dt, 1H, J = 15,8, 6,2 Hz), 2,73 (t, 2H, J = 6,7 Hz), 3,66 (d, 1H, J = 13,8 Hz), 5,16 (d, 1H, J = 13,8 Hz), 7,20-7,50 (m, 7H), 7,69 (d, 1H, J = 7,4 Hz)

RMN ¹³C (50,32 MHz, CDCl₃) δ 38,2, 38,4, 55,3, 107,8, 115,0, 122,6, 122,9, 125,5, 127,1, 127,7, 128,1, 128,3, 128,4, 129,2, 132,2, 148,1, 151,6, 172,2

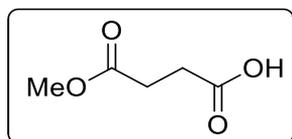
IR (ATR, cm⁻¹) ν 3000-2800, 1651, 1479, 1429, 1396, 1280, 1255

ESI-MS m/z calculée pour C₁₈H₁₆N₂O [M+H]⁺ : 277,13, trouvée : 277,14

Accès à l'ADIBO-CO₂H

Synthèse de l'acide 4-méthoxy-4-oxobutanoïque (**36**)

Ce composé a été obtenu selon le protocole de synthèse décrit par von Wantoch Rekowski, M. *et al.*²⁷⁸



À une solution d'anhydride succinique (10,0 g, 100 mmol, 1 éq.) dans le méthanol anhydre (150 mL) est ajouté sous argon le méthylate de sodium (54 mg, 1 mmol, 1 éq.). La solution est agitée à reflux pendant 1 h 30. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite pour conduire au composé **36** (13,11 g, 99,2 mmol) engagé dans l'étape réactionnelle suivante sans purification.

Aspect : solide blanc

Point de fusion : 57 °C (Litt.²⁷⁸ : 58-59 °C)

Rendement : 99%

RMN ¹H (200,13 MHz, CDCl₃) δ 2,65 (m, 4H), 3,68 (s, 3H), 10,90 (se, 1H)

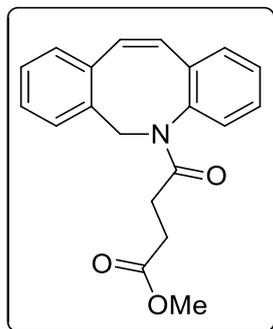
RMN ¹³C (50,32 MHz, CDCl₃) δ 28,7, 29,0, 52,1, 172,8, 178,5

IR (ATR, cm⁻¹) ν 3300-2700, 2700-2300, 1727, 1687, 1440, 1417, 1366, 1344, 1254, 1232, 1198, 1173

ESI-MS m/z calculée pour C₅H₇O₄ [M-H]⁻ : 131,03, trouvée : 131,02

Synthèse du 4-(dibenzo[*b,f*]azocin-5(6*H*)-yl)-4-oxobutanoate de méthyle (**37**)

Ce composé a été obtenu selon le protocole de synthèse décrit par Hubbard, T. A. *et al.*²⁷⁹



À une solution d'acide **36** (2,39 g, 18,1 mmol, 1 éq.) dans le dichlorométhane anhydre (10 mL) sont ajoutés successivement sous argon le *N,N*-diméthylformamide (30 μ L) et le chlorure d'oxalyle (1,94 mL, 22,6 mmol, 1,25 éq.). La solution est agitée à température ambiante pendant 3 h jusqu'à la fin de l'évolution de gaz. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite et le résidu est repris sous argon par le dichlorométhane anhydre (20 mL). À cette solution portée à 0 °C est ajoutée une solution d'amine **31** (2,50 g, 12,1 mmol, 0,67 éq.) et de triéthylamine (3,4 mL, 24,4 mmol, 1,35 éq.) dans le dichlorométhane (80 mL). Après retour à température ambiante, la solution est agitée pendant 2 h puis le milieu réactionnel est lavé successivement par une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium 2 N (3 x 40 mL), une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 2 N (3 x 40 mL) et une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (90 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié sur colonne de silice éluée par un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (70/30, v/v) pour conduire au composé **37** (2,96 g, 9,21 mmol).

Aspect : solide blanc cassé

Point de fusion : 112-113 °C (Litt.²⁸² : 108 °C)

Rendement : 76%

R_f (SiO₂, cyclohexane/acétate d'éthyle, 70/30, v/v) : 0,40

RMN ¹H (200,13 MHz, CDCl₃) δ 1,90-2,10 (m, 1H), 2,35-2,70 (m, 3H), 3,62 (s, 3H), 4,25 (d, 1H, $J = 15,0$ Hz), 5,51 (d, 1H, $J = 15,0$ Hz), 6,61 (d, 1H, $J = 13,0$ Hz), 6,79 (d, 1H, $J = 13,0$ Hz), 7,14 (m, 3H), 7,26 (m, 5H)

RMN ¹³C (50,32 MHz, CDCl₃) δ 29,2, 29,7, 51,8, 54,6, 127,1, 127,4 (2C), 128,2, 128,4, 128,7, 130,3, 131,0, 132,0, 132,8, 134,7, 136,0, 136,6, 140,6, 171,0, 173,6

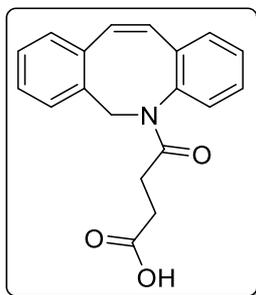
IR (ATR, cm⁻¹) ν 1733, 1645, 1490, 1393, 1362, 1230, 1211, 1162

ESI-MS m/z calculée pour C₂₀H₁₉NO₃Na [M+Na]⁺ : 344,13, trouvée : 344,13

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

Synthèse de l'acide 4-(dibenzo[b,f]azocin-5(6H)-yl)-4-oxobutanoïque (**38**)

Ce composé a été obtenu selon le protocole de synthèse décrit par Chadwick, R. C. *et al.*²⁷⁵



À une solution d'ester **37** (2,50 g, 7,78 mmol, 1 éq.) dans le méthanol (50 mL) est ajoutée une solution d'hydroxyde de lithium (1,12 g, 46,8 mmol, 6 éq.) dans l'eau déionisée (25 mL). La solution est agitée à reflux pendant 18 h. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est dilué par une solution aqueuse d'hydrogénosulfate de sodium 1 M (50 mL) puis extrait par du dichlorométhane (3 x 50 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées puis évaporées sous pression réduite. Le résidu est trituré dans l'éther diéthylique anhydre (20 mL) puis filtré pour conduire au composé **38** (2,07 g, 6,74 mmol). Le produit est engagé dans l'étape réactionnelle suivante sans purification.

Aspect : solide blanc

Point de fusion : 133-134 °C

Rendement : 87%

RMN ¹H (200,13 MHz, CDCl₃) δ 1,90-2,10 (m, 1H), 2,30-2,80 (m, 3H), 4,28 (d, 1H, *J* = 15,0 Hz), 5,52 (d, 1H, *J* = 15,0 Hz), 6,61 (d, 1H, *J* = 12,8 Hz), 6,80 (d, 1H, *J* = 12,8 Hz), 7,10-7,30 (m, 8H), 9,55 (se, 1H)

RMN ¹³C (50,32 MHz, CDCl₃) δ 29,6 (2C), 54,7, 127,2, 127,4 (2C), 128,2, 128,4, 128,8, 130,2, 130,9, 131,9, 132,9, 134,3, 135,9, 136,6, 140,3, 171,6, 177,6

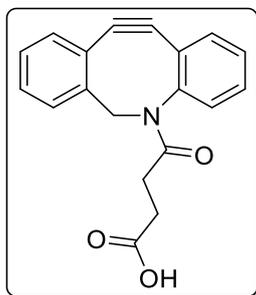
IR (ATR, cm⁻¹) ν 3100-2800, 1695, 1646, 1392, 1256, 1231

ESI-MS *m/z* calculée pour C₁₉H₁₇NO₃Na [M+Na]⁺ : 330,11, trouvée : 330,13

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

Synthèse de l'acide 5-(11,12-didéhydrodibenzo[*b,f*]azocin-5(6*H*)-yl)-4-oxobutanoïque (**39**)

Ce composé a été obtenu selon le protocole de synthèse décrit par Chadwick, R. C. *et al.*²⁷⁵



À une solution de cyclooctène **38** (1,80 g, 5,86 mmol, 1 éq.) dans le dichlorométhane anhydre (80 mL) portée à 0 °C est ajouté sous argon le dibrome (900 µL, 17,6 mmol, 3 éq.). La solution est agitée à 0 °C pendant 2 h. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est dilué par du dichlorométhane (100 mL) puis lavé successivement par une solution aqueuse saturée de bisulfite de sodium (3 x 100 mL), de l'eau déionisée (100 mL) et une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (100 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous pression réduite (température du bain pour l'évaporation < 35 °C). Le résidu est repris sous argon dans le tétrahydrofurane anhydre (100 mL). Le milieu réactionnel est porté à -40 °C avant ajout goutte à goutte d'une solution de *tert*-butylate de potassium dans le tétrahydrofurane anhydre 1 M (21,0 mL, 21,0 mmol, 3,6 éq.). La solution est agitée à -40 °C pendant 1 h 30. Le suivi RMN ¹H indiquant la consommation totale du dérivé dibromé intermédiaire, le milieu réactionnel est porté à température ambiante et le pH ajusté à 1 par addition d'une solution aqueuse d'hydrogénéosulfate de sodium 1 M (ca. 25 mL). La solution est extraite par du dichlorométhane (3 x 100 mL), les phases organiques sont réunies, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le résidu obtenu est trituré dans un petit volume d'éther diéthylique anhydre puis le précipité formé est filtré pour conduire au composé **39** (1,58 g, 5,17 mmol).

Aspect : solide blanc cassé

Point de fusion : 172-174 °C (Litt.²⁷⁵ : 170 °C)

Rendement : 88%

RMN ¹H (200,13 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,76 (m, 1H), 2,27 (m, 2H), 2,57 (m, 1H), 3,61 (d, 1H, *J* = 13,9 Hz), 5,03 (d, 1H, *J* = 13,9 Hz), 7,20-7,70 (m, 8H), 12,03 (se, 1H)

RMN ¹³C (50,32 MHz, DMSO-*d*₆) δ 29,0, 29,3, 55,0, 108,1, 114,3, 121,6, 122,6, 125,2, 126,9, 127,7, 128,1, 128,2, 129,0, 129,7, 132,4, 148,5, 151,5, 170,8, 173,6

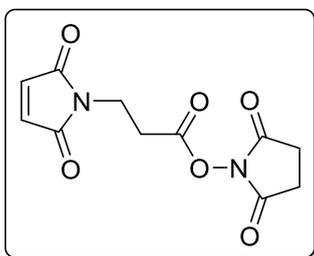
IR (ATR, cm⁻¹) ν 3100-2800, 1704, 1650, 1429, 1395, 1321, 1203

ESI-MS *m/z* calculée pour C₁₉H₁₅NO₃Na [M+Na]⁺ : 328,10, trouvée : 328,16

Accès à l'ADIBO-maléimide

Synthèse du 3-maléimidopropanoate de *N*-succinimidyle (40)

Ce composé a été obtenu selon le protocole de synthèse décrit par Magano, J. *et al.*²⁸⁰



À une solution d'anhydride maléique (4,30 g, 43,9 mmol, 1 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (50 mL) est ajoutée sous argon la β -alanine (3,91 g, 43,9 mmol, 1 éq.). La solution est chauffée à 70 °C pendant 2 h. Après retour à température ambiante, sont ajoutés à 0 °C le *N*-hydroxysuccinimide (6,31 g, 54,8 mmol, 1,25 éq.) puis, par fraction et sur 30 min, le dicyclohexylcarbodiimide (18,1 g, 87,7 mmol, 2 éq.). Après retour à température ambiante, la solution est agitée pendant 18 h. Le solide formé est filtré et rincé successivement par de l'eau déionisée (50 mL) et du dichlorométhane (50 mL). Le filtrat est décanté et la phase aqueuse est extraite par du dichlorométhane (2 x 20 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées successivement par de l'eau déionisée et une solution aqueuse saturée de bicarbonate de sodium (2 x 20 mL), séchées sur sulfate de magnésium, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le résidu est repris par de l'éthanol (30 mL) et agité à température ambiante pendant 2 h. Le solide formé est filtré, lavé avec de l'éthanol (2 x 15 mL) et séché au dessiccateur sous vide une nuit à 30 °C pour conduire au composé **40** (5,84 g, 21,9 mmol).

Aspect : solide blanc cassé

Rendement : 50%

Point de fusion : 162-164 °C (Litt.³⁰⁶ : 158-161 °C)

RMN ¹H (200,13 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2,79 (s, 4H), 3,04 (t, 2H, *J* = 6,7 Hz), 3,74 (t, 2H, *J* = 6,7 Hz), 7,04 (s, 2H)

RMN ¹³C (50,32 MHz, DMSO-*d*₆) δ 25,5 (2C), 29,1, 32,7, 134,7 (2C), 166,8, 170,1 et 170,6 (4C)

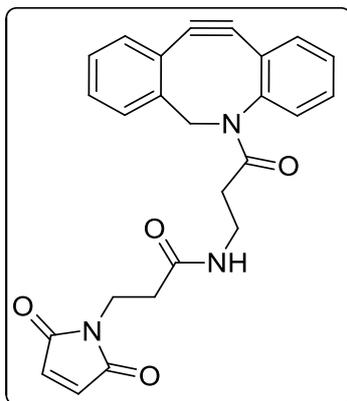
IR (ATR, cm⁻¹) ν 1698, 1380, 1209, 1149, 1068

HRMS *m/z* calculée pour C₁₁H₁₁N₂O₆ [M+H]⁺ : 267,0612, trouvée : 267,0612

³⁰⁶ Paterson, M. J.; Eggleton, I. M. Convenient preparation of *N*-maleoyl amino acid succinimido esters using *N*-trifluoroacetoxysuccinimide. *Synth. Commun.* **2008**, 38(2):303-308.

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

Synthèse du *N*-(3-(11,12-didéhydrodibenzo[*b,f*]azocin-5(6*H*)-yl)-3-oxopropyl)-3-maléimido propanamide (**41**)



À une solution d'amine **35** (298 mg, 1,08 mmol, 1 éq.) dans l'acétonitrile anhydre (10 mL) sont ajoutés successivement sous argon l'ester activé **40** (431 mg, 1,62 mmol, 1,5 éq.) et la *N,N*-diisopropyléthylamine (280 μ L, 1,6 mmol, 1,5 éq.). La solution est agitée à température ambiante pendant 1 h 30. Le milieu réactionnel est ensuite évaporé sous pression réduite et le résidu est purifié sur colonne d'alumine éluée par un mélange dichlorométhane/éthanol (98/2, v/v) pour conduire au composé **41** (280 mg, 655 μ mol).

Aspect : solide blanc

Rendement : 61%

Point de fusion : 79-81 °C

R_f (Al_2O_3 , dichlorométhane/éthanol, 98/2, v/v) : 0,43

RMN 1H ($CDCl_3$, 500,13 MHz) δ 1,92 (ddd, 1H, $J = 16,8, 7,2, 3,6$ Hz), 2,32 (m, 2H), 2,47 (ddd, 1H, $J = 16,7, 8,0, 3,8$ Hz), 3,16 (m, 1H), 3,34 (m, 1H), 3,70 (d, 1H, $J = 13,9$ Hz), 3,74 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz), 5,12 (d, 1H, $J = 13,9$ Hz), 6,08 (m, 1H), 6,66 (s, 2H), 7,27 (dd, 1H, $J = 7,5, 1,2$ Hz), 7,31 (t, 1H, $J = 7,4$ Hz), 7,34-7,43 (m, 5H), 7,66 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz)
RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 125,76 MHz) δ 34,4, 34,7, 34,8, 35,4, 55,7, 107,9, 114,9, 122,7, 123,1, 125,8, 127,4, 128,0, 128,5, 128,6, 128,8, 129,3, 132,2, 134,3 (2C), 148,1, 151,2, 169,5 (2C), 170,5, 172,4

IR (ATR, cm^{-1}) ν 3400-3150, 2923, 1703, 1645, 1445, 1404, 1230, 1205

HRMS m/z calculé pour $C_{25}H_{22}N_3O_4$ $[M+H]^+$: 428,1605, trouvé: 428,1609

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (20/80, v/v) pour conduire au composé **43** (24,1 g, 50,6 mmol).

Aspect : huile incolore

Rendement : 92%

R_f (SiO₂, cyclohexane/acétate d'éthyle, 20/80, v/v) : 0,60

RMN ¹H (200,13 MHz, CDCl₃) δ 1,40 (s, 9H), 2,41 (s, 3H), 2,45 (t, 2H, J = 6,5 Hz), 3,50-3,60 (m 14H), 3,66 (t, 2H, J = 6,5 Hz), 4,12 (t, 2H, J = 4,7 Hz), 7,30 (d, 2H, J = 8,3 Hz), 7,75 (d, 2H, J = 8,3 Hz)

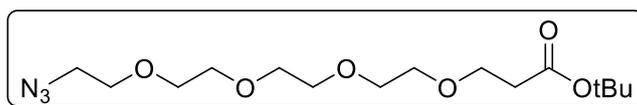
RMN ¹³C (50,32 MHz, CDCl₃) δ 21,5, 27,9 (3C), 36,1, 66,7, 68,4, 69,2, 70,2, 70,3 (2C), 70,4 (2C), 70,5, 80,2, 127,8 (2C), 129,7 (2C), 132,8, 144,7, 170,7

IR (ATR, cm⁻¹) ν 3050-2850, 1732, 1352, 1174, 1095, 917

HRMS *m/z* calculée pour C₂₂H₃₆O₉S [M+Na]⁺ : 499,1972, trouvée : 499,1971

Synthèse du 1-azido-3,6,9,12-tétraoxapentadécan-15-oate de *tert*-butyle (**44**)

Ce composé a été obtenu selon un protocole de synthèse adapté de Zhao, R. Y. *et al.*³⁰⁷



À une solution de tosylate **43** (35,2 g, 73,9 mmol, 1 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (110 mL) est ajouté sous argon l'azoture de sodium (16,8 g, 259 mmol, 3,5 éq.). La solution est agitée à température ambiante pendant 24 h puis à 55 °C pendant 1 h 30. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est dilué par ajout d'eau déionisée (650 mL) puis extrait par de l'acétate d'éthyle (3 x 250 mL). Les phases organiques sont réunies et lavées par de l'eau déionisée (3 x 250 mL) puis par une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (300 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous pression réduite pour conduire au composé **44** (25,5 g, 73,5 mmol).

Aspect : huile jaune pâle

Rendement : 99%

R_f (SiO₂, acétate d'éthyle) : 0,83

RMN ¹H (200,13 MHz, CDCl₃) δ 1,38 (s, 9H), 2,43 (t 2H, J = 6,5 Hz), 3,33 (t, 2H, J = 5,0 Hz), 3,50-3,75 (m, 16H)

RMN ¹³C (50,32 MHz, CDCl₃) δ 28,0 (3C), 36,2, 50,6, 66,8, 70,0, 70,3, 70,4, 70,6 (4C), 80,4, 170,8

IR (ATR, cm⁻¹) ν :2950-2800, 2101, 1727, 1366, 1281, 1253, 1106

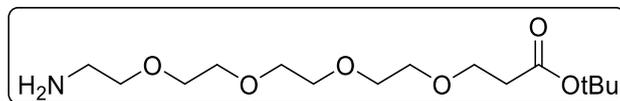
³⁰⁷ Zhao, R. Y.; Yang, Q.; Huang, Y.; Gai, S.; Ye, H.; Yang, C.; Guo, H.; Zhou, X.; Xie, H.; Tong, Q.; Cao, M.; Zhao, L.; Jia, J.; Li, W.; Zuo, X.; Lin, C.; Xu, Y.; Guo, Z. Derivatives of amanita toxins and their conjugation to a cell binding molecule. WO2017046658, **2017**.

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

ESI-MS m/z calculée pour $C_{15}H_{29}N_3NaO_6$ $[M+Na]^+$: 370,20, trouvée : 370,21

Synthèse du 1-amino-3,6,9,12-tétraoxapentadécan-15-oate de *tert*-butyle (45)

Ce composé a été obtenu selon un protocole de synthèse adapté de Zhao, R.Y. *et al.*³⁰⁷



À une solution d'azoture **44** (532 mg, 1,53 mmol, 1 éq.) dans l'éther diéthylique (5 mL) sont ajoutées successivement de l'eau déionisée (30 μ L, 1,67 mmol, 1,1 éq.) puis de la triphénylphosphine (410 mg, 1,56 mmol, 1,1 éq.). La solution est agitée à température ambiante pendant 13 h. Le milieu réactionnel est filtré, le solide rincé par de l'éther diéthylique (2 x 5 mL) puis le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu est purifié sur colonne d'alumine éluée par un mélange dichlorométhane/éthanol/ammoniaque (90/10/0,5, v/v/v) pour conduire au composé **45** (390 mg, 1,21 mmol).

Aspect : huile incolore

Rendement : 79%

R_f (SiO_2 , dichlorométhane/éthanol/ammoniaque, 90/10/0,5) : 0,67

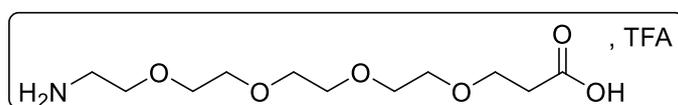
RMN 1H (200,13 MHz, $CDCl_3$) δ 1,43 (s, 9H), 1,70 (se, 2H), 2,49 (t, 2H, $J = 6,6$ Hz), 2,85 (t, 2H, $J = 5,2$ Hz), 3,50 (t, 2H, $J = 5,2$ Hz), 3,55-3,60 (m, 12H), 3,69 (t, 2H, $J = 6,6$ Hz)

RMN ^{13}C (50,32 MHz, $CDCl_3$) δ 28,0 (3C), 36,1, 41,5, 66,7, 70,1, 70,2, 70,4 (4C), 73,0, 80,4, 170,8

IR (ATR, cm^{-1}) ν 2868, 1727, 1366, 1251, 1104

HRMS m/z calculée pour $C_{15}H_{32}NO_6$ $[M+H]^+$: 322,2224, trouvée : 322,2212

Synthèse du trifluoroacétate de l'acide 1-amino-3,6,9,12-tétraoxapentadécan-15-oïque (46.TFA)



À une solution d'amine **45** (181 mg, 563 μ mol) dans le dichlorométhane anhydre (1 mL) portée à 0 °C sont ajoutés successivement sous argon l'anisole (170 μ L) et l'acide trifluoroacétique (500 μ L). Après retour à température ambiante, la solution est agitée pendant 24 h. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite puis le résidu est coévaporé par du dichlorométhane (2 x 5 mL) pour conduire au composé **46.TFA** (213 mg, 562 μ mol).

Aspect : huile jaune

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

Rendement : 99%

RMN ^1H (200,13 MHz, CDCl_3) δ 2,57 (t, 2H, $J = 5,3$ Hz), 3,19 (m, 2H), 3,45-3,85 (m, 16H), 7,30-7,65 (m, 3H), 11,03 (se, 1H)

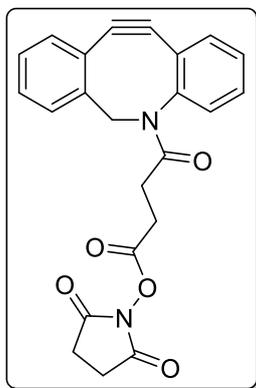
RMN ^{13}C (125,76 MHz, CDCl_3) δ 34,7, 40,1, 66,9, 67,0, 69,9, 70,0, 70,1 (2C), 70,2, 70,3, 115,8 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 288,8$ Hz), 161,0 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 38,4$ Hz), 175,2

IR (ATR, cm^{-1}) ν 3300-3000, 3000-2700, 1723, 1668, 1250-950

HRMS m/z calculée pour $\text{C}_{11}\text{H}_{24}\text{NO}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 266,1598, trouvée : 266,1600

Synthèse du 4-(11,12-didéhydrodibenzo[*b,f*]azocin-5(6*H*)-yl)-4-oxobutanoate de succinimidyle (47)

Ce composé a été obtenu selon le protocole de synthèse décrit par Campbell-Verduyn, L. S. *et al.*²⁸²



À une solution d'acide **39** (1,00 g, 3,28 mmol, 1 éq.) dans le dichlorométhane anhydre (50 mL) sont ajoutés successivement sous argon le *N*-hydroxysuccinimide (565 mg, 4,91 mmol, 1,5 éq.) et le chlorhydrate de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (942 mg, 4,91 mmol, 1,5 éq.). La solution est agitée à température ambiante pendant 3 h 30. Le milieu réactionnel est lavé successivement par une solution aqueuse d'acide citrique à 5% (2 x 50 mL), une solution aqueuse de bicarbonate de sodium à 5% (2 x 50 mL) et une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (50 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié sur colonne de silice éluée par un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (50/50, v/v) pour conduire au composé **47** (1,22 g, 3,03 mmol).

Aspect : solide blanc cassé

Rendement : 93%

Point de fusion : 162-164 °C

R_f (SiO_2 , cyclohexane/acétate d'éthyle, 50/50, v/v) : 0,32

RMN ^1H (200,13 MHz, CDCl_3) δ 2,08 (m, 1H), 2,55-3,10 (m, 7H), 3,68 (d, 1H, $J = 13,8$ Hz), 5,18 (d, 1H, $J = 13,8$ Hz), 7,20-7,50 (m, 7H), 7,69 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz)

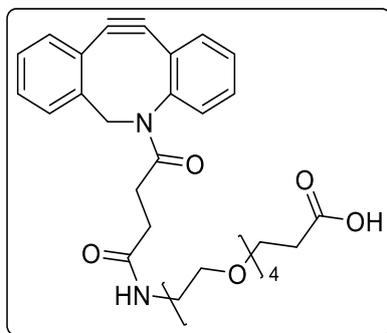
RMN ^{13}C (50,32 MHz, CDCl_3) δ 25,6 (2C), 26,5, 29,3, 55,7, 107,7, 115,1, 122,8, 123,1, 125,6, 127,3, 127,9, 128,5 (2C), 128,7, 129,2, 132,4, 147,9, 151,1, 168,4, 169,0 (2C), 170,4

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

IR (ATR, cm^{-1}) ν 1734, 1656, 1204, 1069

ESI-MS m/z calculée pour $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{NaO}_5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 425,11, trouvée: 425,09

Synthèse de l'acide 20-(11,12-didéhydrodibenzo[*b,f*]azocin-5(6*H*)-yl)-17,20-dioxo-4,7,10,13-tétraoxa-16-azaicosan-1-oïque (**48**)



À une solution d'acide amino **46.TFA** (1,24 g, 3,27 mmol, 1 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (20 mL) sont ajoutés successivement sous argon la *N,N*-diisopropyléthylamine (1,67 mL, 9,82 mmol, 3 éq.) et l'ester activé **47** (1,10 g, 2,73 mmol, 0,8 éq.). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 24 h. Une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 1 N (100 mL) est alors ajoutée puis le milieu est extrait par du dichlorométhane (3 x 100 mL). Les phases organiques sont réunies et lavées par une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (3 x 100 mL), séchées sur sulfate de magnésium, filtrées puis évaporées sous pression réduite. Le résidu est purifié sur colonne de silice éluée par un mélange acétate d'éthyle/éthanol (90/10, v/v) pour conduire au composé **48** (1,35 g, 2,44 mmol).

Aspect : huile incolore

Rendement : 89%

R_f (SiO_2 , acétate d'éthyle/éthanol, 90/10, v/v) : 0,14

RMN ^1H (200,13 MHz, CDCl_3) δ 1,97 (td, 1H, $J = 16,5, 6,1$ Hz), 2,19 (td, 1H, $J = 15,1, 6,1$ Hz), 2,45 (m, 1H), 2,55 (t, 2H, $J = 6,1$ Hz), 2,84 (m, 1H), 3,35 (m, 2H), 3,48 (m, 2H), 3,55-3,80 (m, 15H), 5,15 (d, 1H, $J = 13,8$ Hz), 6,73 (m, 1H), 7,20-7,45 (m, 6H), 7,54 (m, 1H), 7,66 (m, 1H)

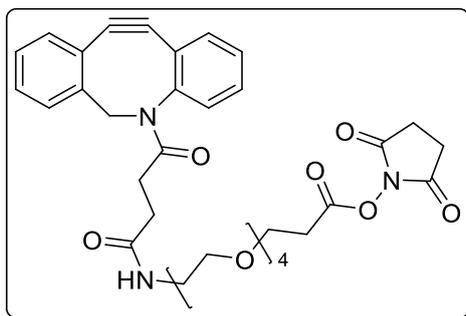
RMN ^{13}C (50,32 MHz, CDCl_3) δ 30,2, 31,1, 34,9, 39,3, 55,6, 66,6, 69,9, 70,2, 70,3, 70,4 (2C), 70,6 (2C), 107,9, 114,7, 122,4, 123,2, 125,5, 127,1, 127,8, 128,2, 128,3, 128,8, 129,4, 132,3, 148,0, 151,3, 172,5, 172,8, 174,1

IR (ATR, cm^{-1}) ν 3400-3200, 3000-2700, 1729, 1652, 1435, 1397, 1253, 1184, 1094

HRMS m/z calculée pour $\text{C}_{30}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 553,2544, trouvée : 553,2544

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

Synthèse du 20-(11,12-didéhydrodibenzo[*b,f*]azocin-5(6*H*)-yl)-17,20-dioxo-4,7,10,13-tétraoxa-16-azaicosan-1-oate de succinimidyle (**49**)



À une solution d'acide **48** (1,35 g, 2,44 mmol, 1 éq.) dans le dichlorométhane anhydre (50 mL) sont ajoutés successivement sous argon le *N*-hydroxysuccinimide (422 mg, 3,67 mmol, 1,5 éq.) et le chlorhydrate de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (702 mg, 3,66 mmol, 1,5 éq.). La solution est agitée à température ambiante pendant 22 h. Le milieu réactionnel est lavé successivement par une solution aqueuse d'acide citrique à 5% (2 x 25 mL), une solution aqueuse d'hydrogénocarbonate de sodium à 5% (2 x 25 mL) et une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (2 x 25 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée sous pression réduite pour conduire au composé **49** (1,57 g, 2,31 mmol).

Aspect : huile jaune

Rendement : 99%

RMN ¹H (200,13 MHz, CDCl₃) δ 1,93 (td, 1H, *J* = 16,3, 6,1 Hz), 2,16 (td, 1H, *J* = 15,1, 6,2 Hz), 2,46 (m, 1H), 2,81 (s, 4H), 2,85 (m, 3H), 3,34 (m, 2H), 3,46 (m, 2H), 3,55-3,75 (m, 13H), 3,82 (t, 2H, *J* = 6,3 Hz), 5,15 (d, 1H, *J* = 13,8 Hz), 6,26 (t, 1H, *J* = 5,2 Hz), 7,20-7,48 (m, 6H), 7,53 (m, 1H), 7,67 (d, 1H, *J* = 6,8 Hz)

RMN ¹³C (50,32 MHz, CDCl₃) δ 25,2 (2C), 30,1, 31,0, 32,1, 39,1, 55,4, 65,6, 69,6, 70,1, 70,4 (3C), 70,5, 706, 107,9, 114,6, 122,3, 123,1, 125,4, 127,0, 127,6, 128,1 (2C), 128,6, 129,4, 132,2, 148,1, 151,4, 166,7, 169 (2C), 172,0, 172,1

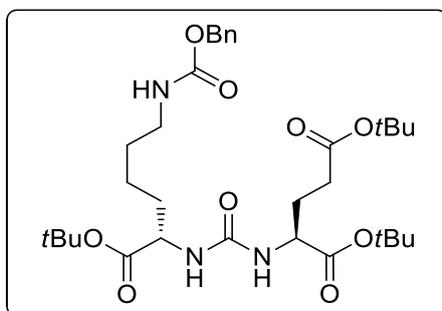
IR (ATR, cm⁻¹) ν 3400-3200, 3050-2800, 1814, 1782, 1735, 1655, 1538, 1431, 1396, 1351, 1252, 1203, 1093, 1066

HRMS *m/z* calculée pour C₃₄H₄₀N₃O₁₀ [M+H]⁺ : 650,2708, trouvée : 650,2720

Accès aux dérivés KuE

Synthèse du (2*S*)-2-(3-((*S*)-6-(benzyloxycarbonyl)amino-1-*tert*-butoxy-1-oxohexan-2-yl)uréido)pentanedioate de di-*tert*-butyle (**50**)

Ce composé a été obtenu selon un protocole de synthèse adapté de McEnaney, P. J. et al.²⁸³



À une solution du chlorhydrate de l'ester di-*tert*-butylique du L-glutamate (2,03 g, 6,86 mmol, 1 éq.) dans le dichlorométhane anhydre (60 mL) est ajoutée sous argon la triéthylamine (3,0 mL, 21,5 mmol, 3,1 éq.). À cette solution, portée à -78 °C est ajoutée lentement une solution de triphosgène (699 mg, 2,36 mmol, 0,34 éq.) dans le dichlorométhane anhydre (20 mL). Après retour à température ambiante, la solution est agitée pendant 30 min. À cette solution sont ajoutées successivement le chlorhydrate de l'ester *tert*-butylique de la L-lysine (1,58 g, 4,22 mmol, 0,6 éq.) puis la triéthylamine (600 µL, 4,3 mmol, 0,6 éq.). La solution est agitée pendant 20 h à température ambiante. Le milieu réactionnel est dilué par du dichlorométhane (100 mL) puis lavé par de l'eau déionisée (2 x 100 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié sur colonne de silice éluée par un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (70/30, v/v) pour conduire au composé **50** (2,56 g, 4,12 mmol).

Aspect : huile incolore

Rendement : 98%

R_f (SiO₂, cyclohexane/acétate d'éthyle, 80/20, v/v) : 0,15

RMN ¹H (200,13 MHz, CDCl₃) δ 1,25 (m, 2H), 1,28-1,45 (m, 27H), 1,45-1,85 (m, 4H), 1,96 (m, 1H), 2,18 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz), 3,08 (m, 2H), 4,20-4,40 (m, 2H), 5,01 (m, 2H), 5,53 (d, 1H, *J* = 8,1 Hz), 5,67 (m, 2H), 7,26 (m, 5H)

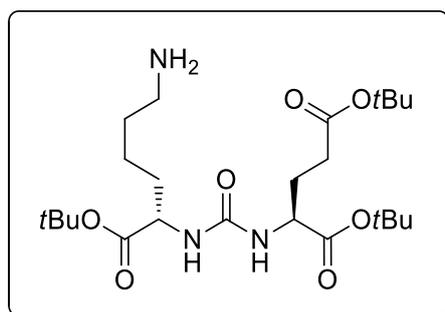
RMN ¹³C (50,32 MHz, CDCl₃) δ 22,4, 28,0 (9C), 28,3, 29,3, 31,5, 32,6, 40,7, 52,7, 53,2, 66,4, 80,4, 81,5, 82,1, 127,9, 128,0 (2C), 128,4 (2C), 136,8, 156,7, 157,2, 172,3, 172,6, 173,2

IR (ATR, cm⁻¹) ν 3450-3200, 3000-2750, 1721, 1699, 1625, 1550, 1532, 1366, 1248, 1151

HRMS *m/z* calculée pour C₃₂H₅₂N₃O₉ [M+H]⁺ : 622,3704, trouvée : 622,3703

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

Synthèse du (2S)-2-(3-((S)-6-amino-1-tert-butoxy-1-oxohexan-2-yl)uréido)pentanedioate de di-tert-butyle (**51**)



À une solution du carbamate de benzyle **50** (425 mg, 684 μmol) dans le méthanol (30 mL) est ajouté du palladium sur charbon à 10% (43 mg). La suspension est hydrogénée à température ambiante pendant 24 h. La suspension est filtrée sur célite 545 puis évaporée sous pression réduite. Le résidu est repris dans un volume minimum de méthanol (3 mL), passé à travers un filtre PTFE (0,45 μm) puis évaporé sous pression réduite pour conduire au composé **51** (330 mg, 677 μmol). Ce dernier est engagé dans l'étape réactionnelle suivante sans purification.

Aspect : huile incolore

Rendement : 99%

RMN ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) δ 1,25-1,40 (m, 29H), 1,40-1,57 (m, 3H), 1,63 (m, 1H), 1,73 (m, 1H), 1,95 (m, 1H), 2,20 (m, 2H), 2,68 (m, 2H), 4,22 (m, 2H), 5,86 (m, 2H)

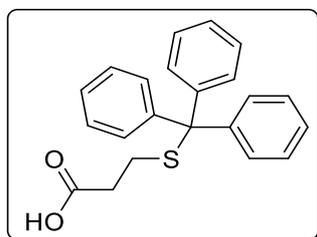
RMN ^{13}C (125,76 MHz, CDCl_3) δ 22,3, 27,9 (6C), 28,0 (3C), 28,3, 30,8, 31,6, 32,2, 40,7, 52,8, 53,3, 80,3, 81,3, 81,7, 157,4, 172,3, 172,6, 172,7

IR (ATR, cm^{-1}) ν 3450-3250, 2977, 2932, 1727, 1641, 1557, 1366, 1253, 1147

HRMS m/z calculée pour $\text{C}_{24}\text{H}_{46}\text{N}_3\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 488,3336, trouvée : 488,3326

Synthèse de l'acide 3-(tritylthio)propanoïque (**52**)

Ce composé a été obtenu selon un protocole de synthèse adapté de Benjamin C. *et al.*²⁷⁰



À une solution d'acide 3 mercaptopropionique (1,00 mL, 11,5 mmol, 1 éq.) dans le dichlorométhane anhydre (10 mL) est ajoutée lentement sur 1 h et sous argon une solution de chlorure de trityle (3,49 g, 12,5 mmol, 1,1 éq.) dans le dichlorométhane anhydre (10 mL). La solution est agitée à température ambiante pendant 15 h. Le précipité formé est alors filtré,

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

lavé par de l'éther diéthylique (3 x 10 mL) et séché au dessiccateur sous vide une nuit à 35 °C pour conduire au composé **52** (4,00 g, 11,5 mmol). Ce dernier est engagé dans l'étape réactionnelle suivante sans purification.

Aspect : solide blanc

Point de fusion : 217-219 °C (Litt.³⁰⁸: 203-204 °C)

Rendement : quant.

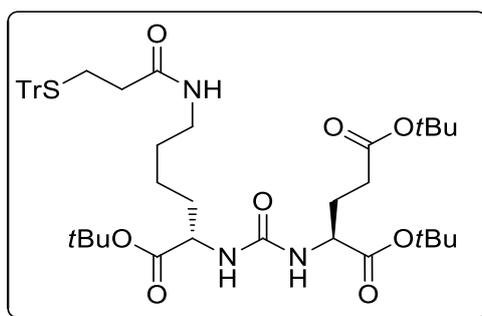
RMN ¹H (DMSO-d₆, 200,13 MHz) δ 2,16 (m, 2H), 2,27 (m, 2H), 7,10-7,45 (m, 15H)

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 50,32 MHz) δ 27,1, 33,3, 66,6, 127,3 (3C), 128,5 (6C), 129,5 (6C), 144,7 (3C), 173,3

IR (ATR, cm⁻¹) ν 3200-2800, 2571, 1700, 1487, 1430, 1408, 1252

HRMS *m/z* calculée pour C₂₂H₂₀NaO₂S [M+Na]⁺ : 371,1076, trouvée : 371,1067

Synthèse du (2*S*)-2-(3-((*S*)-6-(3-(tritylthio)propanamido)-1-*tert*-butoxy-1-oxohexan-2-yl)uréido)pentanedioate de di-*tert*-butyle (**53**)



À une solution d'acide **52** (170 mg, 0,49 mmol, 1,1 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (5 mL) sont ajoutés successivement sous argon l'hydroxybenzotriazole (78 mg, 0,58 mmol, 1,3 éq.) et la *N,N*-diisopropyléthylamine (195 µL, 1,13 mmol, 2,5 éq.). La solution est portée à -10 °C puis sont ajoutés successivement le chlorhydrate de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (121 mg, 0,631 mmol, 1,4 éq.) et une solution d'amine **51** (219 mg, 0,449 mmol, 1 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (5 mL). La solution est portée à température ambiante et agitée pendant 22 h. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite puis le résidu est repris par l'acétate d'éthyle (30 mL). La solution est lavée par de l'eau déionisée (2 x 40 mL) et les phases aqueuses sont regroupées et extraites par de l'acétate d'éthyle (2 x 80 mL). Les phases organiques sont regroupées, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le résidu est purifié sur colonne de silice éluée par un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (7/3, v/v) pour conduire au composé **53** (320 mg, 0,391 mmol).

³⁰⁸ Polidori, A.; Michel, N.; Fabiano, A. S.; Pucci, B. Exotic aqueous behavior of synthetic lipids: formation of vesicular nanotubes. *Chem. and phys. lipids* **2005**, 136(1):23-46.

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

Aspect : solide blanc

Point de fusion : 69-71 °C

Rendement : 87%

R_f (SiO₂, cyclohexane/acétate d'éthyle, 7/3, v/v) : 0,14

Point de fusion : 72-74 °C

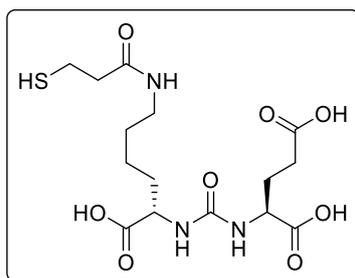
RMN ¹H (CDCl₃, 500,13 MHz) δ 1,25-1,45 (m, 4H), 1,43 (s, 9H), 1,44 (m, 18H), 1,50-1,62 (m, 1H), 1,70-1,80 (m, 1H), 1,80-1,90 (m, 1H), 2,01-2,08 (m, 1H), 2,09 (t, 2H, J = 7,3 Hz), 2,20-2,35 (m, 2H), 2,43-2,55 (m, 2H), 3,05-3,15 (m, 1H), 3,15-3,25 (m, 1H), 4,28 (m, 2H), 5,22 (brs, 2H), 5,87 (m, 1H), 7,20 (t, 3H, J = 7,3 Hz), 7,27 (t, 6H, J = 7,3 Hz), 7,40 (d, 6H, J = 7,3 Hz)

RMN ¹³C (CDCl₃, 125,76 MHz) δ 22,5, 28,0, 28,2 (6C), 28,3 (3C), 28,3 28,9, 31,8, 32,6, 35,7, 39,2, 53,4, 53,5, 67,0, 80,7, 81,9, 82,3, 126,8 (3C), 128,1 (6C), 129,8 (6C), 144,9 (3C), 157,2, 171,5, 172,5 (2C), 172,5

IR (ATR, cm⁻¹) ν 3450-3150, 2977, 2931, 1727, 1643, 1549, 1445, 1367, 1253, 1150

ESI-MS m/z calculé pour C₄₆H₆₄N₃O₈S [M+H]⁺: 818,44, trouvé: 818,46

Synthèse de l'acide (2S)-2-(3-((S)-1-carboxy-5-(3-mercaptopropanamido)pentyl)uréido)pentanedioïque (**54**)



À une solution de trityle **53** (423 mg, 517 μmol, 1 éq.) dans le dichlorométhane anhydre (5 mL) portée à 0 °C sont ajoutés successivement sous argon l'acide trifluoroacétique (1,2 mL) et le triisopropylsilane (530 μL, 2,59 mmol, 5 éq.). Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est agité pendant 19 h. La solution est évaporée sous pression réduite puis le résidu est coévaporé par du dichlorométhane (5 mL). Le résidu obtenu est purifié par CLHP préparative éluee par un mélange acétonitrile/eau (0,1% TFA), 5/95, v/v, élution isocratique sur 3 min, 5/95 → 100/0, v/v, élution par gradient linéaire sur 25 min, puis 100/0, v/v, élution isocratique sur 27 min, t_R = 14,8 min, λ = 220 nm, pour conduire après lyophilisation au composé **54** (83,8 mg, 206 μmol).

Aspect : solide amorphe blanc

Rendement : 40%

RMN ¹H (CD₃OD, 500,13 MHz) δ 1,40-1,49 (m, 2H), 1,49-1,58 (m, 2H), 1,62-1,71 (m, 1H), 1,80-1,86 (m, 1H), 1,86-1,94 (m, 1H), 2,10-2,19 (m, 1H), 2,38-2,45 (m, 2H), 2,48 (t, 2H, J = 6,9 Hz), 2,73 (t, 2H, J = 6,9 Hz), 3,19 (td, 2H, J = 7,0, 1,6 Hz), 4,26 (dd, 1H, J = 8,4, 4,9 Hz), 4,31 (dd, 1H, J = 8,4, 4,9 Hz)

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

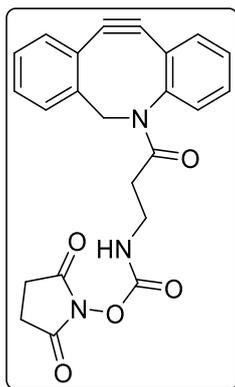
RMN ^{13}C (CD_3OD , 125,76 MHz) δ 21,1, 23,9, 28,9, 29,9, 31,1, 33,2, 40,1, 41,0, 53,5, 53,9, 160,1, 173,8, 175,9, 176,4, 176,5

IR (ATR, cm^{-1}) ν 3450-3200, 3200-2700, 2600-2200, 1713, 1621, 1553, 1430, 1413, 1365, 1177

HRMS m/z calculé pour $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 408,1435, trouvé: 408,1442

Accès aux conjugués ADIBO-KuE

Synthèse du (3-oxo-3-(11,12-didéhydrodibenzo[*b,f*]azocin-5(6*H*)-yl)propyl)carbamate de succinimidyle (**55**)



À une solution d'amine **35** (165 mg, 597 μmol , 1 éq.) dans le tétrahydrofurane anhydre (10 mL) sont ajoutés successivement sous argon le carbonate de *N,N'*-disuccinimidyl (230 mg, 900 μmol , 1,5 éq.) et la triéthylamine (170 μL , 1,22 mmol, 2 éq.). La solution est agitée à température ambiante pendant 4 h. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite et le résidu est repris dans le dichlorométhane (15 mL) puis lavé par une solution aqueuse de bicarbonate de sodium à 5% (2 x 15 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous pression réduite pour conduire au composé **55** (282 mg, 676 μmol). Ce dernier est engagé dans l'étape réactionnelle suivante sans purification.

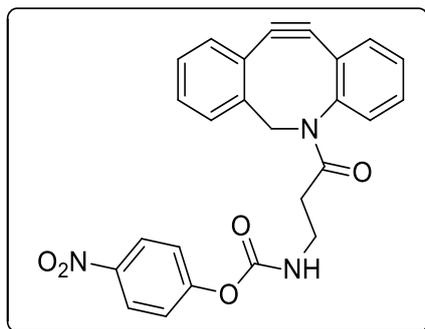
Aspect : solide jaunâtre

Rendement : quant.

RMN ^1H (CDCl_3 , 200,13 MHz) δ 1,77-2,00 (m, 1H), 2,55-2,72 (m, 1H), 2,79 (s, 4H), 3,15-3,45 (m, 2H), 3,71 (d, 1H, $J = 13,8$ Hz), 5,14 (d, 1H, $J = 13,8$ Hz), 6,06 (m, 1H), 7,20-7,45 (m, 7H), 7,66 (d, 1H, $J = 7,0$ Hz)

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

Synthèse du (3-oxo-3-(11,12-didéhydrodibenzo[*b,f*]azocin-5(6*H*)-yl)propyl)carbamate de *p*-nitrophényle (**57**)



À une solution d'amine **35** (159 mg, 575 μmol , 1 éq.) dans le dichlorométhane anhydre (20 mL) portée à 0 °C sont ajoutés successivement sous argon la triéthylamine (80 μL , 574 μmol , 1 éq.) et le chloroformiate de *p*-nitrophényle (118 mg, 585 μmol , 1 éq.). La solution est agitée à 0 °C pendant 1 h 30. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est lavé successivement par une solution aqueuse de bicarbonate de sodium à 10% (3 x 30 mL) et une solution aqueuse de chlorure de sodium saturée (30 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous pression réduite pour conduire au composé **57** (252 mg, 571 μmol). Ce dernier est engagé dans l'étape réactionnelle suivante sans purification.

Aspect : solide jaune-orangé

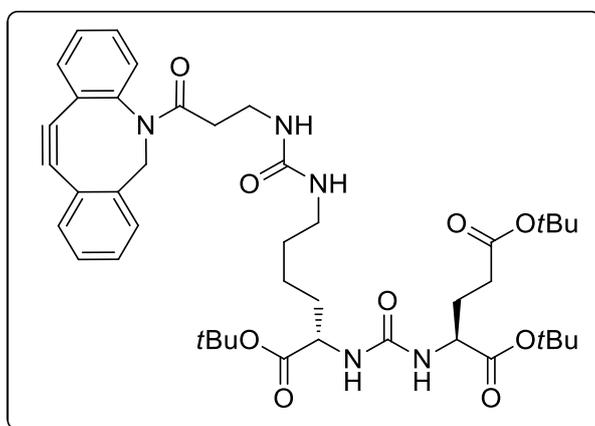
Rendement : 99%

RMN ^1H (CDCl_3 , 200,13 MHz) δ 2,03 (ddd, 1H, $J = 16,7, 6,9, 3,9$ Hz), 2,57 (ddd, 1H, $J = 16,7, 7,3, 4,3$ Hz), 3,15-3,45 (m, 2H), 3,72 (d, 1H, $J = 13,9$ Hz), 5,16 (d, 1H, $J = 13,9$ Hz), 5,81 (t, 1H, $J = 5,9$ Hz), 7,20-7,45 (m, 9H), 7,68 (d, 1H, $J = 7,0$ Hz), 8,21 (d, 2H, $J = 9,2$ Hz)

ESI-MS m/z calculé pour $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{NO}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 442,14, trouvé: 442,13

Synthèse du (3*S*,7*S*)-17-(11,12-didéhydrodibenzo[*b,f*]azocin-5-(6*H*)-yl)-5,13,17-trioxo-4,6,12,14-tétrazaheptadécane-1,3,7-tricarboxylate de tri-*tert*-butyle (**56**)

Première voie d'accès



ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

À une solution de carbamate de succinimidyle **55** (131 mg, 314 μmol , 1 éq.) dans le dichlorométhane anhydre (32 mL) sont ajoutées successivement sous argon la *N,N*-diisopropyléthylamine (54 μL , 310 μmol , 1 éq.) et une solution d'amine **51** (153 mg, 314 μmol , 1 éq.) dans le dichlorométhane anhydre (3 mL). La solution est agitée à température ambiante pendant 4 h. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite.

Le produit attendu n'est pas retrouvé en analyse RMN ^1H du brut réactionnel.

Deuxième voie d'accès

À une solution de carbamate de *p*-nitrophényle **57** (56 mg, 0,13 mmol, 1 éq.) dans le dichlorométhane anhydre (2 mL) sont ajoutées successivement sous argon la *N,N*-diisopropyléthylamine (22 μL , 0,13 mmol, 1 éq.) et une solution d'amine **51** (62 mg, 0,13 mmol, 1 éq.) dans le dichlorométhane anhydre (2 mL). La solution est agitée sous argon à température ambiante pendant 6 h. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans du dichlorométhane (20 mL) puis la solution est lavée successivement par une solution aqueuse saturée de bicarbonate de sodium (2 x 10 mL) puis une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (10 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice éluée par un mélange dichlorométhane/méthanol (98/2, v/v) pour conduire au composé **56** (67 mg, 85 μmol).

Aspect : solide orangé

Point de fusion : 116-118 °C

Rendement : 67%

R_f (SiO_2 , dichlorométhane/méthanol, 98/2, v/v) : 0,09

RMN ^1H (CDCl_3 , 200,13 MHz) (présence de rotamères*) δ 0,75-1,00 (m, 2H), 1,00-1,60 (m, 29H), 1,60-1,90 (m, 4H), 1,90-2,10 (m, 1H), 2,28 (m, 2H), 2,40-2,70 (m, 1H), 2,80-3,20 (m, 2H), 3,20-3,40 (m, 2H), 3,66 et 3,68* (dd, 1H, $J = 13,9$ Hz), 4,20-4,45 (m, 2H), 5,11 et 5,20* (d, 1H, $J = 13,9$ Hz), 5,47 (m, 1H), 5,62 et 5,73* (d, 1H, $J = 8,1$ Hz), 5,88 et 6,02* (d, 1H, $J = 8,1$ Hz), 7,20-7,50 (m, 7H), 7,69 (m, 1H)

IR (ATR, cm^{-1}) ν 3500-3200, 3050-2800, 1725, 1639, 1557, 1449, 1393, 1367, 1250, 1151

HRMS m/z calculée pour $\text{C}_{43}\text{H}_{60}\text{N}_5\text{O}_9$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 790,4386, trouvée : 790,4382

Synthèse de l'acide (3*S*,7*S*)-17-(11,12-didéhydrodibenzo[*b,f*]azocin-5-(6*H*)-yl)-5,13,17-trioxo-4,6,12,14-tétrazaheptadécane-1,3,7-tricarboxylique (ADIBO-KuE1 – voie 1)

Première voie d'accès

À une solution du conjugué triester **56** (49,0 mg, 62,0 μmol) dans le dichlorométhane anhydre (4 mL) est ajouté sous argon de l'acide trifluoroacétique (1 mL). La solution est agitée à température ambiante pendant 24 h. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

réduite. Le résidu est précipité par ajout d'éther diéthylique (3 x 5 mL) puis filtré. Le filtrat est ensuite évaporé sous pression réduite.

Deuxième voie d'accès

À une solution du conjugué triester **56** (50,0 mg, 63,3 μmol , 1 éq.) dans le dichlorométhane (250 μL) est ajoutée une solution d'acide sulfurique concentré (96-98%, 5,3 μL , 94,5 μmol , 1,5 éq.) dans le dichlorométhane (250 μL). La solution est agitée à température ambiante pendant 18 h. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris par une solution aqueuse saturée de carbonate de sodium (300 μL) et de l'eau déionisée (1,5 mL). Après extraction par du dichlorométhane (4 x 3 mL), la phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous pression réduite.

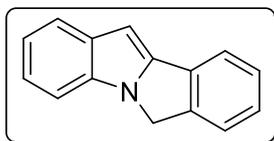
Troisième voie d'accès

À une solution du conjugué triester **56** (50,0 mg, 63,3 μmol) dans le toluène (2 mL) est ajoutée la silice (250 mg). La solution est agitée à reflux pendant 4 h. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré et la silice est lavée successivement par du toluène (2 x 5 mL) puis un mélange dichlorométhane/éthanol (8/2, v/v). La solution est évaporée sous pression réduite.

Quatrième voie d'accès

À une solution aqueuse d'acide phosphorique à 85% (30 μL) sous forte agitation est ajoutée goutte à goutte une solution du conjugué triester **56** (60,0 mg, 76,0 μmol) dans le dichlorométhane (600 μL). Après 8 h sont ajoutés successivement du dichlorométhane (1,4 mL) et de l'éthanol absolu (2 mL). La solution est agitée à température ambiante pendant 28 h. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite.

Toutes ces méthodes de déprotection ont conduit à isoler le composé **56a**.



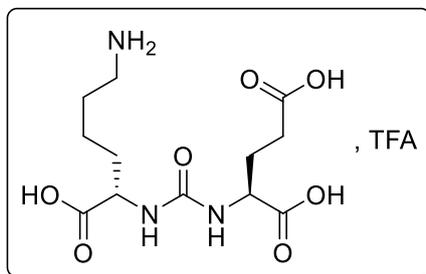
RMN ^1H (CDCl_3 , 500,13 MHz) δ 5,08 (s, 2H), 6,63 (s, 1H), 7,11 (td, $J = 7,5, 1,1$ Hz), 7,20 (td, $J = 7,5, 1,1$ Hz), 7,31 (td, $J = 7,5, 1,1$ Hz), 7,36 (d, $J = 8,1$ Hz), 7,41 (t, $J = 7,6$ Hz), 7,48 (d, $J = 7,6$ Hz), 7,67 (d, $J = 7,9$ Hz), 7,72 (d, $J = 7,6$ Hz)

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

Synthèse du trifluoroacétate de l'acide (2S)-2-(3-((S)-5-amino-1-carboxypentyl)uréido)pentanedioïque (**58.TFA**)

Première voie d'accès

Ce composé a été obtenu selon un protocole de synthèse adapté de Fuchs, A. V. *et al.*³⁰⁹



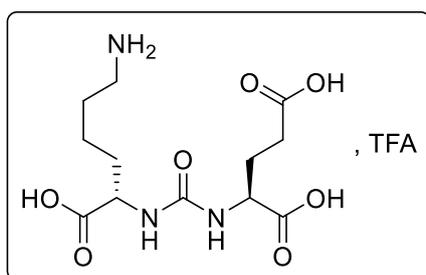
À une solution de triester **51** (90 mg, 185 μmol) dans le dichlorométhane anhydre (400 μL) est ajouté l'acide trifluoroacétique (115 μL). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 20 h avant évaporation sous pression réduite. Le résidu est coévaporé par du dichlorométhane (2 x 5 mL) puis dilué dans un mélange eau/acétonitrile (10/2, v/v, 1,2 mL) et purifié par CLHP préparative éluee par un mélange acétonitrile/eau (0,1% TFA), 5/95, v/v, élution isocratique sur 3 min, 5/95 \rightarrow 100/0, v/v, élution par gradient linéaire sur 20 min, puis 100/0, v/v, élution isocratique sur 10 min, $t_R = 8,4$ min, $\lambda = 210$ et 220 nm, pour conduire après lyophilisation au composé **58.TFA** (41,0 mg, 94,6 μmol).

Aspect : solide blanc

Rendement : 51%

Deuxième voie d'accès

Ce composé a été obtenu selon un protocole de synthèse adapté de Mukai, T. *et al.*²⁸⁴



À une solution de triester **51** (373 mg, 765 μmol) dans l'anisole anhydre (1 mL) portée à -10 °C est ajouté l'acide trifluoroacétique (4 mL). Après retour à température ambiante, la solution est agitée pendant 20 h. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite puis le résidu est purifié par CLHP préparative éluee par un mélange acétonitrile/eau (0,1% TFA), 5/95, v/v, élution isocratique sur 3 min, 5/95 \rightarrow 100/0, v/v, élution par gradient linéaire sur

³⁰⁹ Fuchs, A. V.; Tse, B. W. C.; Pearce, A. K.; Yeh, M. C.; Fletcher, N. L.; Huang, S. S.; Heston, W. D.; Whittaker, A. K.; Russell, P. J.; Thurecht, K. J. Evaluation of polymeric nanomedicines targeted to PSMA: effect of ligand on targeting efficiency. *Biomacromolecules* **2015**, 16(10):3235-3247.

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

20 min, puis 100/0, v/v, élution isocratique sur 10 min, $t_R = 6,0$ min, $\lambda = 210$ et 220 nm, pour conduire après lyophilisation au composé **58.TFA** (270 mg, 623 μmol).

Aspect : solide blanc

Rendement : 81%

Point de fusion : 65-68 °C

RMN ^1H (200,13 MHz, CD_3OD) δ 1,50 (q, 2H, $J = 6,8$ Hz), 1,58-1,80 (m, 3H), 1,80-2,00 (m, 2H), 2,00-2,25 (m, 1H), 2,42 (t, 2H, $J = 7,0$ Hz), 2,92 (t, 2H, $J = 6,9$ Hz), 4,29 (m, 2H)

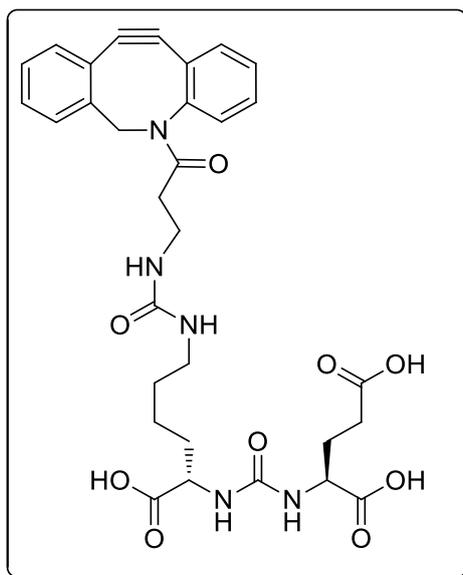
RMN ^{13}C (50,32 MHz, CD_3OD) δ 23,5, 27,9, 28,7, 31,1, 33,0, 40,5, 53,5, 53,6, 160,2, 176,0, 176,1, 176,5

IR (ATR, cm^{-1}) ν 3400-3200, 2945, 2700-2400, 1714, 1662, 1559, 1398, 1186, 1138

HRMS m/z calculée pour $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 320,1452, trouvée : 320,1444

Synthèse de l'acide (3*S*,7*S*)-17-(11,12-didéhydrodibenzo[*b,f*]azocin-5-(6*H*)-yl)-5,13,17-trioxo-4,6,12,14-tétrazaheptadécane-1,3,7-tricarboxylique (**ADIBO-KuE1** – voie 2)

Première voie d'accès



À une solution d'amine **58.TFA** (174 mg, 402 μmol , 1 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (500 μL) sont ajoutés successivement sous argon la *N,N*-diisopropyléthylamine (350 μL , 2,01 mmol, 5 éq.) et une solution du carbamate de succinimidyle **55** (170 mg, 407 μmol , 1 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (500 μL). Après 16 h, du *N,N*-diméthylformamide anhydre (500 μL) est ajouté et la solution est agitée pendant 5 j. Le milieu réactionnel est purifié par CLHP préparative éluee par un mélange acétonitrile/eau (0,1% TFA), 5/95, v/v, élution isocratique sur 3 min, 5/95 \rightarrow 100/0, v/v, élution par gradient linéaire sur 20 min, puis 100/0, v/v, élution isocratique sur 10 min, $t_R = 19,4$ min, $\lambda = 220$ et 254 nm. Les fractions collectées sont neutralisées par ajout d'ammoniaque concentrée puis lyophilisées pour conduire au composé **ADIBO-KuE1** (32,0 mg, 51,5 μmol).

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

Aspect : poudre blanche

Rendement : 13%

Deuxième voie d'accès

À une solution d'amine **58.TFA** (174 mg, 402 μmol , 1 éq.) dans le diméthylsulfoxyde anhydre (300 μL) sont ajoutés successivement sous argon la *N,N*-diisopropyléthylamine (350 μL , 2,0 mmol, 5 éq.) et une solution du carbamate de *p*-nitrophényle **57** (187 mg, 424 μmol , 1 éq.) dans le diméthylsulfoxyde (800 μL). La solution est agitée sous argon à température ambiante pendant 4 h. Le milieu réactionnel est porté à 0 °C puis la *N,N*-diisopropyléthylamine est neutralisée par ajout d'acide trifluoroacétique (80 μL). Le résidu obtenu est purifié par CLHP préparative éluee par un mélange acétonitrile/eau (0,1% TFA), 5/95, v/v, élution isocratique sur 3 min, 5/95 \rightarrow 100/0, v/v, élution par gradient linéaire sur 20 min, puis 100/0, v/v, élution isocratique sur 10 min, $t_R = 6,0$ min, $\lambda = 210$ et 220 nm. Les fractions collectées sont neutralisées par ajout d'ammoniaque concentrée puis lyophilisées pour conduire au composé **ADIBO-KuE1** (50,0 mg, 80,4 μmol).

Aspect : poudre blanche

Rendement brut : 20%

RMN ^1H (CD_3OD , 500,13 MHz) δ 1,30-1,55 (m, 4H), 1,64 (m, 1H), 1,79 (m, 1H), 1,85-2,05 (m, 2H), 2,05-2,20 (m, 1H), 2,32-2,42 (m, 2H), 2,48 (tdd, 1H, $J = 16,0, 6,5, 1,7$ Hz), 2,92-3,05 (m, 2H), 3,05-3,25 (m, système AB, 2H), 3,70 (d, 1H, $J = 14,0$ Hz), 4,16 (ddd, 1H, $J = 8,0, 4,8, 1,9$ Hz), 4,20 (dd, 1H, $J = 7,7, 5,3$ Hz), 5,14 (dd, 1H, $J = 14,0, 1,5$ Hz), 7,25 (dd, 1H, $J = 7,3, 1,4$ Hz), 7,32 (td, 1H, $J = 7,5, 1,4$ Hz), 7,36 (td, 1H, $J = 7,5, 1,4$ Hz), 7,40-7,50 (m, 4H), 7,65 (d, 1H, $J = 7,4$ Hz)

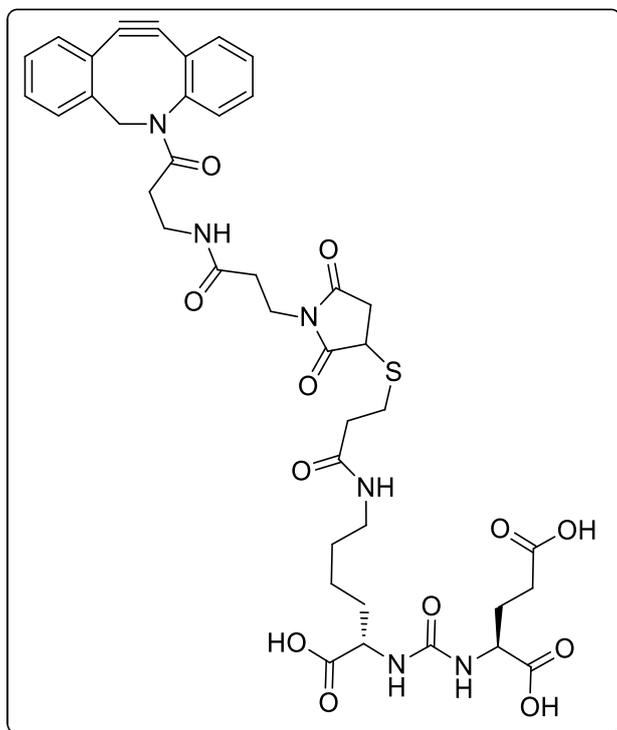
RMN ^{13}C (CD_3OD , 125,76 MHz) δ 23,9, 30,8, 32,1, 33,8, 37,2, 40,8, 55,0, 55,1, 55,3, 55,4, 56,7, 108,7, 115,6, 123,8, 124,4, 126,5, 128,1, 128,9, 129,2, 129,6, 130,0, 130,5, 133,4, 149,5, 152,6, 160,1, 160,9, 173,8, 177,8, 177,9, 178,4

IR (ATR, cm^{-1}) ν 3100-2800, 1630, 1559, 1481, 1447, 1403, 1202, 1133, 1079

HRMS m/z calculée pour $\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{N}_5\text{O}_9$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 622,2513, trouvée : 622,2512

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

Synthèse de l'acide (2S)-2-(3-((1S)-1-carboxy-5-(3-((1-(3-((3-(11,12-didéhydrodibenzo[b,f]azocin-5-(6H)-yl)-3-oxopropyl)amino)-3-oxopropyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl)thio)propanamido)pentyl)uréido)pentanedioïque (ADIBO-KuE2)



À une solution du thiol **54** (114 mg, 280 μmol , 1 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (0,5 mL) sont ajoutés successivement sous argon la *N*-méthylmorpholine (150,0 μL , 1,36 mmol, 4,9 éq.) et une solution de maléimide **41** (129 mg, 302 μmol , 1 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (0,5 mL). La solution est agitée à température ambiante pendant 1 h. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par CLHP préparative éluee par un mélange acétonitrile/eau (0,1% TFA), 5/95, v/v, élution isocratique sur 3 min, 5/95 \rightarrow 100/0, v/v, élution par gradient linéaire sur 22 min, puis 100/0, v/v, élution isocratique sur 7 min, $t_R = 19,0$ min, $\lambda = 220$ et 254 nm. Les fractions collectées sont neutralisées par ajout d'ammoniaque concentrée puis lyophilisées pour conduire au composé **ADIBO-KuE2** (66 mg, 79 μmol).

Aspect : solide amorphe blanc

Rendement : 28%

RMN ^1H (CD_3OD , 500,13 MHz) δ 1,36-1,48 (m, 2H), 1,48-1,58 (m, 2H), 1,60-1,70 (m, 1H), 1,76-1,86 (m, 1H), 1,86-1,96 (m, 1H), 1,98-2,07 (m, 1H), 2,07-2,15 (m, 1H), 2,30 (t, 2H, $J = 7$ Hz), 2,38 (m, 2H), 2,41-2,49 (m, 2H), 2,50-2,56 (m, 3H), 2,90-3,00 (m, 1H), 3,05-3,25 (m, 5H), 3,65 (t, 2H, $J = 7,1$ Hz), 3,71 (d, 1H, $J = 14,1$ Hz), 3,88 (m, 1H), 4,21 (m, 2H), 5,15 (d, 1H, $J = 14,1$ Hz), 7,27 (m, 1H), 7,33 (t, 1H, $J = 7,4$ Hz), 7,37 (td, 1H, $J = 7,4, 1,5$ Hz), 7,42-7,50 (m, 3H), 7,53 (m, 1H), 7,66 (d, 1H, $J = 7,4$ Hz)

RMN ^{13}C (CD_3OD , 125,76 MHz) (présence de rotamères*) δ 23,99 et 24,01*, 28,51 et 28,55*, 29,84, 29,93 et 29,94*, 31,86, 33,71, 34,70, 35,22 et 35,25*, 36,49, 36,77 et 36,80*

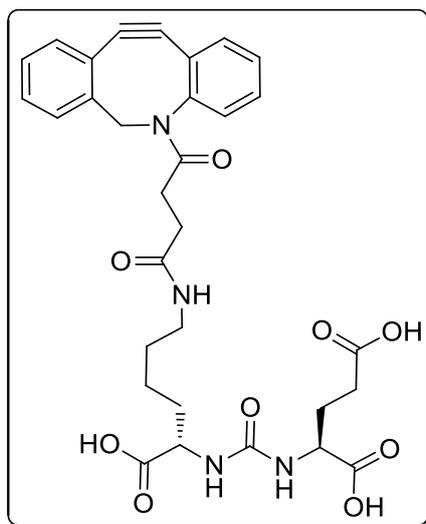
ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

36,80 et 36,83*, 37,03, 40,31 et 40,32*, 40,73-40,81, 54,81, 55,08, 56,63, 108,85, 115,63, 123,68, 124,33, 126,58, 128,16, 128,95, 129,22, 129,69, 130,06, 130,53, 133,42, 149,49, 152,58, 160,07, 172,64, 173,30 et 173,32*, 173,61, 176,58 et 176,60*, 177,54, 177,58 et 177,59*, 178,07, 178,36 et 178,38*

IR (ATR, cm^{-1}) ν 3700-3200, 3100-2700, 2700-2300, 1702, 1633, 1558, 1442, 1402, 1206, 1163, 1080, 1045

HRMS m/z calculée pour $\text{C}_{40}\text{H}_{46}\text{N}_6\text{NaO}_{12}\text{S}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 857,2792, trouvé : 857,2782

Synthèse de l'acide (S)-2-(3-((S)-1-carboxy-5-(4-oxo-4-(11,12-didéhydrodibenzo[*b,f*]azocin-5-(6*H*)-yl)butanamido)pentyl)uréido)pentanedioïque (ADIBO-KuE3)



À une solution de trifluoroacétate d'amine **58.TFA** (70 mg, 168 μmol , 1 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (200 μL) sont ajoutés successivement sous argon la *N,N*-diisopropyléthylamine (275 μL , 1,58 mmol, 9,4 éq.) et une solution d'ester activé **47** (85 mg, 211 μmol , 1,25 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (500 μL). La solution est agitée à température ambiante pendant 6 h. Le milieu réactionnel est dilué par ajout d'eau déionisée (1 mL) puis purifié par CLHP préparative éluee par un mélange acétonitrile/eau (0,1% TFA), 5/95, v/v, élution isocratique sur 3 min, 5/95 \rightarrow 100/0, v/v, élution par gradient linéaire sur 20 min, puis 100/0, v/v, élution isocratique sur 15 min, $t_R = 20,2$ min, $\lambda = 220$ et 254 nm. Les fractions collectées sont neutralisées par ajout d'ammoniaque concentrée puis lyophilisées pour conduire au composé **ADIBO-KuE3** (64 mg, 106 μmol).

Aspect : solide blanc

Rendement : 63%

RMN ^1H (500,13 MHz, CD_3OD) (présence de rotamères*) δ 1,28-1,45 (m, 4H), 1,55-1,70 (m, 1H), 1,70-1,83 (m, 1H), 1,85-2,05 (m, 2H), 2,05-2,20 (m, 2H), 2,25-2,42 (m, 3H), 2,60-2,75 (m, 1H), 2,95-3,10 (m, 2H), 3,68 (d, 1H, $J = 14,0$ Hz), 4,05-4,25 (m, 2H), 5,12 et 5,14* (d, 1H, $J = 14,0$ Hz), 7,23 (d, 1H, $J = 7,4$ Hz), 7,30 (td, 1H, $J = 7,6, 1,3$ Hz),

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

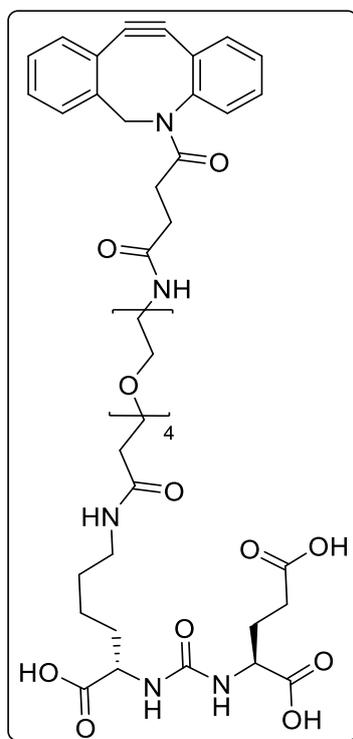
7,35 (td, 1H, $J = 7,5, 1,4$ Hz), 7,40-7,50 (m, 3H), 7,55-7,61 (m, 1H), 7,64 et 7,67* (d, 1H, $J = 7,2$ Hz)

RMN ^{13}C (125,76 MHz, CD_3OD) (présence de rotamères*) δ 23,80 et 23,97*, 29,77 et 29,84*, 29,98 et 30,04*, 31,33 et 31,46*, 31,92 et 31,97*, 32,19 et 32,23*, 33,59 et 33,67*, 40,15 et 40,23*, 55,17 et 55,22*, 55,44 et 55,49*, 56,69, 108,73 et 108,77*, 115,58 et 115,59*, 123,69 et 123,71*, 124,33 et 124,35*, 126,44, 128,06, 128,86, 129,18 et 129,20*, 129,61, 129,97, 130,55 et 130,57*, 133,42 et 133,46*, 149,42, 152,64, 160,10, 174,11 et 174,15*, 174,34 et 174,39*, 178,02 et 178,08*, 178,21 et 178,25*, 178,75 et 178,79*

IR (ATR, cm^{-1}) ν 3450-3300, 3300-2650, 2650-2300, 1720, 1621, 1558, 1447, 1407, 1159

HRMS m/z calculée pour $\text{C}_{31}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_9$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 607,2399, trouvée : 607,2404

Synthèse de l'acide (3*S*,7*S*)-32-(11,12-didéhydrodibenzo[*b,f*]azocin-5(6*H*)-yl)-5,13,29,32-tétraoxo-16,29,22,25-tétraoxa-4,6,12,28-tétraazodotriacontane-1,3,7 tricarboxylique (ADIBO-KuE4)



À une solution de l'amine **58.TFA** (110 mg, 264 μmol , 1 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (200 μL) sont ajoutés successivement sous argon la *N,N*-diisopropyléthylamine (432 μL , 2,54 mmol, 9,5 éq.) puis, après 5 min, une solution de l'ester activé **49** (208 mg, 320 μmol , 1,2 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (300 μL). La solution est agitée à température ambiante pendant 22 h. Le milieu réactionnel est dilué par ajout d'eau déionisée (1,0 mL) puis purifié par CLHP préparative éluée par un mélange acétonitrile/eau (0,1% TFA), 5/95, v/v, élution isocratique sur 3 min, 5/95 \rightarrow 100/0, v/v, élution par gradient linéaire sur 20 min, puis 100/0, v/v, élution isocratique sur 10 min, $t_R = 20,5$ min, $\lambda = 220$ et 254 nm. Les fractions collectées sont neutralisées par ajout

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

d'ammoniaque concentrée puis lyophilisées pour conduire au composé **ADIBO-KuE4** (139 mg, 163 μmol).

Aspect : solide amorphe blanc

Rendement : 62%

RMN ^1H (500,13 MHz, CD_3OD) (présence de rotamères*) δ 1,36-1,45 (m, 2H), 1,45-1,57 (m, 2H), 1,58-1,70 (m, 1H), 1,75-1,85 (m, 1H), 1,85-2,02 (m, 2H), 2,05-2,13 (m, 1H), 2,13-2,22 (m, 1H), 2,30-2,40 (m, 3H), 2,42 (t, 2H, $J = 6,1$ Hz), 2,70 (tdd, 1H, $J = 16,5, 7,5, 2,7$ Hz), 3,16 (t, 2H, $J = 6,7$ Hz), 3,24 (t, 2H, $J = 5,6$ Hz), 3,43 (sx, 2H, $J = 5,6$ Hz), 3,53-3,63 (m, 12H), 3,66-3,73 (m, 3H), 4,16 (dd, 1H, $J = 6,9, 5,0$ Hz), 4,20 (dd, 1H, $J = 7,7, 5,2$ Hz), 5,12 et 5,13* (d, 1H, $J = 14,0$ Hz), 7,24 (dd, 1H, $J = 7,3, 1,5$ Hz), 7,32 (td, 1H, $J = 7,5, 1,3$ Hz), 7,36 (td, 1H, $J = 7,5, 1,5$ Hz), 7,42-7,49 (m, 3H), 7,57-7,62 (m, 1H), 7,62-7,67 (m, 1H)

RMN ^{13}C (125,76 MHz, CD_3OD) (présence de rotamères*) δ 24,01, 29,99, 30,03, 31,37, 31,89, 32,07, 33,78, 37,57, 40,24, 40,33, 55,06, 55,34, 56,68, 68,31, 70,45, 71,19, 71,24, 71,36, 71,41 (2C), 71,43, 108,80, 115,57, 123,67, 124,36, 126,45, 128,10, 128,87, 129,17, 129,64, 130,00, 130,58, 133,43 et 133,44*, 149,46, 152,65, 160,03, 173,81, 173,99 et 174,00*, 174,61, 177,84, 177,98, 178,51

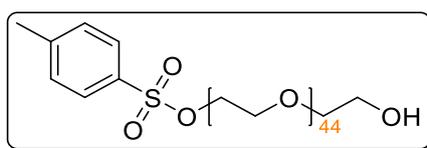
IR (ATR, cm^{-1}) ν 3450-3150, 3150-3000, 3000-2750, 1715, 1633, 1549, 1435, 1398, 1348, 1240, 1201, 1092

HRMS m/z calculée pour $\text{C}_{42}\text{H}_{56}\text{N}_5\text{O}_{14}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 854,3818, trouvée : 854,3834

Accès au dérivé PEG azoture/tétra-phosphonate **L13**

Synthèse du α -tosyl- ω -hydroxy-poly(oxyéthane-1,2-diyl)₍₂₀₀₀₎ (**59**)

Ce composé a été obtenu selon la synthèse adaptée de Harris J. *et al.*²⁹³



À une solution de chlorure de tosylo (5,73 g, 30,1 mmol, 3,0 éq.) dans le dichlorométhane (100 mL) sont ajoutés successivement à 0 °C le PEG₍₂₀₀₀₎ diol (20,0 g, 10,0 mmol, 1 éq.) et une solution de triéthylamine (4,20 mL, 30,1 mmol, 3,0 éq.) dans le dichlorométhane (100 mL). Le milieu réactionnel est agité à 0 °C pendant 2 h. Après retour à température ambiante, la solution est évaporée puis le résidu repris dans du dichlorométhane (500 mL). La solution est lavée successivement par de l'eau déionisée (2 x 250 mL) puis une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium (2 x 250 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur colonne d'alumine éluée par un mélange dichlorométhane/méthanol (99/1, v/v) pour conduire au composé **59** (6,72 g, 3,12 mmol).

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

Aspect : cire blanche

Rendement : 31%

R_f (Al₂O₃, dichlorométhane/méthanol, 99/1, v/v) : 0,06

RMN ¹H (200,13 MHz, CDCl₃) δ 2,25 (s, 3H), 3,15-3,70 (m, ca. 178H), 3,94 (m, 2H), 7,15 (d, 2H, J = 8,2 Hz), 7,57 (d, 2H, J = 8,2 Hz)

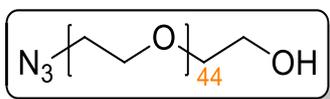
RMN ¹³C (125,76 MHz, CDCl₃) δ 21,8, 61,8, 68,8, 69,4, 70,4, 70,5-70,8 (m, ca. 84C), 70,9, 72,7, 128,1 (2C), 129,9 (2C), 133,1, 144,9

IR (ATR, cm⁻¹) ν 2883, 1466, 1359, 1341, 1279, 1240, 1147, 1101, 1060, 957

MALDI-TOF m/z calculée pour C₉₇H₁₈₈KO₄₈S [M+K]⁺ : 2192,2, trouvée : 2193,5

Synthèse du α-hydro-ω-azido-poly(oxyéthane-1,2-diyl)₍₂₀₀₀₎ (60)

Ce composé a été obtenu selon la synthèse adaptée de Mahou R. *et al.*²⁹⁴



À une solution de tosyte **59** (1,53 g, 710 μmol, 1 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (17 mL) est ajouté sous argon de l'azoture de sodium (231 mg, 3,55 mmol, 5 éq.). La suspension est chauffée à 90 °C sous agitation pendant 18 h. Après retour à température ambiante, le mélange est filtré puis le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans du dichlorométhane (100 mL) puis lavé successivement par de l'eau déionisée (2 x 50 mL) puis une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium (2 x 50 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le résidu est repris dans un volume minimum de dichlorométhane (1,5 mL) avant d'être ajouté goutte à goutte à 0 °C et sous agitation à de l'éther diéthylique anhydre (100 mL). Le précipité formé est filtré puis séché sous pression réduite pour conduire au composé **60** (1,22 g, 602 μmol).

Aspect : cire blanchâtre

Rendement : 85%

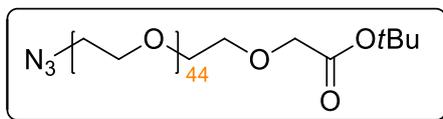
RMN ¹H (200,13 MHz, CDCl₃) δ 3,38 (m, 2H), 3,50-3,90 (m, ca. 178H)

RMN ¹³C (50,32 MHz, CDCl₃) δ 50,3, 61,2, 69,5-72,0 (m, ca. 87C), 72,2

IR (ATR, cm⁻¹) ν 2883, 2098, 1466, 1359, 1341, 1279, 1241, 1147, 1098, 1060, 959

Synthèse du α -(*tert*-butyloxycarbonyl)méthyl- ω -azido-poly(oxy(éthane-1,2-diyl))₍₂₀₀₀₎ (61)

Ce composé a été obtenu selon la synthèse adaptée de Mei, D. S. *et al.*³¹⁰



Une solution d'alcool **60** (505 mg, 249 μ mol, 1 éq.) dans le toluène anhydre (15 mL) est évaporée sous pression réduite puis le résidu est repris dans le tétrahydrofurane anhydre (15 mL). À cette solution portée à 0 °C sont ajoutés successivement sous argon l'hydruure de sodium dans l'huile minérale à 60% (21,7 mg, 543 μ mol, 2,2 éq.) puis, après 3 h, le bromoacétate de *tert*-butyle (80 μ L, 546 μ mol, 2,2 éq.). La solution est portée à 50 °C puis agitée pendant 24 h. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré et le précipité formé est rincé par du tétrahydrofurane (3 x 10 mL) puis le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans le dichlorométhane (20 mL) puis lavé par de l'eau déionisée (10 mL). La phase aqueuse est extraite par du dichlorométhane (2 x 20 mL) puis les phases organiques réunies sont lavées par une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (30 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié sur colonne d'alumine éluée par un mélange dichlorométhane/éthanol (99/1, v/v) pour conduire au composé **61** (395 mg, 185 μ mol).

Aspect : cire jaune

Rendement : 74%

R_f (Al₂O₃, dichlorométhane/éthanol, 99/1, v/v) : 0,01

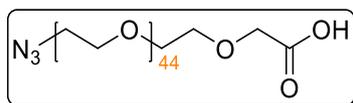
RMN ¹H (500,13 MHz, CDCl₃) δ 1,47 (s, 9H), 3,39 (t, 2H, *J* = 5,1 Hz), 3,55-3,75 (m, ca. 178H), 4,02 (s, 2H)

RMN ¹³C (125,76 MHz, CDCl₃) δ 28,1 (3C), 50,7, 69,0, 70,0, 70,20-71,00 (m, ca. 88C), 81,5, 169,7

IR (ATR, cm⁻¹) ν 2884, 2101, 1752, 1466, 1340, 1279, 1240, 1147, 1105, 1060, 957

MALDI-TOF *m/z* calculée pour C₉₆H₁₉₁N₃NaO₄₇ [M+Na]⁺ : 2161,255, trouvée : 2161,552

Synthèse du α -carboxyméthyl- ω -azido-poly(oxyéthane-1,2-diyl)₍₂₀₀₀₎ (62)



Une solution de l'ester de *tert*-butyle **61** (348 mg, 163 μ mol) dans l'acide chlorhydrique aqueux 2 N (10 mL) est agité à reflux pendant 1 h 15. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est dilué dans l'eau déionisée (10 mL) puis extrait par du dichlorométhane (5 x 20 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée

³¹⁰ Mei, D. S.; Qu, Y.; He, J. X.; Chen, L.; Yao, Z. J. Syntheses and characterizations of novel pyrrolocoumarin probes for SNAP-tag labelling technology. *Tetrahedron* **2011**, 67(12):2251-2259.

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

puis évaporée sous pression réduite pour conduire au composé **62** (340 mg, 163 μmol) engagé dans l'étape réactionnelle suivante sans purification.

Aspect : cire jaune

Rendement : quant.

RMN ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) δ 3,36 (t, 2H, $J = 5,1$ Hz), 3,55-3,70 (m, ca. 176H), 3,73 (m, 2H), 4,13 (s, 2H)

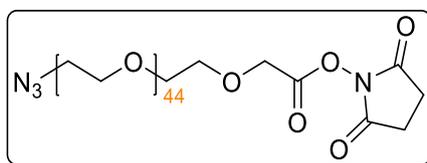
RMN ^{13}C (125,76 MHz, CDCl_3) δ 50,8, 69,0, 70,1, 70,30-71,00 (m, ca. 87C), 71,3, 171,6

IR (ATR, cm^{-1}) ν 2883, 2101, 1743, 1466, 1359, 1340, 1279, 1240, 1147, 1104, 1060, 947

MALDI-TOF m/z calculée pour $\text{C}_{92}\text{H}_{183}\text{N}_3\text{NaO}_{47}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 2105,192, trouvée : 2105,590

Synthèse du α -((succinimidyl)oxy)carbonylméthyl- ω -azido-poly(oxyéthane-1,2-diyl)₍₂₀₀₀₎ (**63**)

Ce composé a été obtenu selon la synthèse adaptée de Benjamin, C. J. *et al.*²⁷⁰



Une solution d'acide **62** (528 mg, 253 μmol , 1 éq.) dans le toluène anhydre (10 mL) est évaporée sous pression réduite. Le résidu est repris dans le dichlorométhane anhydre (10 mL) puis sont ajoutés successivement sous argon le *N*-hydroxysuccinimide (44 mg, 382 μmol , 1,5 éq.) et le chlorhydrate de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (73 mg, 381 μmol , 1,5 éq.). La solution est agitée pendant 18 h. Le milieu réactionnel est dilué par du dichlorométhane (40 mL) puis lavé successivement par une solution aqueuse d'acide citrique à 5% (2 x 50 mL), une solution aqueuse de bicarbonate de sodium à 5% (2 x 50 mL) et par une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (2 x 50 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée sous pression réduite pour conduire au composé **63** (526 mg, 241 μmol) engagé dans l'étape réactionnelle suivante sans purification.

Aspect : cire jaunâtre

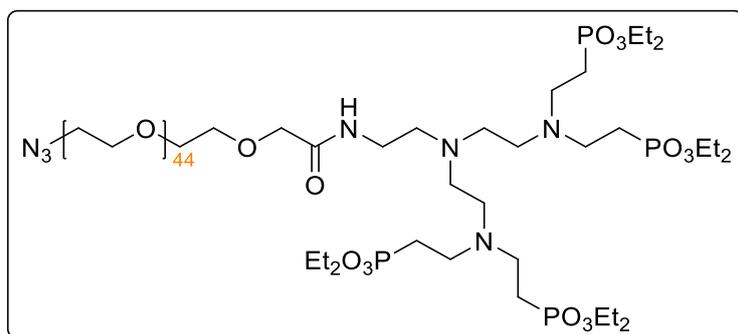
Rendement : 95%

RMN ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) δ 2,82 (s, 4H), 3,34 (t, 2H, $J = 5,0$ Hz), 3,50-3,70 (m, ca. 176H), 3,75 (m, 2H), 4,48 (s, 2H)

RMN ^{13}C (125,76 MHz, CDCl_3) δ 25,6 (2C), 50,7, 66,5, 70,0, 70,45-70,75 (m, ca. 86C), 71,3, 71,9, 166,0, 168,8 (2C)

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

Synthèse du α - (2-((bis(2-(bis((diéthoxyphosphoryl)éthyl)amino)éthyl)amino)éthyl)amino-2-oxoéthoxy)- ω -azido-poly(oxyéthane-1,2-diyl)₍₂₀₀₀₎ (**64**)



À une solution d'amine **22.TFA** (527 mg, 419 μ mol, 1 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (0,8 mL) sont ajoutés successivement, goutte à goutte et sous argon, la *N,N*-diisopropyléthylamine (550 μ L, 3,16 mmol, 7,5 éq.) et une solution d'ester activé **63** (526 mg, 241 μ mol, 0,60 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (2,0 mL). La solution est agitée à température ambiante pendant 16 h. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite puis le résidu est dilué dans le dichlorométhane (50 mL) et lavé successivement par de l'eau déionisée (2 x 30 mL) puis une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (2 x 30 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié sur colonne d'alumine éluée par du dichlorométhane puis par un mélange dichlorométhane/méthanol (98/2, v/v) pour conduire au composé **64** (517 mg, 180 μ mol).

Aspect : cire jaune

Rendement : 75%

R_f (Al₂O₃, dichlorométhane/méthanol, 98/2, v/v) : 0,20

RMN ¹H (500,13 MHz, CDCl₃) δ 1,27 (t, 24H, *J* = 7,1 Hz), 1,79-1,89 (m, 8H), 2,43 (m, 4H), 2,53 (m, 8H), 2,71 (m, 8H), 3,26 (q, 2H, *J* = 6,1 Hz), 3,33 (t, 2H, *J* = 5,1 Hz), 3,50-3,70 (m, ca. 176H), 3,94 (s, 2H), 3,96-4,10 (m, 16H), 7,06 (t, 1H, *J* = 5,3 Hz)

RMN ¹³C (125,76 MHz, CDCl₃) δ 16,5 (d, 8C, ³J_{C-P} = 6,0 Hz), 23,2 (d, 4C, ¹J_{C-P} = 137,5 Hz), 36,8, 46,8 (4C), 50,7 (2C), 51,3 (2C), 52,9 (2C), 53,6, 61,6 (d, 8C, ²J_{C-P} = 6,5 Hz), 70,0, 70,40-70,90 (m, ca. 88C), 169,7

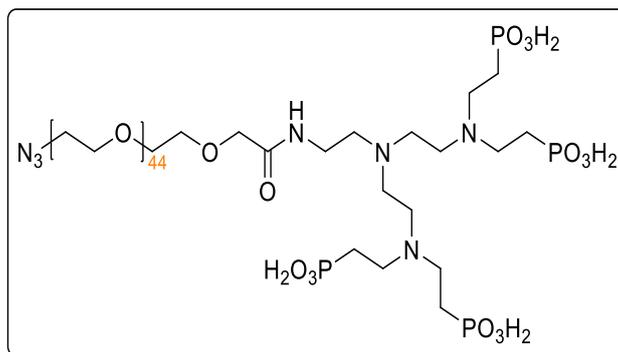
RMN ³¹P (202,6 MHz, CDCl₃) δ 30,3

IR (ATR, cm⁻¹) ν 2884, 2100, 1673, 1466, 1359, 1342, 1279, 1240, 1147, 1105, 1059, 1026, 957

MALDI-TOF *m/z* calculée pour C₁₂₂H₂₅₂N₇O₅₈P₄ [M+H]⁺ : 2867,594, trouvée : 2867,716

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

Synthèse du α - (2-((bis(2-(bis((phosphono)éthyl)amino)éthyl)amino)éthyl)amino-2-oxoéthoxy)- ω -azido-poly(oxyéthane-1,2-diyl)₍₂₀₀₀₎ (L13)



À une solution d'ester **64** (161 mg, 56 μ mol, 1 éq.) dans le dichlorométhane anhydre (2,5 mL) portée à 0 °C est ajouté sous argon le bromotriméthylsilane (120 μ L, 909 μ mol, 16 éq.). La solution est agitée en revenant lentement à température ambiante pendant 16 h. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite puis le résidu est repris dans le méthanol (6 mL) et la solution est agitée à température ambiante pendant 1 h. Après évaporation sous pression réduite, le résidu obtenu est trituré dans l'éther diéthylique (3 x 5 mL). Le précipité formé est séché sous pression réduite pour conduire au composé **L13** (147 mg, 56 μ mol).

Aspect : solide blanc cassé

Rendement : 99%

RMN ¹H (500,13 MHz, D₂O/acétone, 9/1, v/v) δ 2,10-2,28 (m, 8H), 3,00 (t, 2H, $J = 6,1$ Hz), 3,29 (m, 4H), 3,40-3,55 (m, 16H), 3,55-3,75 (m, ca. 178H), 4,08 (s, 2H)

RMN ¹³C (125,76 MHz, D₂O/acétone, 9/1, v/v) δ 23,3 (d, 4C, ¹J_{C-P} = 132,8 Hz), 36,0, 49,7 (2C), 49,9 (4C), 50,8 (2C), 51,5 (4C), 52,8, 70,6, 70,80-71,10 (m, ca. 85C), 71,7, 174,5

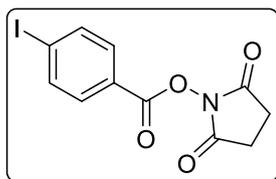
RMN ³¹P (202,6 MHz, D₂O) δ 20,0

IR (ATR, cm⁻¹) ν 2882, 2101, 1646, 1466, 1359, 1342, 1279, 1241, 1146, 1102, 1060, 945

MALDI-TOF m/z calculée pour C₁₀₆H₂₂₀N₇O₅₈P₄ [M+H]⁺ : 2643,343, trouvée : 2644,041

Synthèse du 4-iodobenzoate de succinimidyle (**65**)

Synthèse inspirée de Shell, A. T. et al³¹¹



³¹¹ Shell, T. A.; Mohler, D. L. Selective targeting of DNA for cleavage within DNA-histone assemblies by a spermine-[CpW(CO)3Ph]₂ conjugate. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3(17):3091-3093.

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

À une solution d'acide 4-iodobenzoïque (1,00 g, 4,03 mmol, 1 éq.) dans le dichlorométhane anhydre (100 mL) et sous argon sont ajoutés successivement le *N*-hydroxysuccinimide (464 mg, 4,03 mmol, 1 éq.) puis le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (773 mg, 4,03 mmol, 1 éq.). La solution est agitée à température ambiante pendant 2 h 30. Le milieu réactionnel est lavé successivement par une solution aqueuse d'acide citrique à 5% (30 mL), une solution aqueuse de bicarbonate de sodium à 10% (2 x 30 mL) puis de l'eau déionisée (3 x 30 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée sous pression réduite pour conduire au composé **65** (1,08 g, 3,13 mmol).

Aspect : solide blanc

Point de fusion : 236-237 °C (Litt.³¹² : 134-139 °C)

Rendement : 78%

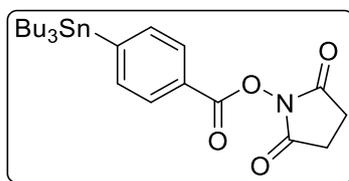
RMN ¹H (200,13 MHz, DMSO-d₆) δ 2,89 (m, 2H), 7,82 (d, 4H, *J* = 8,3 Hz), 8,05 (d, 4H, *J* = 8,3 Hz)

RMN ¹³C (50,32 MHz, DMSO-d₆) δ 25,7 (2C), 105,1, 124,0, 131,5 (2C), 138,8 (2C), 161,8, 170,4 (2C)

IR (ATR, cm⁻¹) ν 1768, 1721, 1584, 1205, 1075, 1049, 987

HRMS *m/z* calculée pour C₁₁H₈INNaO₄ [M+Na]⁺ : 367,9390, trouvée : 367,9392

Synthèse du 4-(tributylstannyl)benzoate de succinimidyle (**66**)



À une solution de 4-iodobenzoate de succinimidyle **65** (300 mg, 869 μmol, 1 éq.) dans le toluène anhydre (10 mL) et sous argon est ajouté l'hexaméthyl-diétain (880 μL, 1,74 mmol, 2 éq.). La solution est dégazée sous argon pendant 10 minutes puis est ajouté le tétrakis(triphénylphosphine)palladium(0) (20 mg, 17 μmol, 0,02 éq.) et la solution est agitée à reflux pendant 5 h. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite et le résidu est purifié sur colonne de silice éluée par du dichlorométhane pour conduire au composé **66** (387 mg, 761 μmol).

Aspect : huile incolore

Rendement : 88%

R_f (SiO₂, dichlorométhane) : 0,23

RMN ¹H (200,13 MHz, CDCl₃) δ 0,88 (t, 9H, *J* = 7,2 Hz), 1,09 (m, 6H), 1,20-1,70 (m, 12H), 2,89 (s, 4H), 7,62 (d, 2H, *J* = 8,2 Hz, *J*_{H-¹¹⁹Sn} = 35,6 Hz, ³*J*_{H-¹¹⁷Sn} = 34,1 Hz), 8,03 (d, 2H, *J* = 8,2 Hz)

³¹² Edem, P. E.; Czorny, S.; Valliant, J. F. Synthesis and evaluation of radioiodinated acyloxymethyl ketones as activity-based probes for cathepsin B. *J. Med. Chem.* **2014**, 57(22):9564-9577.

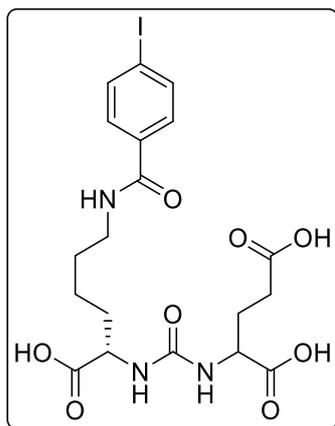
ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

RMN ^{13}C (50,32 MHz, CDCl_3) δ 9,9 (3C, $J_{\text{C}-^{119}\text{Sn}} = 343$ Hz, $J_{\text{C}-^{117}\text{Sn}} = 328$ Hz), 13,8 (3C), 25,8 (2C), 27,4 (3C, $J_{\text{C}-^{117}\text{Sn}/^{119}\text{Sn}} = 56$ Hz), 29,1 (3C, $J_{\text{C}-^{117}\text{Sn}/^{119}\text{Sn}} = 21$ Hz), 124,5, 129,2 (2C, $J_{\text{C}-^{117}\text{Sn}/^{119}\text{Sn}} = 38$ Hz), 136,9 (2C, $J_{\text{C}-^{117}\text{Sn}/^{119}\text{Sn}} = 30$ Hz), 153,3, 162,4, 169,5 (2C)

IR (ATR, cm^{-1}) ν 2955, 2922, 2870, 2851, 1770, 1739, 1254, 1233, 1201, 1068, 994

HRMS m/z calculée pour $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{NO}_4\text{Sn}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 510,1661, trouvée : 510,1666

Synthèse de l'acide (S)-2-(3-((S)-1-carboxy-5-(4-iodobenzamido)pentyl)uréido)pentanedioïque (67)



À une solution de trifluoroacétate de l'acide (2S)-2-(3-((S)-5-amino-1-carboxypentyl)uréido)pentanedioïque **58.TFA** (188 mg, 434 μmol , 1 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (1 mL) et sous argon sont ajoutées successivement la *N,N*-diisopropyléthylamine (370 μL , 2,17 mmol, 5 éq.) puis, après 5 minutes, le 4-iodobenzoate de succinimidyle (150 mg, 435 μmol , 1 éq.). La solution est agitée à température ambiante pendant 25 h. Le milieu réactionnel est dilué par ajout d'eau déionisée (1 mL) puis est purifié par CLHP préparative éluee par un mélange acétonitrile/eau (0,1% TFA), 10/90, v/v, élution isocratique sur 2,5 min, 10/90 \rightarrow 100/0, v/v, élution par gradient linéaire sur 32,5 min, $t_R = 21,0$ min, $\lambda = 220$ et 254 nm pour conduire, après lyophilisation, au composé **67** (125 mg, 228 μmol).

Aspect : solide blanc cassé

Rendement : 52%

RMN ^1H (200,13 MHz, CD_3OD) δ 1,30-2,00 (m, 7H), 2,20-2,30 (m, 1H), 2,41 (m, 2H), 3,33 (t, 2H, $J = 6,6$ Hz), 4,30 (m, 2H), 7,55 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz), 7,82 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz)

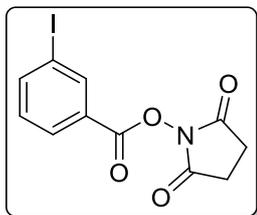
RMN ^{13}C (50,32 MHz, CD_3OD) δ 24,0, 28,8, 29,9, 31,1, 33,1, 40,8, 50,3, 53,5, 99,0, 130,0 (2C), 135,2, 138,8 (2C), 160,1, 169,4, 175,9, 176,5 (2C)

IR (ATR, cm^{-1}) ν 3450-3200, 3200-2700, 2700-2300, 1706, 1629, 1588, 1545, 1410, 1304, 1211, 1175, 1115

HRMS m/z calculée pour $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{IN}_3\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 550,0681, trouvée : 550,0685

Synthèse du 3-iodobenzoate de succinimidyle (**68**)

Ce composé a été obtenu selon la synthèse adaptée de Bohjani, M. S. *et al*³¹³



À une solution d'acide 3-iodobenzoïque (1,09 g, 4,39 mmol, 1 éq.) dans l'acétonitrile anhydre (60 mL) et sous argon sont ajoutés successivement la pyridine anhydre (427 μ L, 5,28 mmol, 1,2 éq.) puis le carbonate de *N,N'*-disuccinimidyle (1,35 g, 5,27 mmol, 1,2 éq.). La solution est agitée à température ambiante pendant 6 h. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite puis le résidu est repris dans le dichlorométhane (100 mL) puis est lavé successivement par une solution aqueuse d'acide citrique à 5% (30 mL), une solution aqueuse de bicarbonate de sodium à 5% (2 x 30 mL) puis de l'eau déionisée (3 x 30 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée sous pression réduite pour conduire au composé **65** (1,14 g, 3,30 mmol).

Aspect : solide blanc

Point de fusion : 143-145 °C (Litt.³¹³ : 147-148 °C)

Rendement : 75%

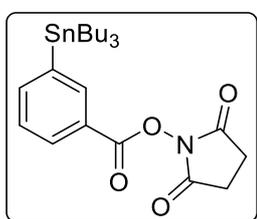
RMN ¹H (200,13 MHz, CDCl₃) δ 2,90 (s, 2H), 7,26 (t, 1H, *J* = 7,7 Hz), 8,00 (d, 1H, *J* = 7,7 Hz), 8,09 (d, 1H, *J* = 7,7 Hz), 8,44 (s, 1H)

RMN ¹³C (50,32 MHz, CDCl₃) δ 25,7 (2C), 94,1, 126,9, 129,6, 130,5, 139,0, 143,7, 160,5, 169,2 (2C)

IR (ATR, cm⁻¹) ν 1773, 1726, 1228, 1203, 1066, 1047, 1005, 991

HRMS *m/z* calculée pour C₁₁H₈INNaO₄ [M+Na]⁺ : 367,9390, trouvée : 367,9394

Synthèse du 3-(tributylstannyl)benzoate de succinimidyle (**69**)



À une solution de 3-iodobenzoate de succinimidyle **65** (325 mg, 942 μ mol, 1 éq.) dans le toluène anhydre (10 mL) et sous argon est ajouté l'hexaméthyl-diétain (952 μ L, 1,88 mmol,

³¹³ Bohjani, M. S.; Ranga, R.; Luker, G. D.; Rehemtulla, A.; Ross, B. D.; Van Dort, M. E. Synthesis and investigation of radioiodinated F3 peptide analog as a SPECT tumor imaging radioligand. *PLoS One* **2011**, 6(7):e22418.

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

2 éq.). La solution est dégazée sous argon pendant 10 minutes puis est ajouté le tétrakis(triphénylphosphine)palladium(0) (22 mg, 19 μmol , 0,02 éq.) et la solution est agitée à reflux pendant 6 h 30. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite et le résidu est purifié sur colonne de silice éluée par un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (2/8, v/v) pour conduire au composé **69** (304 mg, 598 μmol).

Aspect : huile incolore

Rendement : 64%

R_f (SiO₂, cyclohexane/acétate d'éthyle, 2/8, v/v) : 0,31

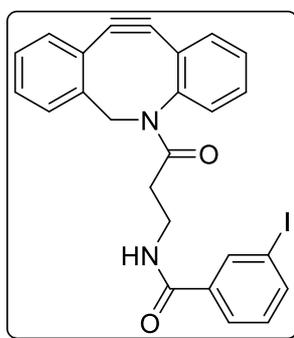
RMN ¹H (200,13 MHz, CDCl₃) δ 0,88 (t, 9H, $J = 7,1$ Hz), 1,09 (m, 6H), 1,20-70 (m, 12H), 2,89 (s, 4H), 7,44 (t, 1H, $J = 7,5$ Hz), 7,76 (d, 1H, $J = 7,2$ Hz, $J_{\text{H-}^{117}\text{Sn}/^{119}\text{Sn}} = 34,8$ Hz), 8,05 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz), 8,19 (s, 1H, $J_{\text{H-}^{117}\text{Sn}/^{119}\text{Sn}} = 40,8$ Hz)

RMN ¹³C (50,32 MHz, CDCl₃) δ 9,7 (3C, $J_{\text{C-}^{119}\text{Sn}} = 347$ Hz, $J_{\text{C-}^{117}\text{Sn}} = 332$ Hz), 13,7 (3C), 25,8 (2C), 27,4 (3C, $J_{\text{C-}^{117}\text{Sn}/^{119}\text{Sn}} = 55,7$ Hz), 29,0 (3C, $J_{\text{C-}^{117}\text{Sn}/^{119}\text{Sn}} = 20,4$ Hz), 124,5, 128,1 (1C, $J_{\text{C-}^{117}\text{Sn}/^{119}\text{Sn}} = 35,4$ Hz), 130,1, 138,2, 143,0, 143,6, 162,5, 169,5 (2C)

IR (ATR, cm⁻¹) ν 2955, 2923, 2871, 2851, 1770, 1739, 1231, 1201, 1067, 1006

HRMS m/z calculée pour C₂₃H₃₆NO₄Sn [M+H]⁺ : 510,1661, trouvée : 510,1665

Synthèse du *N*-(3-(3-iodobenzamido)propionyl)-5,6-dihydro-11,12-didéhydrodibenzo[*b,f*]azocine (**70**)



À une solution de *N*-(3-aminopropionyl)-5,6-dihydro-11,12-didéhydrodibenzo[*b,f*]azocine **35** (122 mg, 441 μmol , 1 éq.) dans le *N,N*-diméthylformamide anhydre (1 mL) et sous argon sont ajoutées successivement la *N,N*-diisopropyléthylamine (150 μL , 861 μmol , 2 éq.) puis, après 5 minutes, le 3-iodobenzoate de succinimidyle (152 mg, 435 μmol , 1 éq.). La solution est agitée à température ambiante pendant 24 h. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite. Le résidu est purifié sur colonne de silice éluée par un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (70/30, v/v, puis 50/50, v/v) pour conduire au composé **70** (137 mg, 271 μmol).

Aspect : solide blanc cassé

Point de fusion : 76-78 °C

Rendement : 61%

ANNEXE IV. Protocoles de synthèses

R_f (SiO₂, cyclohexane/acétate d'éthyle, 3/7, v/v) : 0,08

RMN ¹H (200,13 MHz, CDCl₃) δ 2,06 (ddd, 1H, J = 16,6, 7,3, 4,1 Hz), 2,53 (ddd, 1H, J = 16,6, 6,8, 4,3 Hz), 3,30-3,60 (m, 2H), 3,67 (d, 1H, J = 13,8 Hz), 5,12 (d, 1H, J = 13,8 Hz), 6,78 (t, 1H, 5,7 Hz), 7,06 (t, 1H, J = 8 Hz), 7,12 (d, 1H, J = 7,3 Hz), 7,20-7,50 (m, 7H), 7,66 (d, 1H, J = 7,1 Hz), 7,76 (d, 1H, J = 7,9 Hz), 7,95 (t, 1H, J = 1,5 Hz)

RMN ¹³C (50,32 MHz, CDCl₃) δ 34,7, 35,9, 55,6, 94,2, 107,7, 114,8, 122,5, 122,8, 125,7, 126,1, 127,3, 127,9, 128,3, 128,5, 128,6, 129,0, 130,1, 132,1, 136,1, 136,4, 140,1, 147,9, 150,9, 165,6, 172,3

IR (ATR, cm⁻¹) ν 3450-3200, 2924, 1640, 1558, 1523, 1480, 1466, 1432, 1396, 1285, 1228, 1204

HRMS m/z calculée pour C₂₅H₂₀N₂O₂ [M+H]⁺ : 507,0564, trouvée : 507,0572

Annexe V. Caractérisation par RMN ^1H et ^{13}C du composé ADIBO-KuE3

Les signaux caractéristiques des protons $\text{H}_{6''}$ de l'ADIBO et des protons H_2 et $\text{H}_{1'}$ du ligand KuE ont servi de base à la caractérisation structurale de ce composé (cf. Figure 163).

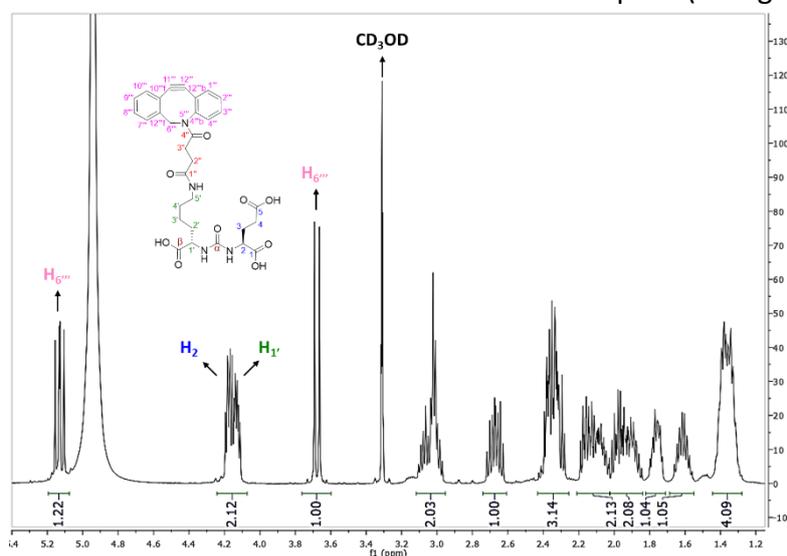


Figure 163 : spectre RMN ^1H du composé ADIBO-KuE3 centré sur les protons aliphatiques

Sachant que les protons portés par une chaîne aliphatique présentent un faible déplacement en RMN ^1H , le premier multiplet (δ 1,28-1,45) a pu être attribué aux protons portés par les carbones $3'$ et $4'$ du ligand KuE. L'attribution des autres protons a été réalisée par l'utilisation d'une séquence COSY. Cette séquence permet de corréliser les protons entre eux par leurs constantes de couplage, jusqu'à 3 liaisons, et ainsi de remonter les chaînes aliphatiques de la lysine et du glutamate (cf. Figure 164). Il a été ainsi possible d'attribuer tous les protons aliphatiques du conjugué ADIBO-KuE3.

ANNEXE V. Caractérisation par RMN ^1H et ^{13}C du composé ADIBO-KuE3

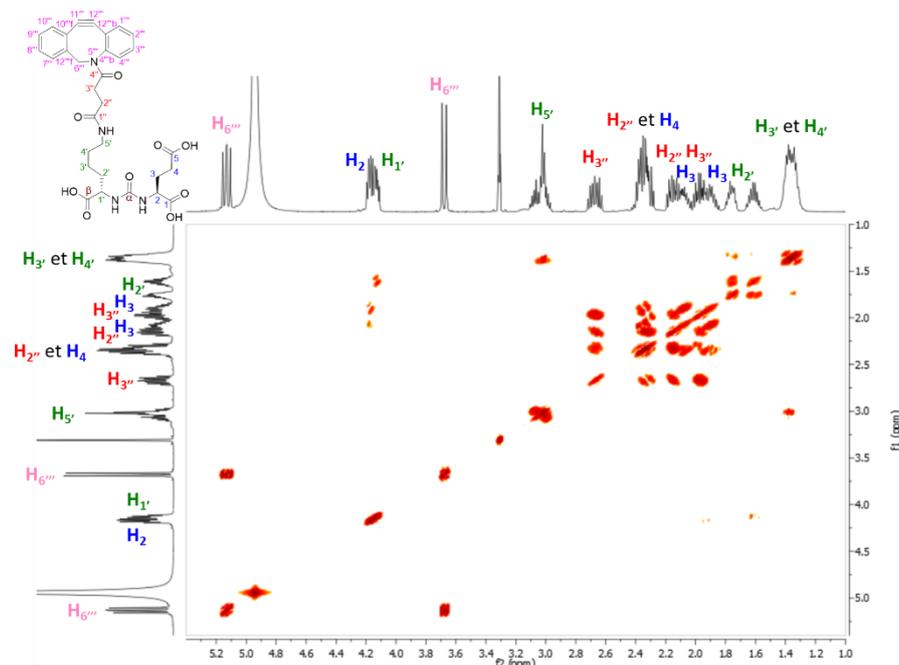


Figure 164 : spectre RMN ^1H - ^1H COSY du composé ADIBO-KuE3 centré sur les protons aliphatiques

De façon similaire, grâce aux spectres RMN ^1H et COSY, il a été possible de caractériser la majorité des protons portés par les cycles benzéniques de l'ADIBO (à l'exception des protons $\text{H}_{1''}$, $\text{H}_{3''}$ et $\text{H}_{4''}$ présentant un signal sous forme de multiplet, cf. Figure 165).

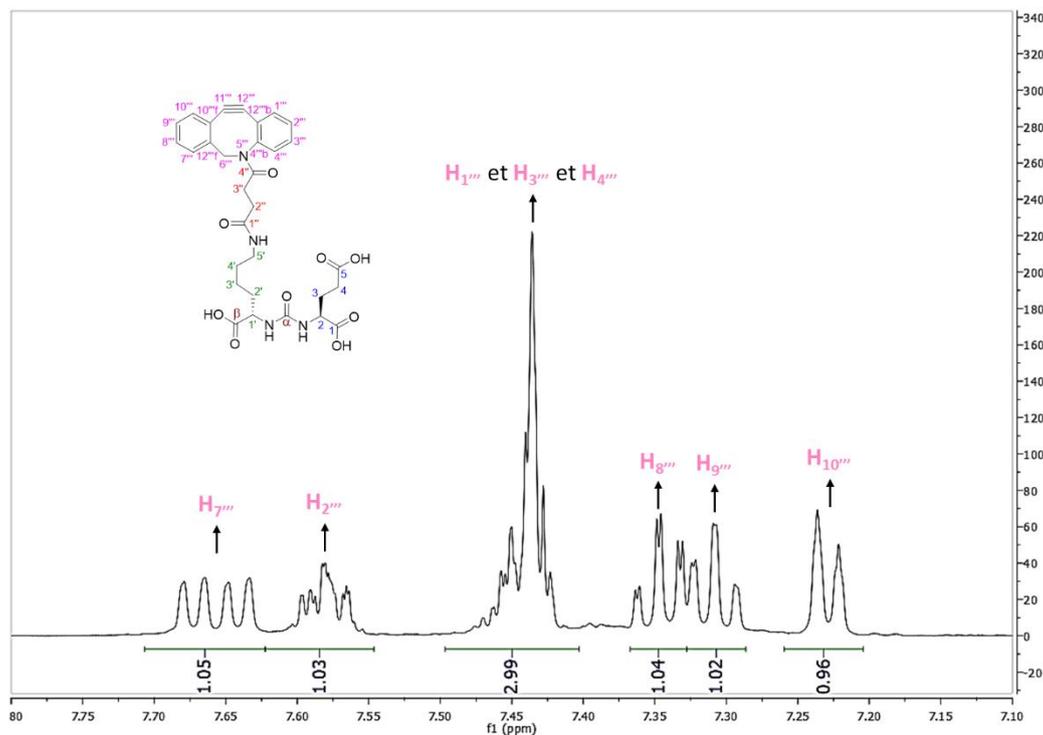


Figure 165 : spectre RMN ^1H du composé ADIBO-KuE1 centré sur les protons aromatiques

L'attribution des carbones a nécessité la réalisation d'une acquisition Jmod. Cette séquence permet d'identifier les carbones CH et CH₃ d'une part et les carbones CH₂ et quaternaires d'autre part (cf. Figure 166).

ANNEXE V. Caractérisation par RMN ^1H et ^{13}C du composé ADIBO-KuE3

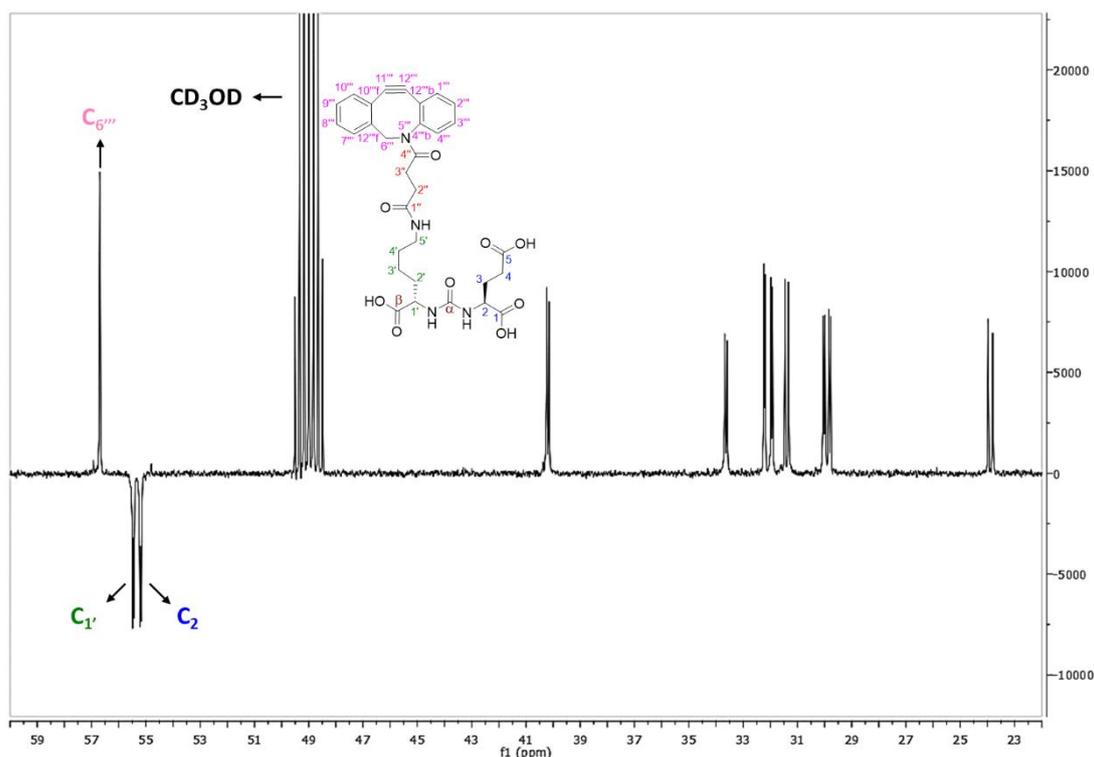


Figure 166 : spectre RMN ^{13}C jmod du composé ADIBO-KuE1 centré sur les carbones aliphatiques

Cette analyse nous a permis, d'attribuer les carbones $\text{C}_{1'}$ et C_2 (CH de la lysine et du glutamate) des chaînes aliphatiques ainsi que le carbone $\text{C}_{6'''}$ de l'ADIBO. Tout comme l'attribution des protons, cette séquence n'a toutefois pas été suffisante pour caractériser l'ensemble des atomes de carbones de la molécule. Il a donc été nécessaire de réaliser des expériences en deux dimensions ^1H - ^{13}C de type HSQC et HMBC. La séquence HSQC (cf. Figure 167) est basée sur les constantes $^1J_{\text{H-C}}$ tandis que la séquence HMBC s'appuie, quant à elle, sur les constantes à longue distance $^{2-4}J_{\text{H-C}}$ (cf. Figure 168).

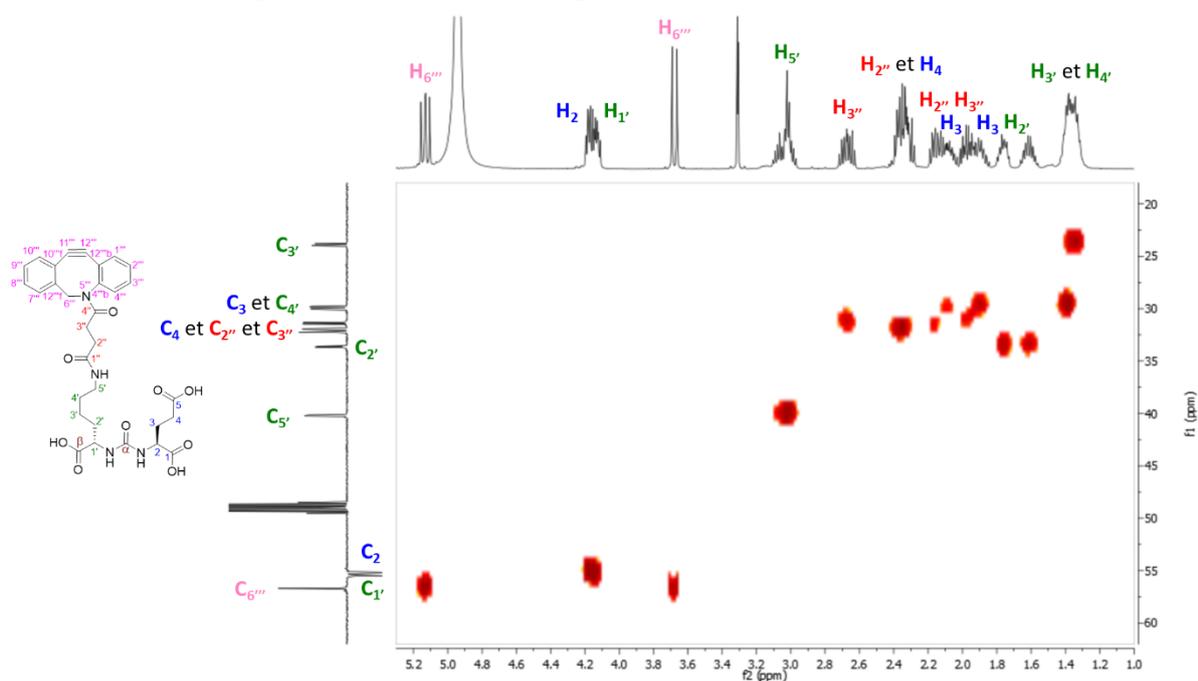


Figure 167 : spectre RMN ^1H - ^{13}C HSQC du composé ADIBO-KuE3 centré sur la zone aliphatique

ANNEXE V. Caractérisation par RMN ^1H et ^{13}C du composé ADIBO-KuE3

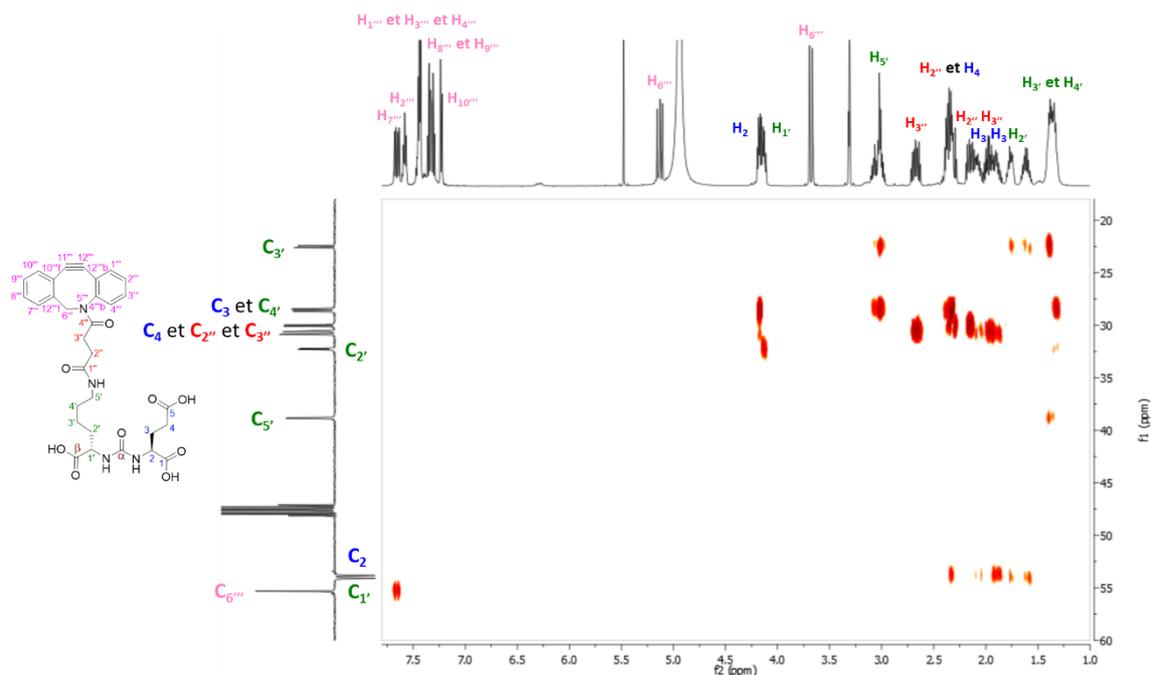


Figure 168 : spectre RMN ^1H - ^{13}C HMBC du composé ADIBO-KuE3 centré sur la zone aliphatique

L'ensemble de ces deux types d'acquisition a permis d'attribuer la totalité des carbones des chaînes aliphatiques de la molécule avec une grande précision.

La caractérisation de la partie aromatique de la molécule (y compris les carbonyles) a été plus complexe, et la totalité des carbones n'a pas pu être attribuée avec certitude en raison d'une trop faible définition des séquences 2D.

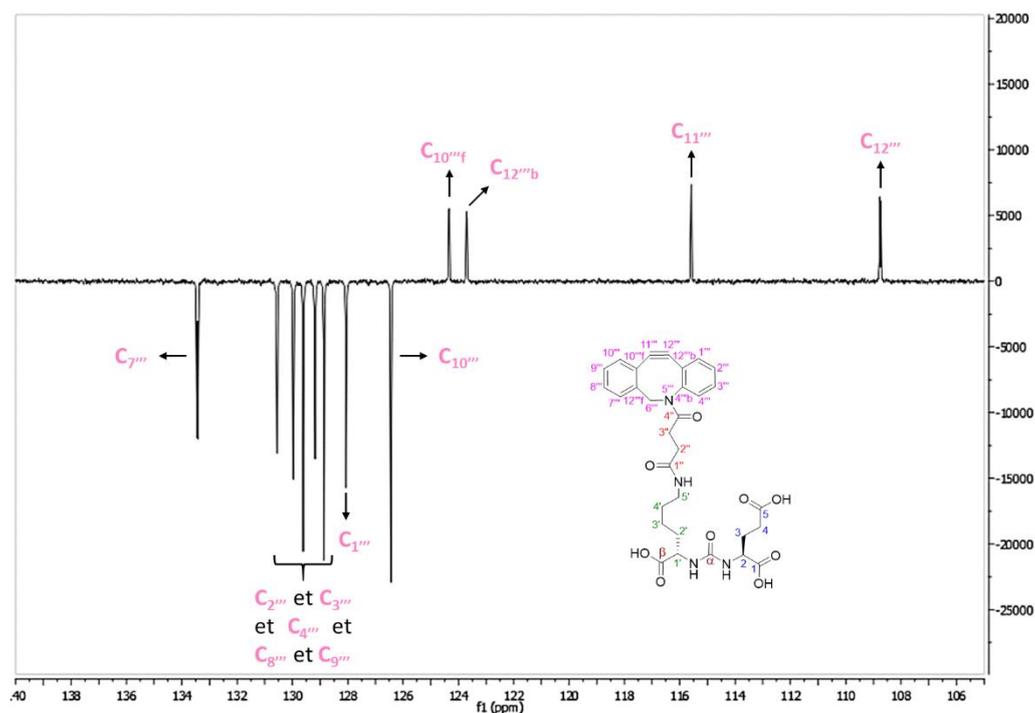


Figure 169 : spectre RMN ^{13}C du composé ADIBO-KuE3 centré sur les carbones aromatiques

ANNEXE V. Caractérisation par RMN ^1H et ^{13}C du composé ADIBO-KuE3

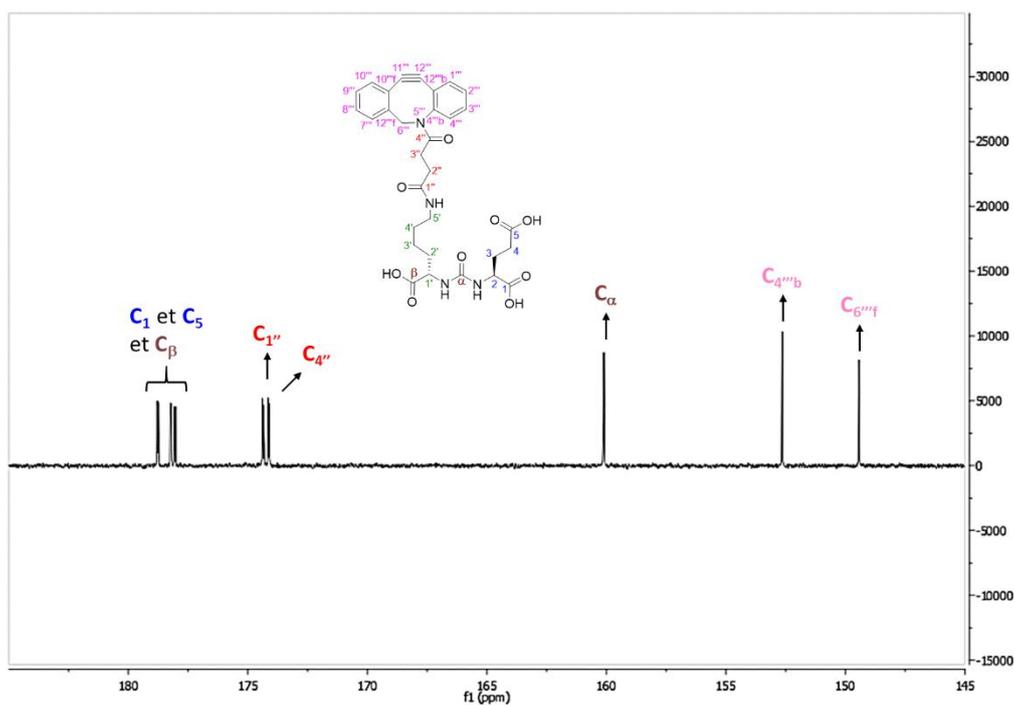


Figure 170 : spectre RMN ^{13}C du composé ADIBO-KuE3 centré sur les carbones aromatiques et carbonyles

Annexe VI. Hydrophilisation des UCNPs

Les UCNPs $\text{NaY}_{0,78}\text{F}_4:\text{Yb}_{0,20},\text{Tm}_{0,02}@ \text{NaYF}_4$ préalablement passées aux US (30 min) et filtrées sur un filtre PTFE 0,20 μm sont évaporées sous pression réduite et pesées. Au résidu est ajouté le PEG ($m_{\text{NPs}} \times 10$) puis le tout est repris dans le tétrahydrofurane anhydre (5 mL) et sous argon. La solution est agitée à 40 °C en ballon scellé pendant 16 h.

Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est transféré dans un tube en téflon et les UCNPs sont précipitées par ajout de cyclohexane, vortexées puis centrifugées (7499 g, 40 min, 22 °C). Après élimination du surnageant, le culot est suspendu dans le tétrahydrofurane (5 mL) et les UCNPs sont précipitées par ajout de cyclohexane (40 mL), vortexées puis centrifugées (7499 g, 40 min, 22 °C). Après élimination du surnageant, le culot est séché sous flux d'air et les nanoparticules sont reprises dans l'eau déionisée puis la suspension est transférée dans un tube AMICON (15 mL, membrane 30 kDa) puis est centrifugée (4000 g, 17 min, 22 °C) et l'opération est reproduite une fois supplémentaire.

Le reliquat est repris dans l'eau déionisée à une concentration de 10 mg/mL en considérant la masse de NPs initiale et conservées à 4 °C.

Annexe VII. Synthèses radiochimiques

Le [¹²⁵I]NaI (3,70 GBq/mL, 643,8 MBq/mg) dans une solution aqueuse d'hydroxyde d'ammonium (1,0 x 10⁻⁵ M, pH 8-11) a été acheté chez PerkinElmer, inc. Les cartouches Sep-Pack light C₁₈ et Chromafix dry (Na₂SO₄) ont été achetée respectivement chez Waters et Macherey-Nagel. Les chromatographies d'exclusion de taille ont été réalisées sur des colonnes PD-10 prépackées (Sephadex™ G-25M, GE Healthcare Life Sciences). Les radiochromatographies sur couche mince ont été analysées avec un appareil miniGITA Dual radio-TLC (Elysia-Raytest).

Les CLHP analytiques ont été réalisées sur un appareil Agilent HP series 1100 (Hewlett Packard), combiné à un détecteur de radioactivité Flow one A500 (Radiomatic Detector Packard). Les séparations ont été réalisées sur une colonne C₁₈ (zorbax 80 Å, 5 µm, 4,6 x 150 mm, Agilent). Les courbes de calibration permettant de déterminer les activités molaires ont été réalisées par CLHP analytique aux longueurs d'ondes d'absorption maximale des composés considérés (268 nm pour [¹²⁵I]65, 250 nm pour [¹²⁵I]67, 232 nm pour [¹²⁵I]68 et 240 nm pour [¹²⁵I]70).

Les CLHP semi-préparatives ont été réalisées sur un appareil Perkin Elmer, constitué d'un injecteur Flexar LC, d'une pompe Series 200, d'un dégazeur à vide, d'un four à colonne Peltier, d'un détecteur à barette de diodes (PDA), couplé à un détecteur de radioactivité γ Gabi Star (Raytest). Les séparations ont été réalisées sur une colonne C₁₈ (zorbax 80 Å, 5 µm, 4,6 x 150 mm, Agilent).

Annexe VIII. Couplage des ligands sur les UCNPs

À une solution de nanoparticules dans l'eau déionisée (10 mg/mL) est ajoutée une solution de conjugué **ADIBO-KuE2**, **-KuE3** ou **-KuE4** dans l'eau déionisée ou de composé **39** dans le DMSO ($n_{N_3} \times 5$, 100 nmol/ μ L). Lorsque nécessaire une solution de DBCO-PEG4-5/6-FAM commercial (ADIBO-FL, $\lambda_{exc} = 492$ nm, $\lambda_{em} = 517$ nm) dans le DMSO (4 nmol/ μ L) est ajoutée à hauteur de 0,5 mol% à la solution de conjugué ADIBO précédent. Le milieu réactionnel est porté à 37 °C pendant 16 h. Après retour à température ambiante, la solution est transférée sur une colonne d'exclusion de taille PD10 préalablement lavée par de l'eau déionisée puis la colonne est éluée par de l'eau déionisée. Chaque fraction (10 gouttes) est déposée sur une plaque CCM révélée au réactif de Dragendorff. Les fractions d'intérêt sont réunies et transférées dans un tube AMICON (15 mL, membrane 30 kDa) puis ce dernier est centrifugé (4000 g, 17 min, 22 °C). Le résidu est transféré dans un autre AMICON et l'opération est reproduite une fois (UCNP@N₃(10%)) ou deux fois supplémentaires (UCNP@N₃(100%)). Le résidu est repris dans l'eau déionisée à une concentration de 10 mg/mL en considérant la masse de nanoparticules initiale et conservées à 4 °C.

Annexe IX. Études *in vitro*

Les lignées de cellules humaines de cancer de la prostate LNCaP-Luc (PSMA positives) et PC3-Luc (PSMA négatives) ont été achetées chez Perkin Elmer (Villebon sur Yvette, France). Les lignées de fibroblastes humains ont été obtenues chez Promocell (Heidelberg, Allemagne). Les cellules LNCaP-Luc ont été cultivées dans du milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal et 4 µg/mL de gentamycine. Les cellules PC3-Luc ont été cultivées dans du milieu MEM supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal et 2 µg/mL de puromycine. Les fibroblastes ont été cultivés dans du milieu MEM supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal, 1 % d'acides aminés non essentiels, 1 mM de pyruvate de sodium, 1 % de vitamines et 4 µg/mL de gentamycine. Les cellules ont été incubées à 37 °C (5% CO₂).

Les études de cytotoxicité ont été réalisées sur les lignées LNCaP-Luc et PC3-Luc. Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 24 puits à hauteur de 3×10^4 cellules par puits puis incubées à 37 °C (5% CO₂) pendant 48 h. Le milieu de culture a été remplacé par du milieu de culture frais contenant des UCNPs en concentration croissante (0,17 µg/mL à 1,7 mg/mL). Les cellules ont été incubées à 37 °C (5% CO₂) pendant 1 h et 24 h. Les milieux de culture ont été éliminés puis les cellules des deux lignées cellulaires ont été mises en présence de résazurine (800 µL d'une solution à 25 µg/mL) et incubées à 37 °C pendant 1 h. La fluorescence de chaque puits a été mesurée dans un lecteur de microplaques (Fluoroskan, Labsystems, λ_{exc} = 530 nm, λ_{em} = 590 nm).

Les études d'inhibition compétitive ont été réalisées sur lignée LNCaP-Luc. Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 24 puits à hauteur de 15×10^4 cellules par puits puis incubées pendant 24 h. Après élimination du milieu de culture, le tapis cellulaire a été lavé par du tampon (RPMI 1640 supplémenté à 0,5% en albumine de sérum bovin). À ces cellules a été ajouté un mélange du composé [¹²⁵I]67 (0,45 nM) et (i) de chaque conjugué **ADIBO-KuE** en concentrations croissantes (1 nM à 10 µM), (ii) de PMPA (1 nM – 10 µM) ou (iii) d'UCNP@**ADIBO-KuE** (0,00017 à 1,7 mg) dans un volume de tampon de 300 µL. Après 1 h d'incubation à 37 °C, le surnageant a été éliminé puis les cellules ont été successivement rincées avec du tampon (300 µL), lysées avec du tampon RIPA (50 mM Tris, pH 7,5 ; 150 mM NaCl ; 1% NP-40 ; 0,5% déoxycholate de sodium ; 0,1% SDS), rincées avec du PBS (1 mL) et comptées dans un appareil 1480 WIZARD Automatic Gamma Counter (Perkin Elmer). Chaque concentration a été étudiée en triplicata.

Les analyses de CMF sur les UCNPs ont été réalisées sur les cellules LNCaP-Luc. Environ 5×10^5 cellules ont été incubées avec les UCNP@**ADIBO-KuE/FL** (100 µL, 6 mg/mL) dans leur milieu de culture respectif à 4 °C pendant 30 min. Les cellules ont été lavées puis centrifugées (500 g, 5 min, 4 °C) trois fois avec une solution constituée de 95 µL d'un mélange de PBS et de sérum de veau fœtal (98/2, v/v, mélange A). Les culots ont été suspendus dans le mélange A (200 µL) puis analysés par cytométrie en flux.

ANNEXE IX. Études in vitro

Les études de captation cellulaire ont été réalisées sur les lignées LNCaP-Lucensemencées à hauteur de 5×10^5 cellules par tube. Les cellules ont été mises en présence de 18,5 kBq d' $[^{125}\text{I}]\text{UCNP@ADIBO-KuE}$ ou d' $\text{UCNP@39}/[^{125}\text{I}]\mathbf{70}$ dans le milieu de culture puis ont été incubées à 37 °C (5% CO_2) pendant 5 min, 30 min, 1 h ou 3 h. Après centrifugation (450 g, 5 min), les cellules ont été lavées par du PBS puis comptées dans un appareil 1480 WIZARD Automatic Gamma Counter (Perkin Elmer).

Annexe X. Études *in vivo*

L'ensemble des expérimentations *in vivo* a été effectué en conformité avec les directives européennes 2010/63/UE et autorisé par le ministère français de la recherche après approbation du comité d'éthique local (autorisation n° 18209). Les études *in vivo* ont été réalisées sur des souris NMRI nude mâles âgées de 4 semaines, provenant du laboratoire Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). Les animaux ont été hébergés dans des conditions standard (5 souris par cage sur des portoirs ventilés, à 24 °C et une hygrométrie de 60%, suivant un cycle jour/nuit de 12 h/12 h) avec un accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum*. Les xénogreffes ont été réalisées par injection sous-cutanée de 10 millions de cellules suspendues dans un mélange PBS/Matrigel (matrice de membrane basale Corning® Matrigel®, 1/1, v/v) dans le flanc droit des animaux. L'étude de biodistribution et d'imagerie ont été réalisées 71 jours après inoculation des tumeurs, lorsque ces dernières ont atteint un volume moyen de 500 mm³. Pour ces deux études, 200 µL de [¹²⁵I]UCNPs@CO₂H_(10%) et [¹²⁵I]UCNPs@KuE_{2(10%)}, formulées dans le sérum physiologique (1,85 et 24,5 MBq/mL, soit 370 kBq et 4,9 MBq, respectivement), ont été injectés dans la veine de la queue.

Résumé

Le cancer de la prostate est un problème majeur de santé publique, avec plus de 1 million de cas estimés en 2018 dans le monde. La principale stratégie thérapeutique repose sur l'exérèse de la prostate, approche toutefois limitée par un nombre important de marges positives (21 à 37%) augmentant le risque de rechute biologique. Une stratégie prometteuse pour améliorer l'efficacité de la résection tumorale consisterait à guider le geste chirurgical au moyen de sondes fluorescentes et/ou radiomarquées, dirigées vers des antigènes surexprimés par les cellules cancéreuses, et pouvant être détectées par imagerie de fluorescence et/ou radiodétection.

Dans ce but des nanoparticules à conversion ascendante (UCNPs), fluorescentes dans le proche infrarouge, biocompatibles, radiomarquées et susceptibles de cibler l'antigène membranaire spécifique de la prostate (PSMA) ont été développées. L'intérêt de cette stratégie repose sur la nature même des UCNPs étudiées qui peuvent être aisément modulées tant en termes de forme, de taille, d'hydrophilie, d'émission de fluorescence et de fonctionnalisation de surface. Plus précisément, des UCNPs « cœur-coquille » dopées par des terres rares ont été synthétisées puis hydrophilisées par divers ligands phosphate, bis et tétraphosphonate pégylés. Après étude de leur stabilité dans différents milieux aqueux, les UCNPs présentant la meilleure biocompatibilité ont été fonctionnalisées en surface, par chimie click, par divers ligands du PSMA et/ou groupement prosthétique fluorescent ou radiomarqué par l'iode-125. Leur cytotoxicité ainsi que leur capacité à cibler les cellules tumorales par inhibition compétitive et cytométrie en flux ont ensuite été évaluées et les données obtenues ont été corrélées à la nature et à la densité des groupements fonctionnels présents à leur surface. Enfin, une étude préliminaire de biodistribution des UCNPs non vectorisées radiomarquées par l'iode-125 a été réalisée sur modèle murin de cancer de la prostate. Les résultats encourageants obtenus tant en termes de vectorisation active que de stabilité *in vitro* et *in vivo*, ouvrent la voie à des études *in vivo* plus poussées afin d'évaluer leur intérêt pour l'imagerie de fluorescence et/ou la radiodétection per-opératoire des cancers de la prostate.

Mots clés : nanoparticules à conversion ascendante, cancer de la prostate, PSMA, chimie click, imagerie de fluorescence, radiodétection per-opératoire.

Abstract

Prostate cancer is one of the most incident cancers worldwide (over 1 million diagnosed cancers in 2018). Radical prostatectomy remains the most common treatment options. Unfortunately, this therapeutic approach leads to positive margins (21 to 37%), which in turn increase the risk of biological recurrences. In order to help the surgeon to enhance tumour boundary delineation and resection, the use of intraoperative fluorescence and/or radioactive detection using dedicated probes, specifically targeted to antigens overexpressed in prostate cancer cells, seems promising.

Herein, we explored the grafting of small prostate-specific membrane antigen (PSMA)-targeting moieties and radiolabelled prosthetic group onto the surface of biocompatible near-infrared (NIR)-to-NIR upconversion nanoparticles (UCNP) for radio and NIR fluorescence imaging of prostate cancer. The appeal of such a strategy is based on the unique properties of UCNP, whose shape, size, hydrophilicity, and fluorescence properties can be tuned, and which offer an ideal platform for multivalent surface functionalization. More specifically, NIR-to-NIR core-shell UCNP doped with rare-earth were prepared, hydrophilized with several PEGylated phosphate, bis- and tetra-phosphonate moieties, and their colloidal stability in different aqueous media were assessed. The most efficient pegylated nanoparticle was then surface-functionalized with PSMA-targeting ligands, fluorescent dye and/or radionuclide (i.e. iodine-125) through click chemistry. Cytotoxicity and the ability to target cancer cells were evaluated in relation to surface density and nature of the tumour-targeting ligands. The biodistribution of ¹²⁵I-radiolabelled non-targeted UCNP was also determined in prostate cancer mouse models by *ex vivo* organ counting. The encouraging preliminary results obtained in this study pave the way for further preclinical evaluations to explore the potential of such tumour-targeted UCNP for dual radio/fluorescence image-guided surgery of prostate cancers.

Key words: upconverting nanoparticles, prostate cancer, PSMA, click chemistry, fluorescence imaging, radio-guided surgery.