



HAL
open science

Synthèse et caractérisation de sondes luminescentes peptidiques pour l'imagerie de cations

Céline Cepeda

► **To cite this version:**

Céline Cepeda. Synthèse et caractérisation de sondes luminescentes peptidiques pour l'imagerie de cations. Chimie inorganique. Université Grenoble Alpes, 2017. Français. NNT : 2017GREAV072 . tel-02136266

HAL Id: tel-02136266

<https://theses.hal.science/tel-02136266v1>

Submitted on 22 May 2019

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Chimie Biologie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Céline CEPEDA

Thèse dirigée par **Olivier SENEQUE, Chargé de Recherche,
CNRS**

préparée au sein du **Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux**
dans l'**École Doctorale Chimie et Science du Vivant**

Synthèse et caractérisation de sondes luminescentes peptidiques pour l'imagerie de cations

Thèse soutenue publiquement le **21 Novembre 2017**,
devant le jury composé de :

Monsieur Fabrice THOMAS

Professeur, Université Grenoble Alpes, Président

Madame Agnès DELMAS

Directrice de Recherche, CNRS, Rapporteur

Monsieur Federico CISNETTI

Maître de Conférences, Université de Clermont Auvergne, Rapporteur

Madame Aline NONAT

Chargée de Recherche, CNRS, Membre

Madame Catherine BELLE

Directrice de Recherche, CNRS, Membre

Monsieur Olivier SENEQUE

Chargé de Recherche, CNRS, Directeur de Thèse



Merci !!!

Je tiens tout d'abord à remercier Olivier Sénèque et Didier Boturyn pour m'avoir encadrée et accompagnée tout au long de ces trois années de thèse. Un grand merci pour votre disponibilité, pour vos conseils et pour avoir fait que ces trois années soit aussi agréable, ça a été un vrai plaisir de travailler avec vous !

L'aventure a commencé en master dans l'équipe I₂BM, où Mélissa Degardin (ma maman de laboratoire) m'a initiée et formée à la synthèse peptidique, tu as également été présente toute au long de ma thèse, je tiens à te remercier pour l'aspect scientifique mais également pour tout le reste ... Je remercie l'équipe I₂BM dans sa globalité ... et évidemment Laureen avec qui j'ai partagé toute cette aventure et bien plus ! Un ENORME merci à Doti et Solène pour leur aide et pour avoir illuminé cette période.

Je remercie également tous les membres de l'équipe PMB présents ou passés : Manon pour m'avoir initiée au projet cuivre, Laurent pour le partage de son savoir faire dans la ligation SEA, Geneviève pour sa disponibilité et ces conseils et toute l'équipe pour les rendez-vous du vendredi matin.

Je remercie aussi nos collaborateurs de l'IAB, Véronique Frachet, Sule Erbek, Alexei Grichine et nos collaborateurs du CBM d'Orléans Svetlana Eliseeva et Stéphane Petoud pour leur aide précieuse.

Et le meilleur pour la fin, je remercie ma famille. Un immense merci à mes parents et Stéphane à qui je dois tout... Je te remercie aussi David pour ta présence, ton soutien et pour avoir fait que la vie ait été plus belle.

Table des matières

Chapitre I : Introduction	9
I.1. Les métaux dans le vivant.....	9
I.2. Zinc et Cuivre	10
I.2.1. Zinc	10
I.2.2. Cuivre.....	11
I.2.3. Sphère de coordination	13
I.3. Détection des cations Zn^{2+} et Cu^{+}	13
I.3.1. Méthodes de détection	13
I.3.2. Sondes fluorescentes	14
I.3.3. Critères pour une sonde idéale	15
I.3.4. Etat de l'art.....	17
I.3.4.1 Sondes à zinc.....	17
I.3.4.2. Sondes à cuivre	21
I.4. Lanthanides	24
I.4.1. Propriétés magnétiques	24
I.4.2. Propriétés de luminescence	25
I.5. Sondes développées au laboratoire	28
I.5.1. Sondes à zinc développées au laboratoire.....	28
I.5.2. Sondes à cuivre développées au laboratoire	33
I.6. Projet de thèse	36
I.6.1. Objectifs	36
I.6.2. Stratégie et mise en œuvre	37
I.6.2.2. Ligation	37
Chapitre II : Des sondes intensiométriques aux sondes ratiométriques	41
II.1. Principe	41
II.2. Sondes intensiométriques émettant dans l'UV	45
II.2.1. Sondes SP3-Cs124-DapDOTA(Ln)	45

II.2.1.2. Synthèse.....	45
II.2.1.3. Caractérisations spectroscopiques et physicochimiques	50
II.2.2. Sondes SP3-Cs124-LysDOTA(Ln)	59
II.2.2.1. Synthèse.....	60
II.2.2.2. Caractérisations spectroscopiques et physicochimiques	60
II.2.3. Conclusion	62
II.3. Sondes ratiométriques émettant dans l'UV	63
II.3.1. Design : une antenne pour deux lanthanides	63
II.3.2. Synthèse des sondes SP3R-Ln1-Cs124-Ln2	67
II.3.3. Caractérisations spectroscopiques et physicochimiques	68
II.3.3.1. SP3R-Eu-Cs124-Tb	68
II.3.3.1. SP3R-Tb-Cs124-Eu	70
II.3.4. Conclusion	72
II.3. Sonde à zinc émettant dans le proche infrarouge	74
II.3.1. Synthèse.....	75
II.3.2. Propriétés spécifiques liées à l'antracène	77
II.3.3.1. Sondes intentionnelles.....	78
II.3.3.1. Sondes ratiométriques.....	80
II.3.4. Conclusion	82
II.4. Conclusion	82
Chapitre III : Développement des sondes pour l'imagerie cellulaire.....	85
III.1. Peptide de pénétration cellulaire	85
III.1.1. Généralités.....	85
III.1.2. Mécanisme de passage de la membrane cellulaire.....	86
III.1.2.1. Translocation	86
III.1.2.2. L'endocytose	88
III.1.3. Séquences de pénétrations choisies pour l'élaboration des sondes.....	88
III.2. Stratégie pour l'élaboration des sondes pénétrantes	89
III.3. Sondes pénétrante de 1 ^{ère} génération : CPP-SP3-Cs124-DOTA(Ln).....	93
III.3.1. Synthèse	93

III.3.2. Caractérisations spectroscopiques et physicochimiques	94
III.3.3. Tests cellulaires	97
III.3.4. Conclusion.....	99
III.4. Sondes pénétrante de 2 ^{nde} génération : CPP-SP3-Acri-DO3A-pic(Ln)	99
III.4.1. Modification de l'antenne	99
III.4.2. Modification du polyaminocarboxylate chélatant le lanthanide	101
III.4.2.1. Chélate DO3A-pic	101
III.4.1.2. Synthèse du DO3A-pic-tri(allyl)ester	102
III.4.2.3. Evaluation de l'influence du DO3A-pic : sonde SP3-Cs124-DO3A-pic(Eu)	103
III.4.2.4. Evaluation de l'influence du DO3A-pic : sonde SP3-Acri-DO3A-pic(Eu)	105
III.4.3. Synthèse des sondes CPP-SP3-Acri-DO3A-pic(Ln).....	107
III.4.4. Caractérisations des sondes CPP-SP3-Acri-DO3A-pic(Ln)	108
III.4.5. Tests cellulaires	109
III.5. Conclusion et perspectives	111
Chapitre IV : Sondes ratiométriques pour la détection du Cu ⁺ et de l'Ag ⁺	115
IV.1. Principe	115
IV.2. Stratégie oxime	117
IV.2 1. Synthèse	118
IV.2.2. Caractérisations spectroscopiques : titrage à l'Ag ⁺ en milieu aérobie.....	122
IV.2.3. Conclusion	122
IV.3. Stratégie thiol-maléimide	123
III.3.1. Synthèse	123
III.3.2. Caractérisations spectroscopiques et physicochimiques	127
III.3.2.1. Titrage au Cu ⁺	128
III.3.2.2. Titrage à l'Ag ⁺	131
IV.3.3. Etude mécanistique de la sonde	133
IV.4. Conclusion	144
V Conclusion et perspectives	145
Chapitre VI : Partie expérimentale.....	149

Peptide synthesis	155
Intensiometric probes (SP3)	156
Ratiometric probe (SP3R)	167
CPP-containing probes	170
Ratiometric copper probes	179
Spectroscopy	185
Sample preparation.....	185
Measurements:	186
Influence of metal cations:	187
Determination of binding constants	187
Determination of q , the number of water molecules coordinated to Tb^{3+} or Eu^{3+} :.....	188
Circular dichroism.....	188
Chapitre VII : Bibliographie	189

Chapitre I : Introduction

I.1. Les métaux dans le vivant

Depuis de nombreuses années, la compréhension des mécanismes du vivant fait partie des axes majeurs de la recherche dans le domaine de la santé. Ainsi l'analyse du vivant a révélé l'importance des cations métalliques dans la machinerie cellulaire de production et de transformation des molécules naturelles. Près de 30 % des enzymes d'un organisme vivant du monde actuel nécessitent la présence d'un métal pour assurer correctement leurs fonctions^[1]. De ce fait 13 métaux, dont le cuivre et le zinc, sont considérés comme essentiels à la vie. En effet, ils confèrent à certaines protéines les propriétés catalytiques et structurales indispensables à leur activité. Leurs fonctions sont très variées puisqu'ils interviennent dans des processus d'oxydo-réduction, de transport, ou dans la structuration (tabl. I.1.).

Tableau I.1. : Métaux essentiels dans le corps humain, ainsi que leur fraction massique et quelques-unes de leurs principales fonctions^[2].

Elément	Fraction massique	Fonction
Calcium	1,4 %	Structure, porteur de charge, messenger
Potassium	0,2 %	Balance osmotique, porteur de charge
Sodium	0,14 %	Balance osmotique, porteur de charge
Magnésium	0,027 %	Structure, hydrolase, isomérase
Fer	60 ppm	Oxydase, transport et stockage de l'oxygène, transfert d'électron, hydrogénase, dismutase, oxygénase
Zinc	33 ppm	Structure, hydrolase
Cuivre	1 ppm	Oxydase, transport de l'oxygène, dismutase, transfert d'électron, réductase, oxygénase
Manganèse	0,2 ppm	Oxydase, réductase, structure
Nickel	0,2 ppm	Hydrogénase, hydrolase
Molybdène	0,1 ppm	Oxydase, nitrogénase, transfert d'oxo
Vanadium	0,1 ppm	Oxydase, nitrogénase
Chrome	0,03 ppm	Possiblement impliqué dans le métabolisme du glucose
Cobalt	0,02 ppm	Oxydase, transfert de groupement alkyle

Bien qu'essentiels ces métaux peuvent également être toxiques. En effet il est maintenant acquis que de nombreuses situations pathologiques, telles que la maladie de Wilson^[3], la maladie de Menkes^[4], certains cancers^[5], les inflammations^[6] ou certaines maladies neurovégétatives^[7], sont liées à une dérégulation de l'homéostasie des métaux. Afin de mieux comprendre les processus biologiques impliqués par ces métaux il est important de pouvoir les détecter, les suivre et les quantifier.

I.2. Zinc et Cuivre

I.2.1. Zinc

Le zinc est essentiel à toutes les formes de vie et il est le deuxième métal le plus abondant chez l'homme après le fer. Le zinc a un rôle principalement structural ou catalytique lorsqu'il est utilisé comme acide de Lewis dans environ 3000 protéines humaines^[8]. Il participe à la stimulation du système immunitaire, il est nécessaire à un développement fœtal et une croissance normale^[9] mais il intervient aussi comme messager intra et intercellulaire^[10].

La configuration électronique du Zn^0 est $[Ar] 4s^2 3d^{10}$. Dans les milieux biologiques le zinc n'est stable qu'au degré +II ($[Ar] 3d^{10}$).

Les cellules humaines contiennent un niveau élevé de Zn^{2+} (entre 200 et 300 μM). La majorité de ce zinc est liée à des protéines, enzymes, métabolites et des molécules de faibles poids moléculaires, les métallothionéines, de façon à ce que la concentration de zinc libre (ou labile) dans la cellule soit de l'ordre du picomolaire au nanomolaire^[11]. Ce processus permet une réponse rapide à un léger déséquilibre. La régulation génétique est plus lente mais permet de faire face à un déséquilibre plus important. Cette régulation permet de limiter ses effets toxiques, cependant du fait de son rôle de messager cette concentration peut varier. En effet certains types de cellules dont les neurones et les ovocytes sont capables d'accumuler du zinc dans des vésicules où sa concentration peut dépasser 1 mmol.L^{-1} ^[12]. La libération rapide de ces vésicules contribue à la signalisation intercellulaire. De plus différentes situations physiopathologiques (anoxie, stress oxydant) induisent une augmentation de la concentration intracellulaire en zinc. Ces fluctuations à l'intérieur de la cellule déclenchent une réponse de la cellule elle-même. Le zinc a donc également une fonction de messager intracellulaire^[13].

Deux classes de transporteurs de zinc contrôlent sa concentration : les protéines ZnT et ZIP^[14]. Ces deux protéines sont aussi bien exprimées sur la membrane plasmique que sur les organelles intracellulaires (fig. I.1.). La transcription de ces protéines est contrôlée génétiquement, en effet alors qu'un excès de zinc engendre une augmentation de la

transcription de la protéine ZnT, un déficit de Zn^{2+} permettra d'accroître la transcription de la protéine ZIP^[15].

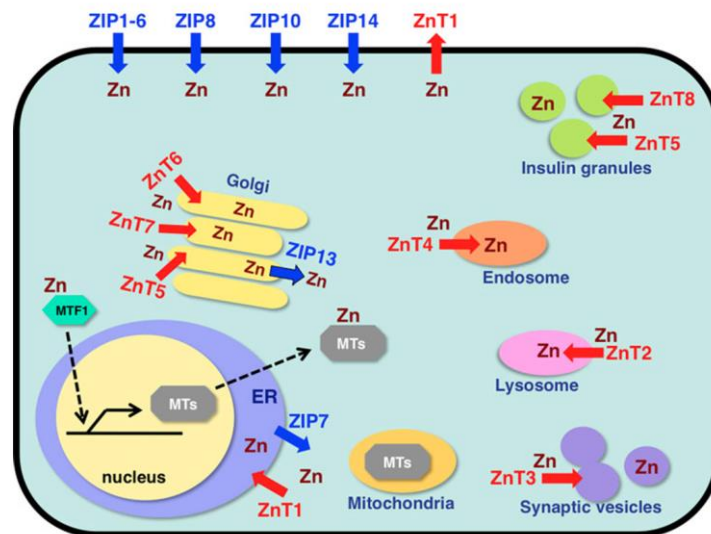


Figure I.1. : Localisation subcellulaire et fonctions potentielles des transporteurs de zinc (ZIP, ZnT), des métallothionéines (MTs) et du facteur de transcription 1 régulé par les métaux (MTF1)^[10].

La régulation de l'homéostasie du zinc est réalisée par les transporteurs ZnT et ZIP qui contrôlent son entrée, sa distribution, son accumulation et son efflux. En maîtrisant les flux de zinc entre les vésicules et les organelles, ces transporteurs permettent de réguler la concentration en zinc. D'autres familles de protéines participent au transport transmembranaire du zinc. Il s'agit de molécules formant des canaux cationiques. Par exemple, les canaux LTCC permettent l'import du zinc dans les neurones corticaux, dans les cellules β des îlots pancréatiques et permet la libération du Zn^{2+} dans le réticulum endoplasmique des mastocytes^[16,17]. Les canaux GluRx permettent l'entrée du zinc dans les neurones post-synaptiques et dans les astrocytes durant l'excitation neuronales^[18,19]. De plus les récepteurs à acétylcholine et les TRP (sigle anglais pour Transient Receptor Potential) conduisent également le zinc^[20].

I.2.2. Cuivre

Le cuivre, tout comme le zinc, est un élément essentiel. Il est le 3^{ème} métal de transition le plus abondant chez l'homme. Le cuivre a un rôle catalytique pour beaucoup de protéines et d'enzymes. Il intervient dans de nombreux processus tels que le transfert d'électrons, le transport de l'oxygène, le métabolisme du fer, la régulation des neurotransmetteurs et des neuropeptides, la synthèse des phospholipides, le fonctionnement du cerveau, la pigmentation^[21].

La configuration électronique du cuivre est Cu^0 : $[Ar] 4s^2 3d^{10}$. En solution, le cuivre forme majoritairement des ions cuivreux Cu^+ et cuivriques Cu^{2+} . L'ion cuivreux (Cu^+) est

obtenu par la perte d'un électron de la couche 4s et l'ion cuivrique (Cu^{2+}) est obtenu par la perte d'un second électron de la couche 3d. Le cuivre(I) est un réducteur puissant qui, en biologie, peut réagir avec H_2O_2 selon un mécanisme de type Fenton et engendrer un radical hydroxyle HO^\bullet qui est un oxydant très puissant et donc extrêmement toxique pour l'organisme.



Cu^+ est l'état majoritaire du cuivre dans les cellules. En effet le transporteur membranaire CTR1 réduit Cu^{2+} en Cu^+ avant son entrée dans la cellule et le milieu réducteur de la cellule permet le maintien de cet état. Du fait de sa toxicité, sa concentration est finement régulée par l'organisme, il va donc être pris en charge par différents types de protéines qui vont l'utiliser, le transporter ou le stocker de façon à ce qu'il n'y ait aucun atome de cuivre libre ($\text{Cu}^+_{(\text{aq})}$) par cellule^[22]. Comme pour le zinc, un dérèglement de l'homéostasie du cuivre est associé à des pathologies telles qu'Alzheimer, Menkes, Wilson et Parkinson^[23]. La concentration totale en cuivre est régulée par les transporteurs présents au niveau de la paroi cellulaire. Dans la cellule le cuivre interagit avec les ligands cellulaires tels que le glutathion (GSH), une métallochaperone (CCS, Atox1, L) qui délivre le cuivre à une cible, la mitochondrie ou les ATPases de l'appareil de golgi (ATP7A, ATP7B). Le cuivre peut aussi être stocké par les métallothionéines (MT) (fig. I.2.).

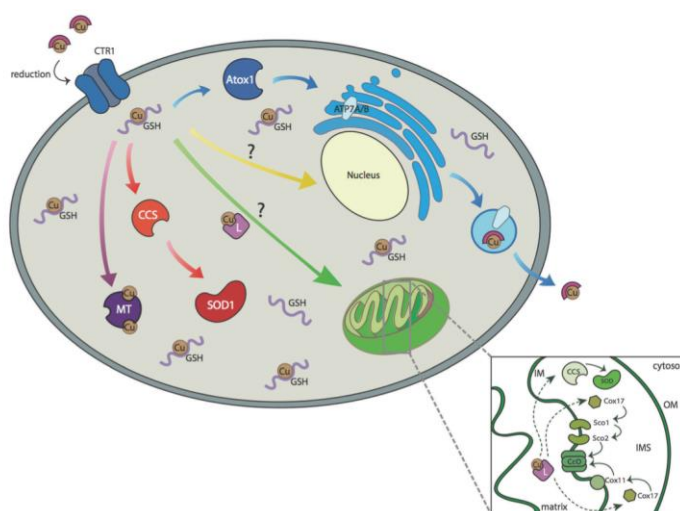


Figure I.2. : Transport du cuivre dans une cellule eucaryote^[24].

Les ATP7A et ATP7B transportent le cuivre de façon spécifique. L'ATP7A (ou protéine de Menkes) est retrouvée au niveau du réseau transgolgien. Le rôle de l'ATP7A est très important dans la régulation du cuivre intracellulaire. En effet, quand celui-ci atteint un niveau toxique, ATP7A permet l'excrétion du cuivre dans la circulation sanguine. La protéine ATP7B (ou protéine de Wilson) est surtout fortement exprimée dans le foie et les reins. Elle permet l'incorporation du cuivre dans les cuproprotéines, mais aussi le relargage du cuivre

dans la bile par le biais d'un trafic vésiculaire lors d'un excès de cuivre dans l'hépatocyte^[25].

I.2.3. Sphère de coordination

Nous venons de voir que le zinc et le cuivre sont deux cations métalliques essentiels au fonctionnement cellulaire. La première étape pour l'utilisation de ces métaux est leurs transports à travers les membranes et le cytoplasme. Il existe donc deux types de protéines capables de lier ces métaux : les protéines de transports et les enzymes. Les sphères de coordination de ces protéines ne sont pas les mêmes. On peut diviser les ligands des acides aminés en trois groupes principaux. Les ligands oxygénés comprenant les résidus aspartate et glutamate, le ligand azoté histidine, puis les ligands soufrés incluant la cystéine et la méthionine. Le Cu^+ lie préférentiellement les ligands mous tels que la cystéine ou la méthionine. Le Cu^{2+} et le Zn^{2+} accommodent des ligands plus durs notamment l'histidine, l'aspartate ou le glutamate. Le nombre de ligands associé au métal varie également selon la fonction de la protéine. Si le rôle du zinc est structural, alors la sphère de coordination sera complète avec quatre ligands. Si le cuivre sert au transfert d'électrons, sa géométrie sera tétraédrique. En revanche pour des fonctions catalytiques, il faut qu'une position soit échangeable avec le substrat. Enfin de façon générale les protéines de transport ont un nombre plus faible de ligands, deux pour le Cu^+ et trois pour le Zn^{2+} ^[26,27] (fig. I.3.).

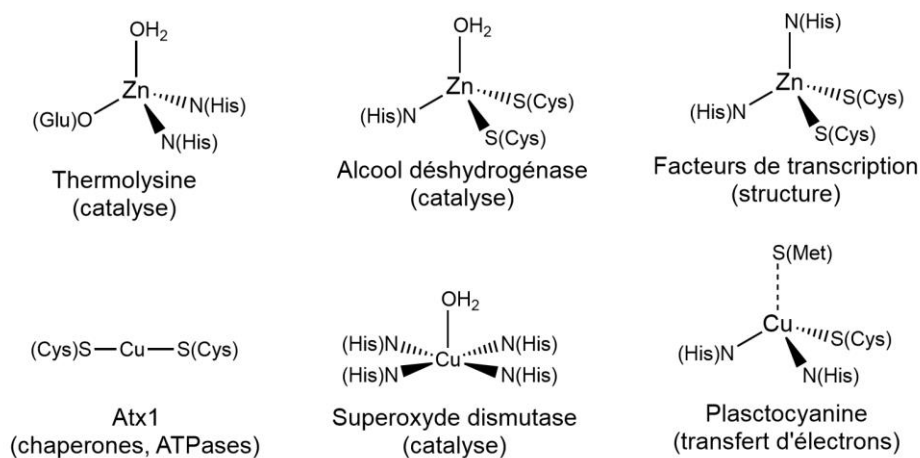


Figure I.3. : Exemples de sites de coordination du zinc et du cuivre.

I.3. Détection des cations Zn^{2+} et Cu^+

Il est important de pouvoir détecter, suivre et quantifier *in cellulo* et *in vivo* ces métaux afin de mieux comprendre les processus biologiques les impliquant.

I.3.1. Méthodes de détection

Une des premières étapes dans l'étude des métaux dans les organismes est leur quantification dans les cellules ou les tissus. Ces analyses élémentaires ont d'abord été faites par spectroscopie d'absorption atomique (AAS)^[28]. Puis la spectroscopie de masse à plasma à

couplage inductif (ICP-MS)^[29] a été développée afin d'assurer des mesures plus rapides, plus précises et plus sensibles. Ces méthodes permettent de déterminer la quantité globale de métal dans un échantillon, mais ne permettent pas la localisation au niveau cellulaire ou subcellulaire des métaux. Cependant cette donnée spatiale est accessible par d'autres méthodes telles que la spectroscopie de masse à ionisation secondaire (SIMS) ou la spectrométrie de masse à plasma induit couplée à l'ablation laser (LA-ICP-MS)^[30]. Ces méthodes permettent la localisation du métal au niveau cellulaire ou subcellulaire. Cependant elles ne permettent pas de différencier les différentes formes du métal (faiblement ou fortement lié). De plus elles ne renseignent pas sur la dynamique, les mouvements en réponse à des perturbations de l'environnement des métaux. Les sondes fluorescentes permettent la détermination de ces informations. Il existe trois types de sondes :

- Les sondes synthétiques qui sont des petites molécules composées d'une partie fluorophore couplée à une unité chélatante. Ces sondes sont élaborées par synthèse chimique. Elles doivent être donc délivrées à l'intérieur des cellules.
- Les sondes codées génétiquement dont la biosynthèse est programmée par des techniques de biologie moléculaire et dont la synthèse est entièrement cellulaire. Ces sondes sont composées d'une séquence peptidique assurant la liaison au métal et d'une protéine fluorescente comme fluorophore.

I.3.2. Sondes fluorescentes

La spectroscopie de fluorescence est l'une des méthodes de détection les plus sensibles. Elle est basée sur la mesure de l'intensité de la lumière émise par fluorescence d'une substance après excitation. Les sondes fluorescentes contiennent deux éléments essentiels : une partie chélatante afin de lier l'analyte et au moins un fluorophore capable d'absorber et d'émettre de la lumière (fig. I.4.).

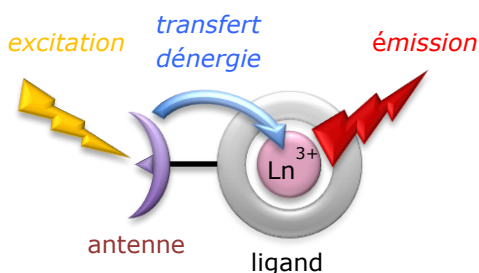


Figure I.4. : Représentation schématique d'une sonde fluorescente.

Afin de jouer le rôle de senseur, la liaison de l'analyte doit modifier la structure électronique ou la structure moléculaire de la sonde afin d'induire un changement d'intensité ou de longueur d'onde d'absorption ou d'émission de la lumière. Les paramètres importants de ces sondes sont leur brillance et leur stabilité. Les fluorophores les plus brillants requièrent

moins d'excitation, ce qui cause moins de photodommage. La brillance d'un fluorophore (B) est définie comme le produit du coefficient d'extinction molaire (ϵ) à la longueur d'onde d'excitation et du rendement quantique (ϕ).

$$B = \epsilon \times \phi$$

Le coefficient d'extinction molaire ϵ représente l'efficacité avec laquelle un échantillon absorbe la lumière, alors que le rendement quantique ϕ décrit sa capacité à émettre de la lumière après l'absorption. D'autres facteurs influencent le fonctionnement des sondes tels que la concentration intracellulaire des sondes. Ce paramètre est contrôlé par leur facilité à passer les membranes et leur capacité à être retenues dans les cellules. Afin d'aider le passage membranaire de certaines sondes il est nécessaire de masquer leurs fonctions trop hydrophobes ou d'ajouter un fragment aidant à la pénétration cellulaire. Les sondes codées génétiquement ont l'avantage d'être directement exprimées dans les cellules, elles ne souffrent donc pas de difficulté pour entrer dans les cellules mais ne sont utilisables que dans les cellules que l'on peut modifier génétiquement afin qu'elles soient capables de les exprimer.

I.3.3. Critères pour une sonde idéale

En plus des propriétés photophysiques citées (brillance, stabilité) d'autres critères sont essentiels afin qu'une sonde soit efficace :

Critères de reconnaissance moléculaire

- Tout d'abord, la reconnaissance de la sonde doit être sélective et spécifique d'un analyte afin d'être capable de le détecter dans l'environnement complexe d'une cellule ou d'un organisme. En effet de nombreux métaux sont présents au niveau cellulaire dont les alcalins (K^+ , Na^+), les alcalino terreux (Mg^{2+} , Ca^{2+}) qui sont les plus abondants au niveau cellulaire mais également des métaux du bloc d en concentrations moindres tels que le zinc ($[Zn^{2+}]_{libre}=10^{-8}-10^{-11}$ M) et de façon plus anecdotique le fer, le cuivre, le manganèse, le nickel et le cobalt. Tous ces métaux ne doivent pas induire de réponse de la sonde ni altérer son fonctionnement.
- Afin de mesurer la distribution de l'analyte de façon dynamique, il faut que sa complexation soit réversible et rapide. Ceci nécessite donc une cinétique et une thermodynamique de complexation du métal de la sonde ajustée. L'affinité de la sonde doit donc être adaptée, c'est-à-dire que la constante de dissociation de la sonde doit être dans la gamme de concentration en métal libre pour détecter un niveau normal. Une affinité trop faible entrainera une détection partielle du métal alors qu'une affinité trop importante pourrait induire une décomplexation des ions métalliques des métalloprotéines l'utilisant comme cofacteur et donc une modification du fonctionnement cellulaire.

Critère de compatibilité biologique

- La sonde doit être capable d'entrer dans la cellule sans perturber son fonctionnement. De plus elle doit être stable et non toxique.

Critères de propriétés optiques

- La réponse de la sonde doit varier en présence de métal. Pour les sondes intensiométriques, l'intensité du signal d'émission pour la sonde varie en présence de l'analyte de façon homogène, soit en augmentant (turn-on), soit en diminuant (turn-off). Afin d'avoir une meilleure résolution spatiale, il est préférable que la sonde s'allume en présence de métal plutôt qu'elle ne s'éteigne. De plus la concentration en sonde intensiométrique doit être connue ou mesurable afin de permettre la quantification. L'un des paramètres les plus communément utilisé pour la détection est l'intensité de fluorescence. Or ce paramètre dépend de la concentration de la sonde. Cette concentration est souvent localement mal maîtrisée, ce qui peut conduire à des résultats faussés. En effet dans le cas d'une sonde turn-on intensiométrique un échantillon avec une concentration élevée en métal donnera le même signal qu'un échantillon avec une concentration localement élevée en sonde. Afin d'éviter ce problème des sondes dites ratiométriques ont été développées.
- Dans les sondes ratiométriques est ajouté un second signal qui varie de façon indépendante du premier lors de la liaison au métal. De cette façon la concentration en métal dépend uniquement du rapport entre les deux signaux et pas de la concentration en sonde. Ces deux signaux peuvent être l'émission à deux longueurs d'onde différentes pour une même longueur d'onde d'excitation, ou bien l'excitation à une longueur d'onde donnée pour deux longueurs d'onde d'excitation (fig. I.5.).

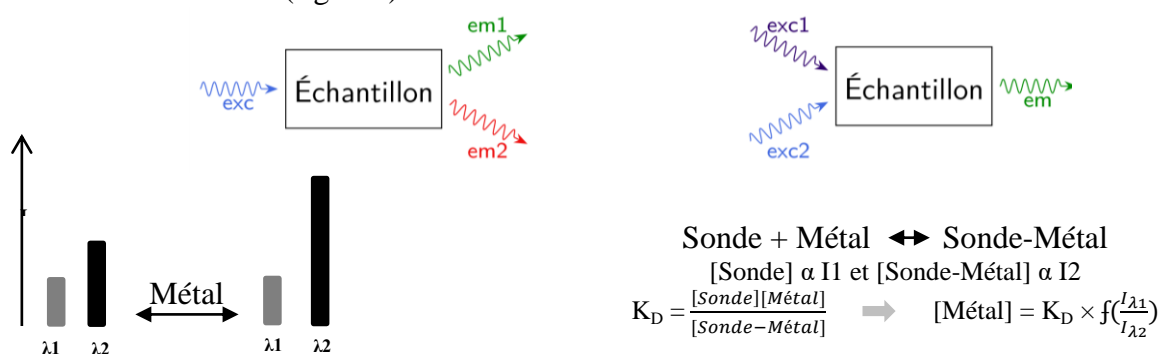


Figure I.5. : Possibilités pour une sonde ratiométrique : (en haut à gauche) deux signaux d'émission, (en haut à droite) deux signaux d'excitation. (En bas) Représentation d'un exemple de variations de l'intensité des signaux et son lien entre la concentration en sonde et le rapport des deux intensités.

- Un autre facteur important qui influe sur la sensibilité des mesures *in vivo* est la longueur d'onde d'excitation et d'émission. Les milieux biologiques absorbent la lumière dans l'ultraviolet jusqu'au visible et l'eau dans l'infrarouge^[31]. D'une manière générale, pour ne

pas endommager les échantillons biologiques la sonde doit absorber et émettre à des longueurs d'onde en dehors du domaine où les protéines et l'eau absorbent afin de diminuer la phototoxicité, diminuer l'autofluorescence et augmenter la pénétration de la lumière. Cette zone spectrale optimale est appelée fenêtre de transparence des milieux biologiques ou fenêtré de diagnostic et est comprise entre 650 et 1500 nm (fig. I.6.).

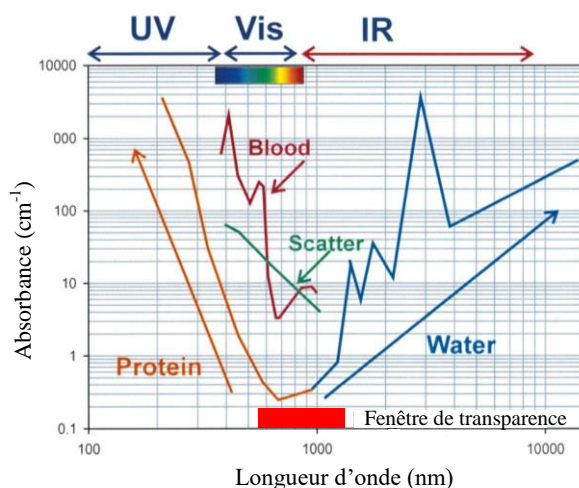


Figure I.6. : Absorption des milieux biologiques^[31].

I.3.4. Etat de l'art

I.3.4.1 Sondes à zinc

Sondes à zinc intensiométriques synthétiques

Parmi les sondes à zinc existantes se trouvent les deux types de sondes : synthétiques et génétiquement codées.

La majorité des sondes à zinc sont des petites molécules synthétiques dont la fluorescence augmente en présence de zinc selon le principe de transfert d'électron photoinduit (PET) entre le groupement liant le métal et le fluorophore. En absence de zinc, un transfert PET de la partie chélatante du métal vers le chromophore éteint la fluorescence du chromophore. En présence de métal, les paires d'électrons libres des atomes du ligand sont impliquées dans la liaison du métal, le PET n'a plus lieu, le chromophore fluoresce, la sonde s'allume (fig. I.7.). Il est possible de modifier les fluorophores et les chélates liant le zinc afin de changer l'efficacité du PET.

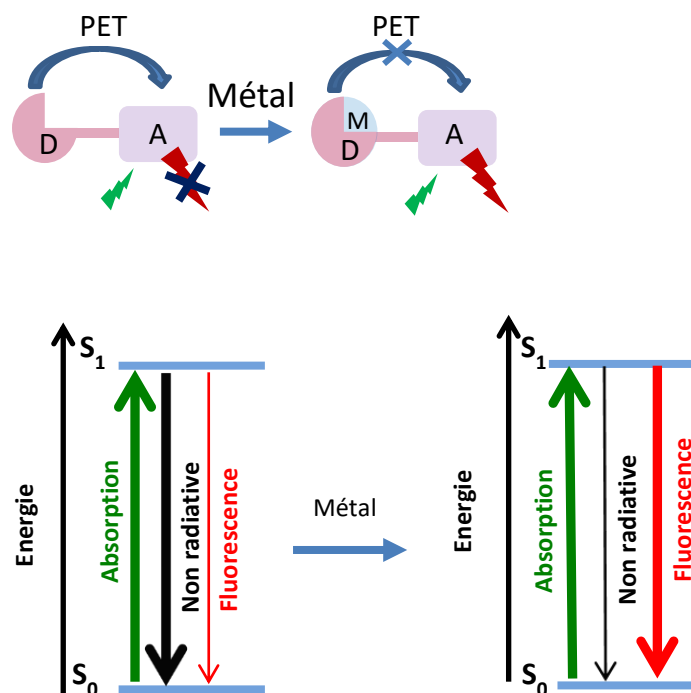


Fig I.7. : Principe des sondes basées sur le transfert d'électron photoinduit (PET).

Les sondes à zinc sont variées et sont développées avec différents types de fluorophore : quinoline^[32], fluorescéine^[33,34], coumarine^[35,36], des dérivés de bore-dipyrométhène (BODIPY)^[37,38], la 4-aminonaphtalimide^[39], la rhodamine^[40,41] et la tricarbo-cyanine^[42]. Cependant les caractéristiques de ces sondes ne correspondent pas aux critères idéals en termes de pK_D (8-11) et de longueur d'onde d'excitation et d'émission (650-1500 nm) comme on peut le voir sur la figure I.8.

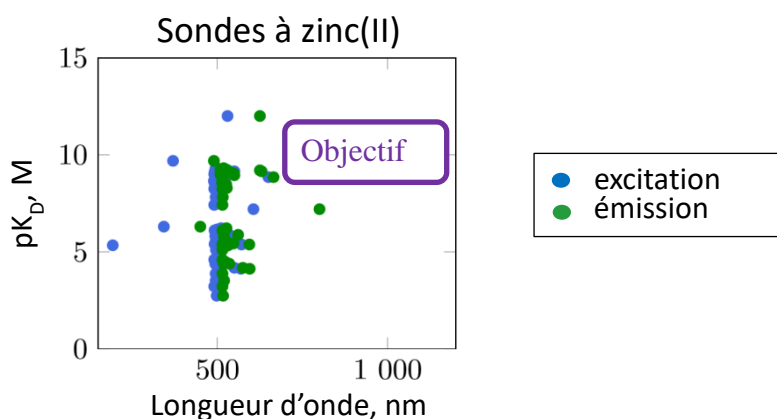


Figure I.8. : Positionnement des sondes synthétiques en fonction de leur constante de dissociation et de leurs longueurs d'onde d'excitation et d'émission. En violet : Situation d'une sonde idéale. Affinité dans la gamme de la concentration en métal mobile, et émission/excitation dans la fenêtre de transparence^[43].

Sondes à zinc ratiométriques synthétiques

Les sondes à zinc ratiométriques sont moins nombreuses que les sondes intensiométriques. Les deux premières sondes ratiométriques à avoir été développées pour la

détection du zinc sont FuraZin et IndoZin^[44] (fig. I.9.). En présence de zinc ces sondes subissent un déplacement des longueurs d'ondes d'excitation (IndoZin) ou d'émission (FuraZin). Ces sondes ont comme inconvénients d'avoir des affinités faibles de l'ordre du micromolaire ce qui les rend peu adaptées à la détection cellulaire du zinc, de plus elles ont des excitations dans l'UV.

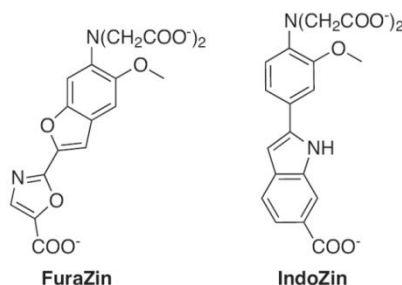


Figure I.9. : Structure des sondes ratiométriques pour la détection du Zinc FuraZin et IndoZin^[44].

Le laboratoire d'O'Halloran a développé la première sonde ratiométrique excitable à deux photons, Zinbo-5^[45] (fig. I.10.). Cette sonde est construite autour du composé fluorescent benzaxole et du groupement chélatant aminométhyl pyridine. En présence de zinc et après excitation à 356 nm le spectre d'émission subit la disparition de la bande à 407 nm correspondant à la forme *apo* et l'apparition d'une bande à 443 nm qui se réfère à la forme *holo*. L'affinité de la sonde de l'ordre du nanomolaire est adaptée à la détection du zinc cellulaire, cependant la sélectivité vis-à-vis des métaux physiologiques n'est pas totale en effet les métaux du bloc d induisent une augmentation du signal ratiométrique. De plus bien que l'excitation à deux photons permet de décaler l'excitation vers les plus grandes longueurs d'onde l'émission de la sonde se fait toujours dans le visible.

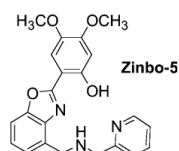


Figure I.10. : Structure de la sonde ratiométrique Zinbo-5^[45].

La liste de ces sondes n'est pas exhaustive et d'autres systèmes ont été développés^[46-48].

Sondes à zinc ratiométriques codées génétiquement

Le développement de sondes à zinc s'est aussi fait par les sondes codées génétiquement. Ces sondes sont introduites dans les cellules ou les tissus par le biais d'ADN par transfection transitoire ou de transduction. Il s'agit de sondes peptidiques incorporant une ou plusieurs protéines fluorescentes en tant que fluorophore ainsi qu'une partie peptidique permettant la liaison au métal. Ces sondes fonctionnent sur le principe de modulation du transfert d'énergie, notamment de type Förster (FRET pour Förster Resonance Energy

Transfer). Ce transfert d'énergie non radiatif résulte d'une interaction dipolaire entre le donneur et l'accepteur et nécessite le recouvrement entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur. L'efficacité du transfert dépend notamment de la distance entre donneur et accepteur r , du rayon de Förster R_0 qui correspond à la distance donneur-accepteur pour laquelle l'efficacité du transfert est de 50 %, de Q_0 le rendement quantique du donneur en l'absence d'accepteur, de K le facteur d'orientation des dipôles, de n l'indice de réfraction du milieu et de J l'intégrale de recouvrement spectral entre l'émission du donneur et l'absorption de l'accepteur.

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \text{ avec } R_0^6 = \frac{9000Q_0(\ln 10)K^2J}{128\pi^2n^4N_A}$$

La modulation du transfert d'énergie est assurée par la distance entre le donneur et l'accepteur qui est modifiée lors de la complexation du métal. En effet, la présence de métal induit un rapprochement ou un éloignement des deux chromophores permettant d'augmenter ou de diminuer le FRET. De façon générale le donneur et l'accepteur sont séparés par un domaine liant le zinc. Le changement structural associé altère le transfert FRET. Expérimentalement le donneur est excité puis l'émission de l'accepteur et celle du donneur sont récoltées et mises sous forme de ratio. La nature ratiométrique de ces senseurs permet la quantification du zinc.

La première sonde génétiquement codée a été développée par le laboratoire d'Eide^[49]. Il s'agit de la sonde Zap1 composée de deux doigts de zinc reliant les protéines fluorescentes CFP et YFP. La présence de Zn^{2+} induit un changement conformationnel des doigts de zinc menant à une modification du FRET (fig. 1.11). La famille de sonde CALWY a ensuite été développée par Merckx et ses collaborateurs^[50]. Ces sondes utilisent comme domaine de liaisons au zinc deux protéines utilisant une paire de cystéines. Par la modification du domaine de liaison de ces sondes il a été possible de synthétiser la famille de sondes eCALWY, ces sondes sont sélectives du zinc et possèdent des affinités variées^[51] (fig. I.11.). Elles ont permis la quantification du zinc libre cytosolique dans les cellules β du pancréas chez différentes lignées cellulaires^[52]. La concentration du Zn^{2+} libre mesurée de 0,4 nM est semblable entre les différentes lignées cellulaires et est cohérente avec des expériences réalisées avec les sondes ratiométriques synthétiques FluoZin et Zinbo-5 (présentées plus haut).

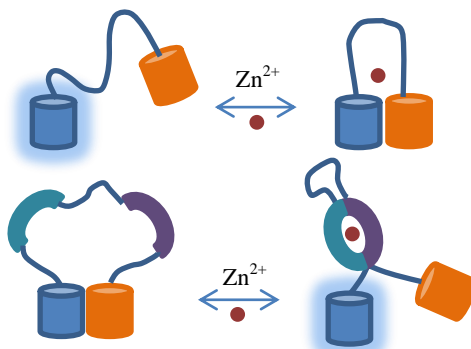


Figure I.11. : Mécanisme de détection du zinc par des sondes génétiquement codées. (a) Zap1 (b) eCALWI.

Cependant de façon générale la quantification du zinc cytoplasmique libre n'est pas toujours triviale. En effet des mesures réalisées à la fois avec des sondes synthétiques ou codées génétiquement donnent des valeurs dans une gamme large de concentrations, allant du micromolaire^[53] à quelques centaines de picomolaires^[54] pour les sondes synthétiques, et de 5-10 picomolaires^[55] à 180 nanomolaires^[56] pour les sondes codées génétiquement. Ces valeurs disparates sont potentiellement liées à une mauvaise calibration des sondes et/ou à l'utilisation d'une sonde non adaptée en termes d'affinité.

I.3.4.2. Sondes à cuivre

L'élaboration de sondes à Cu^+ doit répondre à des challenges supplémentaires notamment dû au caractère redox-actif de l'ion. En effet les sondes doivent être sélectives du Cu^+ par rapport au Cu^{2+} et de plus doivent être capables de stabiliser cet état d'oxydation. De ce fait les sondes à Cu^+ sont moins nombreuses que celles à zinc. Un autre challenge porte sur l'affinité des sondes, elle doit être assez élevée pour être adaptée à la détection du cuivre cellulaire (10^{-21} - 10^{-17} M). Ainsi les constantes d'affinités des sondes adaptées à la détection du cuivre labile dans des cellules saines doivent être très importantes. Un autre parti pris est la synthèse de sonde avec une constante d'affinité moindre pour la détection d'excès de ce métal lié à des pathologies (fig. I.12.).

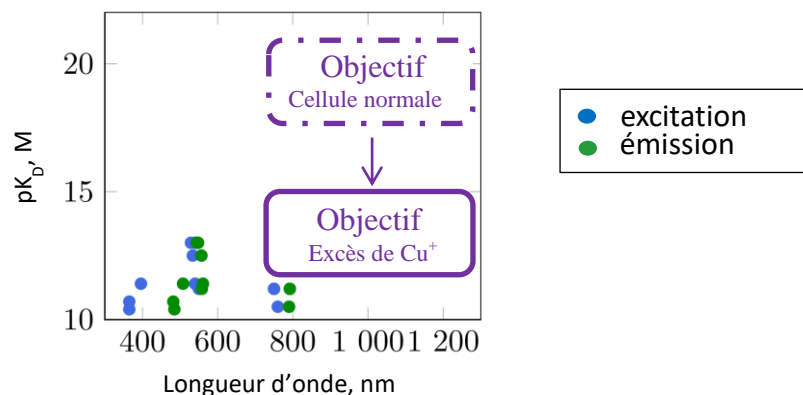


Figure I.12. : Positionnement des sondes à cuivre synthétiques en fonction de leur constante de dissociation et de leurs longueurs d'onde d'excitation et d'émission. En violet : Situation d'une sonde idéale : affinité dans la gamme de la concentration en métal mobile, et émission/excitation dans la fenêtre de transparence^[43].

Sondes à cuivre intensiométriques synthétiques

La première sonde à avoir été développée pour la détection du cuivre est la sonde CTAP-1 mise au point par le groupe de Fahrni en 2005^[57]. Elle est composée de deux parties : un site de liaison au cuivre de type azatetrathiacrown et un chromophore dérivé de la pyrazoline (fig. I.13.). Cette sonde est sélective du Cu^+ par rapport au Cu^{2+} ou aux autres cations cellulaires et voit son émission augmenter d'un facteur 4,6 en raison d'un transfert PET de la partie liante vers la partie chromophore organique. Cependant elle est excitée et

émet dans l'UV et le visible et forme des particules colloïdales en solution. Ce problème est récurrent chez les sondes organiques synthétiques.

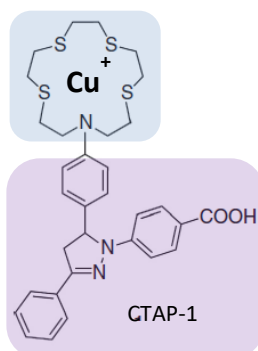


Figure I.13. : Structure de la sonde CTAP-1^[57].

Afin de résoudre le problème de solubilité quatre groupements hydroxyméthyles sont ajoutés sur les fonctions thiazacrown et un groupement sulfonate sur le fluorophore afin de former la sonde CTAP-2^[58] (fig. I.14.). On appellera contraste le facteur d'accroissement de la sonde. Elle s'allume sélectivement en présence de Cu^+ avec un contraste de 65. Néanmoins cette sonde intensimétrique est excitée et émet dans le visible ce qui n'est pas adapté à la détection cellulaire.

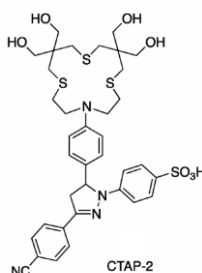


Figure I.14. : Structure de la sonde CTAP-2^[58].

Le laboratoire de Chang a développé la sonde Coppersensor-1 composée du chromophore BODIPY et d'une partie liante riche en thioether^[59]. Comme CTAP-1 cette sonde émet dans le visible mais avec un contraste de 10. Des modifications du chromophore ont permis le développement de la sonde CS3 dont le contraste de 75 est nettement supérieur^[60].

Sondes à cuivre ratiométriques synthétiques

Les sondes ratiométriques pour la détection du Cu^+ sont plus rares. On peut notamment citer la sonde RCS1 développée par le groupe de Chang. Cette sonde est composée d'un groupement BODIPY asymétrique. Après excitation à 480 nm, RCS1 montre deux maxima d'émission d'égale intensité à 505 et 570 nm. La liaison du Cu^+ n'induit pas de

changement d'intensité de la bande à 505 nm et conduit à un déplacement hypsochrome de la seconde bande à 548 nm, avec un contraste de 20^[61] (fig. I.15.).

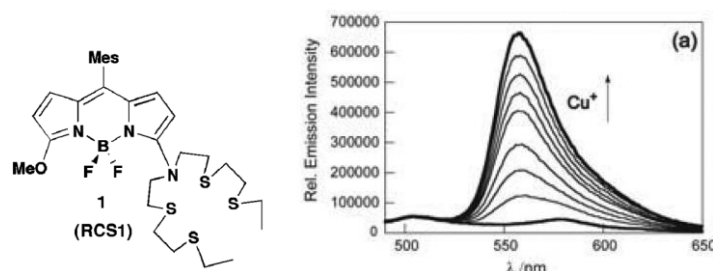


Figure I.15. : (A droite) Structure de la sonde RCS1. (A gauche) Réponse en fluorescence de la sonde RCS1 lors d'un titrage par le Cu⁺. 2 μM RCS1, 20 mM HEPES, pH7, λ_{ex} = 480 nm^[61].

Sondes à cuivre ratiométriques codées génétiquement

Le développement des sondes ratiométriques s'est également effectué comme dans le cas du zinc par le biais de sondes génétiquement encodées basées sur la modulation du FRET. On peut notamment citer les systèmes AMT1-FRET, Ace1-FRET et Mac1-FRET composés d'un site de liaison riche en cystéines capable de lier quatre équivalents de Cu⁺^[62,63]. Un autre exemple est la modification de la sonde ratiométrique à Zn²⁺ eCAWY (présentée plus haut) en eCAWY-C2M-C3M par une double mutation de cystéines en méthionines afin de la rendre sélective du Cu⁺^[64]. Les fonctionnements de ces sondes sont illustrés dans la figure I.16.

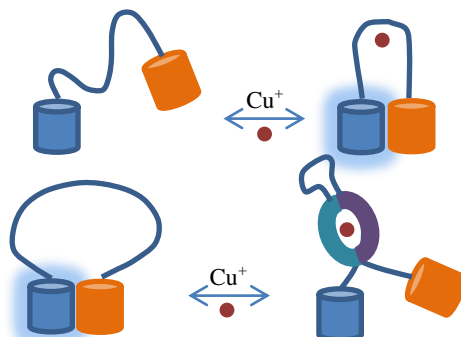


Figure I.16. : Mécanisme de fonctionnement de sondes génétiquement encodées. (En haut) AMT1-FRET, Ace1-FRET, et Mac1-FRET ont des domaines de liaison au Cu⁺ riche en cystéine entre le couple FRET CFP/YFP^[62,63]. La présence de métal induit une augmentation du signal FRET. (En bas) L'association de Cu⁺ sur la plateforme eCALWY-C2M-C3M modifie les structures du senseur et induit une diminution du signal FRET^[64].

Comme dans le cas des sondes à zinc codées génétiquement ces systèmes fonctionnent selon la modulation de l'intensité du FRET. Le rayon de Förster varie entre 10 et 100 Å selon la nature du donneur et de l'accepteur. Pour des molécules organiques dont les bandes d'émission et d'absorption sont larges, le rayon de Förster est de plusieurs dizaines d'angströms. Ceci est adapté pour l'étude d'interactions protéiques mais pas pour la conception de sondes moléculaires organiques car cela nécessiterait la synthèse de molécules de trop haut poids moléculaires. L'utilisation d'un ion lanthanide(III) comme accepteur

permet de diminuer le rayon de Förster à moins de 10 Å. Ainsi une variation de quelques angströms aura plus de conséquences sur l'efficacité du transfert d'énergie. Ce système est donc plus adapté pour le développement de sonde moléculaire.

I.4. Lanthanides

Les lanthanides sont les 15 premiers éléments de la première période du bloc f allant du lanthane ($Z=57$) au lutécium ($Z=71$) (fig. I.17.). Ils existent majoritairement au degré d'oxydation +III avec une configuration électronique correspondant à $[Xe]4f^n$, avec n allant de 0 pour le lanthane à 14 pour le lutécium.

Tableau périodique des éléments

■ Alcalins
■ Alcalino-terreux
■ Métaux
■ Métalloïdes
■ Non-métaux
■ Halogènes
■ Gaz nobles
■ Lanthanides
■ Actinides

Figure I.17. : Tableau périodique des éléments.

Les orbitales 4f présentent une extension radiale plus faible que les orbitales $5s^2 5p^6$ et sont ainsi protégées des perturbations externes. De ce fait tous les lanthanides présentent quasiment la même chimie de coordination. Ils se comportent comme des acides durs se liant de préférence à des ligands durs tels que les atomes d'oxygène et d'azote par des interactions électrostatiques sans direction privilégiée. Les liaisons formées s'organisent donc de façon à minimiser l'énergie électrostatique et les interactions stériques répulsives. Enfin, la taille de l'ion décroît de façon monotone tout au long de la série, il s'agit du phénomène de contraction des lanthanides. Ainsi plus le rayon du lanthanide est grand et plus il acceptera de ligands. Cependant en général, un environnement de 8 ou 9 ligands convient à tous les lanthanides^[65].

I.4.1. Propriétés magnétiques

A cause du principe d'exclusion de Pauli et de la première règle de Hund, le remplissage des orbitales 4f laisse toujours un ou plusieurs électrons célibataires, à

l'exception des ions La^{3+} et Lu^{3+} dont la sous-couche 4f est respectivement vide et totalement remplie. Ainsi, les ions lanthanides sont pratiquement tous paramagnétiques. L'ion Gd(III) possède 7 électrons non appariés, ce qui lui permet de réduire fortement le temps de relaxation de l'eau du milieu environnant. Cette propriété est utilisée pour l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)^[66].

I.4.2. Propriétés de luminescence

Tous les lanthanides trivalents (noté Ln^{3+}), sauf le La^{3+} et le Lu^{3+} sont luminescents. L'émission des lanthanides est due à trois types de transitions :

- les transitions autorisées f-d
- les transitions autorisées dues à des transferts de charge
- les transitions non autorisées f-f

Les deux premières transitions ont lieu à des énergies trop élevées pour être utilisables dans des applications biologiques, nous nous intéresserons donc ici seulement aux transitions f-f. Les bandes d'émission associées à ces transferts f-f sont fines (fig. I.18.), peu sensibles à l'environnement du fait de l'enfouissement des orbitales f. Le spectre des complexes de lanthanides est donc non influencé par le champ de ligands.

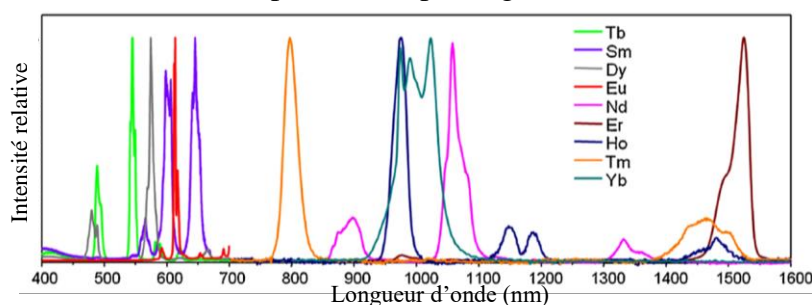


Figure I.18. : Spectre de complexes de lanthanides.

Ces transitions appartenant à la même sous-couche, elles sont interdites par un mécanisme de type dipolaire. De ce fait les coefficients d'extinction molaire sont faibles ($1-10 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) ce qui rend l'excitation directe des ions lanthanides peu efficace. Cependant ces règles établies pour un ion isolé sont partiellement relaxées lorsque l'environnement du lanthanide est non centrosymétrique. Une solution à ce problème est d'incorporer un chromophore (aussi appelé antenne) permettant l'excitation de façon indirecte du complexe de Ln^{3+} , on parle alors d'effet antenne^[67]. En effet c'est l'antenne qui est excitée et qui transfère son énergie au lanthanide qui lui ensuite pourra se désexciter en émettant sa lumière caractéristique (fig. I.19.).

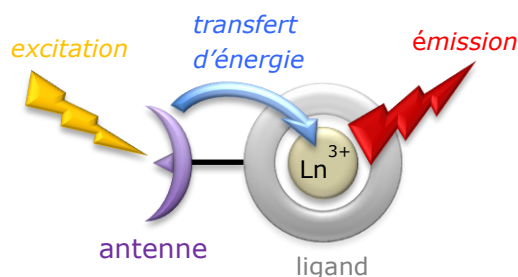


Figure I.19. : Représentation simplifiée des transferts d'énergie au niveau moléculaire pour l'effet d'antenne.

Afin que le transfert soit efficace, il faut que l'antenne soit énergétiquement adaptée au lanthanide. Des règles empiriques ont été développées pour le Tb^{3+} et l' Eu^{3+} ^[68,69]. Dans le cas du terbium, les meilleurs rendements quantiques sont obtenus lorsque l'état excité de l'antenne transférant au lanthanide est situé entre 2 000-5 000 cm^{-1} au-dessus de l'état accepteur émissif $^5\text{D}_4$ (20 400 cm^{-1}) du Tb^{3+} . Au-dessous 2 000 cm^{-1} , la probabilité de transfert retour est importante et le rendement du transfert diminue. Par exemple, le tryptophane dont l'état triplet se trouve à 24 100 cm^{-1} soit 3 700 cm^{-1} au-dessus de l'état $^5\text{D}_4$ du terbium est une bonne antenne pour ce dernier. L'euporium présente plusieurs états excités proches en énergie pouvant intervenir dans le transfert d'énergie. La corrélation entre le rendement quantique et la position de l'état transférant au lanthanide est plus délicate que pour le terbium. Empiriquement, de bons rendements quantiques sont observés lorsque l'état excité de l'antenne transférant au lanthanide se situe au niveau de l'état $^5\text{D}_2$ de l'euporium (21 500 cm^{-1}). Le naphthalène dont l'état triplet se trouve à 21 100 cm^{-1} , donc proche de l'état $^5\text{D}_2$ de l'euporium, est connu pour sensibiliser ce lanthanide. A noter également que les pseudos déplacements de Stokes associés à ces effets antennes sont importants et évitent donc la réabsorption.

De plus l'interdiction des transitions f-f a plusieurs avantages. Tout d'abord elle permet aux Ln^{3+} d'avoir des longs temps de vie, de l'ordre de la microseconde pour les lanthanides émettant dans le proche infrarouge, à la milliseconde pour ceux émettant dans le visible. Cette propriété permet de réaliser des mesures en temps résolu, c'est-à-dire d'introduire un délai entre l'excitation et la détection (fig. I.20.)^[70]. L'état de fluorescence ne dure que quelques nanosecondes, ainsi cette méthode permet d'isoler le signal du lanthanide, notamment de l'autofluorescence du milieu biologique, ainsi que de l'émission de fluorescence de l'antenne et donc de réaliser des mesures avec un meilleur rapport signal/bruit.

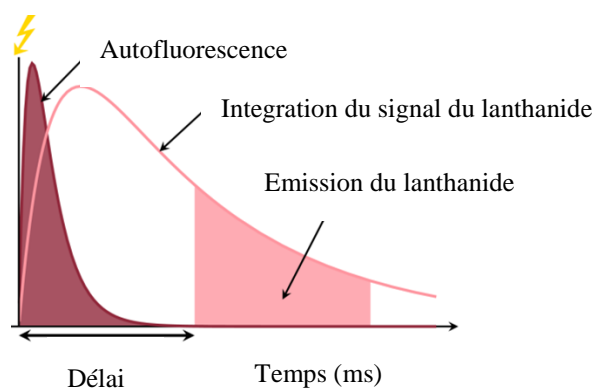


Figure I.20. : Principe de la détection en temps résolu.

Les lanthanides émettant dans le proche infrarouge sont plus adaptés à l'imagerie, mais il nécessite des détecteurs appropriés dont nous ne disposons pas au laboratoire. Cependant les lanthanides ayant des propriétés chimiques similaires il est possible de mettre au point les sondes avec des lanthanides émettant dans le visible et d'ensuite exporter ces modèles pour la détection proche infrarouge en changeant le lanthanide.

Un point également important à considérer est le processus de désexcitation non radiatif des lanthanides en présence des oscillateurs O-H, N-H et C-H. Leurs modes vibrationnels apportent des voies de désexcitation non radiatives aux lanthanides. De ce fait lorsque des molécules d'eau sont coordonnées au centre métallique, la durée de vie de luminescences des lanthanides est diminuée. Ce phénomène est à plusieurs phonons, c'est-à-dire que la différence d'énergie entre l'état excité et l'état fondamental du lanthanide correspond à un multiple de l'énergie de vibration. Or plus le nombre de phonons requis est important, moins le phénomène est probable. Ainsi la désactivation provoquée par les vibreurs O-H est supérieure à celle due aux vibreurs O-D (fig. I.21.).

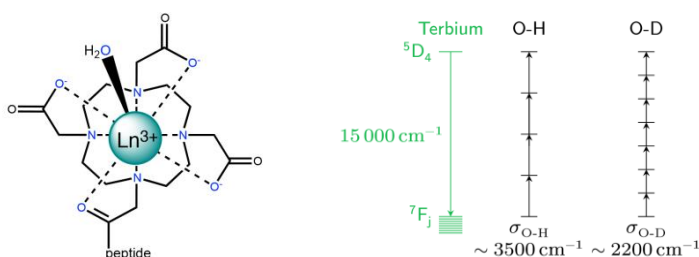


Figure I.21. : (A gauche) Représentation d'un lanthanide complexé par un DOTA et une molécule d'eau. En bleu : atomes liant le lanthanide. (A droite) Illustration de l'extinction de la luminescence du terbium par des vibrations de type O-H et O-D.

De façon générale une diminution du nombre de molécules d'eau dans la sphère de coordination des lanthanides diminue les désexcitations non radiatives, augmentant ainsi la proportion de désexcitations radiatives et donc augmente l'intensité mesurée. De plus la

désactivation est inversement proportionnelle à la différence d'énergie entre l'état émissif et son état fondamental. Par exemple l'extinction de luminescence est plus importante pour l'ion Eu^{3+} ($\Delta E(^5\text{D}_0-^7\text{F}_6) = 12\,300\text{ cm}^{-1}$) que pour l'ion Tb^{3+} ($\Delta E(^5\text{D}_4-^7\text{F}_0) = 14\,800\text{ cm}^{-1}$). Il est possible de déterminer le nombre de molécule d'eau présent dans la sphère de coordination des lanthanides. Ce nombre de molécule d'eau, q , est déterminé à l'aide d'équations phénoménologiques basées sur la différence de temps de vie entre un milieu eau légère et eau lourde^[71]. Pour le Tb^{3+} q est donné par :

$$q_{\text{Tb}}(\text{H}_2\text{O}) = 5,0 \times (\Delta k_{\text{obs}} - 0,06), \text{ avec } \Delta k_{\text{obs}} (\text{ms}) = k_{\text{H}_2\text{O}} - k_{\text{D}_2\text{O}} = \frac{1}{\tau_{\text{H}_2\text{O}}} - \frac{1}{\tau_{\text{D}_2\text{O}}}$$

Et pour l' Eu^{3+} q est calculé grâce à :

$$q_{\text{Eu}}(\text{H}_2\text{O}) = 1,2 \times (\Delta k_{\text{obs}} - 0,25 - 0,075 \times n_{\text{CONH}}), \text{ avec } \Delta k_{\text{obs}} (\text{ms}) = k_{\text{H}_2\text{O}} - k_{\text{D}_2\text{O}} = \frac{1}{\tau_{\text{H}_2\text{O}}} - \frac{1}{\tau_{\text{D}_2\text{O}}}$$

Les sondes utilisant les lanthanides sont basées sur deux principes différents : soit la présence du substrat module la sensibilisation du lanthanide, soit la complexation du substrat modifie le temps de vie de luminescence.

I.5. Sondes développées au laboratoire

Les sondes mises au point au laboratoire sont basées sur un squelette peptidique inspiré du site de liaison de métalloprotéines. Ainsi il est possible de bénéficier de leurs propriétés de sélectivité, de spécificité, de biocompatibilité mais également de permettre la modulation de l'affinité par la modification des acides aminés de la première sphère de coordination^[72,73]. Ces structures sont modifiées afin d'incorporer un complexe de lanthanide et son antenne associée à des emplacements stratégiques afin d'assurer un transfert d'énergie efficace et modulable. Pour la détection du zinc, les sondes sont inspirées des protéines doigts de zinc et pour la détection du cuivre de la protéine CusF. Bien que ces deux sondes s'allument en présence de métal, elles fonctionnent sur des principes différents.

I.5.1. Sondes à zinc développées au laboratoire

Les structures doigts de zinc sont parmi les plus abondantes dans le génome eucaryote. Il s'agit de petits domaines protéiques coordonnant le zinc dans le but de former et stabiliser leur repliement. Ils sont notamment impliqués dans des processus d'interactions et lient tout une variété de molécules comme les acides nucléiques, les protéines ou des petites molécules. Les doigts de zinc peuvent être classés selon des critères structuraux^[74]. Le groupe $\beta\beta\alpha$ est l'un des plus communs chez les eucaryotes et également un des plus étudiés. Il se structure en

présence de zinc afin de former une épingle à cheveux β suivi par une hélice α . Sa séquence est de la forme :

(Tyr,Phe)-X-Cys-X_{2,4}-Cys-X₃-Phe-X₅-Leu-X₂-His-X_{3,4}-His ou X représente un acide aminé quelconque. Les acides aminés conservés sont non seulement les acides aminés liant le zinc (en rouge) mais également les acides aminés hydrophobes (en bleu). Ces derniers forment un cœur hydrophobe lorsque le peptide lie le zinc, les interactions ainsi mises en jeu participent à la structuration du peptide et permettent donc d'augmenter l'affinité du peptide pour le zinc (fig. I.22.).

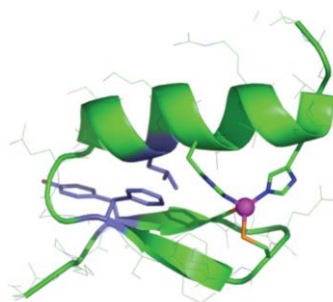


Figure I.22. : Structure d'un domaine doigt de zinc $\beta\beta\alpha$

Ces structures en doigt de zinc $\beta\beta\alpha$ ont déjà été exploitées par l'équipe d'Imperiali afin de développer des sondes à zinc. Ces sondes sont basées sur la modulation de l'exposition au solvant d'un chromophore organique sensible à l'environnement en fonction du repliement peptidique. En effet pour la sonde ZNS1, un groupement dansyl est introduit à la place de la phénylalanine du cœur hydrophobe ainsi il est exposé au solvant en absence de zinc, et est à l'intérieur du cœur hydrophobe en sa présence. De ce fait en limitant les désexcitations non radiatives dues à la présence de l'eau ce phénomène permet une augmentation de la fluorescence d'un facteur 5 à 475 nm lors de l'excitation à 333 nm ainsi que son décalage vers le bleu^[75] (fig. I.23.).

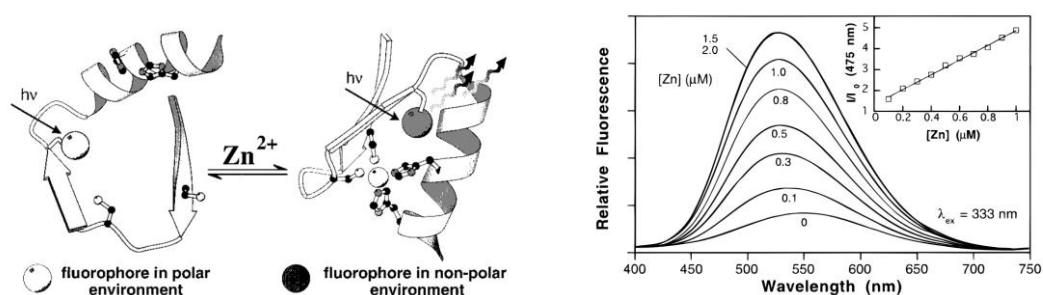


Figure I.23. : (A droite) Dessin schématique du fonctionnement de la sonde. (A gauche) Emission en fluorescence de la sonde ZNS1 lors d'un titrage par le Zn^{2+} . 1,4 μM ZNS1, 50 mM HEPES, pH 7, $\lambda_{ex} = 333$ nm^[75].

Une autre stratégie a été développée par L'équipe de J.M.Berg afin de développer des sondes ratiométriques inspirées de doigt de zinc $\beta\beta\alpha$ ^[76]. Ainsi dans la sonde CP-L-F deux chromophores organiques, la fluorescéine et la lissamine, sont introduits sur la séquence de

façon à ce que leur distance varie en fonction de la coordination au zinc. De cette façon le transfert d'énergie de la fluorescéine vers la lissamine augmente, induisant ainsi une augmentation de l'intensité d'émission de fluorescence de la lissamine à 596 nm alors que celle de la fluorescéine reste quasiment constante (521 nm) (fig. I.24.). Ces deux émissions varient donc de façons différentes ce qui rend la sonde ratiométrique. Cependant l'hypothèse du FRET accru semble douteuse puisqu'elle devrait conduire à une diminution de la fluorescence de la fluorescéine, or celle-ci augmente très légèrement.

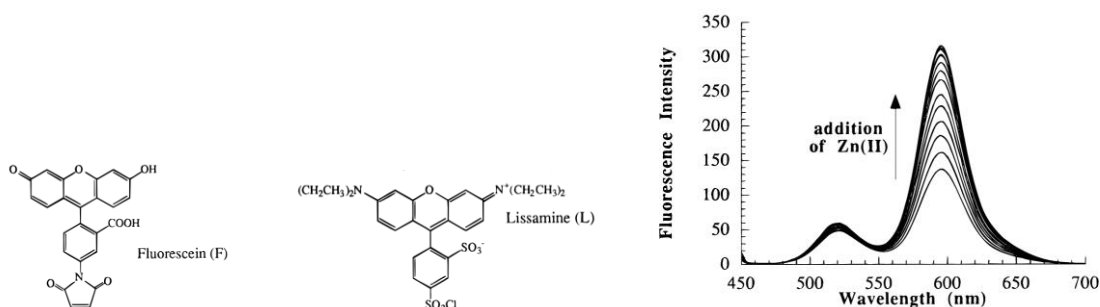


Figure I.24. : (A gauche) Structure de la fluorescéine. (Au milieu) structure de la lissamine. (A droite) Emission en fluorescence de la sonde CP-L-F lors d'un titrage par le Zn^{2+} . $3,7 \mu M$ CP-L-F, $\lambda_{ex} = 430 \text{ nm}$ ^[76].

Ces deux exemples montrent que les doigts de zinc sont intéressants à exploiter pour l'élaboration de sondes, cependant ces deux équipes n'ont pas poussé plus loin leurs travaux. Les sondes à zinc développées au laboratoire fonctionnent sur le principe de modulation du transfert d'énergie en fonction du repliement peptidique. Cependant afin de bénéficier des avantages photophysique des lanthanides, les chromophores organiques sont remplacés par un complexe de lanthanide et de son antenne associée. En absence de zinc, l'antenne et le lanthanide sont trop éloignés pour que le transfert d'énergie soit efficace. En présence de zinc, le peptide se replie, l'antenne et le lanthanide se rapprochent permettant ainsi un transfert d'énergie plus efficace (fig. I.25.).

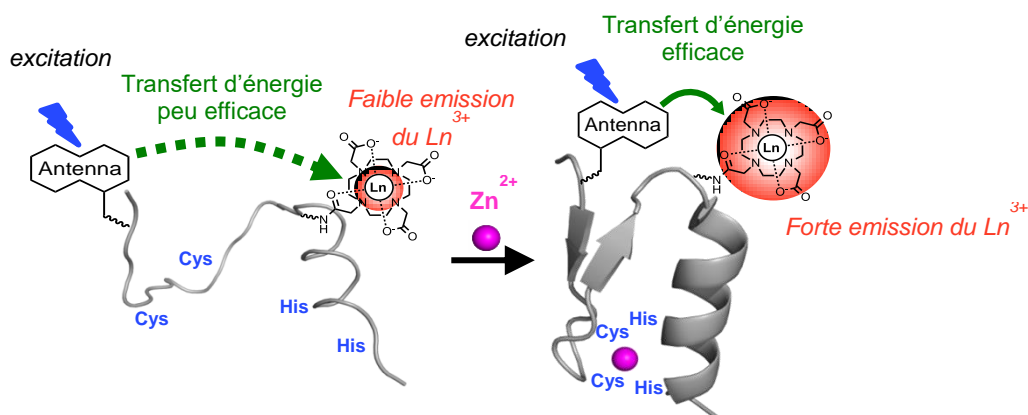


Figure I.25. : Principe de la sonde à zinc.

La première sonde mise au point au laboratoire basée sur ce principe a été synthétisée avant mon arrivée au laboratoire. La séquence de ce peptide, notée SP2(Tb), est basée sur un

doigt de zinc de type $\beta\beta\alpha$. L'antenne utilisée, le tryptophane, est présent dans la séquence dans l'hélice α et le complexe de terbium sur le feuillet β proche de l'extrémité N-terminale. De cette façon ces deux éléments sont éloignés en absence de zinc et proche en sa présence (fig. I.26.).

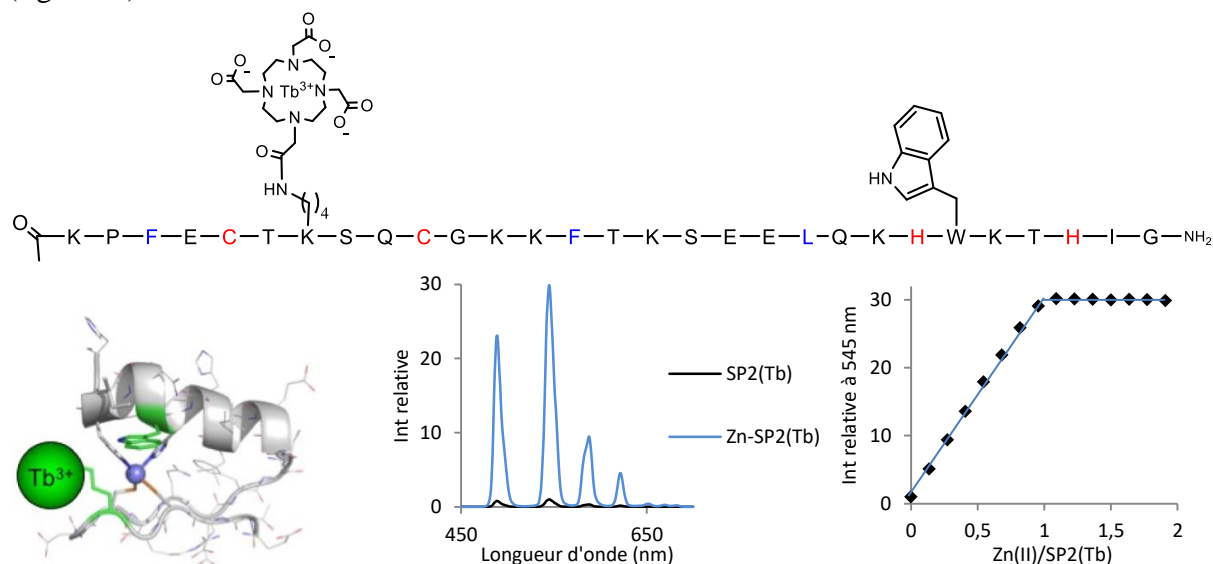


Figure I.26. : (En haut) Séquence de SP2(Tb). En rouge : les acides aminés liant le zinc. En bleu : les acides aminés formant le cœur hydrophobe. (En bas à gauche) Structure et position estimée du terbium dans la sonde SP2(Tb). (En bas à droite) titrage du peptide SP2(Tb) par ZnCl₂ suivi par spectroscopie d'émission en temps résolu. 10 μ M SP2(Tb), 10 mM HEPES pH 7.5, 350 μ M TCEP. $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm, délai 200 μ s, temps d'intégration 2 ms.

Cette sonde valide bien le principe mais doit être améliorée. En effet la constante de dissociation (K_d) de cette sonde est de 10^{-12} M, or les applications cellulaires nécessitent des valeurs de K_d plus élevées comprises dans la gamme de concentration en zinc circulant soit 10^{-11} - 10^{-8} M. De plus, ce modèle est sensible aux changements ponctuels. En effet un changement de lanthanide et/ou d'antenne modifie totalement le comportement de la sonde avec des contrastes moins importants. Afin d'évaluer l'influence de la position du lanthanide et de l'antenne une autre séquence a été mise au point : SP3.

Ainsi la sonde notée SP3-Trp-DapDOTA(Tb) a été élaborée. Elle respecte la séquence consensus des doigts de zinc $\beta\beta\alpha$ mais l'acide aminé hydrophobe phénylalanine en N-terminale est substitué par l'antenne aromatique. L'antenne et le complexe de lanthanide sont introduits de façon à ce que leur distance diminue en présence de zinc. Ainsi l'antenne est placée sur un des feuillet β et le complexe de lanthanide à l'extrémité de l'hélice α . Le repliement dû au zinc induit une augmentation de luminescence d'un facteur 8 (fig. I.27.).

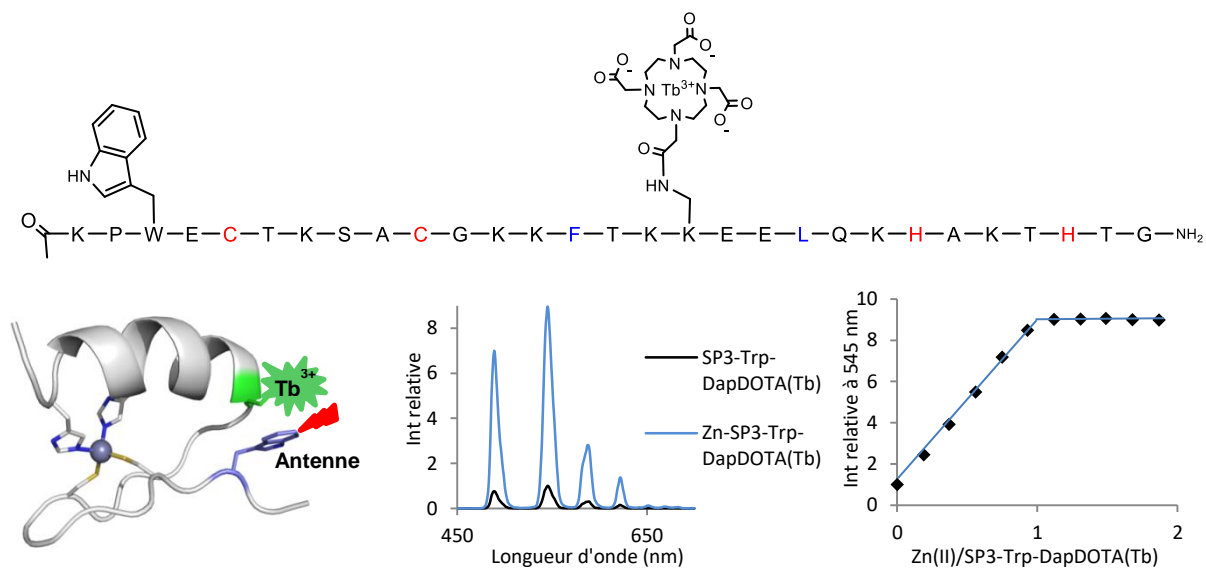


Figure I.27.: (En haut) Séquence de SP3-Trp-DapDOTA(Tb). En rouge : les acides aminés liant le zinc. En bleu : les acides aminés formant le cœur hydrophobe. (En bas à gauche) Structure et position estimée du terbium dans la sonde SP3-Trp-DapDOTA(Tb). (A droite) titrage du peptide SP3-Trp-DapDOTA(Tb) par ZnCl₂ suivi par spectroscopie d'émission en temps résolu. 10 μM SP3-Trp-DapDOTA(Tb), 100 mM HEPES pH 7.5, 350 μM TCEP. λ_{ex} = 280 nm, délai 200 μs, temps d'intégration 2 ms.

Le complexe de terbium est porté sur cette sonde par la chaîne latérale du Dap (fig. 1.28) qui est un acide aminé non naturel dont le carbone α porte un seul carbone puis une fonction amine. Une sonde similaire a été développée en substituant le résidu Dap par une lysine, c'est-à-dire que dans cette sonde le complexe de lanthanide est porté par la chaîne latérale d'une lysine (fig. I.28.).

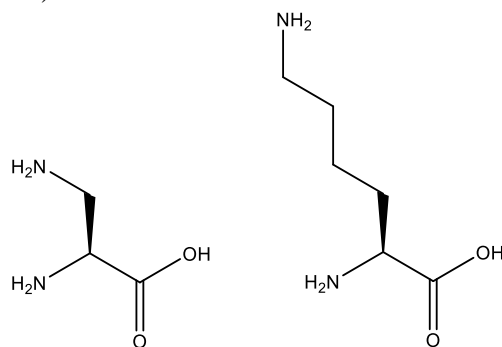


Figure I.28. : (A gauche) Acide Nα-Fmoc-L-2,3-diaminopropionique ou Dap. (A droite) Lysine.

La sonde en série lysine, SP3-Trp-LysDOTA(Tb), a un contraste de 4 soit deux fois moins important que pour la série Dap. Ces sondes SP3 sont synthétisées en utilisant une méthode convergente. Ainsi elles sont synthétisées en deux fragments, puis ces deux fragments sont liés par ligation native. Afin de délimiter le peptide une cystéine naturellement présente dans la séquence est utilisée. L'antenne et le lanthanide se trouvent donc sur des fragments différents. De cette façon il est possible de facilement faire varier ces différents composés et ainsi de tester un nombre de sondes plus élevé (fig. I.29.).

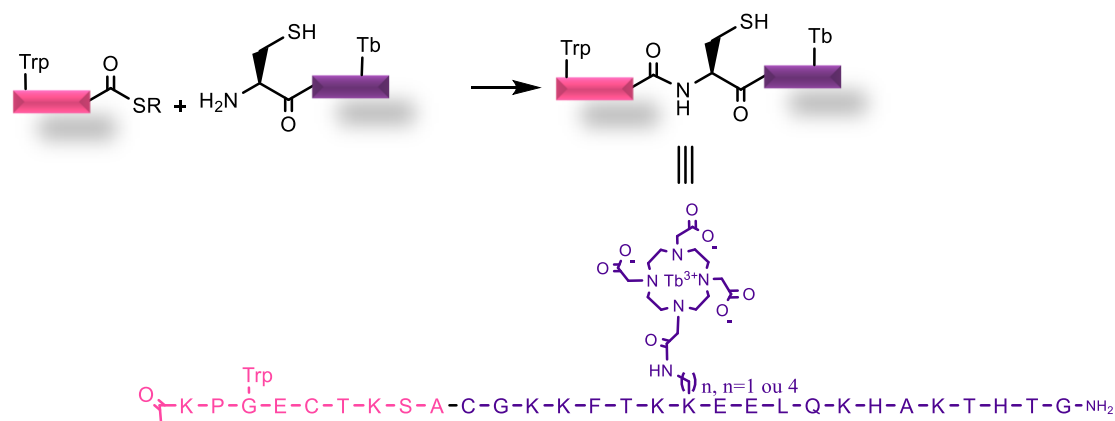


Figure I.29. : Schéma d'assemblage des fragments antenne et lanthanide lors de la synthèse des sondes SP3-Trp-Dap/Lys-Tb.

I.5.2. Sondes à cuivre développées au laboratoire

La sonde intensiométrique CC9 a été synthétisée avant mon arrivée au laboratoire. Elle est inspirée d'une chaperonne à cuivre, la protéine CusF issue du système CusCFBA qui permet l'efflux de l'argent et du cuivre chez *Escherichia coli*. La protéine CusF fait partie de l'opéron *cusCFBA* qui code les protéines CusF, CusC, CusB et CusA. Le complexe CusABC est transmembranaire et permet l'excrétion du cuivre(I) et de l'argent(I). CusF interagit avec CusB pour transférer le métal qui est ensuite éliminé de la cellule (fig. I.30.).

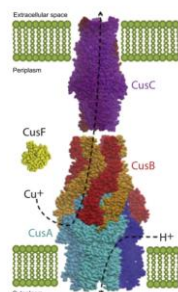


Figure I.30. : Système d'efflux CusCFBA du cuivre(I) et de l'argent(I) chez *Escherichia coli*.

La protéine périplasmique CusF de 10-kDa lie un métal par polypeptide. Cette liaison est assurée par deux méthionines, une histidine, qui sont des ligands classiques du cuivre, mais aussi par un tryptophane via une interaction cation- π selon un complexe tétraédrique (fig. I.31.)^[77].

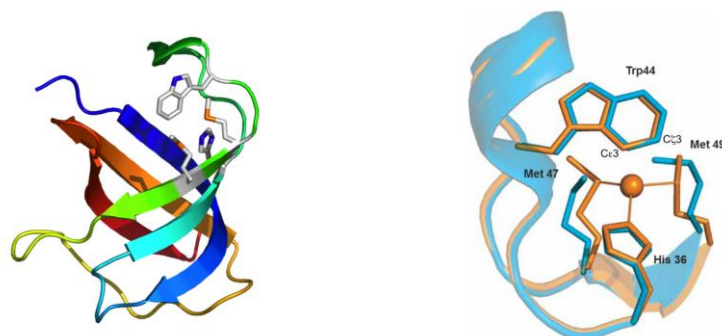


Figure I.31. : (A gauche) Structure cristallographique de CusF comprenant les acides aminés 13-87. (A droite) Superposition du squelette peptidique de apo-CusF (bleu) et Cu^+ -CusF^[77].

L'interaction cation- π entre le cuivre et le tryptophane est inhabituelle. En effet, les interactions cation- π connues s'établissent le plus souvent entre un aromatique et un cation alcalin, alcalino terreux, ou un cation organique (ammonium de lysine). Ainsi il est estimé que tous les 77 acides aminés en moyenne il y aurait une interaction cation- π entre l'ammonium d'une lysine ou d'une arginine et un acide aminé aromatique, ainsi 25% des tryptophanes seraient engagés dans des interactions cation- π . Les distances entre le cuivre et les carbones C ϵ 3 et C α 3 du tryptophane sont respectivement de 2,67 Å et de 2,86 Å. Ces liaisons sont plus longues que les liaisons de coordination du complexe avec l'éthylène (1,945 à 2,028 Å) mais plus courte que la somme des rayons de Van der Waals. Cette liaison est faiblement covalente. Cette interaction cation- π modifie les propriétés spectroscopiques du tryptophane, notamment la signature raman ainsi que l'absorption UV-visible et l'émission de fluorescence. En effet en présence de cuivre(I), la bande d'absorption du tryptophane, liée à la transition π - π^* se déplace vers le rouge, et la fluorescence est éteinte. Cette extinction est provoquée par une augmentation du croisement intersystème de l'état singulet vers l'état triplet du tryptophane^[78].

Pour l'élaboration de la sonde CC9, seule la boucle de 16 acides aminés de CusF comportant les quatre résidus liant le métal a été conservée. Afin d'induire des feuilletts β vrillés retrouvés dans la boucle naturelle de CusF deux acides aminés non naturels ont été ajoutés : l'Aib (α,α' -diméthylglycine) et une D-Proline. Enfin le terbium est complexé par un DOTA qui est introduit sur la chaîne latérale d'une lysine proche du tryptophane dans la séquence pour que le transfert soit efficace (fig. I.32.). La sonde mise au point avant mon arrivée au laboratoire est noté CC9.

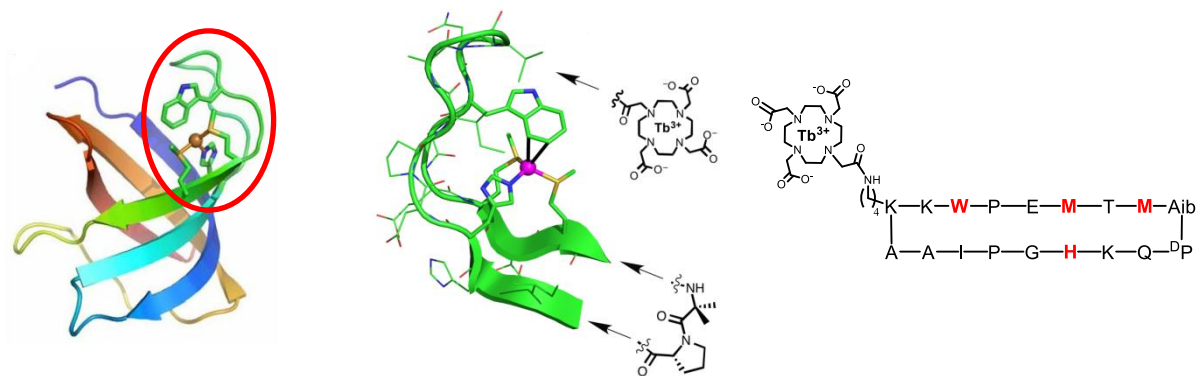


Figure I.32. : (A gauche) Structure de CusF dont la boucle contenant les acides aminés coordinants est entourée. (Au milieu) Schéma de l'incorporation du complexe de DOTA ainsi que des acides aminés Aib-^DPro. (A droite) Séquence de la sonde CC9.

En présence de Cu^+ , l'émission du terbium augmente d'un facteur 6 (fig. I.33.). De plus la sonde est sélective du Cu^+ par rapport aux métaux physiologiques. Elle répond également à l' Ag^+ de façon similaire, ces deux ions ayant des propriétés voisines.

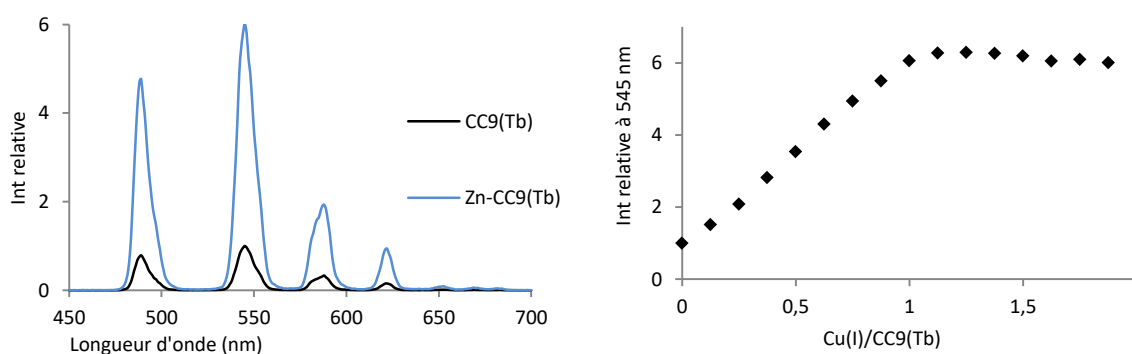


Figure I.33. : (A gauche) Spectres en temps résolu du peptide CC9 avec et sans cuivre. (Au milieu) Evolution de l'émission à 545 nm en fonction de la quantité de cuivre ajoutée. 5 μM CC9, 10mM HEPES pH 7,5, 2 mM. NH_2OH Ajouts de Cu(II)SO_4 . $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, délai 200 μs , temps d'intégration 2 ms.

La modulation du signal du terbium en fonction de la complexation du cuivre(I) est due à la modification des propriétés du tryptophane par l'interaction cation- π . En effet ce phénomène accroît le croisement intersystème de l'état singulet vers l'état triplet du tryptophane. Etant donné que le terbium est sensibilisé par un transfert d'énergie depuis l'état triplet du tryptophane, une modification de cet état modifie le transfert d'énergie et donc la sensibilisation du terbium (fig. I.34.).

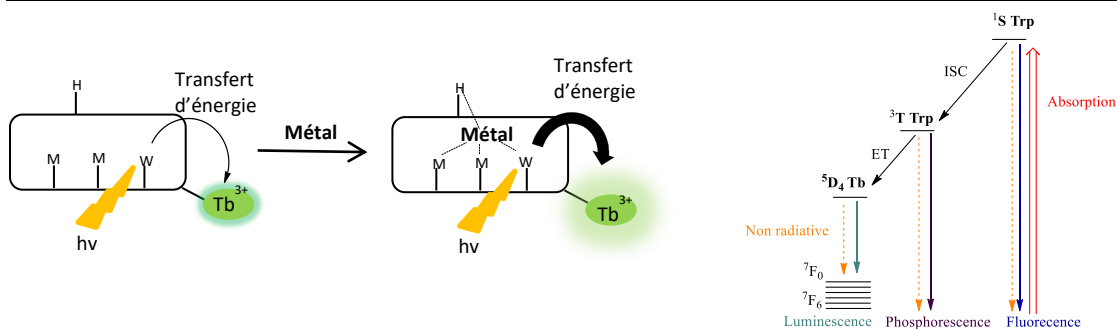


Figure I.34. : (A gauche) Diagramme de Jablonski représentant les transferts possibles d'énergie dans la sonde. (A droite) Diagramme de Jablonski associé à la sonde.

I.6. Projet de thèse

I.6.1. Objectifs

Afin de pouvoir détecter et suivre le zinc et le cuivre, plusieurs sondes intentionnelles, que nous venons de décrire, ont été mises au point au laboratoire avant mon arrivée. Pour développer ces systèmes et réaliser les objectifs fixés pour une utilisation au niveau biologique, il faut perfectionner ces sondes avec trois challenges en ligne de mire :

- (i) Permettre la quantification en développant des systèmes ratiométriques. Pour produire des sondes ratiométriques nous avons choisi d'introduire un second lanthanide différent du terbium afin de disposer de deux signaux qui varient indépendamment avec l'ajout de métal. Afin de sensibiliser les lanthanides, il est possible d'utiliser la même antenne ou d'utiliser une antenne différente excitable à la même longueur d'onde pour chaque lanthanide. Ces deux stratégies seront utilisées et développées dans ce manuscrit, la première pour le développement des sondes à Zn²⁺ ratiométriques et la seconde pour les sondes à Cu⁺ ratiométriques. Les deux émissions des lanthanides doivent avoir des propriétés proches afin d'être enregistrées dans les mêmes conditions.
- (ii) Déplacer l'excitation et l'émission des sondes vers le visible et le proche infrarouge afin de bénéficier de la fenêtre de transparence du milieu biologique. Les systèmes sont mis au point avec des lanthanides émettant dans le visible pour des raisons pratiques. Il faudrait maintenant transposer ces systèmes pour avoir une excitation et des émissions à des longueurs d'ondes supérieures afin de bénéficier de la fenêtre de transparence du milieu biologique.
- (iii) Assurer la pénétration cellulaire. Les peptides que nous utilisons sont incapables de franchir la barrière membranaire. Afin de remédier à ce problème il faut leur adjoindre des peptides pénétrants (CPPs). Ces séquences seront couplées aux sondes via des ligations chémosélectives.

I.6.2. Stratégie et mise en œuvre

I.6.2.2. Ligation

Comme nous le verrons par la suite, nous avons envisagé une approche convergente pour la synthèse des sondes en assemblant plusieurs fragments apportant chacun une propriété différente. Par exemple il est possible de développer des sondes pour la pénétration cellulaire en assemblant trois fragments distincts : un premier avec un complexe de lanthanide pour permettre l'émission, un deuxième incorporant une antenne pour assurer l'excitation et un troisième avec une séquence de pénétration dans le but de passer la membrane. Cette stratégie de « légo » permet de faire varier facilement les fragments et ainsi d'obtenir un panel de sondes important. Pour concevoir de telles architectures, il est nécessaire de contrôler spécifiquement les différentes voies d'assemblage des fragments. Ces assemblages se font par des réactions de ligation chimiosélectives. Une des solutions possible est l'utilisation d'une seule ligation chimiosélective de façon itérative. Une des procédures correspondantes est l'assemblage de fragments peptidiques par ligations natives et déprotections successives des résidus cystéines en N-terminale^[79,80]^[80]

79]

78]

. Un autre exemple est l'assemblage de différents fragments contenant des fonctions alcynes protégées par des groupes orthogonaux par cycloadditions de Huisgen successives^[81]. Cependant ce type de stratégie induit des étapes de déprotections et de couplages successifs. Nous avons donc choisi une autre stratégie basée sur l'utilisation de ligations chimiosélectives orthogonales. Dans cet optique quatre ligations chimiosélectives ont été sélectionnées et utilisées durant ma thèse : la ligation native (et plus particulièrement la ligation SEA), la ligation oxime, la cycloaddition de Huisgen et le couplage thiol-maléimide.

Ligation native

La ligation chimique native (native chemical ligation ou NCL), mise au point par Stephen Kent en 1994^[82], permet de lier deux fragments peptidiques dont l'un contient un thioester en C-terminale et l'autre une cystéine en N-terminale (fig. I.35.).

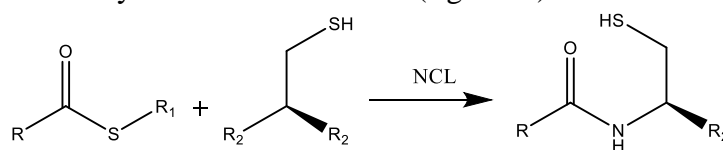


Figure I.35. : Schéma de la ligation native

L'introduction d'une cystéine en N-terminale durant la synthèse peptidique sur support solide (SPPS) se réalise en routine. Cependant l'incorporation d'un thioester en C-terminale en stratégie Fmoc/tBu, qui est la stratégie la plus utilisée de nos jours, est plus complexe. En effet la fonction thioester est instable dans les conditions de déprotection standard du groupement Fmoc. Cette difficulté peut être surmontée en utilisant une base non nucléophile^[83-85]. D'autres stratégies ont été mises au point comme la protection du groupe

thioester^[86] ou bien l'introduction du thioester après l'élongation peptidique^[87,88]. Une autre stratégie est de l'introduire sous la forme d'un précurseur stable qui après réarrangement donne un thioester utilisable pour la ligation native. C'est cette dernière stratégie que nous avons utilisé. Un de ces systèmes est le groupe bis(2-sulfanylethyl)amido (SEA)^[89]. Le peptide SEA est décroché et déprotégé de la résine sous sa forme SEA-on, il peut être ensuite inactivé dans des conditions oxydantes faibles pour mener à sa forme SEA-off (fig. I.36.). Il sera ensuite converti en thioester dans les conditions réductrices de la ligation (TCEP). Cette étape a lieu en présence de MPAA (acide 4-mercaptophénylacétique) qui est un réducteur trop faible pour réduire le SEA-off mais qui cependant catalyse la réaction par transtioesterification.

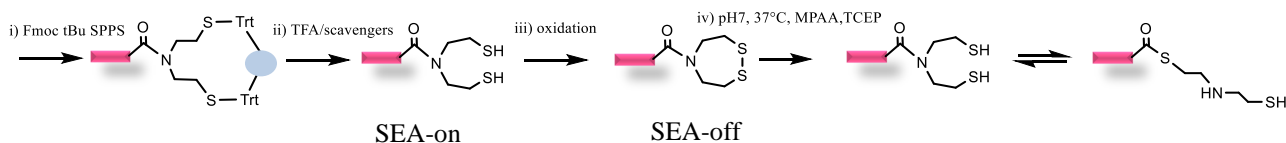


Figure I.36. : Schéma représentatif du passage du fragment SEA-on en SEA-off^[89].

Ligation oxime

La condensation de carbonyle sur des composés aminés, est également une méthode de choix pour la ligation de fragments peptidiques. Tout d'abord cette condensation est possible avec des amines primaires pour former des liens imines réversibles. Ces imines peuvent être réduites pour former des liens amines non-hydrolysables. Cette condensation est également possible avec des composés aminés portant un groupement donneur en α , de type oxyamine, pour former des liens oxime^[90,91] qui seront exploités dans ce manuscrit^{91]}

89]

(fig. I.37.). Ces liens sont stables à pH neutre.

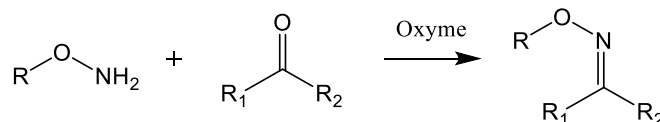


Figure I.37. : Schéma de la ligation oxyme.

Cycloaddition de Huisgen catalysée par le Cu⁺

Parmi les ligations utilisées durant ma thèse nous pouvons citer la cycloaddition de Huisgen catalysée par le Cu⁺^[92,93]. Cette ligation permet de coupler un azoture et un alcyne terminal afin de former un 1,2,3 triazole substitué en position 1, 4 (fig. I.38.).

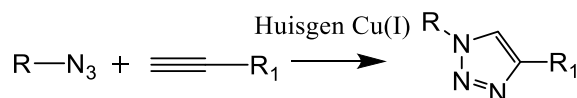


Figure I.38. : Schéma de la ligation Huisgen

Elle peut se réaliser dans une grande gamme de température (0-160°C) et de pH (5 à 12), ainsi que dans différents solvants (dont H₂O). Les deux précurseurs de cette ligation sont stables, facile à introduire, faisant en partie la popularité de cette ligation^[94]. De plus d'un point de vue structural le lien triazole est un isostère de la liaison peptidique avec une susceptibilité moindre la coupure hydrolytique. De nombreuses études se sont penchées sur l'optimisation de cette ligation et ont montré que l'utilisation d'un ligand stabilisant le Cu⁺ permet d'augmenter la cinétique, le rendement de la réaction et limite les oxydations néfastes^[95]. Les ligands les plus utilisés sont basés sur des dérivés tris(triazolyméthyl)amines tels que les analogues solubles dans l'eau THPTA, OEG-TTAA, et BTAA (fig. I.39.).

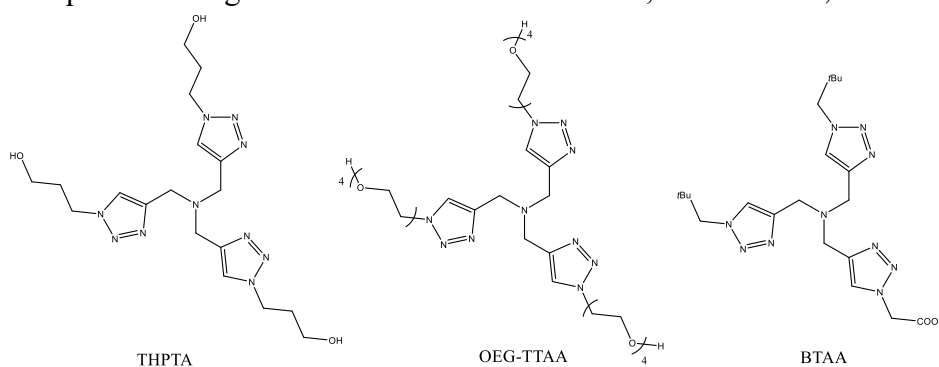


Figure I.39. : Structure des ligands du Cu⁺ : THPTA, OEG-TTAA, et BTAA.

Couplage thiol-maléimide

Parmi les acides aminés naturels, la cystéine combine de nombreux avantages (nucléophilie importante, faible abondance) permettant ainsi son utilisation pour des réactions chimiosélectives. En effet outre la ligation native qui nécessite sa présence, on peut citer la formation de pont disulfure, de lien thioéther, thioester, thiazolidine, la ligation thiol-maléimide. Cette dernière est utilisée dans les travaux présentés dans le manuscrit. Elle consiste en une addition de Michael entre un groupement thiol et maléimide. Elle est spécifique des thiols à pH compris entre 6,5 et 7,5. Cependant ce lien n'est pas stable, il peut subir des réactions d'échanges de thiol ainsi qu'une régénération du maléimide. Ces réactions parasites peuvent être évitées par l'hydrolyse du maléimide^[96] (fig. I.40.). Cette ligation n'étant pas sélective d'une cystéine en particulier elle nécessite l'absence ou la protection orthogonale des autres résidus cystéines dans la séquence.

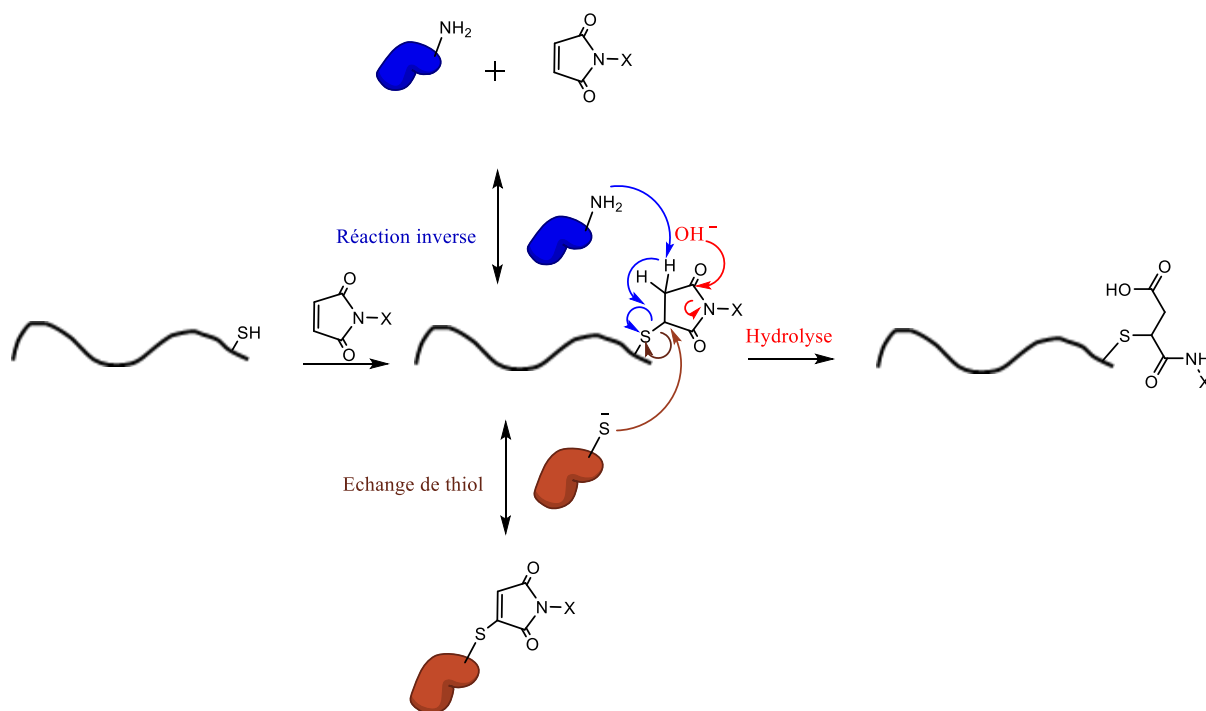


Figure I.40 : Représentation du couplage thiol-maléimide et des réactions parasites associés.

Toutes ces ligations ont été utilisées au fil de ma thèse afin de développer et d'améliorer les différents systèmes. Elles seront donc exploitées dans tous les chapitres du manuscrit. Le chapitre II porte sur l'élaboration de sondes à Zn^{2+} ratiométriques émettant dans le visible mais également dans le proche infrarouge à partir de sondes intensiométriques. Nous verrons dans le chapitre III l'élaboration de sondes de pénétration cellulaire pour le Zn^{2+} ainsi que les premiers tests biologiques qui leur sont associées. Le chapitre IV, quant à lui, décrira une sonde ratiométrique pour le Cu^+ ainsi que les mutants synthétisés pour pouvoir analyser les transferts d'énergie ayant lieu dans la sonde.

Chapitre II : Des sondes intensiométriques aux sondes ratiométriques

II.1. Principe

La sonde intensiométrique SP3-Trp-DapDOTA(Tb) à Zn^{2+} est inspirée d'un domaine « doigt de zinc » classique $\beta\beta\alpha$ (fig. II.1.). Son principe de fonctionnement est basé sur la modulation du transfert d'énergie dû au repliement induit par le Zn^{2+} entre l'antenne aromatique (tryptophane) et le complexe de lanthanide (DOTA-Tb³⁺), tous deux greffés sur le peptide. L'augmentation de luminescence est d'un facteur huit lorsque le complexe de lanthanide est greffé sur la chaîne latérale d'un Dap et de quatre lorsqu'il est greffé sur la chaîne latérale d'une lysine.

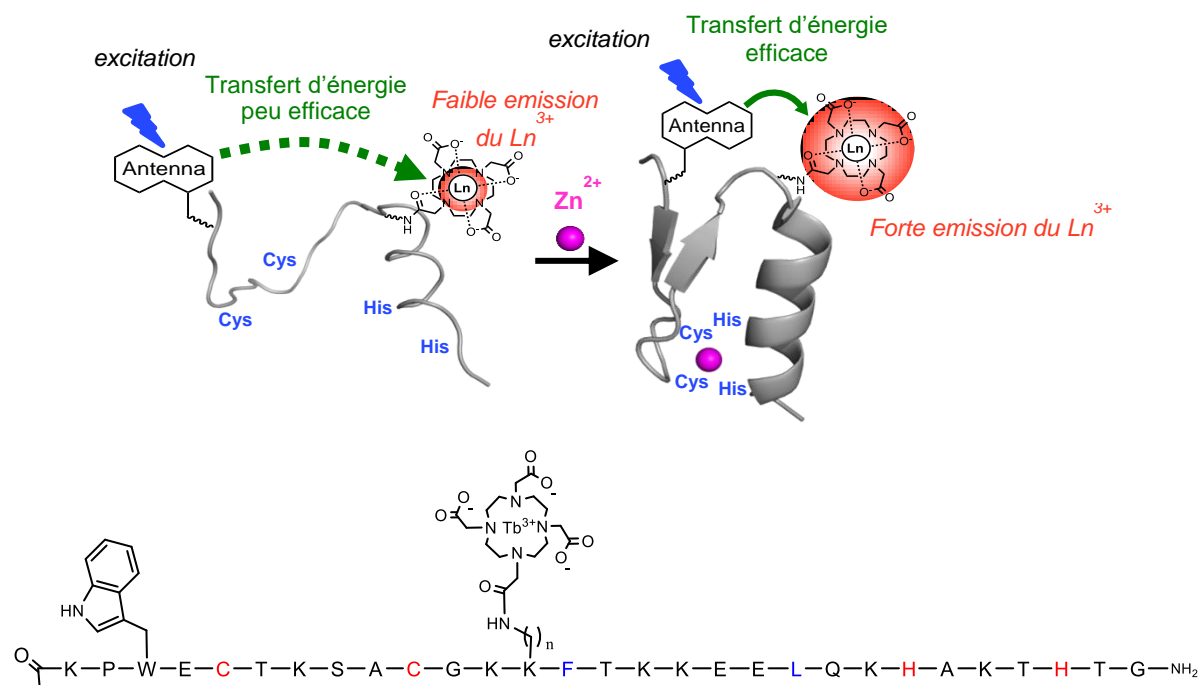


Figure II.1. : (En haut) Principe de la sonde SP3 (En bas) Séquence de SP3-Trp-DapDOTA(Tb). En rouge : les acides aminés liant le zinc. En bleu : les acides aminés formant le cœur hydrophobe.

Un des buts de ma thèse est d'améliorer les propriétés de la sonde SP3-Trp-DapDOTA(Tb) en permettant notamment la détection ratiométrique. Pour produire une sonde ratiométrique il faut ajouter un second lanthanide émettant à une longueur d'onde différente du premier lanthanide. De plus les émissions des deux lanthanides doivent varier indépendamment. Ces lanthanides peuvent être sensibilisés par deux antennes différentes ou par la même antenne. Une sonde ratiométrique à zinc a déjà été mise au point au laboratoire exploitant la première solution. Elle est basée sur le modèle SP2 précédemment utilisé au laboratoire utilisant le DOTA comme chélateur et auquel est ajouté en N-terminale le chélateur DTPA. Ces chélateurs sont stables thermodynamiquement et sont inertes cinétiquement à pH 7. Cependant le DTPA devient labile en condition acide. Cette caractéristique est mise à profit pour la synthèse de cette sonde. En effet après synthèse sur support de la sonde, elle est métallée en solution par un excès de terbium. Les deux chélateurs complexent le Tb^{3+} . La labilité en milieu acide du DTPA est ensuite utilisée afin de retirer le Tb^{3+} du DTPA pour ensuite introduire sélectivement l' Eu^{3+} dans ce dernier (fig. II.2.).

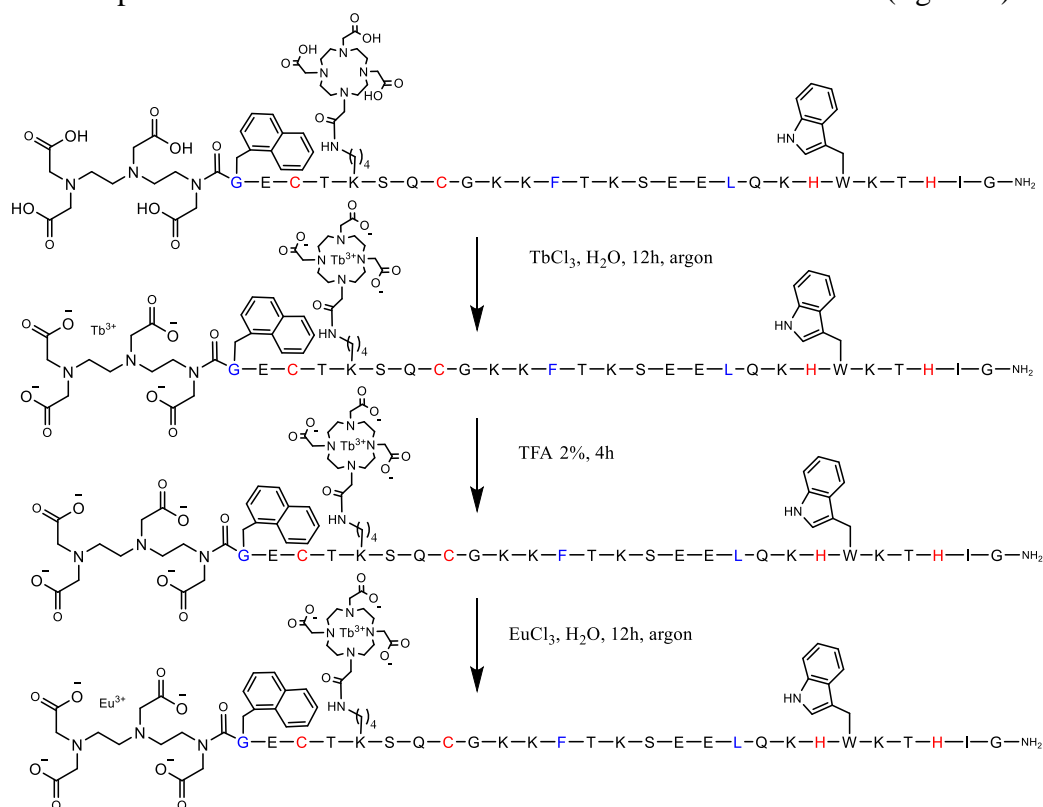


Figure II.2. : Schéma de complexation des lanthanides de la sonde ratiométrique SP2[Eu^T-Tb⁰].

Par cette méthode, quatre sondes ont été synthétisées, elles varient selon le positionnement des lanthanides et des chélateurs. Leur dénomination SP2[Ln1^T ou O -Ln2^T ou O] indique la nature du lanthanide en position N-terminale (Ln1) ou celui dans le corps de la sonde (Ln2) ainsi que les chélateurs utilisés pour le complexer (T pour DTPA ou O pour DOTA). Toutes ont un comportement ratiométrique mais les intensités relatives d'émission du Tb^{3+} et de l' Eu^{3+} ainsi que le comportement induit par le Zn^{2+} est difficilement rationalisable

(fig. II.3.), ce qui est dû à des transferts d'énergie entre les paires antenne/lanthanide (fig. II.3.). De plus cette voie de synthèse ajoute des étapes de demétallation et métallation fastidieuses. Afin de limiter le nombre d'étapes nous ne souhaitons pas utiliser la même stratégie.

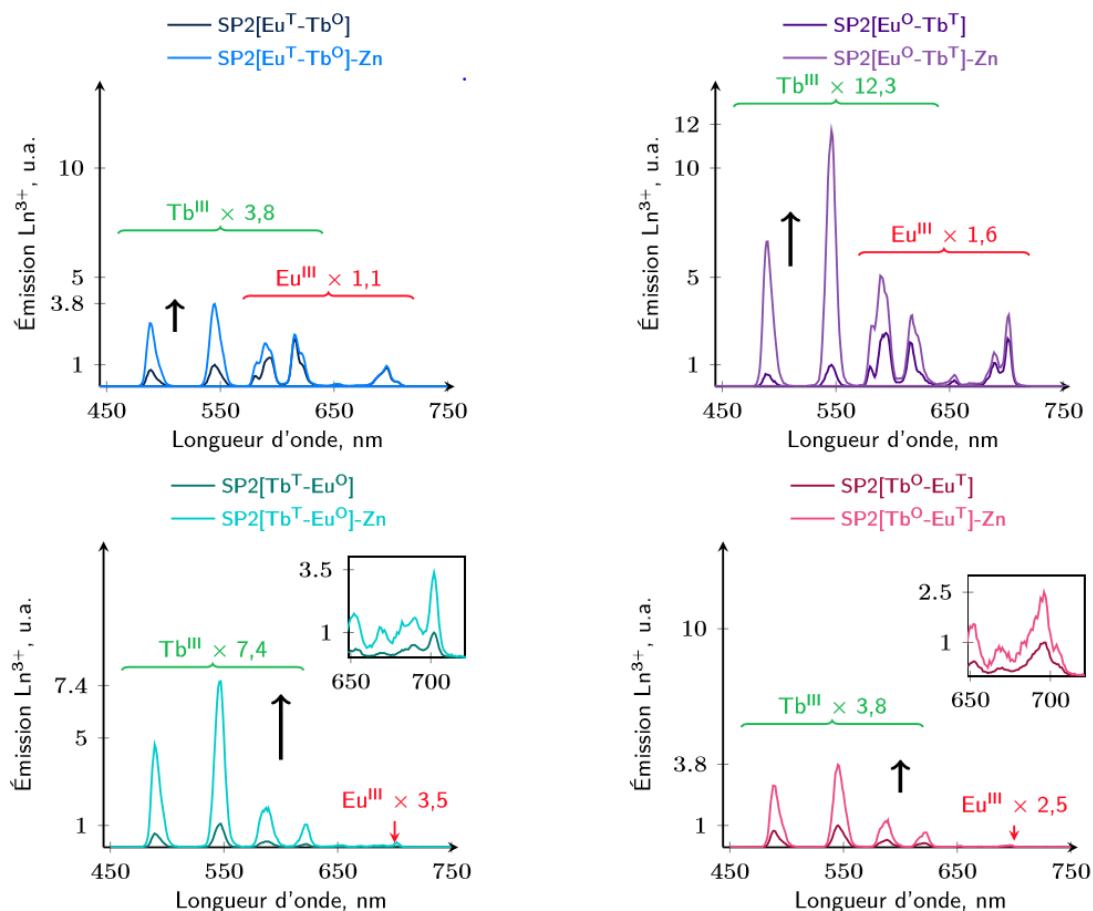


Figure II.3. : Emission en temps résolu des quatre peptides bis-lanthanides SP2. 10 μmol peptide, 10mM HEPES pH 7,5, 250 μM TCEP. $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, délai 200 μs , temps d'intégration 2 ms.

A notre connaissance il n'y a qu'un seul autre exemple de sonde ratiométrique résolu en temps reposant sur deux lanthanides. L'équipe de Faulkner a synthétisé deux sondes ratiométriques contenant deux lanthanides pour la quantification de l'oxygène^[97] (fig.II.4.).

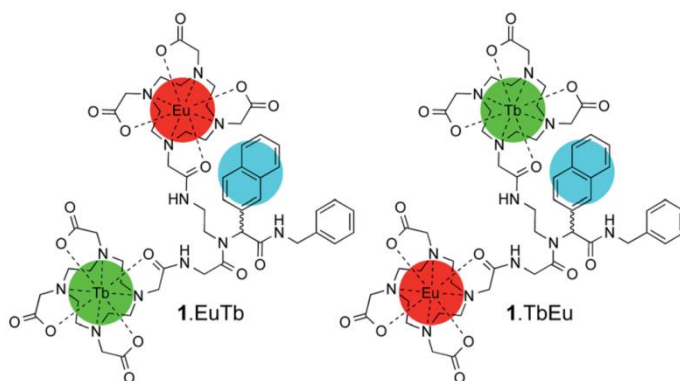


Figure II.4. : Structure des sondes à oxygène EuTb et TbEu.

Dans ces sondes, les lanthanides sont complexés par le même chélateur : le DOTA. Afin d'introduire sélectivement les lanthanides, ces sondes sont synthétisées par une méthode convergente avec deux fragments qui sont sélectivement métallés puis assemblés selon la réaction d'Ugi (fig. II.5.).

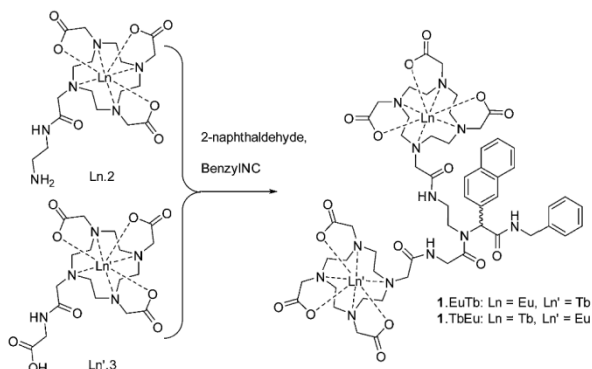


Figure II.5. : Schéma de synthèse des sondes EuTb et TbEu.

Les sondes que nous avons développées ont été également mises au point par synthèse convergente, ce qui comme dans le cas des sondes décrites précédemment nous permettra d'utiliser le même chélateur le DOTA pour les deux lanthanides. Cette voie de synthèse permet de faciliter la synthèse par rapport aux sondes ratiométriques SP2 développées précédemment au laboratoire mais également de limiter son coût de synthèse, puisque le DOTA est moins cher que le chélateur DTPA. Afin d'éviter les transferts d'énergie entre les paires antenne/lanthanide présentes dans les sondes ratiométriques SP2, nous avons choisi d'exciter les deux lanthanides par la même antenne. Pour mettre au point ces sondes, nous avons utilisé les lanthanides terbium et europium qui sont analysables par le spectromètre disponible au laboratoire. L'antenne Cs124 est connue pour sensibiliser ces deux lanthanides^[98,99], les bandes d'absorption du Cs124 ainsi que les bandes d'émission du Cs124, du terbium et de l'euporium sont représentées sur la figure II.6. Ces deux lanthanides émettent dans le visible, leurs spectres d'émission se chevauchent vers 600 nm, cependant certains pics sont distincts notamment le pic à 545 nm pour le Tb³⁺ et à 700 nm pour l'Eu³⁺, ce sont ces pics qui seront exploités lors de la caractérisation des sondes.

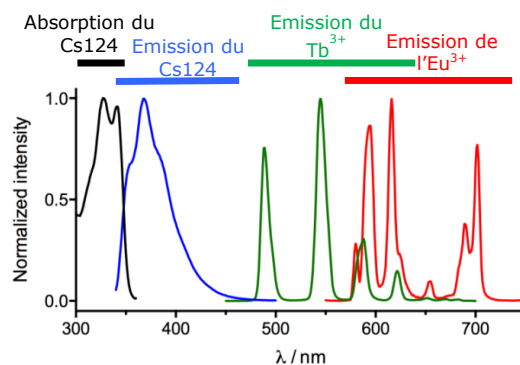


Figure II.6. : Représentation de l'absorption et de l'émission du Cs124 ainsi que de l'émission du terbium et de l'euporium.

Afin de vérifier la sensibilisation du terbium et de l'euprium dans notre système SP3 par le Cs124, des sondes intensiométriques incorporant les couples Cs124/terbium et Cs124/euprium ont été synthétisées. La sonde SP3-Trp-DapDOTA(Tb), développée au laboratoire avant mon arrivée, qui porte le complexe de lanthanide sur la chaîne latérale d'un résidu Dap, montre un contraste deux fois plus important que celui obtenu avec la sonde SP3-Trp-LysDOTA(Tb), dont le complexe de lanthanide est couplé à la chaîne latérale d'un résidu lysine. Bien que les systèmes que nous avons mis au point n'incorporent pas la même antenne, nous avons choisi en première approche de les synthétiser en série Dap.

Les sondes sont synthétisées chimiquement en utilisant une méthode convergente. Ainsi la sonde est synthétisée en deux fragments puis liée par ligation SEA (fig. II.7.). Afin de délimiter ces deux fragments, nous avons utilisé une cystéine naturellement présente dans la séquence. Pour obtenir un thioester en C-terminale, le fragment appelé F1 est synthétisé sur support solide SEA-PS-Résine commerciale selon le même protocole que décrit par Melnyk^[89]. Après décrochage, cette résine permet l'obtention d'une fonction *bis*(2-sulfanylethyl)amido (SEA) en C-terminale qui dans les conditions réductrices de la ligation native se réarrange en thioester. Cette stratégie convergente permet de facilement faire varier le complexe de lanthanide et l'antenne dans le but d'obtenir un panel de sondes variées.

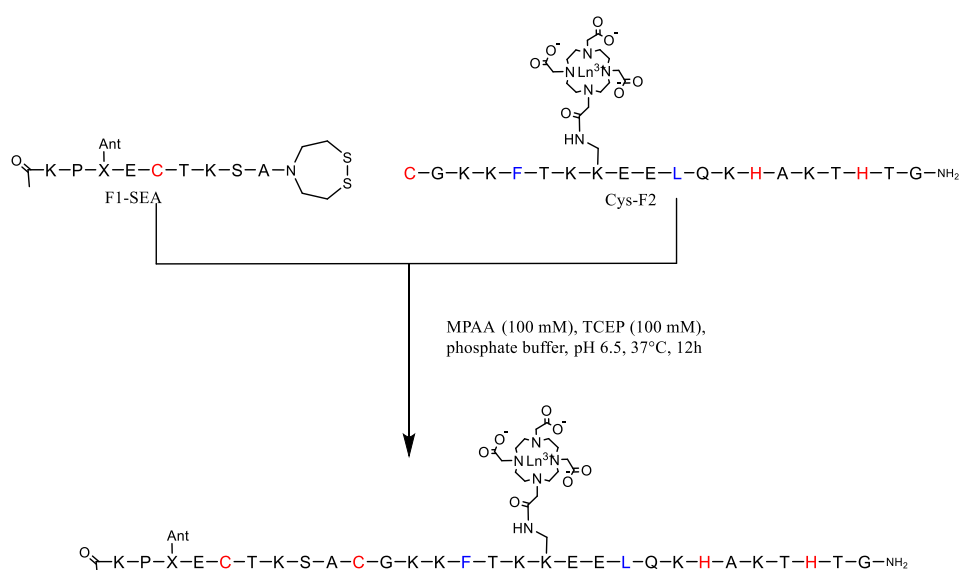


Figure II.7. : Synthèse des sondes par assemblages des fragments F1-SEA et Cys-F2.

II.2. Sondes intensiométriques émettant dans le visible

II.2.1. Sondes SP3-Cs124-DapDOTA(Ln)

II.2.1.2. Synthèse

Le peptide cystéinyl Cys-F2-DapDOTA(Ln) a été synthétisé automatiquement par synthèse peptidique sur support solide (SPPS) en stratégie Fmoc/*t*Bu sur résine Rink amide (fig. II.8.). Les acides aminés non standard Fmoc-Dap(Alloc)-OH et Boc-Cys(Trt)-OH ont été utilisés afin d'introduire respectivement l'acide diaminopropionique et le résidu cystéinyl. Ces acides aminés étant couteux, ils ont été introduits manuellement afin de réduire les équivalents introduits (2 au lieu de 4). Le premier couplage a été effectué également à la main afin de contrôler le taux de greffage sur la résine. Les acides aminés utilisés sont protégés par des groupements standards de synthèse peptidique en Fmoc/*t*Bu, sauf pour le résidu Dap qui est protégé par un groupement orthogonal alloc en vue de l'introduction sélective du DOTA, ainsi que le résidu terminal cystéine qui est protégé en N-terminale par un Boc, au lieu du groupement Fmoc classique.

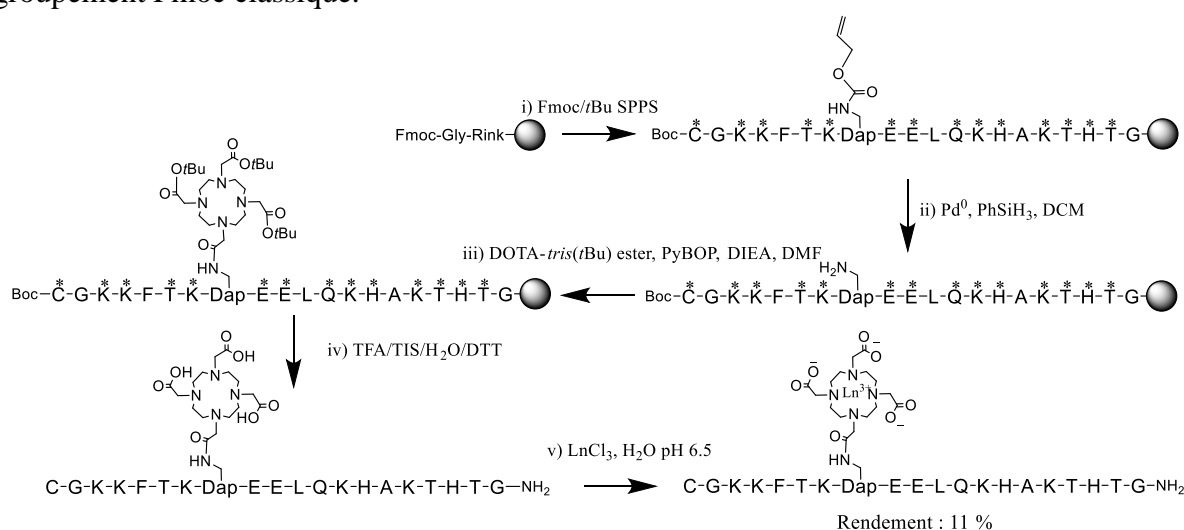


Figure II.8. : Voie de synthèse pour la préparation du fragment Cys-F2-DapDOTA(Ln). * représente les groupements protecteurs standards (Boc pour Lys ; *t*Bu pour Glu, Thr ; Trt pour Cys, Gln et His)

Il a été démontré que la chaîne latérale de la lysine est suffisamment basique pour permettre l'élimination du groupement Fmoc en N-terminale^[100]. Ainsi lors de l'étape de synthèse suivante correspondant au couplage du DOTA, deux fonctions pouvaient potentiellement réagir avec le chélateur menant à des produits secondaires (fig. II.9.). Afin d'empêcher cette réaction parasite, la cystéine N-terminale est introduite sous sa forme protégée non standard Boc-Cys(Trt)-OH. Ainsi le groupement protecteur Fmoc en N-terminale a été remplacé par un groupement Boc stable en milieu basique. Ce groupement protecteur a été retiré dans les conditions standards de déprotection et de décrochage. Bien que la chaîne latérale du Dap soit moins basique que celle de la lysine, nous avons choisi de garder la même stratégie de synthèse.

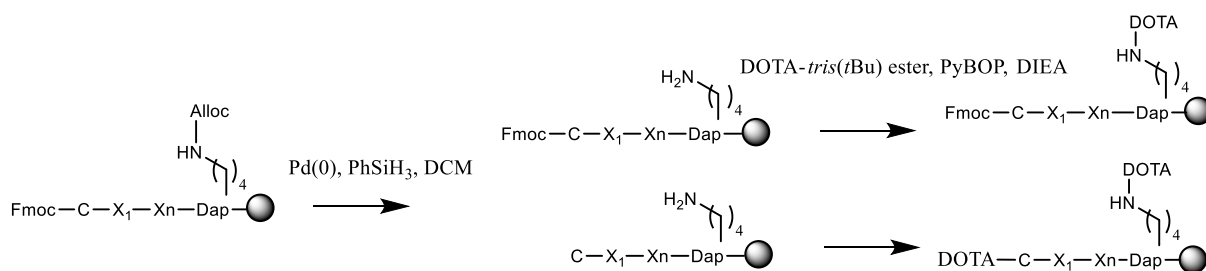


Figure II.9. : Représentation des réactions secondaires associées à la basicité de la chaîne latérale de la lysine.

Le groupement alloc de la chaîne latérale du Dap a été retiré sélectivement en présence de palladium(0) (Pd(Ph₃)₄) et de phénylsilane dans le dichlorométhane (DCM) anhydre et dégazé^[101]. Cette déprotection n'est pas totale, environ 50% ne se déprotège pas et ce même si la réaction est répétée. Après rinçage, le DOTA-tris(tBu)ester a été greffé par un couplage peptidique classique durant une nuit. Le peptide a été ensuite décroché et déprotégé de la résine en présence d'acide trifluoroacétique (TFA) et de scavengers : triisopropylsilane (TIS), eau et dithiothréitol (DTT). Il a été ensuite purifié par HPLC préparative en phase inverse (gradient eau/acétonitrile à 0.1% TFA), puis lyophilisé. Le peptide Cys-F2-DapDOTA(Ln) a été caractérisé en spectrométrie de masse et sa pureté a été contrôlée par HPLC analytique. Il a été ensuite métallé en présence d'un excès de TbCl₃ ou EuCl₃ dans l'eau à pH 6.5 pendant une nuit sous argon. Les peptides ont été ensuite purifiés par HPLC préparative. Du Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) a été ajouté avant l'injection pour réduire les ponts disulfures potentiellement formés par oxydation des cystéines par le dioxygène lors des manipulations du peptide à l'air. Après lyophilisation les peptides Cys-F2-DapDOTA(Tb) et Cys-F2-DapDOTA(Eu) ont été caractérisés par spectrométrie de masse et leur pureté a été contrôlée par HPLC analytique. La figure II.10. montre le chromatogramme et le spectre de masse confirmant l'identité du peptide Cys-F2-DapDOTA(Tb).

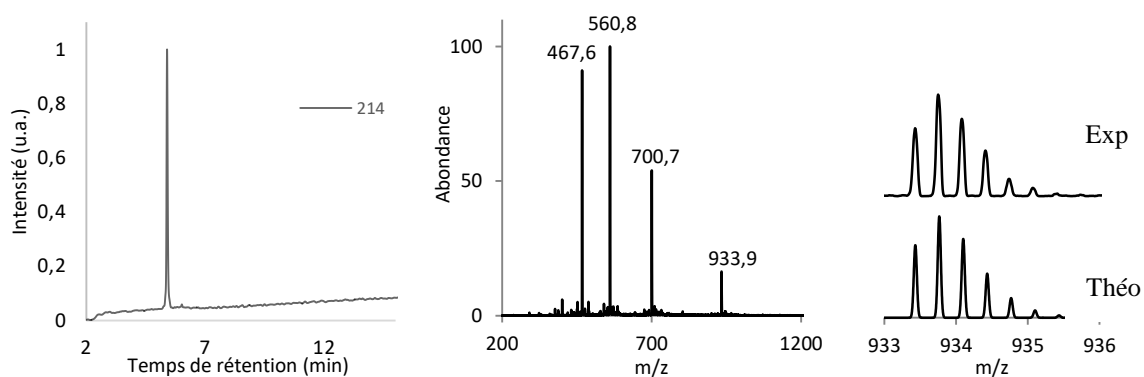


Figure II.10. : (A gauche) Chromatogramme HPLC et (au milieu) spectre ESI-MS (à droite) massif isotopique expérimental et théorique pour le fragment Cys-F2-DapDOTA(Tb). Masse calculée : 933.97 [M+3H]⁴⁺, 700.73 [M+4H]⁴⁺, 560.79 [M+5H]⁵⁺, 467.49 [M+6H]⁶⁺ pour M = C₁₁₃H₁₈₅N₃₆O₃₅STb.

Le fragment F1-SEA incorpore l'antenne Cs124 sous forme d'un acide aminé modifié. La synthèse a été décrite par le groupe d'Imperiali^[102] et a été réalisée au laboratoire. La première étape est la synthèse de la partie aromatique. L'acétoacétate d'éthyle réagit avec la diamine m-phénylènediamine pour mener au groupement Cs124 (rendement 48 %). Cette amine aromatique est ensuite couplée à la chaîne latérale de l'acide aminé acide glutamique protégé Fmoc-Glu(OH)-OtBu en présence d'HATU et de DIEA. S'en suit l'acidolyse de l'ester tertiobutylique du composé Fmoc-Glu(Cs124)-OtBu obtenu en présence de TFA et de TIS dans du CH₂Cl₂ (fig. II.11). Cet acide aminé Fmoc-Glu(Cs124)-OH a été obtenu avec un rendement de 30 %. La réaction peut être améliorée en réalisant le couplage de l'acide aminé et de l'antenne en boîte à gant (rendement 85 %).

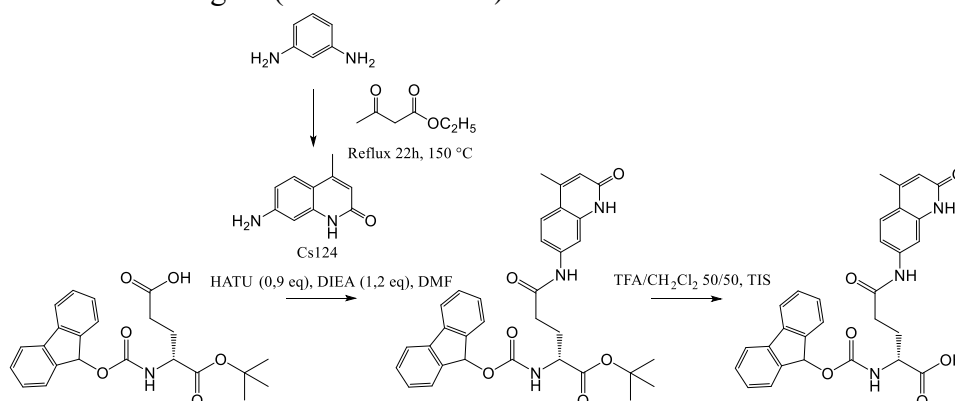


Figure II.11. : Étapes de synthèse de l'aromatique Cs124 et de l'acide glutamique non naturel porteur de l'antenne.

Le fragment thioester F1-Cs124-SEA a été synthétisé manuellement sur support solide SEA-PS-Résine (fig. II.12). Les acides aminés non standard Fmoc-Cys(*S*tBu)-OH et Fmoc-Glu(Cs124)-OH ont été incorporés afin d'introduire respectivement le résidu cystéine et l'antenne. Le groupe protecteur *S*tBu orthogonal du résidu cystéine permet de prévenir l'oxydation de la fonction thiol lors du passage de la forme SEA-on en SEA-off dans des conditions oxydantes^[103]. Le résidu cystéine a été déprotégé ultérieurement dans le milieu réducteur de la ligation native. Le dernier acide aminé a été acétylé en N-terminale pendant 10 min par un mélange DMF/anhydride acétique/pyridine. Le fragment a été ensuite décroché de la résine et déprotégé en présence de TFA, TIS, H₂O et de thioanisole. Il a été ensuite dissout par portion de 10 mg dans une solution aqueuse à 10% d'acide acétique et traité avec une solution d'I₂ (200 mM dans du DMSO) afin d'oxyder le groupement C-terminal SEA-on en SEA-off. Après 30 s quelques grains de DTT ont été ajoutés afin de quencher le diiode en excès. Le peptide oxydé a été ensuite directement purifié par HPLC préparative. Il a été caractérisé en spectrométrie de masse et sa pureté a été contrôlée par HPLC analytique (fig. II.13).

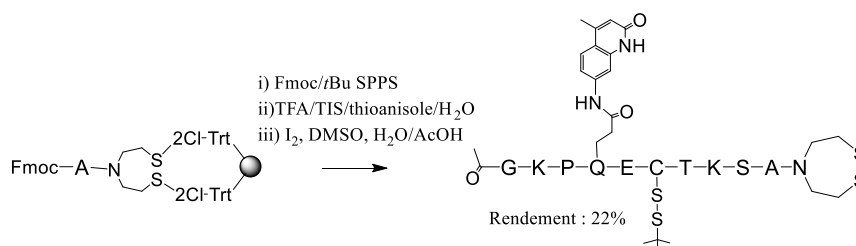


Figure II.12 : Voie de synthèse pour la préparation du fragment F1-Cs124-SEA.

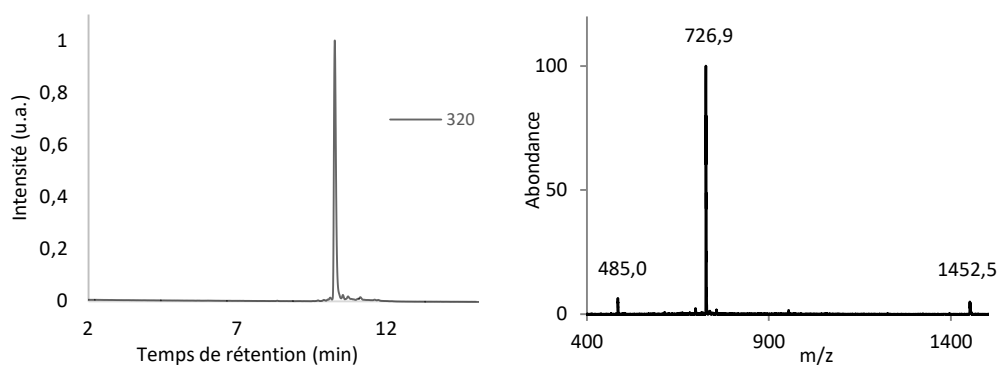


Figure II.13 : (A gauche) Chromatogramme HPLC et (à droite) spectre ESI-MS entier pour le fragment F1(Cs124)-SEA. Masse calculée : 1452.61 [M+H]⁺, 726.81 [M+2H]²⁺, 484.81 [M+3H]³⁺ pour M = C₆₂H₉₇N₁₅O₁₇S₄.

Les deux fragments F1-Cs124-SEA et Cys-F2-DapDOTA(Ln) ont été assemblés par ligation SEA^[104] (fig. II.14.). Une solution de TCEP et de MPAA à 100 mM dans du tampon phosphate pH 7.5 a été ajustée à pH 6.5 à l'aide d'une solution de NaOH (2N). Les fragments ont été dissouts en boite à gant à 3.5 mM dans cette solution et le mélange a été laissé une nuit sous agitation à 37°C. Le mélange réactionnel a été dilué par une solution de TFA 5% puis le MPAA est extrait par de l'éther. Le composé d'intérêt a été purifié par HPLC préparative.

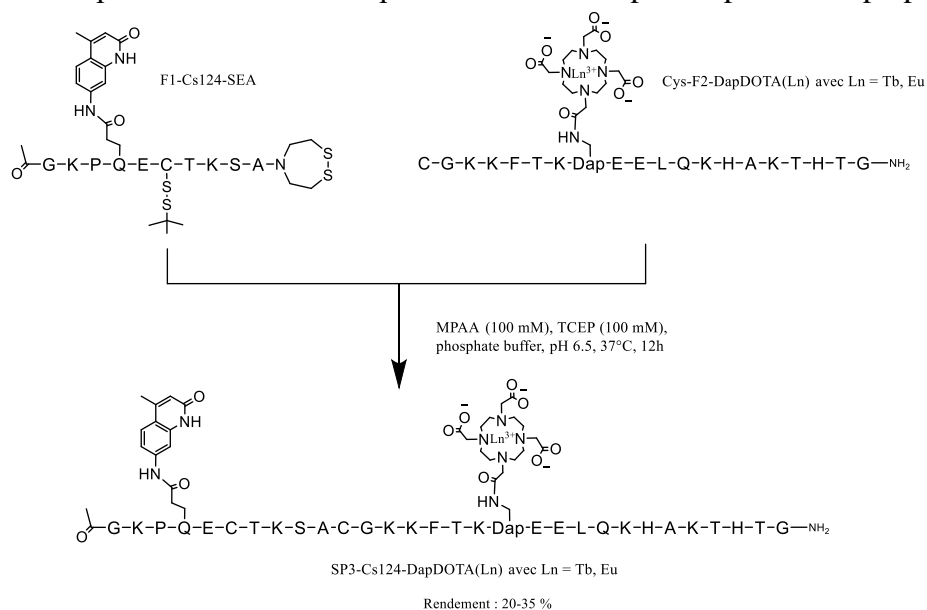


Figure II.14 : Synthèse des sondes SP3-Cs124-DapDOTA(Tb) et SP3-Cs124-DapDOTA(Eu) par assemblage des fragments F1-Cs124-SEA et Cys-F2-DapDOTA(Ln).

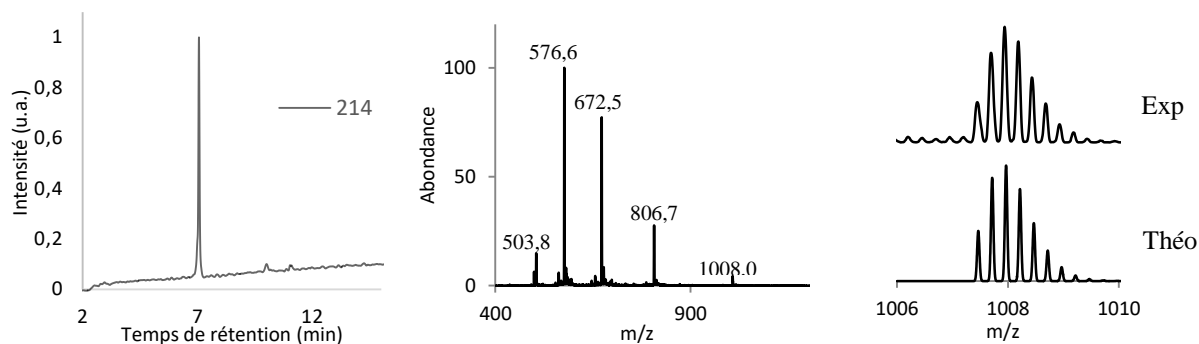


Figure II.15. : (A gauche) Chromatogramme HPLC et (au milieu) spectre ESI-MS (à droite) massif isotopique expérimental et théorique de la sonde SP3-Cs124-DapDOTA(Tb). Masse calculée : 1008.07 $[M+5H]^{4+}$, 806.66 $[M+5H]^{5+}$, 672.38 $[M+6H]^{6+}$, 576.47 $[M+7H]^{7+}$, 503.67 $[M+8H]^{8+}$ pour $M = C_{167}H_{265}N_{50}O_{52}S_2Tb$.

Ainsi par cette méthode convergente nous avons synthétisé deux sondes, SP3-Cs124-DapDOTA(Tb) et SP3-Cs124-DapDOTA(Eu), qui ont été caractérisées par HPLC analytique ainsi que par spectrométrie de masse (fig. II.15.).

II.2.1.3. Caractérisations spectroscopiques et physicochimiques

Les sondes présentées dans ce manuscrit ont été étudiées selon le même protocole. L'analyse du repliement avec et sans zinc ainsi que la détermination de la stœchiométrie ont été réalisées par dichroïsme circulaire. Puis les réponses d'émissions de luminescence et de fluorescence de la sonde en présence de métaux ont été analysées par spectroscopie de fluorescence et de luminescence. Enfin des mesures ont été réalisées pour déterminer leur affinité et leur sélectivité. Les titrages ont été réalisés à l'air, à pH 7,5. A ce pH les cystéines non liées au zinc sont potentiellement oxydables en pont disulfure par le dioxygène dissout dans la solution. L'ajout d'un excès de TCEP avant le début du titrage permet de réduire les ponts disulfures qui pourraient se former et de maintenir les sondes à l'état réduit pendant l'étude.

Dichroïsme circulaire

Le signal de dichroïsme circulaire du peptide SP3-Cs124-DapDOTA(Tb) est fortement négatif à 200 nm, mais présente un épaulement à 220 nm. Le peptide SP3-Cs124-DapDOTA(Tb) est donc majoritairement non structuré. L'ajout de zinc induit un changement dans le signal du dichroïsme circulaire : le signal à 200 nm devient moins négatif alors que l'épaulement est plus marqué, deux signes indiquant que le peptide se structure. L'évolution du spectre est linéaire jusqu'à un équivalent de zinc où il se stabilise, ainsi le peptide et le zinc forme un complexe 1 : 1 (fig. II.16.). Le profil de ces spectres est caractéristique des doigts de zinc classiques $\beta\beta\alpha$ ^[72]. Le dichroïsme circulaire de la sonde SP3-Cs124-DapDOTA(Eu) n'a

pas été mesuré. Etant donné que les deux sondes ne diffèrent que par la nature du lanthanide complexé, leur comportement doit être identique.

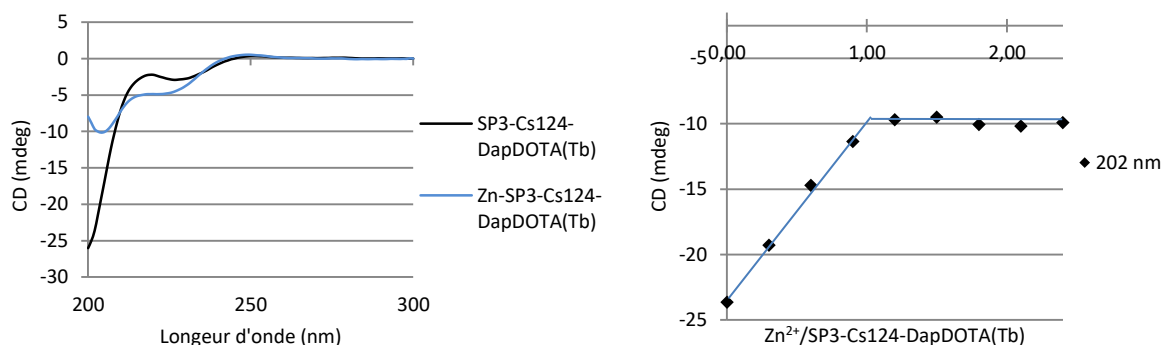


Figure II.16. : Titration du peptide SP3-Cs124-DapDOTA(Tb) par $ZnCl_2$ suivi par dichroïsme circulaire. 10 μM SP3-Cs124-DapDOTA(Tb), 10 mM Pi pH 7.5, 350 μM TCEP.

Absorption

Le spectre d'absorption de la sonde SP3-Cs124-DapDOTA(Tb) présente deux bandes larges à 330 et 340 nm (fig. II.17.). Le spectre obtenu avec le peptide SP3-Cs124-DapDOTA(Eu) a le même profil. Cette absorption correspond bien à ce qui est décrit dans la littérature pour le Cs124^[98].

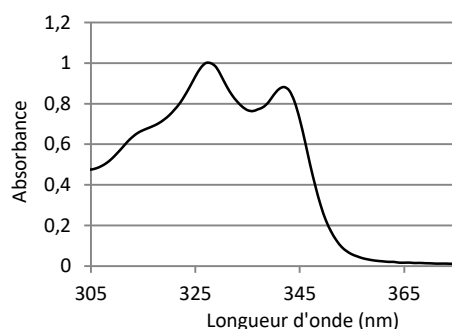


Figure II.17 : Spectre d'absorption de la sonde SP3-Cs124-DapDOTA(Tb). 10 μM SP3-Cs124-DapDOTA(Tb), 10 mM Pi pH 7.5, 350 μM TCEP.

Les sondes sont ensuite analysées par spectroscopie de fluorescence et de luminescence à l'aide du spectrofluorimètre Cary Eclipse à $\lambda_{ex} = 330nm$.

Fluorescence

Lors de l'ajout de zinc, l'émission de fluorescence du Cs124, pour les deux peptides, diminue légèrement jusqu'à un équivalent de zinc, permettant ainsi de confirmer la formation d'un complexe 1 :1 (fig. II.18.). Les rendements quantiques de fluorescence sont du même ordre de grandeur pour les deux sondes (tabl. II.1.). Cependant la diminution est moins marquée dans le cas de la sonde incorporant le terbium avec un abaissement du signal de 17% contre 26% pour celle comprenant l'euporium.

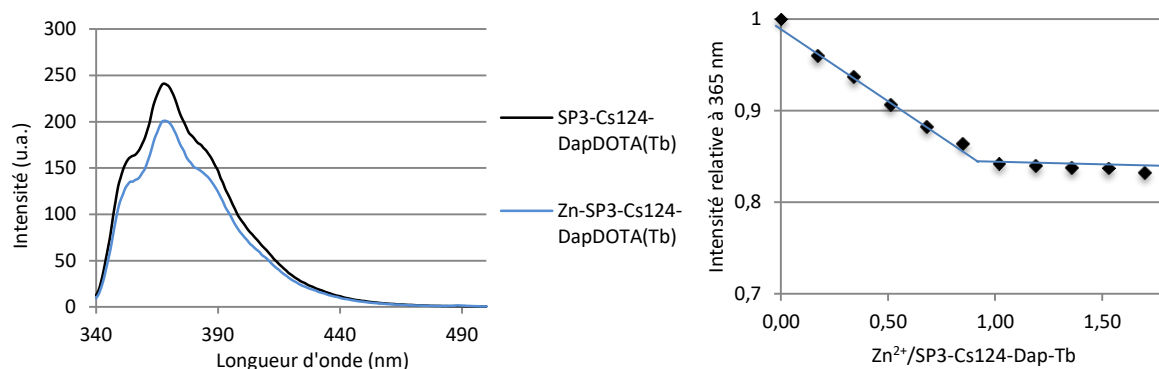


Figure II.18. : Titrage de la sonde SP3-Cs124-DapDOTA(Tb) par $ZnCl_2$ suivi par spectroscopie d'émission de fluorescence. 10 μM SP3-Cs124-DapDOTA(Tb), 10 mM HEPES pH 7.5, 350 μM TCEP, $\lambda_{ex} = 330$ nm, fente d'émission 5/fente d'excitation 5, PM 550 V.

Tableau II.1. : Rendements quantiques de fluorescence avec ou sans zinc pour les sondes SP3-Cs124-DapDOTA(Eu) et SP3-Cs124-DapDOTA(Tb).

Peptide	Φ_{fluo} %	$\Phi_{fluo-Zn}$ %
SP3-Cs124-DapDOTA(Eu)	4,3	3,2
SP3-Cs124-DapDOTA(Tb)	4,5	3,8

Le spectre d'excitation de fluorescence des sondes SP3-Cs124-DapDOTA(Tb) et SP3-Cs124-DapDOTA(Eu) ($\lambda_{em} = 370$ nm) présente le même profil que le spectre d'absorption des sondes (fig. II.19.). L'excitation du peptide correspond bien à l'absorption de l'antenne Cs124.

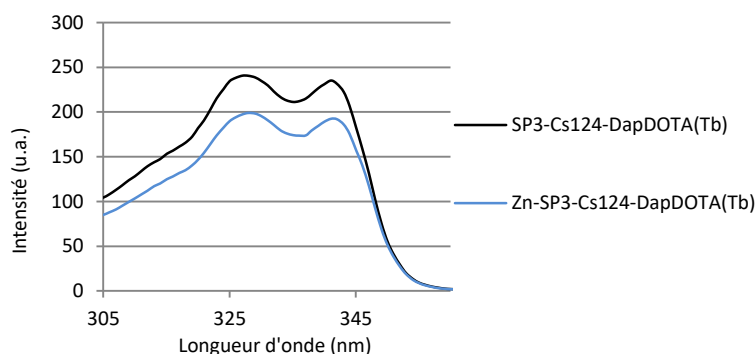


Figure II.19. : Spectre d'excitation de fluorescence de la sonde SP3-Cs124-DapDOTA(Tb), $\lambda_{em} = 370$ nm, fente d'émission 5/fente d'excitation 5, PM 550 V. 10 μM SP3-Cs124-DapDOTA(Tb), 10 mM Pi pH 7.5, 350 μM TCEP.

Luminescence

Les mesures spectroscopiques de luminescence en temps résolu in vitro ont été réalisées en imposant un délai de 200 μs . Le spectre d'émission du terbium présente quatre raies caractéristiques, dû aux transitions $^5D_4 \rightarrow ^7F_n$, avec n représenté sur la figure II.20. La luminescence de la sonde SP3-Cs124-DapDOTA(Tb) augmente jusqu'à un équivalent de zinc puis atteint un plateau. La sonde répond donc bien à la formation du complexe 1 : 1. De plus elle s'allume bien en présence de métal avec un contraste de 13 (I_{Zn}/I_0).

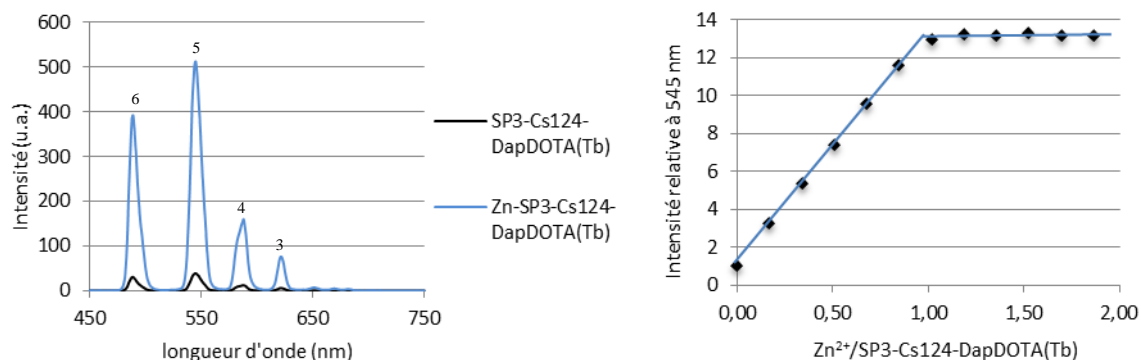


Figure II.20. : Titrage du peptide SP3-Cs124-DapDOTA(Tb) par $ZnCl_2$ suivi par spectroscopie d'émission en temps résolu. 10 μM SP3-Cs124-DapDOTA(Tb), 10 mM HEPES pH 7.5, 350 μM TCEP, $\lambda_{ex} = 330$ nm, fente d'émission 5/fente d'excitation 10, PM 650 V, délai 200 μs , temps d'intégration 2 ms.

Le spectre d'émission de l'euporium présente quatre bandes caractéristiques dues aux transitions $^5D_0 \rightarrow ^7F_n$ avec n représenté sur la figure II.21. La sonde incorporant l'euporium SP3-Cs124-DapDOTA(Eu) a le même comportement que la sonde avec le terbium mais avec un contraste légèrement plus faible de 9.

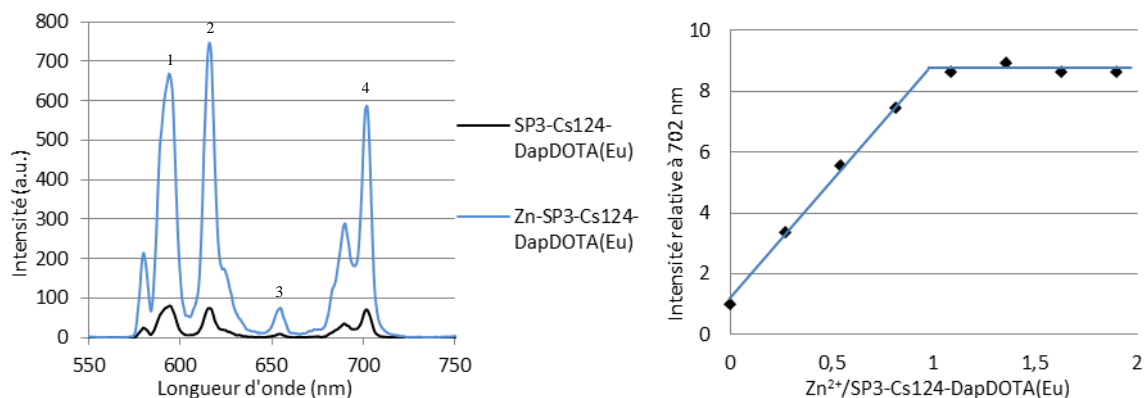


Figure II.21. : Titrage du peptide SP3-Cs124-DapDOTA(Eu) par $ZnCl_2$ suivi par spectroscopie d'émission en temps résolu. 10 μM SP3-Cs124-DapDOTA(Eu), 10 mM HEPES pH 7.5, 350 μM TCEP, $\lambda_{ex} = 330$ nm, fente d'émission 5/fente d'excitation 10, PM 800 V, délai 200 μs , temps d'intégration 2 ms.

Ainsi les deux sondes synthétisées s'allument en présence de zinc avec des contrastes convenables. Les rendements quantiques de luminescence sont supérieurs dans le cas du terbium (tabl. II.2.).

Tableau II.2. : Contrastes et rendements quantiques de luminescence avec ou sans zinc pour les sondes SP3-Cs124-DapDOTA(Eu) et SP3-Cs124-DapDOTA(Tb).

Peptide	Contraste	$\Phi_{Ln}\%$	$\Phi_{Ln-Zn}\%$
SP3-Cs124-DapDOTA(Tb)	13	0,09	1,2
SP3-Cs124-DapDOTA(Eu)	9	0,02	0,22

Le spectre d'excitation de luminescence des sondes SP3-Cs124-DapDOTA(Tb) ($\lambda_{em} = 545$ nm) présente deux pics à 330 et 340 nm (fig. II.22.), correspondant à l'absorption de

Cs124. Le lanthanide est donc excité par un transfert d'énergie depuis le Cs124 et non par excitation directe. Des conclusions similaires sont tirées de l'exploitation du spectre d'excitation pour SP3-Cs124-DapDOTA(Eu).

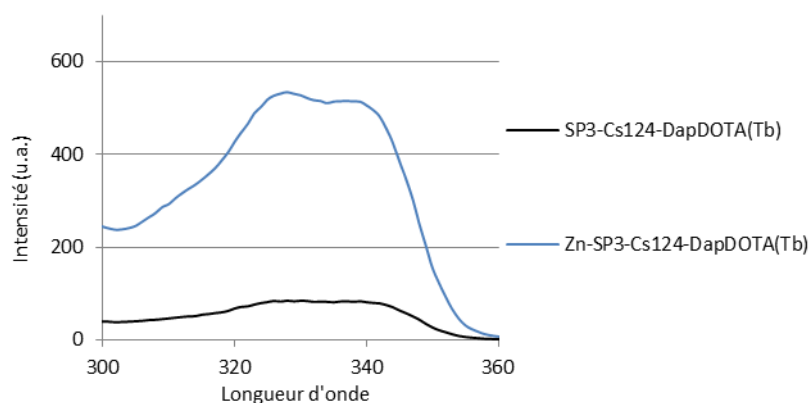


Figure II.22. : Spectres d'excitation de luminescence de la sonde SP3-Cs124-DapDOTA(Tb) $\lambda_{em} = 545$ nm, fente d'émission 5/fente d'excitation 10, PM 700 V. 10 μ M SP3-Cs124-DapDOTA(Tb), 10 mM Pi pH 7.5, 350 μ M TCEP.

L'augmentation de l'émission de luminescence peut être due à une augmentation du transfert d'énergie mais également à un changement d'environnement. En effet la présence des vibreurs de type O-H, N-H et C-H dans la première sphère de coordination peut modifier la luminescence des lanthanides. Ces vibrations peuvent désexciter de manière non radiative l'état électronique excité du lanthanide. De ce fait, lorsque des molécules d'eau sont coordonnées au centre métallique, la durée de vie de luminescence est diminuée. La comparaison des temps de vie dans H₂O et D₂O permet de déterminer le nombre de molécules d'eau dans la première sphère de coordination du lanthanide. Pour des raisons pratiques, il est difficile de mesurer directement le temps de vie de luminescence dans 100% de D₂O, ce qui est dû surtout à la préparation du tampon dans H₂O. Le temps de vie à 100% de D₂O est donc extrapolé à partir de temps de vie mesurés pour différentes proportions de D₂O dans H₂O. Le nombre de molécule d'eau, q , est déterminé à l'aide des équations phénoménologiques basées sur la différence de temps de vie entre milieu eau légère et eau lourde exposées dans l'introduction de cette thèse^[71].

Nous avons mesuré les temps de vie de luminescence des différentes sondes. Pour la sonde SP3-Cs124-DapDOTA(Tb) le temps de vie dans l'eau ne varie pas lors de l'ajout de zinc dans l'eau légère, en effet il passe de $1,99 \pm 0,03$ à $1,98 \pm 0,03$ en présence de zinc (fig. II.23.). Ce temps de vie est normal dans le cas du terbium complexé par du DOTA avec une molécule d'eau^[105].

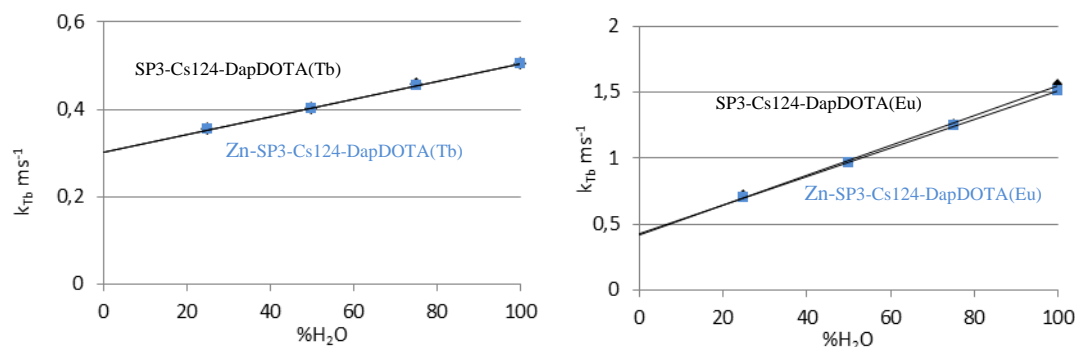


Figure II.23. : (A gauche) Constantes de vitesse de désexcitation radiative du terbium (T_{Tb}^{-1}) en fonction du % de H_2O dans du D_2O pour le peptide SP3-Cs124-DapDOTA(Tb). (A droite) Constantes de vitesse de désexcitation radiative de l'euprium (T_{Eu}^{-1}) en fonction du % de H_2O dans du D_2O pour le peptide SP3-Cs124-DapDOTA(Eu).

Tableau II.3. : Temps de vie de luminescence dans H_2O (T_{H_2O}) et dans D_2O (T_{D_2O}) et nombre de molécules d'eau pour les peptides SP3-Cs124-DapDOTA(Tb) et SP3-Cs124-DapDOTA(Eu) avec et sans zinc.

Peptide	T_{H_2O} ($\pm 0,03$ ms)	T_{D_2O} ($\pm 0,03$ ms)	q ($\pm 0,3$)
SP3-Cs124-DapDOTA(Tb)	1,99	3,30	0,7
Zn-SP3-Cs124-DapDOTA(Tb)	1,98	3,31	0,7
SP3-Cs124-DapDOTA(Eu)	0,64	2,32	1,0
Zn-SP3-Cs124-DapDOTA(Eu)	0,66	2,40	0,9

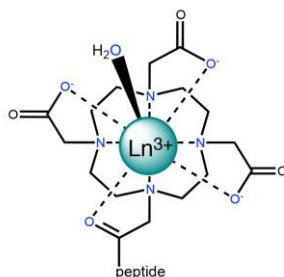


Figure II.24. : Représentation de la coordination du lanthanide par le DOTA.

Le nombre de molécule d'eau est calculé à partir des temps de vie dans H_2O et D_2O et des expressions présentées dans l'introduction. Sa valeur pour le peptide SP3-Cs124-DapDOTA(Tb) ne varie pas lors de la complexation du zinc, il est de $q = 0,7 \pm 0,3$ (tabl. II.3.). Une seule molécule d'eau est donc présente dans la sphère de coordination du terbium. En effet le terbium est complexé par le DOTA par huit atomes : quatre atomes d'azote, trois oxygènes des carboxylates et l'oxygène du groupement amide. Le nombre de coordination le plus fréquent pour les lanthanides étant de 9, le terbium complète sa sphère de coordination par une molécule d'eau (fig. II.24.).

De la même façon le temps de vie de l'euprium est stable au cours du titrage, il passe de $0,64 \pm 0,03$ à $0,66 \pm 0,03$ en présence de zinc (fig. II.23.). Ce temps de vie est classique dans le cas de l'euprium complexé par du DOTA^[106]. Le nombre de molécule d'eau pour le peptide SP3-Cs124-DapDOTA(Eu) a également été calculé, sa valeur est de $q = 1,0 \pm 0,3$ sans

zinc et de $q = 0,9 \pm 0,3$ en présence de zinc (tabl. II.3.). Comme dans le cas de la sonde au terbium le peptide SP3-Cs124-DapDOTA(Eu) possède une molécule d'eau dans sa sphère de coordination ainsi que les huit atomes précité du DOTA.

Le nombre de molécules d'eau présents dans la sphère de coordination reste constant lors de la coordination au zinc, l'augmentation de luminescence est due à l'augmentation du transfert d'énergie induit par le repliement peptidique.

Sélectivité

Pour que ces sondes à zinc soient utilisables et adaptées au milieu biologique, il faut que la réponse du peptide soit spécifique de ce métal. Ces sondes ayant pour vocation des applications dans les milieux biologiques, ce sont les différents métaux physiologiques (alcalins, alcalino-terreux et métaux du bloc d) qui ont été testés. Bien que les doigts de zinc lient préférentiellement le zinc, ils complexent également, avec une affinité moindre, le cobalt(II), le fer(II), et le nickel(II). Des solutions des deux sondes libres ou métallées par du zinc en présence de cation physiologique ont été préparées. L'intensité d'émission a été mesurée et comparée à la réponse de la sonde sans métaux physiologiques. Les métaux physiologiques testés sont les métaux du bloc d (Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} et Cu^{2+}), les alcalins (Na^+ et K^+) et alcalino-terreux (Mg^{2+} , Ca^{2+}). Les concentrations introduites pour les alcalins et alcalino-terreux sont de respectivement de 100 mM et de 10 mM, ce qui correspond à un excès par rapport à la concentration physiologique. Parmi les métaux libres circulants, le Zn^{2+} est le plus abondant, sa concentration est de l'ordre de 10^{-11} - 10^{-9} M^[11]. Cette concentration est négligeable devant la concentration du peptide utilisée durant les titrages (5 μ M). Lors des expériences de sélectivité la concentration de métaux introduits n'est pas physiologique mais correspond à deux équivalents par rapport au peptide.

La présence des métaux n'entraîne pas de modification significative du signal de luminescence de la sonde sauf dans le cas du Cu^{2+} qui induit une légère diminution (fig. II.25.). Il est possible que ce cation oxyde de manière irréversible le peptide. Cependant le Cu^{2+} n'existe pas sous forme libre dans la cellule. Les mesures sont faites à titre indicatif. Deux possibilités permettent d'expliquer que les autres métaux testés n'induisent pas de modifications de la luminescence du lanthanide : soit ils ne lient pas le peptide, soit ils le lient mais n'induisent pas de modification de la luminescence. Les métaux alcalins et alcalino-terreux ne lient pas le peptide dont la sphère de coordination est plutôt molle. Les métaux de transition (Co^{2+} essentiellement) peuvent potentiellement lier le peptide et le replier. Cependant ces métaux présentent des bandes d'absorptions dans le visible, dues aux transitions d-d. Ils peuvent soit quencher les états excités de l'antenne, soit servir d'accepteur pour un transfert d'énergie depuis le lanthanide. Du fait de l'affinité supérieure de la sonde

pour le zinc, ces métaux sont déplacés en sa présence ce qui permet de restaurer la réponse de la sonde.

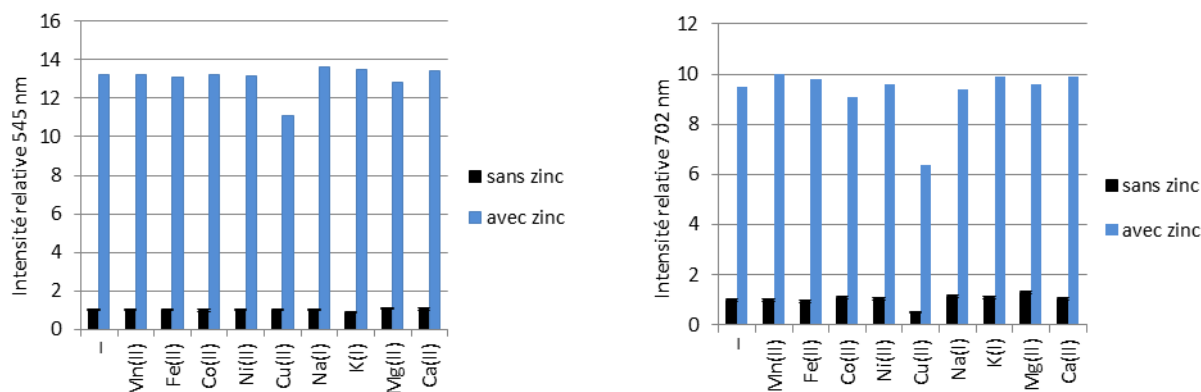


Figure II.25. : Diagramme de sélectivité du peptide SP3-Cs124-Dap(Tb) (5 µM) (à gauche) et du peptide SP3-Cs124-Dap(Eu) (5 µM) (à droite) montrant l'évolution de l'émission de luminescence en temps résolu en absence (noir) et en présence (bleu) de Zn²⁺ (10 µM) après l'addition de différents cations Mn²⁺, Fe²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺ (10 µM), Na⁺, K⁺ (50 mM), Mg²⁺, Ca²⁺ (10 mM).

Affinité

Les peptides SP3-Cs124-DapDOTA(Tb) et SP3-Cs124-DapDOTA(Eu) lient le zinc. Afin d'avoir une sonde adaptée à la détection en milieu cellulaire il faut que sa constante de dissociation soit du même ordre de grandeur que la concentration en zinc circulant. Une affinité trop importante induirait une démetalation des metalloprotéines de la cellule et donc modifierait le fonctionnement cellulaire. A l'inverse une affinité trop faible ne permettrait pas de le détecter car celui-ci ne sera pas lié à la sonde. En milieu cellulaire, la concentration en zinc libre étant de 10^{-11} - 10^{-9} M^[11], la constante de dissociation de nos sondes pour ce métal doit se trouver dans cette gamme. L'affinité des sondes SP3-Cs124-DapDOTA(Tb) et SP3-Cs124-DapDOTA(Eu) a été déterminée par des titrages en compétition. Lors de ces mesures, on suit par luminescence le titrage des peptides en présence d'une quantité connue de compétiteur (un chélateur dont l'affinité est connue). Plusieurs cas limites sont alors possibles (fig. II.26.) :

-Soit l'affinité de la sonde pour le zinc est beaucoup plus importante que celle du compétiteur, dans ce cas la sonde est saturée dès un équivalent de métal. Lorsque le peptide et le compétiteur sont en concentration stœchiométrique, cette situation correspond au cas $K_{\text{peptide}}/K_{\text{compétiteur}} > 1000$ sur la figure II.26.

-Soit l'affinité du compétiteur est beaucoup plus importante pour le zinc que celle de la sonde. Le signal de luminescence est donc stable jusqu'à un équivalent, ce qui correspond à la saturation du compétiteur, puis la luminescence augmente. Ce qui correspond à $K_{\text{peptide}}/K_{\text{compétiteur}} < 0,001$ sur la figure II.26.

-Soit la sonde et le compétiteur ont la même affinité, la luminescence augmente donc linéairement jusqu'à deux équivalents. Cette situation se rapporte à la situation pour laquelle $K_{\text{peptide}}/K_{\text{compétiteur}} = 1$ sur la figure II.26. (trait mixte : tirets pointillés).

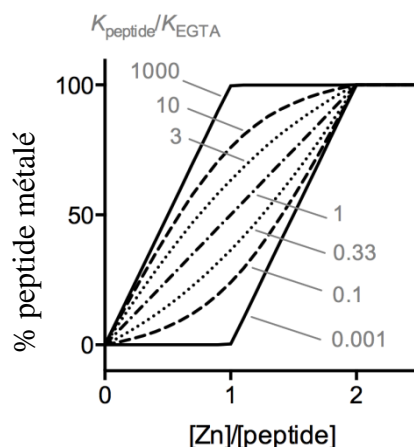


Figure II.26. : Représentation des allures spectrales de luminescence en fonction des ajouts de zinc pour différentes valeurs $K_{\text{peptide}}/K_{\text{compétiteur}}$ dans le cas d'un rapport stœchiométrique entre le peptide et le compétiteur.

Les cas intermédiaires sont représentés par des pointillés ou des tirets. Afin de minimiser les erreurs lors de l'ajustement, le taux de complexation après l'ajout d'un équivalent de métal doit se trouver entre $0,02 < K_{\text{peptide}}/K_{\text{compétiteur}} < 50^{[107]}$. Nous devons donc utiliser un compétiteur dont l'affinité pour le zinc est adaptée. Le titrage est ensuite modélisé à l'aide du logiciel *Specfit* ou à l'aide des équations discutées dans la partie expérimentale. Nous avons utilisé lors des premiers tests les compétiteurs TPEN, EDTA et HEDTA en conditions stœchiométriques qui ont respectivement une affinité de 15.2, 13.6 et 12.1 dans les conditions expérimentales adoptées. Les résultats obtenus avec ces différents compétiteurs sont les mêmes : leurs affinités est trop importantes, les courbes obtenues sont semblable aux cas $K_{\text{peptide}}/K_{\text{compétiteur}} < 0,001$. Enfin nous avons utilisé le compétiteur EGTA qui forme des complexes 1 : 1 avec le zinc avec une affinité de 9.2 à pH 7.5 pour le zinc. Les variations de luminescence au cours du titrage pour le peptide SP3-Cs124-DapDOTA(Tb) sont représentées dans la figure II.27., le signal du terbium augmente quasi-linéairement jusqu'à deux équivalents de zinc. On semble se trouver très proche du cas où $K_{\text{peptide}}/K_{\text{compétiteur}} = 1$. Les données peuvent être convenablement ajustées par le logiciel *Specfit*. En plus de ces données, ce logiciel requiert les concentrations des différentes espèces pour chaque spectre ainsi que la valeur de l'affinité du compétiteur pour le métal. Le logiciel ajuste l'évolution des spectres en fonction de la concentration, et détermine la constante de dissociation du peptide pour le métal. Ainsi la valeur de la constante de dissociation du peptide SP3-Cs124-DapDOTA(Tb) pour le zinc est $K_{d\text{SP3-Cs124-DapDOTA(Tb)}} = 10^{-9,1 \pm 0,2}$. De la même façon la constante de dissociation du peptide SP3-Cs124-DapDOTA(Eu) a été déterminée (fig. II.27.) : $K_{d\text{SP3-Cs124-DapDOTA(Eu)}} = 10^{-9,3 \pm 0,2}$. Ces deux valeurs sont les mêmes dans les limites de l'incertitude, ce qui est cohérent avec la structure similaire des sondes. Les doigts de zinc natifs ont des

affinités plus importantes, leurs constantes de dissociation sont comprises entre 10^{-14} - 10^{-11} [72]. Leurs modifications notamment par l'introduction du Cs124 et du complexe de lanthanide, déstabilise la forme complexée au zinc et induit une diminution de l'affinité permettant ainsi à nos sondes d'avoir une affinité adaptée à la détection du zinc circulant.

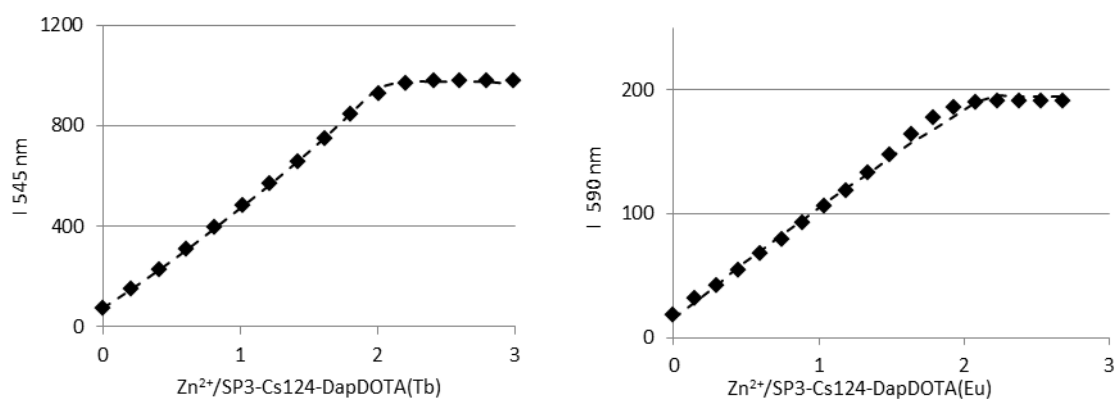


Figure II.27. : Titrage du peptide SP3-Cs124-DapDOTA(Tb) (à gauche) et du peptide SP3-Cs124-DapDOTA(Eu) (à droite) par $ZnCl_2$ en présence d'un équivalent d'EGTA suivi par spectroscopie d'émission en temps résolu.

Pour conclure nous avons synthétisé deux sondes qui s'allument en présence de zinc. Ces sondes sont sélectives du zinc avec des affinités adaptées à des applications dans les milieux biologiques. Leurs propriétés sont récapitulées dans le tableau II.4. ci-dessous.

Tableau II.4. : Tableau récapitulatif des propriétés des sondes SP3-Cs124-DapDOTA(Tb) et SP3-Cs124-DapDOTA(Eu).

Peptide	Contraste	Φ_{Ln} %	Φ_{Ln-Zn} %	Φ_{flu0} %	$\Phi_{flu0-Zn}$ %	Log K \pm	q \pm 0,3
						0,2	
SP3-Cs124-DapDOTA(Tb)	13	0,09	1,2	4,5	3,8	9,1	0,7
SP3-Cs124-DapDOTA(Eu)	9	0,02	0,22	4,3	3,2	9,3	1

II.2.2. Sondes SP3-Cs124-LysDOTA(Ln)

Les premières sondes synthétisées lors de ma thèse incorporent le complexe de lanthanide sur la chaîne latérale d'un résidu Dap. En effet pour la sonde à zinc SP3-Trp-LysDOTA(Ln) basées sur le couple tryptophane/terbium l'utilisation de la lysine à la place du Dap induisait un contraste moindre. Il a été supposé que la flexibilité apportée par la chaîne latérale de la lysine éloigne en moyenne le complexe de lanthanide de l'antenne induisant une diminution du transfert d'énergie et donc de la luminescence du lanthanide. Nous avons donc développé nos sondes en nous basant sur ce résultat. Cependant compte tenu des problèmes de synthèse du fragment Cys-F2-DapDOTA(Ln) (déprotection incomplète de l'alloc), nous avons choisi de développer les sondes en série lysine selon la même stratégie de synthèse. Ces sondes nécessitent donc la synthèse du fragment Cys-F2-LysDOTA(Ln) qui ne diffère du

fragment Cys-F2-DapDOTA(Ln) seulement par la nature de l'acide aminé non standard alloc introduit lors de la SPPS.

II.2.2.1. Synthèse

Le fragment Cys-F2-LysDOTA(Ln) a été synthétisé manuellement de manière similaire au fragment Cys-F2-DapDOTA(Ln) la seule différence est l'introduction de l'acide aminé non standard Fmoc-Lys(alloc)-OH à la place du Fmoc-Dap(alloc)-OH. Le rendement de synthèse associé à ce fragment est de 21 % contre 11% pour l'analogue Dap.

Le fragment Cys-F2-LysDOTA(Ln) ainsi obtenu a été assemblé par ligation native avec le fragment F1-Cs124-SEA. Les produits finaux SP3-Cs124-LysDOTA(Tb) et SP3-Cs124-LysDOTA(Eu) ont été caractérisés en spectrométrie de masse et leur pureté a été contrôlée par HPLC analytique.

Les deux sondes ont ensuite été analysées selon la même démarche que celle utilisée pour les sondes en série Dap. Tout d'abord le repliement et la stœchiométrie vis-à-vis du zinc a été investigué par dichroïsme circulaire puis l'émission de la sonde a été analysée.

II.2.2.2. Caractérisations spectroscopiques et physicochimiques

Dichroïsme circulaire

Le signal de dichroïsme circulaire du peptide SP3-Cs124-LysDOTA(Eu) est fortement négatif à 200 nm ainsi qu'un épaulement à 220 nm. La présence de zinc induit un signal moins négatif à 200 nm alors que l'épaulement est plus marqué, deux signes indiquant que le peptide se structure. L'évolution du spectre est linéaire jusqu'à un équivalent de zinc où il se stabilise, ainsi le peptide et le zinc forme un complexe 1 : 1. Le comportement de la sonde en série lysine est le même qu'en série Dap, ainsi le repliement de la sonde ne semble pas être modifiée par l'allongement de la chaîne latérale portant le complexe de lanthanide (fig. II.28.).

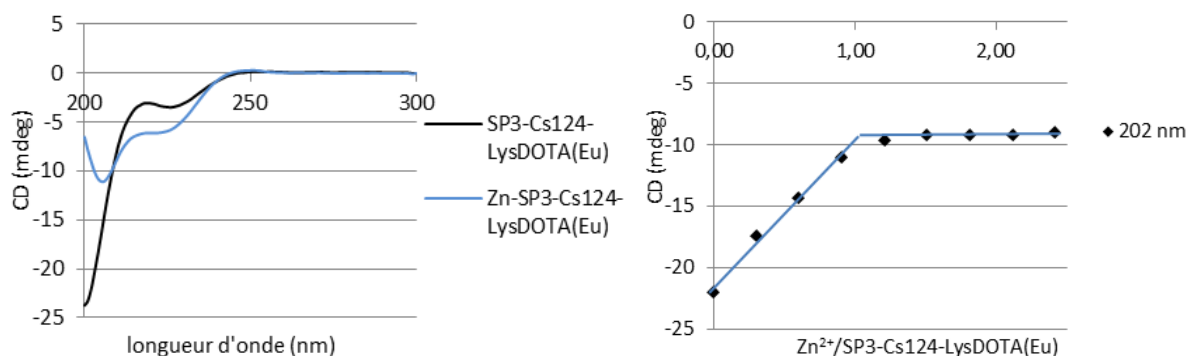


Figure II.28. : Titration du peptide SP3-Cs124-LysDOTA(Eu) par $ZnCl_2$ suivi par dichroïsme circulaire. 10 μM SP3-Cs124-LysDOTA(Eu), 10 mM Pi pH 7.5, 350 μM TCEP.

Propriétés d'émission

L'émission de fluorescence est mesurée au cours des titrages pour les deux peptides. Les allures des spectres sont les mêmes que celles observées avec les sondes SP3-Cs124-DapDOTA(Eu). Lors de l'ajout de zinc, la fluorescence du Cs124 diminue légèrement jusqu'à un équivalent de zinc. Cette diminution est moins marquée dans le cas de la sonde SP3-Cs124-LysDOTA(Tb) avec un abaissement de l'ordre de 3% contre 15% dans le cas de la sonde SP3-Cs124-LysDOTA(Eu). Les rendements quantiques sont du même ordre de grandeur pour les deux sondes (tabl. II.5.).

Tableau II.5.: Rendements quantiques de fluorescence avec ou sans zinc pour les sondes SP3-Cs124-LysDOTA(Eu) et SP3-Cs124-LysDOTA(Tb).

Peptide	$\Phi_{\text{fluo}} \%$	$\Phi_{\text{fluo-Zn}} \%$
SP3-Cs124-LysDOTA(Eu)	4,4	3,7
SP3-Cs124-LysDOTA(Tb)	4,7	4,6

La luminescence du terbium de la sonde SP3-Cs124-LysDOTA(Tb) ainsi que la luminescence de l'euporium pour la sonde SP3-Cs124-LysDOTA(Eu) augmente linéairement jusqu'à un équivalent de zinc puis atteint un plateau. Comme dans le cas des sondes Dap les rendements quantiques de luminescence ainsi que les contrastes sont plus importants dans le cas du terbium (tabl. II.6.).

Tableau II.6. : Contrastes et rendements quantiques de luminescence avec ou sans zinc pour les sondes SP3-Cs124-LysDOTA(Eu) et SP3-Cs124-LysDOTA(Tb).

Peptide	Contraste	$\Phi_{\text{Ln}} \%$	$\Phi_{\text{Ln-Zn}} \%$
SP3-Cs124-LysDOTA(Tb)	16	0,15	2,7
SP3-Cs124-LysDOTA(Eu)	12	0,04	0,37

Affinité

Les différentes sondes ont été titrées par du zinc en présence d'un équivalent de compétiteur EGTA. Les variations de luminescence sont représentées dans la figure II.29.

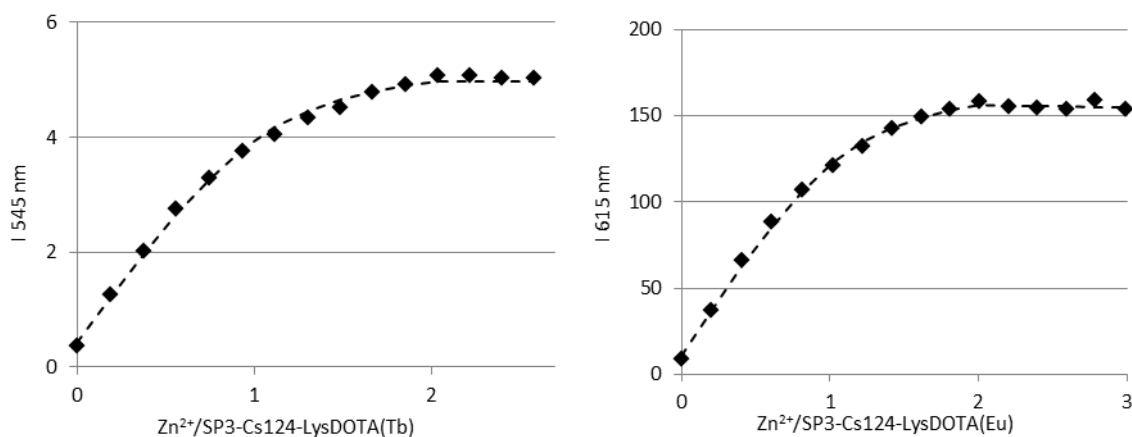


Figure II.29. : Titrage du peptide SP3-Cs124-LysDOTA(Tb) (à gauche) et du peptide SP3-Cs124-LysDOTA(Eu) (à droite) par $ZnCl_2$ en présence d'un équivalent d'EGTA suivi par spectroscopie d'émission en temps résolu.

Les courbes de titrage obtenues sont plus incurvées avec la série lysine qu'avec la série Dap. La constante d'affinité est donc plus importante pour la série lysine. Les affinités sont répertoriées dans le tableau II.7. ci-dessous, elles sont comprises dans la gamme de concentration en zinc circulant (10^{-11} - 10^{-9} M), elles sont donc adaptées à sa détection cellulaire.

Tableau II.7. : Log K des sondes SP3-Cs124-LysDOTA(Eu) et SP3-Cs124-LysDOTA(Tb).

Peptide	Log K \pm 0.2
SP3-Cs124-LysDOTA(Tb)	10,3
SP3-Cs124-LysDOTA(Eu)	10,1

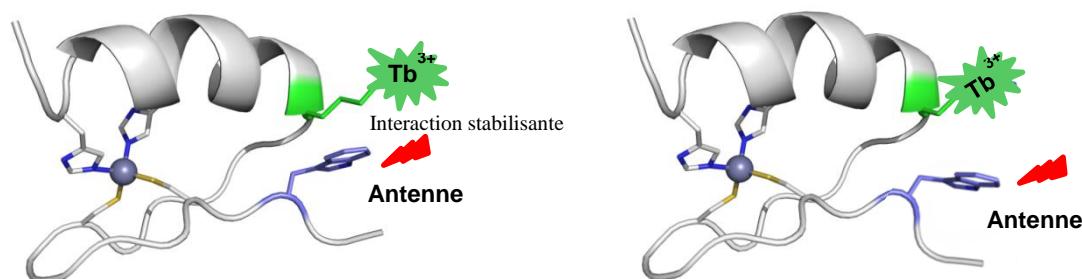
II.2.3. Conclusion

Quatre sondes intensiométriques incorporant le Cs124 comme antenne ont été développées à partir des sondes SP3-Trp-DapDOTA(Tb) mise au point avant mon arrivée. Les sondes SP3-Cs124-LysDOTA(Ln) ne diffèrent des sondes SP3-Cs124-DapDOTA(Ln) seulement par la longueur de la chaîne latérale de l'acide aminé portant le chélateur du lanthanide. Cette modification est un changement ponctuel qui ne touche pas les points essentiels de la sonde, à savoir les acides aminés liant le métal, leur positionnement ou les acides aminés hydrophobes. De ce fait le repliement de la sonde ainsi que la stœchiométrie vis-à-vis du zinc ne varient pas. Cependant les propriétés d'émission des sondes sont modifiées. En effet les sondes en série lysine ont des contrastes ainsi que des rendements quantiques de luminescence supérieurs (tabl. II.8.).

Tableau II.8. : Tableau récapitulatif des propriétés des sondes SP3-Cs124-DapDOTA(Ln) et SP3-Cs124-LysDOTA(Ln).

Peptide	Contraste	$\phi_{Ln}\%$	$\phi_{Ln-Zn}\%$	$\phi_{fluor}\%$	$\phi_{fluor-Zn}\%$	Log K \pm 0,2
SP3-Cs124-DapDOTA(Tb)	13	0,09	1,2	4,5	3,8	9,1
SP3-Cs124-LysDOTA(Tb)	16	0,15	2,7	4,7	4,6	10,3
SP3-Cs124-DapDOTA(Eu)	9	0,02	0,22	4,3	3,2	9,3
SP3-Cs124-LysDOTA(Eu)	12	0,04	0,37	4,4	3,7	10,3

Le transfert d'énergie est donc plus efficace pour les sondes en série lysine. De plus l'affinité de ces sondes est plus importante qu'en série Dap. Notre hypothèse pour expliquer cela est basée sur des structures RX de doigts de zinc. Avec la sonde SP3-Cs124-LysDOTA(Ln), la chaîne latérale de la lysine à quatre carbones formerait des interactions hydrophobes avec le noyau aromatique du Cs124, rapprochant l'antenne et le lanthanide et stabilisant le repliement doigt de zinc. La courte chaîne du Dap, au contraire, aurait tendance à orienter le complexe DOTA(Ln) plus loin du Cs124, rendant le transfert d'énergie moins efficace qu'avec la lysine (fig. II.30.). Cependant bien que les affinités des deux sondes appartenant aux deux séries soit différentes, elles se trouvent dans la gamme de concentration du zinc circulant (10^{-11} - 10^{-8} M) et sont adaptées à sa détection cellulaire.

**Figure II.30.** : Représentation des structures des sondes SP3-Cs124-LysDOTA(Ln) et SP3-Cs124-DapDOTA(Ln).

Nous avons donc synthétisé quatre sondes intensiométriques pour la détection sélective du zinc. Les affinités associées à ces sondes sont adaptées à la détection cellulaire de cet analyte. De plus les sondes en série Lys ont des propriétés d'émission et des rendements de synthèse plus intéressants pour le développement des sondes.

II.3. Sondes ratiométriques émettant dans l'UV

II.3.1. Design : une antenne pour deux lanthanides

Les sondes ratiométriques offrent un avantage évident par rapport aux sondes intensiométriques puisqu'elles permettent la quantification de l'analyte sans connaître la concentration de la sonde. L'objectif a été de construire une sonde excitée à une seule

longueur d'onde et dont l'émission à deux longueurs d'ondes varie différemment. Afin de développer cette sonde nous avons souhaité incorporer à notre système deux lanthanides qui sont sensibilisés par la même antenne (fig. II.31.). Nous venons de voir que l'antenne Cs124 est capable de sensibiliser le terbium et également l'euporium dans nos structures.

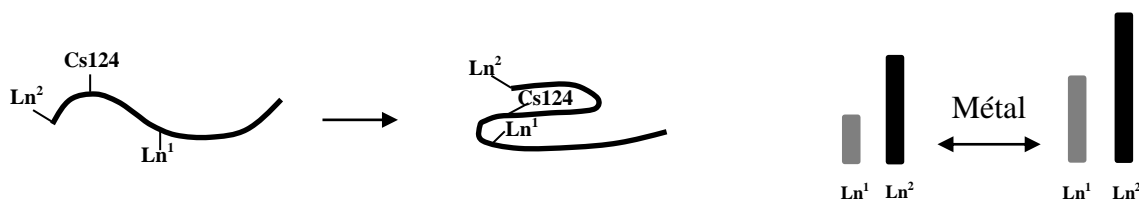


Figure II.31. : Principe de fonctionnement de la sonde.

Ces deux lanthanides émettent dans le visible, leurs spectres d'émission se chevauchent en partie, cependant certains pics sont distincts (fig. II.32.). Nous avons choisi de mesurer la bande d'émission $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$ à 545 nm pour le terbium et la bande d'émission $^5D_0 \rightarrow ^7F_4$ à 702 nm pour l'émission de l'euporium ce qui nous permet d'avoir des intensités conséquentes et distinctes.

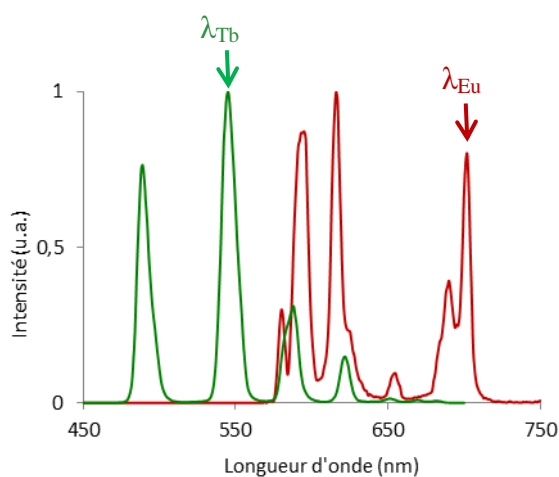


Figure II.32. : Signaux superposés de l'émission du terbium et de l'euporium.

Pour la mise au point de l'architecture de la sonde ratiométrique, nous avons gardé la structure de la sonde intensiométrique et ajouté en N-terminale le second complexe de lanthanide (fig. II.33.). Ces sondes ont été développées en série Dap puisqu'elles ont été synthétisées avant la mise au point des sondes intentionnelles en série lysine.

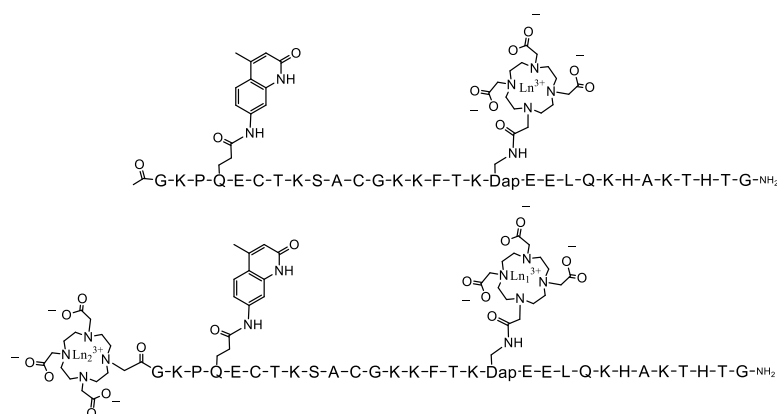


Figure II.33. : Structure des sondes non ratiométriques SP3-Cs124-DapDOTA(Ln) (à gauche) et des sondes ratiométriques SP3R-Ln₂-Cs124-Ln₁.

Pour les sondes intensiométriques SP3-Cs124-DapDOTA(Ln), le signal du lanthanide s'accroît en présence de zinc. L'ajout d'un signal non ou peu modifié lors des ajouts de zinc rendrait la sonde ratiométrique. Le second lanthanide doit donc être placé de façon à ce que sa distance avec l'antenne varie peu lors de la structuration du peptide, ainsi sa sensibilisation par effet d'antenne devrait être peu affectée par l'ajout de zinc. Nous avons choisi d'introduire ce second lanthanide en N-terminal, sur le même feuillet β , de cette façon le repliement n'affecte que peu leur distance (fig. II.34.).

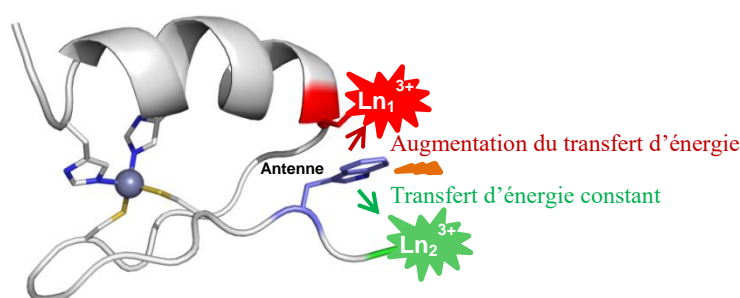


Figure II.34. : Repliement des sondes ratiométriques SP3R-Ln₂-Cs124-Ln₁ induit par le zinc

Les sondes intensiométriques sont sélectives et ont une affinité adaptée à la détection du zinc circulant nous souhaitons donc modifier le moins possible ces propriétés. La structure des sondes ratiométriques ne diffère des sondes intensiométriques Dap que par l'introduction en N-terminal d'un complexe de lanthanide. Ce changement ponctuel ne modifie pas les éléments déterminants de la sonde (acides aminés liant le métal, espacement de ces acides aminés, acides aminés hydrophobes). Ainsi cette modification de la structure de la sonde ne devrait pas perturber ses propriétés.

Nous avons choisi d'appliquer la même méthode de synthèse qu'utilisée pour nos sondes intensiométriques : les sondes ont été synthétisées en deux fragments qui ont été complexés chacun à un lanthanide puis assemblés par ligation native. Cette méthode

convergente nous a permis de sélectivement complexer les lanthanides mais également de facilement les intervertir afin d'obtenir deux sondes aux propriétés spectroscopiques potentiellement différentes (fig. II.35.).

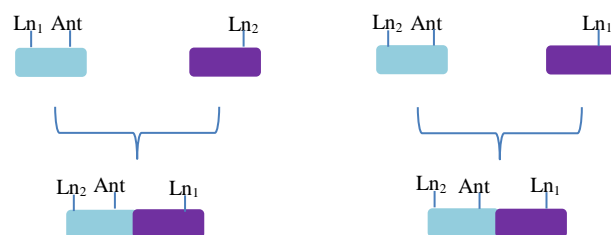


Figure II.35. : Représentation schématique de la stratégie de méthode convergente.

Les signaux des différents lanthanides doivent être visualisables dans les mêmes conditions expérimentales (concentration, photomultiplicateur PM, fentes, temps d'intégration, délai). Or bien que le contraste de ces sondes sont proches (13 pour SP3-Cs124-DapDOTA(Tb) et 9 pour SP3-Cs124-DapDOTA(Eu)) les rendements quantiques associés au terbium et l'euporium diffèrent fortement, d'un ordre de grandeur. Ainsi le signal de l'euporium est dix-huit fois moins intense que celui du terbium lorsqu'ils sont enregistrés dans les mêmes conditions (fig. II.36.).

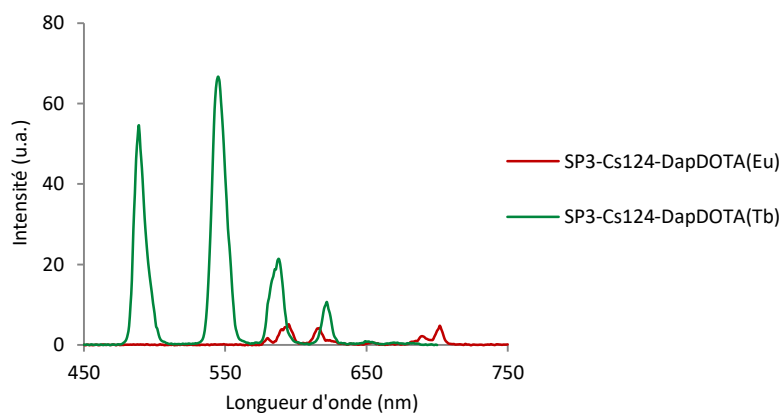


Figure II.36. : Signal du peptide SP3-Cs124-DapDOTA(Tb) et SP3-Cs124-DapDOTA(Eu) par spectroscopie d'émission en temps résolu. SP3-Cs124-DapDOTA(Ln) : 10 μ M peptide, 10 mM HEPES pH 7.5, TCEP 350 μ M, λ_{ex} = 330 nm, fente d'émission 5/fente d'excitation 10, PM 700 V, délai 200 μ s, temps d'intégration 2 ms.

Le positionnement des deux lanthanides doit compenser cette différence de sensibilisation afin de ne pas écraser le signal de l'euporium avec ou sans zinc pour que ces deux signaux soit visibles dans les mêmes conditions. Il est donc intéressant de pouvoir comparer l'émission des sondes dans lesquels le positionnement des lanthanides est interverti. La synthèse de ces composés est facilitée par la voie de synthèse choisie.

II.3.2. Synthèse des sondes SP3R-Ln1-Cs124-Ln2

Les fragments cystéinyl Cys-F2-DapDOTA(Ln) sont les mêmes que ceux synthétisés pour les sondes intensiométriques en série Dap.

Le fragment F1R(Ln)-Cs124-SEA a été synthétisé de manière similaire au peptide F1-Cs124-SEA. Seule la dernière étape sur support diffère. En effet la glycine terminale n'a pas été acétylée mais le DOTA-tris(*t*Bu)ester a été couplé manuellement en N-terminale par un couplage classique en présence de PyBOP et de DIEA. Le fragment F1R-Cs124-SEA a été métallé en présence d'un excès de TbCl₃ ou EuCl₃ dans l'eau à pH 6.5 pendant une nuit sous argon (fig. II.37.). Les peptides F1R(Tb)-Cs124-SEA et F1R(Eu)-Cs124-SEA ont été caractérisés par spectrométrie de masse et leur pureté a été contrôlée par HPLC analytique (fig. II.38.).

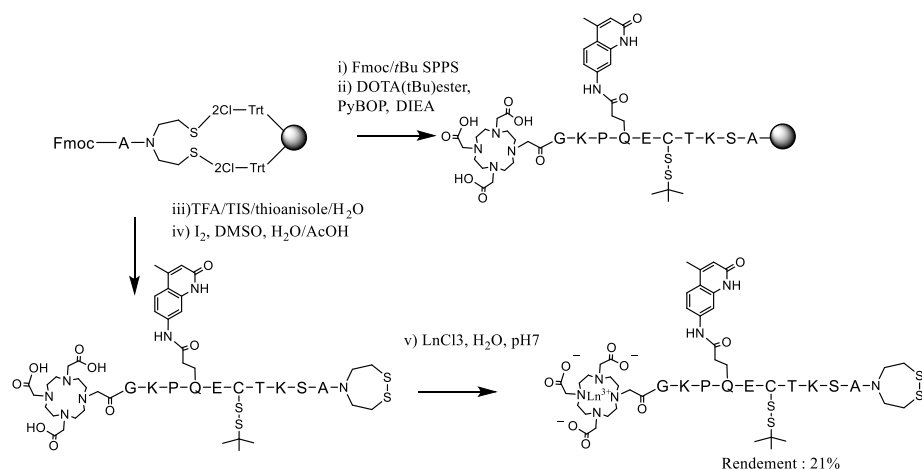


Figure II.37. : Voie de synthèse du fragment F1R(Ln)-Cs124-SEA.

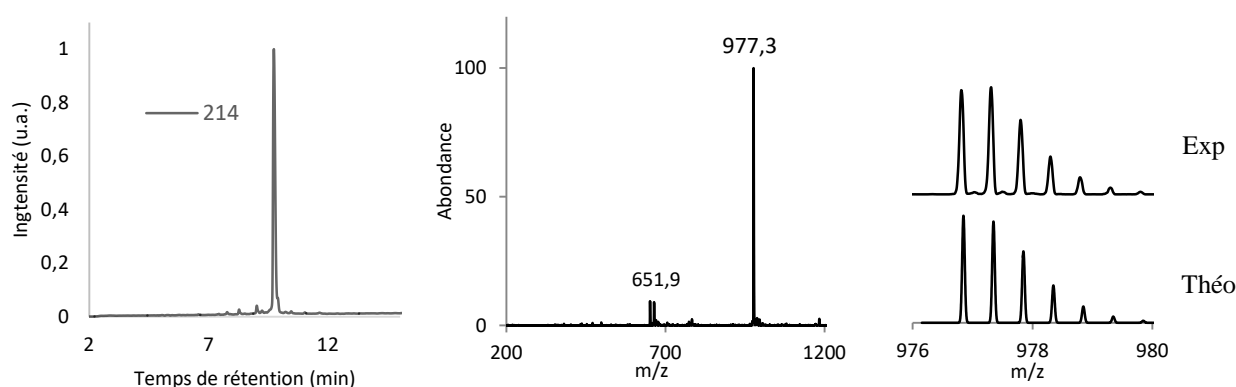


Figure II.38. : (A gauche) Chromatogramme HPLC et (au milieu) spectre ESI-MS (à droite) massif isotopique expérimental et théorique de la sonde du fragment F1R(Tb)-Cs124-SEA. Masse calculée = 977.54 [M+2H]²⁺, 652.03 [M+3H]³⁺ pour M = C₇₆H₁₁₈N₁₉O₂₃S₄Tb.

Les différents fragments ont été assemblés par ligation SEA dans les mêmes conditions expérimentales que celles décrites pour les sondes intensiométriques. Les produits

finaux SP3R-Tb-Cs124-Eu et SP3R-Eu-Cs124-Tb ont été caractérisés en spectrométrie de masse et leur pureté a été contrôlée par HPLC analytique (fig. II.39.).

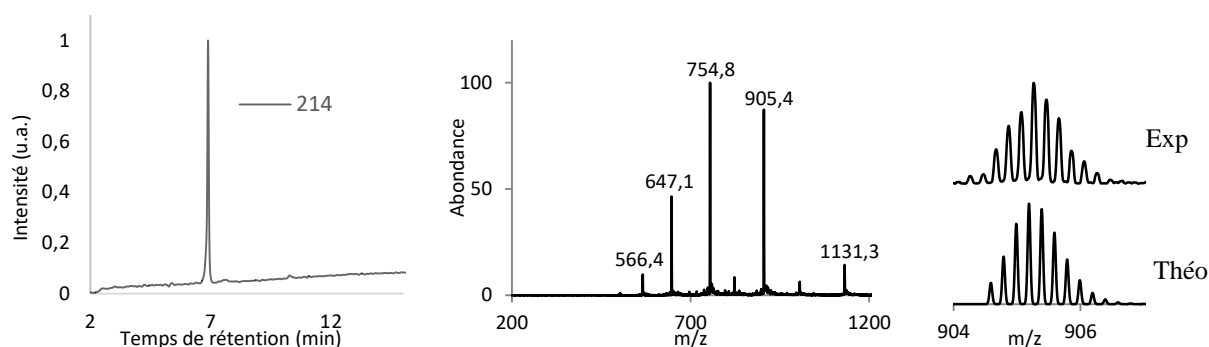
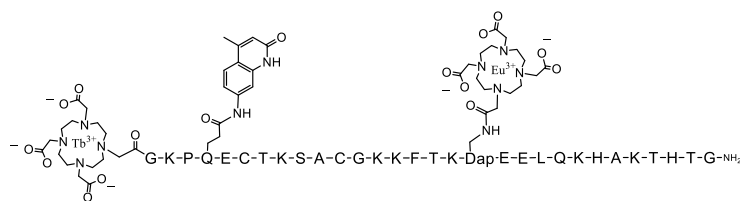


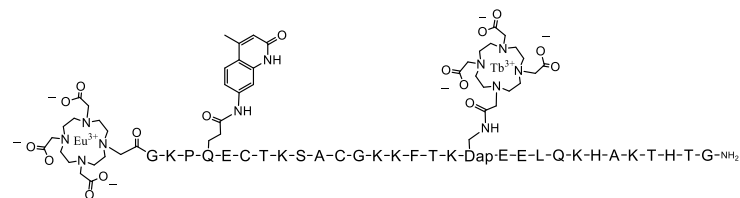
Figure II.39. : (A gauche) Chromatogramme HPLC et (au milieu) spectre ESI-MS (à droite) massif isotopique expérimental et théorique du fragment SP3R-Tb-Cs124-Eu. Masse calculée : 1131.40 $[M+4H]^{4+}$, 905.32 $[M+5H]^{5+}$, 754.60 $[M+6H]^{6+}$, 646.95 $[M+7H]^{7+}$ pour $M = C_{181}H_{286}EuN_{54}O_{58}S_2Tb$.

Par cette méthode nous avons donc synthétisé deux sondes : SP3R-Ln2-Cs124-Ln1 avec Ln1 = Tb et Ln2 = Eu ou Ln1 = Eu et Ln2 = Tb.

SP3R-Tb-Cs124-Eu :



SP3R-Eu-Cs124-Tb :



Ces sondes diffèrent par le positionnement des lanthanides. De ce fait on peut s'attendre à une sensibilisation et un comportement différents de chaque lanthanide entre les deux sondes. Nous allons voir cela par la suite.

II.3.3. Caractérisations spectroscopiques et physicochimiques

II.3.3.1. SP3R-Eu-Cs124-Tb

Fluorescence

L'émission de fluorescence de la sonde ratiométrique SP3R-Eu-Cs124-Tb suit la même tendance que pour les sondes intensiométriques à savoir une diminution de l'émission lors de l'ajout de zinc. Les rendements quantiques de fluorescence sont du même ordre de grandeur que pour les sondes intensiométriques (tabl. II.9).

Tableau. II.9. : Rendements quantiques de fluorescence avec ou sans zinc pour les sondes intensiométriques et SP3R-Eu-Cs124-Tb.

Peptide	$\Phi_{\text{fluo}} \%$	$\Phi_{\text{fluo-Zn}} \%$
SP3-Cs124-DapDOTA(Eu)	4,3	3,2
SP3-Cs124-DapDOTA(Tb)	4,5	3,8
SP3R-Eu-Cs124-Tb	4,1	3,5

Luminescence

Lors du titrage du peptide par le zinc, l'émission du terbium augmente ($\times 11$) et celle de l'euporium reste quasi-constante ($\times 1,5$). L'augmentation du signal du terbium est proche de celle de la sonde intensiométrique ($\times 13$) (fig. II.40.). La faible variation de l'émission de l'euporium correspond au comportement voulu en positionnant ce lanthanide à une distance constante par rapport à l'antenne.

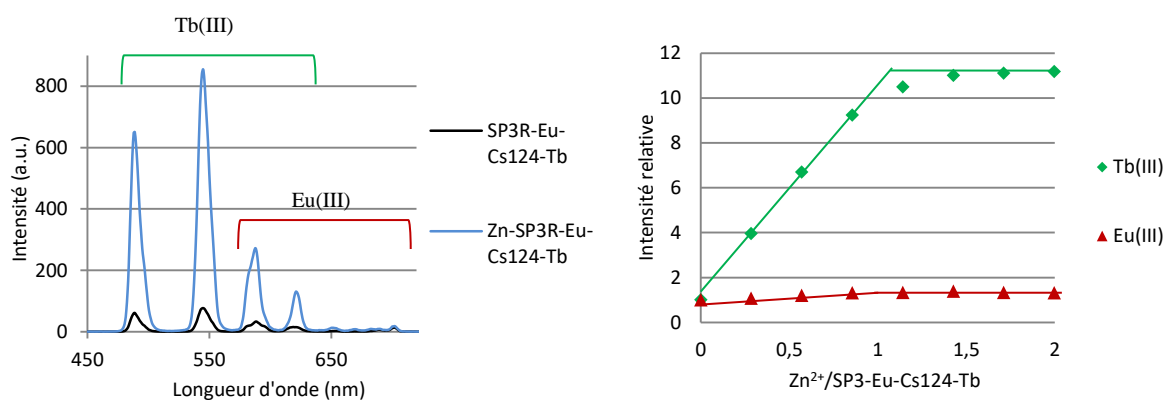


Figure II.40. : (A gauche) Spectre en temps résolu du peptide SP3R-Eu-Cs124-Tb avec et sans zinc et (à droite) évolution du signal du terbium et de l'euporium en fonction des ajouts de zinc. 10 μM SP3R-Eu-Cs124-Tb, 10 mM HEPES pH 7.5, 350 μM TCEP, $\lambda_{\text{ex}} = 330$ nm, fente d'émission 5/fente d'excitation 10, PM 700 V, délai 200 μs , temps d'intégration 2 ms.

La sonde SP3R-Eu-Cs124-Tb est ratiométrique. Le rapport de l'intensité du terbium sur celle de l'euporium augmente de 5,7 à 47,8, jusqu'à atteindre un plateau suivant la formation du complexe Zn-SP3R-Eu-Cs124-Tb (fig. II.41.). Cependant l'émission de l'euporium est totalement écrasée par celle du terbium lorsque le peptide complexe le zinc. En effet, le rapport des deux signaux atteint 50 lorsque la sonde est repliée, ainsi le signal de l'euporium se trouve dans le bruit de fond. La sonde SP3R-Eu-Cs124-Tb n'est donc pas optimale.

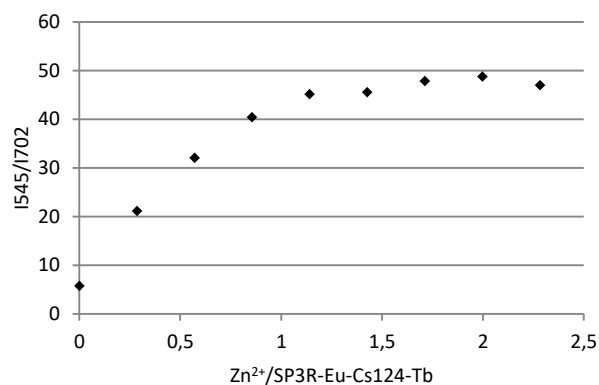


Figure II.41. : Rapport de l'émission du terbium (545 nm) par l'émission de l'euporium (702 nm) pour la sonde SP3R-Eu-Cs124-Tb.

II.3.3.1. SP3R-Tb-Cs124-Eu

Fluorescence

Comme précédemment on observe les mêmes tendances que pour les sondes intensiométriques avec des rendements quantiques similaires (tabl. II.10.).

Tableau II.10. : Rendements quantiques de fluorescence avec ou sans zinc pour les sondes SP3R-Ln₂-Cs124-Ln₁.

Peptide	$\Phi_{\text{fluo}} \%$	$\Phi_{\text{fluo-Zn}} \%$
SP3R-Eu-Cs124-Tb	4,1	3,5
SP3R-Tb-Cs124-Eu	4,2	2,8

luminescence

Lors du titrage de la sonde SP3R-Tb-Cs124-Eu par le zinc, l'émission de l'euporium augmente ($\times 9$) et celle du terbium reste quasi-constante ($\times 1,5$) (fig. II.42.). Le contraste du lanthanide placé en N-terminale est la même quel que soit sa nature.

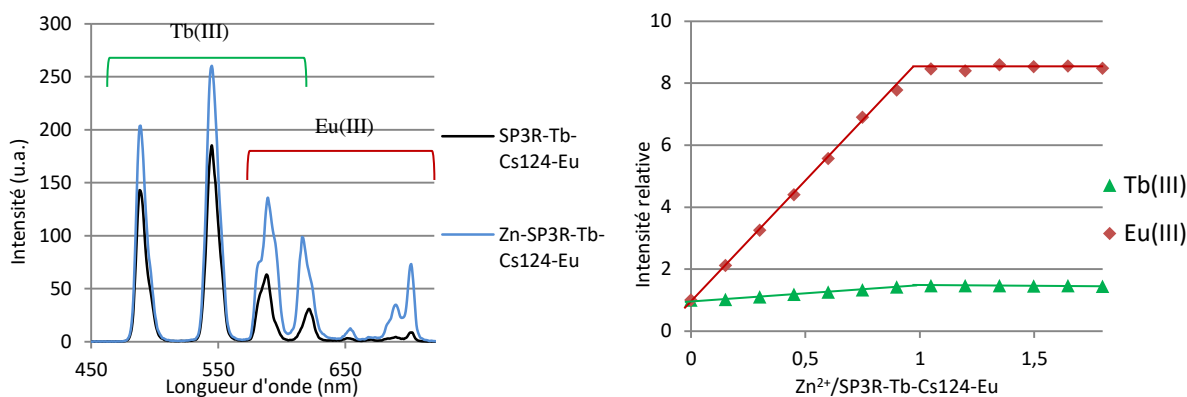


Figure II.42. : Spectre en temps résolu du peptide SP3R-Tb-Cs124-Eu avec et sans zinc et augmentation du signal du terbium et de l'euporium en fonction des ajouts de zinc. 10 μM SP3R-Tb-Cs124-Eu, 10 mM HEPES pH 7.5, 350 μM TCEP, $\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$, fente d'émission 5/fente d'excitation 10, PM 700 V, délai 200 μs , temps d'intégration 2 ms.

La sonde est ratiométrique puisque le rapport de l'intensité de l'euporium sur celle du terbium augmente de 0.05 à 0.27 jusqu'à un équivalent de zinc (fig. II.43.) suivant la formation du complexe Zn-SP3R-Tb-Cs124-Eu. L'augmentation de la luminescence du lanthanide placé du côté C-terminal est légèrement plus faible dans le cas de l'euporium, ce qui est cohérent avec les sondes intensiométriques.

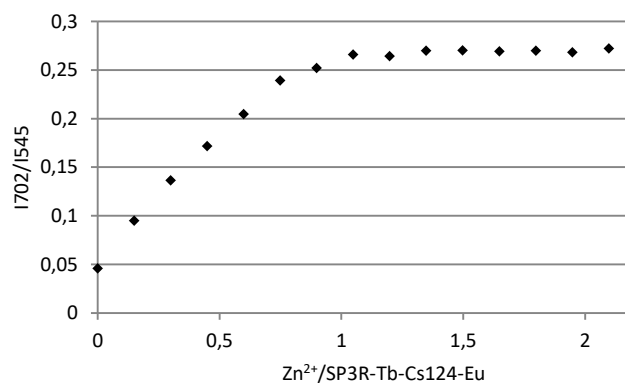


Figure II.43. : Rapport de l'émission de l'euporium (702 nm) par l'émission du terbium (545 nm) pour la sonde SP3R-Tb-Cs124-Eu.

Les rendements quantiques associés à chaque lanthanide dépendent de leur positionnement dans la sonde. Pour un même lanthanide le positionnement sur l'extrémité N-terminale (Ln₂) permet d'obtenir des rendements quantiques plus importants comparé à ceux observés pour les lanthanides du corps de la sonde (Ln₁) (tabl. II.11.). Ceci est cohérent avec un transfert d'énergie accrue dû à la distance Ln₁-Cs124 < Ln₂-Cs124. La différence entre les rendements quantiques du Tb³⁺ et de l'Eu³⁺ est moins marquée pour la sonde Zn-SP3R-Tb-Cs124-Eu que pour la sonde Zn-SP3R-Eu-Cs124-Tb. De ce fait les signaux de l'Eu³⁺ sont moins écrasés. Cette sonde est donc la plus adaptée à la détection ratiométrique du zinc, la suite des caractérisations seront effectuées sur ce peptide.

Tableau II.11. : Rendements quantiques de luminescence pour les sondes ratiométriques SP3R-Ln₂-Cs124-Ln₁.

Peptide	$\Phi_{Ln}\%$		$\Phi_{Ln-Zn}\%$	
	Tb	Eu	Tb	Eu
SP3R-Eu-Cs124-Tb	0,13	0,08	1,41	0,08
SP3R-Tb-Cs124-Eu	0,20	0,03	0,28	0,21

Sélectivité

La sélectivité vis-à-vis des métaux physiologiques a été testée comme précédemment mais en utilisant le rapport $r = \frac{I_{Eu}}{I_{Tb}}$ comme observable. Avant l'ajout de zinc le rapport ratiométrique est la même sauf dans le cas du cuivre(II) qui entraîne une légère diminution du rapport ratiométrique. Après l'ajout de zinc, le rapport ratiométrique de la sonde est la même quelque soit le metal présent en plus du zinc (fig. II.44.). La réponse du rapport ratiométrique est donc sélective du zinc.

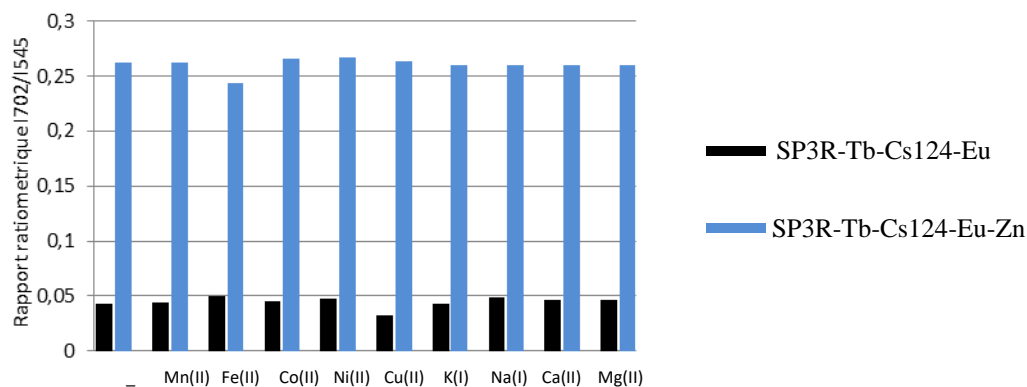


Figure II.44. : Diagramme de sélectivité du peptide SP3R-Tb-Cs124-Eu (5 μ M) montrant l'évolution de l'émission de luminescence en du rapport ratiométrique en temps résolu en absence (noir) et en présence (bleu) de Zn^{2+} (10 μ M) après l'addition de différents cations Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} (10 μ M), Na^+ , K^+ (50 mM), Mg^{2+} , Ca^{2+} (10 mM).

Affinité

L'affinité est mesurée de la même façon que précédemment par titrage en présence d'EGTA (fig. II.45.). La valeur du log K est déterminée à $9,2 \pm 0,2$.

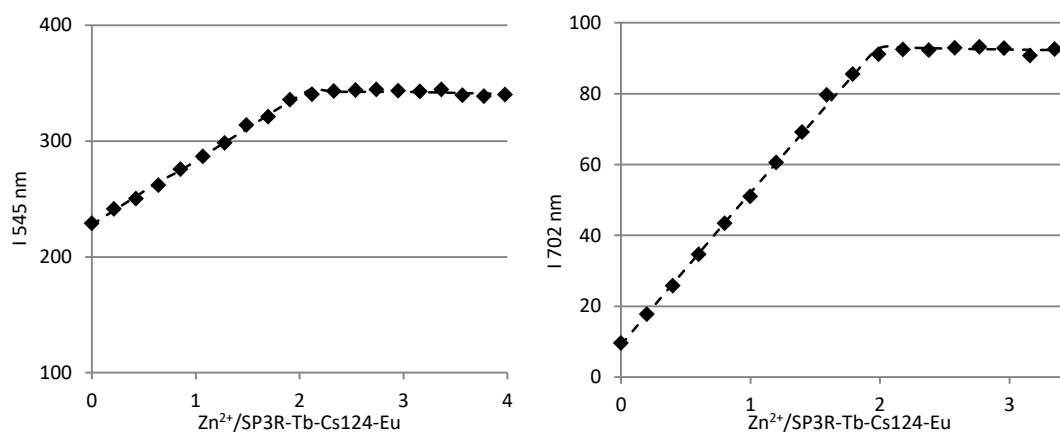


Figure II.45. : (A gauche) Titrage du peptide SP3R-Tb-Cs124-Eu par $ZnCl_2$ en présence d'un équivalent d'EGTA suivi à 545 nm par spectroscopie d'émission en temps résolu. (A droite) Données d'ajustement et valeur expérimentales lors du titrage du peptide SP3R-Tb-Cs124-Eu par $ZnCl_2$ en présence d'un équivalent d'EGTA suivi à 702 nm par spectroscopie d'émission en temps résolu

Cette valeur de constante d'affinité est la même aux incertitudes près de celles trouvées dans le cas des sondes intensiométriques en série Dap. La sonde ratiométrique est adaptée à la détection du zinc circulant puisque sa constante de dissociation se trouve dans la gamme de concentration en zinc circulant : $10^{-11} M < K_d < 10^{-9} M$.

II.3.4. Conclusion

Deux sondes ratiométriques en temps résolu ont été mises au point : SP3R-Tb-Cs124-Eu, SP3R-Eu-Cs124-Tb. Nous avons modifié la séquence du peptide SP3-Cs124-

DapDOTA(Ln) afin d'ajouter en position N-terminale un deuxième lanthanide qui est excité par la même antenne le Cs124. La complexation sélective des lanthanides dans le même chélateur DOTA est assurée par la stratégie de synthèse convergente utilisée. Par rapport à la sonde ratiométrique développée avant mon arrivée au laboratoire (voir début du chapitre) la synthèse est facilitée.

Pour la sonde SP3R-Eu-Cs124-Tb, la luminescence du Tb^{3+} augmente et la luminescence de l' Eu^{3+} est quasiment constante. Cependant le rendement quantique de luminescence en présence de zinc du Tb^{3+} est nettement supérieur à celui de l' Eu^{3+} , le signal de l' Eu^{3+} est écrasé par celui du Tb^{3+} , cette sonde n'est donc pas optimale. Pour la sonde SP3R-Tb-Cs124-Eu, la luminescence de l' Eu^{3+} augmente et celle du Tb^{3+} est quasiment constante. Les rendements quantiques associés à cette sonde sont plus homogènes, le signal de l' Eu^{3+} est moins écrasé, cette sonde est plus adaptée à la détection du zinc.

La structure des sondes ratiométriques ne diffère des sondes intensiométriques Dap que par l'introduction en N-terminale d'un complexe de lanthanide. Ce changement ponctuel en N-terminale ne modifie pas les éléments déterminants de la sonde tels que les acides aminés liant le métal, ni l'espacement entre ces acides aminés, ni les acides aminés hydrophobes ainsi que la chaîne latérale portant le chélateur. Ainsi le comportement général de la sonde n'est pas modifié : les contrastes associés au Ln_1 sont proches de ceux des sondes intensiométriques Dap, les rendements quantiques sont proches et l'affinité de la sonde pour le zinc est la même (tabl. II.12). En comparaison avec la sonde ratiométrique mise au point avant mon arrivée l'utilisation d'une seule antenne pour l'excitation des deux lanthanides permet de rendre les propriétés d'émission de la sonde plus prédictibles.

Tableau II.12. : Tableau récapitulatif des propriétés des sondes intensiométriques et ratiométriques en série Dap.

Peptide	Φ_{fluor} %	$\Phi_{\text{fluor-Zn}}$ %	Φ_{Ln} %		Φ_{Ln-Zn} %		Log K ± 0,1
			Tb	Eu	Tb	Eu	
SP3R-Eu-Cs124-Tb	4,1	3,5	0,13	0,08	1,41	0,08	-
SP3R-Tb-Cs124-Eu	4,2	2,8	0,20	0,03	0,28	0,21	9,2
SP3-Cs124-DapDOTA(Tb)	4,5	3,8	0,09		1,2		9,1
SP3-Cs124-DapDOTA(Eu)	4,3	3,2	0,02		0,22		9,3

Nous avons donc mis au point des sondes intensiométriques et ratiométriques en temps résolu par une méthode de synthèse convergente. Elles sont sélectives du zinc avec une affinité adaptée à sa détection cellulaire. Cependant un inconvénient de ces sondes est qu'elles sont excitées dans l'UV et qu'elles émettent en grande partie dans le visible. Afin de

bénéficier de la fenêtre de transparence du milieu biologique, il faut décaler l'excitation et l'émission vers le visible et le proche infrarouge.

II.3. Sonde à zinc émettant dans le proche infrarouge

Parmi les lanthanides ayant une bande d'émission dans le proche infrarouge on peut citer le praséodyme, le néodyme, le samarium, le dysprosium, l'holmium, l'erbium et le thulium. Ces lanthanides présentent pour la plupart des bandes d'émissions dans l'ultraviolet et dans le visible, et ont souvent des rendements quantiques d'émission dans le proche infrarouge faibles. Les lanthanides les plus utilisés pour leur émission dans le proche infrarouge sont l'ytterbium, le néodyme et l'erbium. L'émission de l'erbium se situe vers 1550 nm. Cette transition correspond à un niveau excité énergétiquement peu élevé, il est le plus sensible aux désexcitations non radiative, les rendements quantiques qui lui sont associés sont donc les plus faibles ($\Phi_{\text{erbium}} < \Phi_{\text{néodyme}} < \Phi_{\text{ytterbium}}$). Nous nous sommes donc intéressés au développement de sondes incorporant l'ytterbium et le néodyme. L'ytterbium n'a qu'une seule transition ${}^2F_{5/2} \rightarrow {}^2F_{7/2}$ située vers 980 nm. Le néodyme présente plusieurs transitions dans le proche infra-rouge à 900, 1060 et 1350 nm pour les transitions ${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_J$ ($J = 9/2, 11/2, 13/2$). Il nous faut donc utiliser une antenne capable de sensibiliser à la fois les lanthanides Yb^{3+} et Nd^{3+} afin de construire une sonde basée sur le même principe que la sonde ratiométrique SP3R-Ln₂-Cs124-Ln₁.

Avant mon arrivée au laboratoire plusieurs chromophores ont été testés par Manon Isaac et Laurent Raibaut afin de sélectionner ceux capables de sensibiliser les lanthanides émettant dans l'infrarouge. Parmi les chromophores expérimentés deux ont eu des réponses intéressantes : le NBD (7-nitrobenzo(1,2,5)oxadiazol-4-amine) qui permet de sensibiliser seulement le Nd^{3+} , et l'anthracène qui est capable de sensibiliser à la fois l' Yb^{3+} et le Nd^{3+} . C'est donc cette dernière antenne que nous avons incorporée à nos sondes. Nous avons dans un premier temps synthétisé les sondes intensiométriques SP3-Anthra-LysDOTA(Yb) et SP3-Anthra-LysDOTA(Nd), afin de connaître le comportement de ces lanthanides dans les systèmes SP3. Puis une fois le principe validé les sondes hétéro-bis(lanthanide) SP3R-Ln₂-Anthra-Ln₁ correspondantes ont été synthétisées. Ces sondes ont été développées en série lysine qui montre des rendements de synthèse supérieurs aux sondes en série Dap.

Le peptide SP3-Anthra-LysDOTA(Ln) est homologue à la sonde SP3-Cs124-LysDOTA(Ln), les seules différences étant l'utilisation de l'acide aminé Fmoc-3-(9-anthryl)-L-alanine commercial (fig. II.46.) à la place de l'acide aminé modifié portant le Cs124 ainsi que la nature des lanthanides complexés dans le chélate DOTA. Les peptides SP3R-Ln₂-Anthra-Ln₁ sont eux homologues aux sondes SP3R-Ln₂-Cs124-Ln₁.

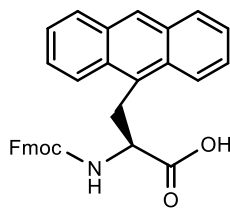


Figure II.46. : Fmoc-3-(9-anthryl)-L-alanine

II.3.1. Synthèse

La stratégie de synthèse appliquée est similaire à celle des peptides précédemment décrits.

Le fragment Cys-F2-LysDOTA est le même que décrit précédemment. Il a été métallé par un excès d' Yb^{3+} ou de Nd^{3+} pour mener aux fragments Cys-F2-LysDOTA(Yb) et Cys-F2-LysDOTA(Nd) ont été caractérisés par spectrométrie de masse et leur pureté a été contrôlée par HPLC analytique.

Les fragments thioester F1-Anthra-SEA et F1R-Anthra-SEA ont été synthétisés de manière similaire au fragment F1-Cs124-SEA et F1R-Cs124-SEA. La seule différence est l'introduction du Fmoc-3-(9-anthryl)-L-alanine commerciale à la place de l'acide aminé Cs124. L'oxydation du fragment SEA-on en SEA-off n'a pas pu être réalisé par du diiode. En effet un suivi en HPLC analytique montre une dégradation importante de l'antenne dans ces conditions expérimentales. Ainsi l'oxydation du fragment SEA-on en SEA-off a été réalisée dans des conditions plus douce, composé de tampon phosphate pH 7, en présence d'un excès de 1,1'-Azobis(*N,N*-diméthylformamide). Après dix minutes sous agitation le peptide est directement purifié par HPLC préparative. Le fragment F1R-Anthra-SEA est ensuite métallé en présence d'ytterbium et de néodyme (fig. II.47.) pour donner F1-Anthra-SEA, F1R(Yb)-Anthra-SEA et F1R(Nd)-Anthra-SEA. Le chromatogramme et le spectre de masse de F1R(Nd)-Anthra-SEA sont donnés sur la figure II.48.

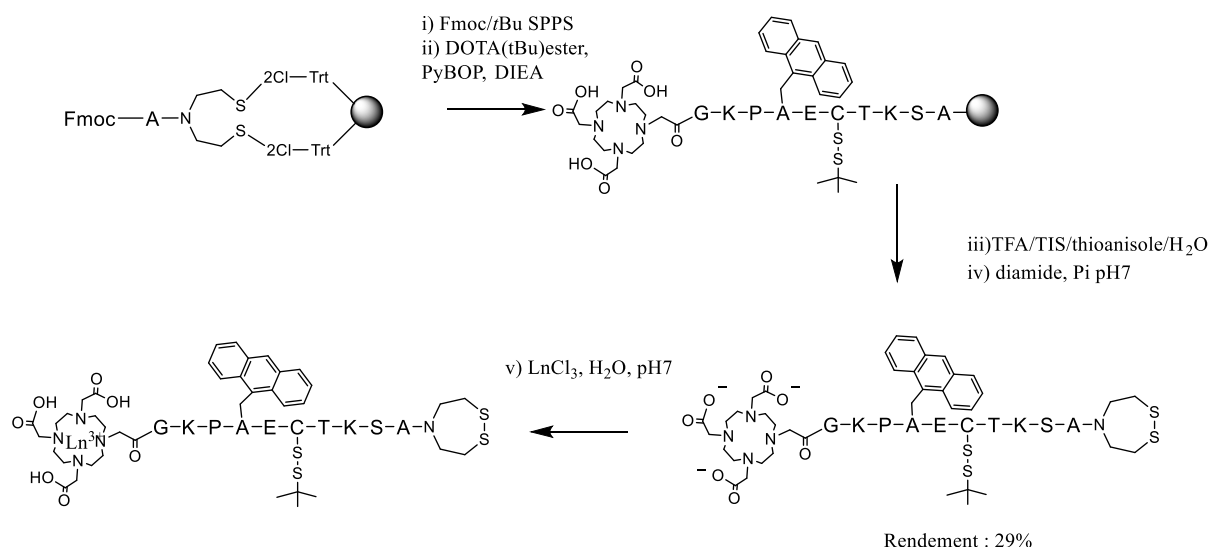


Figure II.47. : Voie de synthèse pour la préparation du fragment FIR(Ln)-Anthra-SEA.

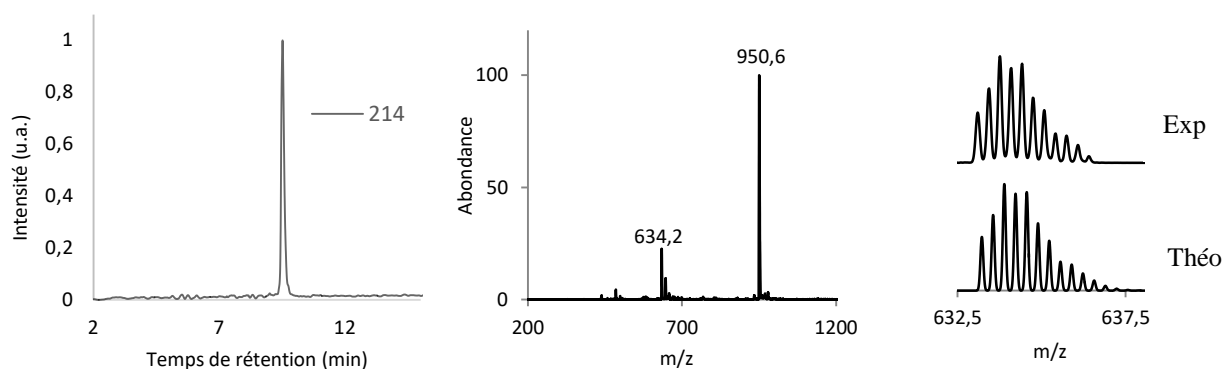


Figure II.48. : (A gauche) Chromatogramme HPLC et (au milieu) spectre ESI-MS (à droite) massif isotopique expérimental et théorique du fragment FIR(Nd)-Anthra-SEA. Masse calculée : 951.19 [M+2H]²⁺, 634.46 [M+3H]³⁺ pour M = C₇₈H₁₁₆N₁₇NdO₂₁S₄.

L'assemblage des fragments a été réalisé par ligation native dans les mêmes conditions que décrites en amont, afin de mener aux sondes intensiométriques SP3-Anthra-LysDOTA(Yb), SP3-Anthra-LysDOTA(Nd) et aux sondes ratiométriques SP3R-Yb-Anthra-Nd et SP3R-Nd-Anthra-Yb. La figure II.49. présente le chromatogramme ainsi que le spectre de masse.

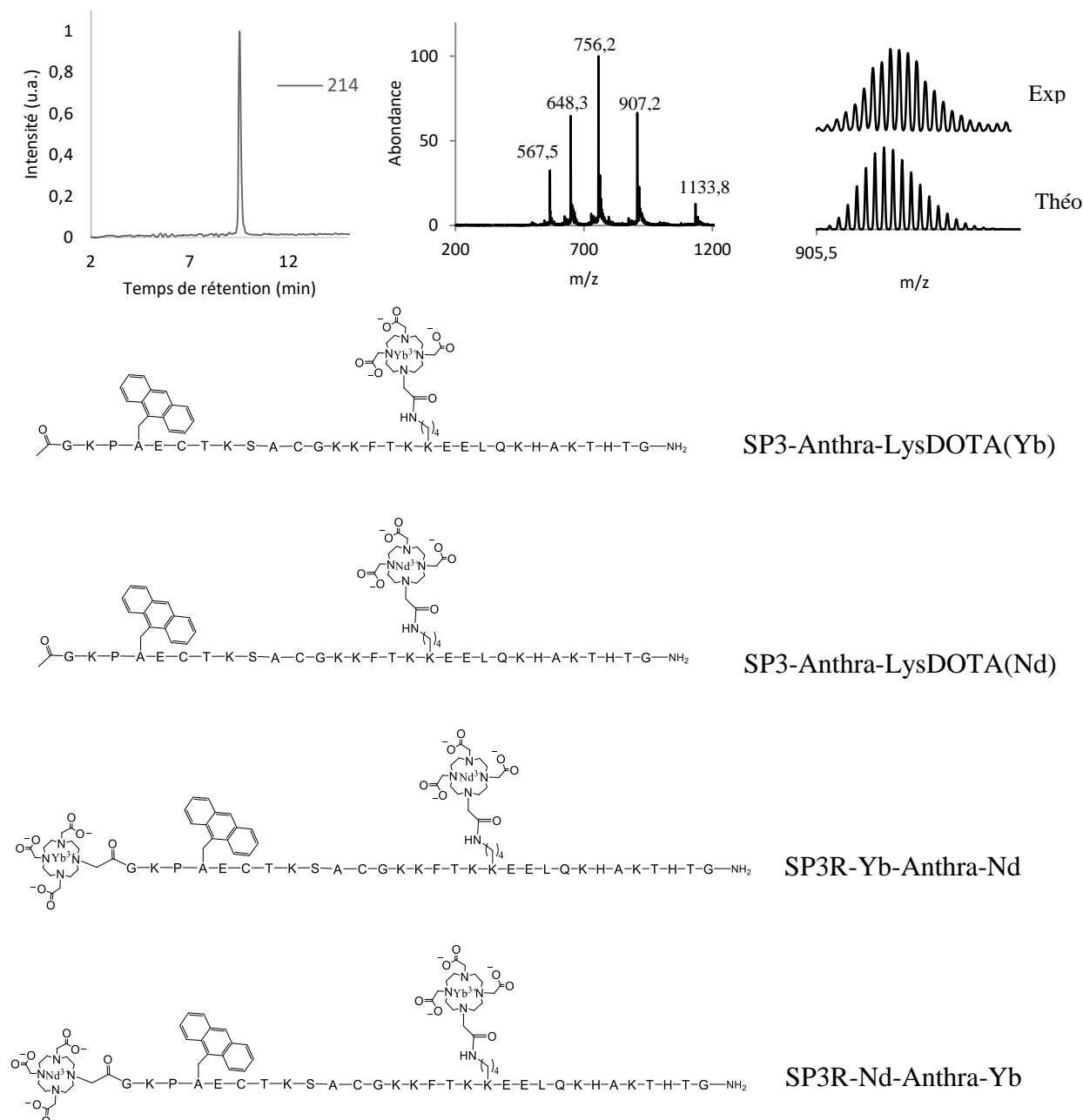


Figure II.49. : (En haut à gauche) Chromatogramme HPLC et (En haut au milieu) spectre ESI-MS (En haut à droite) massif isotopique expérimental et théorique de la sonde SP3R-Nd-Anthra-Yb. Masse calculée : 1133.76 $[M+4H]^{4+}$, 907.21 $[M+5H]^{5+}$, 756.18 $[M+6H]^{6+}$, 648.30 $[M+7H]^{7+}$, 567.38 $[M+8H]^{8+}$ pour $M = C_{186}H_{289}N_{52}NdO_{56}S_2Yb$. (En bas) Structure des sondes pour la détection proche infrarouge.

II.3.2. Propriétés spécifiques liées à l'anthracène

L'anthracène est connu pour se dégrader en présence d'oxygène selon la réaction représentée figure II.50. L'état triplet de l'anthracène réagit avec l'oxygène triplet pour former de l'oxygène singulet. Cette espèce pourra ensuite s'ajouter sur l'anthracène selon une cycloaddition de type [4+2] (réaction de Diels-Alder). En présence d'oxygène nos sondes présentent un photoblanchiment important, avec des dégradations significatives dès la première illumination. Ces sondes ne sont pas stables dans les conditions expérimentales

standards, à savoir en milieu aérobie. Nous les avons donc étudiées en milieu anaérobie (solution préparée sous atmosphère inerte en boîte à gant ou par dégazage).

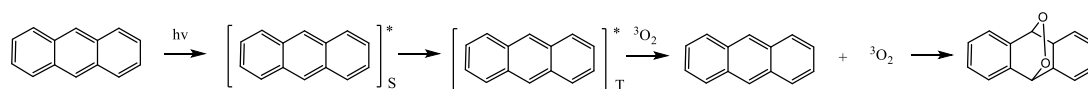


Figure II.50. : Représentation de l'oxydation de l'anthracène par l'oxygène.

La détection de rayonnement proche infrarouge nécessite l'utilisation de détecteurs spécifiques non disponible dans notre laboratoire. De ce fait les mesures sont réalisées en collaboration avec S.Petoud au Centre de Biophysique Moléculaire (CBM) d'Orléans par S.Eliseeva, ou par nos soins à l'Institut Nanoscience et Cryogénie (INAC) de Grenoble sur des spectrophotomètres Fluorolog équipés de détecteurs proche infrarouge.

Les spectres d'absorption ont le même profil pour les sondes intensiométriques ou ratiométriques. Ils présentent 3 bandes à 351, 370 et 389 nm (fig. II.51.). Ces spectres correspondent à l'absorption de l'anthracène. Les études de fluorescence et de luminescence ont été réalisées en excitant à 370 nm.

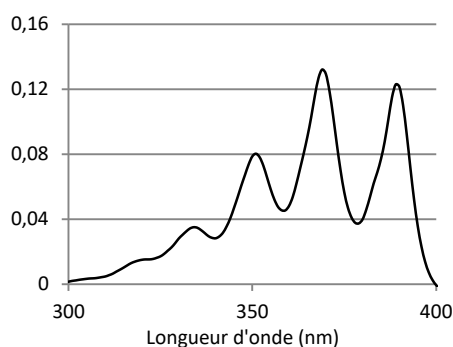


Figure II.51. : Spectre d'absorption de la sonde F1R(Yb)-Anthra-SEA. 20 μ M F1R(Yb)-Anthra-SEA, 10 mM HEPES pH 7.5, 350 μ M TCEP.

II.3.3.1. Sondes intensiométriques

Fluorescence

Les sondes SP3-Anthra-LysDOTA(Nd) et SP3-Anthra-LysDOTA(Yb) ont été titrées en absence d'air avec du $ZnCl_2$. L'émission de fluorescence a été enregistrée après excitation des solutions à 370 nm. Les spectres présentent 3 bandes d'émission à 395, 416 et 440 nm qui sont caractéristiques de l'émission de l'anthracène. L'intensité de ces bandes augmentent linéairement jusqu'à atteindre un plateau à un équivalent de zinc, la sonde répond à la formation du complexe 1 : 1. A titre d'exemple, la figure II.52. montre le titrage associé à la sonde SP3-Anthra-LysDOTA(Nd).

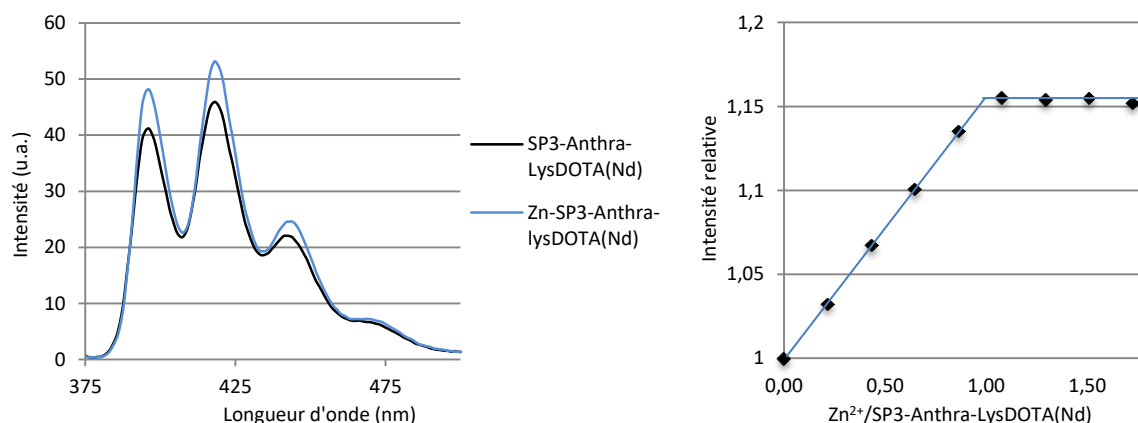


Figure II.52. : Titrage du peptide SP3-Anthra-LysDOTA(Nd) par ZnCl_2 suivi par spectroscopie d'émission de fluorescence. 13 μM SP3-Anthra-LysDOTA(Nd), 10 mM HEPES pH 7.5, 350 μM TCEP, $\lambda_{\text{ex}} = 370$ nm, fente d'émission 5/fente d'excitation 5, PM 400 V.

Luminescence

Les spectres d'émission des sondes SP3-Anthra-LysDOTA(Nd) et SP3-Anthra-LysDOTA(Yb) sont représentés figure II.53. On voit les émissions caractéristiques du Nd^{3+} ($^4\text{F}_{3/2} \rightarrow ^4\text{I}_{11/2}$ à 1060 nm) et de l' Yb^{3+} ($^2\text{F}_{5/2} \rightarrow ^2\text{F}_{7/2}$ à 980 nm). Les spectres d'excitation révèlent que les deux lanthanides Yb^{3+} et Nd^{3+} sont sensibilisés par l'anthracène. Pour ces deux sondes l'ajout de zinc provoque une augmentation de l'émission, mais celle-ci reste très faible (40% pour Nd^{3+} et 60% pour Yb^{3+}). Les rendements quantiques (tabl. II.13.) ont été déterminés par S. Eliseeva (CBM). Ils sont relativement faibles mais du même ordre de grandeur que la sonde SP3-NBD-DapDOTA(Nd) précédemment développée au laboratoire^[108].

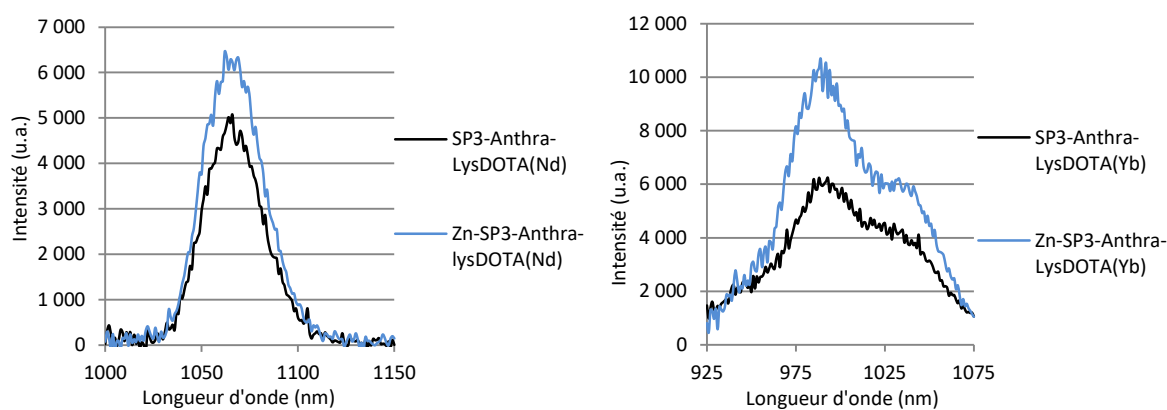


Figure II.53. : (A gauche) Spectre d'émission du néodyme pour le peptide SP3-Anthra-LysDOTA(Nd). 13 μM SP3-Anthra-LysDOTA(Nd), 10 mM HEPES pH 7.5, 350 μM TCEP, $\lambda_{\text{ex}} = 370$ nm, fente d'émission 33/fente d'excitation 14, temps d'intégration 0,5 ms. (A droite) Spectre d'émission du néodyme pour le peptide SP3-Anthra-LysDOTA(Yb). 15 μM SP3-Anthra-LysDOTA(Yb), 10 mM HEPES pH 7.5, 350 μM TCEP, $\lambda_{\text{ex}} = 370$ nm, fente d'émission 33/fente d'excitation 14, temps d'intégration 0,5 ms.

Tableau II.13. : Rendements quantiques de luminescence pour les sondes SP3-Anthra-LysDOTA(Nd) et SP3-Anthra-LysDOTA(Yb).

Peptide	Φ_{Ln} %	Φ_{Ln-Zn} %
SP3-Anthra-LysDOTA(Nd)	0,0014	0,0019
SP3-Anthra-LysDOTA(Yb)	0,0023	0,0048

II.3.3.1. Sondes ratiométriques

Bien qu'ayant des contrastes faibles, ces sondes répondent bien à la présence de zinc. Nous avons étudié les peptides SP3R-Ln2-Anthra-Ln1 et exploré leur capacité à se comporter comme des sondes ratiométriques.

Fluorescence

L'émission de fluorescence au cours du titrage par Zn^{2+} a été également mesurée pour les deux peptides bis-lanthanides. Les spectres ont le même profil après excitation à 370 nm que celui obtenu pour les sondes intensiométriques, caractéristique de l'émission de l'anthracène. Pour les deux peptides, la présence de zinc induit une augmentation du signal jusqu'à un équivalent : l'émission de fluorescence du peptide répond donc à la formation du complexe 1 : 1. A titre d'exemple le titrage de la sonde SP3R-Yb-Anthra-Nd est représenté sur la figure II.54.

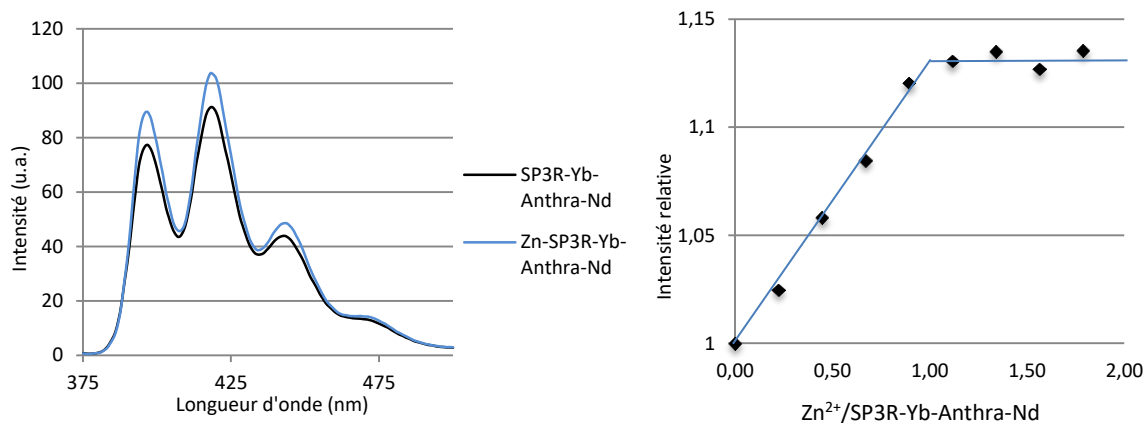


Figure II.54. : Titrage du peptide SP3R-Yb-Anthra-Nd par $ZnCl_2$ suivi par spectroscopie d'émission de fluorescence. 26 μM SP3R-Yb-Anthra-Nd, 10 mM HEPES pH 7.5, 350 μM TCEP, λ_{ex} = 370 nm, fente d'émission 5/fente d'excitation 5, PM 400 V.

Luminescence

Les deux sondes ratiométriques ont été titrées en présence de zinc en milieu anaérobie (fig. II.55.). En absence de zinc, le spectre d'émission du peptide SP3R-Nd-Anthra-Yb est dominé par l'émission de Yb^{3+} avec un faible épaulement vers 1060 nm correspondant à l'émission du Nd^{3+} (fig. II.55A.). L'ajout de zinc provoque une augmentation d'émission du

peptide sans changer le ratio des émissions de l' Yb^{3+} et du Nd^{3+} . Le peptide SP3R-Nd-Anthra-Yb se comporte comme une sonde intensiométrique.

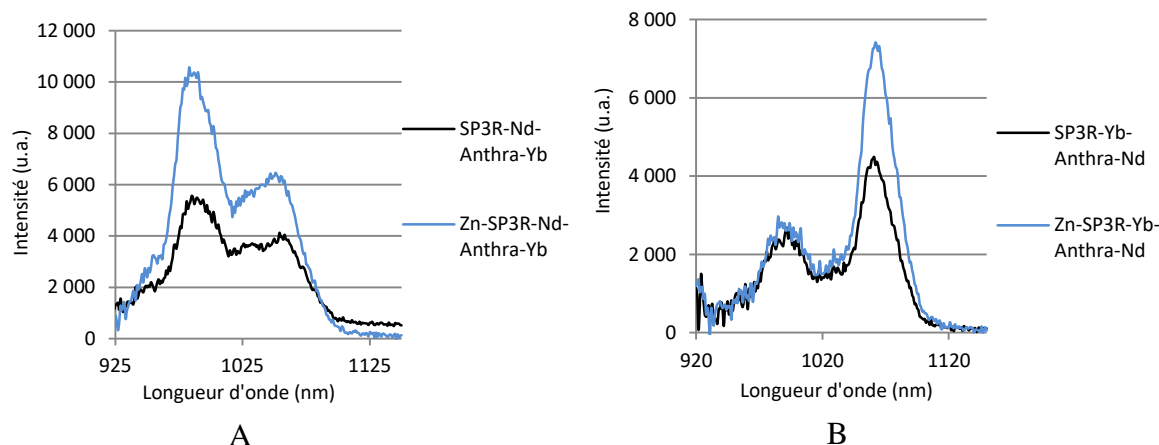


Figure II.55. : (A gauche) Spectre d'émission de luminescence pour le peptide SP3R-Nd-Anthra-Yb (A droite) Spectre d'émission de luminescence pour le peptide SP3R-Yb-Anthra-Nd. 30 μM SP3-Ln₂-Anthra-Ln₁, 30 mM HEPES pH 7.5, 350 μM TCEP, $\lambda_{\text{ex}} = 370$ nm, fente d'émission 33/fente d'excitation 14, temps d'intégration 0,5 ms.

En absence de zinc le sonde SP3R-Yb-Anthra-Nd présente à la fois le signal caractéristique du Nd^{3+} et l' Yb^{3+} (fig. II.55B.), mais cette fois le signal du Nd^{3+} est plus intense et se détache nettement de celui de l' Yb^{3+} . En présence de zinc le signal de l' Yb^{3+} reste quasi-constant alors que celui du Nd^{3+} augmente significativement. Ce peptide se comporte comme une sonde ratiométrique. La figure II.56. présente l'évolution du signal ratiométrique (I_{1060}/I_{980}) en fonction des ajouts de zinc.

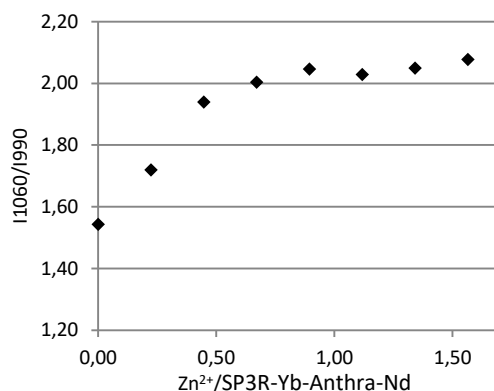


Figure II.56 : Rapport de l'émission du neodyme (1060 nm) par l'émission de l'ytterbium (980 nm) pour la sonde SP3R-Yb-Anthra-Nd.

Les rendements quantiques d'émissions des lanthanides sont donnés dans le tableau II.14. Ils sont du même ordre de grandeur pour les deux sondes et assez similaire à ceux des sondes mono-lanthanide.

Tableau II.14. : Rendements quantiques de luminescence des sondes ratiométriques SP3R-Yb-Anthra-Nd et SP3R-Nd-Anthra-Yb.

Peptide	Φ_{Ln} %	Φ_{Ln-Zn} %
SP3R-Yb-Anthra-Nd	0,003	0,0037
SP3R-Nd-Anthra-Yb	0,004	0,0079

Parmi les deux peptides bis-lanthanides, un seul se comporte comme une sonde ratiométrique.

II.3.4. Conclusion

Quatre sondes émettant dans le proche infrarouge ont été synthétisées. Ces sondes incorporent l'antenne anthracène afin de sensibiliser les lanthanides ytterbium et/ou néodyme. Leur structure ainsi que leur synthèse est similaire aux sondes émettant dans l'UV, les seules différences étant la nature du chromophore ainsi que celle des lanthanides. Comme dans le cas des sondes Cs124, les rendements quantiques de luminescence augmentent en fonction des ajouts de Zn^{2+} (tabl. II.15.), ces sondes répondent bien au zinc. Sur les deux sondes bis-lanthanide émettant dans le proche infrarouge, seule la sonde SP3R-Yb-Anthra-Nd permet la détection ratiométrique, même si les rendements quantiques de cette sonde sont faibles. Cette sonde constitue le premier exemple de sonde ratiométrique basée sur des lanthanides et émettant autour de 1000 nm.

Tableau II.15. : Tableau récapitulatif des propriétés des sondes intensiométriques et ratiométriques en série Lys.

Peptide	Φ_{Ln} %	Φ_{Ln-Zn} %
SP3-Anthra-LysDOTA(Nd)	0,0014	0,0019
SP3-Anthra-LysDOTA(Yb)	0,0023	0,0048
SP3R-Yb-Anthra-Nd	0,003	0,0037
SP3R-Nd-Anthra-Yb	0,004	0,0079

II.4. Conclusion

Les sondes à zinc sont inspirées du peptide doigt de zinc classique $\beta\beta\alpha$. Quatre sondes mono-lanthanide SP3-Cs124-DapDOTA(Ln) et SP3-Cs124-LysDOTA(Ln) (Ln = Tb ou Eu) ont été synthétisées afin d'étudier le comportement du couple Cs124/Tb³⁺ ou Eu³⁺ dans le système SP3. Ces sondes s'allument en présence de zinc, sont sélectives de ce métal et ont une affinité adaptée à sa détection cellulaire. Afin de profiter au mieux des propriétés de luminescence des lanthanides, des sondes ratiométriques en temps résolu ont été mises au point en ajoutant un deuxième complexe de lanthanide aux sondes SP3-Cs124-DapDOTA(Ln) grâce à une voie de synthèse convergente particulièrement efficace qui permet d'obtenir un peptide avec deux chélates DOTA métallés sélectivement. Ces sondes intensiométriques et ratiométriques fonctionnent parfaitement *in vitro*. Notre but étant de

détecter le zinc dans des cellules, il faut leur adjoindre un système de pénétration cellulaire. Ce point est décrit dans le chapitre suivant.

Chapitre III : Développement des sondes pour l'imagerie cellulaire

III.1. Peptide de pénétration cellulaire

III.1.1. Généralités

Le but de nos sondes étant de nous permettre de détecter, visualiser et de quantifier les métaux dans les cellules nous devons nous assurer de l'acheminement des sondes à l'intérieur de celles-ci. Pour cela ces molécules doivent passer la bicouche lipidique de la membrane plasmique. Or, elle est imperméable à un grand nombre de molécules incluant notamment certains agents d'imagerie, peptides, acides nucléiques, nanoparticules. Cependant quelques composés plus complexes, dont les peptides pénétrants (CPPs), peuvent la traverser directement. Les CPPs sont définis comme des petits fragments peptidiques (≤ 40 acides aminés). Ils sont en général très cationiques et souvent riche en arginines ou lysines (tabl. III.1.). Ils ont la propriété de promouvoir l'entrée dans la cellule d'une grande variété de molécules liées de façon covalente ou non covalente. De ce fait ils sont de bons candidats pour l'internalisation des sondes que nous développons.

Tableau III.1.: Origine et séquence de quelques CPPs.

Nom	Séquence	Origine	Ref
Pénétratine	RQIKIWFQNRRMKWKK	Antennapedia	[109]
Tat	GRKKRRQRRPPQ	VIH	[110]
RWR	RRRRWWWRRRR	Synthétique	[111]
Polyarginine	(R) _n 6<n<12	Synthétique	[112]
MAP (Model amphiphilic peptide)	KLALKLALKALKALKLA	Synthétique	[113]
Transportan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	Galanine-Mastoparan	[114]
pVEC	LLIILRRRIRKQAHASK	Cadherin	[115]

Le mécanisme de pénétration des CPPs est complexe, il peut faire intervenir plusieurs voies et varie en fonction du CPP mais également, de la lignée cellulaire utilisée, des conditions expérimentales (température, concentration...), du cargo, de son mode de liaison.

Cependant il est acquis qu'il existe deux grandes voies d'internalisation. D'une part la translocation directe au travers de la bicouche lipidique, qui permet un accès direct et rapide des CPPs au cytoplasme des cellules. D'autre part l'endocytose qui présente l'inconvénient d'une accumulation lente et limitée des CPPs.

III.1.2. Mécanisme de passage de la membrane cellulaire

III.1.2.1. Translocation

La translocation peut suivre plusieurs schémas, les modèles de Barrel-Stave et Carpet étant les plus connus.

Le modèle Barrel-Stave

Le terme Barrel-Stave décrit la formation d'un canal transmembranaire par des peptides (hélices- α) amphipathiques. Ils s'orientent de manière à ce que la partie hydrophobe des peptides soit au contact avec le cœur de la membrane, et la partie hydrophile située à l'intérieur du pore. Le pore transmembranaire est constitué uniquement par des peptides, qui sont regroupés entre eux et orientés comme les planches d'un tonneau (barrel) (fig.III.1.). Après la translocation du pore, les peptides sont transportés à l'intérieur du feuillet membranaire du fait du gradient de concentration des peptides liés à la surface^[116].

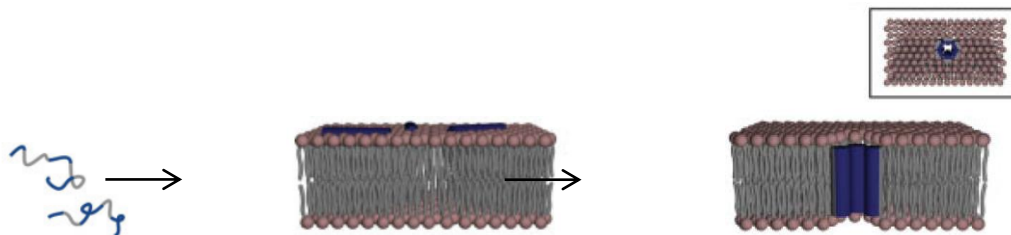


Figure III.1. : Illustration du mécanisme de perméabilisation selon le modèle Barrel-Stave^[117].

Le modèle de Carpet

Dans ce modèle les peptides s'accumulent sur l'interface de la membrane sous forme d'un tapis (carpet). Ils se présentent parallèlement en restant en contact avec la membrane grâce aux forces électrostatiques entre les charges positives des peptides et les charges négatives des têtes polaires des lipides et reste en contact avec ces derniers tout au long du processus d'internalisation. En effet une fois les interactions électrostatiques établies, les monomères s'alignent à la surface de la membrane leur partie hydrophile en contact avec la tête des phospholipides. Il s'ensuit une réorientation des monomères à l'interface de la membrane de telle sorte que les acides aminés basiques soient en interaction avec les têtes polaires des lipides ou avec des molécules d'eau et les résidus hydrophobes orientés vers le cœur de la membrane. La formation de micelle liée à ce processus induit la désintégration de la membrane par rupture de la couche lipidique (fig. III.2.). Le mode de tapis (carpet-like)

nécessite deux conditions principales : une concentration élevée des peptides et une force électrostatique assez fortes entre les peptides et la membrane^[116,118].

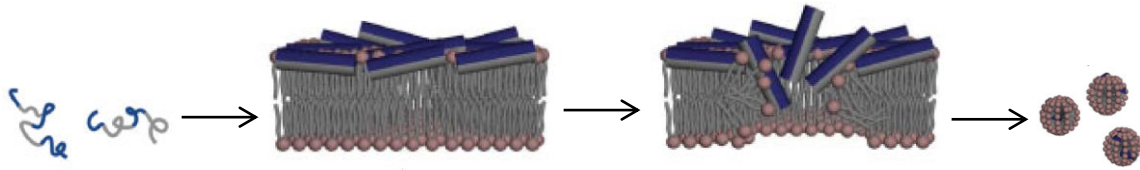


Figure III.2. : Illustration du mécanisme de perméabilisation selon le modèle Carpet^[117].

Le mécanisme de « Toroid Pore » ou « Wormhole »

Ce modèle est caractérisé par l'intercalation des lipides avec les peptides dans le canal transmembranaire. En effet après la fixation des peptides à la membrane par les forces électrostatiques, les peptides prennent la conformation d'une hélice- α en restant toujours parallèle à la membrane. La partie hydrophobe des peptides s'enfouit dans la membrane, et la partie hydrophile se met auprès des têtes polaires en induisant une courbure positive de la membrane^[119]. L'introduction de cette tension et l'affinement de la membrane qui en découle altèrent la surface membranaire. Dès qu'un taux peptide/lipide critique est atteint, la membrane se plie afin de permettre aux peptides à se présenter perpendiculaires à l'interface pour former un pore, appelé pore toroïdal (fig. III.3.).

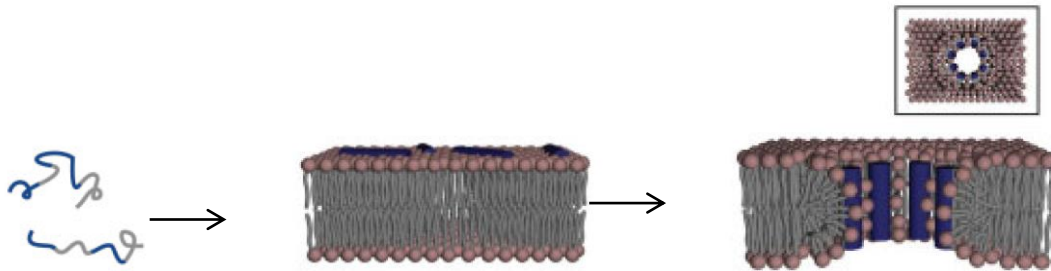


Figure III.3. : Illustration du mécanisme de perméabilisation selon le modèle « Toroid Pore » ou « Wormhole »^[117].

Bien que ces 3 modèles soient les principaux, on peut citer des mécanismes supplémentaires :

- (1) Le modèle du pore transitoire, dans lequel les CPPs induisent un courant transmembranaire lors de la formation du pore^[120].
- (2) Le modèle de fusion membranaire, dans lequel les CPPs en s'insérant dans l'interface externe de la bicouche causent une fusion locale et transitoire de la membrane. Les séquences cationiques du CPP se rapprochent du feuillet interne augmentant la force électrostatique qui permet son entrée dans la cellule^[121].
- (3) Le modèle d'électroporation, dans lequel les CPPs provoquent un champ électrique transmembranaire par leur distribution asymétrique entre les surfaces externe et interne de la bicouche. Ils induisent ainsi une altération des tensions latérales et des courbures de la membrane promouvant l'internalisation des CPPs^[122].

- (4) Le modèle de la micelle inversée, dans lequel les CPPs interagissent avec la membrane conduisant à la formation de micelles inversées^[123].

III.1.2.2. L'endocytose

L'endocytose est un mécanisme énergie-dépendant regroupant les processus de phagocytose pour l'internalisation de larges particules et la pinocytose pour l'internalisation de soluté. La phagocytose est un mécanisme permettant à des cellules spécialisées (macrophages, neutrophiles, cellules dendritique) d'ingérer puis de détruire des larges particules (> 0.5 μm)^[124,125]^[125]
^[124]

^[123]

^[122]

- . La pinocytose apparaît dans tous les types cellulaires et peut être classé en quatre voies :
- La macropinocytose caractérisée par des forts mouvements de la membrane menant à la formation de vésicules de grandes tailles, les macropinosomes^[126,127].
 - L'endocytose dépendante de la clathrine
 - L'endocytose dépendante de la calvéoline
 - L'endocytose indépendante de la clathrine et calvéoline

Ces processus ont tous en commun l'internalisation de molécules par encapsulation dans des vésicules lipidiques^[128]. L'efficacité de ce procédé est limitée par la capacité des CPPs à s'échapper des endosomes.

Ces mécanismes d'internalisation (translocation ou endocytose) peuvent coexister et leurs proportions varient en fonction en fonction du CPP mais également, de la lignée cellulaire utilisée, des conditions expérimentales (température, concentration...), du cargo, de son mode de liaison^[129].

Sur les ≈ 1000 CPPs connus^[130] nous en avons sélectionné trois afin de les introduire dans nos sondes. En effet nous nous sommes intéressés à deux CPPs dérivés de protéines, Tat et pénétratine, ainsi qu'à un CPP synthétique, RWR.

III.1.3. Séquences de pénétrations choisies pour l'élaboration des sondes

Tat

La séquence du CPP Tat (GRKKRRQRRRPPQ) est dérivée du facteur de transcription Tat du virus HIV-I. Seulement 13 acides aminés de la protéine, le fragment 48-60 sont nécessaires et suffisants à la pénétration cellulaire^[110]. Cette séquence est courte, basique, et non structurée^[131]. Il a été démontré que l'entrée de Tat est dépendante de la température et de la présence d'ATP^[132]. De plus la microscopie de fluorescence a révélé une co-localisation

vésiculaire entre le peptide Tat et différents marqueurs de l'endocytose^[133,134]. De ce fait l'internalisation de Tat est probablement due à l'endocytose.

Pénétratine

Comme Tat, le fragment pénétratine (Pen, RQIKIWFQNRRMKWKK) est dérivé d'une protéine existante, il s'agit de l'homéodomaine d'Antennapedia une homéoprotéine de la drosophile. Elle est constituée de 60 acides aminés structurés en 3 hélices α . Les 16 résidus de la troisième hélice sont le motif minimal nécessaire à la pénétration cellulaire^[109]. L'entrée du fragment pénétratine est, comme dans beaucoup de cas, dépendant des conditions expérimentales notamment de la concentration en CPP, il peut ainsi rentrer par translocation ou endocytose^[135]. Cependant l'internalisation est dépendante de la présence de domaine membranaire particulier sur les cellules (GAGs, cholestérol déplétion, céramide formation)^[136].

RWR

Les CPPs précités ont en commun un fort taux de résidus arginines. Ces acides aminés positivement chargés semblent essentiels à l'internalisation des CPPs^[111]. En effet les groupes guanidiniums forment des liaisons hydrogènes bidentates avec les charges négatives des phosphates, permettant ainsi la formation d'une paire d'ions polaires capables de diffuser dans la membrane. Dans le but d'analyser et de simplifier les CPPs des séquences oligoarginines ont été développées^[112]. Octaarginines (R_8) est la plus communément utilisée permettant ainsi d'avoir une bonne pénétration cellulaire en limitant les coûts de synthèse. Cependant la purification de ces composés polychargés n'est pas triviale. L'introduction dans ces séquences de résidus tryptophanes permet de faciliter les purifications. De plus du fait de son aromaticité il joue un rôle dans l'interaction avec la membrane plasmique et donc l'internalisation^[137]. Ainsi Rydberg et al. se sont intéressés à l'élaboration et à l'analyse d'octaarginines incorporant des résidus tryptophane^[138]. La séquence RWR (RRRRWWRRRR) dans lequel quatre tryptophanes sont insérés au milieu du fragment R_8 montre une bonne internalisation cytoplasmique ainsi qu'une faible cytotoxicité. C'est ce CPP avec Tat et pénétratine que nous avons choisi pour l'élaboration des sondes.

III.2. Stratégie pour l'élaboration des sondes pénétrantes

Pour l'élaboration de sondes pénétrantes, nous avons retenu une stratégie de synthèse convergente similaire à celle exposée dans le chapitre précédent, en assemblant trois fragments par des ligations chimiosélectives. Nous avons choisi le découpage suivant :

- un fragment « CPP »
- un fragment « antenne »

- un fragment « lanthanide »

Cette stratégie permet de varier facilement ces différents fragments et d'obtenir facilement un panel de sonde. Comme pour le développement des sondes précédentes, la ligation native a été retenue pour assembler les fragments « antenne » et « lanthanide ». Afin d'associer le fragment « antenne » et le fragment « CPP » nous avons choisi en première approche la ligation oxime. Afin de réaliser cette stratégie de synthèse, le fragment lanthanide contient une cystéine en N-terminale pour permettre la ligation native, le fragment antenne à la fois une fonction SEA pour la ligation native ainsi qu'une fonction oxyamine pour la ligation oxime et le fragment pénétration contient une fonction aldéhyde en N-terminale permettant la ligation oxime (fig. III.4.).

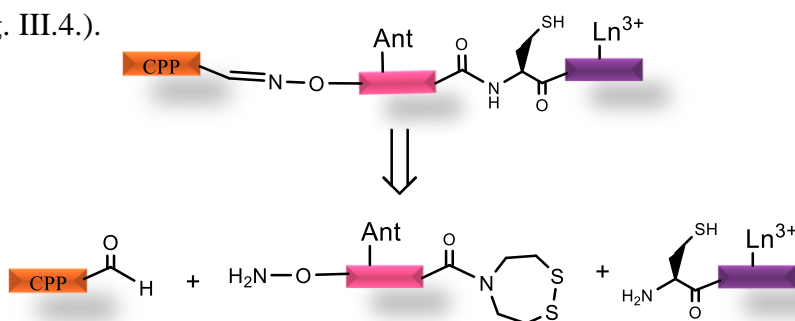


Figure III.4. : Schéma des différents fragments et de leurs fonctions associées pour la stratégie ligation native/ligation oxime.

Le fragment lanthanide est le même que celui présenté dans le chapitre précédent. L'introduction d'un aldéhyde en N-terminale sur le fragment pénétration a été réalisée par acétylation sur support du fragment (fig. III.5.). Cette étape ne pose aucun problème synthétique.

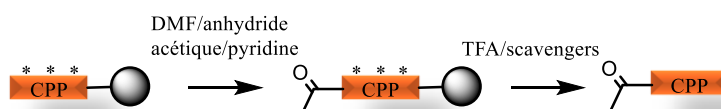


Figure III.5. : Voie de synthèse pour l'obtention de la fonction aldéhyde en N-terminale du fragment pénétration.

Le fragment antenne a été synthétisé sur résine SEA selon la procédure indiquée sur la figure III.6.

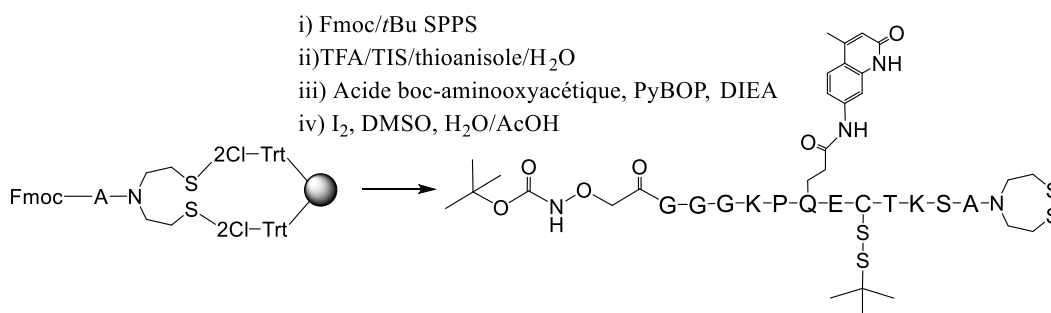


Figure III.6. : Voie de synthèse pour la préparation du fragment F1-Cs124-SEA.

Une microcoupure a été réalisée juste avant l'introduction de l'oxyamine. Le chromatogramme associé à ce fragment présente un pic majoritaire à $t_r=9,8$ min ainsi que deux pics secondaires à $t_r=8,4$ min et $t_r=10,4$ min correspondant aux différentes formes du fragment SEA non oxydées ainsi que des pics supplémentaires correspondant aux peptides tronqués dans lesquels un couplage peptidique n'a pas eu lieu (fig. III.7.).

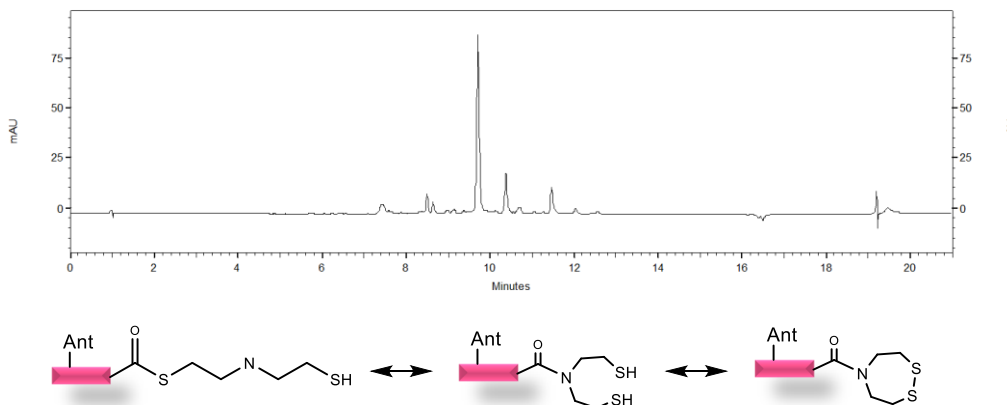


Figure III.7. : (En haut) Chromatogramme du fragment antenne avant l'introduction de l'oxyamine. (En bas) Différentes formes du fragment SEA-on.

L'oxyamine a été introduite en N-terminale sous forme protégée à l'aide de l'acide Boc-aminoxyacétique commercial (fig. III.8.) par un couplage standard en présence de PyBOP et de DIEA.

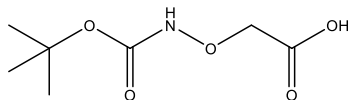


Figure III.8. : Structure de l'acide boc-aminoxyacétique.

Le peptide a été ensuite décroché dans des conditions standards. Afin d'éviter toute réaction parasite de l'oxyamine avec le carbonyle de l'acétone utilisé en routine dans notre laboratoire pour le nettoyage de la verrerie, le décrochage a été réalisé dans l'équipe Ingénierie et Interactions Biomoléculaires (I₂BM) du Département de Chimie Moléculaire (DCM) qui proscrie son utilisation. Après cette étape le chromatogramme n'a plus le même profil (fig. III.9.), en effet l'introduction de l'oxyamine induit l'apparition de pics supplémentaires. La pureté est donc compromise. La pureté du fragment sans oxyamine et de l'oxyamine commerciale est convenable, cependant le couplage des deux conduit à l'apparition de produits secondaires. Ainsi les fonctions SEA et oxyamine ne semblent pas être compatibles, il se pourrait qu'elles réagissent entre elles par des réactions parasites.

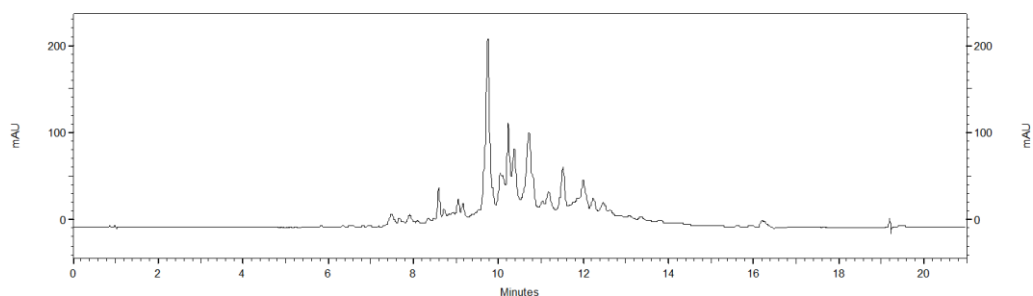


Figure III.9. : Chromatogramme du fragment antenne après l'introduction de l'oxyamine.

La synthèse du fragment antenne étant non concluante par cette voie nous avons donc dû changer de stratégie d'assemblage des différents fragments. Nous avons opté pour un assemblage des fragments « CPP » et « antenne » par cycloaddition de Huisgen catalysée au cuivre(I). Elle se réalise entre un alcyne et un azoture. Il faut donc introduire ces fonctions sur les différents fragments. L'introduction du fragment « CPP » sur le fragment « antenne » nécessite la synthèse d'un fragment « antenne » bifonctionnalisé, avec un groupement SEA en C-terminale. En N-terminale, la fonction doit être soit un alcyne soit un azoture. Nous avons choisi d'introduire l'azoture sur le fragment « antenne » (fig. III.10) afin d'éviter les potentiels problèmes d'addition d'iode sur la triple liaison lors du passage du fragment SEA-on en SEA-off qui se réalise en présence de diiode.

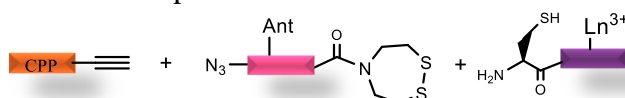


Figure III.10. : Schéma des différents fragments et de leurs fonctions associées pour la stratégie ligation native/cycloaddition de Huisgen.

Pour l'assemblage, la cycloaddition doit être effectuée en premier afin d'éviter la réduction de l'azoture selon la réaction de Staudinger par le TCEP nécessaire à la ligation native. Le produit ainsi obtenu est ensuite couplé par ligation native au fragment cystéinyle « lanthanide » (fig. III.11).

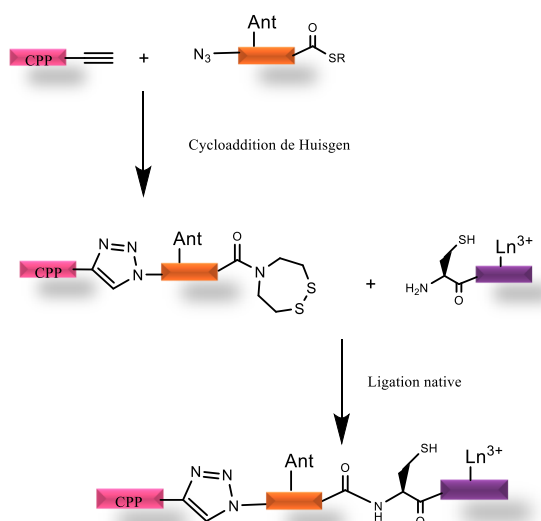


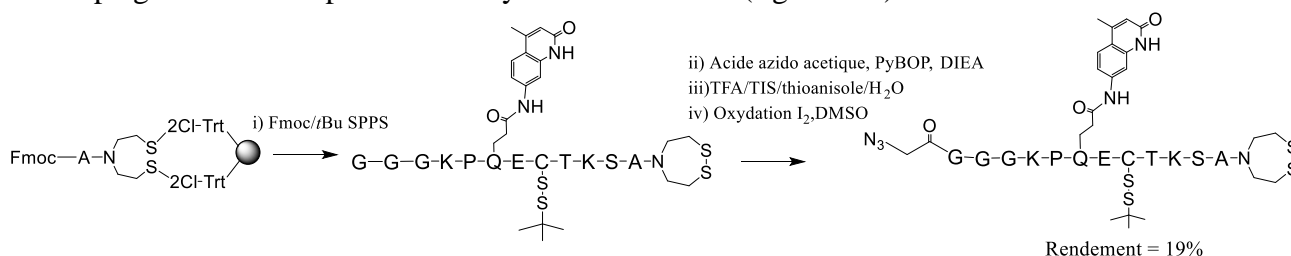
Figure III.11. : Schéma de la stratégie de synthèse pour les sondes incorporant le CPP.

III.3. Sondes pénétrante de 1^{ère} génération : CPP-SP3-Cs124-DOTA(Ln)

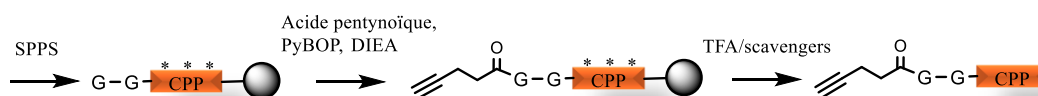
Pour les premières sondes pénétrantes que nous avons synthétisées et étudiées, nous avons choisi l'antenne Cs124, le terbium ou l'euporium comme lanthanide et les trois CPPs Tat, Pen ou RWR.

III.3.1. Synthèse

Le fragment « antenne » F1-N₃-Cs124-SEA a été synthétisé de façon similaire au fragment F1-Cs124-SEA, la seule différence a été l'introduction en N-terminale de deux glycines jouant le rôle d'espaceur puis de l'acide azidoacétique commercial grâce à un couplage standard en présence de PyBOP et de DIEA (fig. III.12.).



Pour le fragment « CPP » F3-CPP, deux glycines ont été ajoutées en N-terminale aux séquences consensus afin de jouer le rôle d'espaceur. Les fragments F3-Tat, F3-Pen et F3-RWR ont été synthétisés automatiquement sur résine rink amide en simple couplage pour F3-Tat et F3-Pen et en double couplage pour F3-RWR. L'introduction de l'alcyne a été assurée *via* l'acide pentynoïque couplé manuellement sur support dans les conditions standards en N-terminale (fig. III.13.). Tous les fragments F3-CPP ont été caractérisés par spectrométrie de masse et leur pureté a été contrôlée par HPLC analytique.



Les fragments F1-N₃-Cs124-SEA et F3-CPP ont été assemblés par cycloaddition de Huisgen en présence de cuivre(II) et de ligand le THPTA dans un mélange DMF/Py/ACN. Dans le but de réduire le Cu(II) en Cu(I) un excès d'ascorbate de sodium a été utilisé (fig. III.14.). La réaction est réalisée en boîte à gant afin de prévenir l'oxydation. Le produit de la réaction a été directement purifié par HPLC préparative. Les fragments Tat-Cs124-SEA, Pen-Cs124-SEA, RWR-Cs124-SEA ont été caractérisés en spectrométrie de masse et leur pureté a été contrôlée par HPLC analytique. Les rendements de synthèse varient en fonction des CPPs

et sont de 54% pour Tat-Cs124-SEA, 40% pour RWR-Cs124-SEA et de 30% pour Pen-Cs124-SEA.

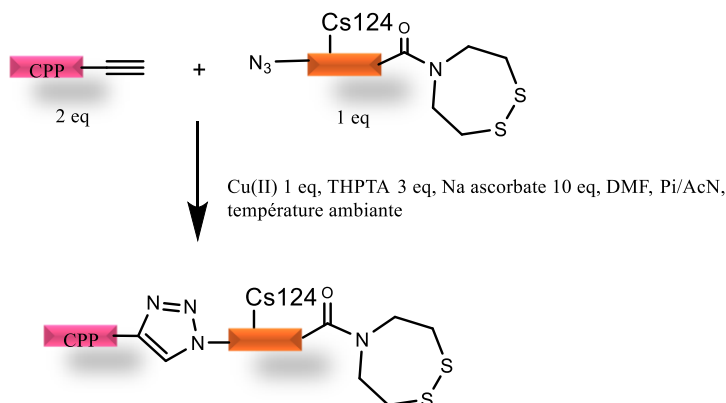


Figure III.14. : Schéma de synthèse des molécules CPP-Cs124-SEA par cycloaddition de Huisgen.

Ces différents fragments issus de la cycloaddition de Huisgen ont ensuite été couplés par ligation SEA avec les fragments Cys-F2-LysDOTA(Tb) et Cys-F2-LysDOTA(Eu) dans les mêmes conditions de ligation SEA que décrites précédemment. Par cette méthode convergente nous avons obtenus six sondes différentes (tabl. III.2.).

Tableau III.2. : Tableau représentant les six sondes pour la pénétration cellulaire.

Peptide	CPP	Antenne	Ln ³⁺
Tat-SP3-Cs124-LysDOTA(Tb)	Tat	Cs124	Tb ³⁺
Tat-SP3-Cs124-LysDOTA(Eu)	Tat	Cs124	Eu ³⁺
Pen-SP3-Cs124-LysDOTA(Tb)	Pen	Cs124	Tb ³⁺
Pen-SP3-Cs124-LysDOTA(Eu)	Pen	Cs124	Eu ³⁺
RWR-SP3-Cs124-LysDOTA(Tb)	RWR	Cs124	Tb ³⁺
RWR-SP3-Cs124-LysDOTA(Eu)	RWR	Cs124	Eu ³⁺

Les fragments « CPP » représentent au minimum 41% des résidus finaux de la sonde. Cette fraction est non négligeable et peut, en intervenant sur le repliement ou sur l'accessibilité du zinc au site de liaison, potentiellement modifier les propriétés de la sonde. Ainsi les sondes ont été analysées selon la méthode décrite dans le chapitre II.

III.3.2. Caractérisations spectroscopiques et physicochimiques

Dichroïsme circulaire

La sonde Tat-SP3-Cs124-LysDOTA(Tb) a été analysée par dichroïsme circulaire. Le signal à 202 nm augmente et celui à 220 nm devient plus négatif jusqu'à atteindre un plateau à un équivalent de zinc : le peptide se structure comme dans le cas des sondes SP3-Cs124-

DapDOTA(Ln) et SP3-Cs124-LysDOTA(Ln) et suit une complexation 1 : 1 (fig. III.15). Cependant le signal à 202 nm est plus négatif et la valeur de celui à 220 nm est plus importante que ceux observés dans le cas de la sonde sans CPP dans les mêmes conditions indiquant une structuration moindre (tabl. III.3). Ces valeurs peuvent être dues au CPP Tat qui du fait de son absence de structure augmente la proportion non structurée de la sonde.

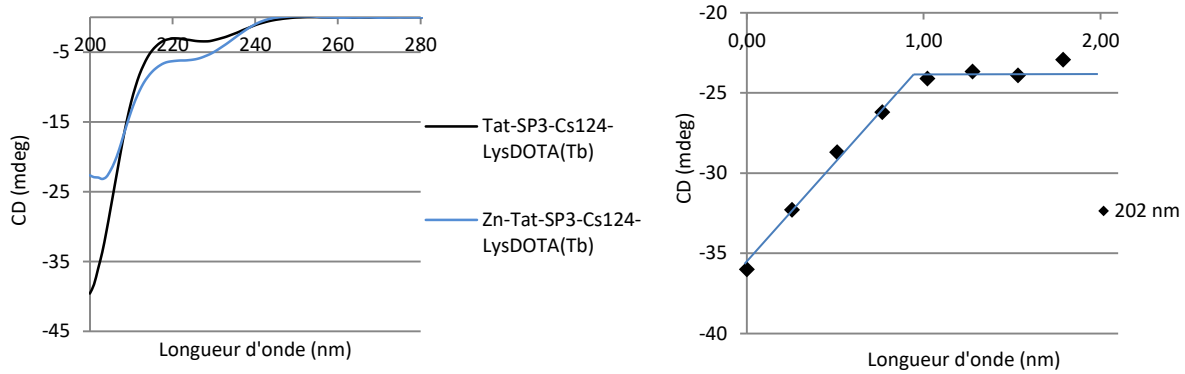


Figure III.15. : Titration du peptide Tat-SP3-Cs124-LysDOTA(Tb) par $ZnCl_2$ suivi par dichroïsme circulaire. Tat-10 μM SP3-Cs124-LysDOTA(Tb), 10 mM Pi pH 7.5, 350 μM TCEP.

Tableau III.3. : Tableau récapitulatif des valeurs en millidegrés de CD à 202 nm et 220 nm pour les sondes SP3-Cs124-Lys-Eu et Tat-Cs124-Eu (10 μM) avec et sans zinc.

Peptide	202 nm (mdeg)	220 nm (mdeg)
SP3-Cs124-LysDOTA(Eu)	-24,65	-3,45
Zn-SP3-Cs124-LysDOTA(Eu)	-10,60	-6,80
Tat-SP3-Cs124-LysDOTA(Eu)	-31,62	-2,65
Zn-Tat-SP3-Cs124-LysDOTA(Eu)	-20,11	-5,6

Absorption

Le spectres d'absorption et d'excitation ont été mesurés pour les six sondes. Ces spectres ont le même profil que ceux obtenus pour les sondes Cs124 sans CPP à savoir deux bandes larges à 330 et 340 nm correspondant à l'absorption du Cs124. De plus les spectres d'excitations sont également similaires. La sensibilisation des lanthanides est due à l'effet d'antenne.

Fluorescence

Les spectres d'émission de fluorescence ont été réalisés pour les six sondes après excitation à 330 nm, les principales propriétés sont répertoriées dans le tableau III.4. Le profil spectral observé est le même que celui des sondes sans séquence de pénétration. Cependant l'ajout de zinc n'induit pas de façon systématique une diminution du signal, il peut également conduire à une légère augmentation. De plus les rendements quantiques de fluorescence sont

modifiés par la présence et la nature du CPP. Ainsi l'ajout d'un CPP modifie la structure de la sonde et induit des propriétés d'émission différentes.

Tableau III.4. : Tableau récapitulatif des rendements quantiques de fluorescence pour les sondes en série lysine avec et sans zinc.

Peptide	$\Phi_{\text{fluo}} \%$	$\Phi_{\text{fluo-Zn}} \%$
SP3-Cs124-LysDOTA(Tb)	4,7	4,6
Tat-SP3-Cs124-LysDOTA(Tb)	6,0	5,7
Pen-SP3-Cs124-LysDOTA(Tb)	3,2	3,7
RWR-SP3-Cs124-LysDOTA(Tb)	2,2	2,7
SP3-Cs124-LysDOTA(Eu)	4,4	3,7
Tat-SP3-Cs124-LysDOTA(Eu)	4,6	3,1
Pen-SP3-Cs124-LysDOTA(Eu)	2,9	2,6
RWR-SP3-Cs124-LysDOTA(Eu)	2,2	2,4

Luminescence

Les sondes avec CPP ont été titrées par Zn^{2+} . A chaque fois, nous avons observé l'augmentation de l'émission du lanthanide (pour une excitation à 330 nm) jusqu'à un équivalent de Zn^{2+} , ce qui indique la formation de complexe 1 : 1. La présence de CPP n'empêche donc pas les sondes de fonctionner. Les rendements quantiques de luminescence (tabl. III.5.) de ces sondes avec ou sans zinc sont du même ordre de grandeur mais légèrement plus faibles que ceux des sondes sans CPP. Cependant, les contrastes associés à ces sondes sont supérieurs à ceux observés pour les sondes sans CPP. Ils dépendent de la nature du CPP et du lanthanide. Ces valeurs montrent donc que la présence du CPP ne modifie pas le comportement général de la sonde mais a une influence sur les propriétés d'émission.

Tableau III.5. : Contrastes et rendements quantiques de luminescence avec ou sans zinc pour les sondes SP3 et CCP-SP3.

Peptide	Contraste	$\Phi_{\text{Ln}} \%$	$\Phi_{\text{Ln-Zn}} \%$
SP3-Cs124-LysDOTA(Tb)	16	0,15	2,7
Tat-SP3-Cs124-LysDOTA(Tb)	21	0,12	2,66
Pen-SP3-Cs124-LysDOTA(Tb)	27	0,07	1,96
RWR-SP3-Cs124-LysDOTA(Tb)	21	0,08	1,33
SP3-Cs124-LysDOTA(Eu)	12	0,04	0,37
Tat-SP3-Cs124-LysDOTA(Eu)	16	0,015	0,19
Pen-SP3-Cs124-LysDOTA(Eu)	17	0,01	0,13
RWR-SP3-Cs124-LysDOTA(Eu)	17	0,01	0,15

Affinité

L'affinité des sondes Tat-SP3-Cs124-LysDOTA(Eu) et Pen-SP3-Cs124-LysDOTA(Eu) ont été mesurées de la même façon que décrite dans le chapitre II de ce manuscrit, les valeurs obtenues sont indiquées dans le tableau III.6. Les affinités des sondes

incorporant les CPPs sont légèrement différentes de celles des sondes sans CPP. Cependant leurs valeurs se trouvent dans la gamme de concentration du zinc circulant (10^{-11} - 10^{-8} M), ces sondes sont donc adaptées à sa détection cellulaire.

Tableau III.6.: Tableau récapitulatif des log K pour les sondes Cs124 en série lysine.

Peptide	Log K \pm 0.2
Tat-SP3-Cs124-LysDOTA(Eu)	9,6
Pen-SP3-Cs124-LysDOTA(Eu)	10,6
SP3-Cs124-LysDOTA(Tb)	10,3
SP3-Cs124-LysDOTA(Eu)	10,1

Nous avons donc synthétisé par une méthode convergente six sondes différentes incorporant des séquences de pénétration où des lanthanides différents. Les propriétés d'émission des sondes varient légèrement selon les sondes, cependant elles ont des contrastes supérieurs à ceux des sondes natives. De plus leurs affinités sont adaptées à la détection cellulaire du zinc. Les premiers tests de microscopie cellulaire sont réalisés avec ces sondes.

III.3.3. Tests cellulaires

Les cellules utilisées sont des cellules HEK qui sont des cellules embryonnaires de reins humains^[139]. Il s'agit du deuxième type cellulaire, après les cellules HeLa, le plus utilisé dans les études biologiques. Elles ont comme spécificités d'être plus épaisses que les cellules HeLa, ce qui permet d'avoir plus de signal lors des expériences en microscopie en épifluorescence. La culture cellulaire a été effectuée à l'Institut pour l'Avancée des Biosciences (IAB) de Grenoble dans l'équipe du Dr Véronique Frachet. Les analyses spectroscopiques ont été réalisées à l'IAB avec Alexei Grichine ou à l'Université Grenoble Alpes (UGA) avec Cécile Cottet. J'ai eu l'opportunité de participer à toutes les étapes de l'étude cellulaire.

Les premiers tests ont été réalisés à l'IAB sur un microscope en épifluorescence. Pour des raisons d'appareillage l'échantillon n'est pas excité à 330 nm mais à 350 nm sur la queue de bande du Cs124. De plus l'objectif ainsi que les filtres n'étaient pas adaptés. Nous nous sommes donc tournés vers un microscope confocal plus adapté à l'Université Grenoble Alpes.

Lors de ces expériences les cellules ont été incubées 10 min avec les différents composés à 5 μ M dans du milieu DMEM sans rouge de phénol à 35 °C. Après rinçage par du PBS les cellules sont observées par microscopie confocale sans délai entre l'excitation et l'émission. L'échantillon est excité à 330 nm. L'émission de chaque point de l'échantillon étant trop faible il n'a pas été possible de récupérer une image. Cependant le signal d'une

zone entière a pu donner en mode spectral des informations sur les espèces émettant. La zone d'intérêt choisie est centrée sur une ou plusieurs cellules.

Le spectre obtenu pour les cellules seules (fig. III.16.A) montre le signal de l'autofluorescence des cellules. Après incubation et rinçage de la sonde Tat-SP3-Cs124-LysDOTA(Tb) le profil du spectre est conservé (fig. III.16.B). Une solution de zinc pyrithione à 50 μM est ensuite déposée sur les cellules pendant 20 min afin d'enrichir en zinc le milieu biologique puis les cellules sont rincées. Le spectre obtenu à la même structure globale que les précédents (fig. III.16.C), cependant plusieurs pics à 483, 547, 587 et 622 nm se différencient du massif. Ces différents pics pourraient correspondre à la signature d'émission du terbium représentée en vert sur la figure III.16.C. Les spectres obtenus après incubation des sondes Pen-SP3-Cs124-LysDOTA(Tb) (fig. III.16.D) et RWR-SP3-Cs124-LysDOTA(Tb) (fig. III.16.E) et de zinc sont moins éloquents, les pics pouvant correspondre au terbium sont moins marqués, de plus l'autofluorescence des cellules change de profil pouvant indiquer une dégradation cellulaire.

Ainsi seule la sonde Tat-SP3-Cs124-LysDOTA(Tb) semble être correctement internalisée dans les cellules avec nos conditions expérimentales. On ne peut pas exclure que les sondes Pen-SP3-Cs124-LysDOTA(Tb) et RWR-SP3-Cs124-LysDOTA(Tb) n'entraîne pas de dégradation cellulaire dans nos conditions expérimentales.

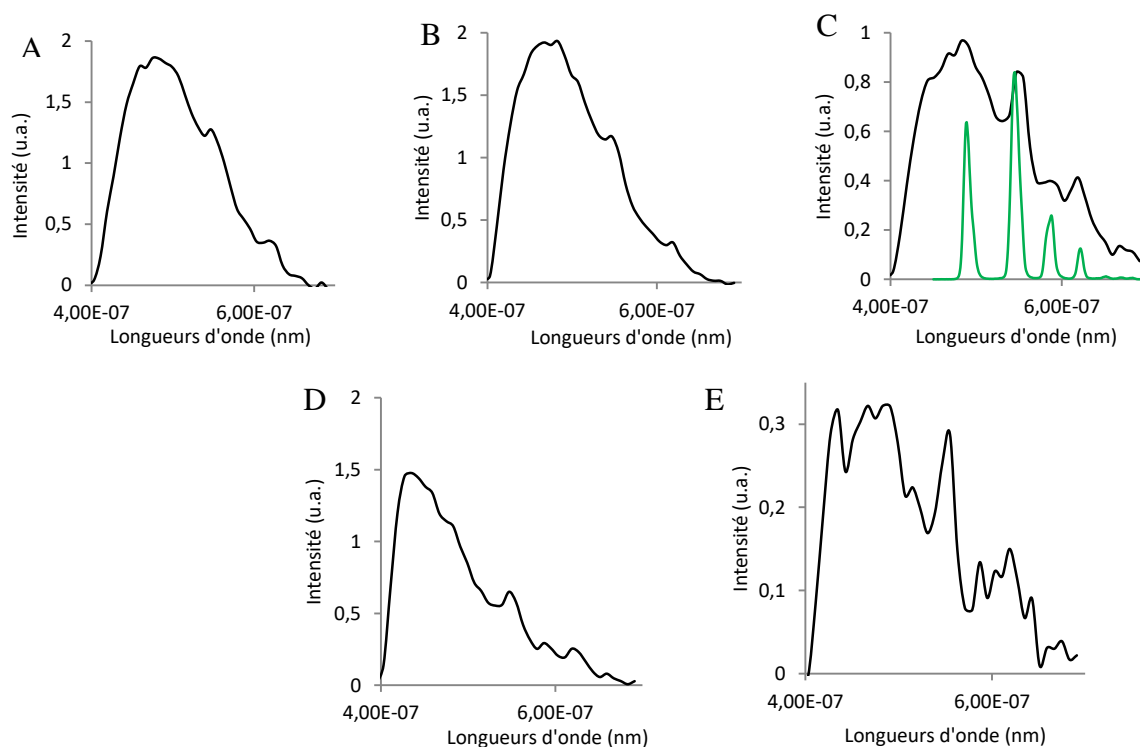


Figure III.16. : Image en mode spectrale.

Des tests ont été réalisés avec les sondes à l'euporium correspondantes cependant la signature spectrale de ce lanthanide n'est pas retrouvée.

III.3.4. Conclusion

Nous avons donc développé des sondes à zinc incorporant des séquences de pénétration cellulaire. Ces sondes s'allument en présence de métal avec des contrastes allant de 16 à 27 et des affinités adaptées à la détection du zinc cellulaire. Le design de la sonde de départ SP3-Trp-Dap-Tb est donc suffisamment robuste pour subir des modifications (modification d'antenne, changement de la nature du lanthanide, ajout de CPPs) tout en gardant un fonctionnement adapté à savoir des contrastes corrects, une affinité dans la bonne gamme ainsi qu'une bonne sélectivité.

Avec ces premières sondes et ces premiers tests cellulaires, il est difficile de conclure quant à la pénétration cellulaire des sondes du fait de l'autofluorescence qui se superpose à l'émission de l'antenne et du lanthanide et de la faible émission du lanthanide. Ceci peut s'expliquer par plusieurs hypothèses :

- par une dégradation de la sonde, qui en se clivant éloigne l'antenne et le lanthanide. De ce fait le lanthanide n'est plus sensibilisé par effet d'antenne et son émission est donc très faible.
- par des rendements quantiques trop faibles. Ceci est cohérent avec le fait que le signal de l'euporium n'est pas détectable alors que celui du terbium dont les rendements quantiques associés sont plus élevés sort légèrement du bruit de fond du spectre.
- par une faible internalisation des sondes.

III.4. Sondes pénétrante de 2^{nde} génération : CPP-SP3-Acri-DO3A-pic(Ln)

Les sondes de première génération ne permettent pas la détection du zinc dans des cellules. Il fallait donc les améliorer. Compte-tenu des points évoqués ci-dessus, il nous a semblé important de jouer sur deux facteurs :

- l'antenne pour déplacer l'excitation vers le visible et diminuer l'autofluorescence,
- le ligand du lanthanide pour éliminer la molécule d'eau liée à ce dernier afin de diminuer les désexcitations non radiatives et augmenter l'émission du lanthanide.

III.4.1. Modification de l'antenne

Nous avons cherché à déplacer l'excitation de l'antenne vers les plus basses énergies pour diminuer l'autofluorescence des cellules. Pour cela, nous avons choisi d'étudier deux chromophores absorbant vers 400 nm, l'acridone (notée Acri, fig. III.17.A) qui est connue

pour sensibiliser l'euporium^[140] et une coumarine^[141] (notée Coum, fig. III.17.B). Un autre moyen de s'affranchir de l'autofluorescence est d'utiliser des chromophores présentant des propriétés d'absorption bi-photonique. Ce genre de composé peut être excité classiquement par absorption d'un photon d'énergie $h\nu$ dans l'UV ou le visible ou peut être excité par absorption de deux photons d'énergie $h\nu/2$ dans le proche-infrarouge. Pour cela, nous avons testé deux antennes, une coumarine fluorée (CoumCF3, fig. III.17.C) décrite comme pouvant sensibiliser l'euporium par excitation biphotonique^[142] et un dérivé fluoré du Cs124 (noté Cs124CF3, fig. III.17.D), connu pour sensibiliser l'euporium^[99]. Dans le paragraphe suivant nous détaillerons succinctement leur comportement au sein des sondes SP3.

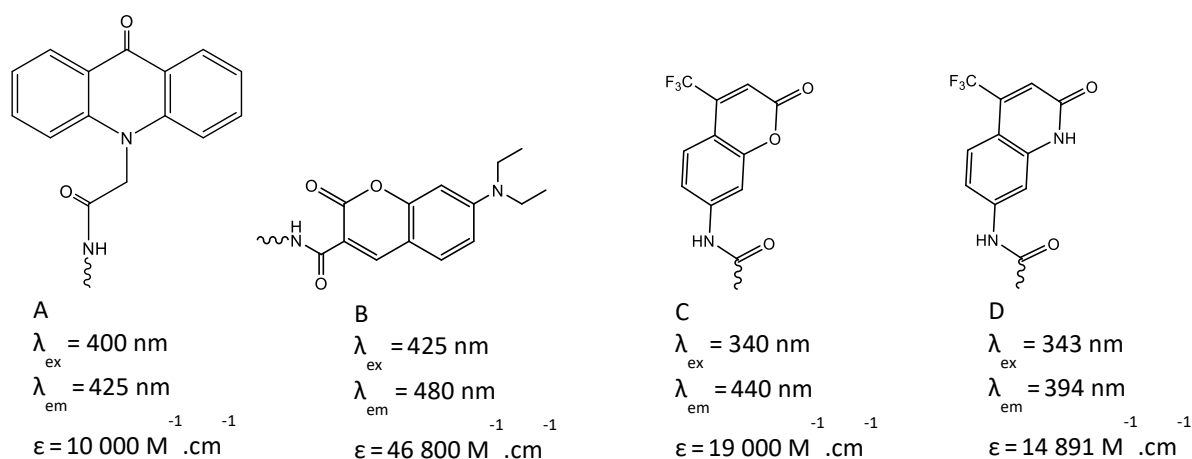


Figure III.17. : Structure des antennes testées dans la seconde partie du chapitre ainsi que leurs longueurs d'ondes d'excitation et d'émission et epsilon associés.

Les sondes SP3-Acri-LysDOTA(Eu) et SP3-Coum-LysDOTA(Eu) ont été synthétisées et étudiées par Guillaume Fremy pendant son stage M2. La première sonde a montré des propriétés de sensibilisation intéressantes avec un contraste de 6 et des rendements quantiques d'émission de l'euporium de 0,2 % en absence de Zn^{2+} et 1,1 % en présence de Zn^{2+} . L'antenne coumarine sensibilise très mal l'euporium : la sonde SP3-Coum-LysDOTA(Eu) présente un temps de vie de l'euporium très court (environ 0,2 ms contre 0,6 ms classiquement pour les complexes DOTA(Eu)) qui indique qu'un niveau excité de l'antenne désactive l'euporium par transfert retour. J'ai synthétisé les sondes SP3-CoumCF3-LysDOTA(Eu) et SP3-Cs124CF3-LysDOTA(Eu). Ces sondes répondent bien au zinc avec des contrastes de 13 et 15, respectivement mais elles sont très sensibles au photoblanchiment, même lors des études avec un spectromètre à lampe à Xenon pulsée, censé limiter le photoblanchiment.

Finalement, l'antenne acridone semble être la plus adaptée parmi les antennes testées.

III.4.2. Modification du polyaminocarboxylate chélatant le lanthanide

III.4.2.1. Chélate DO3A-pic

Dans les travaux qui ont été présentés dans la première partie de ce manuscrit le chélateur utilisé est le DOTA. Il s'agit d'un macrocycle multi-branché, de type polyaminocarboxylate. Cette molécule permet d'avoir une structure combinant à la fois une stabilité thermodynamique et cinétique importante. Cependant le DOTA lie les lanthanides par huit atomes : quatre atomes d'azotes, trois oxygènes des carboxylates et l'oxygène du groupement amide. Le nombre de coordination le plus fréquent pour les lanthanides étant de 9, les lanthanides complètent leur sphère de coordination par une molécule d'eau. Or, la liaison de cette molécule d'eau diminue l'émission du lanthanide mesurée via des désexcitations non radiatives. Afin de limiter ces désexcitations, il a fallu orienter les recherches vers un chélateur offrant neuf positions de coordinations au lanthanide, le DO3A-pic. Ce ligand présente une structure similaire au DOTA mais un bras acétate est remplacé par un bras picolinate (fig. III.18.). Il présente 9 atomes coordinants pour le lanthanide : les quatre azotes du cyclen, trois oxygènes des carboxylates, l'oxygène de l'amide et l'azote de la pyridine.

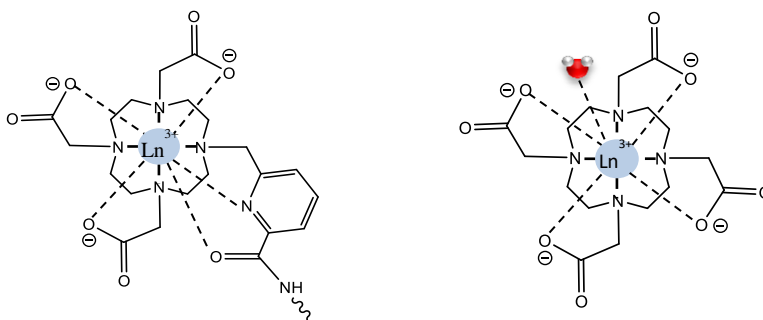


Figure III.18. : Structure du DO3A-pic (à gauche) et du DOTA (à droite) et leurs sphères de coordinations associées.

Le DO3A-pic est couplé au peptide sous forme protégée comme le DOTA. Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire ont montré que son introduction sous la forme DO3A-pic-tri(*t*Bu)ester dans laquelle les fonctions carboxylates sont protégés par des *tert*-butyles ne permet pas d'obtenir le produit final avec un bon rendement puisque seule une déprotection partielle des groupements tertiobutyles a été observée même lors d'un traitement prolongé avec de l'acide trifluoroacétique (jusqu'à 12h). Ainsi la protection des groupements carboxylates par des allyls est préférée pour cette molécule (fig. III.19.). La synthèse du DO3A-pic-tri(allyl)ester a été mise au point au laboratoire par Laurent Raibaut, Margot Boujut et Marine Sanson.

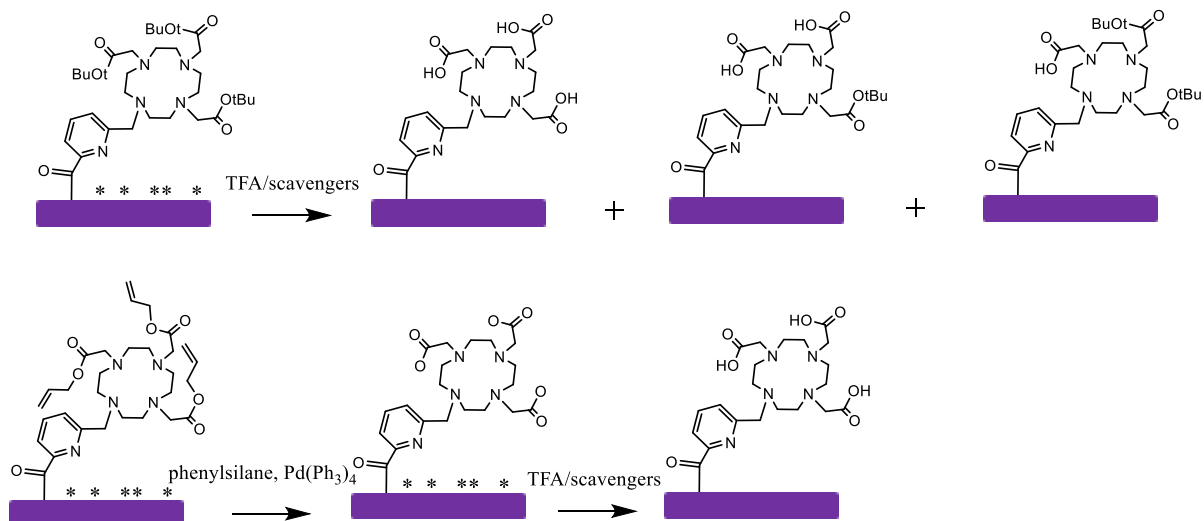


Figure III.19 : Schéma de déprotection du DO3A-pic. (En haut) Stratégie *tertio*-butyle, menant à des sous-produits. (En bas) Stratégie triallyl, menant à un seul produit. Les astérisques indiquent des groupements protecteurs de chaînes latérales.

III.4.1.2. Synthèse du DO3A-pic-tri(allyl)ester

La synthèse du DO3A-pic-tri(allyl)ester a été réalisée par SPPS sur résine chlorotrytile. La résine a été substituée par de l'acide 6-(chlorométhyl)picolinique en milieu basique pendant 45 min. Le cyclen en excès a été ensuite additionné 4h en milieu basique. Le produit obtenu a été mis en présence de chloroacétate d'allyl. Finalement la résine obtenue a été clivée en présence de TFE dans du DCM (1/1) (fig. III.20.). Le produit obtenu a été purifié, caractérisé par masse haute résolution, et sa pureté a été vérifiée par HPLC analytique.

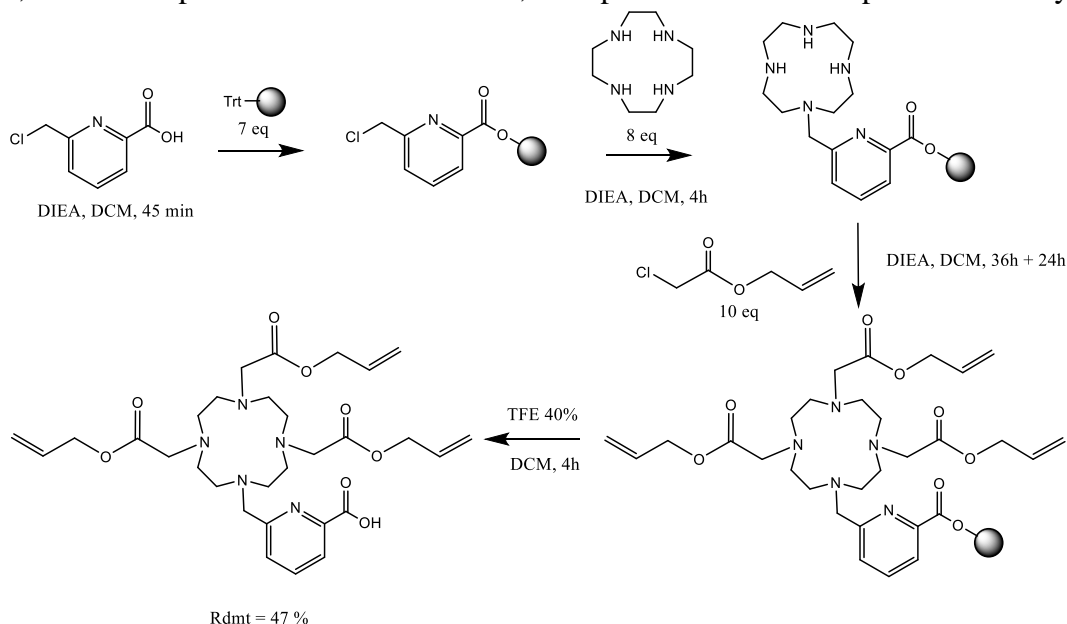


Figure III.20. : Schéma de synthèse du DO3A-pic-tri(allyl)ester

III.4.2.3. Evaluation de l'influence du DO3A-pic : sonde SP3-Cs124-DO3A-pic(Eu)

Nous avons commencé par synthétiser la sonde SP3-Cs124-DO3A-pic(Eu) pour évaluer l'influence du DO3A-pic en comparaison du DOTA. Le fragment Cys-F2-LysDO3A-pic(Eu) a été synthétisé de manière similaire au fragment Cys-F2-LysDOTA(Ln). La différence a été l'introduction du DO3A-pic-tri(allyl)ester à la place du DOTA-tri(*t*Bu)ester. L'introduction de cette molécule a engendré une étape supplémentaire de déprotection des groupements allyles. Cette déprotection a eu lieu en présence de palladium(0) et de phénylsilane dans le dichlorométhane (DCM) anhydre et dégazé. Le composé est ensuite métallé par un excès d'euprium en utilisant le protocole précédemment décrit (fig. III.21.). Le fragment Cys-F2-LysDO3A-pic(Eu) a été caractérisé par spectrométrie de masse et sa pureté contrôlée par HPLC analytique.

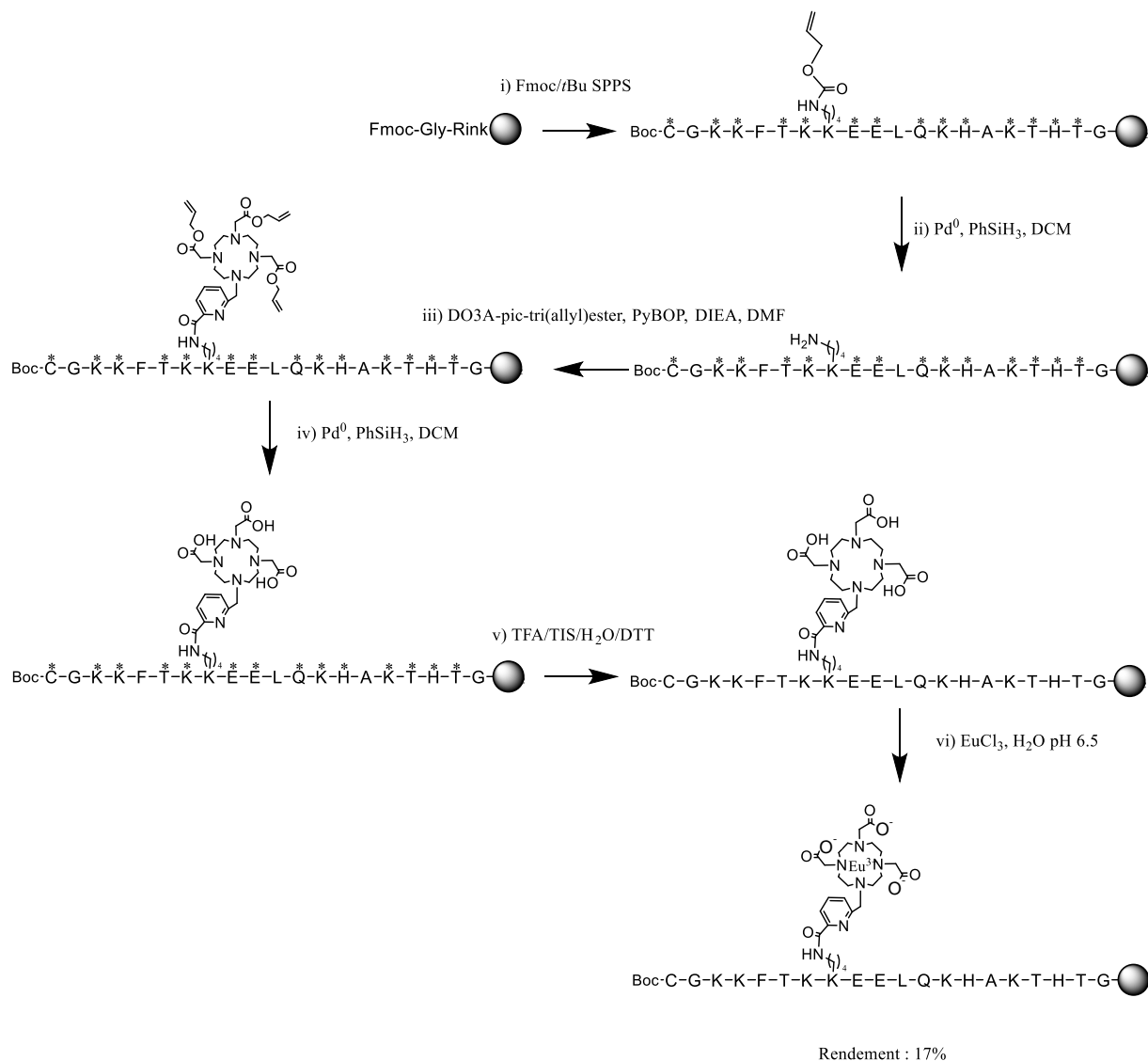


Figure III.21. : Voie de synthèse du fragment Cys-F2-LysDO3A-pic(Eu)

La sonde SP3-Cs124-DO3A-pic(Eu) a été assemblée par ligation SEA des fragments F1(Cs124)-SEA et Cys-F2-LysDO3A-pic(Eu). La sonde obtenue a été caractérisée par spectrométrie de masse et sa pureté contrôlée par HPLC analytique.

Le comportement de la sonde vis-à-vis du zinc a ensuite été étudié. Le spectre d'émission de fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$) a le même profil que celui de la sonde SP3-Cs124-LysDOTA(Eu). De plus le rendement quantique en absence de zinc est du même ordre de grandeur (tabl. III.7). Cependant l'ajout de zinc induit une diminution du signal de fluorescence de 82 %, beaucoup plus importante que celle observée dans le cas de la sonde SP3-Cs124-LysDOTA(Eu) (16%) (fig. III.22.). Ainsi le changement de chélateur a une influence sur le comportement spectroscopique de l'antenne.

Tableau III.7. : Rendements quantiques de fluorescence des sondes SP3-Cs124-LysDOTA(Eu) et SP3-Cs124-LysDO3A-pic(Eu).

Peptide	$\Phi_{\text{fluo}} \%$	$\Phi_{\text{fluo-Zn}} \%$
SP3-Cs124-LysDOTA(Eu)	4,4	3,7
SP3-Cs124-LysDO3A-pic(Eu)	4,9	0,9

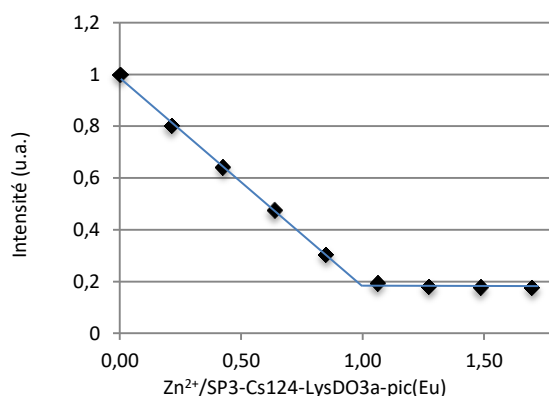


Figure III.22. : Titrage du peptide SP3-Cs124-LysDO3A-pic(Eu) par ZnCl_2 suivi par spectroscopie d'émission de fluorescence. SP3-Cs124-LysDO3A-pic(Eu) : 10 μM peptide, 10 mM HEPES pH 7.5, TCEP 350 μM , $\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$, fente d'émission 5/fente d'excitation 5, PM 550 V.

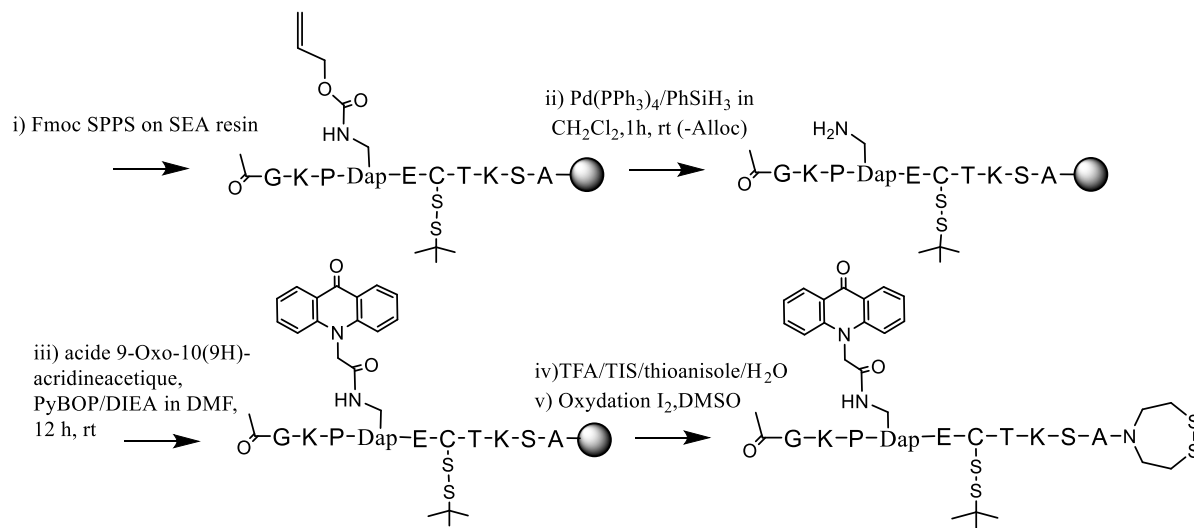
Le signal d'émission de l'euprium augmente lors des ajouts de zinc. Cependant le contraste de la sonde atteint seulement 2,2, ce qui est faible en comparaison de SP3-Cs124-LysDOTA(Eu) et non adapté pour le développement des sondes. Qualitativement, dans les mêmes conditions (concentration, paramètres d'enregistrement), en utilisant la même longueur d'onde d'excitation, l'émission du lanthanide en l'absence de Zn^{2+} est plus grande avec le DO3A-pic comparé au DOTA, mais en présence de Zn^{2+} , l'inverse est observé (tabl. III.8). Nous n'avons pas mesuré le nombre de molécules d'eau lié au lanthanide. Cependant, cela a été fait au laboratoire sur des composés apparentés (SP3-Trp-LysDO3A-pic(Tb), SP3-Trp-LysDO3A-pic(Tb)) et à chaque fois, les mesures ont montré l'absence de molécules d'eau sur le terbium. Il faudra néanmoins le contrôler avec SP3-Cs124-LysDO3A-pic(Eu).

Tableau III.8. : Contrastes d'émission de luminescence et intensités à 702 nm dans les mêmes conditions pour les sondes SP3-Cs124-DapDOTA(Eu) et SP3-Cs124-DapDO3A-pic(Eu).

Peptide	Contraste	$I_{702} \text{ Ø zinc}$	$I_{702} \text{ zinc}$
SP3-Cs124-LysDOTA(Eu)	12	7,7	92,4
SP3-Cs124-LysDO3A-pic(Eu)	2,2	16,2	35,64

III.4.2.4. Evaluation de l'influence du DO3A-pic : sonde SP3-Acri-DO3A-pic(Eu)

Les résultats mitigés obtenus avec SP3-Cs124-LysDO3A-pic(Eu) nous ont poussés à étudier une sonde incorporant l'antenne acridone : SP3-Acri- LysDO3A-pic(Eu). La synthèse du fragment F1-Acri-SEA est similaire à celle de F1-Cs124-SEA, la différence est l'utilisation de l'acide aminé non standard Fmoc-Dap(Alloc)-OH pour introduire l'antenne. Le groupement alloc de ce résidu a été sélectivement retiré puis l'acide 9-Oxo-10(9H)-acridineacétique introduit par couplage classique en présence de PyBOP (fig. III.23.). Les fragments F1-Acri-SEA et Cys-F2-LysDO3A-pic(Eu) ont été assemblés par ligation SEA dans les conditions standards pour mener à la sonde SP3-Acri-LysDO3A-pic(Eu).


Figure III.23. : Voie de synthèse pour la préparation du fragment F1- Acri-SEA.

global yield : 22 %

Le comportement de la sonde SP3-Acri-LysDO3A-pic(Eu) a ensuite été caractérisé. Elle présente deux pics d'absorption à 387 et 402 nm caractéristiques du chromophore acridone (fig. III.24.A). L'émission de fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$) de la sonde SP3-Acri-LysDO3A-pic(Eu) a ensuite été enregistrée au cours d'un titrage avec du zinc. Le signal diminue de 40% jusqu'à atteindre un plateau à un équivalent de zinc (fig. III.25.). La sonde répond bien à la formation du complexe 1 : 1. Le spectre d'excitation de fluorescence ($\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$) présente le même profil que le spectre d'absorption de la sonde (fig. III.24B). L'excitation du peptide correspond bien à l'absorption de l'antenne acridone.

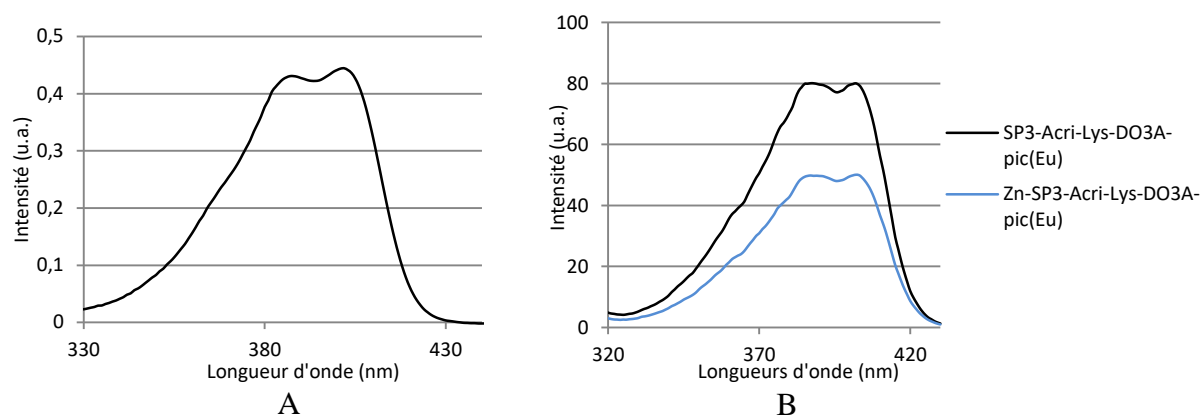


Figure III.24. : (A) : Spectre d'absorption de la sonde SP3-Acri-LysDO3A-pic(Eu). SP3-Acri-LysDO3A-pic(Eu): 10 μ M peptide, 10 mM Pi pH 7.5, TCEP 350 μ M. (B) Spectres d'excitation de fluorescence de la sonde SP3-Acri-LysDO3A-pic(Eu), $\lambda_{em} = 450$ nm, fente d'émission 5/fente d'excitation 5, PM 450 V. SP3-Acri-LysDO3A-pic(Eu): 10 μ M peptide, 10 mM Pi pH 7.5, TCEP 350 μ M.

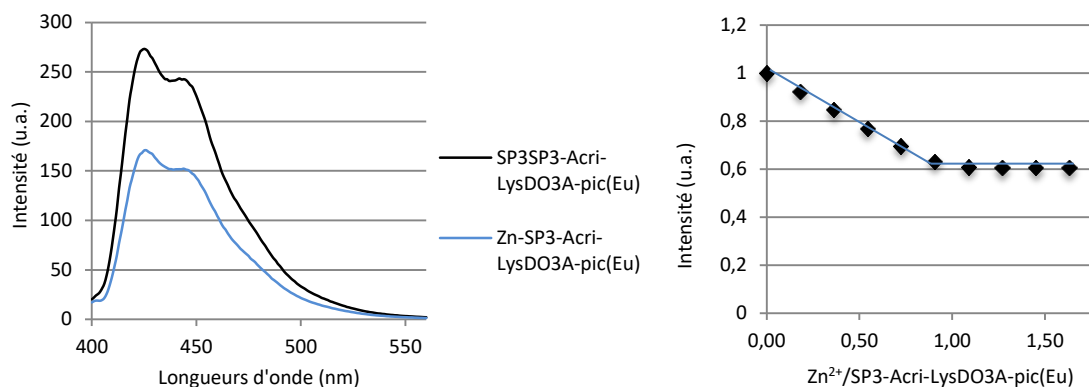


Figure III.25. : Titrage du peptide SP3-Acri-LysDO3A-Pic(Eu) par ZnCl₂ suivi par spectroscopie d'émission de fluorescence. 10 μ M SP3-Acri-LysDO3A-pic(Eu), 10 mM HEPES pH 7.5, TCEP 350 μ M, $\lambda_{ex} = 400$ nm, fente d'émission 5/fente d'excitation 5, PM 500 V.

Lors du titrage de la sonde par Zn²⁺, l'émission de l'euporium augmente jusqu'à un équivalent, avec un contraste de 8,4. Les résultats sont comparés avec ceux obtenus avec la sonde SP3-Acri-LysDOTA(Eu) qui diffère seulement de la sonde SP3-Acri-LysDO3A-pic(Eu) par la nature du chélateur (tabl. III.9.). L'utilisation du DO3A-pic permet une légère augmentation du rendement quantique de l'euporium en l'absence de Zn²⁺. Celui-ci est cependant presque doublé en présence de Zn²⁺. L'utilisation du DO3A-pic est donc bénéfique pour les propriétés de la sonde incorporant l'acridone. Le spectre d'excitation de luminescence de la sonde SP3-Acri-LysDO3A-Pic(Eu) ($\lambda_{em} = 700$ nm) présente deux pics à 387 et 402 nm (fig. III.26.), correspondant à l'absorption de l'acridone. L'euporium est donc bien sensibilisé par l'acridone.

Tableau III.9. : Contrastes et rendements quantiques de luminescence avec zinc et sans pour les sondes SP3 acridone.

Peptide	Contraste	Φ_{Ln} %	Φ_{Ln-Zn} %
SP3-Acri-LysDO3A-Pic(Eu)	8,4	0,3	1,9
SP3-Acri-LysDOTA(Eu)	6	0,2	1,1

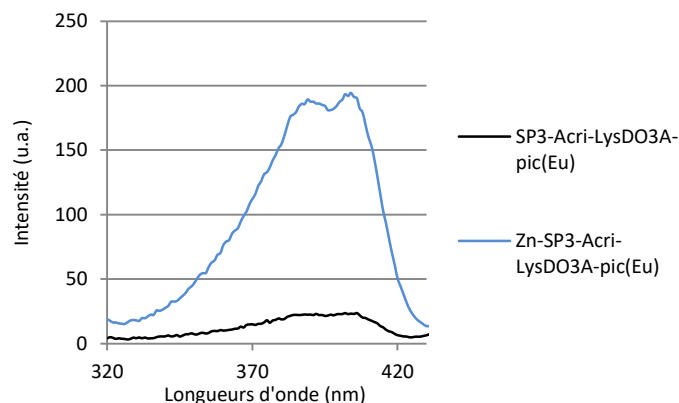


Figure III.26. : Spectre d'excitation de luminescence $\lambda_{em} = 700$ nm, fente d'émission 5/fente d'excitation 10, PM 750 V. SP3-Acri-LysDO3A-pic(Eu). 10 μ M SP3-Acri-LysDO3A-pic(Eu), 10 mM HEPES pH 7.5, TCEP 350 μ M.

Par rapport à la sonde SP3-Cs124-LysDOTA(Eu), la sonde SP3-Acri-LysDO3A-pic(Eu) permet de décaler l'excitation vers les plus grandes longueurs d'onde autour de 400 nm, ce qui est plus adapté pour les microscopes confocaux récents. De plus le rendement quantique de luminescence est supérieur ce qui est intéressant. Le contraste de la sonde SP3-Acri-LysDO3A-pic(Eu) est légèrement inférieur mais reste conséquent (tabl. III.8.).

Tableau III.10. : Longueurs d'onde d'excitation, contrastes et rendements quantiques de luminescence avec et sans zinc pour les sondes SP3 acridone.

Peptide	λ_{ex} (nm)	Contraste	Φ_{Ln} %	Φ_{Ln-zn} %
SP3-Acri-LysDO3A-pic(Eu)	400	8,4	0,23	1,9
SP3-Cs124-LysDOTA(Eu)	300	12	0,04	0,37

III.4.3. Synthèse des sondes CPP-SP3-Acri-DO3A-pic(Ln)

Les sondes CPP-SP3-Acri-LysDO3A-pic(Eu) ont donc été développées pour des applications cellulaires par ajout d'une séquence de pénétration à la sonde SP3-Acri-LysDO3A-pic(Eu). Nous avons entrepris une synthèse convergente similaire à celle des sondes pénétrantes avec l'antenne Cs124. Il nous a fallu un fragment « antenne » bifonctionnel (N_3 /SEA), un fragment « CPP » avec un alcyne et un fragment « lanthanide » avec une cystéine en N-terminale. Les deux derniers sont les mêmes que décrit au début de ce chapitre. La synthèse du fragment F1- N_3 -Acri-SEA est décrite sur la figure III.27. On a introduit durant la synthèse l'acide aminé non standard Fmoc-Dap(Alloc)-OH. Comme nous l'avons observé avec une synthèse test les conditions permettant le retrait de l'alloc ($Pd(PPh_3)_4$, $PhSiH_3$) induisent une réduction partielle de la fonction azote. Ainsi

l'introduction dans la séquence de l'azoture a été réalisée après la déprotection de l'alloc et le couplage de l'antenne acide 9-Oxo-10(9H)-acridineacetique dans des conditions standard.

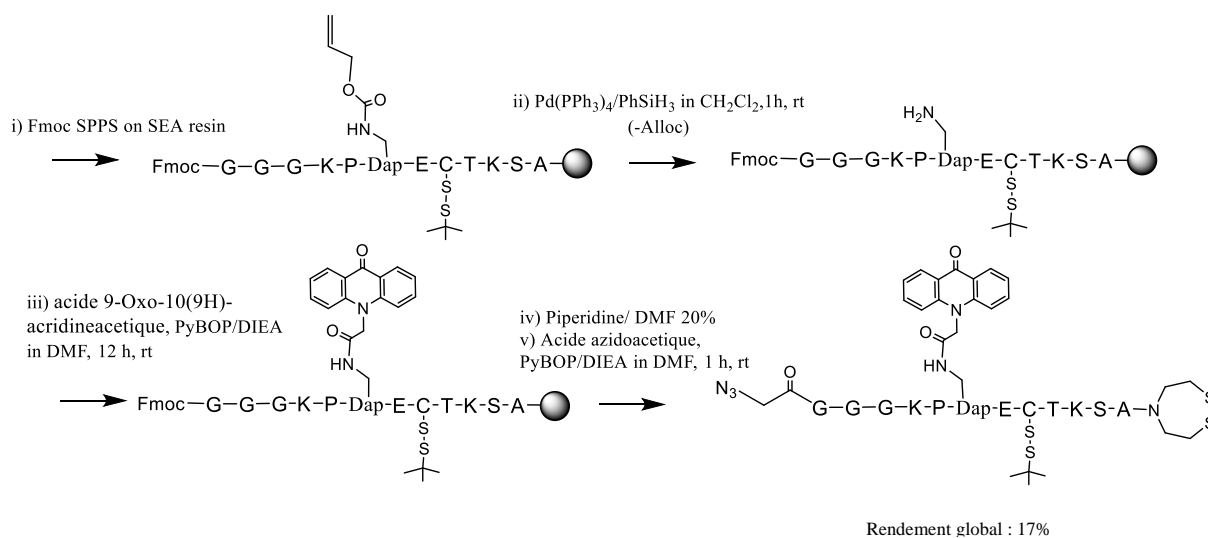


Figure III.27. : Voie de synthèse pour la préparation du fragment F1-N₃-Acri-SEA.

Les différents fragments ont été assemblés selon la stratégie exposée précédemment pour donner les trois sondes Tat-SP3-Acri-DO3A-pic-(Eu), Pen-SP3-Acri-DO3A-pic-(Eu) et RWR-SP3-Acri-DO3A-pic-(Eu).

III.4.4. Caractérisations des sondes CPP-SP3-Acri-DO3A-pic(Ln)

Pour les trois sondes CPP-SP3-Acri-DO3A-pic(Eu), les spectres d'émission de fluorescence ont le même profil que celui de la sonde SP3-Acri-DO3A-pic(Eu) sans CPP. Cependant les intensités diminuent de façon moins importante, de l'ordre de 20% en présence de zinc contre 40% pour la sonde SP3-Acri-DO3A-pic(Eu). L'émission de l'euprium augmente bien avec l'ajout de Zn²⁺ jusqu'à un équivalent. Les contrastes et les rendements quantiques sont reportés dans le tableau III.11. On voit ici que la présence du CPP diminue à la fois le contraste et les rendements quantiques. Les contrastes sont légèrement plus faibles avec les CPPs Tat et Pen par rapport à la sonde sans CPP : 7 contre 8. Pour le CPP RWR, le contraste est divisé par 2. Ce comportement est différent de celui observé pour les sondes CPP-SP3-Cs124-DOTA(Eu), pour lesquelles le contraste était plus grand sans CPP.

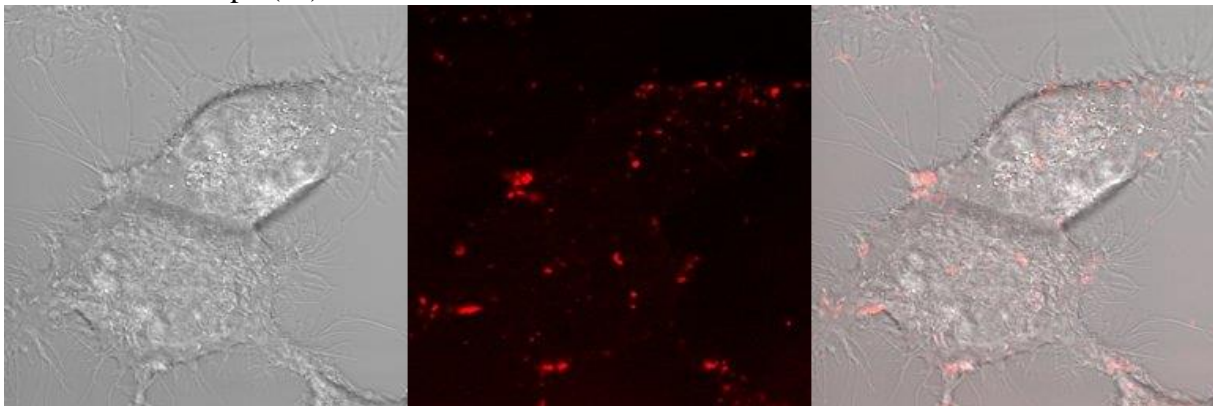
Tableau III.11. : Contrastes et rendements quantiques de luminescence avec ou sans zinc pour les sondes acridone.

Peptide	Contraste	Φ_{Ln} %	Φ_{Ln-Zn} %
SP3-Acri-DO3A-pic(Eu)	8,4	0,23	1,9
Tat-SP3-Acri-DO3A-pic(Eu)	7	0,10	0,7
Pen-SP3-Acri-DO3A-pic(Eu)	7	0,06	0,4
RWR-SP3-Acri-DO3A-pic(Eu)	4	0,02	0,09

III.4.5. Tests cellulaires

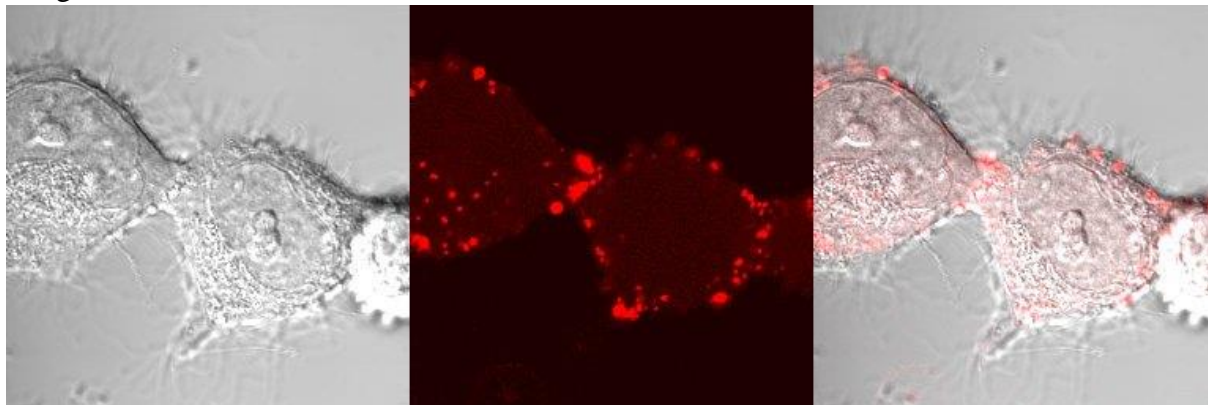
Les mesures ont été réalisées sur un microscope confocal Zeiss LSM710 à l'IAB. Les cellules ont été incubées avec les quatre composés (la sonde SP3-Acri-DO3A-pic(Eu) sans CPP et les trois sondes avec CPP) selon le même protocole que celui utilisé pour les sondes Cs124. Les images ont été enregistrées après 10 minutes d'incubation. La figure III.28. montre pour chaque sonde une image en transmission des cellules, une image en mode fluorescence avec une excitation à 405 nm et la superposition des deux. Avec la sonde SP3-Acri-DO3A-pic(Eu), qui n'a pas de CPP, on peut voir la localisation de molécules fluorescentes sous forme d'« amas ». Une analyse Z-stack (en changeant progressivement le plan confocal pour reconstituer une vue 3D) a permis de déterminer qu'ils étaient pour l'essentiel situés au niveau de la surface de la cellule. Avec le CPP Tat, on peut clairement voir des « amas » proches du pourtour de la cellule mais aussi à l'intérieur. De plus, il y a une émission diffuse uniformément répartie dans toute la cellule. Il semble donc que Tat permette une entrée du composé dans la cellule. Les « amas » pourraient bien correspondre à des endosomes. Avec le CPP Pen, on ne voit que des « amas » proche de la membrane ou dans les cytoplasme. On ne voit pas de répartition uniforme comme avec Tat. Il semble donc que Pen-SP3-Acri-DO3A-pic(Eu) soit internalisé dans des endosomes mais ne soit pas libéré de ceux-ci. Enfin, avec le CPP RWR, il est difficile de détecter de la fluorescence. RWR-SP3-Acri-DO3A-pic(Eu) ne semble pas être internalisé. Au final, le CPP Tat semble être le meilleur candidat pour l'internalisation de nos sondes.

SP3-Acri-DO3A-pic(eu)



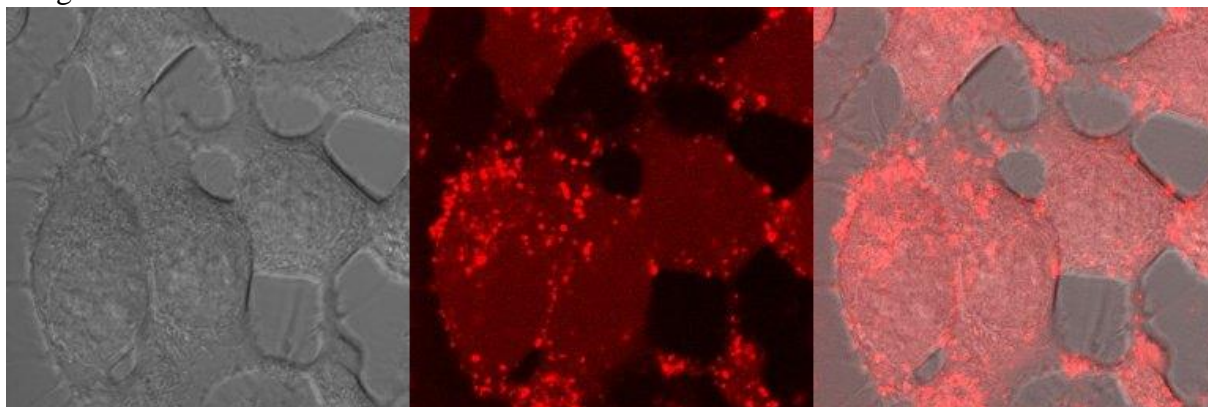
Tat-SP3-Acri-DO3A-Pic(Eu)

Image 1 :

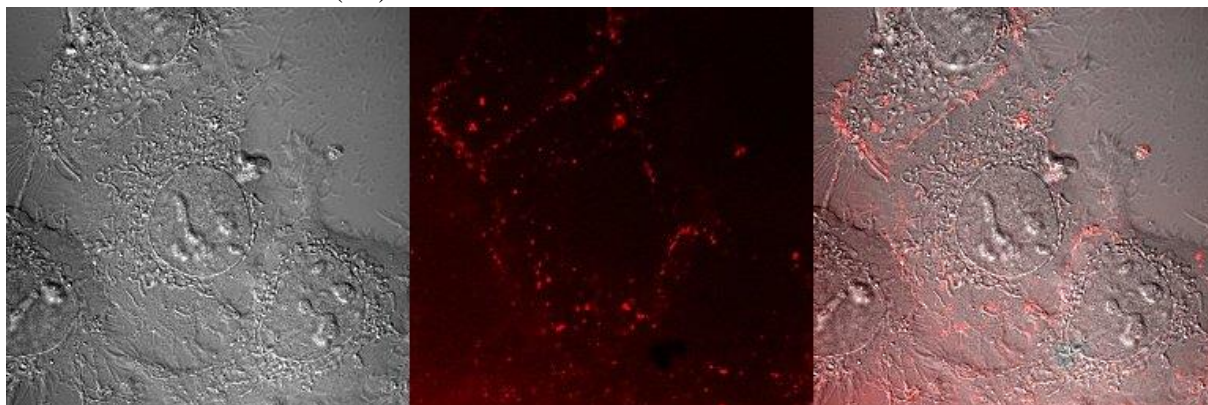


Tat-SP3-Acri-DO3A-Pic(Eu)

Image 2 :



Pen-SP3-Acri-DO3A-Pic(Eu)



RWR-SP3-Acri-DO3A-Pic(Eu)

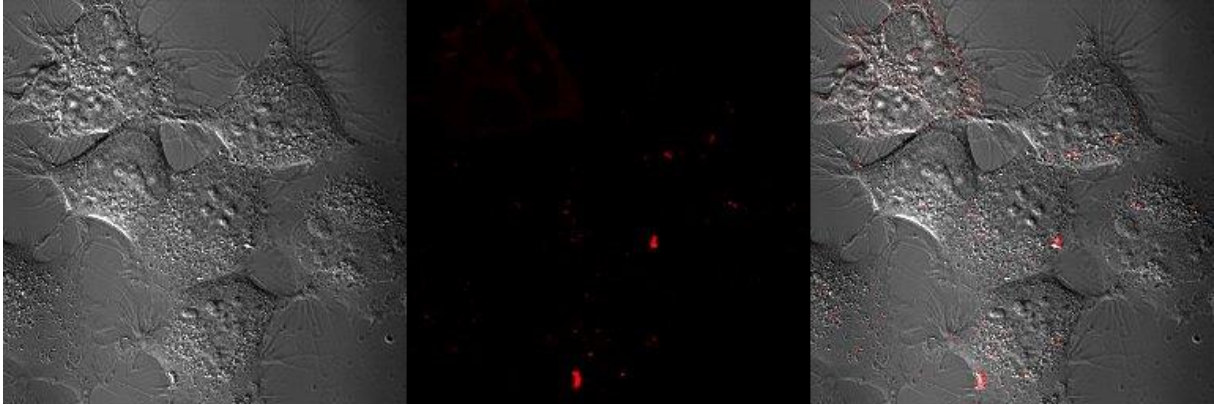


Figure III.28. : (A gauche) Image en transmission, (à droite) Emission, (à droite) Superposition de cellules HEK incubées avec le peptide Tat-SP3-Acri-DO3A-pic-(Eu). Cellule HEK incubées pendant 10 min avec 5 μM de peptide CPP-SP3-Acri-DO3A-pic-(Eu) dissout dans du milieu DMEM. $\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$.

En mode spectral, pour tous ces peptides, l'émission (fig. III.29.) présente la signature de l'acridone comme l'indique la comparaison du spectre des cellules et celui de la sonde SP3-Acri-DO3A-pic(Eu) liée au zinc, enregistré avec un spectrophotomètre. Le signal de l'euporium n'est pas visible sur le spectre enregistré avec le microscope confocal. Deux explications sont possibles : (1) l'émission de l'euporium serait dans le bruit de l'image enregistrée avec le microscope confocal ou (2) le peptide aurait été hydrolysé par des protéases dans les endosomes et le signal détecté correspond à un fragment hydrolysé contenant seulement l'acridone (l'euporium, séparé de son antenne ne serait alors plus visible).

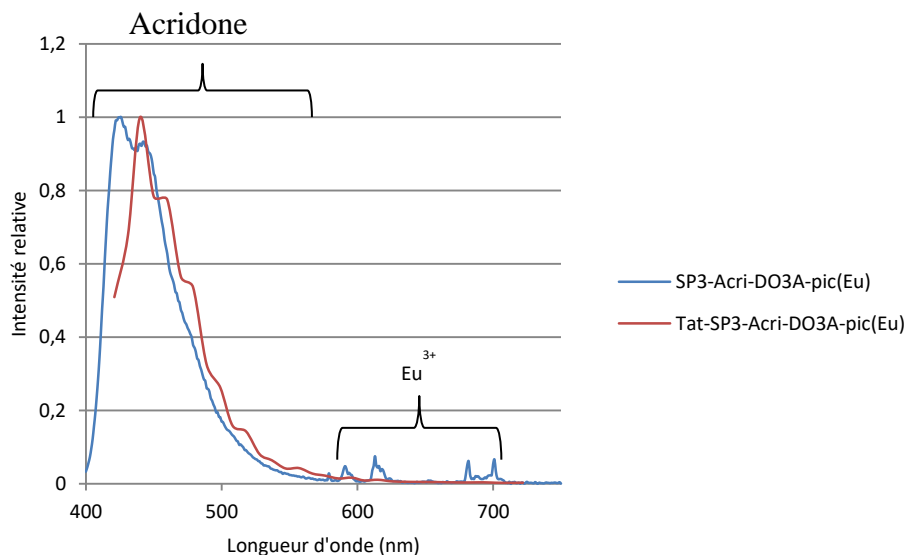


Figure III.29. : Spectre d'émission totale de la sonde SP3-Acri-DO3A-Pic(Eu).

III.5. Conclusion et perspectives

Nous avons synthétisé par une méthode convergente plusieurs sondes de pénétration. Les

premières sondes à avoir été synthétisées incorporent le chromophore Cs124 comme antenne. Elles possèdent une affinité adaptée à la détection du Zn^{2+} cellulaire ($\log K = 9,6$ et $10,6$). Cependant les tests cellulaires réalisés avec ces sondes ne sont pas concluants, l'émission de la sonde est très faible, elle se retrouve dans l'autofluorescence du milieu biologique. Ces sondes ne sont donc pas adaptées et ont été améliorées. Ainsi un système similaire a été développé incorporant l'acridone à la place du Cs124 et le chélateur DO3A-pic à la place du DOTA. Cette antenne permet de décaler l'excitation vers les plus grandes longueurs d'onde et ainsi d'atténuer l'autofluorescence. De plus les rendements quantiques de cette sonde sont plus importants. Ce système paraît donc intéressant et est développé pour des applications biologiques par l'introduction de séquence de pénétration selon la même stratégie que celle utilisée pour les sondes Cs124. Les analyses biologiques réalisées avec ces sondes ne permettent pas de conclure quant à l'internalisation du lanthanide, cependant l'antenne est visible à l'intérieur des cellules, dans ce qui semble être des endosomes pour tous les CPPs testés mais également cytoplasmique et nucléaire pour Tat. Ce dernier est actuellement notre meilleur candidat pour l'internalisation des sondes. Pen et RWR ne sont pas satisfaisants. Ces tests cellulaires ont soulevés plusieurs problèmes potentiels. Premièrement, l'émission de l'euporium n'est pas détectée. Il va donc falloir optimiser les sondes pour trouver un couple antenne/euporium plus efficace, offrant une meilleure brillance pour l'euporium. Deuxièmement, un possible emprisonnement d'une partie des sondes dans des endosomes. En effet, de façon générale, les éléments qui sont internalisés par endocytose sont emprisonnés dans des endosomes, seul un faible pourcentage (typiquement $<5\%$) est capable d'y échapper avant la dégradation lysosomiale. Il a été prouvé que la cyclisation des CPPs polyarginine et tat favorise le relargage endosomiale par rapport aux fragments linéaires^[143,144]^[143]

143]

142]

141]

. Les CPPs cycliques semblent donc être une bonne piste afin d'améliorer le relargage cytoplasmique de nos sondes. Nous avons choisi de tester le CPP C4 développé par le Dr Yung-Sing Wong^[145] du Département de Pharmacochimie Moléculaire (DPM) de Grenoble. Ce CPP est un tetracyclopeptide composé d'une proline, d'une phenylalanine et de deux acides aminés non naturels portant une fonction alcyne et alcène (fig. III.30.). Les tests *in vivo* de ce CPP montrent une internalisation rapide et homogène dans le cytoplasme. La fonction alcyne permet à ce CPP d'être couplé à nos sondes par réaction click, ce qui a permis de synthétiser la sonde C4-SP3-Acri-DO3A-pic (Eu) selon la même stratégie que précédemment. Cette sonde a été analysée *in vitro* mais pas encore étudié par microscopie.

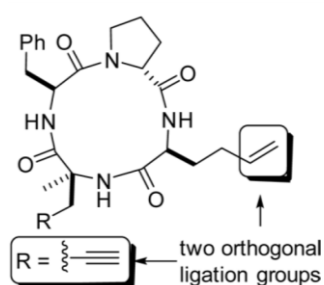


Figure III.30 : Représentation du CPP cyclique C4^[145].

Une autre possibilité afin d'assurer le relargage cytoplasmique est la modification intrinsèque de la séquence du doigt de zinc. En effet l'équipe de Schepartz a montré que l'introduction de cinq arginines à des positions précises dans l'hélice d'un doigt de zinc permettait son internalisation dans des cellules mais également le relargage du peptide des endosomes rapidement et sans dégradation significative (50% sont retrouvés dans le cytosol donc 90% qui sont intacts)^[146]. Les positions utilisées pour l'insertion des arginines ne sont pas celles exploitées dans nos systèmes pour l'introduction de l'antenne ou des lanthanides, ainsi ces travaux sont transposables à nos systèmes (fig. III.31.). En effet le doigt de zinc ZF a été modifié par l'équipe de Shepard pour introduire cinq arginines afin de former le peptide ZF5.3. De façon similaire il est possible de modifier notre système SP3-Ant-DOTA(Eu) afin d'introduire aux mêmes positions des arginines.

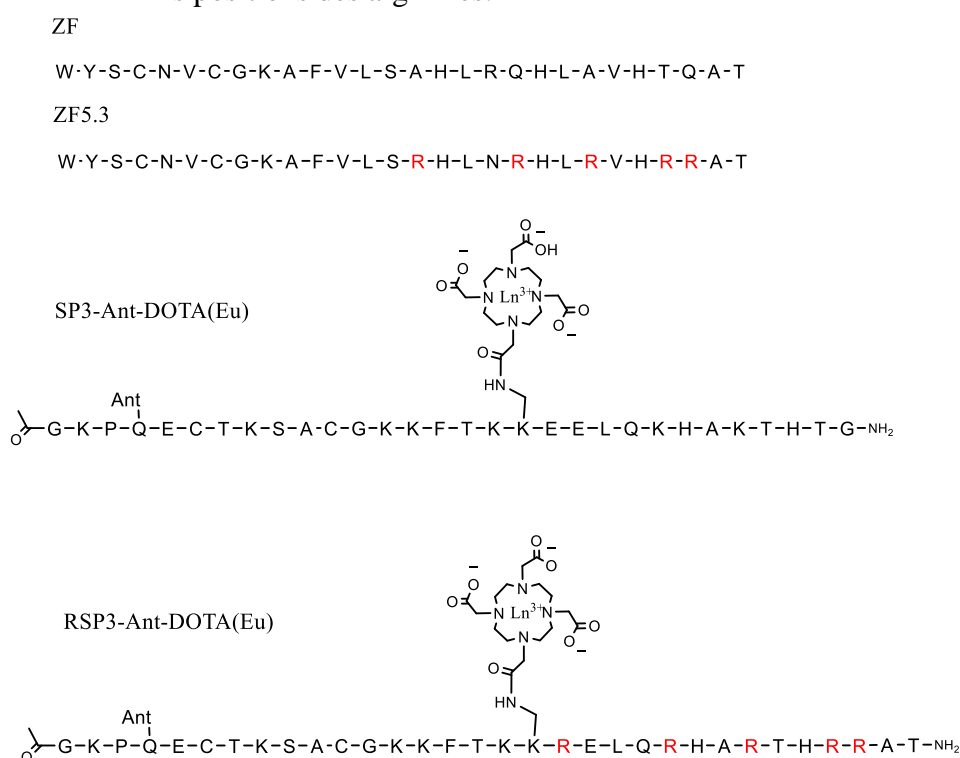


Figure III.31. : Structure des sondes ZF, ZF5.3, SP3-Ant-DOTA(Eu), RSP3-Ant-DOTA(Eu)

Chapitre IV : Sondes ratiométriques pour la détection du Cu^+ et de Ag^+

IV.1. Principe

La sonde à cuivre(I) intensiométrique CC9 a été mise au point avant mon arrivée au laboratoire. Il s'agit d'un peptide cyclique de 18 acides aminés inspiré de la protéine CusF et incorporant un complexe de terbium et son antenne le tryptophane (fig. IV.1.).

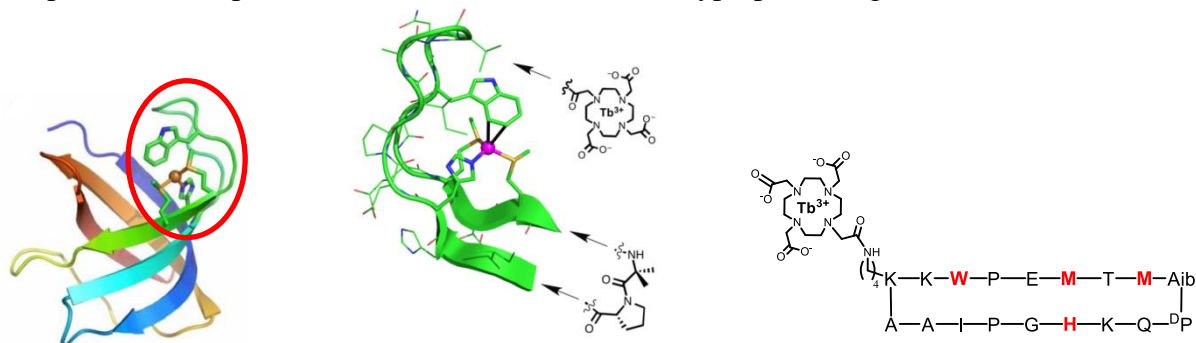


Figure IV.1. : (A gauche) Structure de CusF dont la boucle contenant les acides aminés coordonnants est entourée. (Au milieu) Schéma de l'incorporation du complexe de DOTA ainsi que des acides aminés Aib-DPro. (A droite) Séquence de la sonde CC9.

En présence de Cu^+ l'émission du terbium augmente d'un facteur 6 (fig. IV.2.). De plus la sonde est sélective du Cu^+ par rapport aux métaux physiologiques. Elle répond également à Ag^+ de façon similaire, ces deux ions ayant des propriétés voisines.

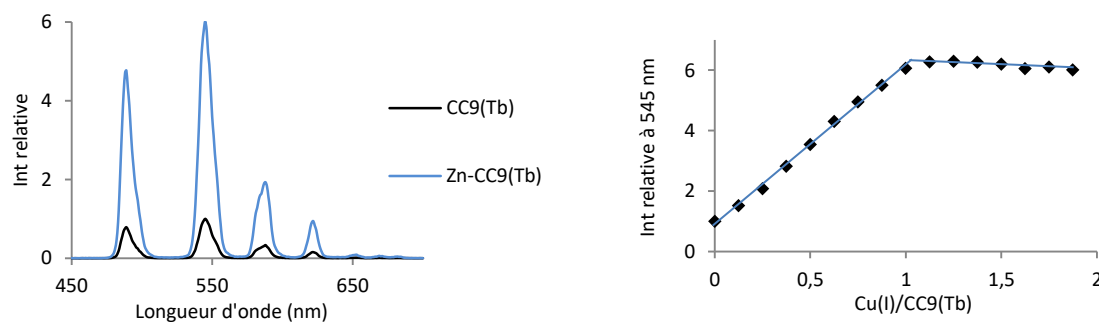


Figure IV.2. : (A gauche) Spectres en temps résolu du peptide CC9 avec et sans cuivre. (A droite) Evolution de l'émission à 545 nm en fonction de la quantité de cuivre ajoutée. CC9 : 5 μM , HEPES pH 7,5 10mM, NH_2OH 2 mM. Ajouts de $\text{Cu}(\text{II})\text{SO}_4$. $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, fente d'émission 5/fente d'excitation 5, PM 650 V.

L'activation de la sonde est due à l'interaction cation- π qui s'établit entre l'ion Cu^+ et le noyau aromatique (fig. IV.1.). Elle permet d'accélérer le croisement intersystème de l'état singulet excité du tryptophane $\text{Trp}(S_1)$ vers son état triplet excité $\text{Trp}(T_1)$. Cela se traduit par un peuplement plus important de l'état $\text{Trp}(T_1)$ qui est l'état donneur d'énergie pour la sensibilisation du terbium (fig. IV.3.). Ainsi, en présence de Cu^+ , l'état excité 5D_4 du terbium devient davantage peuplé, résultant en une émission accrue.

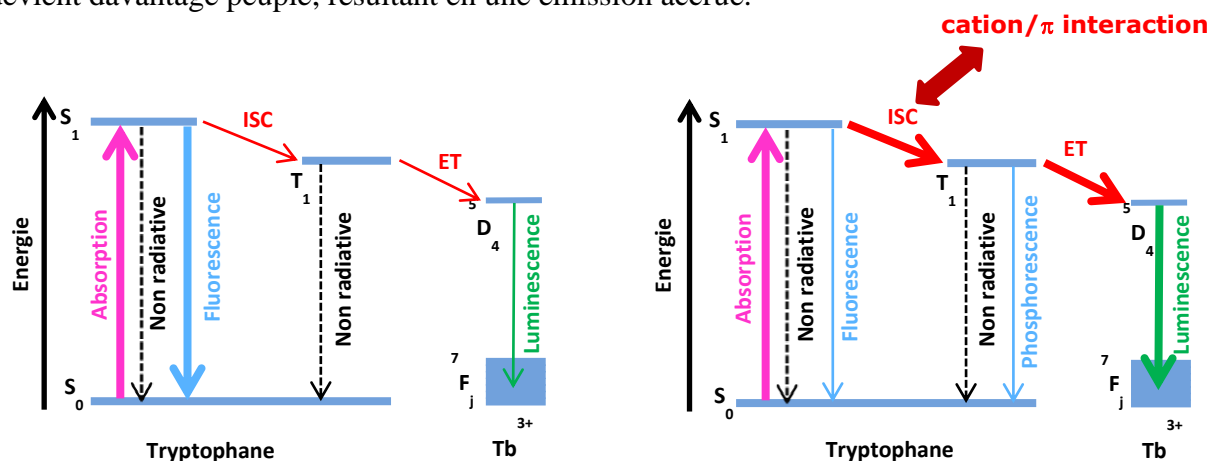


Figure IV.3 : Diagramme de Jablonski représentant le schéma de sensibilisation pour la sonde CC9 (à gauche) sans métal, (à droite) en présence de Cu^+ ou Ag^+ . (ET = transfert d'énergie, ICS = croisement inter système)

Nous souhaitons développer à partir de ce modèle intensimétrique une sonde ratiométrique en temps résolu. La stratégie utilisée n'est pas la même que celle adoptée dans le cas de la construction des sondes à zinc ratiométriques exposée dans le premier chapitre de ce manuscrit. En effet, dans les peptides précédents, la même antenne permet de sensibiliser les deux lanthanides. Dans le cas développé dans ce chapitre, chaque lanthanide possède une antenne associée. Cependant nous souhaitons utiliser deux antennes excitable à la même longueur d'onde et deux lanthanides dont l'émission est enregistrable dans les mêmes conditions expérimentales (fig. IV.4.).



Figure IV.4. : Schéma de fonctionnement de la sonde.

Cette stratégie a déjà été exploitée au laboratoire pour l'élaboration de sonde ratiométrique à zinc SP2R (voir chapitre II). Pour l'élaboration de la sonde ratiométrique à cuivre nous avons choisi de rajouter au système terbium/tryptophane présent initialement dans la sonde CC9, le lanthanide europium et son antenne associée, le naphthalène. Le naphthalène et le tryptophane sont excités à la même longueur d'onde : 280 nm. Le fragment supplémentaire est introduit par branchement sur la sonde initiale afin de garder la topologie de CC9. Pour le

design de la sonde, nous souhaitons introduire la seconde paire antenne/lanthanide le plus loin possible de la première afin de limiter les transferts d'énergie entre ces deux paires. Le couple naphthalène/europium a donc été disposé de l'autre côté du plan du cycle et à l'opposé du couple terbium/tryptophane dans le feuillet (fig. IV.5.). La distance entre les deux paires est ainsi estimée à plus de 15 Å.

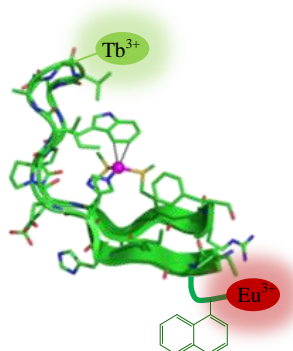


Figure IV.5. : Représentation de la structure de la sonde ratiométrique LCCR1 avec la position des couples antenne/lanthanide.

Le transfert d'énergie entre le terbium et le tryptophane est influencé par l'interaction cation- π et donc augmente en présence de métal. Celui entre le naphthalène et l'euporium devrait être directement lié à la distance entre ces deux éléments. Ils sont placés de façon à ce que la distance qui les sépare ne varie pas. Ainsi l'intensité de l'euporium devrait être constante alors que l'intensité du terbium qui est sensible à la présence de métal devrait augmenter au cours des ajouts (fig. IV.6.).

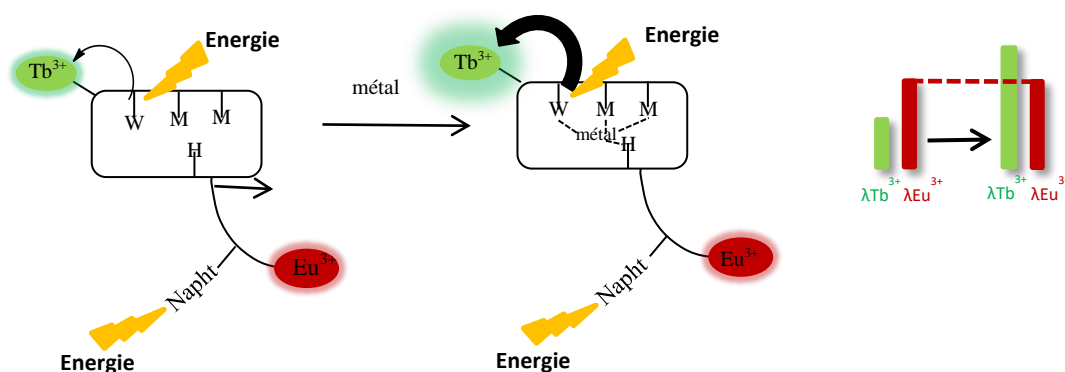


Figure IV.6. : Représentation schématique du fonctionnement de la sonde ratiométrique à cuivre(I).

IV.2. Stratégie oxime

Afin d'obtenir ce composé nous avons mis au point une synthèse convergente, en assemblant deux fragments par un lien oxime pour obtenir le peptide LCCR1. Cette stratégie nécessite donc la synthèse d'un fragment incorporant un oxyamine et un autre intégrant un aldéhyde (fig. IV.7.).

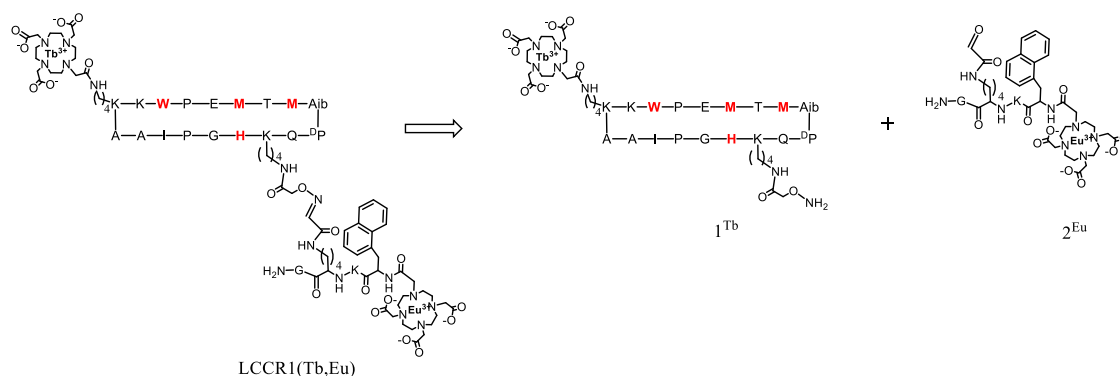


Figure IV.7. : Voie de synthèse de la sonde LCCR1(Tb,Eu) par assemblage des fragments 1^{Tb} et 2^{Eu} .

La stratégie adoptée est celle utilisée en routine par l'équipe Ingénierie et Interactions Biomoléculaires (I₂BM) du Département de Chimie Moléculaire (DCM), laboratoire avec lequel nous collaborons. L'oxyamine et l'aldéhyde sont synthétisés au préalable sous forme d'acides aminés modifiés qui sont introduits sous forme protégés ou masqués lors de la SPPS. La fonction oxyamine est introduite via l'acide aminé non standard Fmoc-Lys(N-EEI-Aoa)-OH mis au point à l'I₂BM^[147]. L'aldéhyde utilisé est un aldéhyde glyoxylique introduit masqué par l'acide aminé modifié Fmoc-Lys(Boc-Ser(*t*Bu))-OH et obtenu après oxydation (fig. IV.8.). Ainsi afin d'éviter toute oxydation parasite des méthionines du fragment cyclique lors de cet étape l'aldéhyde est placé sur le fragment branché.

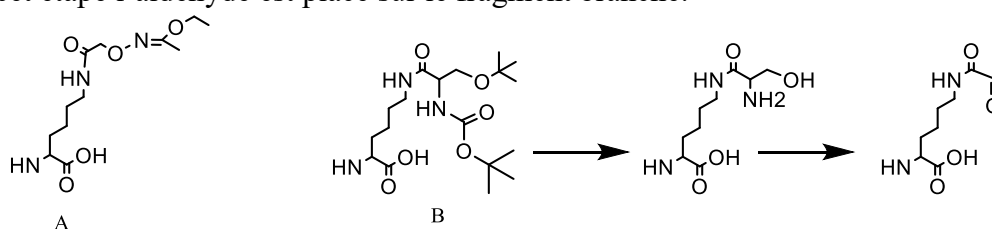


Figure IV.8. : Structure des acide aminé non standard A : Fmoc-Lys(N-EEI-Aoa)-OH, B : Fmoc-Lys(Boc-Ser(*t*Bu))-OH protégé (à droite), déprotégé (au milieu) et oxydé (à gauche).

IV.2 1. Synthèse

La synthèse du peptide cyclique 1^{Tb} est composée d'étapes de synthèse peptidique en phase solide (SPPS) et d'étapes en solution (cyclisation, greffage du DOTA-(*t*Bu)). La synthèse par SPPS a été amorcée par la glycine, acide aminé non chiral afin d'éviter les problèmes de racémisation par formation d'oxazolone lors de la cyclisation. La résine utilisée pour la SPPS a été la résine chlorotrytil, elle est sensible au milieu faiblement acide ce qui permet de décrocher le peptide sans retirer les groupements protecteurs. L'élongation du peptide a été effectuée manuellement en utilisant une méthode de couplage standard excepté pour la D-Proline (couplage de deux fois une heure), l'acide 2-aminoisobutyrique (Aib) (deux fois deux heures) et la méthionine suivante (deux fois une heure). L'Aib étant un acide aminé encombré, la réaction de couplage est plus difficile, elle a été effectuée en présence de l'activateur COMU, plus efficace pour les acides aminés encombrés comme l'Aib.

L'encombrement de cet acide aminé rend également le couplage suivant délicat, c'est pourquoi la méthionine a été couplée avec un temps de couplage plus important. La fonction oxyamine a été introduite via l'acide aminé non standard Fmoc-Lys(N-EEI-Aoa)-OH en conditions standard.

Une fois le peptide linéaire synthétisé, il a été décroché de la résine avec une solution DCM/TFE (2/1). Le peptide linéaire protégé a ensuite été cyclisé en présence de PyBOP dans le DMF une nuit, sous argon. L'alloc de la lysine a été ensuite retiré avec du Pd⁰ puis le DOTA-tris(*t*Bu)ester a été couplé par un couplage peptidique classique en présence de PyBOP dans le DMF pendant une nuit. Tous les groupements protecteurs ont été retirés par une solution TFA/TIS/H₂O/thioanisole/octylsulfide pendant 4h. Le fragment a ensuite été métallé par un excès de terbium pour donner le fragment 1^{Tb} (fig. IV.9.).

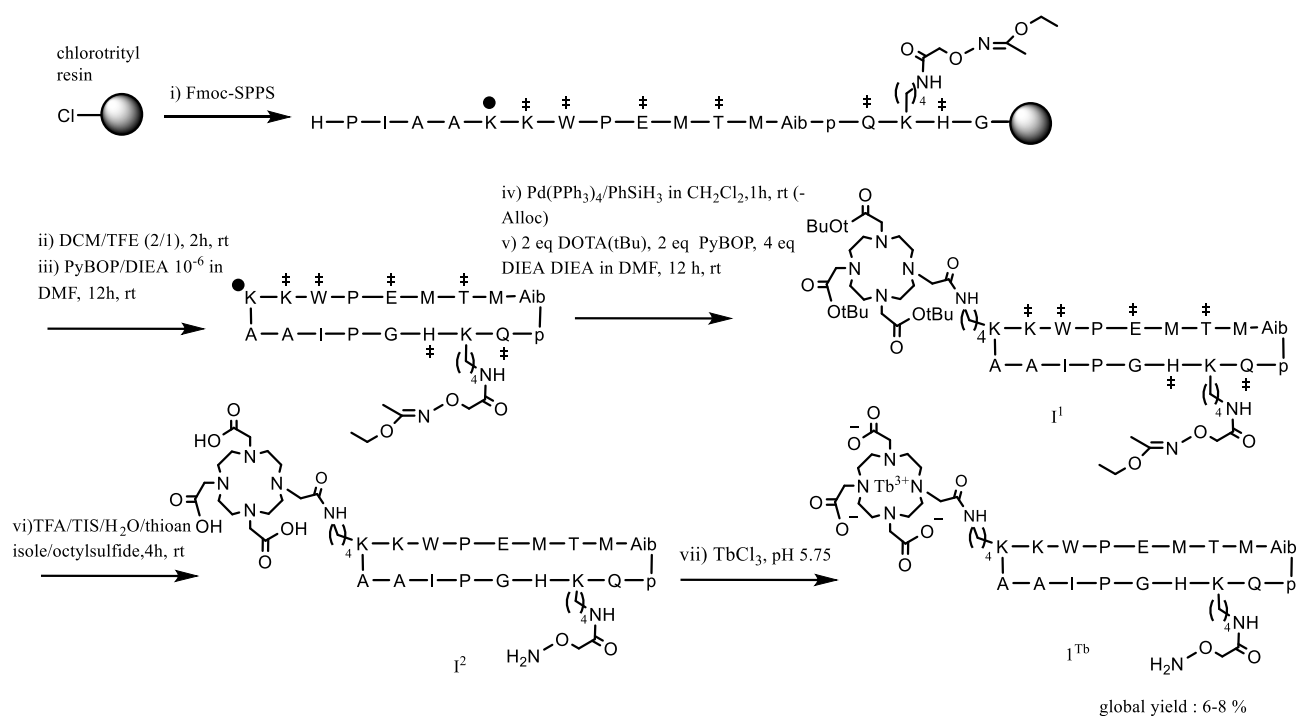


Figure IV.9. : Voie synthétique pour la préparation du fragment 1^{Tb}. † Représente les groupes protecteur standard (Boc pour Lys et Trp ; *t*Bu pour Glu et Thr ; Trt pour Cys, Gln et His). ● Représente le groupement protecteur orthogonal Alloc.

Le chromatogramme associé à la molécule I² indique la présence majoritaire de produits secondaires au pied du bon produit (fig. IV.10.A). Le brut obtenu habituellement pour les peptides de la famille CC9 (sans l'acide aminé non naturel Fmoc-Lys(N-EEI-Aoa)-OH) présentent généralement un pic majoritaire pour le produit attendu. De ce fait la purification de ce composé est délicate et nécessite des injections de petites quantités (moins de 10 mg) sur la colonne HPLC préparative afin d'obtenir une pureté satisfaisante (fig. IV.10.B).

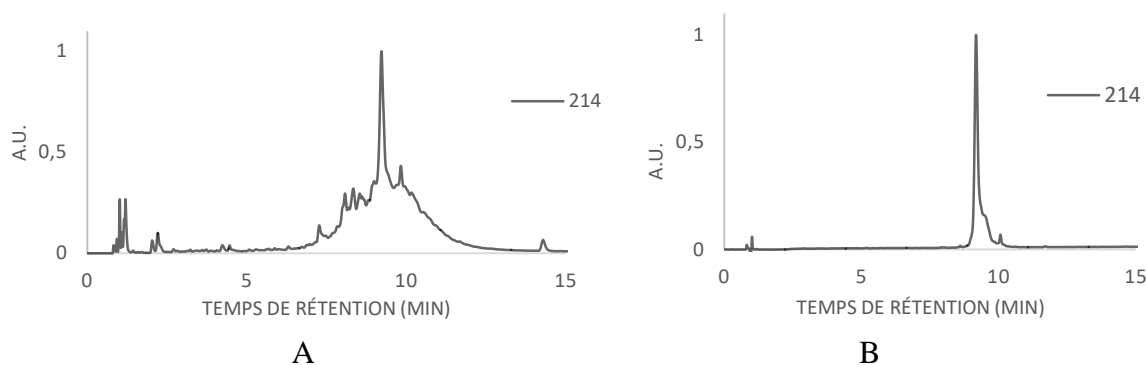


Figure IV.10. : Chromatogramme du précurseur déprotégé I^2 brut (à droite) et purifié (à gauche).

Cette étape de purification a donc été très chronophage et délicate. Nous avons obtenu un rendement de seulement 6% et le produit n'est pas parfaitement pur (fig. IV.10.B). Nous avons donc décidé de déplacer cette étape de purification lors d'une seconde synthèse. Le chromatogramme du composé noté I^1 sur la figure IV.11.A montre que le pic associé à cette molécule est éloigné des produits secondaires, assurant ainsi une purification plus aisée. Une déprotection test de ce composé brut a mené au même spectre qu'observé dans la première synthèse, la synthèse est donc reproductible. Le composé I^1 protégé a été purifié par HPLC préparative. La nature très hydrophobe du composé ne permet pas d'injecter des quantités trop importantes. Ainsi le composé a été purifié par portion de 15 mg. Le chromatogramme du composé I^1 est représenté avant (fig. IV.11.B) et après (fig. IV.11.C) déprotection. Le chromatogramme du composé I^2 brut, figure IV.11.C, est relativement propre et a permis d'obtenir le fragment 1^{Tb} pur. Bien que moins délicate et menant à un rendement légèrement plus important de 8% la purification a été tout autant chronophage.

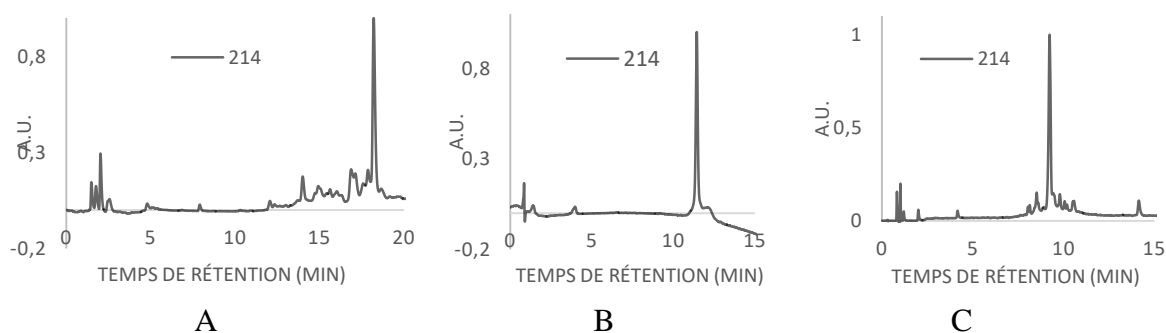


Figure IV.11. : Chromatogramme du précurseur brut protégé I^1 (A), pur (B), et du composé déprotégé I^2 brut (C).

Le fragment linéaire 2^{Eu} a été synthétisé manuellement sur résine rink amide. Les acides aminés non naturel Fmoc-Lys(Boc-Ser(*t*Bu))-OH et Fmoc-3-(1-naphthyl)-L-alanine (Fmoc-L-1Nal-OH) ainsi que le DOTA-tris(*t*Bu)ester sont introduits durant la synthèse afin d'incorporer respectivement la fonction aldéhyde, l'antenne et le chélate au fragment peptidique. Le fragment a ensuite été déprotégé et décroché en présence de TFA/TIS/ H_2O /thioanisole. Le résidu serine a ensuite été oxydé en présence d'un excès de

NaIO_4 dans le but de former un aldéhyde glyoxylique. Le fragment a ensuite été métallé par de l'euprium (fig. IV.12.).

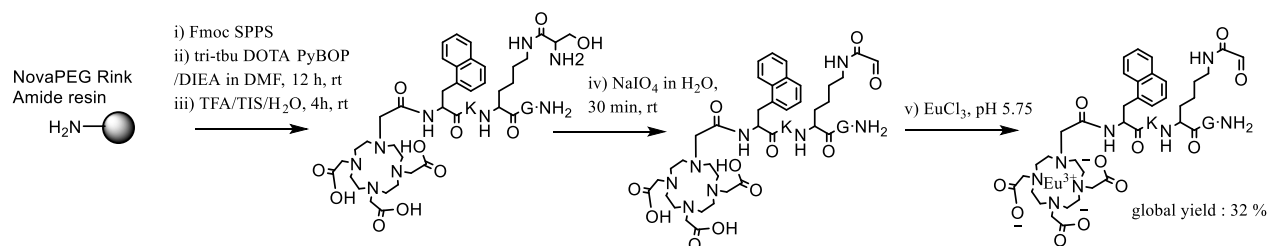


Figure IV.12. : Voie synthétique pour la préparation du fragment 2^{Eu} .

Les deux fragments ont été ensuite couplés par ligation oxime. Dans ce but un équivalent d'oxime et deux d'aldéhyde ont été dissous dans une solution à 0,1% TFA (pH 2) (fig. IV.13.). La réaction a été agitée pendant 1h30 jusqu'à conversion totale pour mener au composé d'intérêt avec un rendement de 50 % après purification.

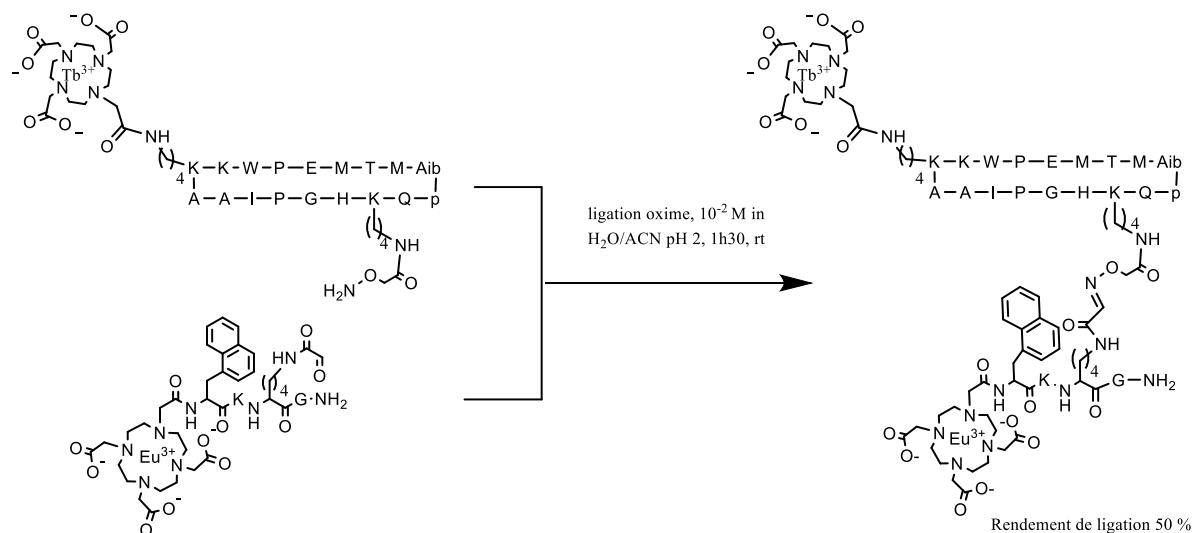


Figure IV.13. : (En haut) Synthèse de la sonde LCCR1(Tb,Eu) par assemblage des fragments 1^{Tb} et 2^{Eu} .

Nous avons donc synthétisé par une méthode convergente une sonde bis-lanthanide. La sonde a été synthétisée en deux fragments qui sont sélectivement complexés au lanthanide puis lié par ligation oxime.

La sonde CC9 lie Cu^+ mais elle est également capable de lier Ag^+ par interaction cation- π . L' Ag^+ n'est pas sensible à l'oxygène, les titrages avec ce métal peuvent être réalisés à l'air. Pour des raisons pratiques, la sonde LCCR1(Tb,Eu) a été étudiée par titrage aérobie avec de l'argent.

IV.2.2. Caractérisations spectroscopiques : titrage à l'Ag⁺ en milieu aérobie

Le titrage du peptide LCCR1(Tb,Eu) en milieu aérobie par de l'Ag⁺ induit une augmentation de la luminescence de l'euporium d'un facteur 7,5 jusqu'à un équivalent mais ne modifie presque pas l'intensité de luminescence du terbium (fig. IV.14.). La sonde répond donc à la présence d'Ag⁺ selon la formation d'un complexe 1 : 1.

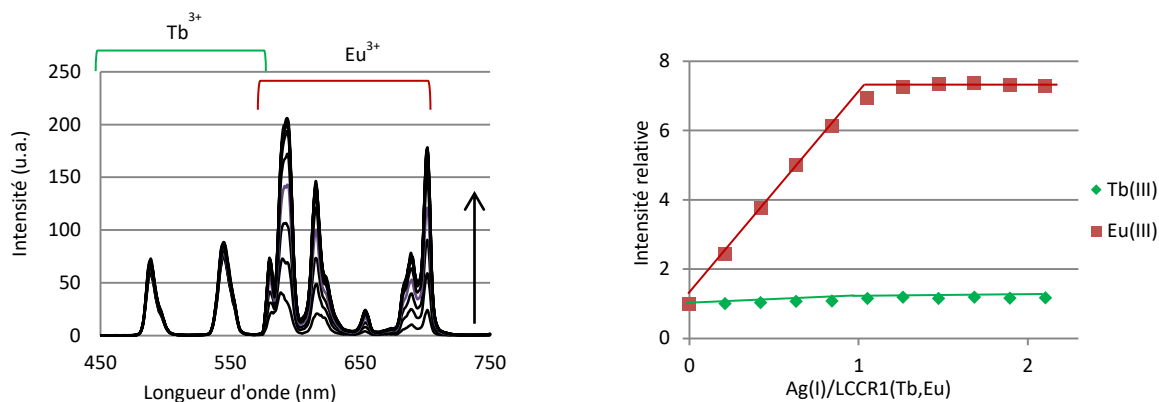


Figure IV.14. : (A gauche) Spectre en temps résolu du peptide LCCR1(Tb,Eu) titré par de l'Ag⁺ en milieu aérobie. (A droite) Evolution du signal du terbium et de l'euporium en fonction des ajouts d'Ag⁺ en milieu aérobie. 20 μM LCCR1(Tb,Eu), 10 mM HEPES pH 7.5, λ_{ex} = 280 nm, fente d'émission 5/fente d'excitation 10, PM 750 V, délai 200 μs, temps d'intégration 2 ms.

De ce fait le rapport ratiométrique de la sonde correspondant au rapport de l'intensité de l'euporium sur le terbium augmente linéairement jusqu'à un équivalent d'Ag⁺ (fig. IV.15.). La sonde est bien ratiométrique dans les conditions aérobie en présence d'Ag⁺.

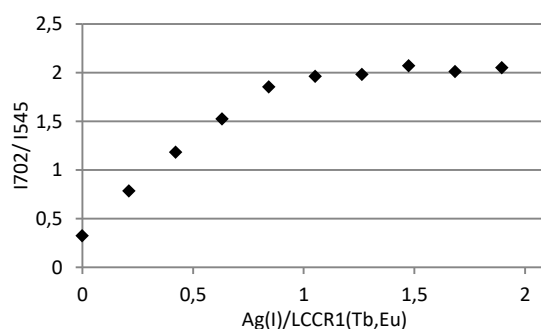


Figure IV.15. : Rapport ratiométrique de la sonde LCCR1(Tb,Eu), se définissant comme le rapport l'intensité de l'euporium à 702 nm par l'intensité du terbium à 545 nm lorsqu'elle est titrée par de l'Ag⁺ en milieu aérobie.

IV.2.3. Conclusion

La sonde LCCR1(Tb,Eu) s'allume en présence d'Ag⁺ et est ratiométrique. Cependant nous nous attendions à ce que l'euporium, dont la distance avec l'antenne ne varie pas, ait une intensité constante et que celle du terbium augmente lors des ajouts de métal. Expérimentalement le comportement observé est l'inverse. Les mécanismes spectroscopiques impliqués dans cette sonde sont donc inattendus et intéressants à étudier. Dans le but de les élucider nous avons souhaité synthétiser plusieurs mutants qui seront décrits par la suite. Ces

mutants sont caractérisés par le retrait de l'antenne naphthalène (l'acide aminé portant le groupement naphthalène est substitué par une alanine) et/ou par le remplacement des lanthanides europium et/ou terbium par le gadolinium ou le lanthane (non émissif). Nous avons commencé à synthétiser une molécule mutante dans laquelle l'europium est substitué par du lanthane. Lors de l'analyse de cette molécule nous avons observé un problème de photostabilité jamais constaté avec CC9. Nous avons suspecté un problème avec l'oxime. De plus, les rendements de synthèse du fragment cyclique 1^{Tb} sont faibles. Ces différentes raisons nous ont poussé à changer de stratégie de synthèse afin de faciliter la synthèse du fragment cyclique. La ligation permettant de coupler les deux fragments a donc été modifiée. Nous avons choisi d'utiliser les propriétés nucléophiles de la cystéine afin de réaliser un couplage et ainsi de s'affranchir de la synthèse d'un acide aminé modifié (Fmoc-Lys(N-EEI-Aoa)-OH et Fmoc-Lys(Boc-Ser(*t*Bu))-OH).

IV.3. Stratégie thiol-maléimide

La chaîne latérale du résidu cystéine porte un groupement thiol très réactif. Une des méthodes les plus populaires de conjugaison par une fonction thiol est le couplage thiol-maléimide. Cette stratégie nécessite donc l'introduction d'une cystéine et d'un maléimide sur chaque fragment. L'introduction du maléimide se fait via l'acide 3-(Maleimido-1-yl)propanoïque commercial. L'introduction de la cystéine se réalise en routine lors de la SPPS, elle est placée sur le fragment cyclique. Afin de garder un espacement entre les deux fragments importants, l'acide 3-(Maleimido-1-yl)propanoïque est introduit sur la chaîne latérale d'une lysine (fig. IV.16.).

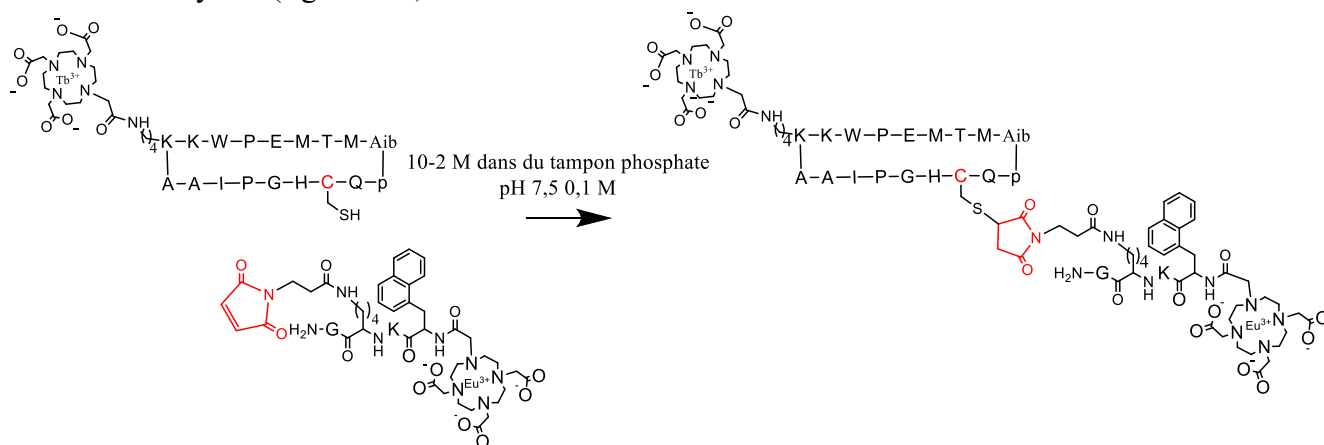


Figure IV.16. : Synthèse de la sonde LCCR2(Tb,Eu) par assemblage des fragments 3^{Tb} et 5^{Eu} .

III.3.1. Synthèse

Deux stratégies ont été testées pour la synthèse du fragment 3^{Tb} .

- (1) Le fragment a été cyclisé en solution en présence de PyBOP en milieu basique.
- (2) Le fragment a été cyclisé par ligation native.

- 1) La synthèse du fragment 3^{Tb} a été réalisée manuellement de façon similaire à la synthèse 1^{Tb} , la seule différence est l'introduction dans la séquence de l'acide aminé standard Fmoc-Cys(Trt)-OH à la place du Fmoc-Lys(N-EEI-Aoa)-OH par un couplage standard. Le fragment a été métallé par du terbium (fig. IV.18.).

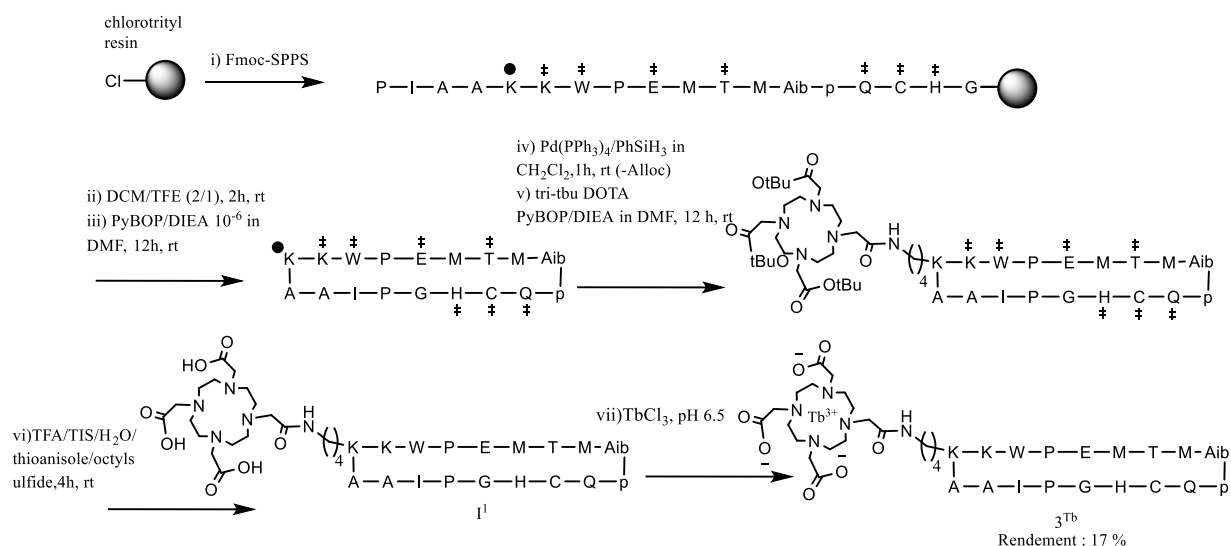


Figure IV.17. : Voie synthétique n°1 pour la préparation du fragment 3^{Tb} .

Le chromatogramme du composé cyclique déprotégé noté I^1 est représenté sur la figure IV.18. Le brut n'est pas pur, des produits secondaires se trouvent au pied du bon pic, cependant leur proportion est beaucoup plus faible que pour la synthèse du fragment cyclique oxyamine. Le brut correspond davantage à ceux obtenus lors de la synthèse de CC9. Le fragment cyclique 3^{Tb} est obtenu avec un rendement de synthèse global de 17%.

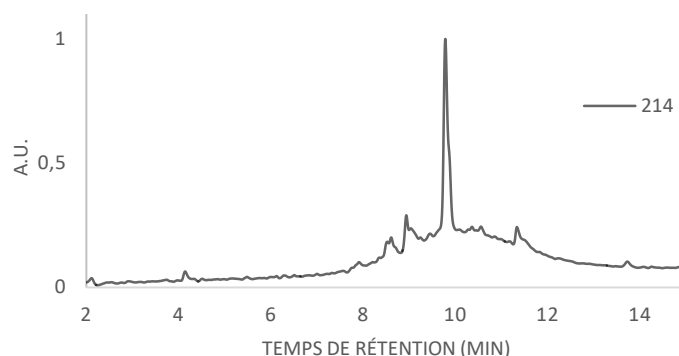


Figure IV.18. : Chromatogramme du précurseur déprotégé I^1 .

- 1) Le fragment peptidique a été synthétisé manuellement sur résine SEA. La séquence peptidique est la même que celle du cas n°1, cependant le peptide a été synthétisé de l'acide aminé Fmoc-Gln(Trt)-OH jusqu'au résidu non standard Boc-Cys(Trt)-OH. Le retrait de l'alloc de la chaîne latérale d'un des résidus lysines ainsi que le couplage du DOTA se réalisant sur support, il a donc été nécessaire de protéger le résidu N-

terminal par un Boc (voir chapitre II). Les groupements protecteurs ont été retirés et le peptide a été décroché en présence de TFA et de scavengers pendant 4h. Le fragment a ensuite été cyclisé par ligation native dans les conditions standards (fig. IV.19.).

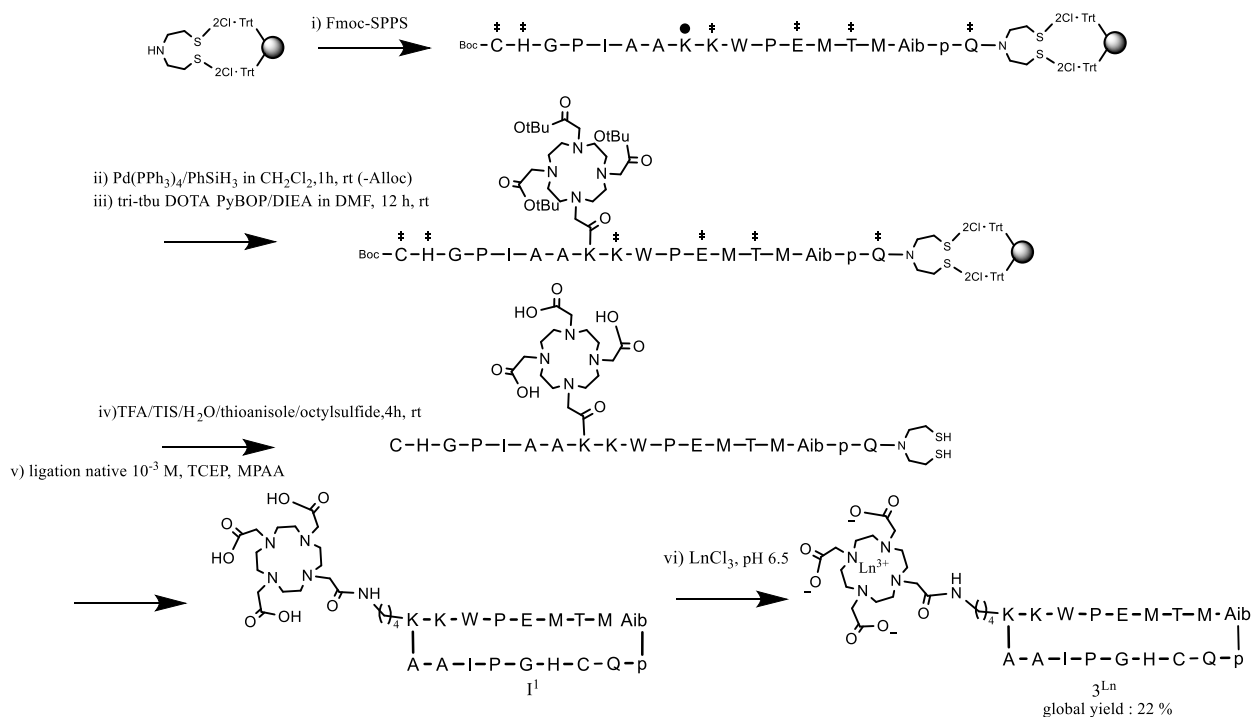


Figure IV.19. : Voie synthétique n°2 pour la préparation du fragment 3^{Ln}.

Le chromatogramme du composé brut noté I¹ sur la figure IV.20. indique qu'il n'est pas pur, cependant les produits secondaires sont majoritairement décalés. La purification est donc facilitée et le rendement de 22 % après purification encore amélioré.

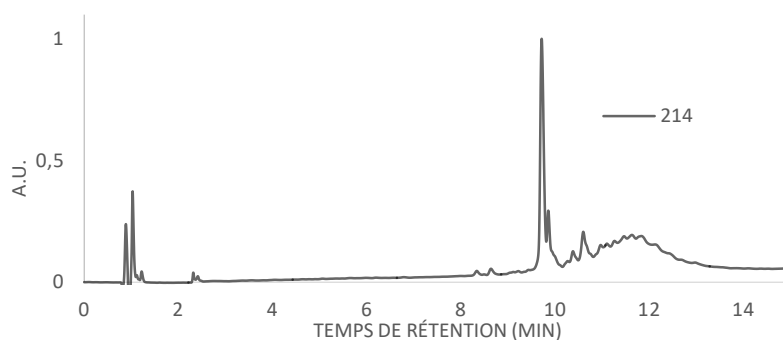


Figure IV.20. : Chromatogramme du précurseur déprotégé I¹.

Le fragment linéaire maléimide a été assemblé manuellement sur résine NovaPEG Rink Amide par couplage standard. L'extrémité N-terminale a été couplé à du DOTA-*tris*(*t*Bu)ester une nuit en présence de PyBOP et de DIEA. Le groupement alloc du résidu Fmoc-Lys(Alloc)-OH introduit durant la SPPS a été retiré dans les conditions standards. L'acide maléimidopropionique a été ensuite couplé sur la chaîne latérale de la lysine en

présence de PyBOP et de DIEA. Le peptide a ensuite été décroché de la résine en présence de TFA/TIS/H₂O/thioanisole puis métallé par de l'euprimum ou du gadolinium (fig. IV.21.).

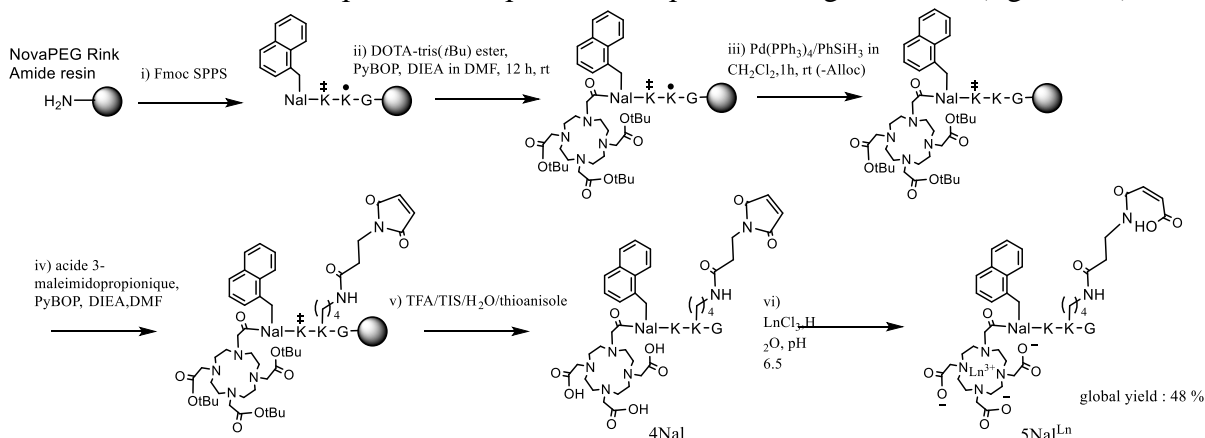


Figure IV.21. : Voie synthétique n°2 pour la préparation du fragment 5NaI^{Ln} (Ln³⁺=Eu³⁺ ou Eu³⁺).

Les composés notés 4NaI et 5NaI^{Ln} ont été caractérisés par spectrométrie de masse et HPLC analytique. L'analyse du composé 5NaI^{Ln} montre un pic unique dont la masse est supérieure de 18 unités à la masse attendue. Cette masse est cohérente avec l'hydrolyse du maléimide. Cette hydrolyse a eu lieu lors de la complexation du lanthanide puisque la masse du composé 4NaI correspond à la forme fermée du maléimide. Elle peut potentiellement être due à la catalyse de l'hydrolyse par les lanthanides polyhydratés.

Les deux fragments ont été ensuite assemblés par couplage thiol-maléamide (fig. IV.22.). Un premier test de couplage dans les conditions de couplage thiol-maléamide a été réalisé en présence de deux équivalents de 5NaI^{Ln} (5 mM dans du Tampon phosphate) et d'un équivalent de 3^{Tb} (300 μM, tampon phosphate) maléamide^[148]. La réaction mène à 80 % de conversion au bout d'une semaine. Le temps de réaction étant long nous avons poussés les conditions : deux équivalents de 5NaI^{Ln} ont été dissous à 50 mM dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,5 puis déposés sur un équivalent de 3^{Tb}. La réaction de formation de la sonde LCCR1(Tb,Eu) a été suivie par HPLC analytique, après disparition du pic correspondant au fragment 3^{Tb} le mélange réactionnel est directement purifié par HPLC préparative. Un temps de 24h est considéré comme suffisant dans nos conditions pour permettre une conversion de 80 %.

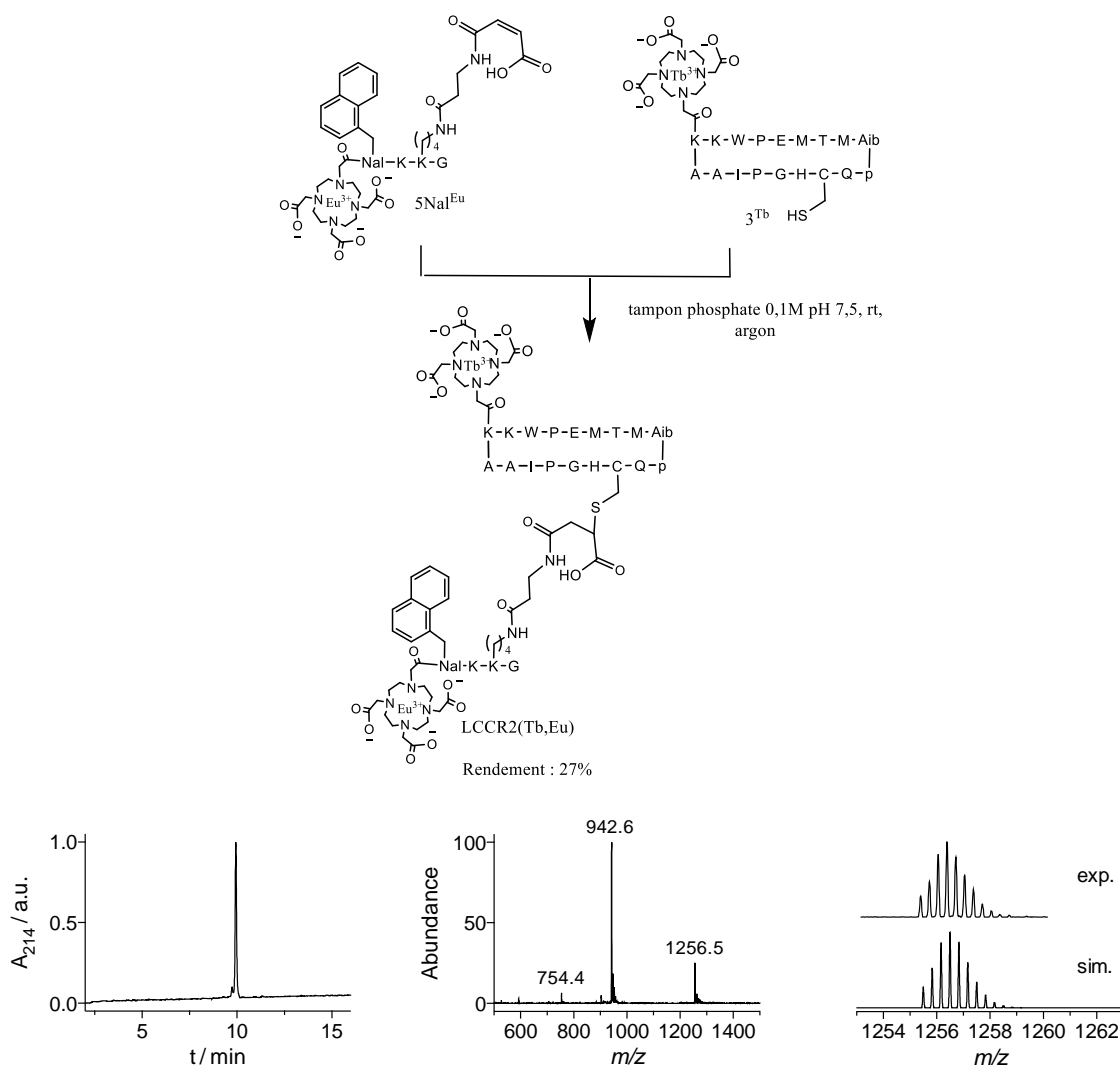


Figure IV.22. : (En haut) Voie synthétique pour la préparation de LCCR2(Tb, Eu). Seulement un des deux régio-isomères issu du couplage thiol-maléamide est représenté. (En bas à gauche) Chromatogramme HPLC, (en bas au milieu) spectre ESI-MS et (en bas à droite) massif isotopique expérimental et théorique pour la sonde LCCR2(Tb, Eu) Masse calculée : 1256.62 [M+3H]³⁺, 942.72 [M+4H]⁴⁺, 754.38 [M+5H]⁵⁺ pour M = C₁₅₅H₂₃₂EuN₄₀O₄₄S₃Tb.

Nous avons donc synthétisé par méthode convergente le composé bis-lanthanide LCCR2(Tb, Eu). L'utilisation du couplage thiol maléamide à la place du lien oxime facilite la synthèse du fragment cyclique (absence d'acide aminé modifié, purification plus aisée), et permet d'avoir des rendements du fragment augmenté d'un facteur 3.

III.3.2. Caractérisations spectroscopiques et physicochimiques

Absorption

Le spectre d'absorption de la sonde LCCR2(Tb, Eu) présente une bande à 280 nm correspondant à l'interaction π - π^* du tryptophane et du naphthalène (fig. IV.23.).

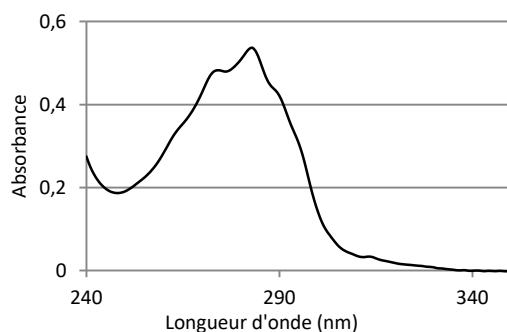


Figure IV.23. : Spectre d'absorption de la sonde LCCR2(Tb,Eu). 5 μ M LCCR2(Tb,Eu), 10 mM HEPES pH 7.5.

III.3.2.1. Titrage au Cu^+

Cu^+ étant instable dans l'eau (dismutation) et en présence de dioxygène (oxydation en Cu^{2+}), les solutions ont été préparées en boîte à gants dans un tampon contenant de l'hydroxylamine. Cu^+ est généré à partir de Cu^{2+} par réduction par l'hydroxylamine^[149].

Fluorescence

L'émission de fluorescence diminue lors des ajouts de Cu^+ jusqu'à atteindre un plateau à un équivalent. La diminution du signal est de 60% (fig. IV.24.). L'interaction cation- π se traduit notamment par l'extinction de fluorescence du tryptophane, ce phénomène est retrouvé dans la sonde LCCR2(Tb,Eu).

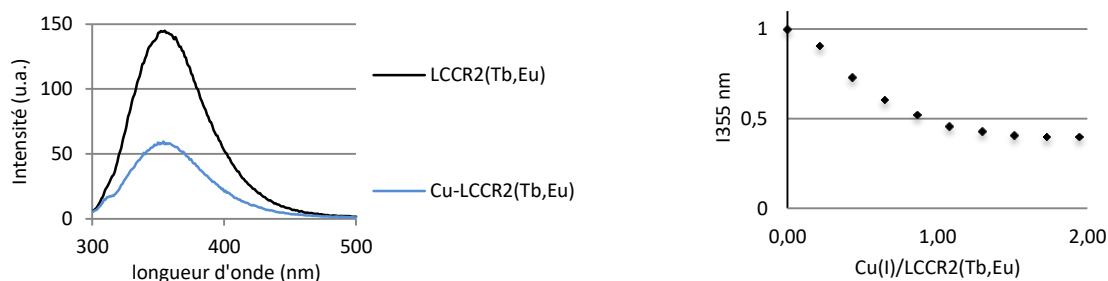


Figure IV.24. : Spectre de fluorescence de la sonde LCCR2(Tb,Eu) avec et sans Cu^+ . 5 μ M LCCR2(Tb,Eu), 10 mM HEPES pH 7,5, 2mM hydroxylamine. $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm, fente d'émission 5/fente d'excitation 5, PM 700V.

Le spectre d'excitation de fluorescence de la sonde LCCR2(Tb,Eu) ($\lambda_{\text{em}} = 355$ nm) présente le même profil que le spectre d'absorption (fig. IV.25.). L'excitation du peptide correspond bien à l'absorption des antennes tryptophane et naphthalène.

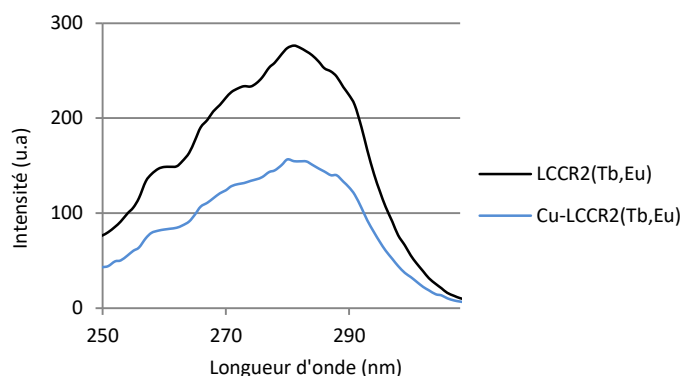


Figure IV.25. : Spectre d'excitation de fluorescence de la sonde LCCR2(Tb,Eu), $\lambda_{\text{em}} = 355$ nm, fente d'émission 5/fente d'excitation 5, PM 750 V. 10 μM LCCR2(Tb,Eu), 10 mM HEPES pH 7.5, 2 mM hydroxylamine.

Luminescence

L'émission du Tb^{3+} et de Eu^{3+} augmente linéairement au cours des ajouts de Cu^+ jusqu'à atteindre un plateau à un équivalent, la sonde répond bien à la formation du complexe 1 : 1. Le contraste associé à l'euporium est de 3,2 alors que celui du terbium est de 1,4 (fig. IV.26.).

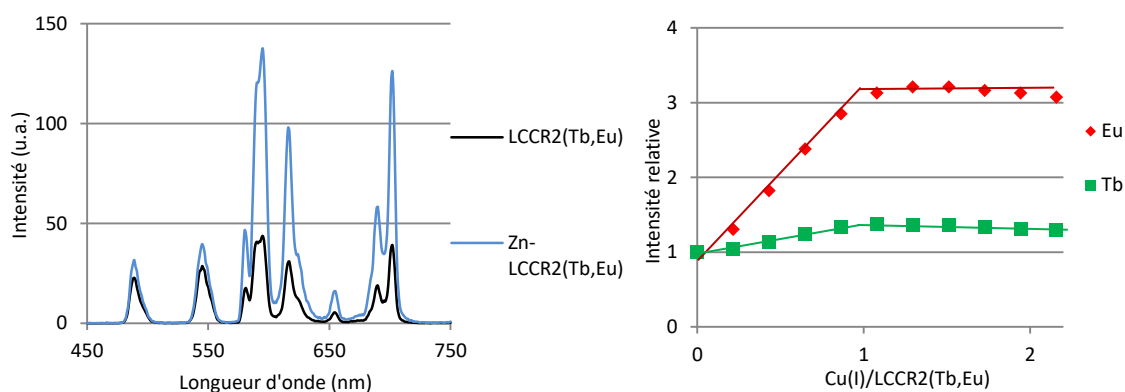


Figure IV.26. : (A gauche) Spectre en temps résolu du peptide LCCR2(Tb,Eu) avec et sans Cu^+ . (A droite) évolution du signal du terbium et de l'euporium en fonction des ajouts de Cu^+ . 5 μM LCCR2(Tb,Eu), 10 mM HEPES pH 7.5, 2 mM hydroxylamine, $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm, fente d'émission 5/fente d'excitation 10, PM 750 V, délai 200 μs , temps d'intégration 2 ms.

Le rapport ratiométrique I_{702}/I_{545} , correspondant à l'émission de Eu^{3+} sur celle du Tb^{3+} , augmente linéairement jusqu'à un équivalent de Cu^+ (fig. IV.27.). La sonde permet donc bien la détection ratiométrique du Cu^+ .

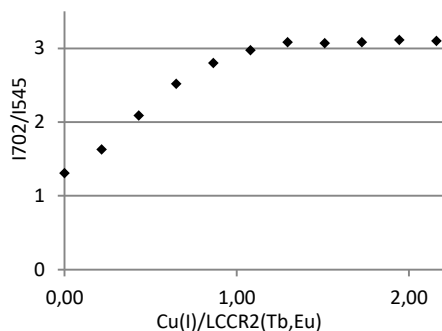


Figure IV.27. : Rapport de l'émission de l'euporium (702 nm) par l'émission du terbium (545 nm) pour la sonde LCCR2(Tb,Eu) en milieu anaérobie.

Les spectres d'excitation de luminescence de la sonde LCCR2(Tb,Eu) ($\lambda_{em} = 545, 702$ nm) présentent un pic à 280 nm correspondant à l'absorption des antennes (fig. IV.28.). Dans le cas de la protéine CusF l'interaction cation- π se traduit par le déplacement bathochrome de la bande d'absorption $\pi \rightarrow \pi^*$ du tryptophane. On retrouve ce déplacement dans la sonde LCCR2(Tb,Eu) puisque les spectres d'excitation de luminescence du peptide lié au cuivre(I) sont déplacés vers le rouge par rapport au peptide libre. Ainsi les spectres d'excitation de luminescence sont sensibles à l'interaction cation- π .

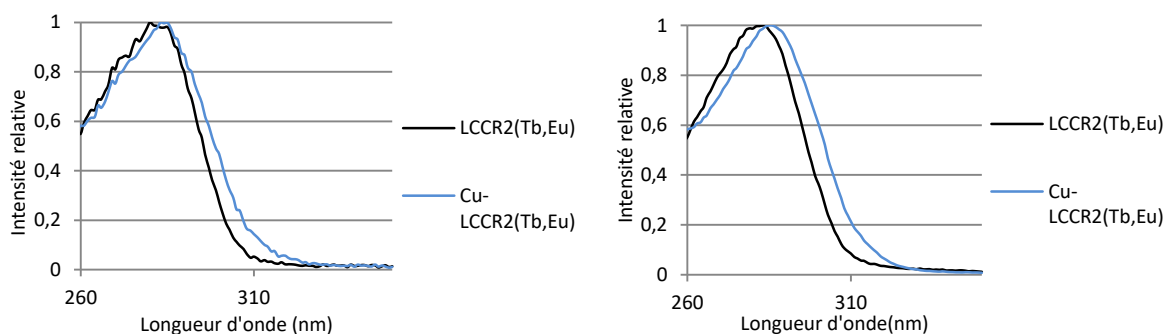


Figure IV.28. : Spectres d'excitation de luminescence de la sonde LCCR2(Tb,Eu), (à gauche) $\lambda_{em} = 545$ nm, fente d'émission 5/fente d'excitation 10, PM 800 V, (à droite) $\lambda_{em} = 702$ nm, fente d'émission 5/fente d'excitation 10, PM 700 V. 5 μ M LCCR2(Tb,Eu), 10 mM HEPES pH 7.5, 2 mM hydroxylamine.

Comme dans le cas de la sonde LCCR1(Tb,Eu) l'émission de l'euporium augmente lors des ajouts de métal et celle du terbium reste quasi constante. Le comportement inattendu de la sonde est donc conservé lorsqu'on modifie le lien entre les deux fragments.

Sélectivité

La sélectivité de la sonde pour le Cu^+ vis-à-vis des métaux physiologiques a été étudiée. Aucun métal physiologique ne modifie la réponse de la sonde en absence ou en présence de Cu^+ (fig. IV.29.). La sonde est bien sélective de cet analyte.

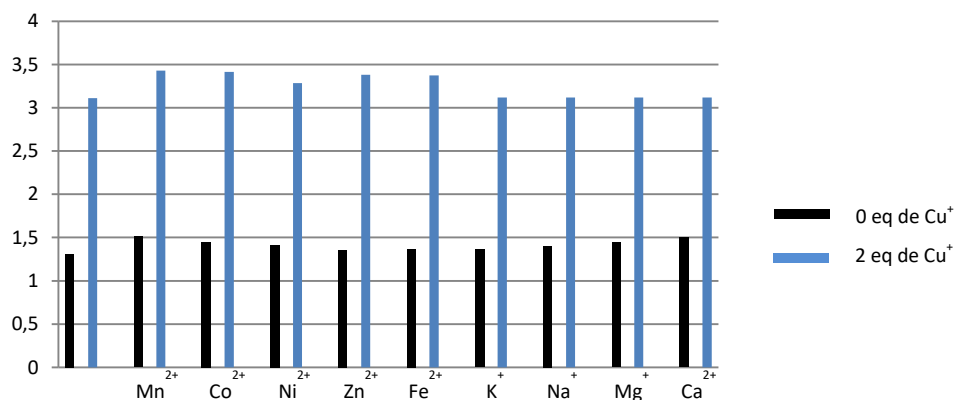


Figure IV.29. : Diagramme de sélectivité du peptide LCCR2(Tb,Eu) (5 µM) montrant l'évolution de l'émission de luminescence en temps résolu en absence (noir) et en présence (bleu) de Ag^+ (10 µM) en milieu aérobie après l'addition de différents cations : Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} (10 µM), Na^+ , K^+ , (50 mM), Mg^{2+} , Ca^{2+} (10 mM).

Affinité

L'affinité de la sonde a été mesurée par la même méthode que celle utilisée précédemment mais en utilisant l'imidazole comme compétiteur. L'imidazole forme des complexes 1 : 1 et 1 : 2 avec le Cu^+ [150]. La sonde a été titrée en présence de Cu^+ et de compétiteur. La valeur de l'affinité a été obtenue grâce au logiciel *Specfit* et est de $\log K = 9,7 \pm 0,2$. Cette valeur est proche de celle trouvée dans le cas de la sonde intensiométrique ($\log K = 9,3 \pm 0,2$), ainsi l'addition d'un fragment modifie très peu l'affinité de la sonde.

III.3.2.2. Titrage à Ag^+

La sonde CC9 et la sonde ratiométrique oxime sont également capables de lier Ag^+ par interaction cation- π . Des titrages similaires ont été effectués sur la sonde LCCR2(Tb,Eu) avec ce métal en milieu anaérobie et aérobie. Le profil des spectres de fluorescence ainsi que l'extinction est similaire à celui observé pour le titrage au Cu^+ . Les spectres de luminescence de la sonde LCCR2(Tb,Eu) dans les différentes conditions expérimentales sont représentés figure IV.30. Le comportement global de la sonde est la même quelques soit les conditions : les signaux des lanthanides augmentent linéairement jusqu'à un équivalent de métal, celui de l'euprotium augmente de façon nettement supérieur à celui du terbium.

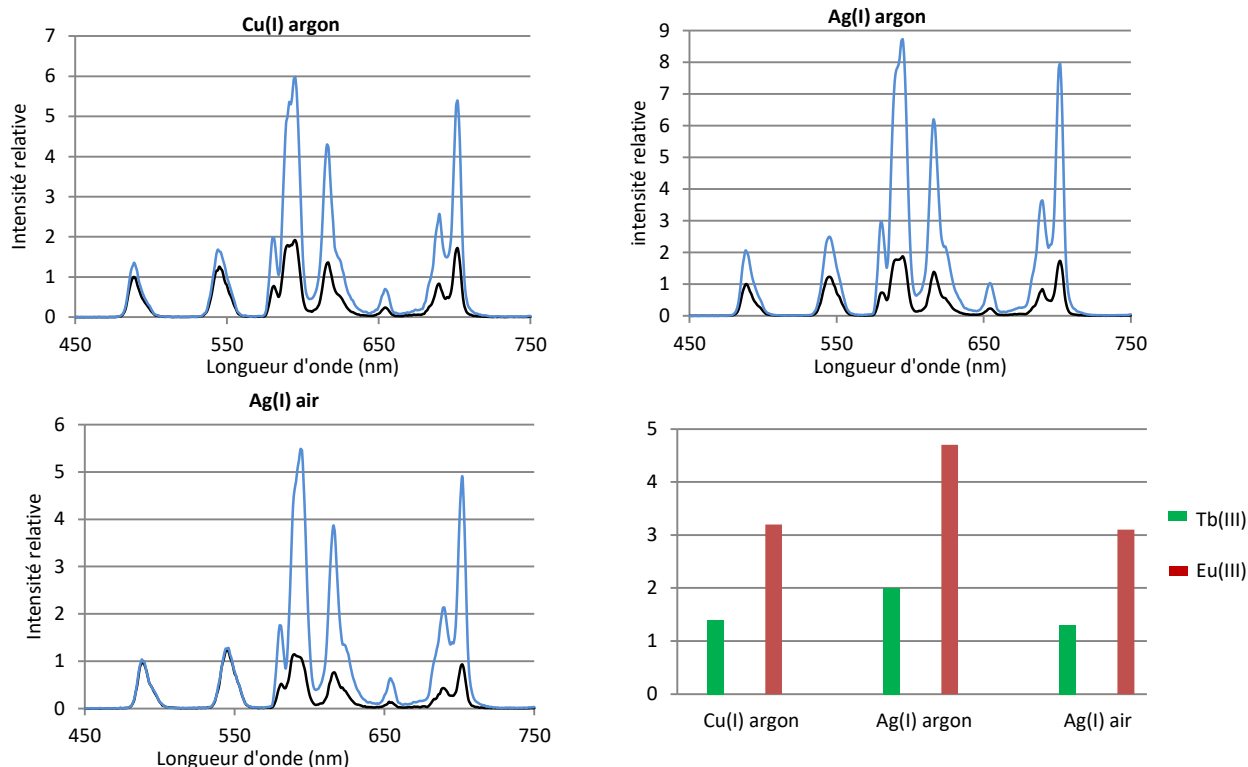


Figure IV.30. : Spectre en temps résolu du peptide LCCR2(Tb,Eu) (en haut à gauche) avec et sans Cu^+ , (en haut à droite) avec et sans Ag^+ en milieu anaérobie, (En bas à droite) avec et sans Ag^+ en milieu aérobie. 5 μM LCCR2(Tb,Eu), 10 mM HEPES pH 7.5, $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, délai 200 μs , temps d'intégration 2 ms. En noir : en absence de métal, en bleu : en présence de métal. (En bas à droite) Augmentation de la luminescence du Tb^{3+} et de Eu^{3+} de la sonde LCCR2(Tb,Eu) dans les différentes conditions expérimentales.

La présence d'air ne modifie pas de façon significative le comportement de la sonde. Cependant les intensités enregistrées dans les mêmes conditions sont 5 fois plus intense en milieu anaérobie qu'en milieu aérobie ce qui est cohérent avec l'implication des états triplets des antennes dans les transferts électroniques.

Affinité

L'affinité de la sonde pour l'argent(I) a été mesurée. Les valeurs obtenues sont dans la même gamme que celles obtenues pour la sonde intensiométrique, l'ajout d'un fragment ne modifie pas de façon significative l'affinité de la sonde (tabl. IV.1.).

Tableau IV.1. : Log K de la sonde LCCR2(Tb,Eu) vis-à-vis de l' Ag^+ et le Cu^+ .

	$\text{Ag}^+ \log K \pm 0,2$	$\text{Cu}^+ \log K \pm 0,2$
LCCR2(Tb,Eu)	7,1	9,7
CC9	7,3	9,3

Nous avons donc développé une nouvelle voie de synthèse convergente qui a permis l'obtention d'une sonde ratiométrique pour la détection du cuivre et de l'argent.

IV.3.3. Etude mécanistique de la sonde

La sonde LCCR2(Tb,Eu) présente un comportement contre-intuitif avec une augmentation de l'émission de l'euporium et une stabilité de l'émission du terbium lors de l'ajout de métal. Les propriétés physicochimiques indiquent la formation d'un complexe 1 : 1 uniquement, comme pour la sonde CC9 et les propriétés spectroscopiques vont dans le sens de la formation d'une interaction cation- π entre le tryptophane et le cation métallique comme pour CC9. Afin de mieux comprendre d'où peut provenir ce comportement contre-intuitif, nous avons commencé par déterminer le nombre de molécules d'eau liées à chacun des deux lanthanides, q_{Tb} et q_{Eu} . Pour cela, nous avons mesuré les temps de vie de luminescence du terbium (τ_{Tb}) et de l'euporium (τ_{Eu}) de LCCR2(Tb,Eu) dans des mélanges de H_2O et D_2O en absence et en présence de Ag^+ (solutions aérées). La figure IV.31. (A et B) montre les graphes des vitesses de désexcitation des lanthanides en fonction du pourcentage de H_2O , qui nous ont permis de déterminer les temps de vie dans D_2O pur. Le tableau IV.2. résume les temps de vie et le nombre de molécules d'eau coordonnées au lanthanide. On constate que q_{Tb} et q_{Eu} restent inchangés et proches de 1 lors de l'ajout de l'ion métallique, indiquant que le phénomène observé ne provient pas d'un changement de la sphère de coordination des lanthanides. Les temps de vie de luminescence de l'euporium dans H_2O est de 0.6 ms, en accord avec ce que nous avons pour les sondes peptidiques à zinc avec un complexe DOTA[Eu] présentées dans ce manuscrit. Les temps de vie de luminescence du terbium (0.7-0.9 ms) sont, eux, plus bas que celui de CC9 (1.9 ms) ou ceux des sondes à zinc avec un complexe DOTA[Tb] (1.9 ms également). On peut aussi noter que τ_{Tb} augmente lorsque l'on ajoute Ag^+ . Ceci indique que le fragment contenant le naphthalène et l'euporium ajoute une voie de désexcitation supplémentaire pour le terbium par rapport à CC9. Un titrage avec Ag^+ (solution aérée préparée avec un tampon HEPES pH 7.5 dans H_2O) montre que τ_{Tb} augmente linéairement avec la concentration de Ag^+ jusqu'à un équivalent de Ag^+ et se stabilise ensuite (fig. IV.31.C). Le même type de variation a été observé en solution sous argon avec Ag^+ ou Cu^+ (fig. IV.31.D). Ce résultat est très intéressant car il montre que LCCR2(Tb,Eu) permet une détection en temps de vie du cation métallique. Ce mode de détection, intrinsèquement ratiométrique, est particulièrement intéressant et assez rare.

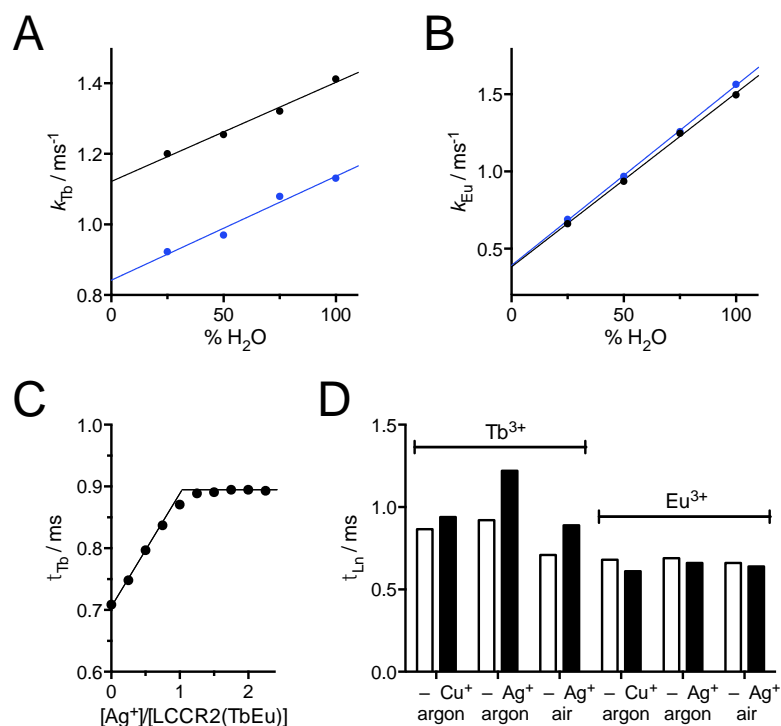


Figure IV.31. : (A, B) Variation de (A) k_{Tb} ($=1/\tau_{Tb}$) et (B) k_{Eu} ($=1/\tau_{Eu}$) en fonction de la proportion de H₂O dans un mélange H₂O/D₂O pour LCCR2(Tb,Eu) en absence (noir) et présence de Ag⁺ (bleu). (C) Evolution de τ_{Tb} lors du titrage de LCCR2(Tb,Eu) par Ag⁺ en solution aérée (HEPES pH 7.5 dans H₂O). (D) Comparaison des temps de vie de luminescence τ_{Tb} et τ_{Eu} de LCCR2(Tb,Eu) dans différentes conditions : absence et présence de cation métallique (Ag⁺ ou Cu⁺) et/ou d'oxygène dissous.

Tableau IV.2. : Temps de vie de luminescence dans H₂O (τ_{H_2O}) et dans D₂O (τ_{D_2O}) et nombre de molécules d'eau (q) pour le peptide LCCR2(Tb,Eu).

Peptide	τ_{Tb} ($\pm 0,03$ ms)		τ_{Eu} ($\pm 0,03$ ms)		q ($\pm 0,3$)	
	H ₂ O	D ₂ O	H ₂ O	D ₂ O	Tb	Eu
LCCR2(Tb,Eu)	0,71	0,89	0,67	2,63	1,2	1,0
Ag-LCCR2(Tb,Eu)	0,88	1,19	0,64	2,56	1,2	1,0

Comme nous l'avons vu précédemment, le spectre d'excitation de l'euporium est déplacé vers les basses énergies lors de la liaison du métal. Or l'absorption du tryptophane est déplacée à cause de l'interaction cation- π mais pas celle du naphthalène. Ceci indique que l'état excité 5D_0 de l'euporium est en partie peuplé suite à l'excitation du tryptophane. Il faut donc envisager que les deux couples antenne/lanthanide, bien qu'éloignés, ne soient pas isolés mais communiquent entre eux et que des transferts d'énergies entre les deux couples se produisent, et notamment un transfert du couple tryptophane/Tb³⁺ vers le couple naphthalène/Eu³⁺. Les transferts d'énergie pouvant se produire sont représentés sur la figure IV.32.

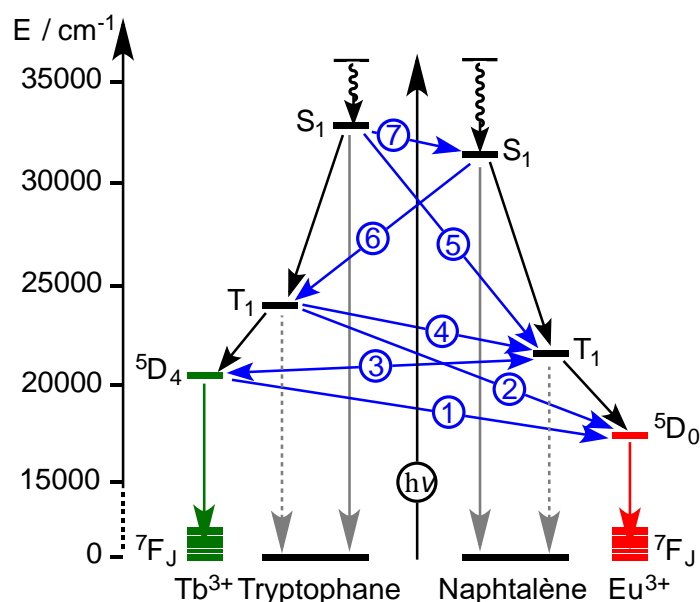


Figure IV.32. : Diagramme de Jablonski pour le système LCCR2(Tb, Eu). Les flèches bleues correspondent aux transferts d'énergie entre les deux couples antenne/lanthanide.

Les états singulets excités S_1 du tryptophane et du naphthalène sont situés à $32\,000\text{ cm}^{-1}$ et $31\,100\text{ cm}^{-1}$, respectivement^[151]. Les états triplets excités T_1 du tryptophane et du naphthalène sont situés à $24\,100\text{ cm}^{-1}$ et $21\,100\text{ cm}^{-1}$, respectivement^[151-153]. Les états excités émissifs du terbium (5D_4) et de l'euporium (5D_0) sont situés à $20\,400\text{ cm}^{-1}$ et $17\,200\text{ cm}^{-1}$, respectivement^[154]. Le tryptophane est connu pour sensibiliser le terbium principalement via son état triplet^[155,156]. C'est également le cas pour la sensibilisation de l'euporium par le naphthalène^[157]. Ces chemins de sensibilisation classiques pour les couples tryptophane/ Tb^{3+} et naphthalène/ Eu^{3+} sont représentés en noir sur la figure IV.32. Les transferts d'énergie entre les deux couples antenne/lanthanide sont représentés en bleu sur la figure IV.32. Le transfert $\text{Tb}^{3+}(^5D_4) \rightarrow \text{Eu}^{3+}(^5D_0)$ (Flèche bleue n°1) a déjà été mis en évidence dans la littérature avec une séparation d'environ 12 \AA entre les ions et peut selon la théorie se produire à plus longue distance^[158] ($>20\text{ \AA}$). La littérature montre que le tryptophane ne sensibilise pas ou très mal l'euporium^[159], mais l'interaction cation- π peut potentiellement changer quelque chose à cela. Le transfert d'énergie $\text{Trp}(T_1) \rightarrow \text{Eu}(^5D_0)$ doit donc être considéré (Flèche bleue n°2). Le naphthalène est capable de sensibiliser le terbium par transfert d'énergie de son état triplet et le transfert retour est thermiquement possible : le transfert $\text{Nal}(T_1) \rightleftharpoons \text{Tb}(^5D_4)$ peut donc avoir lieu dans les deux directions^[157] (Flèche bleue n°3). Des transferts d'énergie sont également possibles entre états excités du tryptophane et du naphthalène. Tout d'abord, le transfert d'énergie entre états de même spin $\text{Trp}(S_1) \rightarrow \text{Nal}(S_1)$ (Flèche bleue n°7) et $\text{Trp}(T_1) \rightarrow \text{Nal}(T_1)$ (Flèche bleue n°4) sont autorisés. Les transferts d'énergie entre états de spins différents $\text{Trp}(S_1) \rightarrow \text{Nal}(T_1)$ (Flèche bleue n°5) et $\text{Nal}(S_1) \rightarrow \text{Trp}(T_1)$ (Flèche bleue n°6) ne sont en principe pas autorisés. Cependant, l'interaction cation- π favorise le croisement intersystème (ISC) si bien que le transfert d'énergie $\text{Trp}(S_1) \rightarrow \text{Nal}(T_1)$ (Flèche bleue n°5) et

Nal(S₁) → Trp(T₁) (Flèche bleue n°6) doivent être envisagés en présence du cation métallique^[160].

Afin de comprendre la nature des transferts d'énergies qui gouvernent le comportement de la sonde LCC2R(Tb,Eu), nous avons réalisé une étude mécanistique en « mutant » la sonde peptidique à l'instar de ce qui se fait en biochimie avec la mutagenèse dirigée pour élucider un mécanisme enzymatique et comprendre le rôle des acides aminés du site actif de l'enzyme. Nous avons synthétisé une série de molécules au sein desquels nous avons éliminé un ou plusieurs éléments parmi les ions Tb³⁺ et Eu³⁺ et le naphthalène. Le tryptophane a systématiquement été conservé dans ces mutants car il participe à la coordination du cation Cu⁺ ou Ag⁺ et l'interaction cation- π , qui s'établit entre le tryptophane et le cation, est responsable de la réponse de la sonde. Pour éliminer les ions Tb³⁺ ou Eu³⁺ sans changer de manière drastique la molécule LCCR2, nous les avons simplement remplacés par l'ion Gd³⁺ dont les états excités sont trop hauts en énergie pour qu'il soit sensibilisé dans notre système. L'ion Gd³⁺ est donc spectateur : il n'est donc pas émissif et ne peut être ni accepteur, ni donneur d'énergie. Pour éliminer le naphthalène, nous avons choisi de remplacer l'acide aminé naphtylalanine par une alanine. Nous avons donc synthétisé trois nouvelles molécules contenant le naphthalène, LCCR2(Tb,Gd), LCCR2(Gd,Eu) et LCCR2(Gd,Gd), et trois molécules sans naphthalène, LCCR2 Δ (Tb,Gd), LCCR2 Δ (Gd,Eu) et LCCR2 Δ (Tb,Eu). Celles-ci ont été obtenues par couplage thiol-maléamide du composé 3^{Ln1} (Ln1 = Tb³⁺ ou Gd³⁺) avec soit 5Nal^{Ln2} ou 5Ala^{Ln2} (Ln2 = Tb³⁺ ou Gd³⁺) comme illustré sur la figure IV.33. Leur synthèse est décrite en partie expérimentale. Chaque molécule a été obtenue avec une pureté >95% (HPLC) et identifiée par spectrométrie de masse (ESI-MS). Une représentation schématique de ces molécules est également donnée sur la figure IV.33.

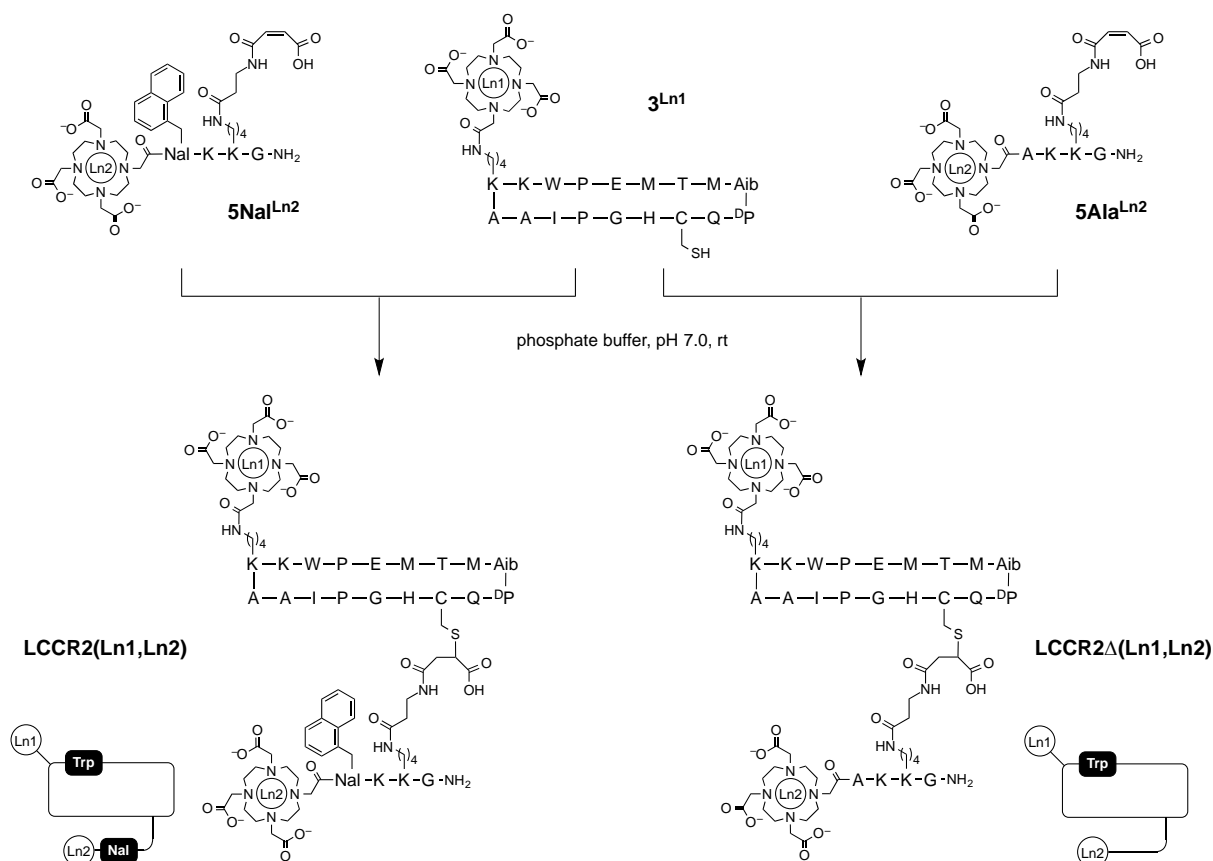


Figure IV.33. : Schéma de synthèse des « mutants » LCCR2(Ln1, Ln2) et LCCR2Δ(Ln1, Ln2) (Ln1 = Tb^{3+} ou Gd^{3+} , Ln2 = Eu^{3+} ou Gd^{3+}) et leurs représentations schématiques.

LCCR2(Tb, Eu) se comporte de manière assez semblable avec Ag^+ et Cu^+ . Par la suite, nous présenterons essentiellement le comportement des mutants avec Ag^+ , d'une part, parce que les tendances sont les mêmes et, d'autre part, pour une raison de simplicité. En effet, nous avons vu avec CC9 que l'interaction cation- π abaisse l'énergie de l'état triplet excité (T_1) du tryptophane. Cette baisse est plutôt faible pour Ag^+ ($\Delta E \sim 600 \text{ cm}^{-1}$ soit $E(T_1) = 23\,500 \text{ cm}^{-1}$) mais conséquente pour Cu^+ ($\Delta E \sim 2\,300 \text{ cm}^{-1}$), ce qui amène l'état triplet excité du tryptophane ($E(T_1) = 21\,800 \text{ cm}^{-1}$) à un niveau très proche de celui du naphthalène ($E(T_1) = 21\,100 \text{ cm}^{-1}$). Nous préférons ne pas présenter le cas de Cu^+ pour ne pas avoir à en tenir compte. Pour tous ces composés, nous avons fait des mesures en absence d'oxygène (solutions que nous appelons dégazées, préparées en boîte à gant sous argon) et en présence d'oxygène (solutions préparées à l'air) pour voir un éventuel effet de l'oxygène sur les états triplets et l'émission des lanthanides. Toutes ces molécules ont été étudiées à la même concentration (10 μM) dans le même tampon (HEPES 10 mM pH 7.5) et tous les spectres ont été enregistrés avec les mêmes réglages du spectromètre d'une molécule à l'autre pour pouvoir directement comparer les intensités émises.

Nous avons commencé par vérifier que l'adjonction d'un fragment peptidique à CC9 n'a pas d'influence notable sur son comportement. Pour cela, nous avons utilisé le composé LCCR2 Δ (Tb,Gd). Si c'est le cas, cette molécule qui ne présente ni le naphthalène, ni l'euporium doit se comporter comme CC9. Comme indiqué précédemment, nous avons étudié l'effet de l'addition de Ag⁺ à LCCR2 Δ (Tb,Gd), en solution aérée et dégazée. Nous avons pu observer des propriétés très similaires à celles de CC9. Les intensités d'émission de fluorescence du tryptophane et de luminescence du terbium sont similaires en l'absence de Ag⁺. L'addition de Ag⁺ provoque une extinction de la fluorescence (légèrement plus faible cependant : 63% contre 75% pour CC9) et un déplacement bathochrome de la bande d'absorption du tryptophane, qui indiquent la formation de l'interaction cation- π , ainsi qu'une augmentation de l'émission du terbium avec des contrastes très similaires (fig. IV.34.). Le temps de vie du terbium reste égal à 1.9 ms avec ou sans Ag⁺, comme pour CC9. Nous pouvons donc conclure de ces résultats que le fragment DOTA[Ln]-peptide ajouté par couplage thiol-maléamide ne perturbe pas le fonctionnement de la sonde.

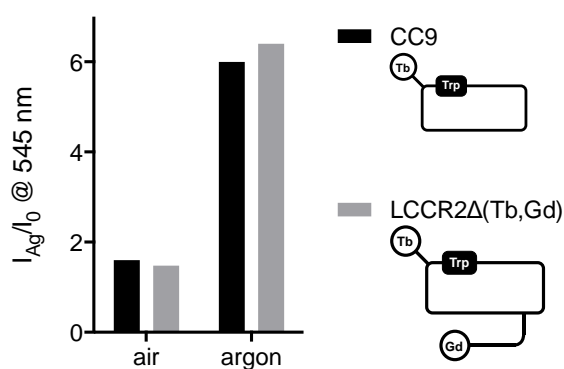


Figure IV.34. : Comparaison du contraste I_{Ag}/I_0 pour l'émission résolue en temps du terbium pour LCCR2 Δ (Tb,Gd) et CC9, en solutions aérées ou dégazées ($\lambda_{ex} = 280$ nm, délai = 100 μ s).

Les travaux de Horrocks *et al.* indiquent que le tryptophane ne peut pas sensibiliser la luminescence de l'euporium^[159]. Comme l'interaction cation- π modifie les propriétés photophysiques du tryptophane, il faut examiner la possibilité qu'elle rende possible la sensibilisation de l'euporium par le tryptophane. Pendant sa thèse, Manon Isaac avait déjà étudié cela avec le peptide CC9 métallé avec Eu³⁺ plutôt que Tb³⁺. L'émission de l'euporium pour CC9(Eu) est extrêmement faible (plus faible que celle due à la contamination par du terbium venant du sel d'euporium utilisé pour la synthèse de ce composé) et celle-ci diminue très légèrement par ajout d'Ag⁺. Ceci suggère que l'établissement de l'interaction cation- π ne permet pas la sensibilisation de l'euporium par le tryptophane. Nous avons également étudié cela avec LCCR2 Δ (Gd,Eu). En l'absence de l'ion Tb³⁺ et de l'antenne naphthalène, l'émission de l'euporium suite à une excitation à 280 nm ne peut provenir que du tryptophane. La figure IV.35.A montre le diagramme de Jablonski dérivé de celui de la figure IV.32. pour la

sensibilisation de l'euporium pour le « mutant » $\text{LCCR2}\Delta(\text{Gd},\text{Eu})$. Dans les mêmes conditions de concentration et avec les mêmes réglages du spectromètre, l'émission de l'euporium du « mutant » $\text{LCCR2}\Delta(\text{Gd},\text{Eu})$ est très faible. Elle est au moins 300 fois inférieure à celle de $\text{LCCR2}(\text{Tb},\text{Eu})$. La figure IV.35.B illustre ceci pour des solutions dégazées. Ceci nous permet d'éliminer le transfert d'énergie $\text{Trp}(\text{T}_1) \rightarrow \text{Eu}({}^5\text{D}_0)$ (Flèche bleue n°2) du diagramme de Jablonski de la figure IV.31.

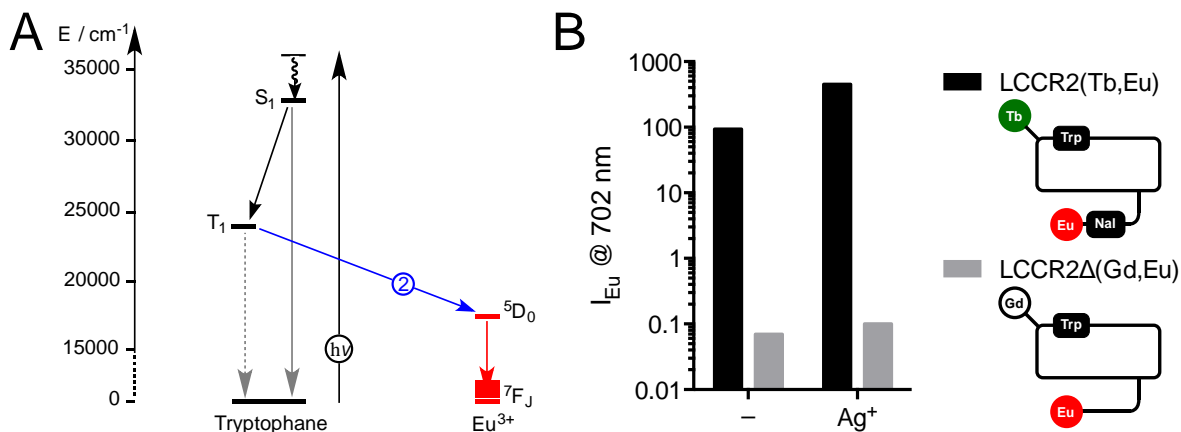


Figure IV.35. : (A droite) Diagramme de Jablonski pour le « mutant » $\text{LCCR2}\Delta(\text{Gd},\text{Eu})$. (A gauche) Comparaison de l'émission de l'euporium pour $\text{LCCR2}(\text{Tb},\text{Eu})$ et $\text{LCCR2}\Delta(\text{Gd},\text{Eu})$ en absence et présence de Ag^+ pour des solutions dégazées ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, délai = 100 μs). Notez l'échelle logarithmique pour l'intensité.

Nous avons ensuite examiné la possibilité d'avoir un transfert d'énergie du terbium vers l'euporium $\text{Tb}^{3+}({}^5\text{D}_4) \rightarrow \text{Eu}^{3+}({}^5\text{D}_0)$ (Flèche bleue n°1 sur la figure IV.32.). Pour cela, nous avons étudié le « mutant » $\text{LCCR2}\Delta(\text{Tb},\text{Eu})$ auquel il manque seulement le naphthalène par rapport à la sonde $\text{LCCR2}(\text{Tb},\text{Eu})$. Sachant que le transfert d'énergie du tryptophane à l'euporium $\text{Trp}(\text{T}_1) \rightarrow \text{Eu}({}^5\text{D}_0)$ n'est pas efficace, comme nous venons de le voir, la seule possibilité de sensibilisation de l'euporium est à travers le transfert $\text{Tb}^{3+}({}^5\text{D}_4) \rightarrow \text{Eu}^{3+}({}^5\text{D}_0)$, comme représenté sur le diagramme de Jablonski de la figure IV.36.A. L'extinction partielle de la fluorescence et le déplacement du spectre d'excitation du terbium vers le rouge indique l'établissement de l'interaction cation- π . Ici encore, l'intensité d'émission de l'euporium pour le « mutant » $\text{LCCR2}\Delta(\text{Tb},\text{Eu})$ est très faible en comparaison de celle de $\text{LCCR2}(\text{Tb},\text{Eu})$. Elle varie entre 6% de l'intensité de $\text{LCCR2}(\text{Tb},\text{Eu})$ (solution aérée sans Ag^+) à moins de 1% (solution dégazée avec Ag^+). La figure IV.36.B illustre ceci pour des solutions dégazées. Cela montre que le transfert d'énergie $\text{Tb}^{3+}({}^5\text{D}_4) \rightarrow \text{Eu}({}^5\text{D}_0)$ (Flèche bleue n°1 du diagramme de Jablonski de la figure IV.32.) contribue mineure à la sensibilisation de l'euporium pour la sonde $\text{LCCR2}(\text{Tb},\text{Eu})$ et qu'il peut être négligé par la suite.

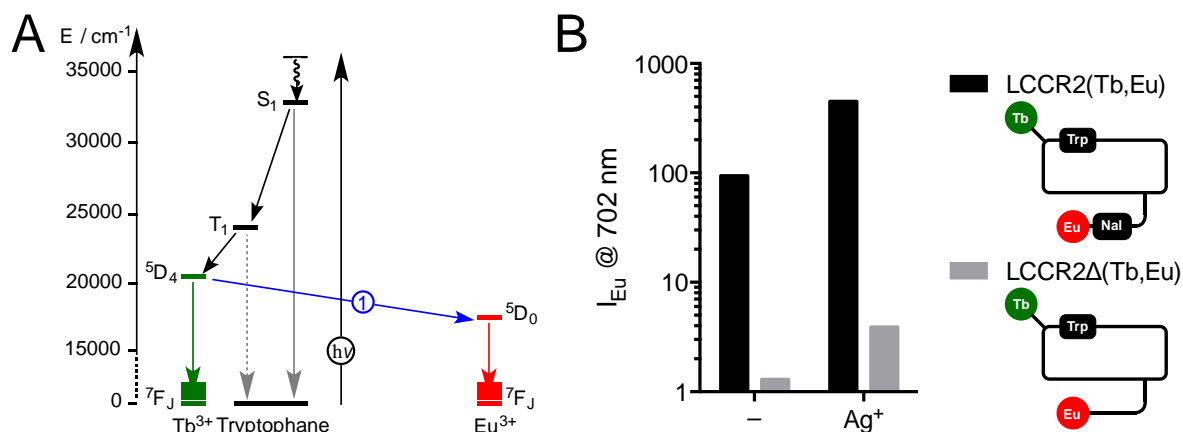


Figure IV.36. : (A droite) Diagramme de Jablonski pour le « mutant » LCCR2Δ(Tb,Eu). (A gauche) Comparaison de l'émission de l'euporium pour LCCR2(Tb,Eu) et LCCR2Δ(Tb,Eu) en absence et présence de Ag^+ pour des solutions dégazées ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, délai = 100 μs). Notez l'échelle logarithmique pour l'intensité.

Les résultats précédents suggèrent que le naphthalène joue un rôle majeur dans le mécanisme de la sonde. Afin de voir si l'adjonction du naphthalène à CC9 perturbait la réponse, nous avons étudié le « mutant » LCCR2(Tb,Gd), qui possède le naphthalène en plus par rapport à CC9 et qui se distingue de LCCR2(Tb,Eu) par le remplacement de Eu^{3+} par Gd^{3+} . Le diagramme de Jablonski pour la sensibilisation du terbium dans cette molécule est représenté sur la figure IV.37.A. La figure IV.37.D montre l'émission de l'ion Tb^{3+} (I_0) ainsi que le contraste (I_{Ag}/I_0) pour CC9 et LCCR2(Tb,Gd) mesurée dans le cas de solutions dégazées. Les deux molécules se comportent très différemment : l'émission du terbium est beaucoup plus importante pour LCCR2(Tb,Gd) et l'argent provoque une forte augmentation de l'émission du terbium pour CC9 (+500%) alors qu'elle est quasi-inexistante (+15%) pour LCCR2(Tb,Gd). On peut noter aussi que le comportement en solutions aérées (fig. IV.37.C) est différent de celui de CC9 (pas d'augmentation de la luminescence du terbium en présence de Ag^+) et que la présence d'oxygène affecte profondément la réponse de ce mutant (fig IV.37.C et IV.37.D). Enfin, la figure IV.37.B montre l'évolution de l'émission du terbium en fonction du temps pour les solutions dégazées. On peut voir un comportement biphasique avec un temps de vie de peuplement de l'état excité 5D_4 très long ($\tau_{\text{rise}} = 0,25 \text{ ms}$ sans Ag^+ et 0,33 ms avec Ag^+), bien supérieur à celui de CC9^[156] ($\tau_{\text{rise}} = 16 \mu\text{s}$). Le déclin de l'état excité 5D_4 est en revanche plus court ($\tau_{\text{decay}} = 1,3 \text{ ms}$ sans Ag^+ et 1,4 ms avec Ag^+) que pour CC9 (1,9 ms). Tout ceci confirme que la présence du naphthalène perturbe donc fortement le couple tryptophane/terbium et la réponse du système à l'argent.

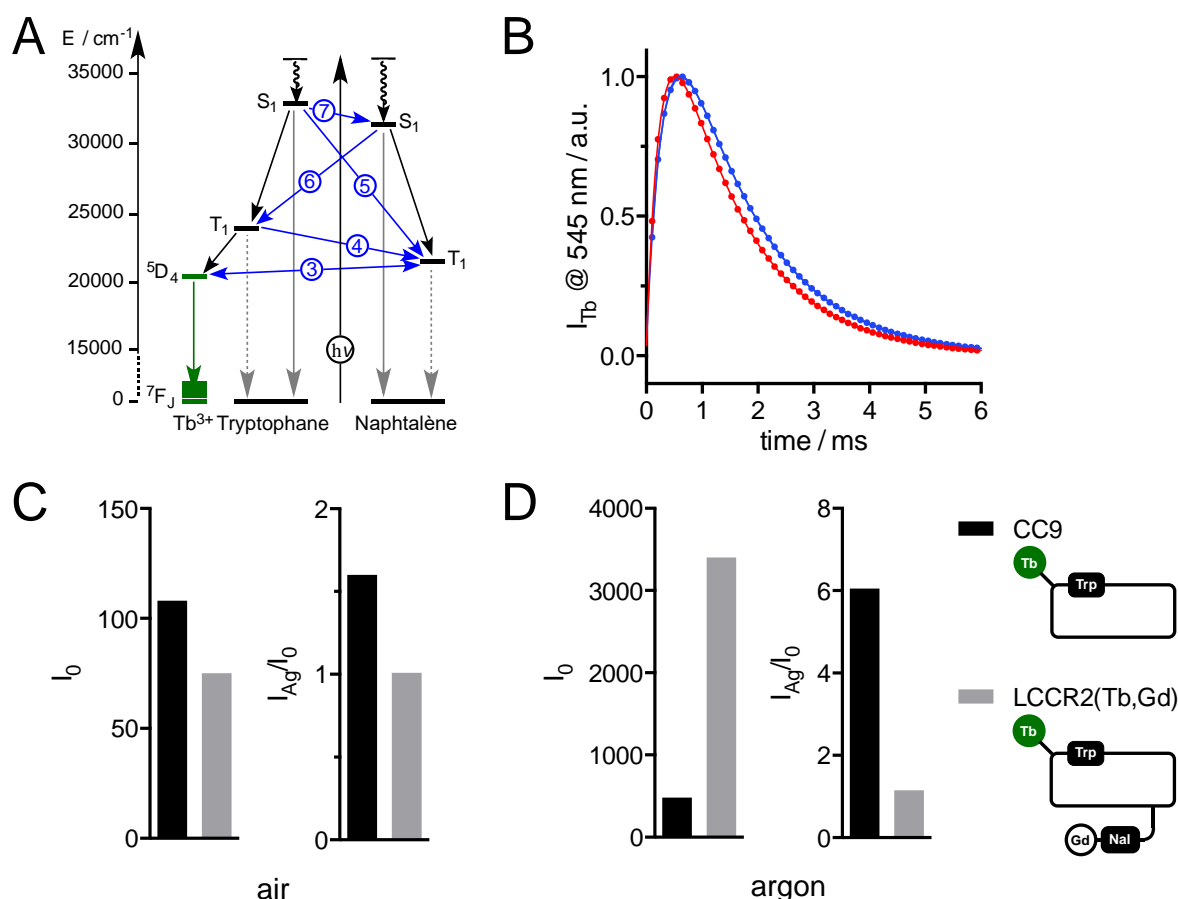


Figure IV.37. : (En haut à gauche) Diagramme de Jablonski pour le « mutant » LCCR2(Tb,Gd). (En haut à droite) Evolution temporelle de l'émission du terbium ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex}} = 545 \text{ nm}$) pour le « mutant » LCCR2(Tb,Gd) en absence (rouge) et présence de Ag^+ (bleu). (En bas à gauche) Comparaison de l'émission du terbium (I_0) et du contraste (I_{Ag}/I_0) pour CC9 et LCCR2(Tb,Gd) pour des solutions aérées ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, délai = $100 \mu\text{s}$). (En bas à droite) Comparaison de l'émission du terbium (I_0) et du contraste (I_{Ag}/I_0) pour CC9 et LCCR2(Tb,Gd) pour des solutions dégazées ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, délai = $100 \mu\text{s}$).

La sensibilisation du terbium par le naphtalène a déjà été montrée par Faulkner et al. L'effet observé de l'oxygène sur cette sensibilisation indique qu'elle provient d'un transfert d'énergie $\text{Nal}(T_1) \rightarrow \text{Tb}(^5D_4)$. Nous avons examiné la possibilité du transfert d'énergie retour $\text{Tb}(^5D_4) \rightarrow \text{Nal}(T_1)$ en excitant directement la sonde LCCR2(Tb,Eu) à 488 nm , ce qui conduit à une excitation directe du terbium, sans passer par un effet d'antenne. La figure IV.38. montre les spectres d'émission résolus en temps obtenus en absence et en présence de Ag^+ après excitation à 488 nm avec des solutions aérées de LCCR2(Tb,Eu). On y voit une intense émission de l'euporium. Comme le transfert direct $\text{Tb}(^5D_4) \rightarrow \text{Eu}(^5D_0)$ n'est pas efficace d'après ce que l'on a vu précédemment, ceci montre que le transfert d'énergie $\text{Tb}(^5D_4) \rightarrow \text{Nal}(T_1)$ est possible. On peut remarquer que l'intensité relative de l'émission de l'euporium par rapport à celle du terbium en excitant directement le terbium à 488 nm est la même qu'en excitant les antennes à 280 nm (fig. IV.30.). Ceci est vrai également pour les mesures réalisées avec des solutions dégazées en l'absence ou en présence d' Ag^+ ou de Cu^+ . Avec le

fait que le spectre d'excitation de l'euporium pour Ag-LCCR2(Tb,Eu) et Cu-LCCR2(Tb,Eu) correspond majoritairement à l'absorption du tryptophane (révélé par le décalage de la transition $\pi-\pi^*$ provoqué par l'interaction cation- π), ceci indique que le processus de sensibilisation majoritaire pour la sonde LCCR2(Tb,Eu) est le suivant : $\text{Trp}(S_1) \rightarrow \text{Trp}(T_1) \rightarrow \text{Tb}(^5D_4) \rightleftharpoons \text{NaI}(T_1) \rightarrow \text{Eu}(^5D_0)$ tel que décrit sur le diagramme de Jablonski de la figure IV.39. De tout cela, il semble que (1) l'augmentation globale de l'intensité de luminescence des lanthanide soit due à l'accroissement de la vitesse du croisement intersystème provoquée par l'interaction cation- π et que (2) le changement de ratio entre l'émission de l'euporium et celle du terbium soit dû à une modulation du transfert d'énergie $\text{Tb}(^5D_4) \rightleftharpoons \text{NaI}(T_1)$ (flèche 3 sur la figure IV.39.) provoquée par la liaison du cation. Un changement conformationnel provoqué par le cation et changeant la distance entre le naphtalène et le terbium pourrait expliquer cela.

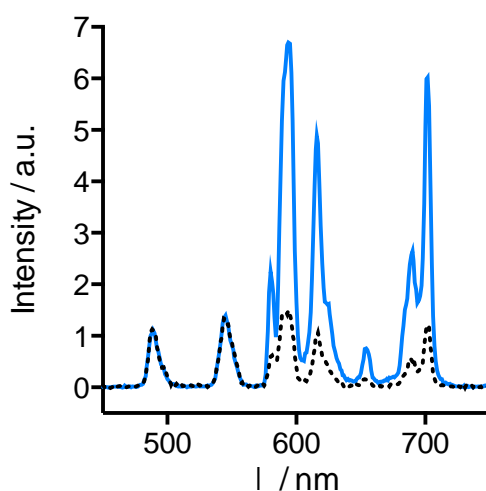


Figure IV.38. : Spectre d'émission résolu en temps avec excitation directe du terbium à 488 nm (délai = 100 μs) pour une solution aérée de LCCR2(Tb,Eu). En pointillé : en absence d' Ag^+ , en trait plein : en présence d' Ag^+ .

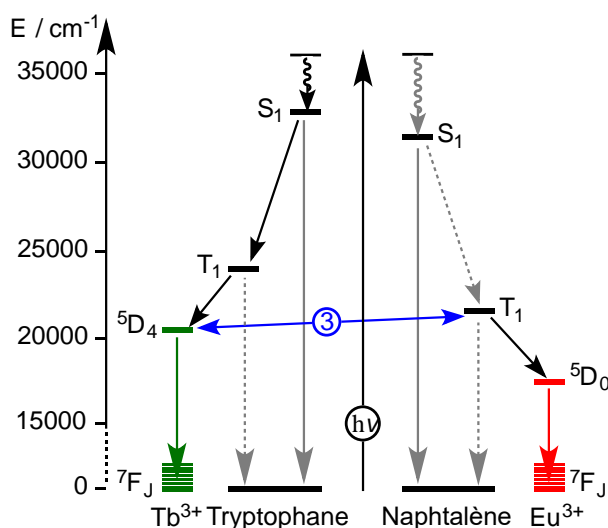


Figure IV.39. : Diagramme de Jablonski pour le système LCCR2(Tb,Eu) montrant le processus de sensibilisation majoritaire.

Enfin, nous avons étudié le « mutant » LCCR2(Gd,Eu) pour lequel l'ion Gd^{3+} remplace Tb^{3+} en comparaison de la sonde mère LCCR2(Tb,Eu). Il nous paraissait intéressant de voir comment l'émission de l'euporium pouvait se comporter dans ce système auquel manque un élément relai du chemin de sensibilisation déterminé ci-dessus. Le diagramme de Jablonski du « mutant » LCCR2(Gd,Eu), dérivé de celui de la figure IV.32., est représenté sur la figure IV.40.A. Il tient compte du fait que le transfert d'énergie $\text{Trp}(T_1) \rightarrow \text{Eu}({}^5D_0)$ n'est pas efficace (Flèche bleue n°2 sur la figure IV.32.). Il n'est donc pas représenté. Le « mutant » LCCR2(Gd,Eu) se comporte de manière quasi-identique à LCCR2(Tb,Eu) : l'extinction de la fluorescence (65% avec Ag^+ et 45% avec Cu^+) est identique à celle de la sonde LCCR2(Tb,Eu). Le spectre d'excitation de l'euporium est fortement déplacé vers le rouge (comme celui du terbium dans CC9), ce qui confirme la formation de l'interaction cation- π mais surtout montre que l'euporium est excité majoritairement à partir des photons absorbés par le tryptophane comme pour LCCR2(Tb,Eu). Concernant l'émission de l'euporium, on peut voir que son intensité en absence de Ag^+ est très semblable à celle de LCCR2(Tb,Eu), aussi bien pour les solutions aérées que pour les solutions dégazées (fig. IV.40.B). De même la réponse de la sonde, à savoir l'augmentation de l'émission de l'euporium induite par Ag^+ , est très similaire entre les deux molécules (fig. IV.40.C). C'est également le cas pour Cu^+ . Ceci suggère que le chemin de sensibilisation de l'euporium dans LCCR2(Gd,Eu) peut provenir d'un transfert d'énergie entre le tryptophane et le naphthalène. Afin d'aller plus loin dans l'étude mécanistique, LCCR2(Tb,Eu), LCCR2(Gd,Eu) et LCCR2(Gd,Gd), le dernier « mutant » qui ne contient aucun lanthanide émissif, ont été étudiés par spectroscopie d'émission résolue en temps streak par Sergey Denisov dans l'équipe de Nathan McClenaghan (Institut des Sciences Moléculaires, Univ. Bordeaux). Les analyses ont été réalisées à l'aide d'une caméra streak qui permet d'enregistrer les spectres d'émission consécutifs à un pulse d'excitation laser sur des temps courts (quelques centaines de μs) avec une résolution temporelle de l'ordre de la μs . Les résultats n'ont pas encore été entièrement analysés, nous ne les commenterons donc pas ici. Néanmoins, il semble que les mesures sur le composé LCCR2(Gd,Gd) montrent un transfert d'énergie de l'état triplet du tryptophane vers celui du naphthalène $\text{Trp}(T_1) \rightarrow \text{Nal}(T_1)$. Ceci permettrait d'expliquer pourquoi l'émission de l'euporium du « mutant » LCCR2(Gd,Eu) s'allume en présence de Ag^+ ou Cu^+ . L'analyse des temps de vie de peuplement et de déclin des différents états excités $\text{Trp}(T_1)$, $\text{Nal}(T_1)$, $\text{Tb}({}^5D_4)$ et $\text{Eu}({}^5D_0)$ nous permettrons d'évaluer l'importance de ce transfert direct $\text{Trp}(T_1) \rightarrow \text{Nal}(T_1)$ par rapport au chemin $\text{Nal}(T_1) \rightarrow \text{Tb}({}^5D_4) \rightleftharpoons \text{Nal}(T_1)$ qui utilise l'état $\text{Tb}({}^5D_4)$ comme intermédiaire.

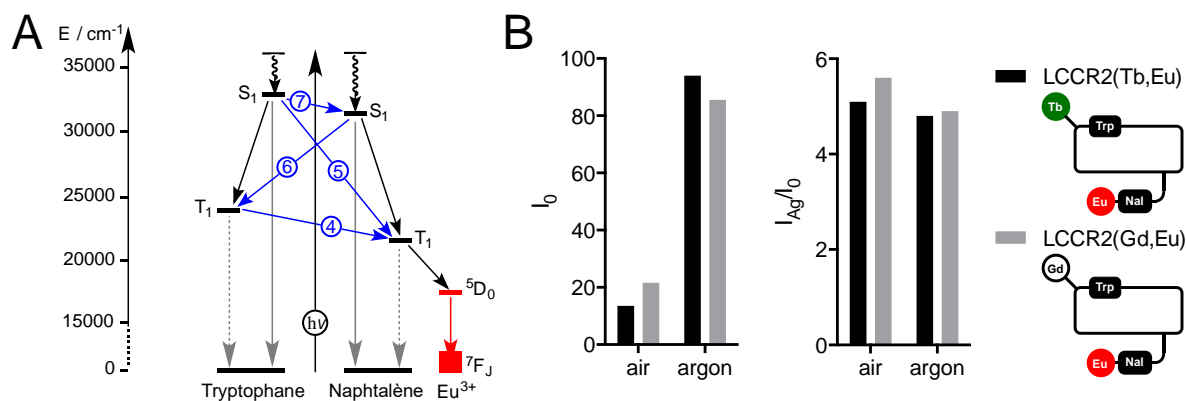


Figure IV.40. : (A gauche) Diagramme de Jablonski pour le « mutant » LCCR2(Gd,Eu). (A droite) Comparaison de l'émission de europium (I_0) et du contraste (I_{Ag}/I_0) pour LCCR2(Tb,Eu) et LCCR2(Gd,Eu) pour des solutions aérées ou dégazées ($\lambda_{ex} = 280$ nm, délai = 100 μ s).

IV.4. Conclusion

Nous avons donc synthétisé par une méthode convergente une sonde ratiométrique sélective du Cu^+ vis-à-vis des métaux physiologiques et qui reconnaît également l' Ag^+ . Cette sonde répond à la formation d'un complexe 1 : 1 avec le métal par l'augmentation du signal de l'euprium ainsi que par une légère hausse de celui du terbium, permettant ainsi l'augmentation du rapport ratiométrique (I_{702}/I_{545}) de façon linéaire jusqu'à atteindre un plateau à un équivalent de métal. Cette sonde est donc bien fonctionnelle. Cependant la constante de dissociation de la sonde est de $10^{-9.7 \pm 0.2}$ pour le Cu^+ , cette valeur est trop importante et ne permettrait pas la détection cellulaire du métal.

Cependant son comportement est contre intuitif. Afin d'élucider les transferts d'énergie majoritaire dans la sonde une série de mutants a été synthétisée. L'analyse de ces mutants a permis de décortiquer le processus de sensibilisation et démontré que l'état triplet du naphtalène servirait de relai entre l'état excité du terbium (5D_4) et celui de l'euprium (5D_0).

Pour une utilisation cellulaire il faudrait augmenter l'affinité, décaler l'excitation et introduire une séquence de pénétration.

V Conclusion et perspectives

Je me suis intéressée au cours de ma thèse au développement de sondes luminescentes pour la détection de cations métalliques : Zn^{2+} et Cu^+ . La reconnaissance de ces ions est assurée par une structure peptidique basée sur le site de liaison de métalloprotéines : un doigt de zinc pour la détection du zinc et une chaperonne à cuivre, CusF, pour la détection du cuivre. L'émission lumineuse est assurée par un complexe de lanthanide afin de bénéficier de leurs propriétés spectroscopiques particulièrement intéressantes (déplacement de Stokes important, raies fines et indépendantes de l'environnement, temps de vie de luminescence très long permettant de s'affranchir de la fluorescence intrinsèque du milieu biologique). Ces deux sondes s'allument en présence du métal d'intérêt et leur réponse est sélective vis-à-vis des métaux et anions physiologiques. Leur fonctionnement est basé sur des principes différents, celui de la sonde à zinc(II) repose sur la diminution de la distance antenne-lanthanide lors de la complexation du zinc, et celui de la sonde à cuivre(I) sur la formation d'une interaction cation- π qui modifie les propriétés photophysiques de l'antenne. Le but de ma thèse a été d'améliorer les propriétés de ces sondes.

Dans une première partie, nous avons eu comme objectif de modifier les sondes à zinc, notamment par le développement de sondes ratiométriques, mais également de décaler l'émission vers les plus grandes longueurs d'onde ainsi que d'ajouter aux sondes des séquences de pénétration permettant l'internalisation cellulaire des composés. La séquence des sondes à zinc intensiométriques SP3 avait été mise au point avant mon arrivée au laboratoire. Elle a été modifiée afin d'incorporer le Cs124 comme antenne et les lanthanides terbium ou europium. Cette sonde est fonctionnelle, émet dans le visible et à des propriétés intéressantes (sélectivité, affinité, contraste). Nous avons donc souhaité la modifier afin de la rendre ratiométrique. La voie de synthèse convergente que nous avons utilisée a permis de facilement introduire un second lanthanide et de sélectivement les complexer dans la séquence. Les sondes ainsi synthétisées permettent la détection ratiométrique du zinc avec une grande sélectivité et une affinité dans la gamme requise pour des applications cellulaires. Afin de déplacer les longueurs d'onde d'excitation et d'émission dans une zone spectrale davantage compatible avec des études *in vivo*, ces systèmes ont été transposés pour l'émission

dans le proche infrarouge par la modification de l'antenne (Cs124 substitué par l'anthracène) et des lanthanides (Nd^{3+} et Yb^{3+} à la place de Tb^{3+} et Eu^{3+}). Ainsi quatre sondes émettant dans le proche infrarouge ont été synthétisées : deux mono-lanthanides et deux bis-lanthanides. Parmi ces peptides, la sonde SP3R-Yb-Anthra-Nd permet la détection ratiométrique. Cette sonde constitue le premier exemple de sonde ratiométrique basée sur des lanthanides et émettant autour de 1000 nm

Un autre point d'amélioration de ces sondes est l'introduction de séquences de pénétration cellulaire Tat, pénétratine et RWR. La voie de synthèse convergente utilisée a permis de facilement introduire différents CPP. La synthèse a été mise au point avec l'antenne Cs124. Les sondes ainsi obtenues ont été testées en imagerie mais n'ont pas donné un résultat satisfaisant : l'émission du lanthanide est très faible et elle est dominée par l'autofluorescence du milieu cellulaire. Pour améliorer ce système, l'antenne Cs124 a été remplacée par l'acridone et le chélate DOTA par le DO3A-pic (l'élimination de la molécule d'eau dans la sphère de coordination du lanthanide permet de limiter les désexcitations non radiatives). Les analyses biologiques réalisées avec ces sondes ne permettent pas de conclure quant à l'internalisation du lanthanide, cependant l'antenne est visible à l'intérieur des cellules, dans ce qui semble être des endosomes pour tous les CPPs testés mais également cytoplasmique et nucléaire pour Tat. Ce dernier est actuellement notre meilleur candidat pour l'internalisation des sondes. Pénétratine et RWR ne sont pas satisfaisants. Ces sondes nécessitent donc encore des améliorations. Deux possibilités devront être explorées : l'utilisation de CPP cycliques et celle de séquences polyarginines directement dans l'hélice du doigt de zinc. Il faudra également améliorer le rendement quantique et la brillance pour l'émission du lanthanide.

Enfin, nous avons cherché à améliorer les propriétés de la sonde à Cu^+ . La sonde intensiométrique, développée avant mon arrivée au laboratoire et basée sur un couple tryptophane/terbium, a été modifiée pour permettre la détection ratiométrique en lui adjoignant un second couple antenne/lanthanide (naphtalène/europium). Une synthèse convergente a été mise au point pour cette nouvelle sonde. Plusieurs voies de synthèse ont été testées. La plus efficace repose sur une cyclisation par ligation native suivie d'un couplage thiol-maléamide pour assembler deux fragments contenant chacun un couple antenne/lanthanide. La sonde obtenue forme un complexe 1 : 1 avec les ions Cu^+ ou Ag^+ , ce qui provoque une forte augmentation du signal de l'euporium alors que celui du terbium est peu affecté, permettant ainsi une détection ratiométrique. Cependant elle possède un comportement contre-intuitif, que nous avons souhaité étudier. Pour cela, une série de « mutants » a été synthétisée. L'analyse de ces « mutants » a permis de décortiquer le processus de sensibilisation. Ces sondes doivent cependant être améliorées en vue d'une

utilisation cellulaire en jouant sur trois facteurs : l'augmentation de l'affinité, le décalage de l'excitation et l'introduction d'une séquence de pénétration.

Chapitre VI : Partie expérimentale

Abbreviations

PyBOP: (Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidino-phosphonium-hexafluorophosphate; HATU: N-[(dimethylamino)-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]-pyridin-1-ylmethylene]-N-methylmethanaminium hexafluorophosphate N-oxide; Cs124: carbostyryl 124; NBD: 7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol; SEA: bis(2-sulfanylethyl)-amino; SEA-PS: (*bis*(2-sulfanylethyl)-amino)-2-chlorotrityl-polystyrene; Dap: diaminopropionic acid; DOTA: 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid; Pd(PPh₃)₄: *tetrakis*(triphenylphosphine)-palladium(0); TIS: triisopropylsilane; TCEP: *tris*(2-carboxyethyl)phosphine; MPAA: 4-mercaptophenylacetic acid; DTT: dithiotreitol; DIEA: N,N-diisopropylethylamine; TFA: trifluoroacetic acid; DCM: dichloromethane; Et₂O: diethylether; DMF: N,N-dimethylformamide; DMSO: dimethylsulfoxide; *t*Bu: *tert*-butyl; Trt: trityl; Fmoc: 9-fluorenylmethoxycarbonyl; Boc: *tert*-butyloxycarbonyl; Pbf: 2,2,4,6,7-pentamethylidihydrobenzofuran-5-sulfonyl; Alloc: allyloxycarbonyl; EDTA, ethylenediamine-tetraacetic acid; EGTA: ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid; HPLC: high performance liquid chromatography; ESI: electrospray ionization; MS: mass spectrometry; UV-Vis: ultraviolet-visible; CD: circular dichroism.

Materials and methods

Reagents and solvents: N- α -Fmoc-protected amino acids for peptide synthesis, PyBOP and HATU coupling reagents were obtained from Novabiochem or Iris Biotech, Fmoc-3-(9-anthryl)-L-alanine and Fmoc-3-(1-naphthyl)-L-alanine come from Santa Cruz Biotechnology and Iris Biotech respectively. Fmoc-Glu(Cs124)-OH was synthesized according to literature procedure^[102]. SEA-PS, NovaPEG Rink Amide resin and 2-Chlorotrityl chloride resin were purchased from X'prochem, Novabiochem and Iris Biotech, respectively. DOTA-*tris*(*t*Bu) ester was purchased from CheMatech. Other reagents for peptide synthesis, solvents, buffers and metal salts were purchased from Sigma-Aldrich. All buffer or metal solutions for spectroscopic measurements were prepared with MilliQ water (Millipore). The concentration

of the Zn^{2+} solution was determined by colorimetric EDTA titrations^[161]. Buffer solutions were treated with Chelex 100 resin (Biorad) to remove trace metal ions.

Characterization and purification: Analytical HPLC separations were performed on an Agilent Infinity 1200 system using Merck Chromolith RP-18e (100 mm × 4.6 mm) columns at 2 mL/min. Preparative HPLC separations were performed on a VWR LaPrepΣ system using a Waters XBridge Peptide BEH130 C18 (5 μm, 150 mm × 19 mm) column at 14 mL/min. Mobile phase consisted in a gradient of solvent A (0.1% TFA in H₂O) and B (0.1% TFA in MeCN/H₂O 9:1). For analytical separations, Method A consisted in 5% B during 1 min followed by a 5 to 50 % B gradient in 14 min at 2 mL/min, Method B consisted in 5% B during 1 min followed by a 5 to 100 % B gradient in 14 min at 2 mL/min.. Eluate was monitored by electronic absorption at 214, 280 and 331 nm. ESI-MS analyses were performed on a Thermo LXQ spectrometer. UV-Vis absorption spectra were recorded on a Perkin-Elmer Lambda 35 spectrophotometer equipped with a thermo-regulated cell holder.

Peptide sequences

F1-Cs124-SEA: Ac-Gly-Lys-Pro-Glu(Cs124)-Glu-Cys(*S*tBu)-Thr-Lys-Ser-Ala-SEA-off

F1-Anthra-SEA: Ac-Gly-Lys-Pro-Dap(Anthra)-Glu-Cys(*S*tBu)-Thr-Lys-Ser-Ala-SEA-off

F1-Acri-SEA: Ac-Lys-Pro-Dap(Acri)-Glu-Cys(*S*tBu)-Thr-Lys-Ser-Ala-SEA-off

F1- Cs124CF₃-SEA : Ac-Lys-Pro-Dap(Cs124CF₃)-Glu-Cys(*S*tBu)-Thr-Lys-Ser-Ala-SEA-off

F1- CoumCF₃-SEA : Ac-Gly-Lys-Pro-Dap(CoumCF₃)-Glu-Cys(*S*tBu)-Thr-Lys-Ser-Ala-SEA-off

Cys-F2-DapDOTA: Cys-Gly-Lys-Lys-Phe-Thr-Lys-Dap(DOTA)-Glu-Glu-Leu-Gln-Lys-His-Ala-Lys-Thr-His-Thr-Gly-NH₂

Cys-F2-DapDOTA(Tb): Cys-Gly-Lys-Lys-Phe-Thr-Lys-Dap(DOTA[Tb])-Glu-Glu-Leu-Gln-Lys-His-Ala-Lys-Thr-His-Thr-Gly-NH₂

Cys-F2-DapDOTA(Eu): Cys-Gly-Lys-Lys-Phe-Thr-Lys-Dap(DOTA[Eu])-Glu-Glu-Leu-Gln-Lys-His-Ala-Lys-Thr-His-Thr-Gly-NH₂

Cys-F2-LysDOTA: Cys-Gly-Lys-Lys-Phe-Thr-Lys-Lys(DOTA)-Glu-Glu-Leu-Gln-Lys-His-Ala-Lys-Thr-His-Thr-Gly-NH₂

Cys-F2-LysDOTA(Tb): Cys-Gly-Lys-Lys-Phe-Thr-Lys-Lys(DOTA[Tb])-Glu-Glu-Leu-Gln-Lys-His-Ala-Lys-Thr-His-Thr-Gly-NH₂

Cys-F2-LysDOTA(Eu): Cys-Gly-Lys-Lys-Phe-Thr-Lys-Lys(DOTA[Eu])-Glu-Glu-Leu-Gln-Lys-His-Ala-Lys-Thr-His-Thr-Gly-NH₂

Cys-F2-LysDOTA-pic: Cys-Gly-Lys-Lys-Phe-Thr-Lys-Lys(DOTA-pic)-Glu-Glu-Leu-Gln-Lys-His-Ala-Lys-Thr-His-Thr-Gly-NH₂

- Cys-F2-LysDOTA-pic(Eu):** Cys-Gly-Lys-Lys-Phe-Thr-Lys-Lys(DOTA-pic[Eu])-Glu-Glu-Leu-Gln-Lys-His-Ala-Lys-Thr-His-Thr-Gly-NH₂
- SP3-Cs124-DapDOTA(Tb):** Ac-Gly-Lys-Pro-Glu(Cs124)-Glu-Cys-Thr-Lys-Ser-Ala-Cys-Gly-Lys-Lys-Phe-Thr-Lys-Dap(DOTA[Tb])-Glu-Glu-Leu-Gln-Lys-His-Ala-Lys-Thr-His-Thr-Gly-NH₂
- SP3-Cs124-DapDOTA(Eu):** Ac-Gly-Lys-Pro-Glu(Cs124)-Glu-Cys-Thr-Lys-Ser-Ala-Cys-Gly-Lys-Lys-Phe-Thr-Lys-Dap(DOTA[Eu])-Glu-Glu-Leu-Gln-Lys-His-Ala-Lys-Thr-His-Thr-Gly-NH₂
- SP3-Cs124-LysDOTA(Tb):** Ac-Gly-Lys-Pro-Glu(Cs124)-Glu-Cys-Thr-Lys-Ser-Ala-Cys-Gly-Lys-Lys-Phe-Thr-Lys-Lys(DOTA[Tb])-Glu-Glu-Leu-Gln-Lys-His-Ala-Lys-Thr-His-Thr-Gly-NH₂
- SP3-Cs124-LysDOTA(Eu):** Ac-Gly-Lys-Pro-Glu(Cs124)-Glu-Cys-Thr-Lys-Ser-Ala-Cys-Gly-Lys-Lys-Phe-Thr-Lys-Lys(DOTA[Eu])-Glu-Glu-Leu-Gln-Lys-His-Ala-Lys-Thr-His-Thr-Gly-NH₂
- SP3-Anthra-LysDOTA(Yb):** Ac-Gly-Lys-Pro-Dap(Anthra)-Glu-Cys-Thr-Lys-Ser-Ala-Cys-Gly-Lys-Lys-Phe-Thr-Lys-Lys(DOTA[Yb])-Glu-Glu-Leu-Gln-Lys-His-Ala-Lys-Thr-His-Thr-Gly-NH₂
- SP3-Anthra-LysDOTA(Nd):** Ac-Gly-Lys-Pro-Dap(Cs124)-Glu-Cys-Thr-Lys-Ser-Ala-Cys-Gly-Lys-Lys-Phe-Thr-Lys-Lys(DOTA[Nd])-Glu-Glu-Leu-Gln-Lys-His-Ala-Lys-Thr-His-Thr-Gly-NH₂
- SP3-CoumCF₃-LysDOTA(Eu):** Ac-Gly-Lys-Pro-Glu(CoumCF₃)-Glu-Cys-Thr-Lys-Ser-Ala-Cys-Gly-Lys-Lys-Phe-Thr-Lys-Lys(DOTA[Eu])-Glu-Glu-Leu-Gln-Lys-His-Ala-Lys-Thr-His-Thr-Gly-NH₂
- SP3-Cs124CF₃-LysDOTA(Eu):** Ac-Lys-Pro-Glu(Cs124CF₃)-Glu-Cys-Thr-Lys-Ser-Ala-Cys-Gly-Lys-Lys-Phe-Thr-Lys-Lys(DOTA[Eu])-Glu-Glu-Leu-Gln-Lys-His-Ala-Lys-Thr-His-Thr-Gly-NH₂
- SP3-Cs124-LysDOTA-pic(Eu):** Ac-Gly-Lys-Pro-Glu(Cs124)-Glu-Cys-Thr-Lys-Ser-Ala-Cys-Gly-Lys-Lys-Phe-Thr-Lys-Lys(DOTA-pic[Eu])-Glu-Glu-Leu-Gln-Lys-His-Ala-Lys-Thr-His-Thr-Gly-NH₂
- SP3-Acri-LysDOTA-pic(Eu):** Ac-Lys-Pro-Dap(Acri)-Glu-Cys-Thr-Lys-Ser-Ala-Cys-Gly-Lys-Lys-Phe-Thr-Lys-Lys(DOTA-pic[Eu])-Glu-Glu-Leu-Gln-Lys-His-Ala-Lys-Thr-His-Thr-Gly-NH₂
- F1R-Cs124-SEA:** DOTA-Gly-Lys-Pro-Glu(Cs124)-Glu-Cys(S*t*Bu)-Thr-Lys-Ser-Ala-SEA-off
- F1R(Tb)-Cs124-SEA:** DOTA[Tb]-Gly-Lys-Pro-Glu(Cs124)-Glu-Cys(S*t*Bu)-Thr-Lys-Ser-Ala-SEA-off
- F1R(Eu)-Cs124-SEA:** DOTA[Eu]-Gly-Lys-Pro-Glu(Cs124)-Glu-Cys(S*t*Bu)-Thr-Lys-Ser-Ala-SEA-off

F1R-Anthra-SEA: DOTA-Gly-Lys-Pro-Dap(Anthra)-Glu-Cys(*S*tBu)-Thr-Lys-Ser-Ala-SEA-off

F1R(Nd)-Anthra-SEA: DOTA[Nd]-Gly-Lys-Pro-Dap(Anthra)-Glu-Cys(*S*tBu)-Thr-Lys-Ser-Ala-SEA-off

F1R(Yb)-Anthra-SEA: DOTA[Yb]-Gly-Lys-Pro-Dap(Anthra)-Glu-Cys(*S*tBu)-Thr-Lys-Ser-Ala-SEA-off

SP3R-Tb-Cs124-Eu: DOTA[Tb]-Gly-Lys-Pro-Glu(Cs124)-Glu-Cys-Thr-Lys-Ser-Ala-Cys-Gly-Lys-Lys-Phe-Thr-Lys-Lys(DOTA[Eu])-Glu-Glu-Leu-Gln-Lys-His-Ala-Lys-Thr-His-Thr-Gly-NH₂

SP3R-Eu-Cs124-Tb: DOTA[Eu]-Gly-Lys-Pro-Glu(Cs124)-Glu-Cys-Thr-Lys-Ser-Ala-Cys-Gly-Lys-Lys-Phe-Thr-Lys-Lys(DOTA[Tb])-Glu-Glu-Leu-Gln-Lys-His-Ala-Lys-Thr-His-Thr-Gly-NH₂

SP3R-Yb-Anthra-Nd: DOTA[Yb]-Gly-Lys-Pro-Dap(Anthra)-Glu-Cys-Thr-Lys-Ser-Ala-Cys-Gly-Lys-Lys-Phe-Thr-Lys-Lys(DOTA[Nd])-Glu-Glu-Leu-Gln-Lys-His-Ala-Lys-Thr-His-Thr-Gly-NH₂

SP3R-Nd-Anthra-Yb: DOTA[Nd]-Gly-Lys-Pro-Dap(Anthra)-Glu-Cys-Thr-Lys-Ser-Ala-Cys-Gly-Lys-Lys-Phe-Thr-Lys-Lys(DOTA[Yb])-Glu-Glu-Leu-Gln-Lys-His-Ala-Lys-Thr-His-Thr-Gly-NH₂

F1-N₃-Cs124-SEA: N₃-Gly-Gly-Gly-Lys-Pro-Glu(Cs124)-Glu-Cys(*S*tBu)-Thr-Lys-Ser-Ala-SEA-off

F1-N₃-Coum-SEA: N₃-Gly-Gly-Gly-Lys-Pro-Dap(Coum)-Glu-Cys(*S*tBu)-Thr-Lys-Ser-Ala-SEA-off

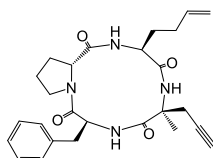
F1-N₃-Acrid-SEA: N₃-Gly-Gly-Gly-Lys-Pro-Dap(Acrid)-Glu-Cys(*S*tBu)-Thr-Lys-Ser-Ala-SEA-off

F3-Tat: HCC-(CH₂)-CO-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-Pro-Pro-Gln-NH₂

F3-Pen: HCC-(CH₂)-CO-Arg-Gln-Ile-Arg-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂

F3-RWR: HCC-(CH₂)-CO-Arg-Arg-Arg-Arg-Trp-Trp-Trp-Trp-Arg-Arg-Arg-Arg-NH₂

F3-C4 :



Tat-Cs124-SEA: 1-(Gly-Gly-Gly-Lys-Pro-Glu(Cs124)-Glu-Cys(*S*tBu)-Thr-Lys-Ser-Ala-SEA-off)-4-((CH₂)-CO-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-Pro-Pro-Gln-NH₂)-1*H*-[1,2,3]triazole

Pen-Cs124-SEA: 1-(Gly-Gly-Gly-Lys-Pro-Glu(Cs124)-Glu-Cys(*S*tBu)-Thr-Lys-Ser-Ala-SEA-off)-4-((CH₂)-CO- Arg-Gln-Ile-Arg-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂)-1*H*-[1,2,3]triazole

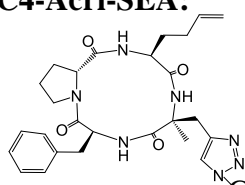
RWR-Cs124-SEA: 1-(Gly-Gly-Gly-Lys-Pro-Glu(Cs124)-Glu-Cys(*S*tBu)-Thr-Lys-Ser-Ala-SEA-off)-4-((CH₂)-CO- Arg-Arg-Arg-Arg-Trp-Trp-Trp-Trp-Arg-Arg-Arg-Arg-NH₂)-1*H*-[1,2,3]triazole

Tat-Acri-SEA: 1-(Gly-Gly-Gly-Lys-Pro-Dap(Acri)-Glu-Cys(*S*tBu)-Thr-Lys-Ser-Ala-SEA-off)-4-((CH₂)-CO-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-Pro-Pro-Gln-NH₂)-1*H*-[1,2,3]triazole

Pen-Acri-SEA: 1-(Gly-Gly-Gly-Lys-Pro-Dap(Acri)-Glu-Cys(*S*tBu)-Thr-Lys-Ser-Ala-SEA-off)-4-((CH₂)-CO- Arg-Gln-Ile-Arg-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂)-1*H*-[1,2,3]triazole

RWR-Acri-SEA: 1-(Gly-Gly-Gly-Lys-Pro-Dap(Acri)-Glu-Cys(*S*tBu)-Thr-Lys-Ser-Ala-SEA-off)-4-((CH₂)-CO- Arg-Arg-Arg-Arg-Trp-Trp-Trp-Trp-Arg-Arg-Arg-Arg-NH₂)-1*H*-[1,2,3]triazole

C4-Acri-SEA:



Gly-Gly-Gly-Lys-Pro-Dap(Acri)-Glu-Cys(*S*tBu)-Thr-Lys-Ser-Ala-SEA-off

Tat-SP3-Cs124-LysDOTA(Eu): 1-(Gly-Gly-Gly-Lys-Pro-Glu(Cs124)-Glu-Cys-Thr-Lys-Ser-Ala-Cys-Gly-Lys-Lys-Phe-Thr-Lys-Lys(DOTA[Eu])-Glu-Glu-Leu-Gln-Lys-His-Ala-Lys-Thr-His-Thr-Gly-NH₂)-4-((CH₂)-CO-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-Pro-Pro-Gln-NH₂)-1*H*-[1,2,3]triazole

Tat-SP3-Cs124-LysDOTA(Tb): 1-(Gly-Gly-Gly-Lys-Pro-Glu(Cs124)-Glu-Cys-Thr-Lys-Ser-Ala-Cys-Gly-Lys-Lys-Phe-Thr-Lys-Lys(DOTA[Tb])-Glu-Glu-Leu-Gln-Lys-His-Ala-Lys-Thr-His-Thr-Gly-NH₂)-4-((CH₂)-CO-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-Pro-Pro-Gln-NH₂)-1*H*-[1,2,3]triazole

Pen-SP3-Cs124-LysDOTA(Eu): 1-(Gly-Gly-Gly-Lys-Pro-Glu(Cs124)-Glu-Cys-Thr-Lys-Ser-Ala-Cys-Gly-Lys-Lys-Phe-Thr-Lys-Lys(DOTA[Eu])-Glu-Glu-Leu-Gln-Lys-His-Ala-Lys-Thr-His-Thr-Gly-NH₂)-4-((CH₂)-CO- Arg-Gln-Ile-Arg-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂)-1*H*-[1,2,3]triazole

Pen-SP3-Cs124-LysDOTA(Tb): 1-(Gly-Gly-Gly-Lys-Pro-Glu(Cs124)-Glu-Cys-Thr-Lys-Ser-Ala-Cys-Gly-Lys-Lys-Phe-Thr-Lys-Lys(DOTA[Tb])-Glu-Glu-Leu-Gln-Lys-His-Ala-Lys-Thr-His-Thr-Gly-NH₂)-4-((CH₂)-CO- Arg-Gln-Ile-Arg-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂)-1*H*-[1,2,3]triazole

RWR-SP3-Cs124-LysDOTA(Eu) : 1-(Gly-Gly-Gly-Lys-Pro-Glu(Cs124)-Glu-Cys-Thr-Lys-Ser-Ala-Cys-Gly-Lys-Lys-Phe-Thr-Lys-Lys(DOTA[Eu])-Glu-Glu-Leu-Gln-Lys-His-Ala-

Lys-Thr-His-Thr-Gly-NH₂)-4-((CH₂)-CO- Arg-Arg-Arg-Arg-Trp-Trp-Trp-Trp-Arg-Arg-Arg-Arg-NH₂)-1*H*-[1,2,3]triazole

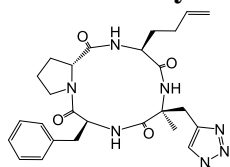
RWR-SP3-Cs124-LysDOTA(Tb) : 1-(Gly-Gly-Gly-Lys-Pro-Glu(Cs124)-Glu-Cys-Thr-Lys-Ser-Ala-Cys-Gly-Lys-Lys-Phe-Thr-Lys-Lys(DOTA[Tb])-Glu-Glu-Leu-Gln-Lys-His-Ala-Lys-Thr-His-Thr-Gly-NH₂)-4-((CH₂)-CO- Arg-Arg-Arg-Arg-Trp-Trp-Trp-Trp-Arg-Arg-Arg-Arg-NH₂)-1*H*-[1,2,3]triazole

Tat-SP3-Acri-LysDOTA-pic(Eu): 1-(Gly-Gly-Gly-Lys-Pro-Dap(Acri)-Glu-Cys-Thr-Lys-Ser-Ala-Cys-Gly-Lys-Lys-Phe-Thr-Lys-Lys(DOTA[Eu])-Glu-Glu-Leu-Gln-Lys-His-Ala-Lys-Thr-His-Thr-Gly-NH₂)-4-((CH₂)-CO-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-Pro-Pro-Gln-NH₂)-1*H*-[1,2,3]triazole

Pen-SP3-Acri-LysDOTA-pic(Eu): 1-(Gly-Gly-Gly-Lys-Pro- Dap(Acri)-Glu-Cys-Thr-Lys-Ser-Ala-Cys-Gly-Lys-Lys-Phe-Thr-Lys-Lys(DOTA[Eu])-Glu-Glu-Leu-Gln-Lys-His-Ala-Lys-Thr-His-Thr-Gly-NH₂)-4-((CH₂)-CO- Arg-Gln-Ile-Arg-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂)-1*H*-[1,2,3]triazole

RWR-SP3-Acri-LysDOTA-pic(Eu) : 1-(Gly-Gly-Gly-Lys-Pro-Dap(Acri)-Glu-Cys-Thr-Lys-Ser-Ala-Cys-Gly-Lys-Lys-Phe-Thr-Lys-Lys(DOTA[Eu])-Glu-Glu-Leu-Gln-Lys-His-Ala-Lys-Thr-His-Thr-Gly-NH₂)-4-((CH₂)-CO- Arg-Arg-Arg-Arg-Trp-Trp-Trp-Trp-Arg-Arg-Arg-Arg-NH₂)-1*H*-[1,2,3]triazole

C4-SP3-Acri-LysDOTA-pic(Eu) :



Gly-Gly-Gly-Lys-Pro-Dap(Acri)-Glu-Cys-Thr-Lys-Ser-Ala-Cys-Gly-Lys-Lys-Phe-Thr-Lys-Lys(DOTA[Eu])-Glu-Glu-Leu-Gln-Lys-His-Ala-Lys-Thr-His-Thr-Gly-NH₂

Tat-SP3-Coum-LysDOTA-pic(Eu): 1-(Gly-Gly-Gly-Lys-Pro-Dap(Coum)-Glu-Cys-Thr-Lys-Ser-Ala-Cys-Gly-Lys-Lys-Phe-Thr-Lys-Lys(DOTA[Eu])-Glu-Glu-Leu-Gln-Lys-His-Ala-Lys-Thr-His-Thr-Gly-NH₂)-4-((CH₂)-CO-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-Pro-Pro-Gln-NH₂)-1*H*-[1,2,3]triazole

1: cyclo(Cys-His-Gly-Pro-Ile-Ala-Ala-Lys(DOTA)-Lys-Trp-Pro-Glu-Met-Thr-Met-Aib-^DPro-Gln)

1^{Tb}: cyclo(Cys-His-Gly-Pro-Ile-Ala-Ala-Lys(DOTA[Tb])-Lys-Trp-Pro-Glu-Met-Thr-Met-Aib-^DPro-Gln)

1^{Gd}: cyclo(Cys-His-Gly-Pro-Ile-Ala-Ala-Lys(DOTA[Gd])-Lys-Trp-Pro-Glu-Met-Thr-Met-Aib-^DPro-Gln)

2Nal: DOTA-Nal-Lys-Lys(MIP)-Gly-NH₂

2Ala: DOTA-Ala-Lys-Lys(MIP)-Gly-NH₂

3Nal^{Eu}: DOTA[Eu]-Nal-Lys-Lys(MAP)-Gly-NH₂

3Nal^{Gd}: DOTA[Gd]-Nal-Lys-Lys(MAP)-Gly-NH₂

3Ala^{Eu}: DOTA[Eu]-Ala-Lys-Lys(MAP)-Gly-NH₂

3Ala^{Gd}: DOTA[Gd]-Ala-Lys-Lys(MAP)-Gly-NH₂

DO3Apic

6-(chloromethyl)picolinic acid (0.9 mmol, 1 eq., 150 mg) and DIEA (2 mmol, 2 eq., 350 μ l) was dissolved in DCM and added immediately to an excess of chlorotrytil resin (7 mmol, 7 eq., 5 g) for 45 min. After washing (2xDCM) the remaining reactive resin was capped with DCM/MeOH/DIEA (17 ml: 2 ml: 1ml, 2x10 min). After washing (4xDCM), a solution of cyclen (3 mmol, 3 eq, 517 mg) and DIEA (20 mmol, 20 eq., 3.5 ml) in DCM was added on the resin for 4h. The resin was washed (3xDCM, 2xDMF, 2xDCM, 2xDMF) and a solution of allyl chloroacetate (10 mmol, 10 eq., 1.2 ml) and DIEA (10 mmol, 10 eq., 1.7 ml) in DMF was coupled during 12 h. After DMF washing the coupling was repeated for 24h. After washing (3xDCM, 2xDMF, 2xDCM) the resin was shrunk in Et₂O and cleaved using TFE/DCM (10 ml : 15 ml). The product was evaporated under pressure and the obtained oil was purified by HPLC preparative (0.415 mmol, 250 mg).

Yield : 46 %

¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂, 300 K) δ = 3.21 (br s, 4H, NCH₂CH₂N), 3.26 (br s, 4H, NCH₂CH₂N), 3.47 (br s, 4H, NCH₂CH₂N), 3.56 (br s, 8H, NCH₂CH₂N + CH₂COOallyl), 4.13 (br s, 2H, CH₂COOallyl), 4.59 (m, 4H, CH₂-CH=CH₂), 4.63 (br s, 2H, CH₂Py), 4.69 (m, 2H, CH₂-CH=CH₂), 5.22-5.44 (m, 6H, CH=CH₂), 5.83-6.02 (m, 3H, CH=CH₂), 7.69 (d, J = 7.8 Hz, 1H, PyH), 8.03 (t, J = 7.8 Hz, 1H, PyH), 8.21 (d, J = 7.8 Hz, 1H, PyH) ppm ; ¹³C NMR (100 MHz, CD₂Cl₂, 300 K) δ = 49.1, 49.2, 51.6, 51.8, 54.0, 54.7, 57.9, 66.1, 66.7, 118.9, 119.3, 125.3, 127.7, 131.1, 134.1, 139.5, 148.2, 151.0, 165.4, 170.0 ppm ; HRMS (ESI+) m/z = 602.3193 (+) (calculated m/z = 602.3190 [M+H]⁺ for M = C₃₀H₄₃N₅O₈).

Peptide synthesis

Peptide elongation: Peptide elongation was performed using standard SPPS protocols using Fmoc/*t*Bu chemistry either manually or on an automated peptide synthesizer (CEM Liberty1 Microwave Peptide Synthesizer or ABI 433 A1 Peptide Synthesizer). Double couplings (30 min) were performed using 4-fold molar excess of Fmoc-L-amino acid, 4-fold molar excess of PyBOP and 8-fold molar excess of DIEA at room temperature. A capping step was performed after each coupling with Ac₂O/DIEA in DMF (5 min). Fmoc removal was performed using 20% piperidine in DMF (2x10 min).

Intensiometric probes (SP3)

SEA-off N-terminal segment F1-Cs124-SEA: Peptide elongation was performed as described above on SEA-PS resin (0.1 mmol, 0.16 mmol/g) after attachment of the first amino acid by double manual coupling (30 min) using 10-fold excess of Fmoc-Ala-OH, 9.5-fold excess of HATU and 10-fold excess of DIEA in DMF with pre-activation (5 min) followed by acetylation using (Ac₂O/DIEA/DCM 2:1:17 by vol., 10 mL, 2×5 min)^[89]. Non-standard Fmoc-Glu(Cs124)-OH and Fmoc-Cys(*S*tBu)-OH amino acid were used to introduce the antenna and the cysteine residue. After acetylation of the N-terminus, removal of acid-labile side chain protecting groups and cleavage of the peptididyl resin was performed with TFA/H₂O/TIS/thioanisole (92.5/2.5/2.5/2.5 by vol., 10 mL) during 2 h. The peptide was then precipitated in ice-cold Et₂O/heptane (1:1 by vol., 100 mL), dissolved in deionized water, and lyophilized. The peptide was dissolved in H₂O/AcOH and treated with a solution of I₂ (200 mM in DMSO) to oxidize the C-terminal SEA-on group into SEA-off group^[103]. After 30 s, DTT (65 mM in water, 500 μl) was added to quench the excess of iodine. The oxidized peptide was immediately purified by HPLC to give F1-Cs124-SEA (32 mg, 22% yield, 0.1 mmol scale). HPLC (anal.) *t*_R = 10.2 min (method A); ESI-MS: monoisotopic *m/z* = 1452.5 (+), 726.9 (2+), 485.0 (3+) / calculated monoisotopic *m/z* = 1452.61 [M+H]⁺, 726.81 [M+2H]²⁺, 484.81 [M+3H]³⁺ for M = C₆₂H₉₇N₁₅O₁₇S₄

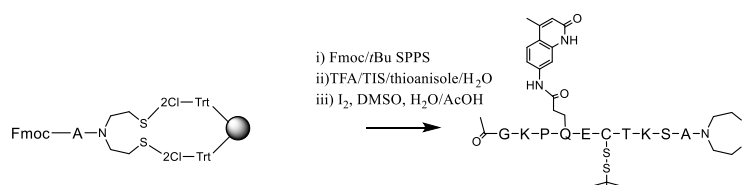


Figure VI.I : Synthetic pathway for the preparation of F1-Cs124-SEA.

SEA-off N-terminal segment F1(Anthra)-SEA: Peptide elongation was performed as described above on SEA-PS resin (0.030 mmol, 0.16 mmol/g) after attachment of the first amino acid by double manual coupling (30 min) using 10-fold excess of Fmoc-Ala-OH, 9.5-fold excess of HATU and 10-fold excess of DIEA in DMF with pre-activation (5 min) followed by acetylation using (Ac₂O/DIEA/DCM 2:1:17 by vol., 10 mL, 2×5 min). Non-standard Fmoc-3-(9-anthryl)-Ala-OH and Fmoc-Cys(*S*tBu)-OH amino acid were used to introduce the antenna and the cysteine residue. After acetylation removal of acid-labile side chain protecting groups and cleavage of the peptididyl resin was performed with TFA/H₂O/TIS/thioanisole (92.5/2.5/2.5/2.5 by vol., 10 mL) during 2 h. The peptide was then precipitated in ice-cold Et₂O/heptane (1:1 by vol., 100 mL), dissolved in deionized water, and lyophilized. The peptide was dissolved in phosphate buffer (1 mg.ml⁻¹) and diamide (5 eq.) was added to oxidize the C-terminal SEA-on group into SEA-off group. After 10 min, peptide was purified by HPLC to give F1(Anthra)-SEA (17 mg, 29% yield). HPLC (anal.) *t*_R = 12.2 min (method A);

ESI-MS: monoisotopic $m/z = 1414.5 (+)$, $707.9 (2+)$ / calculated monoisotopic $m/z = 1414.89$ $[M+H]^+$, $707.80 [M+2H]^{2+}$ for $M = C_{64}H_{95}N_{13}O_{15}S_4$.

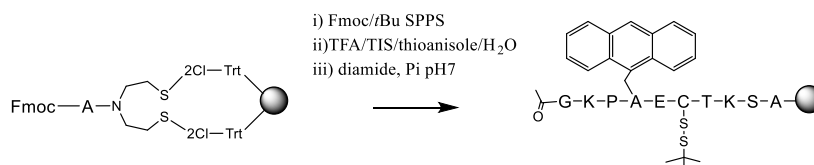


Figure VI.2. : Synthetic pathway for the preparation of F1(Anthra)-SEA.

SEA-off N-terminal segment F1-Acri-SEA: Peptide elongation was performed as described above on SEA-PS resin (0.1 mmol, 0.16 mmol/g) after attachment of the first amino acid by double manual coupling (30 min) using 10-fold excess of Fmoc-Ala-OH, 9.5-fold excess of HATU and 10-fold excess of DIEA in DMF with pre-activation (5 min) followed by acetylation using ($Ac_2O/DIEA/DCM$ 2:1:17 by vol., 10 mL, 2×5 min). Non-standard Fmoc-Dap(Alloc)-OH and Fmoc-Cys(*St*Bu)-OH amino acid were used to introduce the diaminopropionic acid and cysteine residues, respectively. Removal of the N-Alloc protecting group of the Dap(Alloc) was performed using $Pd(PPh_3)_4$ (0.05 mmol, 0.5 eq., 58 mg) and phenylsilane (2.5 mmol, 25 eq., 0.3 mL) in degassed anhydrous DCM (15 mL) for 1h in the dark^[101]. The resin was then washed successively with DCM (2×2 min), DMF (2×2 min), 1% H_2O in DMF (2×2 min), DMF (2×2 min), 1% DIEA in DMF (2×2 min), DMF (2×2 min), sodium diethyldithiocarbamate in DMF (0.12 M, 2×5 min) and DMF (2×2 min). 9-Oxo-10(9H)-acridineacetic acid (0.2 mmol, 50.7 mg, 2 eq.) was dissolved in a small amount of DMF and added to the resin, then a solution of PyBOP (0.2 mmol, 104 mg, 2 eq.) and DIEA (0.4 mmol, 69.7 μ L, 4 eq) in DMF (2 mL) was added. The resin was agitated overnight at room temperature. The resin was washed with DMF (2×2 min), DCM (2×2 min) and Et_2O (2×2 min) and dried. After acetylation of the N-terminus, removal of acid-labile side chain protecting groups and cleavage of the peptidyl resin was performed with TFA/ H_2O /TIS/thioanisole (92.5/2.5/2.5/2.5 by vol., 10 mL) during 2 h. The peptide was then precipitated in ice-cold Et_2O /heptane (1:1 by vol., 100 mL), dissolved in deionized water, and lyophilized. The peptide was dissolved in $H_2O/AcOH$ and treated with a solution of I_2 (200 mM in DMSO) to oxidize the C-terminal SEA-on group into SEA-off group. After 30 s, DTT (65 mM in water, 500 μ L) was added to quench the excess of iodine. The oxidized peptide was immediately purified by HPLC to give F1-Acri-SEA (63.0 mg, 22% yield, 0.1 mmol scale). HPLC (anal.) $t_R = 10.2$ min (method A); ESI-MS: monoisotopic $m/z = 1431.6 (+)$, $716.7 (2+)$ / calculated monoisotopic $m/z = 1431.60 [M+H]^+$, $716.30 [M+2H]^{2+}$ for $M = C_{63}H_{94}N_{14}O_{16}S_4$.

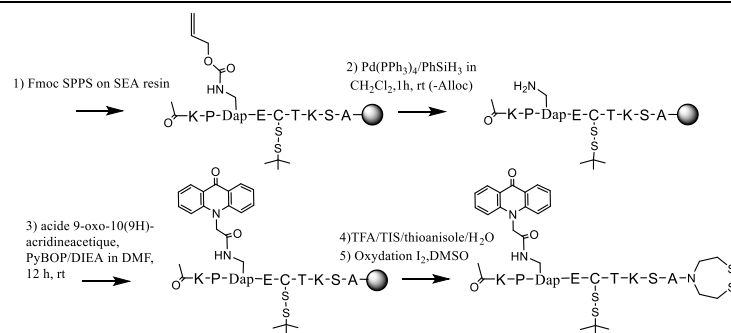


Figure VI.3. : Synthetic pathway for the preparation of F1-Acri-SEA.

SEA-off N-terminal segment F1-Cs124CF₃-SEA: Peptide elongation was performed as described above on SEA-PS resin (0.1 mmol, 0.16 mmol/g) after attachment of the first amino acid by double manual coupling (30 min) using 10-fold excess of Fmoc-Ala-OH, 9.5-fold excess of HATU and 10-fold excess of DIEA in DMF with pre-activation (5 min) followed by acetylation using (Ac₂O/DIEA/DCM 2:1:17 by vol., 10 mL, 2×5 min). Non-standard Fmoc-Glu(Cs124CF₃)-OH and Fmoc-Cys(*t*Bu)-OH amino acid were used to introduce the antenna and the cysteine residue. After acetylation of the N-terminus, removal of acid-labile side chain protecting groups (92.5/2.5/2.5/2.5 by vol., 10 mL) during 2 h. The peptide was then precipitated in ice-cold Et₂O/ and cleavage of the peptidyl resin was performed with TFA/H₂O/TIS/thioanisole heptane (1:1 by vol., 100 mL), dissolved in deionized water, and lyophilized. The peptide was dissolved in H₂O/AcOH and treated with a solution of I₂ (200 mM in DMSO) to oxidize the C-terminal SEA-on group into SEA-off group. After 30 s, DTT (65 mM in water, 500 μl) was added to quench the excess of iodine. The oxidized peptide was immediately purified by HPLC to give F1-Cs124CF₃-SEA (30 mg, 21% yield, 0.1 mmol scale). HPLC (anal.) *t_R* = 7 min (method B); ESI-MS: monoisotopic *m/z* = 1449.6 (+), 725.5 (2+) / calculated monoisotopic *m/z* = 1450.72 [M+H]⁺, 725.86 [M+2H]²⁺ for M = C₆₀H₉₁F₃N₁₄O₁₆S₄.



Figure. VI.4. : Synthetic pathway for the preparation of F1-Cs124CF₃-SEA.

SEA-off N-terminal segment F1-CoumCF₃-SEA: Peptide elongation was performed as described above on SEA-PS resin (0.1 mmol, 0.16 mmol/g) after attachment of the first amino acid by double manual coupling (30 min) using 10-fold excess of Fmoc-Ala-OH, 9.5-fold excess of HATU and 10-fold excess of DIEA in DMF with pre-activation (5 min) followed by acetylation using (Ac₂O/DIEA/DCM 2:1:17 by vol., 10 mL, 2×5 min). Non-standard Fmoc-Glu(CoumCF₃)-OH (0.2 mmol, 116 mg, 2 eq.) was coupled using HOBT (0.2 mmol, 27,0 mg, 2 eq.), DIC (0.2 mmol, 41.27 mg, 2 eq.) and DIEA (0.4 mmol, 69.7 μL, 4 eq.) in order to

introduce the antenna and non-standard Fmoc-Cys(*St*Bu)-OH amino acid was used to introduce the cysteine residue. After acetylation of the N-terminus, removal of acid-labile side chain protecting groups and cleavage of the peptididyl resin was performed with TFA/H₂O/TIS/thioanisole (92.5/2.5/2.5/2.5 by vol., 10 mL) during 2 h. The peptide was then precipitated in ice-cold Et₂O/heptane (1:1 by vol., 100 mL), dissolved in deionized water, and lyophilized. The peptide was dissolved in H₂O/AcOH and treated with a solution of I₂ (200 mM in DMSO) to oxidize the C-terminal SEA-on group into SEA-off group. After 30 s, DTT (65 mM in water, 500 μ l) was added to quench the excess of iodine. The oxidized peptide was immediately purified by HPLC to give F1-CoumCF₃-SEA (30.1 mg, 20% yield, 0.1 mmol scale).

HPLC (anal.) t_R = 13.0 min (method A);

ESI-MS: monoisotopic m/z = 1507.4 (+), 754.6 (2+) / calculated monoisotopic m/z = 1507.57 [M+H]⁺, 754.30 [M+2H]²⁺ for M = C₆₂H₉₃F₃N₁₄O₁₈S₄.

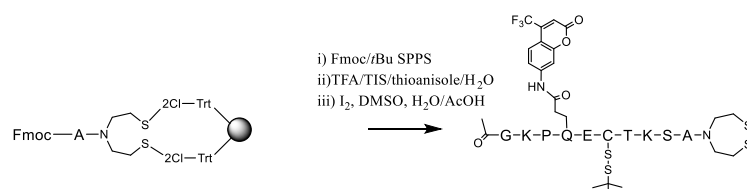


Figure VI.5. : Synthetic pathway for the preparation of F1-CoumCF₃-SEA.

Cys-F2-DapDOTA

Dap C-terminal segment: Peptide elongation was performed as described above using a peptide synthesizer on Rink-PEG-PS resin (Nova PEG Rink Amide, 0.1 mmol, 0.4 mmol/g) after attachment of the first amino acid by single manual coupling (30 min) using 2-fold excess of Fmoc-Gly-OH, 2-fold excess of PyBOP and 6-fold excess of DIEA in DMF followed by acetylation using (Ac₂O/pyridine/DMF 1:2:7 (by vol.), 10 mL, 5 min). Non-standard Fmoc-Dap(Alloc)-OH and Boc-Cys(Trt)-OH amino acids were used to introduce the diaminopropionic acid and cysteine residues, respectively. Removal of the N-Alloc protecting group of the Dap(Alloc) was performed using Pd(PPh₃)₄ (0.05 mmol, 0.5 eq., 58 mg) and phenylsilane (2.5 mmol, 25 eq., 0.3 mL) in degassed anhydrous DCM (15 mL) for 1h in the dark. The resin was then washed successively with DCM (2×2 min), DMF (2×2 min), 1% H₂O in DMF (2×2 min), DMF (2×2 min), 1% DIEA in DMF (2×2 min), DMF (2×2 min), sodium diethyldithiocarbamate in DMF (0.12 M, 2×5 min) and DMF (2×2 min). DOTA-tris(*t*Bu) ester (0.2 mmol, 114 mg, 2 eq.) was dissolved in a small amount of DMF and added to the resin, then a solution of PyBOP (0.2 mmol, 104 mg, 2 eq.) and DIEA (0.4 mmol, 69.7 μ L, 4 eq) in DMF (2 mL) was added. The resin was agitated overnight at room temperature and the coupling step was repeated once for 4h. The resin was washed with DMF (2×2 min), DCM (2×2 min) and Et₂O (2×2 min) and dried. Removal of acid-labile side chain protecting groups and cleavage were performed using TFA/H₂O/TIS/DTT (9.25 ml : 0.25 ml : 0.25 ml : 0.25 mg, 10 mL) for 4 h. The peptide was precipitated in cold Et₂O/heptane (1:1 by vol., 150

mL), centrifuged, dissolved in deionized water, lyophilized and purified by HPLC to give Cys-F2-DapDOTA (29.0 mg, 11% yield, 0.1 mmol scale). HPLC (anal.) $t_R = 5.0$ min (method A); ESI-MS: average $m/z = 1322.6$ (2+), 881.8 (3+), 661.8 (4+), 529.8 (5+), 441.7 (6+) / calculated av. $m/z = 1322.50$ $[M+2H]^{2+}$, 882.01 $[M+3H]^{3+}$, 661.76 $[M+4H]^{4+}$, 538.02 $[M+5H]^{5+}$, 448.52 $[M+6H]^{6+}$ for $M = C_{116}H_{194}N_{36}O_{35}S$); deconvoluted mass found = 2643.5 / expected mass = 2643.00 (average isotopic composition).

Formation of Ln^{3+} complexes of C-terminal segment Cys-F2-DapDOTA(Ln) (Ln = Tb, Eu): Compound Cys-F2-DapDOTA (1.5 μ mol, 4 mg) was dissolved in H_2O and the pH was adjusted to 6.5 using NaOH. Then, the lanthanide salt $LnCl_3$ (12 μ mol) was added. The solution was stirred overnight under argon (after 1h, the pH was controlled and adjusted to 6.2 if needed). TCEP (35 μ mol, 10 mg) was added prior to removal of excess Ln^{3+} by HPLC purification. Cys-F2-DapDOTA(Ln) was obtained as a white powder after freeze-drying (85-90% yield).

Cys-F2-DapDOTA(Tb): HPLC (anal.) $t_R = 5.2$ min (method A);

ESI-MS: average $m/z = 1400.3$ (2+), 933.9 (3+), 700.7 (4+), 560.8 (5+), 467.6 (6+) / calculated av. $m/z = 1400.46$ $[M+2H]^{2+}$, 933.97 $[M+3H]^{3+}$, 700.73 $[M+4H]^{4+}$, 560.79 $[M+5H]^{5+}$, 467.49 $[M+6H]^{6+}$ for $M = C_{113}H_{185}N_{36}O_{35}STb$); deconvoluted mass found = 2799.0 / expected mass = 2798.90 (average isotopic composition).

Cys-F2-DapDOTA(Eu): HPLC (anal.) $t_R = 5.2$ min (method A);

ESI-MS: average $m/z = 1396.8$ (2+), 931.7 (3+), 699.1 (4+), 559.5 (5+), 466.4 (6+) / calculated av. $m/z = 1396.97$ $[M+2H]^{2+}$, 931.65 $[M+3H]^{3+}$, 698.99 $[M+4H]^{4+}$, 559.39 $[M+5H]^{5+}$, 466.32 $[M+6H]^{6+}$ for $M = C_{113}H_{185}N_{36}O_{35}SEu$); deconvoluted mass found = 2792.0 / expected mass = 2791.93 (average isotopic composition).

Cys-F2-DapDOTA(Nd): HPLC (anal.) $t_R = 5.2$ min (method A); ESI-MS: average $m/z = 1392.5$ (2+), 928.8 (3+), 696.9 (4+), 557.8 (5+), 465.1 (6+) / calculated av. $m/z = 1393.11$ $[M+2H]^{2+}$, 929.08 $[M+3H]^{3+}$, 697.06 $[M+4H]^{4+}$, 557.85 $[M+5H]^{5+}$, 465.04 $[M+6H]^{6+}$ for $M = C_{113}H_{185}N_{36}O_{35}SNd$); deconvoluted mass found = 2783.5 / expected mass = 2784.21 (average isotopic composition).

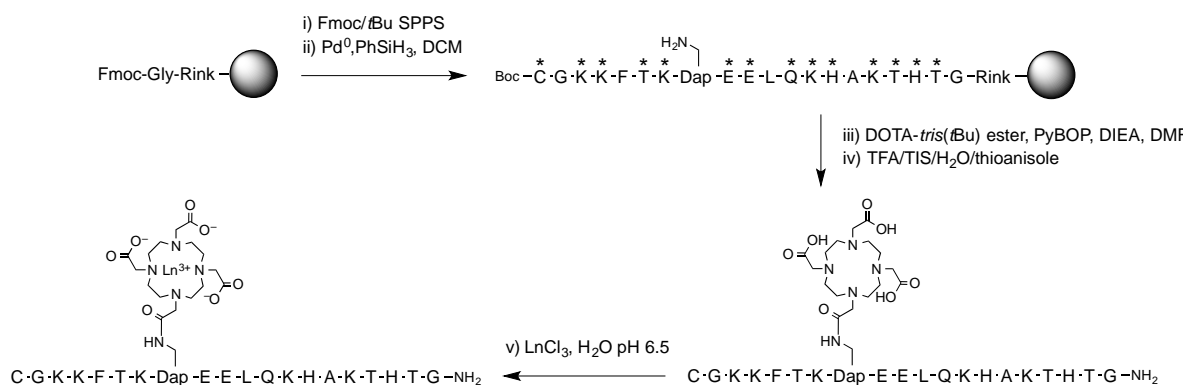


Figure VI.6. : Synthetic pathway for the preparation of Cys-F2-DapDOTA(Ln). * denotes standard side chain protecting group (Boc for Lys; *t*Bu for Glu, Thr and Ser; Trt for Cys, Gln and His).

Cys-F2-LysDOTA

Lys C-terminal segment : Peptide elongation was performed manually as described above on Rink-PEG-PS resin (Nova PEG Rink Amide, 0.2 mmol, 0.4 mmol/g) after attachment of the first amino acid by single manual coupling (30 min) using 2-fold excess of Fmoc-Gly-OH, 2-fold excess of PyBOP and 6-fold excess of DIEA in DMF followed by acetylation using (Ac₂O/pyridine/DMF 1:2:7 (by vol.), 10 mL, 5 min). Non-standard Fmoc-Lys(Alloc)-OH and Boc-Cys(Trt)-OH amino acids were used to introduce the diaminopropionic acid and cysteine residues, respectively. Removal of the N-Alloc protecting group of the Lys(Alloc) was performed using Pd(PPh₃)₄ (0.1 mmol, 0.5 eq., 116 mg) and phenylsilane (5 mmol, 25 eq., 0.6 mL) in degassed anhydrous DCM (20 mL) for 1h in the dark. The resin was then washed successively with DCM (2×2 min), DMF (2×2 min), 1% H₂O in DMF (2×2 min), DMF (2×2 min), 1% DIEA in DMF (2×2 min), DMF (2×2 min), sodium diethyldithiocarbamate in DMF (0.12 M, 2×5 min) and DMF (2×2 min). DOTA-*tris*(*t*Bu)ester (0.4 mmol, 228 mg, 2 eq.) was dissolved in a small amount of DMF and added to the resin, then a solution of PyBOP (0.4 mmol, 208 mg, 2 eq.) and DIEA (0.6 mmol, 104 μL, 4 eq) in DMF (2 mL) was added. The resin was agitated overnight at room temperature. The resin was washed with DMF (2×2 min), DCM (2×2 min) and Et₂O (2×2 min) and dried. Removal of acid-labile side chain protecting groups and cleavage were performed using TFA/H₂O/TIS/DTT (18.5 ml : 0.5 ml : 0.5 ml : 0.5 mg, 20 mL) for 4 h. The peptide was precipitated in cold Et₂O/heptane (1:1 by vol., 150 mL), centrifuged, dissolved in deionized water, lyophilized and purified by HPLC to give Cys-F2-LysDOTA (56.4 mg, 21% yield, 0.1 mmol scale).

HPLC (anal.) $t_R = 5.4$ min (method A);

ESI-MS: average $m/z = 895.9$ (3+), 672.3 (4+), 538.0 (5+), 448.5 (6+) / calculated av. $m/z = 896.03$ [M+3H]³⁺, 672.28 [M+4H]⁴⁺, 538.02 [M+5H]⁵⁺, 448.52 [M+6H]⁶⁺ for M = C₁₁₆H₁₉₄N₃₆O₃₅S); deconvoluted mass found = 2684.8 / expected mass = 2685.07 (average isotopic composition).

Formation of Ln³⁺ complexes of C-terminal segment Cys-F2-LysDOTA(Ln) (Ln = Tb, Eu): Compound 2 (1.5 μmol , 4 mg) was dissolved in H₂O and the pH was adjusted to 6.5 using NaOH. Then, the lanthanide salt LnCl₃ (12 μmol) was added. The solution was stirred overnight under argon (after 1h, the pH was controlled and adjusted to 6.2 if needed). TCEP (35 μmol , 10 mg) was added prior to removal of excess Ln³⁺ by HPLC purification. Cys-F2-LysDOTA(Ln) was obtained as a white powder after freeze-drying (85-90% yield).

Cys-F2-LysDOTA(Tb): HPLC (anal.) $t_R = 5.4$ min (method A);

ESI-MS: average $m/z = 947.9$ (3+), 711.2 (4+), 569.3 (5+), 474.5 (6+) / calculated av. $m/z = 948.00$ [M+3H]³⁺, 711.25 [M+4H]⁴⁺, 569.20 [M+5H]⁵⁺, 474.5 [M+6H]⁶⁺ for M = C₁₁₆H₁₉₁N₃₆O₃₅STb; deconvoluted mass found = 2841.0 / expected mass = 2840.98 (average isotopic composition).

Cys-F2-LysDOTA(Eu): HPLC (anal.) $t_R = 5.4$ min (method A);

ESI-MS: average $m/z = 945.6$ (3+) 709.5 (4+), 567.8 (5+), 473.4 (6+) / calculated av. $m/z = 709.51$ [M+4H]⁴⁺, 567.81 [M+5H]⁵⁺, 473.34 [M+6H]⁶⁺ for M = C₁₁₆H₁₉₁EuN₃₆O₃₅S; deconvoluted mass found = 2834.0 / expected mass = 2834.01 (average isotopic composition).

Cys-F2-LysDOTA(Yb): HPLC (anal.) $t_R = 5.9$ min (method A);

ESI-MS: average $m/z = 952.6$ (3+), 714.8 (4+), 572.2 (5+) / calculated av. $m/z = 952.70$ [M+3H]³⁺, 714.78 [M+4H]⁴⁺, 572.02 [M+5H]⁵⁺ for M = C₁₁₆H₁₉₁N₃₆O₃₅SYb; deconvoluted mass found = 2855.2 / expected mass = 2855.09 (average isotopic composition).

Cys-F2-LysDOTA(Nd): HPLC (anal.) $t_R = 5.9$ min (method A);

The compound was obtained as a dimere. ESI-MS: average $m/z = 942.9$ (6+), 808.3 (7+), 707.4 (8+), 629.0 (9+), 566.2 (10+), 514.8 (11+) / calculated av. $m/z = 943.10$ [M+6H]⁶⁺, 808.52 [M+7H]⁷⁺, 707.58 [M+8H]⁸⁺, 629.07 [M+9H]⁹⁺, 566.26 [M+10H]¹⁰⁺, 514.88 [M+11H]¹¹⁺ for M = C₂₂₆H₃₈₂N₇₂O₇₀S₂Nd₂; deconvoluted mass found = 5651.0 / expected mass = 5652.57 (average isotopic composition).

Cys-F2-LysDO3A-pic

Lys C-terminal segment 2: Peptide elongation was performed manually as described above on Rink-PEG-PS resin (Nova PEG Rink Amide, 0.1 mmol, 0.4 mmol/g) after attachment of the first amino acid by single manual coupling (30 min) using 2-fold excess of Fmoc-Gly-OH, 2-fold excess of PyBOP and 6-fold excess of DIEA in DMF followed by acetylation using (Ac₂O/pyridine/DMF 1:2:7 (by vol.), 10 mL, 5 min). Non-standard Fmoc-Lys(Alloc)-OH and Boc-Cys(Trt)-OH amino acids were used to introduce the diaminopropionic acid and cysteine residues, respectively. Removal of the N-Alloc protecting group of the Lys(Alloc) was performed using Pd(PPh₃)₄ (0.05 mmol, 0.5 eq., 58 mg) and phenylsilane (2.5 mmol, 25 eq., 0.3 mL) in degassed anhydrous DCM (10 mL) for 1h in the dark. The resin was then washed successively with DCM (2×2 min), DMF (2×2 min), 1% H₂O in DMF (2×2 min), DMF (2×2 min), 1% DIEA in DMF (2×2 min), DMF (2×2 min), sodium diethyldithiocarbamate in DMF

(0.12 M, 2×5 min) and DMF (2×2 min). DO3A-pic tris(allyl) ester (0.2 mmol, 120.3 mg, 2 eq.) was dissolved in a small amount of DMF and added to the resin, then a solution of PyBOP (0.2 mmol, 104 mg, 2 eq.) and DIEA (0.4 mmol, 69.7 μ L, 4 eq) in DMF (2 mL) was added. Removal of the Allyl protecting group of the DOTA-pic tris(allyl) was performed using with Pd(PPh₃)₄ (0.05 mmol, 0.5 eq., 58 mg) and phenylsilane (5 mmol, 50 eq., 0.6 mL) in degassed anhydrous DCM (10 mL) for 1h in the dark. The resin was then washed successively with DCM (2×2 min), DMF (2×2 min), 1% H₂O in DMF (2×2 min), DMF (2×2 min), 1% DIEA in DMF (2×2 min), DMF (2×2 min), sodium diethyldithiocarbamate in DMF (0.12 M, 2×5 min) and DMF (2×2 min). The resin was dried. Removal of acid-labile side chain protecting groups and cleavage were performed using TFA/H₂O/TIS/ DTT (9.25 ml : 0.25 ml : 0.25 ml : 0.25 mg, 10 mL) for 4 h. The peptide was precipitated in cold Et₂O/heptane (1:1 by vol., 150 mL), centrifuged, dissolved in deionized water, lyophilized and purified by HPLC to give Cys-F2-LysDOTA-pic (46.9 mg, 17% yield, 0.1 mmol scale). HPLC (anal.) t_R = 5.7 min (method A);

ESI-MS: average m/z = 921.7 (3+), 691.6 (4+), 553.4 (5+), 461.4 (6+) / calculated av. m/z = 921.73 [M+3H]³⁺, 691.55 [M+4H]⁴⁺, 553.44 [M+5H]⁵⁺, 461.37 [M+6H]⁶⁺ for M = C₁₂₁H₁₉₇N₃₇O₃₅S); deconvoluted mass found = 2762.0 / expected mass = 2762.16 (average isotopic composition).

Formation of Ln³⁺ complexes of C-terminal segment Cys-F2-LysDO3A-pic(Eu):

Compound Cys-F2-LysDO3A-pic (1.5 μ mol, 4 mg) was dissolved in H₂O and the pH was adjusted to 6.5 using NaOH. Then, the lanthanide salt LnCl₃ (12 μ mol) was added. The solution was stirred overnight under argon (after 1h, the pH was controlled and adjusted to 6.2 if needed). TCEP (35 μ mol, 10 mg) was added prior to removal of excess Ln³⁺ by HPLC purification. Cys-F2-LysDOTA-pic(Eu) was obtained as a white powder after freeze-drying (85-90% yield).

HPLC (anal.) t_R = 6.1 min (method A);

ESI-MS: average m/z = 971.3 (3+), 728.8 (4+), 583.3 (5+) / calculated av. m/z = 971.37 [M+3H]³⁺, 728.78 [M+4H]⁴⁺, 583.23 [M+5H]⁵⁺ for M = C₁₂₁H₁₉₄EuN₃₇O₃₅S); deconvoluted mass found = 2911.2 / expected mass = 2911.10 (average isotopic composition).

SP3-Cs124-DapDOTA(Ln) (Ln = Tb or Eu):

A TCEP/MPAA solution was prepared by dissolving TCEP (28.7 mg, 0.1 mmol) and MPAA (16.8 mg, 0.1 mmol) in 0.1 M pH 7.5 sodium phosphate buffer (1 mL). The pH of the solution was adjusted to 6.5 using aq. NaOH (2 N). Peptides F1-Cs124-SEA (0.7 μ mol, 1 mg) and Cys-F2-DapDOTA(Ln) (0.8 μ mol, 2.1 mg, 1.1 eq.) were dissolved in the TCEP/MPAA solution (197 μ L, final peptide concentration 3.5 mM, pH 6.5). The native chemical ligation was performed at 37°C and monitored by RP-HPLC. At the end, the reaction mixture was

diluted with water-TFA 5% (2 mL), MPAA was extracted by diethyl ether. The peptide was purified by HPLC. HPLC (anal.) $t_R = 7.0$ min (method A);

SP3-Cs124-DapDOTA(Tb): Isolated yield = 20%; HPLC (anal.) $t_R = 7.1$ min (method A); ESI-MS: average $m/z = 1008.0$ (4+), 806.7 (5+), 672.5 (6+), 576.6 (7+), 503.8 (8+) / calculated av. $m/z = 1008.07$ $[M+4H]^{4+}$, 806.66 $[M+5H]^{5+}$, 672.38 $[M+6H]^{6+}$, 576.47 $[M+7H]^{7+}$, 504.57 $[M+8H]^{8+}$ for $M = C_{167}H_{265}N_{50}O_{52}S_2Tb$; deconvoluted mass found = 4028.9 / expected mass = 4028.26 (average isotopic composition).

SP3-Cs124-DapDOTA(Eu): Isolated yield = 35%; HPLC (anal.) $t_R = 7.1$ min (method A); ESI-MS: average $m/z = 1341.3$ (3+), 1006.4 (4+), 805.4 (5+), 671.3 (6+), 575.7 (7+), 503.8 (8+) / calculated av. $m/z = 1341.44$ $[M+3H]^{3+}$, 1006.33 $[M+4H]^{4+}$, 805.27 $[M+5H]^{5+}$, 671.22 $[M+6H]^{6+}$, 575.48 $[M+7H]^{7+}$, 503.67 $[M+8H]^{8+}$ for $M = C_{167}H_{265}N_{50}O_{52}S_2Tb$; deconvoluted mass found = 4022.3 / expected mass = 4021.30 (average isotopic composition).

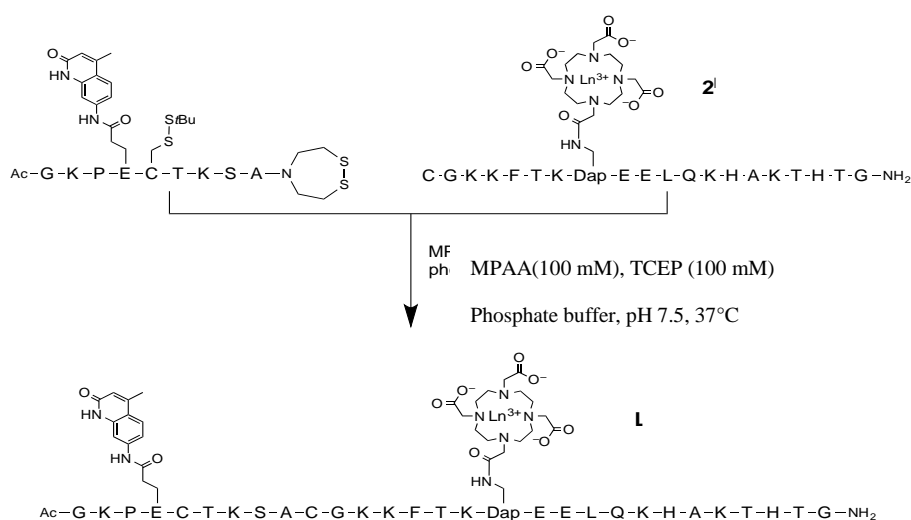


Figure VI.7. : Preparation of SP3-Cs124-DapDOTA(Ln) by assembly of segments F1-Cs124-SEA and Cys-F2-DapDOTA(Ln).

SP3-Cs124-LysDOTA(Ln) (Ln = Tb or Eu):

A TCEP/MPAA solution was prepared by dissolving TCEP (28.7 mg, 0.1 mmol) and MPAA (16.8 mg, 0.1 mmol) in 0.1 M pH 7.5 sodium phosphate buffer (1 mL). The pH of the solution was adjusted to 6.5 using aq. NaOH (2 N). Peptides F1-Cs124-SEA (0.48 μmol , 0.8 mg) and SP3-Cs124-LysDOTA(Ln) (0.52 μmol , 2 mg, 1.1 eq.) were dissolved in the TCEP/MPAA solution (140 μL , final peptide concentration 3.5 mM, pH 6.5). The native chemical ligation was performed at 37°C and monitored by RP-HPLC. At the end, the reaction mixture was diluted with water-TFA 5% (2 mL), MPAA was extracted by diethyl ether. The peptide was purified by HPLC.

SP3-Cs124-LysDOTA(Tb): Isolated yield = 15%;

HPLC (anal.) $t_R = 7.1$ min (method A);

ESI-MS: average $m/z = 1018.3$ (4+), 815.0 (5+), 679.4 (6+), 582.5 (7+) / calculated av. $m/z = 1018.59$ $[M+4H]^{4+}$, 815.05 $[M+5H]^{5+}$, 679.40 $[M+6H]^{6+}$, 582.48 $[M+7H]^{7+}$ for $M =$

$C_{170}H_{270}N_{50}O_{52}S_2Tb$; deconvoluted mass found = 4070.4 / expected mass = 4070.34 (average isotopic composition).

SP3-Cs124-LysDOTA(Eu): Isolated yield = 16%;

HPLC (anal.) t_R = 7.1 min (method A);

ESI-MS: average m/z = 1016.8 (4+), 813.8 (5+), 678.3 (6+), 581.6 (6+), 509.0 (7+) / calculated av. m/z = 1016.85 $[M+4H]^{4+}$, 813.68 $[M+5H]^{5+}$, 678.24 $[M+6H]^{6+}$, 581.48 $[M+7H]^{7+}$, 508.93 $[M+8H]^{8+}$ for $M = C_{170}H_{270}EuN_{50}O_{52}S_2$; deconvoluted mass found = 4063.8 / expected mass = 4063.38 (average isotopic composition).

SP3-Anthra-Lys-DOTA(Ln) (Ln = Yb or Nd):

A TCEP/MPAA solution was prepared by dissolving TCEP (28.7 mg, 0.1 mmol) and MPAA (16.8 mg, 0.1 mmol) in 0.1 M pH 7.5 sodium phosphate buffer (1 mL). The pH of the solution was adjusted to 6.5 using aq. NaOH (2 N). Peptides F1(Anthra)-SEA (0.56 μ mol, 0.8 mg) and Cys-F2-LysDOTA(Ln) (0.62 μ mol, 1.7 mg, 1.1 eq.) were dissolved in the TCEP/MPAA solution (170 μ L, final peptide concentration 3.5 mM, pH 6.5). The native chemical ligation was performed at 37°C and monitored by RP-HPLC. At the end, the reaction mixture was diluted with water-TFA 5% (2 mL), MPAA was extracted by diethyl ether. The peptide was purified by HPLC and HPLC (anal.).

SP3-Anthra-Lys-DOTA(Nd): Isolated yield = 51%;

HPLC (anal.) t_R = 8.9 min (method A);

ESI-MS: average m/z = 804.3 (5+), 670.5 (6+), 574.9 (7+) / calculated av. m/z = 804.54 $[M+5H]^{5+}$, 670.61 $[M+6H]^{6+}$, 574.96 $[M+7H]^{7+}$ for $M = C_{172}H_{269}N_{48}NdO_{50}S_2$; deconvoluted mass found = 4016.5 / expected mass = 4017.64 (average isotopic composition).

SP3-Anthra-Lys-DOTA(Yb): Isolated yield = 50%;

HPLC (anal.) t_R = 8.8 min (method A);

ESI-MS: average m/z = 810.2 (5+), 675.4 (6+), 579.1 (7+) / calculated av. m/z = 810.30 $[M+5H]^{5+}$, 675.42 $[M+6H]^{6+}$, 579.07 $[M+7H]^{7+}$ for $M = C_{172}H_{269}N_{48}O_{50}S_2Yb$; deconvoluted mass found = 4046.3 / expected mass = 4046.45 (average isotopic composition).

SP3-Cs124CF3-LysDOTA(Eu):

A TCEP/MPAA solution was prepared by dissolving TCEP (28.7 mg, 0.1 mmol) and MPAA (16.8 mg, 0.1 mmol) in 0.1 M pH 7.5 sodium phosphate buffer (1 mL). The pH of the solution was adjusted to 6.5 using aq. NaOH (2 N). Peptides F1-Cs124CF₃-SEA (0.7 μ mol, 1 mg) and SP3-Cs124-LysDOTA(Eu) (0.8 μ mol, 2.2 mg, 1.1 eq.) were dissolved in the TCEP/MPAA solution (197 μ L, final peptide concentration 3.5 mM, pH 6.5). The native chemical ligation was performed at 37°C and monitored by RP-HPLC. At the end, the reaction mixture was diluted with water-TFA 5% (2 mL), MPAA was extracted by diethyl ether. The peptide was purified by HPLC and HPLC (anal.).

SP3-Cs124-LysDOTA(Eu): Isolated yield = 15%;

HPLC (anal.) t_R = 8.0 min (method A);

ESI-MS: average m/z = 1015.9 (4+), 813.0 (5+), 677.8 (6+), 581.1 (6+) / calculated av. m/z = 1015.83 $[M+4H]^{4+}$, 812.78 $[M+5H]^{5+}$, 677.56 $[M+6H]^{6+}$, 580.91 $[M+7H]^{7+}$ for $M = C_{168}H_{264}EuF_3N_{49}O_{51}S_2$; deconvoluted mass found = 4060.7 / expected mass = 4059.29 (average isotopic composition).

SP3-CoumCF3-LysDOTA(Eu):

A TCEP/MPAA solution was prepared by dissolving TCEP (28.7 mg, 0.1 mmol) and MPAA (16.8 mg, 0.1 mmol) in 0.1 M pH 7.5 sodium phosphate buffer (1 mL). The pH of the solution was adjusted to 6.5 using aq. NaOH (2 N). Peptides F1-Cs124CF₃-SEA (0.5 μ mol, 1 mg) and SP3-Cs124-LysDOTA(Eu) (0.6 μ mol, 1.5 mg, 1.1 eq.) were dissolved in the TCEP/MPAA solution (156 μ L, final peptide concentration 3.5 mM, pH 6.5). The native chemical ligation was performed at 37°C and monitored by RP-HPLC. At the end, the reaction mixture was diluted with water-TFA 5% (2 mL), MPAA was extracted by diethyl ether. The peptide was purified by HPLC and HPLC (anal.).

SP3-Cs124-LysDOTA(Eu): Isolated yield = 31%;

HPLC (anal.) t_R = 8.9 min (method A);

ESI-MS: average m/z = 1030.5 (4+), 824.7 (5+), 687.4 (6+), 589.4 (6+) / calculated av. m/z = 1030.34 $[M+4H]^{4+}$, 824.47 $[M+5H]^{5+}$, 687.23 $[M+6H]^{6+}$, 589.20 $[M+7H]^{7+}$ for $M = C_{170}H_{266}EuF_3N_{49}O_{53}S_2$; deconvoluted mass found = 4118.4 / expected mass = 4117.33 (average isotopic composition).

SP3-Cs124-LysDO3A-pic(Eu):

A TCEP/MPAA solution was prepared by dissolving TCEP (28.7 mg, 0.1 mmol) and MPAA (16.8 mg, 0.1 mmol) in 0.1 M pH 7.5 sodium phosphate buffer (1 mL). The pH of the solution was adjusted to 6.5 using aq. NaOH (2 N). Peptides F1-Cs124-SEA (0.6 μ mol, 0.9 mg) and Cys-F2-LysDO3A-pic(Eu) (0.7 μ mol, 2 mg, 1.1 eq.) were dissolved in the TCEP/MPAA solution (177 μ L, final peptide concentration 3.5 mM, pH 6.5). The native chemical ligation was performed at 37°C and monitored by RP-HPLC. At the end, the reaction mixture was diluted with water-TFA 5% (2 mL), MPAA was extracted by diethyl ether. The peptide was purified by HPLC.

SP3-Cs124-LysDOTA-pic(Eu): Isolated yield = 22%;

HPLC (anal.) t_R = 9.2 min (method A);

ESI-MS: average m/z = 1036.1 (4+), 829.1 (5+), 691.2 (6+), 592.6 (7+) / calculated av. m/z = 1036.37 $[M+4H]^{4+}$, 829.30 $[M+5H]^{5+}$, 691.25 $[M+6H]^{6+}$, 592.64 $[M+7H]^{7+}$ for $M = C_{175}H_{273}EuN_{50}O_{53}S_2$; deconvoluted mass found = 4141.2 / expected mass = 4141.45 (average isotopic composition).

SP3-Acri-LysDO3A-pic(Eu):

A TCEP/MPAA solution was prepared by dissolving TCEP (28.7 mg, 0.1 mmol) and MPAA (16.8 mg, 0.1 mmol) in 0.1 M pH 7.5 sodium phosphate buffer (1 mL). The pH of the solution was adjusted to 6.5 using aq. NaOH (2 N). Peptides F1-Acri-SEA (0.4 μ mol, 0.6 mg) and Cys-F2-LysDOTA-pic(Eu) (0.45 μ mol, 1.3 mg, 1.1 eq.) were dissolved in the TCEP/MPAA solution (115 μ L, final peptide concentration 3.5 mM, pH 6.5). The native chemical ligation was performed at 37°C and monitored by RP-HPLC. At the end, the reaction mixture was diluted with water-TFA 5% (2 mL), MPAA was extracted by diethyl ether. The peptide was purified by HPLC.

SP3-Acri-LysDO3A-pic(Eu): Isolated yield = 41%;

HPLC (anal.) t_R = 9.0 min (method A);

ESI-MS: average m/z = 1030.8 (4+), 824.9 (5+), 687.7 (6+), 589.6 (7+) / calculated av. m/z = 1030.87 $[M+4H]^{4+}$, 824.90 $[M+5H]^{5+}$, 687.58 $[M+6H]^{6+}$, 589.50 $[M+7H]^{7+}$ for M = C₁₇₆H₂₇₁EuN₅₀O₅₁S₂; deconvoluted mass found = 4119.4 / expected mass = 4119.44 (average isotopic composition).

Ratiometric probe (SP3R)

SEA-off N-terminal segment F1R-Cs124-SEA: Peptide elongation was performed as described above on SEA-PS resin (0.025 mmol, 0.16 mmol/g) after attachment of the first amino acid by double manual coupling (30 min) using 10-fold excess of Fmoc-Ala-OH, 9.5-fold excess of HATU and 10-fold excess of DIEA in DMF with pre-activation (5 min) followed by acetylation using (Ac₂O/DIEA/DCM 2:1:17 by vol., 10 mL, 2×5 min). Non-standard Fmoc-Glu(Cs124)-OH and Fmoc-Cys(*St*Bu)-OH amino acid were used to introduce the antenna and the cysteine residue. Contrary to F1-Cs124-SEA the N-term glycine was coupled with commercial DOTA-tris(*t*Bu)ester (3 eq, 3 eq PyBOP, 6 eq DIEA). After acetylation removal of acid-labile side chain protecting groups and cleavage of the peptididyl resin was performed with TFA/H₂O/TIS/thioanisole (92.5/2.5/2.5/2.5 by vol., 10 mL) during 2 h. The peptide was then precipitated in ice-cold Et₂O/heptane (1:1 by vol., 100 mL), dissolved in deionized water, and lyophilized. The peptide was dissolved in H₂O/AcOH and treated with a solution of I₂ (200 mM in DMSO) to oxidize the C-terminal SEA-on group into SEA-off group. After 30 s, DTT (65 mM in water, 500 μ l) was added to quench the excess of iodine. The oxidized peptide was immediately purified by HPLC to give F1R-Cs124-SEA (10 mg, 21% yield).

HPLC (anal.) t_R = 10.3 min (method A);

ESI-MS: monoisotopic m/z = 898.9 (2+), 599.8 (3+) / calculated monoisotopic m/z = 898.90 $[M+2H]^{2+}$, 599.60 $[M+3H]^{3+}$ for M = C₇₆H₁₂₁N₁₉O₂₃S₄; deconvoluted mass found = 1796.6 / expected mass = 1797.16 (average isotopic composition).

Formation of Ln³⁺ complexes of N-terminal segment F1R(Ln₂)-Cs124-SEA (Ln = Tb, Eu): Compound F1R(Ln)(Cs124)-SEA (2.6 μ mol, 5 mg) was dissolved in H₂O and the pH

was adjusted to 6.5 using NaOH. Then, the lanthanide salt LnCl_3 (20 μmol) was added. The solution was stirred overnight under argon (after 1h, the pH was controlled and adjusted to 6.2 if needed). $\mathbf{1}^{\text{Ln/Cs124}}$ was obtained as a white powder after freeze-drying (85-90% yield).

F1R(Tb)-Cs124-SEA: HPLC (anal.) $t_{\text{R}} = 9.8$ min (method A);

ESI-MS: average $m/z = 977.3$ (2+), 651.8 (3+) / calculated av. $m/z = 977.54$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 652.03 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ for $\text{M} = \text{C}_{76}\text{H}_{118}\text{N}_{19}\text{O}_{23}\text{S}_4\text{Tb}$; deconvoluted mass found = 1952.6 / expected mass = 1953.06 (average isotopic composition).

F1R(Eu)-Cs124-SEA: HPLC (anal.) $t_{\text{R}} = 9.8$ min (method A);

ESI-MS: average $m/z = 974.1$ (2+), 649.8 (3+) / calculated av. $m/z = 974.06$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 649.71 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ for $\text{M} = \text{C}_{76}\text{H}_{118}\text{EuN}_{19}\text{O}_{23}\text{S}_4$; deconvoluted mass found = 1945.7 / expected mass = 1946.10 (average isotopic composition).

SEA-off N-terminal segment F1R(Anthra)-SEA: Peptide elongation was performed as described above on SEA-PS resin (0.030 mmol, 0.16 mmol/g) after attachment of the first amino acid by double manual coupling (30 min) using 10-fold excess of Fmoc-Ala-OH, 9.5-fold excess of HATU and 10-fold excess of DIEA in DMF with pre-activation (5 min) followed by acetylation using ($\text{Ac}_2\text{O}/\text{DIEA}/\text{DCM}$ 2:1:17 by vol., 10 mL, 2 \times 5 min). Non-standard Fmoc-3-(9-anthryl)-Ala-OH and Fmoc-Cys(*S*tBu)-OH amino acid were used to introduce the antenna and the cysteine residue. Commercial DOTA-tris(*t*Bu)ester (2 eq, 2 eq PyBOP, 4 eq DIEA) was coupled on the N-term glycine. After acetylation removal of acid-labile side chain protecting groups and cleavage of the peptididyl resin was performed with TFA/ $\text{H}_2\text{O}/\text{TIS}/\text{thioanisole}$ (92.5/2.5/2.5/2.5 by vol., 10 mL) during 2 h. The peptide was then precipitated in ice-cold $\text{Et}_2\text{O}/\text{heptane}$ (1:1 by vol., 100 mL), dissolved in deionized water, and lyophilized. The peptide was dissolved in phosphate buffer (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) and diamide (5 eq.) was added to oxidize the C-terminal SEA-on group into SEA-off group. After 10 min, peptide was purified by HPLC to give F1R(Anthra)-SEA (17 mg, 29% yield).

HPLC (anal.) $t_{\text{R}} = 12.3$ min (method A);

ESI-MS: monoisotopic $m/z = 880.4$ (2+), 587.0 (3+) / calculated monoisotopic $m/z = 879.89$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 586.93 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ for $\text{M} = \text{C}_{78}\text{H}_{119}\text{N}_{17}\text{O}_{21}\text{S}_4$.

Formation of Ln^{3+} complexes of N-terminal segment F1R(Ln)(Anthra)-SEA (Ln = Yb, Nd): Compound F1R(Anthra)-SEA (2.5 μmol , 5 mg) was dissolved in H_2O and the pH was adjusted to 6.5 using NaOH. Then, the lanthanide salt LnCl_3 (20 μmol) was added. The solution was stirred overnight under argon (after 1h, the pH was controlled and adjusted to 6.2 if needed). F1R(Ln)(Anthra)-SEA was obtained as a white powder after freeze-drying (85-90% yield).

F1R(Yb)-Anthra-SEA: HPLC (anal.) $t_{\text{R}} = 9.8$ min (method A);

ESI-MS: average $m/z = 965.5$ (2+) / calculated av. $m/z = 965.59$ $[M+2H]^{2+}$ for $M = C_{78}H_{116}N_{17}O_{21}S_4Yb$; deconvoluted mass found = 1928.6 / expected mass = 1929.16 (average isotopic composition).

F1R(Nd)-Anthra-SEA: HPLC (anal.) $t_R = 9.8$ min (method A);

ESI-MS: average $m/z = 950.6$ (2+), 634.2 (3+) / calculated av. $m/z = 951.19$ $[M+2H]^{2+}$, 634.46 $[M+3H]^{3+}$ for $M = C_{78}H_{116}N_{17}NdO_{21}S_4$; deconvoluted mass found = 1899.6 / expected mass = 1900.36 (average isotopic composition).

SP3R-Ln₂-Cs124-Ln₁ (Ln = Tb or Eu):

A TCEP/MPAA solution was prepared by dissolving TCEP (28.7 mg, 0.1 mmol) and MPAA (16.8 mg, 0.1 mmol) in 0.1 M pH 7.5 sodium phosphate buffer (1 mL). The pH of the solution was adjusted to 6.5 using aq. NaOH (2 N). Peptides F1R(Ln)-Cs124-SEA (0.41 μ mol, 0.9 mg) and Cys-F2-DapDOTA(Ln) (0.45 μ mol, 1.6 mg, 1.1 eq.) were dissolved in the TCEP/MPAA solution (130 μ L, final peptide concentration 3.5 mM, pH 6.5). The native chemical ligation was performed at 37°C and monitored by RP-HPLC. At the end, the reaction mixture was diluted with water-TFA 5% (2 mL), MPAA was extracted by diethyl ether. The peptide was purified by HPLC and HPLC (anal.).

SP3R-Eu-Cs124-Tb: Isolated yield = 25%;

HPLC (anal.) $t_R = 6.9$ min (method A);

ESI-MS: average $m/z = 905.4$ (5+), 754.8 (6+), 647.1 (7+) / calculated av. $m/z = 905.32$ $[M+5H]^{5+}$, 754.60 $[M+6H]^{6+}$, 646.95 $[M+7H]^{7+}$ for $M = C_{181}H_{286}EuN_{54}O_{58}S_2Tb$; deconvoluted mass found = 4522.2 / expected mass = 4521.57 (average isotopic composition).

SP3R-Tb-Cs124-Eu: Isolated yield = 35%;

HPLC (anal.) $t_R = 6.9$ min (method A);

ESI-MS: average $m/z = 1131.3$ (4+), 905.3 (5+), 754.8 (6+), 647.1 (7+) / calculated av. $m/z = 1131.40$ $[M+4H]^{4+}$, 905.32 $[M+5H]^{5+}$, 754.60 $[M+6H]^{6+}$, 646.95 $[M+7H]^{7+}$ for $M = C_{181}H_{286}EuN_{54}O_{58}S_2Tb$; deconvoluted mass found = 4522.2 / expected mass = 4521.57 (average isotopic composition).

SP3R-Ln₁-Anthra-Ln₂ (Ln = Yb or Nd):

A TCEP/MPAA solution was prepared by dissolving TCEP (28.7 mg, 0.1 mmol) and MPAA (16.8 mg, 0.1 mmol) in 0.1 M pH 7.5 sodium phosphate buffer (1 mL). The pH of the solution was adjusted to 6.5 using aq. NaOH (2 N). Peptides **F1R(Ln)(Anthra)-SEA** (0.46 μ mol, 1 mg) and Cys-F2-LysDOTA(Ln) (0.5 μ mol, 1.68 mg, 1.1 eq.) were dissolved in the TCEP/MPAA solution (140 μ L, final peptide concentration 3.5 mM, pH 6.5). The native chemical ligation was performed at 37°C and monitored by RP-HPLC. At the end, the

reaction mixture was diluted with water-TFA 5% (2 mL), MPAA was extracted by diethyl ether. The peptide was purified by HPLC and HPLC (anal.).

SP3R-Yb-Anthra-Nd: Isolated yield = 60%;

HPLC (anal.) t_R = 9.9 min (method A);

ESI-MS: average m/z = 1134.2 (4+), 907.2 (5+), 756.3 (6+), 648.5 (7+), 567.4 (8+) / calculated av. m/z = 1133.76 $[M+4H]^{4+}$, 907.21 $[M+5H]^{5+}$, 756.18 $[M+6H]^{6+}$, 648.30 $[M+7H]^{7+}$, 567.38 $[M+8H]^{8+}$ for $M = C_{186}H_{289}N_{52}NdO_{56}S_2Yb$; deconvoluted mass found = 4531.5 / expected mass = 4531.02 (average isotopic composition).

SP3R-Nd-Anthra-Yb: Isolated yield = 56%;

HPLC (anal.) t_R = 9.5 min (method A);

ESI-MS: average m/z = 907.2 (5+), 756.2 (6+), 648.3 (7+), 567.5 (8+) / calculated av. m/z = 1133.76 $[M+4H]^{4+}$, 907.21 $[M+5H]^{5+}$, 756.18 $[M+6H]^{6+}$, 648.30 $[M+7H]^{7+}$, 567.38 $[M+8H]^{8+}$ for $M = C_{186}H_{289}N_{52}NdO_{56}S_2Yb$; deconvoluted mass found = 4531.5 / expected mass = 4531.02 (average isotopic composition).

CPP-containing probes

SEA-off N-terminal segment F1-N₃-Cs124-SEA: Peptide elongation was performed as described above on SEA-PS resin (0.1 mmol, 0.16 mmol/g) after attachment of the first amino acid by double manual coupling (30 min) using 10-fold excess of Fmoc-Ala-OH, 9.5-fold excess of HATU and 10-fold excess of DIEA in DMF with pre-activation (5 min) followed by acetylation using (Ac₂O/DIEA/DCM 2:1:17 by vol., 10 mL, 2×5 min). Non-standard Fmoc-Cys(*S*tBu)-OH, Fmoc-Glu(Cs124)-OH amino acid and 2-Azidoacetic acid were used to introduce the cysteine residue, the antenna and the azide function. Removal of acid-labile side chain protecting groups and cleavage of the peptidyl resin was performed with TFA/H₂O/TIS/thioanisole (92.5/2.5/2.5/2.5 by vol., 10 mL) during 2 h. The peptide was then precipitated in ice-cold Et₂O/heptane (1:1 by vol., 100 mL), dissolved in deionized water, and lyophilized. The peptide (5.8 μmol, 10 mg) was dissolved in phosphate buffer (1 mg.ml⁻¹) and treated with a solution of diamide (29 μmol, 5 eq, 5 mg) to oxidize the C-terminal SEA-on group into SEA-off group. After 10 min, the oxidized peptide was purified by HPLC to give F1-N₃-Cs124-SEA (17.4 μmol, 30 mg, 17% yield, 0.1 mmol scale).

HPLC (anal.) t_R = 10.,5 min (method A);

ESI-MS: monoisotopic m/z = 804.4 (2+), 536.8 (3+) / calculated monoisotopic m/z = 804.33 $[M+2H]^{2+}$, 536.56 $[M+3H]^{3+}$ for $M = C_{66}H_{102}N_{20}O_{19}S_4$.

SEA-off N-terminal segment F1-N₃-Acri-SEA: Peptide elongation was performed as described above on SEA-PS resin (0.1 mmol, 0.16 mmol/g) after attachment of the first amino acid by double manual coupling (30 min) using 10-fold excess of Fmoc-Ala-OH, 9.5-fold excess of HATU and 10-fold excess of DIEA in DMF with pre-activation (5 min) followed by

acetylation using ($\text{Ac}_2\text{O}/\text{DIEA}/\text{DCM}$ 2:1:17 by vol., 10 mL, 2×5 min). Non-standard Fmoc-Dap(Alloc)-OH and Fmoc-Cys(*S*tBu)-OH amino acid were used to introduce the diaminopropionic acid and cysteine residues, respectively. Removal of the N-Alloc protecting group of the Dap(Alloc) was performed after the coupling of the third glycine using $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.05 mmol, 0.5 eq., 58 mg) and phenylsilane (2.5 mmol, 25 eq., 0.3 mL) in degassed anhydrous DCM (15 mL) for 1h in the dark. The resin was then washed successively with DCM (2×2 min), DMF (2×2 min), 1% H_2O in DMF (2×2 min), DMF (2×2 min), 1% DIEA in DMF (2×2 min), DMF (2×2 min), sodium diethyldithiocarbamate in DMF (0.12 M, 2×5 min) and DMF (2×2 min). 9-Oxo-10(9H)-acridineacetic acid (0.2 mmol, 50,7 mg, 2 eq.) was dissolved in a small amount of DMF and added to the resin, then a solution of PyBOP (0.2 mmol, 104 mg, 2 eq.) and DIEA (0.4 mmol, 69,7 μL , 4 eq) in DMF (2 mL) was added. The resin was agitated overnight at room temperature. The resin was washed with DMF (2×2 min), DCM (2×2 min). After fmoc removal of terminal glycine, azidoacetic acid (0.2 mmol, 15 μL , 2 eq.) was dissolved in a small amount of DMF and added to the resin, then a solution of PyBOP (0.2 mmol, 104 mg, 2 eq.) and DIEA (0.4 mmol, 69.7 μL , 4 eq) in DMF (2 mL) was added, the resin was agitated during 1h30. Removal of acid-labile side chain protecting groups and cleavage of the peptididyl resin was performed with TFA/ $\text{H}_2\text{O}/\text{TIS}/\text{thioanisole}$ (92.5/2.5/2.5/2.5 by vol., 10 mL) during 2 h. The peptide was then precipitated in ice-cold $\text{Et}_2\text{O}/\text{heptane}$ (1:1 by vol., 100 mL), dissolved in deionized water, and lyophilized. The peptide was dissolved in $\text{H}_2\text{O}/\text{AcOH}$ and treated with a solution of I_2 (200 mM in DMSO) to oxidize the C-terminal SEA-on group into SEA-off group. After 30 s, DTT (65 mM in water, 500 μL) was added to quench the excess of iodine. The oxidized peptide was immediately purified by HPLC to give F1-N₃-Acri-SEA (27,9 mg, 17% yield, 0.1 mmol scale).

HPLC (anal.) $t_{\text{R}} = 13,3$ min (method A);

ESI-MS: monoisotopic $m/z = 822.4$ (2+), 549.0 (3+) / calculated monoisotopic $m/z = 822.33$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 548.56 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ for $\text{M} = \text{C}_{69}\text{H}_{102}\text{N}_{20}\text{O}_{19}\text{S}_4$.

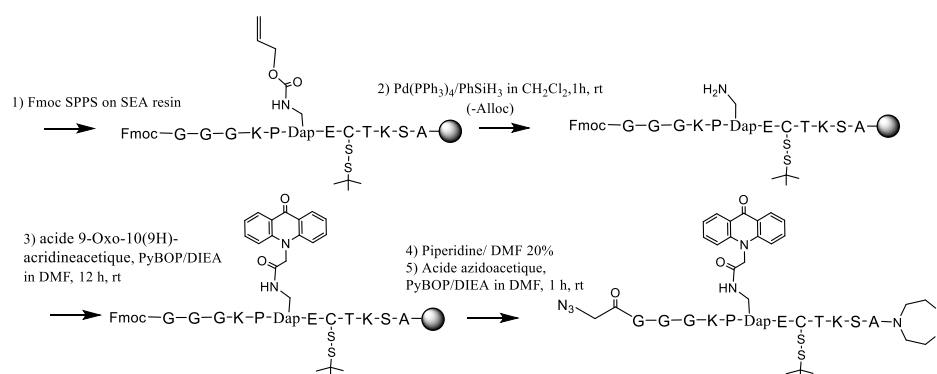


Figure VI.8. : Synthetic pathway for the preparation of F1-N₃-Acridine-SEA.

SEA-off N-terminal segment F1-N₃-Coum-SEA: Peptide elongation was performed as described above on SEA-PS resin (0.1 mmol, 0.16 mmol/g) after attachment of the first amino acid by double manual coupling (30 min) using 10-fold excess of Fmoc-Ala-OH, 9.5-fold

excess of HATU and 10-fold excess of DIEA in DMF with pre-activation (5 min) followed by acetylation using (Ac₂O/DIEA/DCM 2:1:17 by vol., 10 mL, 2×5 min). Non-standard Fmoc-Dap(Alloc)-OH and Fmoc-Cys(*S*tBu)-OH amino acid were used to introduce the diaminopropionic acid and cysteine residues, respectively. Removal of the N-Alloc protecting group of the Dap(Alloc) was performed after the coupling of the third glycine using Pd(PPh₃)₄ (0.05 mmol, 0.5 eq., 58 mg) and phenylsilane (2.5 mmol, 25 eq., 0.3 mL) in degassed anhydrous DCM (15 mL) for 1h in the dark. The resin was then washed successively with DCM (2×2 min), DMF (2×2 min), 1% H₂O in DMF (2×2 min), DMF (2×2 min), 1% DIEA in DMF (2×2 min), DMF (2×2 min), sodium diethyldithiocarbamate in DMF (0.12 M, 2×5 min) and DMF (2×2 min). 7-(Diethylamino)coumarin-3-carboxylic acid (0.2 mmol, 52.2 mg, 2 eq.) was dissolved in a small amount of DMF and added to the resin, then a solution of PyBOP (0.2 mmol, 104 mg, 2 eq.) and DIEA (0.4 mmol, 69.7 μL, 4 eq) in DMF (2 mL) was added. The resin was agitated overnight at room temperature. The resin was washed with DMF (2×2 min), DCM (2×2 min). After fmoc removal of terminal glycine, azidoacetic acid (0.2 mmol, 15 μl, 2 eq.) was dissolved in a small amount of DMF and added to the resin, then a solution of PyBOP (0.2 mmol, 104 mg, 2 eq.) and DIEA (0.4 mmol, 69.7 μL, 4 eq) in DMF (2 mL) was added, the resin was agitated during 1h30. Removal of acid-labile side chain protecting groups and cleavage of the peptididyl resin was performed with TFA/H₂O/TIS/thioanisole (92.5/2.5/2.5/2.5 by vol., 10 mL) during 2 h. The peptide was then precipitated in ice-cold Et₂O/heptane (1:1 by vol., 100 mL), dissolved in deionized water, and lyophilized. The peptide was dissolved in H₂O/AcOH and treated with a solution of I₂ (200 mM in DMSO) to oxidize the C-terminal SEA-on group into SEA-off group. After 30 s, DTT (65 mM in water, 500 μl) was added to quench the excess of iodine. The oxidized peptide was immediately purified by HPLC to give F1-N₃-Coum-SEA (38,0 mg, 23% yield, 0.1 mmol scale).

HPLC (anal.) $t_R = 7.8$ min (method B);

ESI-MS: monoisotopic $m/z = 826.4$ (2+)/ calculated monoisotopic $m/z = 826.35$ [M+2H]²⁺ for M = C₆₈H₁₀₆N₂₀O₂₀S₄.

CPP segment 3: Peptide elongation was performed as described above using a peptide synthesizer on Rink-PEG-PS resin (Nova PEG Rink Amide, 0.1 mmol, 0.45 mmol/g) after attachment of the first amino acid by single manual coupling (30 min) using 2-fold excess of Fmoc-Gly-OH, 2-fold excess of PyBOP and 6-fold excess of DIEA in DMF followed by acetylation using (Ac₂O/pyridine/DMF 1:2:7 (by vol.), 10 mL, 5 min). Non-standard 4-pentynoic acid was introduced manually in N-terminal to insert alkyne function using a standard coupling. The resin was dried with Et₂O. Removal of acid-labile side chain protecting groups and cleavage were performed using TFA/H₂O/TIS/thioanisole (92.5:2.5:2.5:2.5 by vol., 10 mL) for 4 h. The peptide was precipitated in cold Et₂O/heptane

(1:1 by vol., 150 mL), centrifuged, dissolved in deionized water, lyophilized and purified by HPLC.

F3-Tat (11.8 μmol , 33 mg, 12% yield, 0.1 mmol scale).

HPLC (anal.) $t_{\text{R}} = 4.3$ min (method A);

ESI-MS: average $m/z = 1187.4$ (2+), 751.9 (3+), 535.8 (4+) / calculated av. $m/z = 1185.16$ $[\text{M}+2\text{H}+4\text{TFA}]^{2+}$, 752.44 $[\text{M}+3\text{H}+3\text{TFA}]^{3+}$, 536.79 $[\text{M}+4\text{H}+2\text{TFA}]^{4+}$ for $\text{M} = \text{C}_{79}\text{H}_{142}\text{N}_{38}\text{O}_{18}$.

F3-Pen (2.8 μmol , 9 mg, 3% yield, 0.1 mmol scale).

HPLC (anal.) $t_{\text{R}} = 9.9$ min (method A);

ESI-MS: average $m/z = 814.3$ (3+), 611.0 (4+), 489.1 (5+) / calculated av. $m/z = 814.32$ $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, 610.99 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$, 488.99 $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ for $\text{M} = \text{C}_{113}\text{H}_{179}\text{N}_{37}\text{O}_{22}\text{S}$; deconvoluted mass found = 2439.9 / expected mass = 2439.94 (average isotopic composition).

F3-RWR (5 μmol , 15.5 mg, 5% yield, 0.1 mmol scale). HPLC (anal.)

$t_{\text{R}} = 9.2$ min (method A);

ESI-MS: average $m/z = 386.8$ (6+) / calculated av. $m/z = 387.60$ $[\text{M}+6\text{H}+1\text{TFA}]^{6+}$ for $\text{M} = \text{C}_{101}\text{H}_{149}\text{N}_{43}\text{O}_{15}$.

Huisgen ligation

One equivalent of alkyne peptide F3 and one equivalent of azido peptide F1-N₃-Cs124-SEA were dissolved in DMF (40 mmol.l⁻¹) in a glove box. A CuSO₄/THPTA solution was prepared by dissolving one equivalent of CuSO₄ (60 mmol.l⁻¹) and three equivalents of THPTA (100 mmol.l⁻¹) in phosphate buffer pH 7 in glove box. The copper solution was added to the peptide solution. Then a solution of sodium ascorbate (10 equivalents) in phosphate buffer pH 7 (250 mmol.l⁻¹) was added under stirring. The reaction mixture was stirred at room temperature in the glove box and monitored by RP-HPLC. Reaction time depends on CPP nature.

Pen-Cs124-SEA:

The peptide ligation was performed with F3-Pen (1.36 μmol , 4.4 mg) and F1-N₃-Cs124-SEA (1.36 μmol , 2.2 mg) to give Pen-Cs124-SEA (0.4 μmol , 2 mg).

Yield : 30 %

$t_{\text{R}} = 10.7$ min (method A);

ESI-MS: average $m/z = 1012.8$ (4+), 810.5 (5+), 675.7 (6+) / calculated av. $m/z = 1012.97$ $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$, 810.58 $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$, 675.65 $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ for $\text{M} = \text{C}_{179}\text{H}_{281}\text{N}_{57}\text{O}_{41}\text{S}_5$; deconvoluted mass found = 4047.6 / expected mass = 4047.84 (average isotopic composition).

Tat-Cs124-SEA:

The peptide ligation was performed with F3-Tat (1.21 μmol , 3.4 mg) and F1-N₃-Cs124-SEA (1.21 μmol , 1.9 mg) to give Tat-Cs124-SEA (0.65 μmol , 3 mg).

Yield : 54%

$t_{\text{R}} = 9.09$ min (method A);

ESI-MS: average $m/z = 881.0$ (4+), 705.0 (5+), 587.0 (6+), 503.9 (7+) / calculated av. $m/z = 881.04$ $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$, 705.03 $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$, 587.70 $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$, 503.88 $[\text{M}+7\text{H}]^{7+}$ for $\text{M} = \text{C}_{145}\text{H}_{244}\text{N}_{58}\text{O}_{37}\text{S}_4$; deconvoluted mass found = 3520.2 / expected mass = 3520.13 (average isotopic composition).

RWR-Cs124-SEA:

The peptide ligation was performed with F3-RWR (0.64 μmol , 2 mg) and F1-N₃-Cs124-SEA (0.64 μmol , 2.6 mg) to give RWR-Cs124-SEA (0.4 μmol , 1 mg).

Yield : 40%

$t_{\text{R}} = 10.6$ min (method A);

ESI-MS: average $m/z = 809.0$ (5+), 712.3 (6+), 693.3 (6+), 578.1 (7+) / calculated av. $m/z = 809.31$ $[\text{M}+5\text{H}+2\text{TFA}]^{5+}$, 712.60 $[\text{M}+6\text{H}+4\text{TFA}]^{6+}$, 693.59 $[\text{M}+6\text{H}+3\text{TFA}]^{6+}$, 578.36 $[\text{M}+7\text{H}+2\text{TFA}]^{7+}$ for $\text{M} = \text{C}_{167}\text{H}_{251}\text{N}_{63}\text{O}_{34}\text{S}_4$.

Tat-Acri-SEA:

The peptide ligation was performed with F3-Tat (1.21 μmol , 2.3 mg) and F1-N₃-Acri-SEA (1.22 μmol , 2 mg) to give Tat-Acri-SEA (0.6 μmol , 2.1 mg).

Yield : 50%

$t_{\text{R}} = 11.5$ min (method A);

ESI-MS: average $m/z = 918.2$ (4+), 780.3 (5+), 757.5 (5+), 631.7 (6+), 593.8 (6+), 525.1 (7+), 509.2 (7+), 445.7 (8+) / calculated av. $m/z = 918.55$ $[\text{M}+4\text{H}+\text{TFA}]^{4+}$, 780.65 $[\text{M}+5\text{H}+\text{TFA}]^{5+}$, 757.85 $[\text{M}+5\text{H}+2\text{TFA}]^{5+}$, 631.71 $[\text{M}+6\text{H}+2\text{TFA}]^{6+}$, 593.70 $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$, 509.03 $[\text{M}+7\text{H}]^{7+}$, 445.53 $[\text{M}+8\text{H}]^{8+}$ for $\text{M} = \text{C}_{148}\text{H}_{244}\text{N}_{58}\text{O}_{37}\text{S}_4$.

Pen-Acri-SEA:

The peptide ligation was performed with F3-Pen (1.21 μmol , 2.95 mg) and F1-N₃-Acri-SEA (1.22 μmol , 2 mg) to give Pen-Acri-SEA (0.3 μmol , 1.23 mg).

Yield : 25 %

$t_{\text{R}} = 11.0$ min (method A);

ESI-MS: average $m/z = 1021.9$ (4+), 817.8 (5+), 681.7 (6+), 584.5 (7+) / calculated av. $m/z = 1021.98$ $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$, 817.78 $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$, 681.65 $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$, 584.42 $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ for $\text{M} = \text{C}_{182}\text{H}_{281}\text{N}_{57}\text{O}_{41}\text{S}_5$; deconvoluted mass found = 4084.1 / expected mass = 4083.88 (average isotopic composition).

RWR-Acri-SEA:

The peptide ligation was performed with F3-Pen (1.22 μmol , 2.7 mg) and F1-N₃-Acri-SEA (1.22 μmol , 2 mg) to give RWR-Acri-SEA (0.49 μmol , 1.9 mg).

Yield : 40%

$t_{\text{R}} = 11.0$ min (method A);

ESI-MS: average $m/z = 816.3$ (5+), 718.3 (6+), 699.3 (6+), 680.3 (6+), 567.1 (6+), 583.3 (7+), 551.0 (7+), 496.3 (8+), 482.3 (9+) / calculated av. $m/z = 816.51$ [M+5H+2TFA]⁵⁺, 718.60 [M+6H+4TFA]⁶⁺, 699.60 [M+6H+3TFA]⁶⁺, 680.59 [M+6H+2TFA]⁶⁺, 567.22 [M+6H+TFA]⁶⁺, 583.51 [M+7H+2TFA]⁷⁺, 550.93 [M+7H]⁷⁺, 496.45 [M+8H+1TFA]⁸⁺, 489.19 [M+8H]⁸⁺ for M = C₁₇₀H₂₅₁N₆₃O₃₄S₄.

C4-Acri-SEA:

The peptide ligation was performed with F3-C4 (1.25 μmol , 0.6 mg) and F1-N₃-Acri-SEA (1.22 μmol , 2 mg) to give C4-Acri-SEA (0.6 μmol , 1.3 mg).

Yield : 48%

$t_{\text{R}} = 8.3$ min (method A);

ESI-MS: average $m/z = 1054.8$ (2+), 703.8 (6+) / calculated av. $m/z = 1055.26$ [M+2H]²⁺, 703.84 [M+3H]³⁺ for M = C₉₅H₁₃₄N₂₄O₂₃S₄; deconvoluted mass found = 2107.6 / expected mass = 2108.50 (average isotopic composition).

Tat-Coum-SEA:

The peptide ligation was performed with F3-Tat (1.21 μmol , 2.3 mg) and F1-N₃-Coum-SEA (1.21 μmol , 2 mg) Tat-Coum-SEA (2.3 mg, 0.64 μmol).

Yield : 53%

$t_{\text{R}} = 11.2$ min (method A);

ESI-MS: average $m/z = 920.2$ (4+), 781.8 (5+), 759.1 (5+), 632.7 (6+), 613.8 (10+), 595.2 (6+), 526.3 (7+), 510.3 (7+), 446.6 (8+) / calculated av. $m/z = 920.54$ [M+4H+1TFA]⁴⁺, 782.26 [M+5H+3TFA]⁵⁺, 759.45 [M+5H+2TFA]⁵⁺, 633.05 [M+6H+2TFA]¹⁰⁺, 614.04 [M+6H+1TFA]⁶⁺, 594.04 [M+6H]⁶⁺, 526.47 [M+7H+1TFA]⁷⁺, 510.18 [M+7H]⁷⁺, 446.56 [M+8H]⁸⁺ for M = C₁₄₇H₂₄₈N₅₈O₃₈S₄.

CPP-SP3-Cs124-LysDOTA(Ln) (Ln = Tb or Eu):

A TCEP/MPAA solution was prepared by dissolving TCEP (28.7 mg, 0.1 mmol) and MPAA (16.8 mg, 0.1 mmol) in 0.1 M pH 7.5 sodium phosphate buffer (1 mL). The pH of the solution was adjusted to 6.5 using aq. NaOH (2 N). Peptides CPP-Cs124-SEA and SP3-Cs124-LysDOTA(Ln) (1.1 eq.) were dissolved in the TCEP/MPAA solution (final peptide concentration 3.5 mM, pH 6.5). The native chemical ligation was performed at 37°C and monitored by RP-HPLC. At the end, the reaction mixture was diluted with water-TFA 5% (2

mL), MPAA was extracted by diethyl ether. The peptide was purified by HPLC and HPLC (anal.).

Tat-SP3-Cs124-LysDOTA(Tb):

The native ligation was performed with Tat-Cs124-SEA (0.85 μmol , 3 mg) and Cys-F2-LysDOTA(Tb) (0.95 μmol , 2.7 mg) to give Tat-SP3-Cs124-LysDOTA(Tb) (0.29 μmol , 1.8 mg).

Isolated yield = 34%

HPLC (anal.) t_R = 6.9 min (method A)

ESI-MS: average m/z = 929.3 (7+), 796.5 (8+), 708.1 (9+), 614.9 (10+), 559.1 (11+), 512.7 (12+), 473.3 (13+) / calculated av. m/z = 926.69 $[\text{M}+7\text{H}+3\text{TFA}]^{7+}$, 796.72 $[\text{M}+8\text{H}+2\text{TFA}]^{8+}$, 708.31 $[\text{M}+9\text{H}+2\text{TFA}]^{9+}$, 614.78 $[\text{M}+10\text{H}]^{10+}$, 558.98 $[\text{M}+11\text{H}]^{11+}$, 512.48 $[\text{M}+12\text{H}]^{12+}$, 473.14 $[\text{M}+13\text{H}]^{13+}$ for $\text{M} = \text{C}_{253}\text{H}_{418}\text{N}_{93}\text{O}_{72}\text{S}_2\text{Tb}$; deconvoluted mass found = 6139.8 / expected mass = 6137.68 (average isotopic composition).

Tat-SP3-Cs124-LysDOTA(Eu):

The native ligation was performed with Tat-Cs124-SEA (0.85 μmol , 3 mg) and Cys-F2-LysDOTA(Eu) (0.95 μmol , 2.7 mg) to give Tat-SP3-Cs124-LysDOTA(Tb) (0.28 μmol , 1.7 mg).

Isolated yield = 33%;

HPLC (anal.) t_R = 6.9 min (method A);

ESI-MS: average m/z = 909.1 (7+), 795.6 (8+), 707.3 (9+), 694.8 (9+), 614.3 (10+), 558.5 (11+), 512.1 (12+), 472.8 (13+), 439.1 (14+) / calculated av. m/z = 909.40 $[\text{M}+7\text{H}+2\text{TFA}]^{7+}$, 795.85 $[\text{M}+8\text{H}+2\text{TFA}]^{8+}$, 707.54 $[\text{M}+9\text{H}+2\text{TFA}]^{9+}$, 694.87 $[\text{M}+9\text{H}+1\text{TFA}]^{9+}$, 614.08 $[\text{M}+10\text{H}]^{10+}$, 558.35 $[\text{M}+11\text{H}]^{11+}$, 511.90 $[\text{M}+12\text{H}]^{12+}$, 472.60 $[\text{M}+13\text{H}]^{13+}$, 438.92 $[\text{M}+14\text{H}]^{14+}$ for $\text{M} = \text{C}_{253}\text{H}_{418}\text{EuN}_{93}\text{O}_{72}\text{S}_2$; deconvoluted mass found = 6132.4 / expected mass = 6130.72 (average isotopic composition).

Pen-SP3-Cs124-LysDOTA(Tb):

The native ligation was performed with Pen-Cs124-SEA (0.34 μmol , 1.5 mg) and Cys-F2-LysDOTA(Tb) (0.42 μmol , 1.2 mg) to give Pen-SP3-Cs124-LysDOTA(Tb) (0.1 μmol , 0.7 mg).

Isolated yield = 29%;

HPLC (anal.) t_R = 9.1 min (method A);

ESI-MS: average m/z = 1111.8 (6+), 953.1 (7+), 834.2 (8+), 741.7 (9+), 667.6 (10+), 607.0 (11+), 556.6 (12+), 513.8 (13+) / calculated av. m/z = 1111.91 $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$, 953.21 $[\text{M}+7\text{H}]^{7+}$, 834.20 $[\text{M}+8\text{H}]^{8+}$, 741.61 $[\text{M}+9\text{H}]^{9+}$, 667.55 $[\text{M}+10\text{H}]^{10+}$, 606.95 $[\text{M}+11\text{H}]^{11+}$, 556.46

$[M+12H]^{12+}$, 513.73 $[M+13H]^{13+}$ for $M = C_{287}H_{455}N_{92}O_{76}S_3Tb$; deconvoluted mass found = 6666.1 / expected mass = 6665.39 (average isotopic composition).

Pen-SP3-Cs124-LysDOTA(Eu):

The native ligation was performed with Pen-Cs124-SEA (0.34 μ mol, 1.5 mg) and Cys-F2-LysDOTA(Eu) (0.13 μ mol, 0.9 mg) to give Pen-SP3-Cs124-LysDOTA(Tb) (0.1 μ mol, 0.7 mg).

Isolated yield = 38%;

HPLC (anal.) $t_R = 9.1$ min (method A);

ESI-MS: average $m/z = 1110.7$ (6+), 952.2 (7+), 833.3 (8+), 740.8 (9+), 666.9 (10+), 606.4 (11+), 555.9 (12+), 513.3 (13+) / calculated av. $m/z = 1110.75$ $[M+6H]^{6+}$, 952.21 $[M+7H]^{7+}$, 833.31 $[M+8H]^{8+}$, 740.83 $[M+9H]^{9+}$, 666.85 $[M+10H]^{10+}$, 606.32 $[M+11H]^{11+}$, 555.88 $[M+12H]^{12+}$, 513.19 $[M+13H]^{13+}$ for $M = C_{287}H_{455}EuN_{92}O_{76}S_3$; deconvoluted mass found = 6658.4 / expected mass = 6658.43 (average isotopic composition).

RWR-SP3-Cs124-LysDOTA(Tb):

The native ligation was performed with RWR-Cs124-SEA (0.25 μ mol, 1 mg) and Cys-F2-LysDOTA(Tb) (0.28 μ mol, 0.8 mg) to give RWR-SP3-Cs124-LysDOTA(Tb) (0.06 μ mol, 0.4 mg).

Isolated yield = 23%;

HPLC (anal.) $t_R = 8.7$ min (method A);

ESI-MS: average $m/z = 715.3$ (9+), 644.0 (10+), 835.5 (11+), 536.8 (12+), 495.6 (13+), 460.4 (14+) / calculated av. $m/z = 715.56$ $[M+9H]^{9+}$, 644.11 $[M+10H]^{10+}$, 585.64 $[M+11H]^{11+}$, 536.92 $[M+12H]^{12+}$, 495.70 $[M+13H]^{13+}$, 460.36 $[M+14H]^{14+}$ for $M = C_{275}H_{425}N_{98}O_{69}S_2Tb$; deconvoluted mass found = 6429.5 / expected mass = 6431.00 (average isotopic composition).

RWR-SP3-Cs124-LysDOTA(Eu):

The native ligation was performed with RWR-Cs124-SEA (0.25 μ mol, 1 mg) and Cys-F2-LysDOTA(Eu) (0.28 μ mol, 0.8 mg) to give RWR-SP3-Cs124-LysDOTA(Eu) (0.05 μ mol, 0.3 mg).

Isolated yield = 20%;

HPLC (anal.) $t_R = 8.7$ min (method A);

ESI-MS: average $m/z = 714.7$ (9+), 643.3 (10+), 584.8 (11+), 536.4 (12+) / calculated av. $m/z = 714.79$ $[M+9H]^{9+}$, 643.41 $[M+10H]^{10+}$, 585.01 $[M+11H]^{11+}$, 536.34 $[M+12H]^{12+}$ for $M = C_{275}H_{425}EuN_{98}O_{69}S_2$; deconvoluted mass found = 6522.3 / expected mass = 6424.04 (average isotopic composition).

Tat-SP3-Acri-LysDOTA-pic(Eu):

The native ligation was performed with Tat-Acri-SEA (0.42 μmol , 1.5 mg) and Cys-F2-LysDO3A-pic(Eu) (0.48 μmol , 1.4 mg) to give Tat-SP3-Acri-LysDO3A-pic(Eu) (0.09 μmol , 0.56 mg).

Isolated yield = 21%;

HPLC (anal.) t_R = 7.0 min (method A);

ESI-MS: average m/z = 809.7 (8+), 719.8 (9+), 694.8 (9+), 647.9 (10+), 625.3 (10+), 578.8 (11+), 568.8 (11+), 521.4 (12+), 481.4 (13+) / calculated av. m/z = 809.99 $[\text{M}+8\text{H}+2\text{TFA}]^{8+}$, 720.11 $[\text{M}+9\text{H}+2\text{TFA}]^{9+}$, 694.77 $[\text{M}+9\text{H}]^{9+}$, 648.20 $[\text{M}+10\text{H}+2\text{TFA}]^{10+}$, 625.39 $[\text{M}+10\text{H}]^{10+}$, 578.99 $[\text{M}+11\text{H}+1\text{TFA}]^{11+}$, 568.63 $[\text{M}+11\text{H}]^{11+}$, 521.33 $[\text{M}+12\text{H}]^{12+}$, 431.30 $[\text{M}+13\text{H}]^{13+}$ for $\text{M} = \text{C}_{261}\text{H}_{421}\text{EuN}_{94}\text{O}_{72}\text{S}_2$; deconvoluted mass found = 6245.1 / expected mass = 6243.83 (average isotopic composition).

Pen-SP3-Acri-LysDOTA-pic(Eu):

The native ligation was performed with Pen-Acri-SEA (0.15 μmol , 0.6 mg) and Cys-F2-LysDO3A-pic(Eu) (0.17 μmol , 0.5 mg) to give Pen-SP3-Acri-LysDO3A-pic(Eu) (0.04 μmol , 0.27 mg).

Isolated yield = 27%;

HPLC (anal.) t_R = 9.3 min (method A);

ESI-MS: average m/z = 968.3 (7+), 847.3 (8+), 753.3 (9+), 678.2 (10+), 616.7 (11+), 565.4 (12+) / calculated av. m/z = 968.37 $[\text{M}+7\text{H}]^{7+}$, 847.45 $[\text{M}+8\text{H}]^{8+}$, 753.40 $[\text{M}+9\text{H}]^{9+}$, 678.16 $[\text{M}+10\text{H}]^{10+}$, 616.60 $[\text{M}+11\text{H}]^{11+}$, 565.30 $[\text{M}+12\text{H}]^{12+}$ for $\text{M} = \text{C}_{295}\text{H}_{458}\text{EuN}_{93}\text{O}_{76}\text{S}_3$; deconvoluted mass found = 6771.6 / expected mass = 6771.55 (average isotopic composition).

RWR-SP3-Acri-LysDOTA-pic(Eu):

The native ligation was performed with RWR-Acri-SEA (0.42 μmol , 1.6 mg) and Cys-F2-LysDO3A-pic(Eu) (0.45 μmol , 1.3 mg) to give RWR-SP3-Acri-LysDO3A-pic(Eu) (0.062 μmol , 0.4 mg).

Isolated yield = 15%;

HPLC (anal.) t_R = 9.0 min (method A);

ESI-MS: average m/z = 1015.9 (7+), 874.8 (8+), 777.8 (9+), 765.1 (9+), 688.8 (10+), 677.3 (10+), 615.9 (11+), 605.6 (11+), 545.9 (12+) / calculated av. m/z = 1016.33 $[\text{M}+7\text{H}+5\text{TFA}]^{7+}$, 875.16 $[\text{M}+8\text{H}+4\text{TFA}]^{8+}$, 778.03 $[\text{M}+9\text{H}+4\text{TFA}]^{9+}$, 765.37 $[\text{M}+9\text{H}+3\text{TFA}]^{9+}$, 688.93 $[\text{M}+10\text{H}+3\text{TFA}]^{10+}$, 677.53 $[\text{M}+10\text{H}+2\text{TFA}]^{10+}$, 616.02 $[\text{M}+11\text{H}+2\text{TFA}]^{11+}$, 605.66 $[\text{M}+11\text{H}+1\text{TFA}]^{11+}$, 545.77 $[\text{M}+12\text{H}]^{12+}$ for $\text{M} = \text{C}_{283}\text{H}_{428}\text{EuN}_{99}\text{O}_{69}\text{S}_2$;

C4-SP3-Acri-LysDOTA-pic(Eu):

The native ligation was performed with C4-Acri-SEA (0.52 μmol , 1.1 mg) and Cys-F2-LysDO3A-pic(Eu) (0.55 μmol , 1.6 mg) to give C4-SP3-Acri-LysDO3A-pic(Eu) (0.2 μmol , 0.96 mg).

Isolated yield = 38%;

HPLC (anal.) t_R = 6.4 min (method B);

ESI-MS: average m/z = 1199.9 (4+), 960.8 (5+), 800.5 (6+), 686.5 (7+), 600.8 (8+) / calculated av. m/z = 1099.80 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$, 960.04 $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$, 800.20 $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$, 686.03 $[\text{M}+7\text{H}]^{7+}$, 600.40 $[\text{M}+8\text{H}]^{8+}$ for $\text{M} = \text{C}_{208}\text{H}_{310}\text{EuN}_{60}\text{O}_{58}\text{S}_2$; deconvoluted mass found = 4797.0 / expected mass = 4795.16 (average isotopic composition).

Tat-SP3-Coum-LysDO3A-pic(Eu):

The native ligation was performed with Tat-Acri-SEA (0.42 μmol , 1.5 mg) and Cys-F2-LysDO3A-pic(Eu) (0.45 μmol , 1.3 mg, 1.1 eq.) to give Tat-SP3-Coum-LysDO3A-pic(Eu) (0.12 μmol , 0.72 mg).

SP3-Cs124-LysDO3A-pic(Eu): Isolated yield = 28%;

HPLC (anal.) t_R = 8.0 min (method A);

ESI-MS: average m/z = 942.6 (7+), 810.7 (8+), 720.7 (9+), 648.7 (10+), 637.4 (10+), 626.5 (10+), 569.5 (7+), 522.1 (12+) / calculated av. m/z = 943.00 $[\text{M}+7\text{H}+3\text{TFA}]^{7+}$, 811.00 $[\text{M}+8\text{H}+2\text{TFA}]^{8+}$, 721.00 $[\text{M}+9\text{H}+2\text{TFA}]^{9+}$, 649.00 $[\text{M}+10\text{H}+2\text{TFA}]^{10+}$, 637.60 $[\text{M}+10\text{H}+1\text{TFA}]^{10+}$, 626.19 $[\text{M}+10\text{H}]^{10+}$, 569.36 $[\text{M}+11\text{H}]^{11+}$, 522.00 $[\text{M}+12\text{H}]^{12+}$ for $\text{M} = \text{C}_{260}\text{H}_{425}\text{EuN}_{94}\text{O}_{73}\text{S}_2$.

Ratiometric copper probes

1: Peptide Boc-Cys(Trt)-His(Trt)-Gly-Pro-Ile-Ala-Ala-Lys(Alloc)-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Pro-Glu(*t*Bu)-Met-Thr(*t*Bu)-Met-Aib-^DPro-Gln(Trt) was assembled on SEA-PS resin (135 μmol , 0.16 mmol/g). The first amino acid, Fmoc-Gln(Trt)-OH was attached to the resin by double manual coupling (30 min) using 10-fold excess of Fmoc-Ala-OH, 9.5-fold excess of HATU and 10-fold excess of DIEA in DMF with pre-activation (5 min) followed by acetylation using ($\text{Ac}_2\text{O}/\text{DIEA}/\text{DCM}$ 2:1:17 by vol., 10 mL, 2 \times 5 min). Peptide elongation was performed as described above but with extended coupling time for ^DPro (1 h), Aib (2 h) and the first Met (1 h). Fmoc-Aib-OH coupling was performed using COMU instead of PyBOP. Boc-Cys(*St*Bu)-OH was used to introduce the final cysteine. Removal of the N-Alloc protecting group of the Lys(Alloc) residue was performed by treating the resin twice with $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (70 μmol , 0.5 eq., 82 mg) and phenylsilane (3.5 mmol, 25 eq., 0.44 mL) in degassed anhydrous DCM (15 mL) for 1h in the dark. The resin was then washed successively with DCM (2 \times 2 min), DMF (2 \times 2 min), 1% H_2O in DMF (2 \times 2 min), DMF (2 \times 2 min), 1% DIEA in DMF (2 \times 2 min), DMF (2 \times 2 min), sodium diethyldithiocarbamate in DMF (0.12 M, 2 \times 5 min) and DMF (2 \times 2 min). A solution of DOTA-*tris*(*t*Bu) ester (142 μmol , 2 eq., 81 mg), PyBOP (142 μmol ,

2 eq., 74 mg) and DIEA (570 μmol , 4 eq., 100 μL) was added to the resin. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The resin was washed with DMF, DCM and Et_2O then dried. The peptide was released from the resin and the side-chain protecting groups were removed by treatment with a TFA/TIS/ H_2O /DTT/thioanisole/octylsulfide cocktail (15 mL:0.5 mL:0.5 mL:500 mg:0.25 mL:0.25 mL) for 6 h. The crude linear peptide Cys(Trt)-His-Gly-Pro-Ile-Ala-Ala-Lys(DOTA)-Lys-Trp-Pro-Glu-Met-Thr-Met-Aib-^DPro-Gln-SEA was obtained as a white solid powder after precipitation with diethyl ether (386 mg). The cyclization was performed on portions corresponding to *ca.* one tenth of the crude linear peptide. A TCEP/MPAA solution was prepared by dissolving TCEP (57.4 mg, 0.2 mmol) and MPAA (33.6 mg, 0.2 mmol) in 0.1 M pH 7 sodium phosphate buffer (2 mL). The pH of the solution was adjusted to 6.5 using aq. NaOH (2 N). The crude linear peptide (40 mg) was dissolved in the TCEP/MPAA solution (1.94 mL, final peptide concentration 7.5 mM). The pH was adjusted to 6.5 and the solution was degassed with argon. The SEA ligation was performed at 37°C. After completion of the reaction as judged by RP-HPLC monitoring (*ca.* 24 h), the reaction medium was purified by preparative RP-HPLC to yield 1 as a white powder (8 mg, 3.0 μmol).

Isolated yield: 22%.

HPLC (anal.) $t_{\text{R}} = 9.8$ min (method A); ESI-MS: average $m/z = 1190.0$ (2+), 793.8 (3+), 595.7 (4+) / calculated av. $m/z = 1190.41$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 793.94 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, 595.71 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ for $\text{M} = \text{C}_{105}\text{H}_{164}\text{N}_{28}\text{O}_{29}\text{S}_3$; deconvoluted mass found = 2378.4 / expected mass = 2378.80 (average isotopic composition).

Formation of Ln^{3+} complexes 1^{Ln} ($\text{Ln} = \text{Tb}$ or Gd):

Compound 1 (1.5 μmol , 4 mg) and LnCl_3 (50 μmol , 15 mg) were dissolved in H_2O and the pH was adjusted to 6.2 using NaOH. The solution was stirred overnight under argon (after 1h, the pH was controlled and adjusted to 6.2 if needed). TCEP (18 μmol , 5 mg) was added prior to removal of excess Ln^{3+} by HPLC purification. 1^{Ln} was obtained as a white powder after freeze-drying (85-90% yield).

1^{Tb} : HPLC (anal.) $t_{\text{R}} = 9.9$ min (method A);

ESI-MS: average $m/z = 1268.1$ (2+), 845.8 (3+) / calculated av. $m/z = 1268.36$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 845.91 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ for $\text{M} = \text{C}_{105}\text{H}_{161}\text{N}_{28}\text{O}_{29}\text{S}_3\text{Tb}$; deconvoluted mass found = 2534.4 / expected mass = 2534.70 (average isotopic composition).

1^{Gd} : HPLC (anal.) $t_{\text{R}} = 9.9$ min (method A);

ESI-MS: average $m/z = 1267.2$ (2+), 845.3 (3+) / calculated av. $m/z = 1267.52$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 845.35 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ for $\text{M} = \text{C}_{105}\text{H}_{161}\text{N}_{28}\text{O}_{29}\text{S}_3\text{Gd}$; deconvoluted mass found = 2532.6 / expected mass = 2533.02 (average isotopic composition).

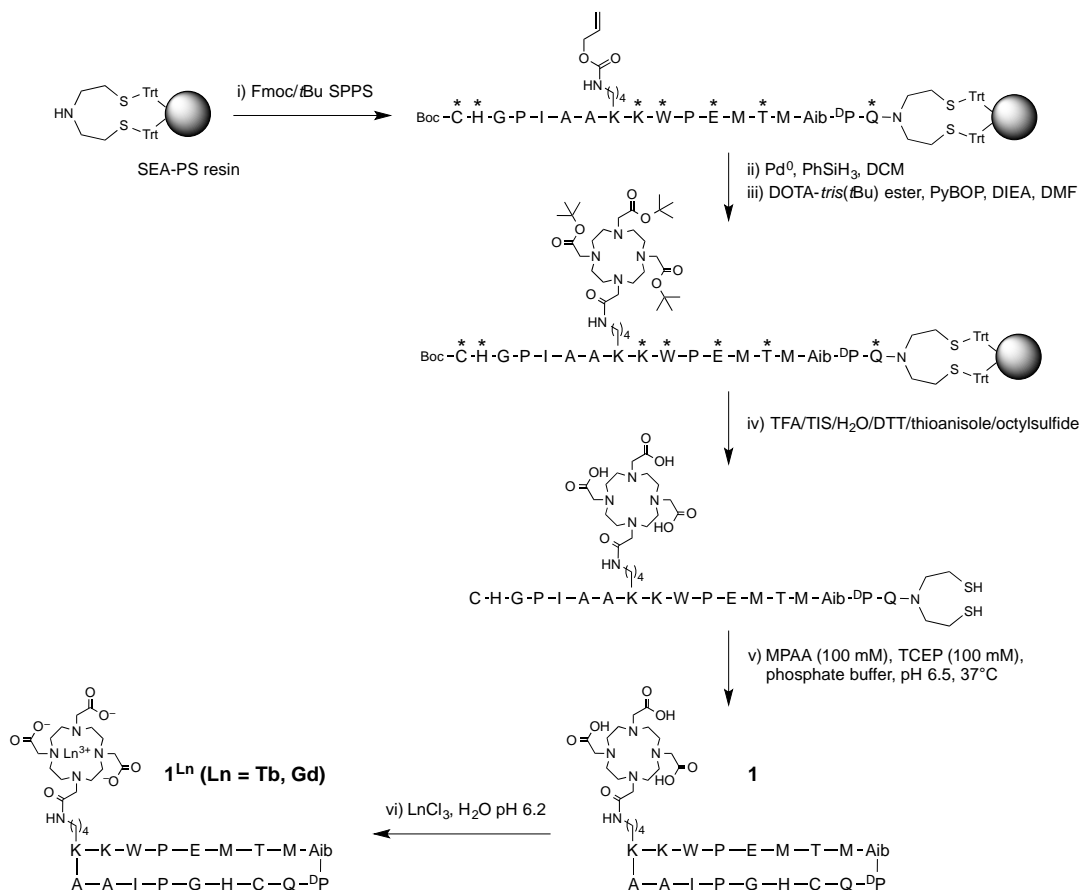


Figure VI.9. : Synthetic pathway for the preparation of 1^{Ln} ($Ln = Tb$ or Gd). * denotes a standard side chain protecting group (Boc for Lys and Trp; *t*Bu for Glu and Thr; Trt for Cys, Gln and His).

2Nal: The peptide was assembled on NovaPEG Rink Amide resin (120 μ mol, 0.4 mol/g) as described above. The N-terminus was acylated overnight at room temperature with DOTA-*tris*(*t*Bu) ester (240 μ mol, 2 eq., 137 mg) using PyBOP (240 μ mol, 2 eq., 125 mg) and DIEA (480 μ mol, 4 eq., 84 μ L) in DMF. The resin was washed with DMF and DCM. Removal of the N-Alloc protecting group of the Lys(Alloc) residue was performed by treating the resin twice with $Pd(PPh_3)_4$ (60 μ mol, 0.5 eq., 82 mg) and phenylsilane (3 mmol, 25 eq., 0.38 mL) in degassed anhydrous DCM (15 mL) for 1h in the dark. The resin was then washed successively with DCM (2 \times 2 min), DMF (2 \times 2 min), 1% H₂O in DMF (2 \times 2 min), DMF (2 \times 2 min), 1% DIEA in DMF (2 \times 2 min), DMF (2 \times 2 min), sodium diethyldithiocarbamate in DMF (0.12 M, 2 \times 5 min) and DMF (2 \times 2 min). 3-Maleimidopropionic acid (240 μ mol, 2 eq., 41 mg) was coupled to the unprotected lysine side chain using PyBOP (240 μ mol, 2 eq., 125 mg) and DIEA (480 μ mol, 4 eq, 84 μ l) in DMF for 30 min. The resin was washed with DMF, DCM and Et₂O then dried. The peptide was released from the resin and the side-chain protecting groups were removed by treatment with a TFA/TIS/H₂O/thioanisole cocktail (12 mL : 0.4 mL : 0.4 mL : 0.2 mL) for 4 h. After precipitation with cold Et₂O and HPLC purification, compound 2Nal was obtained as a white powder (68 g, 58 μ mol of the 2Nal·TFA salt). Isolated yield: 48 %. HPLC (anal.) $t_R = 7.3$ min (method A);

ESI-MS: monoisotopic $m/z = 1065.6 (+)$, $533.3 (2+)$ / calculated monoisotopic $m/z = 1065.53 [M+H]^+$, $533.27 [M+2H]^{2+}$ for $M = C_{50}H_{72}N_{12}O_{14}$.

Formation of Ln^{3+} complexes $3Na^{Ln}$ ($Ln = Eu$ or Gd): Compound $2Na$ ($3.4 \mu\text{mol}$, 4 mg) was dissolved in H_2O and the pH was adjusted to 6.2 using $NaOH$. Then, the lanthanide salt $LnCl_3$ ($10 \mu\text{mol}$) was added. After 1 h, the pH was controlled and adjusted to 6.2. The solution was stirred for 48h under argon until hydrolysis of the maleimide moiety is complete, as judged by HPLC monitoring. Excess Ln^{3+} was removed by HPLC purification. Compound $3Na^{Ln}$ was obtained as a white powder after freeze-drying (85-90% yield).

$3Na^{Eu}$: HPLC (anal.) $t_R = 6.9 \text{ min}$ (method A);

ESI-MS: monoisotopic $m/z = 1233.4 (+)$, $617.3 (2+)$ / calculated monoisotopic $m/z = 1233.44 [M+H]^+$, $617.23 [M+2H]^{2+}$ for $M = C_{50}H_{71}N_{12}O_{15}Eu$.

$3Na^{Gd}$: HPLC (anal.) $t_R = 6.9 \text{ min}$ (method A);

ESI-MS: monoisotopic $m/z = 1238.4 (+)$, $619.8 (2+)$ / calculated monoisotopic $m/z = 1238.45 [M+H]^+$, $619.73 [M+2H]^{2+}$ for $M = C_{50}H_{71}N_{12}O_{15}Gd$.

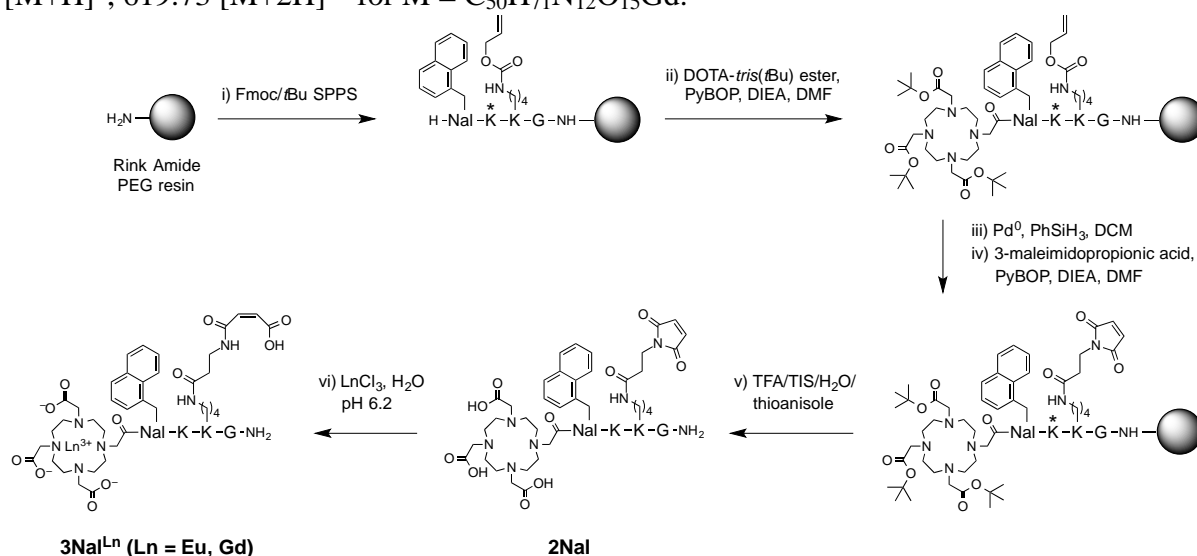


Figure VI.10. : Synthetic pathway for the preparation of $3Na^{Ln}$ ($Ln = Eu$ or Gd). * denotes a side chain Boc protecting group.

2Ala: Compound $2Ala$ was synthesized following the procedure described above for $2Na$ but replacing Fmoc-Nal-OH by Fmoc-Ala-OH. Compound $2Ala$ was obtained as a white powder after HPLC purification (57 g , $54 \mu\text{mol}$ of the $2Ala \cdot TFA$ salt).

Isolated yield: 45 %.

HPLC (anal.) $t_R = 3.1 \text{ min}$ (method A);

ESI-MS: monoisotopic $m/z = 939.5 (+)$, $470.4 (2+)$ / calculated monoisotopic $m/z = 939.48 [M+H]^+$, $470.25 [M+2H]^{2+}$ for $M = C_{40}H_{66}N_{12}O_{14}$.

Formation of Ln³⁺ complexes 3Ala^{Ln} (Ln = Eu or Gd): Compound 2Ala (3.8 μmol, 4 mg) was dissolved in H₂O and the pH was adjusted to 6.2 using NaOH. Then, the lanthanide salt LnCl₃ (10 μmol) was added. After 1 h, the pH was controlled and adjusted to 6.2. The solution was stirred for 48h under argon until hydrolysis of the maleimide moiety is complete, as judged by HPLC monitoring. Excess Ln³⁺ was removed by HPLC purification. Compound 3Na^{Ln} was obtained as a white powder after freeze-drying (85-90% yield).

3Ala^{Eu}: HPLC (anal.) *t*_R = 3.1 min (method A);

ESI-MS: monoisotopic *m/z* = 1107.3 (+), 554.4 (2+) / calculated monoisotopic *m/z* = 1107.40 [M+H]⁺, 554.20 [M+2H]²⁺ for M = C₄₀H₆₅N₁₂O₁₅Eu.

3Ala^{Gd}: HPLC (anal.) *t*_R = 3.1 min (method A);

ESI-MS: monoisotopic *m/z* = 1112.3 (+), 556.6 (2+) / calculated monoisotopic *m/z* = 1112.40 [M+H]⁺, 556.70 [M+2H]²⁺ for M = C₄₀H₆₅N₁₂O₁₅Gd.

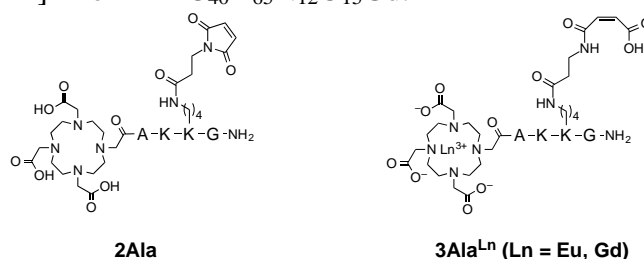


Figure VI.10. : Compounds 2Ala and 3Ala^{Ln} (Ln = Eu or Gd).

LCC2^{Ln1Ln2} (Ln1 = Tb or Gd; Ln2 = Eu or Gd): Compounds 1^{Ln1} (1.8 μmol, 5 mg) was dissolved in a 50 mM solution of 3Na^{Ln2} (3.2 μmol, 4.3 mg) in 0.1 M pH 7.5 sodium phosphate buffer prepared in a glove box. The reaction mixture was stirred at room temperature in the glove box for 24 h (1^{Ln1} and LCC2^{Ln1|Na||Ln2} could not be resolved using an analytical Merck Chromolith HPLC column but could be separated on the preparative Waters XBridge column used for purification). After HPLC purification and freeze-drying, LCC2^{Ln1Ln2} was obtained as a white powder (*ca.* 2 mg, 0.5 μmol of the LCC2^{Ln1Ln2}·(TFA)₃ salt, 20-30 % yield). **LCC2^{TbEu}:** HPLC (anal.) *t*_R = 9.9 min (method A); ESI-MS: average *m/z* = 1256.5 (3+), 942.6 (4+), 754.4 (5+) / calculated av. *m/z* = 1256.62 [M+3H]³⁺, 942.76 [M+4H]⁴⁺, 754.38 [M+5H]⁵⁺ for M = C₁₅₅H₂₃₂N₄₀O₄₄S₃TbEu); deconvoluted mass found = 3766.8 / expected mass = 3766.84 (average isotopic composition).

LCC2^{TbGd}: HPLC (anal.) *t*_R = 9.9 min (method A);

ESI-MS: average *m/z* = 1258.1 (3+), 944.2 (4+), 755.4 (5+) / calculated av. *m/z* = 1258.38 [M+3H]³⁺, 944.04 [M+4H]⁴⁺, 755.43 [M+5H]⁵⁺ for M = C₁₅₅H₂₃₂N₄₀O₄₄S₃TbGd); deconvoluted mass found = 3771.2 / expected mass = 3772.13 (average isotopic composition).

LCC2^{GdEu}: HPLC (anal.) *t*_R = 10.0 min (method A);

ESI-MS: average *m/z* = 1255.7 (3+), 942.2 (4+), 754.2 (5+) / calculated av. *m/z* = 1256.06 [M+3H]³⁺, 942.30 [M+4H]⁴⁺, 754.04 [M+5H]⁵⁺ for M = C₁₅₅H₂₃₂N₄₀O₄₄S₃GdEu);

deconvoluted mass found = 3765.1 / expected mass = 3765.16 (average isotopic composition).

LCC2^{GdGd}: HPLC (anal.) t_R = 9.9 min (method A);

ESI-MS: average m/z = 1257.2 (3+), 943.3 (4+), 754.5 (5+) / calculated av. m/z = 1257.82 [M+3H]³⁺, 943.62 [M+4H]⁴⁺, 755.10 [M+5H]⁵⁺ for M = C₁₅₅H₂₃₂N₄₀O₄₄S₃Gd₂); deconvoluted mass found = 3769.1 / expected mass = 3770.45 (average isotopic composition).

LCC2 Δ ^{Ln1Ln2} (Ln1 = Tb or Gd; Ln2 = Eu or Gd): Compounds 1^{Ln1} (0.7 μ mol, 2 mg) was dissolved in a 50 mM solution of 3Ala^{Ln2} (1.4 μ mol, 1.8 mg) in 0.1 M pH 7.5 sodium phosphate buffer prepared in a glove box. The reaction mixture was stirred at room temperature in the glove box until the thiol-maleamide coupling reaction is completed as judged by analytical HPLC (*ca.* 15-24 h). After HPLC purification and freeze-drying, LCC2 Δ ^{Ln1Ln2} was obtained as a white powder (*ca.* 0.8 mg, 0.2 μ mol of the LCC2^{Ln1|Ala|Ln2}·(TFA)₃ salt, 20-30 % yield).

LCC2 Δ ^{TbEu}: HPLC (anal.) t_R = 9.2 min (method A);

ESI-MS: average m/z = 1214.4 (3+), 1221.7 (3+), 911.2 (4+), 916.6 (3+), 920.6 (3+), 733.6 (5+), 736.8 (5+) / calculated av. m/z = 1214.57 [M+3H]³⁺, 1221.90 [M+2H+Na]³⁺, 911.18 [M+4H]⁴⁺, 916.67 [M+3H+Na]⁴⁺, 920.70 [M+3H+K]⁴⁺, 733.54 [M+4H+Na]⁵⁺, 736.76 [M+4H+K]⁵⁺ for M = C₁₄₅H₂₂₆N₄₀O₄₄S₃GdEu); deconvoluted mass found = 3639.1 / expected mass = 3639.01 (average isotopic composition).

LCC2 Δ ^{TbGd}: HPLC (anal.) t_R = 9.2 min (method A);

ESI-MS: average m/z = 1216.2 (3+), 912.3 (4+), 730.1 (5+) / calculated av. m/z = 1216.33 [M+3H]³⁺, 912.50 [M+4H]⁴⁺, 730.20 [M+5H]⁵⁺ for M = C₁₄₅H₂₂₆N₄₀O₄₄S₃TbGd); deconvoluted mass found = 3645.2 / expected mass = 3645.97 (average isotopic composition).

LCC2 Δ ^{GdEu}: HPLC (anal.) t_R = 9.3 min (method A);

ESI-MS: average m/z = 1214.0 (3+), 910.7 (4+), 728.8 (5+) / calculated av. m/z = 1214.01 [M+3H]³⁺, 910.76 [M+4H]⁴⁺, 728.81 [M+5H]⁵⁺ for M = C₁₄₅H₂₂₆N₄₀O₄₄S₃GdEu); deconvoluted mass found = 3639.1 / expected mass = 3639.01 (average isotopic composition).

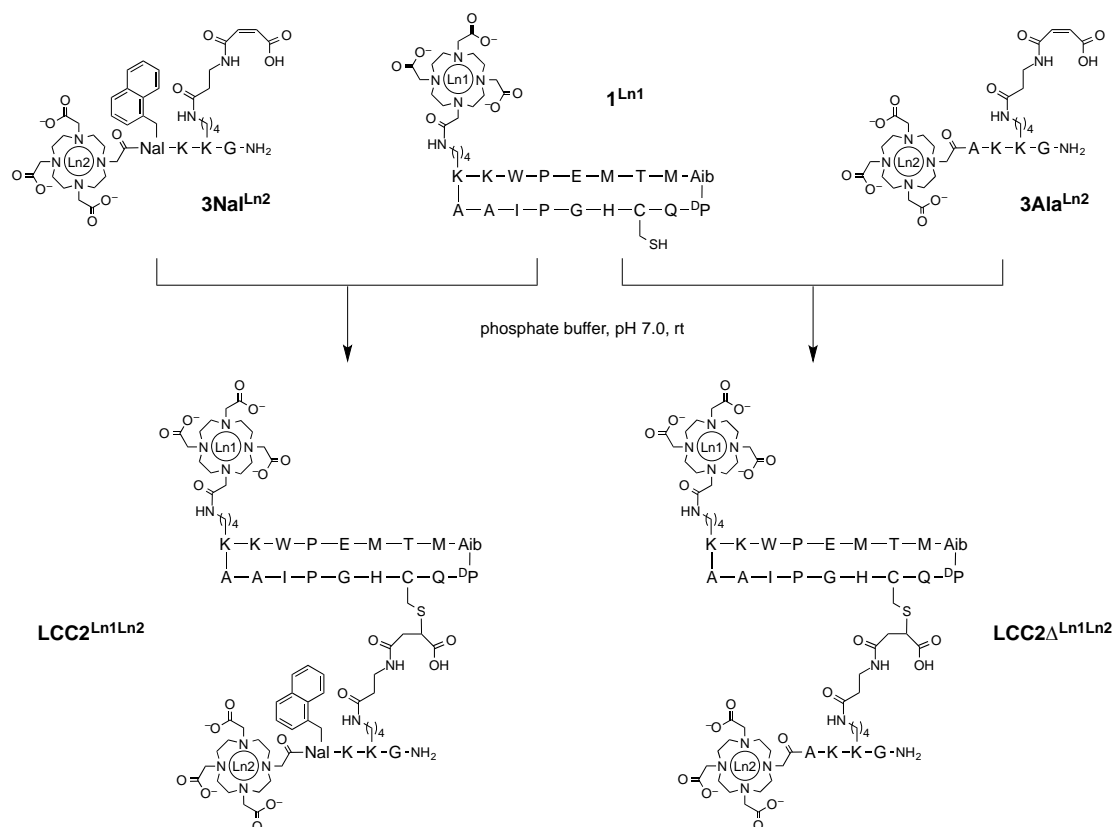


Figure VI.11. : Synthetic pathway for the preparation of $LCC2^{Ln1Ln2}$ and $LCC2\Delta^{Ln1Ln2}$ from 1^{Ln1} , $3Na^{Ln2}$ or $3Ala^{Ln2}$ ($Ln1$ or $Ln2 = Tb, Eu$ or Gd). Only one of the two possible regio-isomers for the thiol-maleimide coupling is represented.

Spectroscopy

Sample preparation

All stock solutions (buffer, hydroxylamine) were prepared in order to avoid chloride. The pH was adjusted with $HClO_4$. Peptide stock solutions were prepared by dissolving peptide in water. The concentrations were measured by absorbance spectroscopy (tabl. VI.1.).

Table VI.1. : Absorption coefficients of antennas

Antenna	λ (nm)	$\epsilon, M^{-1}.cm^{-1}$
Tryptophan	280	5690
Naphtalene	283	5650
Anthracene	370	8000
Cs124	330	17150
Coumarin-CF3	340	19000
Acridone	400	10000
Cs124-CF3	343	14900
Coumarin	425	46800

Samples were prepared daily by mixing in rubber-sealed quartz cell (1 cm path length) the peptide, the buffer. The buffers were chosen according to the spectroscopy used: HEPES for absorbance and luminescence studies, phosphate buffer for the CD spectroscopy. For zinc(II) probes titrations were performed by additions of ZnCl_2 (1.68 mM in water) aerobically using TCEP as a reductant (250 μM). For silver(I) experiments, metalation was performed using a solution of AgClO_4 (3.52 mM, in water). For copper(I) experiments, hydroxylamine (2 mM) was added to generate copper(I) introduced as CuSO_4 solution (2.18 mM, in water). Copper(I) and some silver(I) titration were performed anaerobically, for this purpose water, buffer, metal solution were kept in glove box and all handling were performed in the glove box.

Measurements:

For Tb^{3+} - and Eu^{3+} -containing samples, emission and excitation spectra were measured on a Varian Cary Eclipse spectrometer equipped with a thermo-regulated cell holder or on a modular Fluorolog FL3-22 spectrometer from Horiba-Jobin Yvon-Spex equipped with a double-grating excitation monochromator and an iHR320 imaging spectrometer coupled to an R928P Hamamatsu photomultiplier. Time-gated Tb^{3+} and Eu^{3+} luminescence spectra were acquired with 100 μs time delay. Tb^{3+} and Eu^{3+} luminescence lifetimes were measured using a Varian Cary Eclipse spectrometer. Quantum yields for antenna (Φ_{antenna}) and lanthanide (Φ_{Ln}) emission of LZFI probes were determined by a relative method with quinine sulphate in 0.5M H_2SO_4 or $\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2$ in H_2O as standards^[162] for Tb^{3+} and Eu^{3+} -based probes. Estimated experimental error for the quantum yield determination in the visible range is ~10 %.

For Nd^{3+} and Yb^{3+} -containing samples: Emission and excitation spectra were measured on a custom-designed Horiba Scientific Fluorolog 3 spectrofluorimeter equipped with either a visible photomultiplier tube (PMT) (220–850 nm, R928P; Hamamatsu) or a NIR PMT (940–1650 nm, H10330-75; Hamamatsu) or 300-1400 nm, R5509; Hamamatsu). Excitation and emission spectra were corrected for the instrumental functions. Luminescence lifetimes were determined by a Nd:YAG laser (YG 980; Quantel). Signals were detected in the NIR by a Hamamatsu H10330-75 PMT. Output signals from the detector were fed into a 500 MHz bandpass digital oscilloscope (TDS 754C; Tektronix), transferred to a PC for data processing with the program Origin 8®. Luminescence lifetimes are averages of at least three independent measurements. Quantum yields were determined with the Fluorolog 3 spectrofluorimeter based on an absolute method using an integration sphere (Model G8, GMP SA, Renens, Switzerland)^[163]. Each sample was measured several times under comparable experimental conditions. Estimated experimental error for the quantum yield determination in the NIR range is ~10 %.

Influence of metal cations:

Solutions of zinc probes in the absence and presence of 2.0 eq. Zn^{2+} were prepared in a HEPES buffer (10 mM, pH 7.5) containing TCEP (250 μ M). Time-gated emission spectra were recorded before and after addition of concentrated stock solutions of metal cations corresponding to 2 eq. vs zinc probes for Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} or Cu^{2+} (sulphate salts), 50 mM for Na^+ or K^+ (perchlorate salts) and 10 mM for Mg^{2+} and Ca^{2+} (perchlorate salts). Same experiments were performed using a stock solution of copper probes containing 2 mM of hydroxylamine in anaerobic medium in the absence and presence of 2.0 eq. Cu^+ .

Determination of binding constants

For zinc probes, binding constants were determined by titrating a solution containing the zinc probe and a known amount of an appropriate competitor tested among EDTA, HEDTA and EGTA. For all probes, EDTA and HEDTA were found to be too strong competitors and the binding constants were determined using EGTA. For all zinc probes, time-gated Ln^{3+} emission was used to monitor the titration. For each titration, the evolution of the intensity against the Zn^{2+} /peptide ratio (r) was fitted to the equilibrium $Zn \cdot SP3 + EGTA \rightleftharpoons SP3 + Zn \cdot EGTA$ by Equations (1-7) in which I_0 and I_F are the emission intensities at the beginning and the end of the titration, $[SP3]_t$, $[EGTA]_t$ and $[Zn]_t$ the total concentrations of SP3, EGTA and Zn^{2+} introduced in the solution. The apparent Zn^{2+} binding constant of EGTA at pH 7.5 was calculated from pKa and $\log \beta_{11}$ values reported in the literature: $K_{Zn-EGTA} = 10^{9.2[164,165]}$. The dilution could be neglected.

$$I = I_0 + \frac{I_F - I_0}{[SP3]_t} \times \frac{-b - \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}, \text{ when } [Zn]_t < [SP3]_t + [EGTA]_t \quad (1)$$

$$I = I_F, \text{ when } [Zn]_t > [SP3]_t + [EGTA]_t \quad (2)$$

$$r = \frac{[Zn]_t}{[SP3]} \quad (3)$$

$$a = K - 1 \quad (4)$$

$$b = r[SP3]_t - [EGTA]_t - rK[SP3]_t - K[SP3]_t \quad (5)$$

$$c = rK[SP3]_t^2 \quad (6)$$

$$K = \frac{K_{SP3}}{K_{Zn-EGTA}} \quad (7)$$

For copper probes, binding constants were determined by titrating a solution containing the copper probe (10 μ M), imidazole (5 mM) and hydroxylamine (2 mM) for copper titration and. Eu^{3+} emission spectra ($\lambda_{ex} = 280$ nm) were recorded after each addition of metal (equilibration is reached in a few seconds). The titrations were fitted using the

program SPECFIT with the formation constants of the $[\text{Cu}(\text{imidazole})]^+$, $[\text{Cu}(\text{imidazole})_2]^{+[150]}$, $[\text{Ag}(\text{imidazole})]^+$, $[\text{Ag}(\text{imidazole})_2]^{+[166]}$.

Determination of q , the number of water molecules coordinated to Tb^{3+} or Eu^{3+} :

Solutions of probes in a HEPES buffer (10 mM, pH 7.5) containing TCEP (250 μM) for zinc probes were prepared in various $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ mixtures (25, 50, 75 and 100 % H_2O). Lifetimes in 100 % D_2O were extrapolated from the plot of the rate constants of Ln^{3+} luminescence decay ($k_{\text{Ln}} = \tau_{\text{Ln}}^{-1}$) against the fraction of H_2O in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ mixtures. The number of coordinated water molecules (q) was determined using $q = 5 \times (k_{\text{Tb}/\text{H}_2\text{O}} - k_{\text{Tb}/\text{D}_2\text{O}} - 0.06)$ for Tb^{3+} and $q = 1.2 \times (k_{\text{Eu}/\text{H}_2\text{O}} - k_{\text{Eu}/\text{D}_2\text{O}} - 0.325)$ for Eu^{3+} [71].

Circular dichroism

Circular dichroism was used to monitor the Zn-induced folding of the zinc probes. For this purpose a solution of the zinc probe (10-15 μM) was prepared in an aerated phosphate buffer (10 mM, pH 7.5) containing TCEP as reducing agent (250 μM). Zn^{2+} was titrated into this solution using a $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2$ solution (1.00 mM in water). CD spectra were recorded on an Applied Photophysics Chirascan spectropolarimeter equipped with a thermo-regulated cell holder using 0.4 cm path length cuvettes. Spectra were recorded from 300 nm to 200 nm every 1 nm with a 2 s signal averaging for each point. Each spectrum was recorded twice, averaged and smoothed using a Stavitsky-Golay filter.

Chapitre VII : Bibliographie

- [1] F. P. Guengerich, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 709–709.
- [2] F. Vella, *Biochem. Educ.* **1995**, *23*, 115–115.
- [3] R. Portmann, M. Solioz, *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 3589–3595.
- [4] I. Voskoboinik, J. Mar, J. Camakaris, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *301*, 488–494.
- [5] M. Baharvand, S. Manifar, R. Akkafan, H. Mortazavi, S. Sabour, *Biomed. J.* **2014**, *37*, 331–336.
- [6] M. Foster, S. Samman, *Nutrients* **2012**, *4*, 676–694.
- [7] A. Gaeta, R. C. Hider, *Br. J. Pharmacol.* **2005**, *146*, 1041–1059.
- [8] C. Andreini, L. Banci, I. Bertini, A. Rosato, *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 196–201.
- [9] C. Castillo-Durán, G. Weisstaub, *J. Nutr.* **2003**, *133*, 1494S–7S.
- [10] T. Fukada, S. Yamasaki, K. Nishida, M. Murakami, T. Hirano, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2011**, *16*, 1123–1134.
- [11] T. Kočańczyk, A. Drozd, A. Krężel, *Metallomics* **2015**, *7*, 244–257.
- [12] C. J. Frederickson, S. W. Suh, D. Silva, C. J. Frederickson, R. B. Thompson, *J. Nutr.* **2000**, *130*, 1471S–83S.
- [13] S. Yamasaki, K. Sakata-Sogawa, A. Hasegawa, T. Suzuki, K. Kabu, E. Sato, T. Kurosaki, S. Yamashita, M. Tokunaga, K. Nishida, et al., *J. Cell Biol.* **2007**, *177*, 637–645.
- [14] D. J. Eide, *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1763*, 711–722.
- [15] P. Bonaventura, G. Benedetti, F. Albarède, P. Miossec, *Autoimmun. Rev.* **2015**, *14*, 277–285.
- [16] G. A. Kerchner, L. M. Canzoniero, S. P. Yu, C. Ling, D. W. Choi, *J. Physiol.* **2000**, *528 Pt 1*, 39–52.
- [17] S. Yamasaki, A. Hasegawa, S. Hojyo, W. Ohashi, T. Fukada, K. Nishida, T. Hirano, *PLoS One* **2012**, *7*, e39654.
- [18] A. Bouron, J. Oberwinkler, *Pflugers Arch.* **2014**, *466*, 381–387.
- [19] L. M. Canzoniero, D. M. Turetsky, D. W. Choi, *J. Neurosci.* **1999**, *19*, RC31.
- [20] D. Ragozzino, A. Giovannelli, V. Degasperri, F. Eusebi, F. Grassi, *J. Physiol.* **2000**, *529 Pt 1*, 83–91.
- [21] R. A. Festa, D. J. Thiele, *Curr. Biol.* **2011**, *21*, R877–R883.
- [22] T. D. Rae, P. J. Schmidt, R. A. Pufahl, V. C. Culotta, T. V. O’Halloran, *Science* **1999**, *284*, 805–808.
- [23] O. Bandmann, K. H. Weiss, S. G. Kaler, *Lancet Neurol* **2015**, *14*, 103–113.
- [24] J. Joseph A. Cotruvo, A. T. Aron, K. M. Ramos-Torres, C. J. Chang, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4400–4414.
- [25] S. Lutsenko, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 211–217.
- [26] J. T. Rubino, K. J. Franz, *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *107*, 129–143.

- [27] M. Laitaoja, J. Valjakka, J. Jänis, *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 10983–10991.
- [28] J. C. Smith, G. P. Butrimovitz, W. C. Purdy, *Clin. Chem.* **1979**, *25*, 1487–1491.
- [29] D. Pröfrock, A. Prange, *Appl. Spectrosc.* **2012**, *66*, 843–868.
- [30] Z. Qin, J. A. Caruso, B. Lai, A. Matusch, J. S. Becker, *Metallomics* **2011**, *3*, 28–37.
- [31] R. j. Gillies, *J. Cell. Biochem.* **2002**, *87*, 231–238.
- [32] Y. Mikata, Y. Sato, S. Takeuchi, Y. Kuroda, H. Konno, S. Iwatsuki, *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 9688–9698.
- [33] G. K. Walkup, S. C. Burdette, S. J. Lippard, R. Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5644–5645.
- [34] T. Hirano, K. Kikuchi, Y. Urano, T. Higuchi, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12399–12400.
- [35] N. C. Lim, L. Yao, H. C. Freake, C. Brückner, *Bioorg. Med. Chem. Let.* **2003**, *13*, 2251–2254.
- [36] N. C. Lim, C. Brückner, *Chem. Commun.* **2004**, *0*, 1094–1095.
- [37] Y. Wu, X. Peng, B. Guo, J. Fan, Z. Zhang, J. Wang, A. Cui, Y. Gao, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1387–1392.
- [38] H. Koutaka, J. Kosuge, N. Fukasaku, T. Hirano, K. Kikuchi, Y. Urano, H. Kojima, T. Nagano, *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, *52*, 700–703.
- [39] J. Wang, Y. Xiao, Z. Zhang, X. Qian, Y. Yang, Q. Xu, *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 2836–2839.
- [40] P. Du, S. J. Lippard, *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 10753–10755.
- [41] H. Sasaki, K. Hanaoka, Y. Urano, T. Terai, T. Nagano, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 1072–1078.
- [42] B. Tang, H. Huang, K. Xu, L. Tong, G. Yang, X. Liu, L. An, *Chem. Commun.* **2006**, *0*, 3609–3611.
- [43] K. P. Carter, A. M. Young, A. E. Palmer, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4564–4601.
- [44] K. R. Gee, Z.-L. Zhou, D. Ton-That, S. L. Sensi, J. H. Weiss, *Cell Calcium* **2002**, *31*, 245–251.
- [45] M. Taki, J. L. Wolford, T. V. O'Halloran, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 712–713.
- [46] S. Maruyama, K. Kikuchi, T. Hirano, Y. Urano, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10650–10651.
- [47] K. P. Divya, S. Sreejith, P. Ashokkumar, K. Yuzhan, Q. Peng, S. K. Maji, Y. Tong, H. Yu, Y. Zhao, P. Ramamurthy, et al., *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 3469–3474.
- [48] N. Lin, Q. Zhang, X. Xia, M. Liang, S. Zhang, L. Zheng, Q. Cao, Z. Ding, *RSC Adv.* **2017**, *7*, 21446–21451.
- [49] W. Qiao, M. Mooney, A. J. Bird, D. R. Winge, D. J. Eide, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 8674–8679.
- [50] E. M. W. M. van Dongen, L. M. Dekkers, K. Spijker, E. W. Meijer, L. W. J. Klomp, M. Merckx, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10754–10762.
- [51] E. M. W. M. van Dongen, T. H. Evers, L. M. Dekkers, E. W. Meijer, L. W. J. Klomp, M. Merckx, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3494–3495.
- [52] J. L. Vinkenburg, T. J. Nicolson, E. A. Bellomo, M. S. Koay, G. A. Rutter, M. Merckx, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 737–740.
- [53] I. A. Brand, J. Kleineke, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 1941–1949.
- [54] A. Krezel, W. Maret, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, *11*, 1049–1062.
- [55] R. A. Bozym, R. B. Thompson, A. K. Stoddard, C. A. Fierke, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 103–111.
- [56] P. J. Dittmer, J. G. Miranda, J. A. Gorski, A. E. Palmer, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 16289–16297.

- [57] L. Yang, R. McRae, M. M. Henary, R. Patel, B. Lai, S. Vogt, C. J. Fahrni, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102*, 11179–11184.
- [58] M. T. Morgan, P. Bagchi, C. J. Fahrni, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15906–15909.
- [59] L. Zeng, E. W. Miller, A. Pralle, E. Y. Isacoff, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10–11.
- [60] S. C. Dodani, D. W. Domaille, C. I. Nam, E. W. Miller, L. A. Finney, S. Vogt, C. J. Chang, *PNAS* **2011**, *108*, 5980–5985.
- [61] D. W. Domaille, L. Zeng, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1194–1195.
- [62] S. V. Wegner, F. Sun, N. Hernandez, C. He, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2571–2573.
- [63] S. V. Wegner, H. Arslan, M. Sunbul, J. Yin, C. He, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2567–2569.
- [64] M. S. Koay, B. M. G. Janssen, M. Merckx, *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 3230–3232.
- [65] J.-C. G. Bünzli, *J. Coord. Chem.* **2014**, *67*, 3706–3733.
- [66] P. Caravan, J. J. Ellison, T. J. McMurry, R. B. Lauffer, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2293–2352.
- [67] J.-C. G. Bünzli, *Coord. Chem. Rev.* **2015**, *293*, 19–47.
- [68] F. J. Steemers, W. Verboom, D. N. Reinhoudt, E. B. van der Tol, J. W. Verhoeven, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9408–9414.
- [69] M. Latva, H. Takalo, V.-M. Mikkala, C. Matachescu, J. C. Rodríguez-Ubis, J. Kankare, *J. Lumin.* **1997**, *75*, 149–169.
- [70] A. Thibon, V. C. Pierre, *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 107–120.
- [71] A. Beeby, I. M. Clarkson, R. S. Dickins, S. Faulkner, D. Parker, L. Royle, A. S. de Sousa, J. A. G. Williams, M. Woods, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1999**, *0*, 493–504.
- [72] O. Sénèque, J.-M. Latour, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17760–17774.
- [73] S. Allen, A. Badarau, C. Dennison, *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 3233–3239.
- [74] S. S. Krishna, I. Majumdar, N. V. Grishin, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 532–550.
- [75] G. K. Walkup, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3053–3054.
- [76] H. A. Godwin, J. M. Berg, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6514–6515.
- [77] S. Franke, G. Grass, C. Rensing, D. H. Nies, *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 3804–3812.
- [78] Y. Xue, A. V. Davis, G. Balakrishnan, J. P. Stasser, B. M. Staehlin, P. Focia, T. G. Spiro, J. E. Penner-Hahn, T. V. O’Halloran, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 107–109.
- [79] D. Bang, S. B. H. Kent, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2534–2538.
- [80] L. Raibaut, H. Adihou, R. Desmet, A. F. Delmas, V. Aucagne, O. Melnyk, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 4061–4066.
- [81] P. M. E. Gramlich, S. Warncke, J. Gierlich, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3442–3444.
- [82] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776–779.
- [83] A. B. Clippingdale, C. J. Barrow, J. D. Wade, *J. Pept. Sci.* **2000**, *6*, 225–234.
- [84] X. Li, T. Kawakami, S. Aimoto, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8669–8672.
- [85] X. Li, T. Kawakami, S. Aimoto, in *Peptide Science — Present and Future*, Springer, Dordrecht, **1999**, pp. 579–580.
- [86] J. Brask, F. Albericio, K. J. Jensen, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2951–2953.
- [87] J. Tulla-Puche, G. Barany, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4101–4107.
- [88] H. Hojo, Y. Onuma, Y. Akimoto, Y. Nakahara, Y. Nakahara, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 25–28.
- [89] N. Ollivier, L. Raibaut, A. Blanpain, R. Desmet, J. Dheur, R. Mhidia, E. Boll, H. Drobecq, S. L. Pira, O. Melnyk, *J. Pept. Sci.* **2014**, *20*, 92–97.
- [90] W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 475–481.
- [91] K. Rose, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 30–33.

- [92] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *114*, 2708–2711.
- [93] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
- [94] S. Bräse, C. Gil, K. Knepper, V. Zimmermann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5188–5240.
- [95] V. Hong, S. I. Presolski, C. Ma, M. G. Finn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9879–9883.
- [96] D. Lin, S. Saleh, D. C. Liebler, *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 2361–2369.
- [97] T. Just Sørensen, A. M. Kenwright, S. Faulkner, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 2054–2059.
- [98] P. Ge, P. R. Selvin, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 1088–1094.
- [99] D. Kovacs, X. Lu, L. S. Mészáros, M. Ott, J. Andres, K. E. Borbas, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 5756–5767.
- [100] J. Farrera-Sinfreu, M. Royo, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 7813–7815.
- [101] N. Thieriet, J. Alsina, E. Giralt, F. Guibé, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7275–7278.
- [102] A. M. Reynolds, B. R. Sculimbrene, B. Imperiali, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 588–591.
- [103] E. Boll, H. Drobecq, N. Ollivier, A. Blanpain, L. Raibaut, R. Desmet, J. Vicogne, O. Melnyk, *Nat. Protocols* **2015**, *10*, 269–292.
- [104] N. Ollivier, J. Dheur, R. Mhidia, A. Blanpain, O. Melnyk, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5238–5241.
- [105] J. Moreau, E. Guillon, J.-C. Pierrard, J. Rimbault, M. Port, M. Aplincourt, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 5218–5232.
- [106] M. Li, P. R. Selvin, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8132–8138.
- [107] Z. Xiao, A. G. Wedd, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 768–789.
- [108] M. Isaac, L. Raibaut, C. Cepeda, A. Roux, D. Boturnyn, S. V. Eliseeva, S. Petoud, O. Sénéque, *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 10992–10996.
- [109] D. Derossi, A. H. Joliot, G. Chassaing, A. Prochiantz, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 10444–10450.
- [110] E. Vivès, P. Brodin, B. Lebleu, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 16010–16017.
- [111] P. E. G. Thorén, D. Persson, P. Isakson, M. Goksör, A. Onfelt, B. Nordén, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *307*, 100–107.
- [112] S. Futaki, T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda, Y. Sugiura, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 5836–5840.
- [113] J. Oehlke, A. Scheller, B. Wiesner, E. Krause, M. Beyermann, E. Klauschenz, M. Melzig, M. Bienert, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1414*, 127–139.
- [114] M. Pooga, M. Hällbrink, M. Zorko, Uuml, L. Langel, *FASEB J.* **1998**, *12*, 67–77.
- [115] A. Elmquist, M. Lindgren, T. Bartfai, null Langel U, *Exp. Cell Res.* **2001**, *269*, 237–244.
- [116] M. R. Yeaman, N. Y. Yount, *Pharmacol. Rev.* **2003**, *55*, 27–55.
- [117] O. Toke, *Biopolymers* **2005**, *80*, 717–735.
- [118] Y. Shai, Z. Oren, *Peptides* **2001**, *22*, 1629–1641.
- [119] T. Hara, Y. Mitani, K. Tanaka, N. Uematsu, A. Takakura, T. Tachi, H. Kodama, M. Kondo, H. Mori, A. Otaka, et al., *Biochemistry* **2001**, *40*, 12395–12399.
- [120] S. Deshayes, T. Plénat, P. Charnet, G. Divita, G. Molle, F. Heitz, *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758*, 1846–1851.
- [121] S. T. Henriques, M. A. R. B. Castanho, *Biochemistry* **2004**, *43*, 9716–9724.
- [122] J. Gehl, *Acta Physiol. Scand.* **2003**, *177*, 437–447.
- [123] P. Lundberg, U. Langel, *J. Mol. Recognit.* **2003**, *16*, 227–233.
- [124] A. Aderem, D. M. Underhill, *Annu. Rev. Immunol.* **1999**, *17*, 593–623.

- [125] J. A. Champion, S. Mitragotri, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 4930–4934.
- [126] M. C. Kerr, R. D. Teasdale, *Traffic* **2009**, *10*, 364–371.
- [127] J. Mercer, A. Helenius, *Nat. Cell Biol.* **2009**, *11*, 510–520.
- [128] S. D. Conner, S. L. Schmid, *Nature* **2003**, *422*, 37–44.
- [129] S. R. Schwarze, S. F. Dowdy, *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, *21*, 45–48.
- [130] W. B. Kauffman, T. Fuselier, J. He, W. C. Wimley, *Trends Biochem. Sci.* **2015**, *40*, 749–764.
- [131] E. Eiríksdóttir, K. Konate, U. Langel, G. Divita, S. Deshayes, *BBA Mol. Cell Res.* **2010**, *1798*, 1119–1128.
- [132] J. P. Richard, K. Melikov, E. Vives, C. Ramos, B. Verbeure, M. J. Gait, L. V. Chernomordik, B. Lebleu, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 585–590.
- [133] J. P. Richard, K. Melikov, H. Brooks, P. Prevot, B. Lebleu, L. V. Chernomordik, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 15300–15306.
- [134] J. S. Wadia, R. V. Stan, S. F. Dowdy, *Nat. Med.* **2004**, *10*, 310–315.
- [135] I. D. Alves, C. Bechara, A. Walrant, Y. Zaltsman, C.-Y. Jiao, S. Sagan, *PLoS One* **2011**, *6*, DOI 10.1371/journal.pone.0024096.
- [136] C. Bechara, M. Pallerla, F. Burlina, F. Illien, S. Cribier, S. Sagan, *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, *72*, 809–820.
- [137] W.-M. Yau, W. C. Wimley, K. Gawrisch, S. H. White, *Biochemistry* **1998**, *37*, 14713–14718.
- [138] H. A. Rydberg, M. Matson, H. L. Åmand, E. K. Esbjörner, B. Nordén, *Biochemistry* **2012**, *51*, 5531–5539.
- [139] A. A. Stepanenko, V. V. Dmitrenko, *Gene* **2015**, *569*, 182–190.
- [140] A. Dadabhoy, S. Faulkner, P. G. Sammes, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2002**, *0*, 348–357.
- [141] H. Tsutsumi, S. Abe, T. Mino, W. Nomura, H. Tamamura, *Chembiochem* **2011**, *12*, 691–694.
- [142] G. Piszczek, B. P. Maliwal, I. Gryczynski, J. Dattelbaum, J. R. Lakowicz, *J. Fluoresc.* **2001**, *11*, 101–107.
- [143] Z. Qian, J. R. LaRochelle, B. Jiang, W. Lian, R. L. Hard, N. G. Selner, R. Luechapanichkul, A. M. Barrios, D. Pei, *Biochemistry* **2014**, *53*, 4034–4046.
- [144] N. Nischán, H. D. Herce, F. Natale, N. Bohlke, N. Budisa, M. C. Cardoso, C. P. R. Hackenberger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 1950–1953.
- [145] F. Francisco Hilário, M. D. M. Traoré, V. Zwick, L. Berry, C. A. Simões-Pires, M. Cuendet, N. Fantozzi, R. Pereira de Freitas, M. Maynadier, S. Wein, et al., *Org. Lett.* **2017**, *19*, 612–615.
- [146] J. S. Appelbaum, J. R. LaRochelle, B. A. Smith, D. M. Balkin, J. M. Holub, A. Schepartz, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 819–830.
- [147] S. Foillard, M. O. Rasmussen, J. Razkin, D. Boturyn, P. Dumy, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 983–991.
- [148] J. G. Cannon, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 631–631.
- [149] Z. Xiao, L. Gottschlich, R. van der Meulen, S. R. Udagedara, A. G. Wedd, *Metallomics* **2013**, *5*, 501–513.
- [150] P. Kamau, R. B. Jordan, *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 3879–3883.
- [151] M. Montalti, A. Credi, L. Prodi, M. T. Gandolfi, in *Handbook of Photochemistry*, 3rd Ed., CRC Press, Boca Raton, **2006**.
- [152] Y. Kai, K. Imakubo, *Photochem. Photobiol.* **1979**, *29*, 261–265.
- [153] V. M. Mazhul', A. V. Timoshenko, E. M. Zaitseva, S. G. Loznikova, I. V. Halets, T. S. Chernovets, in *Reviews in Fluorescence*, Springer, Dordrecht, **2008**, pp. 37–67.

- [154] J.-C. G. Bünzli, S. V. Eliseeva, in *Lanthanide Luminescence* (Eds.: P. Hänninen, H. Härmä), Springer Berlin Heidelberg, **2011**, pp. 1–45.
- [155] B. D. Schlyer, D. G. Steel, A. Gafni, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 22890–22894.
- [156] M. Isaac, S. A. Denisov, A. Roux, D. Imbert, G. Jonusauskas, N. D. McClenaghan, O. Sénèque, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, *54*, 11453–11456.
- [157] T. J. Sørensen, A. M. Kenwright, S. Faulkner, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 2054–2059.
- [158] A. Zaïm, S. V. Eliseeva, L. Guénée, H. Nozary, S. Petoud, C. Piguet, *Chem.-Eur. J.* **2014**, *20*, 12172–12182.
- [159] W. D. Horrocks, J. P. Bolender, W. D. Smith, R. M. Supkowski, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5972–5973.
- [160] H. Masuhara, H. Shioyama, T. Saito, K. Hamada, S. Yasoshima, N. Mataga, *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 5868–5873.
- [161] G. Schwarzenbach, H. Flaschka, *Complexometric Titrations*, Methuen, London, **1969**.
- [162] A. M. Brouwer, *Pure Appl. Chem.* **2011**, *83*, 2213–2228.
- [163] H. ishida, J.-C. G. Bünzli, A. Beeby, *Pure Appl. Chem.* **2016**, *88*, 701–711.
- [164] R. M. Smith, A. E. Martell, in *Critical Stability Constants*, Springer, Boston, MA, **1989**, pp. 128–158.
- [165] R. M. Smith, A. E. Martell, R. J. Motekaitis, *Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes Database 46*, **2001**.
- [166] R. Czoika, A. Heintzb, E. Johna, W. Marczaka, *Acta Phys. Pol.* **2008**, *114*, A52–A56.

Résumé en français

Les ions métalliques sont essentiels pour le vivant. Une machinerie complexe tant au niveau cellulaire qu'au niveau de l'organisme entier permet de réguler finement leurs concentrations. Un dérèglement de leur homéostasie est souvent associé à des maladies. Afin de mieux comprendre les processus biologiques dans lesquels ces métaux sont impliqués, il est important de pouvoir les détecter, les suivre et les quantifier. Le but de ma thèse a été de synthétiser des sondes luminescentes pour la détection sélective du Zn^{2+} et du Cu^+ au sein de cellules. Nous avons préparé et caractérisé des macromolécules sophistiquées présentant les qualités requises pour un tel objectif. Ces molécules sont synthétisées par méthode convergente mettant en jeu différentes ligations chimiosélectives. Nous avons développé une famille de sondes sélectives de Zn^{2+} , intensiométriques ou ratiométriques et émettant dans le visible ou dans le proche infrarouge. En vue de réaliser des sondes pour l'imagerie cellulaire par microscopie confocale, nous avons mis au point une méthode de synthèse pour ajouter différentes séquence de pénétration à ces sondes. Elles ont été ensuite testées *in cellulo*. Bien qu'elles ne permettent pas la détection du zinc, elles ont néanmoins permis d'identifier une séquence de pénétration permettant une internalisation cellulaire. Nous avons ensuite développé une sonde incorporant deux complexes de lanthanides (terbium et europium) pour la détection du Cu^+ . Cette sonde répond parfaitement à la présence de Cu^+ avec un signal ratiométrique. Son comportement contre intuitif a été étudié grâce à la synthèse et la caractérisation de différents « mutants ».

English abstract

Metal ions are essential for life. Complex machineries at both the cellular and the whole organism levels regulate finely their concentrations. A disruption of their homeostasis can lead to disorders and serious diseases. In order to better understand the biological processes involving these metals, it is important to be able to detect, track and quantify them. The aim of my PhD was to develop luminescent probes for the detection of Zn^{2+} and Cu^+ . We prepared and characterized sophisticated molecules exhibiting the qualities required for this goal. These molecules were synthesized by convergent methods involving various chemoselective ligations. We developed a family of selective zinc probes, intensimetric or ratiometric, which emitted in the visible or near infra red. In order to elaborate probes for cellular imaging by confocal microscopy, we designed a synthetic pathway to add different penetrating peptides to these probes. They were tested in *cellulo*. Although they didn't demonstrate zinc detection, they allowed identification of the penetrating sequence which permitted the cellular internalisation. We then developed a probe which incorporated two lanthanide complexes (terbium and europium) for the Cu^+ detection. This probe responds perfectly to the presence of Cu^+ with a ratiometric signal. Its counter-intuitive behaviour was studied thanks to the synthesis and the characterisations of different « mutants ».