



HAL
open science

Libération de NO photocontrôlée : complexes de ruthénium à ligand nitrosyle pour des applications innovantes en photothérapie

Mathilde Bocé

► **To cite this version:**

Mathilde Bocé. Libération de NO photocontrôlée : complexes de ruthénium à ligand nitrosyle pour des applications innovantes en photothérapie. Chimie thérapeutique. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2018. Français. NNT : 2018TOU30158 . tel-02301091

HAL Id: tel-02301091

<https://theses.hal.science/tel-02301091>

Submitted on 30 Sep 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

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 – Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Mathilde BOCÉ

Le 4 octobre 2018

**Libération de NO photocontrôlée :
Complexes de ruthénium à ligand nitrosyle
pour des applications innovantes en photothérapie**

École doctorale : **SDM – Sciences De la Matière – Toulouse**

Spécialité : **Chimie-Biologie-Santé**

Unités de recherche :

**LCC - Laboratoire de Chimie de Coordination
IPBS - Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale**

Thèse dirigée par :

Isabelle MALFANT et Marie-Pierre ROLS

Jury :

Pr. Gilles GASSER, Chimie Paris-Tech, PSL : Rapporteur
Dr. Dario BASSANI, ISM, Université de Bordeaux : Rapporteur
Pr. Sylvie DUCKI, ICCF, Sigma-Clermont : Examinatrice
Pr. Éric BENOIST, SPCMIB, Université Toulouse 3 : Président du jury
Pr. Isabelle MALFANT, Université Toulouse 3 : Directrice de thèse
Dr. Marie-Pierre ROLS, IPBS : Co-directrice de thèse

Remerciements

*« Le succès est la capacité d'aller d'échec en échec
sans perdre son enthousiasme. »*

Winston Churchill

Les travaux décrits dans ce mémoire de thèse résultent de la collaboration entre le Laboratoire de Chimie de Coordination (LCC) et l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS).

Je remercie ainsi en premier lieu Monsieur Azzedine Bousseksou, directeur du LCC, et Monsieur Jean-Philippe Girard, directeur de l'IPBS, qui m'ont accueillie pour mes travaux de doctorat dans leurs établissements.

Je tiens à remercier Monsieur Gilles Gasser, professeur à Chimie Paris-Tech, PSL et Monsieur Dario Bassani, directeur de recherche au laboratoire ISM de l'Université de Bordeaux, pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse et d'en être les rapporteurs scientifiques. Je remercie également Madame Sylvie Ducki, professeur à Sigma Clermont et Monsieur Éric Benoist, professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse, d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

J'adresse toute ma reconnaissance à ma directrice de thèse Madame Isabelle Malfant, professeur à l'Université Paul Sabatier et responsable de l'équipe « Molécules et composites pour l'optique » du LCC. Je vous remercie pour votre patience, votre grande implication et votre disponibilité ainsi que pour vos nombreux conseils qui m'ont permis d'avancer dans ces travaux. Vous avez toujours réservé un accueil chaleureux à mes questions, même les plus basiques, cela m'a permis d'avancer avec sérénité.

Je tiens à remercier ma co-directrice de thèse Madame Marie-Pierre Rols, directrice de recherche et responsable de l'équipe « Biophysique cellulaire » à l'IPBS d'avoir partagé ses connaissances et de m'avoir permis de développer les applications biologiques de ce projet de thèse en mettant à ma disposition tous les outils nécessaires. Merci pour ta gentillesse et pour tes conseils, ainsi que pour les relectures attentives de ce mémoire de thèse.

J'adresse également mes plus vifs remerciements à Madame Patricia Vicendo, directrice de recherche au laboratoire IMRCP, à l'origine de ce projet à l'interface de la chimie et de la biologie. Je te remercie pour toutes nos discussions et les différents essais que nous avons menés dans les périodes difficiles afin d'apporter de l'originalité à ces travaux. Enfin, merci de m'avoir permis de présenter mes résultats en congrès international à Bari.

Je souhaite également remercier Pascal Lacroix, directeur de recherche dans l'équipe du LCC, pour tous les conseils bienveillants qu'il m'a donnés et qui ont amélioré mon sens critique. Merci également de m'avoir permis de réaliser quelques calculs théoriques, dont vous avez pris le temps de discuter les résultats.

Je remercie profondément Marine Tassé, technicienne dans l'équipe, pour sa bonne humeur quotidienne. J'ai beaucoup apprécié nos discussions, scientifiques ou non, elles ont rendu mes journées plus agréables.

J'adresse ma gratitude à Isabelle Sasaki, anciennement chargée de recherche dans l'équipe du LCC, pour les conseils techniques qu'elle m'a prodigués au début de ma thèse et pour ses remarques en réunions d'équipe. Je remercie également Bénédicte de Bonneval pour les échanges toujours chaleureux que nous avons eus, dans le cadre de l'enseignement ou dans l'équipe.

Je remercie tous les étudiants avec lesquels j'ai pu travailler : Alejandro, Valerii, Andrés, Diego et particulièrement Max, avec qui j'ai partagé ces trois années de thèse.

Je tiens également à remercier mes collègues de l'IPBS pour m'avoir accueillie dans leurs laboratoires. Je remercie particulièrement Laure Gibot pour m'avoir formée à la culture cellulaire, Flavien Pillet et Charlotte Da Silva pour m'avoir formée à la microbiologie. Merci pour votre patience face aux questions de biologiste débutant dont je vous ai inondés. Merci également à Elisabeth Bellard pour les manipulations en microscopie biphotonique et à Laetitia Hellaudais pour sa disponibilité.

Je remercie ensuite toutes les personnes qui m'ont apporté leur soutien technique en chimie. L'aide de Véronique Pimienta et Charles-Louis Serpentine a été indispensable pour la réalisation des nombreuses mesures photométriques au laboratoire IMRCP. Je remercie également Fabrice Collin et Viviane Peyrou (pour les analyses en spectrométrie de masse), Lionel Rechinat (pour les analyses RPE), Sonia Mallet-Ladeira (pour les analyses DRX), l'équipe du service RMN et celle du service électrochimie.

J'adresse également mes remerciements à Philippe Prono et Michel Maupomé, qui ont toujours eu un mot gentil envers moi lorsque nous nous croisions dans un couloir. Ils ont participé à rendre ces trois années encore plus agréables.

J'adresse ma reconnaissance à Éric Benoist, mon parrain de thèse, pour m'avoir écoutée au cours de nos différents entretiens et pour les conseils qu'il m'a donnés concernant l'après-thèse. Je remercie également l'École Doctorale Sciences de la Matière pour son suivi et la diversité des formations qu'elle propose.

Je remercie profondément tous les maîtres de conférences et les professeurs de l'Université Paul Sabatier qui m'ont permis de découvrir l'enseignement en tant que DCCE : Nans Roques, Bénédicte de Bonneval, Corinne Payrastra, Isabelle Hallery et Michèle Brost. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée et pour tous les conseils et les encouragements dont vous m'avez fait part.

Enfin, j'exprime mes plus sincères remerciements à ma famille, mes grands-parents, mon oncle, ma marraine et Camille, qui ont su m'encourager. Merci particulièrement à mes parents dont l'amour et le soutien m'accompagnent depuis toujours. Merci enfin à Sylvain, dont la patience et le soutien moral à chaque instant m'ont été indispensables.

SOMMAIRE

Sommaire

| | |
|---|-----------|
| Introduction générale | 15 |
| Chapitre I : Etat de l'art..... | 21 |
| I. 1. Le monoxyde d'azote NO [*] | 21 |
| I. 1. 1- Découverte | 21 |
| I. 1. 2- Aspects physico-chimiques | 22 |
| I. 1. 3- Réactivité | 22 |
| I. 1. 4- Sources endogènes de NO [*] | 24 |
| I. 1. 5- Aspects biologiques | 26 |
| I. 1. 6- Dualité des rôles de NO [*] | 27 |
| I. 2. Techniques de détection du NO [*] | 30 |
| I. 2. 1- Méthodes indirectes | 30 |
| I. 2. 2- Méthodes directes | 33 |
| I. 3. Sources exogènes de NO [*] | 36 |
| I. 3. 1- Molécules organiques | 37 |
| I. 3. 2- La thérapie photodynamique (PDT)..... | 38 |
| I. 3. 3- La chimiothérapie photoactivée (PACT) | 43 |
| I. 4. Complexes de métaux de transition à ligand nitrosyle | 45 |
| I. 4. 1- La liaison métal-nitrosyle..... | 45 |
| I. 4. 2- Libération de NO [*] par les complexes [M-NO]..... | 46 |
| I. 5. Complexes de ruthénium à ligand nitrosyle | 49 |
| I. 5. 1- Complexes [Ru-NO] à ligand 2,2'-bipyridine | 51 |
| I. 5. 2- Complexes [Ru-NO] à ligand tridente | 52 |
| I. 5. 3- Complexes [Ru-NO] à ligand tétradente..... | 54 |
| I. 5. 4- Complexes [Ru-NO] à ligand pentadente | 56 |
| I. 6. Optimisation de la photolibération de NO [*] pour la PACT..... | 57 |
| I. 6. 1- Interactions lumière-tissus | 57 |
| I. 6. 2- Optimisation de la libération de NO [*] par irradiation dans le visible | 59 |
| I. 6. 3- Optimisation de la libération de NO [*] par excitation à deux photons..... | 60 |
| I. 7. Voies de synthèse de complexes de ruthénium à ligand nitrosyle | 66 |
| I. 7. 1- Voie de synthèse A | 66 |
| I. 7. 2- Voie de synthèse B..... | 67 |
| I. 7. 3- Voie de synthèse C..... | 68 |
| I. 7. 4- Voie de synthèse D | 70 |
| I. 7. 5- Conclusion | 71 |

| | |
|--|----|
| I. 8. Application en biologie pour des thérapies anticancéreuses..... | 71 |
| I. 8. 1- Présentation de la maladie..... | 71 |
| I. 8. 2- Les traitements du cancer..... | 73 |
| I. 8. 3- Le rôle du monoxyde d'azote NO [•] | 74 |
| I. 8. 4- Les stratégies de contrôle de la libération de NO [•] | 75 |
| I. 8. 5- Conclusion..... | 79 |
| I. 9. Application en microbiologie pour la lutte contre la résistance antimicrobienne..... | 79 |
| I. 9. 1- La résistance antimicrobienne..... | 79 |
| I. 9. 2- Généralités sur les bactéries et les antibiotiques..... | 81 |
| I. 9. 3- Les biofilms bactériens..... | 83 |
| I. 9. 4- Les stratégies de lutte contre le développement des biofilms..... | 88 |
| I. 9. 5- Conclusion..... | 93 |
| I. 10. Conclusion..... | 94 |

Chapitre II : Photolibération de NO[•] par les complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ et [RuFT(bpy)NO](PF₆)₃ dans l'acétonitrile 97

| | |
|--|-----|
| II. 1. Introduction..... | 97 |
| II. 2. Synthèses des complexes [RuFTCl ₂ NO]PF ₆ et [RuFT(bpy)NO](PF ₆) ₃ | 99 |
| II. 2. 1- Synthèse des complexes <i>cis</i> (Cl,Cl)- et <i>trans</i> (Cl,Cl)-[RuFTCl ₂ NO]PF ₆ | 99 |
| II. 2. 2- Synthèse du complexe [RuFT(bpy)NO](PF ₆) ₃ | 100 |
| II. 3. Etude des propriétés des complexes <i>cis</i> (Cl,Cl)- et <i>trans</i> (Cl,Cl)-[RuFTCl ₂ NO]PF ₆ et [RuFT(bpy)NO](PF ₆) ₃ sous irradiation monophotonique dans l'acétonitrile..... | 102 |
| II. 3. 1- Mise en évidence de la libération de NO [•] sous irradiation..... | 102 |
| II. 3. 2- Caractérisation des photoproduits de <i>cis</i> (Cl,Cl)- et <i>trans</i> (Cl,Cl)-[RuFTCl ₂ NO]PF ₆ | 107 |
| II. 3. 3- Rendements quantiques de NO [•] des <i>cis</i> (Cl,Cl)- et <i>trans</i> (Cl,Cl)-[RuFTCl ₂ NO]PF ₆ et [RuFT(bpy)NO]PF ₆ dans l'acétonitrile..... | 111 |
| II. 4. Photolibération de NO [•] par les complexes <i>cis</i> (Cl,Cl)- et <i>trans</i> (Cl,Cl)-[RuFTCl ₂ NO]PF ₆ sous irradiation biphotonique..... | 122 |
| II. 4. 1- Absorption à deux photons..... | 122 |
| II. 4. 2- Mise en évidence de la libération de NO [•] par RPE sous irradiation à deux photons..... | 124 |
| II. 5. Conclusion..... | 126 |

Chapitre III : Étude des propriétés de *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ dans l'eau 131

| | |
|---|-----|
| III. 1. Introduction..... | 131 |
| III. 2. Caractérisation de la transformation des complexes <i>cis</i> (Cl,Cl)- et <i>trans</i> (Cl,Cl)-[RuFTCl ₂ NO] ⁺ en présence d'eau..... | 131 |
| III. 2. 1- Etude préliminaire du spectre d'absorption de <i>trans</i> (Cl,Cl)-[RuFTCl ₂ NO]PF ₆ en présence d'eau par spectroscopie UV-Vis..... | 131 |
| III. 2. 2- Spectrométrie de masse sur <i>trans</i> (Cl,Cl)- et <i>cis</i> (Cl,Cl)-[RuFTCl ₂ NO] ⁺ en présence d'eau..... | 132 |
| III. 2. 3- Analyse par diffraction des rayons X..... | 138 |

| | |
|---|-----|
| III. 2. 4- Influence de la transformation des complexes sur la fréquence d'élongation de la liaison N-O | 143 |
| III. 2. 5- Calculs théoriques | 144 |
| III. 2. 6- Suivi des spectres d'absorption des <i>cis</i> (Cl,Cl)- et <i>trans</i> (Cl,Cl)-[RuFTCl ₂ NO]PF ₆ en présence d'eau par spectroscopie UV-Vis | 148 |
| III. 2. 7- Analyse par résonance magnétique nucléaire des produits transformés dans l'eau | 152 |
| III. 2. 8- Proposition d'interprétation des mécanismes mis en jeu..... | 154 |
| III. 3. Propriétés photochimiques du complexe <i>trans</i> (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF ₆ dans l'eau | 156 |
| III. 3. 1- Mise en évidence de la photolibération de NO [•] dans l'eau | 156 |
| III. 3. 2- Quantification de la libération de NO [•] dans l'eau | 159 |
| III. 3. 3- Mesure du rendement quantique de NO [•] dans l'eau..... | 167 |
| III. 4. Propriétés photochimiques du complexe <i>trans</i> (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF ₆ dans le milieu de culture bactérien LB..... | 171 |
| III. 4. 1- Evolution du spectre d'absorption des isomères de [RuFTCl ₂ NO]PF ₆ dans le LB..... | 172 |
| III. 4. 2- Mesure du rendement quantique de NO [•] du <i>trans</i> (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF ₆ dans le LB..... | 174 |
| III. 5. Conclusion | 176 |

Chapitre IV : Synthèse de nouveaux complexes de ruthénium à ligand nitrosyle et étude de la photolibération de NO[•] 181

| | |
|---|-----|
| IV. 1. Introduction..... | 181 |
| IV. 2. Synthèse des complexes [RuTCC2FCl ₂ NO]PF ₆ , [RuTCC3FCl ₂ NO]PF ₆ et [RuFFTCl ₂ NO]PF ₆ | 183 |
| IV. 2. 1- Synthèse des trois ligands dérivés de la 4'-(2-fluorényl)-2,2':6',2''-terpyridine..... | 183 |
| IV. 2. 2- Complexation et bullage de NO [•] | 185 |
| IV. 2. 3- Séparation des isomères et caractérisation par RMN | 186 |
| IV. 3. Photolibération de NO [•] par les complexes [RuTCC2FCl ₂ NO]PF ₆ , [RuTCC3FCl ₂ NO]PF ₆ et [RuF _{Me} F _{Me} Cl ₂ NO]PF ₆ dans l'acétonitrile..... | 188 |
| IV. 3. 1- Mise en évidence de la photolibération de NO [•] | 188 |
| IV. 3. 2- Mesures des rendements quantiques de NO [•] | 189 |
| IV. 3. 3- Mesures des sections efficaces d'absorption à deux photons..... | 202 |
| IV. 4. Photolibération de NO [•] par les nouveaux complexes dans l'eau | 203 |
| IV. 4. 1- Mise en évidence d'une transformation dans l'eau | 203 |
| IV. 4. 2- Mesure des rendements quantiques de NO [•] des complexes dans l'eau..... | 209 |
| IV. 5. Conclusion | 214 |

Chapitre V : Propriétés anticancéreuses des complexes de ruthénium à ligand nitrosyle sous irradiation 219

| | |
|--|-----|
| V. 1. Introduction | 219 |
| V. 2. Les différents tests de viabilité cellulaire | 220 |
| V. 2. 1- Test MTT..... | 221 |

| | |
|---|-----|
| V. 2. 2- Test Presto-Blue | 221 |
| V. 2. 3- Test de clonogénie..... | 222 |
| V. 3. Etude de la cytotoxicité du <i>trans</i> (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF ₆ sur deux lignées cellulaires | 223 |
| V. 3. 1- Test clonogénique sur les cellules HCT 116 | 223 |
| V. 3. 2- Test de Presto-Blue sur les cellules HCT 116..... | 225 |
| V. 3. 3- Test de Presto-Blue sur les cellules FaDu | 226 |
| V. 4. Etude de la phototoxicité du <i>trans</i> (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF ₆ sur deux lignées cellulaires | 227 |
| V. 4. 1- Etude de la toxicité de l'irradiation sur les HCT 116 | 227 |
| V. 4. 2- Etude de la phototoxicité du complexe <i>trans</i> (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF ₆ sur les cellules HCT 116..... | 228 |
| V. 4. 3- Etude de la phototoxicité du complexe <i>trans</i> (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF ₆ sur les cellules FaDu | 231 |
| V. 4. 4- Conclusion..... | 232 |
| V. 5. Conception de nano-agrégats de <i>trans</i> (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF ₆ | 233 |
| V. 5. 1- Fabrication des auto-assemblages de complexe de ruthénium | 234 |
| V. 5. 2- Propriétés photochimiques des auto-assemblages de complexe <i>trans</i> (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF ₆ | 236 |
| V. 6. Conclusion..... | 237 |

Chapitre VI : Effet bactéricide du NO[•] libéré par irradiation des complexes de ruthénium à ligand nitrosyle 241

| | |
|---|-----|
| VI. 1. Introduction..... | 241 |
| VI. 2. Choix du modèle <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 242 |
| VI. 2. 1- Généralités sur <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 242 |
| VI. 2. 2- Description des souches de <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 et ATCC 35984 | 243 |
| VI. 3. Effet bactéricide de NO [•] libéré par irradiation du complexe <i>trans</i> (NO,OH) [RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF ₆ | 248 |
| VI. 3. 1- Étude de la cinétique de croissance de <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984..... | 248 |
| VI. 3. 2- Suivi de croissance des bactéries traitées par <i>trans</i> (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF ₆ sans et avec irradiation..... | 251 |
| VI. 3. 3- Quantification de l'effet bactéricide de <i>trans</i> (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF ₆ sans et avec irradiation par comptage bactérien | 254 |
| VI. 3. 4- Suivi de croissance des bactéries traitées à la méthicilline. Détermination de la CMI | 258 |
| VI. 3. 5- Suivi de croissance des bactéries traitées avec <i>trans</i> (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF ₆ irradiés combinés à la méthicilline. Détermination de la CMI | 261 |
| VI. 3. 6- Etude de l'effet du photoproduit | 267 |
| VI. 4. Études préliminaires de l'effet bactéricide de NO [•] libéré par irradiation d'autres complexes de ruthénium à ligand nitrosyle | 270 |
| VI. 4. 1- Effet bactéricide de NO [•] libéré par irradiation de <i>trans</i> (NO,OH)-[RuTCC2F(Cl)(OH)(NO)]PF ₆ | 270 |

| | |
|--|------------|
| VI. 4. 2- Effet bactéricide de NO [•] libéré par irradiation de <i>trans</i> (NO,OH)- [RuTCC3F(Cl)(OH)(NO)]PF ₆ | 272 |
| VI. 4. 3- Effet bactéricide de NO [•] libéré par irradiation de <i>trans</i> (NO,OH)- [RuFFT(Cl)(OH)(NO)]PF ₆ | 273 |
| VI. 4. 4- Conclusion..... | 275 |
| VI. 5. Conclusion | 276 |
| Conclusion générale | 281 |
| Perspectives..... | 285 |
| Annexes | 289 |
| Annexe 1 : Produits chimiques et équipements..... | 291 |
| Annexe 2 : Synthèse et caractérisations des complexes | 295 |
| Annexe 3 : Données cristallographiques | 306 |
| Annexe 4 : Résonance paramagnétique électronique..... | 325 |
| Annexe 5 : Rendement quantique de NO [•] d'une réaction | 326 |
| Annexe 6 : Principe du Z-Scan..... | 334 |
| Annexe 7 : Electrode NO..... | 336 |
| Annexe 8 : Culture cellulaire | 338 |
| Annexe 9 : Microbiologie..... | 341 |
| Bibliographie..... | 351 |

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Introduction générale

Le monoxyde d'azote (NO[•]) est un radical gazeux de petite taille biosynthétisé par divers organismes vivants. Le Prix Nobel de physiologie et de médecine de 1998 a été attribué à Louis Ignarro, Ferid Murad et Robert Furchgott pour l'identification du rôle de NO[•] dans le système cardiovasculaire.¹ Après cette découverte, de nombreux chercheurs se sont intéressés au monoxyde d'azote et ont mis en évidence son rôle dans différents processus biologiques tels que la régulation de la pression sanguine², la neurotransmission³ et la réponse immunitaire⁴. Il intervient également dans plusieurs pathologies comme l'angine de poitrine⁵, les cancers^{6,7}, le diabète^{8,9} ou la schizophrénie¹⁰ et il peut également présenter des propriétés bactéricides.^{11,12} Mais son implication est ambiguë car, pour une même pathologie, selon sa concentration dans le milieu, il peut avoir des rôles opposés et donc des effets thérapeutiques ou délétères.¹³

Un des principaux enjeux sociétaux en santé de nos jours est le traitement contre le cancer. Le cancer est la seconde cause de mortalité humaine dans le monde faisant des millions de victimes chaque année. La recherche de nouveaux traitements plus efficaces, plus ciblés, avec moins d'effets secondaires et à des coûts limités est donc primordiale.

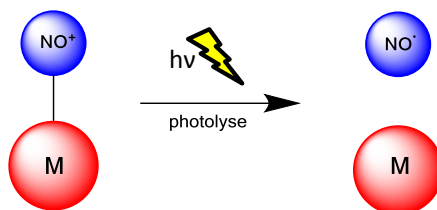
La résistance antimicrobienne et plus particulièrement la résistance des bactéries aux antibiotiques constituent également un problème majeur de santé publique. Le nombre de victimes d'infections tolérantes aux antibiothérapies continue d'augmenter et dépassera le nombre de victimes du cancer dès 2050.¹⁴ Le nombre d'antibiotiques mis sur le marché est en constante diminution et ceux qui étaient utilisés deviennent inefficaces. Il est par conséquent nécessaire de développer de nouvelles molécules antibiotiques ou de nouveaux traitements capables d'inhiber la résistance aux antibiotiques usuels.

Un des points communs entre les cancers et la résistance des bactéries est l'implication du monoxyde d'azote dans les mécanismes de développement et d'apoptose des cellules eucaryotes et procaryotes.

L'apport exogène de monoxyde d'azote constitue donc une stratégie intéressante pour traiter des pathologies comme les cancers et lutter contre la résistance antimicrobienne. Des donneurs de NO[•] organiques ont été synthétisés mais la libération spontanée de la molécule ne permet pas d'envisager leur utilisation dans des thérapies ciblées. En effet, le contrôle de la

concentration en monoxyde d'azote libérée sur une zone ciblée est indispensable pour éviter les effets délétères.

Pour cela, la chimie de coordination et la synthèse de complexes à base de métaux de transition à ligand nitrosyle forment une voie prometteuse. En effet, ils permettent l'obtention de systèmes dont la libération de NO[•] est contrôlée par la lumière.¹⁵



Plus particulièrement, les complexes de ruthénium sont attractifs car ils présentent des propriétés photophysiques intéressantes et une bonne stabilité en milieu physiologique.¹⁶ L'efficacité de libération de NO[•] sous irradiation est affectée par le choix des autres ligands dans la sphère de coordination du ruthénium. Différents ligands ont donc été utilisés par différents groupes de recherche pour l'optimisation de ces systèmes.

De nombreux complexes de ruthénium à ligand nitrosyle sont photoréactifs sous irradiation dans l'UV et certains groupes de recherche ont pu synthétiser des systèmes capables d'absorber dans le visible.¹⁷ Mais, l'utilisation de photons encore moins énergétiques permettrait d'irradier dans la fenêtre thérapeutique, et donc d'éviter les dommages sur les tissus sains et d'atteindre des zones plus profondes. Pour cela, le recours au processus physique d'absorption à deux photons (ADP) est une stratégie adaptée. La capacité des complexes de ruthénium à absorber une irradiation à deux photons est influencée par la nature des ligands. Ainsi, la coordination de ligands présentant de bonnes propriétés d'absorption à deux photons permet d'améliorer les caractéristiques des systèmes et d'envisager un traitement plus ciblé.¹⁸

Ces travaux de thèse portent sur la synthèse de complexes de ruthénium à ligand nitrosyle avec un ligand 2,2':6',2''-terpyridine stable, fonctionnalisé par des groupements présentant de bonnes propriétés d'absorption à deux photons. Les objectifs de cette thèse sont l'étude de l'efficacité de libération de NO[•] par ces complexes et l'investigation de leurs propriétés pour des applications en biologie.

La première partie de cette thèse de doctorat propose dans un premier temps une présentation du monoxyde d'azote et de ses propriétés biologiques fortement dépendantes de sa concentration. Dans un second temps, différentes techniques de détection du radical sont présentées. Ensuite, les sources exogènes de NO[•] pour une application en photothérapie sont décrites, et particulièrement les complexes de ruthénium à ligand nitrosyle. Deux enjeux biomédicaux importants sont ensuite exposés : le cancer et la résistance antimicrobienne et cette partie s'intéresse à l'utilisation de la libération contrôlée de NO[•] dans la lutte contre ces enjeux majeurs de santé publique.

Le second chapitre est consacré à la synthèse de complexes de ruthénium présentant le ligand 4'-(2-fluorényl)-2,2':6',2''-terpyridine et à l'étude de leurs propriétés de photolibération de NO[•], sous excitation mono- et biphotonique.

Dans le troisième chapitre, la stabilité des complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ est étudiée dans l'eau. Les rendements quantiques de NO[•] sont ensuite mesurés en milieu aqueux en milieu biologique.

Le quatrième chapitre développe la synthèse de nouveaux complexes de ruthénium à ligand nitrosyle comportant des ligands dérivés du 4'-(2-fluorényl)-2,2':6',2''-terpyridine. Les rendements quantiques de NO[•] de ces nouveaux systèmes sont mesurés et comparés à ceux des complexes précédemment synthétisés. Leurs capacités de libération de NO[•] dans l'eau sont également analysées.

Le cinquième chapitre s'intéresse aux effets cyto- et phototoxiques d'un complexe de ruthénium à ligand nitrosyle sur deux lignées de cellules cancéreuses : les HCT 116 (cellules du cancer du colon) et les FaDu (cellules du cancer du pharynx).

Le sixième et dernier chapitre de ce mémoire de thèse est consacré à l'étude de l'influence des complexes de ruthénium à ligand nitrosyle sous irradiation sur deux souches de *Staphylococcus epidermidis*, dont l'une (ATCC 35984) présente une résistance aux antibiotiques et est impliquée dans de nombreuses infections. L'effet bactéricide du monoxyde d'azote seul ou combiné à une antibiothérapie est exploré.

CHAPITRE I

État de l'art

Chapitre I :

Etat de l'art

I. 1. Le monoxyde d'azote NO[•]

I. 1. 1- Découverte

A la fin des années 1970, John Zawadzki, sous la direction de Robert Furchgott, mettait en évidence l'effet vasodilatateur de l'acétylcholine lors de ses expérimentations sur des fragments d'aorte de lapins. L'étude montrait que les cellules endothéliales sont nécessaires à la relaxation des cellules musculaires lisses, permettant ainsi l'augmentation du diamètre des vaisseaux sanguins et la réduction de la pression artérielle. Les chercheurs nommèrent alors la substance responsable de cette régulation facteur de relaxation dérivé de l'endothélium ou EDRF (Endothelium-Derived Relaxing Factor).¹⁹

Pendant les années qui ont suivi, les équipes d'Ignarro, Murad, Moncada et Vanhoutte ont travaillé à l'identification de ce facteur impliqué dans la vasodilatation. En 1977, Murad et ses collaborateurs ont découvert que l'EDRF avait une action sur une enzyme appelée la guanylyl cyclase.²⁰ Le rôle de l'EDRF est de réguler la biosynthèse du 3'5'-guanosine monophosphate cyclique (GMPC).²¹

En 1986, Ignarro et Furchgott suggérèrent dans des travaux indépendants que l'EDRF pourrait être le monoxyde d'azote NO[•]. En 1987, Ignarro vérifie cette hypothèse en comparant les réactivités biologiques de l'EDRF et de NO[•] exogène : tous deux sont responsables de la régulation du GMPC.^{22,23} Par la suite, les travaux de Palmer et Moncada ont permis d'apporter des preuves factuelles de la nature de l'EDRF.²⁴

Pour leurs travaux remarquables sur la découverte et l'identification du monoxyde d'azote comme molécule de signalisation dans le système cardiovasculaire, les trois scientifiques Louis Ignarro, Ferid Murad et Robert Furchgott ont reçu le Prix Nobel de physiologie et de médecine en 1998.

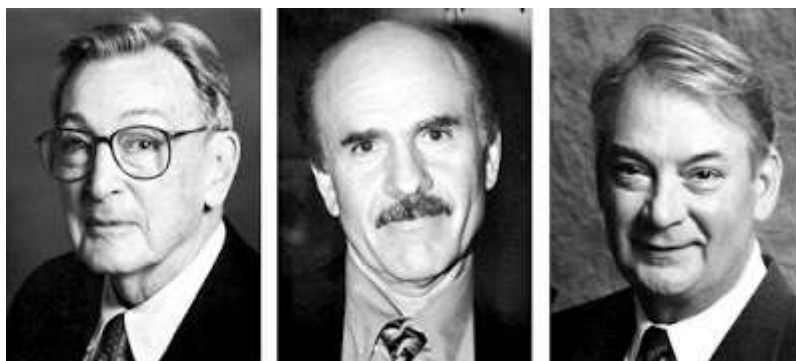
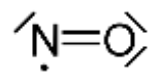


Figure I-1 : R. Furchgott, L. Ignarro et F. Murad, lauréats du Prix Nobel de Physiologie et de Médecine en 1998

I. 1. 2- Aspects physico-chimiques

Le monoxyde d'azote, ou oxyde nitrique (NO[•]) est une espèce radicalaire. Le radical est porté par l'atome d'azote, et sa structure de Lewis est la suivante :



La longueur de la liaison N-O dans la molécule libre est de 1,154 Å.

Dans les conditions normales de pression et de température, il est présent sous la forme d'un gaz incolore et toxique. Sa solubilité dans l'eau est de 1,9 mmol.L⁻¹.atm⁻¹ et elle peut atteindre 15 mmol.L⁻¹.atm⁻¹ dans des solvants organiques comme le cyclohexane. Dans un milieu déoxygené, le coefficient de diffusion de NO[•] dans l'eau est de 3300 μm².s⁻¹ à 37°C, ce qui correspond à 1,2 fois celui du dioxygène. En revanche, dans le milieu biologique, sa durée de vie ne dépasse pas quelques secondes. Par exemple, dans le sang, sa demi-vie varie entre 0,05 et 1,8 ms.^{25,26,27}

I. 1. 3- Réactivité

Les structures électroniques de l'atome d'azote N et de l'atome d'oxygène O étant respectivement 1s²2s²2p³ et 1s²2s²2p⁴, le diagramme d'orbitales moléculaires de NO[•] présentant les électrons de valence est donné sur la **Figure I-2**. La présence d'un électron célibataire confère à l'espèce un caractère paramagnétique et permet d'expliquer sa réactivité. En effet, cet électron non apparié est situé dans une orbitale π* anti-liante.

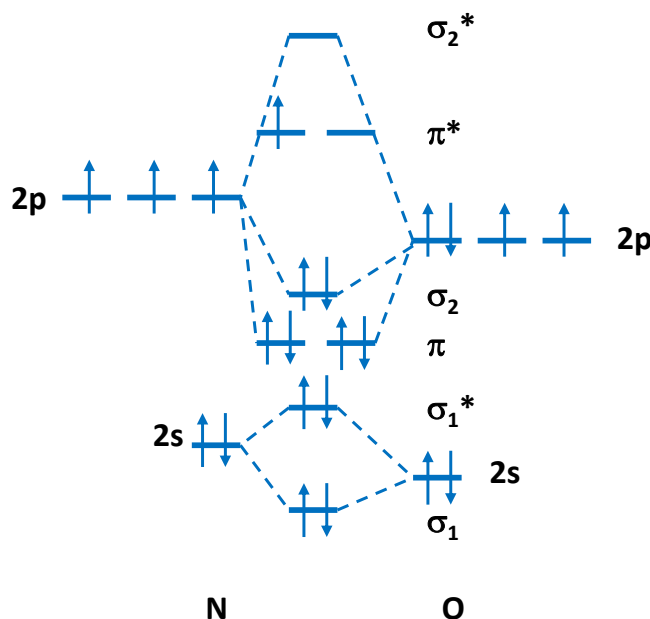


Figure I-2 : Diagramme d'orbitales moléculaires du monoxyde d'azote NO[•]

Le NO[•] intervient donc dans deux couples oxydant/réducteur puisque cet électron peut aisément être cédé pour former le cation nitrosonium NO⁺ ou un autre électron peut être capté afin de former l'anion nitroxyde NO⁻. Le potentiel redox associé à ces couples dépend fortement du solvant et du pH en solution aqueuse. A pH neutre, le potentiel du couple NO⁺/NO[•] est de +1,2 V/ESH. Celui du couple NO[•]/NO⁻ varie légèrement selon si NO⁻ se trouve dans l'état singulet ¹NO⁻ ou triplet ³NO⁻. Dans le premier cas, le potentiel redox est d'environ -0,8V/ESH et dans le second cas, il est de -1,7 V/ESH.^{28,29}

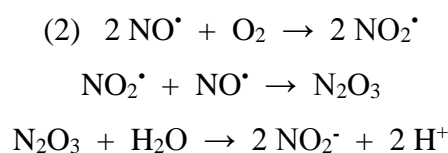
Le potentiel d'ionisation de NO[•] est de 9,26 eV et il possède une affinité électronique de 0,024 eV.^{30,31}

D'après le diagramme d'orbitales moléculaires, l'ordre de la liaison N-O est de 2,5. D'ailleurs la longueur de la liaison N-O dans la molécule libre est de 1,154 Å, distance intermédiaire entre une double et une triple liaison, respectivement de 1,18 Å et 1,06 Å. Lors de l'oxydation et de la réduction, l'ordre de la liaison N-O varie en passant respectivement à 3 et à 2. La longueur de la liaison varie donc également et cela est visible en spectroscopie infrarouge avec la variation des énergies de vibration d'élongation de la liaison N-O : les fréquences d'élongation sont à $\nu_{\text{NO}} = 2377, 1875$ et 1470 cm^{-1} pour NO⁺, NO[•] et NO⁻ respectivement.²⁶

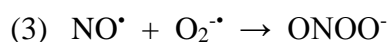
Le monoxyde d'azote peut réagir facilement avec le dioxygène, pour former des espèces réactives de l'azote (RNS), qui sont actives biologiquement. En phase gazeuse, ils forment le dioxyde d'azote NO_2^\bullet (1), toxique.²⁷



En solution aqueuse, ils entraînent la formation de NO_2^\bullet , qui réagit sur le NO^\bullet pour donner le trioxyde de diazote. Ce dernier, en présence d'eau, génère des nitrites (2).³²



En solution aqueuse, le monoxyde d'azote réagit très rapidement avec le radical superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$ pour former des ions peroxyneutrites ONOO^- (3).



I. 1. 4- Sources endogènes de NO^\bullet

Chez les mammifères, NO^\bullet est biosynthétisé par l'oxydation de l'acide aminé L-arginine en L-citrulline grâce à des enzymes nommées NO-synthases ou NOS. La réaction se fait en présence de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) et de dioxygène. La tétrahydrobioptérine (notée BH_4), la flavine mononucléotide (FMN), la flavine adénine dinucléotide (FAD) et un groupe hème sont les cofacteurs nécessaires aux protéines NOS pour la biosynthèse de NO^\bullet .



Figure I-3 : Réaction de biosynthèse de NO^\bullet à partir de la L-arginine

Les NOS sont des protéines homodimériques contenant un fragment hème (avec un atome de fer) et sont constituées de deux domaines catalytiques : un domaine catalytique « hème oxygénase » NOS_{ox} qui se lie au substrat L-arginine et le cofacteur BH₄ et un domaine « réductase » NOS_{red} qui se lie aux cofacteurs FMN, FAD et NADPH. Les NOS sont généralement associées à une protéine calmoduline, sensible au taux de calcium dans le milieu. La **Figure I-4** schématise la structure des NOS.³³

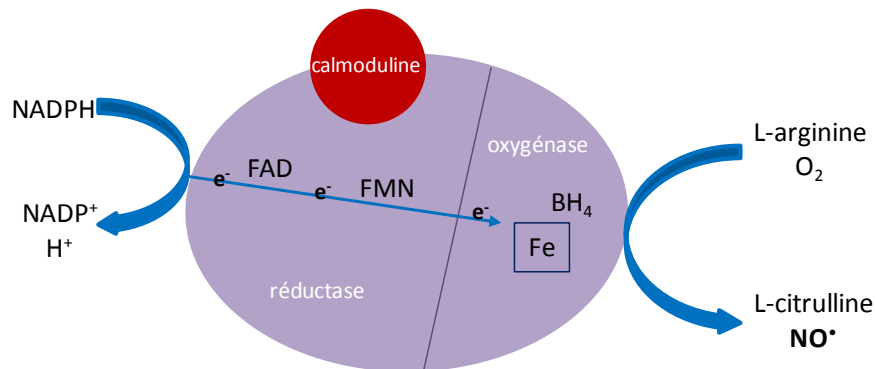


Figure I-4 : Structure d'une NO-synthase, avec ses deux domaines catalytiques (d'après Alderton *et al.*, *Biochem. J.*, **2001**, 357, 593-615)

Il existe trois isoformes de NOS, dont les structures et les fonctions diffèrent : la NOS neuronale (nNOS), la NOS endothéliale (eNOS) et la NOS inducible (iNOS). Les NOS neuronale et endothéliale sont exprimées de façon permanente par les cellules, principalement les neurones et les cellules endothéliales respectivement. Ces types de NOS sont régulées par l'influx de calcium dans la cellule. L'activation de l'iNOS n'est pas dépendante de la concentration en calcium mais sa synthèse est régulée par des facteurs transcriptionnels à partir de l'ADN.^{34,13}

Grâce au séquençage génomique, la présence de NOS homologues a pu être mise en évidence chez certains organismes procaryotes et principalement chez les bactéries à Gram +, comme les streptocoques, les bacilles et les staphylocoques. Les NOS bactériennes, notées bNOS, sont très semblables aux mNOS (NOS mammifères) mais elles ne possèdent pas de domaine catalytique « réductase ». Elles sont pourtant capables de catalyser la réaction d'oxydation de l'arginine en utilisant des réductases non spécifiques présentes dans le milieu cellulaire et d'ainsi permettre la synthèse de NO•.^{35,36,37}

I. 1. 5- Aspects biologiques

La petite taille de la molécule NO[•] ainsi que son caractère lipophile lui permettent de traverser les membranes cellulaires. Grâce à ses propriétés, il intervient dans différents processus biologiques pour lesquels il joue le rôle de messager (« signalling molecule »). NO[•] peut traverser les différents tissus, jusqu'à plusieurs centaines de micromètres, avec une vitesse d'environ 5 à 10 cellules par seconde (environ 50 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), mais il est rapidement consommé dans les vaisseaux sanguins à cause de sa forte affinité avec le fer de l'hémoglobine. Ils forment alors le complexe Fe^{II}-NO-Hb, dont la constante de dissociation est très faible (entre 10⁻¹⁰ et 10⁻¹¹ M).^{38,39,40}

En conditions physiologiques, NO[•] est impliqué dans des réactions avec d'autres radicaux et particulièrement avec le radical superoxyde pour la formation de péroxynitrites ONOO⁻. Il peut également réagir avec des métaux de transition comme le fer pour former des complexes, qui sont souvent présents au niveau des sites actifs des enzymes. Ainsi, ce radical est impliqué dans la régulation de l'activité de plusieurs enzymes ainsi que dans la production d'ions péroxynitrites.

Dans le corps humain, NO[•] est donc responsable de différents processus.

La première action de NO[•], est la vasodilatation. Il est produit par la eNOS dans les cellules endothéliales puis diffuse à travers les cellules musculaires lisses. Sa fixation sur l'enzyme guanylate cyclase entraîne, par l'intermédiaire de plusieurs réactions biochimiques, la relaxation des cellules musculaires lisses. La concentration endogène de NO[•] dans ce type de régulation est de 10 à 30 nM.^{41,39}

Les propriétés de signalisation de NO[•] se retrouvent également dans la neurotransmission. Généré par la NOS neuronale à des concentrations de 0,2 à 10 nM, il réagit à nouveau sur la guanylate cyclase et peut avoir une action sur les systèmes digestif, respiratoire et urogénital et participer au développement de la mémoire, de la reproduction et des fonctions motrices.^{42,43}

Enfin, NO[•] peut intervenir en tant qu'agent antimicrobien. Les phagocytes, cellules du système immunitaire, absorbent les corps étrangers nocifs et NO[•] est libéré pour induire leur mort. L'intervention de l'ion superoxyde et la formation de ONOO⁻, entraînent de nombreuses modifications sur l'ADN et les protéines, qui peuvent induire la mort des bactéries. Dans ce

cas, les concentrations de NO^\bullet exprimées sont bien plus importantes et peuvent atteindre 1000 nM.^{44,45,46}

La production moyenne de NO^\bullet biosynthétisé dans le corps humain est d'environ $0,63 \pm 0,45 \mu\text{mol.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Lors d'une infection ou d'une inflammation, ce taux peut augmenter de plusieurs ordres de grandeur.⁴⁷

I. 1. 6- Dualité des rôles de NO^\bullet

I. 1. 6- a) Effets directs et indirects

D'un point de vue général, les effets biologiques de NO^\bullet peuvent être séparés en deux groupes qui sont les effets directs et les effets indirects. La première catégorie regroupe les réactions rapides et directes de NO^\bullet sur une cible biologique. Dans la seconde, NO^\bullet réagit d'abord avec l'oxygène ou l'ion superoxyde pour générer des RNS (espèces réactives de l'azote) qui, elles, interagissent avec une cible biologique. En général, les effets directs ont lieu à faible concentration de NO^\bullet alors que les effets indirects sont observables à plus hautes concentrations.³⁹

Effets directs [NO] < 200 nM

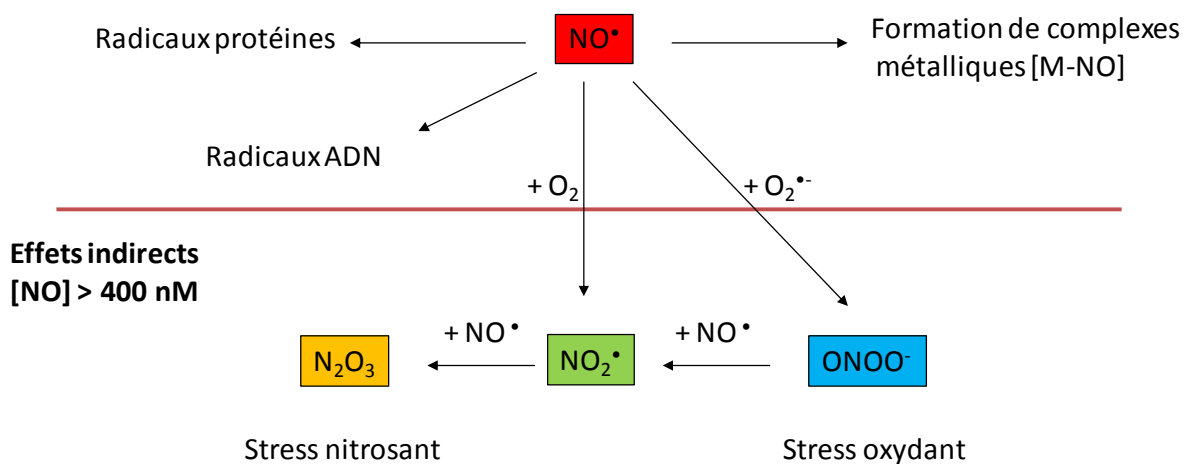


Figure I-5 : Les effets biologiques directs et indirects de NO^\bullet (d'après Thomas et al. *Free Radic. Biol. M.*, 2008, 45, 18-31)

NO^\bullet peut provoquer des dommages à l'ADN par les stress nitrosant et oxydant. Les peroxy-nitrites ONOO^- peuvent oxyder l'ADN et également provoquer des cassures simple-

brins. N_2O_3 transforme les amines en N-nitrosamines et est également capable d'alkyler l'ADN. En milieu aqueux, NO_2 peut également se transformer en nitrites et nitrates.

Avec son électron non apparié, NO^\bullet est capable de réagir sur des radicaux présents dans le milieu cellulaire, comme des radicaux d'acides aminés, mais également de former des complexes métalliques, notamment avec le fer (II). Cela permet d'expliquer pourquoi NO^\bullet est rapidement détruit dans les vaisseaux sanguins.

I. 1. 6- b) La concentration en monoxyde d'azote

D'après les paragraphes précédents, NO^\bullet joue différents rôles dans différents processus biologiques chez l'homme comme chez les organismes procaryotes. Mais il est aussi impliqué dans différentes pathologies. Ainsi, il peut avoir un effet bénéfique ou délétère dans de nombreux troubles de la santé.

De nombreuses études ont été menées pour comprendre la relation entre NO^\bullet et les cancers. Certaines études démontrent qu'il favorise le développement des cellules cancéreuses alors que d'autres suggèrent un effet anti-prolifératif.¹³

A des concentrations de l'ordre du micromolaire, le monoxyde d'azote permet la régression des tumeurs et la mort cellulaire. En effet, par la formation de ROS et de RNS, comme le trioxyde d'azote ou les peroxy-nitrites capables de générer des cassures et des mutations, il induit l'apoptose des cellules cancéreuses.³⁴

Pour des concentrations plus faibles, à l'échelle picomolaire, un effet anti-apoptotique et pro-angiogénique des tumeurs cancéreuses est observé. Les apports sanguin et nutritif sont augmentés et le développement tumoral est favorisé.

De plus, bien que le rôle de NO^\bullet soit moins bien décrit chez les bactéries dans la littérature, NO^\bullet a montré des propriétés antimicrobiennes alors que plusieurs études suggèrent que ce radical permet aux bactéries de se défendre contre les attaques d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). En 2016, Knikel *et al.* ont montré que les NOS chez les staphylocoques (*S. aureus*) permettent la synthèse de NO^\bullet , transformé ensuite en nitrates, utilisés dans le mécanisme de respiration via la nitrate réductase.⁴⁸

Gusarov *et al.* ont mis en évidence que la production endogène de NO• participait à la protection de la bactérie contre différents antibiotiques, soit en dégradant l'agent cytotoxique, soit en réduisant le stress oxydant provoqué au sein de la bactérie.^{49,50}

Ensuite, NO• peut avoir des conséquences positives sur la cicatrisation et l'inflammation d'une plaie mais il est aussi impliqué dans les mécanismes de l'inflammation de certaines maladies.⁵¹

Ainsi, NO• peut jouer des rôles très différents dans certaines maladies et cette dichotomie dépend de la concentration du radical. Selon les pathologies, une forte concentration en NO• n'entraînera pas forcément l'éradication de la maladie et, inversement, une plus faible concentration n'aura pas obligatoirement un effet malin.

Ainsi, le monoxyde d'azote peut présenter de nombreuses applications biomédicales, résumées sur la **Figure I-6**, mais pour cela, sa concentration doit être mesurée et contrôlée.

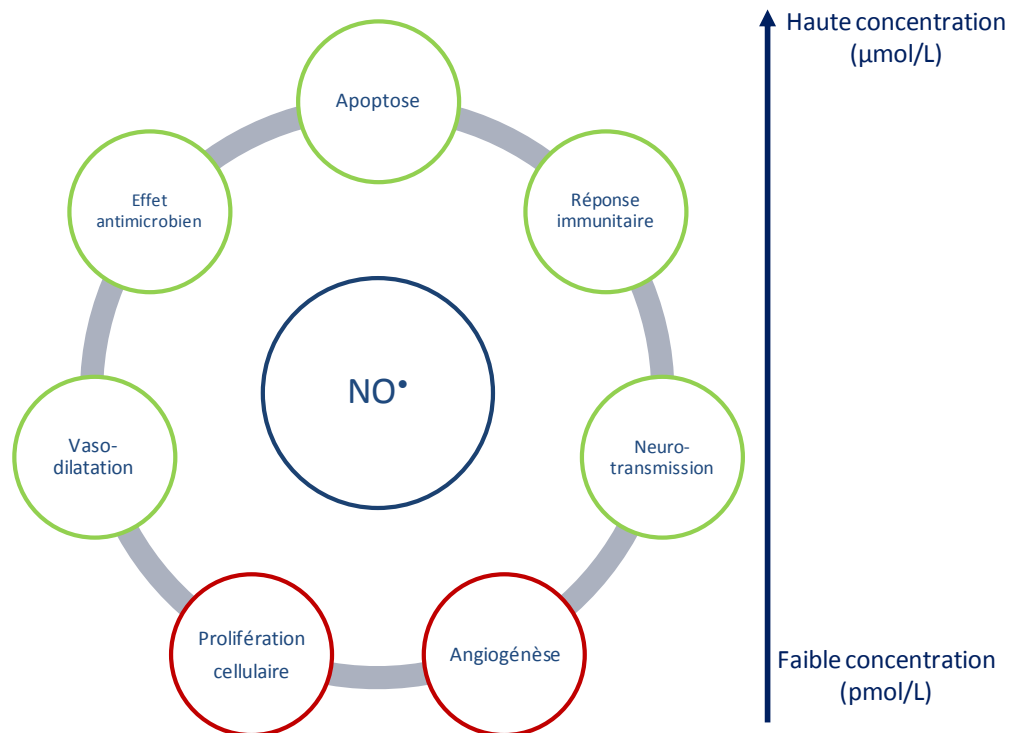


Figure I-6 : Les différentes applications biomédicales de NO•

I. 2. Techniques de détection du NO[•]

La partie précédente a mis en évidence l'importance considérable de NO[•] ainsi que de sa concentration dans différents mécanismes biologiques. De nombreux groupes de recherche se sont attachés à développer des méthodes analytiques variées pour permettre la détection de NO[•] et une mesure précise de sa concentration.^{52,53}

Dans cette partie, l'intégralité des techniques analytiques ne sera pas présentée mais seulement certaines des plus couramment employées. A cause de sa courte durée de vie, certaines techniques utilisent la détection de sous-produits plus stables, issus de réactions avec NO[•] : ce sont des méthodes indirectes. Au contraire, les techniques permettant la détection du radical non transformé sont des méthodes directes.

I. 2. 1- Méthodes indirectes

I. 2. 1- a) La fluorescence

Cette technique nécessite des molécules initialement peu ou non fluorescentes, qui le deviennent après réaction avec NO[•] ou avec un sous-produit de dégradation. L'intensité de fluorescence mesurée en spectroscopie est proportionnelle à la quantité de NO[•] présente dans le milieu.⁵²

Les diaminonaphtalènes (DAN) ou les diaminofluorescéines (DAF) sont des sondes fluorescentes utilisées pour la détection de NO[•].

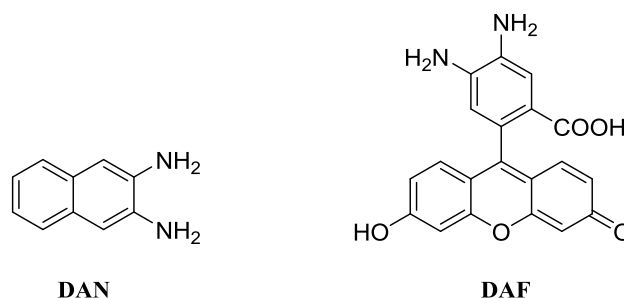


Figure I-7 : Molécules utilisées pour la détection de NO[•] en fluorescence

Les sondes de la famille des DAF réagissent sur un produit issu de la transformation de NO[•] en milieu aqueux qui est le trioxyde d'azote N₂O₃, comme le montre la **Figure I-8**.

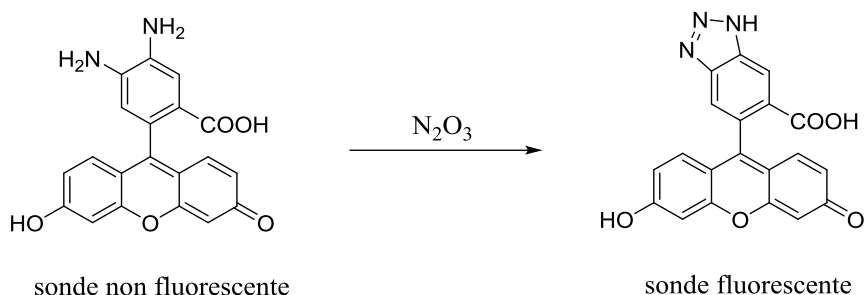
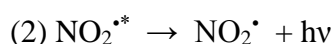
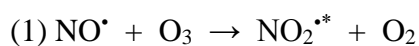


Figure I-8 : Réaction d'une sonde DAF avec un produit d'oxydation de NO[•]

I. 2. 1- b) La chimiluminescence

Le principe de cette technique est similaire à celui de la fluorescence. La réaction chimique entre une molécule donnée et l'analyte entraîne une émission de lumière, qui est mesurée. Dans le cas de la détection du monoxyde d'azote, l'une des réactions utilisées en chimiluminescence implique l'ozone et la production de dioxyde d'azote dans son état excité. Son retour à l'état fondamental s'accompagne de l'émission d'un photon, qui est détecté :

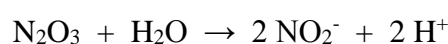
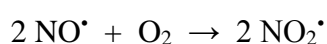


I. 2. 1- c) Le test de Griess

Cette méthode est largement répandue pour la détection indirecte de NO[•] et la mesure de sa concentration par spectrophotométrie d'absorbance. En effet, elle est assez facile à mettre en œuvre et peut être utilisée en milieu biologique.⁵⁴

Cette méthode, proposée par Griess en 1879⁵⁶, est spécifique des ions nitrites NO₂⁻. Le monoxyde d'azote s'oxydant en nitrites en solution aqueuse, cette technique permet de mesurer indirectement la concentration en NO[•].^{55,56}

L'oxydation de NO[•] en NO₂⁻ se fait suivant les réactions suivantes :



La méthode actuelle est dérivée de celle proposée initialement par Griess. Les ions NO_2^- issus de l'oxydation de NO^* réagissent avec le sulfanilamide en milieu acide pour donner un intermédiaire diazonium, qui va ensuite former un colorant « azo » stable après réaction avec la N-(1-naphtyl)éthylènediamine, comme le montre la **Figure I-9**.

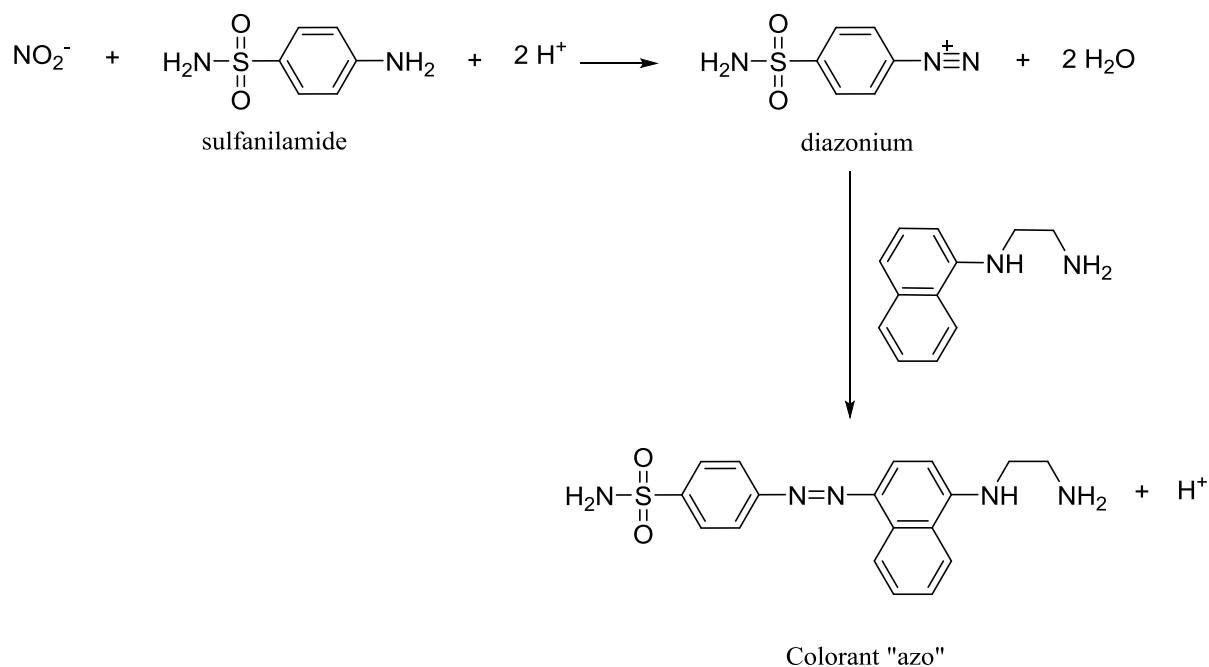


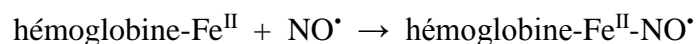
Figure I-9 : Principe du test de Griess pour la détection de nitrites

Ce colorant présente un maximum d'absorption vers 540 nm. Sa formation, preuve indirecte de la présence de NO^* dans le milieu, peut donc être suivie par spectroscopie d'absorbance et la concentration en nitrites peut être déterminée. La limite de détection de ce test est de 2,5 $\mu\text{mol/L}$.

Mais cette technique présente des inconvénients puisque la concentration en nitrites mesurée peut être sur- ou sous-estimée. En effet, la présence en solution de nitrites qui ne proviennent pas de l'oxydation de NO^* peut fausser la valeur de concentration mesurée. De plus, les nitrates n'étant pas détectés par ce test, la concentration en NO_3^- issus de l'oxydation de NO^* ou des NO_2^- n'est pas mesurée.

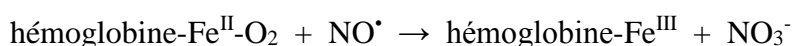
Il existe d'autres méthodes de spectrophotométrie d'absorbance utilisables pour la détection de NO^* .

Par exemple, la réaction du monoxyde d'azote avec la déoxyhémoglobine est observable car la complexation de NO[•] avec le Fe^{II} de l'hémoglobine entraîne un décalage du maximum d'absorbance. Il passe de 433 nm pour la protéine seule à 406 nm.²³



C'est notamment en utilisant cette technique qu'Ignarro a pu montrer que l'EDRF était en réalité NO[•].²³

La réaction du monoxyde d'azote sur l'oxyhémoglobine permet également une détection par spectrophotométrie d'absorbance. Le fer (II) de l'hémoglobine est oxydé et des nitrates sont formés.



Dans ce cas, le changement d'absorption est dû à l'oxydation du fer.⁵⁷

I. 2. 2- Méthodes directes

I. 2. 2- a) La résonance paramagnétique électronique

La résonance paramagnétique électronique (RPE) est une méthode permettant la détection d'espèces présentant un ou plusieurs électrons non appariés.⁵⁸

Le principe de la RPE est similaire à celui de la RMN (résonance magnétique nucléaire) excepté le fait que ce sont les spins électroniques qui sont excités et non les spins nucléaires (cf Chapitre II p.102).

NO[•] étant un radical, il peut être en principe détecté de façon directe par cette méthode spectroscopique. En réalité, sa détection n'est pas aisée car la limite de détection est comprise en 10 et 100 nM et car il présente une durée de vie trop courte. Pour résoudre ces problèmes, des piègeurs de spin (ou « spin traps ») sont utilisés. Leur rôle est de réagir avec NO[•] pour former des radicaux plus stables.⁵⁹

Les dithiocarbamates de fer sont communément utilisés comme piègeur de NO[•], le fer(II) bas spin étant silencieux en RPE. Ils sont très utilisés car ils présentent des constantes de réactions avec NO[•] très importantes, de $1,1 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour le Fe-proline-dithiocarbamate et $4,4 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour le Fe-N-dithiocarboxy-sarcosine par exemple. Le complexe Fe-N-

méthyl-d-glucamine dithiocarbamate $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{MGD})_2]$, dont la structure est présentée sur la **Figure I-10**, est très souvent utilisé pour la détection de NO^\bullet .

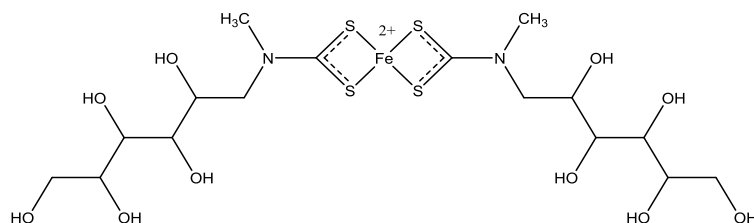


Figure I-10 : Structure du complexe $[\text{Fe}(\text{MGD})_2]$

De plus, le coefficient de diffusion de ces espèces étant faible, il n'y a pas ou peu de réactions secondaires. Ce type de molécules est donc très efficace pour piéger NO^\bullet .

Les réactions de NO^\bullet avec la déoxyhémoglobine et l'oxyhémoglobine présentées précédemment dans l'utilisation de la spectrophotométrie d'absorbance peuvent être utilisées comme méthode de spin trap en RPE. L'hémoglobine est un assemblage de quatre sous-unités polypeptidiques, contenant un complexe hème par unité. L'hème est un complexe de fer, coordonné à un ligand porphyrine tétradente, dont une sous-unité est représentée sur la **Figure I-11**.

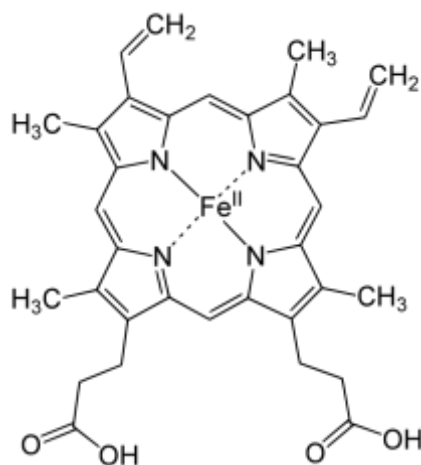


Figure I-11 : Structure de la sous-unité porphyrinique de l'hème b

La réaction avec la déoxyhémoglobine entraîne la formation de nitrate et d'un complexe de fer (III) visible en RPE. Mais cette méthode n'est pas spécifique au NO^\bullet . La réaction avec l'oxyhémoglobine permet la formation rapide de complexe hémoglobine- NO^\bullet , détectable en RPE.⁶⁰

I. 2. 2- b) Les méthodes électrochimiques

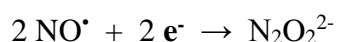
Dans le cas du monoxyde d'azote, l'électrochimie est une technique permettant la détection directe de l'espèce. L'application d'un potentiel positif ou négatif à l'électrode engendre l'oxydation ou la réduction de NO[•]. Les échanges électroniques mis en jeu lors de ces réactions créent un courant qui est mesuré.

En voltamétrie cyclique, les variations de courant d'une solution, suite à un balayage en potentiel, sont mesurées au cours du temps. Ce courant résultant est la somme d'un courant capacitif dû à la résistance du montage (charge de l'électrode) et d'un courant faradique traduisant les échanges électroniques. Le voltamogramme obtenu présente des bandes caractéristiques de l'espèce analysée et permet de conclure sur le nombre d'électrons transférés lors des différents processus d'oxydo-réduction. Le processus cyclique renseigne sur la réversibilité des réactions d'oxydo-réduction.

La voltamétrie en vague carrée, dérivée de la voltamétrie cyclique, est souvent une méthode complémentaire car elle permet de négliger le courant capacitif.

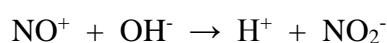
Les méthodes électrochimiques permettent également de mesurer la concentration de NO[•] en solution. En effet, le courant résultant des transferts électroniques est proportionnel à la concentration en NO[•].

Des potentiels de l'ordre de -0,5 à -1,4 V (vs Ag/AgCl) induisent la réduction du NO[•] en N₂O₂²⁻ par un mécanisme mettant en jeu deux électrons :



Cette stratégie est peu utilisée car la réduction du dioxygène présent en milieux aqueux ou biologique interfère avec celle de NO[•]. De plus, ce type d'électrodes présente souvent une sensibilité faible.⁶¹

L'électro-oxydation est la méthode la plus utilisée pour la mesure de la concentration en NO[•]. L'application de potentiels entre 0,6 et 0,9 V (vs Ag/AgCl) provoque l'oxydation de NO[•] en NO₃⁻ par un transfert de trois électrons :



L'oxydation des nitrites en nitrates dans la dernière étape est réalisée électrochimiquement.⁶² Ainsi, la totalité des nitrites présents dans le milieu, y compris ceux ne provenant pas de l'oxydation de NO[•], sont mesurés. Pour éviter la surestimation de la concentration, certaines électrodes sont recouvertes de membranes assurant la sélectivité de la mesure. Par exemple, le Nafion®, polymère fluoré chargé négativement, évite l'interférence d'espèces anioniques telles que les nitrites.

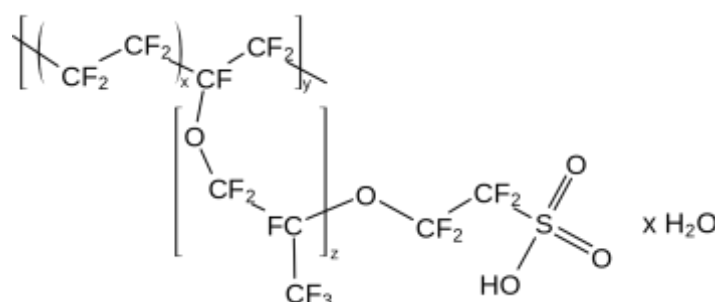


Figure I-12 : Structure du polymère Nafion® utilisé comme membrane spécifique en électrochimie

Différents types d'électrodes sont aujourd'hui sur le marché pour la détection spécifique de NO[•]. Les compagnies Innovative Instruments Inc. et World Precision Instruments, par exemple, propose diverses électrodes spécifiques comportant des membranes permettant uniquement la diffusion du gaz NO[•]. Certaines d'entre elles sont utilisables *in vivo*, afin de mesurer la concentration de NO[•] directement chez la souris ou le rat.⁶³

I. 3. Sources exogènes de NO[•]

D'après les parties précédentes, le monoxyde d'azote peut être utilisé pour différentes applications thérapeutiques comme les traitements anticancéreux ou antimicrobiens. Dans ces deux cas, selon la concentration de NO[•], l'effet peut être bénéfique ou délétère en induisant le développement ou la mort des cellules. Ainsi il est réellement important de synthétiser des donneurs de NO[•] capables de libérer le radical à sa cible thérapeutique. Le contrôle de la concentration de NO[•] fournie est indispensable pour obtenir l'effet escompté. Plusieurs sources exogènes de NO[•] décrites dans la littérature sont présentées dans cette partie.

I. 3. 1- Molécules organiques

Les premiers donneurs de NO[•] qui ont été développés étaient des composés organiques. Les plus communément utilisés sont des molécules organiques à base de nitrates (nitrates organiques), présentant le groupement R-ONO₂.

La trinitroglycérine (GTN) en est l'exemple le mieux étudié et est indiqué dans le traitement de l'hypertension pulmonaire depuis les années 1880. La GTN, qui possède trois fonctions nitrates, ne peut libérer qu'une seule molécule de NO[•], par réduction ou par réaction enzymatique. Le PETN et l'ISMN ont également des effets sur la vasodilatation.⁶⁴

Quelques donneurs de NO[•] de cette classe sont représentés sur la **Figure I-13**.

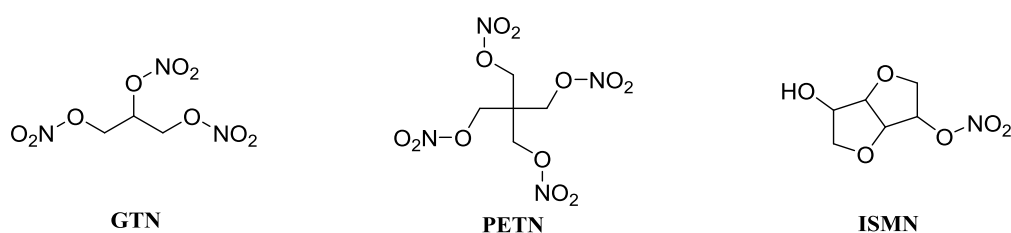


Figure I-13 : Exemples de donneurs de NO[•] à base de nitrates

Les nitrites organiques ont également été étudiés. Ils présentent de meilleures propriétés vasodilatatrices, mais sont moins stables en milieu aqueux.⁶⁵

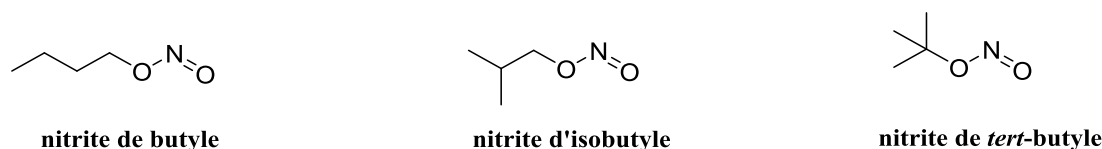


Figure I-14 : Exemples de donneurs de NO[•] à base de nitrites

Les diazéniumdiolates, ou NONOates, sont d'autres systèmes organiques capables de libérer NO[•]. Ils sont utilisés depuis des années pour l'inhibition de l'agrégation plaquettaire et de la coagulation sanguine et également pour leurs propriétés vasodilatatrices. Ces NONOates se décomposent spontanément, en milieu aqueux à pH et température physiologiques, pour libérer deux équivalents de NO[•].^{66,67} La réaction de libération de NO[•] est détaillée sur la **Figure I-15**.

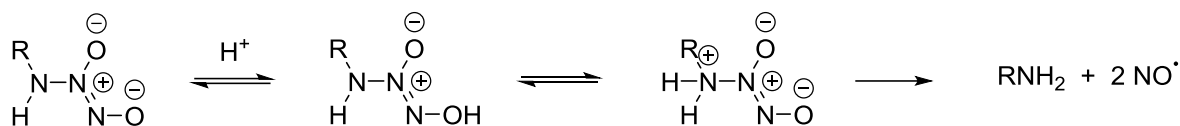


Figure I-15 : Réaction de libération de NO[•] par les NONOates

Malgré l'utilisation répandue de ces molécules dans les traitements vasodilatateurs, leur propriété de donneur spontané de NO[•] en milieu physiologique en fait de mauvais candidats pour des applications thérapeutiques ciblées. Premièrement, la concentration de NO[•] libérée n'est pas contrôlée : elle peut donc entraîner des effets délétères. La localisation de la libération n'est pas non plus maîtrisée. De plus, en condition physiologique, la biodisponibilité de ces molécules n'est pas très importante. Des réactions biochimiques ou enzymatiques peuvent avoir lieu et diminuer la concentration effectivement disponible pour le traitement. Ces médicaments ne peuvent donc pas être utilisés pour des traitements anticancéreux ou antimicrobiens.

L'objectif est donc de proposer des systèmes capables de libérer NO[•] de façon contrôlée. La synthèse de systèmes photoactifs, libérant le radical toxique avec une concentration contrôlée et dans une zone ciblée, constitue une méthode de choix pour des applications thérapeutiques ciblées comme notamment pour la chimiothérapie photoactivée.

I. 3. 2- La thérapie photodynamique (PDT)

La thérapie photodynamique est une technique de photothérapie dans laquelle une molécule, appelée photosensibilisateur, est excitée par irradiation lumineuse.⁶⁸ Le photosensibilisateur ne présente aucune toxicité sans irradiation, mais son excitation en présence de dioxygène provoque la destruction sélective de cellules dans la zone d'irradiation.

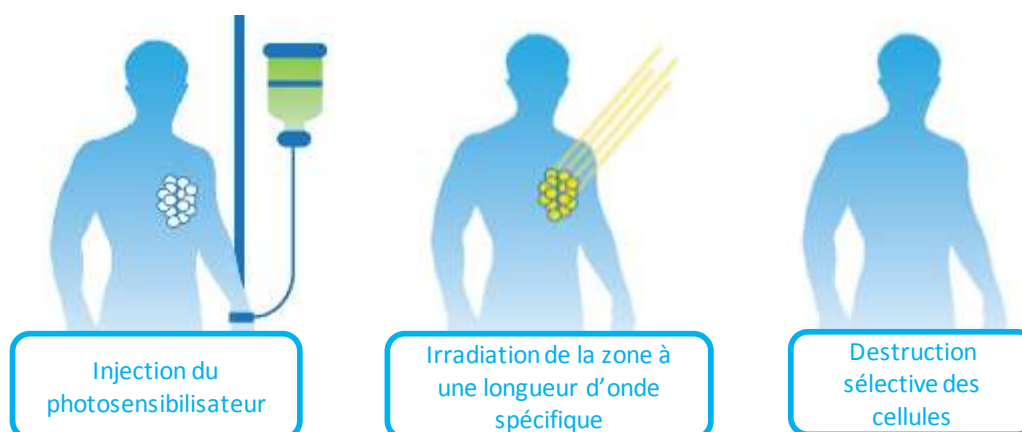


Figure I-16 : Principe de la photothérapie (d'après <http://photoimmune.org/photodynamic-therapy/#imageclose-418>)

Sous irradiation, le photosensibilisateur passe de son état fondamental S_0 à un état excité singulet S_1 de courte durée de vie. Par croisement intersystème, cet état S_1 se désexcite vers un état triplet T_1 . Deux mécanismes sont ensuite possibles.

Le mécanisme de type I implique un transfert d'électron(s) ou d'atome(s) d'hydrogène entre le photosensibilisateur et un substrat (molécule biologique, solvant ou autre sensibilisateur). Cela induit la formation de radicaux, qui vont ensuite réagir avec le dioxygène pour former des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ces ROS provoquent un important stress oxydant chez les cellules traitées.

Le mécanisme de type II implique un transfert d'énergie entre le photosensibilisateur dans son état triplet excité T_1 et le dioxygène (dans son état fondamental triplet). Ainsi, de l'oxygène singulet 1O_2 est généré et il peut induire également un stress oxydant comme réponse biologique.⁶⁹

Ces mécanismes sont schématisés sur le diagramme de Jablonski⁷⁰ de la **Figure I-17**.

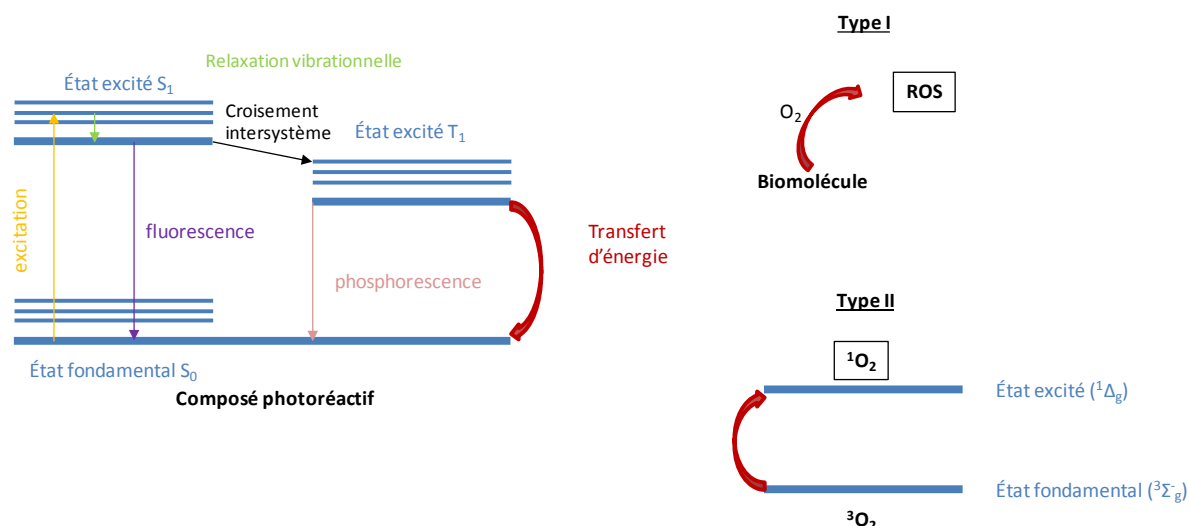


Figure I-17 : Mécanismes de la PDT (adapté d'après G.M. Fioramonti Calixto, *Molecules*, **2016**, 21(3), 342)

Ces stress oxydants peuvent être induits chez les cellules eucaryotes et procaryotes. Ils provoquent des dommages à l'ADN et aux protéines. La membrane cytoplasmique peut également être endommagée entraînant une fuite du contenu cellulaire ou une inactivation du transport transmembranaire par les enzymes. La PDT peut donc trouver des applications en thérapie anticancéreuse ainsi que dans des traitements antibactériens.

La PDT est déjà utilisée comme traitement dans les hôpitaux. De nombreux photosensibilisateurs ont été mis sur le marché et un encore plus grand nombre est encore en phase clinique. Par exemple, le Photofrin®, dont la structure est représentée sur la **Figure I-18**, est utilisé pour traiter différents cancers (œsophage, poumon, vessie). L'ensemble de ces molécules est intéressant car elles ne sont pas toxiques pour les cellules humaines et animales et sont capables de s'accumuler dans les tumeurs.

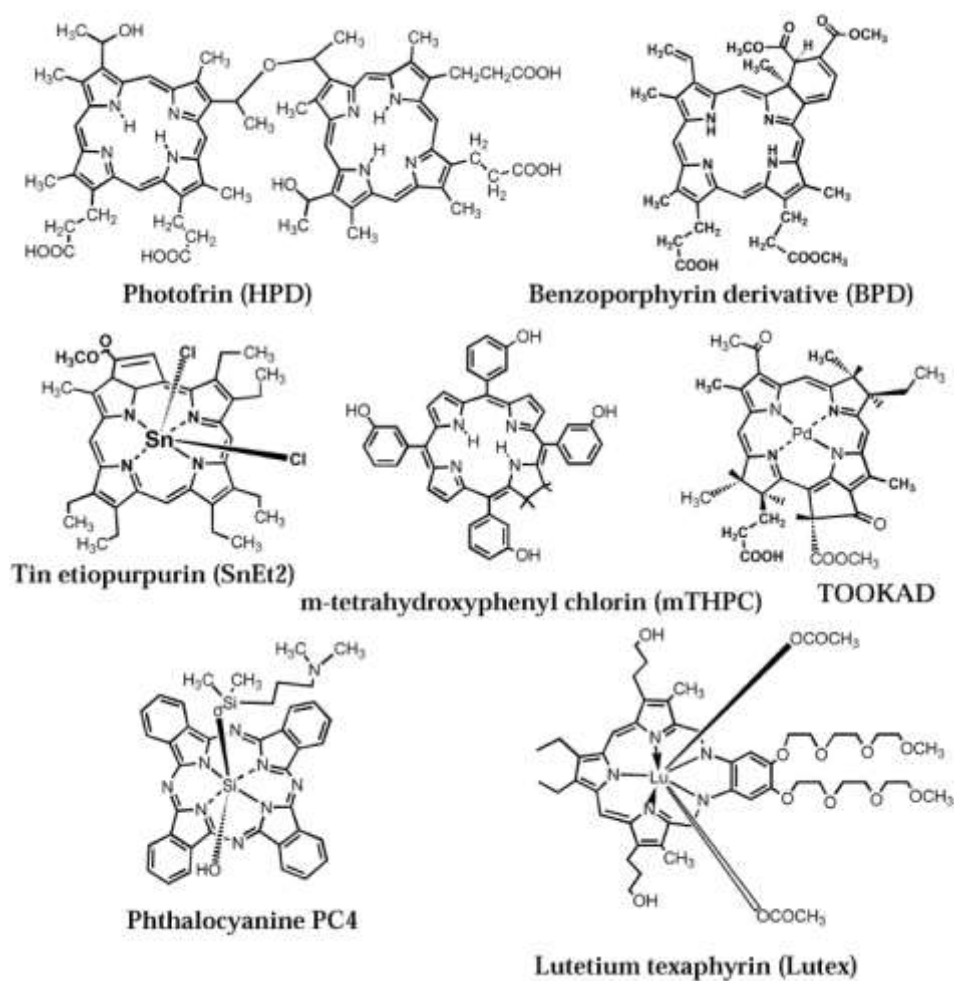


Figure I-18 : Structure de photosensibilisateurs en PDT utilisés en thérapie ou en phase clinique de développement (d'après Hamblin *et al.*, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2004**, 3, 436-450)

Les applications sont en effet variées puisque l'irradiation de diverses zones du corps humain est possible pour des thérapies anti-cancéreuses : la peau (**Figure I-21**, image **a**)), les yeux, la poitrine (**Figure I-19**, image **b**)), les poumons, mais également le pancréas, la prostate ou la langue.⁷¹

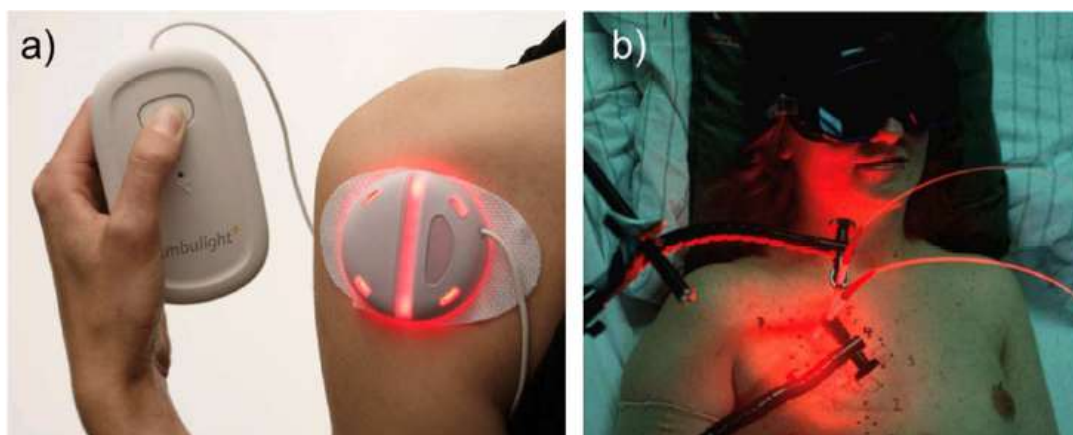


Figure I-19 : Applications médicales de la PDT sur (a) la peau et (b) la poitrine (d'après S. Bonnet, *Dalton Trans.*, **2018**, 47, 10330-10343)

La PDT est également utilisée pour éradiquer des micro-organismes. Des molécules comme le bleu de méthylène ou le rose bengal^{72,73} ont montré des propriétés antimicrobiennes sous irradiation. La macromolécule poly-L-lysine chlorure (e6)⁷⁴, constituée de plusieurs acides aminés lysine, a été utilisée pour améliorer la cicatrisation d'une plaie infectée par *P. aeruginosa* chez la souris.

La chimie de coordination est également une source de photosensibilisateurs.

En 2014, le groupe de recherche de G. Gasser présente deux complexes de ruthénium utilisés comme photosensibilisateurs.⁷⁵ Ces derniers, composés de ligands polypyridyl (**Figure I-20**), permettent la production d'oxygène singulet sous irradiation à 420 nm.

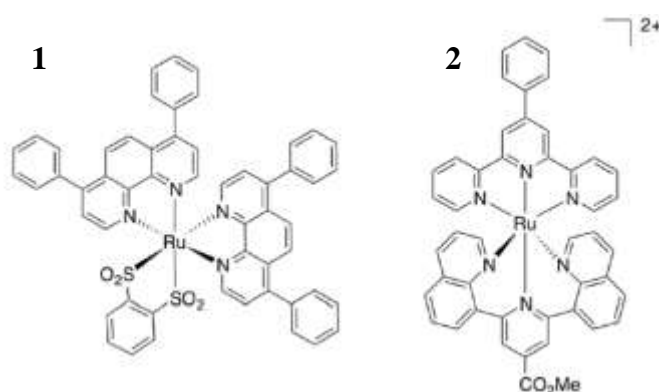


Figure I-20 : Structures de complexes de ruthénium utilisés comme photosensibilisateurs en PDT

Ces complexes, non toxiques dans l'obscurité, présentent des propriétés phototoxiques importantes sur les cellules cancéreuses HeLa avec un IC_{50} de 620 nM pour (**1**) et de 15 μ M

pour (2). Ces photosensibilisateurs permettent aussi une inactivation quasiment totale de bactéries comme *S. aureus* et *E. coli* sous irradiation à 380-480 nm.

Bertiaume *et al.* ont appliqué la PDT antimicrobienne *in vivo* en étudiant l'effet d'un complexe porphyrinique d'étain sous irradiation sur une plaie infectée par *Pseudomonas aeruginosa* chez la souris.⁷⁶

La PDT appliqué au traitement antimicrobien peut être mentionnée PDI (Inactivation Photodynamique), aPDT (« Antimicrobial Photodynamic Therapy ») ou PACT pour « Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy ». Ce dernier acronyme ne doit pas être confondu avec la chimio-thérapie photoactivée présentée dans le paragraphe suivant.

Mais la PDT n'est pas toujours un traitement adapté car il requiert l'intervention d'oxygène. D'après la littérature, les tumeurs cancéreuses sont souvent hypoxiques, cela signifie que la zone tumorale est privée d'oxygène. De même, certaines bactéries ou micro-organismes se développent dans des conditions anaérobies. Dans de tels cas, la PDT n'est pas une solution et la chimiothérapie photoactivée peut être une bonne alternative.

I. 3. 3- La chimiothérapie photoactivée (PACT)

La chimiothérapie photoactivée (PACT) est une technique thérapeutique dans laquelle une prodrogue inactive est excitée par irradiation lumineuse. La prodrogue ne présente aucune toxicité dans l'obscurité, mais l'irradiation de la molécule à une longueur d'onde spécifique provoque la destruction sélective des cellules dans la zone d'irradiation.

Sous irradiation, la molécule passe de son état fondamental à un état excité, de courte durée de vie. Le retour à l'état fondamental a lieu avec une modification de la structure de la prodrogue.

Après la découverte du *cis*-diamminedichloroplatine $cis\text{-[Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ et de son effet anticancéreux, la chimie de coordination pour la médecine s'est considérablement développée. En effet, de nombreux complexes à base de métaux de transition (Fe, Ru, Cr) ont été synthétisés et étudiés pour leurs propriétés biomédicales.^{77,78}

Ainsi, dans les années 1990, Morrison propose un complexe de rhodium photoactivable : $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]\text{Cl}$.⁷⁹ Depuis, les chimistes de coordination ne cessent de synthétiser de nouveaux complexes inorganiques car ils présentent des propriétés photochimiques intéressantes et sont de potentiels candidats pour des applications en PACT.⁷¹

Il existe différents types de composés avec différents mécanismes. Le premier type regroupe les composés constitués de platine Pt^{IV} ou de cobalt Co^{III} qui peuvent être photoréduits dans le milieu biologique pour former des espèces à base de Pt^{III} ou de Co^{II} qui sont toxiques. Ensuite, le second groupe est celui des complexes à métaux de transition qui présentent souvent des propriétés photophysiques intéressantes, avec dissociation de ligand. Parmi eux, le ruthénium est utilisé depuis des décennies pour former des complexes présentant une activité anticancéreuse.^{80,81,82,83,84,85,86} La dernière classe est celle des composés dont une liaison C-C peut être rompue sous irradiation.

La synthèse de complexes de coordination capables de libérer le monoxyde d'azote sous irradiation est donc une voie prometteuse en PACT. Le contrôle de l'intensité et du temps de l'irradiation ainsi que de la zone permet ainsi de délivrer une concentration idéale en NO^{\bullet} de façon ciblée.

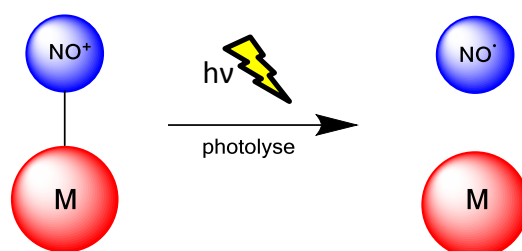


Figure I-21 : Libération de NO^{\bullet} par irradiation du complexe $[\text{M-NO}]$

I. 4. Complexes de métaux de transition à ligand nitrosyle

I. 4. 1- La liaison métal-nitrosyle

Dans un complexe métallique, le ligand nitrosyle se lie généralement par l'atome d'azote pour former la liaison M-N-O. D'autres configurations peuvent être obtenues par irradiation de complexes photochromes. Ces configurations correspondent à des états métastables dans lesquels le ligand nitrosyle s'est isomérisé en isonitrosyle (liaison M-O-N) ou a fait une rotation de 90° pour atteindre une géométrie coudée.^{87,88,89,90}

Selon le diagramme d'orbitales moléculaires, deux composantes interviennent dans la liaison M-N-O. La première est la donation de la densité électronique du ligand nitrosyle au métal par le doublet non liant porté par l'atome d'azote : $M \leftarrow NO$. La seconde composante est due au caractère π -accepteur du ligand nitrosyle : la densité électronique des orbitales d_π du métal est délocalisée vers l'orbitale anti-liante π^* du ligand. Il s'agit du phénomène de rétro-donation : $M \rightarrow NO$.²⁶ Ces composantes de la liaison M-N-O sont représentées sur la **Figure I-22**.

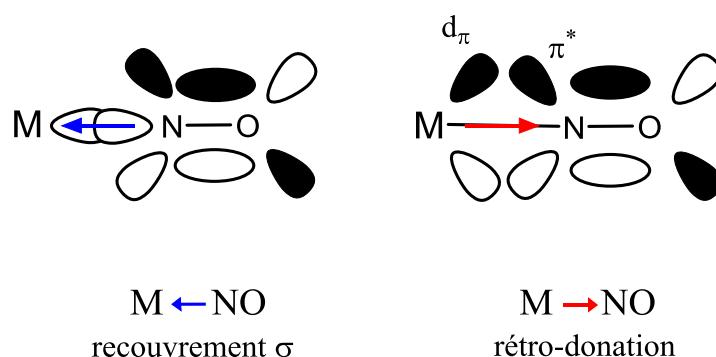


Figure I-22 : Composantes orbitales de la liaison M-N-O

Ceci est la description générale de la liaison. En effet, elle peut être perturbée par la nature du métal et des ligands secondaires puis par l'état d'oxydation du ligand nitrosyle.

Le ligand nitrosyle peut se présenter sous trois états d'oxydation différents : NO^+ , NO^\bullet et NO^- . L'angle M-N-O est proche de 180° et la conformation est linéaire dans les complexes contenant le fragment NO^+ . Au contraire, dans le cas de NO^- , la conformation est coudée avec un angle M-N-O d'environ 120° . Les deux conformations sont représentées sur la **Figure I-23**.

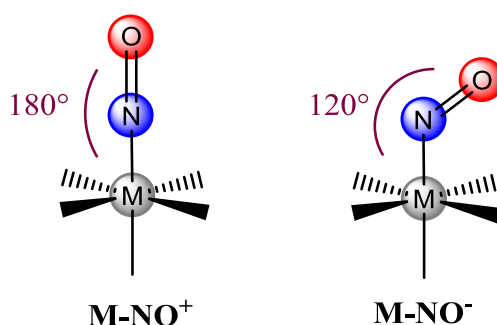


Figure I-23 : Les deux géométries possibles de la liaison M-N-O

En spectroscopie infrarouge, une évolution de la fréquence d'élongation de la liaison N-O est observable entre le monoxyde d'azote libre et le coordiné. Le NO[•] libre présente une fréquence d'élongation à 1875 cm⁻¹. Dans les complexes à fragment M-N-O linéaire, la fréquence ν_{NO} varie entre 1950 et 1450 cm⁻¹ et entre 1720 et 1400 cm⁻¹ pour des complexes contenant le fragment coudé. Ces domaines de fréquences étant larges, la mesure de la fréquence d'élongation de la liaison ne permet pas de déterminer la géométrie du fragment M-N-O avec certitude.²⁶

Afin de simplifier la description de ces systèmes et d'éviter d'avoir à déterminer le degré d'oxydation du métal et du ligand nitrosyle, la notation d'Enemark et Feltham est utilisée. Il s'agit de décrire les trois structures électroniques du complexe à ligand nitrosyle sous la forme {M-NO}ⁿ, où n représente le nombre d'électrons présents dans les orbitales d du métal et dans l'orbitale π^* du ligand nitrosyle.⁹¹

Ainsi, les complexes de ruthénium à ligand nitrosyle notés {Ru-NO}⁶ peuvent avoir deux structures différentes : [Ru^{II}-NO⁺] ou [Ru^{III}-NO[•]]. Dans le premier cas, le métal compte six électrons dans sa couche d et le ligand nitrosyle n'en compte pas ; dans la seconde structure, le ruthénium possède cinq électrons et le ligand un dans son orbitale π .

I. 4. 2- Libération de NO[•] par les complexes [M-NO]

Les complexes de métaux de transition sont connus dans la littérature pour présenter des propriétés photochimiques.⁹² Certains ont donc été étudiés pour leur capacité à libérer NO[•] sous irradiation et particulièrement les complexes à base de Fe, Mn, Cr et Ru.^{93,94,95} En

effet, la plupart de ces complexes sont stables thermiquement et réagissent seulement sous irradiation.

Le radical NO[•] peut être libéré à partir de complexes à ligand nitrosyle ou à ligand nitro comme le *cis*-[Ru^{II}(NO₂)L(bpy)₂]⁺ où bpy représente le ligand 2,2'-bipyridine et L les ligands pyridine, 4-picoline ou pyrazine.⁹⁶

La photolibération de NO[•] peut également se faire à partir de complexes métalliques possédant un ligand nitrite. La liaison O-N est rompue suite à l'irradiation et le NO[•] est libéré (cf **Figure I-24**).

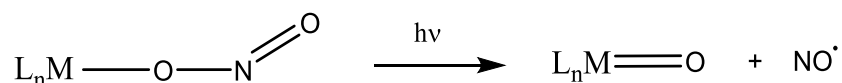


Figure I-24 : Photolibération de NO à partir d'un complexe [L_nM(ONO)]

Mais souvent, la libération de nitrites en solution est également observée, ce qui diminue l'efficacité de cette technique.

Dans la suite de ces travaux, seuls les complexes à ligand nitrosyle seront considérés.

L'efficacité de photolibération de NO[•] est donnée par le rendement quantique de NO[•] Φ_{NO}, qui représente le rapport entre le nombre de molécules de NO[•] libérées sur le nombre de photons absorbés par le complexe par unité de temps et de volume (cf **Annexe 5** p.320). Il dépend de la longueur d'onde d'irradiation et de la nature des ligands secondaires.

I. 4. 2- a) Exemple de complexes [Fe-NO]

Les complexes de fer à ligand nitrosyle sont très nombreux dans la littérature. En effet, le fer étant l'un des principaux métaux naturellement présents dans l'organisme, ces complexes sont potentiellement biocompatibles. Ainsi, le nitroprussiate de sodium est un médicament couramment administré pour abaisser rapidement la pression sanguine lors de crises d'hypertension. Ce complexe, dont la structure est représentée sur la **Figure I-25**, est assez stable en milieu physiologique et libère NO[•] par action de l'irradiation.

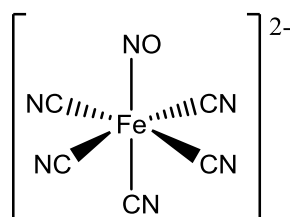


Figure I-25 : Structure du complexe $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$

La photolibération de NO^* est accompagnée de la libération d'ions cyanures toxiques. Les traitements par le SNP sont donc combinés à l'administration de thiosulfate de sodium $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ pour former des thiocyanates éliminés naturellement par l'organisme.⁶⁶

Les sels de Roussin sont des complexes multi-métalliques de fer comportant plusieurs ligands nitrosyle. Les structures du RRS (Roussin's Red Salt) et du RBS (Roussin's Black Salt) sont représentées sur la **Figure I-26**.

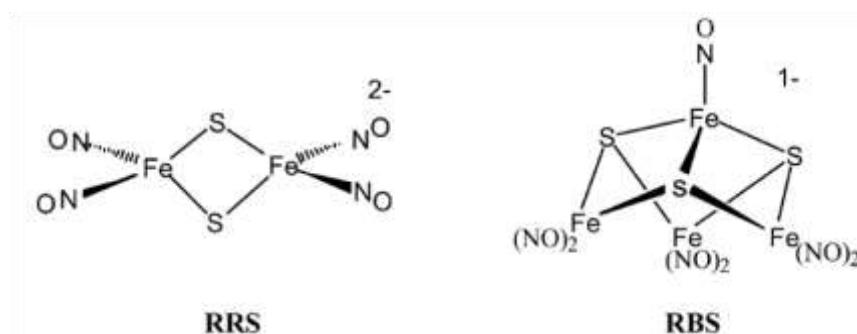


Figure I-26 : Structures des sels de Roussin

Ils sont connus depuis le XIX^e siècle mais leurs propriétés photochimiques n'ont été étudiées que récemment. Ils sont hydrosolubles et leurs spectres d'absorption présentent une bande dans le visible.

Le rendement quantique de NO^* du RRS dans l'eau sous irradiation dans la zone 313-546 nm est de $\Phi_{\text{NO}} = 0,07$. En présence d'oxygène, le RRS peut se transformer en RBS. Le RBS, qui est moins photo-réactif, donne deux intermédiaires sous irradiation, lesquels réagissent à nouveau avec le monoxyde d'azote libéré pour reformer le complexe de départ. Le rendement quantique de NO^* est donc moins important dans ce cas.^{97,98}

I. 4. 2- b) Exemple du complexe $[\text{Mn}(\text{PaPy}_3)\text{NO}]\text{ClO}_4$

Les complexes de manganèse à ligand nitrosyle $\{\text{Mn-NO}\}^6$ sont aussi des complexes photoréactifs capables de libérer NO^\bullet sous irradiation. Le complexe $[\text{Mn}^{\text{II}}(\text{PaPy}_3)\text{NO}]\text{ClO}_4$, avec son ligand pentadente, présente une structure $\{\text{Mn}^{\text{II}}\text{-NO}^\bullet\}$. Il libère NO^\bullet dans différents solvants et sous irradiation par une lampe au tungstène.⁹⁹ La photoréaction est présentée sur la **Figure I-27**.

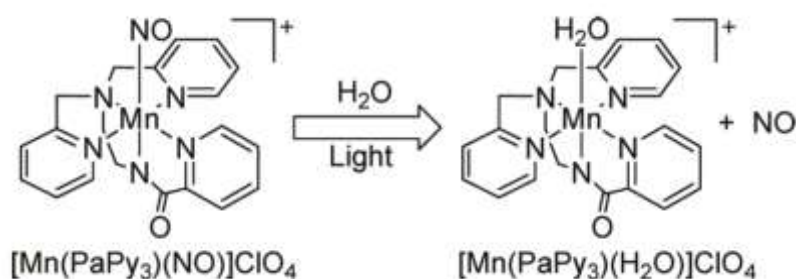


Figure I-27 : Photolibération de NO^\bullet à partir du complexe $[\text{Mn}^{\text{II}}(\text{PaPy}_3)\text{NO}]\text{ClO}_4$ (d'après Ghosh et al., *Inorg. Chem.*, **2004**, 43, 2988-2997)

Dans l'eau, le ligand nitrosyle est remplacé par une molécule d'eau dans la sphère de coordination du Mn. Lorsque la photolyse est réalisée dans l'acétonitrile, c'est une molécule de CH_3CN qui se coordine au métal suite au départ de NO^\bullet . De manière générale, le photoproduit présente donc une molécule de solvant à la place du ligand nitrosyle.

I. 5. Complexes de ruthénium à ligand nitrosyle

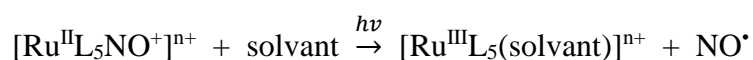
Les complexes de ruthénium constituent une part importante des complexes à ligand nitrosyle décrits dans la littérature. En effet, contrairement aux complexes de fer, de manganèse ou de chrome qui présentent parfois une instabilité thermique, en milieu aqueux (hydrolyse) ou une toxicité, les complexes $\{\text{RuNO}\}^6$ décrits sont généralement stables à température ambiante dans les conditions physiologiques.

Ce sont ces complexes qui seront étudiés dans ces travaux de thèse.

Selon Rose et Mascharak, la plupart des complexes de ruthénium à ligand nitrosyle de la forme $[\text{RuL}_5\text{NO}]$ de configuration $\{\text{Ru-NO}\}^6$ peuvent être décrits par la structure

[Ru^{II}NO⁺]. La photolibération est due à un transfert de charge d'une orbitale occupée d'un ligand ou du fragment [RuL_n] vers une orbitale vacante anti-liante du ligand nitrosyle.¹⁵

Comme pour les complexes à base de manganèse, la réaction de photolibération de NO⁺ s'accompagne d'un remplacement de ce ligand par une molécule de solvant. En revanche, dans ce cas, le ligand nitrosyle NO⁺ est réduit en NO[•] et le Ru^{II} est oxydé en Ru^{III}. L'équation de la réaction de photolibération de NO⁺ par ces systèmes est donc la suivante :



Les premiers complexes étudiés ont été les complexes [Ru^{II}Cl₅NO]²⁻ et [RuCl₃NO] par Cox *et al.* en 1971.

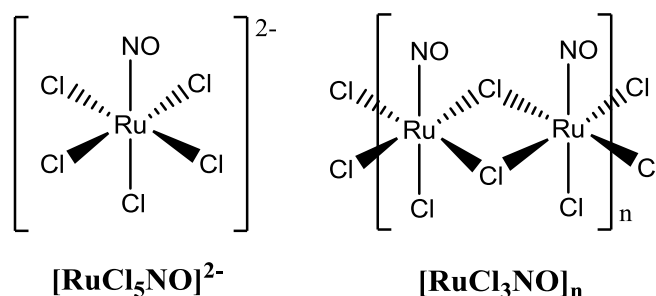


Figure I-28 : Structures des complexes de ruthénium à ligands nitrosyle et chloro

Le photoproduit obtenu a été caractérisé par spectroscopie infrarouge : la disparition de la bande relative à l'élongation de la liaison N-O confirme la libération du monoxyde d'azote. L'étude par RPE de ce photoproduit en 1983 met en évidence la présence d'une espèce paramagnétique (Ru^{III}). La structure de ce photoproduit est [Ru^{III}Cl₅(H₂O)]²⁻. En 1996, Trentham *et al.* ont mesuré les rendements quantiques de NO[•] de ces deux complexes. [Ru^{II}Cl₅NO]²⁻ a un rendement quantique de NO[•] de 0,06 sous irradiation à 355 nm dans l'eau. [RuCl₃NO], qui existe principalement sous forme de dimère, a un rendement quantique plus faible, de 0,012 dans les mêmes conditions.

En revanche, les ligands chloro peuvent aisément être substitués par des molécules d'eau en milieu physiologique. De plus, les complexes de ruthénium (II ou III) à ligand H₂O peuvent se lier aux sites basiques de molécules biologiques comme l'ADN.¹⁰⁰ Ces réactions non contrôlées peuvent avoir des effets délétères.

De nouveaux complexes de ruthénium avec des ligands amine ont été synthétisés, notamment par Franco *et al.* Les rendements quantiques de NO[•] de complexes du type [Ru(NH₃)₄(X)(NO)]³⁺ ont été mesurés à pH acide.

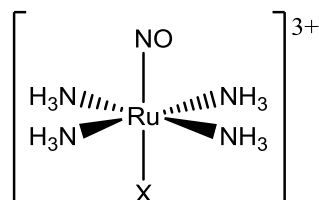


Figure I-29 : Structure des complexes [Ru(NH₃)₄(X)(NO)]³⁺ étudiés par Franco *et al.*

La nature du ligand X en *trans* du nitrosyle a une influence sur la valeur du rendement quantique. Ainsi lorsque X=NH₃, $\Phi_{\text{NO}}=0,17$ mais lorsque X=P(OEt)₃, Φ_{NO} augmente jusqu'à une valeur de 0,30.¹⁶ Cette étude montre l'influence que peuvent avoir les ligands périphériques sur la photolibération de NO[•] et particulièrement le ligand en *trans* du ligand nitrosyle dans des complexes octaédriques de {Ru-NO}⁶.

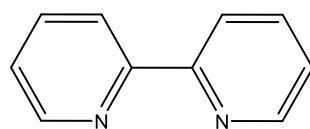
De même, le *trans* [Ru^{II}(py)₄Cl(NO)]²⁺ présente des propriétés photophysiques importantes. Il présente un rendement quantique Φ_{NO} de 0,0016 à 455 nm^{101,102}, ce qui est assez faible. En revanche, ce complexe présente des propriétés photochromes intéressantes. En effet, sous irradiation à 476 nm, la ligand nitrosyle s'isomérisse pour donner le complexe *trans* [Ru^{II}(py)₄Cl(ON)]²⁺.¹⁰³

Afin d'améliorer la stabilité du complexe en milieu biologique, les complexes monodentes sont remplacés par des complexes liés plusieurs fois avec le centre métallique (polydentes).

I. 5. 1- Complexes [Ru-NO] à ligand 2,2'-bipyridine

Les ligands polydentes sont intéressants puisqu'ils sont de meilleurs ligands : ils sont plus stables vis-à-vis de réactions de substitution et peuvent également permettre d'améliorer la solubilité du complexe en milieux aqueux et biologique.

Il existe des ligands bidentes, comme la 2,2'-bipyridine qui présente deux sites azotés permettant la liaison au centre métallique.



ligand bpy

Figure I-30 : Structure du ligand 2,2' bipyridine

Silva *et al.* ont synthétisé des complexes de ruthénium à ligand bipyridine de type *cis* $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{L})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$ où L représente les ligands pyridine, 4-picoline ou 4-acétylpyridine. Les rendements quantiques de NO^\bullet de ces complexes en solution tamponnée à pH 2 et sous irradiation à 355 nm sont de 0,17, 0,16 et 0,07 respectivement. Cette étude leur a également permis de conclure sur l'effet donneur de ce ligand L : plus L est π -accepteur, moins bon est le rendement quantique de NO^\bullet .¹⁰⁴

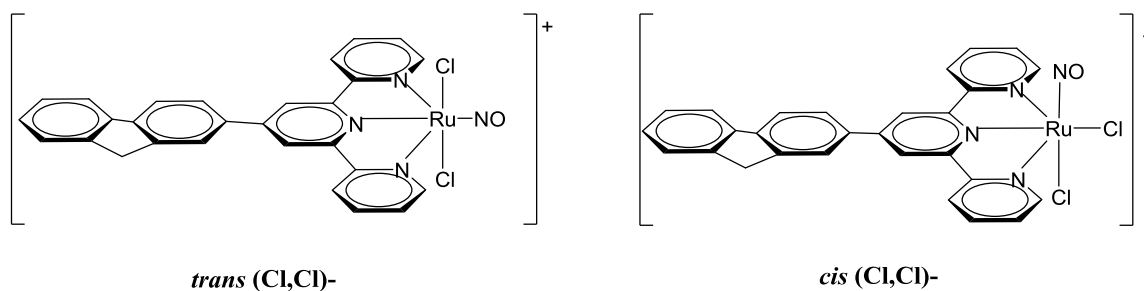
De plus, le complexe *cis* $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ClNO}](\text{PF}_6)_3$, a été synthétisé au sein de l'équipe d'Isabelle Malfant du LCC. Avec un ligand donneur comme le chloro, le rendement quantique de libération de NO^\bullet est de 0,70.¹⁰⁵

I. 5. 2- Complexes $[\text{Ru}-\text{NO}]$ à ligand tridente

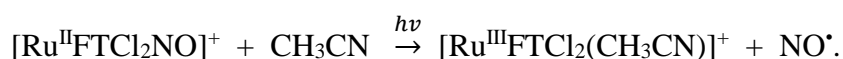
Les ligands tridentes comme la 2,2':6',2''-terpyridine (terpy) ont été utilisées par Karidi *et al.* en 2005 pour la formation de complexes à ligand nitrosyle. Le complexe *cis* $(\text{Cl},\text{Cl})-[\text{Ru}(\text{terpy})\text{Cl}_2\text{NO}]\text{Cl}$ présente une bande d'absorption à 349 nm correspondant à un transfert de charge des orbitales d du métal vers l'orbitale π^* du ligand nitrosyle. L'excitation de cette transition permet la libération de NO^\bullet dans l'acétonitrile¹⁰⁶, selon la réaction :



Dans l'équipe du LCC, les complexes *trans* $(\text{Cl},\text{Cl})-$ et *cis* $(\text{Cl},\text{Cl})-[\text{RuFTCl}_2\text{NO}]\text{PF}_6$, à ligand terpyridine substitué par un fluorène, ont été synthétisés¹⁰⁷.

**Figure I-31** : Structures des *trans* $(\text{Cl},\text{Cl})-$ et *cis* $(\text{Cl},\text{Cl})-[\text{RuFTCl}_2\text{NO}]\text{PF}_6$

La capacité de photolibération de NO[•] de ces deux isomères a été mise en évidence à l'aide du test de Griess. En effet, sous irradiation à 405 nm dans un mélange équimolaire de réactif de Griess (dans l'eau) et d'acétonitrile, les bandes caractéristiques du fragment Ru-NO (389 nm pour le *cis* (Cl,Cl)- et 414 nm pour le *trans* (Cl,Cl)-) diminuent et une large bande avec un maximum d'absorption vers 510 nm apparaît. Cette bande, qui n'apparaît pas dans l'obscurité, est caractéristique du colorant « azo » formé par le réactif de Griess en présence de nitrites. Une étude électrochimique en voltamétrie cyclique a permis d'observer la disparition des bandes attribuées aux couples redox de NO[•] ainsi que l'apparition d'une bande correspondant au couple Ru^{II}/Ru^{III} en réduction.¹⁰⁷ Le processus de photolibération est donc :



D'autres complexes ont également été étudiés au sein de l'équipe. Le ligand terpyridine a été substitué par un groupement phényle et l'évolution du rendement quantique de NO[•] a été observée.

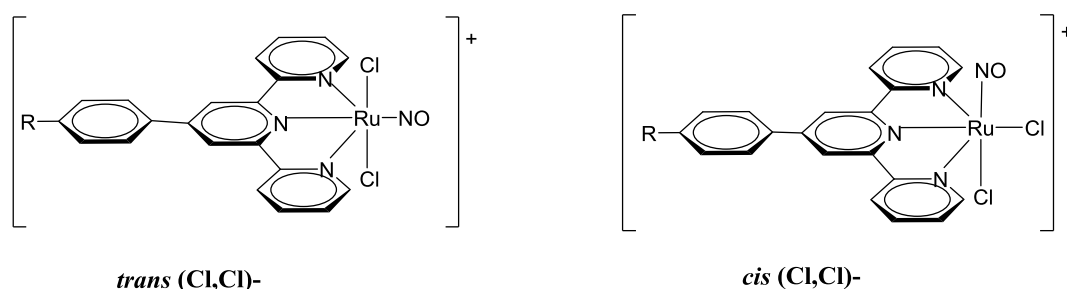


Figure I-32 : Structures des complexes [Ru(R-Phterpy)Cl₂NO]⁺

L'étude a été réalisée pour quatre substituants différents : R = NO₂, H, Br, O-CH₃. Dans tous les cas, l'isomère *cis* (Cl,Cl)- présente un rendement quantique de NO[•] supérieur à son isomère *trans* (Cl,Cl)-. Ceci est dû à la présence d'un ligand chloro avec un meilleur caractère donneur en *trans* du nitrosyle dans le cas du *cis* (Cl,Cl)- que la pyridine pour le *trans* (Cl,Cl)-. Ensuite, il a été difficile de trouver une tendance d'évolution du Φ_{NO} selon le caractère électro-attracteur ou électro-donneur du groupement R, suggérant que l'explication du mécanisme de photolibération de NO[•] est plus complexe qu'un simple transfert de charge du ligand vers le fragment Ru-NO.¹⁰⁸

Galvão de Lima *et al.* ont présenté en 2006 des complexes constitués d'un ligand bidente (2,2'-bipyridine ou quinone-diimine) et d'un ligand tridenté (2,2':6',2''-terpyridine).¹⁰⁹

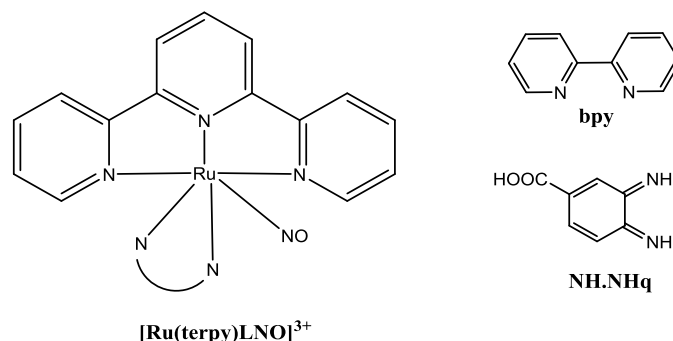


Figure I-33 : Complexes $[\text{Ru}(\text{terpy})\text{LNO}]^{3+}$

Le rendement quantique de NO^* est influencé par la nature du ligand bidente. Le rendement quantique de NO^* sous irradiation à 355 nm en milieu acide, passe de 0,14 pour le $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bpy})\text{NO}]^{3+}$ à 0,47 pour le $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{NH.NHq})\text{NO}]^{3+}$. L'augmentation du rendement quantique dans le second cas serait due à l'importante délocalisation électronique dans NH.NHq qui favoriserait la rétro-donation du métal vers le ligand nitrosyle.

I. 5. 3- Complexes $[\text{Ru}-\text{NO}]$ à ligand tétradente

Le ligand tétradente le plus intéressant est la porphyrine. En effet, c'est une molécule macrocyclique biosynthétisée par l'organisme.

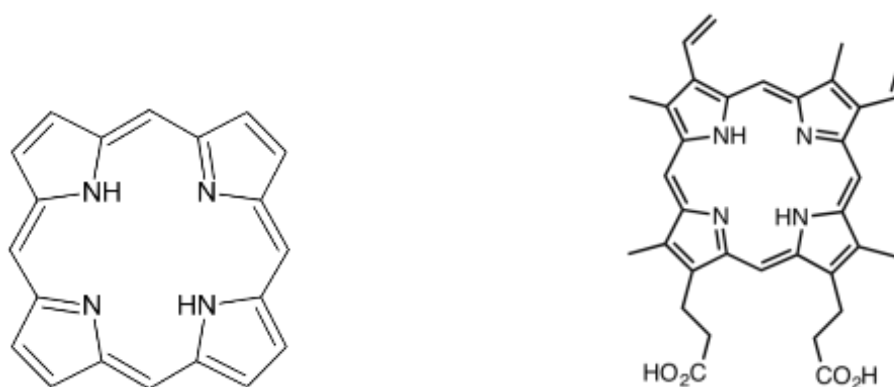


Figure I-34 : Structures de la porphyrine et du dérivé porphyrinique formant l'hème

Il existe différents dérivés porphyriniques bien connus puisque l'un d'entre eux, la protoporphyrine IX, se combine au fer pour former l'hème, qui est un composant indispensable à l'hémoglobine. On trouve également ce ligand coordonné au cobalt dans la cobalamine, plus connue sous le nom de vitamine B12.

Lim *et al.* ont étudié les capacités de photolibération de NO[•] par ces complexes de ruthénium à ligand porphyrinique TPP (tétraphénylporphyrine) ou OEP (octaéthylporphyrine). Que le sixième ligand soit un chloro ou un nitro, la photolibération est réversible, ce qui fait que NO[•] réagit sur le photoproduit pour reformer le complexe de départ. Ces complexes ne sont donc pas idéaux pour les applications recherchées.

Cet inconvénient concerne aussi les complexes contenant des bases de Schiff comme ligands. Les ligands salen (N,N'-bis(salicylidene)éthylènediamine) et salophen (N,N'-bis(salicylidene)o-phénylènediamine) se lient au métal par les doublets non liants des atomes d'azote et d'oxygène.

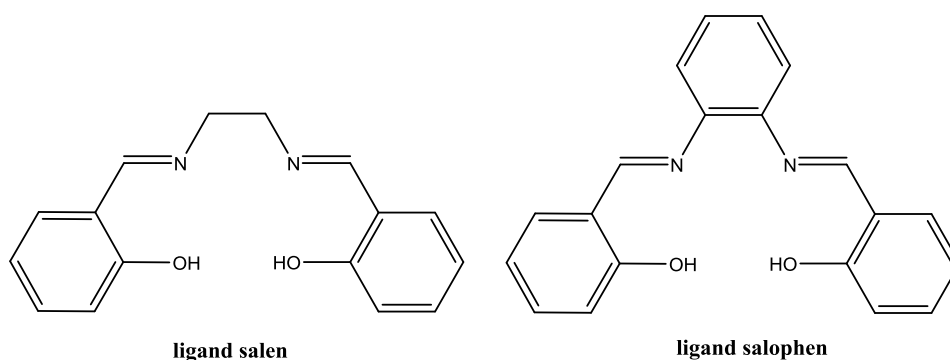


Figure I-35 : Structures des ligands salen et salophen

Par exemple, le complexe [Ru^{II}(salen)(Cl)NO] présente un rendement quantique de NO[•] de 0,13 à 365 nm dans l'acétonitrile mais la réaction est réversible, avec une constante de vitesse de 5.10⁻⁴ mol.L⁻¹.s⁻¹. La substitution du ligand chloro par des ligands moins σ -donneurs fait chuter le rendement quantique et, bien que la constante de vitesse de la réaction retour du NO[•] sur le photoproduit soit plus faible que dans le cas des porphyrines, cela fait de ces complexes de moins bons candidats pour la PACT.^{110,111}

Mais les ligands tétradentes n'ont pas tous ces conséquences négatives. L'étude sur les complexes à ligand dérivé du 1,2-bis(pyridine-2-carboxamido)-benzène (bpb) par le groupe de Mascharak a permis de montrer l'influence de la conjugaison des ligands. En effet, en

substituant les ligands bpb par une quinoline ou une isoquinoline, qui sont des systèmes où la délocalisation des électrons π est importante, le rendement quantique de NO^{\bullet} a augmenté et les composés absorbent dans le visible (475 nm).^{112,17}

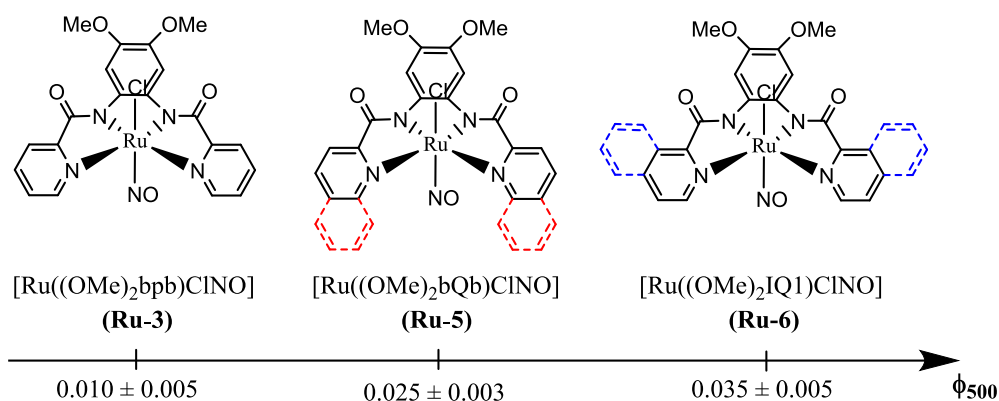


Figure I-36 : Rendements quantiques de NO^{\bullet} pour les complexes à ligand tétradente dicarboxamide (d'après Fry *et al.*, *Inorg. Chem.*, **2011**, 50, 317-324)

De plus, Patra *et al.* ont étudié la substitution du ligand chloro par une pyridine pour former le complexe $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{Me}_2\text{bpb})(\text{py})(\text{NO})]$. La mesure des constantes de vitesses des réactions de libération de NO^{\bullet} ont montré que la présence d'un ligand Cl *en trans* du ligand nitrosyle favorise la photolibération du monoxyde d'azote par rapport à la pyridine.¹¹³

I. 5. 4- Complexes [Ru-NO] à ligand pentadente

Une série de complexes de ruthénium constitués d'un ligand nitrosyle et d'un ligand pentadente a été synthétisée par le groupe de Mascharak. Les ligands utilisés sont des dérivés de carboxamides : le ligand PaPy₃ (N,N-bis(2-pyridylméthyl)amine-N-éthyl-2-pyridine-2-carboxamide) et le PaPy₂Q (N,N-bis(2-pyridylméthyl)amine-N-éthyl-2-quinaldine-2-carboxamide).

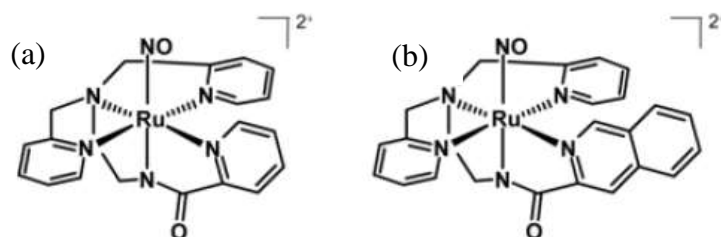


Figure I-37 : Structures des complexes à ligands dérivés carboxamides : (a) PaPy₃H et (b) PaPy₂QH

Dans le complexe (b), un fragment quinoline a été greffé sur le ligand PaPy₃ afin d'apporter une délocalisation électronique plus importante. Ainsi la comparaison des rendements quantiques de NO[•] permet de conclure sur l'influence de la conjugaison des ligands. Sous irradiation à 410 nm, le rendement quantique passe de 0,05 pour le [RuPaPy₃NO]²⁺ à 0,17 pour le [RuPaPy₂QNO]²⁺.¹¹⁴

De plus, avec ces ligands, il n'y a pas de réaction-retour du photoproduit sur le NO[•].

I. 6. Optimisation de la photolibération de NO[•] pour la PACT

D'après les parties précédentes, un complexe de ruthénium à ligand nitrosyle pour des applications en PACT doit vérifier plusieurs propriétés pour garantir l'efficacité du traitement. Pour des applications anticancéreuses, les complexes peuvent être vectorisés pour un meilleur ciblage des tumeurs. Mais ces complexes doivent être solubles et stables en milieu physiologique dans l'obscurité, pour libérer NO[•] de façon efficace quand la zone à traiter est irradiée.

I. 6. 1- Interactions lumière-tissus

La plupart des complexes à ligand nitrosyle décrits dans la littérature sont capables de libérer NO[•] sous irradiation dans l'UV. Même si certains tissus, comme les yeux ou la vessie, peuvent être irradiés dans les domaines bleus et verts, les muscles, par exemple, absorbent ces longueurs d'onde et nécessitent une irradiation dans le rouge ou le proche infrarouge.⁷¹

Dans la fenêtre thérapeutique, entre 600 et 1300 nm, les constituants des tissus n'absorbent pas ou peu. Dans le domaine ultraviolet, ce sont principalement les protéines,

l'ADN et la mélanine qui absorbent. L'hémoglobine et la myoglobine absorbent dans le visible. Dans l'infrarouge, ce sont principalement l'eau et les collagènes qui présentent des coefficients d'extinction molaire importants.^{115,116} La **Figure I-38** représente les spectres d'absorption de ces différents composants biologiques et la fenêtre thérapeutique.

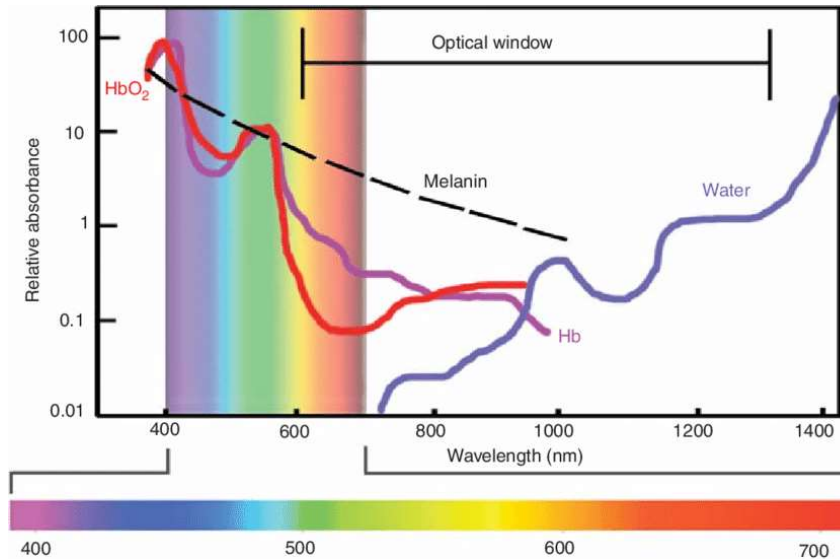


Figure I-38 : Spectres d'absorbance des différents composants biologiques (d'après Lyons *et al.*, *Cold Spring Harb. Protoc.*, 2013, 8, 685-699)

Aussi, des longueurs d'onde plus élevées permettent de traverser la plupart des tissus et ainsi d'activer les complexes donneurs de NO[•]. Une irradiation dans le proche infrarouge (NIR) permet d'atteindre le muscle alors qu'une irradiation dans le visible à 450 nm ne pénètre dans les tissus que sur 0,2 mm.

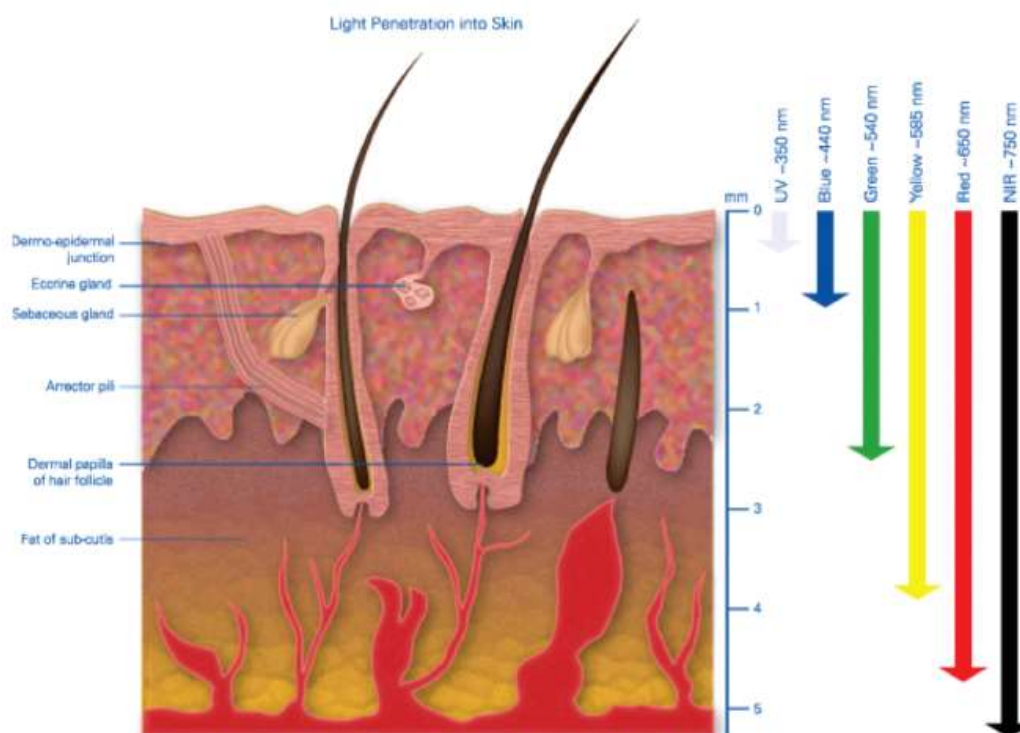


Figure I-39 : Profondeur de pénétration des différentes longueurs d'onde d'irradiation à travers la peau (d'après Ash *et al.*, *Lasers Med Sci*, 2017, 32, 1909–1918)

Ainsi, les traitements par PACT peuvent être utilisés sur des tumeurs ou des infections jusqu'à une profondeur de 5 mm dans les tissus. De plus, à de telles longueurs d'onde, l'énergie de l'irradiation n'est pas assez forte pour causer des dommages cutanés, comme les UVs par exemple.¹¹⁷

I. 6. 2- Optimisation de la libération de NO[•] par irradiation dans le visible

Afin de libérer NO[•] à partir de complexes de ruthénium à ligand nitrosyle par irradiation dans la fenêtre thérapeutique, le groupe de recherche de Mascharak a choisi d'utiliser une « antenne excitatrice ». Son rôle est d'absorber les photons et de transférer l'énergie sur le fragment Ru-NO pour favoriser la libération de monoxyde d'azote, sous excitation dans le visible. Pour cela, ils ont utilisé la résorufine, chromophore présentant une bande d'absorption très intense à 590 nm. Coordiné au ruthénium en *trans* du ligand nitrosyle, sa bande d'absorption se superpose à la bande impliquée dans le départ de NO[•]. Ainsi, le complexe [Ru((OMe)₂IQ1)(Resf)(NO)] (représenté sur la **Figure I-40**) présente un rendement

quantique de NO[•] de 0,271, environ sept fois supérieur à celui de son homologue [Ru((OMe)₂IQ1)Cl(NO)].



Figure I-40 : Structure du complexe [Ru((OMe)₂IQ1)(Resf)(NO)] (d'après Fry *et al.*, *Acc. Chem. Res.*, **2011**, 44(4), 289-298)

Cette stratégie a d'une part permis d'augmenter le rendement quantique de NO[•] mais également de décaler la bande d'absorption du fragment Ru-NO afin de permettre la photolibération de NO[•] sous excitation à 500 nm.¹⁷

I. 6. 3- Optimisation de la libération de NO[•] par excitation à deux photons

I. 6. 3- a) Principe de l'absorption à deux photons

L'autre stratégie pour optimiser la libération de NO[•] dans les tissus biologiques est d'utiliser le phénomène photophysique d'absorption à deux photons (ADP, ou TPA pour « Two-Photon Absorption »).

L'absorption à deux photons est un processus de résonance non linéaire du troisième ordre durant lequel deux photons sont absorbés simultanément par un composé à l'état fondamental pour atteindre son état excité. L'énergie nécessaire pour atteindre l'état excité responsable de la photolibération de NO[•] en absorption monophotonique est $h\nu_1$ et correspond à l'énergie d'un photon dans l'UV-Visible. En TPA, deux photons d'énergie moitié ($h\nu_2 = h\nu_1/2$), donc de longueur d'onde double ($\lambda_2 = 2\lambda_1$) sont absorbés simultanément (**Figure I-41**). Les photons d'excitation sont donc moins énergétiques et cette technique permet d'éviter les dommages causés par une irradiation dans l'UV-Visible.

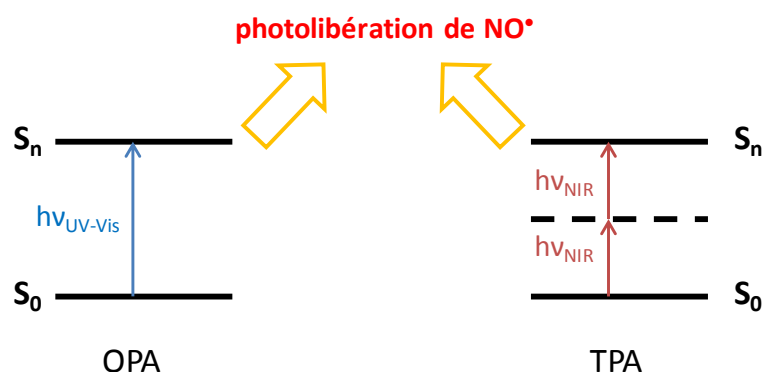


Figure I-41 : Absorptions monophotonique (OPA) et biphotonique (TPA) à l'origine de la libération de NO*

L'absorption à deux photons permet donc d'exciter les composés dans la fenêtre thérapeutique (600-1300 nm). Grâce à l'utilisation de hautes longueurs d'onde, cette stratégie permet aux photons de pénétrer en profondeur au sein des tissus. De plus, cette méthode permet un ciblage accru du traitement puisque le phénomène d'absorption à deux photons a lieu au point focal du laser (avec un volume d'environ $1 \mu\text{m}^3$) (**Figure I-42**).

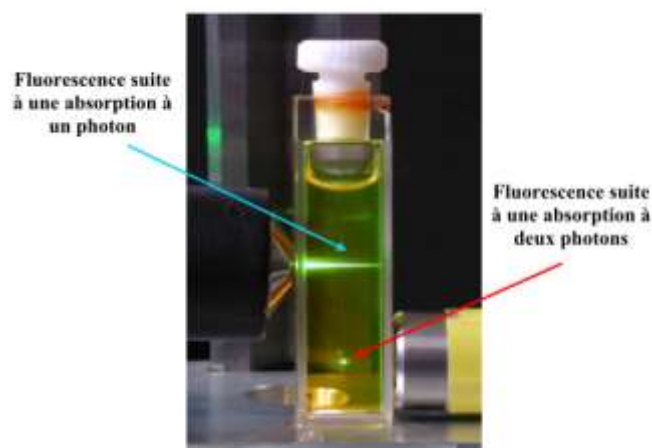


Figure I-42 : Focalisation des irradiations mono- (à gauche) et biphotonique (à droite) dans une solution de fluorescéine (d'après la thèse de Joëlle Akl, « Photolibération de NO dans les complexes de ruthénium à ligand nitrosyle : nouvelles perspectives en thérapie photodynamique par absorption à deux photons », 2014, Université Paul Sabatier)

Cela s'explique par la relation quadratique existant entre le processus et l'intensité de l'irradiation. Ainsi, le traitement des tumeurs et des plaies ou infections peut se faire de manière sélective sur les cellules se trouvant au point focal, sans endommager les tissus sains.

I. 6. 3- b) Mesure de la section efficace

La capacité d'une molécule à absorber deux photons de façon simultanée est évaluée par la section efficace σ (ou « cross-section»). Celle-ci est exprimée en Goeppert-Mayer (GM) et est donnée par la formule :

$$\frac{dnp}{dt} = N \cdot \sigma \cdot F^2$$

où $\frac{dnp}{dt}$ est le nombre de photons absorbés par TPA par unité de temps, N la concentration en molécules actives et F le flux de photons.

Il existe de nombreuses techniques permettant la mesure de la section efficace de composés. Les plus couramment utilisées sont la fluorescence induite par excitation à deux photons (TPEF) et le Z-Scan.

La TPEF, décrite en 1996 par Xu *et al.*, consiste en la mesure du signal de fluorescence de l'échantillon, généré par excitation à deux photons.¹¹⁸ Ce signal donne le produit $\sigma \cdot \Phi_f$ (Φ_f est le rendement de luminescence) et ainsi la section efficace d'absorption à deux photons σ peut être déterminée.

Le Z-Scan, présenté en 1990 par Bahae *et al.*, consiste en la mesure de la transmittance de l'échantillon suivant sa position sur l'axe z, direction de propagation du laser. Cette technique permet ainsi la mesure de la section efficace d'absorption à deux photons pour les échantillons non fluorescents.¹¹⁹ (cf **Annexe 6** p.328).

I. 6. 3- c) Propriétés d'absorption à deux photons de quelques complexes

Les premiers complexes de fer à ligand nitrosyle à propriétés d'absorption à deux photons ont été synthétisés par le groupe de Ford en 2004. Ils ont modifié le sel de Roussin rouge (RRS) avec des groupements esters et un chromophore protoporphyrine IX ou fluorescéine pour former les complexes PPIX-RSE et Fluor-RSE. Leurs structures sont données sur la **Figure I-43**.

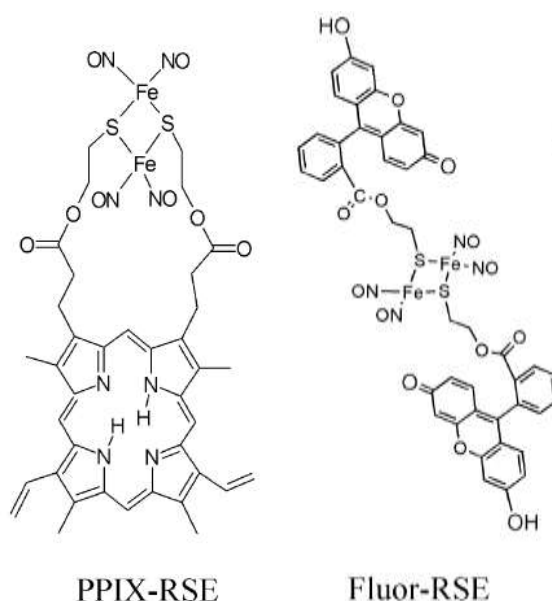


Figure I-43 : Les complexes de fer à ligand nitrosyle possédant des propriétés ADP.

Ces ligands ont été choisis pour leurs propriétés ADP. Par exemple la section efficace du ligand porphyrinique PPIX est de 2 GM à 790 nm, ce qui est faible. Le ligand fluorescéine est choisi pour apporter des propriétés de fluorescence au complexe afin de pouvoir mesurer sa section efficace par la méthode TPEF. La section efficace du complexe Fluor-RSE est de 63 GM à 800 nm. Une mesure électrochimique a permis de montrer que l'irradiation de ces composés par un laser pulsé Ti/saphir à 810 nm provoque la photolibération de NO[•]. Il a été prouvé que la photolibération de NO[•] est due à un processus à deux photons puisque la vitesse de formation de NO[•] était proportionnelle au carré de la puissance du laser.^{18,120}

Dans l'équipe d'Isabelle Malfant du LCC, des travaux ont été menés sur les propriétés d'absorption à deux photons des complexes *trans* (Cl,Cl)- et *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆, présentés précédemment dans l'état de l'art. Par le test de Griess il a été prouvé que les deux isomères pouvaient libérer NO[•] sous irradiation à deux photons à 810 nm. A cette longueur d'onde, les complexes ne présentent aucune bande d'absorption monophotonique. Au cours de l'irradiation en présence de réactif de Griess, une bande vers 500-520 nm apparaît sur le spectre d'absorbance de la solution, caractéristique de la formation du colorant « azo »^{121,122} (**Figure I-44**).

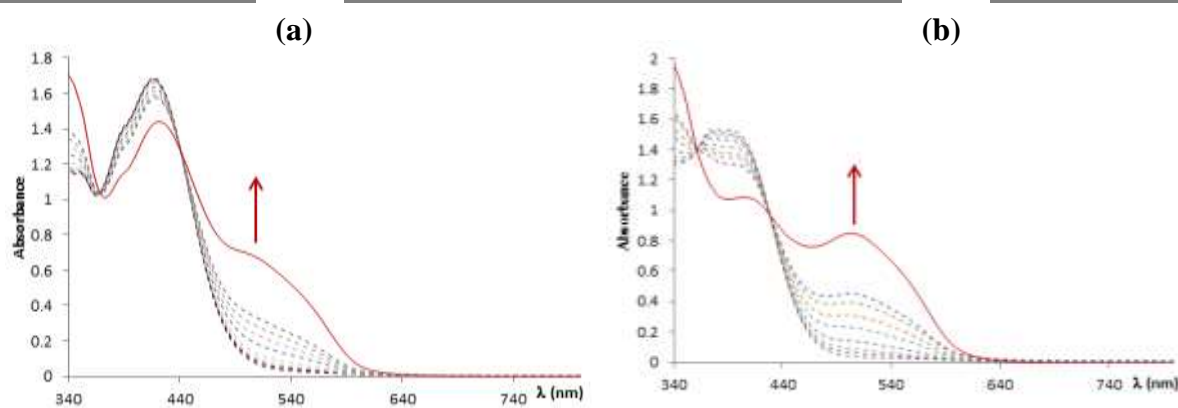


Figure I-44 : Evolutions des spectres d'absorption de (a) *trans* (Cl,Cl)- et (b) *cis* (Cl,Cl)- [RuFTCl₂NO]PF₆ en fonction du temps d'irradiation (810 nm), en présence de réactif de Griess (d'après *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2016, 15, 1484-1491)

De plus, l'absorbance de la solution a été tracée au cours du temps pour différentes puissances P de la source : plusieurs droites sont obtenues. Ensuite, la courbe $\log(\text{pente}) = f(\log P)$ est tracée (**Figure I-45**). La pente de cette droite est de 1,4 mettant en évidence un processus non linéaire.

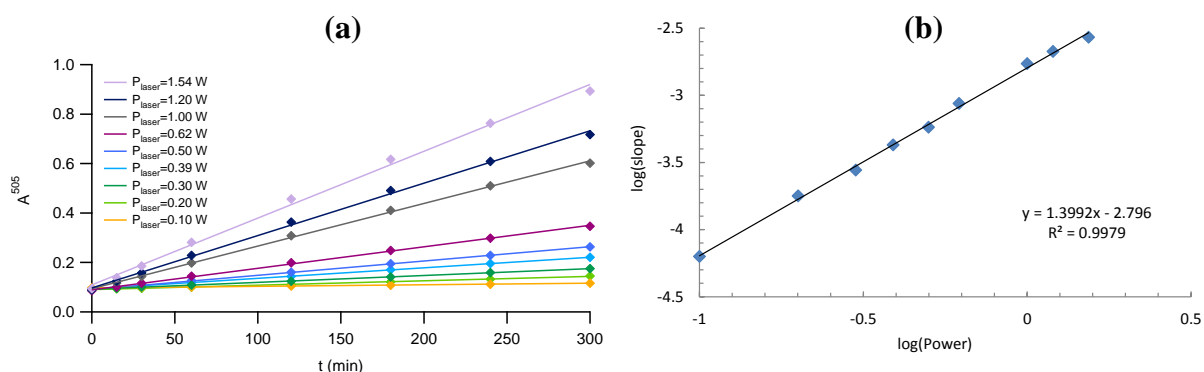


Figure I-45 : Cinétique de la photolibération de NO' sous irradiation à deux photons pour différentes puissances de laser (a) et variation de la constante cinétique en fonction de la puissance (b) (d'après *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2016,15, 1484-1491)

Dans l'équipe également, l'introduction d'un groupement carbazole sur le ligand terpyridine a été réalisée afin d'augmenter la délocalisation électronique sur ce ligand et augmenter l'effet « push-pull » dans le complexe, dans l'optique d'obtenir une section efficace importante. Par exemple, la section efficace du complexe représenté sur la **Figure I-46** à 800 nm est de 159 GM.¹²³

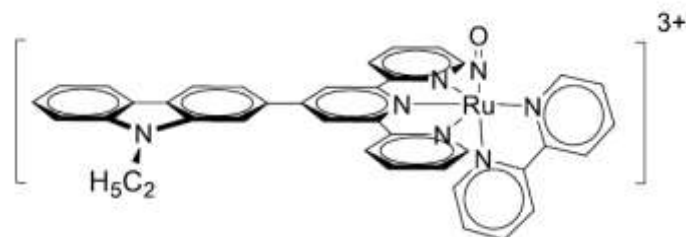


Figure I-46 : Structure d'un complexe à ligand terpyridine-carbazole

En 2015, Fowley *et al.* ont conçu un système pour la photolibération de NO[•] sous irradiation à deux photons en greffant un donneur de NO[•] sur des quantum dots de carbone.¹²⁴ Ces quantum dots constituent une nouvelle classe de matériaux possédant d'importantes sections efficaces pouvant aller jusqu'à 40 000 GM. Dans les systèmes **3** ainsi obtenus, représentés sur la **Figure I-47**, sous irradiation, un transfert de charge des quantum dots **1** jusqu'au donneur de NO[•] (organique) **2** a lieu, favorisant ainsi la photolibération de NO[•].

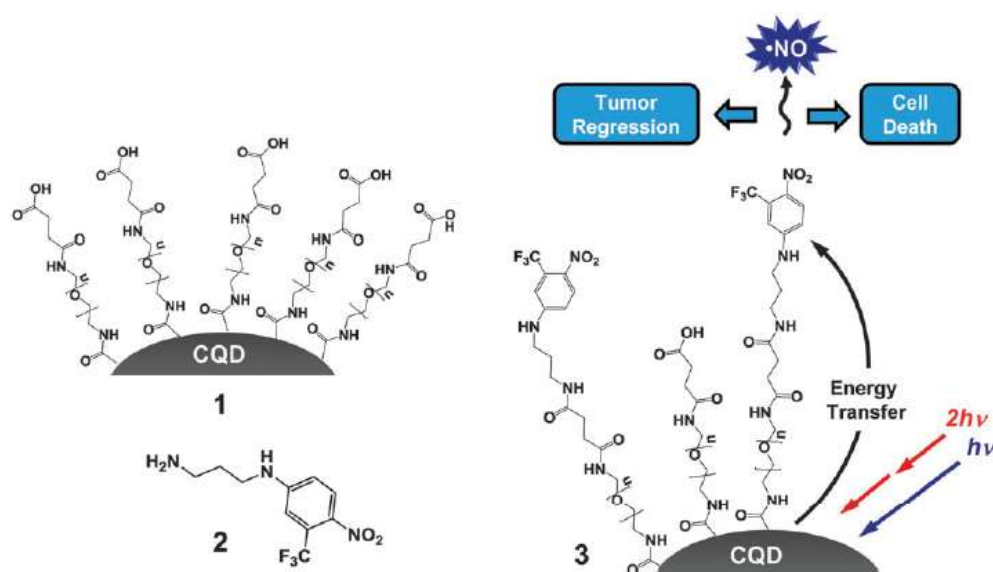


Figure I-47 : Quantum dots liés à un donneur de NO[•] pour la photolibération de NO[•] sous irradiation à deux photons

I. 7. Voies de synthèse de complexes de ruthénium à ligand nitrosyle

Différentes voies de synthèse de complexes de ruthénium à ligand nitrosyle ont été décrites par les groupes de recherche. Quatre voies de synthèse principales sont actuellement utilisées. Celles-ci sont présentées sur la **Figure I-48**. Le précurseur est le complexe $[\text{Ru}^{\text{III}}\text{Cl}_3] \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (commerciallement disponible).

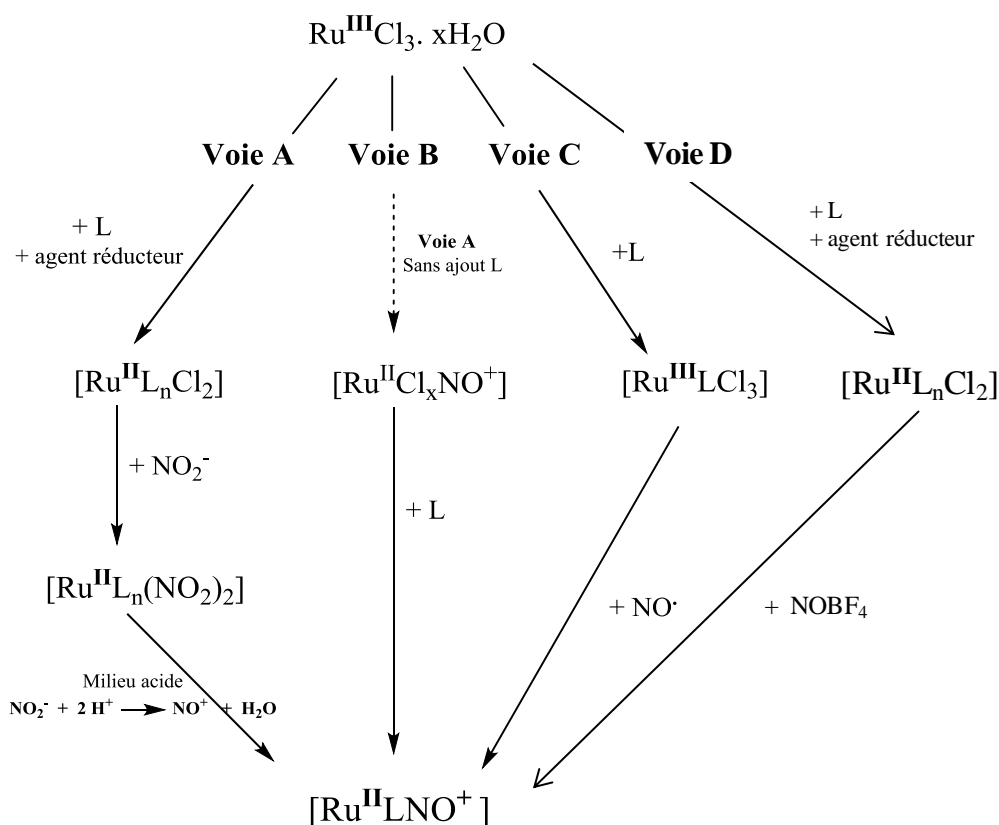


Figure I-48 : Les quatre voies de synthèse principales pour la synthèse de complexes de ruthénium à ligand nitrosyle (d'après la thèse « Photolibération de NO^\bullet dans les complexes de ruthénium à ligand nitrosyle : Nouvelles perspectives en thérapie photodynamique par absorption à deux photons » de Joëlle Akl, 2014)

I. 7. 1- Voie de synthèse A

Cette voie met en jeu plusieurs étapes donnant des intermédiaires isolables.

La première étape de cette voie de synthèse est la coordination du ligand L_n (mono- ou bidente) à partir du complexe de ruthénium (III) $[\text{Ru}^{\text{III}}\text{Cl}_3]$. L'ajout des ligands se fait en

milieu réducteur (dans un solvant réducteur comme l'éthanol ou en présence de triéthylamine par exemple) pour réduire le Ru^{III} en Ru^{II} et former l'intermédiaire [Ru^{II}L_nCl₂].

Dans une seconde étape, les ligands chloro sont substitués par des ligands nitro pour former l'intermédiaire [Ru^{II}L_n(NO₂)₂]. Pour cela, du nitrite de sodium NaNO₂ est ajouté dans un mélange éthanol/eau.

La dernière étape consiste en une réaction acido-basique pour la transformation d'un ligand nitro en ligand nitrosyle [Ru^{II}L_n(NO₂)(NO)]²⁺. Cette réaction, réalisée en présence d'un large excès d'acide chlorhydrique, est la suivante : NO₂⁻ + 2 H⁺ → NO⁺ + H₂O.

Parfois, le second ligand nitro qui n'a pas été transformé est substitué par un chloro (provenant de HCl).

Cette méthode a été utilisée pour synthétiser le complexe [Ru(bpy)₂(NO)(NO₂)](PF₆)₂ à partir du précurseur [RuL₂Cl₂] où L₂ représente le ligand bpy (2,2'-bipyridine).¹²⁵

D'autres complexes ont été synthétisés suivant cette méthode. Parmi eux, des complexes à ligand 2,2':6',2''-terpyridine ont été obtenus. Par exemple, Frantz *et al.* en 2014, ont travaillé sur le complexe [Ru^{III}(terpy)Cl₃], obtenu par complexation du ligand terpyridine sur le précurseur [Ru^{III}Cl₃]. Le ligand 2,2'-bipyrazine (bpz) a ensuite été complexé et l'ajout de NaNO₂ suivi d'un traitement acide a permis l'obtention du complexe [Ru^{II}(terpy)(bpz)NO](PF₆)₃.¹²⁶

Bryan *et al.* ont également utilisé cette voie de synthèse pour obtenir le complexe [Ru^{II}(terpy)(Cl)(OH)(NO)].¹²⁷

I. 7. 2- Voie de synthèse B

Pour cette voie de synthèse, les précurseurs sont des complexes de ruthénium (II) à ligand chloro et nitrosyle, comme K₂[Ru^{II}Cl₅NO] ou [RuCl₃NO].5H₂O. Le premier complexe est lui-même obtenu par la **Voie A** à partir de [Ru^{III}Cl₃] selon la méthode de Durig *et al.*¹²⁸ Le second est disponible commercialement.

Le ligand L est ensuite ajouté dans une seconde étape pour donner le composé attendu [Ru^{II}L(NO)].

En 2002, Works *et al.* ont utilisé cette méthode pour obtenir les complexes $[\text{Ru}(\text{}^t\text{Bu}_2\text{salophen})(\text{Cl})(\text{NO})]$ et $[\text{Ru}(\text{}^t\text{Bu}_4\text{salen})(\text{Cl})(\text{NO})]$ à partir du $[\text{RuCl}_3\text{NO}]\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ et des ligands ${}^t\text{Bu}_2\text{salophen}$ et ${}^t\text{Bu}_4\text{salen}$.¹¹⁰

Comme pour la **Voie A**, cette voie a été largement utilisée pour la synthèse de complexes à ligand terpyridine. Les travaux de Karidi et Nagao ont montré que la réaction d'une terpyridine avec $\text{K}_2[\text{RuCl}_5\text{NO}]$ donnait deux isomères de $[\text{Ru}(\text{terpy})\text{Cl}_2(\text{NO})]$. Ces isomères sont notés *cis* (Cl,Cl)- ou *trans* (Cl,Cl)- selon la position des ligands.^{129,106} La réaction est représentée sur la **Figure I-49**.

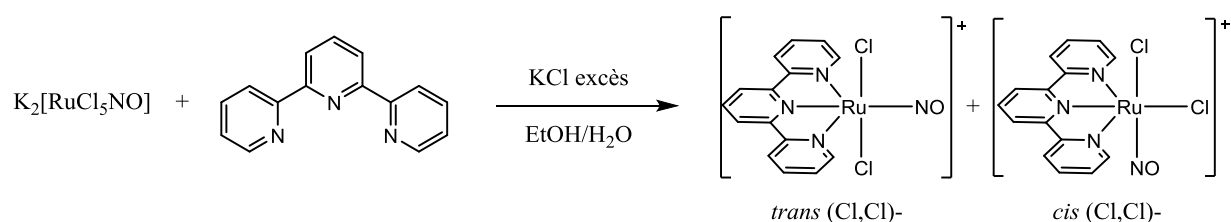


Figure I-49 : Réaction de complexation de la terpyridine pour former deux isomères

Les travaux d'Akl *et al.* dans l'équipe du LCC ont mené à la synthèse des complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)- $[\text{RuFTCl}_2\text{NO}]\text{PF}_6$. Par la **Voie B**, un mélange des deux isomères et du complexe homoleptique $[\text{Ru}(\text{FT})_2](\text{PF}_6)_2$ est obtenu. De plus, l'utilisation de 13 équivalents de KCl a entraîné un ratio *cis/trans* de 18/47 avec 35% d'homoleptique dans le mélange, alors que 21 équivalents ont permis l'obtention d'un ratio *cis/trans* de 20/38 avec 42% d'homoleptique. La première méthode, avec un moindre excès de KCl donne une proportion de complexe à ligand nitrosyle plus importante.^{107,130}

I. 7. 3- Voie de synthèse C

Pour cette troisième voie de synthèse, la première étape est la coordination du ligand L au précurseur $[\text{Ru}^{\text{III}}\text{Cl}_3]\cdot x\text{H}_2\text{O}$, sans agent réducteur, pour former le complexe de ruthénium (III).

L'étape suivante consiste en l'introduction de monoxyde d'azote NO^\bullet gaz dans le milieu contenant le complexe intermédiaire. Le gaz étant réducteur, le ruthénium (III) est réduit en ruthénium (II) et un ligand chloro est substitué par un ligand nitrosyle pour donner le complexe $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{-NO}^+]$.

Des complexes de ruthénium à ligand pyridine-carboxamide ont pu être obtenus grâce à cette méthode. Après déprotonation du ligand 1,2-bis(pyridine-2-carboxamido)-4,5-diméthoxybenzène ((OMe)₂bpb), celui-ci est complexé au précurseur [Ru^{III}Cl₃].xH₂O. Ensuite, du NO[•] gazeux est passé dans la solution pour donner le complexe [Ru^{II}((OMe)₂bpb)ClNO].¹¹³ Cette réaction est représentée sur la **Figure I-50**.

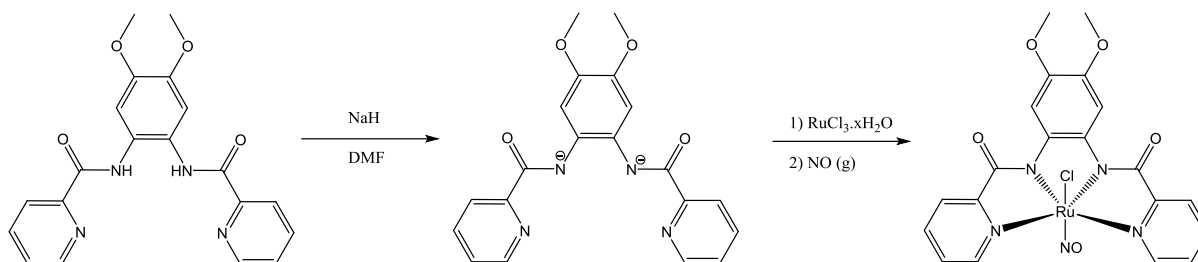
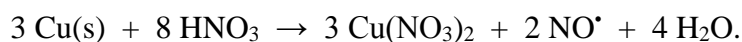


Figure I-50 : Synthèse du complexe [Ru^{II}((OMe)₂bpb)ClNO]

Dans l'équipe du LCC, la synthèse des complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ a également été menée par la **Voie C**. L'utilisation de cette méthode permet d'obtenir uniquement un mélange *cis/trans*, sans la présence de complexe homoleptique (cf **Voie B**).^{121,122} Dans ce cas, le monoxyde d'azote est généré *in situ* par oxydation du cuivre par l'acide nitrique selon la réaction :



Le gaz NO[•] ainsi produit traverse un piègeur de NaOH (8 mol/L) qui permet d'absorber les produits d'oxydation de NO[•] tels que NO₂. Le montage est placé sous atmosphère inerte pour éviter l'oxydation du NO[•]. Il est ensuite introduit dans la solution de complexe [Ru^{III}FTCl₃] dans le DMF à 80°C. Le NO[•] substitue un ligand chloro et réduit le ruthénium (III) pour former les complexes attendus. Le montage est représenté sur la **Figure I-51**.

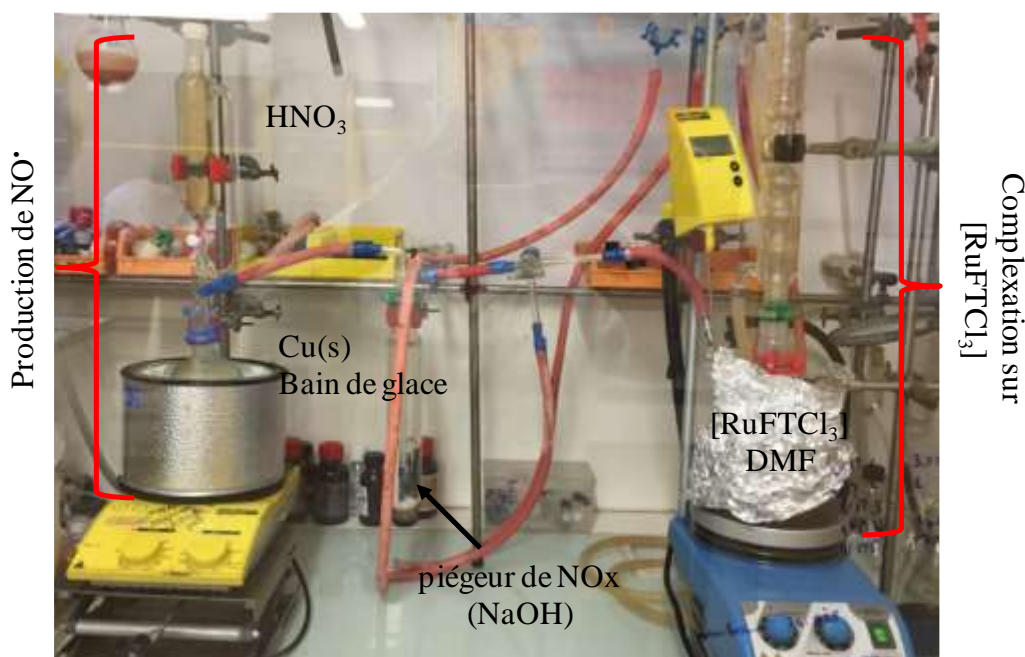


Figure I-51 : Montage du bullage de NO• sur le complexe [RuFTCl₃] pour la synthèse des *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]⁺

Les complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]⁺ sont ensuite séparés par HPLC.

Cette voie est donc plus avantageuse que la **Voie B** pour la synthèse de complexes à ligand terpyridine et nitrosyle. Elle a d'ailleurs été utilisée pour la synthèse d'autres complexes dans l'équipe comme les [Ru(R-PhTerpy)Cl₂NO]⁺, avec PhTerpy = 4'-phényl-2,2':6',2''-terpyridine avec en position du groupement phényle R = NO₂, H, Br, O-CH₃.¹⁰⁸

I. 7. 4- Voie de synthèse D

Il existe une autre voie de synthèse moins développée dans la littérature qui utilise le tétrafluoroborate de nitrosyle NOBF₄. La première étape de cette voie est identique à celle de la **Voie A** : il s'agit de la coordination du ligand sur le précurseur [Ru^{III}Cl₃] en milieu réducteur. La seconde étape est la coordination de NO• sur le centre métallique.

Par exemple, les complexes [1]BF₄ et [2](BF₄)₂ de la **Figure I-52** ont été obtenus par Chowdhury *et al.* en utilisant cette méthode.¹³¹

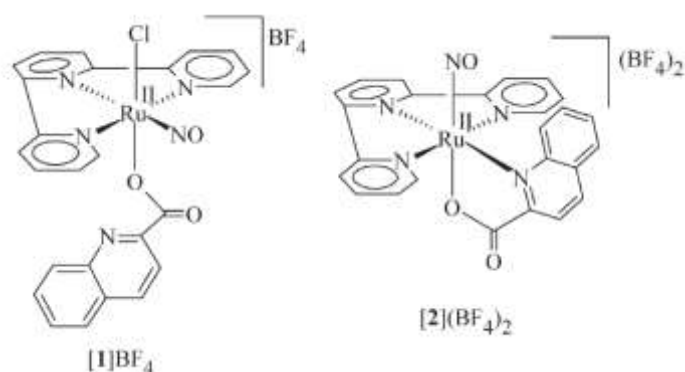


Figure I-52 : Complexes de ruthénium à ligand nitrosyle obtenus par NOBF_4

I. 7. 5- Conclusion

D'après les parties précédentes, les complexes de ruthénium à ligand nitrosyle présentent un intérêt important pour diverses applications biologiques en photothérapie. Grâce à leur capacité de photolibération de NO^* , ils sont de bons candidats pour des traitements ciblés sur des cellules cancéreuses ou des bactéries.

Différentes voies de synthèse existent et peuvent être choisies en fonction des ligands à coordonner au ruthénium.

Dans les prochaines parties, deux enjeux biologiques importants seront présentés : le cancer et la lutte contre la résistance antimicrobienne. Des exemples de traitement par le monoxyde d'azote et les complexes de ruthénium à ligand nitrosyle seront proposés.

I. 8. Application en biologie pour des thérapies anticancéreuses

I. 8. 1- Présentation de la maladie

I. 8. 1- a) Quelques chiffres

Le cancer est un ensemble de maladies caractérisées par une croissance anormale des cellules. Ces maladies constituent la deuxième cause de mortalité dans le monde. En 2015, 8,8 millions de personnes sont décédées d'un cancer, ce qui représente environ 13 % de la totalité des décès. Les cancers les plus répandus chez les hommes sont le cancer du poumon, de la

prostate, le cancer colorectal, le cancer de l'estomac et du foie. Chez la femme, le plus courant est le cancer du sein, puis viennent les cancers colorectal, du poumon, du col de l'utérus et de l'estomac.

D'après l'Institut National du Cancer, 400 000 nouveaux cas sont apparus en France en 2017 (l'incidence), 214 000 chez les hommes et 186 000 chez les femmes et 150 000 décès ont été comptabilisés. Sur la période 2005-2012 en France, l'incidence a diminué de 1,3 % chez les hommes et augmenté de 0,2 % chez les femmes, mais la mortalité a chuté dans les deux cas.

I. 8. 1- b) Du dysfonctionnement de la cellule au développement du cancer

Le corps humain est constitué de 10 000 milliards de cellules. La cellule est l'unité de base de tout organisme vivant et se développe, se différencie, se divise et meurt de façon autonome. Elle est constituée d'une membrane renfermant le cytoplasme contenant divers organites dont les mitochondries nécessaires à la respiration et le noyau qui contient le matériel génétique de la cellule.

Les cellules somatiques se divisent par le processus de la mitose qui, à partir d'une cellule-mère, donne deux cellules-filles qui lui sont identiques. Ce processus est divisé en cinq étapes, qui sont représentées sur la **Figure I-53**.

La première étape G₀ est une phase de repos, durant laquelle la cellule attend le signal de reproduction pour passer à l'étape suivante. En G₁, première phase de croissance, la cellule se développe et synthétise des protéines et de l'ARN. A ce stade, la cellule peut continuer le cycle cellulaire ou en sortir, pour se différencier, maturer et mourir. En phase de synthèse S, l'ADN est répliqué. Durant la seconde phase de croissance G₂, la cellule continue la production de protéines. La dernière phase est la mitose M durant laquelle la cellule se divise en deux cellules-filles.¹³²

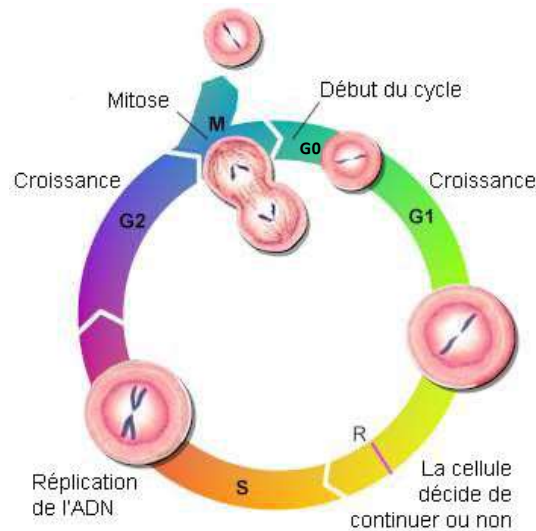


Figure I-53 : Cycle de division cellulaire

(d'après http://www.daviddarling.info/images/cell_cycle.jpg)

Entre chaque phase, la cellule passe par des « points de contrôle », qui permettent notamment de déceler les problèmes de réplication de l'ADN (mutations). La cellule peut alors déclencher la correction de ces erreurs ou bien l'apoptose. L'accumulation de ces erreurs et un mauvais contrôle de la division cellulaire entraînent la cancérisation.

Les cellules cancéreuses sont ensuite insensibles aux signaux de régulation de division : elles ne déclenchent plus d'apoptose et se divisent indéfiniment.

Sans traitement, le cancer se développe en partant d'une lésion précancéreuse où la cellule est en cours de transformation. Une cellule cancéreuse apparaît et se multiplie, mais reste localisée dans un tissu : cela constitue le stade 1. Ensuite la tumeur grossit (stade 2) et envahit les tissus alentours (stade 3). Par la suite, des métastases apparaissent dans différents tissus dont les ganglions lymphatiques (stade 4).

I. 8. 2- Les traitements du cancer

Les traitements les plus utilisés aujourd'hui incluent la chirurgie (ablation de la tumeur), la radiothérapie (destruction des cellules par des rayons de haute énergie), la chimiothérapie (administration de molécules tuant ou ralentissant le développement des cellules cancéreuses), l'hormonothérapie (pour créer un milieu défavorable au développement des tumeurs) et l'immunothérapie (qui consiste à faire exprimer les cellules du système

immunitaire contre la tumeur cancéreuse). Ces traitements peuvent être utilisés seuls ou associés, comme par exemple la chirurgie et la radiothérapie.

Malgré ces thérapies, les chercheurs doivent continuer à les améliorer car il existe des populations de patients qui n'y répondent pas et d'autres qui y développent une résistance. Il est donc très important de développer de nouveaux traitements contre les cancers.

I. 8. 3- Le rôle du monoxyde d'azote NO[•]

Depuis les années 1990, plusieurs études ont montré la présence des trois isoformes de NOS (NO-synthases) dans différents types de cellules cancéreuses. L'augmentation de l'activité de ces enzymes dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines suggère que le monoxyde d'azote joue un rôle dans le développement et l'apoptose de ces cellules.^{133,134}

Rapidement, les chercheurs concluent sur la dualité du NO[•] : selon sa concentration, il permet le développement ou la régression des tumeurs.¹³

Dans des concentrations de l'ordre du micromolaire et au-delà, le monoxyde d'azote est impliqué dans le processus d'apoptose de nombreux types cellulaires, comme les neurones, les cellules pancréatiques et les macrophages.¹³⁵

Premièrement, NO[•] peut endommager l'ADN. En milieu physiologique, NO[•] réagit avec du dioxygène ou avec le radical superoxyde pour former des RNOS telles que le dioxyde d'azote NO₂, le trioxyde d'azote N₂O₃ ou les ions péroxynitrites ONOO⁻.

Les péroxynitrites peuvent également provoquer la nitration de fragments tyrosine dans les protéines, mais aussi modifier l'ADN en oxydant par exemple la 8-oxoguanine en 8-nitroguanine. Des cassures des brins d'ADN sont également observées, plus particulièrement lors des étapes de réplication et de traduction où l'ADN est sous la forme d'un seul brin.

N₂O₃ est capable de nitrosyler des amines, qui deviennent des agents alkylants de l'ADN. Les RNOS peuvent également entraîner la déamination de bases de l'ADN.

Ensuite, les NOS ont également été observées dans les mitochondries. Le monoxyde d'azote peut augmenter la perméabilité des pores de ces organites, induisant ainsi la libération de cytochrome c dans le cytoplasme. Ce dernier entraîne l'oligomérisation d'un facteur apoptotique (Apaf-1) qui active la caspase-9, puis dans une réaction en cascade, les caspases 7 et 3 qui déclenchent l'apoptose de la cellule. De plus, en se liant à la cytochrome c-oxydase,

NO[•] permet l'augmentation des concentration en O₂⁻ et H₂O₂. Ces agents oxydants peuvent à nouveau attaquer l'ADN.¹³⁶

L'utilisation de NO[•] dans de fortes concentrations est donc une thérapie anticancéreuse prometteuse. Mais le contrôle de la concentration est primordial car des effets opposés, comme l'angiogénèse, peuvent être obtenus si la concentration est trop faible.

I. 8. 4- Les stratégies de contrôle de la libération de NO[•]

La thérapie génique constitue un domaine de recherche intéressant. Il s'agit de transférer des séquences d'ADN codant pour les NOS dans des cellules pour augmenter la production endogène de NO[•]. Par exemple, la transfection de cellules K-1735 de mélanome exprimant la iNOS a montré des effets antitumoraux chez la souris.¹³⁷

La seconde stratégie consiste en l'utilisation de donneurs de NO[•] exogènes. Pour cela, les complexes de ruthénium à ligand nitrosyle photoactivables sont également étudiés.

Le groupe de recherche de Mascharak a présenté en 2008 la synthèse de plusieurs complexes de ruthénium à ligand nitrosyle. L'un d'entre eux, le [(Me₂bpb)Ru(NO)(Resf)], dont la structure du ligand (Me₂bpb) est représentée sur la **Figure I-54**, a été testé sur des cellules cancéreuses MDA-MB-231, cellules mammaires humaines.¹³⁸ Dans l'obscurité, ce composé n'a aucune toxicité alors que lorsque les cellules sont irradiées dans le visible, des signes d'apoptose tels que la condensation de la chromatine ou la fuite du cytoplasme sont observés.

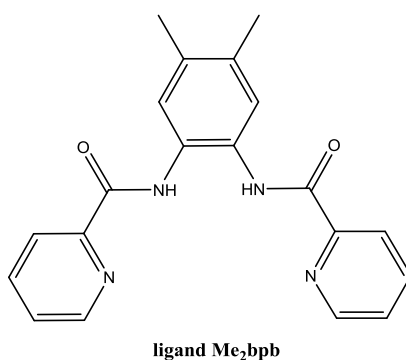


Figure I-54 : Structure du ligand Me₂bpb

L'incorporation de complexes de ruthénium dans des liposomes a été étudiée par Rodrigues *et al.* Les liposomes sont des vésicules constitués d'une bicouche phospholipidique, comme le montre la **Figure I-55**. Les phospholipides présentent une tête hydrophile et une queue hydrophobe, leur permettant d'encapsuler des molécules hydrophiles ou hydrophobes dans les différentes zones du liposome. Ces systèmes protègent la molécule d'une dégradation enzymatique ou chimique et évitent l'exposition des tissus sains à la molécule active, tout en favorisant la pénétration intracellulaire de la molécule active.

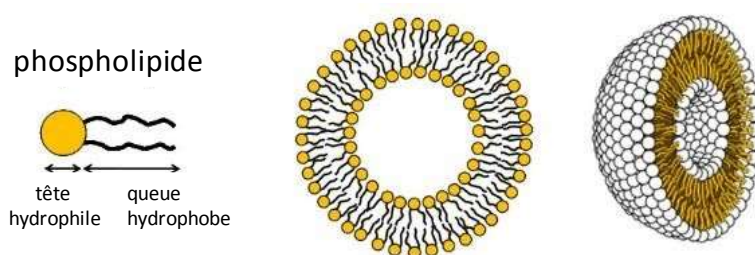


Figure I-55 : Structure schématisée d'un liposome

Le complexe $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2(4\text{-pic})](\text{PF}_6)_3$, où 4-pic représente le ligand 4-picoline, est incorporé dans des liposomes et testé sur des cellules cancéreuses d'un carcinome du foie HepG2. La viabilité des cellules est affectée par la libération de NO^* (non photo-induite ici). Des études complémentaires ont montré que l'apoptose a été déclenchée par la libération de cytochrome c par les mitochondries, suivie de l'activation de la caspase-9.¹³⁹

En 2015, le groupe de Liu présente des nanoparticules de TiO_2 couplées à un fragment Ru-NO et un fragment acide folique.¹⁴⁰ Ces systèmes sont représentés sur la **Figure I-56**. L'acide folique permet le ciblage des récepteurs à acide folique sur la cellule, alors que le complexe $[\text{Ru}(\text{tpy}^{\text{COOH}})(\text{DAMBO})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$ est capable de libérer NO^* sous irradiation.

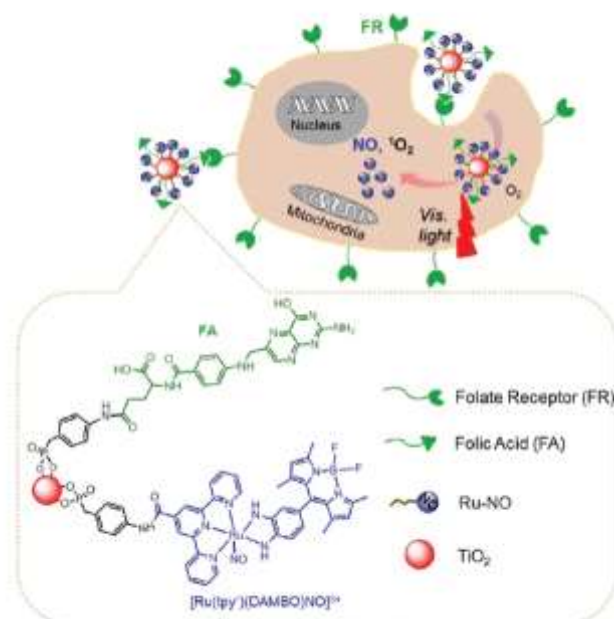


Figure I-56 : Nanoparticules de TiO₂ contenant un complexe [Ru-NO] (d'après Xiang *et al.*, *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 2555-2558)

Ces nanoparticules peuvent traverser les membranes des cellules cancéreuses comme les cellules HeLa ou les MCF-7. L'hydrolyse intracellulaire des nanoparticules provoque une augmentation de fluorescence, qui permet de suivre l'internalisation de ces systèmes. Dans l'obscurité, ces nanoparticules n'ont pas d'effet toxique sur les cellules mais, sous irradiation dans le visible, la viabilité des cellules HeLa est fortement affectée. Ces systèmes sont capables de générer à la fois du monoxyde d'azote et de l'oxygène singulet. Pour comparaison, des nanoparticules à base du complexe de ruthénium dans lequel le ligand nitrosyle a été remplacé par un ligand chloro sont obtenues. Ces systèmes montrent une phototoxicité beaucoup plus faible, montrant ainsi l'intérêt de la libération de NO[•].

D'autres complexes de ruthénium à ligand nitrosyle ont été synthétisés et encapsulés dans des nano-particules. C'est le cas de *trans*-[Ru(NO)Cl(cyclam)](PF₆)₂ et [Ru(NO)(Hedta)], où cyclam représente le ligand 1,4,8,11-tetraazacyclotétradécane et Hedta le ligand acide éthylènediaminetétraacétique.¹⁴¹ Ces complexes sont phototoxiques pour les cellules de mélanome B16-F10 et leur efficacité est due à la libération de NO[•]. En effet, le test sur les cellules en présence d'un piègeur de NO[•], le carboxy-PTIO, ne montre aucune toxicité.

Des études de photolibération de NO[•] sous irradiation à deux photons ont également été menées. Ainsi Fowley *et al.* ont greffé un donneur de NO[•] photoréactif sur des quantum dots de carbone¹²⁴, présentés précédemment en **Figure I-47**.

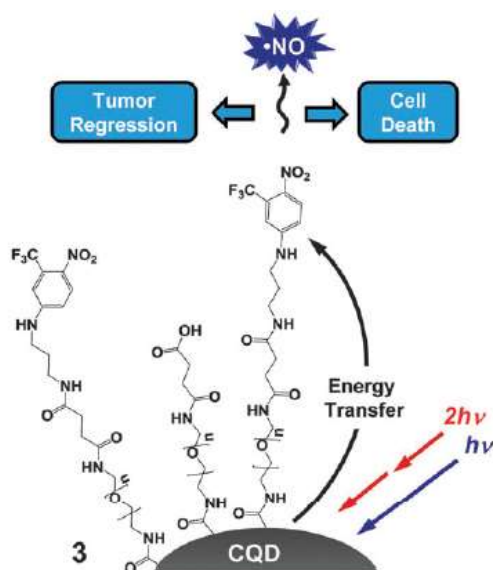


Figure I-57 : Quantum dots liés à un donneur de NO[•] pour la photolibération de NO[•] sous irradiation à deux photons

Ces systèmes ont été testés *in vitro* sur des cellules HeLa : dans l'obscurité, aucune toxicité n'est observée, alors que sous irradiation à 800 nm, dans la fenêtre thérapeutique, la viabilité cellulaire chute jusqu'à environ 60%. *In vivo*, des tumeurs pancréatiques ont été injectées chez la souris puis traitées par ces nouveaux composés : une diminution du volume de la tumeur de 8 % a été observée pour les souris traitées et dont la tumeur a été irradiée à 800 nm, alors que les tumeurs ont augmenté de plus de 50% chez les souris non traitées pendant la même période.

Les hautes concentrations de NO[•] peuvent également être combinées à un traitement par chimiothérapie. Par exemple, des fibroblastes pré-traités par un donneur de NO[•] ont montré une sensibilité accrue au cisplatine par la suite.¹⁴²

De même, des cellules cancéreuses MCF-7 traitées directement par du monoxyde d'azote (gaz) ont permis de rendre aux cellules leur sensibilité à la doxorubicine.¹⁴³

Enfin, l'utilisation de nitrosocaptopril (donneur de NO[•]) permet d'améliorer la pénétration cellulaire du Taxol et donc ses effets cytotoxiques sur des lignées cellulaires de cancer de la prostate.¹⁴⁴

I. 8. 5- Conclusion

Dans cette partie, le rôle que joue NO[•] dans l'apoptose des cellules a été présenté. L'apport exogène de NO[•] constitue donc une stratégie intéressante pour la destruction des cellules cancéreuses. Le contrôle de la libération de NO[•] par l'irradiation (à un ou deux photons) est une piste encourageante vers laquelle de nombreux groupes de recherche se dirigent. Différentes lignées cellulaires correspondant à différents types de cancer ont ainsi pu être traitées *in vitro* et *in vivo*. Diverses méthodes d'encapsulation comme l'utilisation de liposomes permettent d'augmenter l'effet des donneurs de NO[•], notamment en facilitant le passage des membranes cellulaires. En plus de ses propriétés cytotoxiques, NO[•] peut être utilisé en traitement combiné avec d'autres molécules afin d'augmenter l'efficacité des chimiothérapies usuelles.

I. 9. Application en microbiologie pour la lutte contre la résistance antimicrobienne

I. 9. 1- La résistance antimicrobienne

La résistance antimicrobienne est un problème de santé publique prenant de plus en plus d'ampleur. Aujourd'hui, 700 000 personnes par an décèdent des suites de ce fléau. D'après le Centre Européen de contrôle des maladies (ECDC), le nombre de victimes de la résistance bactérienne en Europe est de 25 000 par an.¹⁴⁵

Dr Margaret Chan, directrice générale de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), a qualifié l'émergence de la résistance antimicrobienne de crise mondiale et de grande menace pour la santé publique : "The rise of antimicrobial resistance is a global crisis, recognized as one of the greatest threats to health today.". La lutte contre cette menace globale est devenue la première préoccupation de l'OMS.

Une étude menée par l'économiste Jim O'Neill prédit qu'en 2050, la résistance antimicrobienne sera la première cause de décès dans le monde avec plus de 10 millions de victimes par an, devant les cancers. Cette estimation est représentée sur la **Figure I-58**, issue

de la présentation “Tackling Drug-Resistant Infections Globally : Final Report And Recommendations” de Jim O’Neill de Mai 2016.¹⁴

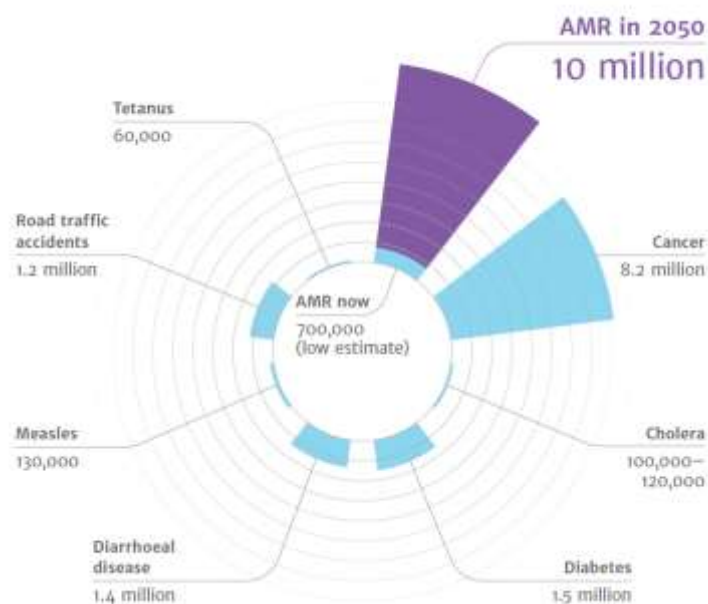


Figure I-58 : Répartition du nombre de décès par an (d’après “Tackling Drug-Resistant Infections Globally : Final Report And Recommendations” de Jim O’Neill de Mai 2016)

La résistance aux antimicrobiens (AMR) est un phénomène naturel. En effet, les bactéries possèdent les gènes impliqués dans le phénomène de résistance depuis des millions d’années, bien avant l’utilisation d’antibiotiques. Mais, la sur-consommation et la mauvaise utilisation de ces médicaments par la population ont forcé les micro-organismes à développer une résistance, grâce à des transferts de gènes horizontaux intra ou inter-espèces. De plus, l’agriculture et l’élevage sont des domaines qui utilisent de façon abusive les antibiotiques. Les bactéries développent des résistances chez les animaux ou les cultures et elles sont ensuite transférées au consommateur.¹⁴⁶

Les médicaments antimicrobiens regroupent différentes classes de médicaments, chacune prescrite pour traiter un type d’infection. Les antibiotiques luttent contre les infections par les bactéries, alors que les antiviraux s’attaquent aux virus. Les antifongiques sont utilisés contre les champignons et d’autres molécules sont actives sur les parasites.

Le nombre de décès est déjà important mais ne cessera d’augmenter puisque les antibiotiques usuels voient aujourd’hui leur efficacité diminuer. En plus des infections qui ne pourront plus être facilement traitées, des procédures aujourd’hui banalisées deviendront trop

dangereuses pour être réalisées. Ainsi, les chirurgies, les césariennes ou les traitements de cancers par chimiothérapie ne pourront plus être menés aussi fréquemment.

Afin de préserver l'efficacité des antibiotiques actuels, leur consommation doit être rationalisée. La prescription de ces médicaments doit être adaptée. Par exemple, des tests de dépistage rapides peuvent permettre de distinguer infections bactériennes et virales et donc éviter la dépense inutile d'antibiotiques. Ensuite, des diagnostics médicaux plus précis permettraient l'utilisation d'antibiotiques courants, à spectre plus étroit, plutôt que celle de nouvelles molécules à large spectre, comme les céphalosporines qui sont bien trop souvent prescrites. Enfin, le respect de la durée du traitement antibiotique est indispensable. Qu'il soit plus court ou plus long que nécessaire peut participer au développement de la résistance des bactéries à ce traitement.

La recherche et le développement de nouveaux antibiotiques sont évidemment de la plus haute importance afin de limiter les mécanismes de résistance et permettre à la population de continuer à se protéger contre différentes infections.

I. 9. 2- Généralités sur les bactéries et les antibiotiques

Les bactéries sont des micro-organismes procaryotes. Elles existent sous différentes formes dont les coques et les bacilles sont les plus connues. Les bactéries sont protégées par une paroi cellulaire qui renferme le cytosol dans lequel se trouve le matériel génétique de la bactérie. Ces organismes sont classés en deux groupes selon leur organisation structurale. Certaines présentent une unique membrane à l'intérieur de la paroi cellulaire et d'autres ont une paroi bimembranée. Ces bactéries sont nommées Gram + et Gram – respectivement, du nom du test de Gram qui permet de différencier la structure de la paroi.¹⁴⁷

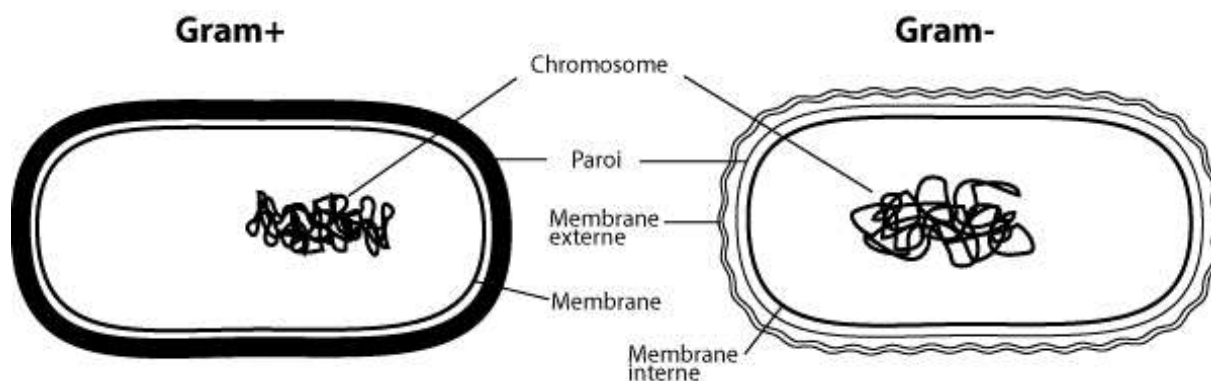


Figure I-59 : Schéma comparatif des organisations structurales des bactéries Gram + et Gram – (d'après <https://www.bioutils.ch/protocoles/5-la-coloration-de-gram>)

Afin d'éradiquer les bactéries responsables d'infections sans endommager les cellules eucaryotes de l'hôte, des médicaments antibactériens – antibiotiques - sont utilisés.

Il existe trois grandes classes d'antibiotiques avec des mécanismes d'action différents. La première classe d'antibiotiques agit en inhibant la biosynthèse de la paroi de peptidoglycane bactérienne, rendant ainsi la bactérie plus sensible à une lyse de la paroi. Elle regroupe les β -lactamines (pénicillines et les céphalosporines) et les dérivés de la vancomycine. La seconde classe d'antibiotiques rassemble les inhibiteurs de synthèse de protéines et d'ARN, comme les dérivés de l'érythromycine par exemple. Le dernier groupe d'antibiotiques, les quinolones, cible une enzyme impliquée dans la réplication de l'ADN bactérien (la DNA-gyrase).

En réponse à ces trois grandes classes de traitement, les bactéries ont développé trois grands mécanismes de résistance. Les bactéries sont capables de produire des protéines membranaires qui agissent en tant que pompes à efflux pour faire sortir l'antibiotique de l'intérieur de la bactérie. La concentration intracellulaire en antibiotique devient trop faible pour être efficace. La seconde stratégie est l'altération de l'antibiotique afin qu'il ne soit plus reconnu par les protéines de transport des bactéries. Par exemple, l'hydrolyse des cycles β -lactames empêche la reconnaissance des molécules par les PBPs (« penicillin binding proteins ») et donc leur internalisation. Les bactéries sont également capables de modifier la cible de l'antibiotique. Ainsi, la résistance aux pénicillines est aussi due à la mutation de PBP en de nouvelles protéines n'ayant que peu d'affinité avec l'antibiotique.¹⁴⁸

Les bactéries sont donc capables de développer des mécanismes de résistance pour se protéger des agents bactéricides de leur environnement. En outre, dans la nature, les bactéries vivent dans des communautés, souvent multi-espèces, appelées biofilms.

I. 9. 3- Les biofilms bactériens

I. 9. 3- a) Présentation des biofilms

Un biofilm est une communauté de micro-organismes adhérant entre eux et sur une surface, grâce à la sécrétion d'une matrice extracellulaire.¹⁴⁹ Cette matrice est composée de polysaccharides, de protéines, de lipides et d'ADN extracellulaire et constitue une barrière protectrice pour l'ensemble des bactéries qui y sont regroupées. Ce sont des systèmes organisés en plusieurs couches de bactéries, qui interagissent afin de coopérer pour permettre la prolifération du biofilm avec une division cellulaire rapide. L'organisation spatiale leur permet de communiquer à l'aide d'échanges de métabolites, de molécules de signalisation ou par des impulsions électriques. La proximité entre les bactéries favorise également le transfert de gènes entre souches et ainsi des plasmides portant des gènes codant pour la capacité à former des biofilms peuvent transférer de nouvelles bactéries. Ce comportement est appelé « quorum-sensing ».

Ce sont ces systèmes bactériens qui sont responsables des maladies telles que la mucoviscidose (fibrose kystique), les infections pulmonaires chroniques et la parodontite ou encore d'infections nosocomiales.

La formation d'un biofilm peut être divisée en quatre étapes¹⁵⁰, schématisées sur la **Figure I-60**. Tout d'abord, les bactéries planctoniques, qui sont isolées et en suspension dans le milieu, adhèrent à un support, de façon réversible en premier lieu, puis irréversible. Celles-ci se divisent et sécrètent des substances polymères extracellulaires (EPS) qui vont créer une matrice dans laquelle elles vont se loger. Ensuite, les bactéries dans le biofilm se multiplient et s'organisent dans une structure en trois dimensions, toujours au sein de la matrice extracellulaire. Celle-ci permet de protéger les bactéries des agressions extérieures (physiques ou chimiques) et permet également le développement d'interactions sociales au sein du biofilm (le quorum sensing). Le biofilm continue de se développer jusqu'à ce que des bactéries soient libérées et retrouvent leur état planctonique. Elles peuvent ensuite s'attacher à

nouveau à un support et permettre la colonisation de ce support par un autre biofilm. Le cycle se répète ensuite.

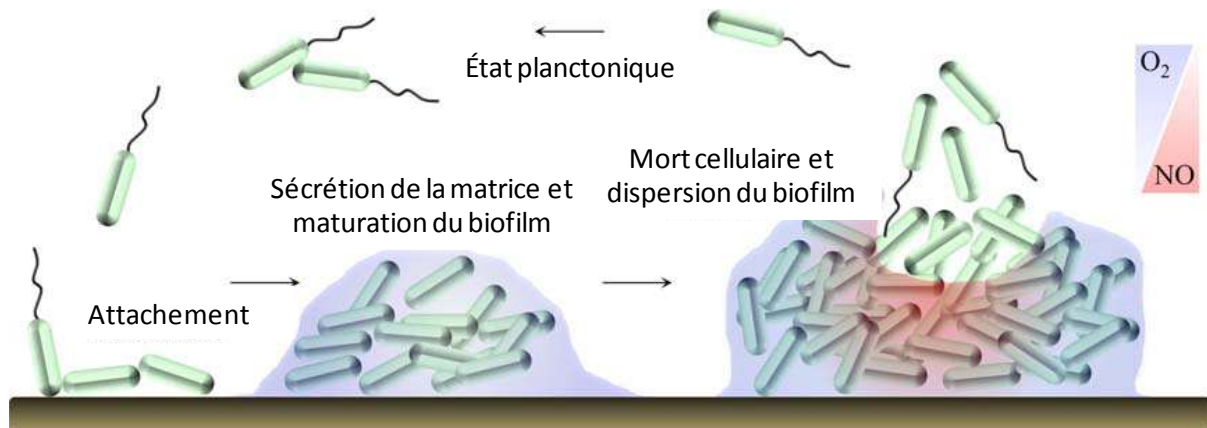


Figure I-60 : Cycle de vie d'un biofilm bactérien (d'après Barraud *et al.*, *Curr. Pharm. Des.*, 2015, 21, 31-42)

Les bactéries sont dispersées naturellement suite à la production endogène de monoxyde d'azote NO^{\bullet} dans le biofilm.¹⁵¹ Il régule le passage des bactéries de l'état planctonique à l'état de biofilm. En effet, une étude à l'aide de sondes fluorescentes a pu mettre en évidence sa production endogène à l'endroit même où les bactéries sont libérées. L'effet de NO^{\bullet} sur la dispersion des biofilms a été observé pour différentes espèces bactériennes comme *P. aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* et *Staphylococcus aureus*.¹⁵²

De faibles concentrations de NO^{\bullet} (de l'ordre du nanomolaire) entraînent l'activation de la phosphodiesterase (PDE) qui, elle-même, engendre une diminution de la concentration en c-di-GMP.¹⁵¹ Le c-di-GMP (di-guanosine monophosphate cyclique) est un messenger impliqué dans la régulation de nombreux processus comme la virulence, la formation ou la dispersion des biofilms. Une réduction de la concentration intracellulaire en c-di-GMP entraîne la dispersion du biofilm.

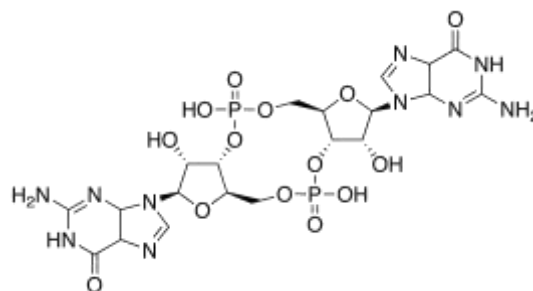


Figure I-61 : Structure du messenger c-di-GMP

Ainsi, les communautés de bactéries sont mieux protégées que les bactéries planctoniques vis-à-vis de l'environnement. Les biofilms sont non seulement résistants aux antibiotiques mais leur exposition à des concentrations sub-léthales peut également engendrer la prolifération de ces derniers. La récurrence des infections étudiées de nos jours est finalement moins due à la résistance acquise par transfert de gènes entre les bactéries qu'à la formation de biofilms.

I. 9. 3- b) Les infections par les biofilms

Les infections par les biofilms bactériens sont principalement dues à des bactéries commensales comme *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*.^{153,154} Ces bactéries, qui se trouvent habituellement dans les muqueuses ou sur la peau (pour *S. aureus* et *S. epidermidis* respectivement) sont des pathogènes opportunistes. Cela signifie qu'ils profitent d'un affaiblissement du système immunitaire pour proliférer et devenir pathogènes pour leur hôte. Ce sont donc majoritairement des patients immunodéprimés à la suite d'une greffe, atteints par le VIH, suivant un traitement de chimiothérapie ou encore des nouveau-nés prématurés qui souffrent de telles infections. La première souche bactérienne impliquée dans ces infections nosocomiales est le *S. aureus*, noté MRSA pour « methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ». Le MRSE, *Staphylococcus epidermidis* résistant à la méthicilline, est la première cause des infections par les corps étrangers sous-cutanés. Les souches de MRSE se répandent aisément sur des instruments ou dispositifs médicaux comme des prothèses orthopédiques, des cathéters veineux, des sondes ou encore des valves cardiaques. Comme leurs noms l'indiquent, ces staphylocoques sont résistants à la méthicilline, qui fut longtemps la thérapie recommandée pour ce type d'infection. Actuellement, entre 75 et 90 % des isolats de *Staphylococcus epidermidis* issus d'infections nosocomiales sont des souches résistantes à la méthicilline (dans la plupart des pays d'Amérique et d'Europe).

La méthicilline est un antibiotique β -lactame de la classe des pénicillines. Sa structure est représentée sur la **Figure I-62**.

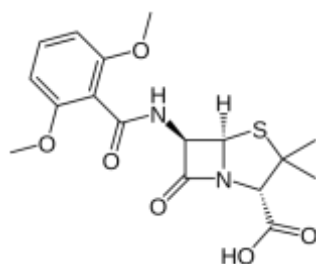


Figure I-62 : Structure de la méthicilline

Comme les autres antibiotiques de sa classe, la méthicilline agit en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne, en se liant aux PBP (penicillin-binding proteins) de la bactérie. Elle est résistante aux β -lactamases qui sont des enzymes bactériennes pouvant détruire les antibiotiques β -lactames tels que la benzylpénicilline (ou pénicilline G).

Cependant, des souches bactériennes ont tout de même développé une tolérance. La biosynthèse de nouvelles PBP, notamment PBP2a, n'ayant pas d'affinité avec les pénicillines est responsable de la résistance acquise par certaines souches, comme *Staphylococcus aureus*.

Staphylococcus epidermidis colonise les dispositifs médicaux à l'aide de la production de matrice extracellulaire hydrophobe. Cette matrice renferme de nombreux constituants tels que de l'ADN extracellulaire ou des adhésines permettant l'adhérence du biofilm à un support. Mais le constituant principal est le PIA, « Polysaccharide Intercellular Adhesin », dont la synthèse est codée par le gène *icaADBC*.¹⁵⁵ Il peut aussi être nommé PNAG pour poly-N-acétylglucosamine et sa structure est représentée sur la **Figure I-63**. Celle-ci a pu être déterminée sur une souche de *S. epidermidis*, mais un homologue existe sur d'autres souches de staphylocoques comme *S. aureus*. Le PIA est indispensable à la formation de biofilm puisque les souches ne possédant pas le gène *icaADBC* ne sont pas pathogènes.

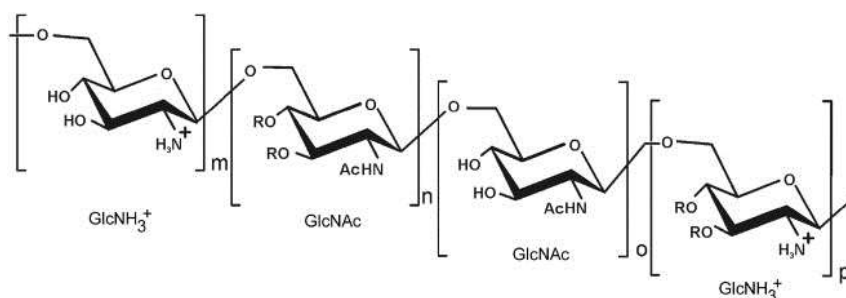


Figure I-63 : Structure du PIA

Le PIA est aussi impliqué dans le phénomène d'agrégation des bactéries en biofilm. En effet, la déacétylation de certaines unités confère une charge positive à l'ensemble du

polymère. Les parois des bactéries étant chargées négativement, le PIA lie les bactéries entre elles grâce à des interactions électrostatiques.¹⁵⁶

I. 9. 3- c) La résistance des biofilms aux antibiotiques

Les bactéries peuvent acquérir une résistance envers les antibiotiques. Mais ce ne sont pas ces mécanismes qui confèrent aux bactéries organisées en biofilms leur résistance.¹⁴⁸ En effet, une souche bactérienne telle que la *Klebsiella pneumoniae*, ne présentant pas de résistance à l'état planctonique, peut nécessiter une concentration d'antibiotique 2500 fois plus importante lorsqu'elle se développe en biofilm.¹⁵⁷

La protection qu'apporte la matrice extracellulaire aux bactéries du biofilm peut être l'une des raisons de la résistance de ces souches aux antibiotiques.^{158,159,160} En effet, la pénétration des agents antimicrobiens peut être freinée ou stoppée grâce à la matrice extracellulaire. Les antibiotiques peuvent s'adsorber à la matrice et leur pénétration à l'intérieur du biofilm est retardée. De plus, des réactions enzymatiques (avec des beta-lactamases par exemple) entraînant la désactivation des agents bactéricides peuvent avoir lieu et les rendre inactifs.

Ensuite, il existe des gradients de concentration de métabolites au sein du biofilm, entraînant la présence de niches privées d'oxygène ou de zones où le pH diffère. Ainsi, les bactéries ne sont pas toutes dans la même phase de croissance, certaines d'entre elles sont même en dormance, c'est-à-dire que leur cycle de division est stoppé. Celles dont la croissance est stoppée se positionnent de façon à protéger les autres puisque les antibiotiques tels que les pénicillines ne sont efficaces que sur les bactéries en croissance.

Certaines bactéries sont également capables de se différencier pour acquérir un phénotype différent qui leur permet de résister à des agents chimiques. Les bactéries en biofilms s'organisent afin de permettre à la souche de se développer au maximum.

Ces différents mécanismes de défense des bactéries en biofilm sont résumés sur la **Figure I-64**.

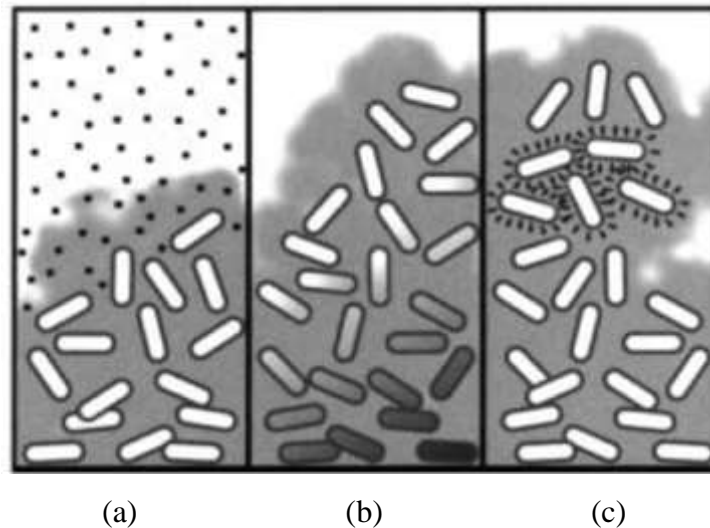


Figure I-64 : Schéma des mécanismes de résistance des biofilms : (a) l'antibiotique (points) ne pénètre pas dans la matrice, (b) les gradients de métabolites génèrent des zones de bactéries en dormance (en noir) et (c) certaines bactéries se différencient et expriment des phénotypes résistants (d'après Stewart, *Int. Med. Microbiol.*, **2002**, 292, 107-113)

La formation de biofilms est à présent devenue un facteur de virulence important et est responsable de nombreuses infections chroniques.

I. 9. 4- Les stratégies de lutte contre le développement des biofilms

I. 9. 4- a) Les différentes pistes pour l'éradication des biofilms

Aujourd'hui, les biofilms bactériens sont principalement traités par de fortes doses d'antibiotiques. Mais de nouvelles stratégies physiques et chimiques sont proposées.

Différentes approches physiques sont envisagées pour induire la destruction du biofilm. Des jets haute pression, des plasmas froids ou encore des champs électriques peuvent être utilisés pour détacher le biofilm. Le traitement des dispositifs médicaux internes par des antibiotiques peut également être envisagé afin de prévenir la formation de biofilms.

Une autre stratégie consiste à cibler la matrice extracellulaire, soit en inhibant sa synthèse en agissant sur les molécules messagères impliquées telles que les c-di-GMP et c-di-AMP, soit en agissant sur sa constitution chimique, notamment à l'aide d'enzymes. Des glycosides hydrolases ont d'ailleurs été utilisées chez la souris contre un biofilm de

Staphylococcus epidermidis et *Pseudomonas aeruginosa*. Enfin, l'utilisation d'anticorps spécifiques de composés de la matrice extracellulaire pourrait être envisagée.

La troisième stratégie est d'induire la dispersion du biofilm. En effet, les bactéries libérées du biofilm retrouvent leur état planctonique et leur susceptibilité aux antibiotiques.¹⁶¹ Les agents capables de disperser les biofilms pourraient être utilisés en combinaison avec des antibiotiques. Le messager c-di-GMP est impliqué de façon importante dans le cycle de vie des biofilms bactériens. Une forte concentration favorise la formation du biofilm alors que de plus faibles concentrations tendent à les disperser. Les concentrations de c-di-GMP sont régulées par le monoxyde d'azote NO[•].

I. 9. 4- b) Dispersion du biofilm par l'action de NO[•]

NO[•] intervient dans le mécanisme naturel de dispersion dans le cycle de vie du biofilm (cf **Figure I-60**). Dans l'environnement naturel, la concentration en NO[•] ne dépasse pas 100 pM (soit 3 pmol/mg) et cette concentration n'est pas toxique pour les bactéries.¹⁵⁰ Mais le monoxyde d'azote présente des propriétés bactéricides.¹⁶² C'est cette stratégie qui est suivie dans ces travaux de thèse.

A de plus fortes concentrations de l'ordre du micromolaire, NO[•] présente un effet bactéricide. Il peut en effet inhiber la réplication de l'ADN bactérien et la respiration bactérienne. Dans les conditions physiologiques, le radical peut se transformer en d'autres espèces réactives de l'azote (RNS) comme les péroxynitrites ONOO⁻, le trioxyde d'azote N₂O₃, le dioxyde d'azote NO₂[•] ou les S-nitrosothiols. Celles-ci sont capables d'induire des dommages à l'ADN (la déamination et l'oxydation qui font apparaître des sites abasiques ou des cassures) et aux protéines (oxydation) bactériens mais aussi aux cellules hôtes. Ces espèces peuvent greffer des groupements nitro NO₂ ou nitrosyle NO sur des molécules à fonctions amine, thiol ou à fragment tyrosine.^{163,164} D'ailleurs, une étude a montré que l'exposition à 200 ppm de NO gaz pendant 5 heures permettait l'éradication totale de cultures *in vitro* de *S. aureus* résistant à la méthicilline, *E. coli* ou *P. aeruginosa*.¹⁶⁵

Différentes stratégies sont envisageables pour délivrer le monoxyde d'azote sur les bactéries à éradiquer.

Premièrement, plusieurs expérimentations ont été menées en appliquant directement du NO• sous forme de gaz. Des souches de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* ont été traitées par une exposition continue de 160 ppm de NO• gazeux pendant 24 heures. La croissance bactérienne a pu être réduite de 90 %.^{166,162}

Deuxièmement, la stimulation de la production endogène de NO• constitue une autre stratégie. Cette concentration supérieure de NO• peut provenir du biofilm lui-même ou des tissus hôtes environnants, par des enzymes comme les NOS (NO synthases) à partir de L-arginine.¹⁵⁰

La troisième stratégie est l'utilisation de donneurs de NO•. NO• peut être libéré spontanément ou par activation du donneur par des conditions de pH spécifiques ou par irradiation par exemple.

Le groupe de recherche de Schoenfisch utilise des nanoparticules de silice sur lesquelles sont greffés des donneurs de NO• de type diazeniumdiolate. Ces systèmes sont capables de libérer de façon spontanée 3,8 $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de NO• en solution aqueuse. Le pré-traitement de surfaces à risques par des composés sol-gel contenant des donneurs de NO• est également expérimenté. Entre autres, des observations par microscopie de fluorescence ont montré l'efficacité de ce traitement sur de l'acier inoxydable sur lesquels *S. epidermidis* est désormais incapable de proliférer.¹⁶⁷

Halpenny *et al.* ont synthétisé un complexe de manganèse $[\text{Mn}(\text{PaPy}_3)\text{NO}]\text{ClO}_4$ capable de libérer NO• sous irradiation.⁹⁵ Il s'agit donc d'un exemple de chimiothérapie photoactivée (PACT). Une irradiation de 5 minutes permet la libération d'environ 4,5 μM de NO•. Les conséquences sur les colonies de *P. aeruginosa* ou *S. aureus* sont sans appel : les bactéries traitées ne peuvent plus se multiplier. La **Figure I-65** montre la différence de croissance entre des bactéries non traitées (partie gauche des boîtes de Pétri) et celle qui ont été incubées avec le complexe et irradiées (partie droite des boîtes de Pétri).

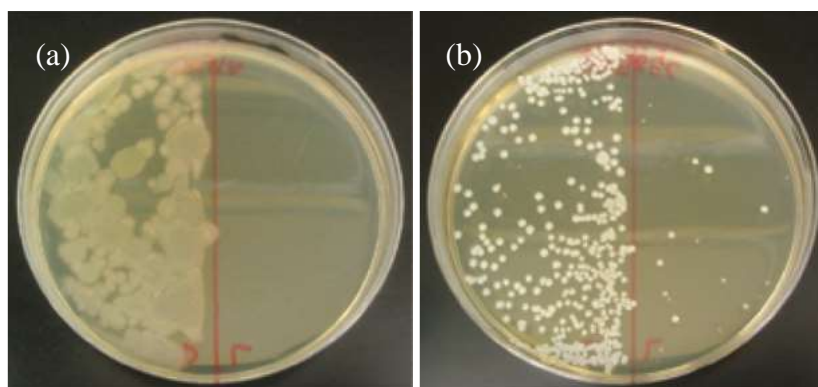


Figure I-65 : Colonies formées par (a) *P. aeruginosa* et (b) *S. aureus*, sans traitement (moitiés gauches) et après traitement par le complexe et irradiation (parties droites) (d'après Halpenny *et al.*, *ACS Med. Chem. Lett.*, **2010**, 1, 180-183)

Des complexes similaires à base de ruthénium ont été synthétisés dans le groupe de recherche de Mascharak pour être encapsulés dans des matrices silicates biocompatibles afin de former des composés sol-gel photoréactifs. Des hydrogels à base de pHEMA (poly(2-hydroxyéthylméthacrylate) permettent d'envisager la conception de bandages actifs sur la blessure ou l'infection.^{168,169}

Récemment, une étude a été publiée sur l'effet bactéricide de nanoparticules de polystyrène greffées avec un donneur de NO[•] et un photosensibilisateur sur *E. coli*.¹⁷⁰ Ces nanoparticules sont donc capables de libérer NO[•] et de former de l'oxygène singulet et des ROS, tous impliqués dans l'éradication des bactéries. Bien que les résultats montrent que l'utilisation de nanoparticules chargées uniquement du donneur de NO[•] est plus efficace, entraînant une inactivation presque totale des bactéries (en mélange 1/1 nanoparticules/bactéries), l'idée d'utiliser la combinaison d'un photosensibilisateur et de NO[•] est prometteuse.

Cependant, il est important de contrôler la dose de NO[•] libérée car les plus fortes concentrations de NO[•] peuvent cependant avoir des effets négatifs. Par exemple, il peut être toxique pour les macrophages impliqués dans le mécanisme de lutte contre une infection ou encore inhiber l'angiogénèse et ralentir la cicatrisation d'une plaie.¹⁷¹

I. 9. 4- c) Utilisation de faibles concentrations de NO*

De plus faibles concentrations de l'ordre du picomolaire ou du nanomolaire ne semblent pas avoir d'impact sur la viabilité des bactéries. Le biofilm est dispersé naturellement sous l'action de NO*, ce qui permet aux bactéries planctoniques de coloniser plus d'espace et ce, pour différentes espèces Gram + et Gram -. Une autre approche de lutte est donc d'induire la dispersion du biofilm par l'utilisation de NO*. Les bactéries libérées du biofilm retrouvent leur susceptibilité aux antibiotiques.^{162,151,172}

Par exemple, la **Figure I-66** montre que le traitement par 100 μM de tobramycine seule n'a aucun effet toxique sur le biofilm. L'influence de 500 nM de SNP est déjà assez importante sur la viabilité du biofilm. Mais, l'utilisation combinée de SNP (nitroprussiate de sodium) et de la tobramycine (antibiotique) permet l'éradication totale du biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*. La figure présente également l'effet de l'eau oxygénée (à une concentration de 10 mM) pour comparaison.

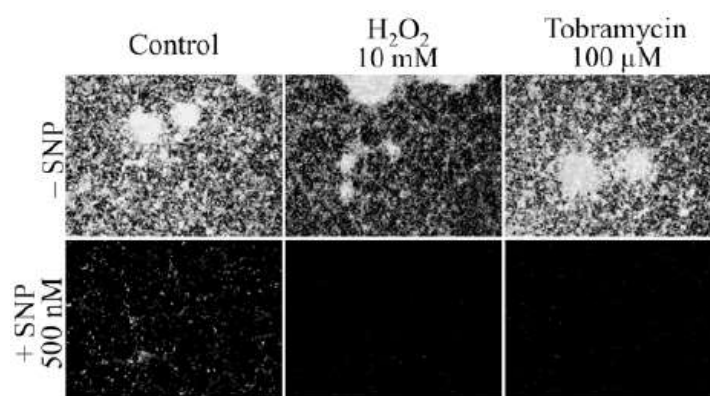


Figure I-66 : Observation de biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* traités par différentes techniques par microscopie de fluorescence (d'après Barraud *et al.*, *J. Bacteriol.*, 2006, 188, 7344-7353)

Ces études montrent l'intérêt du traitement combiné d'un antibiotique avec un donneur de NO*.

Des dérivés d'antibiotiques sont également synthétisés dans le but de libérer des concentrations de NO* induisant la dispersion de biofilm. Par exemple, les céphalosporines sont dérivatisées pour donner des céphalosporine-3'-diazoniumdiolate. Ce sont des pro-drogues qui, dans les conditions physiologiques en présence de β -lactamases des biofilms, libèrent un donneur de NO* instable, comme le montre la **Figure I-67**.¹⁷²

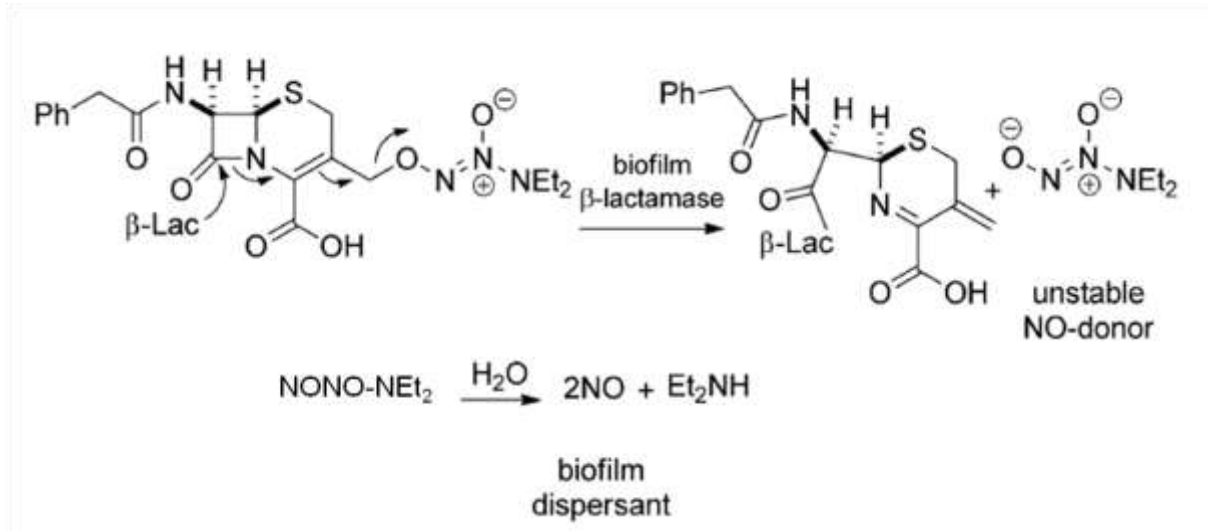


Figure I-67 : Libération de NO[•] par un dérivé de la céphalosporine

Ces systèmes ont montré une capacité à réduire la biomasse d'un biofilm de *P. aeruginosa* grâce à une mesure en flux continu. Cela prouve leur efficacité dans la dispersion de ces biofilms bactériens.

De plus, une faible concentration en NO[•] a permis de réduire la taille d'un biofilm de *P. aeruginosa*, et sa combinaison avec l'azithromycine a permis de réduire la viabilité des bactéries *Haemophilus influenzae* de 2 log par rapport au traitement antibiotique seul.¹⁶⁵

I. 9. 5- Conclusion

Dans cette partie de l'état de l'art, le problème majeur de la résistance aux antimicrobiens et plus particulièrement aux antibiotiques a été présenté. Les bactéries sont capables de développer des mécanismes de résistance aux antibiotiques usuels, mais la cause la plus importante des infections et des maladies nosocomiales difficiles à soigner sont les biofilms bactériens. Ce sont des systèmes complexes qui, entre autres, permettent la protection des bactéries. En étudiant leur cycle de vie, les chercheurs ont compris que le monoxyde d'azote endogène induisait la dispersion des biofilms. Dans les différentes stratégies existant pour lutter contre ces biofilms, l'une des plus prometteuses est le traitement par du monoxyde d'azote exogène. Différentes applications ont été décrites et permettent d'éradiquer, ou bien de disperser les biofilms bactériens. Afin de contrôler la dose, la photochimiothérapie photoactivée (PACT) est une stratégie intéressante : il s'agit de contrôler la libération de NO[•] par la lumière. Cette application porte également le nom de PDI (« Photo-

Activated Inactivation »). Selon la concentration en NO[•] libérée dans le milieu, les donneurs de NO[•] peuvent être utilisés seuls ou en combinaison avec une antibiothérapie.

I. 10. Conclusion

Les complexes à base de métaux de transition et à ligand nitrosyle ont largement été décrits dans la littérature pour leurs propriétés photophysiques et leurs applications biomédicales. Les complexes de ruthénium sont particulièrement intéressants pour leur stabilité en milieu physiologique. De nombreux ligands peuvent être coordonnés sur ce métal, en suivant différentes voies de synthèse, pour améliorer leur capacité de photolibération de NO[•] et donc augmenter les rendements quantiques. Ces systèmes permettent un contrôle de la libération du monoxyde d'azote, du point de vue de la concentration et du ciblage de la zone à traiter, afin d'éviter les effets délétères qu'il peut engendrer. De plus, une irradiation dans la fenêtre thérapeutique peut être envisagée grâce à la synthèse de complexes photoactifs dans le visible ou grâce au phénomène physique d'absorption à deux photons.

Enfin, de nombreuses applications des complexes de ruthénium à ligand nitrosyle ont été étudiées dans la littérature. Ainsi, seul ou combiné avec des traitements usuels, le monoxyde d'azote peut être libéré de façon ciblée sur une tumeur ou une plaie infectée et ainsi induire l'apoptose des cellules cancéreuses et éradiquer des bactéries pathogènes.

Les différents objectifs de ces travaux de thèse sont donc la synthèse de complexes de ruthénium à ligand nitrosyle capables de libérer NO[•] sous irradiation à un et deux photons et l'étude de leurs propriétés biologiques pour des applications en thérapies anticancéreuse et antimicrobienne.

CHAPITRE II

Photolibération de NO[•] par les complexes

cis (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-

[RuFTCl₂NO]PF₆

et [RuFT(bpy)NO](PF₆)₃ dans l'acétonitrile

Chapitre II :

Photolibération de NO[•] par les complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ et [RuFT(bpy)NO](PF₆)₃ dans l'acétonitrile

II. 1. Introduction

Des études sur les complexes [Ru(tpy)Cl₂NO]PF₆, avec tpy représentant le ligand 2,2':6',2''-terpyridine, ont été menées précédemment pour ses propriétés photochromes⁸⁷ et ses applications en optique non linéaire.¹⁷³ En effet, l'équipe s'est intéressée au phénomène de commutation moléculaire dans ces systèmes. Sous irradiation à l'état solide, le ligand nitrosyle du complexe de ruthénium Ru-N-O dans son état fondamental (GS) peut s'isomériser en deux états métastables MS1 et MS2. Dans l'état MS1, le complexe est de la forme Ru-O-N, le ligand NO étant lié au ruthénium par l'atome d'oxygène (ligand isonitrosyle). L'état MS2 caractérise une conformation coudée du ligand nitrosyle, ou appelée «sideways-bound isomer». Les différentes conformations GS, MS1 et MS2 sont représentées sur la **Figure II-1**.¹⁵

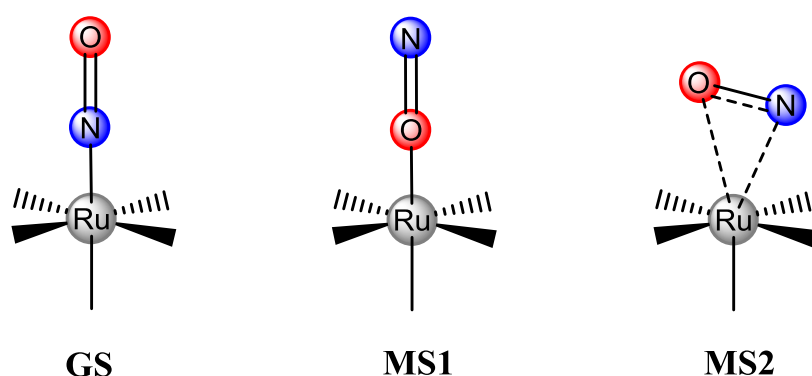


Figure II-1 : Les configurations des différents états GS, MS1 et MS2 (d'après Rose *et al.*, *Coord. Chem. Rev.*, 2008)

L'objectif des travaux de cette thèse est d'induire la libération de NO[•] par une excitation biphotonique pour une application en PACT (Photo-Activated Chemo-Therapy) sur des complexes de ruthénium à ligand nitrosyle. Pour cela, des systèmes tels que [RuFTCl₂NO]PF₆ ont été synthétisés. Le ligand terpyridine a été substitué par un groupement

fluorène en position 4' dans le but d'apporter un effet donneur à ce ligand. Celui-ci favorise le transfert de charge impliqué dans le départ de NO[•]. De plus, le fluorène possède des propriétés d'absorption à deux photons intéressantes. En effet, ce fragment, souvent utilisé dans la littérature, présente une conjugaison des électrons π importante et cette propriété est indispensable pour atteindre de bonnes propriétés d'optique non linéaire. Le fluorène a été utilisé comme fragment central dans la synthèse de plusieurs chromophores et la mesure de leurs propriétés d'absorption à deux photons a montré une section efficace bien plus élevée que pour des homologues à cœur biphényle.^{15,107,174,175}

L'objectif de ce chapitre est de comparer la photolibération de NO[•] pour deux types de complexes de ruthénium à ligand nitrosyle.

Le premier est le [RuFTCl₂NO]PF₆, constitué du ligand 4'-(2-fluorényl)-2,2':6',2''-terpyridine (noté FT) et de deux ligands chloro. Ce complexe est obtenu sous forme de deux isomères, nommés *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)- selon la position relative des ligands chloro. Ces isomères sont séparés par chromatographie. Ils sont représentés sur la **Figure II-2**.

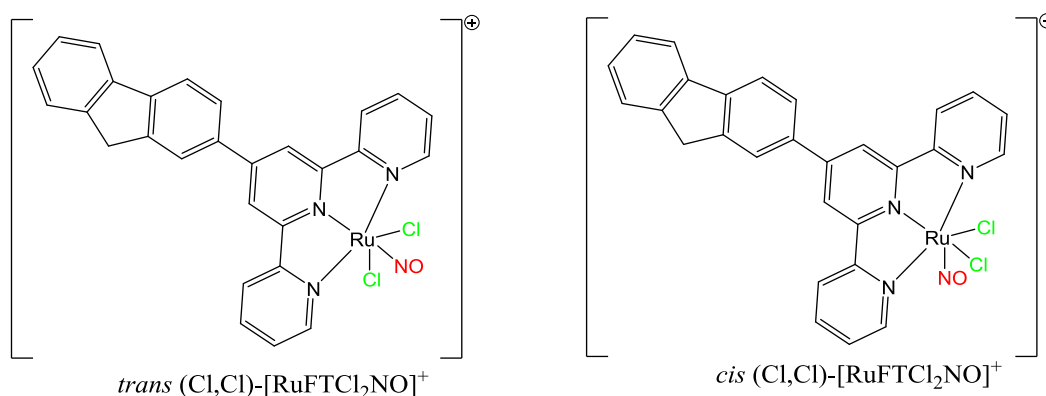


Figure II-2 : Structures des complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆

Le second complexe d'intérêt est le [RuFT(bpy)NO](PF₆)₃, qui est constitué du ligand tridentate FT et du ligand 2,2'-bipyridine (noté bpy). Grâce à ce ligand bidentate, ce complexe ne présente pas de formes isomères, nécessitant une séparation chromatographique. De plus, le ligand bipyridine étant moins labile que les ligands chloro, ce complexe est conçu pour être plus stable dans les milieux aqueux et biologiques. Sa structure est représentée sur la **Figure II-3**.

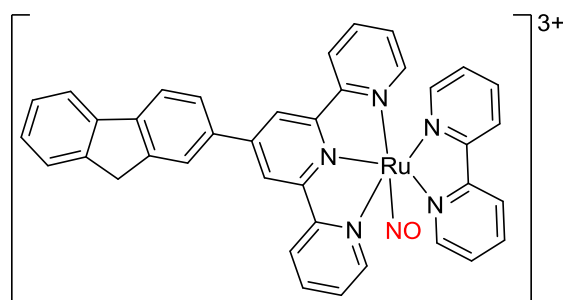


Figure II-3 : Structure du complexe $[\text{RuFT}(\text{bpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$

II. 2. Synthèses des complexes $[\text{RuFTCl}_2\text{NO}]\text{PF}_6$ et $[\text{RuFT}(\text{bpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$

Le ligand FT (4'-(2-fluorényl)-2,2':6',2''-terpyridine) est obtenu en deux étapes synthétiques à partir du fluorène-2-carboxaldéhyde : par condensation de l'acétylpyridine, suivie d'une réaction de Kröhnke sur l'iodure de 1-(2-pyridinylcarbonyl)pyridinium en présence d'acétate d'ammonium. Cette synthèse, décrite par Akl *et al.* en 2014¹⁰⁷ et a été adaptée de la synthèse du 9,9-bis-diéthylfluorène-4'-terpyridine décrite par Thomas *et al.* en 2002.^{176,177} Le schéma de cette synthèse est représenté sur la **Figure II-4**.

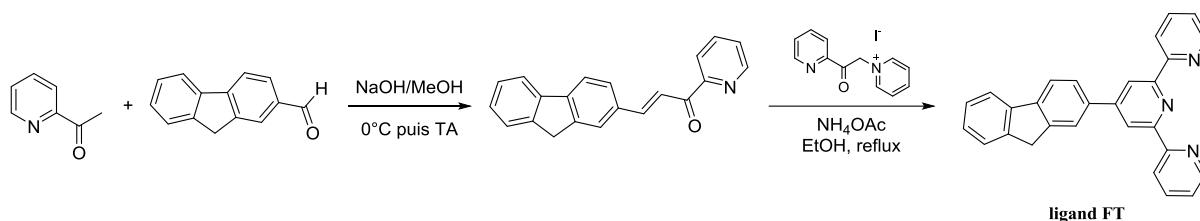


Figure II-4 : Schéma de synthèse du ligand FT

II. 2. 1- Synthèse des complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)- $[\text{RuFTCl}_2\text{NO}]\text{PF}_6$

Après la synthèse du ligand FT, le complexe peut être obtenu par deux méthodes, qui sont rappelées dans le Chapitre I. Soit il est obtenu après complexation de FT sur le $\text{K}_2[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cl}_5\text{NO}]$, soit par bullage de NO^* sur une solution concentrée de $[\text{Ru}^{\text{III}}\text{FTCl}_3]$, respectivement nommées **Voie B** et **Voie C**.

Cette seconde méthode permet l'obtention d'un mélange de deux isomères *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)- $[\text{RuFTCl}_2\text{NO}]\text{PF}_6$, en évitant la formation du complexe homoleptique

$[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{FT})_2]^{2+}$. C'est cette voie, résumée sur la **Figure II-5** qui sera utilisée dans ces travaux de thèse.¹²¹

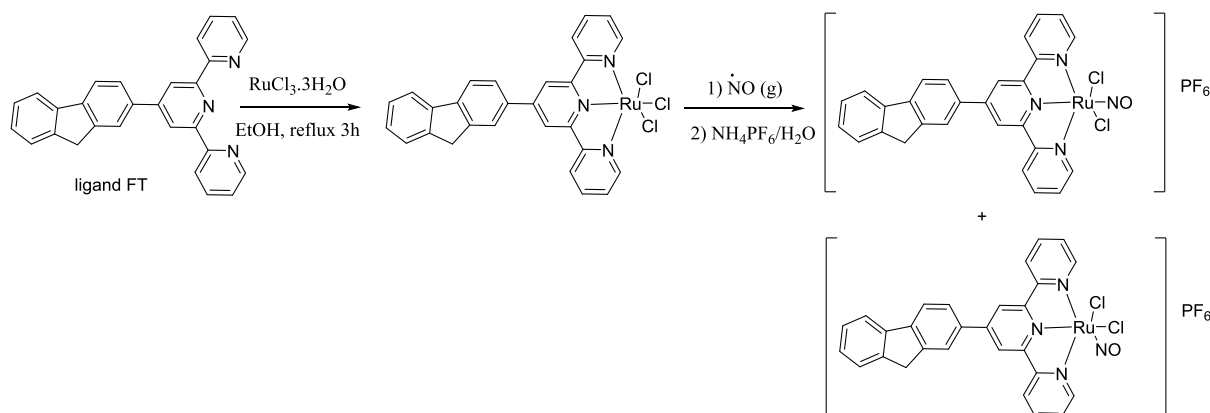


Figure II-5 : Schéma de la synthèse de *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)- $[\text{RuFTCl}_2\text{NO}]\text{PF}_6$

Après bullage de NO^\bullet sur le $[\text{Ru}^{\text{III}}\text{FTCl}_3]$, un mélange de complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)- $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{FTCl}_2\text{NO}]\text{Cl}$ est obtenu. Les isomères sont séparés par HPLC préparative par le service HPLC de l'Institut de Chimie de Toulouse (ICT). Après séparation, les contre-ions sont changés en PF_6^- .

Les complexes obtenus ont été caractérisés par RMN, IR et spectrométrie de masse. Ces informations sont regroupées dans l'**Annexe 2** p.295.

II. 2. 2- Synthèse du complexe $[\text{RuFT}(\text{bpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$

Ce complexe est obtenu par la **Voie de synthèse A**. Le ligand FT est complexé au ruthénium pour former $[\text{Ru}^{\text{III}}\text{FTCl}_3]$ puis, en milieu réducteur, ce complexe réagit sur la 2,2'-bipyridine. Cette étape est réalisée en présence de LiCl afin d'éviter la formation du complexe homoleptique $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{FT})_2]^{2+}$. Le complexe $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{FT}(\text{bpy})\text{Cl}]\text{Cl}$ ainsi obtenu réagit avec NaNO_2 pour substituer un ligand chloro par un ligand nitro, et le contre-ion est changé en PF_6^- . Ce dernier complexe est ensuite mis en présence d'un large excès d'acide chlorhydrique pour donner le complexe final $[\text{RuFT}(\text{bpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$ après ajout d'un excès de NH_4PF_6 . Le schéma synthétique est représenté sur la **Figure II-6**.¹⁷⁸

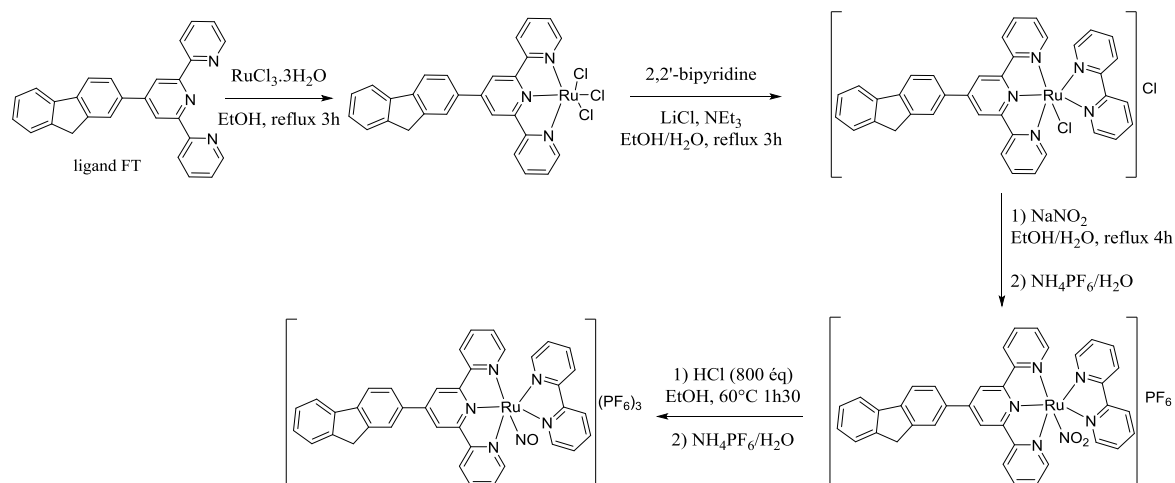


Figure II-6 : Schéma réactionnel de la synthèse de $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{FT}(\text{bpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$

Le respect de la température du mélange réactionnel lors de la dernière étape est crucial. En effet, en présence d'un excès d'acide chlorhydrique concentré (12 M, 800 équivalents), le chauffage à reflux entraîne le remplacement d'un ligand nitro par un chloro et le complexe obtenu est le $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{FT}(\text{bpy})\text{Cl}]^+$. En pratique, l'acide est d'abord dilué dans l'éthanol et cette solution est ensuite utilisée pour dissoudre le complexe. Le mélange est ensuite chauffé à 60°C.

De plus, le complexe $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{FT}(\text{bpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$ est très sensible à l'eau. En effet, une analyse en RMN ^1H a permis de conclure sur la rapide transformation du ligand nitrosyle en nitro selon l'équilibre acido-basique $\text{NO}^+ \leftrightarrow \text{NO}_2^-$. En effet, le spectre RMN obtenu en présence de traces d'eau est superposable à celui du complexe $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{FT}(\text{bpy})\text{NO}_2]\text{PF}_6$. Or, l'objectif ici est de libérer NO^\bullet sous irradiation d'un complexe de ruthénium à ligand nitrosyle.

Les complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)- $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{FTCl}_2\text{NO}]\text{PF}_6$ ne subissent pas cette transformation.

Le complexe a été analysé par RMN ^1H , spectroscopie infrarouge et par microanalyse élémentaire. Ces données sont disponibles en **Annexe 2** p.295.

II. 3. Etude des propriétés des complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ et [RuFT(bpy)NO](PF₆)₃ sous irradiation monophotonique dans l'acétonitrile

II. 3. 1- Mise en évidence de la libération de NO[•] sous irradiation

Précédemment, la libération de NO[•] avait été prouvée grâce à l'utilisation du réactif de Griess.¹⁰⁷ Les complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ ont été irradiés à 405 nm en présence de réactif de Griess. En spectroscopie d'absorption en UV-Vis, une large bande vers 500-550 nm apparaît au cours de l'irradiation, caractéristique du composé formé par transformation du réactif de Griess en présence de nitrites. Cette méthode apporte une preuve indirecte de la libération de NO[•]. Une expérimentation en électrochimie a également permis d'observer la disparition des bandes attribuées à la réduction NO⁺/NO[•] et NO[•]/NO⁻ (cf Chapitre I)

Dans cette partie, l'objectif est d'apporter une preuve directe de la libération de NO[•] au cours de l'irradiation. L'utilisation de la Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) et d'une électrode spécifique de NO[•] peuvent apporter cette preuve. La manipulation de ce type d'électrode requérant une solution aqueuse, le RPE est choisie pour mettre en évidence la libération du radical dans l'acétonitrile.

II. 3. 1- a) Principe de la RPE

La Résonance Paramagnétique Electronique est une technique permettant l'identification d'espèces possédant un ou plusieurs électrons non appariés. Ces espèces paramagnétiques peuvent être des radicaux (libres, anions, cations), des espèces excitées dont un électron a changé d'état de spin, ou des complexes de métaux de transition possédant un électron célibataire sur la couche d.

L'électron possède un moment cinétique de spin **S** et un moment magnétique de spin μ_s lui est associé. En l'absence de champ magnétique, les niveaux d'énergie Zeeman sont dégénérés mais cette dégénérescence est levée en présence d'un champ magnétique d'intensité B. Les deux niveaux d'énergie sont distants de : $\Delta E = E_{+1/2} - E_{-1/2} = g \cdot \beta_e \cdot B$

(où g est le facteur de Landé de l'électron dans son environnement chimique, spécifique de l'espèce analysée ; $\beta_e = 9,274 \cdot 10^{-27} \text{ J.T}^{-1}$ le magnéton de Bohr).

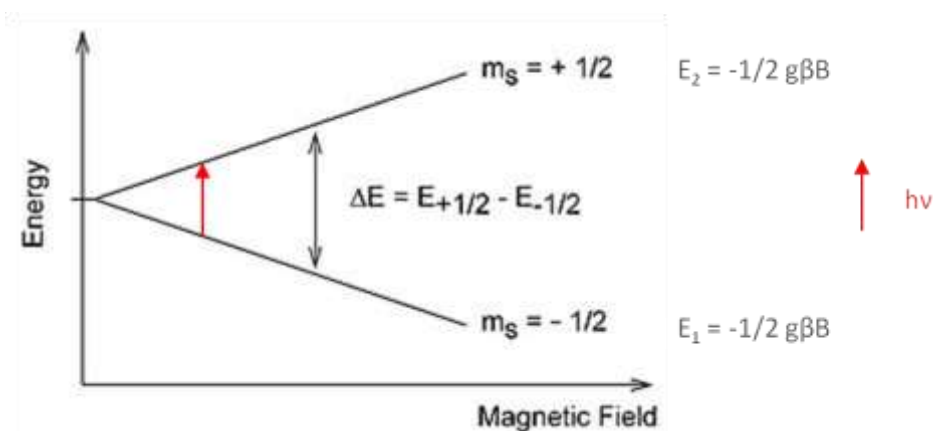


Figure II-7 : Schéma de la levée de dégénérescence des états de spin en présence d'un champ magnétique

En RPE, l'énergie $h\nu$ apportée à l'échantillon est constante et le champ magnétique varie pour trouver les conditions de résonance. S'il y a résonance, c'est-à-dire si $\Delta E = h\nu = g \cdot \beta_e \cdot B_{\text{res}}$, le champ magnétique induit des transitions entre ces deux niveaux. La première règle de sélection est donc $\Delta m_s = \pm 1$. Le spectre RPE montre la dérivée de l'absorption en fonction du champ magnétique.

De plus, si le noyau qui porte le spin électronique possède un spin nucléaire I , les deux spins S et I peuvent interagir : c'est le couplage hyperfin, caractérisé par la constante a (exprimée en cm^{-1}). La seconde règle de sélection est la conservation du spin nucléaire, soit $\Delta m_I = 0$. Dans le cas de ce couplage, le nombre de raies observées sur le signal RPE est $2I+1$.

II. 3. 1- b) Application à la détection de NO*

Dans le cas du radical NO*, l'électron célibataire est porté par l'atome d'azote, qui a un spin nucléaire I de 1. Le spectre RPE comporte donc 3 raies de même intensité.

En l'absence d'irradiation, les complexes $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{-NO}^+]$ ne sont pas visibles car les espèces Ru^{II} et NO^+ sont silencieuses en RPE. Il est donc possible de suivre la libération de NO* par cette méthode.

En revanche, la durée de vie du radical NO^\bullet étant trop courte pour son observation, l'utilisation d'un piègeur de spin (ou spin-trap) stable est nécessaire. Dans ce cas, il s'agit d'un complexe de fer (II) permettant l'observation du radical NO^\bullet , puisque le Fe^{II} est bas spin et donc silencieux en RPE. Ce piègeur est capable de complexer NO sous la forme NO^\bullet pour donner $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{MGD})_2\text{-NO}^\bullet]$, avec le ligand MGD, soit N-méthyl-D-glucamine dithiocarbamate, comme le montre la **Figure II-8**. C'est donc le signal de cet adduit qui est observé en RPE.

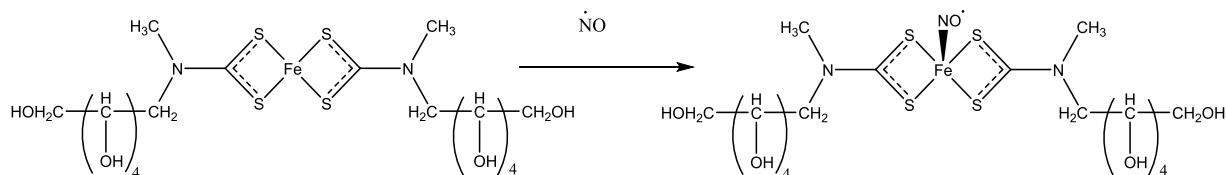


Figure II-8 : Structures du « spin trap » $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{MGD})_2]$ et du complexe formé avec NO^\bullet

L'utilisation d'un piègeur de spin en RPE est la méthode de choix pour la détection directe du NO^\bullet .¹⁷⁹

II. 3. 1- c) Détection de la libération de NO^\bullet sous irradiation

Les complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)- $[\text{RuFTCl}_2\text{NO}]\text{PF}_6$ sont dissous dans l'acétonitrile à une concentration de 1 mmol/L. Une solution aqueuse de piègeur $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{MGD})_2]$ fraîchement préparée est mélangée aux solutions de complexes (10 % en volume au final). Les solutions finales sont placées dans un capillaire en quartz dans la cavité RPE. La **Figure II-9** montre les signaux obtenus pour les deux isomères dans l'obscurité en gris. Aucun signal n'est détecté dans ce cas, ce qui prouve qu'il n'y a pas de photolibération spontanée.

Ensuite, les capillaires contenant les solutions de complexe sont irradiés grâce à une lampe à vapeur de mercure munie d'un filtre coupant les ultraviolets ($\lambda > 400$ nm). Les signaux obtenus après 12 minutes d'irradiation sont tracés en bleu sur la **Figure II-9**.

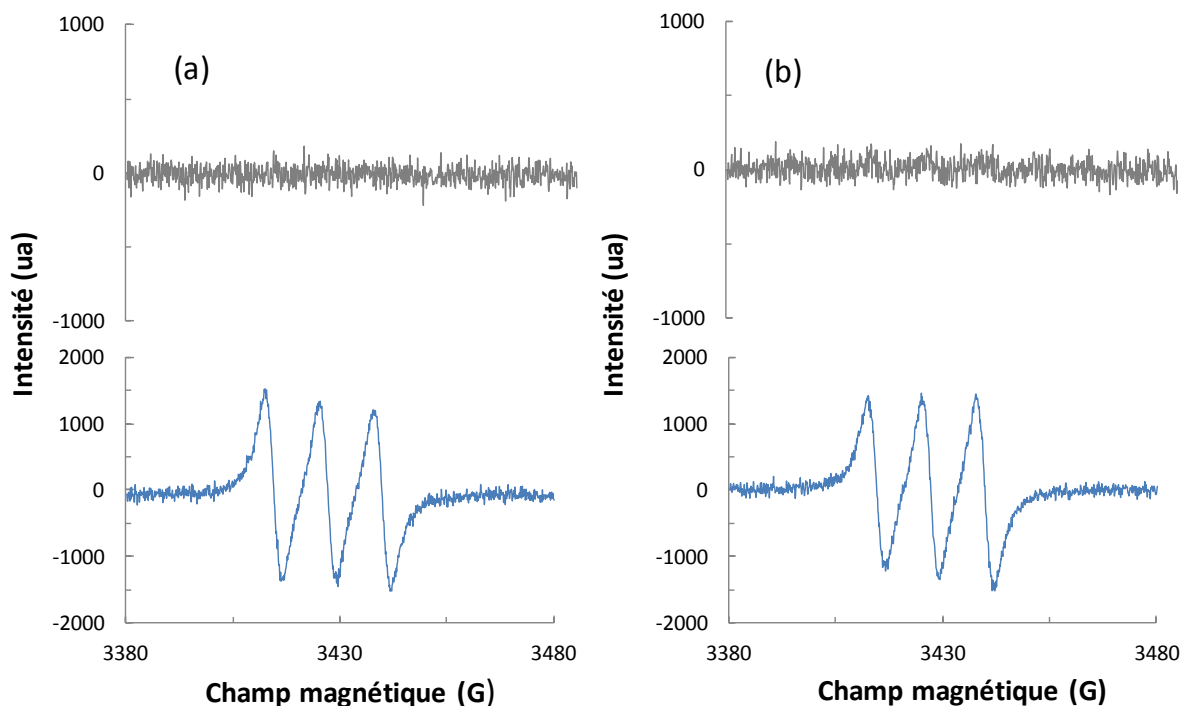


Figure II-9 : Spectres RPE obtenus pour les complexes (a) *trans* (Cl,Cl)- et (b) *cis* (Cl,Cl)- [RuFTCl₂NO]PF₆, dans l'obscurité (courbes grises) et sous irradiation (courbes bleues), en présence de piègeur de spin

La même expérimentation est menée sur le [RuFT(bpy)NO](PF₆)₃. Le signal obtenu dans l'obscurité est tracé en gris sur la **Figure II-10**.

L'irradiation de cette solution contenant 10% d'eau n'a pas permis d'observer un signal en RPE. Ceci est dû à la transformation du ligand nitrosyle en nitro. L'expérimentation est ensuite menée sur cette solution en présence d'acide chlorhydrique (environ 8 mmol/L au final dans le mélange) pour stabiliser le ligand nitrosyle. Le signal obtenu après 14 minutes d'irradiation ($\lambda > 400$ nm) est tracé en vert sur la **Figure II-10**.

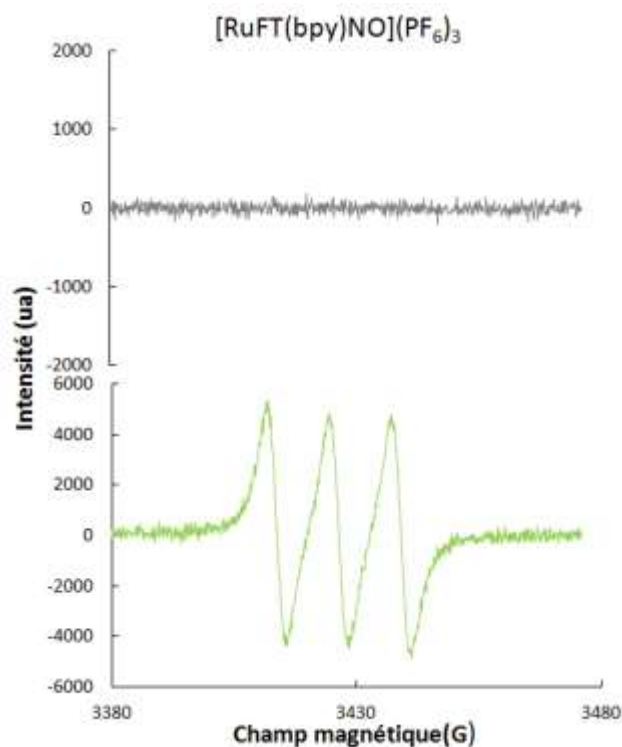


Figure II-10 : Spectre RPE obtenu pour le complexe $[\text{RuFT}(\text{bpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$, dans l'obscurité (courbe grise) et sous irradiation (courbe verte), en présence de piègeur de spin et en milieu acide

Pour les trois complexes, des signaux semblables sont obtenus sous irradiation. Ce sont des triplets, avec une constante de couplage hyperfin $a = 1,2 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$ et un facteur de Landé $g = 2,040$. D'après Liu *et al.*, ces données correspondent à la formation de l'adduit $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{MGD})_2\text{-NO}^\bullet]$.¹⁸⁰

Ces analyses prouvent donc de façon directe que les deux isomères *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)- $[\text{RuFTCl}_2\text{NO}]\text{PF}_6$ ainsi que le complexe $[\text{RuFT}(\text{bpy})\text{NO}](\text{PF}_6)_3$ en condition acide libèrent le radical NO^\bullet sous irradiation à un photon ($\lambda > 400 \text{ nm}$).¹²¹

II. 3. 2- Caractérisation des photoproduits de *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆

II. 3. 2- a) Analyses des photoproduits des isomères de [RuFTCl₂NO]PF₆ en spectrométrie de masse

L'analyse par spectrométrie de masse en ESI-positive des composés de départ *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ dans l'acétonitrile donne la masse du cation de formule brute C₂₈H₁₉Cl₂N₄ORu, qui est de 599 g/mol.

Après irradiation des solutions des isomères dans l'acétonitrile (échantillons de concentrations différentes), une autre analyse de masse est réalisée. Les spectres de masse obtenus avant et après irradiation dans l'acétonitrile sont présentés sur la **Figure II-11**.

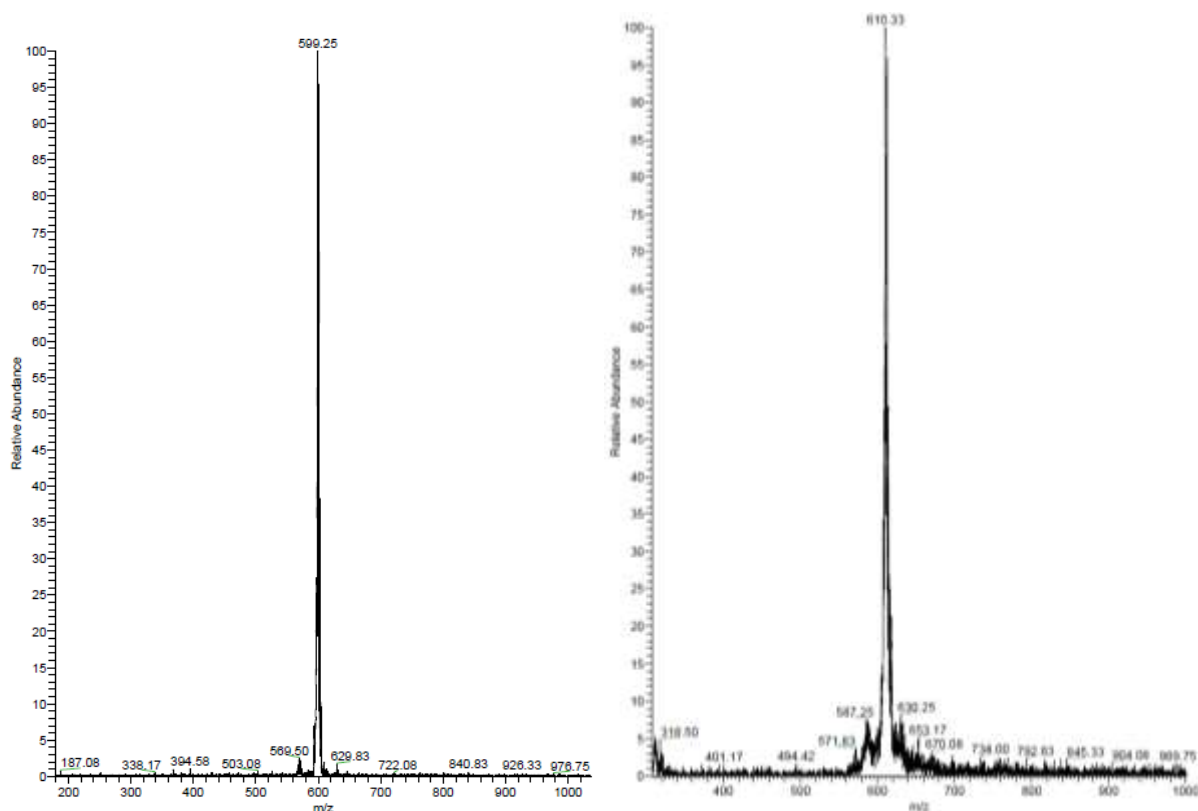
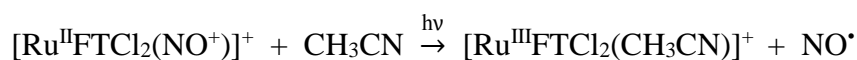


Figure II-11 : Spectres de masse des *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ (à gauche) et de leurs photoproduits (à droite)

D'après l'analyse, l'espèce obtenue après la photoréaction des deux complexes a une masse de 610 g/mol. Cette masse correspond à une perte du ligand nitrosyle (30 g/mol) et à la complexation d'une molécule d'acétonitrile (41 g/mol).

La photoréaction dans ce cas peut donc s'écrire :



Cette analyse permet donc de prouver que la photolibération de NO^\bullet est accompagnée du remplacement de ce ligand par une molécule de solvant, ce qui a longtemps été postulé par de nombreux groupes de recherche.¹⁵

II. 3. 2- b) Analyses des photoproduits des isomères de $[\text{RuFTCl}_2\text{NO}]\text{PF}_6$ par diffraction des rayons X

Après irradiation d'une solution de *trans* (Cl,Cl)- $[\text{RuFTCl}_2\text{NO}]\text{PF}_6$ dans l'acétonitrile, un monocristal du photoproduit a été obtenu par diffusion d'éther diéthylique. Le complexe cristallise dans le groupe d'espace triclinique P-1 et sa structure est représentée sur la **Figure II-12**, dans laquelle les atomes d'hydrogène sont omis par souci de clarté.

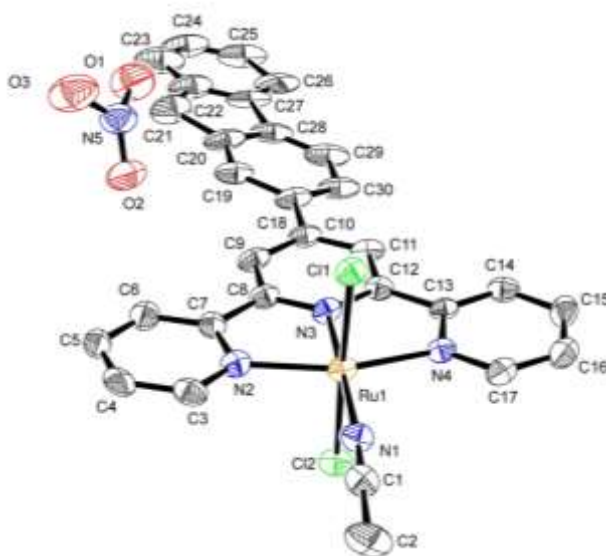


Figure II-12 : Structure cristallographique du photoproduit de *trans* (Cl,Cl)- $[\text{RuFTCl}_2\text{NO}]\text{PF}_6$ obtenu dans l'acétonitrile

Le photoproduit obtenu après irradiation du *trans* (Cl,Cl)- $[\text{RuFTCl}_2\text{NO}]\text{PF}_6$ est le *trans* (Cl,Cl)- $[\text{RuFTCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})]\text{NO}_3$. En effet, le ligand nitrosyle est remplacé par une molécule d'acétonitrile, et les autres ligands ne changent pas de position. Les deux ligands

chloro sont toujours en *trans* l'un de l'autre et les distances et angles entre les atomes constituant le ligand fluorène-terpyridine sont semblables à ceux du réactif.

De plus, le contre-ion qui a co-cristallisé dans la maille est un ion nitrate NO_3^- . Cet ion, qui ne peut provenir que de l'oxydation du NO^* , apporte une nouvelle preuve de la capacité du complexe à libérer NO^* sous excitation.¹²¹

Un monocristal a également été obtenu après irradiation du *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆. Le photoproduit obtenu est le *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂(CH₃CN)]NO₃, dans ce cas aussi. Le NO^* a été libéré sous irradiation, mais le ligand chloro en *trans* de la terpyridine est passé en position axiale, afin que la molécule d'acétonitrile puisse se lier au ruthénium en *trans* du ligand tridente, comme le montre la **Figure II-13**.¹²¹

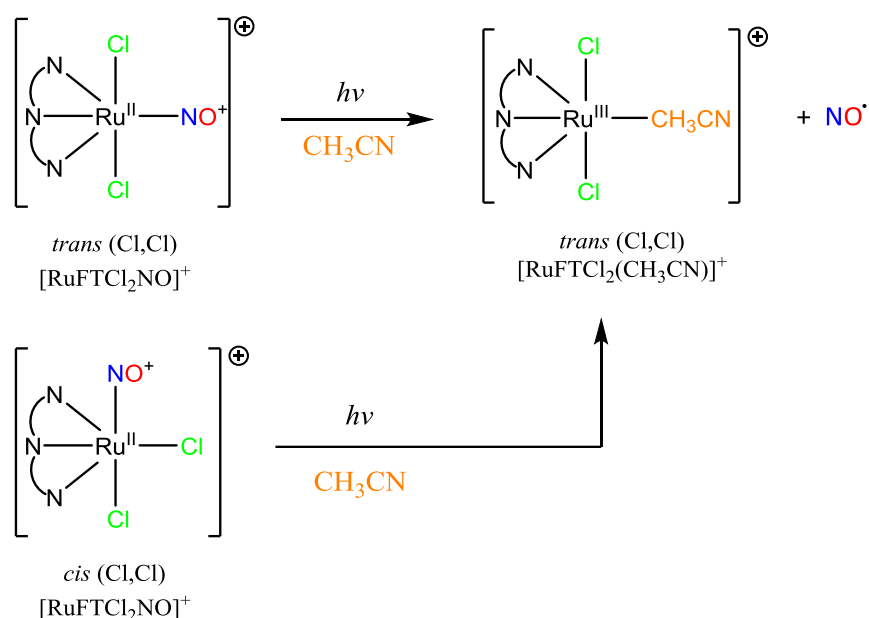


Figure II-13 : Schéma de la photolibération de NO^* par le *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]⁺

Pour expliquer cette isomérisation, des calculs théoriques (DFT, de la Théorie Fonctionnelle de la Densité) ont été menés par Dr. P.G. Lacroix dans l'équipe du LCC. La méthode utilisée est B3PW91/6-31G*, comme c'est souvent le cas pour ce type de structure.¹⁰⁷

L'énergie du complexe *cis* (Cl,Cl)- après la libération de NO^* , c'est-à-dire *cis* (Cl,Cl)-[Ru^{III}FTCl₂]⁺ est calculée pour les différentes conformations prises par ce système pour s'isomériser en *trans* (Cl,Cl)-[Ru^{III}FTCl₂]⁺. Ces conformations sont caractérisées par la

valeur de l'angle Cl-Ru-Cl, qui passe d'environ 90° à environ 180°. La courbe donnant l'énergie (en kcal/mol) en fonction de l'angle Cl-Ru-Cl est représentée sur la **Figure II-14**.

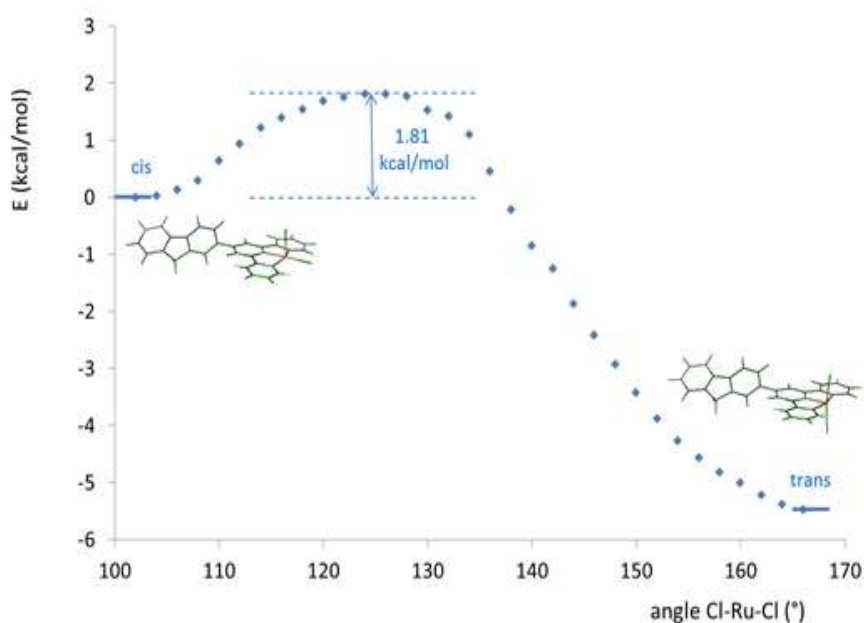


Figure II-14 : Evolution de l'énergie du $[\text{Ru}^{\text{III}}\text{FTCl}_2]^{+}$ en fonction de l'angle Cl-Ru-Cl

D'après les calculs, l'isomère *trans* (Cl,Cl)- $[\text{Ru}^{\text{III}}\text{FTCl}_2]^{+}$ est plus stable que le *cis* (Cl,Cl)- $[\text{Ru}^{\text{III}}\text{FTCl}_2]^{+}$ avec une différence d'énergie d'environ 5,5 kcal/mol.

De plus, la **Figure II-14** montre qu'après le départ de NO^{\bullet} , l'isomère *cis* (Cl,Cl)- $[\text{Ru}^{\text{III}}\text{FTCl}_2]^{+}$ n'a qu'à franchir un faible col énergétique de 1,81 kcal/mol pour se transformer en l'isomère le plus stable. En effet, cette énergie est inférieure à celle nécessaire à la libre rotation des groupements méthyles autour de la liaison C-C dans la molécule d'éthane, qui est d'environ 3,0 kcal/mol.

Ces données sont cohérentes avec l'obtention d'un photoproduit identique pour les deux isomères *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)- $[\text{RuFTCl}_2\text{NO}]^{+}$.

II. 3. 3- Rendements quantiques de NO[•] des *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ et [RuFT(bpy)NO]PF₆ dans l'acétonitrile

II. 3. 3- a) Mesure des rendements quantiques de NO[•] des *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆

-Considérations théoriques

Le spectre d'absorption expérimental du ligand fluorène-terpyridine (FT) dans l'acétonitrile est représenté sur la **Figure II-15**. Celui-ci présente une bande avec deux maxima qui se situent à 297 nm et 309 nm, qui correspond à une transition $\pi \rightarrow \pi^*$.¹⁰⁷

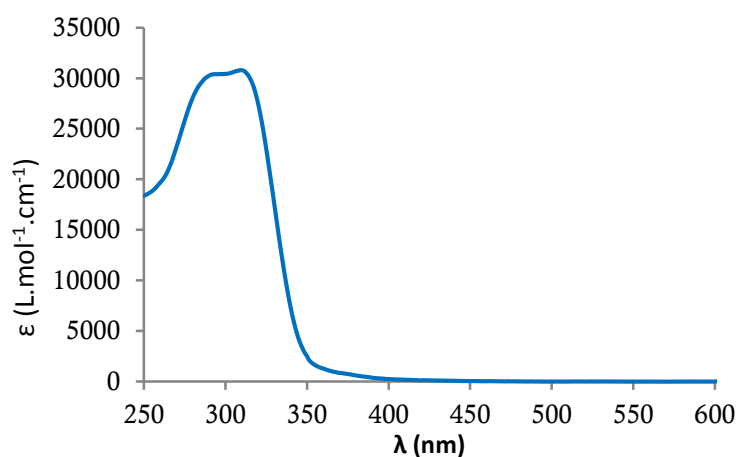


Figure II-15 : Spectre d'absorption du ligand fluorène-terpyridine dans l'acétonitrile

Les spectres d'absorption des isomères *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ dans l'acétonitrile sont superposés sur la **Figure II-16**.¹⁰⁷

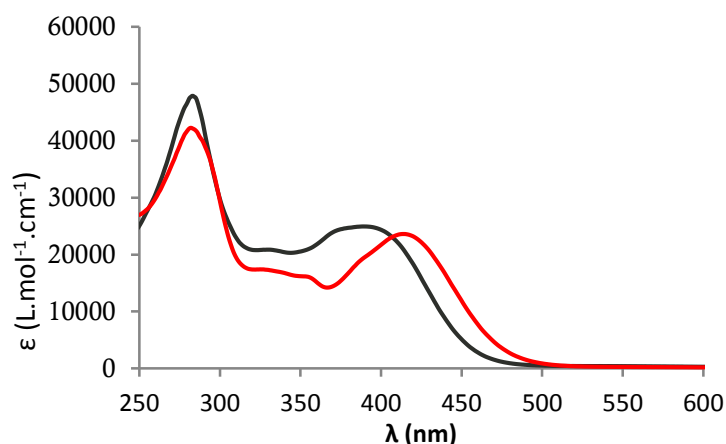


Figure II-16 : Spectres d'absorption de *cis* (Cl,Cl)- (en noir) et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ (en rouge) dans l'acétonitrile (d'après Akl *et al.*, *Dalton Trans.*, **2014**, 43, 12721-12733)

Tous deux présentent une bande de forte intensité à 280 nm, qui est attribuée à une transition située sur le ligand, comme le montre la **Figure II-15**. Ensuite, l'isomère *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ possède une bande d'absorption à 389 nm et le *trans* (Cl,Cl)- à 414 nm. Ces deux bandes reflètent donc une ou plusieurs transitions impliquant le fragment Ru-NO.

Des calculs théoriques de la fonctionnelle de densité (DFT) ont été précédemment menés par Dr. P.G. Lacroix et Joelle Akl. Ceux-ci ont permis d'identifier les orbitales impliquées dans cette transition de plus faible énergie : c'est une transition de caractère majoritaire HOMO → LUMO. L'orbitale occupée de plus haute énergie se situe sur la partie fluorène du ligand tridentate, alors que la plus basse vacante est sur le fragment Ru-NO, comme le montre la **Figure II-17**. L'excitation de la HOMO par irradiation permet donc un transfert de charge du fluorène vers le fragment Ru-NO, ce qui favorise la libération de NO[•].^{181,182,183,184,185,186,187}

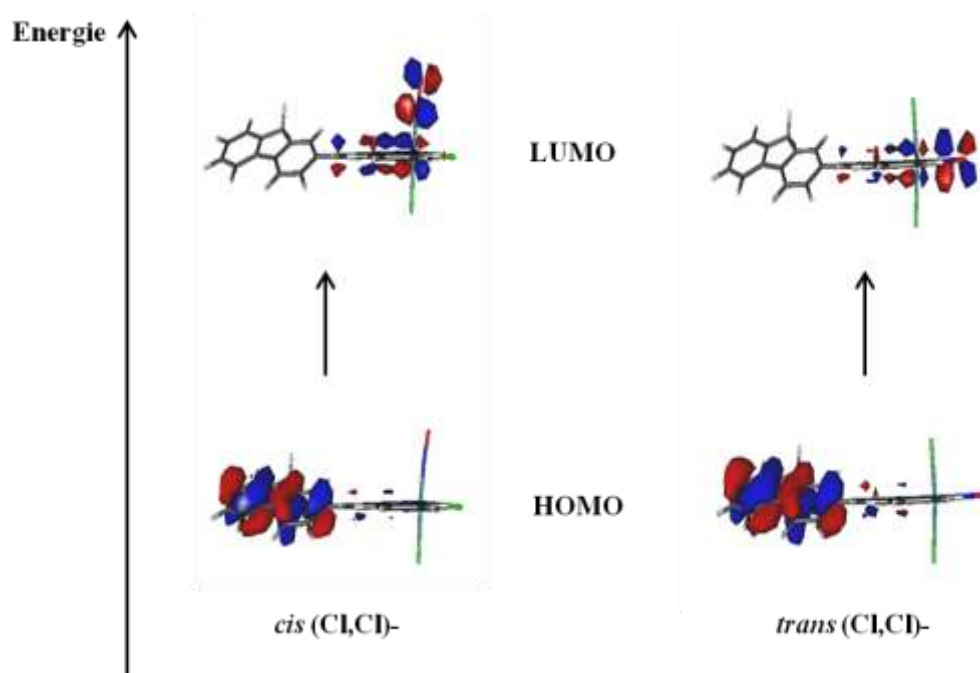


Figure II-17 : Transitions HOMO → LUMO pour les *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆

De plus, une étude théorique approfondie menée sur ces complexes par Juan S. García de l'équipe du Pr. F. Alary du LCPQ a montré que le mécanisme de libération de NO[•] par

irradiation des complexes de ruthénium à ligand nitrosyle ne peut pas être expliquée par l'absorption d'un unique photon. Les calculs DFT démontrent l'existence d'un intermédiaire commun aux mécanismes de photolibération de NO[•] et d'isomérisation Ru-N-O ↔ Ru-O-N (état MS1), qui est l'état métastable MS2, de configuration coudée.¹⁸⁸ En effet, la première étape de ces mécanismes est l'excitation du complexe de l'état fondamental singulet (GS) pour atteindre un niveau excité singulet. Par croisement inter-système, cet état se désexcite jusqu'à un état triplet, qui va ensuite lui-même passer à l'état ¹MS2 par croisement inter-système. Cet état ¹MS2 est stable, avec l'obtention d'une géométrie coudée pour le fragment Ru-NO. L'absorption (successive) d'un second photon est nécessaire et permet d'exciter cet état jusqu'à un état ¹ES', qui, après croisement inter-système, se relaxe vers l'état triplet ³MS2. A partir de cet état, la photolibération ou la photoisomérisation sont possibles et le mécanisme emprunté dépendra de l'énergie de dissociation ou de la barrière énergétique d'isomérisation. Ce mécanisme est résumé sur la **Figure II-18** dans laquelle les structures des trois états sont également rappelées.

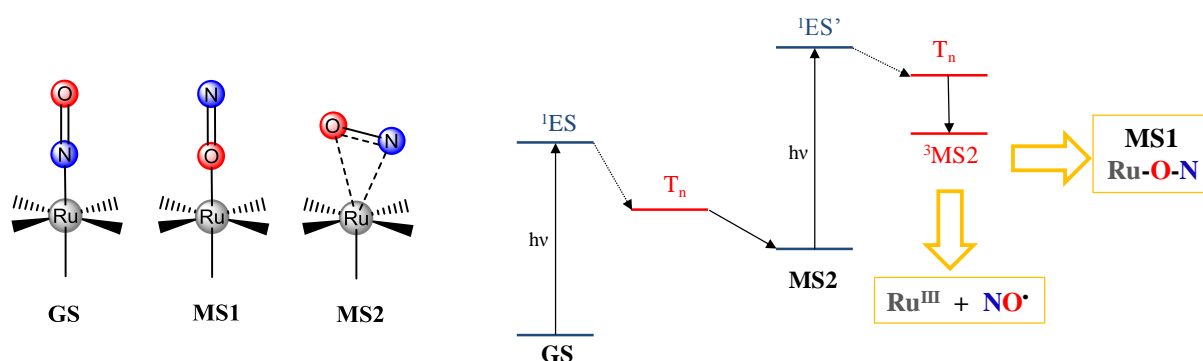


Figure II-18 : Mécanisme impliqué dans la photolibération de NO[•] (schéma simplifié d'après García *et al.*, *J. Mol. Model.*, 2016, 22, 284)

La première étape du mécanisme étant l'absorption d'un photon par le complexe à l'état fondamental, les systèmes [Ru-NO] présentés sont donc irradiés sur la transition de plus faible énergie, à deux longueurs d'onde qui sont 365 et 420 nm.

- Evolution du spectre d'absorption

Les irradiations sont produites à l'aide de deux LEDs monochromatiques de longueur d'onde 365 nm et 420 nm. Cela correspond à l'excitation de la transition située à 389 nm pour l'isomère *cis* (Cl,Cl)- et à 414 nm pour le *trans* (Cl,Cl)- favorisant la libération de NO*.

Les spectres d'absorption des deux complexes sont suivis par spectroscopie UV-Vis sous irradiation et leurs évolutions sont représentées sur les figures suivantes.

Les **Figures II-19** et **II-20** représentent l'évolution du spectre d'absorption de l'isomère *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ dans l'acétonitrile sous irradiation à 365 et 420 nm respectivement. Les courbes bleues représentent le spectre avant irradiation et les courbes rouges sont enregistrées à la fin de l'irradiation. La longueur d'onde d'irradiation est représentée par les pointillés jaunes sur chaque graphe. Au cours de l'irradiation par les deux longueurs d'onde, la bande à 414 nm diminue et deux bandes à 340 nm et 440 nm apparaissent. La légère intensification d'une bande vers 600 nm est due à la présence du photoproduit sous la forme Ru^{III}.^{110,113}

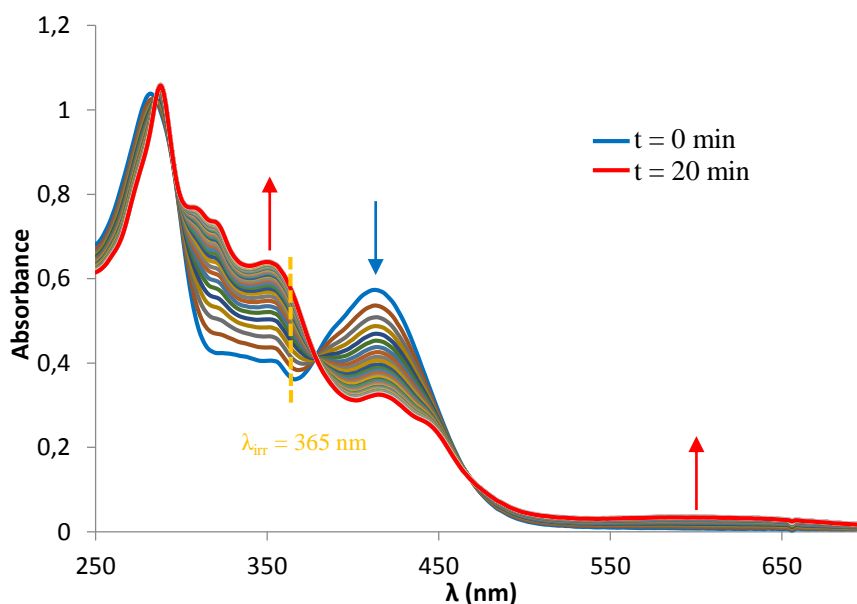


Figure II-19 : Evolution du spectre d'absorption du complexe *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ dans l'acétonitrile sous irradiation à 365 nm

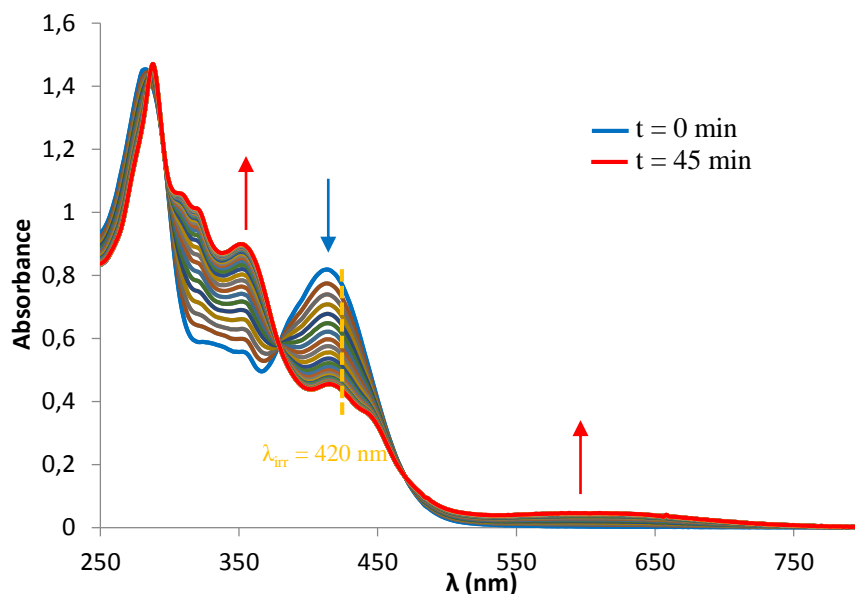


Figure II-20 : Evolution du spectre d'absorption du complexe *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ dans l'acétonitrile sous irradiation à 420 nm

La présence de trois points isosbestiques à 294 nm, 376 nm et 466 nm traduit un équilibre entre deux espèces que sont le *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ et son photoproduit.

La photoréaction est plus rapide sous irradiation à 365 nm puisque la transformation est totale en 20 minutes à cette longueur d'onde alors qu'elle prend 45 minutes à 420 nm.

Les **Figures II-21 et II-22** représentent l'évolution du spectre d'absorption de l'isomère *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ dans l'acétonitrile sous irradiation à 365 nm et 420 nm respectivement. La bande correspondant à la transition impliquée dans la libération de NO[•], ici à 389 nm, diminue sous irradiation aux deux longueurs d'onde et de nouvelles bandes apparaissent vers 340 nm, 440 nm et 600 nm, comme pour le *trans* (Cl,Cl)-.

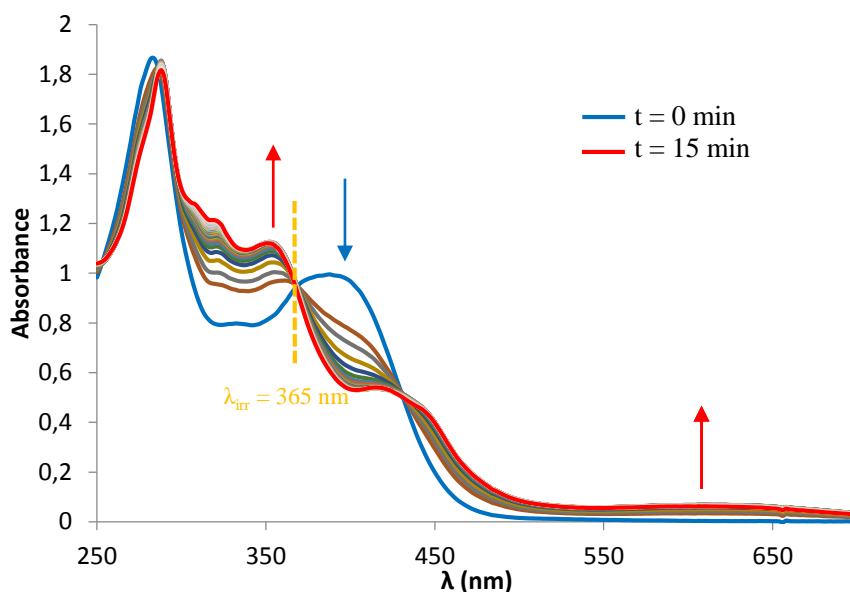


Figure II-21 : Evolution du spectre d'absorption du complexe *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ dans l'acétonitrile sous irradiation à 365 nm

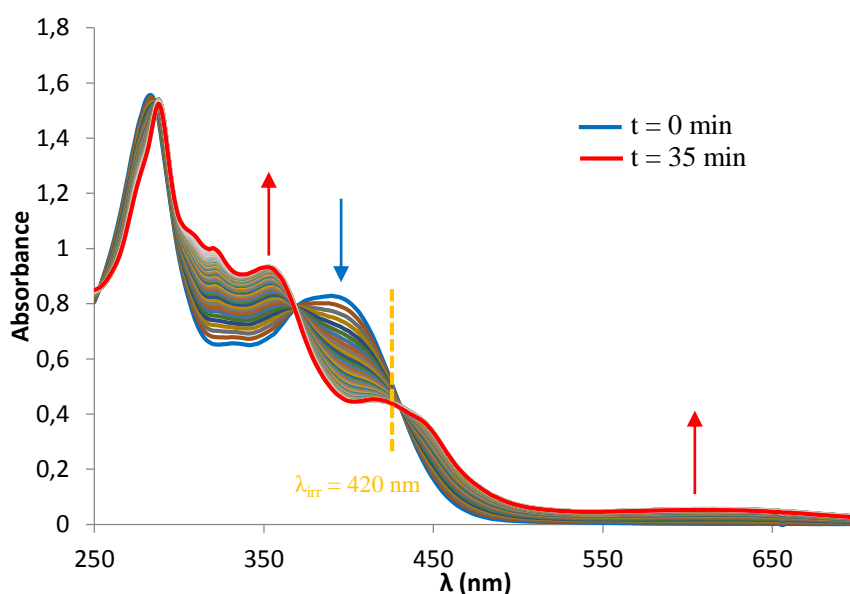
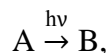


Figure II-22 : Evolution du spectre d'absorption du complexe *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ dans l'acétonitrile sous irradiation à 420 nm

Pour l'isomère *cis* (Cl,Cl)- également, l'absorbance reste constante au cours de l'évolution pour trois longueurs d'onde, ce qui se manifeste par trois points isosbestiques à 284 nm, 366 nm et 426 nm. Cela prouve la transformation du complexe en un photoproduit unique, comportant un ruthénium de degré d'oxydation (III) comme le montre l'épaulement vers 600 nm.

-Calcul du rendement quantique Φ_{NO}

D'après les données expérimentales présentées en **Annexe 5**, la réaction de photolibération de ces complexes est totale, elle peut donc être modélisée par l'équation :



dans laquelle A est le complexe de départ *cis* (Cl,Cl)- ou *trans* (Cl,Cl)-[Ru^{II}FTCl₂NO]⁺ et B le photoproduit *trans* (Cl,Cl)-[Ru^{III}FTCl₂(CH₃CN)]⁺.

L'efficacité de libération de NO[•] sous irradiation par les complexes de ruthénium est évaluée par la mesure du rendement quantique de NO[•], noté Φ_{NO} . Celui-ci est calculé à partir du rendement quantique du réactif A, qui correspond au nombre de moles de A ayant réagi par rapport au nombre de moles de photons absorbés par A, par unité de temps et de volume (cf **Annexe 5** p.326).^{189,190,191,192}

$$\Phi_A = \frac{\text{nombre de moles de A ayant réagi}}{\text{nombre de moles de photons absorbés par A}}$$

Le calcul du rendement quantique est développé dans l'**Annexe 5**. Celui-ci nécessite les données d'absorbance en fonction du temps sous irradiation, pour deux longueurs d'onde : la longueur d'onde d'irradiation et une longueur d'onde d'observation. Après avoir déterminé l'intensité de photons incidente, l'absorbance au cours du temps peut être calculée pour ces deux longueurs d'onde à l'aide du logiciel Sa3.3.

Sur la **Figure II-23**, les courbes expérimentales (obtenues d'après dans le paragraphe précédent) sont tracées en pointillés et les courbes issues de la résolution de l'équation différentielle reliant l'évolution de la concentration en A au rendement quantique sont tracées en trait plein, pour les deux longueurs d'onde d'irradiation, pour l'isomère *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆. Les conditions expérimentales dans lesquelles le calcul a été fait sont rassemblées dans le **Tableau 5-1** de l'**Annexe 5** p.329. Les réactions sont totales car la concentration du photoproduit B en fin de réaction est très proche de celle du réactif A avant irradiation [A]₀.

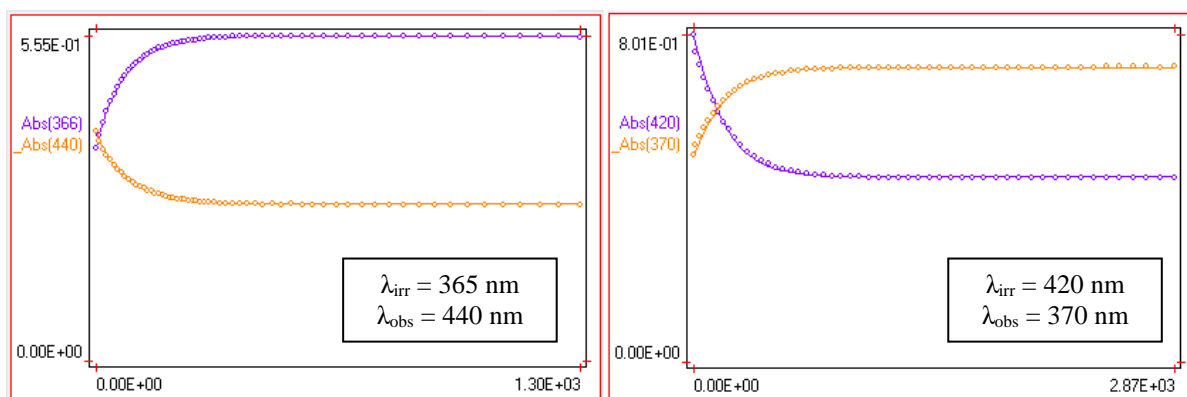
trans (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆

Figure II-23 : Evolutions expérimentale et calculée de l'absorbance aux longueurs d'onde d'irradiation et d'observation pour le *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆, en fonction du temps (en secondes)

La **Figure II-24** présente les mêmes courbes (expérimentales et théoriques) obtenues pour l'isomère *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆.

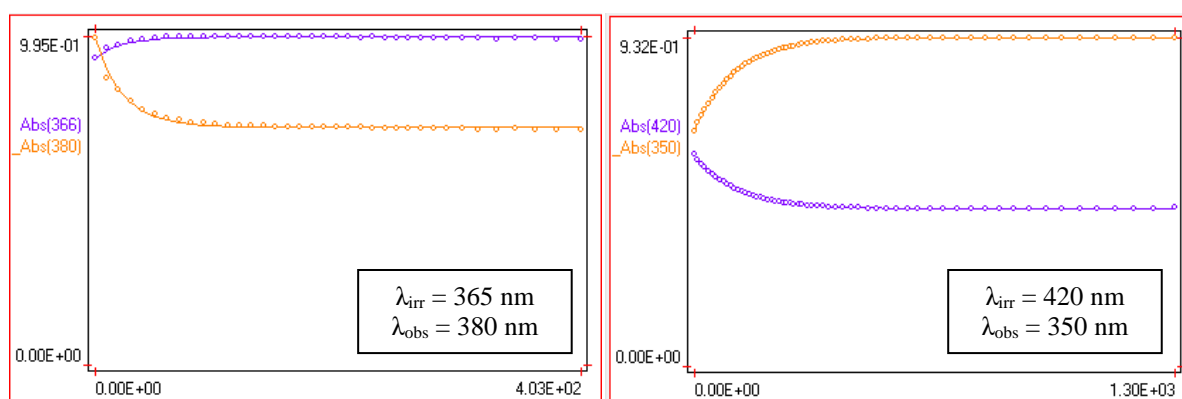
cis (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆

Figure II-24 : Evolutions expérimentale et calculée de l'absorbance aux longueurs d'onde d'irradiation et d'observation pour le *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆, en fonction du temps (en secondes)

L'ajustement des points expérimentaux et de la loi théorique est obtenu pour les deux isomères aux deux longueurs d'onde d'irradiation. Les rendements quantiques de NO[•] sont présentés dans le **Tableau II-1**. Les rendements quantiques de ces deux isomères ont également été mesurés sous irradiation à 405 nm, par une lampe à vapeur de mercure munie d'un filtre monochromatique (cf **Tableau 5-2** de l'**Annexe 5** p.329). Les rendements sont de 0,045 pour le *trans* (Cl,Cl)- et 0,100 pour le *cis* (Cl,Cl).

Tableau II-1 : Rendements quantiques de NO[•] pour les deux isomères de [RuFTCl₂NO]PF₆ sous irradiation à 365 et 420 nm dans l'acétonitrile

| | Φ_{NO}^{365} | Φ_{NO}^{405} | Φ_{NO}^{420} |
|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <i>trans</i> (Cl,Cl)-[RuFTCl ₂ NO]PF ₆ | 0,066 | 0,045 | 0,034 |
| <i>cis</i> (Cl,Cl)-[RuFTCl ₂ NO]PF ₆ | 0,222 | 0,100 | 0,067 |

Pour les trois longueurs d'onde utilisées, le rendement quantique est plus élevé pour l'isomère *cis* (Cl,Cl)- que pour le *trans* (Cl,Cl)-. Ceci s'explique par l'effet σ et π -donneur du ligand en *trans* du ligand nitrosyle dans chaque complexe. Pour l'isomère *trans* (Cl,Cl)-, le nitrosyle est en *trans* de la terpyridine, qui est moins σ et π -donneur que le ligand chloro dans l'isomère *cis* (Cl,Cl)-. La présence d'un ligand donneur en *trans* du ligand nitrosyle favorise la libération de NO[•] en diminuant l'ordre de la liaison Ru-N.

Le rendement quantique rend compte de l'efficacité de libération de NO[•] puisque Φ_{NO} est égal au nombre de molécules de NO[•] libérées sur le nombre de photons absorbés par le complexe. Or, le nombre de photons absorbés par le complexe dépend de son coefficient d'extinction molaire à la longueur d'onde d'excitation. Ainsi, plus le coefficient d'extinction molaire est grand, meilleure est la probabilité d'absorber le nombre de photons nécessaires à la libération de NO[•]. Donc, le produit du coefficient d'extinction molaire et du rendement quantique ($\epsilon_A \cdot \Phi_{\text{NO}}$) pourrait être un bon indicateur pour la comparaison des efficacités de libération de NO[•] de différents complexes.

Pour les deux complexes présentés dans cette partie, le produit $\epsilon_A \cdot \Phi_{\text{NO}}$ évolue de la même façon que Φ_{NO} . D'une part, pour une longueur d'onde donnée, le produit $\epsilon_A \cdot \Phi_{\text{NO}}$ est plus élevé pour l'isomère *cis* (Cl,Cl)- que pour le *trans* (Cl,Cl)-. D'autre part, l'évolution du produit $\epsilon_A \cdot \Phi_{\text{NO}}$ selon la longueur d'onde d'irradiation suit celle du rendement quantique. Dans la suite de ces travaux, le rendement quantique Φ_{NO} sera utilisé pour comparer les efficacités de photolibération des différents systèmes.

D'après le **Tableau II-1**, le rendement quantique de NO[•] augmente avec l'énergie des photons incidents. Plusieurs hypothèses peuvent être faites pour expliquer ce phénomène. Lors de l'irradiation à 365 nm, les photons d'énergie supérieure excitent le complexe dans un état S_{n-365} plus haut en énergie que lors d'une irradiation à 420 nm qui mène à un état S_{n-420} .

La première hypothèse est que cette transition $S_0 \rightarrow S_{n-365}$ peut elle aussi être impliquée dans la libération de NO^* , en présentant un transfert de charge vers le Ru-NO.

La seconde hypothèse est qu'après avoir atteint un état excité S_{n-365} supérieur en énergie, des relaxations vibrationnelles ramènent le complexe à l'état excité S_{n-420} . L'énergie libérée lors de cette relaxation peut être impliquée dans la libération de NO^* , induisant une efficacité supérieure de libération à l'absorption d'un photon de plus faible énergie.

Afin d'améliorer la solubilité des complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ dans l'acétonitrile, le fluorène est substitué par deux chaînes hexyles en position 9f. Les complexes obtenus sont notés *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuF_{hex}TCl₂NO]PF₆. Les rendements quantiques de NO^* de ces deux complexes sont également mesurés dans l'acétonitrile et sont rassemblés dans le **Tableau II-2**.

Tableau II-2 : Rendements quantiques de NO^* obtenus pour les isomères de [RuFTCl₂NO]PF₆ et [RuF_{hex}TCl₂NO]PF₆ dans l'acétonitrile à 365 et 420 nm

| | Φ_{NO}^{365} | Φ_{NO}^{420} |
|--|--------------------------|--------------------------|
| <i>trans</i> (Cl,Cl)-[RuFTCl ₂ NO]PF ₆ | 0,066 | 0,034 |
| <i>cis</i> (Cl,Cl)-[RuFTCl ₂ NO]PF ₆ | 0,222 | 0,067 |
| <i>trans</i> (Cl,Cl)-[RuF _{hex} TCl ₂ NO]PF ₆ | 0,077 | 0,031 |
| <i>cis</i> (Cl,Cl)-[RuF _{hex} TCl ₂ NO]PF ₆ | 0,233 | 0,070 |

L'ajout de chaînes hexyles sur le fluorène du ligand FT n'a quasiment pas d'influence sur le rendement quantique de NO^* dans l'acétonitrile.

Dans cette partie, les complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ ont montré de bonnes propriétés de libération de NO^* sous irradiation à un photon. Les deux isomères donnent un photoproduit unique et commun qui a pu être caractérisé.

Les propriétés de photolibération de NO^* sous irradiation monophotonique du complexe [RuFT(bpy)NO](PF₆)₃ sont étudiées dans le paragraphe suivant.

II. 3. 3- b) Etude comparative des rendements quantiques de NO[•]

L'évolution des spectres d'absorption du complexe [RuFT(bpy)NO](PF₆)₃ sous irradiation est représentée sur la **Figure II-25**. Le complexe est irradié à 405 nm car la bande qu'il présente à 440 nm correspond à une transition HOMO → LUMO impliquée dans le transfert de charge favorisant la libération de NO[•].¹⁷⁸

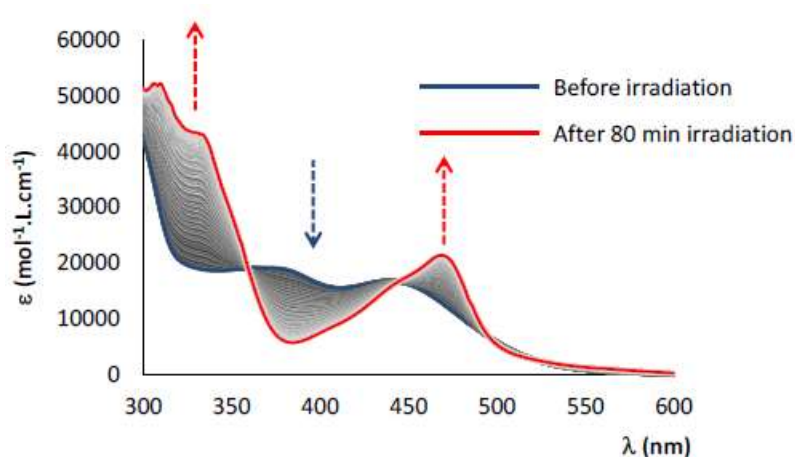


Figure II-25 : Evolution du spectre d'absorption du complexe [RuFT(bpy)NO](PF₆)₃ dans l'acétonitrile sous irradiation à 405 nm (d'après Enriquez-Cabrera *et al.*, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2017**, 1446-1546)

Le rendement quantique de NO[•] du [RuFT(bpy)NO](PF₆)₃, calculé avec ces données, est de 0,020 à 405 nm.

La valeur de Φ_{NO} obtenue pour le [RuFT(bpy)NO](PF₆)₃ est légèrement plus faible que celle obtenue pour le complexe *cis* (Cl,Cl)- et assez proche de celle du *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆, rappelées dans le **Tableau II-3**.

Tableau II-3 : Rendements quantiques des complexes à ligand FT à 405 nm dans l'acétonitrile

| | Φ_{NO}^{405} |
|--|--------------------------|
| [RuFT(bpy)NO](PF ₆) ₃ | 0,020 |
| <i>trans</i> (Cl,Cl)-[RuFTCl ₂ NO]PF ₆ | 0,045 |
| <i>cis</i> (Cl,Cl)-[RuFTCl ₂ NO]PF ₆ | 0,100 |

Comme précédemment, ceci peut être expliqué par l'effet σ et π -donneur du ligand en *trans* du ligand nitrosyle. Dans le *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆, le ligand nitrosyle est en *trans* d'un ligand chloro, alors que dans le *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ et le [RuFT(bpy)NO](PF₆)₃, il est en *trans* d'une pyridine qui est π -accepteur.¹⁹³ Il est donc cohérent de trouver des valeurs de rendement quantique similaires pour le *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ et le [RuFT(bpy)NO](PF₆)₃ et plus faibles que celle du *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆.

Les trois complexes présentés dans cette partie sont donc capables de libérer NO[•] sous irradiation. En revanche, le [RuFT(bpy)NO](PF₆)₃ n'est stable qu'en milieu acide et montre une efficacité de photolibération de NO[•] légèrement inférieure au *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆. La suite de ces travaux de thèse est donc menée uniquement sur des complexes possédant deux ligands chloro comme les isomères *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆.

L'objectif de ces travaux est d'utiliser les propriétés d'absorption à deux photons de ces complexes afin de pouvoir les irradier dans la fenêtre thérapeutique (600-1300 nm). Dans la partie suivante, la capacité de photolibération de NO[•] de ces complexes sous irradiation à deux photons sera étudiée.

II. 4. Photolibération de NO[•] par les complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ sous irradiation biphotonique

II. 4. 1- Absorption à deux photons

L'absorption à deux photons (ADP ou TPA pour Two-Photon Absorption) est un processus durant lequel une molécule est excitée par l'absorption de deux photons simultanément. C'est un processus d'optique non linéaire (ONL). Ce phénomène a été prédit par Maria Göppert-Mayer en 1931¹⁹⁴ et c'est en 1961 que son observation a pu être faite grâce au développement des lasers pulsés par Kaiser et Garret. C'est un processus du troisième ordre, de plusieurs degrés de magnitude plus faible que l'absorption monophotonique pour de faibles énergies. C'est pour cette raison que l'observation de ce phénomène requiert l'utilisation de lasers de forte puissance.

Dans ces travaux, les deux photons simultanément absorbés ont la même énergie, qui correspond à la moitié de l'énergie nécessaire pour atteindre le niveau excité par absorption à un photon (OPA pour One-Photon Absorption). La **Figure II-26** compare les deux processus OPA et TPA.

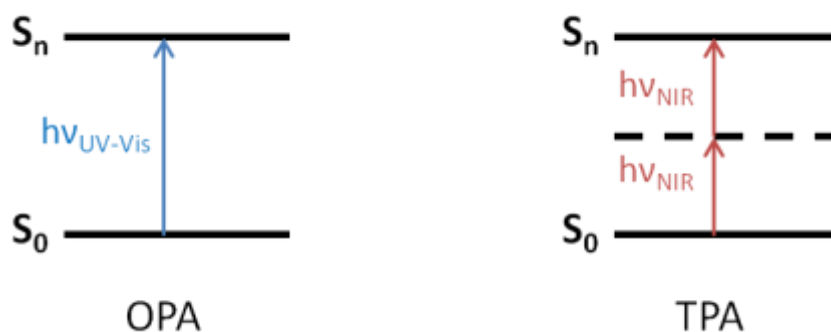


Figure II-26 : Phénomènes d'absorption à un photon (OPA) et à deux photons (TPA)

En OPA, la molécule absorbe un photon d'énergie $h\nu_{UV-Vis}$, donc de longueur d'onde située dans l'ultraviolet ou le visible. En TPA, deux photons d'énergie moitié ($h\nu_{UV-Vis}/2$) sont absorbés simultanément pour atteindre l'état excité. Cela correspond à l'absorption de deux photons de longueur d'onde double, donc dans le proche infrarouge. Dans le cas des isomères *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆, dont la transition de plus basse énergie se situe vers 400 nm, l'irradiation à deux photons se fait donc à 800 nm.

La capacité d'une molécule à absorber simultanément deux photons est évaluée par la section efficace σ_{TPA} , exprimée en Goeppert-Mayer (GM). Celle-ci est donnée par la formule :

$$\frac{dnp}{dt} = N \cdot \sigma_{TPA} \cdot F^2$$

où $\frac{dnp}{dt}$ est le nombre de photons absorbés par TPA par unité de temps, N la concentration en molécules actives et F le flux de photons.

Les complexes étudiés dans l'équipe n'étant pas fluorescents, leur section efficace est mesurée par la méthode de Z-scan (cf **Annexe 6** p.334). Des chaînes hexyles ont été greffées sur le fluorène du ligand des complexes à tester afin d'améliorer leur solubilité pour l'expérience. Les études photocinétiques des *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuF_{hex}TCl₂NO]PF₆ ont montré que la présence des chaînes hexyles n'a pas d'influence sur le rendement quantique de NO[•].

Les sections efficaces des composés *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuF_{hex}TCl₂NO]PF₆ ainsi que [RuF_{hex}T(bpy)NO](PF₆)₃ ont été mesurées dans l'équipe du Dr. G. Ramos du Centro de Investigaciones en Óptica de León au Mexique. Celles-ci sont répertoriées dans le **Tableau II-4**.

Tableau II-4 : Sections efficaces des isomères de [RuF_{hex}TCl₂NO]PF₆ et de [RuF_{hex}T(bpy)NO](PF₆)₃ mesurées par Z-scan dans l'acétonitrile à 800 nm

| | $\sigma_{\text{TPA}} \text{ à } 800 \text{ nm (GM)}$ |
|--|--|
| <i>cis</i> (Cl,Cl)-[RuF _{hex} TCl ₂ NO]PF ₆ | 100 ± 13 |
| <i>trans</i> (Cl,Cl)-[RuF _{hex} TCl ₂ NO]PF ₆ | 87 ± 14 |
| [RuF _{hex} T(bpy)NO](PF ₆) ₃ | 108 ± 18 |

Les sections efficaces σ_{TPA} des trois complexes ont des valeurs proches de 100 GM, avec une valeur légèrement supérieure pour celui possédant le ligand 2,2'-bipyridine. Cette valeur de 100 GM est de l'ordre de celle qui a été mesurée pour les molécules classiques de type « donneur-accepteur » (ou « push-pull ») comme les di-alkyl-amino-nitrostilbene (DANS) (88 GM).¹⁹⁵

II. 4. 2- Mise en évidence de la libération de NO[•] par RPE sous irradiation à deux photons

Comme pour l'irradiation à un photon, la technique employée pour apporter la preuve de la photolibération de NO[•] est la RPE.

Les complexes *trans* (Cl,Cl)- et *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ sont mis en solution dans l'acétonitrile en présence de piègeur [Fe^{II}(MGD)₂] fraîchement préparée.

La **Figure II-27** montre les signaux obtenus pour les deux isomères *trans* (Cl,Cl)- et *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ dans l'obscurité en gris. Aucun signal dû à la présence de NO[•] n'est observé.

Comme cela a été décrit précédemment, l'irradiation à deux photons requiert un laser pulsé. Le laser pulsé disponible sur le site est celui intégré dans un microscope biphotonique de l'IPBS, qui permet classiquement l'observation d'échantillons biologiques voire de petits animaux. L'appareil est un microscope à fluorescence droit 7MP équipé d'un laser

Chameleon Ultra II Ti-sapphire, capable de générer des pulses de 140 fs à une fréquence de 80 MHz. Le laser est réglé pour générer une longueur d'onde de 810 nm, avec une puissance de 360 mW. Les signaux obtenus après 30 minutes d'irradiation à deux photons sont présentés en rouge sur la **Figure II-27**.

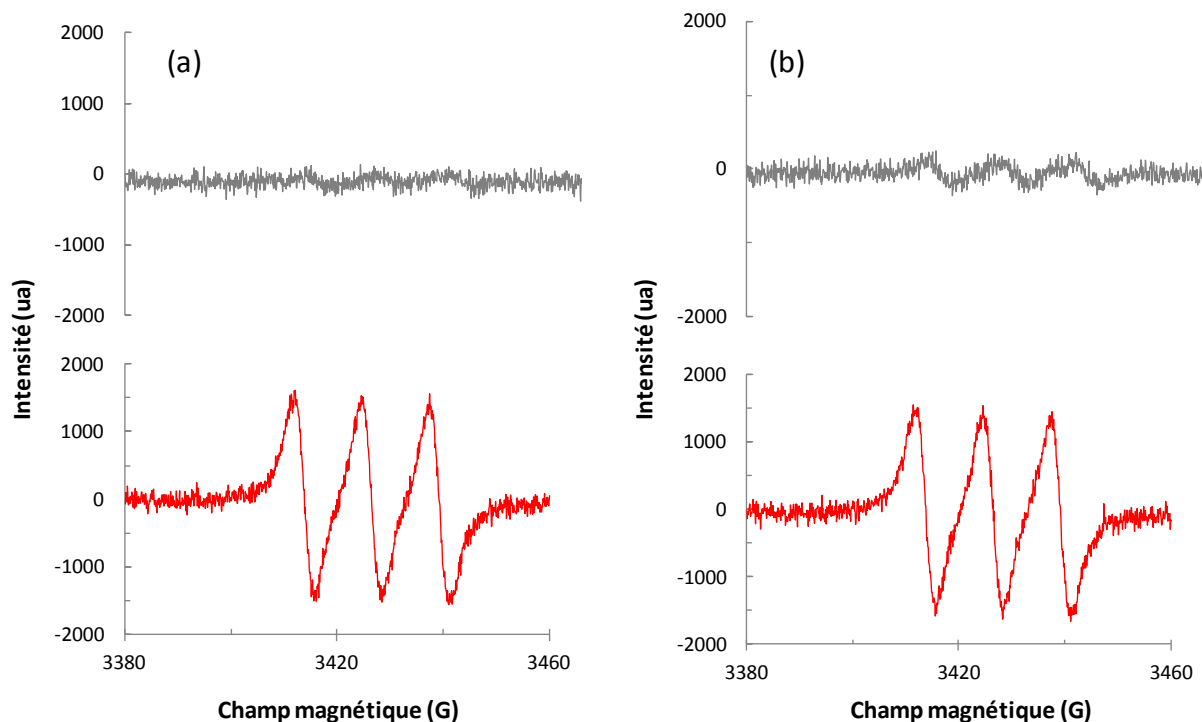
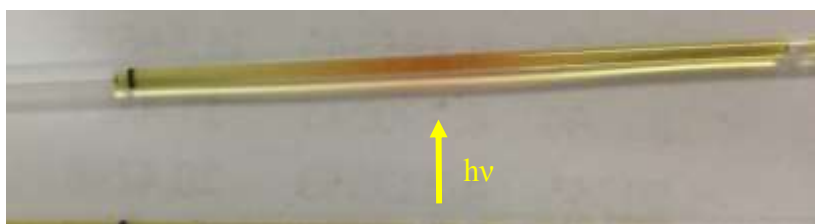


Figure II-27 : Spectres RPE obtenus pour les complexes (a) *trans* (Cl,Cl)- et (b) *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆, dans l'obscurité (courbes grises) et sous irradiation à deux photons (courbes rouges), en présence de piègeur de spin

Pour les deux isomères, l'analyse RPE après irradiation montre le triplet caractéristique de l'adduit que forme le piègeur avec NO^{*}, avec un facteur $g = 2,040$ et une constante de couplage hyperfin $a = 1,22 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$. Cette expérience montre la capacité de photolibération des complexes *trans* (Cl,Cl)- et *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ sous excitation à deux photons.¹⁸⁰

De plus, après irradiation par le laser pulsé, les capillaires présentent un changement de couleur au niveau du point focal. La **Figure II-28** est la photographie d'un capillaire après irradiation à deux photons. La solution est rose au niveau du point focal et dans le volume de diffusion du complexe [Fe(MGD)₂-NO^{*}] alors que le reste de la solution qui n'a pas été irradié n'a pas changé de couleur.



Point focal du laser pulsé

Figure II-28 : Photographie d'un capillaire contenant une solution de *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ après irradiation à deux photons

L'observation des tubes après l'excitation à deux photons permet de visualiser la zone de diffusion du produit après irradiation à deux photons. En effet, celle-ci reste très restreinte par rapport à la zone transformée après irradiation monophotonique. Cela corrobore les observations faites par l'équipe en 2014, illustrées sur la **Figure II-29** où le point focal est très précis, ce qui est un critère important pour la photothérapie dynamique. C'est l'un des avantages majeurs de l'excitation à deux photons car une thérapie sur un patient présentant une plaie peu étendue peut être imaginée, sans créer de dommages sur les tissus périphériques.



Figure II-29 : Volume du point focal¹²²

II. 5. Conclusion

Dans ce chapitre, les complexes *trans* (Cl,Cl)- et *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ et [RuFT(bpy)NO](PF₆)₃ ont été présentés. Dans une première partie, leurs synthèses ont brièvement été rappelées. Ensuite, une analyse par RPE a permis d'apporter une preuve directe de la photolibération de NO[•] par ces trois complexes.

Les deux isomères de [RuFTCl₂NO]PF₆ donne le même photoproduit qui est le *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂(CH₃CN)]PF₆, caractérisé par DRX.

Les rendements quantiques de NO^{\bullet} de ces trois systèmes ont été calculés à partir de l'évolution des spectres d'absorption sous irradiation à différentes longueurs d'onde. Le complexe le plus efficace est le *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆, devant son isomère *trans* (Cl,Cl)- et ensuite le [RuFT(bpy)NO](PF₆)₃. Ces valeurs confirment l'importance de la nature du ligand en position *trans* du ligand nitrosyle dans le complexe.

Les sections efficaces de ces complexes ont été mesurées en utilisant des dérivés possédant des chaînes hexyles. Le *cis* (Cl,Cl)-[RuF_{hex}TCl₂NO]PF₆ est celui qui possède la section efficace la plus importante. Dans la suite de ces travaux de thèse, les expérimentations ne seront pas poursuivies sur le complexe [RuFT(bpy)NO](PF₆)₃, qui est instable en milieu aqueux.

Les complexes *trans* (Cl,Cl)- et *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ ont été irradiés à deux photons (à 800 nm) grâce à un laser pulsé. L'analyse par RPE a de nouveau été utilisée pour montrer la photolibération de NO^{\bullet} . Les complexes de ruthénium à ligand nitrosyle sont donc des systèmes capables de libérer NO^{\bullet} sous irradiation monophotonique et biphotonique. Des perspectives d'études sur l'élaboration d'une thérapie photodynamique (PACT) peuvent donc être imaginées.

CHAPITRE III

**Étude des propriétés de *cis* (Cl,Cl)-
et *trans* (Cl,Cl)- [RuFTCl₂NO]PF₆
dans l'eau**

Chapitre III :

Étude des propriétés de *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ dans l'eau

III. 1. Introduction

Les complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ sont des systèmes photoactivables capables de libérer NO[•] de façon contrôlée sous irradiation à un et deux photons, dans l'acétonitrile. L'objectif étant d'aboutir à une application biomédicale, il est nécessaire d'étudier les propriétés de ces complexes dans l'eau.

Dans un premier temps, le comportement des complexes sans irradiation sera analysé en solution aqueuse et dans un second temps, leurs propriétés sous irradiation seront étudiées.

III. 2. Caractérisation de la transformation des complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]⁺ en présence d'eau

III. 2. 1- Etude préliminaire du spectre d'absorption de *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ en présence d'eau par spectroscopie UV-Vis

Le suivi d'absorbance en UV-Vis du complexe *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ dans l'acétonitrile CH₃CN et dans le DMSO a montré que ces solutions sont stables à l'abri de la lumière pendant au moins 48 heures. Dans le DMSO, le maximum d'absorption dans le domaine entre 350 et 800 nm se situe à 431 nm et 379 nm pour le *trans* (Cl,Cl)- et le *cis* (Cl,Cl)- respectivement. Le maximum à plus faible longueur d'onde (vers 280 nm) correspond à une transition $\pi \rightarrow \pi^*$ localisée sur le ligand terpyridine-fluorène.

Une solution de complexe *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ dans un mélange 50/50 eau/DMSO a été préparée pour étudier la stabilité du complexe en présence d'eau. La concentration de la solution n'est pas contrôlée pour cette expérimentation car l'objectif est simplement de savoir si le complexe est stable ou non dans ces conditions. Les spectres

d'absorbance en UV-Vis pris au cours du temps et à l'abri de la lumière sont représentés sur la **Figure III-1**.

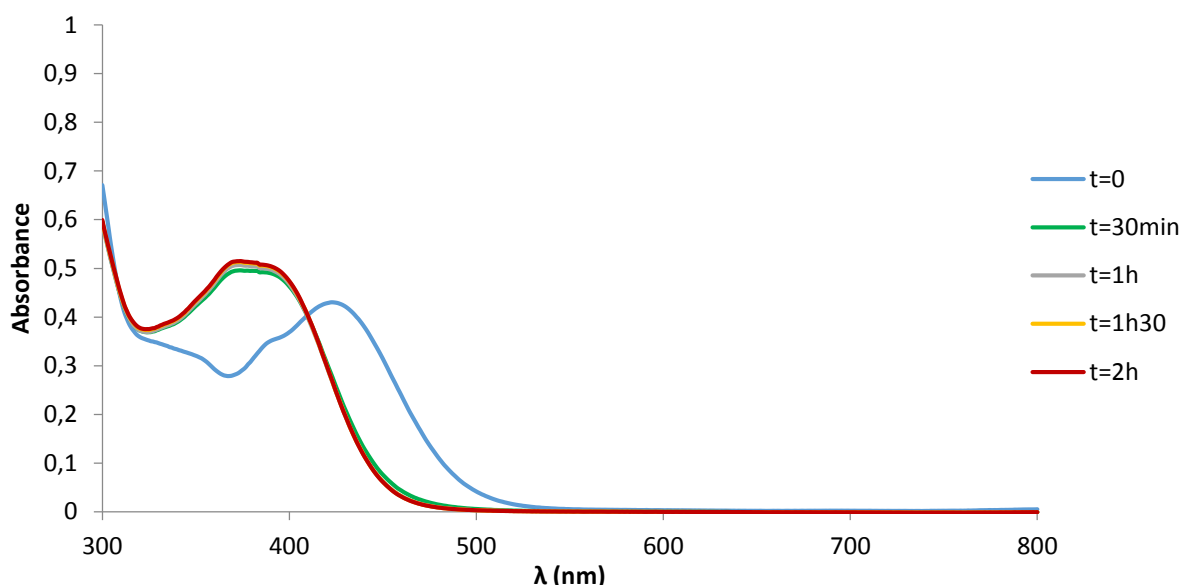


Figure III-1 : Evolution du spectre d'absorption de *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ dans un mélange 50/50 eau/DMSO

La **Figure III-1** montre que le complexe évolue très rapidement lorsqu'il est en présence d'eau. Le maximum d'absorption à t=0 min se situe à 423 nm puis l'allure globale de la courbe varie beaucoup entre 0 et 30 minutes où l'absorption maximale est à 374 nm.

Cette expérience préliminaire, sur seulement 2 heures, a permis de voir que dans un mélange eau/DMSO, le complexe n'est pas stable. Plusieurs analyses ayant pour but la détermination structurale du produit transformé sont présentées ensuite.

III. 2. 2- Spectrométrie de masse sur *trans* (Cl,Cl)- et *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]⁺ en présence d'eau

III. 2. 2- a) Analyse de l'isomère *trans* (Cl,Cl)- en spectrométrie de masse

Afin d'élucider la structure en laquelle le complexe *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ se transforme, des analyses en spectrométrie de masse sont réalisées.

Une première analyse est réalisée dans l'acétonitrile pur. En ESI-positive, c'est la masse du cation qui est observée. Sa formule brute est $C_{28}H_{19}Cl_2N_4ORu$ donc sa masse exacte est de 599 g/mol. De plus, celui-ci est monochargé.

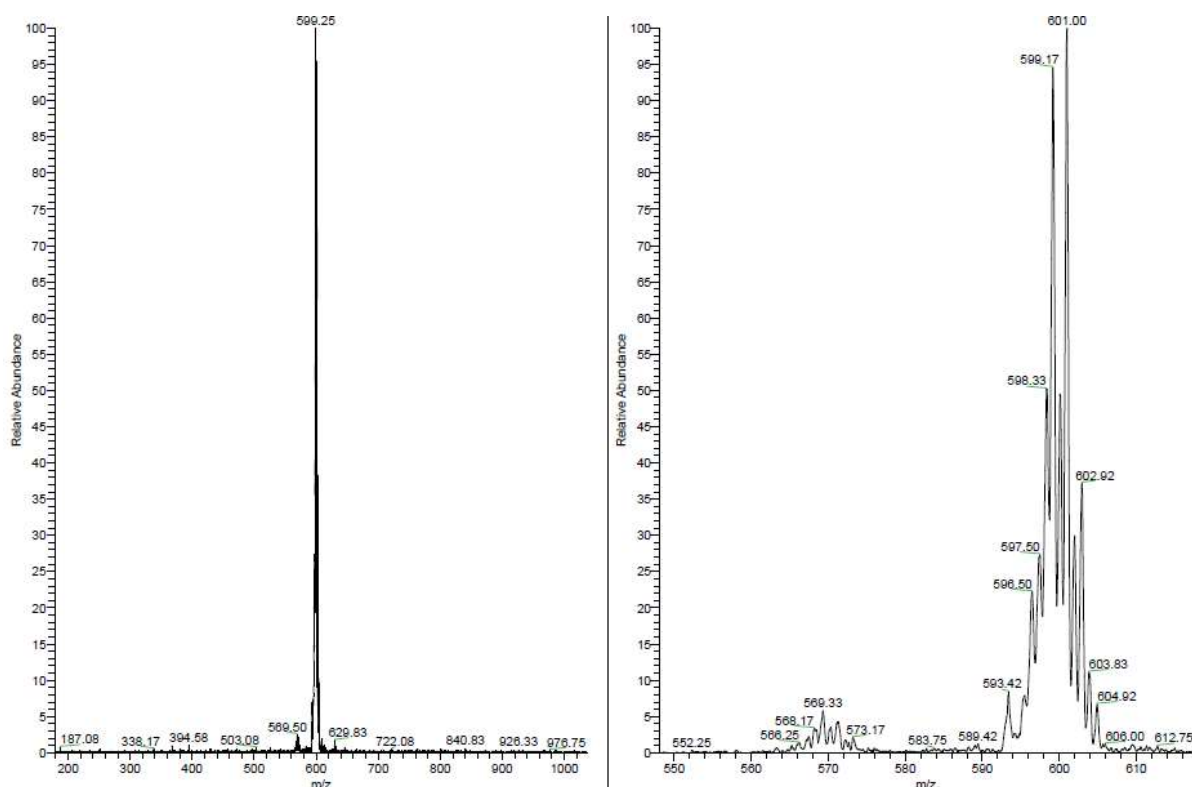


Figure III-2 : Spectres de masse du *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ dans l'acétonitrile

Sur le spectre de masse de gauche de la **Figure III-2**, un pic majoritaire est obtenu à $m/z = 599,2$, correspondant à la masse du cation attendu. La présence d'un pic d'intensité très faible à $m/z = 569,5$ correspond à la fragmentation du ligand nitrosyle dont la masse exacte est 30 g/mol.

Le spectre de masse de droite, qui est un agrandissement du premier permet l'observation du massif isotopique du pic à 599. Ce profil isotopique montre des pics distants de $\Delta m/z = 1$, ce qui prouve que le complexe analysé est bien monochargé. La masse du pic pseudo-moléculaire et sa charge correspondent à ce qui était attendu pour le complexe analysé.

Le spectre de masse théorique simulé de ce complexe chargé est représenté sur la **Figure III-3**.

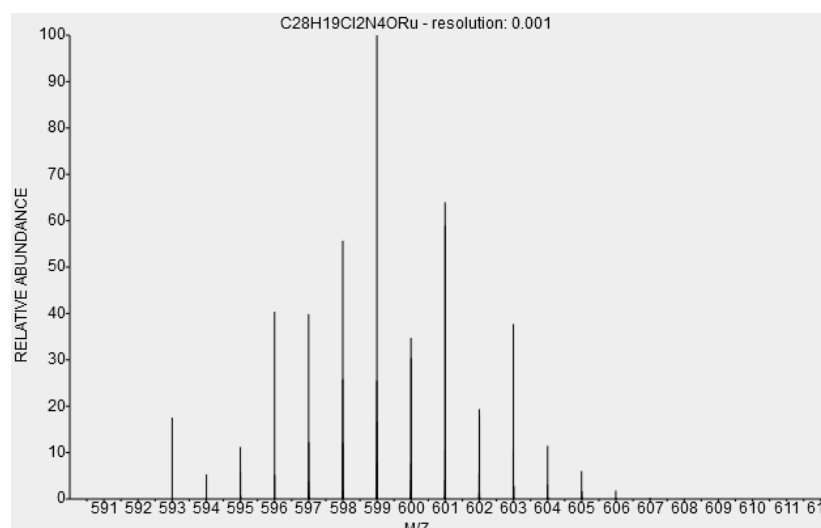


Figure III-3 : Spectre de masse théorique de *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]⁺

Les intensités relatives des pics P+1 (m/z = 600), P+2 (m/z = 601), P+3 (m/z = 602), P+4 (m/z = 603), P+5 (m/z = 604) et P+6 (m/z = 605) correspondent au profil isotopique théorique (**Figure III-3**) de ce complexe contenant deux ligands Cl et un atome de ruthénium.

Ensuite, une analyse du complexe *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ est faite en présence d'eau. Le complexe est préalablement dissous dans l'acétonitrile et de l'eau est ajoutée pour obtenir une solution finale à 50/50 eau/acétonitrile. Le spectre de masse obtenu est représenté sur la **Figure III-4**.

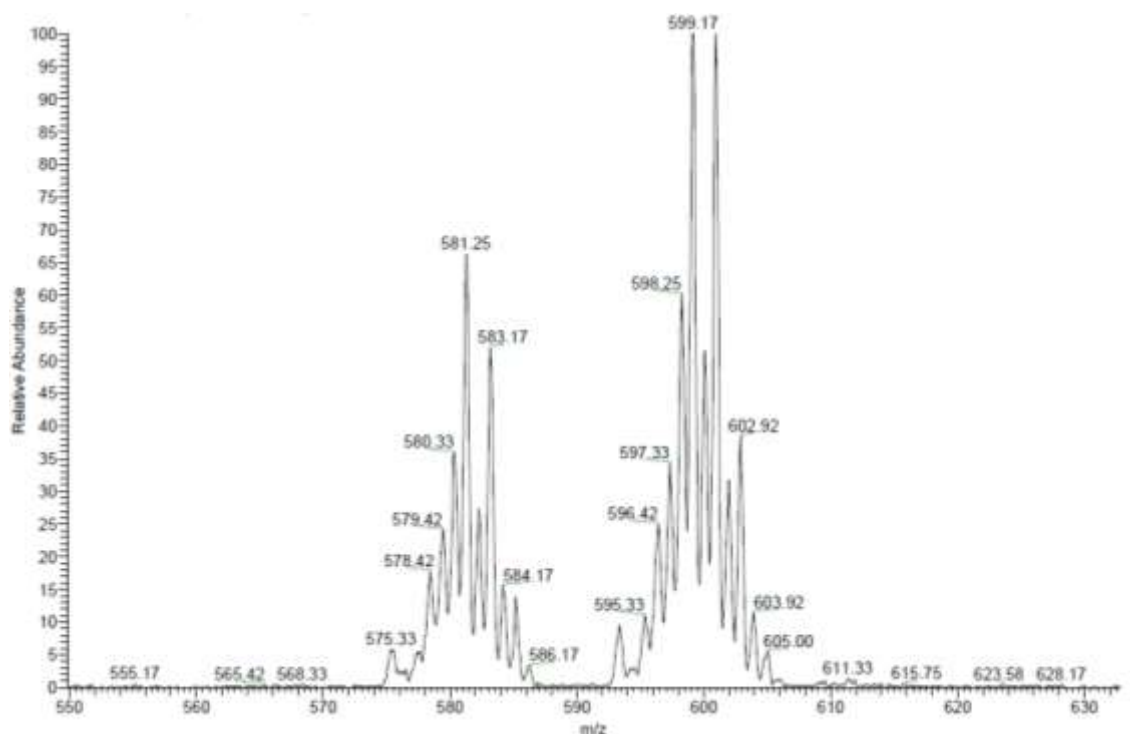


Figure III-4 : Spectre de masse du *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ dans 50/50 eau/acétonitrile

Lors de l'analyse MS du complexe dans ces conditions (**Figure III-4**), le pic à $m/z = 599,2$ est toujours visible mais un second pic à $m/z = 581,2$ apparaît. Ce pic est dû à une seconde espèce provenant à la transformation du complexe.

Une troisième analyse de ce complexe est ensuite réalisée dans les conditions proches de celles utilisables en biologie, c'est-à-dire dans l'eau avec 0,5% DMSO (cf Chapitres V et VI). Le spectre de masse obtenu est le suivant (**Figure III-5**) :

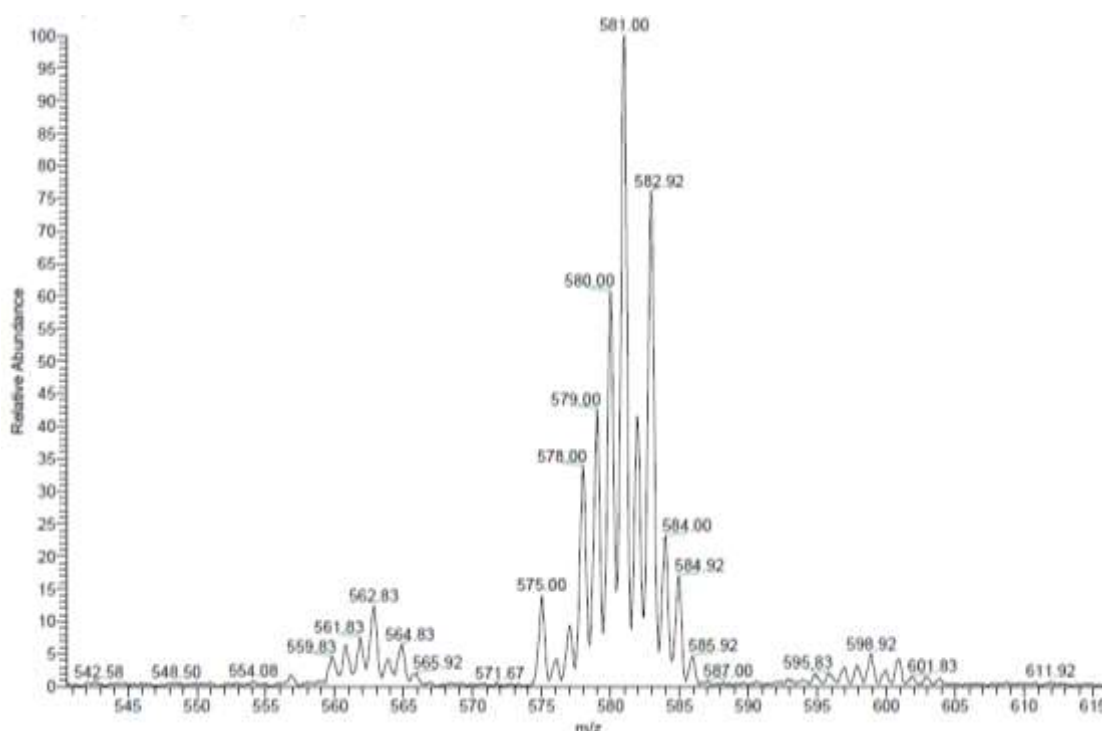


Figure III-5 : Spectre de masse du *trans* (Cl,Cl)-[Ru^{II}FTCl₂NO]PF₆ dans l'eau (0,5% DMSO)

Dans ce cas, le pic à $m/z = 599$ a totalement disparu et le pic à $m/z = 581$ est majoritaire. Le complexe est donc totalement transformé, lorsqu'il est en solution dans l'eau.

Le profil isotopique de ce nouveau pic montre que l'espèce correspondante est également monochargée. La masse de 581 g/mol, qui correspond à une différence de 18 par rapport à celle du cation dans l'acétonitrile, pourrait correspondre à plusieurs espèces.

En supposant qu'en milieu aqueux, au moins un atome d'oxygène se lie au ruthénium, il existe deux structures respectant le spectre de masse obtenu : [Ru^{II}FT(H₂O)₂(NO₂)]⁺ ou [Ru^{II}FT(Cl)(OH)(NO)]⁺.

Pour identifier laquelle des deux espèces est analysée, les massifs isotopiques des deux complexes envisageables sont comparés à l'expérimental. En effet, la présence d'un ligand Cl dans un seul des deux cas permet de distinguer les massifs.

Les intensités relatives des pics P ($m/z = 581$), P+1 ($m/z = 582$), P+2 ($m/z = 583$), P+3 ($m/z = 584$), P+4 ($m/z = 585$), P+5 ($m/z = 586$) et P+6 ($m/z = 587$) correspondent au spectre de masse théorique du complexe $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{FT}(\text{Cl})(\text{OH})(\text{NO})]^+$ (**Figure III-6**). En effet, la simulation du spectre de $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{FT}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NO}_2)]^+$ montre un massif isotopique différent, présentant les pic à $m/z = 581$ (pic P), 582 (pic P+1), 583 (pic P+2), 584 (pic P+3) et 585 (pic P+4), mais pas de pic à $m/z = 586$ et 587 (**Figure III-7**), contrairement à ce que l'on observe sur le spectre de masse expérimental et sur le spectre de masse théorique de $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{FT}(\text{Cl})(\text{OH})(\text{NO})]^+$.

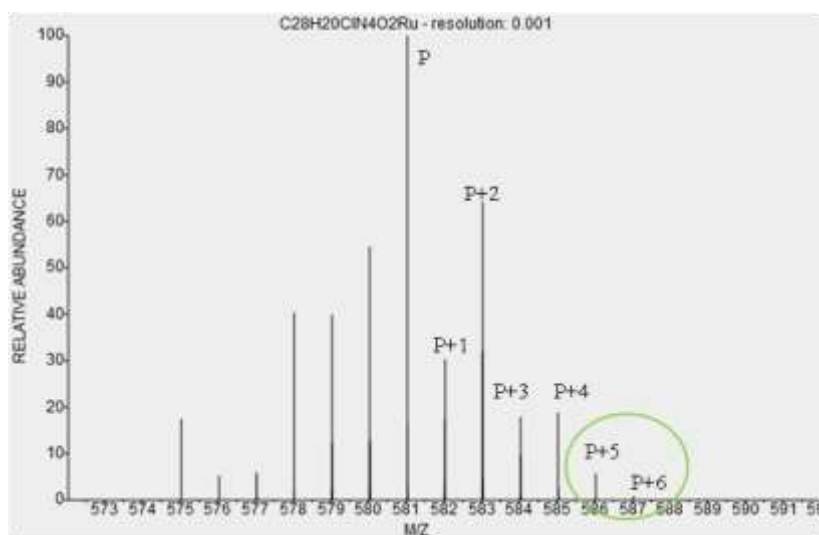


Figure III-6 : Spectre de masse théorique de $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{FT}(\text{Cl})(\text{OH})(\text{NO})]^+$

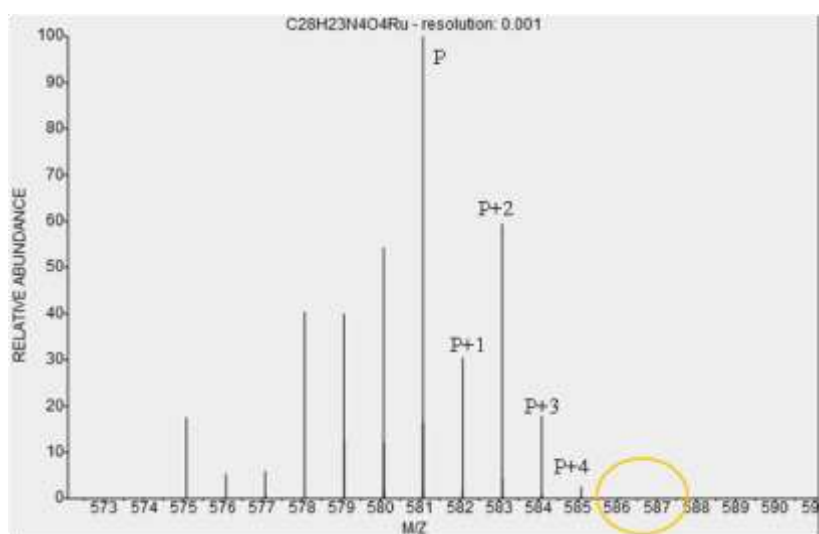


Figure III-7 : Spectre de masse théorique de $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{FT}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NO}_2)]^+$

De plus, le massif à $m/z = 562,8$ correspond à une fragmentation du complexe transformé. En raison de la mauvaise résolution du pic due à sa faible intensité, il est difficile de dire s'il y a une perte de 17 ou de 18 par rapport au pic majoritaire. Ce petit massif pourrait donc concorder à la fragmentation du ligand OH du complexe $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{FT}(\text{Cl})(\text{OH})(\text{NO})]^+$.

Ainsi, ces expérimentations de spectrométrie de masse ont permis d'identifier la transformation du complexe *trans* (Cl,Cl)- $[\text{RuFTCl}_2\text{NO}]\text{PF}_6$. Il est maintenant clair que le complexe subit une substitution du ligand Cl par un OH et que le complexe *trans* (Cl,Cl)- $[\text{RuFTCl}_2\text{NO}]^+$ se transforme en $[\text{RuFT}(\text{Cl})(\text{OH})(\text{NO})]^+$ en présence d'eau.

III. 2. 2- b) Analyse de l'isomère *cis* (Cl,Cl)- en spectrométrie de masse

Dans l'acétonitrile pur, le *cis* (Cl,Cl)- $[\text{RuFTCl}_2\text{NO}]\text{PF}_6$, donne, comme le *trans* (Cl,Cl)-, un pic à $m/z = 599$, en ESI-positve.

L'analyse de masse du complexe *cis* (Cl,Cl)- $[\text{RuFTCl}_2\text{NO}]\text{PF}_6$ est ensuite poursuivie dans l'eau avec 0,5 % DMSO. Le spectre de masse est présenté sur la **Figure III-8**.

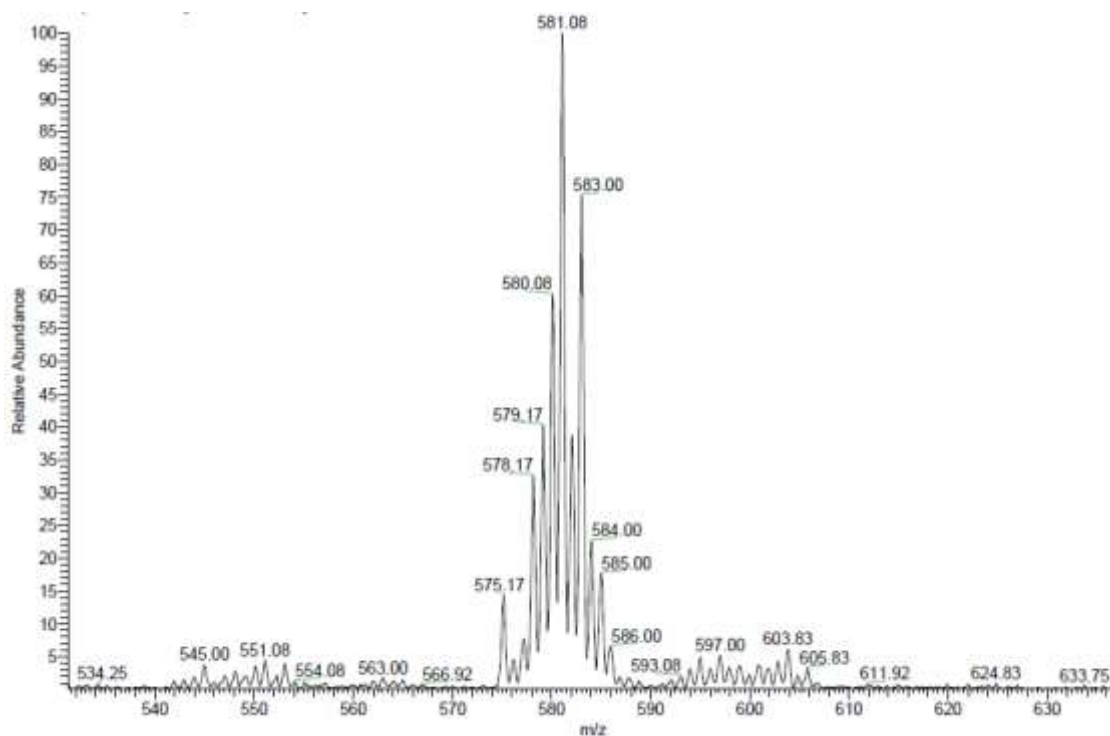


Figure III-8 : Spectre de masse du *cis* (Cl,Cl)- $[\text{RuFTCl}_2\text{NO}]\text{PF}_6$ dans l'eau (0,5 % DMSO)

L'analyse en masse montre la totale disparition du pic à $m/z = 599$ et la présence du pic monochargé à $m/z = 581$. Le profil isotopique et la masse correspondant à ce pic sont identiques à ce qui a été observé pour le *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ en présence d'eau. Le même échange de ligand a donc lieu sur les deux isomères, et les complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]⁺ se transforment en [RuFT(Cl)(OH)(NO)]⁺.

III. 2. 3- Analyse par diffraction des rayons X

Un monocristal du produit transformé a été obtenu à partir d'une solution concentrée de *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ dans un mélange 50/50 eau/acétonitrile par diffusion d'éther diéthylique. Le complexe cristallise dans le groupe d'espace triclinique P-1 et la structure est représentée sur la **Figure III-9**.

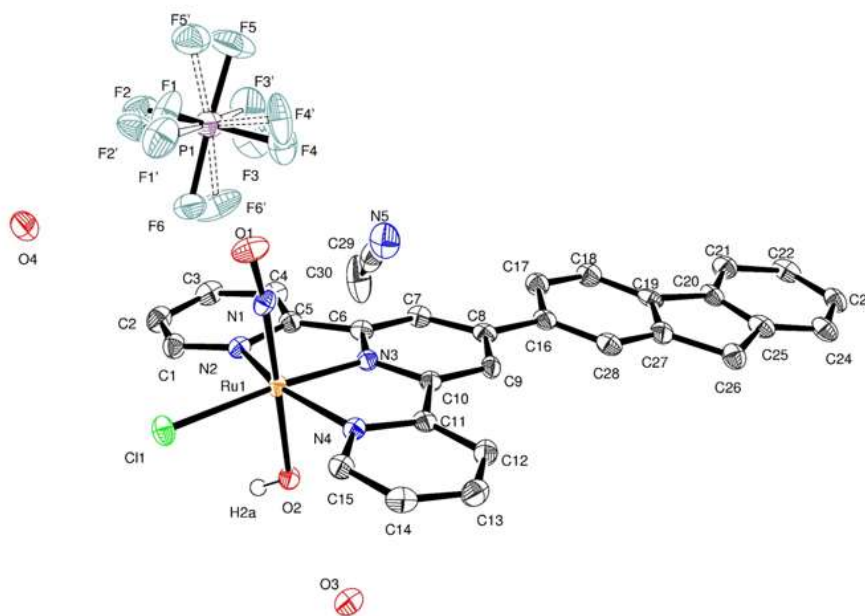


Figure III-9 : Structure cristallographique du produit *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ transformé dans l'eau

L'analyse par DRX montre que la substitution d'un ligand Cl par un OH a eu lieu. Le *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ se transforme en *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ en présence d'eau.

D'après le calcul des densités électroniques, l'unité asymétrique contient également le contre-ion PF₆⁻, deux molécules d'eau et une demi-molécule d'acétonitrile. L'ion PF₆⁻ présente un désordre au niveau de la position des atomes de fluor, mais la présence d'un seul

contre-ion est certaine. Un unique atome d'hydrogène a été placé sur le ligand OH et la présence d'un seul contre-ion sont deux arguments qui prouvent que le ligand final est un hydroxo et non pas un aquo.

La formule brute calculée est donc : $C_{28}H_{20}ClN_4O_2Ru, F_6P, 0,5 (C_2H_3N), 2 (H_2O)$.

Les paramètres de maille sont rassemblés dans le **Tableau III-1** suivant :

Tableau III-1 : Paramètres de maille de la structure de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆, 0,5 CH₃CN, 2 H₂O

| Distances (Å) | Angles (°) |
|------------------|-----------------------|
| a = 8,1415 (6) | $\alpha = 94,482 (2)$ |
| b = 11,4934 (7) | $\beta = 95,417 (2)$ |
| c = 16,4051 (11) | $\gamma = 97,154 (2)$ |

Un des ligands chloro en *cis* de la terpyridine a été remplacé par un ligand hydroxo OH. En effet, dans ce nouveau complexe, la densité électronique autour du ruthénium et donc les distances de liaisons calculées sont caractéristiques d'une liaison Ru-Cl et d'une liaison Ru-O. La longueur de la liaison Ru-Cl est de 2,4020(8) Å alors que celle de la liaison Ru-O est de 1,950(2) Å. L'électronégativité de l'atome d'oxygène étant supérieure à celle du chlore, il est logique de trouver une liaison plus courte dans le complexe transformé. La substitution d'un ligand chloro labile sur des complexes de ruthénium a déjà été mise en évidence dans la littérature. En milieu aqueux, le chlore peut être remplacé par une molécule de H₂O ou un groupement hydroxo.^{129,196}

La transformation observée est schématisée sur la **Figure III-10**.

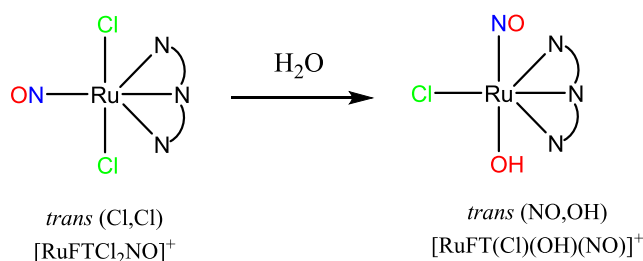


Figure III-10 : Transformation dans l'eau du complexe *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]⁺

Quant au ligand nitrosyle, il est toujours lié au ruthénium par l'azote, mais en position *cis* de la terpyridine, le dernier ligand Cl s'étant placé en *trans* du ligand tridente. La longueur de la liaison N-O est faiblement modifiée, ceci étant dû à l'échange de Cl par un ligand légèrement plus attracteur. Elle passe de 1,132(7) Å dans le *trans* (Cl,Cl)- à 1,147(4) Å dans le *trans* (NO,OH)-. Le fragment Ru-N-O reste quant à lui quasiment linéaire avec un angle de 173,8(3)°. Dans les deux complexes (avant et après transformation dans l'eau), la configuration électronique du fragment Ru-NO est la suivante : {Ru^{II}-NO⁺}.^{15,197}

En revanche, la position de la terpyridine n'a pas changé par rapport au complexe de départ, dont la structure obtenue par DRX est rappelée **Figure III-11**.¹⁰⁷

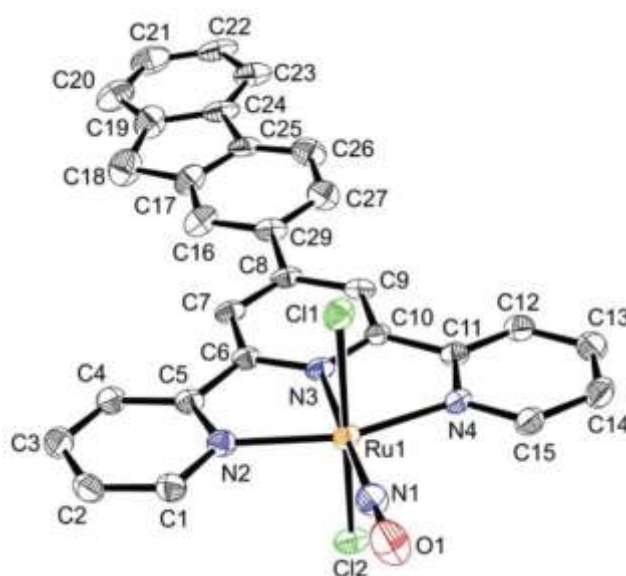


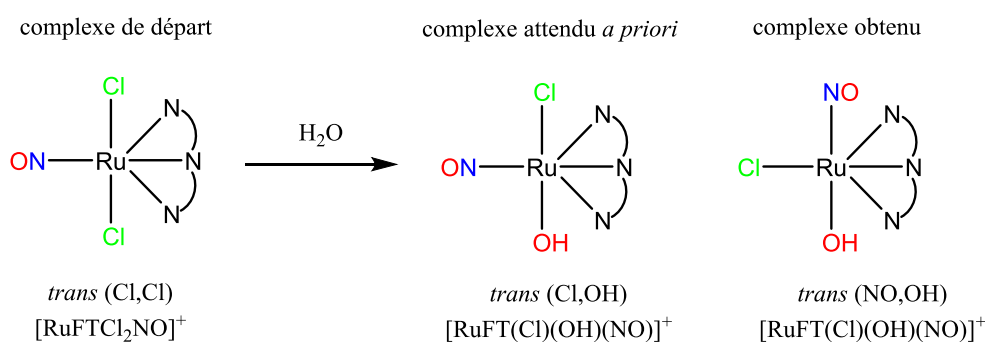
Figure III-11 : Structure cristallographique du *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]⁺

Le **Tableau III-2** rassemble les distances caractéristiques citées plus haut, telles que celle entre le ruthénium et les différents atomes d'azote de la terpyridine ou celle de la liaison N-O, ainsi que des angles entre ces atomes pour le complexe de départ et le complexe transformé en présence d'eau.

Tableau III-2 : Distances et angles caractéristiques des complexes *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]⁺ et *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]⁺

| Distances (Å) | <i>trans</i> (Cl,Cl)-[RuFTCl ₂ NO] ⁺ | <i>trans</i> (NO,OH)- [RuFT(Cl)(OH)(NO)] ⁺ |
|---|--|--|
| Ru-Cl | 2,3642(18) et 2,3478(18) | 2,4020(8) |
| Ru-O | - | 1,950(2) |
| N-O | 1,132(7) | 1,147(4) |
| Ru-N(2) _{terpy} | 2,081(6) | 2,086(3) |
| Ru-N(3) _{terpy} | 2,001(5) | 1,981(3) |
| Ru-N(4) _{terpy} | 2,073(6) | 2,081(3) |
| Angles (°) | <i>trans</i> (Cl,Cl)-[RuFTCl ₂ NO] ⁺ | <i>trans</i> (NO,OH)- [RuFT(Cl)(OH)(NO)] ⁺ |
| Ru-N-O | 179,5(6) | 173,8(3) |
| N(2) _{terpy} -Ru-N(4) _{terpy} | 156,4(2) | 158,06(11) |
| N(3) _{terpy} -Ru-N(2) _{terpy} | 77,6(2) | 79,64(11) |
| N(3) _{terpy} -Ru-N(4) _{terpy} | 78,7(2) | 79,51(11) |

L'isomère obtenu n'est pas celui qui aurait pu être attendu puisque tous les ligands ont subi un déplacement autour du ruthénium. En effet, par simple échange de ligand Cl/OH, le complexe attendu aurait été *trans* (Cl,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆, avec le ligand nitrosyle toujours en *trans* de la terpyridine, comme montré sur la **Figure III-12**. Il y a donc un réarrangement complet dans la sphère de coordination du métal.

**Figure III-12 : Représentation schématique du complexe de départ et des complexes attendus *a priori* et obtenu après transformation dans l'eau**

Pour plus de clarté, dans la **Figure III-12** ci-dessus, le ligand terpyridine n'est pas entièrement représenté.

Dans un second temps, l'analyse par DRX permet de mettre en évidence les liaisons Hydrogène existant entre deux cations de la même maille. Ces interactions sont présentées sur la **Figure III-13**.

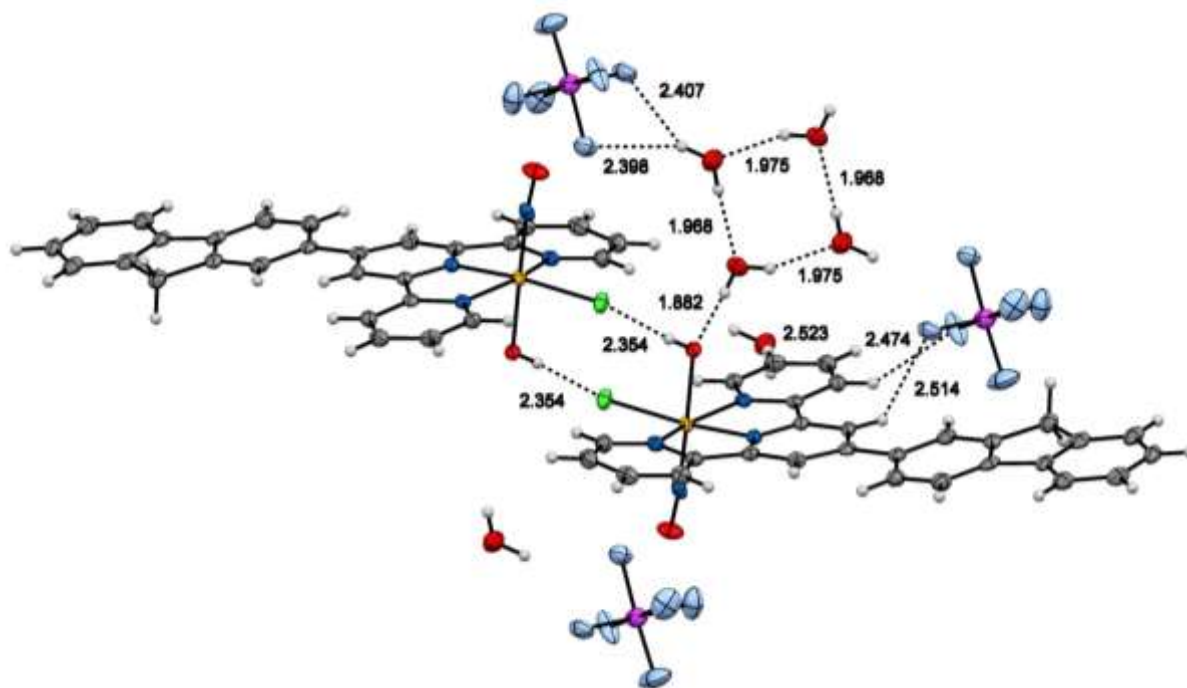


Figure III-13 : Structure cristallographique présentant les liaisons Hydrogène entre deux cations

Des liaisons Hydrogène ont pu être identifiées entre le ligand Cl en *trans* de la terpyridine d'un premier complexe et l'atome d'hydrogène porté par le ligand hydroxo d'un second complexe. La présence de ces deux liaisons Hydrogène intermoléculaires stabilise le complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆, ce qui ne pourrait pas être le cas pour le complexe attendu *a priori* (*trans* (Cl,OH)- [RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆). Il existe aussi une liaison Hydrogène entre le ligand OH et une molécule d'eau qui a co-cristallisé dans la maille. Des liaisons Hydrogène sont également créées entre une molécule d'eau et l'ion PF₆⁻.

En revanche, des cristaux n'ont pas pu être obtenus pour le *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆. Il n'est donc pas possible de conclure sur la nature de l'isomère de [RuFT(Cl)(OH)(NO)]⁺ qui est obtenu dans ce cas par la diffraction des rayons X. Mais l'hypothèse d'un simple échange de ligand Cl par OH sur le complexe est envisageable.

III. 2. 4- Influence de la transformation des complexes sur la fréquence d'élongation de la liaison N-O

En spectroscopie infrarouge, les bandes d'élongation de la liaison N-O se situent au-delà de 1820 cm^{-1} pour des complexes présentant le fragment $\{\text{Ru}^{\text{II}}\text{-NO}^+\}$.⁹¹

Selon la position des autres ligands, la bande relative à l'élongation de N-O peut varier de plusieurs cm^{-1} . En effet, le *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]⁺ présente une bande de vibration à 1903 cm^{-1} tandis que cette bande est à 1894 cm^{-1} pour son isomère *cis* (Cl,Cl)-. Dans le *trans* (Cl,Cl)-, le ligand nitrosyle est en *trans* de la terpyridine qui est π -accepteur, donc l'ordre de la liaison Ru-N est diminué et par conséquent celui de la liaison N-O est augmenté. Ceci se traduit par une augmentation de l'énergie de l'élongation de la liaison N-O par rapport au *cis* (Cl,Cl)-.¹⁰⁷

D'après la littérature, la fréquence d'élongation de la liaison N-O peut varier lorsque les ligands Cl sont remplacés par des ligands OH ou H₂O. En effet, sur des complexes [Ru(NH₃)₄(NO)(X)]Cl_n, Fairey *et al.* ont observé que le remplacement du ligand Cl par un ligand H₂O augmentait la fréquence de la bande N-O de 32 cm^{-1} alors que sa substitution par OH la faisait diminuer de 33 cm^{-1} .¹⁹⁸

Lorsque le *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]⁺ est transformé en présence d'eau, la fréquence d'élongation de la liaison N-O passe de 1903 cm^{-1} à 1894 cm^{-1} . Ceci correspond au comportement décrit lors du remplacement d'un ligand Cl par un OH. S'il y avait eu une substitution par H₂O, la fréquence aurait dû augmenter. En effet, le groupement OH⁻ est un meilleur ligand que Cl⁻ lorsqu'il est en *trans* du NO.¹²⁹ L'ordre de liaison Ru-N est donc augmenté et celui de la liaison N-O est diminué, ce qui est traduit par une diminution de la fréquence ν_{NO} .

De plus, dans le produit *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]⁺, on retrouve la bande d'élongation de N-O à la même fréquence que pour le *cis* (Cl,Cl)- [RuFTCl₂NO]⁺.

III. 2. 5- Calculs théoriques

III. 2. 5- a) Calculs de l'enthalpie libre des isomères de [RuFT(Cl)(OH)(NO)]⁺

Des calculs sont menés afin de justifier l'obtention de l'isomère *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]⁺ à partir du *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]⁺. Les trois isomères envisageables sont représentés sur la **Figure III-14**.

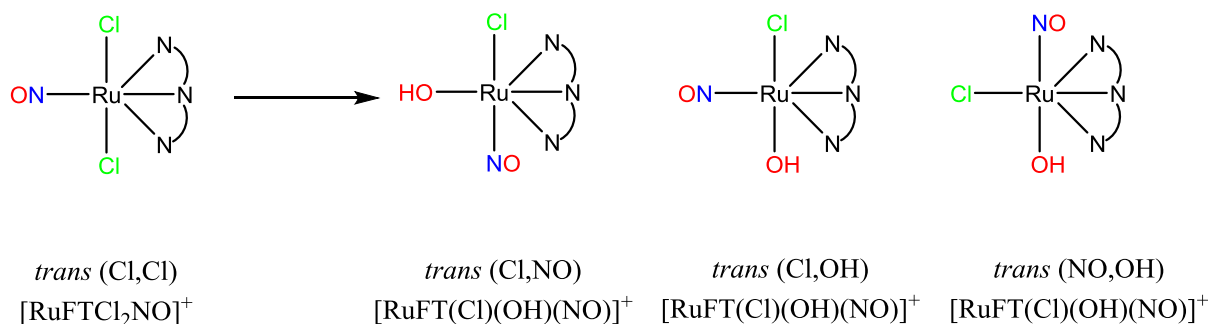


Figure III-14 : Structures simplifiées des trois isomères envisageables après transformation du *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]⁺ dans l'eau

Les répulsions électroniques entre les différents groupements ne semblent pas être minimisées de façon importante dans un des isomères plutôt que dans un autre.

Ainsi, pour comprendre pour quelle raison un tel réarrangement de la sphère de coordination du ruthénium a lieu, les enthalpies libres des trois isomères possibles sont calculées. La méthode utilisée est B3PW91 et les résultats sont présentés dans le **Tableau III-3**.¹⁰⁷

Tableau III-3 : Enthalpies libres des trois isomères de [RuFT(Cl)(OH)(NO)]⁺ envisageables (en Hartree et en kcal/mol)

| Enthalpie G | <i>trans</i> (Cl,NO) | <i>trans</i> (Cl,OH) | <i>trans</i> (NO,OH) |
|---------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| (en Ha) | -2001,576810 | -2001,58331 | -2001,592491 |
| (en kcal/mol) | -1,256009.10 ⁶ | -1,256013.10 ⁶ | -1,256019.10 ⁶ |

L'isomère *trans* (Cl,NO)- est le moins stable des trois isomères proposés. En effet, son énergie est supérieure de 4,1 kcal/mol par rapport au *trans* (Cl,OH)- et de 9,8 kcal/mol par rapport au *trans* (NO,OH)-. L'isomère le plus stable, avec une énergie de Gibbs plus faible

que les deux autres est le *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]⁺. Ceci est résumé sur la **Figure III-15**.

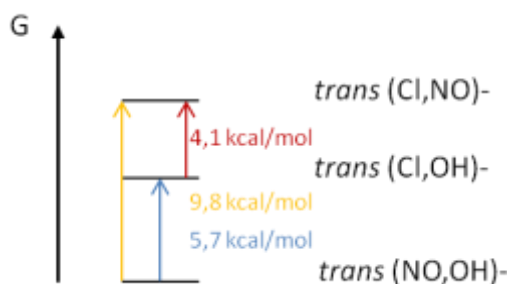


Figure III-15 : Schéma des enthalpies libres des trois isomères envisageables

Cela est cohérent avec les observations menées en diffraction des rayons X. Sa meilleure stabilité permet d'expliquer pourquoi cet isomère est obtenu préférentiellement.

III. 2. 5- b) Calculs théoriques des spectres d'absorption

Les spectres d'absorption théoriques du produit de départ *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]⁺, de son produit dans l'eau *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]⁺ et du *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]⁺ sont calculés afin de comparer les transitions impliquées dans le départ de NO[•].

Les calculs sont menés avec la méthode CAM-B3LYP/6-31G* pour les différentes propositions comme cela a été le cas pour plusieurs complexes similaires, avec l'eau comme solvant.¹⁰⁷

Le spectre théorique obtenu pour le produit de départ *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]⁺ est représenté sur la **Figure III-16**. La transition la plus intense se situe à 369 nm.

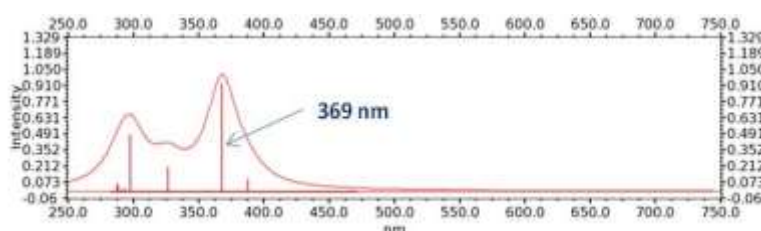


Figure III-16 : Spectre d'absorption théorique de *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]⁺, calculé dans l'eau

Celui de l'isomère *cis* (Cl,Cl)- est présenté sur la **Figure III-17**. Par rapport à son isomère, celui-ci est décalé vers les plus faibles longueurs d'onde, avec un maximum d'absorption à 354 nm.

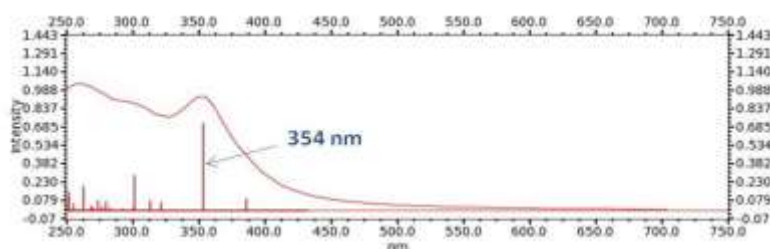


Figure III-17 : Spectre d'absorption théorique de *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]⁺, calculé dans l'eau

Le spectre théorique calculé pour le produit transformé dans l'eau *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]⁺ est tracé sur la **Figure III-18**.

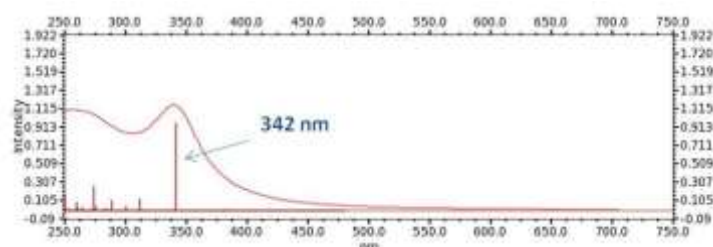


Figure III-18 : Spectre d'absorption théorique de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]⁺, calculé dans l'eau

La transition de plus faible énergie est décalée de 369 nm à 342 nm quand le produit évolue dans l'eau. Le décalage entre les transitions de plus basse énergie pour le *trans* (Cl,Cl)- et le *trans* (NO,OH)- correspond à une énergie de 2140 cm⁻¹. Ce blue-shift est dû à la substitution d'un ligand Cl par OH.

En effet, le calcul du spectre théorique de *trans* (Cl,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]⁺ montre que l'échange de ligand Cl par OH sans réarrangement a également un effet hypsochrome. La transition étudiée est décalée à 353 nm.

Expérimentalement, un décalage vers les faibles longueurs d'onde est donc attendu pour la transition de plus basse énergie du produit transformé par rapport au *trans* (Cl,Cl)- de départ.

Le **Tableau III-4** rassemble, pour chacun des trois complexes dont le spectre d'absorption théorique a été calculé, la longueur d'onde d'absorption maximale, la force d'oscillateur et la composition de la transition de plus basse énergie. Pour les trois complexes,

cette transition de plus basse énergie va de l'état fondamental vers le sixième état excité ($1 \rightarrow 7$).

Tableau III-4 : Caractéristiques de la bande de plus basse énergie pour les complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]⁺ et *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]⁺

| Complexe | Transition | λ_{\max} | f | Composition |
|-----------------------|-------------------|------------------|-------|---|
| <i>trans</i> (Cl,Cl)- | $1 \rightarrow 7$ | 369 | 0,665 | 68,9% 136 \rightarrow 137 + 10,8% 136 \rightarrow 139 |
| <i>cis</i> (Cl,Cl)- | $1 \rightarrow 7$ | 354 | 0,722 | 50,5% 136 \rightarrow 137 + 20,0% 136 \rightarrow 139 |
| <i>trans</i> (NO,OH)- | $1 \rightarrow 7$ | 342 | 0,961 | 65,6% 132 \rightarrow 133 + 14,6% 132 \rightarrow 135 |

Pour le *cis* (Cl,Cl)- et le *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]⁺, l'orbitale 136 correspond à la HOMO et la 137 à la LUMO. Pour le *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]⁺, l'orbitale 132 est la HOMO et la 133 est la LUMO. Dans les trois cas, les calculs ont montré que la transition de plus basse énergie a un caractère HOMO \rightarrow LUMO dominant.

Les densités électroniques des orbitales HOMO et LUMO des trois complexes sont représentées sur la **Figure III-19**.

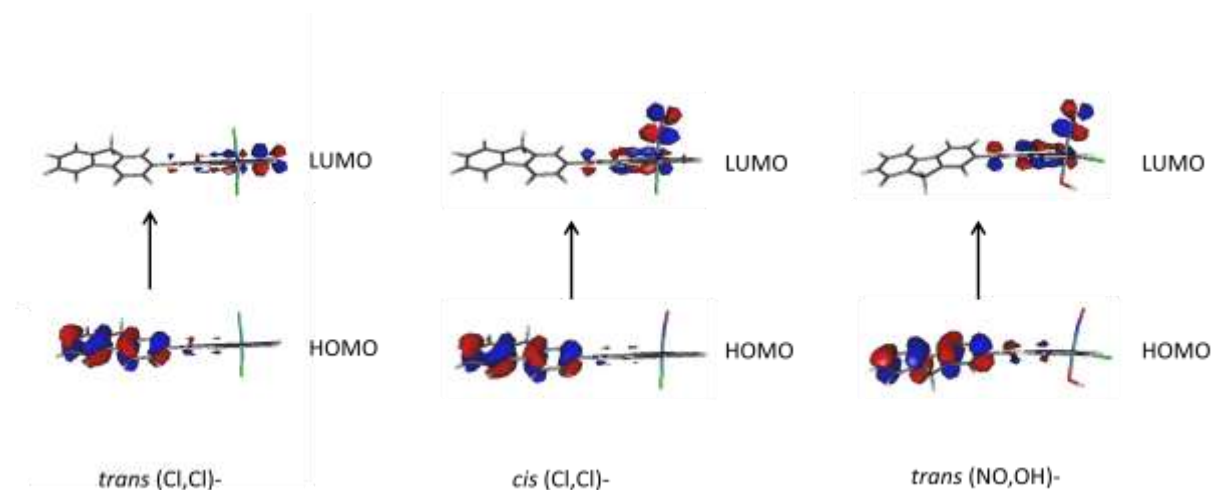


Figure III-19 : Orbitales HOMO et LUMO pour les complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]⁺ et *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]⁺

Pour les transitions HOMO \rightarrow LUMO des trois complexes *cis* (Cl,Cl)-, *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]⁺ et *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]⁺, il existe un transfert de charge du fragment fluorène vers des orbitales anti-liantes entre le métal et le ligand NO. Ce transfert de

charge diminue l'ordre de la liaison Ru-N et favorise le départ de NO^{*}. Cela suggère que l'excitation de cette transition doit induire le départ de NO^{*} et ce, également pour le complexe transformé dans l'eau.

Pour comparaison, le spectre d'absorption théorique de *trans* (Cl,H₂O)-[RuFT(Cl)(H₂O)(NO)]²⁺ est ensuite calculé. La **Figure III-20** montre que la transition de plus faible énergie est à 409 nm. Le maximum d'absorption, dans le cas d'une substitution du ligand Cl par le ligand H₂O, se décale donc vers les hautes longueurs d'onde par rapport au complexe *trans* (Cl,Cl)- de départ, contrairement à sa substitution par OH.

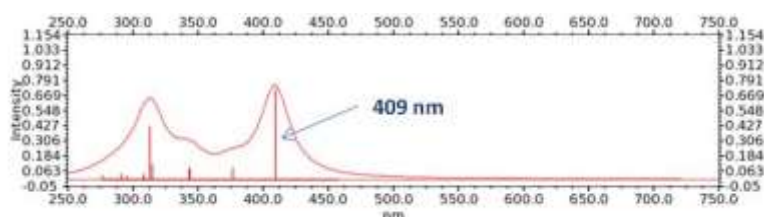


Figure III-20 : Spectre d'absorption théorique de *trans* (Cl,H₂O)-[RuFT(Cl)(H₂O)(NO)]²⁺, calculé dans l'eau

En résumé, la transformation du *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]⁺ en *trans* (Cl,H₂O)-[RuFT(Cl)(H₂O)(NO)]²⁺ est caractérisée par un red-shift de la bande de plus faible énergie, alors que sa transformation en *trans* (Cl,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]⁺ s'accompagne d'un blue-shift.

III. 2. 6- Suivi des spectres d'absorption des *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ en présence d'eau par spectroscopie UV-Vis

III. 2. 6- a) Evolution du *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆

Le complexe *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ est stable au moins 48 heures dans l'acétonitrile CH₃CN et dans le DMSO à l'abri de la lumière, d'après un suivi en spectroscopie d'absorption.

Le complexe n'étant pas soluble dans l'eau, pour étudier ses propriétés dans des conditions compatibles en biologie, ce dernier est d'abord solubilisé dans le DMSO, puis dans l'eau pour obtenir une solution à 0,5 % DMSO dans l'eau. Ces conditions sont connues pour ne pas avoir d'influence en biologie.

Des spectres d'absorption pris à différents temps après la mise en solution sont représentés sur la **Figure III-21**. Le maximum d'absorption situé à 280 nm est lié au ligand fluorène-terpyridine (FT), comme cela a été décrit dans le Chapitre II. Dans cette partie, le domaine d'intérêt se situe entre 300 et 800 nm.

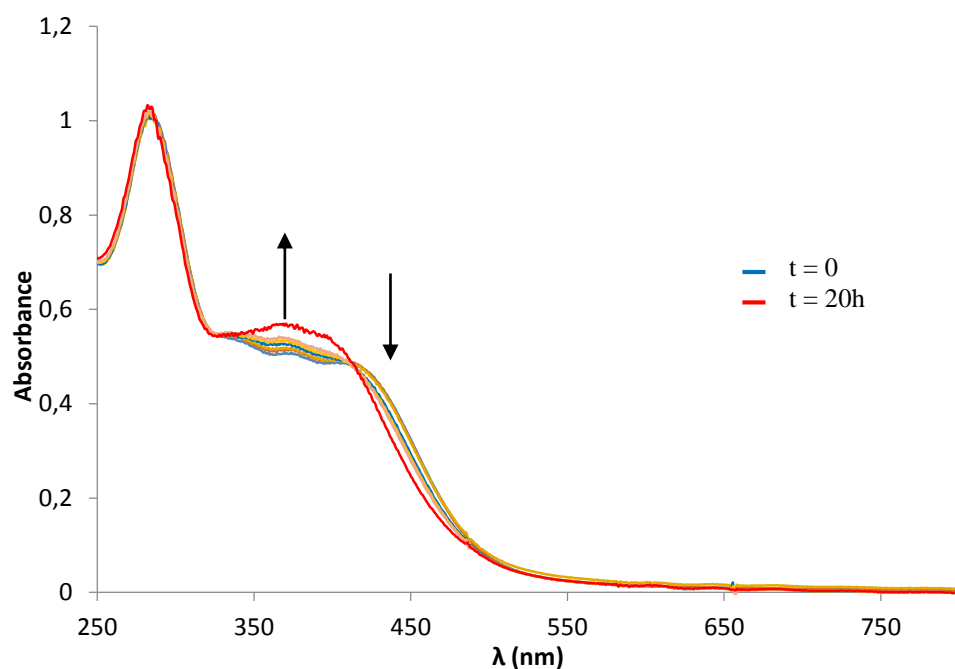


Figure III-21 : Evolution de *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ dans l'eau (0,5% DMSO)

La **Figure III-21** montre que le spectre d'absorption du *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ évolue au cours du temps sur le domaine 300-800 nm. A $t = 0$ min, le spectre présente trois maxima d'absorption : à 333 nm, 374 nm et 410 nm. L'absorbance augmente au cours du temps entre 325 nm et 408 nm, et diminue après 408 nm pour s'annuler au-delà de 600 nm. Le dernier spectre pris après 20 heures d'évolution présente un maximum d'absorption à 365 nm et cette espèce est stable dans l'eau (0,5% DMSO). Tous les spectres enregistrés lors de l'évolution du composé se croisent en un point isosbestique situé à 408 nm. Cela signifie qu'il existe un équilibre entre le composé de départ et l'espèce transformée, qui serait, d'après les précédentes analyses, *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆.

III. 2. 6- b) Evolution du *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆

La transformation de *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ doit à présent être étudiée dans l'eau. Comme pour son isomère *cis* (Cl,Cl)-, le complexe est solubilisé dans le DMSO, puis la solution est diluée dans l'eau afin d'avoir un pourcentage volumique final en DMSO de 0,5%. L'évolution des spectres d'absorption est représentée sur la **Figure III-22**. Comme pour le *cis* (Cl,Cl)-, le domaine d'intérêt se situe entre 300 et 800 nm.

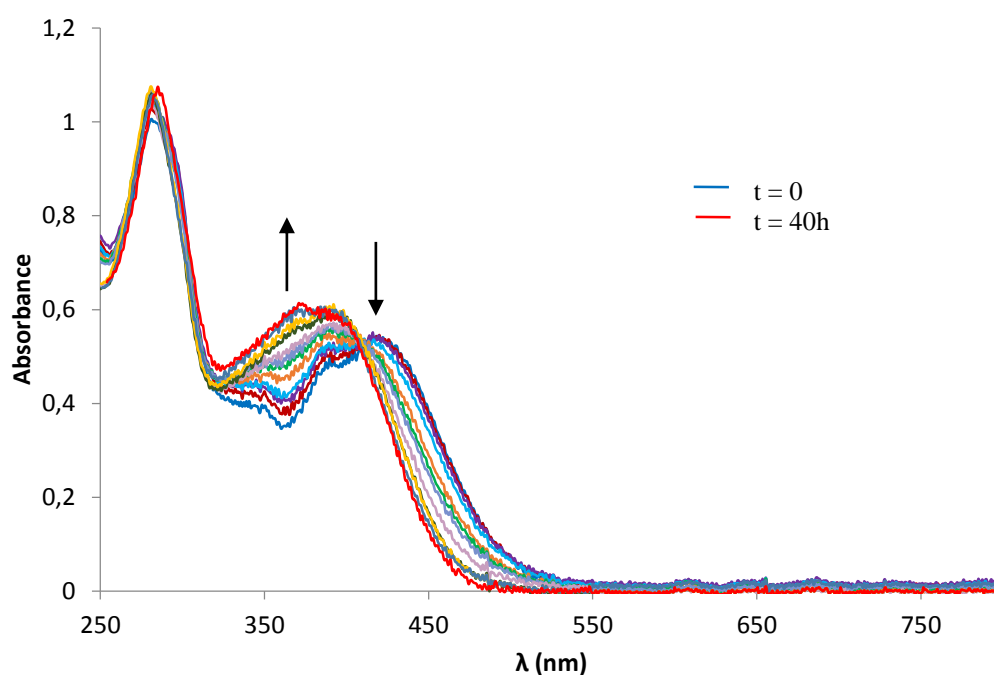


Figure III-22 : Evolution du spectre d'absorption de *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ dans l'eau (0,5% DMSO)

L'évolution débute dès les premières minutes et dure 40 heures. Avant la transformation, à $t = 0$ min, le maximum d'absorption se trouve à 420 nm. Ensuite, l'allure du spectre évolue très rapidement et le maximum d'absorption se décale à 390 nm. Plus tard, un nouveau maximum d'absorption à 365 nm apparaît et une espèce stable est obtenue après 40 heures d'évolution.

Au cours de l'évolution, les courbes d'absorbance se coupent en un point isobestique situé à 408 nm. L'absorbance augmente au cours du temps entre 315 nm et 408 nm, diminue après 408 nm et reste nulle au-delà de 600 nm.

III. 2. 6- c) Comparaison des évolutions des deux isomères de $[\text{RuFTCl}_2\text{NO}]^+$

Même si l'évolution est plus lente pour le *trans* (Cl,Cl)- $[\text{RuFTCl}_2\text{NO}]\text{PF}_6$ que pour son isomère *cis* (Cl,Cl)-, les deux suivis par spectroscopie d'absorption sont similaires. En effet, dans les deux cas, un point isosbestique à 408 nm est observé, ce qui met en évidence un équilibre entre deux espèces.

Les spectres obtenus après transformation complète des complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)- dans l'eau sont normalisés et tracés sur la **Figure III-23**. Les deux tracés sont quasiment superposables, ils présentent tous deux deux maxima d'absorption à 280 nm et 365 nm et une absorbance nulle après 600 nm.

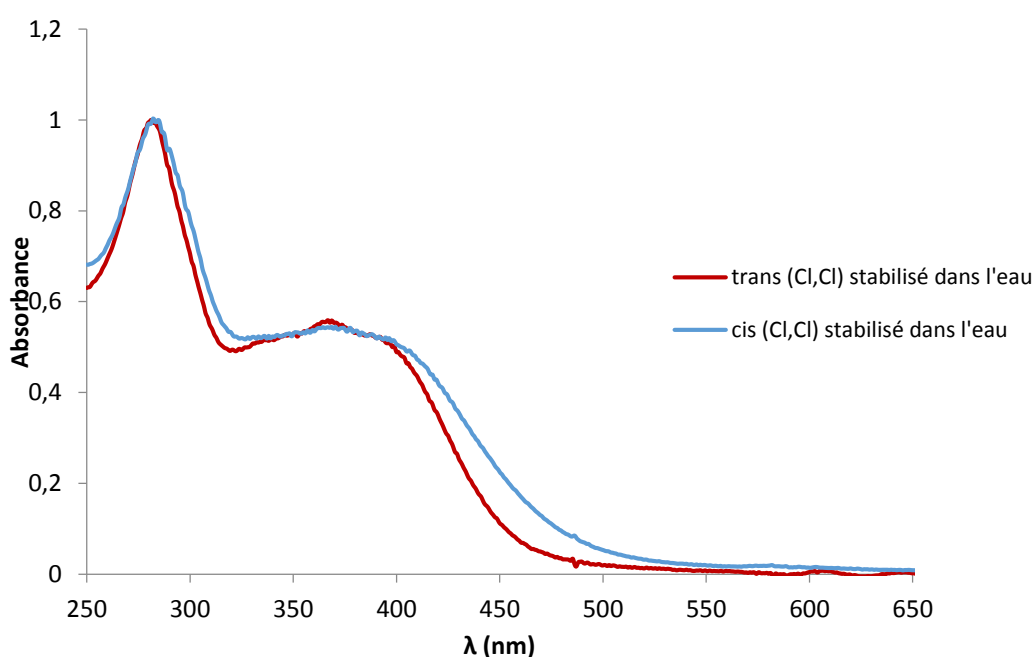


Figure III-23 : Comparaison des spectres d'absorption de *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)- $[\text{RuFTCl}_2\text{NO}]\text{PF}_6$ après évolution dans l'eau (0,5% DMSO)

D'après les analyses en spectrométrie de masse, les deux isomères *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)- $[\text{RuFTCl}_2\text{NO}]^+$ se transforment tous deux en $[\text{RuFT}(\text{Cl})(\text{OH})(\text{NO})]^+$ dans l'eau. Le fait que les spectres d'absorption soient superposables et que tous les deux soient décalés vers les faibles longueurs d'onde par rapport aux complexes de départ, suggèrent, grâce aux calculs théoriques, que les deux isomères se transforment en la même espèce : le *trans* (NO,OH)- $[\text{RuFT}(\text{Cl})(\text{OH})(\text{NO})]^+$.

III. 2. 7- Analyse par résonance magnétique nucléaire des produits transformés dans l'eau

La RMN du proton est une technique qui renseigne sur l'environnement des protons. Cela permet donc d'identifier les isomères obtenus dans l'eau par comparaison avec les produits *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)- de départ.

Sur la **Figure III-24** sont superposés les spectres RMN ^1H du *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ (en bleu), du *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ (en vert) et du *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ (en rouge). Les trois complexes ont été dissous dans l'acétonitrile deutéré CD₃CN.

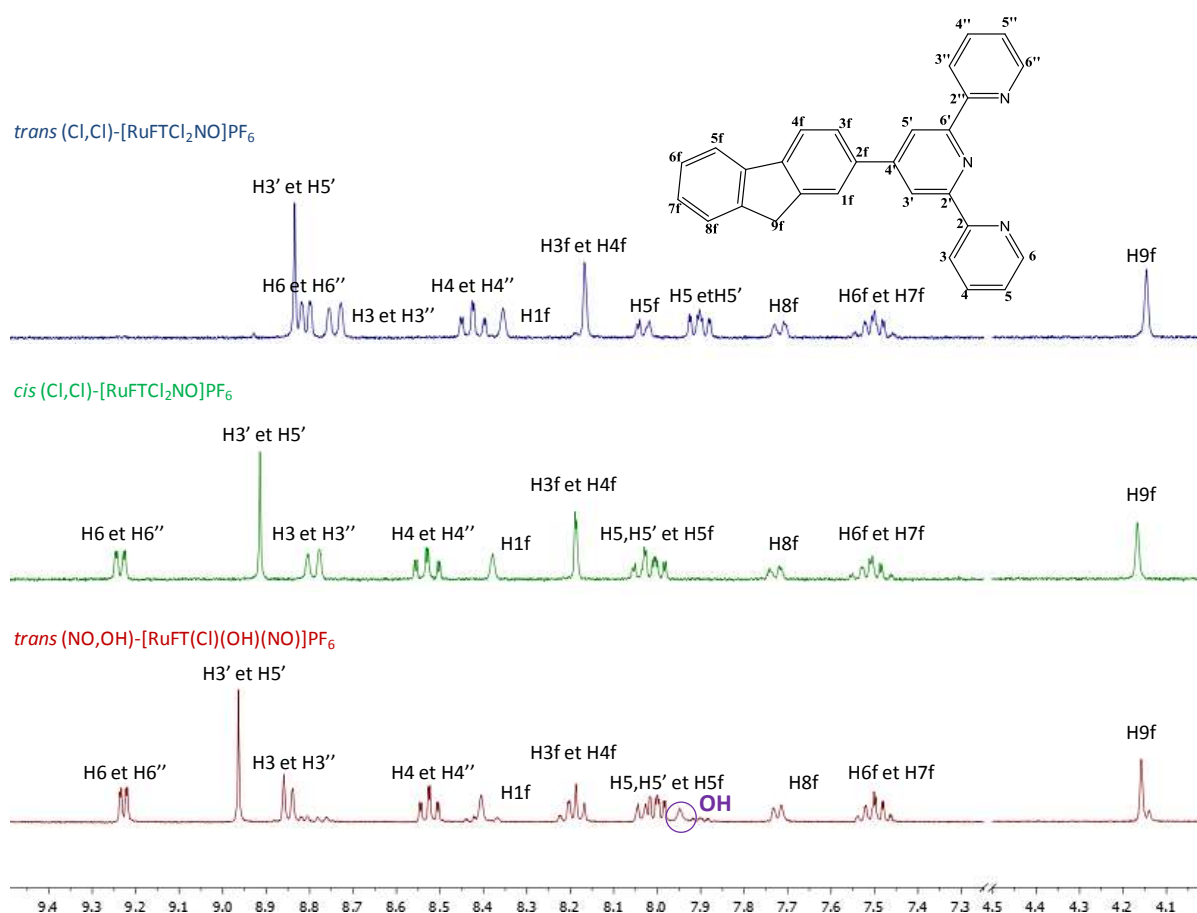


Figure III-24 : Comparaison des spectres RMN ^1H du *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ et du produit transformé *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ dans CD₃CN

D'après la **Figure III-24**, pour le produit transformé dans l'eau, le nombre de protons aromatiques est de 18. Il y a un proton de plus, sous la forme d'un singulet élargi situé à 7,95 ppm, correspondant à celui du ligand hydroxo. De plus, le doublet correspondant aux protons

H6 et H6'' de la terpyridine est plus déblindé dans le complexe transformé : il passe de 8,81 ppm pour le *trans* (Cl,Cl)- à 9,23 ppm pour le *trans* (NO,OH). Le singulet correspondant aux protons H3' et H5' est également plus déblindé dans le complexe transformé (8,96 ppm contre 8,82 ppm). Ces nouveaux déplacements chimiques sont similaires à ceux obtenus pour l'isomère *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ dans CD₃CN.¹⁰⁷ Cela signifie que lors de la transformation du *trans* (Cl,Cl)- dans l'eau, le ruthénium passe d'un environnement *trans* (Cl,Cl)- à un environnement proche du *cis* (Cl,Cl)-, qui est celui du *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]⁺.

Une analyse RMN ¹H est également réalisée sur le produit transformé dans l'eau à partir du *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆. Le nombre de protons total est également supérieur de 1 par rapport au produit de départ à cause de la substitution d'un ligand Cl par un OH. Le doublet correspondant aux protons H6 et H6'' de la terpyridine se situe au même déplacement chimique que le produit de départ (9,23 ppm pour le produit transformé et 9,24 ppm pour le *cis* (Cl,Cl)-). Cela montre que pour cet isomère, il n'y a pas de réarrangement des ligands et qu'un ligand Cl est directement remplacé par un ligand OH. Dans l'eau, le *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]⁺ se transforme donc en *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]⁺.

Les deux spectres RMN ¹H obtenus par transformation dans l'eau du *trans* (Cl,Cl)- et du *cis* (Cl,Cl)- sont quasiment superposables. Le **Tableau III-5** regroupe les différents signaux et leur déplacement chimique.

Tableau III-5 : Déplacements chimiques (en ppm) des signaux en RMN ¹H pour les différents complexes dans CD₃CN

| Protons | <i>trans</i> (Cl,Cl)- | <i>cis</i> (Cl,Cl)- | <i>trans</i> (Cl,Cl)- | <i>cis</i> (Cl,Cl)- |
|-------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | | transformé dans l'eau | transformé dans l'eau |
| H6 et H6'' | 8,81 | 9,24 | 9,23 | 9,22 |
| H3' et H5' | 8,82 | 8,91 | 8,96 | 8,93 |
| H3 et H3'' | 8,73 | 8,79 | 8,85 | 8,81 |
| H4 et H4'' | 8,43 | 8,53 | 8,52 | 8,49 |
| H1f | 8,34 | 8,38 | 8,40 | 8,38 |
| H3f et H4f | 8,17 | 8,19 | 8,24-8,16 | 8,21-8,14 |
| H5 et H5'' | 8,03-7,90 | 8,06-7,97 | 8,06-7,98 | 8,05-7,96 |
| OH | / | / | 7,95 | 7,15 |

| | | | | |
|-------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| H8f | 7,72 | 7,72 | 7,72 | 7,72 |
| H6f et H7f | 7,53-7,47 | 7,56-7,45 | 7,55-7,45 | 7,55-7,45 |
| H9f | 4,15 | 4,17 | 4,16 | 4,14 |

L'analyse par RMN du proton confirme que les deux isomères *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)- [RuFTCl₂NO]⁺ se transforment en la même espèce dans l'eau.

III. 2. 8- Proposition d'interprétation des mécanismes mis en jeu

Dans les paragraphes précédents, les techniques de spectroscopie UV-Vis et de RMN ¹H ont permis de conclure sur la transformation des isomères *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)- [RuFTCl₂NO]⁺ en une même espèce qui est le *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]⁺, comme le résume la **Figure III-25**.

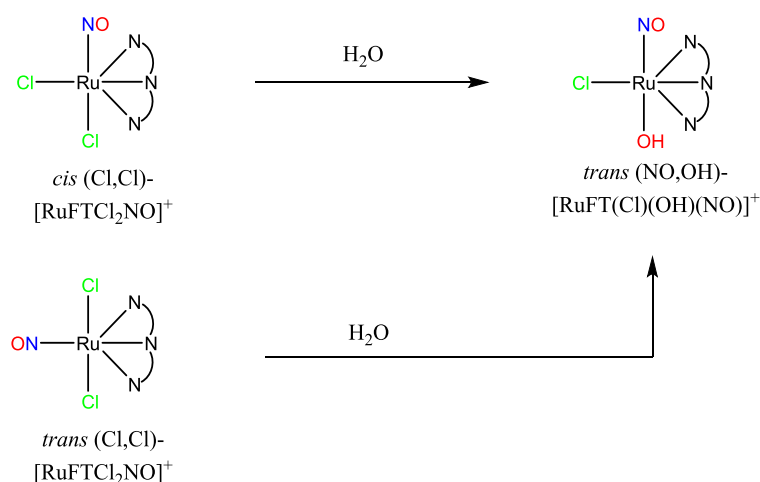


Figure III-25 : Transformation des isomères *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]⁺ en *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]⁺ dans l'eau

D'après les suivis d'absorption par spectroscopie UV-Vis, l'évolution du *cis* (Cl,Cl)- [RuFTCl₂NO]⁺ est assez rapide et la présence d'un point isobestique traduit l'existence d'un équilibre avec une seule espèce. Cette observation concorde avec le fait que pour se convertir en *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]⁺, il suffit qu'un ligand OH se substitue au ligand Cl situé en *trans* du nitrosyle sur le complexe *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]⁺. L'isomère *trans* (Cl,Cl)- doit aussi subir une réorganisation des ligands autour du métal. D'après Nagao *et al.*, la substitution d'un ligand Cl s'accompagne d'un déplacement du ligand nitrosyle qui était en *trans* de la terpyridine à la position *cis*.¹²⁹ Cependant, la présence d'un point isobestique dans

le suivi des spectres d'absorption suggère que cette étape est assez rapide, de sorte que l'évolution qui est suivie par spectroscopie correspond à l'échange de ligand, comme observé pour le complexe *cis* (Cl,Cl)-.

La réaction ayant lieu en milieu aqueux, l'hypothèse de la substitution du ligand Cl par une molécule d'H₂O est émise, induisant la formation d'intermédiaire(s) non caractérisé(s) (**Figure III-26**).

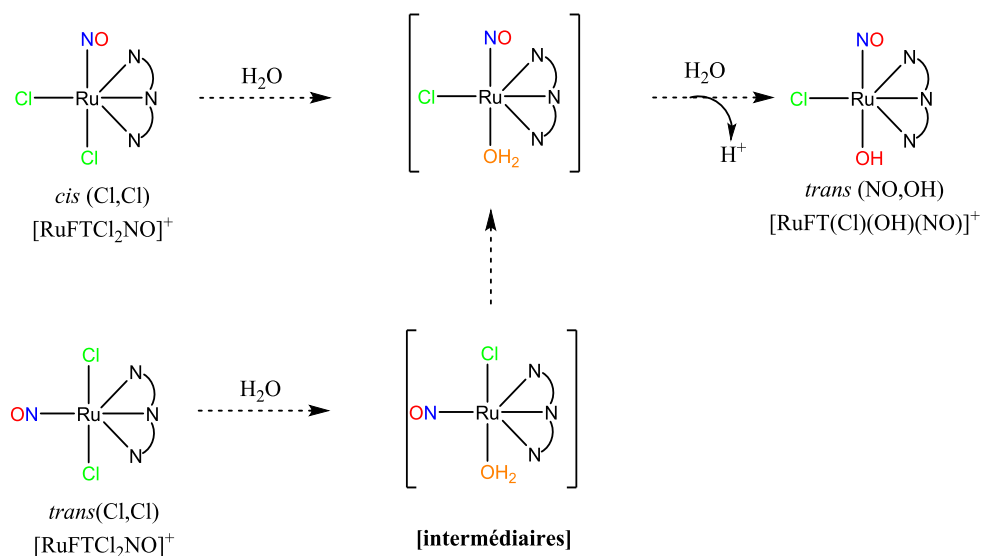
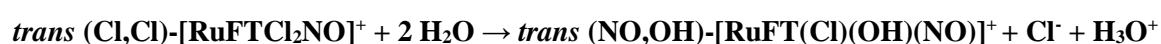


Figure III-26 : Proposition d'étapes de transformation des *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)- [RuFTCl₂NO]⁺ dans l'eau

La variation d'enthalpie libre de la réaction d'échange avec H₂O est calculée à partir de l'isomère *trans* (Cl,Cl)- :



Pour cette réaction, le calcul donne $\Delta G^\circ = + 38,6$ kcal/mol (méthode B3PW91/6-31G*). Cette valeur indique que la réaction n'est pas thermodynamiquement favorable.

Le même type de calcul est donc réalisé sur la réaction de substitution par OH⁻ :



Dans ce cas, la variation d'enthalpie libre est négative ($\Delta G^\circ = -58,9$ kcal/mol), la réaction est donc thermodynamiquement favorable. Or, l'échange ayant lieu en milieu aqueux à pH≈6, peu d'ions OH⁻ sont présents en solution pour substituer directement le ligand Cl. De plus, le ligand nitrosyle (NO⁺), qui est sensible en condition basique, se transformerait aisément en NO₂⁻. Or cela n'est pas constaté. Le mécanisme de cette transformation est donc plus complexe, avec la mise en jeu d'un mécanisme concerté.

La transformation des complexes dans l'eau présentée dans cette partie est plus ou moins rapide selon l'isomère. D'après les suivis par spectroscopie UV-Vis, les solutions de complexe qui sont utilisées 48 heures après la mise en solution sont constituées uniquement de l'espèce transformée *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]⁺. Dans la suite des travaux, les études menées sur le complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]⁺ sont faites sur ces solutions stabilisées.

D'après les études précédentes, il peut être considéré que pendant les premiers temps de l'évolution, ce sont les complexes de départ *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]⁺ qui sont en solution. Par la suite, ces complexes évoluent dans l'eau et pendant leur transformation (avant la stabilisation), ils sont notés : *cis* (Cl,Cl)* et *trans* (Cl,Cl)*. Sous irradiation, l'évolution de l'absorbance qui sera enregistrée pourra donc provenir de deux phénomènes simultanés : la transformation des complexes de départ en *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]⁺ et la photolibération de NO[•].

III. 3. Propriétés photochimiques du complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ dans l'eau

Dans la partie précédente, la transformation des deux isomères *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ dans l'eau a été caractérisée. Les propriétés de photolibération de NO[•] par ce nouveau complexe doivent être étudiées dans l'eau, dans des conditions proches de celles utilisées en biologie.

III. 3. 1- Mise en évidence de la photolibération de NO[•] dans l'eau

De la même façon que dans l'acétonitrile, pour apporter une preuve directe de la nature du produit libéré par irradiation, la résonance paramagnétique électronique (RPE) est utilisée. Le radical NO[•] ayant une très faible durée de vie en solution (de l'ordre de quelques millisecondes), le piègeur [Fe^{II}(MGD)₂] permet de pouvoir observer l'adduit [Fe(MGD)₂-NO[•]] (car le Fe^{II} qui est bas spin est silencieux en RPE).

Une solution de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ dans l'eau (avec 0,5% DMSO) est analysée par RPE sous irradiation à un photon à l'aide d'une lampe à mercure. Sur la **Figure III-27** sont représentées les courbes obtenues au cours de l'irradiation.

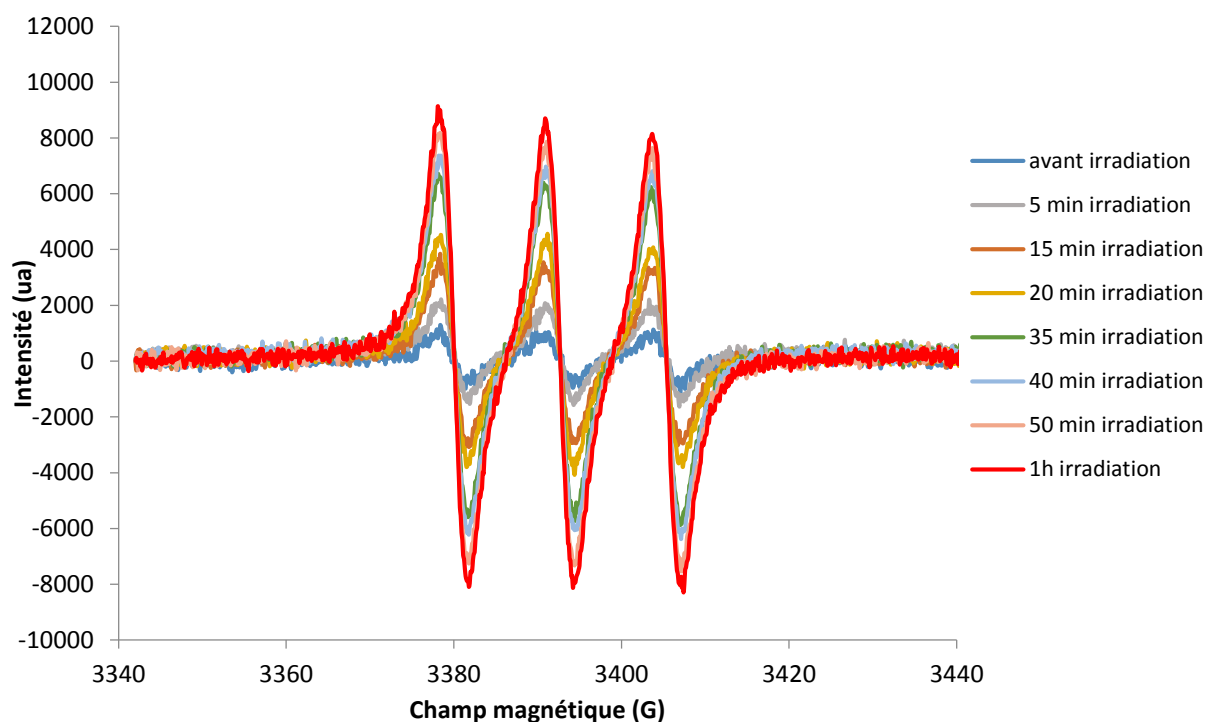


Figure III-27 : Signal RPE obtenu par irradiation du *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ dans l'eau en présence de piègeur de spin

Les signaux obtenus sont des triplets, avec un facteur de Landé $g = 2,040$ et une constante de couplage hyperfin $a = 1,20 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$, caractéristiques de l'adduit formé avec NO[•].¹⁸⁰

Un léger signal est détecté avant irradiation, une faible quantité de NO[•] étant libérée par la luminosité ambiante. La **Figure III-27** montre que l'intensité du signal dû à la libération de NO[•] augmente avec le temps d'irradiation. Cette expérience prouve que le NO[•] peut être photolibéré dans des conditions proches de celles utilisées en biologie (eau, 0,5% DMSO).

De plus, la même expérimentation est réalisée en utilisant une solution de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ dans l'eau (0,5% DMSO) dans laquelle de l'argon a préalablement été bullé pendant une heure. Sur la **Figure III-28** sont superposés les signaux obtenus après 20 minutes d'irradiation pour la solution faite dans l'eau (présentée **Figure III-27**) et pour la solution dépourvue d'oxygène.

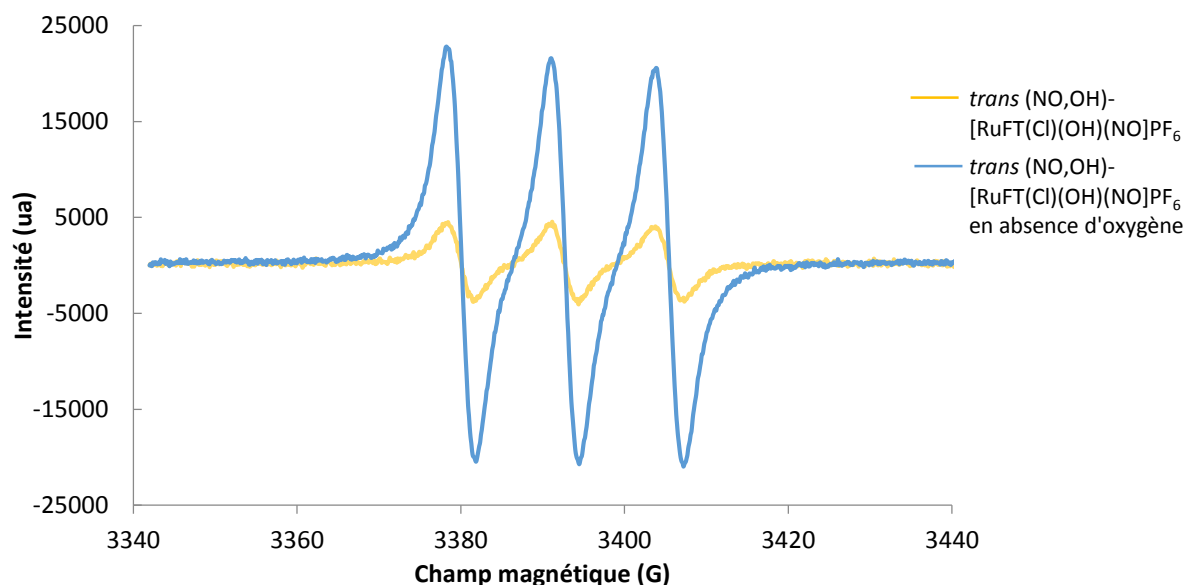


Figure III-28 : Signaux RPE obtenus après 20 min d'irradiation d'une solution de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ en présence (courbe jaune) et en absence (courbe bleue) d'oxygène

Les signaux caractéristiques du NO[•] piégé montrent que pour un même temps d'irradiation, la quantité de NO[•] libérée par le complexe est environ cinq fois supérieure dans le cas de la solution dans laquelle l'argon a été bullé. En effet, en l'absence d'oxygène, le NO[•] n'a plus la possibilité de s'oxyder (en nitrites et nitrates) donc la réaction de complexation avec le piègeur n'est plus en compétition avec l'oxydation. La totalité du NO[•] généré est donc visible en RPE.

L'utilisation d'un piègeur et la visualisation du signal triplet en RPE apportent une preuve directe de la libération de NO[•] sous irradiation dans l'eau. Cette technique ne permet pas une approche quantitative de la photolibération dans ces conditions.

III. 3. 2- Quantification de la libération de NO[•] dans l'eau

III. 3. 2- a) Principe de détection par une électrode spécifique de NO[•]

Une des techniques les plus courantes pour mesurer une concentration de NO[•] en milieu aqueux est l'électrochimie, plus précisément l'utilisation d'une électrode spécifique de NO[•].

L'électrode spécifique de NO[•] utilisée est composée d'un capteur ampérométrique, recouvert de plusieurs membranes assurant la sélectivité des espèces titrées. Le gaz NO[•] peut diffuser à travers ces membranes jusqu'à l'électrode. Le potentiel appliqué à cette électrode provoque l'oxydation du NO[•] en NO⁺, et le courant issu des électrons générés est enregistré. Ce courant est proportionnel à la concentration de NO[•] diffusant à travers la membrane de l'électrode et donc à la concentration de NO[•] en solution.

La solution contenant le donneur de NO[•] doit être sous agitation afin que la concentration soit homogène dans la solution ainsi que dans la membrane de l'électrode.

L'électrode utilisée dans ces travaux pour la mesure de la concentration de NO[•] libéré par l'irradiation de complexes de ruthénium à ligand nitrosyle est une ami-NO 700, provenant de chez Innovative Instruments Inc. Il s'agit d'une électrode combinée, c'est-à-dire que ni électrode de référence ni contre-électrode ne sont nécessaires.

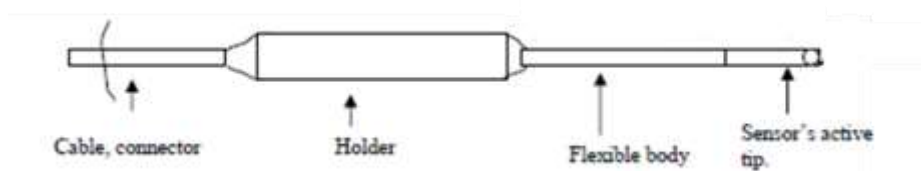


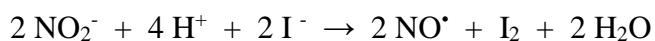
Figure III-29 : Schéma de l'électrode NO ami-NO 700, Innovative Instruments Inc.

III. 3. 2- b) Calibration de l'électrode

Afin de relier le courant mesuré à la concentration de NO[•] en solution, une calibration est nécessaire. Il s'agit de générer une concentration connue de NO[•], de mesurer le courant résultant et de calculer le coefficient permettant de relier ces deux grandeurs. Ce coefficient est la sensibilité de l'électrode, valeur homogène à une intensité divisée par une concentration (pA/nM).

Plusieurs techniques de calibration existent : à partir de gaz NO• directement bullé dans une solution aqueuse désoxygénée, à partir de SNAP (S-nitroso-acétylpénicillamine) en solution aqueuse en présence d'ions Cu²⁺, ou à partir de nitrates en solutions.

C'est cette dernière technique qui est utilisée dans cette étude. En effet, la réduction en milieu acide de NO₂⁻ donne NO• en solution aqueuse, selon l'équation de réaction :



En pratique, il s'agit d'ajouter, sous agitation constante, un volume connu d'une solution de NaNO₂ de concentration connue dans une solution aqueuse, contenant un excès de KI, acidifiée par H₂SO₄. La réaction de réduction étant équimolaire, la concentration de NO₂⁻ mise en solution est égale à la concentration de NO•, qui correspond au courant mesuré. La **Figure III-30** présente une calibration de l'électrode NO autour de 100 nM (le volume total étant de 20 mL).

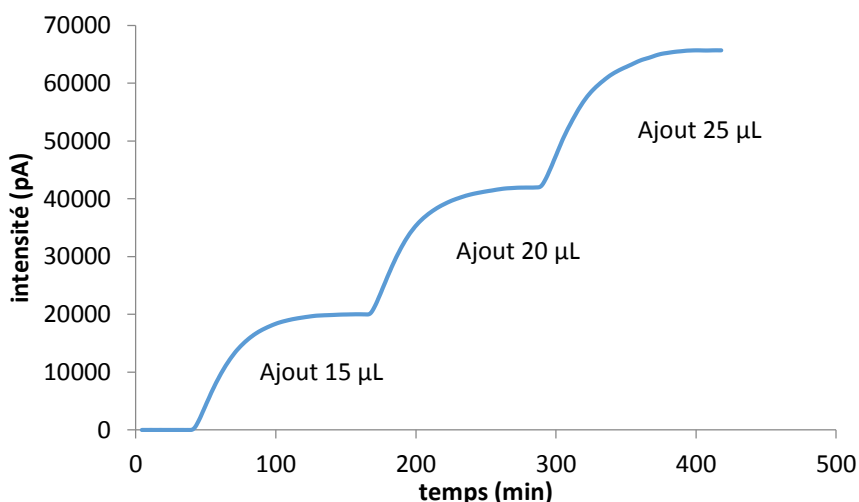


Figure III-30 : Exemple de calibration de l'électrode NO par ajout de NaNO₂ dans une solution acidifiée contenant KI

III. 3. 2- c) Mise au point du protocole expérimental

La libération de NO• est provoquée par l'irradiation de la solution à l'aide d'une lampe à vapeur de mercure.

Des premiers essais d'irradiation en continu ont été menés. Malheureusement ceux-ci n'ont pas permis de rendre compte de la concentration totale de NO• libéré. En effet, lorsque la solution aqueuse de complexe est placée sous irradiation continue, le courant atteint assez rapidement un maximum alors que la totalité du composé en solution n'a pas réagi. Cela est

expliqué par le fait que la longue irradiation libère une quantité importante de NO[•] et ce maximum correspond au début de la dégradation du NO[•] par des réactions d'oxydation en nitrites et nitrates. La compétition entre la réaction à l'électrode et la réaction de dégradation du NO[•] masque la production de NO[•]. Le courant mesuré arrête d'augmenter et commence même à diminuer. Quand l'irradiation est stoppée, il n'y a plus de production de NO[•] et le signal chute brutalement, puisque seule la dégradation du NO[•] est enregistrée. Si la solution est irradiée à nouveau, le signal recommence à augmenter car il y a production de NO[•]. Cela montre que l'irradiation continue ne permet pas de rendre compte de la totalité du NO[•] libéré.

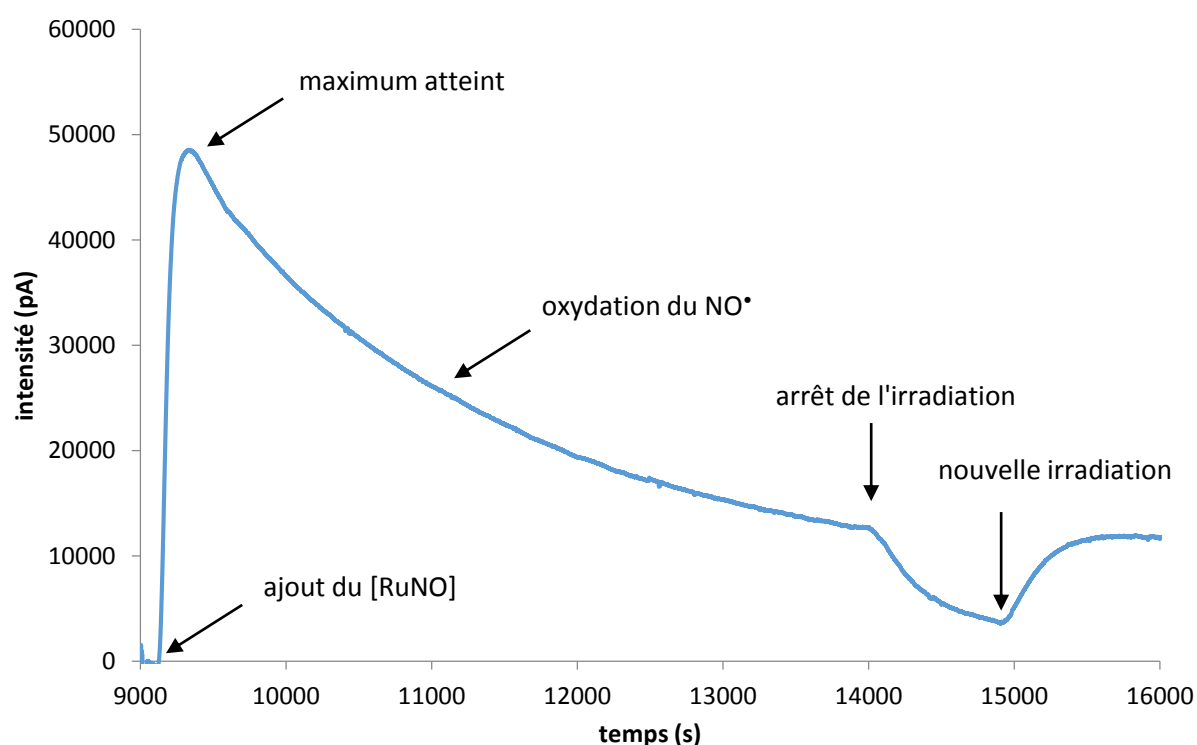


Figure III-31 : Signal de NO[•] enregistré sous irradiation continue de la solution contenant le complexe

Pour ces raisons, le mode d'irradiation choisi est l'utilisation de courtes irradiations successives.¹⁹⁹ Cela permet au système de prendre en compte la totalité de la quantité de NO[•] libérée à chaque irradiation, et ce, jusqu'à ce qu'un plateau soit atteint, ce qui signifie que tout le complexe en solution a réagi.

L'étude de l'irradiation d'une solution aqueuse sans donneur de NO[•] a permis de mettre en évidence la présence d'artéfacts dus aux flashes d'irradiation. En effet, même en plaçant l'électrode NO en dehors du flux lumineux de la fibre, comme cela est préconisé par

le groupe de Mascharak²⁰⁰ ou de Liu²⁰¹, un courant est mesuré à chaque irradiation. Chaque flash entraîne la même augmentation de courant et le léger échauffement de la solution est traduit par la dérive de la ligne de base du signal. Le signal engendré par l'irradiation 15 secondes toutes les 110 secondes est représenté sur la **Figure III-32**.

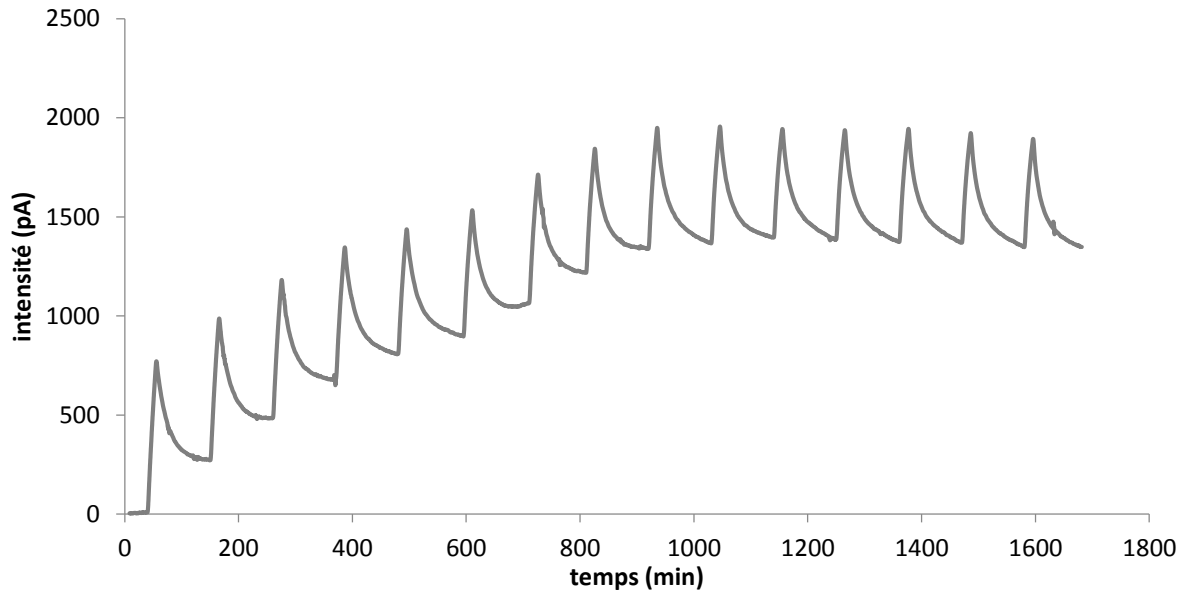


Figure III-32 : Signal « parasite » enregistré par l'électrode NO dû uniquement à l'irradiation

Afin de tenter de réduire ces artéfacts dus à l'irradiation, plusieurs montages ont été envisagés. La première suggestion concernait la focalisation du faisceau de la fibre dans la solution, afin que celui-ci ne rencontre pas l'électrode. Malheureusement, cette technique n'a pas permis l'affranchissement de ces artéfacts. En effet, le graphe de la **Figure III-33** montre qu'à chaque irradiation de 20 secondes, toutes les 50 secondes, un courant est mesuré.

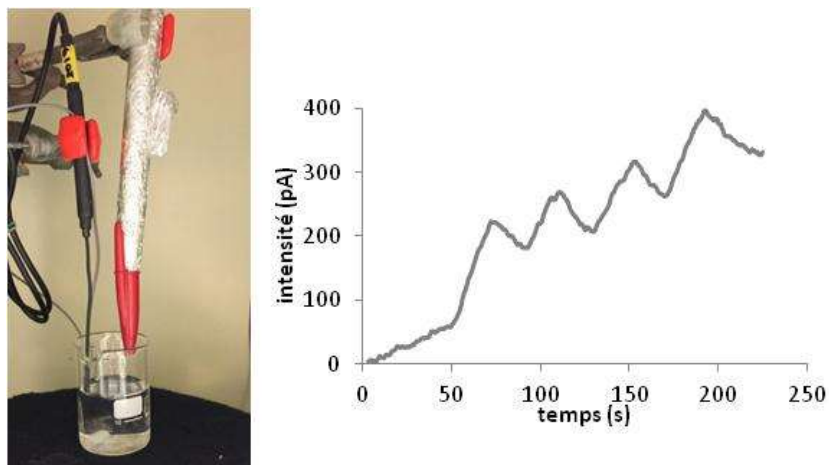


Figure III-33 : Premier montage proposé (à gauche) et artéfacts dus à l'irradiation mesurés par l'électrode NO (à droite)

Le second montage envisagé est l'irradiation de la solution et l'utilisation d'une protection de l'électrode afin d'empêcher le flux lumineux de l'atteindre directement, comme montré sur la **Figure III-34**.

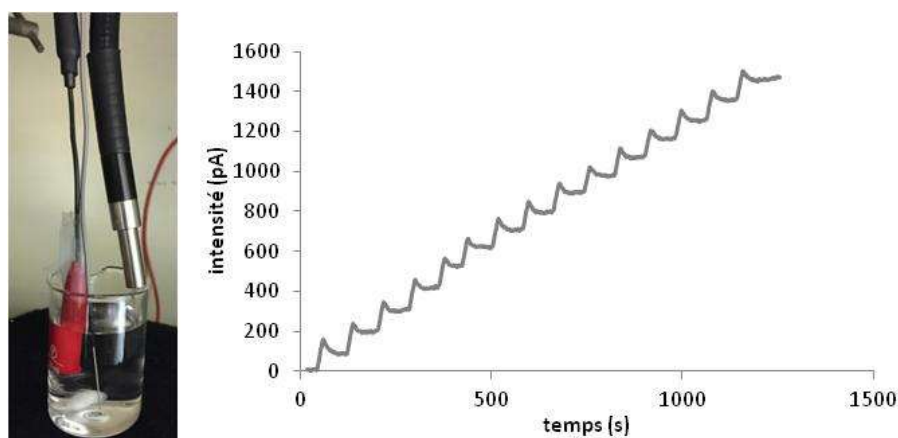


Figure III-34 : Second montage proposé (à gauche) et artéfacts dus à l'irradiation mesurés par l'électrode NO (à droite)

Cette technique non plus n'a pas permis d'annuler les artéfacts dus à l'irradiation. Au bout de 250 secondes, l'intensité du courant est environ de 400 pA, ce qui est le cas dans le montage de la **Figure III-33** également.

Différents contenants pour la solution aqueuse ont également été testés afin de réduire la réflexion de la lumière par le verre blanc. Des béccher teintés en noir, des béccher en téflon et des barreaux aimantés foncés ont été utilisés. Mais ces derniers ne permettaient pas d'améliorer l'expérimentation.

Pour rendre compte du courant généré par la libération de NO^* uniquement, le signal parasite dû à l'irradiation doit être retranché du signal brut enregistré après l'irradiation de la solution contenant le complexe de ruthénium à ligand nitrosyle.

Finalement, toutes les méthodes expérimentées requièrent la soustraction du signal intrinsèque à l'irradiation, donc un montage simple sans protection est utilisé et le protocole qui est choisi est le suivant. Après la calibration de l'électrode et la mesure de sa sensibilité, un « blanc », qui correspond au signal « parasite » de l'irradiation dans l'eau, doit être enregistré. Ensuite, le signal brut est mesuré pendant l'irradiation de la solution aqueuse du complexe. Pour finir, le « blanc » est retranché informatiquement au signal brut et le courant généré par NO^* uniquement est obtenu.

Par exemple, la mesure du courant généré par la photolibération de NO[•] par le *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ (irradié par une lampe à mercure) en fonction du temps est montrée sur la **Figure III-35**.

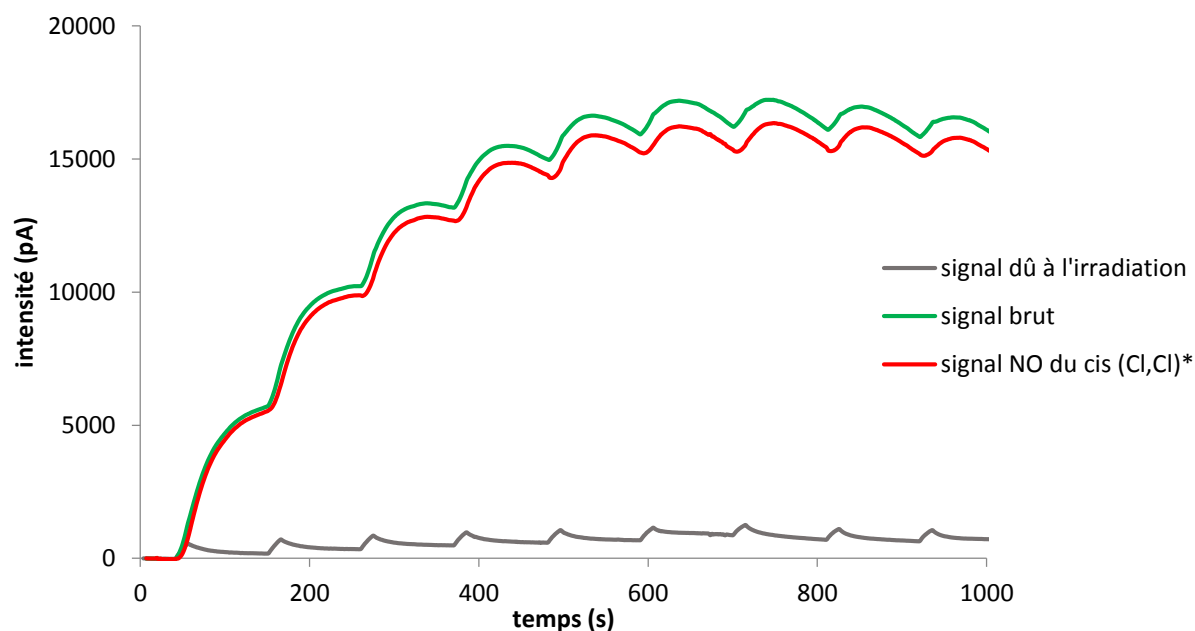


Figure III-35 : Signal du NO[•] photolibéré après soustraction du signal artéfact

La courbe grise représente le signal de l'irradiation de la lampe dans l'eau pure et la verte correspond au signal enregistré après irradiation de la solution aqueuse de *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆. La courbe rouge est la différence des deux précédentes et correspond uniquement au signal du NO[•]. Pour d'importantes concentrations de NO[•] libéré, comme ici 400 nM, le signal de l'irradiation seule est pratiquement négligeable.

Dans le prochain paragraphe, les courbes de libération de NO[•] en fonction du temps présentées montrent uniquement le signal dû au NO[•], celui de l'irradiation ayant déjà été retranché.

III. 3. 2- d) Mesure de la concentration de NO[•] libéré par irradiation

Plus tôt dans ce chapitre, la transformation des isomères *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ a été mise en évidence. Il est donc capital de vérifier que le complexe obtenu dans l'eau conserve sa capacité de photolibération de NO[•].

Après avoir calibré l'électrode et enregistré le signal de l'irradiation dans l'eau pure, la libération des complexes *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆, *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ et *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ peut être comparée.

Des irradiations courtes de 15 secondes, toutes les 110 secondes constituent la méthode d'irradiation choisie pour mesurer la concentration de NO[•] photolibéré. Ces paramètres de temps permettent au signal de NO[•] de se stabiliser après chaque irradiation, ce qui correspond à une concentration de NO[•] stable, mais ils sont choisis aussi pour que l'irradiation suivante ait lieu avant que le signal de NO[•] ne commence à décroître (oxydation en nitrites et nitrates). La durée totale de l'irradiation est de 15 minutes, car c'est la période durant laquelle l'évolution de la libération de NO[•] est la plus importante.

Lors de la mesure de la concentration de NO[•] libéré par les *trans* (Cl,Cl)- et *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆, les solutions dans l'eau sont préparées au dernier moment, entre 30 secondes et 1 minute avant la mesure. D'après l'étude de l'évolution du spectre d'absorption UV-Vis faite en **III. 2. 6-**, dans cette gamme de temps, les produits ne sont pas encore transformés en *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ au début de l'expérience. Les complexes évoluent ensuite dans l'eau donc d'après le paragraphe **III. 2. 8-**, les complexes *cis* (Cl,Cl)* ou *trans* (Cl,Cl)* sont étudiés.

La même expérimentation est menée sur une solution transformée en *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆. La **Figure III-36** rassemble les courbes de libération de NO[•] au cours du temps pour les trois complexes précédemment cités.

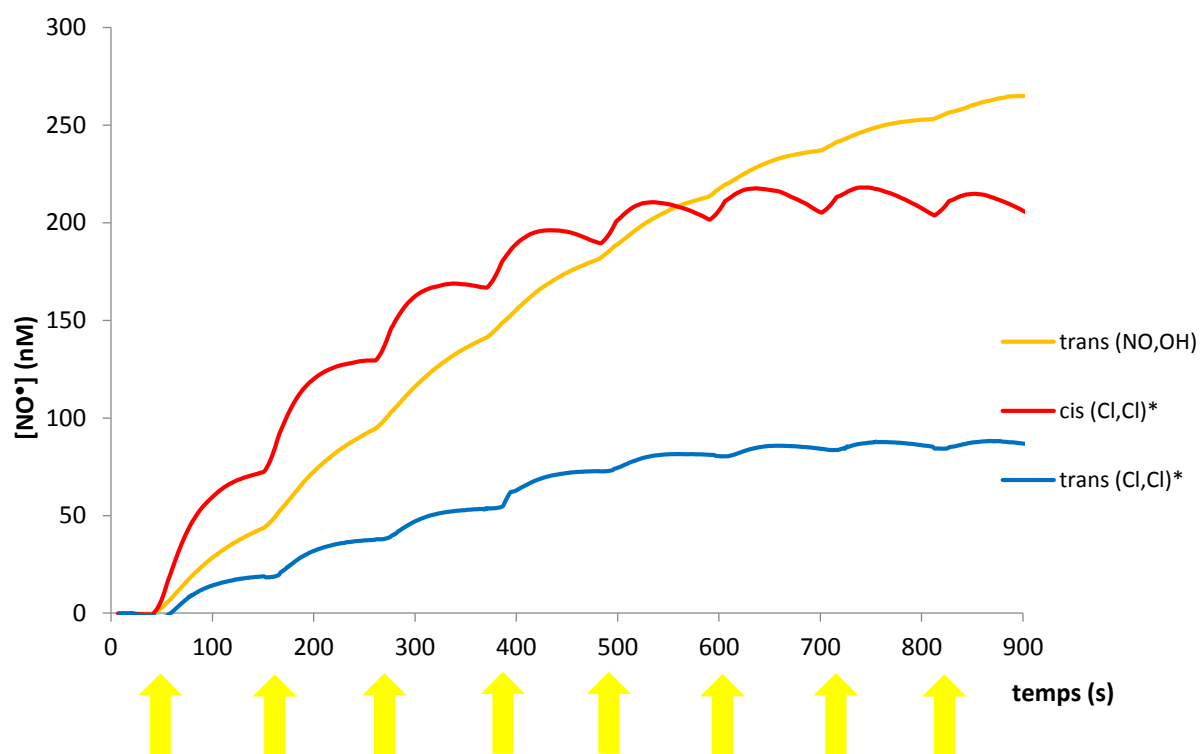


Figure III-36 : Concentrations en NO^\bullet au cours du temps sous irradiation par flashes de *cis* (Cl,Cl)*, *trans* (Cl,Cl)* et *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆, mesurées par l'électrode NO

La **Figure III-36** montre qu'à chaque flash d'irradiation, la concentration en NO^\bullet dans la solution augmente. Cela signifie donc que tous les complexes, y compris le complexe transformé *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ libèrent NO^\bullet sous irradiation. Avant cette première irradiation, le signal est nul, ce qui prouve que la libération du radical n'est pas spontanée dans l'eau.

De plus, pour un même temps d'irradiation de 900 secondes, le *trans* (Cl,Cl)* (en cours de transformation) est le complexe qui est le moins efficace des trois dans la libération de NO^\bullet . En effet, seulement 90 nM de NO^\bullet sont relargués à partir d'une solution à 400 nM.

Le *cis* (Cl,Cl)* libère quant à lui environ 220 nM en 900 secondes sous ce type d'irradiation, c'est 2,3 fois plus que l'isomère *trans* (Cl,Cl)*. Le ratio entre les concentrations de NO^\bullet libéré par les deux isomères est semblable au ratio des rendements quantiques de NO^\bullet mesurés dans l'acétonitrile (Chapitre II), qui est de 2,2. Il est donc cohérent de retrouver que le complexe *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ libère plus de NO^\bullet que son isomère pour un même temps d'irradiation.

Finalement, le *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ est le complexe qui libère le plus efficacement NO[•] sous irradiation. En 900 secondes d'irradiation, il peut libérer jusqu'à 265 nM de NO[•], ce qui représente une concentration 1,2 fois plus élevée que celle relarguée par le *cis* (Cl,Cl)* et 2,9 fois plus élevée que celle relarguée par le *trans* (Cl,Cl)*. Malgré une transformation inattendue, le complexe résultant est plus efficace en photolibération de NO[•] que ses précurseurs.

III. 3. 3- Mesure du rendement quantique de NO[•] dans l'eau

Dans les études précédentes, la preuve de la capacité de photolibération du complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆, obtenu dans l'eau, a été apportée.

Comme pour le Chapitre II, le rendement quantique de NO[•] du complexe est obtenu à partir de l'évolution de son spectre d'absorption sous irradiation. D'après l'étude théorique menée en **III. 2. 5- b)**, la transition impliquée dans le départ de NO[•] est celle de plus basse énergie (à 342 nm théoriquement). L'irradiation est réalisée à deux longueurs d'onde : 365 nm et 420 nm grâce à des LEDs monochromatiques.

Sous irradiation à 420 nm, la bande d'absorption allant de 362 nm à 380 nm disparaît et une bande à 330 nm apparaît, comme le montre la **Figure III-37**.

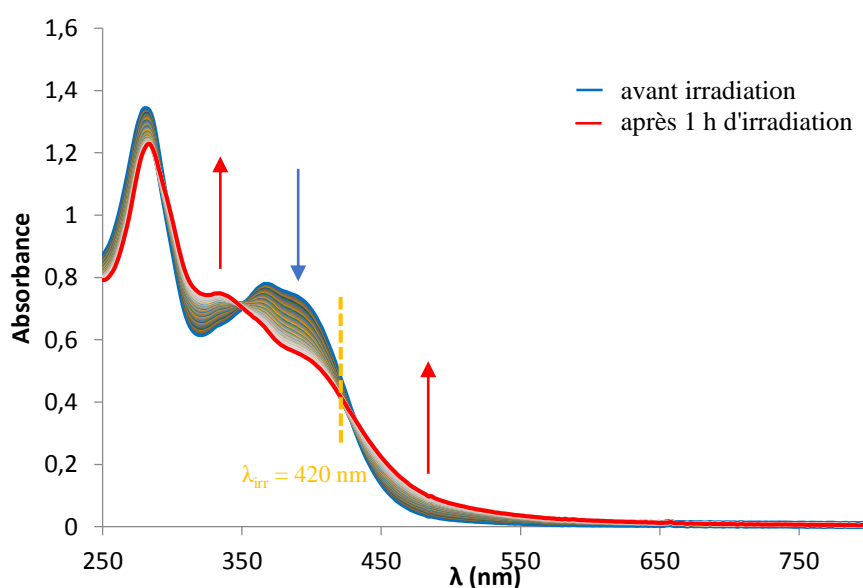


Figure III-37 : Evolution du spectre d'absorption de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ dans l'eau (0,5% DMSO), sous irradiation à 420 nm.

Les courbes se coupent en deux points isosbestiques, à 346 nm et 426 nm, traduisant l'équilibre entre le complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ et son photoproduit.

Sous irradiation à 365 nm, la bande à 362-380 nm disparaît tandis qu'une nouvelle bande apparaît à 330 nm, comme le montre la **Figure III-38**.

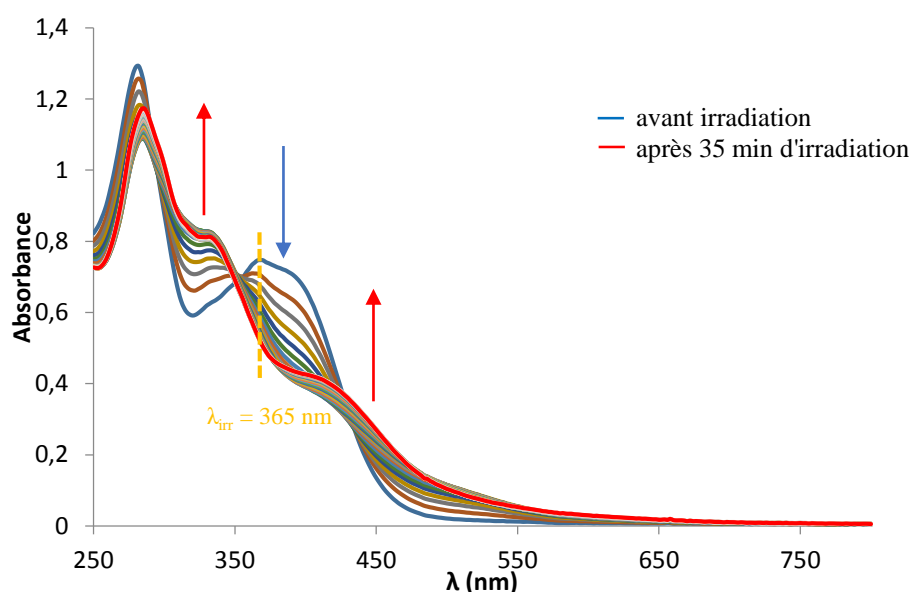


Figure III-38 : Evolution du spectre d'absorption de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ dans l'eau (0,5% DMSO), sous irradiation à 365 nm.

Un point isosbestique est présent à 350 nm mais dans ce cas, celui aux alentours de 430 nm n'est pas bien défini. Cela est certainement dû à la transformation dans l'eau du photoproduit de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆. L'expérience a été reproduite plusieurs fois et ce photoproduit semble continuer d'évoluer dans l'eau. Ceci n'est pas visible sous irradiation à 420 nm car la photoréaction est plus lente.

L'évolution pendant les 15 premières minutes environ, représentée sur la **Figure III-39**, montre deux points isosbestiques bien définis à 346 et 426 nm. Cela signifie que pendant ce début d'évolution sous irradiation, la réaction peut être modélisée par le modèle $A \xrightarrow{h\nu} B$.

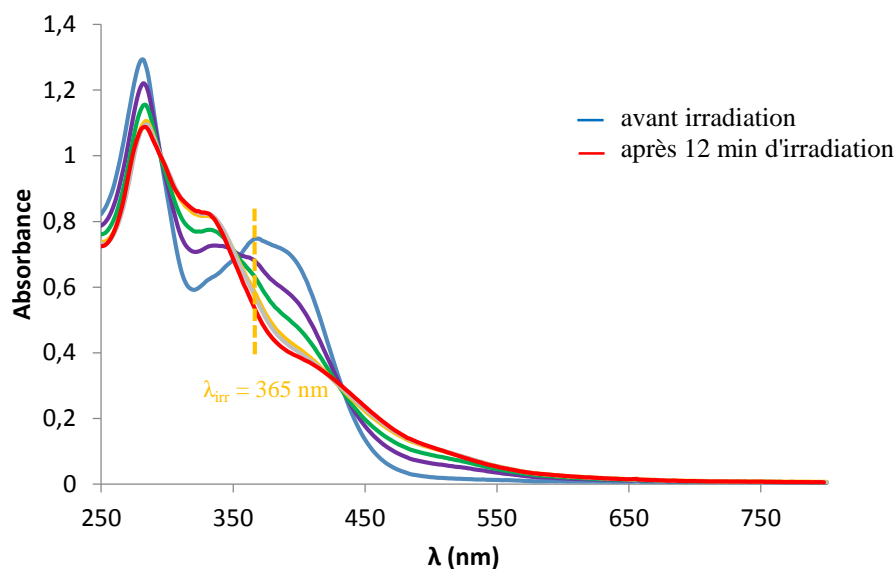
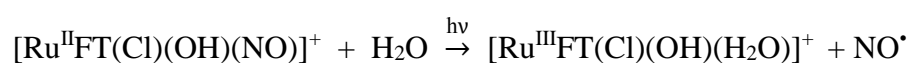


Figure III-39 : Evolution du spectre d'absorption de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ dans l'eau (0,5% DMSO), sous irradiation à 365 nm, pendant les 12 premières minutes

D'après ces données expérimentales, la réaction de photolibération est totale et peut s'écrire :



ou plus simplement : $\text{A} \xrightarrow{h\nu} \text{B}$.

Le rendement quantique de NO* peut être obtenu à partir de l'évolution de l'absorbance à la longueur d'onde d'irradiation et à une seconde longueur d'onde d'observation. La concentration en A et son coefficient d'extinction molaire ϵ_A sont fixés, alors que le coefficient d'extinction molaire de B ϵ_B et le rendement quantique Φ_A sont variables.

Sur la **Figure III-40**, les courbes expérimentales sont tracées en pointillés et les courbes issues de la résolution de l'équation différentielle reliant l'évolution de la concentration en A au rendement quantique sont tracées en trait plein, pour les deux longueurs d'onde d'irradiation. Ces calculs sont réalisés à l'aide du logiciel Sa3.3 développé par V. Pimienta et D. Lavabre.^{191,192} Les données expérimentales sont rassemblées dans le **Tableau 5-3** de l'**Annexe 5** p.330.

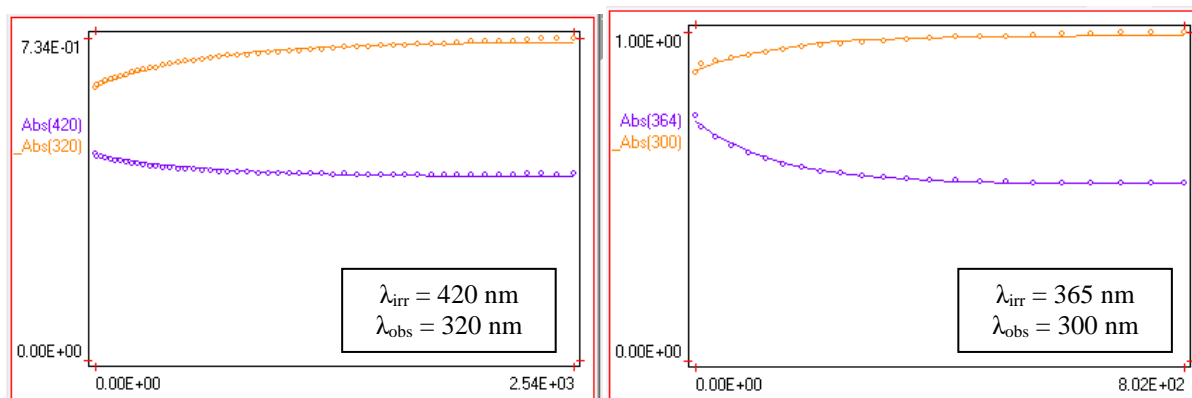


Figure III-40 : Evolutions expérimentale et calculée de l'absorbance aux longueurs d'onde d'irradiation et d'observation, en fonction du temps (en secondes)

Les points expérimentaux et le calcul concordent bien. Le rendement quantique de NO^{\bullet} obtenu à 365 nm est de 0,040 et celui à 420 nm est de 0,020. Comme dans l'acétonitrile, le rendement est plus élevé pour une irradiation à la plus faible longueur d'onde.

Les rendements quantiques de NO^{\bullet} obtenus dans l'eau pour le *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]⁺ sont inférieurs aux valeurs mesurées dans l'acétonitrile pour les deux isomères de départ (0,222 pour le *cis* (Cl,Cl)- et 0,066 pour le *trans* (Cl,Cl)- à 365 nm par exemple). Cependant, il faut comparer ces valeurs aux rendements quantiques des isomères dans le même solvant, c'est-à-dire dans l'eau avant leur transformation.

D'après le paragraphe **III. 2. 8-**, pendant le temps de l'expérience, les complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ ne sont pas encore transformés et sont notés *cis* (Cl,Cl)* et *trans* (Cl,Cl)*. La mesure a été faite sous irradiation à 420 nm dans l'eau. Le *trans* (Cl,Cl)* présente un rendement quantique de NO^{\bullet} de 0,002 et celui du *cis* (Cl,Cl)* est de 0,014. Cette valeur mesurée peut ne pas être précise puisqu'elle peut également rendre compte de la transformation des complexes dans l'eau.

L'étude précédente de mesure de la concentration de NO^{\bullet} libéré grâce à l'électrode spécifique de NO^{\bullet} a permis de montrer que le *trans* (Cl,Cl)* a des capacités de libération inférieures au *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]⁺ dans l'eau. Le *trans* (NO,OH)- libère 1,2 fois plus de NO^{\bullet} que le *cis* (Cl,Cl)*, qui en libère 2,4 fois plus que le *trans* (Cl,Cl)*. D'après ces mesures, il est possible d'estimer les rendements quantiques des complexes de départ dans l'eau (avant transformation). Les facteurs calculés grâce à l'électrode NO sont appliqués sur les rendements quantiques mesurés de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]⁺

dans l'eau pour trouver ceux des complexes de départ. Le **Tableau III-6** regroupe les concentrations de NO[•] libéré mesurées, les rendements quantiques de NO[•] mesurés à 420 nm et 365 nm et les rendements quantiques de NO[•] estimés à 420 nm et 365 nm.

Tableau III-6 : Rendements quantiques dans l'eau des complexes *cis* (Cl,Cl)* et *trans* (Cl,Cl)* en cours de transformation et de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]⁺

| | [NO [•]] mesurée | Φ_{NO}^{420} mesuré | Φ_{NO}^{420} estimé | Φ_{NO}^{365} mesuré | Φ_{NO}^{365} estimé |
|-----------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <i>trans</i> (NO,OH) | 265 nM | 0,020 | - | 0,040 | - |
| <i>cis</i> (Cl,Cl)* | 220 nM | 0,014 | 0,017 | - | 0,033 |
| <i>trans</i> (Cl,Cl)* | 90 nM | 0,002 | 0,007 | - | 0,014 |

Les valeurs de rendements quantiques estimés à 420 nm pour les complexes *cis* (Cl,Cl)* et *trans* (Cl,Cl)* sont très proches de celles mesurées. Elles reflètent donc assez bien la photolibération de NO[•], tout en prenant en compte la transformation de ces complexes dans l'eau. Ce calcul permet donc également de prédire les rendements quantiques de NO[•] pour le *cis* (Cl,Cl)* et le *trans* (Cl,Cl)* à 365 nm.

Le complexe transformé *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]⁺ a donc un meilleur rendement quantique que les complexes synthétisés avec deux ligands chloro. Ce complexe a donc plus d'intérêt à être testé pour ses propriétés biologiques que ses précurseurs. Dans le prochain paragraphe, ses propriétés de photolibération seront étudiées dans un milieu de culture biologique.

III. 4. Propriétés photochimiques du complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ dans le milieu de culture bactérien LB

Le complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]⁺, qui est finalement le complexe présent en solution aqueuse, présente de bonnes propriétés de libération de NO[•]. Il constitue donc un candidat idéal pour tester ses effets en biologie.

A mi-chemin entre l'étude dans l'eau et l'étude sur des cellules se situe l'étude de ses propriétés dans un milieu de culture biologique. Le milieu utilisé dans cette partie est le milieu LB (Lysogeny Broth), qui est utilisé pour la culture de micro-organismes procaryotes,

comme les bactéries par exemple. Ce milieu est une solution aqueuse contenant 10 g/L de tryptone (source d'acides aminés nécessaires à la croissance des micro-organismes), 5 g/L d'extrait de levure et 5 g/L de NaCl.

III. 4. 1- Evolution du spectre d'absorption des isomères de $[\text{RuFTCl}_2\text{NO}]\text{PF}_6$ dans le LB

Comme pour l'étude dans l'eau, le complexe *cis* (Cl,Cl)- $[\text{RuFTCl}_2\text{NO}]\text{PF}_6$ a d'abord été solubilisé dans le DMSO, puis la solution est diluée dans le LB pour avoir un pourcentage final de 0,5% DMSO. La **Figure III-41** montre l'évolution des spectres d'absorption du complexe dans le LB.

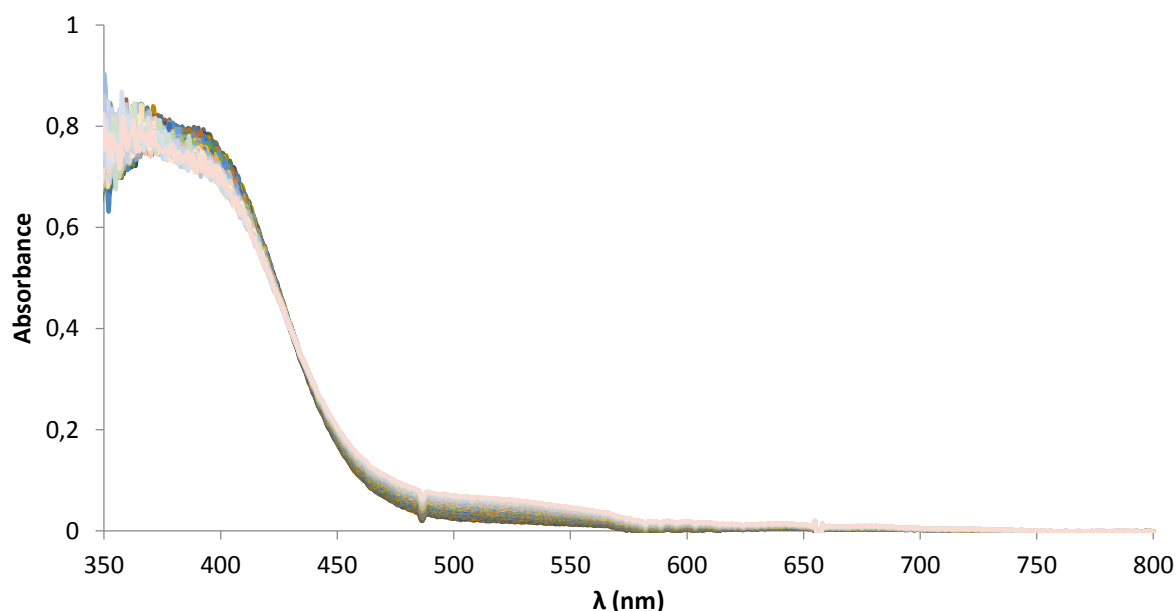


Figure III-41 : Evolution du spectre d'absorption de *cis* (Cl,Cl)- $[\text{RuFTCl}_2\text{NO}]\text{PF}_6$ dans le LB (0,5% DMSO)

Le complexe présente aussi une évolution dans le LB, pour se stabiliser en environ 24 heures. Le maximum d'absorption passe de 389 nm à $t = 0$ min à 365 nm. Les courbes se croisent en un point isosbestique situé à 430 nm. Dans le LB, une bande à 530 nm apparaît au cours du temps, ce qui n'était pas le cas dans l'eau (0,5% DMSO).

De plus, les spectres des produits transformés issus du *cis* (Cl,Cl)- et du *trans* (Cl,Cl)- $[\text{RuFTCl}_2\text{NO}]\text{PF}_6$ (à partir de $t = 24$ h) sont superposables, comme le montre la **Figure III-42**.

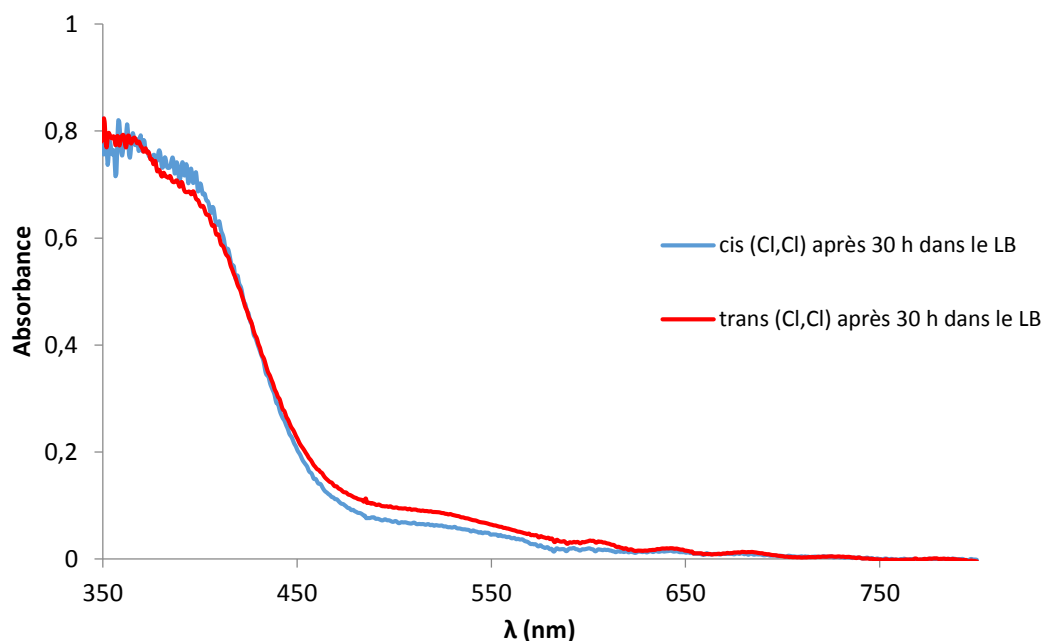


Figure III-42 : Comparaison des spectres issus du *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ après évolution dans le LB

Cela signifie, d'après ce qui a été vu dans l'eau que les deux isomères donnent le même produit après transformation dans le LB (0,5% DMSO).

Sur la **Figure III-43** sont tracés les spectres normalisés des produits transformés (stabilisés après 24 heures) dans l'eau et dans le LB.

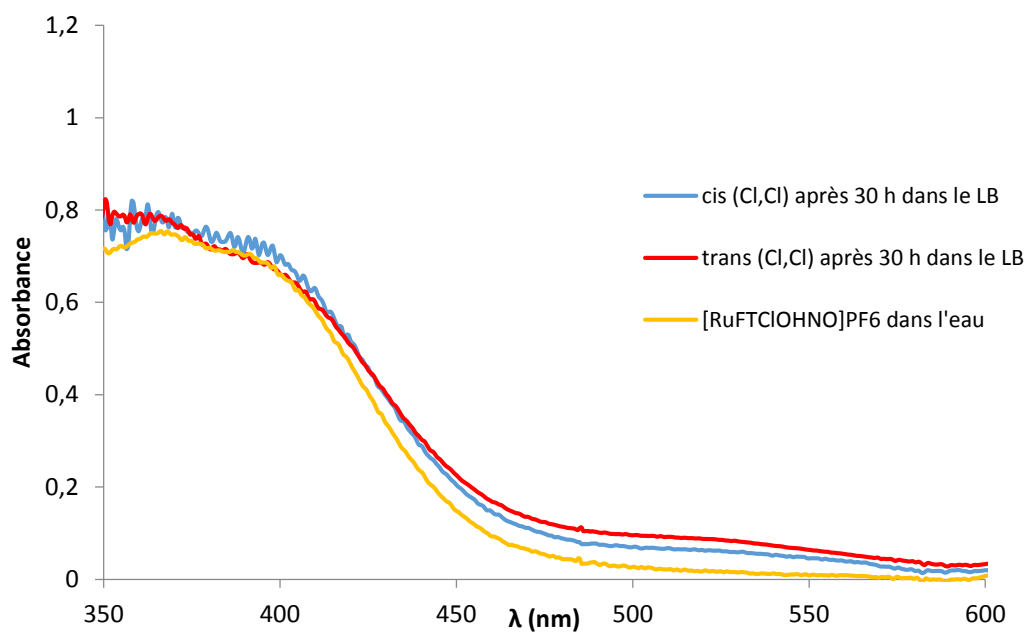


Figure III-43 : Comparaison des spectres transformés dans l'eau et dans le LB

Les spectres présentent un maximum d'absorption à 365 nm avec un épaulement vers 390 nm. Ils sont quasiment superposables, mise à part une bande vers 530 nm qui apparaît dans le LB. Cette bande est liée à la composition du LB qui change au cours du temps puisqu'il n'est pas utilisé en conditions stériles pour cette expérimentation.

Grâce à ces spectres, il sera supposé que le produit transformé dans le LB est le même que dans l'eau, c'est-à-dire le *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆. Cela signifie que dans les conditions biologiques (LB avec 0,5% DMSO), c'est le complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ qui sera testé.

III. 4. 2- Mesure du rendement quantique de NO[•] du *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ dans le LB

Comme pour l'étude du rendement quantique de NO[•] dans l'eau, celui-ci est obtenu à partir de l'évolution de l'absorbance du complexe sous irradiation. Dans le cas du complexe dans le LB, il sera irradié à 365 nm. L'irradiation par la LED à 420 nm est inefficace puisque le LB, qui est un milieu jaune, absorbe à cette longueur d'onde.

La **Figure III-44** montre le changement de couleur de la solution avant et après irradiation : elle passe de jaune à rose. Cela prouve qu'il y a eu photoréaction dans le milieu LB.



Figure III-44 : Changement de couleur de la solution de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ après irradiation dans le LB

La **Figure III-45** montre l'évolution de l'absorbance de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ au cours de l'irradiation à 365 nm.

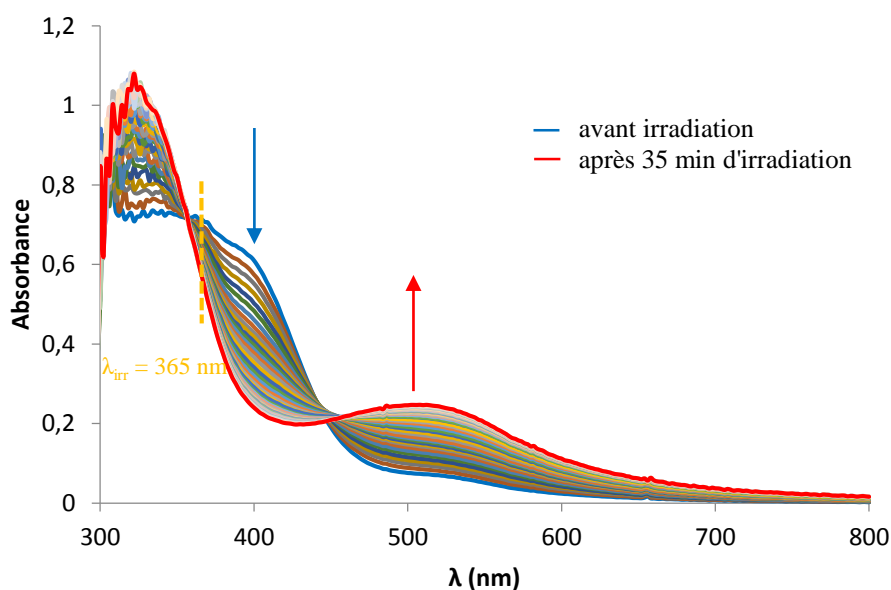


Figure III-45 : Evolution des spectres d'absorption de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ dans le LB sous irradiation à 365 nm

Sous irradiation, la bande à 390 nm disparaît et une bande à 510 nm apparaît. Les courbes présentent un point isosbestique à 355 nm et un autre moins bien défini à 440 nm.

La **Figure III-46** présente les courbes expérimentales (en pointillés) et les courbes issues du calcul théorique du rendement quantique (en trait plein), pour le *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(OH)(NO)]PF₆ dans le LB. Le calcul du rendement quantique est mené de la même façon que pour le complexe dans l'eau (**Figure III-40**). Les données expérimentales sont rassemblées dans le **Tableau 5-4** de l'**Annexe 5** p.330.

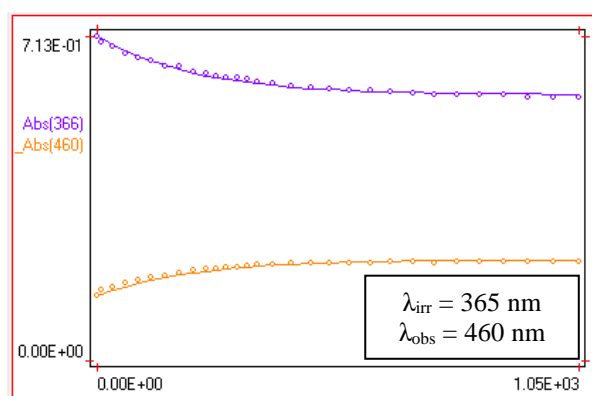


Figure III-46 : Evolutions expérimentale et calculée de l'absorbance aux longueurs d'onde d'irradiation et d'observation en fonction du temps (en secondes), pour le *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(OH)(NO)]PF₆ dans le LB

Le calcul coïncide avec les points expérimentaux et le rendement quantique de NO[•] obtenu à 365 nm est de 0,023. Cette valeur est plus basse que celle mesurée dans l'eau (0,5% DMSO), qui est rappelée dans le **Tableau III-7**.

Tableau III-7 : Rendements quantiques de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)PF₆ dans l'eau et le LB à 365 nm

| Φ_{NO}^{365} dans l'eau (0,5% DMSO) | Φ_{NO}^{365} dans le LB (0,5% DMSO) |
|--|--|
| 0,040 | 0,023 |

Cette diminution du rendement peut être due au fait que le milieu de culture est complexe et que le NO[•] peut être piégé par des acides aminés présents. Par exemple il est connu que le NO[•] peut réagir sur les radicaux de tyrosine ou de tryptophane, pour aboutir entre autres à la nitration de la tyrosine.^{202, 203} Le rendement est plus faible mais l'expérience suit le modèle A → B et donc NO[•] est également photolibéré dans le LB. Les valeurs des rendements quantiques mesurés dans l'eau et le LB se situent tout de même dans une gamme de valeurs correctes.¹⁷⁸

De plus, le rendement quantique dans le LB (0,5% DMSO) a également été mesuré pour les complexes *cis* (Cl,Cl)* et *trans* (Cl,Cl)* en cours de transformation. Il est de 0,013 dans les deux cas. Le rendement est encore plus faible avant la stabilisation des complexes dans le milieu. En revanche, le fait qu'il soit le même pour les deux isomères, ce qui n'est pas le cas ni dans l'acétonitrile ni dans l'eau, suggère que les deux isomères se sont déjà transformés en une espèce commune, pas encore tout à fait stabilisée.

III. 5. Conclusion

Dans ce chapitre, l'objectif a été d'étudier le comportement des complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ en solution dans l'eau. En effet, pour mettre au point une application en biologie, et plus tard concevoir une thérapie, il faut se rapprocher du milieu biologique.

Dans une première partie, la transformation des complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ a été mise en évidence. Des caractérisations par spectrométrie de

masse, diffraction des rayons X, RMN du proton et spectroscopie d'absorption en UV-Vis ont permis de déterminer la structure obtenue dans l'eau pour les deux isomères. Les deux complexes se transforment en *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ par simple échange de ligand dans le cas du *cis* (Cl,Cl)- et par échange de ligand et réorganisation de la sphère de coordination du ruthénium dans le cas du *trans* (Cl,Cl)-.

Dans la seconde partie, les propriétés de photolibération de NO[•] de ce nouveau complexe dans l'eau ont été investiguées. L'utilisation de la résonance paramagnétique électronique a confirmé la libération de NO[•] et une étude à l'aide d'une électrode spécifique a permis de mesurer la quantité de NO[•] libéré. Le rendement quantique du complexe dans l'eau a pu être obtenu et, bien que les valeurs dans l'eau soient plus faibles que dans l'acétonitrile, ce complexe présente de meilleures propriétés de libération de NO[•] que ceux dont il est issu : le *cis* (Cl,Cl)* et le *trans* (Cl,Cl)*.

Ensuite, l'étude de la photolibération de NO[•] par ce complexe a été réalisée dans un milieu de culture biologique. Le rendement quantique est plus faible dans un tel milieu, contenant de nombreuses substances nécessaires au développement de micro-organismes, mais la valeur obtenue rend compte de l'efficacité de libération du complexe.

CHAPITRE IV

Synthèse de nouveaux complexes de ruthénium à ligand nitrosyle et étude de la photolibération de NO•

Chapitre IV :

Synthèse de nouveaux complexes de ruthénium à ligand nitrosyle et étude de la photolibération de NO[•]

IV. 1. Introduction

L'objectif de ce chapitre est la synthèse et l'étude des propriétés de photolibération de NO[•] par de nouveaux complexes. Ces nouveaux complexes sont conçus dans le but d'améliorer la section efficace et le rendement quantique de NO[•] par rapport aux *trans* (Cl,Cl)- et *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆, dont les structures sont rappelées sur la **Figure IV-1**.

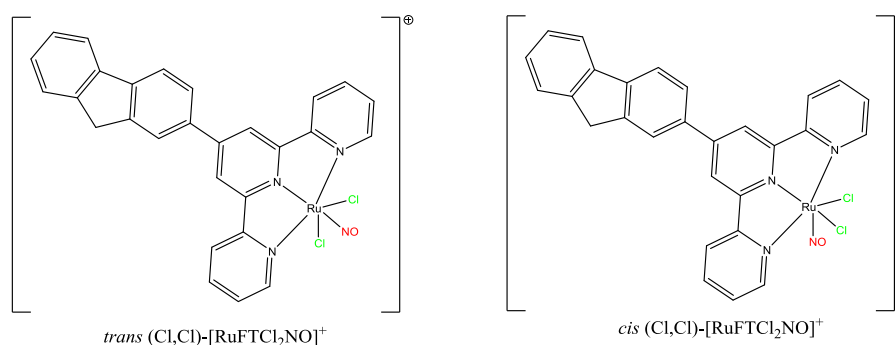


Figure IV-1 : Structures des *trans* (Cl,Cl)- et *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆

Les structures étudiées dans ce chapitre ont été proposées pour augmenter la conjugaison des électrons π sur le groupement porté par le ligand 2,2':6',2''-terpyridine. En effet, dans les précédents complexes, le transfert de charge impliqué dans la libération de NO[•] part du fragment fluorène et se déplace vers le fragment Ru-NO (cf Chapitre II). Ces nouveaux complexes possédant un ligand tridentate encore plus riche en électrons pourront *a priori* présenter des rendements quantiques de NO[•] supérieurs à ceux précédemment mesurés. De plus, d'après la littérature, les propriétés ONL d'une molécule sont plus importantes lorsque les électrons π sont délocalisés.^{15,107,174,175} En effet, des chromophores à base de fluorène, choisi pour ses bonnes propriétés d'absorption à deux photons, ont une section efficace d'absorption à deux photons plus importante lorsque les unités fluorène sont conjuguées. La présence d'une double ou triple liaison entre ces fluorènes permet également d'augmenter la longueur du système et de rendre le chromophore plan.

Ainsi, l'introduction d'une double ou triple liaison (C=C ou C≡C) entre le fluorène et la terpyridine permettrait de rigidifier la structure en empêchant la libre rotation autour de la liaison C₂fluorène-C₄'terpyridine, et ainsi promouvoir la délocalisation des électrons. La troisième structure proposée présente un ligand 2,2':6',2''-terpyridine possédant en position 4' deux unités fluorène conjuguées liées par les carbones 7f et 2f'. Les trois ligands proposés (**Figure IV-2**) présentent tous trois des chaînes hexyles en position 9f du fluorène, afin d'améliorer la solubilité des complexes lors des mesures Z-Scan.

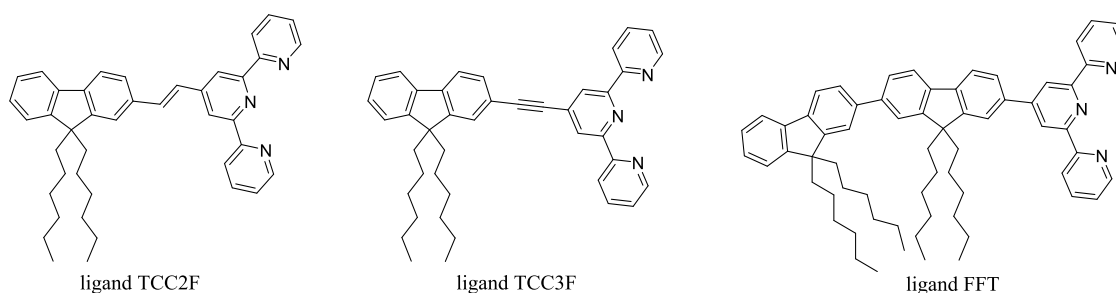


Figure IV-2 : Structures des ligands TCC2F, TCC3F et FFT, dérivés du 4'-(2-fluorényl)-2,2':6',2''-terpyridine

Ces ligands sont utilisés pour former des complexes de type $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{L}_3\text{Cl}_2\text{NO}]^+$, avec $\text{L}_3 = \text{TCC2F}$, TCC3F ou FFT , et deux ligands chloro. Deux isomères sont donc attendus selon la position relative des deux ligands chloro : *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-. Les structures des isomères *trans* (Cl,Cl)- des trois nouveaux complexes sont présentés sur la **Figure IV-3**.

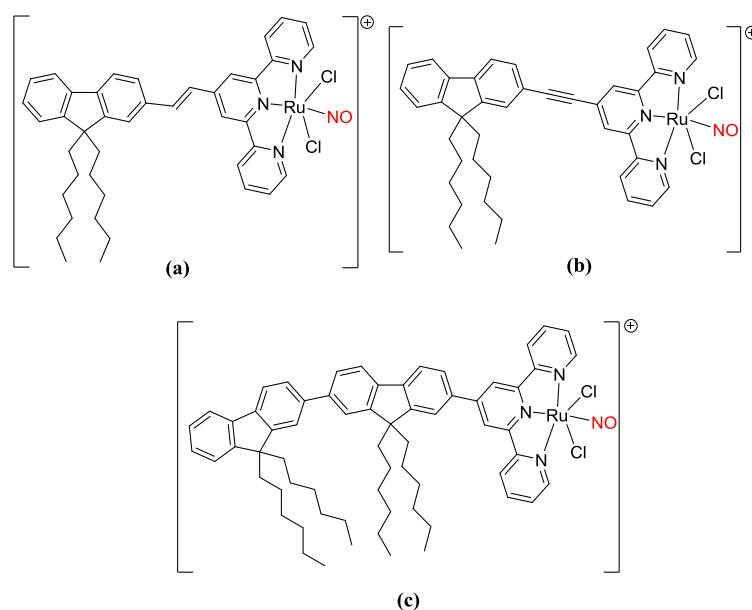


Figure IV-3 : Structures des (a) *trans* (Cl,Cl)- $[\text{RuTCC2FCl}_2\text{NO}]^+$, (b) *trans* (Cl,Cl)- $[\text{RuTCC3FCl}_2\text{NO}]^+$ et (c) *trans* (Cl,Cl)- $[\text{RuFFTCl}_2\text{NO}]^+$

Dans une première partie, les synthèses des ligands et des complexes seront présentées, puis dans une seconde partie, leur efficacité de photolibération de NO[•] dans l'acétonitrile sera évaluée. Enfin, leurs propriétés seront étudiées dans l'eau.

IV. 2. Synthèse des complexes [RuTCC2FCl₂NO]PF₆, [RuTCC3FCl₂NO]PF₆ et [RuFFTCl₂NO]PF₆

IV. 2. 1- Synthèse des trois ligands dérivés de la 4'-(2-fluorényl)-2,2':6',2''-terpyridine

Les ligands ont été synthétisés au sein de l'équipe pour former différents types de complexes de ruthénium à ligand nitrosyle. Ces résultats n'ont pas encore été publiés. La synthèse du ligand TCC2F a été menée par Andrés Roja (stage de Master 2), celle du TCC3F a été mise au point par Valerii Bukhanko (doctorant) et celle du ligand FFT a été proposée par Diego Martinez-Bourget (stage Master 2).

Le ligand TCC2F est obtenu à partir du bromofluorène. Les chaînes hexyles sont ajoutées en position 9f et le brome est substitué par un ester qui, après réduction au DIBAL-H et oxydation ménagée, donne l'aldéhyde correspondant. Puis l'addition de l'acétylpyridine et la réaction avec un sel de Kröhnke permettent, en présence d'acétate d'ammonium, de former la terpyridine du ligand désiré.²⁰⁴

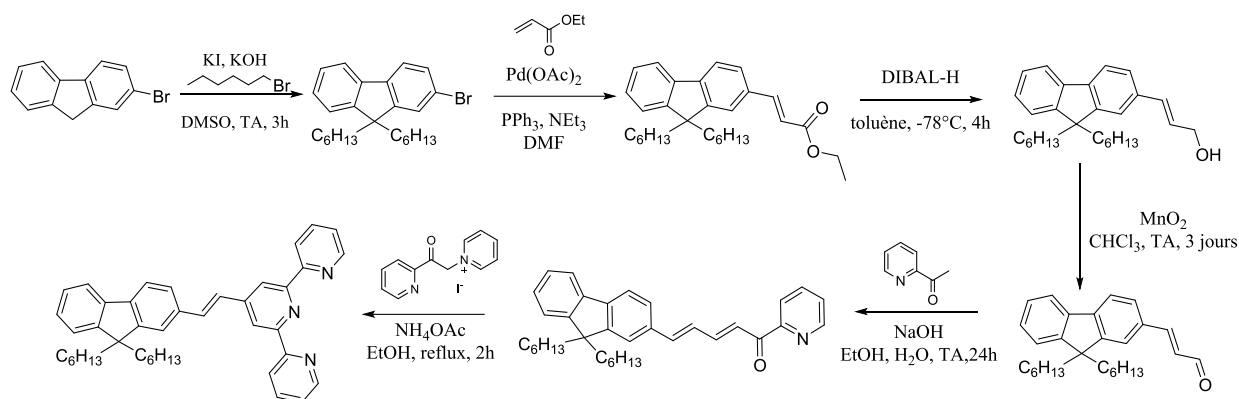


Figure IV-4 : Schéma de synthèse du ligand TCC2F

Le ligand TCC3F est obtenu par un couplage de Sonogashira entre une molécule de terpyridine portant un groupement triflate et une molécule de fluorène substitué en position 2f par un alcyne vrai.²⁰⁴

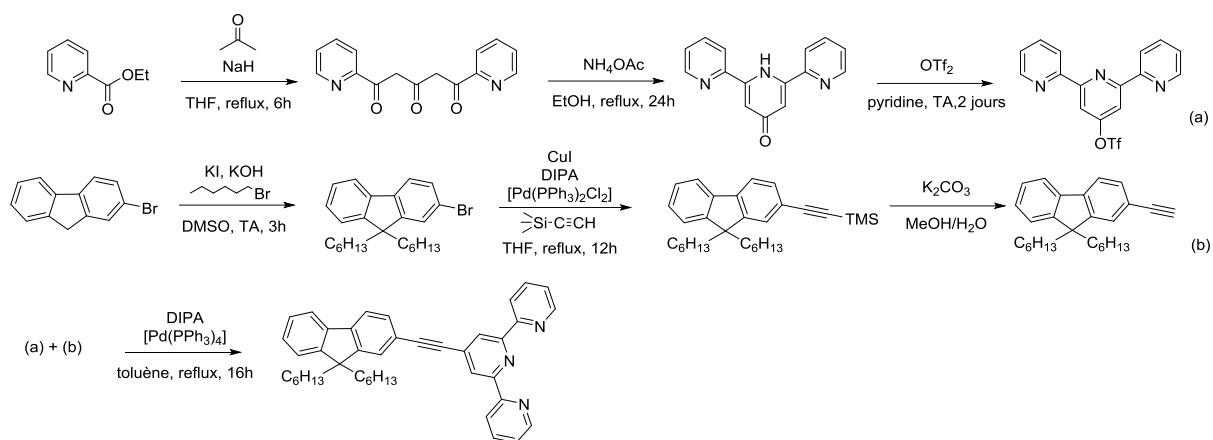


Figure IV-5 : Schéma de synthèse du ligand TCC3F

Le ligand FFT est synthétisé par un couplage de Suzuki entre deux unités fluorène, dont l'une porte une fonction aldéhyde. L'acétylpyridine est ensuite ajoutée sur cet intermédiaire et la réaction de Kröhnke en présence de NH_4OAc permet la cyclisation de la terpyridine.^{205,206,207,208,107}

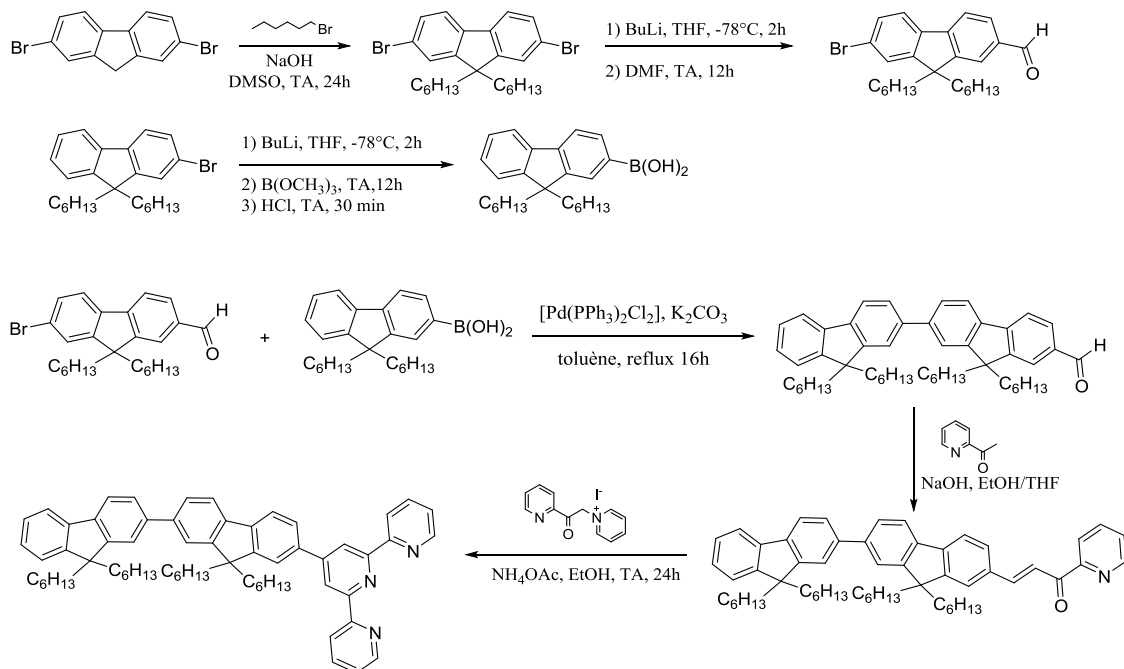


Figure IV-6 : Voie de synthèse du ligand FFT

IV. 2. 2- Complexation et bullage de NO

A partir des trois ligands tridentés, des complexes intermédiaires de la forme $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{R-terpy})\text{Cl}_3]$ sont synthétisés par complexation sur $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Après bullage de NO^\bullet généré *in situ* sur ces intermédiaires, les complexes sont finalement formés (selon la **Voie C**).¹²¹

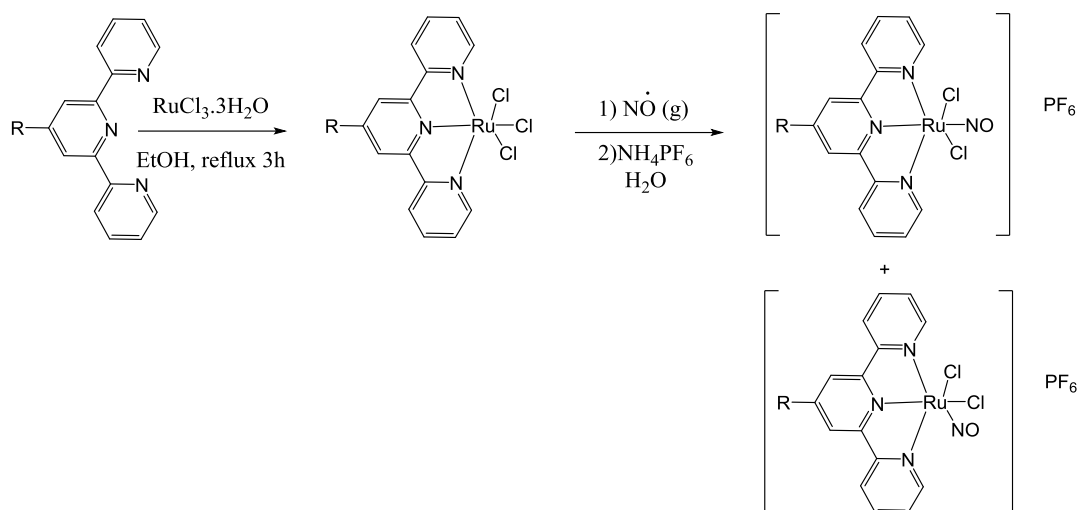


Figure IV-7 : Schéma de synthèse des complexes de type $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{R-terpy})\text{Cl}_2\text{NO}]\text{PF}_6$

Dans les trois cas, des mélanges d'isomères *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)- sont obtenus. Une analyse par RMN ^1H du mélange permet de quantifier les isomères. La **Figure IV-8** présente les spectres RMN ^1H entre 7,0 et 9,5 ppm des trois mélanges obtenus après bullage de NO^\bullet . Sur chaque spectre, les signaux caractéristiques correspondant aux H6 et H6'', H3' et H5', H4 et H4'' sont présents deux fois à des intensités et des déplacements chimiques différents : une fois pour chaque isomère (notés *a* et *b* sur la **Figure IV-8**). Le ratio de l'intensité des pics correspondant aux mêmes atomes d'hydrogène donne la proportion des isomères dans le mélange. Quel que soit le ligand terpyridine complexé (FT, TCC2F, TCC3F ou FFT), le ratio *cis* / *trans* après bullage est d'environ 30 / 70.

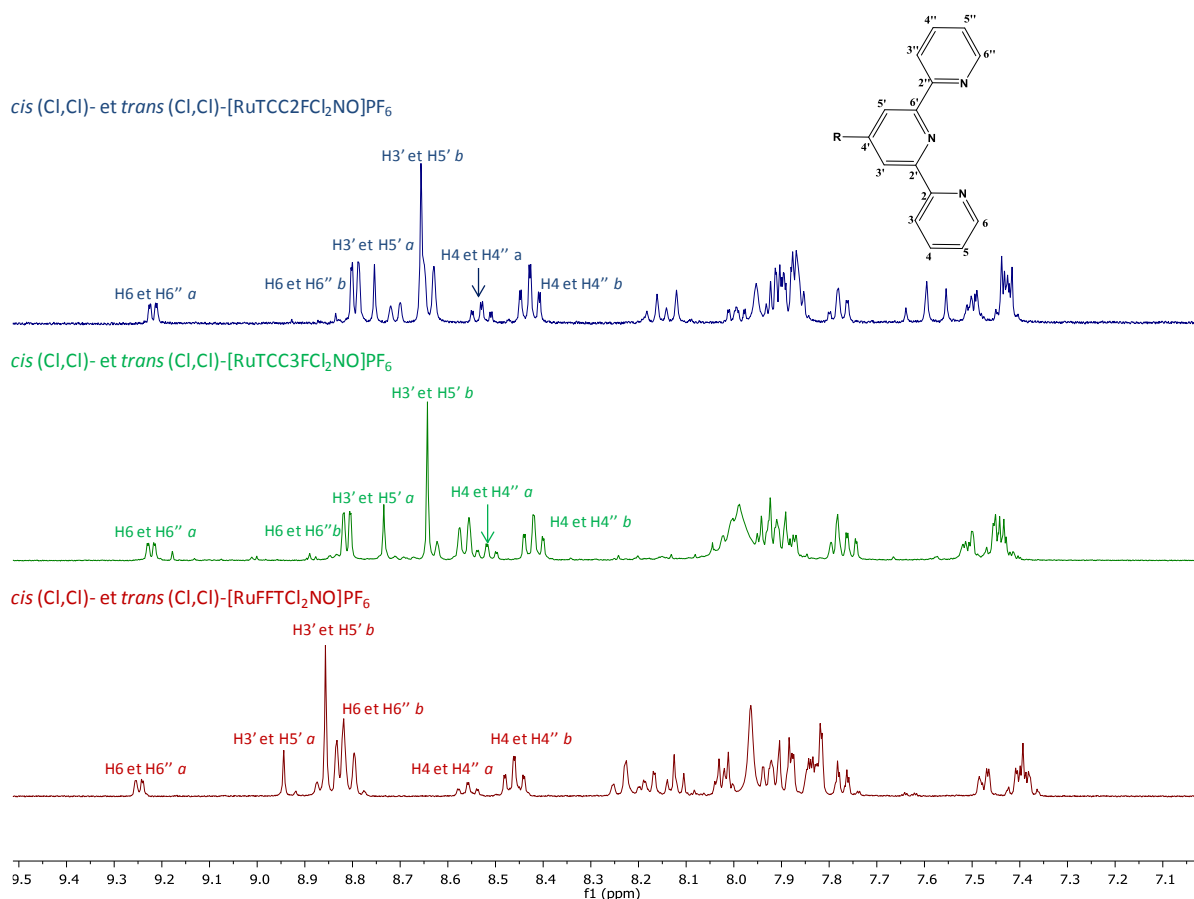


Figure IV-8 : Comparaison des spectres RMN ^1H des mélanges *cis/trans* obtenus après bullage de NO^\bullet sur les trois complexes

IV. 2. 3- Séparation des isomères et caractérisation par RMN

Les isomères *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)- des complexes $[\text{RuTCC2FCI}_2\text{NO}]\text{PF}_6$ et $[\text{RuTCC3FCI}_2\text{NO}]\text{PF}_6$ sont ensuite séparés par HPLC préparative par le service HPLC de l'ICT. La séparation des complexes possédant des chaînes hexyles est assez complexe. Ainsi, afin de pouvoir séparer les isomères à ligand FFT pour leur étude dans l'acétonitrile, ceux-ci sont synthétisés à nouveau en remplaçant les chaînes hexyles par des groupements méthyles. Ces derniers sont notés $[\text{RuF}_{\text{Me}}\text{F}_{\text{Me}}\text{TCl}_2\text{NO}]\text{PF}_6$.

Une structure cristallographique a pu être obtenue pour l'isomère *trans* (Cl,Cl).

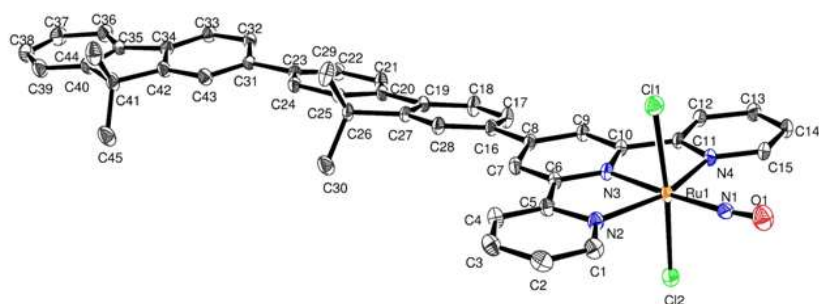


Figure IV-9 : Structure cristallographique du *trans* (Cl,Cl)-[RuF_{Me}F_{Me}TCl₂NO]⁺

La comparaison des spectres RMN ¹H de ces isomères permet de voir que les signaux caractéristiques des H6-H6'' ou des H3'-H5' sont bien plus déblindés dans le cas des isomères *cis* (Cl,Cl)-, comme c'est le cas pour [RuFTCl₂NO]PF₆. Le **Tableau IV-1** regroupe les déplacements chimiques de ces signaux caractéristiques pour les isomères *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)- de chaque complexe. Les déplacements chimiques correspondant aux complexes *trans* (Cl,Cl)- et *cis* (Cl,Cl)-[RuFFTCl₂NO]PF₆ (avec les chaînes hexyles) sont issus du spectre RMN du mélange de la **Figure IV-8**.

Tableau IV-1 : Déplacement chimique de trois signaux caractéristiques pour les isomères *trans* (Cl,Cl)- et *cis* (Cl,Cl)- de quatre complexes (en ppm)

| | δ (H6 et H6'') | δ (H3' et H5') | δ (H4 et H4'') |
|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| <i>trans</i> (Cl,Cl)-[RuTCC2FCl ₂ NO]PF ₆ | 8,79 | 8,63 | 8,43 |
| <i>cis</i> (Cl,Cl)-[RuTCC2FCl ₂ NO]PF ₆ | 9,22 | 8,72 | 8,53 |
| <i>trans</i> (Cl,Cl)-[RuTCC3FCl ₂ NO]PF ₆ | 8,80 | 8,64 | 8,43 |
| <i>cis</i> (Cl,Cl)-[RuTCC3FCl ₂ NO]PF ₆ | 9,23 | 8,73 | 8,52 |
| <i>trans</i> (Cl,Cl)-[RuFFTCl ₂ NO]PF ₆ | 8,82 | 8,86 | 8,46 |
| <i>cis</i> (Cl,Cl)-[RuFFTCl ₂ NO]PF ₆ | 9,25 | 8,94 | 8,56 |
| <i>trans</i> (Cl,Cl)-[RuF _{Me} F _{Me} TCl ₂ NO]PF ₆ | 8,81 | 8,87 | 8,46 |
| <i>cis</i> (Cl,Cl)-[RuF _{Me} F _{Me} TCl ₂ NO]PF ₆ | 9,24 | 8,95 | 8,55 |

D'après ce tableau, le déplacement chimique de ces signaux caractéristiques varie très peu entre le *trans* (Cl,Cl)-[RuTCC2FCl₂NO]PF₆ (respectivement *cis* (Cl,Cl)-) et le *trans* (Cl,Cl)-[RuTCC3FCl₂NO]PF₆ (respectivement *cis* (Cl,Cl)-). La différence de déplacement chimique entre ces complexes et ceux possédant deux fragments fluorène est légèrement plus

importante. La nature du substituant de la terpyridine n'influe pas de façon significative sur les déplacements chimiques de ces hydrogènes, comme le montre le **Tableau VI-1**.

IV. 3. Photolibération de NO[•] par les complexes [RuTCC2FCl₂NO]PF₆, [RuTCC3FCl₂NO]PF₆ et [RuF_{Me}F_{Me}Cl₂NO]PF₆ dans l'acétonitrile

L'objectif de la synthèse de ces nouveaux complexes est d'augmenter la délocalisation électronique sur le ligand tridentate afin d'obtenir un rendement quantique de NO[•] et une section efficace d'absorption à deux photons supérieurs à ceux obtenus pour le complexe [RuFTCl₂NO]PF₆ précédemment présenté dans le Chapitre II. Dans cette partie, les propriétés des isomères *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)- des complexes [RuTCC2FCl₂NO]PF₆, [RuTCC3FCl₂NO]PF₆ et [RuF_{Me}F_{Me}TCl₂NO]PF₆ sont étudiés dans l'acétonitrile.

IV. 3. 1- Mise en évidence de la photolibération de NO[•]

Dans un premier temps, la capacité de photolibération de NO[•] des isomères *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,C) des complexes [RuTCC2FCl₂NO]PF₆ et [RuTCC3FCl₂NO]PF₆ est appréciée qualitativement. La technique de la résonance paramagnétique électronique est à nouveau utilisée puisqu'il s'agit d'une des meilleures méthodes pour apporter la preuve directe de la libération de NO[•].¹⁸⁰

Comme précédemment, les complexes sont dissous dans l'acétonitrile pour obtenir une solution à 1 mM. Une solution de piègeur est ajoutée (10% en volume) et les mélanges sont introduits dans des capillaires. Ces derniers sont placés dans la cavité de résonance et ils sont ensuite irradiés par une lampe à vapeur de mercure munie d'un filtre coupant les ultraviolets ($\lambda > 400$ nm).

L'ensemble des complexes testés ne donne pas de signal intense sans irradiation. La luminosité ambiante engendre une légère libération de NO[•] qui est détectée par la cavité RPE très sensible. La **Figure IV-10** présente l'évolution de l'intensité du signal de NO[•] libéré par le *trans* (Cl,Cl)-[RuTCC2FCl₂NO]PF₆ sous irradiation.

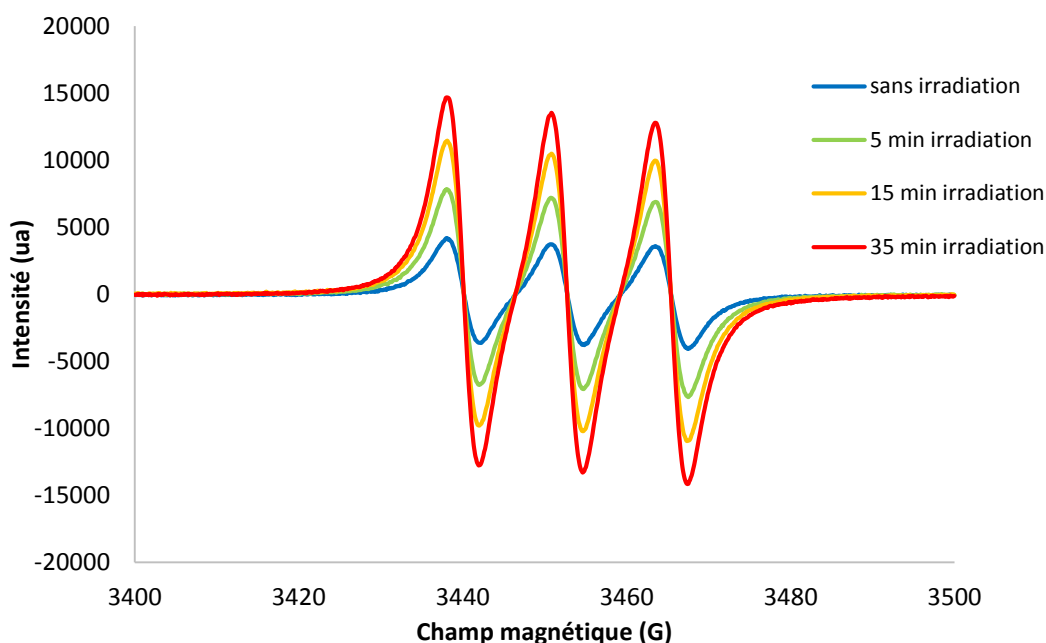


Figure IV-10 : Signaux RPE obtenus pour le *trans* (Cl,Cl)-[RuTCC2FC12NO]PF₆ sous irradiation

Pour chaque complexe, le même type de résultat est obtenu : le triplet présente un facteur de Landé de 2,040 et une constante de couplage hyperfin de $1,2 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$, qui sont caractéristiques de l'adduit [Fe(MGD)₂-NO[•]]. L'augmentation de l'intensité du triplet sous irradiation traduit la libération de NO[•] au cours du temps d'irradiation.¹⁸⁰

L'analyse par RPE permet de conclure que tous les complexes analysés sont capables de libérer NO[•] sous irradiation. Cette méthode n'est pas utilisée ici pour comparer les concentrations de NO[•] piégées pour chaque complexe. En effet, de nombreux paramètres interviennent dans l'obtention du signal, comme le ratio complexe / piègeur, qu'il est difficile de contrôler parfaitement et de reproduire entre expériences indépendantes. Il est donc intéressant de comparer leur efficacité de photolibération par mesure du rendement quantique de NO[•].

IV. 3. 2- Mesures des rendements quantiques de NO[•]

L'objectif de ce paragraphe est la mesure du rendement quantique Φ_{NO} pour les deux isomères des complexes [RuTCC2FC12NO]PF₆, [RuTCC3FC12NO]PF₆ et [RuF_{Me}F_{Me}TCl₂NO]PF₆ dans l'acétonitrile.

Dans les chapitres précédents, des calculs DFT ont été menés et ont montré que la bande de plus basse énergie des complexes *cis* (Cl,Cl)-, *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ et *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ correspondait majoritairement à une transition HOMO → LUMO, s'accompagnant d'un transfert de charge du ligand fluorène-terpyridine vers le fragment Ru-NO. Ces complexes ont été irradiés sur cette transition (à 365 et 420 nm) afin de provoquer la libération de NO[•].

Le **Tableau IV-2** donne, pour chaque nouveau complexe, les valeurs des longueurs d'onde où l'absorbance est maximale et le coefficient d'extinction molaire du complexe à cette longueur d'onde sans irradiation.

Pour les complexes d'intérêt de ce présent chapitre, les maxima d'absorption de la bande de plus faible énergie se situent entre 414 et 456 nm. L'hypothèse que la transition correspondant à cette bande est impliquée dans la libération de NO[•] par un transfert de charge, comme dans le cas des complexes précédents, est émise. Ainsi, les six complexes de cette partie sont également irradiés à 365 et 420 nm.

Tableau IV-2 : Maxima d'absorption et coefficients d'extinction molaire correspondants pour les isomères *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)- de [RuTCC2FCl₂NO]PF₆, [RuTCC3FCl₂NO]PF₆ et [RuF_{Me}F_{Me}FCl₂NO]PF₆

| Complexe | λ_{\max} (nm) | ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹) |
|--|-----------------------|---|
| <i>cis</i> (Cl,Cl)-[RuTCC2FCl ₂ NO]PF ₆ | 310 | 17 232 |
| | 446 | 18 277 |
| <i>trans</i> (Cl,Cl)-[RuTCC2FCl ₂ NO]PF ₆ | 302 | 15 186 |
| | 462 | 17 152 |
| <i>cis</i> (Cl,Cl)-[RuTCC3FCl ₂ NO]PF ₆ | 296 | 33 372 |
| | 420 | 18 791 |
| <i>trans</i> (Cl,Cl)-[RuTCC3FCl ₂ NO]PF ₆ | 298 | 30 720 |
| | 434 | 17 133 |
| <i>cis</i> (Cl,Cl)- [RuF _{Me} F _{Me} TCl ₂ NO]PF ₆ | 328 | 20 085 |
| | 434 | 9 297 |
| <i>trans</i> (Cl,Cl)- [RuF _{Me} F _{Me} TCl ₂ NO]PF ₆ | 330 | 19 385 |
| | 450 | 9 127 |

IV. 3. 2- a) Evolution du spectre d'absorption des complexes sous irradiation**-Spectres d'absorption des *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuTCC2FCl₂NO]PF₆**

La **Figure IV-11** présente les spectres d'absorption par spectroscopie UV-Vis des complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuTCC2FCl₂NO]PF₆ sous irradiation à 365 nm. D'après les spectres pris avant irradiation (courbes bleues), la bande de plus faible énergie se situe entre 365 et 510 nm pour l'isomère *cis* (Cl,Cl)- et entre 400 et 530 nm pour le *trans* (Cl,Cl)-. L'excitation de ces complexes à 365 nm est donc réalisée à une longueur d'onde un peu décalée par rapport à la transition d'intérêt.

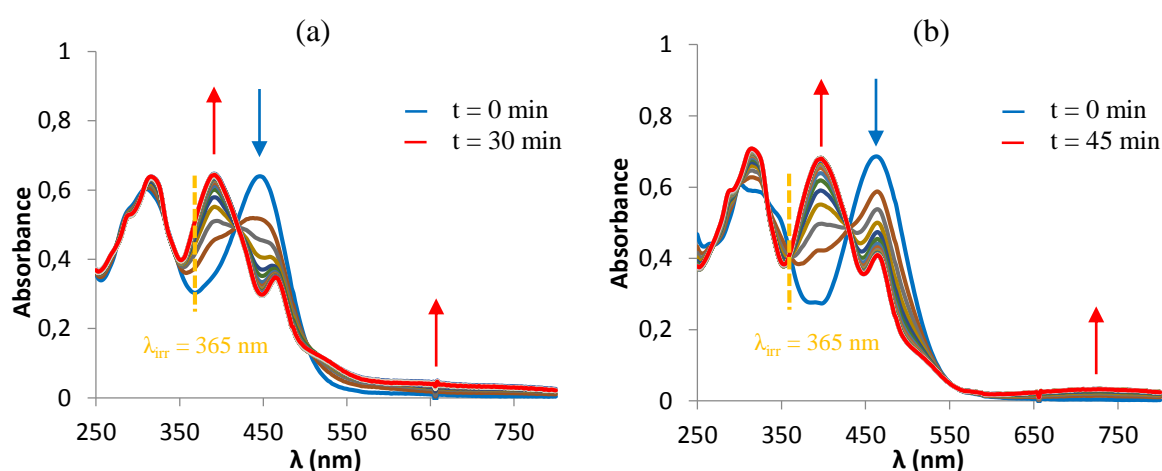


Figure IV-11 : Evolution des spectres d'absorption de (a) *cis* (Cl,Cl)- et (b) *trans* (Cl,Cl)-[RuTCC2FCl₂NO]PF₆ sous irradiation à 365 nm

L'allure du spectre d'absorption du *cis* (Cl,Cl)-[RuTCC2FCl₂NO]PF₆ évolue rapidement, avec la diminution de la bande à 440 nm et apparition d'une bande à 385 nm. L'évolution des spectres présente cinq points isosbestiques (à 270, 305, 333, 418 et 500 nm). Ils caractérisent un équilibre entre le complexe de départ et son photoproduit.

L'isomère *trans* (Cl,Cl)- est lui aussi transformé par irradiation à 365 nm. La bande correspondant au transfert de charge du ligand vers de fragment Ru-NO à 456 nm diminue alors qu'une bande à 390 nm s'intensifie.

Pour les deux isomères de [RuTCC2FCl₂NO]PF₆, une bande de faible intensité est obtenue entre 650 et 700 nm. Cela correspond à une espèce contenant un atome de ruthénium de degré d'oxydation III.^{110,113} Par analogie avec les complexes [RuFTCl₂NO]PF₆, le photoproduit correspondrait au complexe *trans* (Cl,Cl)-[RuTCC2FCl₂(CH₃CN)]⁺.¹²¹

Ces complexes sont ensuite irradiés à 420 nm et l'évolution des spectres d'absorption est présentée sur la **Figure IV-12**. Cette fois-ci, la longueur d'onde d'irradiation permet d'exciter plus précisément les complexes sur leur bande de plus faible énergie.

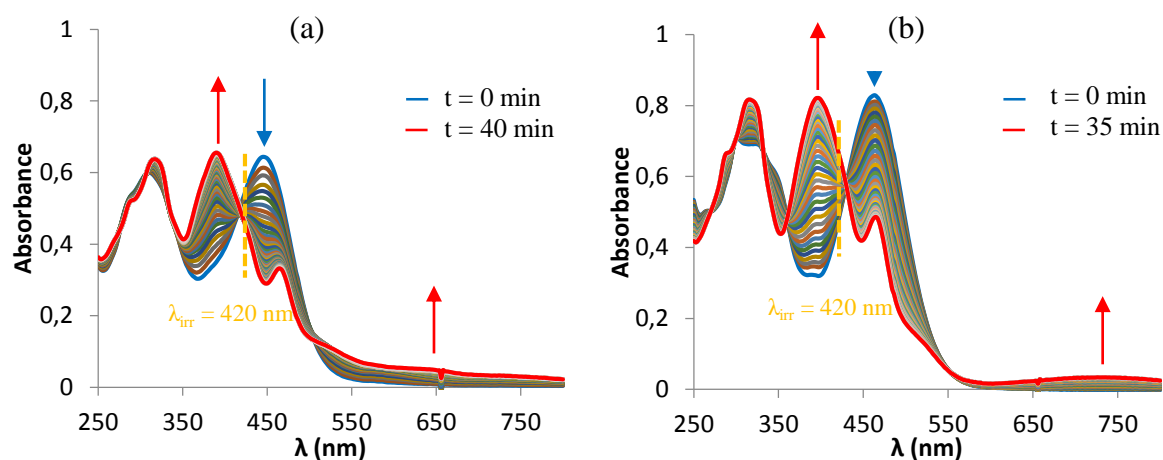


Figure IV-12 : Evolution des spectres d'absorption de (a) *cis* (Cl,Cl)- et (b) *trans* (Cl,Cl)-[RuTCC2FCl₂NO]PF₆ sous irradiation à 420 nm

Sous irradiation à 420 nm, la transformation des complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuTCC2FCl₂NO]PF₆ est plus lente mais l'évolution des spectres d'absorption correspond à celle décrite pour l'irradiation à 365 nm.

Les spectres obtenus en fin d'irradiation sont quasiment superposables, suggérant l'obtention d'un même photoproduit après photolibération de NO[•] des deux isomères.

-Spectres d'absorption des *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuTCC3FCl₂NO]PF₆

Les spectres d'absorption des complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuTCC3FCl₂NO]PF₆ sous irradiation à 365 nm sont présentés sur la **Figure IV-13**. Sur les spectres avant irradiation, les maxima d'absorption entre 350 et 800 nm se situent à 414 et 426 nm pour le *cis* (Cl,Cl)- et le *trans* (Cl,Cl)- respectivement. Comme c'était le cas pour les complexes précédemment étudiés, l'irradiation à 365 nm est légèrement décalée par rapport à la bande de plus faible énergie.

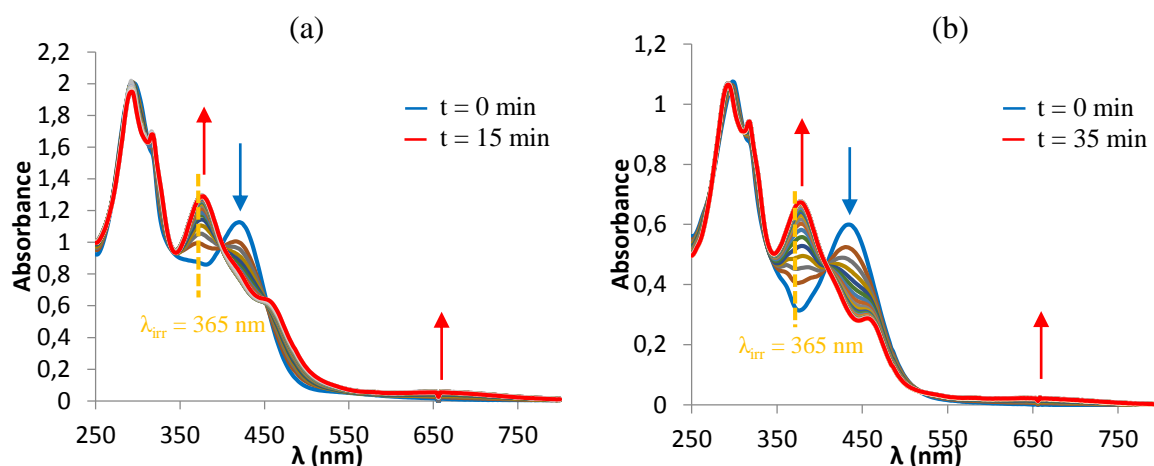


Figure IV-13 : Evolution des spectres d'absorption de (a) *cis* (Cl,Cl)- et (b) *trans* (Cl,Cl)-[RuTCC3FCl₂NO]PF₆ sous irradiation à 365 nm

Sous irradiation à 365 nm, ces complexes subissent également une transformation. Le *cis* (Cl,Cl)- voit sa bande à 414 nm disparaître et deux bandes à 370 et 650 nm apparaître. Un épaulement vers 455 nm se forme également sous irradiation. Les spectres d'absorption se coupent tous en cinq points isosbestiques (à 265, 338, 400, 455 et 550 nm).

La bande à 426 nm de l'isomère *trans* (Cl,Cl)-[RuTCC3FCl₂NO]PF₆ disparaît et trois bandes augmentent à 370, 455 et 650 nm. Les points isosbestiques de cette évolution se situent à 270, 338, 405 et 510 nm.

L'allure du photoproduit semble identique pour les deux isomères, ce qui suggère, d'après ce qui a été observé pour les *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆, qu'un photoproduit commun est obtenu.¹²¹

Les complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuTCC3FC1₂NO]PF₆ sont également irradiés à 420 nm. La **Figure IV-14** présente les spectres d'absorption obtenus sous irradiation. A cette longueur d'onde, la transition de plus faible énergie est précisément excitée.

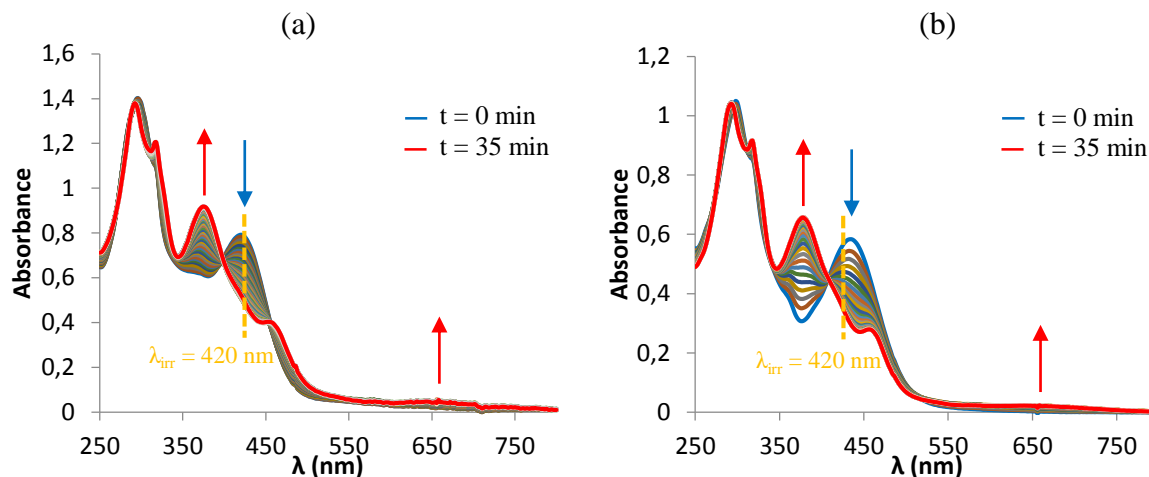


Figure IV-14 : Evolution des spectres d'absorption de (a) *cis* (Cl,Cl)- et (b) *trans* (Cl,Cl)-[RuTCC3FC1₂NO]PF₆ sous irradiation à 420 nm

A nouveau, la transformation photochimique est plus lente à 420 nm, mais l'allure des spectres est la même que sous irradiation à 365 nm. Les points isosbétiques se trouvent aussi aux mêmes longueurs d'onde que pour l'irradiation précédente.

-Spectres d'absorption des *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuF_{Me}F_{Me}TCl₂NO]PF₆

Afin de mesurer le rendement quantique de NO^{*} des complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFFTCl₂NO]PF₆, ce sont les isomères de [RuF_{Me}F_{Me}TCl₂NO]PF₆ qui sont analysés. Comme expliqué précédemment, ces derniers sont plus facilement purifiables en chromatographie. De plus, une étude sur les *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ avec et sans chaînes hexyles en position 9f du fluorène a montré que la présence des chaînes n'avait pratiquement pas d'influence sur le rendement quantique de NO^{*} dans l'acétonitrile (cf Chapitre II, **Tableau II-2**, p.120).

La **Figure IV-15** présente les spectres d'absorbance des complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuF_{Me}F_{Me}TCl₂NO]PF₆ sous irradiation à 365 nm.

Pour l'isomère *cis* (Cl,Cl)-, la bande à 322 nm n'évolue pas mais la bande à 426 nm diminue au cours de l'irradiation. De plus, deux bandes à 375 nm et 450 nm apparaissent, ainsi que la bande caractéristique du Ru (III) vers 700 nm. Trois points isosbestiques sont visibles pour cette photoréaction : à 284, 350 et 416 nm.

La bande à 326 nm de l'isomère *trans* (Cl,Cl)- augmente en intensité au cours de l'irradiation, ce qui indique l'implication du ligand dans la transformation du complexe en photoproduit. Comme pour l'autre isomère, une bande vers 375 nm apparaît et la bande à 444 nm diminue. De même, un épaulement vers 450 nm et la bande vers 700 nm s'intensifient. L'évolution du spectre d'absorption se fait avec cinq points isosbestiques à 272, 336, 350, 430 et 560 nm.

Les deux complexes évoluent jusqu'à donner des espèces dont les spectres d'absorption sont superposables.

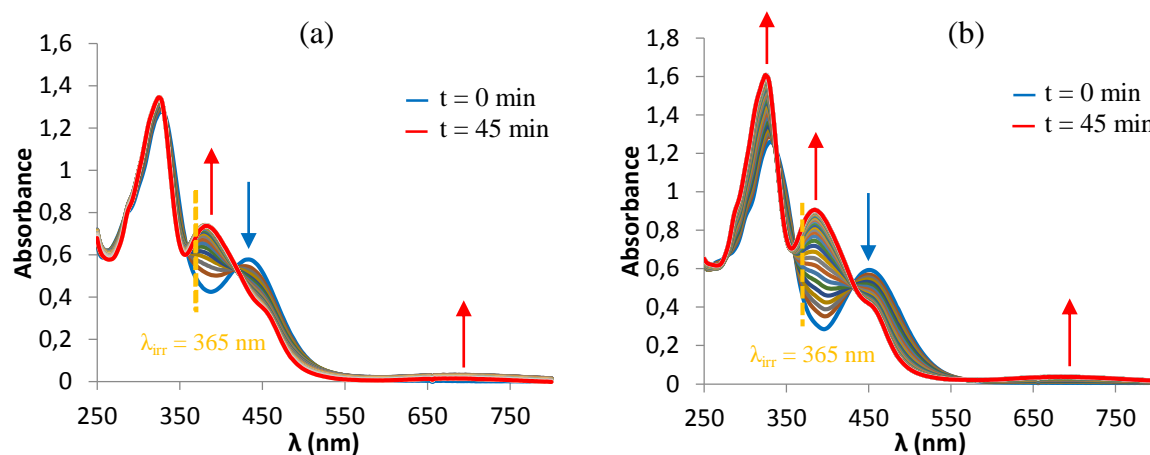


Figure IV-15 : Evolution des spectres d'absorption de (a) *cis* (Cl,Cl)- et (b) *trans* (Cl,Cl)- [RuF_{Me}F_{Me}Cl₂NO]PF₆ sous irradiation à 365 nm

Les complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuF_{Me}F_{Me}TCl₂NO]PF₆ sont ensuite irradiés à 420 nm et l'évolution des spectres d'absorption est représentée sur la **Figure IV-16**.

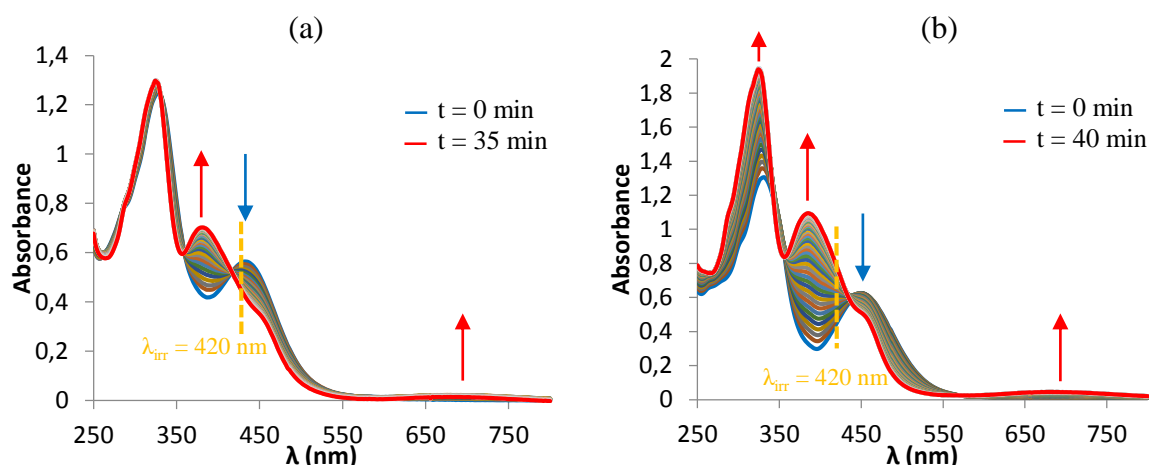


Figure IV-16 : Evolution des spectres d'absorption de (a) *cis* (Cl,Cl)- et (b) *trans* (Cl,Cl)-[RuF_{Me}F_{Me}Cl₂NO]PF₆ sous irradiation à 420 nm

Sous irradiation à cette seconde longueur d'onde, les mêmes évolutions que sur la **Figure IV-15** sont obtenues. Des bandes similaires apparaissent et les mêmes points isosbestiques sont observés.

IV. 3. 2- b) Détermination du rendement quantique de NO*

D'après l'**Annexe 5**, le rendement quantique de NO* est déterminé par la résolution de la loi de vitesse à l'aide des données de l'évolution de l'absorbance à la longueur d'onde d'irradiation et à une longueur d'onde d'observation. Les conditions expérimentales dans lesquelles les rendements quantiques de cette partie ont été calculés sont rassemblées dans les **Tableaux 5-5, 5-6 et 5-7** de l'**Annexe 5** p.331-332. Ils sont déterminés dans l'acétonitrile pour les irradiations à 365 et 420 nm.

La **Figure IV-17** montre l'évolution de l'absorbance en fonction du temps calculée (en trait plein) et celle enregistrée expérimentalement (en pointillés) pour les complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuTCC₂FC₂NO]PF₆.

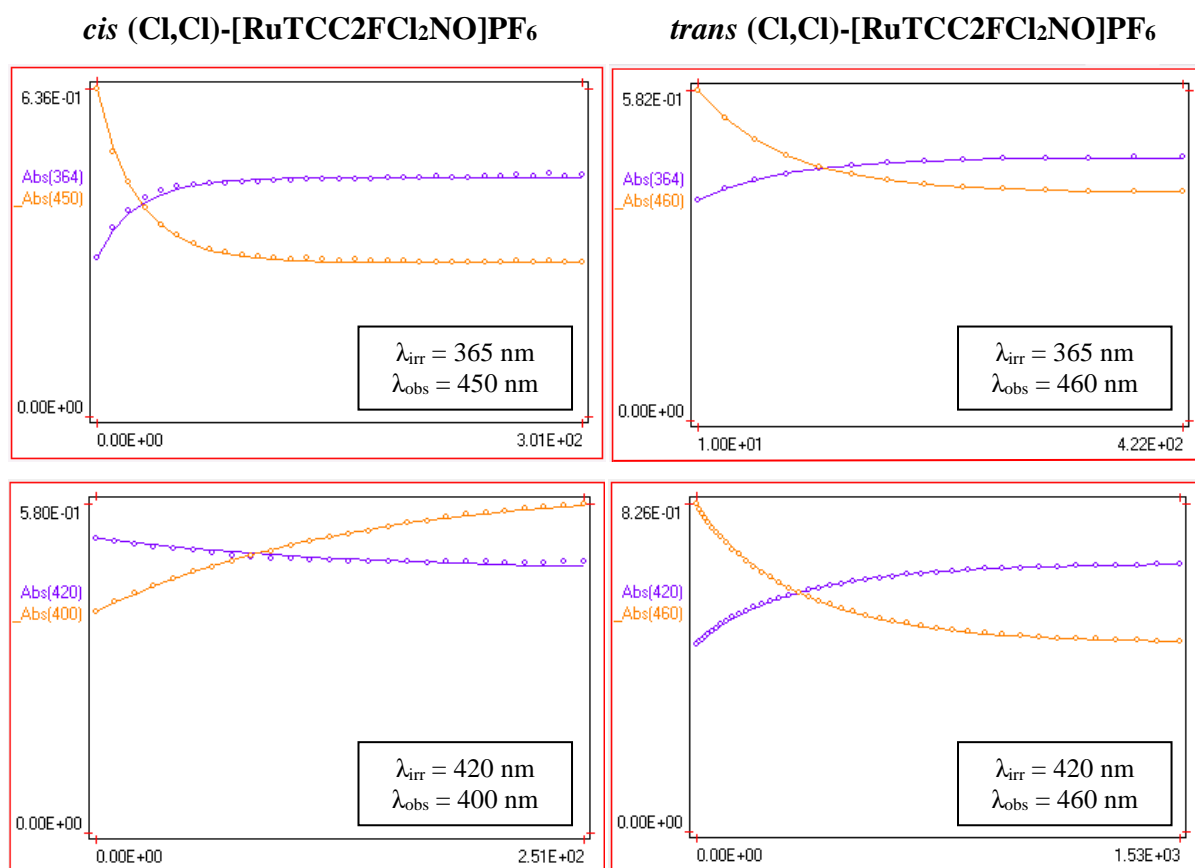


Figure IV-17 : Evolutions expérimentale et calculée de l'absorbance aux longueurs d'onde d'irradiation et d'observation pour le *cis* (Cl,Cl)- (à gauche) et *trans* (Cl,Cl)-[RuTCC2FCl₂NO]PF₆ (à droite), en fonction du temps (en secondes)

D'après ces graphes, le calcul est cohérent avec l'expérimentation pour ces deux complexes [RuTCC2FCl₂NO]PF₆. Ces courbes théoriques sont obtenues pour des rendements quantiques de NO[•] de 0,267 et 0,083 à 365 nm (pour le *cis* (Cl,Cl)- et le *trans* (Cl,Cl)- respectivement) et 0,056 et 0,038 à 420 nm. L'isomère *cis* (Cl,Cl)- est plus efficace que le *trans* (Cl,Cl)-, comme dans le cas du [RuFTCl₂NO]PF₆.

Le même type de calcul est utilisé pour la détermination du rendement quantique des *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuTCC3FCl₂NO]PF₆ dans l'acétonitrile. Les courbes expérimentales et théoriques sont tracées sur la **Figure IV-18**.

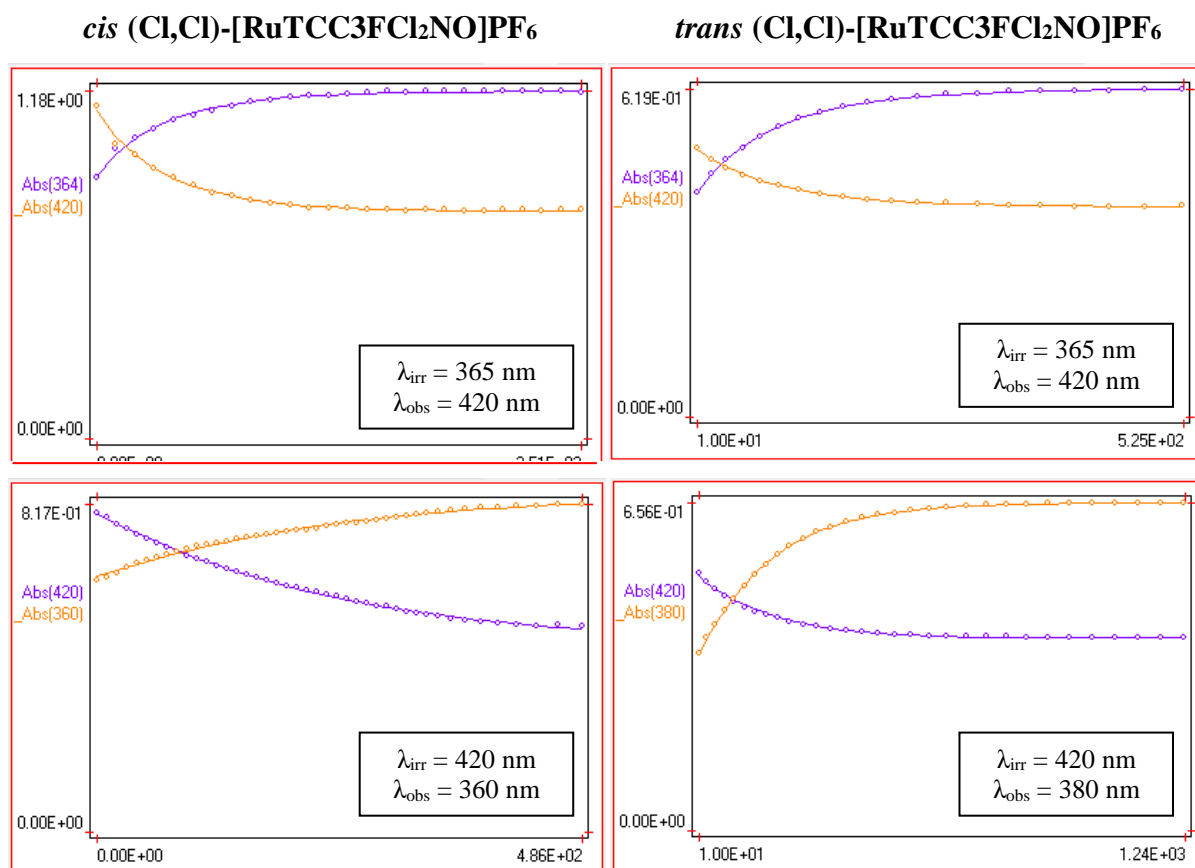


Figure IV-18 : Evolutions expérimentale et calculée de l'absorbance aux longueurs d'onde d'irradiation et d'observation pour le *cis* (Cl,Cl)- (à gauche) et *trans* (Cl,Cl)-[RuTCC3FCl₂NO]PF₆ (à droite), en fonction du temps (en secondes)

Les courbes théoriques sont superposables aux données expérimentales pour des rendements quantiques de NO[•] de 0,198 et 0,062 à 365 nm (pour le *cis* (Cl,Cl)- et le *trans* (Cl,Cl)- respectivement) et de 0,030 et 0,023 à 420 nm. Pour les complexes constitués du ligand TCC3F également, l'isomère *cis* (Cl,Cl)- a un meilleur rendement quantique de NO[•] que le *trans* (Cl,Cl)-.

Les rendements quantiques de NO[•] des complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuF_{Me}F_{Me}TCl₂NO]PF₆ sont également calculés de la même façon dans l'acétonitrile. Le **Figure IV-19** présente les courbes expérimentales et calculées de l'évolution de l'absorbance au cours du temps pour les deux isomères.

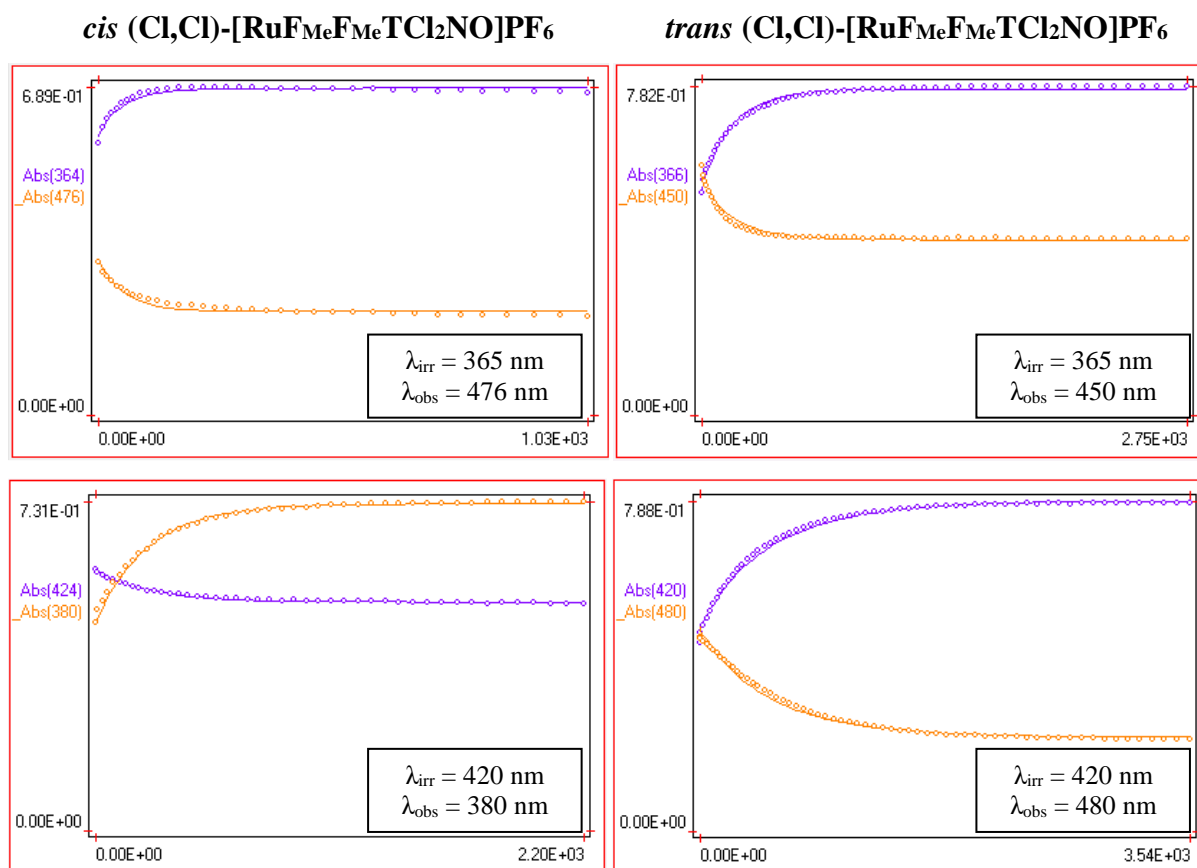


Figure IV-19 : Evolutions expérimentale et calculée de l'absorbance aux longueurs d'onde d'irradiation et d'observation pour le *cis* (Cl,Cl)- (à gauche) et *trans* (Cl,Cl)-[RuF_{Me}F_{Me}TCl₂NO]PF₆ (à droite), en fonction du temps (en secondes)

L'ajustement des points expérimentaux et de la loi théorique est obtenu pour les deux isomères aux deux longueurs d'onde d'irradiation. Les rendements quantiques de NO[•] calculés sont de 0,310 et 0,110 respectivement pour le *cis* (Cl,Cl)- et le *trans* (Cl,Cl)- à 365 nm et de 0,057 et 0,034 à 420 nm.

Les rendements quantiques mesurés pour ces complexes dans l'acétonitrile à 365 et 420 nm sont regroupés dans le **Tableau IV-3**. Les rendements quantiques mesurés à ces deux longueurs d'onde pour les isomères de [RuFTCl₂NO]PF₆ (Chapitre II) sont également rappelés.

Tableau IV-3 : Rendements quantiques de NO[•] pour les différents complexes à 365 et 420 nm dans l'acétonitrile

| | Φ_{NO}^{365} | Φ_{NO}^{420} |
|---|--------------------------|--------------------------|
| <i>cis</i> (Cl,Cl) [RuTCC2FCl ₂ NO]PF ₆ | 0,267 | 0,056 |
| <i>trans</i> (Cl,Cl) [RuTCC2FCl ₂ NO]PF ₆ | 0,083 | 0,038 |
| <i>cis</i> (Cl,Cl) [RuTCC3FCl ₂ NO]PF ₆ | 0,198 | 0,030 |
| <i>trans</i> (Cl,Cl) [RuTCC3FCl ₂ NO]PF ₆ | 0,062 | 0,023 |
| <i>cis</i> (Cl,Cl) [RuF _{Me} F _{Me} TCI ₂ NO]PF ₆ | 0,310 | 0,057 |
| <i>trans</i> (Cl,Cl) [RuF _{Me} F _{Me} TCI ₂ NO]PF ₆ | 0,110 | 0,034 |
| <i>cis</i> (Cl,Cl) [RuFTCl ₂ NO]PF ₆ | 0,222 | 0,067 |
| <i>trans</i> (Cl,Cl) [RuFTCl ₂ NO]PF ₆ | 0,066 | 0,034 |

Les rendements quantiques mesurés à 365 nm sont plus élevés qu'à 420 nm, comme cela avait été observé dans la Chapitre II pour les complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)- [RuFTCl₂NO]PF₆.

Les isomères *cis* (Cl,Cl)- de ces nouveaux complexes présentent de meilleurs rendements quantiques de NO[•] que les *trans* (Cl,Cl)-. Cette même observation a été faite dans le cas des isomères de [RuFTCl₂NO]PF₆, dont les rendements quantiques ont été présentés dans le Chapitre II. En effet, dans les isomères *trans* (Cl,Cl)- de ces nouveaux complexes, le ligand nitrosyle est à nouveau en *trans* d'une pyridine π -accepteur qui défavorise la rétrodonation du métal vers le groupement nitrosyle. Donc l'ordre de la liaison Ru-N est plus important que dans l'isomère *cis* (Cl,Cl)- dans lequel le ligand nitrosyle est en *trans* d'un ligand chloro avec un caractère donneur. L'ordre de liaison étant affaibli pour le *cis* (Cl,Cl)-, la libération de NO[•] est favorisée.

D'après le **Tableau IV-3**, les rendements quantiques des trois complexes de même configuration (*cis* (Cl,Cl)- ou *trans* (Cl,Cl)-) sont similaires.

A 420 nm, qui est la longueur d'onde d'irradiation la plus centrée sur la transition d'intérêt, les rendements quantiques sont de l'ordre de 0,060 pour les isomères *cis* (Cl,Cl)- et

de l'ordre de 0,030 pour les *trans* (Cl,Cl)-. Les isomères de [RuTCC3FCl₂NO]PF₆ sont légèrement moins efficaces.

A 365 nm, l'introduction d'une double liaison entre la terpyridine et le fluorène permet une légère augmentation du rendement quantique de NO[•]. La structure du complexe étant aplanie et la conjugaison étant étendue par rapport au complexe avec le ligand fluorène-terpyridine, le transfert de charge du ligand vers le fragment Ru-NO est certainement amélioré et engendre une efficacité de libération de NO[•] plus importante.

En revanche, l'utilisation d'une triple liaison entre le fluorène et la terpyridine ne semble pas optimiser l'efficacité de photolibération. Il ne semble donc pas y avoir de tendance évidente dans l'évolution du rendement quantique avec l'augmentation de la délocalisation électronique.

De plus, des mesures de rendements quantiques de NO[•] ont été réalisées dans l'équipe pour des complexes à ligand 2,2'-bipyridine. Les rendements quantiques de [RuFT(bpy)NO](PF₆)₃, [RuTCC2F(bpy)NO](PF₆)₃ et [RuTCC3F(bpy)NO](PF₆)₃ dans l'acétonitrile sous irradiation à 436 nm sont respectivement 0,010, 0,008 et 0,009. Les trois rendements obtenus sont très proches, il est donc difficile de conclure sur l'effet de l'augmentation de la conjugaison du ligand tridentate sur l'efficacité de photolibération de NO[•] dans cette série de complexes également.

Les complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuF_{Me}F_{Me}TCl₂NO]PF₆ présentent des rendements quantiques de NO[•] semblables à ceux des complexes [RuFTCl₂NO]PF₆ avec un seul fragment fluorène à 420 nm. En revanche, sous irradiation à 365 nm, ce sont ces complexes possédant un ligand terpyridine substitués par deux unités fluorène conjuguées qui présentent les meilleurs rendements quantiques de la série avec 0,310 pour le *cis* (Cl,Cl)- et 0,110 pour le *trans* (Cl,Cl)-. La conjugaison est augmentée sur le ligand et donc le transfert de charge vers le fragment Ru-NO sous excitation est amélioré par rapport aux autres complexes. La libération de NO[•] se fait ainsi de façon plus efficace.

Ainsi, la stratégie adoptée par l'équipe qui est d'augmenter la délocalisation électronique sur le ligand afin d'améliorer le transfert de charge vers le fragment Ru-NO sous irradiation ne permet donc pas de conclure sur une évolution évidente du rendement quantique de NO[•]. Cela suggère que le mécanisme impliqué dans la photolibération de NO[•] est plus

complexe qu'un unique transfert de charge au sein du complexe sous l'effet de l'excitation par un photon.

IV. 3. 3- Mesures des sections efficaces d'absorption à deux photons

Le second objectif de l'augmentation de la délocalisation électronique sur le ligand terpyridine-fluorène est l'amélioration de la section efficace d'absorption à deux photons σ par rapport à celles des complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuF_{hex}TCl₂NO]. Les mesures des sections efficaces des complexes *trans* (Cl,Cl)-[RuTCC2FCl₂NO]PF₆ et *trans* (Cl,Cl)-[RuTCC3FCl₂NO]PF₆ ont récemment été réalisées au CIO. De plus, pour comparaison, les sections efficaces des complexes possédant un ligand 2,2'-bipyridine, mesurées par V. Bukhanko, sont également présentées dans le **Tableau IV-4**.

Tableau IV-4 : Section efficaces à 800 nm pour différents complexes de ruthénium à ligand nitrosyle

| Complexe | σ à 800 nm (GM) |
|--|------------------------|
| <i>trans</i> (Cl,Cl)-[RuF _{hex} TCl ₂ NO]PF ₆ | 87 |
| <i>trans</i> (Cl,Cl)-[RuTCC2FCl ₂ NO]PF ₆ | 191 |
| <i>trans</i> (Cl,Cl)-[RuTCC3FCl ₂ NO]PF ₆ | 167 |
| [RuFT(bpy)NO](PF ₆) ₃ | 108 |
| [RuTCC2F(bpy)NO](PF ₆) ₃ | 131 |
| [RuTCC3F(bpy)NO](PF ₆) ₃ | 150 |

Ces mesures montrent que l'introduction d'une double ou triple liaison entre le fluorène et la terpyridine permet d'augmenter de façon importante la section efficace par rapport au complexe avec le ligand FT. Une tendance similaire a été observée pour les complexes à ligand bipyridine.

La section efficace du complexe [RuFT(bpy)NO](PF₆)₃ étant proche de celle du *cis* (Cl,Cl)-[RuF_{hex}TCl₂NO]PF₆ (108 et 100 GM, cf Chapitre II), les complexes *cis* (Cl,Cl)-[RuTCC2FCl₂NO]PF₆ et *cis* (Cl,Cl)-[RuTCC3FCl₂NO]PF₆ suivront la même tendance : leurs sections efficaces seront augmentées.

Quant aux complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuF_{Me}F_{Me}TCl₂NO]PF₆, l'introduction d'un second groupement fluorène conjugué au premier ne peut qu'augmenter la

section efficace d'absorption à deux photons car le fluorène est un groupement très étudié pour ses bonnes propriétés d'absorption à deux photons (TPA). Les mesures n'ont pas encore pu être réalisées.

La stratégie qui consiste à augmenter la délocalisation électronique sur le ligand terpyridine afin d'augmenter le transfert de charge dans le complexe et donc sa section efficace d'absorption à deux photons est ainsi validée. Les substituants utilisés permettent donc d'augmenter la réponse TPA des complexes tout en conservant leur efficacité de libération de NO[•].

IV. 4. Photolibération de NO[•] par les nouveaux complexes dans l'eau

IV. 4. 1- Mise en évidence d'une transformation dans l'eau

Dans le Chapitre III, un échange de ligand sur le complexe [RuFTCl₂NO]⁺ a été mis en évidence en présence d'eau. En effet, un des ligands chloro du complexe a été substitué par un hydroxo. Ainsi, dans un premier temps, avant d'étudier les propriétés de photolibération des nouveaux complexes synthétisés dans ce chapitre, leur stabilité dans l'eau est vérifiée.

IV. 4. 1- a) Etude par spectroscopie d'absorption UV-Vis

Pour vérifier la stabilité dans l'eau, la stratégie est de suivre le spectre d'absorption du complexe dans l'eau avec 0,5% de DMSO, conditions proches de celles utilisées en biologie (cf Chapitres V et VI), au cours du temps.

Pour le complexe [RuTCC₂FCl₂NO]PF₆, l'analyse est réalisée sur l'isomère *trans* (Cl,Cl)- car il a été obtenu en plus grande quantité. La **Figure IV-20** présente l'évolution de son spectre d'absorption sur 48 heures.

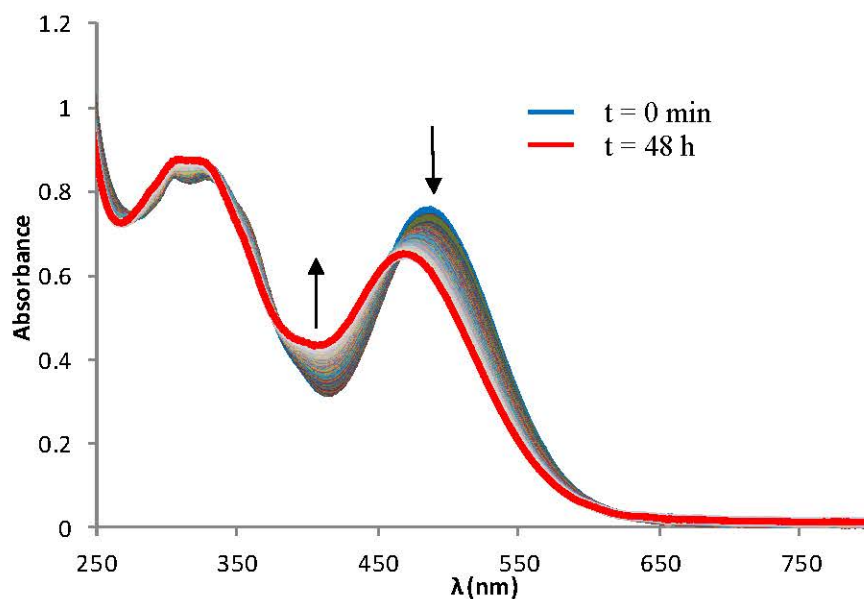


Figure IV-20 : Evolution du spectre d'absorption du *trans* (Cl,Cl)-[RuTCC2FCl₂NO]PF₆ dans l'eau (0,5% DMSO) sur 48 heures

Les spectres d'absorption du complexe dans l'eau au cours du temps montrent que celui-ci n'est pas stable. A $t = 0$ min, le spectre présente un épaulement avec deux maxima à 300 et 320 nm ainsi qu'un maximum à 485 nm. Au cours de la transformation, les maxima à plus faible longueur d'onde restent quasiment inchangés alors que la bande à 485 nm se décale à 465 nm. La transformation dans l'eau de ce complexe s'accompagne donc d'un décalage vers les plus faibles longueurs d'onde, comme c'est le cas pour les *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ (cf Chapitre III).

Cette évolution se fait avec cinq points isosbestiques à 274, 335, 374, 460 et 620 nm. Cela montre donc l'équilibre entre le complexe de départ et son produit transformé dans l'eau, qui est stable dans l'eau sans irradiation.

L'isomère *trans* (Cl,Cl)-[RuTCC3FCl₂NO]PF₆ est également suivi par spectroscopie d'absorption au cours du temps en milieu aqueux. La **Figure IV-21** présente les spectres d'absorption du complexe pris pendant 48 heures.

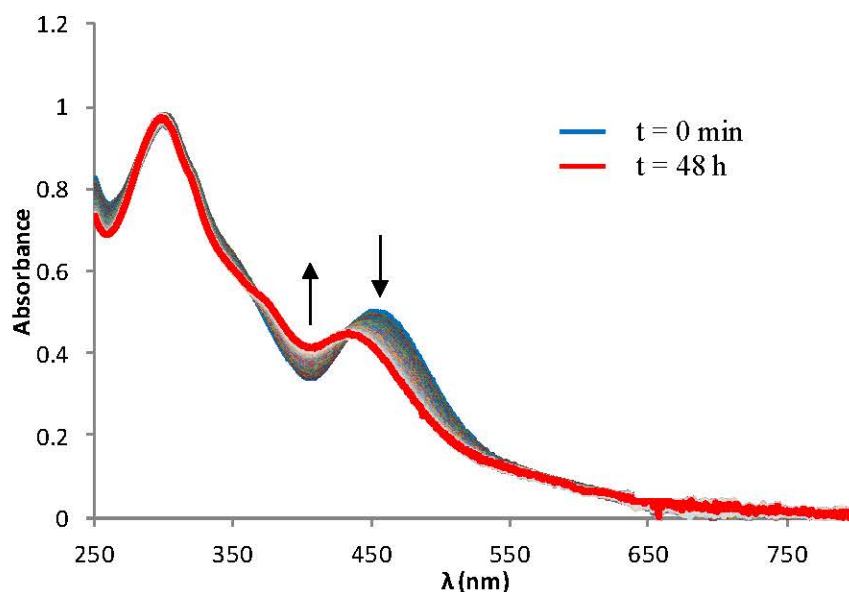


Figure IV-21 : Evolution du spectre d'absorption du *trans* (Cl,Cl)-[RuTCC3FCl₂NO]PF₆ dans l'eau (0,5% DMSO)

Ce complexe présente également une évolution de son spectre d'absorption UV-Vis dans l'eau au cours du temps. Le maximum d'absorption à 285 nm ne subit pas de changement au cours de la transformation, ce qui confirme que cette bande est relative à une transition centrée sur le ligand TCC3F. En revanche, la bande présentant le second maximum d'absorption à 452 nm diminue car la bande se décale vers les hautes énergies, avec un maximum d'absorption situé à 428 nm.

L'absorbance reste constante au cours du temps pour quatre longueurs d'onde : à 280, 359, 428 et 615 nm. Ces points isosbestiques traduisent à nouveau l'équilibre du complexe *trans* (Cl,Cl)- [RuTCC3FCl₂NO]PF₆ avec un produit transformé dans l'eau.

Pour le troisième complexe [RuFFTC₁₂NO]PF₆ (possédant les chaînes hexyles), c'est le mélange des deux isomères obtenus après bullage de NO[•] (et changement du contre-ion) qui est analysé dans l'eau (**Figure IV-22**).

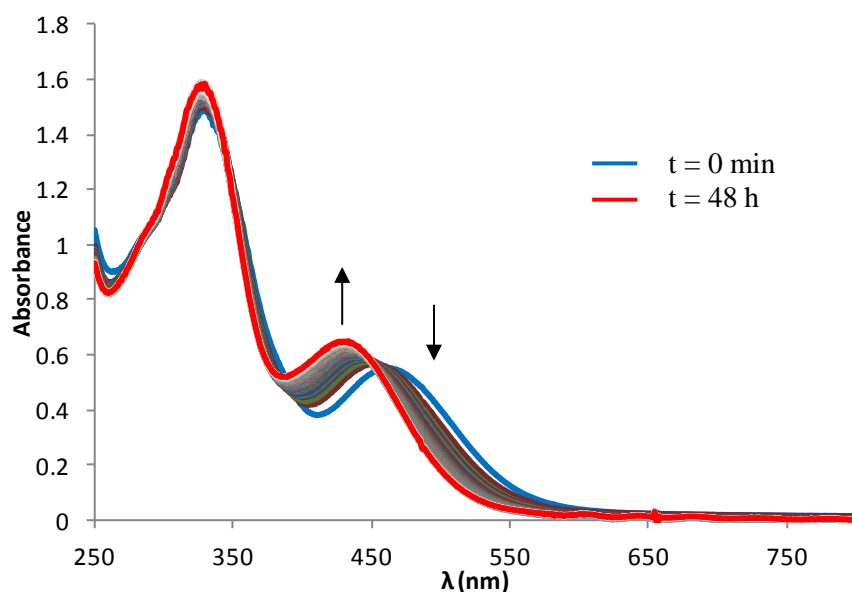


Figure IV-22 : Evolution du spectre d'absorption du mélange des *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFFTC12NO]PF₆ dans l'eau (0,5% DMSO) au cours du temps

Le mélange d'isomères étudié ici n'est pas stable en milieu aqueux. Le spectre à $t = 0$ min présente deux maxima d'absorption à 322 et 460 nm. Le mélange évolue ensuite pour donner, en 48 heures, un spectre présentant un maximum à 322 nm et dont la bande de plus basse énergie s'est décalée de 460 à 422 nm. L'évolution des spectres d'absorption se fait avec trois points isosbestiques à 285, 343 et 452 nm. Le mélange de départ *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFFTC12NO]PF₆ se transforme donc en une espèce ou un mélange d'espèces stable dans l'eau.

Dans ce paragraphe, le suivi du spectre d'absorption des *trans* (Cl,Cl)-[RuTCC2FC12NO]PF₆, *trans* (Cl,Cl)-[RuTCC3FC12NO]PF₆ et *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFFTC12NO]PF₆ a permis de montrer que ces complexes subissent une transformation dans l'eau. Une espèce stable est finalement obtenue dans les trois cas, comme cela a été observé pour les *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl2NO]PF₆. L'hypothèse que les isomères *cis* (Cl,Cl)-[RuTCC2FC12NO]PF₆ et *cis* (Cl,Cl)-[RuTCC3FC12NO]PF₆ se transforment également en présence d'eau est émise.

Une étude par spectrométrie de masse est ensuite proposée afin de comprendre quel type de transformation a lieu dans l'eau.

IV. 4. 1- b) Etude par spectrométrie de masse

Par spectrométrie de masse, le mélange de *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)- [RuTCC2FCl₂NO]PF₆ obtenu après bullage de NO[•] est analysé dans l'acétonitrile et dans l'eau (avec 0,5% DMSO). Dans l'acétonitrile, en ESI-positive, la masse attendue est celle du cation de formule brute C₄₅H₄₂Cl₂N₄ORu et de masse 793,2 g/mol. Le pic obtenu en spectrométrie de masse est bien à m/z = 793,2.

Le mélange des deux isomères *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)- donne un unique pic de masse m/z = 775,2. Le pic obtenu correspond à une espèce monochargée et le profil isotopique est cohérent avec la présence d'un seul chlore, comme le montre la **Figure IV-23**.

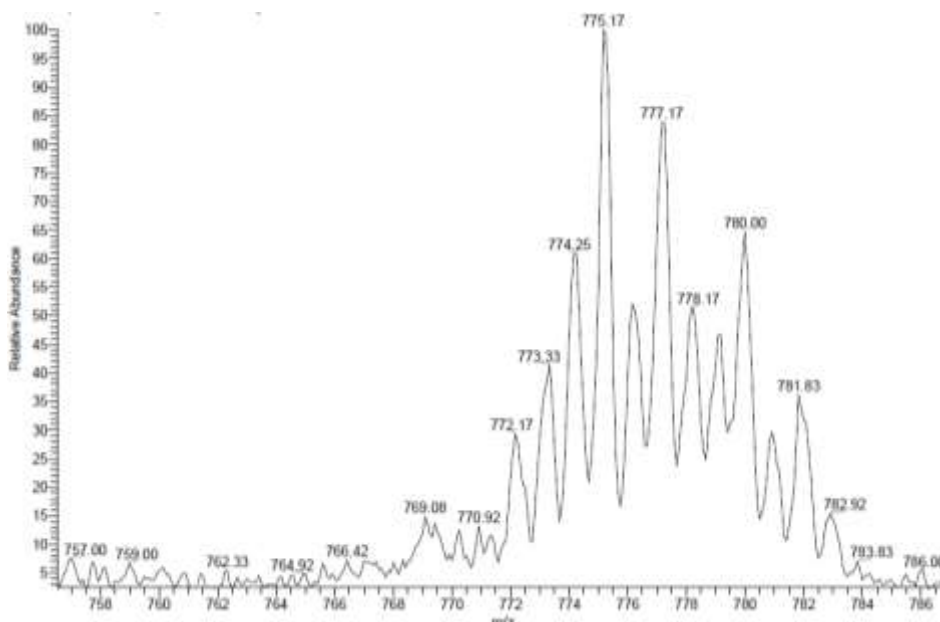


Figure IV-23 : Massif isotopique obtenu pour le mélange des isomères de [RuTCC2FCl₂NO]PF₆ dans l'eau (0,5% DMSO)

Les deux isomères subissent donc la même transformation. Il s'agit d'une différence de 18 g/mol, ce qui correspond au remplacement d'un ligand chloro par un hydroxo.

La même étude est menée sur le mélange obtenu après bullage de NO[•] sur le [RuTCC3FCl₃]. Dans l'acétonitrile, le pic obtenu est à m/z = 791,2, correspondant à la masse du cation de formule brute C₄₂H₄₃Cl₂N₄ORu. Dans l'eau (avec 0,5% de DMSO), le spectre de masse montre un unique pic à m/z = 773,2. Celui-ci est monochargé et correspond à nouveau à la masse du complexe ayant subi un échange de ligand Cl/OH.

Enfin, l'étude du mélange de *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFFTCI₂NO]PF₆ est réalisée dans les mêmes conditions. Dans l'acétonitrile, ces isomères donnent un pic à $m/z = 1099,5$ en ESI-positive, correspondant à la masse attendue pour le cation.

Dans l'eau (0,5% DMSO), les complexes évoluent et le pic observé en ESI-positive se situe à $m/z = 1081,5$ (**Figure IV-24**).

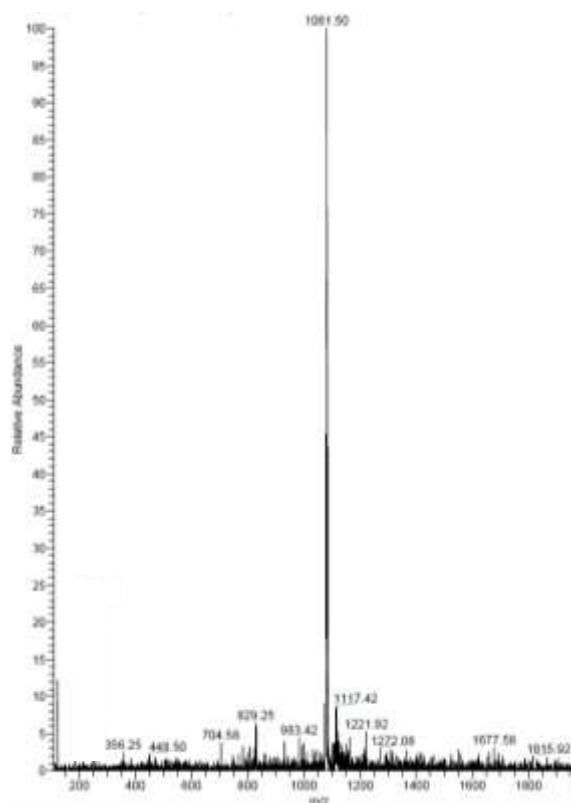


Figure IV-24 : Spectre de masse du mélange *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFFTCI₂NO]PF₆ dans l'eau (0,5% DMSO)

Dans ce troisième cas également, la substitution d'un ligand chloro par un hydroxo est mise en évidence. Cette transformation a été décrite dans le Chapitre III pour les *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆. Les deux complexes évoluent dans l'eau pour donner un complexe identique qui est le *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆.

Ainsi, l'hypothèse de la transformation des deux isomères *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)- en l'isomère *trans* (NO,OH)- correspondant peut être faite pour les nouveaux complexes à ligand TCC2F, TCC3F et FFT. Les trois complexes dont les rendements quantiques de NO[•] doivent être déterminés dans l'eau sont donc : *trans* (NO,OH)-[RuTCC2FCI₂NO]PF₆, *trans* (NO,OH)-[RuTCC3FCI₂NO]PF₆ et *trans* (NO,OH)-[RuFFTCI₂NO]PF₆.

IV. 4. 2- Mesure des rendements quantiques de NO[•] des complexes dans l'eau

Dans ce paragraphe, les rendements quantiques de NO[•] des complexes *trans* (NO,OH)-[RuTCC2F(Cl)(OH)(NO)]PF₆, *trans* (NO,OH)-[RuTCC3F(Cl)(OH)(NO)]PF₆ et *trans* (NO,OH)-[RuFFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ sont mesurés dans l'eau.

Dans le Chapitre III, des calculs DFT ont montré que la bande de plus basse énergie du complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ correspondait majoritairement à une transition HOMO → LUMO, s'accompagnant d'un transfert de charge du ligand fluorène-terpyridine vers le fragment Ru-NO. Ce complexe a été irradié sur cette transition (à 365 et 420 nm) afin de provoquer la libération de NO[•].

Le **Tableau IV-5** donne, pour les trois complexes, les valeurs des longueurs d'onde où l'absorbance est maximale et le coefficient d'extinction molaire du complexe à cette longueur d'onde sans irradiation.

Pour les trois complexes étudiés dans l'eau, les maxima d'absorption de la bande de plus faible énergie se situent entre 424 et 464 nm. L'hypothèse que cette transition correspond à un transfert de charge favorisant la libération de NO[•], est émise. Ainsi, les six complexes de cette partie sont également irradiés à 365 et 420 nm.

Tableau IV-5 : Maxima d'absorption et coefficients d'extinction molaire correspondants pour les complexes *trans* (NO,OH)-[RuTCC2F(Cl)(OH)(NO)]PF₆, *trans* (NO,OH)-[RuTCC3F(Cl)(OH)(NO)]PF₆ et *trans* (NO,OH)-[RuFFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆

| Complexe | λ_{\max} (nm) | ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹) |
|---|-----------------------|---|
| | 306 | 22 598 |
| <i>trans</i> (NO,OH)-[RuTCC2F(Cl)(OH)(NO)]PF ₆ | 318 | 22 650 |
| | 464 | 17 622 |
| <i>trans</i> (NO,OH)-[RuTCC3F(Cl)(OH)(NO)]PF ₆ | 298 | 22 882 |
| | 430 | 10 253 |
| <i>trans</i> (NO,OH)-[RuFFT(Cl)(OH)(NO)]PF ₆ | 326 | 39 226 |
| | 430 | 15 930 |

IV. 4. 2- a) Evolution du spectre d'absorption des complexes sous irradiation

Les rendements quantiques de NO[•] des trois complexes obtenus après stabilisation dans l'eau sont déterminés dans ce paragraphe. De nouveau, la résolution de la loi de vitesse permet l'obtention du Φ_{NO} grâce au suivi de l'absorbance du réactif sous irradiation, à la longueur d'onde d'irradiation et à une longueur d'onde d'observation (cf **Annexe 5** p.326).

Ces rendements quantiques de NO[•] dans l'eau sont mesurés aux mêmes longueurs d'onde que dans l'acétonitrile : 365 et 420 nm (cf **IV. 3. 2-**).

Les suivis des spectres d'absorption de *trans* (NO,OH)-[RuTCC2F(Cl)(OH)(NO)]PF₆ sous irradiation à 365 et 420 nm sont présentés sur la **Figure IV-25**.

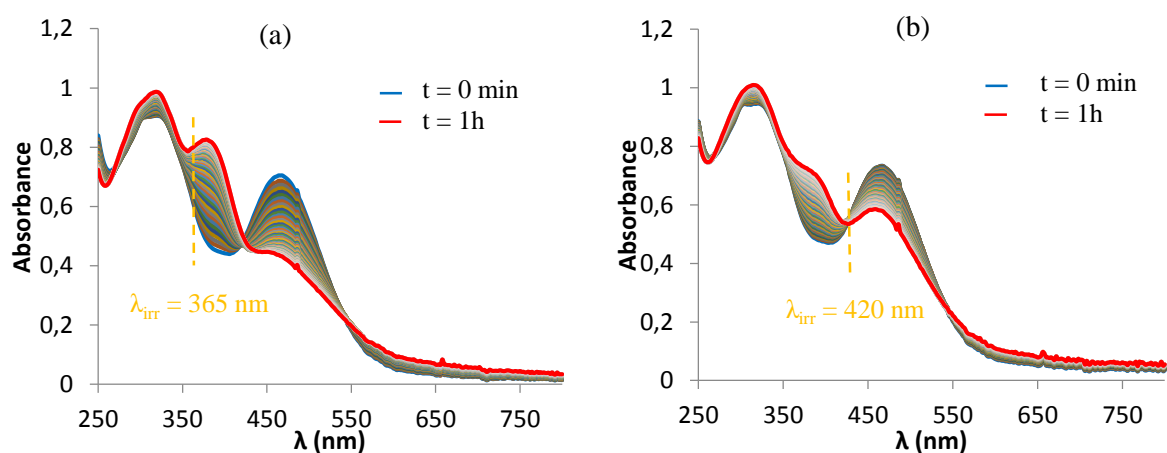


Figure IV-25 : Evolution du spectre d'absorption de *trans* (NO,OH)-[RuTCC2F(Cl)(OH)(NO)]PF₆ sous irradiation à (a) 365 nm et (b) 420 nm dans l'eau (0,5% DMSO)

La **Figure IV-25** montre que la bande de plus faible énergie située à 464 nm, diminue au cours de l'irradiation. Une bande apparaît à 372 nm et le maximum d'absorption à 312 nm augmente un peu. Trois points isosbestiques sont présents au cours de l'évolution à 268, 424 et 540 nm. Comme pour l'expérimentation dans l'acétonitrile, l'excitation à 365 nm est légèrement décalée par rapport à la bande de plus basse énergie.

Les spectres d'absorption du *trans* (NO,OH)-[RuTCC3F(Cl)(OH)(NO)]PF₆ sont ensuite enregistrés sous irradiation aux deux longueurs d'onde et sont présentés sur la **Figure IV-26**.

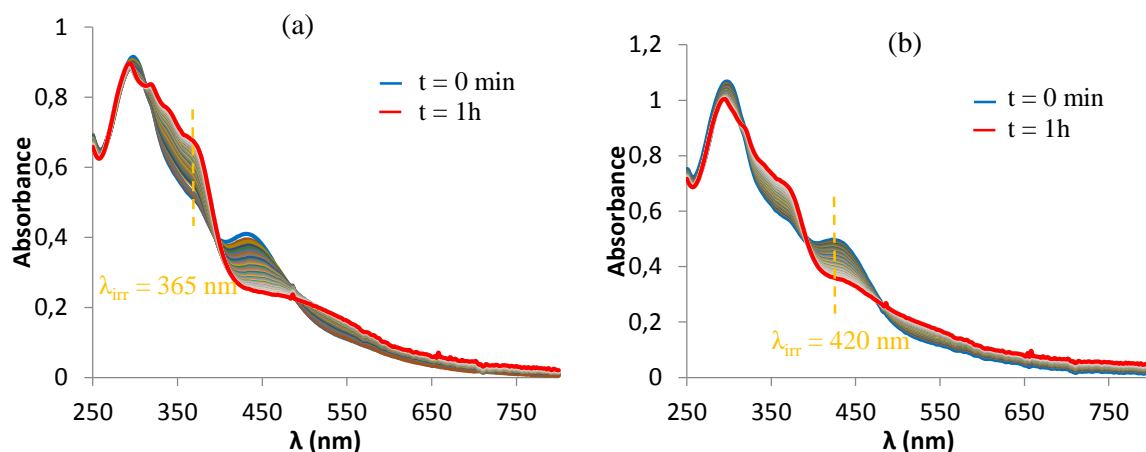


Figure IV-26 : Evolution du spectre d'absorption de *trans* (NO,OH)-[RuTCC3F(Cl)(OH)(NO)]PF₆ sous irradiation à (a) 365 nm et (b) 420 nm dans l'eau (0,5% DMSO)

Le graphe (a) correspondant à l'irradiation à 365 nm montre une évolution avec quatre points isobestiques à 284, 336, 404 et 478 nm, alors que le graphe (b) est légèrement différent et n'en montre que trois (à 354, 394 et 490 nm). Au cours de l'irradiation, la bande à 430 nm diminue alors qu'apparaissent une bande à 384 nm et une augmentation légère de l'intensité vers 500-550 nm. Après 1 heure d'irradiation à ces deux longueurs d'onde, l'absorbance reste constante, traduisant que la réaction est totale.

Les mêmes suivis spectroscopiques sous irradiation sont menés sur le *trans* (NO,OH)-[RuFFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆. Ils sont représentés sur la **Figure IV-27**.

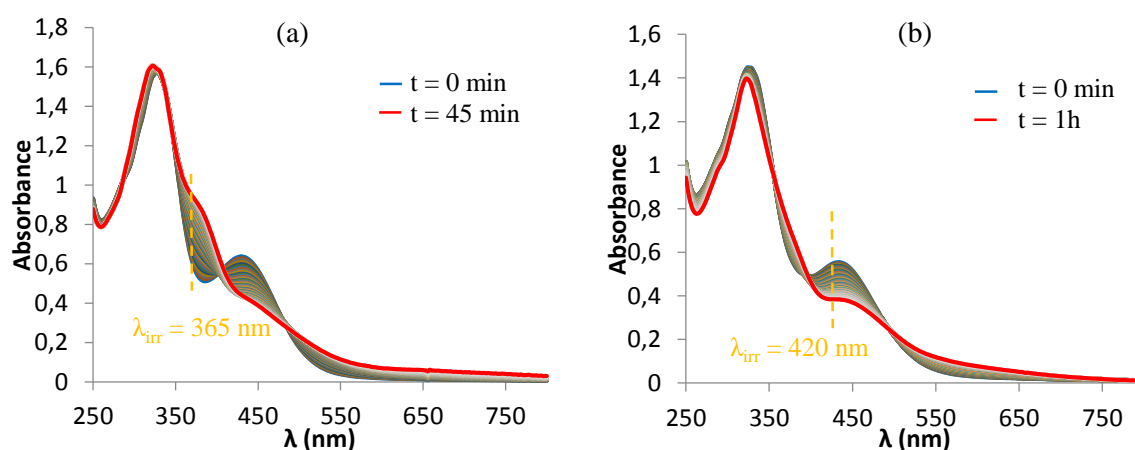


Figure IV-27 : Evolution du spectre d'absorption de *trans* (NO,OH)-[RuFFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ sous irradiation à (a) 365 nm et (b) 420 nm dans l'eau (0,5% DMSO)

Sous irradiation à 365 nm, les spectres se coupent en quatre points isobestiques à 284, 336, 404 et 480 nm. L'évolution est un peu différente sous irradiation à 420 nm puisque trois points isobestiques sont observés à 354, 392 et 488 nm. Cela peut être dû au fait que l'irradiation à 365 nm est un peu décalée par rapport à la transition de plus faible énergie qui devrait être excitée.

Les deux irradiations permettent d'observer la diminution de la bande à 430 nm et l'apparition de bandes à 380 et 520 nm.

Les suivis d'absorbance au cours de l'irradiation des trois complexes dans l'eau de ce paragraphe fournissent les données nécessaires aux calculs des rendements quantiques de NO[•] pour chaque cas. Les résultats obtenus sont présentés dans le paragraphe suivant.

IV. 4. 2- b) Détermination du rendement quantique de NO[•]

Pour chaque complexe, après détermination de l'intensité du flux incident I_0 , les courbes théoriques de l'évolution de l'absorbance au cours du temps pour les longueurs d'onde d'irradiation et d'observation sont calculées. Ces calculs, menés à partir des données expérimentales regroupées dans les **Tableaux 5-8** et **5-9** de l'**Annexe 5** p.332-333, permettent de déduire le rendement quantique de NO[•] des complexes correspondant.

Les **Figures IV-28**, **IV-29** et **IV-30** ci-dessous présentent les courbes expérimentales (en pointillés) et les courbes théoriques (trait plein) de l'absorbance au cours du temps du *trans* (NO,OH)-[RuTCC2F(Cl)(OH)(NO)]PF₆, *trans* (NO,OH)-[RuTCC3F(Cl)(OH)(NO)]PF₆ et *trans* (NO,OH)-[RuFFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ respectivement.

trans (NO,OH)-[RuTCC2F(Cl)(OH)(NO)]PF₆

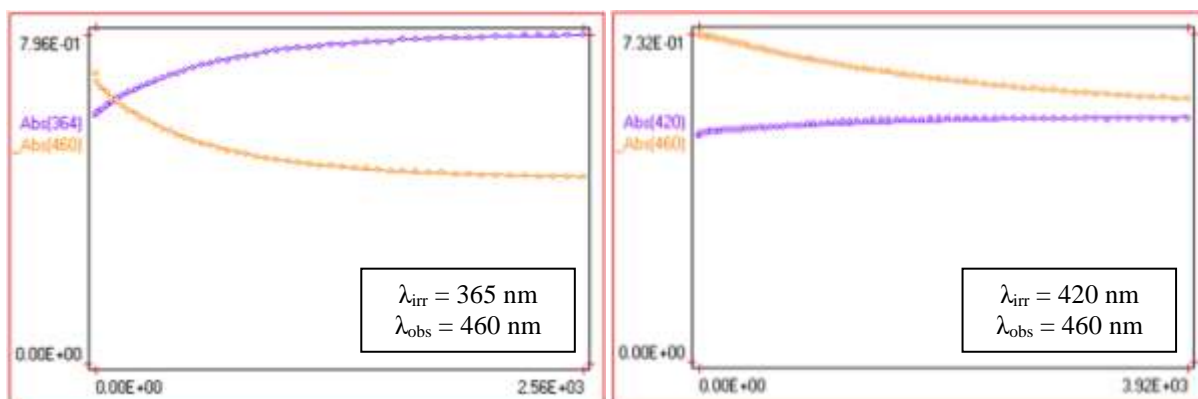


Figure IV-28 : Evolutions expérimentale et calculée de l'absorbance pour le *trans* (NO,OH)-[RuTCC2F(Cl)(OH)(NO)]PF₆, en fonction du temps (en secondes)

trans (NO,OH)-[RuTCC3F(Cl)(OH)(NO)]PF₆

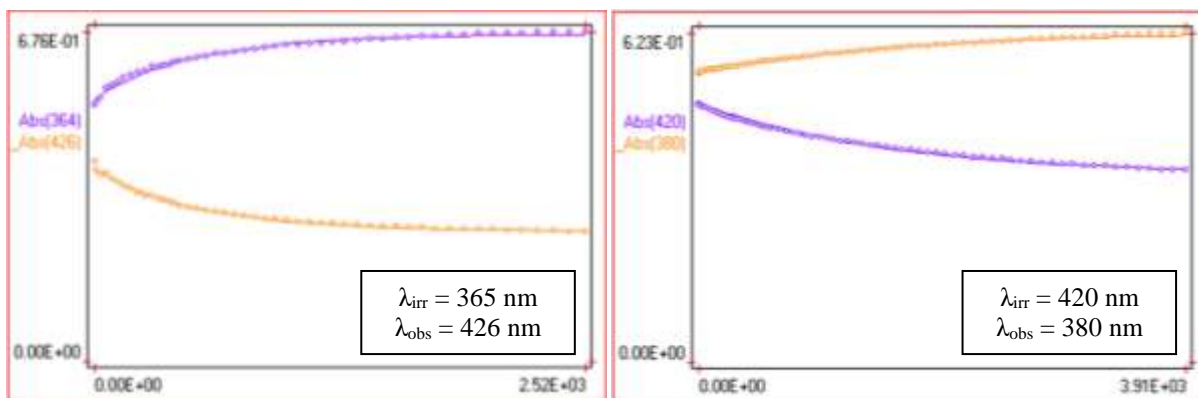


Figure IV-29 : Evolutions expérimentale et calculée de l'absorbance pour le *trans* (NO,OH)-[RuTCC3F(Cl)(OH)(NO)]PF₆, en fonction du temps (en secondes)

trans (NO,OH)-[RuFFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆

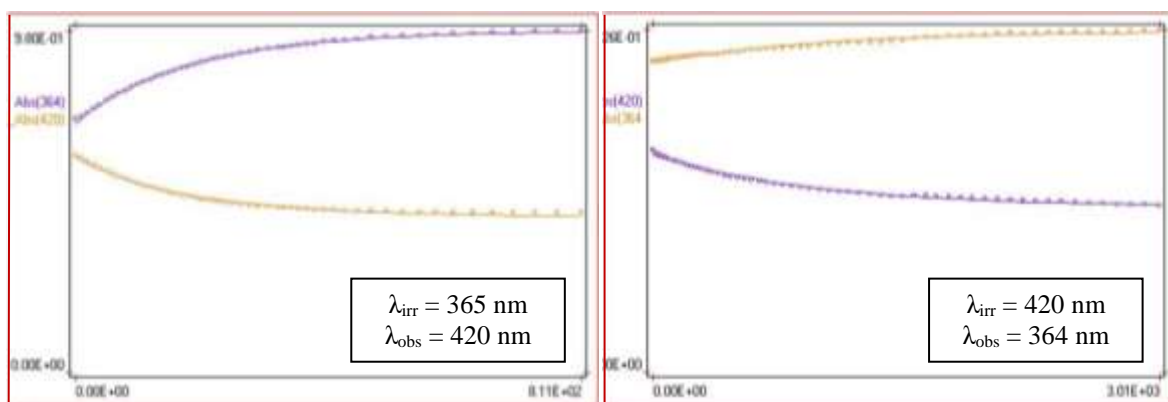


Figure IV-30 : Evolutions expérimentale et calculée de l'absorbance pour le *trans* (NO,OH)-[RuFFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆, en fonction du temps (en secondes)

Pour les trois complexes étudiés, les courbes théoriques calculées sont superposables aux points expérimentaux. Les trois rendements quantiques de NO[•] qui sont issus de ces calculs sont rassemblés dans le **Tableau IV-6**. Dans ce tableau, le rendements quantiques de NO[•] mesurés dans l'eau pour *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ (Chapitre III) sont également rappelés pour comparaison.

Tableau IV-6 : Rendements quantiques de NO[•] dans l'eau pour les quatre complexes à ligand terpyridine à 365 nm et 420 nm

| | Φ_{NO}^{365} | Φ_{NO}^{420} |
|---|--------------------------|--------------------------|
| <i>trans</i> (NO,OH) [RuTCC2F(Cl)(OH)(NO)]PF ₆ | 0,010 | 0,0040 |
| <i>trans</i> (NO,OH) [RuTCC3F(Cl)(OH)(NO)]PF ₆ | 0,011 | 0,005 |
| <i>trans</i> (NO,OH) [RuFFT(Cl)(OH)(NO)]PF ₆ | 0,027 | 0,008 |
| <i>trans</i> (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF ₆ | 0,040 | 0,020 |

A 365 et 420 nm dans l'eau, le complexe présentant le rendement quantique de NO[•] le plus élevé est le *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆. Les complexes possédant les ligands TCC2F et TCC3F ont des rendements quantiques similaires mais plus faibles.

Ces mesures montrent l'importance du solvant dans la réaction de photolibération de NO[•]. En effet, le solvant peut avoir une influence pour différentes réactions photochimiques.^{209,210} Ce dernier peut avoir une influence sur le transfert de charge intramoléculaire et donc sur l'efficacité de la photolibération de NO[•].

Tous les complexes présentés dans ce chapitre ont de bons rendements quantiques de NO[•] dans l'eau sous irradiation à 365 et 420 nm.

IV. 5. Conclusion

Dans ce chapitre, six nouveaux complexes ont été synthétisés dans le but d'augmenter le transfert de charge du ligand vers le fragment Ru-NO et ainsi d'obtenir de meilleurs rendements quantiques de photolibération de NO[•] et des sections efficaces d'absorption à deux photons plus élevées : les isomères *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)- de [RuTCC2FCl₂NO]PF₆, [RuTCC3FCl₂NO]PF₆ et [RuFFTCl₂NO]PF₆.

Les capacités de photolibération de NO[•] des complexes *cis* (Cl,Cl) et *trans* (Cl,Cl)-[RuTCC2FCl₂NO]PF₆ et [RuTCC3FCl₂NO]PF₆ ont été prouvées par RPE. Ensuite, les rendements quantiques de NO[•] de ces complexes ont été mesurés dans l'acétonitrile à 365 et 420 nm. Pour les complexes *cis* (Cl,Cl) et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆, des composés analogues sans chaînes hexyles ont dû être synthétisés pour permettre la séparation et la mesure du rendements quantique de NO[•] dans l'acétonitrile. Les isomères *cis* (Cl,Cl)- sont tous plus efficaces que leur isomère *trans* (Cl,Cl) dans la photolibération de NO[•]. Pour une même longueur d'onde, les complexes de même configuration *cis* / *trans* (Cl,Cl)- ont des rendements quantiques de NO[•] du même ordre de grandeur mais les complexes (Cl,Cl)-[RuF_{Me}F_{Me}TCl₂NO]PF₆ sont les plus efficaces à 365 nm, devant [RuTCC2FCl₂NO]PF₆, puis [RuFTCl₂NO]PF₆ et [RuTCC3FCl₂NO]PF₆. Sous irradiation à 420 nm, tous les complexes ont des rendements quantiques de NO[•] voisins, excepté les isomères [RuTCC3FCl₂NO]PF₆ qui ont une efficacité moindre. L'analyse de ces données, par comparaison avec les données obtenues pour une famille de complexes analogues (à ligand 2,2'-bipyridine), ne permet pas de conclure sur l'évolution du rendement quantique en fonction de l'augmentation du transfert de charge.

Les sections efficaces d'absorption à deux photons des complexes *trans* (Cl,Cl)-[RuTCC2FCl₂NO]PF₆ et *trans* (Cl,Cl)-[RuTCC3FCl₂NO]PF₆ sont très largement supérieures à celle du *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆. Les mesures sur le complexe [RuF_{Me}F_{Me}TCl₂NO]PF₆ et les isomères *cis* (Cl,Cl)- doivent encore être réalisées mais les résultats obtenus permettent de prouver que l'augmentation du transfert de charge au sein du complexe permet d'améliorer la réponse TPA.

La stabilité des complexes dans l'eau a ensuite été analysée. L'ensemble de ces complexes subit la même transformation dans l'eau que les *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆, c'est-à-dire la substitution d'un ligand chloro par un hydroxo.

Ces complexes transformés ont ensuite été irradiés à 365 et 420 nm pour mesurer leur efficacité de libération de NO[•] dans l'eau. Dans ce cas, c'est le *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ qui présente le meilleur rendement quantique.

L'ensemble des complexes synthétisés dans ce chapitre présente un grand intérêt pour des applications en photothérapies.

CHAPITRE V

Propriétés anticancéreuses des complexes de ruthénium à ligand nitrosyle sous irradiation

Chapitre V :

Propriétés anticancéreuses des complexes de ruthénium à ligand nitrosyle sous irradiation

V. 1. Introduction

Selon sa concentration, le rôle biologique de NO[•] varie et les conséquences sont opposées, comme cela a précédemment été décrit dans la partie état de l'art. Pour des concentrations faibles, en-dessous du micromolaire, il peut avoir un effet pro-prolifératif accompagné d'un développement vasculaire et donc un effet négatif puisqu'il est favorable au développement de tumeurs. Au contraire, pour des concentrations plus élevées, de l'ordre du micro ou du millimolaire, NO[•] induit l'apoptose des cellules. Différentes sources exogènes de NO[•], en chimie organique et organométallique, ont été développées afin d'utiliser le rôle que joue NO[•] dans l'apoptose des cellules dans diverses thérapies anticancéreuses.²¹¹

NO[•] étant un bon ligand, de nombreux complexes de coordination photoactivables ont été synthétisés¹⁵ et leurs capacités de photolibération de NO[•] ont été étudiées. Ce type de complexes s'inclut dans le cadre de la chimiothérapie photoactivée, qui regroupe les systèmes non toxiques dans l'obscurité et qui se transforment sous irradiation pour donner une entité toxique.

Une étude préliminaire a été menée en 2014-2015 par l'équipe d'Isabelle Malfant au LCC sur l'action d'un complexe de ruthénium à ligand nitrosyle sur des cellules cancéreuses de colon humain HCT 116.^{121,122} Le complexe *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆, dont la transformation dans l'eau n'avait pas encore été mise en évidence, ne présente aucune toxicité envers la lignée cellulaire sans irradiation. Mais, sous irradiation (8 minutes, $\lambda > 400$ nm, 8,2 J.cm⁻²), celui-ci induit une mortalité cellulaire atteignant 50 % pour une concentration de 20 μ M, comme le rappelle la **Figure V-1**. Une expérimentation supplémentaire a permis de prouver la non-toxicité du photoproduit.

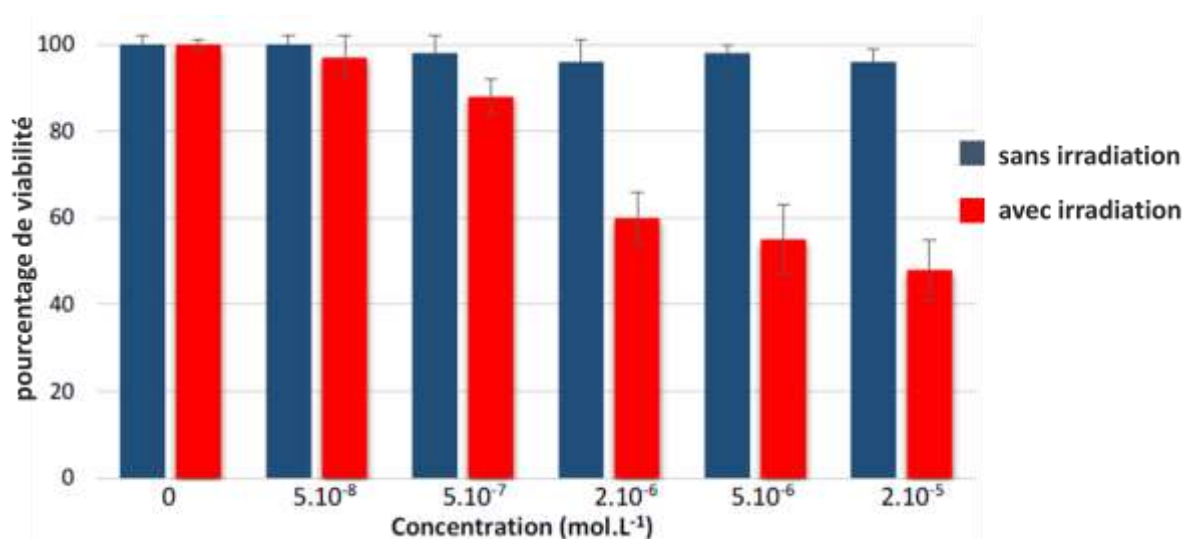


Figure V-1 : Effet du complexe *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ sur les cellules HCT 116, sans et avec irradiation¹²¹

Dans le Chapitre III, la transformation des complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ en *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ a été mise en évidence. L'objectif de ce chapitre est d'approfondir l'étude des propriétés biologiques du complexe de ruthénium *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆.

Dans un premier temps, les différents tests permettant la mesure de l'effet d'un agent cytotoxique sur la viabilité cellulaire seront présentés. Ensuite, l'effet toxique du complexe sans irradiation sera étudié sur deux lignées cellulaires. Dans un troisième temps, l'influence du complexe sous irradiation monophotonique sera analysée, avant de proposer une stratégie pour l'amélioration de l'efficacité du traitement proposé.

V. 2. Les différents tests de viabilité cellulaire

La viabilité peut être mesurée de différentes façons. L'intégrité de la membrane cellulaire permet d'apporter des informations sur l'état de la cellule. Cette caractéristique peut être visualisée grâce à des sondes fluorescentes non perméantes qui colorent le noyau des cellules mortes, comme avec l'iodure de propidium par exemple. Une autre technique est l'évaluation de l'activité mitochondriale de la cellule, c'est-à-dire la respiration cellulaire. Le rôle des mitochondries est de convertir les nutriments en adénosine triphosphate (ATP), qui est la source d'énergie des cellules. Il existe des méthodes de dosage de cette ATP.

Enfin l'activité mitochondriale peut être évaluée par deux tests répandus que sont les tests MTT et Presto-Blue.²¹²

V. 2. 1- Test MTT

Ce premier test mesure l'activité mitochondriale des cellules. Il est basé sur la capacité des cellules vivantes à transformer le MTT hydrosoluble en formazan insoluble (violet), comme le montre la **Figure V-2**. Cette réduction est induite par l'enzyme succinate déshydrogénase mitochondriale NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Hydrogénase). La quantité de formazan produite est proportionnelle à l'activité métabolique des cellules.

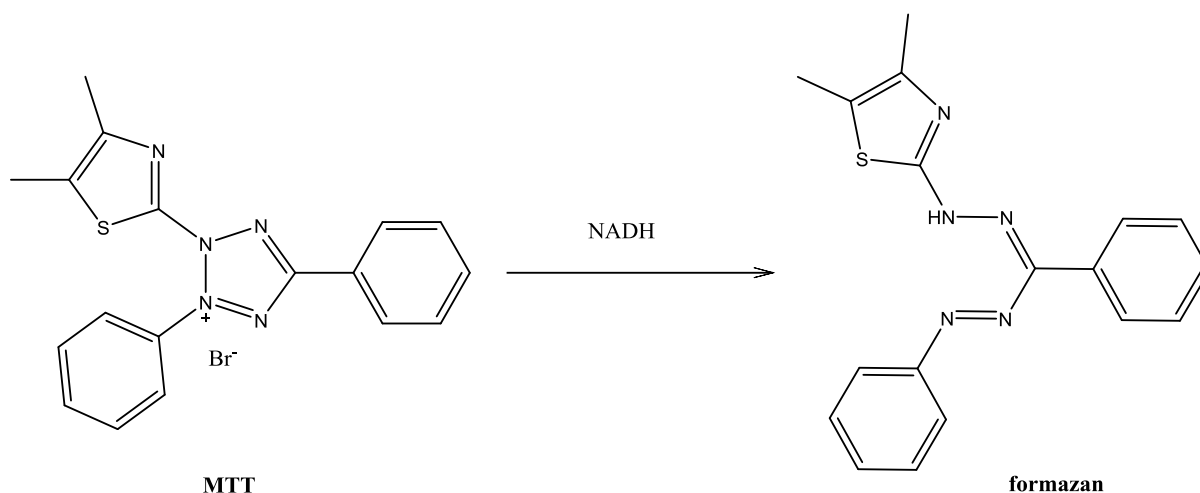


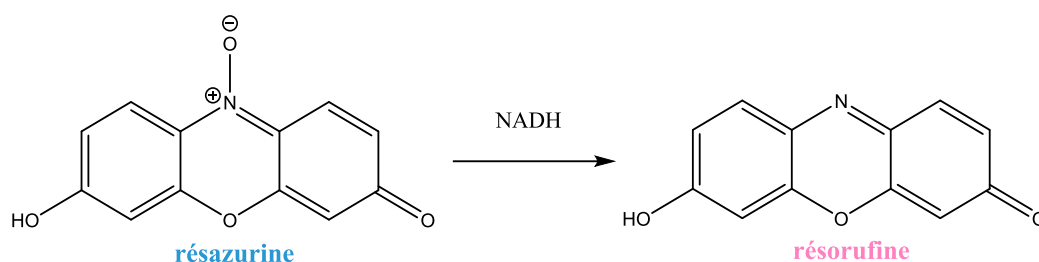
Figure V-2 : Transformation du MTT en formazan par les cellules vivantes

Après 2 heures d'incubation en présence des cellules, des cristaux de formazan se forment. Ils sont ensuite dissous pour permettre la mesure de l'absorbance à 570 nm. L'absorbance mesurée est comparée à celle d'un témoin et un pourcentage de viabilité en est déduit.

V. 2. 2- Test Presto-Blue

Ce second test rend aussi compte de l'activité mitochondriale des cellules. Il peut être utilisé pour différents types de cellules (eucaryotes, bactéries, champignons microscopiques). Les cellules vivantes sont capables de réduire (avec différentes enzymes dont la NADH) le

réactif de Presto-Blue, qui est la résazurine bleue en résorufine rose, selon la réaction de la **Figure V-3**.



| | |
|------------------------------------|--------------------------|
| réactif de Presto-Blue bleu | cellules mortes |
| réactif de Presto-Blue rose | cellules vivantes |

Figure V-3 : Réduction du réactif de Presto-Blue™ par les cellules vivantes

Les cellules vivantes transforment donc le réactif bleu en produit réduit rose, alors qu'une population de cellules mortes ne réalise pas cette réduction : le réactif reste bleu.

Après incubation avec les cellules, l'absorbance est mesurée à 570 nm et 600 nm et un pourcentage de réduction du réactif de Presto-Blue™ est calculé, correspondant au pourcentage de viabilité cellulaire.²¹³

C'est ce second test qui sera principalement utilisé dans ces travaux.

V. 2. 3- Test de clonogénie

Le test de clonogénie est le test de référence pour l'évaluation de la viabilité des cellules. Il permet de dénombrer les cellules vivantes qui ont conservé leur capacité de division après un traitement, et non seulement les survivantes.

Après traitement par un agent toxique, une très faible fraction de cellules est réensemencée. Après incubation et division des cellules pendant au moins une semaine, des colonies se forment, et après avoir été colorées à l'aide de Crystal Violet, celles-ci sont visibles à l'œil nu et dénombrées. Le ratio par rapport à un témoin donne le pourcentage de viabilité.

V. 3. Etude de la cytotoxicité du *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ sur deux lignées cellulaires

V. 3. 1- Test clonogénique sur les cellules HCT 116

La première lignée cellulaire choisie pour tester la toxicité du complexe de ruthénium à ligand nitrosyle *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ est HCT 116. Il s'agit de cellules cancéreuses du colon humain. Ce sont des cellules épithéliales, adhérentes et cultivées en monocouche dans le DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) pour cette étude.

Dans un premier temps, la toxicité du complexe d'intérêt sans irradiation est étudiée. En effet, l'objectif de l'étude est l'utilisation d'un système photoactivable, ne présentant aucune toxicité par rapport aux cellules dans l'obscurité, mais libérant un agent cytotoxique sous irradiation.

Cette toxicité est en premier lieu étudiée par un test de clonogénie. Ce test étant le plus précis, il permettra par la suite de valider le second test de viabilité plus rapide utilisé dans cette étude. Les concentrations du complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ utilisées sont comprises entre 1 µM et 100 µM, dans le DMEM. Le complexe n'étant pas hydrosoluble, il est d'abord dissous dans du DMSO puis la solution-mère est diluée dans le milieu de culture pour avoir un pourcentage volumique final de DMSO de 0,5 % dans la solution. Les cellules sont incubées avec le complexe, rincées et remises en culture dans du DMEM frais. Elles sont ensuiteensemencées à très faible densité, et les colonies sont dénombrées.

Le DMSO a également été choisi comme contrôle positif car il est connu dans la littérature qu'une concentration de DMSO supérieure à 1% dans le milieu de culture a un effet toxique sur les cellules.²¹⁴

Plusieurs concentrations de DMSO dans le DMEM ont été testées : 10, 20 et 30 %. Ces concentrations entraînent respectivement 58, 78 et 89 % de mortalité sur les HCT 116. C'est la concentration la plus toxique qui est choisie comme contrôle positif : 30 % DMSO.

La **Figure V-4** est une photographie des colonies obtenues dans le cas d'un traitement par 1 µM de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ (dans les puits du haut) et par 30 % de DMSO, comme contrôle positif (dans les trois puits du bas).

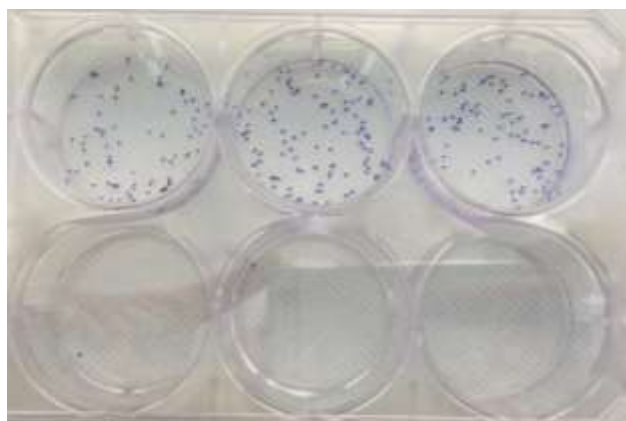


Figure V-4 : Test de clonogénie montrant les colonies formées après traitement par 1 µM de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ (en haut) et par 30 % de DMSO (en bas)

La **Figure V-5** montre le pourcentage de viabilité des cellules traitées par les différentes concentrations de complexe de ruthénium à ligand nitrosyle : 1, 5, 10, 50 et 100 µM. Ce pourcentage est issu du dénombrement cellulaire pratiqué sur les colonies formées pendant le test de clonogénie.

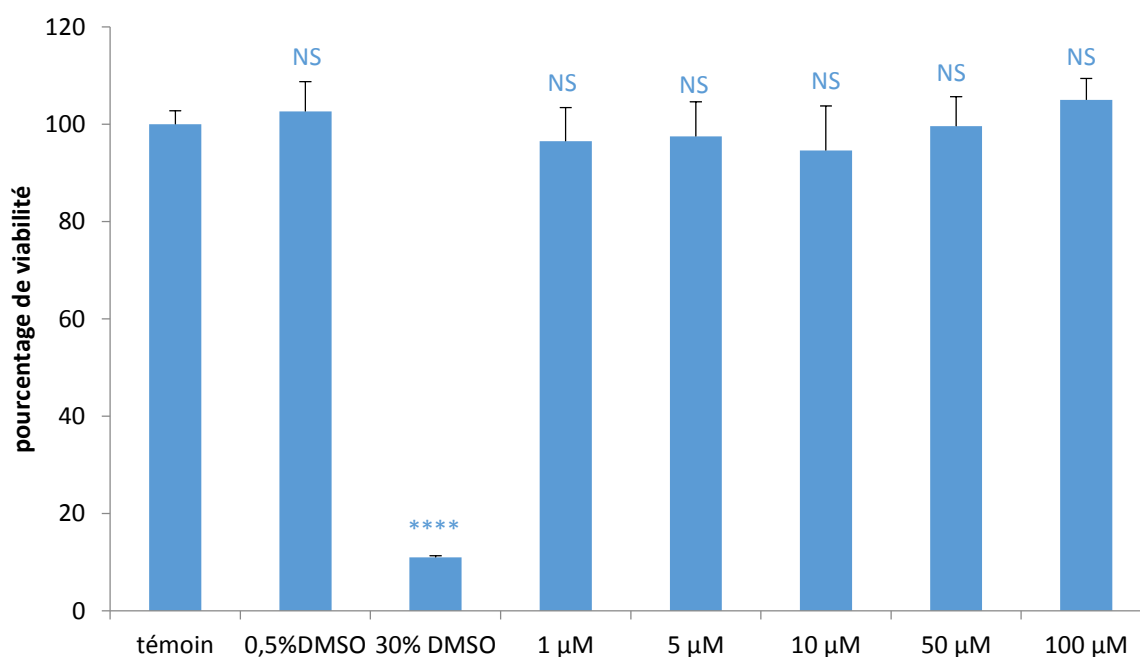


Figure V-5 : Effet de différentes concentrations de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ sur la viabilité des cellules HCT 116, quantifié par clonogénie. Les pourcentages de viabilité sont issus de la moyenne de deux expérimentations indépendantes, chacune réalisée en triplicat. Les barres d'erreur représentent l'écart-type comparé au témoin.

D'après la **Figure V-5**, la viabilité des cellules n'est pas affectée en présence de 0,5 % de DMSO dans la solution. Ce test de viabilité précis a permis de vérifier que cette concentration de DMSO peut être utilisée pour assurer la solubilité du complexe sans avoir d'effet sur les cellules.

Un contrôle positif a été utilisé, il s'agit de 30 % de DMSO dans le DMEM. Cela a pour conséquence une diminution de la viabilité des HCT 116 à 11 %.

Des concentrations allant de 1 μM à 100 μM de complexe de ruthénium ont ensuite été testées. Aucune des concentrations testées n'a d'effet sur la viabilité des cellules. Le complexe sans irradiation n'a donc pas d'effet toxique sur cette lignée cellulaire pour une large gamme de concentrations.

V. 3. 2- Test de Presto-Blue sur les cellules HCT 116

L'étude de la cytotoxicité du complexe sur les HCT 116 est ensuite menée grâce au test Presto-Blue. Les mêmes concentrations en *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ sont testées : 1, 5, 10, 50 et 100 $\mu\text{mol/L}$.

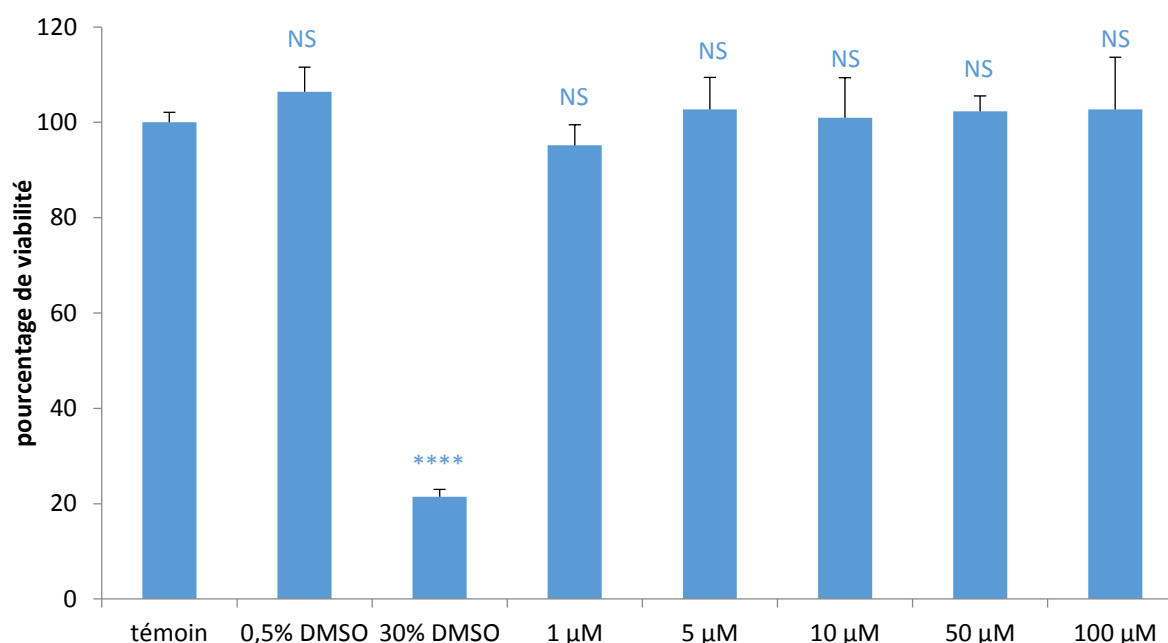


Figure V-6 : Effet de différentes concentrations de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ sur la viabilité des cellules HCT 116, quantifié par le test Presto-Blue. Les pourcentages de viabilité sont issus de la moyenne de cinq expérimentations indépendantes, chacune réalisée en triplicat. Les barres d'erreur représentent l'écart-type comparé au témoin.

Comme précédemment, un contrôle est réalisé avec 0,5 % de DMSO dans le milieu de culture, nécessaire à la solubilisation du complexe. Ce test révèle également que ce pourcentage n'est pas toxique pour les cellules HCT 116.

La **Figure V-6** montre qu'aucune des concentrations de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ utilisées n'influe sur la viabilité des HCT 116. Le test de viabilité Presto-Blue montre également que le complexe testé ne présente pas de toxicité envers les cellules HCT 116.

Une concentration élevée de DMSO est utilisée dans ce cas aussi comme contrôle positif. Ce test montre donc une bonne cohérence avec le test de clonogénie. Dans la suite de l'étude, c'est le test Presto-Blue qui sera utilisé pour évaluer la viabilité des cellules car il est plus rapide à mettre en œuvre.

V. 3. 3- Test de Presto-Blue sur les cellules FaDu

L'effet toxique du complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ est étudié sur une seconde lignée cellulaire. Il s'agit de cellules FaDu, cellules cancéreuses de pharynx humain. Ce sont également des cellules épithéliales et adhérentes, cultivées en monocouche dans le DMEM. Ces cellules sont choisies car elles sont couramment cultivées dans le laboratoire de l'IPBS et que les conditions de culture sont identiques à celles des HCT 116. De plus, la réponse de ces cellules au traitement par un complexe de ruthénium à ligand nitrosyle peut être différente des HCT 116. En effet, il a été montré que la viabilité de ces deux lignées n'est pas influencée de la même façon par un traitement par le phéophorbide, un photosensibilisateur pour la PDT, encapsulé dans des polymères.²¹⁵

La cytotoxicité du complexe *trans* est étudiée à l'aide du test Presto-Blue. La **Figure V-7** présente les pourcentages de viabilité obtenus après traitement par différentes concentrations de complexes entre 5 et 50 μM.

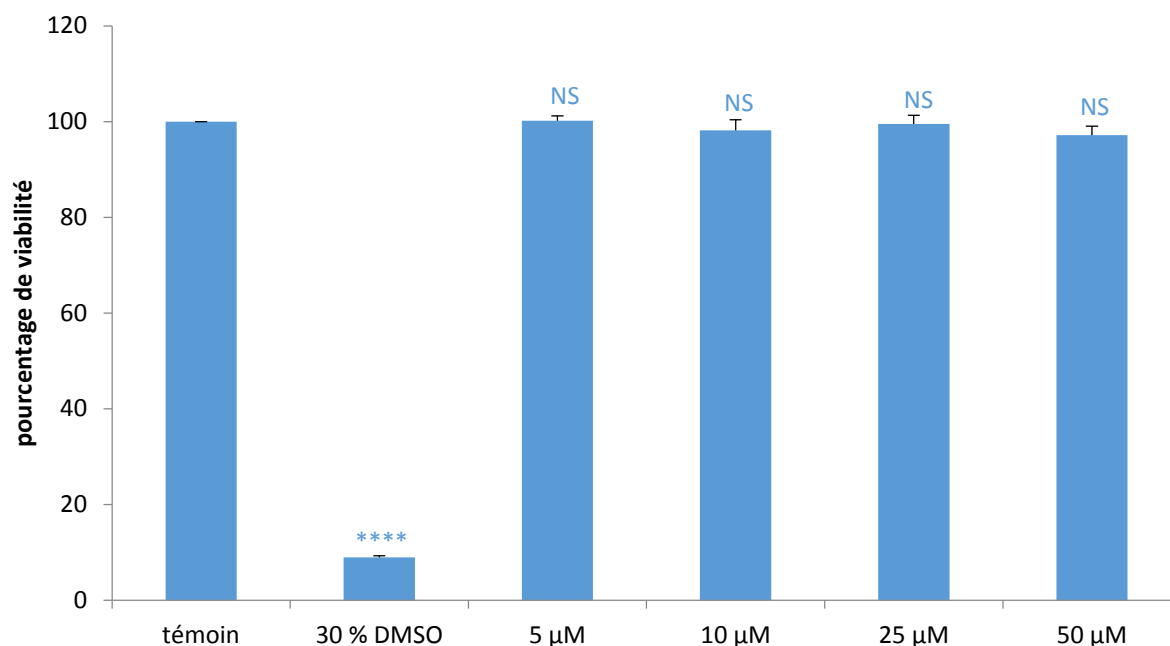


Figure V-7 : Effet de différentes concentrations de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ sur la viabilité des cellules FaDu, quantifié par le test Presto-Blue. Les pourcentages sont calculés à partir de trois expérimentations indépendantes, chacune faite en triplicat.

Le pourcentage de viabilité des cellules FaDu, traitées par des concentrations de complexe de ruthénium à ligand nitrosyle entre 5 µM et 50 µM, n'est pas significativement différent du témoin. Le complexe n'est donc pas toxique pour cette lignée cellulaire non plus.

Le complexe de ruthénium à ligand nitrosyle étudié ne présente donc aucune toxicité envers les deux lignées cellulaires testées. La phototoxicité du complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ peut donc être investiguée.

V. 4. Etude de la phototoxicité du *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ sur deux lignées cellulaires

V. 4. 1- Etude de la toxicité de l'irradiation sur les HCT 116

Avant d'irradier le complexe et d'étudier l'influence de ce traitement sur les cellules cancéreuses, l'effet de l'irradiation seule doit être analysé.

L'irradiation se fait par le dessous de la boîte de culture, par une lampe halogène de puissance 17 mW.cm^{-2} , équipée d'un filtre ne laissant pas passer les ultraviolets ($\lambda > 400 \text{ nm}$), comme le montre la **Figure V-8**.

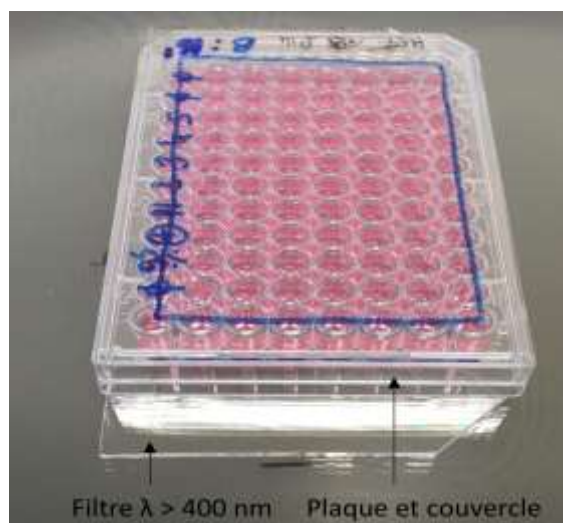


Figure V-8 : Irradiation des plaques 96 puits par le dessous de la boîte

Un test de viabilité Presto-Blue a été fait après irradiation des cellules dans leur milieu de culture à différents temps. Avec cette méthode, l'irradiation continue pendant 2, 5, 10, 15, 20 et 25 minutes n'a aucun effet toxique.

V. 4. 2- Etude de la phototoxicité du complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ sur les cellules HCT 116

L'effet de l'irradiation du complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ sur les cellules est étudié grâce au test Presto-Blue.

Ce test a d'abord été mené sur des cellules HCT 116 traitées par $10 \mu\text{M}$ de complexe et irradiées 25 minutes. Aucune toxicité n'a été observée. Ainsi, le temps d'irradiation choisi pour ces expérimentations est de 30 minutes. Même s'il est possible qu'il entraîne une certaine toxicité, l'objectif est d'observer un pourcentage de mortalité par rapport au témoin irradié.

La **Figure V-9** présente les pourcentages de viabilité des cellules traitées par 5, 10, 25 et $50 \mu\text{M}$ de complexe, sans ou avec irradiation. La dose d'irradiation à cette puissance est de 30 J.cm^{-2} pour 30 minutes et de 46 J.cm^{-2} pour 45 minutes d'irradiation.

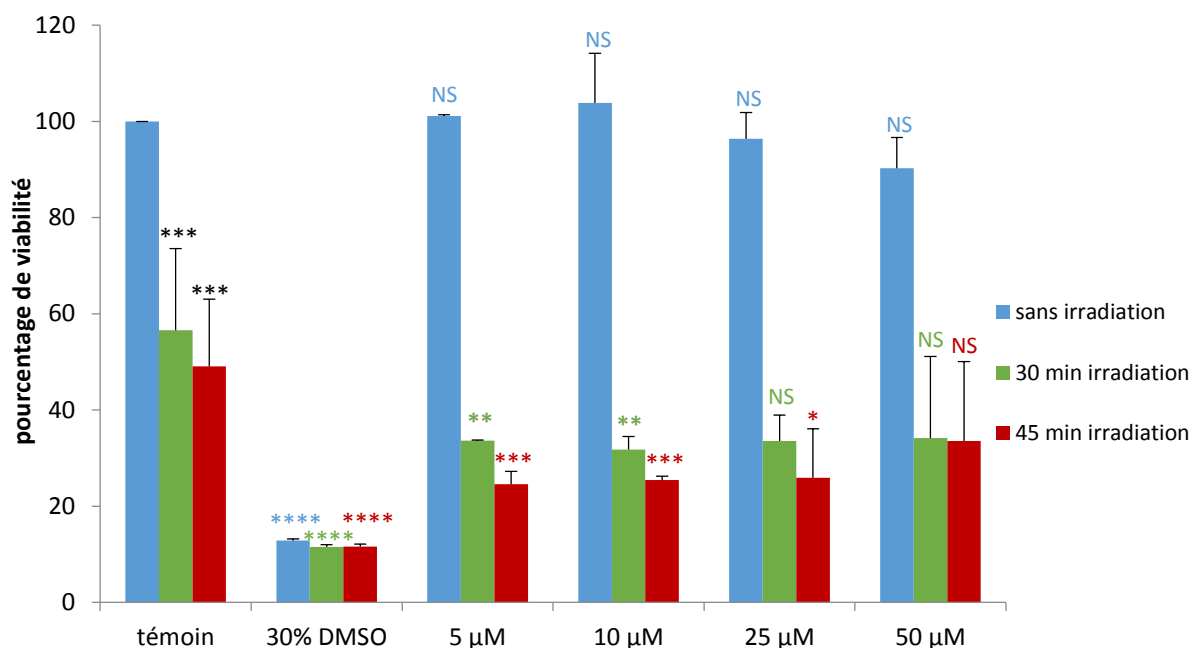


Figure V-9 : Effet de l'irradiation du *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ sur les HCT 116. Les valeurs sont obtenues en moyennant deux expérimentations indépendantes, chacune faite en sextuplicat. Les barres d'erreur représentent l'erreur-type par rapport au témoin non irradié pour les viabilités des témoins irradiés, et l'erreur-type par rapport au témoin irradié (le même temps) pour toutes les autres valeurs.

La première série d'expérience témoin montre que les irradiations de 30 et 45 minutes ont un effet toxique sur les cellules HCT 116 dans le DMEM. Elles entraînent respectivement une chute de 40 et 50 % de la viabilité.

Malgré l'effet intrinsèque de l'irradiation, un effet toxique additionnel est observé lorsque le complexe est irradié, dès les concentrations de 5 et 10 µM. En effet, pour ces concentrations, l'irradiation des cellules en présence du complexe photoactivable entraîne une chute de la viabilité d'environ 25 % supplémentaire par rapport aux témoins irradiés. Cela montre bien que le complexe de ruthénium à ligand nitrosyle étudié a une influence sur la viabilité des cellules.

Pour les concentrations plus importantes de 25 et 50 µM, les barres d'erreur sont plus grandes, on ne peut donc pas conclure aussi facilement sur l'effet phototoxique du complexe. Le fait que les irradiations entraînent une toxicité qui leur est propre semble masquer l'effet du NO[•] libéré. En effet, théoriquement, une plus grande concentration de NO[•] doit engendrer un taux de mortalité cellulaire plus important.

La **Figure V-10** présente deux images prises au microscope (Leica DMIRB, caméra coolSNAP HQ, objectif 20x, 1G). A gauche, il s'agit d'un échantillon témoin de HCT 116 cultivées dans le DMEM. A droite, l'image a été prise sur un échantillon après traitement par 5 μ M de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ et irradié 30 minutes. Les zones photographiées sont représentatives de l'échantillon entier.

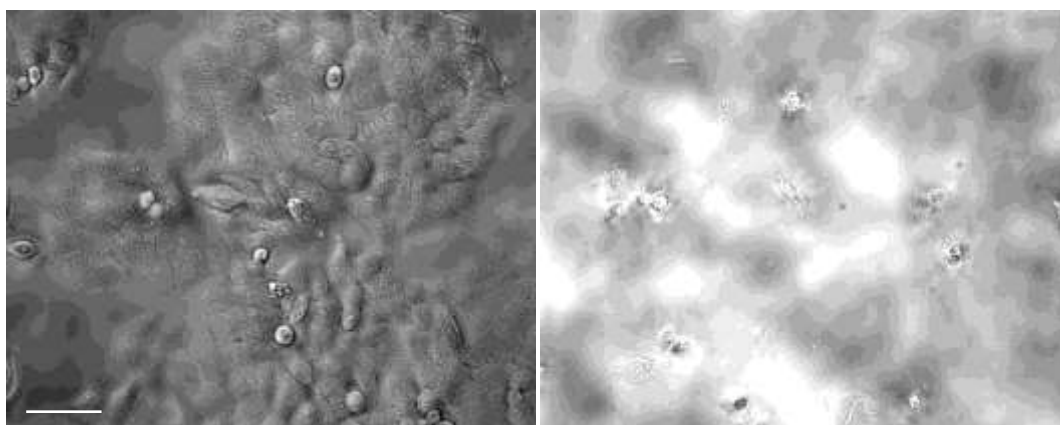


Figure V-10 : Images d'un échantillon témoin de HCT 116 (à gauche) et d'un échantillon traité par le complexe et irradié 30 minutes (à droite).

L'image des cellules non traitées montrent de nombreuses HCT 116, cultivées en monocouche, adhérant au fond de la boîte. Les cellules sont bien contrastées, permettant la distinction du contenu intracellulaire et notamment du noyau.

L'image de droite, prise après le traitement des cellules par le complexe et l'irradiation, montre une densité cellulaire très faible. La plupart des cellules sont mortes et sont dégradées. Les seules cellules présentes sur l'image ont une forme sphérique, ce qui signifie qu'elles sont endommagées et qu'elles n'adhèrent presque plus au fond du puits de culture.

L'observation microscopique de ces échantillons illustre l'efficacité du traitement proposé. L'optimisation des conditions d'irradiation permettra de réduire l'effet toxique de l'irradiation des cellules.

V. 4. 3- Etude de la phototoxicité du complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ sur les cellules FaDu

L'étude de la phototoxicité du complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ est à présent menée sur la lignée cellulaire FaDu. Comme précédemment, la viabilité des cellules est mesurée par le test Presto-Blue. Les résultats du traitement par le complexe et l'irradiation sont présentés dans la **Figure V-11**.

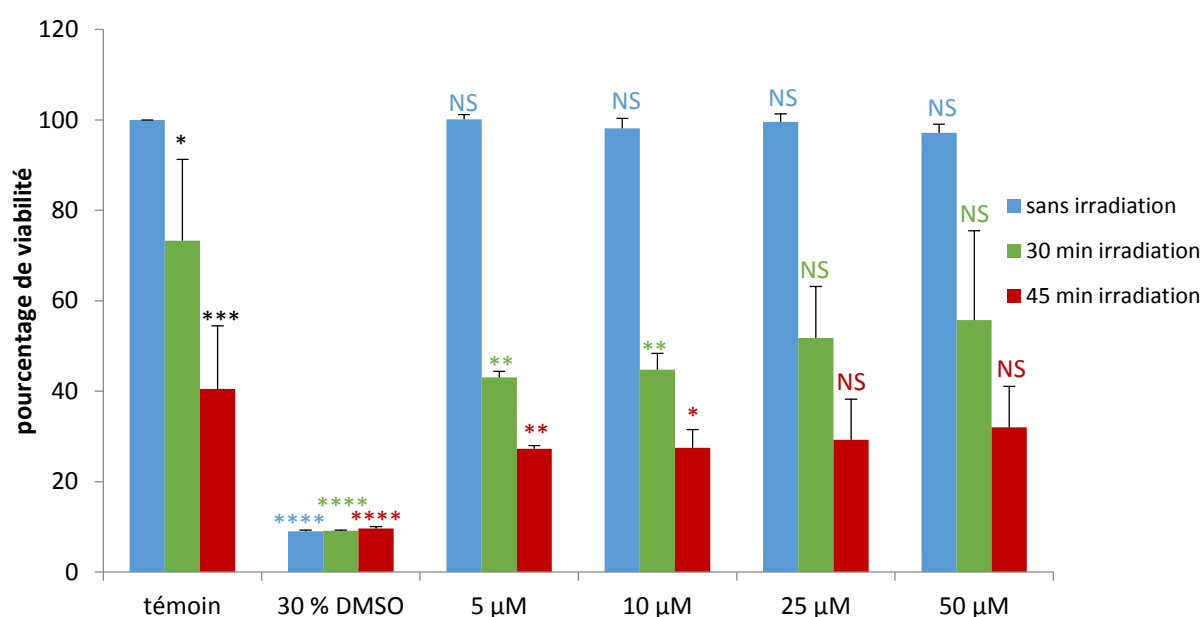


Figure V-11 : Effet de l'irradiation du *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ sur les FaDu. Les viabilités sont obtenues à partir de la moyenne de deux expérimentations indépendantes, chacune faite en sextuplicat. Les barres d'erreur des témoins irradiés représentent l'erreur-type par rapport au témoin non irradié, et, sur les autres colonnes, elles représentent l'erreur-type par rapport au témoin irradié (le même temps).

Pour cette lignée, l'irradiation a toujours une influence sur la viabilité mais les FaDu sont moins sensibles à l'irradiation que les HCT 116. L'irradiation de 30 minutes entraîne seulement 25 % de mortalité, ce qui est très raisonnable, et 45 minutes d'irradiation font chuter le pourcentage de viabilité à 40 %.

Les expérimentations suivantes montrent les cellules traitées par 5, 10, 25 et 50 µM de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆. Sous 30 minutes d'irradiation, la viabilité chute de 30 % pour l'utilisation de 5 µM et 10 µM de complexe, par rapport au témoin irradié. L'irradiation la plus longue ayant déjà un effet toxique, le traitement par 5 et 10 µM de

complexe fait chuter le pourcentage de viabilité de 15 %. Pour les concentrations les plus élevées, comme pour l'étude sur le HCT 116, l'imprécision des résultats (et donc les barres d'erreur) fait que la variation de viabilité des cellules par rapport aux témoins n'est pas significative. Il est donc difficile de conclure sur l'effet du complexe à ces concentrations.

Pour les FaDu, qui semblent peu sensibles à l'irradiation de 30 minutes, le traitement par le complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ et l'irradiation provoquent une chute de la viabilité de près de 60 %. Ce résultat prouve que le NO[•] libéré par ces systèmes peut induire une mort cellulaire.

V. 4. 4- Conclusion

Une étude préliminaire de la phototoxicité de ce complexe avait précédemment été menée.¹²¹ Bien que la structure du complexe en milieu aqueux n'était pas encore connue, il avait été conclu que le *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ à 20 μM entraînait environ 50 % de mortalité cellulaire.

Dans ce chapitre, la non-toxicité du produit sans irradiation a été mise en évidence par plusieurs tests de viabilité et pour deux lignées cellulaires. La phototoxicité a ensuite été étudiée et un effet a pu être observé pour les deux lignées malgré la toxicité intrinsèque de l'irradiation aux temps utilisés. Pour les HCT 116, le traitement provoque une mortalité d'environ 60 à 70 % selon le temps d'irradiation, ce qui correspond à 25 et 30 % de mortalité supplémentaire par rapport au témoin irradié. Pour les FaDu, le complexe entraîne une chute de la viabilité d'environ 55 % après 30 minutes d'irradiation, ce qui correspond à une mortalité de 30 % de plus que l'irradiation seule. Des résultats similaires ont été rapportés par Gomes *et al.* en 2013 avec le complexe photoréactif *trans*-[Ru(NO)Cl(cyclam)](PF₆)₂.²¹⁶ Ils sont d'ailleurs en accord avec ce qu'observe Rose *et al.* pour leurs complexes donneurs de NO[•] induisant l'apoptose de cellules de cancer du sein.¹³⁸

Ces résultats sont encourageants, puisqu'ils suggèrent qu'après l'optimisation de l'irradiation, différentes lignées de cellules cancéreuses pourront être éradiquées, ce qui signifie que deux types de cancers différents pourraient être traités grâce à cette méthode de PACT. Ces résultats montrent le potentiel des complexes de ruthénium à ligand nitrosyle dans le développement de nouvelles thérapies photoactivées.

Des essais d'irradiation à deux photons devront être menés, dans la perspective d'un traitement par irradiation dans le proche infrarouge.

V. 5. Conception de nano-agrégats de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆

Plusieurs mécanismes de transport de molécules vers l'intérieur de la cellule existent. Pour l'internalisation de petites molécules telles que O₂, N₂ ou NO*, le transport est passif. Cela signifie que les espèces vont diffuser à travers la membrane cellulaire lorsque la concentration extracellulaire est supérieure à l'intracellulaire.

Pour de plus grosses espèces (de masse supérieure à 150 Da) et particules, la cellule utilise un mode de transport actif : l'endocytose. Les particules sont piégées dans des vésicules, issues de l'invagination de la membrane cellulaire, qui vont ensuite libérer leur contenu du côté intracellulaire.^{217,218}

La **Figure V-12** résume ces deux mécanismes.

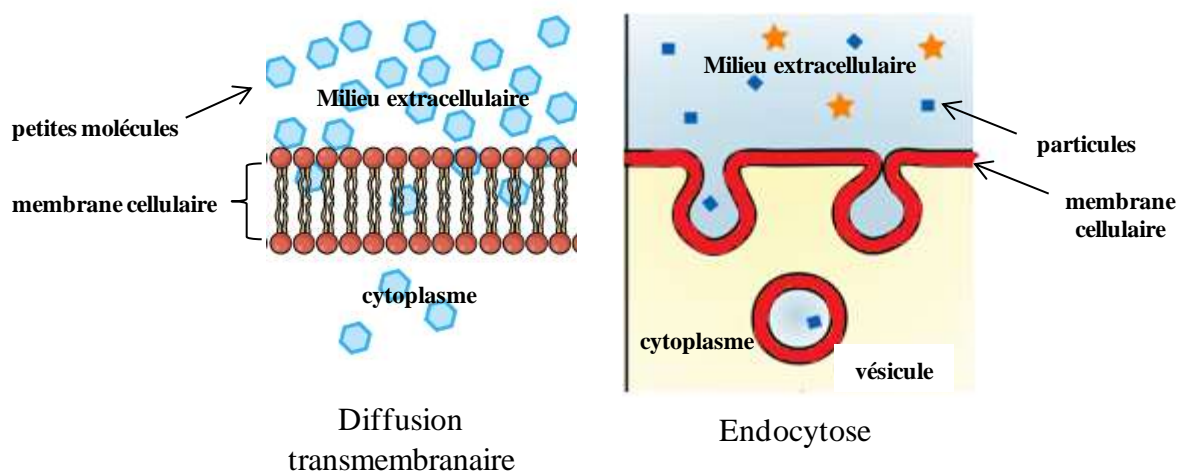


Figure V-12 : Mécanismes de diffusion et d'endocytose. Figures adaptées de Molecular Cell Biology, 2000 et The Cell : A Molecular Approach, 2000^{217,218}

Afin d'augmenter l'effet du NO* sur les cellules, la stratégie proposée ici est de travailler sur l'amélioration de la pénétration du complexe au sein des cellules, en favorisant le mécanisme d'endocytose. Pour cela, la stratégie consiste à utiliser des nano-agrégats du complexe, ou auto-assemblages, de taille plus importante.

V. 5. 1- Fabrication des auto-assemblages de complexe de ruthénium

Plusieurs méthodes existent pour assembler des molécules par des interactions non covalentes. Dans ces travaux, réalisés en collaboration avec Dr. Patricia Vicendo du laboratoire IMRCP, les nano-agrégats ont été réalisés par la méthode de reprecipitation, décrite en 1992 par Nakanishi.^{219,220}

Il s'agit de solubiliser le complexe dans un solvant organique miscible à l'eau (comme l'acétone) pour obtenir une solution de concentration de l'ordre du millimolaire. Ensuite, un certain volume de cette solution est ajouté goutte à goutte dans l'eau, sous agitation vigoureuse. La variation soudaine dans l'environnement du complexe provoque la nucléation et la croissance de nano-agrégats (cf **Figure V-13**). L'agitation est poursuivie quelques minutes afin que les micro-cristaux reprecipitent. La solution obtenue est limpide, les particules étant de taille inférieure aux longueurs d'onde de la lumière visible.

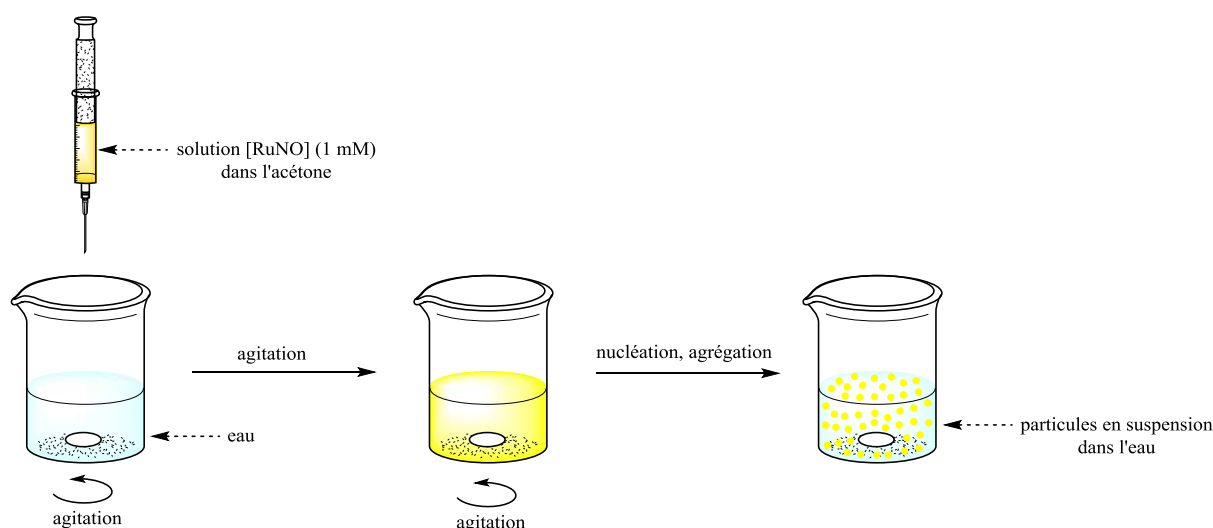


Figure V-13 : Méthode de reprecipitation pour l'obtention de nano-agrégats de complexe

Plusieurs paramètres peuvent être ajustés et avoir une influence sur la taille des nano-agrégats. Ce sont la température, la concentration, la vitesse d'addition de la solution et la vitesse d'agitation.

Dans cette étude, la concentration finale de la solution dans l'eau est de $2 \cdot 10^{-5}$ mol/L. Pour cela, 100 μ L d'une solution à 1 mM dans l'acétone sont ajoutés sous agitation à 350 rpm dans 4,9 mL d'eau, puis la solution est agitée pendant 10 minutes à température ambiante. Deux vitesses d'addition de la solution dans l'eau sont comparées.

L'échantillon A contient des agrégats formés par l'addition rapide en 1 minute de la solution de complexe dans l'eau et pour l'échantillon B, l'addition a duré 4 minutes. Dans les

deux cas, la solution est maintenue sous agitation pendant 10 minutes après l'ajout. La concentration finale est la même dans les deux cas.

La technique de la DLS (« Dynamic Light Scattering ») est basée sur la diffusion de la lumière par les particules en suspension, celle-ci étant reliée au coefficient de diffusion des particules et donc à leur taille. Cette méthode a permis de conclure sur la présence d'agrégats dans les deux échantillons et sur leur taille, plus précisément sur leur diamètre hydrodynamique.

La **Figure V-14** montre la distribution de taille mesurée pour chaque échantillon.

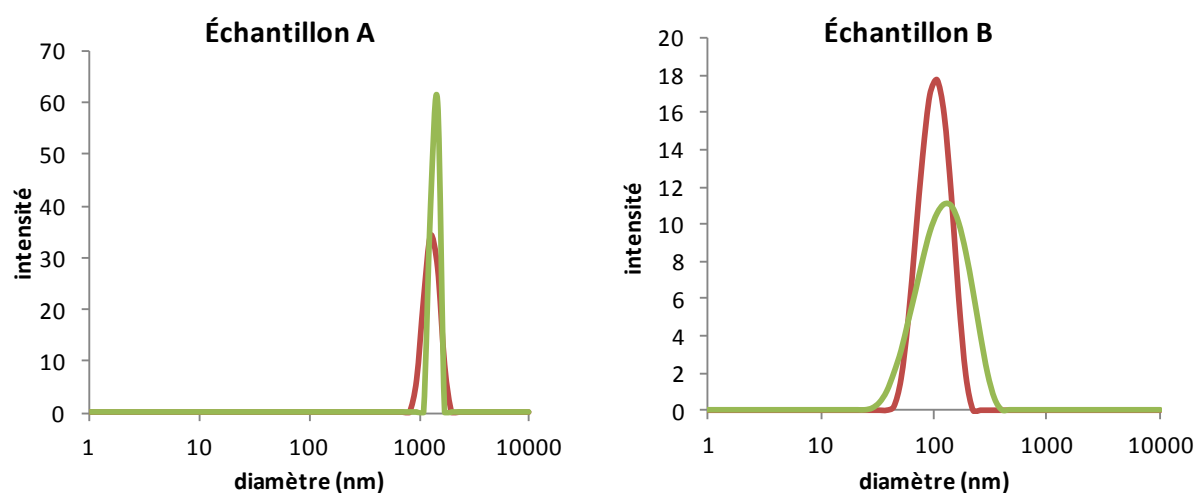


Figure V-14 : Distributions de tailles des agrégats mesurées par DLS, sur deux expérimentations indépendantes sur deux échantillons

Chaque mesure a été faite à partir de deux échantillons obtenus indépendamment, représentés par les deux courbes vertes et rouges.

Dans le cas où l'addition de la solution a été faite rapidement (en 1 minute, échantillon A), la taille moyenne des particules est de 1280 nm. Pour l'échantillon où l'addition a été plus lente (en 4 minutes, échantillon B), les agrégats ont une taille moyenne d'environ 115 nm. Les distributions de taille sont étroites dans les deux cas, ce qui signifie que l'ensemble des particules d'un même échantillon ont un diamètre proche.

Cette expérimentation montre que la méthode de reprecipitation est une méthode facile et rapide pour la fabrication de nano-agrégats et celle-ci donne des résultats assez reproductibles. Le temps d'ajout a une forte influence sur la taille des agrégats obtenus.

L'objectif est de tester les propriétés phototoxiques des auto-agrégats du complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ sur les cellules cancéreuses. Dans un premier temps, la capacité de photolibération de NO[•] par ces auto-assemblages doit être vérifiée.

V. 5. 2- Propriétés photochimiques des auto-assemblages de complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆

Afin de vérifier si ces auto-assemblages de complexes sont capables de libérer NO[•] sous irradiation, la résonance paramagnétique électronique est utilisée, à l'aide du piègeur de NO[•] (ou spin-trap) [Fe^{II}(MGD)₂].

La **Figure V-15** montre les signaux obtenus dans l'obscurité (en bleu), et après 5 minutes d'irradiation par la lampe à vapeur de mercure (munie d'un filtre $\lambda > 400$ nm) pour l'échantillon A (en rouge) et pour le B (en vert).

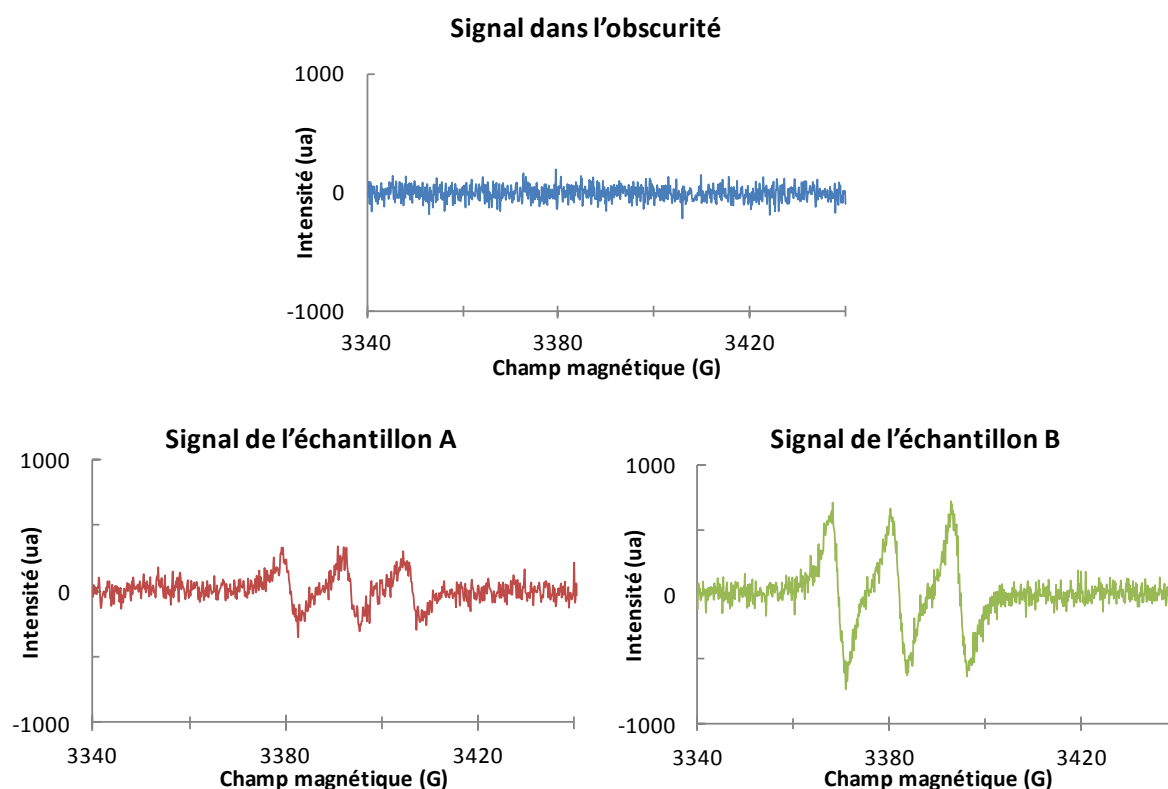


Figure V-15 : Spectres RPE obtenus dans l'obscurité et sous irradiation ($\lambda > 400$ nm) des deux échantillons contenant les agrégats de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆

D'après la **Figure V-15**, dans l'obscurité, aucun signal n'apparaît en RPE. Cela est représenté par la courbe bleue, obtenue dans le cas des deux échantillons. Cela signifie que ces particules ne relarguent pas spontanément NO[•] en solution aqueuse.

Après 5 minutes d'irradiation, pour les deux échantillons, un signal triplet apparaît avec une constante de couplage hyperfin de $1,2 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$ et un facteur de Landé de 2,040, signature de l'adduit $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{MGD})_2\text{-NO}^{\bullet}]$.¹⁸⁰

Ces analyses montrent que les nano-agrégats formés à partir du complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ sont capables de libérer NO[•] sous irradiation. De plus, la solution contenant les particules de plus grande taille (échantillon B, de 1280 nm de diamètre) enregistre un signal triplet caractéristique de NO[•] environ deux fois plus intense que l'échantillon A (particules de 117 nm de diamètre). La fabrication d'agréats plus gros semble donner lieu à une libération de NO[•] plus efficace.

Ces auto-assemblages de complexe ont été testés sur les HCT 116 et ne présentent pas non plus de toxicité. L'étude de leurs propriétés phototoxiques doit encore être menée afin de voir si elles sont améliorées par rapport à l'utilisation du complexe en solution.

V. 6. Conclusion

Dans ce chapitre, les propriétés anticancéreuses des complexes de ruthénium à ligand nitrosyle ont été investiguées. Le complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ montre un intérêt pour son application en PACT. En effet, ce complexe qui est non toxique *in vitro* dans l'obscurité, engendre un pourcentage de mortalité de plus de 50 % sur deux lignées de cellules cancéreuses. Le photoproduit avait montré une non-toxicité envers les HCT 116, mais de nouvelles études doivent encore être menées pour prouver que l'effet toxique est bien dû à la libération de NO[•]. L'influence des produits d'oxydation de NO[•] en solution aqueuse sur la viabilité cellulaire devra par exemple faire l'objet d'une étude approfondie. L'utilisation d'un piègeur de NO[•] peut également permettre de montrer l'implication du radical dans l'effet toxique observé.

Un premier essai de fabrication de nano-objets capables de libérer NO[•] sous irradiation a également été présenté dans ce chapitre. L'objectif est d'augmenter la proportion de complexe qui pénètre dans les cellules, ou au moins qui interagit avec la membrane cellulaire.

La méthode de reprecipitation a été utilisée pour obtenir deux échantillons d'agrégats de tailles différentes. Ces agrégats conservent la capacité de photolibération de NO[•] du complexe en solution. N'étant pas toxiques sans irradiation, des tests de phototoxicité constituent la prochaine étape de cette étude. De plus, un dosage du ruthénium par ICP-MS pourrait permettre de comparer le taux d'internalisation du complexe sous forme d'agrégats et en solution.

CHAPITRE VI

Effet bactéricide du NO[•] libéré par irradiation des complexes de ruthénium à ligand nitrosyle

Chapitre VI :

Effet bactéricide du NO[•] libéré par irradiation des complexes de ruthénium à ligand nitrosyle

VI. 1. Introduction

Depuis les dernières décennies, la résistance aux antibiotiques de nombreux pathogènes, notamment ceux impliqués dans les maladies nosocomiales est en recrudescence. En effet, l'utilisation systématique d'antibiotiques à large spectre, essentiellement des β -lactames, lors d'opérations chirurgicales ainsi que la mauvaise utilisation de ces médicaments par la population, ont fait qu'aujourd'hui de nombreux pathogènes ont développé une tolérance envers ces traitements. De nouveaux antibiotiques, obtenus par dérivation des plus anciens, ont été synthétisés. Mais déjà les bactéries ont développé une résistance à leur égard.

En 2016, Dr. Margaret Chan, directrice générale de l'Organisation Mondiale de la Santé a qualifié cette résistance de « crise planétaire, aujourd'hui reconnue comme une des plus importantes menaces sur la santé ».

Staphylococcus aureus et *Staphylococcus epidermidis* font partie des bactéries les plus souvent impliquées dans les infections chez l'homme. *S. epidermidis* est la cause la plus importante d'infections en général, et la deuxième cause d'infections liées à l'implantation d'un dispositif médical.^{221,222} Ces bactéries sont en effet capables de s'accumuler dans un biofilm hydrophobe qui adhère à des surfaces telles que les dispositifs médicaux. Souvent ces infections deviennent chroniques car le système immunitaire ne parvient pas à se débarrasser de ces microorganismes.²²³

Devant les difficultés rencontrées par les antibiotiques usuels pour traiter certaines infections et particulièrement celles dues aux biofilms, il est urgent de développer de nouvelles thérapies qui permettraient de lutter contre la résistance antimicrobienne.

Comme présenté précédemment dans l'état de l'art, l'oxyde nitrique présente des propriétés bactéricides, il est notamment décrit comme pouvant induire la dispersion de

biofilms bactériens.^{150,162} Les complexes de ruthénium à ligand nitrosyle synthétisés et étudiés au cours de ces travaux de thèse sont donc de potentiels agents antimicrobiens. La libération contrôlée de l'agent bactéricide par la lumière permet d'imaginer de nouvelles thérapies ciblées et contrôlées.

L'objectif de ces travaux est d'étudier l'effet des complexes de ruthénium à ligand nitrosyle photoactivables sur des bactéries résistantes aux antibiotiques présentes sous différentes formes de culture : planctonique ou en formation de biofilms. Dans ce chapitre, un modèle de souche bactérienne résistante à un antibiotique sera d'abord présenté, puis l'effet bactéricide d'un premier complexe de ruthénium à ligand nitrosyle sous irradiation sera étudié. Ensuite ce traitement sera combiné avec un antibiotique afin d'investiguer l'effet de leur association. Enfin, des études préliminaires sur de nouveaux complexes seront exposées.

VI. 2. Choix du modèle *Staphylococcus epidermidis*

Afin d'apporter une preuve de concept de l'efficacité des donneurs de NO^{*} synthétisés, une souche bactérienne ayant la capacité de former des biofilms et présentant une résistance à au moins un antibiotique a été choisie : *Staphylococcus epidermidis*. Après description et quelques généralités sur l'espèce, les principales caractéristiques morphologiques de *S. epidermidis* sont observées et déterminées grâce à différentes techniques.

VI. 2. 1- Généralités sur *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis est un pathogène opportuniste, c'est-à-dire qu'il profite d'un affaiblissement du système immunitaire (comme par exemple chez les patients atteints du SIDA, ceux étant traités par chimiothérapie, les nouveaux-nés prématurés, ...) pour se propager chez l'homme. Il est ainsi l'un des principaux micro-organismes responsables des infections nosocomiales, notamment par la contamination de dispositifs médicaux extérieurs (cathéters, prothèses, pacemakers), et peut engendrer une septicémie ou une endocardite.

S. epidermidis se présente sous forme de coques (ou cocci) à Gram + qui poussent sous forme de grappe de bactéries. Anaérobies facultatives, elles se développent mieux en

présence d'oxygène. Leur diamètre est compris entre 0,5 et 1,5 μm et elles forment de petites colonies blanches de 1 à 2 mm de diamètre.

Dans la nature, la plupart de ces bactéries vivent sous forme de biofilms. On peut voir sur la **Figure VI-1** l'aspect de *S. epidermidis* à l'état planctonique (à gauche) et sous forme de biofilm (à droite) avec la matrice extracellulaire visible dans l'espace entre les différentes grappes permettant aux bactéries de s'agréger.^{150,224}

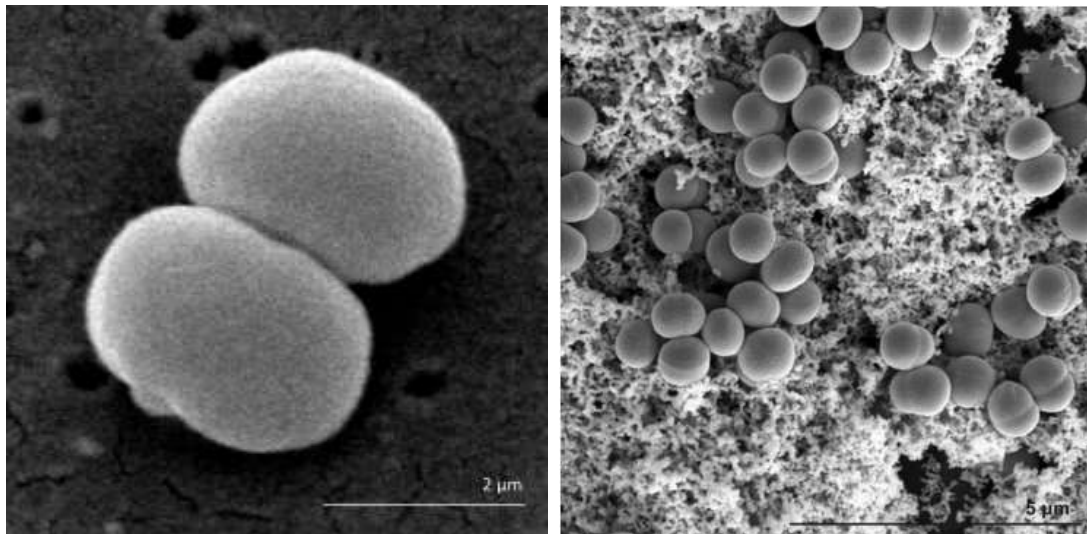


Figure VI-1 : Images de *S. epidermidis* en MEB de deux bactéries isolées (à gauche) et sous forme de biofilm (à droite)²²⁵

Dans ces travaux de thèse, deux souches de *Staphylococcus epidermidis* sont utilisées :

- ATCC 12228, qui ne forme pas de biofilms et qui ne présente pas de résistance à la méthicilline
- ATCC 35984, qui est connue pour être résistante à la méthicilline et pour sa capacité à former des biofilms. Elle fait partie des MRSE (« Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* »).

VI. 2. 2- Description des souches de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 et ATCC 35984

Ces souches de *Staphylococcus epidermidis* sont cultivées dans le LB (Lysogeny Broth). Ce milieu est une solution aqueuse contenant 10 g/L de tryptone (source d'acides

aminés nécessaires à la croissance des micro-organismes), 5 g/L d'extrait de levure et 5 g/L de NaCl.

Lors de leur culture en solution, les bactéries sont normalement présentes à l'état planctonique. Leur croissance induit une augmentation de la turbidité du milieu et il est impossible de les distinguer à l'œil nu. C'est le cas pour la souche ATCC 12228, qui, même après 24 heures de culture, ne forme pas d'agrégats : le milieu est trouble mais aucun agglomérat n'est visible à l'œil nu.

En revanche, les bactéries de la souche ATCC 35984 en suspension forment au bout d'environ 3 heures des agrégats visibles à l'œil nu (**Figure VI-2A**). Ceux-ci grossissent et forment ensuite de larges filaments après une dizaine d'heures de culture (**Figure VI-2B**).

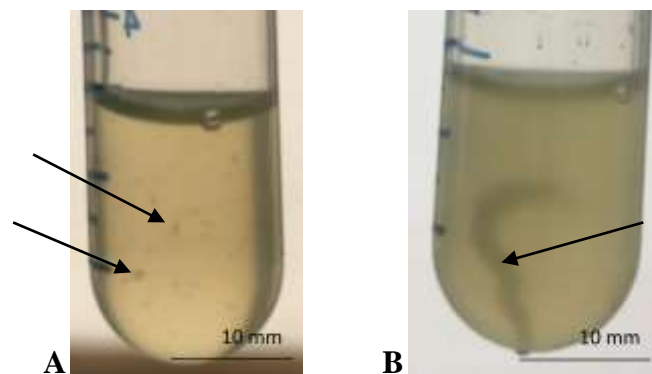


Figure VI-2 : Agrégats planctoniques de *Staphylococcus epidermidis* après 3 h (A) et 10 h (B) de culture

Cette observation semble mettre en évidence la formation d'agrégats de bactéries, ressemblant à un biofilm non adhérent à un support.

Afin de mieux caractériser l'organisation de cet état d'agrégation planctonique, les bactéries ont été visualisées en microscopie à force atomique (AFM). Il s'agit de mesurer les forces d'attraction et répulsion entre une pointe du microscope et les atomes à la surface d'un échantillon. Cela permet de topographier la surface d'un échantillon, ici des bactéries dans leur milieu de culture, et également de mesurer des propriétés nanomécaniques telles que la viscoélasticité ou la rugosité. Ces expérimentations ont été réalisées par le Dr. Flavien Pillet de l'équipe de Marie-Pierre Rols de l'IPBS, sur un Nanowizard III (JPK Instruments) équipé de cantilevers MLCT (Bruker).

Une suspension de bactéries de la souche ATCC 35984 a été comparée à une suspension de la souche ATCC 12228 qui ne forme pas de biofilms ni d'agrégats. Afin de les

observer en milieu liquide (dans le LB), un timbre en PDMS (polydiméthylsiloxane) a été utilisé pour immobiliser les bactéries. Elles sont retenues par leur taille dans de petites cavités (qui correspondent aux carrés noirs sur les images AFM).

D'après la littérature, la souche ATCC 12228, ne forme pas de biofilm et ne présente pas de résistance aux antibiotiques. En AFM, comme le montre la **Figure VI-3**, il est possible de voir qu'une seule bactérie peut être isolée et piégée dans une cavité (cube sombre sur l'image).

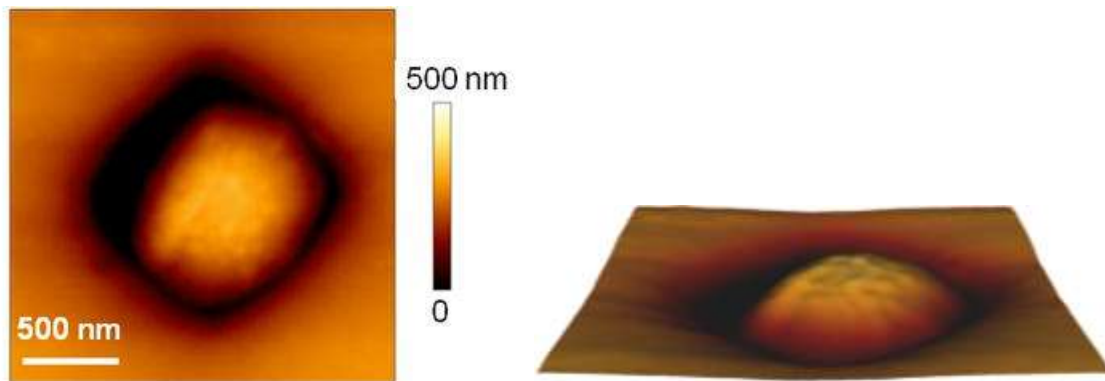


Figure VI-3 : Observation en AFM liquide d'une bactérie de souche ATCC 12228 en 2D (à gauche) et en 3D (à droite)

Les bactéries de la souche ATCC 35984, capable de former des biofilms, ont été cultivées dans le LB puis sont déposées sur le timbre PDMS. Les images AFM de la **Figure VI-4** montrent clairement que cette souche forme des agrégats. Les bactéries n'ont pas pu être piégées une à une dans les cavités et sont agglutinées en forme de grappe. Certaines d'entre elles poussent au-dessus de la première couche. Les bactéries s'organisent donc en agrégats structurés de plusieurs couches.

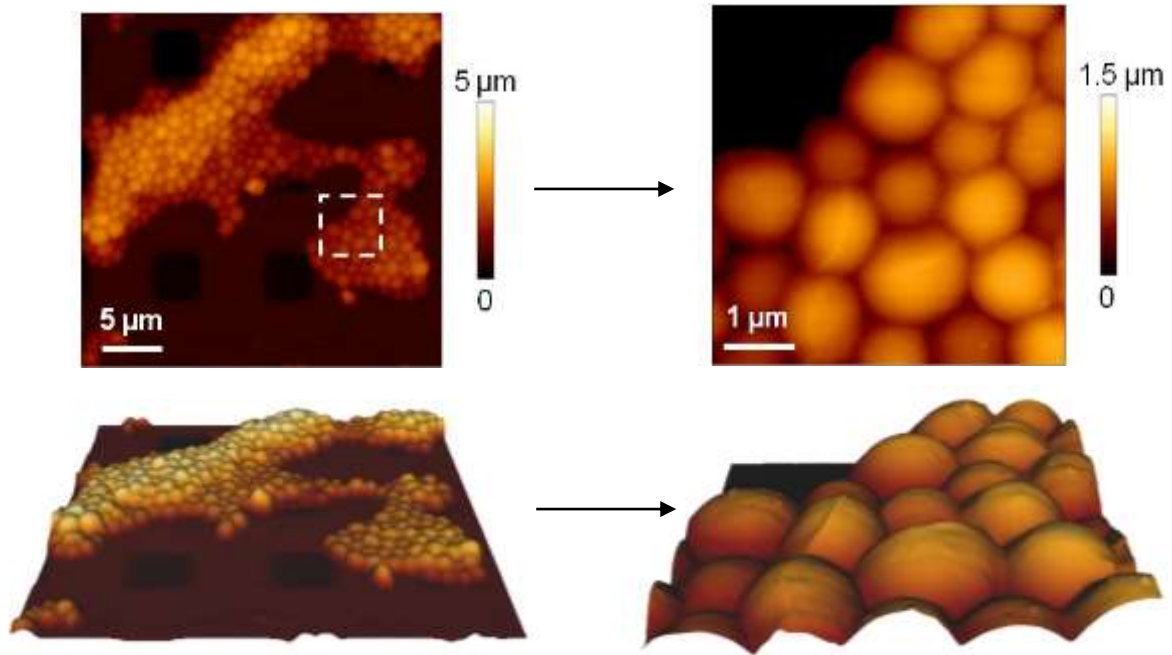


Figure VI-4 : Observation en AFM liquide d'agrégats de la souche ATCC 35984. Les images de droite sont extraites de la zone représentée par un carré blanc sur l'image de gauche. Sous chaque image AFM en 2D, une image en 3D de la même zone est présentée.

Les observations faites en microscopie à force atomique permettent de suggérer que la présence d'agrégats joue un rôle dans la résistance aux antibiotiques. En effet, la souche ATCC 35984 qui présente une résistance à la méthicilline a montré qu'elle forme naturellement des agrégats, contrairement à la souche ATCC 12228.

De plus, à l'échelle nanométrique, la rugosité moyenne a été mesurée pour les deux souches bactériennes. Cela correspond à la différence de relief sur la surface de l'échantillon. La souche ATCC 12228 présente une rugosité de $2,8 \pm 1,7$ nm alors que la souche formant des agrégats a une rugosité de $5,6 \pm 5,9$ nm. Ces valeurs, qui sont issues de la mesure de la rugosité sur 30 bactéries de chaque souche, semblent indiquer la présence de matrice extracellulaire dans le cas de la souche résistante aux antibiotiques. En effet, cette variation de rugosité peut être due à un changement dans l'organisation de la paroi bactérienne pour ces bactéries formant des biofilms.

La rigidité des bactéries a également été mesurée. Il s'agit de mesurer les propriétés mécaniques des bactéries en réponse à une force de 5 nN appliquée par la pointe AFM. Pour les bactéries non résistantes, la rigidité est de 152 ± 29 mN/m alors qu'elle n'est que de 98 ± 52 mN/m pour la souche formant un biofilm. Ces différences au niveau des propriétés

mécaniques de l'échantillon bactérien peuvent également refléter la formation de matrice extracellulaire dans le cas de la souche ATCC 35984.

Il est décrit que *Staphylococcus aureus* peut en fait exister sous trois formes différentes. On peut les trouver sous forme planctonique et en biofilm mais elles peuvent aussi former des agrégats planctoniques.²²⁶ *Staphylococcus epidermidis* semble donc avoir des propriétés similaires. L'agrégation des bactéries en suspension observée en AFM suggère que la matrice extracellulaire du biofilm commence déjà à être biosynthétisée avec production de PIA (Polysaccharide Intercellular Adhesin) avant la phase d'attachement primaire au support. Pour *S. aureus*, il a par ailleurs été observé qu'au début de la croissance, peu d'agrégats sont présents mais qu'en phase exponentielle, 50 % des bactéries sont sous forme d'agrégats planctoniques. Ceci est cohérent avec les observations faites sur les cultures de *S. epidermidis* (**Figure VI-2**).

Finalement, d'après ces observations, ce ne sont pas sur des bactéries planctoniques de *S. epidermidis* que les complexes de ruthénium à ligand nitrosyle seront testés mais sur la forme d'agrégats planctoniques. Ceux-ci partagent de nombreuses propriétés avec les biofilms dont la plus importante est la fabrication d'une matrice extracellulaire. La différence principale est que ces bactéries ont une activité métabolique environ sept fois supérieure à celles des bactéries en biofilms et qu'elles conservent leur mobilité, ce qui les rend encore plus résistantes.²²⁶

D'autres souches bactériennes comme *Staphylococcus aureus* ou *Pseudomonas aeruginosa* sont capables de former des biofilms et présentent également une résistance à la méthicilline. Il existe donc une relation entre la capacité des bactéries à former des agrégats et des biofilms et leur résistance aux antibiotiques.

Après avoir choisi et caractérisé les modèles bactériens de l'étude, l'effet bactéricide des complexes de ruthénium à ligand nitrosyle a été étudié.

VI. 3. Effet bactéricide de NO[•] libéré par irradiation du complexe *trans* (NO,OH) [RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆

Pour étudier l'effet de NO[•] libéré par irradiation du complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ sur les bactéries de la souche ATCC 35984, la première étape consiste en la caractérisation de la croissance des bactéries sans traitement. La seconde étape a pour objectif d'étudier l'effet de ce système avec irradiation sur la croissance des bactéries. Dans un dernier temps, l'étude est étendue à la combinaison de ce traitement avec un antibiotique.

VI. 3. 1- Étude de la cinétique de croissance de *Stapylococcus epidermidis* ATCC 35984

VI. 3. 1- a) Généralités sur le suivi de croissance bactérienne

La croissance des bactéries peut être suivie par mesure de la turbidité du milieu. En effet, le nombre de bactéries en suspension est directement lié à la turbidité du milieu. Plus il y a de bactéries en solution, plus le milieu est trouble. Pour cela, à l'aide d'un spectrophotomètre, l'absorption (ou Densité Optique, DO) de la solution est mesurée à 600 nm. Cette longueur d'onde est choisie afin de mesurer la diffusion de la lumière par les bactéries, sans qu'elle ne soit absorbée par le contenu intracellulaire.

La courbe de croissance bactérienne théorique est représentée sur la **Figure VI-5**.

La croissance des bactéries peut être divisée en quatre phases. La première est la phase de latence durant laquelle les bactéries s'adaptent à leur milieu de culture. Ensuite, vient la phase exponentielle de croissance durant laquelle elles se nourrissent des nutriments du milieu et se multiplient avec une vitesse maximale. La troisième phase est appelée stationnaire car le milieu commence à s'épuiser, les bactéries se multiplient moins rapidement et le nombre de bactéries mortes compense le nombre de vivantes. Enfin, la dernière partie de la courbe est la phase de déclin : les nutriments du milieu ont été consommés et les bactéries restantes meurent. Ces différentes phases de croissance ont des temps différents selon la nature des micro-organismes.

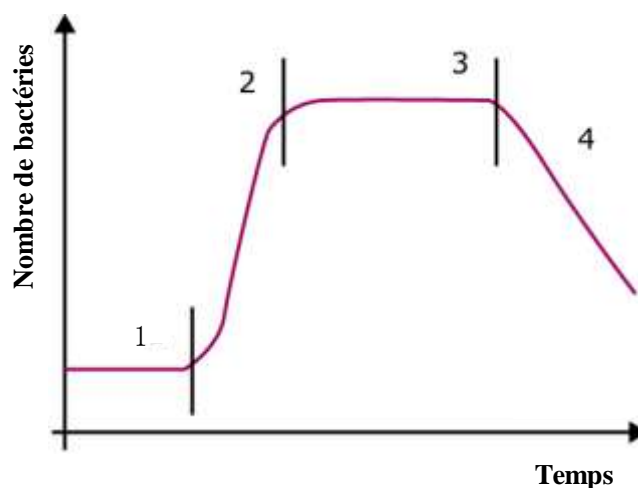


Figure VI-5 : Courbe de croissance théorique de micro-organismes, constituée de quatre phases : 1) Phase de latence, 2) Phase exponentielle, 3) Phase stationnaire, 4) Phase de déclin

VI. 3. 1- b) Suivi de croissance de *S. epidermidis* ATCC 35984

La croissance des bactéries est déterminée par mesure de la DO à 600 nm, toutes les 30 minutes, à partir d'aliqots provenant de cultures sous agitation. Dans l'équipe de l'IPBS, les bactéries sont habituellement cultivées dans des erlenmeyers contenant 10 mL de milieu de culture.

L'objectif est l'étude de l'effet du complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ irradié. Dans un souci d'économie du produit, les bactéries seront cultivées dans des tubes de culture contenant 3 mL de LB.

Dans un premier temps, la croissance des bactéries dans ces deux conditions de culture doit être comparée afin de vérifier que ce changement n'a pas d'effet sur leur viabilité.

Le paramètre permettant de comparer les vitesses de croissance des bactéries est le temps de génération G de la souche. Il correspond au temps nécessaire à la population bactérienne pour doubler. Ce dernier peut être obtenu d'après le taux de croissance népérien μ_{\max} (en min^{-1}), pente de la courbe $\ln(\text{DO})$ en fonction du temps sur le début de la phase exponentielle, d'après l'équation : $G = \ln(2) / \mu_{\max}$.²²⁷

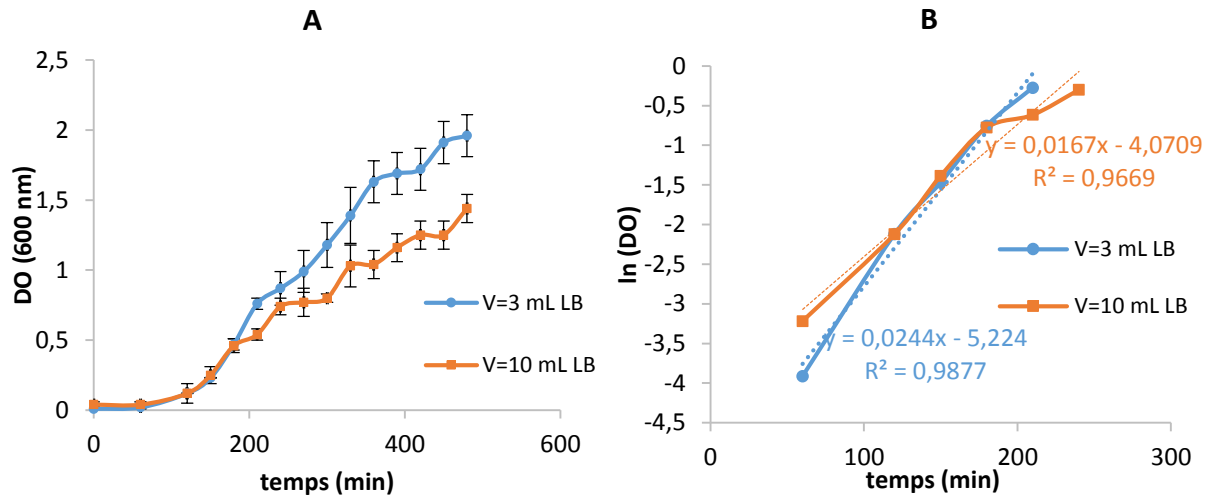


Figure VI-6 : A) Courbes de croissance de *S.epidermidis* ATCC 35984 dans 3 et 10 mL de LB et B) calcul du temps de génération dans deux conditions de culture grâce au tracé de $\ln(\text{DO})=f(t)$. Les courbes de croissance présentées sont les moyennes calculées sur 3 expérimentations indépendantes. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type à la moyenne pour les différents points.

Lorsqu'elle est cultivée dans 10 mL de LB, la souche a un temps de génération de 41 minutes, ce qui est cohérent avec les valeurs de la littérature (38 minutes^{224,228}). Ce temps de génération passe à 31 minutes dans les nouvelles conditions de culture (3 mL de LB).

La croissance des bactéries n'est donc pas très affectée par la culture dans 3 mL de LB, les bactéries se multiplient même plus rapidement. Les courbes de croissance présentées par la suite sont issues d'un suivi de DO d'une culture dans ce plus petit volume.

La DO peut être directement reliée au nombre de bactéries. En effet, un aliquot de la suspension à une DO donnée peut être mis en culture sur boîte et les colonies dénombrées le lendemain donnent le nombre d'unités formant colonie correspondant à la DO de prélèvement. Dans les conditions de culture précédemment utilisées, en phase exponentielle de croissance à DO 0,3, le nombre de bactéries est de $1,46 \cdot 10^8$ UFC/mL.

De plus, pour cette souche, la courbe de croissance s'éloigne un peu de la courbe de croissance théorique avec ses quatre phases distinctes. Ceci est dû à la présence d'agrégats en suspension.

VI. 3. 2- Suivi de croissance des bactéries traitées par *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ sans et avec irradiation

La structure du complexe dont l'effet antibactérien est testé est rappelée **Figure VI-7**.

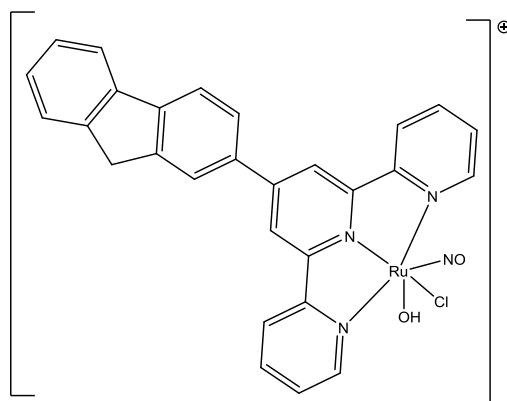


Figure VI-7 : Structure du complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]⁺

Le complexe n'étant pas soluble dans l'eau, un faible pourcentage de DMSO (de 0,5 % dans la solution finale) est utilisé pour préparer les solutions. Cette concentration de DMSO n'a pas d'influence sur la viabilité des bactéries, comme le montre la **Figure VI-8**.

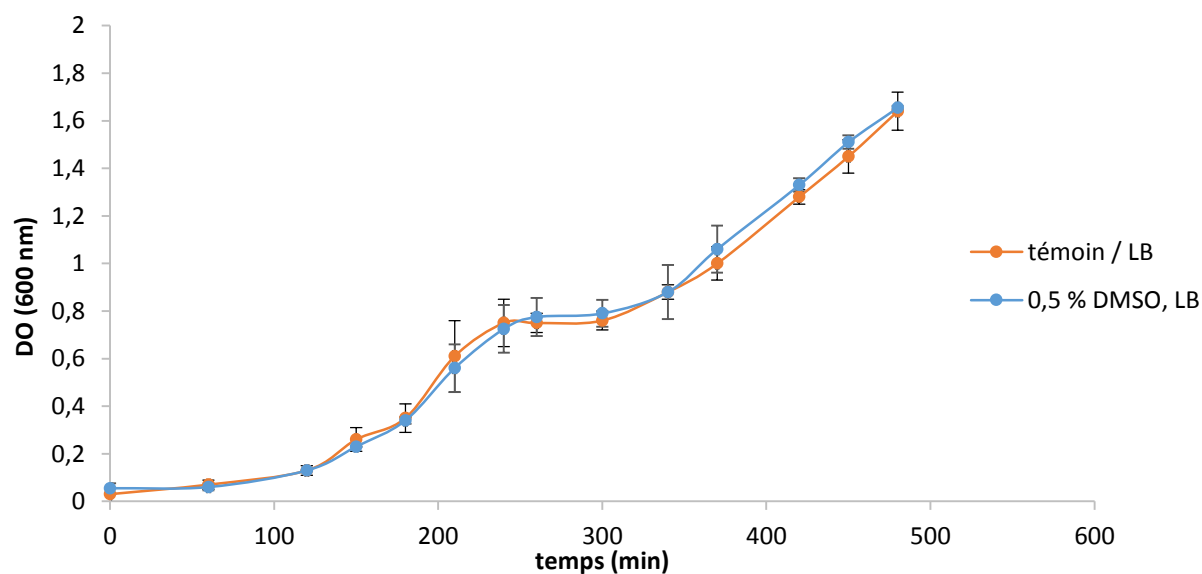


Figure VI-8 : Courbes de croissance de *S. epidermidis* ATCC 35984 en présence de 0,5% DMSO dans le LB. Les courbes présentées sont les moyennes avec écart-type de deux expérimentations indépendantes.

Les courbes de croissance avec et sans 0,5% de DMSO au final dans le LB sont superposables. Ce pourcentage de solvant organique peut donc être utilisé pour assurer la solubilisation des complexes.

Le complexe étudié, *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆, libère l'agent bactéricide sous irradiation. L'influence de l'irradiation seule sur la croissance des bactéries est elle aussi vérifiée afin de pouvoir relier tout effet toxique à la libération de NO[•] (cf **Figure VI-9**).

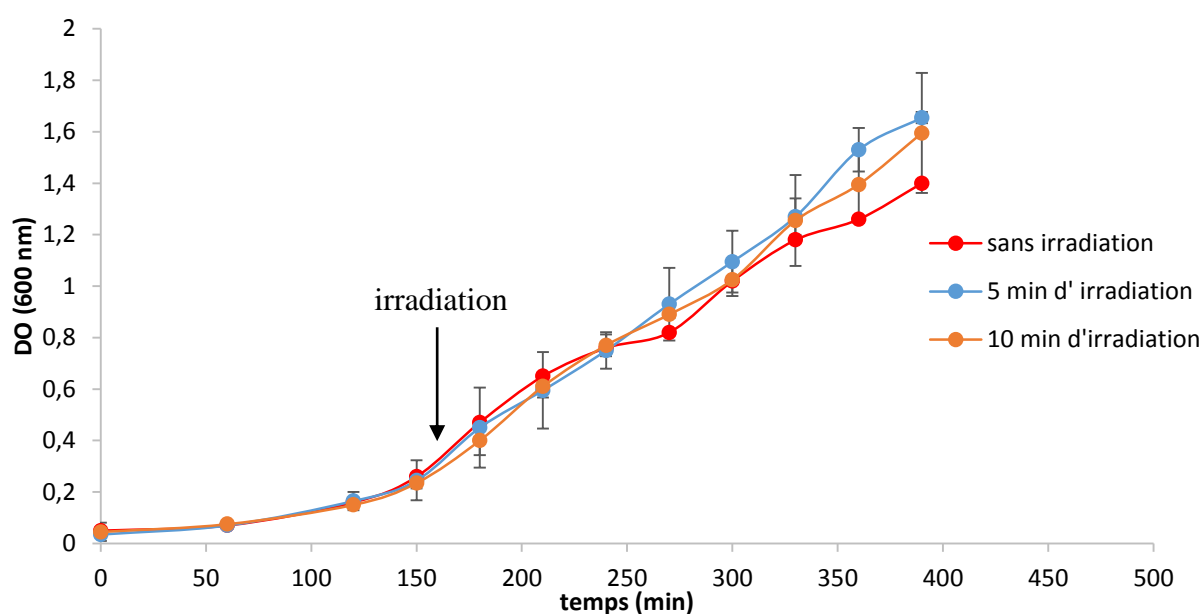


Figure VI-9 : Influence de l'irradiation sur la croissance de *S. epidermidis* ATCC 35984

Trois courbes de croissance sont représentées sur la **Figure VI-9** : la courbe rouge est celle des bactéries non irradiées dans le LB, et les deux autres sont celles correspondant aux irradiations de 5 ou 10 minutes des bactéries à DO 0,3 (marquée par la flèche). L'irradiation est réalisée à l'aide d'une lampe à vapeur de mercure.

Les trois courbes sont superposables donc on peut conclure que les temps d'irradiation utilisés n'ont pas d'effet sur la croissance de la souche ATCC 35984.

De plus, la température est suivie lors de ces irradiations et il n'y a pas d'échauffement des solutions (l'augmentation de la température est inférieure à 0,2°C).

Afin de définir la gamme de concentrations en *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ à utiliser, la croissance des bactéries est suivie après leur traitement et irradiation à DO 0,3 (en phase exponentielle de croissance).²²⁹ Les concentrations intéressantes sont celles qui n'entraînent pas de baisse significative de la DO sans irradiation mais pour lesquelles une chute de la DO est observée après irradiation. Dans cette étude, les courbes de croissance présentées sur la **Figure VI-10** sont obtenues en moyennant les DO relevées pour 3 expérimentations distinctes. Les barres d'erreur montrent l'écart-type de la mesure.

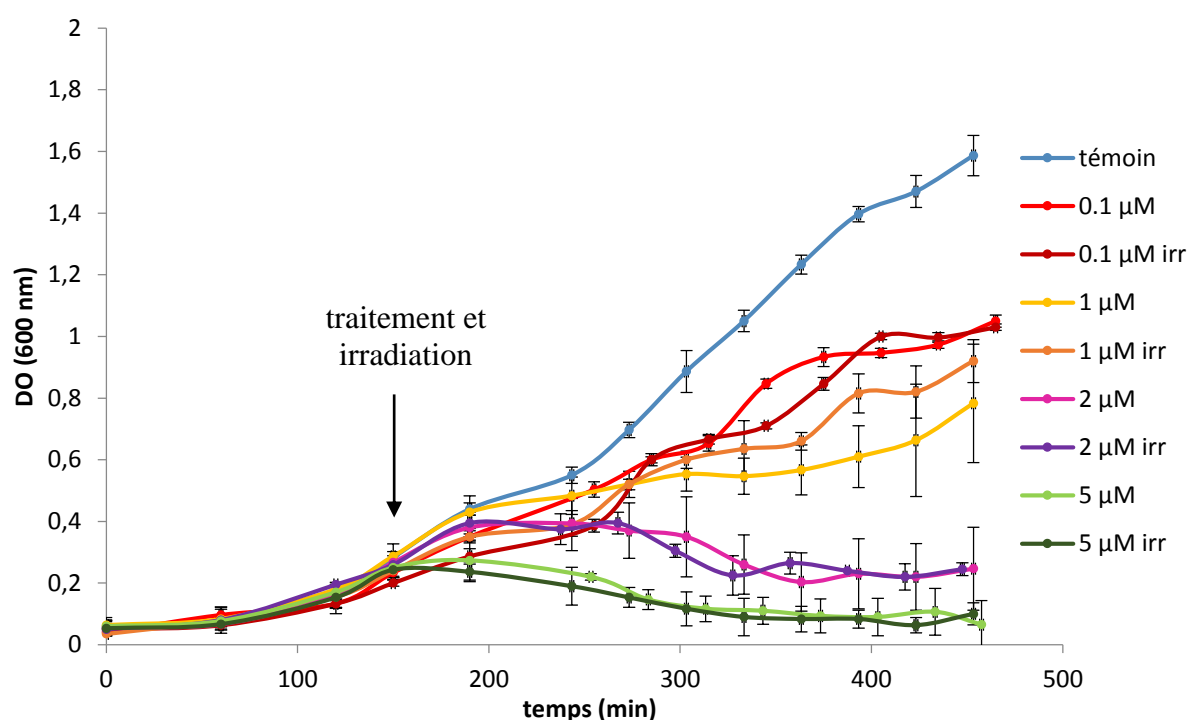


Figure VI-10 : Courbe de croissance de *S. epidermidis* ATCC 35984 après traitement par 0,1, 1, 2 et 5 µM de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ et 10 minutes d'irradiation (à DO 0,3)

La **Figure VI-10** montre que les concentrations de 2 et 5 µM (complexes irradiés ou non) entraînent une chute de la DO en 300 min. Cela signifie que pour des concentrations au-delà de 2 µM, le complexe est toxique pour la souche bactérienne.

Les concentrations de 0,1 et 1 µM permettent aux bactéries de poursuivre leur croissance, malgré un léger fléchissement de la courbe par rapport au témoin. Cette méthode de suivi de croissance par mesure de DO ne permet pas de mettre en évidence de différence entre le traitement par le complexe et le traitement par le complexe suivi de l'irradiation. Cela peut être dû au fait que, lors de la fin de la phase exponentielle et de la phase stationnaire, la

DO mesurée reflète la diffusion des bactéries en suspension, qu'elles soient vivantes ou mortes.

Afin de quantifier avec précision l'effet du complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ sans et avec irradiation, la clonogénie est utilisée. Il s'agit de réaliser un dénombrement bactérien 24 heures après le traitement. Seules les bactéries vivantes et capables de se multiplier forment des colonies. Les concentrations qui seront étudiées en clonogénie se situent donc entre 0,1 et 1 µM.

VI. 3. 3- Quantification de l'effet bactéricide de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ sans et avec irradiation par comptage bactérien

VI. 3. 3- a) Détermination du temps d'irradiation de *S. epidermidis* ATCC 35984

Afin de connaître précisément le pourcentage de mortalité induit par ces traitements, un test clonogénique est réalisé. Il permet de comptabiliser les bactéries vivantes et capables de se multiplier et former une colonie (visible à l'œil nu).

Dans un premier temps, l'influence du temps d'irradiation sur la viabilité des bactéries est étudiée.

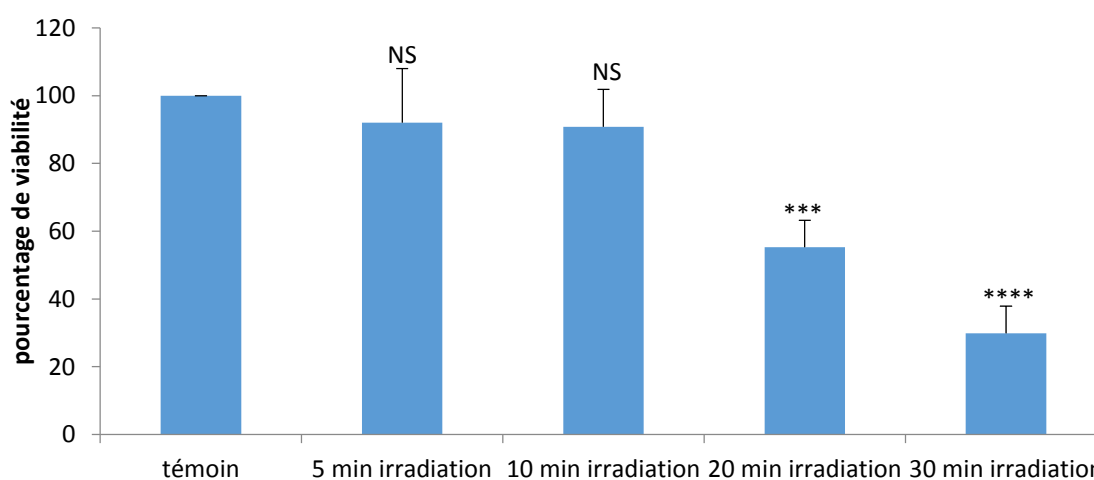


Figure VI-11 : Influence du temps d'irradiation sur la viabilité de *S. epidermidis* ATCC 35984. Les valeurs sont issues de trois expérimentations indépendantes, chacune d'entre elles réalisée en triplicat. Les barres d'erreur représentent l'erreur-type comparée au témoin.

Les irradiations de 5 et 10 minutes n'ont pas d'effet toxique, l'irradiation n'est pas suffisante pour permettre la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) car la dose est d'environ 20 J.cm^{-2} avec une irradiation par lampe à vapeur de mercure.²³⁰

Les temps d'irradiation de 20 et 30 minutes ont un effet toxique sur les bactéries. Leur viabilité est réduite à 42 % et 30 % respectivement. Il est connu dans la littérature que la lumière bleue a un effet toxique sur différents types de bactéries, comme en particulier *Escherichia coli* (Gram -) et *Staphylococcus aureus* (Gram +). Enwemeka *et al.* ont montré un effet dose-dépendent de l'irradiation par une lumière bleue de longueur d'onde 470 nm sur *S. aureus*, provoquant 90 % de mortalité avec une dose de 55 J.cm^{-2} . Cette toxicité peut provenir de la production de ROS due à la présence naturelle d'oxygène et de photosensibilisateurs dans le milieu ou dans les bactéries.²³⁰

Le temps d'irradiation choisi pour la suite des études est donc de 10 minutes. Dans ces conditions, l'irradiation ne provoque pas d'élévation de la température (l'augmentation est inférieure à $0,2^{\circ}\text{C}$) ni de perte de viabilité cellulaire.

VI. 3. 3- b) Influence du complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ sur la viabilité de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984

Les bactéries sont traitées par le complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ dans les concentrations suivantes : 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, et 1 μM . Comme dans les expérimentations précédentes, le traitement des bactéries et leur irradiation sont réalisés lorsqu'elles sont à DO 0,3 (début de la phase exponentielle).

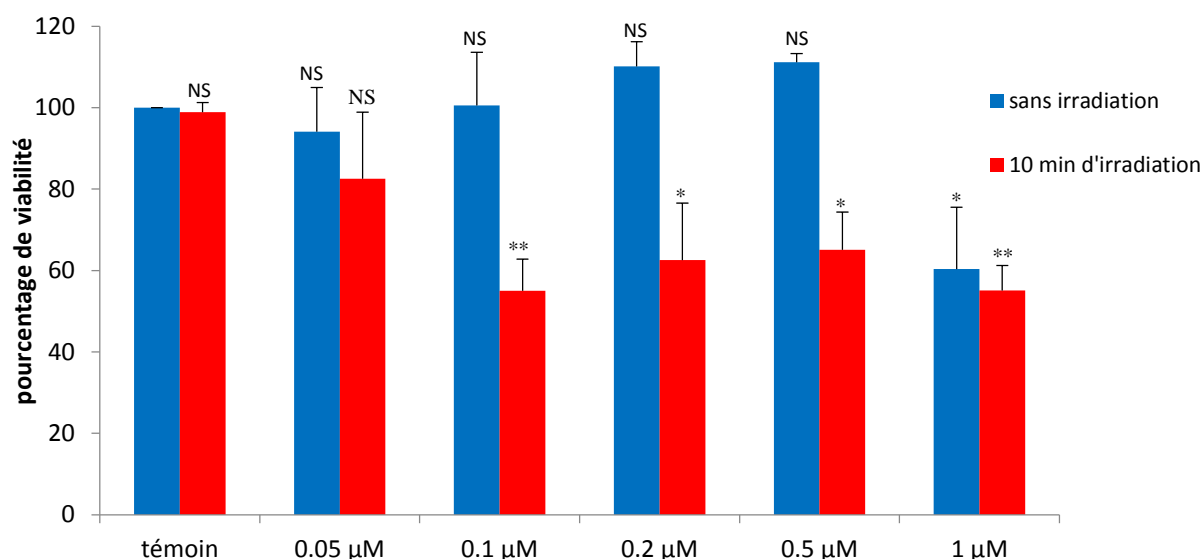


Figure VI-12 : Effet du traitement par le complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆, sans ou avec irradiation, sur la souche ATCC 35984. Les valeurs sont issues de la moyenne de quatre expériences indépendantes, chacune d'entre elles réalisée en triplicat. Les barres d'erreur représentent l'erreur-type de chaque colonne, comparée à la colonne témoin.

Les expériences de clonogénie ainsi menées indiquent que le complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ n'a pas d'effet toxique sur les bactéries de la souche ATCC 35984 pour des concentrations allant de 0,05 à 0,5 µM. A partir de 1 µM, le complexe commence à avoir un effet sur la viabilité des bactéries qui chute à 60 %. Ceci est peut-être dû à l'apparition d'un effet bactéricide du complexe à partir de 1 µM. En effet, des complexes de ruthénium à ligands polypyridines ont déjà montré des propriétés antimicrobiennes.^{231,232,75}

L'irradiation de 10 minutes (seule) n'a pas d'effet sur la viabilité des bactéries, comme montré par le témoin. Comme précédemment, l'irradiation ne provoque pas d'élévation de la température, l'effet observé sera donc dû à l'irradiation du complexe et non à l'échauffement de la solution.

Les bactéries ont ensuite été exposées à des concentrations de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ et ont été irradiées 10 minutes avec une lampe à vapeur de mercure. Il apparaît que le complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ irradié a un effet toxique sur les bactéries. En particulier, la concentration de 0,1 µM de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ entraîne l'effet le plus important, avec seulement 55 % de viabilité.

Grâce au complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ photoactivable, quasiment la moitié de la population bactérienne de la souche résistante et formant des biofilms est éradiquée.

VI. 3. 3- c) Influence du complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ sur la viabilité de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

En comparaison avec l'étude sur la souche ATCC 35984, il est intéressant de regarder le comportement de la souche ATCC 12228, qui est une souche de *Staphylococcus epidermidis* non résistante aux antibiotiques et ne formant pas de biofilm, après son traitement par NO^{*} libéré par le complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆.

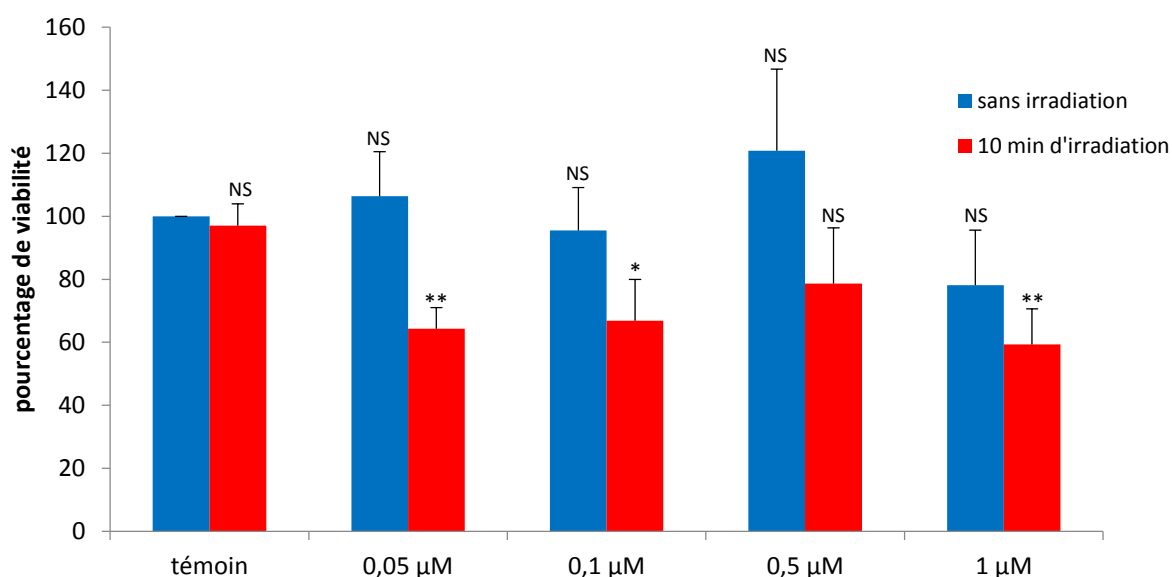


Figure VI-13 : Effet du traitement par le complexe [RuNO], sans ou avec irradiation, sur la souche ATCC 12228. Les pourcentages de viabilités présentés sont les moyennes de quatre expérimentations indépendantes, chacune réalisée en triplicat. Les barres d'erreur représentent l'erreur-type par rapport au témoin.

Comme dans l'étude menée sur la souche résistante, l'utilisation du complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ sans irradiation n'est pas toxique pour des concentrations inférieures à 1 µM. Au-delà, il semble y avoir un effet dû au complexe lui-même. La viabilité des bactéries n'est pas non plus influencée par l'irradiation de 10 minutes. Les bactéries de la

souche non résistante sont ensuite traitées par *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ et irradiées.

La souche ATCC 12228 présente également une sensibilité au traitement par NO[•]. En présence de 0,1 μM de complexe, la viabilité n'est plus que de 66 %. Cependant, le mécanisme de NO[•] doit être différent puisque dans ce cas, son rôle n'est pas de disperser le biofilm. Il a été montré que ce radical peut inhiber la réplication de l'ADN ou encore inhiber la respiration de la bactérie. En présence d'oxygène, il peut être transformé en NO₂[•], N₂O₃ ou ONOO⁻, espèces sont capables d'oxyder certaines bases de l'ADN ainsi que des protéines.¹⁶³

D'après cette étude, la photoactivation du complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ entraîne un certain effet sur la viabilité des bactéries, mais le pourcentage de mortalité engendré ne permet pas d'éradiquer ni la souche ATCC 12228, ni les agrégats de la souche ATCC 35984. En effet, pour éradiquer complètement des souches résistantes à la méthicilline, Ghaffari *et al.* ont utilisé une concentration d'environ 8 μM (par bullage de gaz NO[•]). Dans un autre travail, des cathéters libérant entre 2 et 60 μM de NO[•] ont été conçus pour lutter contre les infections par *Escherichia coli*.^{165,233} Les concentrations en NO[•] utilisées dans ces cas sont bien supérieures à celle libérée par le système *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆, puisque la toxicité du complexe apparaît dès 1 μM.

Afin d'augmenter l'effet bactéricide de ce composé, ce traitement peut être combiné à l'utilisation d'un antibiotique.¹⁵⁰ Dans le cas étudié dans ce chapitre, l'utilisation de la méthicilline s'impose puisque la souche ATCC 35984 y est résistante. L'objectif est de rendre à cette dernière sa susceptibilité aux antibiotiques de la famille des pénicillines.

VI. 3. 4- Suivi de croissance des bactéries traitées à la méthicilline. Détermination de la CMI

Dans un premier temps, les deux souches ont été traitées avec la méthicilline pour observer leur croissance et déterminer leur susceptibilité. Pour quantifier l'efficacité de l'antibiotique sur les bactéries, le paramètre à mesurer est la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI). Il s'agit de la plus faible concentration de méthicilline inhibant visiblement la croissance de la souche. Dans cette étude, la CMI correspond à la plus faible concentration inhibant totalement la croissance des bactéries et celle-ci est déterminée par suivi de DO.

Il est connu que pour le genre *Staphylococci*, les CMI des différentes souches non résistantes sont comprises entre 0,12 et 128 $\mu\text{g/mL}$.²³⁴

Pour la souche ATCC 12228, des concentrations en méthicilline allant de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ à 200 $\mu\text{g/mL}$ ont été testées à DO 0,1. Les courbes de croissance correspondantes sont représentées sur la **Figure VI-14**.

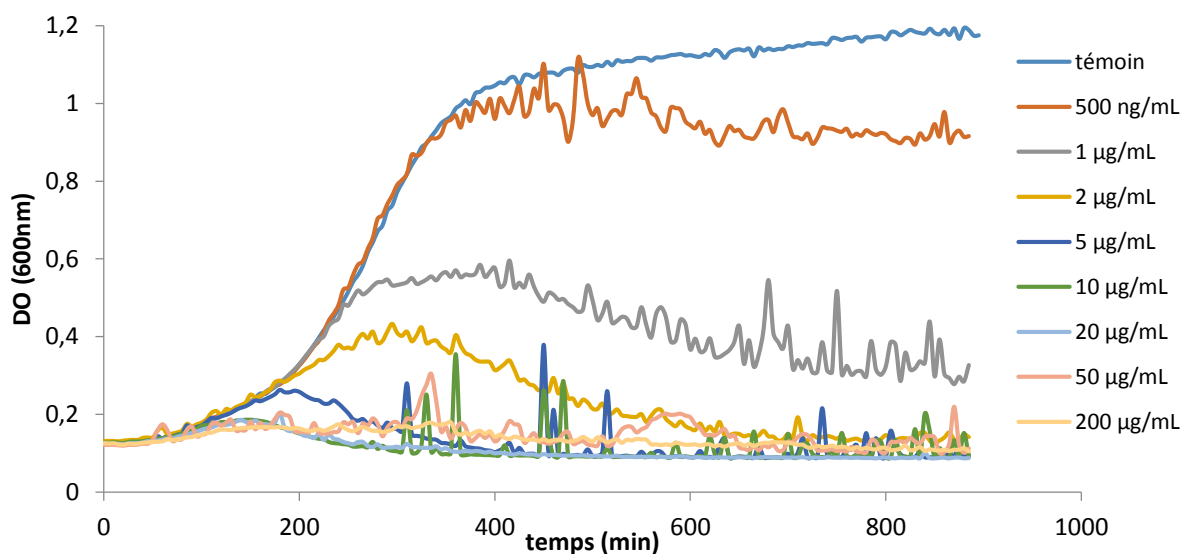


Figure VI-14 : Courbe de croissance de la souche ATCC 12228 en présence de différentes concentrations de méthicilline dans le LB. Les courbes de croissance sont tracées à partir de quatre expériences indépendantes, chacune réalisée en triplicat. Pour plus de clarté, les barres d'erreur ne sont pas représentées sur les courbes de croissance.

Pour la souche ATCC 12228, on remarque que plus la concentration en méthicilline augmente, plus les courbes de croissance présentent un retard à la croissance, exprimé par la pente de plus en plus faible en phase exponentielle. Pour les concentrations les plus élevées, au-delà de 1 $\mu\text{g/mL}$, une chute de la DO est observée. La concentration de méthicilline la plus faible entraînant une inhibition totale de la croissance est **5 $\mu\text{g/mL}$** .

Pour la souche ATCC 35984, des concentrations plus élevées ont dû être utilisées. En effet, dans la gamme précédemment choisie d'après la littérature, aucune chute de DO n'était observée.²³⁴

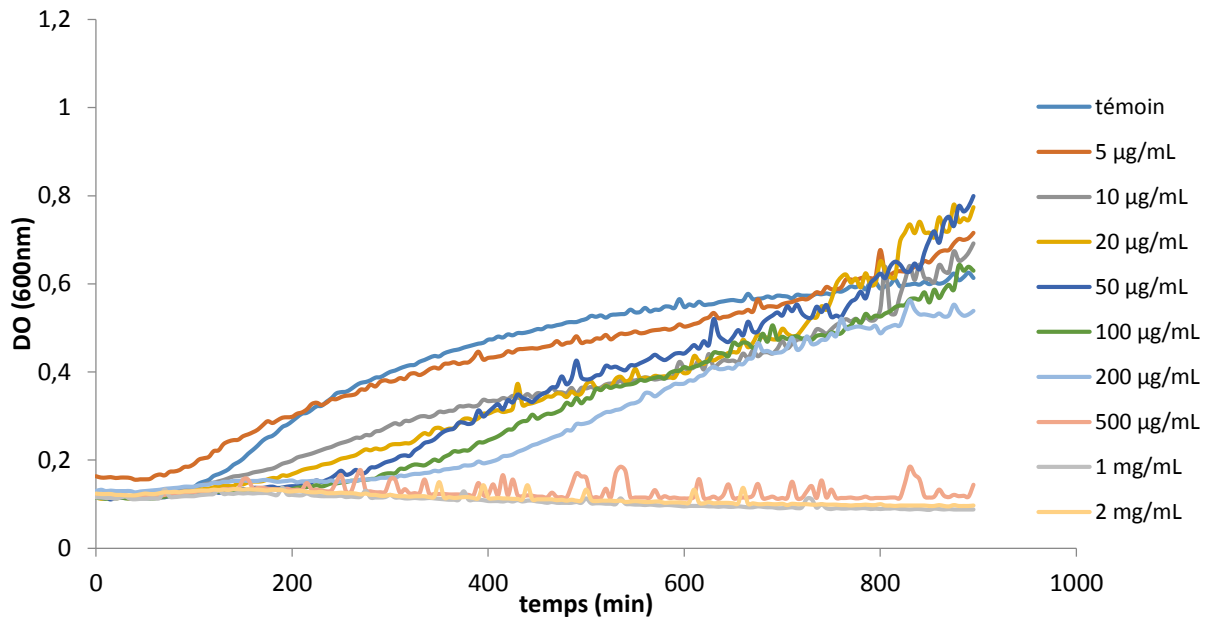


Figure VI-15 : Courbes de croissance de la souche ATCC 35984 en présence de différentes concentrations de méthicilline dans le LB. Les courbes de croissance sont tracées à partir de quatre expériences indépendantes, chacune réalisée en triplicat. Pour plus de clarté, les barres d'erreur ne sont pas représentées sur les courbes de croissance.

Dans le cas de la souche ATCC 35984, en faisant la même étude, la CMI est de **500 µg/mL** dans le LB. On remarque que la concentration en antibiotique pour inhiber la croissance de cette souche est 100 fois supérieure à celle nécessaire pour la souche 12228 non résistante.

Cette étude des CMI de méthicilline pour les deux souches permet de montrer que la souche ATCC 35984 est effectivement bien plus tolérante à la méthicilline que la souche ATCC 12228 dans le milieu de culture LB. Ce milieu est utilisé pour favoriser la formation d'agrégats et de biofilms sur la souche résistante, mais c'est le milieu Müller-Hinton Broth (MHB), supplémenté de 2% NaCl (wt/vol), qui est préconisé dans les standards de mesure de CMI.^{235,236} La même étude est également menée dans ce second milieu et des valeurs de CMI similaires sont obtenues. Les CMI mesurées dans chaque cas sont reportées dans le **Tableau VI-1**.

Tableau VI-1 : Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) en méthicilline pour les deux souches de *Staphylococcus epidermidis*.

| | ATCC 12228 | ATCC 35984 |
|----------------------------------|---------------|---------------|
| LB | 5 µg/mL | 500 µg/mL |
| MHB, 2% NaCl (wt/vol) | 5 µg/mL | 1 mg/mL |

VI. 3. 5- Suivi de croissance des bactéries traitées avec *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ irradiés combinés à la méthicilline. Détermination de la CMI

La CMI de la méthicilline pour les deux souches de *S. epidermidis* ayant été déterminée, l'effet du traitement par le *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ irradié combiné à l'action de l'antibiotique est étudié. L'objectif de cette expérimentation est de déterminer si l'utilisation de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ irradié peut rendre à la souche 35984 sa susceptibilité à la méthicilline.

VI. 3. 5- a) Effet combiné de l'irradiation de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ avec la méthicilline sur *S. epidermidis* ATCC 12228

Les bactéries de la souche non résistante ATCC 12228 sont traitées par le *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆, irradiées 10 minutes par la lampe à vapeur de mercure, puis la méthicilline est ajoutée, dans des concentrations de 20 ng/mL à 2 µg/mL. La DO est suivie au cours du temps pour étudier l'effet du traitement sur la croissance bactérienne. Les courbes de croissance de cette souche sont présentées sur la **Figure VI-16**.

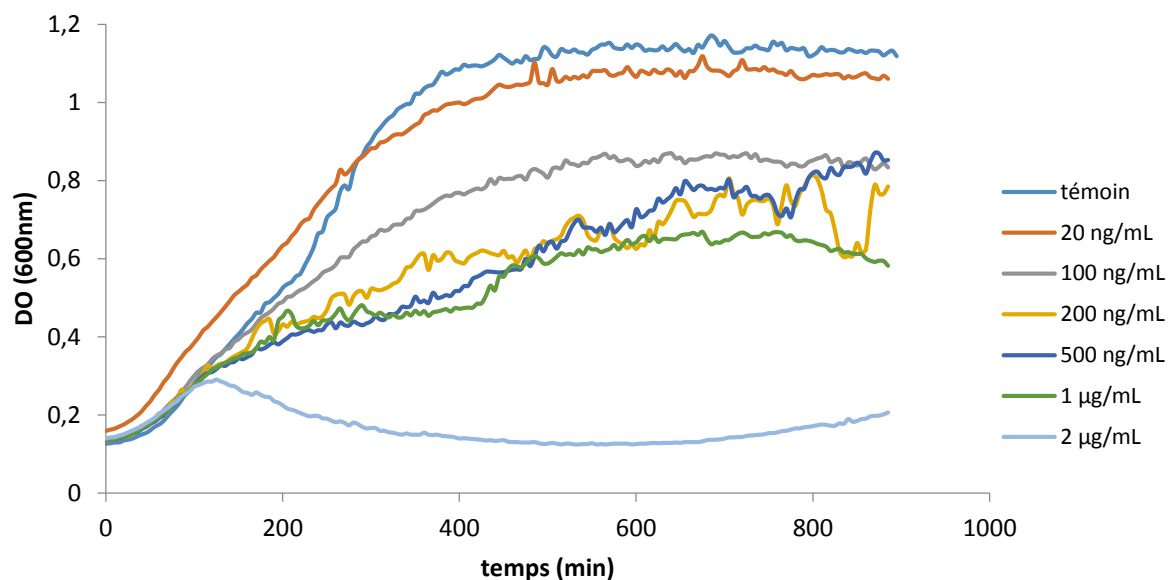


Figure VI-16 : Courbes de croissance de la souche ATCC 12228 dans le LB après traitement par 0,1 μM de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ et irradiation en combinaison avec différentes concentrations de méthicilline

D'après la **Figure VI-16**, plus la concentration de méthicilline augmente, plus les courbes de croissance sont affectées.

L'action combinée du *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ avec la méthicilline permet d'empêcher la croissance des bactéries pour une concentration en méthicilline de **2 $\mu\text{g/mL}$** .

La CMI de la méthicilline seule étant de **5 $\mu\text{g/mL}$** (d'après la **Figure VI-14**), ce traitement combiné n'entraîne qu'une faible diminution de la CMI. Cette étude est également menée dans le MHB et la même diminution est observée. Il n'y a quasiment pas d'amélioration par rapport à l'utilisation de la méthicilline seule. Cette souche qui est susceptible aux pénicillines et qui ne forme pas d'agrégats ne voit donc pas sa croissance changer sous ce traitement combiné par rapport à un traitement antibiotique seul.

Cette étude est ensuite menée sur la souche ATCC 35984, présentant une résistance à la méthicilline.

VI. 3. 5- b) Effet combiné de l'irradiation de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ avec la méthicilline sur *S. epidermidis* ATCC 35984

Les bactéries de la souche ATCC 35984 sont traitées par le *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆, irradiées 10 minutes par la lampe à vapeur de mercure, puis la méthicilline est ajoutée, dans des concentrations de 0,2 µg/mL à 20 µg/mL. La DO est ensuite suivie pour étudier l'effet du traitement sur la croissance bactérienne. Les courbes de croissance sont présentées sur la **Figure VI-17**.

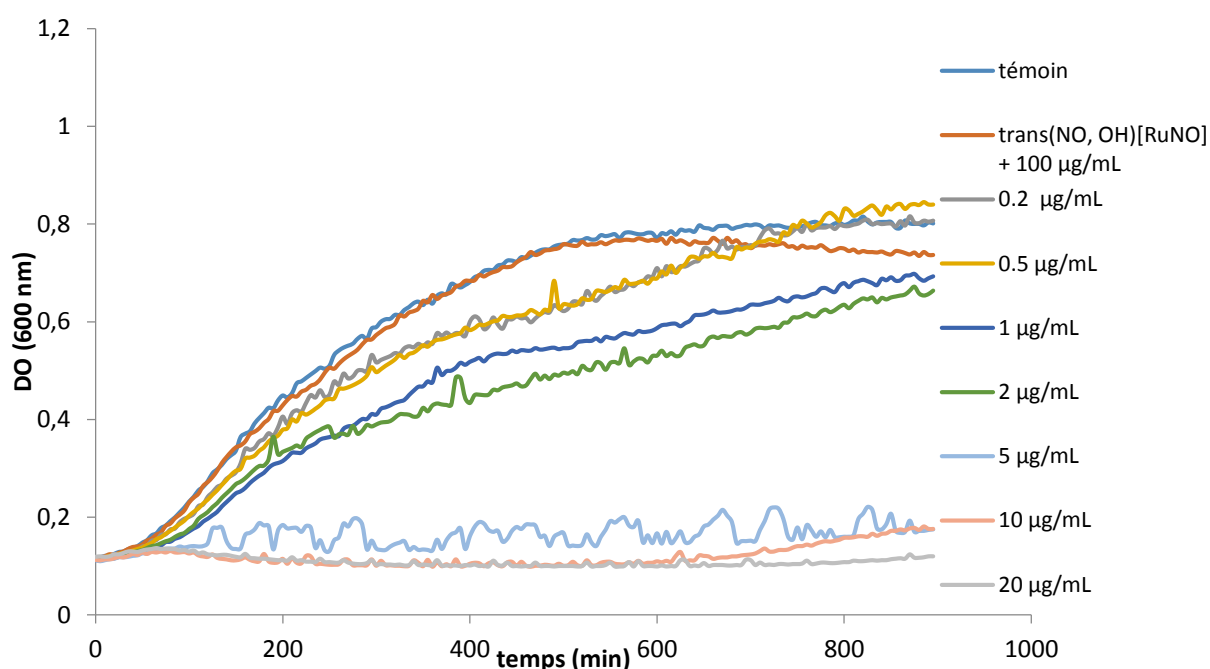


Figure VI-17 : Courbes de croissance de la souche ATCC 35984 dans le LB après traitement par 0,1 µM de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆, irradiation de la suspension et utilisation de différentes concentrations de méthicilline

L'irradiation des bactéries en présence ou non de 100 µg/mL de méthicilline (concentration élevée inférieure à la CMI) ainsi que le traitement par 0,1 µmol/L de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ sans irradiation n'ont pas d'effet sur la courbe de croissance. De plus, le traitement par le *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ non irradié combiné avec une concentration élevée en méthicilline de 100 µg/mL (inférieure à la CMI) n'a pas d'effet sur la croissance des bactéries. Ainsi, en absence d'irradiation, la combinaison

du *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ et de la méthicilline n'a pas d'effet toxique sur la souche bactérienne étudiée.

En revanche, sous irradiation, les courbes de croissance permettent de mettre en évidence l'effet du traitement combiné.

Les concentrations en méthicilline utilisées dans cette étude (**Figure VI-17**) sont bien plus faibles que précédemment lors de la recherche de la CMI de l'antibiotique seul (**Figure VI-15**). Plus la concentration en méthicilline augmente, plus la DO à 900 minutes diminue. La souche ATCC 35984, résistante à la méthicilline et présentant une CMI de **500 µg/mL**, voit celle-ci passer à **5 µg/mL** lorsque les bactéries ont précédemment subi un traitement par le complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ suivi d'une irradiation.

Il y a donc une diminution de **2 log** de la concentration en méthicilline nécessaire pour inhiber la croissance des bactéries de la souche ATCC 35984.

Il est donc à présent possible d'éradiquer cette souche formant des biofilms avec une concentration 100 fois plus faible d'antibiotique. L'utilisation d'une très faible concentration de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆, soit 0,1 µM ou 74 µg/L, permet ainsi de lutter contre la résistance à la méthicilline de *Staphylococcus epidermidis*. Ces systèmes semblent donc permettre de rendre aux bactéries de cette souche leur susceptibilité à la méthicilline.

Comme précédemment, l'étude est également menée dans le MHB (2% NaCl wt/vol). Les courbes de croissance (moyenne de trois expérimentations indépendantes, réalisées en triplicat) sont représentées ci-dessous sur la **Figure VI-18**.

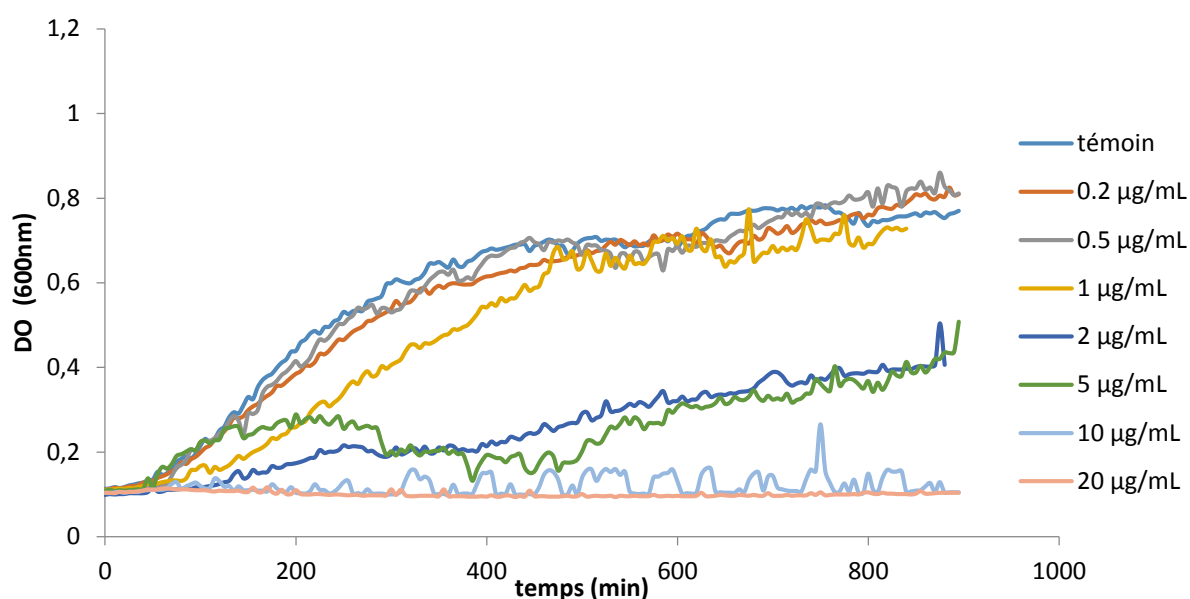


Figure VI-18 : Courbes de croissance de la souche ATCC 35984 dans le MHB (2% NaCl wt/vol) après traitement par 0,1 µM de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆, irradiation de la suspension et combinaison avec différentes concentrations de méthicilline

Dans le milieu de référence, la CMI de la méthicilline diminue de **1 mg/mL** à **10 µg/mL** avec un traitement préalable avec 0,1 µM de [RuNO] irradié.

Finalement, dans les deux milieux de culture testés, l'action combinée de la méthicilline avec le *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ irradié fait chuter la CMI de **2 log**, comme le résume le **Tableau VI-2**.

Tableau VI-2 : Concentrations Minimales Inhibitrices en méthicilline pour les deux souches de *S. epidermidis*

| | ATCC 12228 | | ATCC 35984 | |
|------------------------------|------------|---------|----------------|-----------------|
| | LB | MHB | LB | MHB |
| méthicilline | 5 µg/mL | 5 µg/mL | 500 µg/mL | 1 mg/mL |
| [RuNO] + méthicilline | 2 µg/mL | 2 µg/mL | 5 µg/mL | 10 µg/mL |

La croissance des bactéries peut donc être inhibée avec une concentration de méthicilline 100 fois plus faible lorsqu'elles sont traitées avec $0,1 \mu\text{M}$ soit $74 \mu\text{g/L}$ de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ irradié. Avec cette concentration de précurseur de NO^{*}, la résistance de la souche bactérienne est levée. En effet, la quantité de méthicilline nécessaire à l'éradication de la souche résistante est maintenant quasiment égale à celle éradiquant la souche sensible ATCC 12228.

Pour résumer, la **Figure VI-19** présente les courbes de croissance obtenues pour la souche ATCC 35984 après traitement par $5 \mu\text{g/mL}$ de méthicilline seule (courbe jaune), par $0,1 \mu\text{M}$ de [RuNO] et $100 \mu\text{g/mL}$ de méthicilline (courbe verte) et par *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ suivi d'une irradiation et de $5 \mu\text{g/mL}$ de méthicilline (courbe rouge).

Ces courbes permettent de conclure que la croissance est inhibée après le traitement combiné du complexe irradié et de l'antibiotique. Sans irradiation, il n'y a pas d'effet.

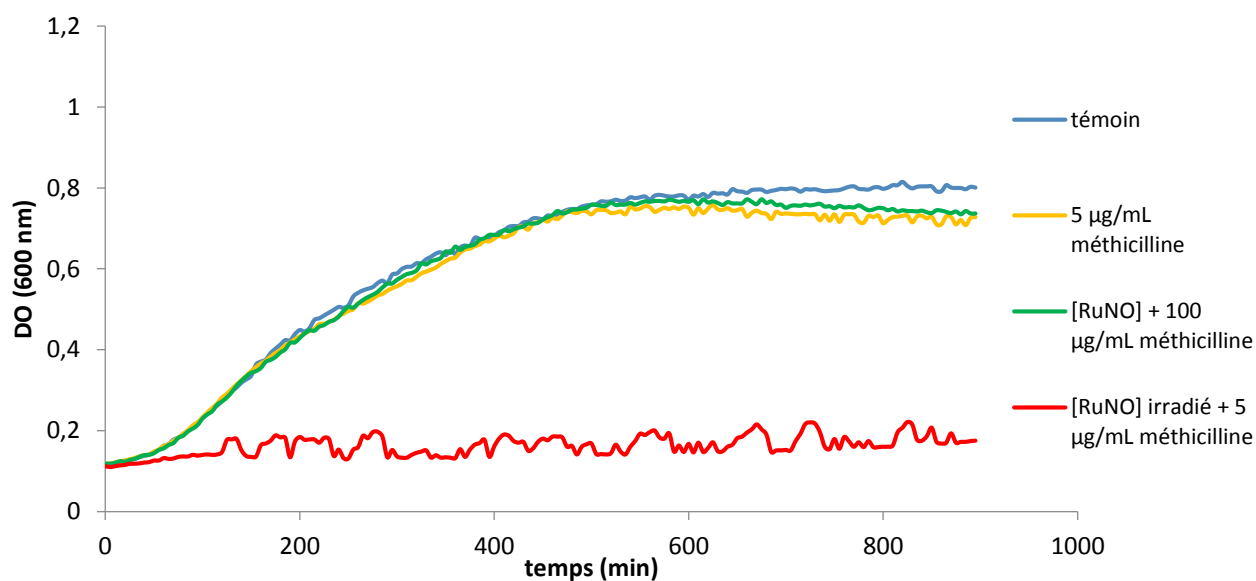


Figure VI-19 : Courbes de croissance de la souche ATCC 35984 dans le LB sans et avec le traitement combiné ([RuNO]= *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆)

En déposant des aliquots des bactéries ayant subi les différents traitements sur des boîtes de Pétri gélosées, on peut comparer le nombre de colonies qui ont pu se former. Sur la **Figure VI-20**, à gauche, se trouvent les colonies formées après un traitement avec $5 \mu\text{g/mL}$ de méthicilline seule et dilution de la suspension $5 \cdot 10^6$ fois. A droite, ce sont les colonies se

développant après le traitement par 0,1 μM de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆, l'irradiation et 5 $\mu\text{g/mL}$ de méthicilline, puis dilution de la suspension 10⁶ fois. Le nombre de colonies formées après le traitement combiné est de 5 alors qu'à gauche, pour la même dilution, le nombre de colonies est d'environ 500.

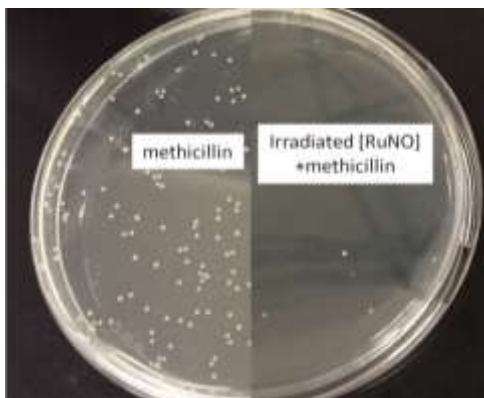


Figure VI-20 : Nombre de colonies de la souche ATCC 35984 après le traitement par la méthicilline (à gauche) et après le traitement combiné (*trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ / méthicilline) (à droite)

La méthode de clonogénie permet elle aussi de montrer que l'utilisation du traitement combinant le ruthénium irradié et la méthicilline augmente d'un facteur 100 l'effet bactéricide par rapport à l'action de la méthicilline seule. Ceci est cohérent avec les études menées par suivi de DO.

Ainsi, la CMI de la méthicilline est diminuée d'un facteur 100 lorsqu'elle est utilisée en combinaison avec le NO[•] libéré par le complexe photoactivable sur la souche ATCC 35984 résistante. En revanche, cela n'est pas le cas pour la souche ATCC 12228, pour laquelle la CMI n'est pratiquement pas diminuée. Ceci tend à conclure sur l'intérêt et l'efficacité du NO[•] libéré par le complexe de ruthénium à ligand nitrosyle pour disperser les agrégats planctoniques formés par ATCC 35984. La méthicilline intervient ensuite pour éradiquer les bactéries planctoniques libérées, qui ont retrouvé leur susceptibilité à l'antibiotique.^{150,162}

VI. 3. 6- Etude de l'effet du photoproduit

Afin de prouver que l'effet observé est bien dû au NO[•] photolibéré par le *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆, la non-toxicité des autres constituants de la solution

après irradiation doit être vérifiée. Celle-ci contient le photoproduit mais aussi des produits d'oxydation du NO[•] en milieu aqueux comme par exemple des nitrites NO₂⁻ et nitrates NO₃⁻. D'autres espèces très réactives peuvent être formées comme des peroxy-nitrites ONOO⁻ (issues de la réaction de NO[•] avec O₂^{•-}), mais celles-ci finissent également par former des nitrites ou nitrates.¹⁶³

L'effet du photoproduit à 0,1 μM est déterminé sur la souche ATCC 35984 et les pourcentages de viabilité sont reportés sur la **Figure VI-21**.

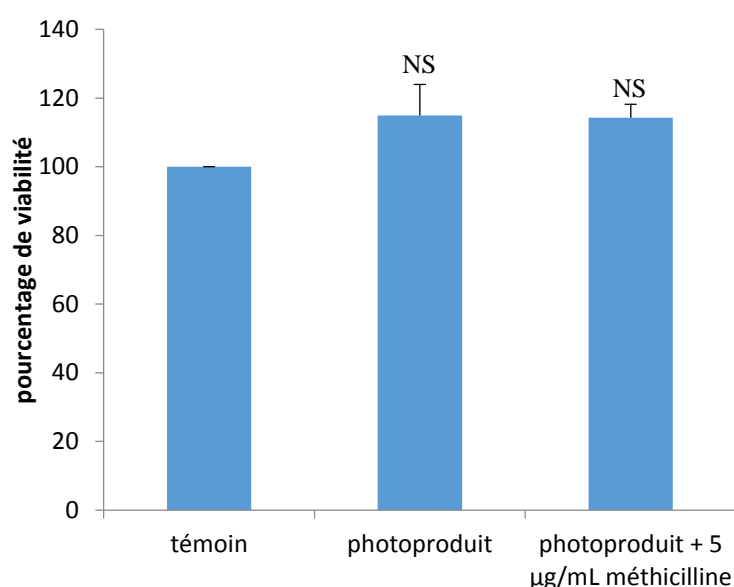


Figure VI-21 : Effet du photoproduit sans et avec méthicilline sur la viabilité de la souche ATCC 35984. Les pourcentages de viabilité sont calculés à partir de deux expériences indépendantes, chacune réalisée en triplicat.

La différence entre le pourcentage de viabilité observé pour les bactéries non traitées et pour celles traitées par le photoproduit est non significative. Le photoproduit du complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ étudié n'a donc aucun effet toxique. Cela signifie que l'effet toxique précédemment observé n'est pas dû au photoproduit.

Ensuite, la viabilité des bactéries est étudiée en présence de ce photoproduit et de 5 μg/mL de méthicilline. Cette concentration est choisie car elle correspond à la CMI observée lors de l'action combinée de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ irradié et de l'antibiotique. Donc si l'effet était dû au photoproduit, le pourcentage de viabilité trouvé

devrait être quasiment nul. Or, ce n'est pas le cas, il n'y a aucun effet visible induit par le mélange de photoproduit et d'antibiotique.

On peut donc conclure que le photoproduit du complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ étudié n'est pas toxique pour cette souche bactérienne.

Des solutions de NaNO₂ et NaNO₃ ont été préparées à une concentration de 0,01 μM dans le LB, qui est, d'après la mesure des rendements quantiques, la concentration maximale que pourraient atteindre ces ions dans la solution après photolyse.

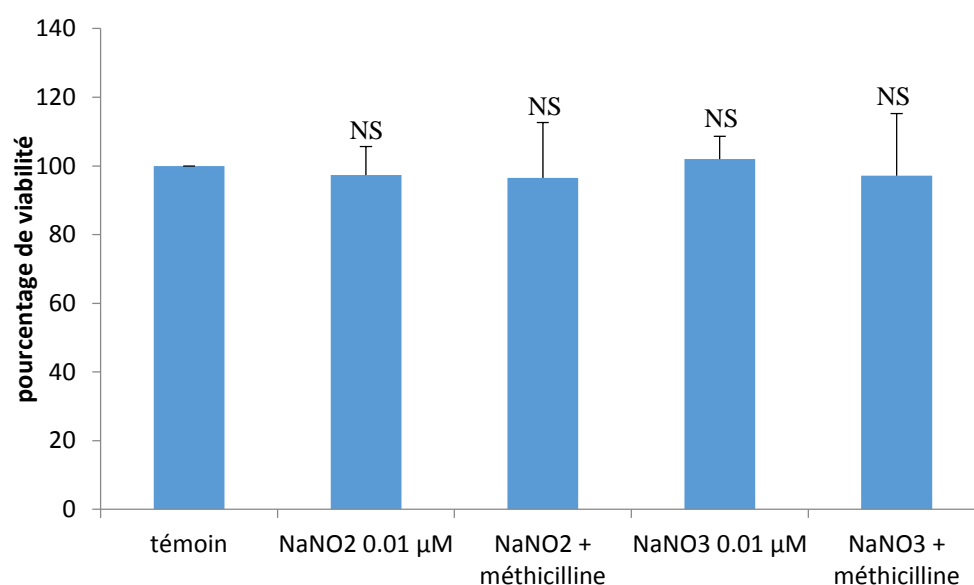


Figure VI-22 : Effet des solutions de nitrites et nitrates à 0,01 μM sans et avec méthicilline sur la viabilité de la souche ATCC 35984. Les pourcentages de viabilité sont issus de la moyenne de deux expérimentations indépendantes faites en triplicat.

Aucune différence significative n'est constatée entre les viabilités des bactéries non traitées et celles mises en culture avec NaNO₂ ou NaNO₃. L'effet toxique observé dans les manipulations de clonogénie n'est donc pas dû à ces produits d'oxydation du NO[•].

De plus, lorsque 5 μg/mL de méthicilline sont ajoutés au traitement par NaNO₂ ou NaNO₃, aucune toxicité n'est observée.

En conclusion, ni le photoproduit, ni les produits d'oxydation du NO[•] ne sont responsables de l'important effet bactéricide observé lors du traitement combiné du

trans(NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ irradié et de la méthicilline. Cette étude a donc permis de prouver que c'est bien le NO[•] photolibéré qui conduit à une chute de la CMI de 2 log.

VI. 4. Études préliminaires de l'effet bactéricide de NO[•] libéré par irradiation d'autres complexes de ruthénium à ligand nitrosyle

Dans cette dernière partie, l'effet bactéricide d'un traitement combinant la méthicilline avec trois autres complexes de ruthénium à ligand nitrosyle sous irradiation est étudié. Les trois complexes sont : *trans* (NO,OH)-[RuTCC2F(Cl)(OH)(NO)]PF₆, *trans* (NO,OH)-[RuTCC3F(Cl)(OH)(NO)]PF₆ et *trans* (NO,OH)-[RuFFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆. Ces complexes diffèrent du *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ précédemment testé par la présence de chaînes hexyles apolaires sur le ligand fluorène. Les propriétés biologiques de ces nouveaux complexes peuvent donc être différentes et cette étude constitue l'objectif de cette partie.

VI. 4. 1- Effet bactéricide de NO[•] libéré par irradiation de *trans* (NO,OH)-[RuTCC2F(Cl)(OH)(NO)]PF₆

La structure du composé étudié dans cette partie est rappelée sur la **Figure VI-23**.

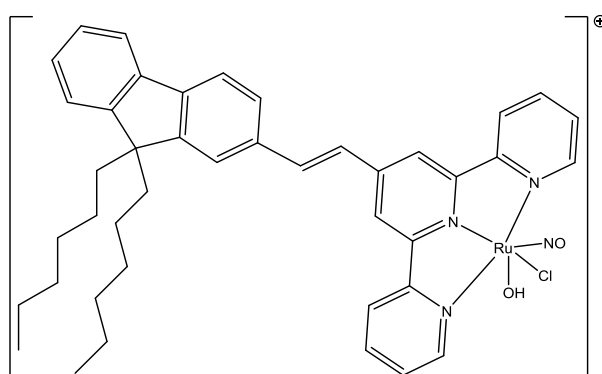


Figure VI-23 : Structure du complexe *trans* (NO,OH)-[RuTCC2F(Cl)(OH)(NO)]⁺

Une étude préliminaire est menée pour évaluer l'effet bactéricide de cet autre complexe.

Le travail est mené sur la souche résistante ATCC 35984. Comme précédemment, la CMI de la méthicilline est recherchée après un traitement des bactéries par le complexe *trans* (NO,OH)-[RuTCC2F(Cl)(OH)(NO)]PF₆ et 10 minutes d'irradiation pendant la phase exponentielle de croissance.

Pour rappel, la CMI de la méthicilline seule sur cette souche est de 500 µg/mL. Les courbes de croissance des bactéries préalablement traitées et exposées à différentes concentrations de méthicilline sont tracées sur la figure ci-dessous (**Figure VI-24**).

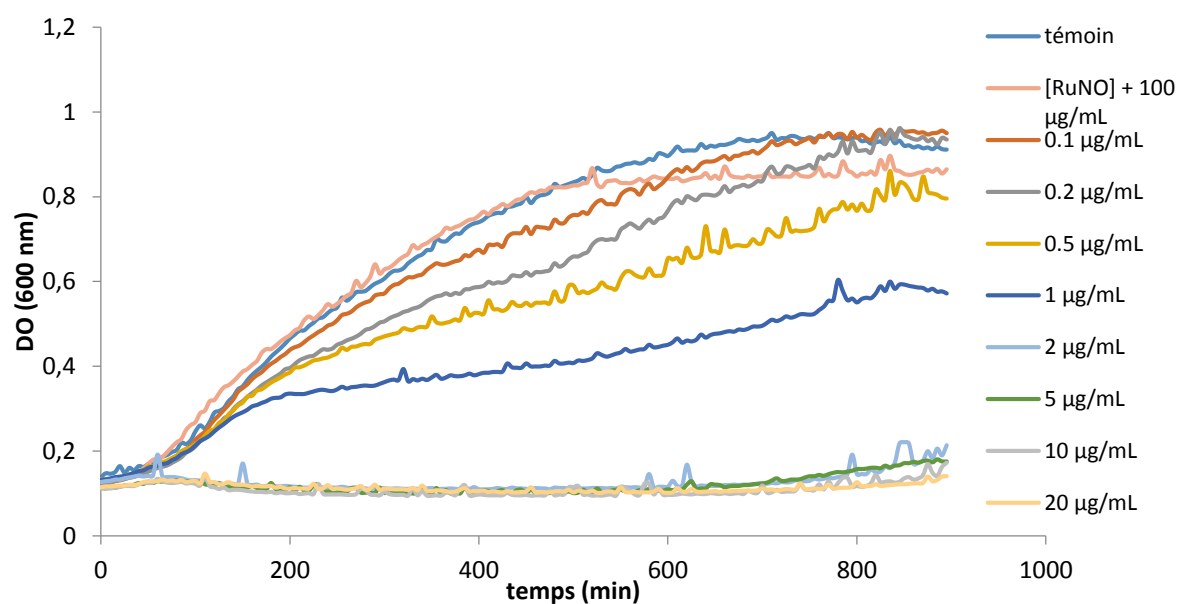


Figure VI-24 : Courbes de croissance de la souche ATCC 35984 dans le LB après traitement par 0,1 µM de *trans* (NO,OH)-[RuTCC2F(Cl)(OH)(NO)]⁺ et irradiation en combinaison avec différentes concentrations de méthicilline

Avec ce nouveau complexe, il n'y a pas non plus d'influence sur la croissance de la souche lorsque ce dernier n'est pas irradié, même en présence d'une concentration élevée d'antibiotique (100 µg/mL).

Plus la concentration en méthicilline est importante, plus les courbes de croissance sont affectées. La concentration minimale de méthicilline inhibant totalement la croissance des bactéries est ici **2 µg/mL**. Ainsi, l'utilisation de 0,1 µmol/L de *trans* (NO,OH)-[RuTCC2F(Cl)(OH)(NO)]⁺ irradié en présence des bactéries permet de réduire la CMI en méthicilline de **500 µg/mL** à **2 µg/mL**, la chute de la CMI étant donc dans ce cas de **2,4 log**.

VI. 4. 2- Effet bactéricide de NO[•] libéré par irradiation de *trans* (NO,OH)-[RuTCC3F(Cl)(OH)(NO)]PF₆

Un troisième complexe est étudié pour ses propriétés bactéricides. Sa structure est représentée sur la **Figure VI-25**.

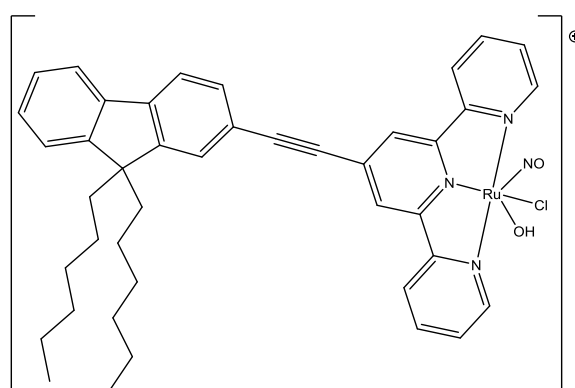


Figure VI-25 : Structure du complexe *trans* (NO,OH)-[RuTCC3F(Cl)(OH)(NO)]⁺

De nouveau, une expérimentation permettant de mesurer la CMI de la méthicilline après traitement des bactéries par le complexe *trans* (NO,OH)-[RuTCC3F(Cl)(OH)(NO)]PF₆ et 10 minutes d'irradiation est menée.

La **Figure VI-26** rassemble les courbes de croissance des bactéries préalablement mises en présence de *trans* (NO,OH)-[RuTCC3F(Cl)(OH)(NO)]PF₆, irradiées et traitées par différentes concentrations de méthicilline.

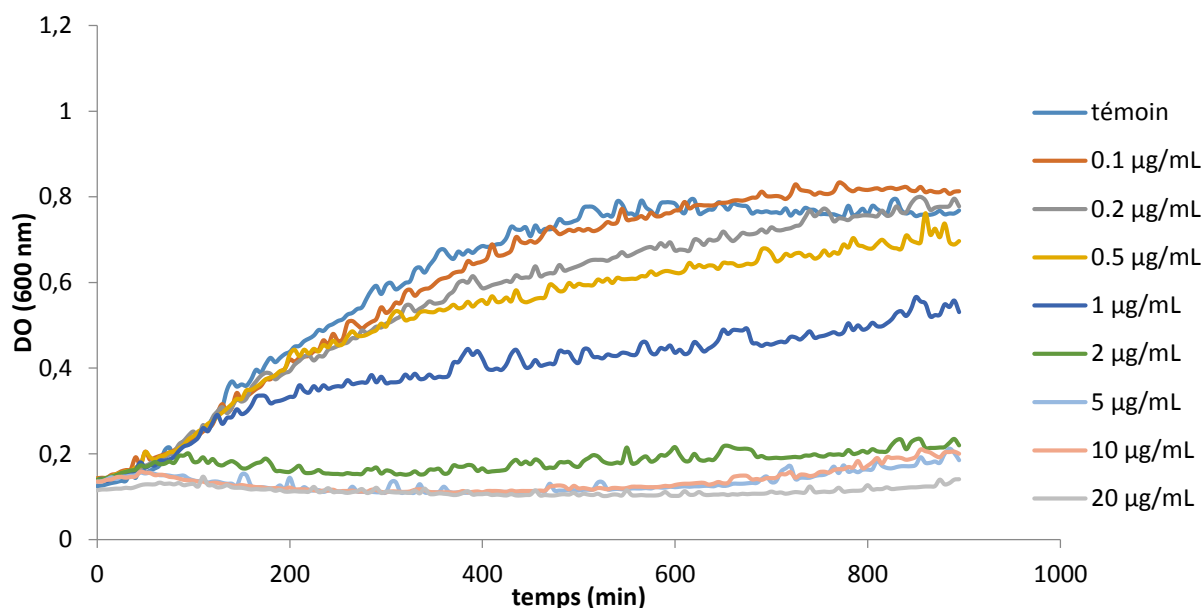


Figure VI-26 : Courbes de croissance de la souche ATCC 35984 dans le LB après traitement par 0,1 µM de *trans* (NO,OH)-[RuTCC3F(Cl)(OH)(NO)]⁺ et irradiation en combinaison avec différentes concentrations de méthicilline

Les courbes de croissance en conditions témoin sont suivies comme pour les cas précédents, mais ne sont pas présentées. Le complexe sans irradiation, avec ou sans méthicilline (100 µg/mL) n'entraîne pas de chute de la DO. Les bactéries, sous irradiation, en présence ou non de méthicilline (100 µg/mL) ne voient pas leur courbe de croissance changer par rapport au témoin.

La DO à 900 minutes des bactéries montre également que la concentration croissante en méthicilline fait chuter la viabilité des bactéries. Avec ce traitement, la croissance des bactéries est inhibée dès l'utilisation de **2 µg/mL** de méthicilline.

Comme pour le *trans* (NO,OH)-[RuTCC2F(Cl)(OH)(NO)]⁺, avec le *trans* (NO,OH)-[RuTCC3F(Cl)(OH)(NO)]⁺ irradié en présence des bactéries, la CMI en méthicilline passe de **500 µg/mL** à **2 µg/mL**. La chute de la CMI est donc également de **2,4 log**.

VI. 4. 3- Effet bactéricide de NO' libéré par irradiation de *trans* (NO,OH)-[RuFFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆

Enfin, le quatrième complexe de l'étude est représenté sur la **Figure VI-27**.

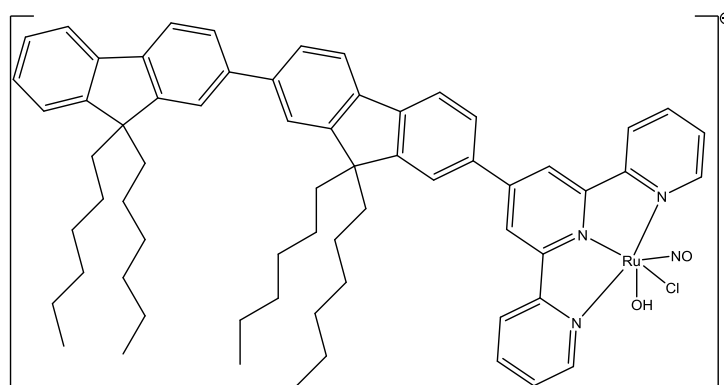


Figure VI-27 : Structure du complexe *trans* (NO,OH)-[RuFFT(Cl)(OH)(NO)]⁺

Une étude de la CMI de la méthicilline est ensuite faite avec l'utilisation d'un dernier complexe de ruthénium à ligand nitrosyle.

Ce complexe, *trans* (NO,OH)-[RuFFT(Cl)(OH)(NO)]⁺, présente un rendement quantique plus proche de celui du *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]⁺ que pour les deux derniers complexes étudiés, mais toujours inférieur.

Les courbes de croissance obtenues en présence de différentes concentrations de méthicilline sont présentées ci-dessous (**Figure VI-28**).

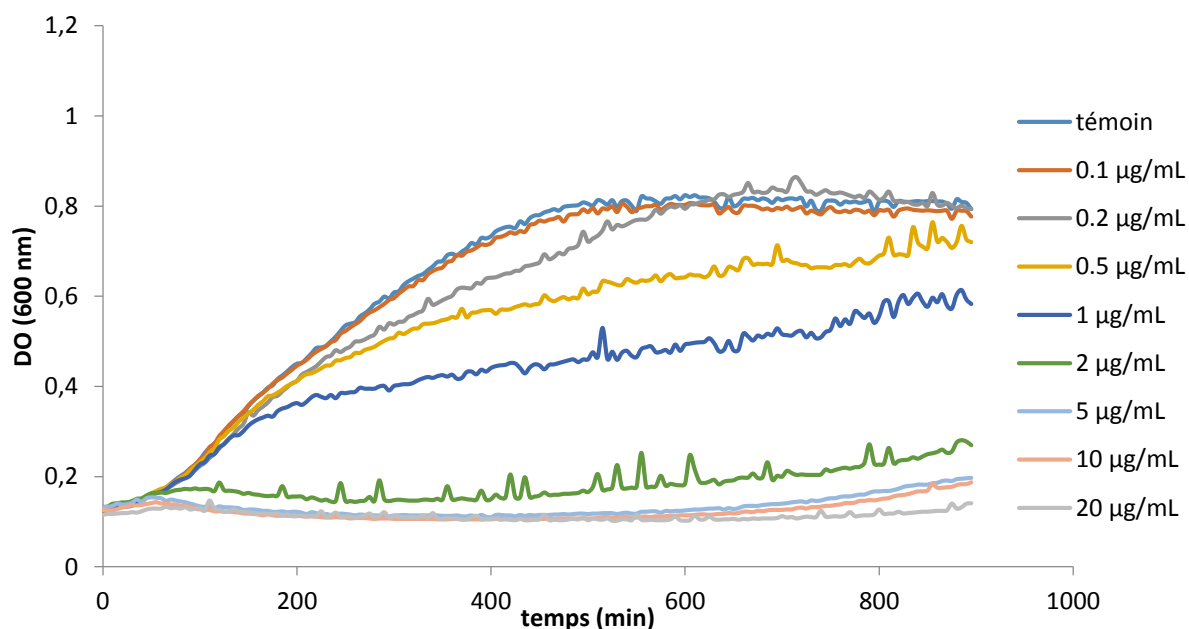


Figure VI-28 : Courbes de croissance de la souche ATCC 35984 dans le LB après traitement par 0,1 μM de *trans* (NO,OH)-[RuFFT(Cl)(OH)(NO)]⁺ et irradiation en combinaison avec différentes concentrations de méthicilline

Comme pour les précédents systèmes étudiés, ce complexe sans irradiation, avec ou sans méthicilline (100 µg/mL), n'a pas d'influence sur la croissance des bactéries. Leur croissance n'est pas non plus perturbée sous irradiation, avec ou sans méthicilline (100 µg/mL) par rapport au témoin.

Avec ce quatrième complexe, une concentration de **2 µg/mL** de méthicilline suffit pour inhiber la croissance de la souche ATCC 35984. La CMI en méthicilline diminue donc aussi de **500 µg/mL** à **2 µg/mL**, ce qui correspond à **2,4 log**.

VI. 4. 4- Conclusion

On remarque que le traitement des bactéries par ces nouveaux complexes entraîne une chute de la CMI légèrement plus importante que celle engendrée par l'utilisation du complexe précédent *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]⁺, c'est-à-dire **2,4 log** de diminution contre **2 log** pour le précédent.

Le point commun des trois derniers complexes testés est la présence de chaînes hexyles sur le(s) fluorène(s), contrairement au *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]⁺. Ceci semble entraîner une baisse du rendement quantique dans l'eau, peut-être à cause d'une moins bonne solubilité (non observée à l'œil nu), mais l'efficacité bactéricide est meilleure. L'ajout de ces longues chaînes carbonées fait augmenter la lipophilie des complexes et par conséquent, l'interaction avec les membranes lipidiques des bactéries est facilitée.²³⁷

D'après le calcul des rendements quantiques des complexes dans l'eau, le *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ devrait être le système entraînant la diminution de CMI la plus importante, or ce n'est pas le cas. Donc la différence de 0,4 log de diminution de la CMI qui a été observée entre ce complexe et ses homologues est due au caractère plus lipophile apporté par les chaînes hexyles.

VI. 5. Conclusion

Dans une première partie, l'observation et la caractérisation de la souche *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 ont permis de mettre en évidence l'existence de cette souche sous une forme d'agrégats planctoniques, forme intermédiaire dans la formation de biofilms. Ces agrégats planctoniques partagent de nombreux points communs avec les biofilms, sauf leur activité métabolique plus élevée et leur non-adhérence à un support. Ce sont sur ces systèmes, résistants à la méthicilline, que les donneurs de NO[•] synthétisés ont été testés.

Les complexes de ruthénium à ligand nitrosyle sont des systèmes capables de libérer NO[•] dans des solvants organiques mais aussi dans l'eau, sous irradiation à un et deux photons. Ainsi, dans une seconde partie, l'effet bactéricide du complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ irradié a été étudié sur une souche résistance à la méthicilline et formant des agrégats planctoniques. Il a montré un caractère bactéricide avec environ 50 % de mortalité observé pour une faible concentration de 0,1 µmol/L (soit 74 µg/mL).

Lors de son utilisation combinée avec la méthicilline, la résistance de la souche ATCC 35984 est levée puisque la CMI de la méthicilline est diminuée de 2 log, et de 2,4 log pour des complexes présentant une hydrophobicité plus importante. Une concentration de 5 µg/mL suffit pour inhiber la croissance des bactéries de la souche non résistance ATCC 12228, mais aussi, avec ce traitement combiné, de la souche ATCC 35984. Ces résultats sont particulièrement prometteurs quant à la perspective du développement d'une thérapie antimicrobienne.

Les avantages de la photothérapie antimicrobienne (aPDT) ou Inactivation Photodynamique (PDI) sont nombreux. D'abord, l'utilisation de systèmes photoactivables donneurs de NO[•] permet de traiter une zone d'infection ou une plaie bien définies. Par exemple, lors d'une opération chirurgicale pour la mise en place d'un dispositif médical, la zone pourra être traitée par des complexes comme le *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆, irradié et ceci combiné à l'administration d'un antibiotique (locale ou par voie orale). Ainsi la zone sera protégée et cela préviendra le risque de développement d'un biofilm et d'une infection.

Le donneur de NO[•] devra être appliqué de façon locale sur la plaie, par instillation, injection interstitielle ou par aérosol, avant d'être irradié préférentiellement dans le proche infrarouge. Cette technique est non invasive et l'irradiation à deux photons permet d'éviter les brûlures des tissus environnants, avec une profondeur de pénétration et une précision importantes. Ceci constitue un point fort puisque souvent, les infections nosocomiales requièrent l'ablation du dispositif médical ou une intervention chirurgicale pour drainer un abcès.²³⁸

La première perspective de travail consiste en l'étude des propriétés bactéricides de ces systèmes sur des biofilms de staphylocoques (*S. epidermidis* et *S. aureus*), qui pousseront en adhérant à un support. Le traitement combiné avec des antibiotiques sera très intéressant à tester sur ces communautés plus complexes ainsi que sur des bactéries à Gram – telles qu'*Escherichia coli* ou *Pseudomonas aeruginosa*.

La seconde perspective est l'irradiation à deux photons des complexes donneurs de NO[•]. D'un point de vue photochimique, la capacité de photolibération de NO[•] sous irradiation à deux photons a été montrée pour les complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)- [RuFTCl₂NO]PF₆ dans le Chapitre II. L'étude de l'effet sur les bactéries *in vitro* constitue la prochaine étape de cette étude.

CONCLUSION GÉNÉRALE

ET PERSPECTIVES

Conclusion générale

Les recherches bibliographiques réalisées dans le premier chapitre de cette thèse de doctorat ont permis de mettre en évidence l'intérêt de la libération d'une dose contrôlée de NO[•] de façon localisée pour des applications en chimiothérapie photoactivée et en inactivation photodynamique. Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont eu pour objectifs de développer la synthèse de nouveaux complexes de ruthénium à ligand nitrosyle possédant des propriétés d'absorption à deux photons, la mesure de leur efficacité de photolibération de NO[•] ainsi que l'application de ces systèmes en biologie pour le traitement de cellules cancéreuses et de bactéries présentant une antibiorésistance.

Dans le deuxième chapitre, trois complexes à ligand 4'-(2-fluorényl)-2,2':6',2''-terpyridine (FT) ont été synthétisés : *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ et [RuFT(bpy)NO](PF₆)₃. Leur capacité de photolibération de NO[•] a été mise en évidence par résonance paramagnétique électronique (RPE) dans l'acétonitrile. Le même photoproduit *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂(CH₃CN)]PF₆ a été obtenu après photolyse des complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ dans l'acétonitrile. Les rendements quantiques de NO[•] dans l'acétonitrile des trois complexes ont été mesurés à trois longueurs d'onde d'irradiation (365, 405 et 420 nm). Le plus efficace est le *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆, suivi du *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ et le moins efficace est le [RuFTbpyNO](PF₆)₃. Les complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ ont également été excités à 810 nm et la preuve directe de la photolibération de NO[•] sous excitation à deux photons a été apportée par RPE.

Dans le troisième chapitre, les complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ ont été étudiés en milieu aqueux. La transformation de ces complexes en une espèce commune a pu être mise en évidence grâce à diverses techniques analytiques incluant l'obtention d'une structure cristallographique. Les deux isomères se transforment en *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆, stable dans l'eau et les milieux biologiques. La libération de NO[•] par l'irradiation de ce complexe dans l'eau a été suivie par RPE et à l'aide d'une électrode spécifique. Le rendement quantique de NO[•] de ce complexe a été mesuré dans l'eau à deux longueurs d'onde (0,020 à 420 nm et 0,040 à 365 nm) et les valeurs sont

supérieures à celles obtenues pour les complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)- dont il est issu (respectivement 0,014 et 0,002 à 420 nm).

Dans le quatrième chapitre, de nouveaux complexes possédant les ligands 4'-(2-(9,9-dihexyl-9H-fluorényl)vinyl)-2,2':6',2''-terpyridine (TCC2F), 4'-(2-(9,9-dihexyl-9H-fluorén-2-yl)éthynyl)-2,2':6',2''-terpyridine (TCC3F) et 4'-(9,9,9',9'-tétrahexyl-9H,9'H-[2,2'-bifluorèn]-7-yl)-2,2':6',2''-terpyridine (FFT) ont été synthétisés dans le but d'augmenter la délocalisation électronique sur le ligand. Les rendements quantiques de NO[•] ainsi que les sections efficaces d'absorption à deux photons ont été mesurés dans l'acétonitrile. L'augmentation de la délocalisation électronique sur le ligand 2,2':6',2''-terpyridine permet une augmentation du transfert de charge dans le complexe et donc une amélioration des propriétés d'absorption à deux photons des complexes, tout en conservant leur efficacité de photolibération de NO[•]. En milieu aqueux, l'ensemble de ces complexes subit une substitution de ligand et les rendements quantiques de NO[•] des complexes *trans* (NO,OH)-[RuTCC2F(Cl)(OH)(NO)]PF₆, *trans* (NO,OH)-[RuTCC3F(Cl)(OH)(NO)]PF₆ et *trans* (NO,OH)-[RuFFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ ont été mesurés dans l'eau. Le complexe le plus efficace dans l'eau est le *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ avec un rendement quantique de 0,040 à 365 nm.

Le cinquième chapitre s'est intéressé à l'étude de l'effet du complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ sur les cellules cancéreuses HCT 116 et FaDu. Deux tests de viabilité ont permis de vérifier que le complexe ne présente aucune cytotoxicité sur les deux lignées dans l'obscurité. Malgré l'effet toxique intrinsèque de l'irradiation, un léger effet supplémentaire a été mis en évidence en présence de 5 μM de complexe : une chute d'environ 25 % par rapport au témoin irradié est observée pour les deux lignées. Ces résultats sont encourageants et suggèrent que la combinaison de l'irradiation et de ces complexes constitue une voie de recherche intéressante pour le traitement des cancers.

Dans le sixième chapitre de ce mémoire de thèse, deux souches de *Staphylococcus epidermidis* ont été choisies pour leurs caractéristiques propres : la souche ATCC 35984 est résistante à la méthicilline et est capable de former des agrégats et des biofilms au contraire de la souche ATCC 12228, qui est susceptible aux antibiotiques et ne forme pas d'agrégats. Les bactéries des deux souches ont été caractérisées par AFM à l'état planctonique et la présence d'une matrice extracellulaire est visible pour la souche résistante. Le complexe *trans*

(NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ a été testé sur ces deux souches et ne présente pas de toxicité sans irradiation. Au contraire, l'utilisation de 0,1 µM de complexe et l'irradiation des bactéries traitées font chuter la viabilité des deux souches d'environ 50 %. La combinaison de ce donneur de NO• avec la méthicilline a ensuite été étudiée. Après traitement des bactéries par le complexe *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ et irradiation, les CMI de la méthicilline chutent d'un facteur 2,5 pour la souche ATCC 12228 et de 2 log pour la souche ATCC 35984. Cette étude démontre l'intérêt de ces systèmes donneurs de NO• pour rendre aux bactéries résistantes leur susceptibilité aux antibiotiques. Les complexes *trans* (NO,OH)-[RuTCC2F(Cl)(OH)(NO)]PF₆, *trans* (NO,OH)-[RuTCC3F(Cl)(OH)(NO)]PF₆ et *trans* (NO,OH)-[RuFFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ ont ensuite été testés. Ces trois nouveaux complexes entraînent une diminution de la CMI de la méthicilline de 2,4 log, ce qui en fait des candidats prometteurs dans la lutte contre la résistance bactérienne.

En résumé, dans ces travaux de thèse, plusieurs complexes de ruthénium à ligand nitrosyle ont été synthétisés. Leur capacité de libération de NO• sous irradiation a été mise en évidence et le rendement quantique, caractérisant l'efficacité de libération, a été mesuré pour chacun. Le comportement des complexes ainsi que leurs propriétés de photolibération ont ensuite été étudiés dans l'eau et dans un milieu biologique. L'effet de ces systèmes sous irradiation a ensuite été analysé pour des applications en photothérapie. L'utilisation des complexes de ruthénium à ligand nitrosyle est prometteuse pour le traitement de cellules cancéreuses et présente un immense potentiel contre l'antibiorésistance.

Perspectives

Dans ce mémoire de thèse, la synthèse et l'étude des capacités de photolibération de NO[•] de dix complexes de ruthénium à ligand nitrosyle ont été présentées. De nombreuses perspectives en chimie et en biologie sont envisageables pour approfondir et poursuivre ces travaux à plus ou moins long-terme.

La conception et la synthèse d'autres ligands pourrait permettre d'obtenir des complexes avec de meilleurs rendements quantiques de NO[•], de meilleures sections efficaces d'absorption à deux photons, tout en assurant la stabilité en milieu physiologique.

Premièrement, la stabilité du complexe et particulièrement du ligand nitrosyle peut être améliorée. Par exemple, le ligand nitrosyle du complexe [RuFT(bpy)NO](PF₆)₃, présenté dans le Chapitre II, réagit en condition basique pour donner un ligand nitro. Des travaux sur les complexes *cis*- et *trans*-[Ru(Bpy)₂(SO₃)(NO)]⁺ ont démontré que la coordination d'un ligand sulfite sur le ruthénium assure la stabilité du nitrosyle en présence d'ions hydroxyde entre pH 2,0 et 9,0. Ces complexes sont donc de bons candidats pour délivrer NO[•] *in vivo*. Le ligand 2,2'-bipyridine pourrait donc être à nouveau utilisé dans un complexe de ruthénium à ligand nitrosyle, tout en évitant la transformation acido-basique du ligand principal.²³⁹

La coordination de ligands pentadentes stables constitue un axe de recherche intéressant pour la photolibération de NO[•]. Les ligands étant multidentés et par conséquent très stables, le complexe de ruthénium ne présenterait qu'un ligand (photo-)réactif qui est le ligand nitrosyle.²⁴⁰

Une étude a récemment débuté sur l'utilisation de ce type de ligands dans l'équipe d'Isabelle Malfant au LCC. La fonctionnalisation des différents ligands pentadentes peut être envisagée afin d'augmenter le rendement quantique de libération de NO[•], mais aussi pour favoriser les propriétés d'absorption à deux photons de ces systèmes, en utilisant par exemple des groupements fluorène.

Pour les applications anticancéreuses, les résultats sont prometteurs mais de futures expérimentations sont nécessaires pour augmenter l'activité phototoxique des complexes. L'encapsulation de ces systèmes donneurs de NO[•] peut être envisagée. Des micelles de polymères²⁴¹ ou des nanotubes de carbone²⁴² sont souvent utilisés afin de protéger les molécules actives de l'environnement biologique jusqu'à la cible thérapeutique et faciliter leur internalisation par les cellules.

D'un point de vue microbiologique, de nombreuses perspectives sont envisageables.

Les complexes de ruthénium à ligand nitrosyle présentés dans ces travaux ont montré une phototoxicité sur des agrégats planctoniques de *S. epidermidis* et une levée de la résistance à la méthicilline de la souche ATCC 35984. Ces traitements peuvent être utilisés sur de nouvelles souches bactériennes comme *S. aureus* et *P. aeruginosa* afin d'étudier la levée de la résistance aux antibiotiques sur différents micro-organismes.

De plus, il serait intéressant de combiner les complexes de ruthénium à ligand nitrosyle avec d'autres antibiotiques pour lesquels il existe une résistance (comme la vancomycine pour laquelle *S. aureus* développe une résistance). Cela apporterait des informations sur l'action des complexes et de NO[•] dans la levée de la résistance.²⁴³

Les infections les plus répandues sont dues à la présence de biofilms bactériens. Ainsi, les propriétés de ces complexes photoréactifs doivent être testées sur des biofilms bactériens matures, adhérents à des supports, afin d'évaluer leur efficacité sur ces systèmes biologiques. Parmi ces infections courantes, un nombre important est dû au développement de biofilms sur des dispositifs médicaux comme les prothèses ou les cathéters. Il peut être envisagé que les complexes de ruthénium à ligand nitrosyle soient utilisés dans des hydrogels qui permettraient ainsi de prétraiter les surfaces à risques et ainsi prévenir ce genre d'infections.¹⁶⁸

Les bactéries planctoniques et les biofilms ainsi traités pourraient ensuite être observés par AFM (Microscopie à Force Atomique) ou TEM (Microscopie Electronique en Transmission) afin de mettre en évidence les dommages causés sur les parois ou la matrice extracellulaire par le monoxyde d'azote libéré par les complexes de ruthénium à ligand nitrosyle sous irradiation. Ces observations ainsi que la levée de la résistance d'une souche comme *S. aureus* à plusieurs antibiotiques pourraient permettre de proposer un mécanisme d'action à plus long terme.

De plus, les complexes de ruthénium à ligand nitrosyle ayant montré leur capacité d'absorption à deux photons, des cellules cancéreuses et des bactéries en biofilms traitées par ces complexes photoréactifs peuvent être irradiées en biphotonique *in vitro*. Après optimisation des conditions, le traitement de tumeurs et d'infections bactériennes chez le petit animal pourra être envisagé.

ANNEXES

Annexe 1 :
Produits chimiques et équipements

Liste des produits chimiques et des solvants :

2-acétylpyridine, C₇H₇NO, Alfa-Aesar, cas : 1122-62-9
fluorène-2-carboxaldéhyde, C₁₄H₁₀O, Alfa-Aesar, cas : 30084-90-3
diiodure, I₂, Sigma-Aldrich, cas : 7553-56-2
chlorure de ruthénium, RuCl₃.xH₂O, Strem Chemicals, cas : 14898-67-0
cuivre, Cu, Sigma-Aldrich, cas : 7440-50-8
2,2'-bipyridine, C₁₀H₈N₂, TCI, cas : 366-18-7
acide nitrique (65%), HNO₃, VWR Chemicals, cas : 7697-37-2
triéthylamine (99%), C₆H₁₅N, Acros Organics, cas : 121-44-8
nitrite de sodium, NaNO₂, Fluka, cas : 7632-00-0
acide chlorhydrique, HCl (37%), VWR Chemicals, cas : 7647-01-0
hydroxyde de sodium, NaOH, Fluka, cas : 1310-73-2
acétate d'ammonium, C₂H₇NO₂, Alfa-Aesar, cas : 631-61-8
hexafluorophosphate d'ammonium, NH₄PF₆, Alfa-Aesar, cas : 16941-11-0
chlorure de lithium, LiCl, Acros, cas : 7447-41-8
charbon actif, Sigma, cas : 7440-44-0
pyridine, C₅H₅N, Prolabo, cas : 110-86-1
éther diéthylique, C₄H₁₀O, VWR Chemicals, cas : 60-29-7
éthanol absolu, C₂H₆O, Honeywell, cas : 64-17-5
méthanol, CH₄O, HoneyWell, cas : 67-56-1
pentane, C₅H₁₂, VWR Chemicals, cas : 109-66-0
acétate d'éthyle, C₄H₈O₂, Sigma, cas : 141-78-6
acétonitrile, C₂H₃N, VWR Chemicals, cas : 75-05-8
diméthylsulfoxyde, C₂H₆OS, VWR Chemicals, cas : 67-68-5
diméthylformamide, C₃H₇NO, Sigma-Aldrich, cas : 68-12-2
acétonitrile deutéré, CD₃CN, Sigma-Aldrich, cas : 2206-26-0
chloroforme deutéré, CDCl₃, Sigma-Aldrich, cas : 865-49-6
diméthylsulfoxyde deutéré, C₂D₆OS, Sigma-Aldrich, cas : 2206-27-1

Les solvants et les produits chimiques ont été utilisés en synthèse sans purification supplémentaire.

Equipements :

Résonance Magnétique Nucléaire

Les analyses RMN ont été réalisées sur les spectromètres Bruker Avance 300 (300 MHz) et 400 (400 MHz) au LCC. Les spectres ont été enregistrés dans les solvants deutérés CDCl_3 et CD_3CN .

Les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm, et les constantes de couplage J en hertz (Hz). Des abréviations sont utilisées pour indiquer la multiplicité des signaux : s-singulet, se-singulet élargi, d-doublet, t-triplet, q-quadruplet, dd-doublet dédoublé, td-triplet dédoublé, ddd-doublet dédoublé dédoublé.

Spectroscopie infrarouge

Les analyses infrarouge des complexes ont été réalisées par IR ATR (Attenuated Total Reflectance), sur cristal de diamant, sur le Spectromètre Perkin Elmer FT-IR/FIR Frontier.

Spectroscopie d'absorption UV-Vis

Les spectres d'absorption en spectroscopie UV-Vis ont été réalisés par un spectrophotomètre en transmission UV-Vis Lambda 35 de chez Perkin Elmer Instruments et sur un spectrophotomètre à barrette de diodes Analytik Jenia Specord S600 pour les suivis au cours du temps.

Diffraction des rayons X

Les analyses par diffraction des rayons X sur les monocristaux obtenus ont été réalisées par Sonia Mallet-Ladeira au service de DRX du LCC. L'appareil utilisé est un diffractomètre Bruker Kappa Apex II. Les mesures sont faites à basse température (100 K) et les structures sont résolues à l'aide du logiciel SHELXS-97.

Microanalyse élémentaire

Les analyses élémentaires ont été faites par Isabelle Borget du service de microanalyse du LCC. L'appareil utilisé est un analyseur Perkin Elmer 2400 Série II.

Spectrométrie de masse

Les analyses de spectrométrie de masse ont été réalisées sur le spectromètre ThermoScientific LCQ Fleet, soit par injection directe par Viviane Peyrou, soit à l'aide d'un passeur. Le passeur est inclus dans une chaîne de chromatographie liquide ThermoScientific Dionex UltiMate 3000, comprenant également une pompe, un compartiment pour une colonne et un détecteur UV-Vis à barrette de diodes.

Purification par Chromatographie préparative

Les séparations des isomères *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)- des différents complexes ont été réalisées par Isabelle Fabing du service HPLC de l'ICT (Institut de Chimie de Toulouse). Des analyses UPLC-MS ont été menées afin de mettre au point les conditions de séparation. Ensuite les purifications ont été réalisées sur une Chaîne Auto Purif Waters, munie d'un détecteur UV à barrette de diodes.

Résonance Paramagnétique Electronique sous irradiation

Les analyses RPE ont été faites par Lionel Rechinat au service de mesures magnétiques du LCC. L'appareillage utilisé est un Bruker elexsys E500 en bande X et une cavité haute sensibilité 4122SHQE.

Irradiation monophotonique

Les irradiations pour les analyses RPE et pour les expérimentations biologiques ont été réalisées à l'aide d'une lampe à vapeur de mercure Oriel 250W (Palaiseau, France) munie d'un filtre $\lambda > 400$ nm (Oriel WG UV filter, Palaiseau, France).

Irradiation biphotonique

Les expérimentations d'irradiation à deux photons ont été réalisées à l'aide du laser pulsé Chameleon Ultra II Ti-saphire du microscope à fluorescence 7MP de la plateforme Imagerie TRI de l'IPBS. Le laser est paramétré à 810 nm et sa fréquence est de 80 MHz, pour des pulses d'une durée de 140 fs.

Mesures photocinétiques

Les expérimentations de photocinétique permettant la mesure des rendements quantiques de NO[•] ont été menées au laboratoire IMRCP (Interactions Moléculaires et Réactivités Chimiques et Photochimiques). L'irradiation provient d'une lanterne à LEDs (WLS-22-A de

Mightex), équipée de LEDs de longueurs d'onde monochromatiques 365 nm (de puissance 2 W) et 420 nm (de puissance 3 W) (références : WLS-LED-0365-2 et WLS-LED-0420-3). L'irradiation à 405 nm provient, quant à elle, d'une lampe à vapeur de mercure équipée d'un filtre monochromatique. Une fibre optique dirige le faisceau depuis ces systèmes d'irradiation vers le côté d'une cuve en quartz aux quatre faces polies, maintenue sous agitation. Les spectres d'absorbance sont enregistrés par un spectrophotomètre Hewlett Packard HP8452A, piloté par le logiciel Olis Globalworks.

Electrode NO

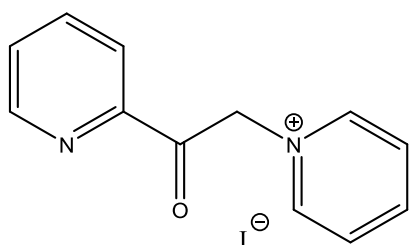
La concentration de NO[•] en solution aqueuse a été mesurée par une électrode spécifique AmiNO-700 de chez Innovative Instruments Inc. Le signal est exploité par le logiciel inNO 5.2.

Annexe 2 :

Synthèse et caractérisations des complexes de ruthénium à ligand nitrosyle

1. Synthèse du ligand 4'-(2-fluorényl)-2,2':6',2''-terpyridine (ligand FT)¹⁰⁷

Le ligand 4'-(2-fluorényl)-2,2':6',2''-terpyridine est synthétisé en suivant la méthode de Kröhnke. Le sel de Kröhnke est d'abord obtenu selon le protocole de synthèse décrit dans la littérature.¹⁷⁷

1. a) Synthèse du sel de Kröhnke ou iodure de 1-(2-pyridinylcarbonyl)pyridinium

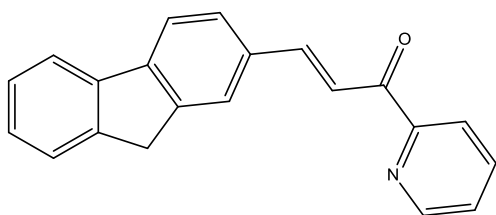
Chemical Formula: C₁₂H₁₁IN₂O
Molecular Weight: 326.14

Une solution de diiode (10,2 g, 40 mmol) dans 30 mL de pyridine est ajoutée à une solution d'acétylpyridine (4,5 mL, 40 mmol) dans 10 mL de pyridine. Le milieu réactionnel est chauffé à 100°C pendant 3h. Le lendemain, le produit brut est récupéré par filtration, rincé à l'éther diéthylique puis recristallisé dans 210 mL d'éthanol en présence de charbon

actif. Le mélange est filtré à chaud et des cristaux beiges sont obtenus.

(5,92 g, rendement : 46 %).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆, 298 K) : δ (ppm) 9,01 (2H, d, J= 6,0 Hz), 8,88 (1H, d, J=4,5 Hz), 8,73 (1H, t, J=7,9 Hz), 8,28 (2H, t, J=7,1 Hz), 8,14 (1H, td, J= 1,8 Hz, 7,9 Hz), 8,08 (1H, d, J=7,6 Hz), 7,84 (1H, ddd, J=1,8, 5,0 et 7,8 Hz), 6,51 (2H, s).

1. b) Synthèse de la 3-(4-fluorène)-1-(pyridin-2-yl)prop-2-èn-1-one

Chemical Formula: C₂₁H₁₅NO
Molecular Weight: 297.36

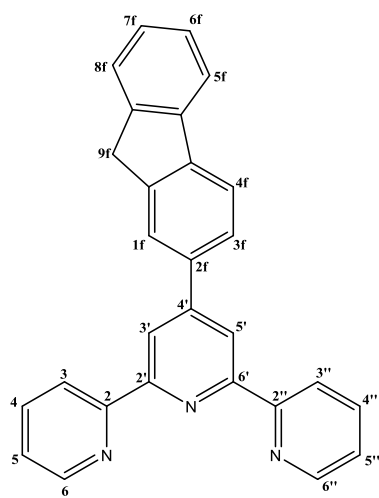
Une solution de NaOH (1M, 11mL) est ajoutée à l'acétylpyridine (0,22 mL , 2,0 mmol) dans 20 mL de méthanol. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 1h. Le fluorène-2-carboxaldéhyde (0,40 g, 2,0 mmol) est ensuite ajouté

et le milieu devient jaune vif. Il est agité à température ambiante pendant 12h. Le produit est

récupéré par filtration et rincé avec très peu de méthanol pour donner une poudre jaune (0,509g, rendement : 86 %)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, 298 K) : δ (ppm) 8,79 (1H, d, *J*=4,7 Hz), 8,38 (1H, d, *J*= 16,0 Hz), 8,22, (1H, d, *J*= 4,8 Hz), 8,06 (1H, d, *J*= 16,0 Hz), 7,97 (1H, s), 7,91 (1H, td, *J*=7,6 Hz, 1,7 Hz), 7,84 (2H, d, *J*=7,8 Hz), 7,79 (1H, d, *J*=8,4 Hz), 7,60 (1H, d, *J*= 7,6 Hz), 7,52 (1H, ddd, *J*=7,4 Hz, 4,8 Hz, 1,2 Hz), 7,43 (1H, t, *J*=7,6 Hz), 7,38 (1H, td, *J*= 1,5 Hz, 7,8 Hz), 3,98 (2H, s).

1.c) Synthèse du ligand 4'-(2-fluorényl)-2,2':6',2''-terpyridine



Chemical Formula: C₂₈H₁₉N₃

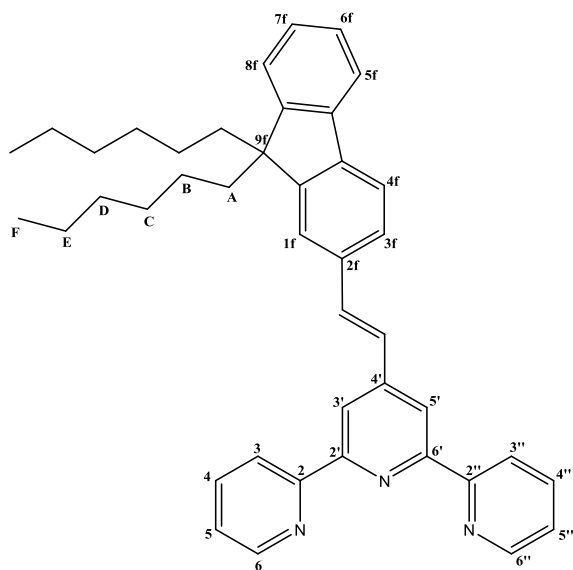
Molecular Weight: 397.48

L'énone-fluorène (509 mg, 1,7 mmol), le sel de Kröhnke (554 mg, 1,7 mmol) et l'acétate d'ammonium (1,6 g, 20 mmol) sont dissous dans 10 mL d'éthanol. Le mélange est chauffé au reflux pendant 16h. La solution passe du jaune au marron et un précipité se forme. Le produit est récupéré par filtration et est rincé à l'eau. Il est ensuite purifié par chromatographie flash sur colonne de silice avec comme éluant un mélange 4/1 pentane/acétate d'éthyle, avec 3% de triéthylamine.

(solide beige, 0,263 g, rendement : 41 %).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, 298 K) : δ (ppm) 8,83 (2H, s, H3' et H5'), 8,78 (2H, ddd, *J*=4,8 Hz, 1,8 Hz, 0,9 Hz, H6 et H6''), 8,72 (2H, dt, *J*=8,0 Hz, 1,1 Hz, H3 et H3''), 8,14 (1H, s, H1f), 7,93-7,90 (4H, m, H4, H4'', H3f et H4f), 7,87 (1H, d, *J*=7,6 Hz, H5f), 7,62 (1H, d, *J*=7,3 Hz, H8f), 7,46 (1H, t, *J*=7,2 Hz, H7f), 7,41-7,35 (3H, m, H5, H5'' et H6f), 4,04 (2H,s, H9f).

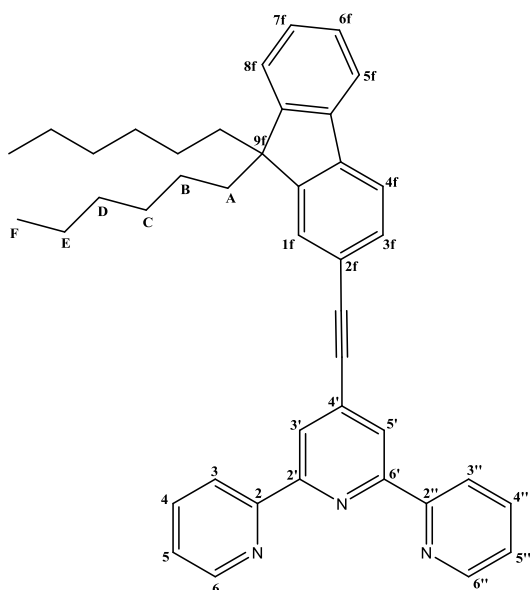
2. Caractérisation du ligand (E)-4'-(2-(9,9-dihexyl-9H-fluorényl)vinyl)-2,2':6',2''-terpyridine (ligand TCC2F)



Chemical Formula: $C_{42}H_{45}N_3$
Molecular Weight: 591.84

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$, 298 K) : δ (ppm)
8,77 (2H, d, $J= 4,7$ Hz, H6 et H6''), 8,69 (2H, d, $J= 8,0$ Hz, H3 et H3''), 8,64 (2H, s, H3' et H5'), 7,91 (2H, td, $J= 7,6$ Hz, 1,9 Hz, H4 et H4''), 7,78-7,68 (3H, m, H3f, H4f et $H_{C=C}$), 7,63-7,56 (2H, m, H1f et $H_{C=C}$), 7,41-7,30 (6H, m, H5, H5'', H5f, H6f, H7f et H8f), 2,07-1,97 (4H, m, H_A), 1,19-1,02 (12H, m, H_B , H_D , H_E), 0,78 (6H, t, $J=6,7$ Hz, H_F), 0,75-0,60 (4H, m, H_C).

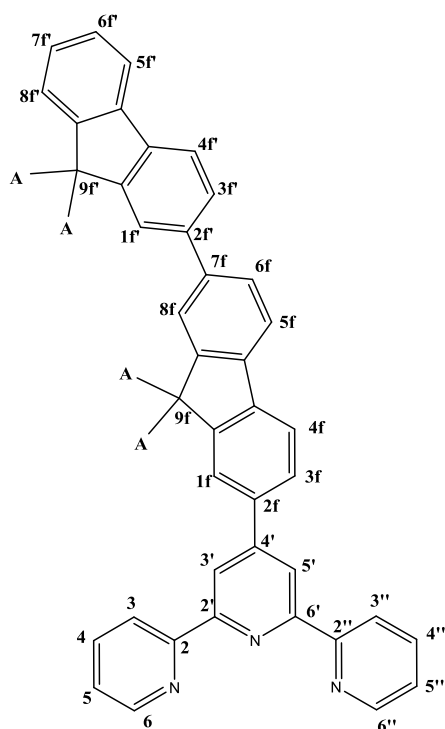
3. Caractérisation du ligand 4'-(2-(9,9-dihexyl-9H-fluorén-2-yl)éthynyl)-2,2':6',2''-terpyridine (ligand TCC3F)



Chemical Formula: $C_{42}H_{43}N_3$
Molecular Weight: 589.83

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$, 298 K) : δ (ppm)
8,76 (2H, ddd, $J= 4,8$ Hz, 1,8 Hz, 0,9 Hz, H6 et H6''), 8,67 (2H, dt, $J= 7,9$ Hz, 1,0 Hz, H3 et H3''), 8,65 (2H, s, H3' et H5'), 7,91 (2H, td, $J= 7,8$ Hz, 1,8 Hz, H4 et H4''), 7,76-7,71 (2H, m, H3f et H4f), 7,61-7,56 (2H, m, H1f et H5f), 7,41-7,34 (5H, m, H5, H5'', H6f, H7f et H8f), 2,04-1,98 (4H, m, H_A), 1,18-1,02 (12H, m, H_B , H_D , H_E), 0,80 (6H, t, $J= 6,9$ Hz, H_F), 0,72-0,60 (4H, m, H_C).

4. Caractérisation du ligand 4'-(9,9,9',9'-tétraméthyl-9*H*,9'*H*-[2,2'-bifluorèn]-7-yl)-2,2':6',2''-terpyridine (ligand F_{Me}F_{Me}T)



Chemical Formula: C₄₅H₃₅N₃
Molecular Weight: 617.80

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, 298 K) : δ (ppm) 8,89 (2H, s, H3' et H5'), 8,82 (2H, d, *J*= 4,4 Hz, H6 et H6'), 8,76 (2H, d, *J*= 8,0 Hz, H3 et H3''), 7,99 (2H, t, *J*= 8,0 Hz, H4 et H4''), 7,94-7,66 (9H, m), 7,52-7,32 (6H, m), 1,61 (6H, s, H_A)

5. Synthèse des complexes [RuL₃Cl₃]

Dans un ballon monocol, le ligand tridenté L₃ (0,66 mmol) est dissous dans 50 mL d'éthanol absolu. RuCl₃.3H₂O (0,263 mg, 0,66 mmol) est ajouté et le mélange est chauffé au reflux 3h à l'abri de la lumière. Le milieu est plongé dans un bain de glace pour favoriser l'apparition du précipité et celui-ci est filtré sous vide, rincé à l'eau et avec un peu d'éther diéthylique. Le produit obtenu est une poudre noire. Les rendements obtenus pour cette étape sont rassemblés dans le **Tableau 2-1**.

Tableau 2-1 : Rendement de la complexation pour les différents complexes [RuL₃Cl₃]

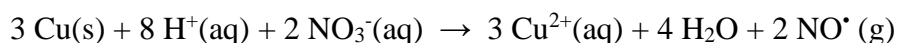
| complexe | rendement de la complexation |
|---|------------------------------|
| [RuFTCl ₃] | 95 % |
| [RuTCC2FCl ₃] | 93 % |
| [RuTCC3FCl ₃] | 78 % |
| [RuF _{Me} F _{Me} TCl ₃] | 95 % |

Ces intermédiaires étant paramagnétiques (Ru^{III}), ils n'ont pas pu être caractérisés par RMN. Un suivi en CCM (éluant : pentane/acétate d'éthyle 9/1) et en spectrométrie de masse a permis de vérifier que la totalité du ligand a été complexée.

6. Synthèse des complexes [RuL₃Cl₂NO]PF₆¹²¹

Le complexe [RuL₃Cl₂NO]Cl est obtenu par bullage de NO[•] dans une solution de [RuL₃Cl₃] dans le DMF.

Le NO[•] est obtenu *in situ* par la réaction d'oxydoréduction entre l'acide nitrique HNO₃ et le cuivre Cu(s) selon :



Pour éviter l'oxydation de NO[•] en NO₂ par l'oxygène, le montage est d'abord placé sous atmosphère inerte par bullage d'argon pendant 45 minutes.

Une solution diluée d'HNO₃ (7 mol/L, 100 mL) est ajoutée goutte à goutte à l'aide d'une ampoule de coulée sur du cuivre solide (15 g) contenu dans un bicol. Ce bicol est placé dans un bain de glace afin d'éviter la transformation du NO[•] en NO₂ (g) car la réaction est exothermique. Le NO[•] formé passe dans une solution de NaOH (8 mol/L, obtenue par dissolution de 24 g de NaOH dans 75 mL d'eau) afin d'absorber les éventuels gaz NO_x provenant de l'oxydation de NO[•].

Le gaz formé est introduit dans une solution de [RuL₃Cl₃] (0,2 mmol) dans le DMF (15 mL) à 80°C, sous atmosphère inerte. Le bullage est arrêté après observation d'un changement de couleur du milieu réactionnel. Le montage est ensuite purgé à l'argon pendant 45 minutes.

Le montage est présenté à la **Figure I-51** p.70.

Dans le cas de la synthèse de $[\text{RuFTCl}_2\text{NO}]\text{Cl}$ et $[\text{RuFFTC}_2\text{NO}]\text{Cl}$, une fraction pure de l'isomère *trans* précipite dans le DMF et est récupérée par filtration.

L'autre partie du mélange réactionnel est évaporé sous vide et le mélange *cis/trans* est séparé par HPLC préparative. La séparation est réalisée par Isabelle Fabing du service HPLC de l'Institut de Chimie de Toulouse. La phase stationnaire est une colonne apolaire X Bridge C18 5 μm 19 mm x 150 mm. La phase mobile est un mélange d'acétonitrile avec 1 % d'acide trifluoroacétique (TFA) et d'eau avec 1 % de TFA, dont les proportions suivent un gradient d'élution, qui diffère selon les espèces.

Les rendements de l'étape de bullage, après séparation sont rassemblés dans le **Tableau 2-2**.

Tableau 2-2 : Rendement du bullage de NO^* pour les différents complexes $[\text{RuL}_3\text{Cl}_2\text{NO}]$

| complexe | rendement bullage |
|---|-------------------|
| <i>cis</i> (Cl,Cl)- $[\text{RuFTCl}_2\text{NO}]$ | 17 % |
| <i>trans</i> (Cl,Cl)- $[\text{RuFTCl}_2\text{NO}]$ | 65 % |
| <i>cis</i> (Cl,Cl)- $[\text{RuTCC}_2\text{FCl}_2\text{NO}]$ | 3 % |
| <i>trans</i> (Cl,Cl)- $[\text{RuTCC}_2\text{FCl}_2\text{NO}]$ | 9 % |
| <i>cis</i> (Cl,Cl)- $[\text{RuTCC}_3\text{FCl}_2\text{NO}]$ | 19 % |
| <i>trans</i> (Cl,Cl)- $[\text{RuTCC}_3\text{FCl}_2\text{NO}]$ | 66 % |
| <i>cis</i> (Cl,Cl)- $[\text{RuF}_{\text{Me}}\text{F}_{\text{Me}}\text{TCl}_2\text{NO}]$ | 3 % |
| <i>trans</i> (Cl,Cl)- $[\text{RuF}_{\text{Me}}\text{F}_{\text{Me}}\text{TCl}_2\text{NO}]$ | 49 % |

Les contre-ions Cl^- des complexes sont ensuite changés pour PF_6^- . Pour cela, les complexes sont solubilisés dans un minimum de DMF (0,16 mmol dans 10 mL de DMF) et une solution aqueuse contenant un large excès de NH_4PF_6 (environ 350 mg dans 30 mL d'eau) est ajoutée. Le solide formé est filtré sous vide, rincé à l'eau puis à l'éther.



RMN ^1H (300 MHz, CD_3CN , 298 K) : δ (ppm) 9,24 (2H, dd, $J = 5,5$ Hz, 1,01 Hz, H6 et H6''), 8,91 (2H, s, H3' et H5'), 8,79 (2H, d, $J = 8,2$ Hz, H3 et H3''), 8,53 (2H, td, $J = 7,9$ Hz, 1,5 Hz, H4 et H4''), 8,38 (1H, s, H1f), 8,19 (2H, d, $J = 8,0$ Hz, H3f et H4f), 8,06-7,97 (3H, m,

H5f, H5 et H5''), 7,72 (1H, d, $J=7,1$ Hz, H8f), 7,56-7,45 (2H, m, H6f et H7f), 4,17 (2H, s, H9f).

IR(ATR) : $\nu_{\text{NO}}=1894$ cm^{-1}

Spectrométrie de masse : $m/z=599,2$ [M^+]

***trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆**

RMN ¹H (300 MHz, CD₃CN, 298 K) : δ (ppm) 8,82 (2H, s, H3' et H5'), 8,81 (2H, dd, $J= 5,7$ Hz, 0,8 Hz, H6 et H6''), 8,73 (2H, d, $J= 8,0$ Hz, H3 et H3''), 8,43 (2H, td, $J= 8,0$ Hz, 1,4 Hz, H4 et H4''), 8,34 (1H, s, H1f), 8,17 (2H, m, H3f et H4f), 8,03 (1H, d, $J= 7,1$ Hz, H5f), 7,90 (2H, ddd, $J= 7,7$ Hz, 5,7 Hz, 1,4 Hz, H5 et H5''), 7,72 (1H, d, $J= 7,2$ Hz, H8f), 7,53-7,47 (2H, m, H6f et H7f), 4,15 (2H, s, H9f).

IR(ATR) : $\nu_{\text{NO}}=1903$ cm^{-1}

Spectrométrie de masse : $m/z=599,2$ [M^+]

***cis* (Cl,Cl)-[RuTCC2FCl₂NO]PF₆**

RMN ¹H (400 MHz, CD₃CN, 298 K) : δ (ppm) 9,22 (2H, dd, $J=5,5$ Hz, 1,3 Hz, H6 et H6''), 8,72 (2H, s, H3' et H5'), 8,68 (2H, d, $J= 8,0$ Hz, H3 et H3''), 8,53 (2H, td, $J= 7,9$ Hz, 1,6 Hz, H4 et H4''), 8,14 (1H, d, $J= 16,3$ Hz, $\text{H}_{\text{C}=\text{C}}$), 8,02-7,97 (2H, m, H5 et H5''), 7,95-7,85 (3H, m, H1f, H3f et H4f), 7,79 (1H, dd, $J= 8,0$ Hz, 1,2 Hz, H5f), 7,61 (1H, d, $J= 16,3$ Hz, $\text{H}_{\text{C}=\text{C}}$), 7,52-7,40 (3H, m, H6f, H7f et H8f), 2,16-2,10 (4H, m, H_A), 1,16-1,00 (12H, m, H_B, H_D, H_E), 0,78 (6H, t, $J=7,0$ Hz, H_F), 0,66-0,54 (4H, m, H_C).

IR(ATR) : $\nu_{\text{NO}}=1894$ cm^{-1}

Spectrométrie de masse : $m/z=793,2$ [M^+]

***trans* (Cl,Cl)-[RuTCC2FCl₂NO]PF₆**

RMN ¹H (400 MHz, CD₃CN, 298 K) : δ (ppm) 8,79 (2H, dd, $J= 5,6$ Hz, 1,0 Hz, H6 et H6''), 8,63 (2H, s, H3' et H5'), 8,60 (2H, d, $J= 7,9$ Hz, H3 et H3''), 8,43 (2H, td, $J= 7,9$ Hz, 1,4 Hz, H4 et H4''), 8,12 (1H, d, $J= 16,2$ Hz, $\text{H}_{\text{C}=\text{C}}$), 7,94-7,84 (5H, m, H5, H5''), H1f, H3f et H4f), 7,77 (1H, dd, $J= 8,0$ Hz, 1,2 Hz, H5f), 7,57 (1H, d, $J= 16,2$ Hz, $\text{H}_{\text{C}=\text{C}}$), 7,52-7,40 (3H, m, H6f,

H7f et H8f), 2,16-2,10 (4H, m, H_A), 1,16-1,00 (12H, m, H_B, H_D, H_E), 0,77 (6H, t, $J= 6,8$ Hz, H_F), 0,64-0,54 (4H, m, H_C).

IR(ATR) : $\nu_{\text{NO}}=1904$ cm⁻¹

Spectrométrie de masse : $m/z=793,2$ [M⁺]

***cis* (Cl,Cl)-[RuTCC3FCl₂NO]PF₆**

RMN ¹H (300 MHz, CD₃CN, 298 K) : δ (ppm) 9,23 (2H, d, $J= 5,4$ Hz, H₆ et H_{6''}), 8,73 (2H, s, H_{3'} et H_{5'}), 8,63 (2H, d, $J= 7,9$ Hz, H₃ et H_{3''}), 8,52 (2H, t, $J= 7,9$ Hz, H₄ et H_{4''}), 8,05-7,86 (4H, m, H₅, H_{5''}, H_{3f} et H_{4f}), 7,82-7,75 (2H, m, H_{1f} et H_{5f}), 7,54-7,42 (3H, m, H_{6f}, H_{7f} et H_{8f}), 2,14-2,08 (4H, m, H_A), 1,20-0,97 (12H, m, H_B, H_D, H_E), 0,80 (6H, t, $J= 6,8$ Hz, H_F), 0,65-0,50 (4H, m, H_C).

IR(ATR) : $\nu_{\text{NO}}=1897$ cm⁻¹

Spectrométrie de masse : $m/z=791,2$ [M⁺]

***trans* (Cl,Cl)-[RuTCC3FCl₂NO]PF₆**

RMN ¹H (400 MHz, CD₃CN, 298 K) : δ (ppm) 8,80 (2H, ddd, $J= 5,6$ Hz, 1,5 Hz, 0,7 Hz, H₆ et H_{6''}), 8,64 (2H, s, H_{3'} et H_{5'}), 8,56 (2H, d, $J= 7,9$ Hz, H₃ et H_{3''}), 8,43 (2H, td, $J= 8,0$ Hz, 1,4 Hz, H₄ et H_{4''}), 7,96-7,87 (4H, m, H₅, H_{5''}, H_{3f} et H_{4f}), 7,79-7,74 (2H, m, H_{1f} et H_{5f}), 7,53-7,43 (3H, m, H_{6f}, H_{7f} et H_{8f}), 2,14-2,08 (4H, m, H_A), 1,16-1,02 (12H, m, H_B, H_D, H_E), 0,78 (6H, t, $J= 6,9$ Hz, H_F), 0,62-0,52 (4H, m, H_C).

IR(ATR) : $\nu_{\text{NO}}=1904$ cm⁻¹

Spectrométrie de masse : $m/z=791,2$ [M⁺]

***cis* (Cl,Cl)-[RuF_{Me}F_{Me}TCl₂NO]PF₆**

RMN ¹H (300 MHz, CD₃CN, 298 K) : δ (ppm) 9,24 (2H, dd, $J= 5,4$ Hz, 1,3 Hz, H₆ et H_{6''}), 8,95 (2H, s, H_{3'} et H_{5'}), 8,84 (2H, d, $J= 7,9$ Hz, H₃ et H_{3''}), 8,55 (2H, td, $J= 8,0$ Hz, 1,5 Hz, H₄ et H_{4''}), 8,35 (1H, s, H_{1f}), 8,20-8,16 (2H, m, H_{8f} et H_{10f}), 8,08-7,77 (9H, m), 7,61-7,57 (1H, m), 7,44-7,39 (2H, m), 1,75 (6H, s, H_A), 1,60 (6H, s, H_A).

IR(ATR) : $\nu_{\text{NO}}=1897$ cm⁻¹

Spectrométrie de masse : $m/z=820,2 [M^+]$

trans (Cl,Cl)-[RuF_{Me}F_{Me}TCl₂NO]PF₆

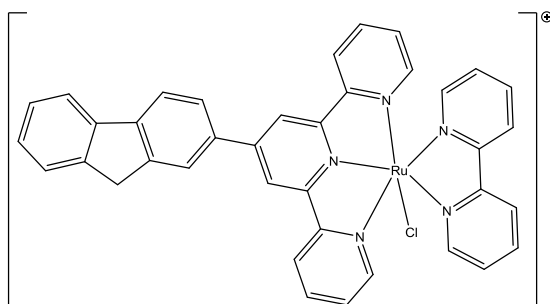
RMN ¹H (300 MHz, CD₃CN, 298 K) : δ (ppm) 8,87 (2H, s, H3' et H5'), 8,81 (4H, m, H6, H6'', H3 et H3''), 8,46 (2H, td, $J=7,9$ Hz, 1,4 Hz, H4 et H4''), 8,33 (1H, s, H1f), 8,16 (2H, s, H8f et H1f'), 8,08-7,77 (8H, m), 7,61-7,57 (2H, m), 7,43-7,39 (2H, m, H_A), 1,73 (6H, s, H_A), 1,59 (6H, s, H_A).

IR(ATR) : $\nu_{NO}=1904 \text{ cm}^{-1}$

Spectrométrie de masse : $m/z=820,2 [M^+]$

7. Synthèse des complexes [RuFT(bpy)NO]PF₆ ¹⁷⁸

7. a) Synthèse du complexe [RuFT(bpy)Cl]Cl



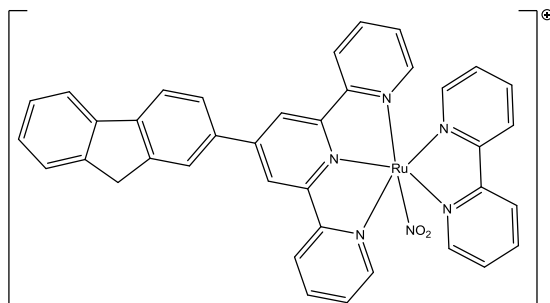
Chemical Formula: C₃₈H₂₇ClN₅Ru⁺
Molecular Weight: 690.19

Le complexe [RuFTCl₃] (50 mg, 0,085 mmol), la 2,2'-bipyridine (13 mg, 0,085 mmol), le chlorure de lithium LiCl (35 mg, 0,85 mmol) et 0,1 mL de triéthylamine sont dissous dans 20 mL d'éthanol (75 %). Le mélange est chauffé au reflux pendant 4h. Ensuite, le milieu est refroidi dans un bain de glace à 0°C et le précipité obtenu est filtré, rincé

à l'eau, à l'éthanol puis à l'éther diéthylique. Le produit obtenu est un solide violet. (44 mg, rendement : 72 %).

RMN ¹H (300 MHz, CD₃CN, 298 K) : δ (ppm) 10,29 (1H, ddd, $J=5,6$ Hz, 1,6 Hz, 0,8 Hz), 8,80 (2H, s), 8,63 (1H, d, $J=8,1$ Hz), 8,50 (2H, d, $J=8,1$ Hz), 8,38 (1H, s), 8,35-8,26 (2H, m), 8,19-8,10 (2H, dd, $J=8,0$ Hz, 1,7 Hz), 8,04-7,98 (2H, m), 7,81 (2H, t, $J=7,6$ Hz), 7,73-7,69 (3H, m), 7,69-7,66 (1H, m), 7,52 (1H, t, $J=7,4$ Hz), 7,46 (1H, td, $J=7,4$ Hz, 1,4 Hz), 7,37 (1H, dd, $J=5,6$ Hz, 0,5 Hz), 7,27 (2H, t, $J=7,6$ Hz), 6,96 (1H, ddd, $J=7,4$ Hz, 6,0 Hz, 1,4 Hz), 4,09 (2H, s).

7. b) Synthèse du complexe [RuFT(bpy)NO₂]*PF*₆



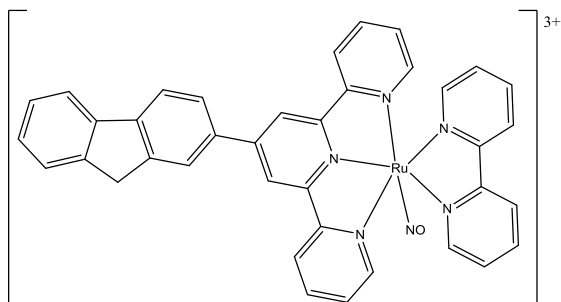
Chemical Formula: C₃₈H₂₇N₆O₂Ru³⁺
Molecular Weight: 700.74

Le complexe [RuFT(bpy)Cl]Cl (44 mg, 0,061 mmol) et NaNO₂ (42,1 mg, 0,61 mmol) sont dissous dans 25 mL d'éthanol (75 %) et le mélange est chauffé au reflux pendant 4h. Le milieu est refroidi dans un bain de glace puis NH₄PF₆ (200 mg) en solution dans 5 mL d'eau est ajouté. Un précipité rouge est récupéré par

filtration, rincé à l'eau et à l'éther. (31 mg, rendement : 60 %).

RMN ¹H (300 MHz, CD₃CN, 298 K) : δ (ppm) 9,92 (1H, d, *J*= 5,1 Hz), 8,81 (2H, s), 8,62 (1H, d, *J* = 8,1 Hz), 8,53 (2H, d, *J*= 8,1 Hz), 8,40-8,25 (3H, m), 8,17 (1H, s), 8,06-7,93 (4H, m), 7,84-7,77 (3H, m), 7,72 (1H, d, *J*= 7,4 Hz), 7,55-7,42 (3H, m), 7,36-7,30 (2H, m), 7,09 (1H, td, *J*= 7,1 Hz, 1,2 Hz), 4,14 (2H, s).

7. c) Synthèse du complexe [RuFT(bpy)NO](*PF*₆)₃



Chemical Formula: C₃₈H₂₇N₆ORu³⁺
Molecular Weight: 684.74

Le complexe [RuFT(bpy)NO₂](PF₆)₃ (31 mg, 0,037 mmol) est solubilisé dans un mélange de 3 mL d'acide chlorhydrique (12 N) et de 15 mL d'éthanol et le mélange est chauffé à 60°C pendant 1h30. Le milieu est refroidi à l'aide d'un bain de glace puis NH₄PF₆ (200 mg) en

solution dans 5 mL d'eau est ajouté. Le précipité obtenu est filtré et rincé à l'eau, à l'éthanol et à l'éther. (28 mg, rendement : 68 %).

RMN ¹H (300 MHz, CD₃CN, 298 K) : δ (ppm) 9,33 (1H, d, *J* = 5,6 Hz), 9,16 (2H, s), 8,89 (2H, d, *J*= 7,8 Hz), 8,83 (1H, d, *J*= 7,8 Hz, 1H), 8,73 (1H, td, *J*= 7,8 Hz, 1,4 Hz), 8,64 (1H, d, *J*= 8,1 Hz), 8,52 (2H, td, *J*= 7,8, 1,4 Hz), 8,36-8,25 (4H, m), 8,12-8,07 (1H, m), 8,05 (2H, dd, *J*= 5,7 Hz, 0,9 Hz), 7,80-7,72 (3H, m), 7,57-7,49 (3H, m), 7,35 (1H, dd, *J*= 6,0 Hz, 1,3 Hz), 4,23 (2H, s).

IR (ATR) : ν_{NO}=1913 cm⁻¹

Analyse élémentaire : $C_{38}H_{27}F_{18}N_6OP_3Ru$: calculé : %C = 40,76, %H = 2,43, %N = 7,51
trouvé : %C = 40,80, %H = 2,17, %N = 7,28.

8. Caractérisation de *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ obtenu par transformation des complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ dans l'eau

***trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆**

RMN ¹H (400 MHz, CD₃CN, 298 K) : δ (ppm) 9,23 (2H, dd, $J= 5,7$ Hz, 1,4 Hz, H6 et H6''), 8,96 (2H, s, H3' et H5'), 8,85 (2H, d, $J= 8,2$ Hz, H3 et H3''), 8,52 (2H, td, $J= 7,8$ Hz, 1,5 Hz, H4 et H4''), 8,40 (1H, s, H1f), 8,24-8,16 (2H, m, H3f et H4f), 8,06-7,98 (3H, m, H5f, H5 et H5''), 7,95 (1H, se, OH), 7,72 (1H, d, $J= 6,8$ Hz, H8f), 7,55-7,45 (2H, m, H6f et H7f), 4,16 (2H, s, H9f).

IR(ATR) : $\nu_{NO}=1894$ cm⁻¹

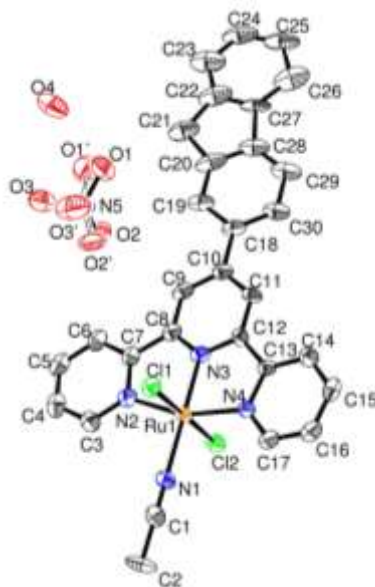
Spectrométrie de masse : $m/z=581,2$ [M⁺]

Analyse élémentaire : $C_{28}H_{20}ClN_4O_2RuPF_6, H_2O$: calculé : %C = 50,20 ; %H = 3,31 ; %N = 8,36 ; trouvé : %C = 50,32 ; %H = 2,98 ; %N = 8,63

Annexe 3 :

Données cristallographiques

- *trans* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂(CH₃CN)]NO₃



| | | |
|---------------------------------|---|-------------------------|
| Empirical formula | C ₃₀ H ₂₂ Cl ₂ N ₄ Ru, N O ₃ , 0.5 O | |
| Formula weight | 680.5 | |
| Temperature | 100(2) K | |
| Wavelength | 0.71073 Å | |
| Crystal system, space group | triclinic, P -1 | |
| Unit cell dimensions | a = 10.7597(9) Å | alpha = 104.041(4) deg. |
| | b = 11.7995(8) Å | beta = 108.259(4) deg. |
| | c = 12.4220(11) Å | gamma = 100.800(4) deg. |
| Volume | 1392.28(19) Å ³ | |
| Z, Calculated density | 2, 1.623 Mg/m ³ | |
| Absorption coefficient | 0.800 mm ⁻¹ | |
| F(000) | 686 | |
| Crystal size | 0.08 x 0.04 x 0.01 mm | |
| Theta range for data collection | 1.86 to 24.73 deg. | |
| Limiting indices | -12 ≤ h ≤ 12, -13 ≤ k ≤ 13, -14 ≤ l ≤ 14 | |
| Reflections collected / unique | 40132 / 4751 [R(int) = 0.1108] | |
| Completeness to theta = 24.73 | 99.8 % | |
| Max. and min. transmission | 0.7451 and 0.6838 | |
| Refinement method | Full-matrix least-squares on F ² | |

Data / restraints / parameters 4751 / 60 / 409
 Goodness-of-fit on F^2 1.025
 Final R indices [$I > 2\sigma(I)$] $R1 = 0.0480$, $wR2 = 0.1072$
 R indices (all data) $R1 = 0.0985$, $wR2 = 0.1287$
 Largest diff. peak and hole 0.786 and -0.563 e. \AA^{-3}

Coordonnées

$U(\text{eq})$ is defined as one third of the trace of the orthogonalized U_{ij} tensor.

| | x | y | z | U (eq) |
|--------|----------|----------|-----------|--------|
| C (1) | 7535 (6) | 420 (5) | 9998 (6) | 34 (2) |
| C (2) | 8453 (7) | -242 (6) | 10554 (7) | 54 (2) |
| C (3) | 6808 (6) | 817 (5) | 6860 (6) | 35 (2) |
| C (4) | 6955 (6) | 664 (6) | 5777 (6) | 41 (2) |
| C (5) | 6394 (6) | 1289 (6) | 5050 (6) | 38 (2) |
| C (6) | 5675 (6) | 2066 (5) | 5411 (6) | 37 (2) |
| C (7) | 5521 (6) | 2192 (5) | 6482 (5) | 29 (1) |
| C (8) | 4732 (6) | 2949 (5) | 6938 (5) | 29 (1) |
| C (9) | 4052 (6) | 3656 (5) | 6385 (5) | 33 (2) |
| C (10) | 3303 (6) | 4287 (5) | 6899 (6) | 33 (2) |
| C (11) | 3286 (6) | 4209 (5) | 8002 (5) | 31 (2) |
| C (12) | 3992 (6) | 3494 (5) | 8537 (5) | 27 (1) |
| C (13) | 4081 (5) | 3287 (5) | 9681 (5) | 26 (1) |
| C (14) | 3399 (6) | 3744 (5) | 10379 (5) | 33 (2) |
| C (15) | 3537 (7) | 3458 (5) | 11431 (5) | 38 (2) |
| C (16) | 4347 (6) | 2733 (5) | 11746 (6) | 38 (2) |
| C (17) | 4993 (6) | 2299 (5) | 11021 (5) | 32 (2) |
| C (18) | 2554 (6) | 5037 (5) | 6297 (6) | 37 (2) |
| C (19) | 2325 (6) | 4855 (5) | 5080 (6) | 41 (2) |
| C (20) | 1625 (7) | 5560 (7) | 4506 (7) | 54 (2) |
| C (21) | 1234 (8) | 5533 (7) | 3268 (7) | 60 (2) |
| C (22) | 550 (8) | 6567 (7) | 3233 (9) | 65 (2) |
| C (23) | 72 (8) | 6987 (7) | 2340 (9) | 76 (3) |
| C (24) | -482 (8) | 7944 (7) | 2505 (9) | 71 (3) |
| C (25) | -613 (7) | 8471 (7) | 3585 (9) | 70 (3) |

| | | | | |
|--------|-----------|-----------|-----------|--------|
| C (26) | -104 (7) | 8035 (7) | 4572 (8) | 76 (3) |
| C (27) | 490 (6) | 7049 (6) | 4335 (8) | 48 (2) |
| C (28) | 1171 (6) | 6442 (6) | 5147 (8) | 50 (2) |
| C (29) | 1378 (6) | 6609 (6) | 6318 (8) | 53 (2) |
| C (30) | 2067 (6) | 5910 (5) | 6888 (7) | 45 (2) |
| N (1) | 6834 (5) | 899 (4) | 9573 (4) | 31 (1) |
| N (2) | 6112 (5) | 1570 (4) | 7216 (4) | 30 (1) |
| N (3) | 4694 (5) | 2886 (4) | 7994 (4) | 28 (1) |
| N (4) | 4889 (5) | 2551 (4) | 10007 (4) | 26 (1) |
| N (5) | 1876 (6) | 1844 (6) | 2870 (6) | 52 (1) |
| O (1) | 1011 (13) | 2456 (12) | 2605 (11) | 81 (4) |
| O (2) | 2976 (14) | 2455 (14) | 3572 (18) | 79 (4) |
| O (3) | 1618 (10) | 880 (9) | 2004 (9) | 80 (3) |
| O (1') | 1309 (19) | 2380 (19) | 2198 (17) | 73 (4) |
| O (2') | 2950 (20) | 2072 (18) | 3630 (30) | 60 (4) |
| O (3') | 1140 (14) | 865 (13) | 2919 (15) | 86 (4) |
| Cl (1) | 3789 (1) | 211 (1) | 7859 (1) | 31 (1) |
| Cl (2) | 7640 (2) | 3584 (1) | 9716 (1) | 35 (1) |
| Ru (1) | 5704 (1) | 1906 (1) | 8763 (1) | 26 (1) |
| O (4) | 200 (11) | 2430 (10) | 252 (11) | 78 (3) |

Distances

| | | | |
|------------|----------|-------------|----------|
| C(1)-N(1) | 1.105(7) | C(6)-C(7) | 1.367(8) |
| C(1)-C(2) | 1.478(8) | C(6)-H(6) | 0.9500 |
| C(2)-H(2A) | 0.9800 | C(7)-N(2) | 1.383(7) |
| C(2)-H(2B) | 0.9800 | C(7)-C(8) | 1.476(8) |
| C(2)-H(2C) | 0.9800 | C(8)-N(3) | 1.345(7) |
| C(3)-N(2) | 1.345(7) | C(8)-C(9) | 1.376(8) |
| C(3)-C(4) | 1.377(9) | C(9)-C(10) | 1.389(9) |
| C(3)-H(3) | 0.9500 | C(9)-H(9) | 0.9500 |
| C(4)-C(5) | 1.369(9) | C(10)-C(11) | 1.400(9) |
| C(4)-H(4) | 0.9500 | C(10)-C(18) | 1.484(8) |
| C(5)-C(6) | 1.387(9) | C(11)-C(12) | 1.388(7) |
| C(5)-H(5) | 0.9500 | C(11)-H(11) | 0.9500 |

| | | | |
|--------------|-----------|-------------|------------|
| C(12)-N(3) | 1.352(7) | C(23)-H(23) | 0.9500 |
| C(12)-C(13) | 1.476(8) | C(24)-C(25) | 1.398(12) |
| C(13)-C(14) | 1.379(8) | C(24)-H(24) | 0.9500 |
| C(13)-N(4) | 1.381(7) | C(25)-C(26) | 1.435(11) |
| C(14)-C(15) | 1.399(8) | C(25)-H(25) | 0.9500 |
| C(14)-H(14) | 0.9500 | C(26)-C(27) | 1.442(11) |
| C(15)-C(16) | 1.369(9) | C(26)-H(26) | 0.9500 |
| C(15)-H(15) | 0.9500 | C(27)-C(28) | 1.467(9) |
| C(16)-C(17) | 1.363(9) | C(28)-C(29) | 1.358(11) |
| C(16)-H(16) | 0.9500 | C(29)-C(30) | 1.384(8) |
| C(17)-N(4) | 1.339(7) | C(29)-H(29) | 0.9500 |
| C(17)-H(17) | 0.9500 | C(30)-H(30) | 0.9500 |
| C(18)-C(30) | 1.397(9) | N(1)-Ru(1) | 2.063(5) |
| C(18)-C(19) | 1.408(9) | N(2)-Ru(1) | 2.067(5) |
| C(19)-C(20) | 1.398(9) | N(3)-Ru(1) | 1.947(4) |
| C(19)-H(19) | 0.9500 | N(4)-Ru(1) | 2.065(5) |
| C(20)-C(28) | 1.410(11) | N(5)-O(2') | 1.177(13) |
| C(20)-C(21) | 1.452(10) | N(5)-O(2) | 1.187(10) |
| C(21)-C(22) | 1.541(11) | N(5)-O(1') | 1.244(13) |
| C(21)-H(21A) | 0.9900 | N(5)-O(3) | 1.276(9) |
| C(21)-H(21B) | 0.9900 | N(5)-O(1) | 1.293(10) |
| C(22)-C(23) | 1.321(10) | N(5)-O(3') | 1.300(12) |
| C(22)-C(27) | 1.376(12) | Cl(1)-Ru(1) | 2.3287(15) |
| C(23)-C(24) | 1.375(12) | Cl(2)-Ru(1) | 2.3311(15) |

Angles

| | | | |
|------------------|----------|----------------|----------|
| N(1)-C(1)-C(2) | 178.9(7) | C(5)-C(4)-C(3) | 119.8(6) |
| C(1)-C(2)-H(2A) | 109.5 | C(5)-C(4)-H(4) | 120.1 |
| C(1)-C(2)-H(2B) | 109.5 | C(3)-C(4)-H(4) | 120.1 |
| H(2A)-C(2)-H(2B) | 109.5 | C(4)-C(5)-C(6) | 119.5(6) |
| C(1)-C(2)-H(2C) | 109.5 | C(4)-C(5)-H(5) | 120.3 |
| H(2A)-C(2)-H(2C) | 109.5 | C(6)-C(5)-H(5) | 120.3 |
| H(2B)-C(2)-H(2C) | 109.5 | C(7)-C(6)-C(5) | 119.9(6) |
| N(2)-C(3)-C(4) | 121.0(6) | C(7)-C(6)-H(6) | 120.0 |
| N(2)-C(3)-H(3) | 119.5 | C(5)-C(6)-H(6) | 120.0 |
| C(4)-C(3)-H(3) | 119.5 | C(6)-C(7)-N(2) | 119.9(5) |

| | | | |
|-------------------|----------|---------------------|-----------|
| C(6)-C(7)-C(8) | 124.8(5) | C(18)-C(19)-H(19) | 120.6 |
| N(2)-C(7)-C(8) | 115.2(5) | C(19)-C(20)-C(28) | 120.0(7) |
| N(3)-C(8)-C(9) | 119.9(6) | C(19)-C(20)-C(21) | 129.7(8) |
| N(3)-C(8)-C(7) | 113.4(5) | C(28)-C(20)-C(21) | 110.3(7) |
| C(9)-C(8)-C(7) | 126.7(6) | C(20)-C(21)-C(22) | 103.5(7) |
| C(8)-C(9)-C(10) | 120.4(6) | C(20)-C(21)-H(21A) | 111.1 |
| C(8)-C(9)-H(9) | 119.8 | C(22)-C(21)-H(21A) | 111.1 |
| C(10)-C(9)-H(9) | 119.8 | C(20)-C(21)-H(21B) | 111.1 |
| C(9)-C(10)-C(11) | 118.4(5) | C(22)-C(21)-H(21B) | 111.1 |
| C(9)-C(10)-C(18) | 120.5(6) | H(21A)-C(21)-H(21B) | 109.0 |
| C(11)-C(10)-C(18) | 121.0(6) | C(23)-C(22)-C(27) | 121.7(9) |
| C(12)-C(11)-C(10) | 119.5(6) | C(23)-C(22)-C(21) | 129.3(10) |
| C(12)-C(11)-H(11) | 120.2 | C(27)-C(22)-C(21) | 109.0(6) |
| C(10)-C(11)-H(11) | 120.2 | C(22)-C(23)-C(24) | 120.1(10) |
| N(3)-C(12)-C(11) | 119.8(5) | C(22)-C(23)-H(23) | 120.0 |
| N(3)-C(12)-C(13) | 112.8(5) | C(24)-C(23)-H(23) | 120.0 |
| C(11)-C(12)-C(13) | 127.4(5) | C(23)-C(24)-C(25) | 122.1(8) |
| C(14)-C(13)-N(4) | 120.8(5) | C(23)-C(24)-H(24) | 119.0 |
| C(14)-C(13)-C(12) | 124.5(5) | C(25)-C(24)-H(24) | 119.0 |
| N(4)-C(13)-C(12) | 114.7(5) | C(24)-C(25)-C(26) | 119.2(8) |
| C(13)-C(14)-C(15) | 119.2(6) | C(24)-C(25)-H(25) | 120.4 |
| C(13)-C(14)-H(14) | 120.4 | C(26)-C(25)-H(25) | 120.4 |
| C(15)-C(14)-H(14) | 120.4 | C(25)-C(26)-C(27) | 115.3(9) |
| C(16)-C(15)-C(14) | 119.3(6) | C(25)-C(26)-H(26) | 122.4 |
| C(16)-C(15)-H(15) | 120.4 | C(27)-C(26)-H(26) | 122.4 |
| C(14)-C(15)-H(15) | 120.4 | C(22)-C(27)-C(26) | 121.7(7) |
| C(17)-C(16)-C(15) | 119.1(6) | C(22)-C(27)-C(28) | 108.6(7) |
| C(17)-C(16)-H(16) | 120.4 | C(26)-C(27)-C(28) | 129.6(9) |
| C(15)-C(16)-H(16) | 120.4 | C(29)-C(28)-C(20) | 121.2(6) |
| N(4)-C(17)-C(16) | 123.5(6) | C(29)-C(28)-C(27) | 130.4(8) |
| N(4)-C(17)-H(17) | 118.2 | C(20)-C(28)-C(27) | 108.4(7) |
| C(16)-C(17)-H(17) | 118.2 | C(28)-C(29)-C(30) | 118.9(7) |
| C(30)-C(18)-C(19) | 118.9(6) | C(28)-C(29)-H(29) | 120.5 |
| C(30)-C(18)-C(10) | 122.7(6) | C(30)-C(29)-H(29) | 120.5 |
| C(19)-C(18)-C(10) | 118.4(6) | C(29)-C(30)-C(18) | 122.1(7) |
| C(20)-C(19)-C(18) | 118.9(7) | C(29)-C(30)-H(30) | 119.0 |
| C(20)-C(19)-H(19) | 120.6 | C(18)-C(30)-H(30) | 119.0 |

| | | | |
|------------------|-----------|-------------------|------------|
| C(1)-N(1)-Ru(1) | 173.8(5) | O(2')-N(5)-O(3') | 105.3(14) |
| C(3)-N(2)-C(7) | 119.9(5) | O(2)-N(5)-O(3') | 126.9(13) |
| C(3)-N(2)-Ru(1) | 128.0(4) | O(1')-N(5)-O(3') | 118.6(12) |
| C(7)-N(2)-Ru(1) | 112.1(4) | O(3)-N(5)-O(3') | 65.3(9) |
| C(8)-N(3)-C(12) | 121.9(5) | O(1)-N(5)-O(3') | 103.0(11) |
| C(8)-N(3)-Ru(1) | 118.6(4) | N(3)-Ru(1)-N(1) | 178.0(2) |
| C(12)-N(3)-Ru(1) | 119.5(4) | N(3)-Ru(1)-N(4) | 79.81(19) |
| C(17)-N(4)-C(13) | 118.0(5) | N(1)-Ru(1)-N(4) | 101.34(18) |
| C(17)-N(4)-Ru(1) | 128.7(4) | N(3)-Ru(1)-N(2) | 80.70(19) |
| C(13)-N(4)-Ru(1) | 113.2(4) | N(1)-Ru(1)-N(2) | 98.19(19) |
| O(2')-N(5)-O(2) | 23.1(14) | N(4)-Ru(1)-N(2) | 160.45(17) |
| O(2')-N(5)-O(1') | 135.3(15) | N(3)-Ru(1)-Cl(1) | 91.39(14) |
| O(2)-N(5)-O(1') | 112.5(15) | N(1)-Ru(1)-Cl(1) | 90.24(13) |
| O(2')-N(5)-O(3) | 112.8(17) | N(4)-Ru(1)-Cl(1) | 88.09(13) |
| O(2)-N(5)-O(3) | 126.2(13) | N(2)-Ru(1)-Cl(1) | 90.83(13) |
| O(1')-N(5)-O(3) | 93.4(12) | N(3)-Ru(1)-Cl(2) | 89.97(13) |
| O(2')-N(5)-O(1) | 133.9(15) | N(1)-Ru(1)-Cl(2) | 88.41(14) |
| O(2)-N(5)-O(1) | 113.9(11) | N(4)-Ru(1)-Cl(2) | 91.25(13) |
| O(1')-N(5)-O(1) | 30.8(10) | N(2)-Ru(1)-Cl(2) | 90.29(13) |
| O(3)-N(5)-O(1) | 111.9(8) | Cl(1)-Ru(1)-Cl(2) | 178.36(6) |

• **trans (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆**



Empirical formula C₂₈ H₂₀ Cl N₄ O₂ Ru, F₆ P, 0.5(C₂ H₃ N), 2(H₂ O)

Formula weight 782.53

Temperature 100(2) K

Wavelength 0.71073 Å

Crystal system, space group Triclinic, P -1

Unit cell dimensions a = 8.1415(6) Å alpha = 94.482(2) deg.

b = 11.4934(7) Å beta = 95.417(2) deg.

c = 16.4051(11) Å gamma = 97.154(2) deg.

Volume 1510.04(18) Å³

Z, Calculated density 2, 1.721 Mg/m³

Absorption coefficient 0.742 mm⁻¹

F(000) 786

Crystal size 0.200 x 0.040 x 0.020 mm

Theta range for data collection 1.252 to 26.494 deg.

Limiting indices -10<=h<=10, -14<=k<=14, -20<=l<=20

Reflections collected / unique 48609 / 6221 [R(int) = 0.0692]

Completeness to theta = 25.242 99.9 %

Refinement method Full-matrix least-squares on F²

Data / restraints / parameters 6221 / 125 / 510

Goodness-of-fit on F² 1.153

Final R indices [I>2sigma(I)] R1 = 0.0369, wR2 = 0.0926

R indices (all data) R1 = 0.0513, wR2 = 0.1042

Largest diff. peak and hole 0.741 and -0.640 e.Å⁻³

Coordonnées

U(eq) is defined as one third of the trace of the orthogonalized U_{ij} tensor

| | x | y | z | U (eq) |
|--------|-----------|-----------|----------|--------|
| C (1) | 5033 (4) | 3687 (3) | 1358 (2) | 22 (1) |
| C (2) | 3900 (4) | 3017 (3) | 1769 (2) | 26 (1) |
| C (3) | 3712 (4) | 3376 (3) | 2562 (2) | 25 (1) |
| C (4) | 4611 (4) | 4421 (3) | 2937 (2) | 22 (1) |
| C (5) | 5693 (4) | 5073 (3) | 2497 (2) | 19 (1) |
| C (6) | 6615 (4) | 6232 (3) | 2814 (2) | 17 (1) |
| C (7) | 6466 (4) | 6863 (3) | 3542 (2) | 19 (1) |
| C (8) | 7309 (4) | 8009 (3) | 3730 (2) | 18 (1) |
| C (9) | 8282 (4) | 8485 (3) | 3134 (2) | 18 (1) |
| C (10) | 8412 (4) | 7819 (3) | 2408 (2) | 16 (1) |
| C (11) | 9318 (4) | 8185 (3) | 1708 (2) | 17 (1) |
| C (12) | 10158 (4) | 9298 (3) | 1686 (2) | 21 (1) |
| C (13) | 10970 (4) | 9545 (3) | 999 (2) | 24 (1) |
| C (14) | 10924 (4) | 8692 (3) | 358 (2) | 23 (1) |
| C (15) | 10031 (4) | 7598 (3) | 403 (2) | 19 (1) |
| C (16) | 7136 (4) | 8709 (3) | 4506 (2) | 20 (1) |
| C (17) | 6251 (4) | 8196 (3) | 5119 (2) | 23 (1) |
| C (18) | 6008 (5) | 8842 (3) | 5830 (2) | 25 (1) |
| C (19) | 6675 (4) | 10016 (3) | 5950 (2) | 21 (1) |
| C (20) | 6648 (4) | 10923 (3) | 6639 (2) | 22 (1) |
| C (21) | 5915 (4) | 10836 (3) | 7381 (2) | 26 (1) |
| C (22) | 6118 (4) | 11844 (3) | 7936 (2) | 26 (1) |
| C (23) | 7006 (4) | 12876 (3) | 7749 (2) | 25 (1) |
| C (24) | 7699 (4) | 12960 (3) | 7010 (2) | 26 (1) |
| C (25) | 7507 (4) | 11971 (3) | 6461 (2) | 24 (1) |
| C (26) | 8111 (4) | 11827 (3) | 5613 (2) | 24 (1) |
| C (27) | 7562 (4) | 10542 (3) | 5359 (2) | 22 (1) |
| C (28) | 7791 (4) | 9894 (3) | 4638 (2) | 21 (1) |

| | | | | |
|--------|------------|-----------|-----------|--------|
| C1 (1) | 7573 (1) | 4791 (1) | -135 (1) | 22 (1) |
| P (1) | 8940 (1) | 2419 (1) | 3006 (1) | 29 (1) |
| F (1) | 10167 (13) | 2032 (11) | 2383 (7) | 48 (3) |
| F (2) | 7842 (14) | 1153 (7) | 2858 (8) | 39 (2) |
| F (3) | 7626 (10) | 2861 (9) | 3619 (5) | 49 (2) |
| F (4) | 9956 (14) | 3725 (8) | 3165 (8) | 47 (3) |
| F (5) | 9967 (8) | 2039 (9) | 3785 (6) | 59 (3) |
| F (6) | 7819 (11) | 2856 (7) | 2269 (4) | 36 (2) |
| F (1') | 9860 (20) | 2156 (19) | 2178 (9) | 47 (4) |
| F (2') | 7620 (20) | 1269 (12) | 2669 (11) | 40 (3) |
| F (3') | 8066 (19) | 2557 (13) | 3800 (7) | 49 (3) |
| F (4') | 10340 (20) | 3504 (12) | 3289 (11) | 46 (4) |
| F (5') | 10124 (10) | 1509 (10) | 3410 (8) | 45 (3) |
| F (6') | 7886 (17) | 3203 (13) | 2501 (10) | 52 (3) |
| N (1) | 9373 (4) | 5034 (2) | 1523 (2) | 18 (1) |
| N (2) | 5919 (3) | 4692 (2) | 1711 (2) | 18 (1) |
| N (3) | 7623 (3) | 6709 (2) | 2282 (2) | 16 (1) |
| N (4) | 9236 (3) | 7348 (2) | 1062 (2) | 16 (1) |
| N (5) | 3646 (11) | 5262 (7) | 4899 (4) | 45 (2) |
| C (29) | 2317 (14) | 5095 (7) | 4961 (5) | 42 (2) |
| C (30) | 509 (13) | 4946 (15) | 5059 (11) | 68 (4) |
| O (1) | 10441 (3) | 4490 (2) | 1653 (2) | 29 (1) |
| O (2) | 5940 (3) | 6668 (2) | 803 (1) | 18 (1) |
| O (3) | 6347 (3) | 8654 (2) | -2 (2) | 28 (1) |
| O (4) | 6213 (4) | 682 (3) | 1012 (2) | 40 (1) |
| Ru (1) | 7713 (1) | 5802 (1) | 1213 (1) | 14 (1) |

Distances

| | | | |
|-----------|----------|-----------|----------|
| C(1)-N(2) | 1.341(4) | C(4)-C(5) | 1.378(5) |
| C(1)-C(2) | 1.386(5) | C(4)-H(4) | 0.9500 |
| C(1)-H(1) | 0.9500 | C(5)-N(2) | 1.366(4) |
| C(2)-C(3) | 1.362(5) | C(5)-C(6) | 1.475(5) |
| C(2)-H(2) | 0.9500 | C(6)-N(3) | 1.354(4) |
| C(3)-C(4) | 1.392(5) | C(6)-C(7) | 1.372(5) |
| C(3)-H(3) | 0.9500 | C(7)-C(8) | 1.405(5) |

| | | | |
|-------------|----------|--------------|-----------|
| C(7)-H(7) | 0.9500 | C(25)-C(26) | 1.523(5) |
| C(8)-C(9) | 1.415(5) | C(26)-C(27) | 1.503(5) |
| C(8)-C(16) | 1.479(5) | C(26)-H(26A) | 0.9900 |
| C(9)-C(10) | 1.384(4) | C(26)-H(26B) | 0.9900 |
| C(9)-H(9) | 0.9500 | C(27)-C(28) | 1.389(5) |
| C(10)-N(3) | 1.347(4) | C(28)-H(28) | 0.9500 |
| C(10)-C(11) | 1.483(5) | Cl(1)-Ru(1) | 2.4020(8) |
| C(11)-N(4) | 1.365(4) | P(1)-F(3') | 1.549(9) |
| C(11)-C(12) | 1.377(5) | P(1)-F(6') | 1.553(10) |
| C(12)-C(13) | 1.390(5) | P(1)-F(1) | 1.572(7) |
| C(12)-H(12) | 0.9500 | P(1)-F(5) | 1.580(5) |
| C(13)-C(14) | 1.375(5) | P(1)-F(4') | 1.589(10) |
| C(13)-H(13) | 0.9500 | P(1)-F(6) | 1.596(6) |
| C(14)-C(15) | 1.382(5) | P(1)-F(2) | 1.598(7) |
| C(14)-H(14) | 0.9500 | P(1)-F(4) | 1.611(7) |
| C(15)-N(4) | 1.344(4) | P(1)-F(2') | 1.619(10) |
| C(15)-H(15) | 0.9500 | P(1)-F(3) | 1.635(7) |
| C(16)-C(28) | 1.392(5) | P(1)-F(1') | 1.640(10) |
| C(16)-C(17) | 1.415(5) | P(1)-F(5') | 1.643(7) |
| C(17)-C(18) | 1.378(5) | N(1)-O(1) | 1.147(4) |
| C(17)-H(17) | 0.9500 | N(1)-Ru(1) | 1.761(3) |
| C(18)-C(19) | 1.383(5) | N(2)-Ru(1) | 2.086(3) |
| C(18)-H(18) | 0.9500 | N(3)-Ru(1) | 1.981(3) |
| C(19)-C(27) | 1.393(5) | N(4)-Ru(1) | 2.081(3) |
| C(19)-C(20) | 1.479(5) | N(5)-C(29) | 1.090(12) |
| C(20)-C(25) | 1.381(5) | C(29)-C(30) | 1.486(15) |
| C(20)-C(21) | 1.411(5) | C(30)-H(30A) | 0.9800 |
| C(21)-C(22) | 1.399(5) | C(30)-H(30B) | 0.9800 |
| C(21)-H(21) | 0.9500 | C(30)-H(30C) | 0.9800 |
| C(22)-C(23) | 1.382(5) | O(2)-Ru(1) | 1.950(2) |
| C(22)-H(22) | 0.9500 | O(2)-H(2A) | 0.830(10) |
| C(23)-C(24) | 1.390(5) | O(3)-H(3A) | 0.841(10) |
| C(23)-H(23) | 0.9500 | O(3)-H(3B) | 0.843(10) |
| C(24)-C(25) | 1.377(5) | O(4)-H(4A) | 0.851(10) |
| C(24)-H(24) | 0.9500 | O(4)-H(4B) | 0.843(10) |

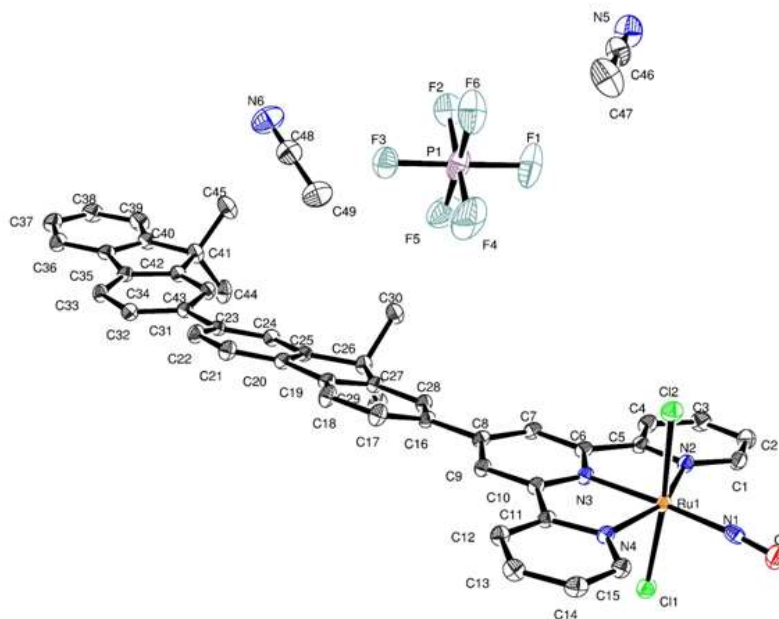
Angles

| | | | |
|-------------------|----------|-------------------|----------|
| N(2)-C(1)-C(2) | 122.0(3) | C(13)-C(12)-H(12) | 120.8 |
| N(2)-C(1)-H(1) | 119.0 | C(14)-C(13)-C(12) | 120.2(3) |
| C(2)-C(1)-H(1) | 119.0 | C(14)-C(13)-H(13) | 119.9 |
| C(3)-C(2)-C(1) | 118.9(3) | C(12)-C(13)-H(13) | 119.9 |
| C(3)-C(2)-H(2) | 120.5 | C(13)-C(14)-C(15) | 118.9(3) |
| C(1)-C(2)-H(2) | 120.5 | C(13)-C(14)-H(14) | 120.5 |
| C(2)-C(3)-C(4) | 120.0(3) | C(15)-C(14)-H(14) | 120.5 |
| C(2)-C(3)-H(3) | 120.0 | N(4)-C(15)-C(14) | 121.5(3) |
| C(4)-C(3)-H(3) | 120.0 | N(4)-C(15)-H(15) | 119.3 |
| C(5)-C(4)-C(3) | 119.0(3) | C(14)-C(15)-H(15) | 119.3 |
| C(5)-C(4)-H(4) | 120.5 | C(28)-C(16)-C(17) | 118.5(3) |
| C(3)-C(4)-H(4) | 120.5 | C(28)-C(16)-C(8) | 120.8(3) |
| N(2)-C(5)-C(4) | 120.9(3) | C(17)-C(16)-C(8) | 120.6(3) |
| N(2)-C(5)-C(6) | 115.6(3) | C(18)-C(17)-C(16) | 121.7(3) |
| C(4)-C(5)-C(6) | 123.4(3) | C(18)-C(17)-H(17) | 119.1 |
| N(3)-C(6)-C(7) | 119.5(3) | C(16)-C(17)-H(17) | 119.1 |
| N(3)-C(6)-C(5) | 113.5(3) | C(17)-C(18)-C(19) | 118.8(3) |
| C(7)-C(6)-C(5) | 126.9(3) | C(17)-C(18)-H(18) | 120.6 |
| C(6)-C(7)-C(8) | 120.7(3) | C(19)-C(18)-H(18) | 120.6 |
| C(6)-C(7)-H(7) | 119.6 | C(18)-C(19)-C(27) | 120.7(3) |
| C(8)-C(7)-H(7) | 119.6 | C(18)-C(19)-C(20) | 131.6(3) |
| C(7)-C(8)-C(9) | 117.4(3) | C(27)-C(19)-C(20) | 107.7(3) |
| C(7)-C(8)-C(16) | 121.3(3) | C(25)-C(20)-C(21) | 121.1(3) |
| C(9)-C(8)-C(16) | 121.3(3) | C(25)-C(20)-C(19) | 109.0(3) |
| C(10)-C(9)-C(8) | 120.3(3) | C(21)-C(20)-C(19) | 129.9(3) |
| C(10)-C(9)-H(9) | 119.8 | C(22)-C(21)-C(20) | 117.5(3) |
| C(8)-C(9)-H(9) | 119.8 | C(22)-C(21)-H(21) | 121.2 |
| N(3)-C(10)-C(9) | 119.2(3) | C(20)-C(21)-H(21) | 121.2 |
| N(3)-C(10)-C(11) | 113.1(3) | C(23)-C(22)-C(21) | 120.2(3) |
| C(9)-C(10)-C(11) | 127.7(3) | C(23)-C(22)-H(22) | 119.9 |
| N(4)-C(11)-C(12) | 121.2(3) | C(21)-C(22)-H(22) | 119.9 |
| N(4)-C(11)-C(10) | 115.5(3) | C(22)-C(23)-C(24) | 122.0(3) |
| C(12)-C(11)-C(10) | 123.3(3) | C(22)-C(23)-H(23) | 119.0 |
| C(11)-C(12)-C(13) | 118.5(3) | C(24)-C(23)-H(23) | 119.0 |
| C(11)-C(12)-H(12) | 120.8 | C(25)-C(24)-C(23) | 118.2(4) |

| | | | |
|---------------------|-----------|---------------------|------------|
| C(25)-C(24)-H(24) | 120.9 | F(4)-P(1)-F(3) | 87.7(6) |
| C(23)-C(24)-H(24) | 120.9 | F(3')-P(1)-F(1') | 175.3(9) |
| C(24)-C(25)-C(20) | 121.0(3) | F(6')-P(1)-F(1') | 87.4(7) |
| C(24)-C(25)-C(26) | 128.9(3) | F(4')-P(1)-F(1') | 89.3(9) |
| C(20)-C(25)-C(26) | 110.1(3) | F(2')-P(1)-F(1') | 86.3(9) |
| C(27)-C(26)-C(25) | 102.1(3) | F(3')-P(1)-F(5') | 91.7(5) |
| C(27)-C(26)-H(26A) | 111.3 | F(6')-P(1)-F(5') | 171.6(5) |
| C(25)-C(26)-H(26A) | 111.3 | F(4')-P(1)-F(5') | 90.9(7) |
| C(27)-C(26)-H(26B) | 111.3 | F(2')-P(1)-F(5') | 87.0(6) |
| C(25)-C(26)-H(26B) | 111.3 | F(1')-P(1)-F(5') | 84.6(6) |
| H(26A)-C(26)-H(26B) | 109.2 | O(1)-N(1)-Ru(1) | 173.8(3) |
| C(28)-C(27)-C(19) | 120.5(3) | C(1)-N(2)-C(5) | 119.2(3) |
| C(28)-C(27)-C(26) | 128.5(3) | C(1)-N(2)-Ru(1) | 128.0(2) |
| C(19)-C(27)-C(26) | 111.0(3) | C(5)-N(2)-Ru(1) | 112.8(2) |
| C(27)-C(28)-C(16) | 119.7(3) | C(10)-N(3)-C(6) | 122.7(3) |
| C(27)-C(28)-H(28) | 120.1 | C(10)-N(3)-Ru(1) | 118.6(2) |
| C(16)-C(28)-H(28) | 120.1 | C(6)-N(3)-Ru(1) | 118.2(2) |
| F(3')-P(1)-F(6') | 96.2(6) | C(15)-N(4)-C(11) | 119.6(3) |
| F(1)-P(1)-F(5) | 94.8(5) | C(15)-N(4)-Ru(1) | 127.2(2) |
| F(3')-P(1)-F(4') | 93.7(8) | C(11)-N(4)-Ru(1) | 113.1(2) |
| F(6')-P(1)-F(4') | 91.3(7) | N(5)-C(29)-C(30) | 176.5(11) |
| F(1)-P(1)-F(6) | 89.8(5) | C(29)-C(30)-H(30A) | 109.5 |
| F(5)-P(1)-F(6) | 175.4(4) | C(29)-C(30)-H(30B) | 109.5 |
| F(1)-P(1)-F(2) | 91.3(6) | H(30A)-C(30)-H(30B) | 109.5 |
| F(5)-P(1)-F(2) | 91.3(4) | C(29)-C(30)-H(30C) | 109.5 |
| F(6)-P(1)-F(2) | 89.6(4) | H(30A)-C(30)-H(30C) | 109.5 |
| F(1)-P(1)-F(4) | 91.4(6) | H(30B)-C(30)-H(30C) | 109.5 |
| F(5)-P(1)-F(4) | 90.1(4) | Ru(1)-O(2)-H(2A) | 115(3) |
| F(6)-P(1)-F(4) | 88.8(5) | H(3A)-O(3)-H(3B) | 100(4) |
| F(2)-P(1)-F(4) | 176.9(7) | H(4A)-O(4)-H(4B) | 117(4) |
| F(3')-P(1)-F(2') | 90.6(9) | N(1)-Ru(1)-O(2) | 176.27(11) |
| F(6')-P(1)-F(2') | 90.2(7) | N(1)-Ru(1)-N(3) | 97.43(12) |
| F(4')-P(1)-F(2') | 175.2(10) | O(2)-Ru(1)-N(3) | 85.36(10) |
| F(1)-P(1)-F(3) | 177.1(5) | N(1)-Ru(1)-N(4) | 94.65(11) |
| F(5)-P(1)-F(3) | 88.0(4) | O(2)-Ru(1)-N(4) | 83.39(10) |
| F(6)-P(1)-F(3) | 87.5(4) | N(3)-Ru(1)-N(4) | 79.51(11) |
| F(2)-P(1)-F(3) | 89.5(6) | N(1)-Ru(1)-N(2) | 94.75(11) |

| | | | |
|------------------|------------|------------------|-----------|
| O(2)-Ru(1)-N(2) | 88.18(10) | N(3)-Ru(1)-Cl(1) | 174.08(8) |
| N(3)-Ru(1)-N(2) | 79.64(11) | N(4)-Ru(1)-Cl(1) | 100.55(8) |
| N(4)-Ru(1)-N(2) | 158.06(11) | N(2)-Ru(1)-Cl(1) | 99.48(8) |
| N(1)-Ru(1)-Cl(1) | 88.47(9) | | |
| O(2)-Ru(1)-Cl(1) | 88.76(7) | | |

• ***trans* (NO,OH)-[RuF₆Me₂T(Cl)(OH)(NO)]PF₆**



| | |
|-----------------------------------|--|
| Empirical formula | C ₄₅ H ₃₅ Cl ₂ N ₄ O Ru, F ₆ P, 2(C ₂ H ₃ N) |
| Formula weight | 1046.82 |
| Temperature | 100(2) K |
| Wavelength | 0.71073 Å |
| Crystal system, space group | Triclinic, P -1 |
| Unit cell dimensions | a = 11.6939(12) Å alpha = 74.716(3) deg. b = 13.6871(13) Å beta = 73.022(4) deg. c = 16.3467(16) Å gamma = 64.856(4) deg. |
| Volume | 2235.6(4) Å ³ |
| Z, Calculated density | 2, 1.555 Mg/m ³ |
| Absorption coefficient | 0.577 mm ⁻¹ |
| F(000) | 1064 |
| Crystal size | 0.120 x 0.120 x 0.060 mm |
| Theta range for data collection | 1.966 to 29.130 deg. |
| Limiting indices | -16<=h<=16, -18<=k<=18, -22<=l<=22 |
| Reflections collected / unique | 80026 / 11986 [R(int) = 0.0632] |
| Completeness to theta = 25.242 | 99.4 % |
| Refinement method | Full-matrix least-squares on F ² |
| Data / restraints / parameters | 11986 / 0 / 601 |
| Goodness-of-fit on F ² | 1.079 |
| Final R indices [I>2sigma(I)] | R1 = 0.0442, wR2 = 0.1172 |
| R indices (all data) | R1 = 0.0591, wR2 = 0.1269 |

Largest diff. peak and hole 1.721 and -1.078 e.A⁻³

Coordonnées

U(eq) is defined as one third of the trace of the orthogonalized Uij tensor.

| | x | y | z | U (eq) |
|--------|-----------|----------|-----------|--------|
| C (1) | 13580 (3) | 4241 (2) | 4412 (2) | 21 (1) |
| C (2) | 13751 (3) | 3173 (2) | 4415 (2) | 24 (1) |
| C (3) | 12841 (3) | 2759 (2) | 4947 (2) | 24 (1) |
| C (4) | 11766 (3) | 3436 (2) | 5460 (2) | 20 (1) |
| C (5) | 11640 (2) | 4494 (2) | 5432 (2) | 17 (1) |
| C (6) | 10542 (2) | 5276 (2) | 5950 (2) | 15 (1) |
| C (7) | 9451 (2) | 5118 (2) | 6483 (2) | 17 (1) |
| C (8) | 8496 (2) | 5947 (2) | 6938 (2) | 16 (1) |
| C (9) | 8694 (2) | 6926 (2) | 6835 (2) | 16 (1) |
| C (10) | 9794 (2) | 7045 (2) | 6288 (2) | 15 (1) |
| C (11) | 10149 (2) | 8002 (2) | 6120 (2) | 15 (1) |
| C (12) | 9387 (3) | 8930 (2) | 6494 (2) | 18 (1) |
| C (13) | 9811 (3) | 9792 (2) | 6302 (2) | 20 (1) |
| C (14) | 10990 (3) | 9688 (2) | 5749 (2) | 21 (1) |
| C (15) | 11720 (3) | 8737 (2) | 5396 (2) | 18 (1) |
| C (16) | 7310 (2) | 5825 (2) | 7507 (2) | 16 (1) |
| C (17) | 6244 (3) | 6749 (2) | 7772 (2) | 21 (1) |
| C (18) | 5111 (3) | 6668 (2) | 8290 (2) | 21 (1) |
| C (19) | 5020 (3) | 5644 (2) | 8548 (2) | 17 (1) |
| C (20) | 3962 (3) | 5316 (2) | 9086 (2) | 17 (1) |
| C (21) | 2732 (3) | 5917 (2) | 9507 (2) | 20 (1) |
| C (22) | 1932 (3) | 5374 (2) | 10008 (2) | 20 (1) |
| C (23) | 2327 (3) | 4238 (2) | 10105 (2) | 16 (1) |
| C (24) | 3561 (3) | 3646 (2) | 9662 (2) | 18 (1) |
| C (25) | 4370 (3) | 4182 (2) | 9155 (2) | 17 (1) |
| C (26) | 5715 (3) | 3707 (2) | 8606 (2) | 18 (1) |
| C (27) | 6066 (3) | 4717 (2) | 8278 (2) | 16 (1) |
| C (28) | 7210 (3) | 4790 (2) | 7768 (2) | 17 (1) |
| C (29) | 6648 (3) | 2799 (2) | 9135 (2) | 28 (1) |
| C (30) | 5665 (3) | 3286 (3) | 7836 (2) | 27 (1) |
| C (31) | 1438 (3) | 3677 (2) | 10627 (2) | 17 (1) |
| C (32) | 335 (3) | 4193 (2) | 11233 (2) | 19 (1) |
| C (33) | -536 (3) | 3695 (2) | 11693 (2) | 19 (1) |
| C (34) | -301 (3) | 2656 (2) | 11568 (2) | 18 (1) |
| C (35) | -1034 (3) | 1938 (2) | 11931 (2) | 19 (1) |
| C (36) | -2229 (3) | 2106 (3) | 12500 (2) | 23 (1) |
| C (37) | -2691 (3) | 1261 (3) | 12739 (2) | 27 (1) |
| C (38) | -1993 (3) | 285 (3) | 12422 (2) | 28 (1) |
| C (39) | -803 (3) | 120 (3) | 11843 (2) | 28 (1) |
| C (40) | -341 (3) | 962 (2) | 11593 (2) | 22 (1) |
| C (41) | 903 (3) | 989 (2) | 10962 (2) | 23 (1) |
| C (42) | 811 (3) | 2120 (2) | 10989 (2) | 19 (1) |
| C (43) | 1665 (3) | 2625 (2) | 10518 (2) | 20 (1) |

| | | | | |
|--------|-----------|-----------|-----------|--------|
| C (44) | 2095 (3) | 94 (3) | 11278 (2) | 30 (1) |
| C (45) | 910 (4) | 880 (3) | 10050 (2) | 35 (1) |
| C (46) | 5526 (3) | 9727 (3) | 976 (2) | 32 (1) |
| C (47) | 5513 (5) | 10767 (3) | 1062 (3) | 47 (1) |
| C (48) | 1377 (4) | 2947 (3) | 7867 (2) | 39 (1) |
| C (49) | 2518 (4) | 3166 (4) | 7807 (3) | 48 (1) |
| N (1) | 13711 (2) | 6656 (2) | 4421 (2) | 19 (1) |
| N (2) | 12553 (2) | 4889 (2) | 4917 (2) | 17 (1) |
| N (3) | 10679 (2) | 6232 (2) | 5856 (1) | 15 (1) |
| N (4) | 11312 (2) | 7904 (2) | 5573 (1) | 16 (1) |
| N (5) | 5566 (3) | 8923 (3) | 879 (2) | 39 (1) |
| N (6) | 481 (4) | 2801 (3) | 7900 (3) | 57 (1) |
| O (1) | 14582 (2) | 6807 (2) | 4077 (2) | 30 (1) |
| F (1) | 5492 (2) | 9136 (2) | 3028 (2) | 61 (1) |
| F (2) | 3464 (2) | 9147 (2) | 3513 (1) | 41 (1) |
| F (3) | 2932 (2) | 10517 (2) | 4258 (1) | 38 (1) |
| F (4) | 4937 (3) | 10506 (3) | 3762 (2) | 71 (1) |
| F (5) | 4632 (2) | 8929 (2) | 4474 (2) | 55 (1) |
| F (6) | 3754 (2) | 10699 (2) | 2820 (2) | 53 (1) |
| P (1) | 4220 (1) | 9817 (1) | 3649 (1) | 34 (1) |
| Cl (1) | 13254 (1) | 5599 (1) | 6280 (1) | 22 (1) |
| Cl (2) | 11072 (1) | 7243 (1) | 3959 (1) | 22 (1) |
| Ru (1) | 12257 (1) | 6450 (1) | 5077 (1) | 15 (1) |

Distances

| | | | |
|-------------|----------|--------------|----------|
| C(1)-N(2) | 1.346(3) | C(14)-H(14) | 0.9500 |
| C(1)-C(2) | 1.387(4) | C(15)-N(4) | 1.349(3) |
| C(1)-H(1) | 0.9500 | C(15)-H(15) | 0.9500 |
| C(2)-C(3) | 1.385(4) | C(16)-C(17) | 1.406(4) |
| C(2)-H(2) | 0.9500 | C(16)-C(28) | 1.412(4) |
| C(3)-C(4) | 1.395(4) | C(17)-C(18) | 1.380(4) |
| C(3)-H(3) | 0.9500 | C(17)-H(17) | 0.9500 |
| C(4)-C(5) | 1.381(4) | C(18)-C(19) | 1.394(4) |
| C(4)-H(4) | 0.9500 | C(18)-H(18) | 0.9500 |
| C(5)-N(2) | 1.367(3) | C(19)-C(27) | 1.401(4) |
| C(5)-C(6) | 1.479(4) | C(19)-C(20) | 1.461(3) |
| C(6)-N(3) | 1.347(3) | C(20)-C(21) | 1.392(4) |
| C(6)-C(7) | 1.386(3) | C(20)-C(25) | 1.400(4) |
| C(7)-C(8) | 1.404(4) | C(21)-C(22) | 1.386(4) |
| C(7)-H(7) | 0.9500 | C(21)-H(21) | 0.9500 |
| C(8)-C(9) | 1.414(3) | C(22)-C(23) | 1.399(4) |
| C(8)-C(16) | 1.475(3) | C(22)-H(22) | 0.9500 |
| C(9)-C(10) | 1.382(3) | C(23)-C(24) | 1.403(4) |
| C(9)-H(9) | 0.9500 | C(23)-C(31) | 1.489(3) |
| C(10)-N(3) | 1.348(3) | C(24)-C(25) | 1.389(3) |
| C(10)-C(11) | 1.474(3) | C(24)-H(24) | 0.9500 |
| C(11)-N(4) | 1.366(3) | C(25)-C(26) | 1.522(4) |
| C(11)-C(12) | 1.382(4) | C(26)-C(29) | 1.521(4) |
| C(12)-C(13) | 1.395(4) | C(26)-C(27) | 1.526(3) |
| C(12)-H(12) | 0.9500 | C(26)-C(30) | 1.540(4) |
| C(13)-C(14) | 1.382(4) | C(27)-C(28) | 1.383(3) |
| C(13)-H(13) | 0.9500 | C(28)-H(28) | 0.9500 |
| C(14)-C(15) | 1.385(4) | C(29)-H(29A) | 0.9800 |

| | | | |
|--------------|----------|--------------|-----------|
| C(29)-H(29B) | 0.9800 | C(44)-H(44A) | 0.9800 |
| C(29)-H(29C) | 0.9800 | C(44)-H(44B) | 0.9800 |
| C(30)-H(30A) | 0.9800 | C(44)-H(44C) | 0.9800 |
| C(30)-H(30B) | 0.9800 | C(45)-H(45A) | 0.9800 |
| C(30)-H(30C) | 0.9800 | C(45)-H(45B) | 0.9800 |
| C(31)-C(43) | 1.399(4) | C(45)-H(45C) | 0.9800 |
| C(31)-C(32) | 1.411(4) | C(46)-N(5) | 1.132(5) |
| C(32)-C(33) | 1.393(4) | C(46)-C(47) | 1.460(5) |
| C(32)-H(32) | 0.9500 | C(47)-H(47A) | 0.9800 |
| C(33)-C(34) | 1.388(4) | C(47)-H(47B) | 0.9800 |
| C(33)-H(33) | 0.9500 | C(47)-H(47C) | 0.9800 |
| C(34)-C(42) | 1.400(4) | C(48)-N(6) | 1.130(5) |
| C(34)-C(35) | 1.471(3) | C(48)-C(49) | 1.459(6) |
| C(35)-C(36) | 1.397(4) | C(49)-H(49A) | 0.9800 |
| C(35)-C(40) | 1.398(4) | C(49)-H(49B) | 0.9800 |
| C(36)-C(37) | 1.397(4) | C(49)-H(49C) | 0.9800 |
| C(36)-H(36) | 0.9500 | N(1)-O(1) | 1.085(3) |
| C(37)-C(38) | 1.383(5) | N(1)-Ru(1) | 1.819(2) |
| C(37)-H(37) | 0.9500 | N(2)-Ru(1) | 2.089(2) |
| C(38)-C(39) | 1.400(4) | N(3)-Ru(1) | 2.003(2) |
| C(38)-H(38) | 0.9500 | N(4)-Ru(1) | 2.074(2) |
| C(39)-C(40) | 1.393(4) | F(1)-P(1) | 1.597(2) |
| C(39)-H(39) | 0.9500 | F(2)-P(1) | 1.607(2) |
| C(40)-C(41) | 1.526(4) | F(3)-P(1) | 1.605(2) |
| C(41)-C(42) | 1.517(4) | F(4)-P(1) | 1.576(3) |
| C(41)-C(44) | 1.532(5) | F(5)-P(1) | 1.596(3) |
| C(41)-C(45) | 1.535(4) | F(6)-P(1) | 1.613(3) |
| C(42)-C(43) | 1.387(4) | Cl(1)-Ru(1) | 2.3589(7) |
| C(43)-H(43) | 0.9500 | Cl(2)-Ru(1) | 2.3651(8) |

Angles

| | | | |
|-----------------|----------|-------------------|----------|
| N(2)-C(1)-C(2) | 121.7(3) | C(9)-C(8)-C(16) | 119.9(2) |
| N(2)-C(1)-H(1) | 119.1 | C(10)-C(9)-C(8) | 119.7(2) |
| C(2)-C(1)-H(1) | 119.1 | C(10)-C(9)-H(9) | 120.1 |
| C(3)-C(2)-C(1) | 119.5(3) | C(8)-C(9)-H(9) | 120.1 |
| C(3)-C(2)-H(2) | 120.3 | N(3)-C(10)-C(9) | 120.3(2) |
| C(1)-C(2)-H(2) | 120.3 | N(3)-C(10)-C(11) | 113.4(2) |
| C(2)-C(3)-C(4) | 118.9(3) | C(9)-C(10)-C(11) | 126.3(2) |
| C(2)-C(3)-H(3) | 120.6 | N(4)-C(11)-C(12) | 121.7(2) |
| C(4)-C(3)-H(3) | 120.6 | N(4)-C(11)-C(10) | 115.0(2) |
| C(5)-C(4)-C(3) | 119.4(3) | C(12)-C(11)-C(10) | 123.3(2) |
| C(5)-C(4)-H(4) | 120.3 | C(11)-C(12)-C(13) | 119.2(2) |
| C(3)-C(4)-H(4) | 120.3 | C(11)-C(12)-H(12) | 120.4 |
| N(2)-C(5)-C(4) | 121.4(2) | C(13)-C(12)-H(12) | 120.4 |
| N(2)-C(5)-C(6) | 114.9(2) | C(14)-C(13)-C(12) | 119.0(3) |
| C(4)-C(5)-C(6) | 123.8(2) | C(14)-C(13)-H(13) | 120.5 |
| N(3)-C(6)-C(7) | 120.1(2) | C(12)-C(13)-H(13) | 120.5 |
| N(3)-C(6)-C(5) | 112.8(2) | C(13)-C(14)-C(15) | 119.5(2) |
| C(7)-C(6)-C(5) | 127.1(2) | C(13)-C(14)-H(14) | 120.2 |
| C(6)-C(7)-C(8) | 120.0(2) | C(15)-C(14)-H(14) | 120.2 |
| C(6)-C(7)-H(7) | 120.0 | N(4)-C(15)-C(14) | 121.9(2) |
| C(8)-C(7)-H(7) | 120.0 | N(4)-C(15)-H(15) | 119.1 |
| C(7)-C(8)-C(9) | 117.9(2) | C(14)-C(15)-H(15) | 119.1 |
| C(7)-C(8)-C(16) | 122.2(2) | C(17)-C(16)-C(28) | 119.0(2) |

| | | | |
|---------------------|----------|---------------------|----------|
| C(17)-C(16)-C(8) | 120.1(2) | C(32)-C(31)-C(23) | 121.2(2) |
| C(28)-C(16)-C(8) | 120.9(2) | C(33)-C(32)-C(31) | 121.6(3) |
| C(18)-C(17)-C(16) | 121.7(2) | C(33)-C(32)-H(32) | 119.2 |
| C(18)-C(17)-H(17) | 119.1 | C(31)-C(32)-H(32) | 119.2 |
| C(16)-C(17)-H(17) | 119.1 | C(34)-C(33)-C(32) | 119.3(3) |
| C(17)-C(18)-C(19) | 119.0(3) | C(34)-C(33)-H(33) | 120.3 |
| C(17)-C(18)-H(18) | 120.5 | C(32)-C(33)-H(33) | 120.3 |
| C(19)-C(18)-H(18) | 120.5 | C(33)-C(34)-C(42) | 119.7(2) |
| C(18)-C(19)-C(27) | 120.0(2) | C(33)-C(34)-C(35) | 132.2(3) |
| C(18)-C(19)-C(20) | 131.0(3) | C(42)-C(34)-C(35) | 108.1(2) |
| C(27)-C(19)-C(20) | 109.0(2) | C(36)-C(35)-C(40) | 120.7(3) |
| C(21)-C(20)-C(25) | 120.2(2) | C(36)-C(35)-C(34) | 130.8(3) |
| C(21)-C(20)-C(19) | 131.5(2) | C(40)-C(35)-C(34) | 108.5(2) |
| C(25)-C(20)-C(19) | 108.2(2) | C(37)-C(36)-C(35) | 118.1(3) |
| C(22)-C(21)-C(20) | 119.0(3) | C(37)-C(36)-H(36) | 120.9 |
| C(22)-C(21)-H(21) | 120.5 | C(35)-C(36)-H(36) | 120.9 |
| C(20)-C(21)-H(21) | 120.5 | C(38)-C(37)-C(36) | 121.3(3) |
| C(21)-C(22)-C(23) | 121.9(3) | C(38)-C(37)-H(37) | 119.4 |
| C(21)-C(22)-H(22) | 119.0 | C(36)-C(37)-H(37) | 119.4 |
| C(23)-C(22)-H(22) | 119.0 | C(37)-C(38)-C(39) | 120.7(3) |
| C(22)-C(23)-C(24) | 118.4(2) | C(37)-C(38)-H(38) | 119.6 |
| C(22)-C(23)-C(31) | 120.9(2) | C(39)-C(38)-H(38) | 119.6 |
| C(24)-C(23)-C(31) | 120.6(2) | C(40)-C(39)-C(38) | 118.4(3) |
| C(25)-C(24)-C(23) | 120.3(2) | C(40)-C(39)-H(39) | 120.8 |
| C(25)-C(24)-H(24) | 119.9 | C(38)-C(39)-H(39) | 120.8 |
| C(23)-C(24)-H(24) | 119.9 | C(39)-C(40)-C(35) | 120.7(3) |
| C(24)-C(25)-C(20) | 120.2(2) | C(39)-C(40)-C(41) | 128.3(3) |
| C(24)-C(25)-C(26) | 128.8(2) | C(35)-C(40)-C(41) | 111.0(2) |
| C(20)-C(25)-C(26) | 111.0(2) | C(42)-C(41)-C(40) | 101.0(2) |
| C(29)-C(26)-C(25) | 112.1(2) | C(42)-C(41)-C(44) | 111.6(2) |
| C(29)-C(26)-C(27) | 112.4(2) | C(40)-C(41)-C(44) | 111.4(2) |
| C(25)-C(26)-C(27) | 101.2(2) | C(42)-C(41)-C(45) | 111.4(3) |
| C(29)-C(26)-C(30) | 110.2(3) | C(40)-C(41)-C(45) | 111.1(2) |
| C(25)-C(26)-C(30) | 110.8(2) | C(44)-C(41)-C(45) | 110.2(3) |
| C(27)-C(26)-C(30) | 109.9(2) | C(43)-C(42)-C(34) | 121.0(3) |
| C(28)-C(27)-C(19) | 121.2(2) | C(43)-C(42)-C(41) | 127.6(3) |
| C(28)-C(27)-C(26) | 128.4(2) | C(34)-C(42)-C(41) | 111.4(2) |
| C(19)-C(27)-C(26) | 110.4(2) | C(42)-C(43)-C(31) | 120.2(3) |
| C(27)-C(28)-C(16) | 119.0(2) | C(42)-C(43)-H(43) | 119.9 |
| C(27)-C(28)-H(28) | 120.5 | C(31)-C(43)-H(43) | 119.9 |
| C(16)-C(28)-H(28) | 120.5 | C(41)-C(44)-H(44A) | 109.5 |
| C(26)-C(29)-H(29A) | 109.5 | C(41)-C(44)-H(44B) | 109.5 |
| C(26)-C(29)-H(29B) | 109.5 | H(44A)-C(44)-H(44B) | 109.5 |
| H(29A)-C(29)-H(29B) | 109.5 | C(41)-C(44)-H(44C) | 109.5 |
| C(26)-C(29)-H(29C) | 109.5 | H(44A)-C(44)-H(44C) | 109.5 |
| H(29A)-C(29)-H(29C) | 109.5 | H(44B)-C(44)-H(44C) | 109.5 |
| H(29B)-C(29)-H(29C) | 109.5 | C(41)-C(45)-H(45A) | 109.5 |
| C(26)-C(30)-H(30A) | 109.5 | C(41)-C(45)-H(45B) | 109.5 |
| C(26)-C(30)-H(30B) | 109.5 | H(45A)-C(45)-H(45B) | 109.5 |
| H(30A)-C(30)-H(30B) | 109.5 | C(41)-C(45)-H(45C) | 109.5 |
| C(26)-C(30)-H(30C) | 109.5 | H(45A)-C(45)-H(45C) | 109.5 |
| H(30A)-C(30)-H(30C) | 109.5 | H(45B)-C(45)-H(45C) | 109.5 |
| H(30B)-C(30)-H(30C) | 109.5 | N(5)-C(46)-C(47) | 177.4(4) |
| C(43)-C(31)-C(32) | 118.2(2) | C(46)-C(47)-H(47A) | 109.5 |
| C(43)-C(31)-C(23) | 120.6(2) | C(46)-C(47)-H(47B) | 109.5 |

| | | | |
|---------------------|------------|-------------------|------------|
| H(47A)-C(47)-H(47B) | 109.5 | F(1)-P(1)-F(3) | 178.95(15) |
| C(46)-C(47)-H(47C) | 109.5 | F(4)-P(1)-F(2) | 178.18(17) |
| H(47A)-C(47)-H(47C) | 109.5 | F(5)-P(1)-F(2) | 89.50(13) |
| H(47B)-C(47)-H(47C) | 109.5 | F(1)-P(1)-F(2) | 90.01(15) |
| N(6)-C(48)-C(49) | 178.3(4) | F(3)-P(1)-F(2) | 89.94(12) |
| C(48)-C(49)-H(49A) | 109.5 | F(4)-P(1)-F(6) | 89.92(16) |
| C(48)-C(49)-H(49B) | 109.5 | F(5)-P(1)-F(6) | 177.63(15) |
| H(49A)-C(49)-H(49B) | 109.5 | F(1)-P(1)-F(6) | 89.96(14) |
| C(48)-C(49)-H(49C) | 109.5 | F(3)-P(1)-F(6) | 88.99(12) |
| H(49A)-C(49)-H(49C) | 109.5 | F(2)-P(1)-F(6) | 88.32(14) |
| H(49B)-C(49)-H(49C) | 109.5 | N(1)-Ru(1)-N(3) | 176.90(10) |
| O(1)-N(1)-Ru(1) | 174.9(2) | N(1)-Ru(1)-N(4) | 99.68(9) |
| C(1)-N(2)-C(5) | 119.1(2) | N(3)-Ru(1)-N(4) | 78.71(9) |
| C(1)-N(2)-Ru(1) | 126.15(18) | N(1)-Ru(1)-N(2) | 103.53(9) |
| C(5)-N(2)-Ru(1) | 114.54(18) | N(3)-Ru(1)-N(2) | 78.02(9) |
| C(6)-N(3)-C(10) | 121.9(2) | N(4)-Ru(1)-N(2) | 156.72(9) |
| C(6)-N(3)-Ru(1) | 119.58(18) | N(1)-Ru(1)-Cl(1) | 90.93(8) |
| C(10)-N(3)-Ru(1) | 118.49(17) | N(3)-Ru(1)-Cl(1) | 86.44(7) |
| C(15)-N(4)-C(11) | 118.8(2) | N(4)-Ru(1)-Cl(1) | 90.64(7) |
| C(15)-N(4)-Ru(1) | 126.81(18) | N(2)-Ru(1)-Cl(1) | 87.35(7) |
| C(11)-N(4)-Ru(1) | 114.39(17) | N(1)-Ru(1)-Cl(2) | 95.16(8) |
| F(4)-P(1)-F(5) | 92.25(17) | N(3)-Ru(1)-Cl(2) | 87.49(7) |
| F(4)-P(1)-F(1) | 90.45(16) | N(4)-Ru(1)-Cl(2) | 89.24(6) |
| F(5)-P(1)-F(1) | 90.97(15) | N(2)-Ru(1)-Cl(2) | 90.33(7) |
| F(4)-P(1)-F(3) | 89.56(14) | Cl(1)-Ru(1)-Cl(2) | 173.84(2) |
| F(5)-P(1)-F(3) | 90.08(14) | | |

Annexe 4 : Résonance Paramagnétique Electronique

A cause de sa faible durée de vie, la détection du radical NO^\bullet en RPE requiert l'utilisation d'un piègeur ou spin-trap. Dans ces travaux, le piègeur est un complexe de fer (II), avec deux ligands N-méthyl-D-glucamine dithiocarbamato (MGD^-) : $[\text{Fe}(\text{MGD})_2]$.¹⁸⁰

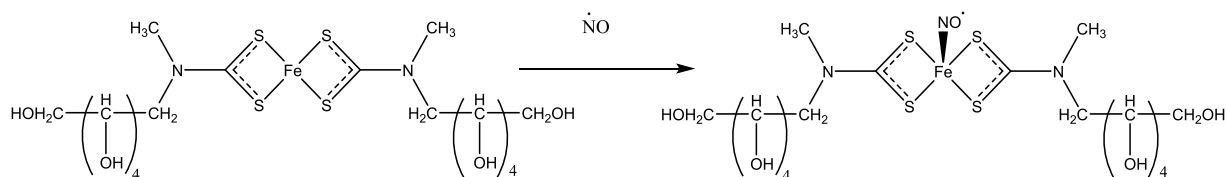


Figure 4-1 : Réaction du piègeur de spin sur NO^\bullet

Avant chaque analyse RPE, le piègeur doit être formé. Il est obtenu à partir de la complexation de la NaMGD sur un complexe de Fe^{II} . Pour avoir un bon rendement, 4 équivalents de ligand sont utilisés.

Une solution de sel de Mohr $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ à 20 mM dans l'eau est préparée et 125 μL de cette solution sont ajoutés sur 3,1 mg de NaMGD. La formation du piègeur est visible car elle s'accompagne d'un changement de couleur du vert pâle (sel de Mohr) au marron. Cette étape est réalisée à l'abri de la lumière.

Ensuite 90 μL d'une solution de complexe de ruthénium à ligand nitrosyle de concentration de 1mM sont mélangés à 10 μL de la solution de piègeur. Ce mélange est ensuite placé dans un capillaire en quartz. Celui-ci est scellé avant d'être placé dans la cavité RPE.

Annexe 5 :

Rendement quantique de NO[•] d'une réaction

La capacité des complexes de ruthénium à ligand nitrosyle à libérer le radical NO[•] sous irradiation est caractérisée par le rendement quantique de NO[•], noté Φ_{NO} .

Pour avoir accès à cette donnée, il s'agit de calculer le rendement quantique Φ_A , du réactif A irradié par une longueur d'onde monochromatique, selon la réaction simplifiée et totale $A \xrightarrow{h\nu} B$. Φ_A est défini comme étant le rapport entre le nombre de moles de A ayant réagi sous irradiation sur le nombre de photons absorbés par A, tout cela par unité de temps et de volume. L'expression donnant Φ_A est donc :

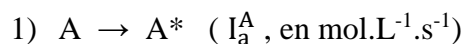
$$\Phi_A = \frac{\text{nombre de moles de A ayant réagi}}{\text{nombre de moles de photons absorbés par A}}$$

Le rendement quantique est exprimé en mol/einstein (où 1 einstein représente 1 mole de photons), mais cette grandeur est souvent donnée sans unité.

Etude cinétique d'une réaction photochimique

La transformation d'un réactif A en photoproduit B par réaction photochimique (notée $A \xrightarrow{h\nu} B$) peut être divisée en deux étapes que sont l'excitation de A par l'irradiation puis la réaction donnant B. La désexcitation de A* en A par des processus radiatifs doit également être prise en compte dans la cinétique de la réaction.

La première étape est caractérisée par l'intensité du flux photonique absorbé par A, notée I_a^A . En effet, uniquement les photons absorbés permettent la réaction donc la vitesse est dépend du flux lumineux I_a^A , exprimé en mol.L⁻¹.s⁻¹.



Après avoir atteint son état excité, le réactif A* peut soit se désexciter en A selon l'étape élémentaire 2), soit donner le photoproduit B selon l'étape élémentaire 3), chacune caractérisée par sa constante de vitesse k_d ou k_r (en secondes⁻¹).



La vitesse de la réaction est égale à la vitesse de disparition de A, soit $-\frac{d[A]}{dt}$ elle peut s'écrire : $\frac{d[A]}{dt} = -I_a^A + k_d [A^*]$

Or, d'après l'AEQS (Approximation de l'Etat Quasi-Stationnaire) appliqué à l'état A*, de courte durée de vie, on peut écrire :

$$\frac{d[A^*]}{dt} = I_a^A - k_d [A^*] - k_r [A^*] = 0 \text{ et donc } [A^*] = I_a^A / (k_r + k_d).$$

$$\text{Ainsi, } -\frac{d[A]}{dt} = \frac{d[B]}{dt} = I_a^A - k_d [I_a^A / (k_r + k_d)] = I_a^A [k_r / (k_r + k_d)] = I_a^A \Phi_A.$$

Le rendement quantique de la réaction Φ_A est posé comme étant le produit de l'intensité du flux lumineux et d'un rapport des constantes de vitesses des étapes élémentaires

constituant la cinétique de la réaction photochimique, et donc : $\Phi_A = -\frac{d[A]}{I_a^A dt}$.

Détermination du nombre de photons absorbés par le réactif A I_a^A et résolution de la loi cinétique

L'intensité totale du flux lumineux absorbé, notée I_a , représente la différence entre le flux lumineux incident I_0 et le flux lumineux transmis, ce qui s'écrit :

$$I_a = I_0 - I, \text{ avec } I \text{ l'intensité du flux transmis.}$$

Or d'après la loi de Beer-Lambert, l'absorbance totale (somme de l'absorbance de A et du photoproduit B) à une longueur d'onde donnée s'écrit : $A_{tot} = -\log(I / I_0)$.

$$\text{Ainsi, } I_a = I_0 (1 - 10^{-A_{tot}}).$$

D'après l'additivité des absorbances, la fraction correspondant à l'absorbance de A uniquement s'écrit A_A / A_{tot} , et A_B / A_{tot} pour la fraction relative à l'absorbance de B. Donc la fraction du flux photonique absorbée par A correspond à : $I_a^A = I_a (A_A / A_{tot})$.

Grâce à cette relation, la loi cinétique de la réaction $A \rightarrow B$ peut être donnée par :

$$-\frac{d[A]}{dt} = I_a^A \Phi_A = \Phi_A I_a (A_A / A_{tot}) = \Phi_A I_0 (1 - 10^{-A_{tot}}) (A_A / A_{tot}) = \Phi_A I_0 F A_A,$$

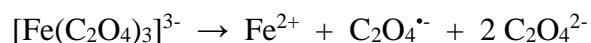
où $F = (1 - 10^{-A_{tot}}) / A_{tot}$ est le facteur photocinétique de la réaction photochimique.

La résolution de cette équation différentielle se fait à l'aide du programme Sa3.3 (Simulation Adjustment) mis au point par les Pr. Pimienta et Dr. Lavabre. Grâce au modèle de réaction totale $A \rightarrow B$, l'évolution de l'absorbance au cours du temps peut être modélisée. Les concentrations initiales, les coefficients d'extinctions molaires et le flux de photons sont des constantes, alors que le rendement quantique est une variable. Le résultat de l'équation différentielle donne le produit $\Phi_A I_0$, le flux lumineux incident doit donc être déterminé par ailleurs.^{191,192}

Détermination de l'intensité du flux lumineux incident I_0

L'intensité incidente est obtenue par actinométrie chimique. Il s'agit d'utiliser une réaction photochimique dont le rendement quantique est connu et dont l'inconnue est I_0 .

Plusieurs actinomètres chimiques sont disponibles selon la gamme de longueurs d'onde pour laquelle le I_0 doit être mesuré. L'actinomètre utilisé dans ces travaux est le ferrioxalate de potassium, qui permet la détermination de I_0 pour des longueurs d'onde allant de l'ultraviolet jusqu'à 500 nm. La réaction photochimique sur ce complexe est la suivante :



L'évolution de l'absorbance de la solution de ferrioxalate de potassium en milieu acide sous irradiation permet de résoudre l'équation différentielle et de déterminer I_0 , grâce aux rendements quantiques connus dans la littérature : $\Phi_{\text{NO}}^{365} = 1,21$; $\Phi_{\text{NO}}^{405} = 1,14$, $\Phi_{\text{NO}}^{436} = 1,11$

I_0 est déterminé par actinométrie chimique avant chaque mesure photocinétique de complexe.^{189,190}

Données expérimentales des différents calculs de rendement quantique de NO^{\cdot}

Les données expérimentales de chaque mesure de rendement quantique des complexes dans les différents solvants et à différentes longueurs d'onde sont regroupées dans des tableaux dans cette annexe. Pour chaque cas, sont mentionnés l'intensité du flux incident I_0 , la concentration du réactif $[A]_0$ en début de réaction, celle du photoproduit en fin de réaction $[B]_f$ et les coefficients d'extinction molaire du réactif A et du produit B aux longueurs d'onde d'irradiation et d'observation : ϵ_A^{irr} , ϵ_B^{irr} , ϵ_A^{obs} et ϵ_B^{obs} .

Tableau 5-1 : Données expérimentales pour le calcul de Φ_{NO} des *trans* (Cl,Cl)- et *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ dans CH₃CN à 365 et 420 nm

| Composé | <i>trans</i> (Cl,Cl)- $\lambda_{irr}=365$ nm | <i>cis</i> (Cl,Cl)- $\lambda_{irr}=365$ nm | <i>trans</i> (Cl,Cl)- $\lambda_{irr}=420$ nm | <i>cis</i> (Cl,Cl)- $\lambda_{irr}=420$ nm |
|--|---|---|---|---|
| I_0 (mol.L ⁻¹ .s ⁻¹) | 9,66.10 ⁻⁶ | 9,66.10 ⁻⁶ | 6,08.10 ⁻⁶ | 6,08.10 ⁻⁶ |
| [A] ₀ (mol.L ⁻¹) | 2,6.10 ⁻⁵ | 4,32.10 ⁻⁵ | 3,7.10 ⁻⁵ | 3,6.10 ⁻⁵ |
| [B] _f (mol.L ⁻¹) | 2,6.10 ⁻⁵ | 4,32.10 ⁻⁵ | 3,7.10 ⁻⁵ | 3,59.10 ⁻⁵ |
| ϵ_A^{irr} (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) | $\epsilon_A^{365} = 13846$ | $\epsilon_A^{365} = 21477$ | $\epsilon_A^{420} = 21464$ | $\epsilon_A^{420} = 16657$ |
| ϵ_A^{obs} (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) | $\epsilon_A^{440} = 15046$ | $\epsilon_A^{380} = 22877$ | $\epsilon_A^{370} = 13568$ | $\epsilon_A^{320} = 18579$ |
| ϵ_B^{irr} (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) | $\epsilon_B^{365} = 21272$ | $\epsilon_B^{365} = 22966$ | $\epsilon_B^{420} = 12176$ | $\epsilon_B^{420} = 12432$ |
| ϵ_B^{obs} (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) | $\epsilon_B^{440} = 10230$ | $\epsilon_B^{380} = 16626$ | $\epsilon_B^{370} = 19412$ | $\epsilon_B^{320} = 25926$ |

Tableau 5-2 : Données expérimentales pour le calcul de Φ_{NO} des *trans* (Cl,Cl)- et *cis* (Cl,Cl)-[RuFTCl₂NO]PF₆ et [RuFT(bpy)NO](PF₆)₃ dans CH₃CN à 405 nm

| Composé | <i>trans</i> (Cl,Cl)- $\lambda_{irr}=405$ nm | <i>cis</i> (Cl,Cl)- $\lambda_{irr}=405$ nm | [RuFT(bpy)NO](PF ₆) ₃ $\lambda_{irr}=405$ nm |
|--|---|---|--|
| I_0 (mol.L ⁻¹ .s ⁻¹) | 2,97.10 ⁻⁶ | 2,97.10 ⁻⁶ | 1,00.10 ⁻⁶ |
| [A] ₀ (mol.L ⁻¹) | 3,0.10 ⁻⁵ | 2,8.10 ⁻⁵ | 4,94.10 ⁻⁵ |
| [B] _f (mol.L ⁻¹) | 2,96.10 ⁻⁵ | 2,8.10 ⁻⁵ | 4,90.10 ⁻⁵ |
| ϵ_A^{irr} (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) | $\epsilon_A^{405} = 21182$ | $\epsilon_A^{405} = 22175$ | $\epsilon_A^{405} = 15729$ |
| ϵ_A^{obs} (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) | $\epsilon_A^{330} = 17128$ | $\epsilon_A^{330} = 20140$ | $\epsilon_A^{470} = 12579$ |
| ϵ_B^{irr} (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) | $\epsilon_B^{405} = 11995$ | $\epsilon_B^{405} = 12724$ | $\epsilon_B^{405} = 7969$ |
| ϵ_B^{obs} (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) | $\epsilon_B^{330} = 24717$ | $\epsilon_B^{330} = 27897$ | $\epsilon_B^{470} = 21422$ |

Tableau 5-3 : Données expérimentales pour le calcul de Φ_{NO} des *trans* (Cl,Cl)* , *cis* (Cl,Cl)* et *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ dans l'eau à 420 et 365 nm

| Composé | <i>trans</i> (Cl,Cl)* $\lambda_{irr}=420$ nm | <i>cis</i> (Cl,Cl)* $\lambda_{irr}=420$ nm | <i>trans</i> (NO,OH)- $\lambda_{irr}=420$ nm | <i>trans</i> (NO,OH)- $\lambda_{irr}=365$ nm |
|--|---|---|---|---|
| I_0 (mol.L ⁻¹ .s ⁻¹) | $6,08.10^{-6}$ | $6,08.10^{-6}$ | $6,08.10^{-6}$ | $9,66.10^{-6}$ |
| [A] ₀ (mol.L ⁻¹) | $4,57.10^{-5}$ | $4,57.10^{-5}$ | $4,57.10^{-5}$ | $4,57.10^{-5}$ |
| [B] _f (mol.L ⁻¹) | $4,54.10^{-5}$ | $4,51.10^{-5}$ | $4,52.10^{-5}$ | $4,52.10^{-5}$ |
| ϵ_A^{irr} (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) | $\epsilon_A^{420} = 11980$ | $\epsilon_A^{420} = 15560$ | $\epsilon_A^{420} = 10243$ | $\epsilon_A^{365} = 16333$ |
| ϵ_A^{obs} (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) | $\epsilon_A^{320} = 13658$ | $\epsilon_A^{326} = 17313$ | $\epsilon_A^{320} = 13597$ | $\epsilon_A^{300} = 19322$ |
| ϵ_B^{irr} (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) | $\epsilon_B^{420} = 8148$ | $\epsilon_B^{420} = 12585$ | $\epsilon_B^{420} = 9136$ | $\epsilon_B^{365} = 11790$ |
| ϵ_B^{obs} (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) | $\epsilon_B^{320} = 15922$ | $\epsilon_B^{326} = 19505$ | $\epsilon_B^{320} = 15834$ | $\epsilon_B^{300} = 21658$ |

Tableau 5-4 : Données expérimentales pour le calcul de Φ_{NO} des *trans* (Cl,Cl)* , *cis* (Cl,Cl)* et *trans* (NO,OH)-[RuFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ dans le LB à 365 nm

| Composé | <i>trans</i> (Cl,Cl)* $\lambda_{irr}=365$ nm | <i>cis</i> (Cl,Cl)* $\lambda_{irr}=365$ nm | <i>trans</i> (NO,OH)- $\lambda_{irr}=365$ nm |
|--|---|---|---|
| I_0 (mol.L ⁻¹ .s ⁻¹) | $9,66.10^{-6}$ | $1,13.10^{-5}$ | $1,13.10^{-5}$ |
| [A] ₀ (mol.L ⁻¹) | $4,57.10^{-5}$ | $4,57.10^{-5}$ | $4,57.10^{-5}$ |
| [B] _f (mol.L ⁻¹) | $4,46.10^{-5}$ | $4,53.10^{-5}$ | $4,44.10^{-5}$ |
| ϵ_A^{irr} (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) | $\epsilon_A^{365} = 18962$ | $\epsilon_A^{365} = 17484$ | $\epsilon_A^{365} = 15611$ |
| ϵ_A^{obs} (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) | $\epsilon_A^{470} = 5457$ | $\epsilon_A^{430} = 16103$ | $\epsilon_A^{460} = 3094$ |
| ϵ_B^{irr} (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) | $\epsilon_B^{365} = 17136$ | $\epsilon_B^{365} = 19600$ | $\epsilon_B^{365} = 12794$ |
| ϵ_B^{obs} (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) | $\epsilon_B^{470} = 7595$ | $\epsilon_B^{430} = 8838$ | $\epsilon_B^{460} = 4838$ |

Tableau 5-5 : Données expérimentales pour le calcul de Φ_{NO} des *trans* (Cl,Cl)- et *cis* (Cl,Cl)-[RuTCC2FCl₂NO]PF₆ dans CH₃CN à 365 et 420 nm

| Composé | <i>trans</i> (Cl,Cl)- TCC2F $\lambda_{irr}=365$ nm | <i>cis</i> (Cl,Cl)- TCC2F $\lambda_{irr}=365$ nm | <i>trans</i> (Cl,Cl)- TCC2F $\lambda_{irr}=420$ nm | <i>cis</i> (Cl,Cl)- TCC2F $\lambda_{irr}=420$ nm |
|--|--|--|--|--|
| I_0 (mol.L ⁻¹ .s ⁻¹) | 1,13.10 ⁻⁵ | 1,07.10 ⁻⁵ | 5,45.10 ⁻⁶ | 6,74.10 ⁻⁶ |
| [A] ₀ (mol.L ⁻¹) | 4,01.10 ⁻⁵ | 3,5.10 ⁻⁵ | 4,0.10 ⁻⁵ | 3,5.10 ⁻⁵ |
| [B] _f (mol.L ⁻¹) | 3,98.10 ⁻⁵ | 3,5.10 ⁻⁵ | 3,95.10 ⁻⁵ | 3,0.10 ⁻⁵ |
| ϵ_A^{irr} (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) | $\epsilon_A^{365} = 8753$ | $\epsilon_A^{365} = 8780$ | $\epsilon_A^{420} = 11730$ | $\epsilon_A^{420} = 14823$ |
| ϵ_A^{obs} (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) | $\epsilon_A^{460} = 17113$ | $\epsilon_A^{450} = 18177$ | $\epsilon_A^{460} = 20640$ | $\epsilon_A^{400} = 11123$ |
| ϵ_B^{irr} (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) | $\epsilon_B^{365} = 9674$ | $\epsilon_B^{365} = 13252$ | $\epsilon_B^{420} = 16848$ | $\epsilon_B^{420} = 13153$ |
| ϵ_B^{obs} (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) | $\epsilon_B^{460} = 10022$ | $\epsilon_B^{450} = 8500$ | $\epsilon_B^{460} = 11845$ | $\epsilon_B^{400} = 17350$ |

Tableau 5-6 : Données expérimentales pour le calcul de Φ_{NO} des *trans* (Cl,Cl)- et *cis* (Cl,Cl)-[RuTCC3FCl₂NO]PF₆ dans CH₃CN à 365 et 420 nm

| Composé | <i>trans</i> (Cl,Cl)- TCC3F $\lambda_{irr}=365$ nm | <i>cis</i> (Cl,Cl)- TCC3F $\lambda_{irr}=365$ nm | <i>trans</i> (Cl,Cl)- TCC3F $\lambda_{irr}=420$ nm | <i>cis</i> (Cl,Cl)- TCC3F $\lambda_{irr}=420$ nm |
|--|--|--|--|--|
| I_0 (mol.L ⁻¹ .s ⁻¹) | 1,13.10 ⁻⁵ | 1,07.10 ⁻⁵ | 5,45.10 ⁻⁶ | 6,74.10 ⁻⁶ |
| [A] ₀ (mol.L ⁻¹) | 3,50.10 ⁻⁵ | 6,0.10 ⁻⁵ | 3,5.10 ⁻⁵ | 4,0.10 ⁻⁵ |
| [B] _f (mol.L ⁻¹) | 3,49.10 ⁻⁵ | 5,99.10 ⁻⁵ | 3,5.10 ⁻⁵ | 3,6.10 ⁻⁵ |
| ϵ_A^{irr} (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) | $\epsilon_A^{365} = 12120$ | $\epsilon_A^{365} = 14810$ | $\epsilon_A^{420} = 14481$ | $\epsilon_A^{420} = 19775$ |
| ϵ_A^{obs} (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) | $\epsilon_A^{420} = 14422$ | $\epsilon_A^{420} = 18517$ | $\epsilon_A^{380} = 10035$ | $\epsilon_A^{360} = 15881$ |
| ϵ_B^{irr} (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) | $\epsilon_B^{365} = 17671$ | $\epsilon_B^{365} = 19603$ | $\epsilon_B^{420} = 10964$ | $\epsilon_B^{420} = 11827$ |
| ϵ_B^{obs} (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) | $\epsilon_B^{420} = 11319$ | $\epsilon_B^{420} = 12819$ | $\epsilon_B^{380} = 18708$ | $\epsilon_B^{360} = 20936$ |

Tableau 5-7 : Données expérimentales pour le calcul de Φ_{NO} des *trans* (Cl,Cl)- et *cis* (Cl,Cl)-[RuF_{Me}F_{Me}TCl₂NO]PF₆ dans CH₃CN à 365 et 420 nm

| Composé | <i>trans</i> (Cl,Cl)- FFT $\lambda_{irr}=365$ nm | <i>cis</i> (Cl,Cl)- FFT $\lambda_{irr}=365$ nm | <i>trans</i> (Cl,Cl)- FFT $\lambda_{irr}=420$ nm | <i>cis</i> (Cl,Cl)- FFT $\lambda_{irr}=420$ nm |
|--|--|--|--|--|
| I_0 (mol.L ⁻¹ .s ⁻¹) | 5,34.10 ⁻⁶ | 5,34.10 ⁻⁶ | 6,44.10 ⁻⁵ | 6,44.10 ⁻⁵ |
| [A] ₀ (mol.L ⁻¹) | 6,50.10 ⁻⁵ | 6,50.10 ⁻⁵ | 6,50.10 ⁻⁵ | 6,50.10 ⁻⁵ |
| [B] _f (mol.L ⁻¹) | 6,50.10 ⁻⁵ | 6,50.10 ⁻⁵ | 6,50.10 ⁻⁵ | 6,49.10 ⁻⁵ |
| ϵ_A^{irr} (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) | $\epsilon_A^{365} = 8238$ | $\epsilon_A^{365} = 9021$ | $\epsilon_A^{420} = 7366$ | $\epsilon_A^{424} = 8895$ |
| ϵ_A^{obs} (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) | $\epsilon_A^{450} = 8708$ | $\epsilon_A^{476} = 5020$ | $\epsilon_A^{480} = 7464$ | $\epsilon_A^{380} = 7082$ |
| ϵ_B^{irr} (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) | $\epsilon_B^{365} = 11921$ | $\epsilon_B^{365} = 10548$ | $\epsilon_B^{420} = 12126$ | $\epsilon_B^{424} = 7807$ |
| ϵ_B^{obs} (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) | $\epsilon_B^{450} = 6406$ | $\epsilon_B^{476} = 3335$ | $\epsilon_B^{480} = 3445$ | $\epsilon_B^{380} = 11158$ |

Tableau 5-8 : Données expérimentales pour le calcul de Φ_{NO} des *trans* (NO,OH)-[RuTCC2F(Cl)(OH)(NO)]PF₆, *trans* (NO,OH)-[RuTCC3F(Cl)(OH)(NO)]PF₆ et *trans* (NO,OH)-[RuFFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ dans l'eau à 365 nm

| Composé | <i>trans</i> (NO,OH)- TCC2F $\lambda_{irr}=365$ nm | <i>trans</i> (NO,OH)- TCC3F $\lambda_{irr}=365$ nm | <i>trans</i> (NO,OH)- FFT $\lambda_{irr}=365$ nm |
|--|--|--|--|
| I_0 (mol.L ⁻¹ .s ⁻¹) | 1,07.10 ⁻⁵ | 1,07.10 ⁻⁵ | 1,11.10 ⁻⁵ |
| [A] ₀ (mol.L ⁻¹) | 4,0.10 ⁻⁵ | 4,0.10 ⁻⁵ | 4,0.10 ⁻⁵ |
| [B] _f (mol.L ⁻¹) | 3,94.10 ⁻⁵ | 3,96.10 ⁻⁵ | 3,93.10 ⁻⁵ |
| ϵ_A^{irr} (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) | $\epsilon_A^{365} = 14958$ | $\epsilon_A^{365} = 13394$ | $\epsilon_A^{365} = 17806$ |
| ϵ_A^{obs} (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) | $\epsilon_A^{460} = 16990$ | $\epsilon_A^{426} = 9883$ | $\epsilon_A^{420} = 15410$ |
| ϵ_B^{irr} (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) | $\epsilon_B^{365} = 19903$ | $\epsilon_B^{365} = 16766$ | $\epsilon_B^{365} = 24530$ |
| ϵ_B^{obs} (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) | $\epsilon_B^{460} = 11213$ | $\epsilon_B^{426} = 6664$ | $\epsilon_B^{420} = 11132$ |

Tableau 5-9 : Données expérimentales pour le calcul de Φ_{NO} des *trans* (NO,OH)-[RuTCC2F(Cl)(OH)(NO)]PF₆, *trans* (NO,OH)-[RuTCC3F(Cl)(OH)(NO)]PF₆ et *trans* (NO,OH)-[RuFFT(Cl)(OH)(NO)]PF₆ dans l'eau à 420 nm

| Composé | <i>trans</i> (NO,OH)- TCC2F $\lambda_{\text{irr}}=420$ nm | <i>trans</i> (NO,OH)- TCC3F $\lambda_{\text{irr}}=420$ nm | <i>trans</i> (NO,OH)- FFT $\lambda_{\text{irr}}=420$ nm |
|---|---|---|---|
| I_0 (mol.L ⁻¹ .s ⁻¹) | $6,74.10^{-5}$ | $6,74.10^{-5}$ | $6,88.10^{-5}$ |
| $[A]_0$ (mol.L ⁻¹) | $4,0.10^{-5}$ | $4,0.10^{-5}$ | $4,0.10^{-5}$ |
| $[B]_f$ (mol.L ⁻¹) | $3,31.10^{-5}$ | $3,74.10^{-5}$ | $3,85.10^{-5}$ |
| ϵ_A^{irr} (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) | $\epsilon_A^{420} = 12812$ | $\epsilon_A^{420} = 14823$ | $\epsilon_A^{420} = 13077$ |
| ϵ_A^{obs} (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) | $\epsilon_A^{460} = 18292$ | $\epsilon_A^{400} = 11123$ | $\epsilon_A^{364} = 18606$ |
| ϵ_B^{irr} (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) | $\epsilon_B^{420} = 13840$ | $\epsilon_B^{420} = 13153$ | $\epsilon_B^{420} = 9957$ |
| ϵ_B^{obs} (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹) | $\epsilon_B^{460} = 13903$ | $\epsilon_B^{400} = 17380$ | $\epsilon_B^{364} = 20516$ |

Annexe 6 : Principe du Z-Scan

La section efficace d'un échantillon peut être mesurée par les méthodes de Z-Scan et TPEF (« Two-Photon-Excited Fluorescence »). Le Z-Scan a été utilisé pour les mesures des composés de l'équipe car cette technique peut être appliquée sur des échantillons non fluorescents. De plus, cette méthode est assez facile à mettre en œuvre et a une bonne sensibilité.

Il s'agit de déplacer l'échantillon le long de l'axe z de propagation du laser et de mesurer l'intensité lumineuse transmise au niveau du détecteur 2. Le détecteur 1 permet d'adapter la puissance du laser en analysant ses fluctuations d'intensité.

Le montage d'une mesure par Z-Scan est représenté sur la **Figure 6-1**.

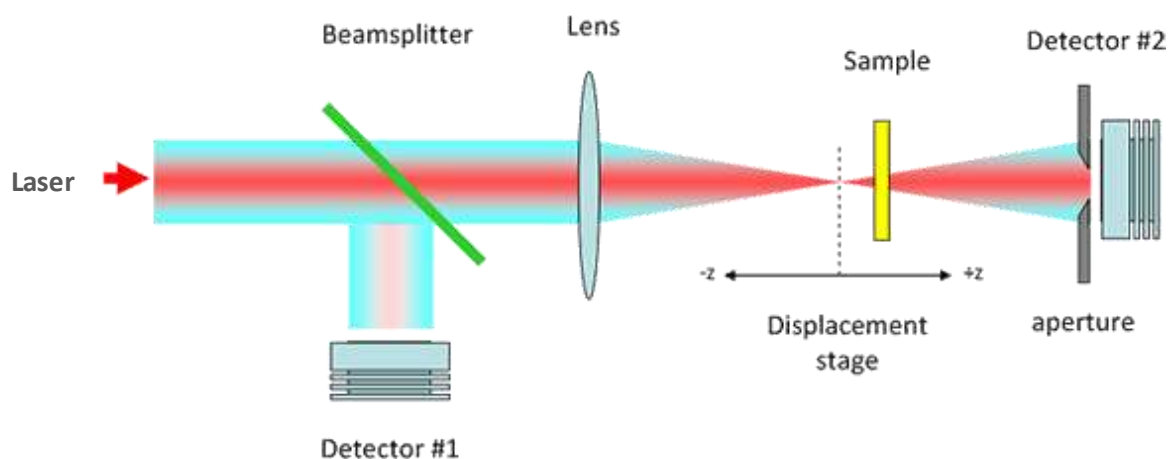


Figure 6-1 : Montage Z-Scan permettant la mesure de la section efficace ²⁴⁴

Pour chaque position z de l'échantillon, la transmittance $T(z)$ est mesurée.

Par exemple, les courbes représentant l'allure de la transmittance en fonction de la position de l'échantillon pour les complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[RuF_{hex}TCl₂NO]PF₆ et [RuF_{hex}TbpyNO](PF₆)₃, ainsi que pour le *trans* (Cl,Cl)-[RuTCC₂FCI₂NO]PF₆ sont présentées sur la **Figure 6-2**.¹⁷⁸

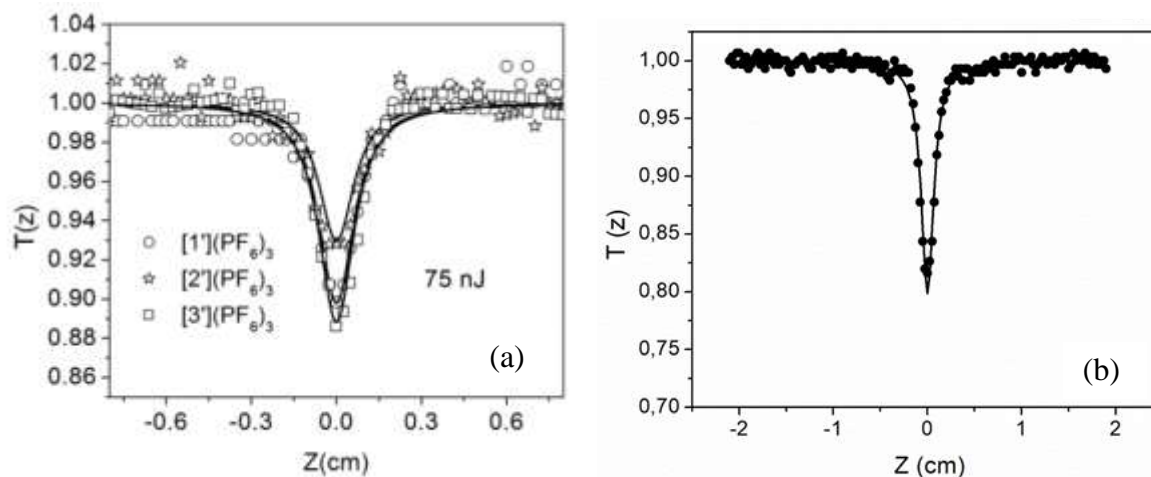


Figure 6-2 : Courbes Z-scan obtenues à 800 nm pour (a) *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)- $[\text{RuF}_{\text{hex}}\text{TCl}_2\text{NO}]\text{PF}_6$ et $[\text{RuF}_{\text{hex}}\text{TbpyNO}](\text{PF}_6)_3$ et (b) *trans* (Cl,Cl)- $[\text{RuTCC}_2\text{FCl}_2\text{NO}]\text{PF}_6$

La transmittance $T(z)$ est reliée au coefficient d'absorption à deux photons β par la relation :

$$T(z) = 1 - \frac{\beta I_0 (1 - e^{-\alpha L})}{2^{\frac{3}{2}} \varepsilon \left(1 + \frac{z^2}{z_0^2}\right)}$$

où I_0 est l'intensité de la source du laser pulsé, ε le coefficient d'extinction molaire de l'échantillon, L l'épaisseur de l'échantillon, α le coefficient d'absorption linéaire, z sa position et z_0 est la portée de Rayleigh. Celle-ci est reliée à la longueur d'onde d'irradiation λ : $z_0 = \pi \omega_0^2 / \lambda$, avec ω_0 la largeur minimale du faisceau au point d'origine.

Le coefficient d'absorption à deux photons β est déterminé par régression linéaire, puis la section efficace d'absorption à deux photons est calculée par la relation : $\sigma = \frac{\beta h\nu}{N_A C} \cdot 10^3$

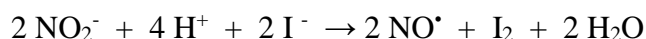
où N_A est le nombre d'Avogadro, C la concentration de la molécule et $h\nu$ l'énergie de la source d'excitation.²⁴⁵

Annexe 7 : Electrode NO

Calibration de l'électrode NO

L'électrode doit être calibrée avant chaque série de mesures. Cette manipulation permet de déterminer le coefficient de proportionnalité (exprimé en pA/nM) reliant l'intensité du courant mesurée et la concentration de NO[•] en solution dans l'eau. La calibration doit être faite dans une gamme de concentrations correspondant à la concentration recherchée.

Pour cela, une concentration connue de NO[•] doit être reliée à une intensité de courant. La réaction chimique utilisée pour la calibration est la réduction en milieu acide des ions nitrites en NO[•] :



Dans cette réaction, le nombre de moles de NO[•] produit est égal au nombre de moles de NO₂⁻ mis en solution. Donc l'intensité mesurée correspond à la concentration de NO[•] qui est égale à la concentration en NO₂⁻.

Dans un bécher contenant 18 mL d'eau, acidifiée par 2 mL d'acide sulfurique (H₂SO₄) à 1 mM, un large excès d'iodure de potassium (KI) est ajouté (environ 20 mg). Ceci constitue la « solution de calibration ». A cette solution est ajouté un volume connu d'une solution de nitrite de sodium (NaNO₂) à 100 μM.

Par exemple, si l'électrode est calibrée pour une gamme de concentrations autour de 100 nM, 20 μL de la solution de NaNO₂ à 100 μM sont ajoutés dans le bécher de 20 mL d'eau, donnant comme concentration finale en NO₂⁻ 100 nM. La réaction de réduction des ions nitrates en oxyde nitrique étant équimolaire, 100 nM de NO[•] sont générés en solution. Cet ajout correspond à un courant de 22 000 pA donc la sensibilité de l'électrode dans ce cas est de 220 pA/nM. Deux autres ajouts de 15 μL et 25 μL permettent de faire une moyenne et d'avoir une valeur de la sensibilité plus fiable, comme le montre la **Figure 7-1**.

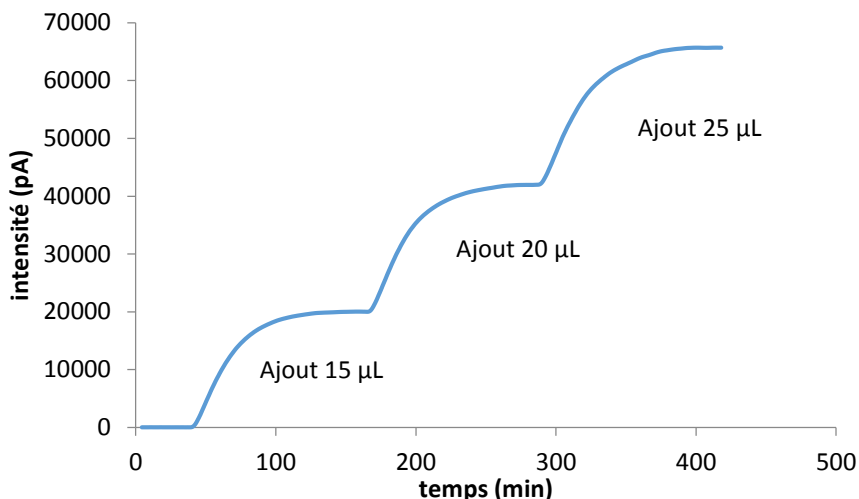


Figure 7-1 : Chrono-ampéromètre pour la calibration de l'électrode NO dans une gamme autour de 100 nM

Le même type de manipulation est utilisé pour calibrer l'électrode autour de 400 nM. Une calibration est réalisée avant chaque mesure des solutions de complexes de ruthénium à ligand nitrosyle.

Mesure de la concentration de NO[•] libéré par irradiation des complexes de ruthénium à ligand nitrosyle

Dans un premier temps, le signal de l'irradiation dans l'eau sans donneur de NO[•] est enregistré. Le bécher contenant 20 mL d'eau est irradié 15 secondes toutes les 110 secondes avec la lampe à mercure plein spectre ($\lambda > 365$ nm).

Dans un second temps, la même manipulation est réalisée en présence de complexe photoactivable en solution. Les complexes de ruthénium à ligand nitrosyle, n'étant pas hydrosolubles, ils sont d'abord dissous dans du DMSO à une concentration-mère de 2 mM. Au dernier moment, cette solution est diluée dans l'eau 100 fois et la solution est rapidement injectée dans le bécher, pour avoir une concentration finale en complexe de 400 nM. Le signal est ensuite enregistré dans les mêmes conditions d'irradiation, sans perturber le montage.

Enfin, le courant obtenu dans l'eau pure est retranché à celui enregistré en présence de donneur de NO[•], seul le signal relatif à la libération du NO[•] peut être analysé. (cf **Figure III-35** p.164)

Annexe 8 :

Culture cellulaire

Les cellules utilisées dans ces travaux sont des HCT 116 (ATCC CCL-247) et des FaDu (ATCC HTB-43). Elles sont cultivées dans du milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Life Science), supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) et de 1 % d'un mélange de pénicilline (10 000 unités/mL) et streptomycine (10 000 µg/mL). Les cellules sont cultivées dans un incubateur à 37°C, sous une atmosphère à 85 % d'humidité et 5 % de CO₂.

Mesure de l'effet cytotoxique et phototoxique du complexe de ruthénium à ligand nitrosyle

Les cellules sontensemencées sur des plaques 96 puits à une densité de 10 000 cellules par puits dans 200 µL de DMEM-10%SVF et sont cultivées 16 heures à 37°C.

Les solutions de [RuNO] sont préparées à partir d'une solution-mère de concentration 2 mM dans le DMSO par dilutions dans le DMEM. Le pourcentage final de DMSO est de 0,5% en volume dans les puits, et les concentrations finales de [RuNO] à tester sont 1, 5, 10, 25 50, et 100 µmol/L.

Le DMEM des puits est remplacé par 200 µL des différentes solutions de [RuNO]. Les puits extérieurs sont remplis d'eau stérile afin de limiter l'évaporation dans les puits centraux. Les cellules sont incubées 3 heures à 37°C en présence du complexe. Ensuite, les puits sont rincés avec du PBS et les cellules sont remises en culture dans du DMEM frais.

Les plaques contrôles sont gardées à l'abri de la lumière et les autres plaques sont irradiées grâce à une source halogène $\lambda > 400$ nm, de puissance 40 mW.cm⁻² à 420 nm. Les tests de cytotoxicité sont réalisés sur les plaques non irradiées, alors que celles qui ont été irradiées sont utilisées pour effectuer la mesure de l'effet phototoxique.

- Par le test Presto-Blue²¹³

Le réactif Presto-Blue utilisé dans ces travaux provient de Life Technologies, référence A13262, lot 1710852A.

Le test est réalisé 48 heures après le traitement des cellules. Après avoir retiré le DMEM, 50 μL d'une solution de Presto-Blue diluée 10 fois dans le PBS sont ajoutés dans chaque puits et les plaques sont incubées 40 minutes à 37°C. Les résultats de viabilité sont ensuite obtenus par mesure des absorbances à 600 nm (maximum d'absorption du réactif) et 570 nm (maximum d'absorption du produit réduit) dans chaque puits, à l'aide d'un lecteur d'absorbance (CLARIOstar, BMG Labtech). Ensuite, à partir des absorbances mesurées, et des coefficients d'absorption molaire connus des deux espèces à ces deux longueurs d'onde, le pourcentage de réduction du réactif de Presto-Blue peut être calculé, correspondant au pourcentage de viabilité, grâce à la formule :

$$\% \text{ reduction PB reagent} = 100 \times [(O2 \times A1) - (O1 \times A2) / (R1 \times N2) - (R2 \times N1)]$$

avec A1 et A2 les absorbances à 570 nm et 600 nm respectivement, N1 et N2 celles du milieu seul. O1, O2, R1 et R2 sont les coefficients d'extinction molaire du réactif et du produit aux deux longueurs d'onde et son répertoriés dans le **Tableau 8-1** ci-dessous.

Tableau 8-1 : Coefficients d'extinctions molaires du réactif de Presto-Blue et de son produit d'oxydation

| longueur d'onde (nm) | ϵ produit réduit ($\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) | ϵ réactif ($\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) |
|----------------------|--|---|
| 570 | 155677 | 80586 |
| 600 | 14652 | 117216 |

Chaque condition expérimentale est répétée six fois par plaque et sur deux ou quatre expérimentations indépendantes.

- Par le test de clonogénie

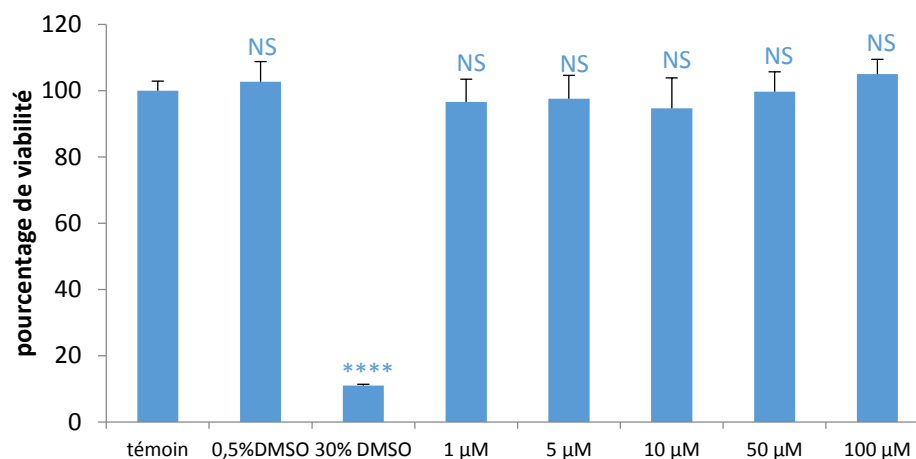
L'ensemencement et le traitement des cellules sont réalisés de la même façon que pour le test Presto-Blue.

Les cellules non traitées sont détachées des puits grâce à l'action de la trypsine, diluées et comptées. Les cellules traitées sont également trypsinées et sont ensemencées dans une plaque 6 puits à une densité de 250 cellules par puits. Elles sont incubées pendant 7 jours, le

DMEM étant renouvelé tous les 2 jours. Les puits sont ensuite rincés au PBS, et 1 mL de Crystal Violet (0,2 % dans le PBS) est ajouté et les plaques sont agitées pendant 20 minutes. Le Crystal Violet est ensuite retiré, les puits sont rincés à l'eau et les colonies marquées en bleu peuvent être comptées. Chaque condition est répétée en triplicat, sur deux expérimentations indépendantes. Le rapport entre le nombre de colonies formées par les cellules traitées sur le nombre de colonies formées par les cellules témoins permet de déterminer le pourcentage de viabilité.

Présentation des résultats

Les résultats sont présentés sous forme de graphe, donnant le pourcentage de viabilité des cellules testées en fonction des différentes concentrations du complexe étudié. Le graphe ci-dessous est celui présenté en **Figure V-5** du Chapitre V.



Le nombre d'expérimentations est précisé dans chaque cas. Les barres d'erreur représentent l'écart-type ou l'erreur-type par rapport au témoin. Elles sont représentées uniquement en positif pour des raisons de clarté, mais elles sont identiques en négatif.

Les analyses statistiques ont été menées grâce au test t de Student. Le calcul de la valeur p permet de renseigner sur la différence par rapport au témoin. Ainsi, pour $p < 0,05$, la colonne est marquée d'une étoile * : cela signifie que la viabilité mesurée a 5% de chance de ne pas être significativement différente du témoin. Si $p < 0,01$, la colonne est marquée de deux étoiles **. Si $p < 0,001$, trois étoiles *** sont notées sur la colonne correspondante et etc.

La notation « NS » signifie que la différence statistique entre les résultats d'une colonne est « non-significative » par rapport au témoin ($p > 0,05$).

Annexe 9 : Microbiologie

Culture des bactéries et suivi de croissance

Les souches de *Staphylococcus epidermidis* utilisées dans ces travaux sont ATCC 35984 et ATCC 12228. Ces bactéries sont cultivées dans le milieu de culture LB (Lysogeny Broth, Sigma-Aldrich, France) à 37°C sous agitation.

Des cultures sur boîtes de Pétri sont réalisées afin de constituer une « boîte-stock » de bactéries, à partir de laquelle seront prélevées des colonies pour les expérimentations. Pour cela, une paillette (une ou plusieurs colonies de bactéries conservées dans l'azote liquide) est dissoute dans 10 mL de milieu de culture LB et mise en culture sur la nuit à 37°C, sous agitation à 200 rpm. Ensuite, la suspension bactérienne est diluée 10^7 fois et 100 μ L sont déposés sur une boîte de Pétri contenant du milieu LB gélosé (LBA : LB+1,5% Agar). La boîte est placée à 37°C pendant 24 h. Les colonies s'étant développées, la boîte est conservée à 4°C pour stopper la croissance des bactéries. (**Schéma 9-1**)

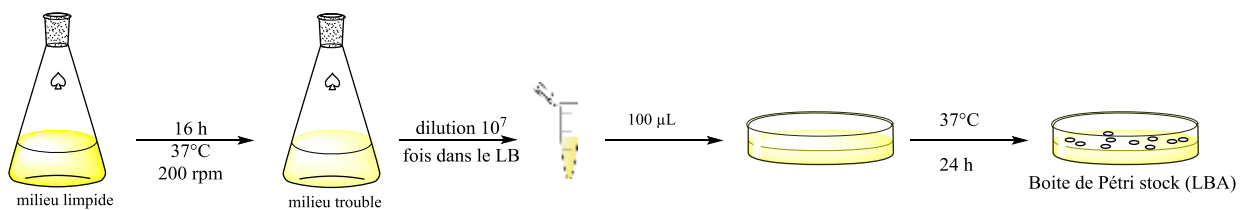


Schéma 9-1 : Mise en culture des bactéries et réalisation d'une boîte-stock

Pour mettre les bactéries en culture, une colonie est prélevée de la boîte-stock avec une anse stérile et est déposée dans un erlenmeyer stérile de 100 mL contenant 10 mL de milieu de culture LB. Ce dernier est mis sous agitation à 200 rpm à 37°C pendant la nuit. (**Schéma 9-2**) Ceci constitue la pré-culture, nécessaire pour permettre au micro-organisme de relancer son métabolisme.

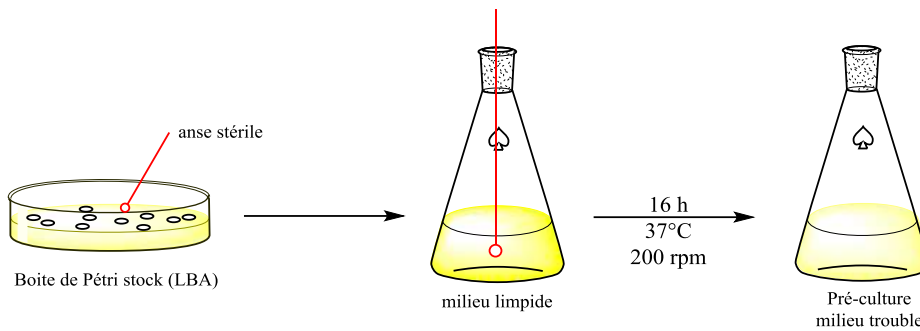


Schéma 9-2 : Réalisation d'une pré-culture

Le lendemain, la suspension bactérienne est diluée au centième (pour avoir environ 10^7 CFU/mL en solution) et est mise en culture dans un tube de culture (polypropylène) de 13 mL contenant 3 mL de LB. De manière générale, afin d'oxygéner correctement le milieu, les récipients contenant les suspensions bactériennes doivent être remplis au maximum à un quart de leur volume total.

La croissance des bactéries est suivie par mesure de la densité optique (DO) à 600 nm de la suspension bactérienne. La DO est mesurée toutes les heures jusqu'au début de la phase exponentielle de croissance puis toutes les 30 minutes. La courbe de croissance est obtenue en traçant la DO en fonction du temps. (**Schéma 9-3**)²⁴⁶

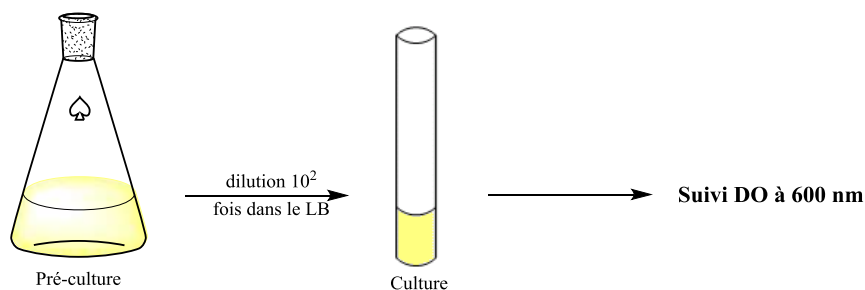


Schéma 9-3 : Mise en culture des bactéries pour le suivi de leur croissance par mesure de la DO

Suivi de croissance des bactéries traitées et quantification de l'effet bactéricide du complexe de ruthénium à ligand nitrosyle [RuNO]

De la même façon que pour le suivi de la croissance bactérienne par spectrophotométrie, les bactéries sont mises en pré-culture la veille de leur traitement. Ensuite, la solution est diluée au centième dans un tube de culture.

Les bactéries sont cultivées jusqu'à atteindre une DO de 0,3 (en début de phase exponentielle de croissance), ce qui correspond à un temps d'incubation d'environ 3 heures pour les souches étudiées dans ces travaux.

Des solutions de concentrations connues de complexes [RuNO] sont préparées au dernier moment par dilutions dans le LB d'une solution à 2mM dans le DMSO et ajoutées dans les tubes de culture contenant les suspensions bactériennes. Les concentrations finales dans les tubes sont 0,1, 1, 2 et 5 $\mu\text{mol/L}$. Après 30 minutes d'incubation à 37°C sous agitation, les tubes sont irradiés 10 min avec une lampe à vapeurs de mercure (32 mW, dose de 19,2 J.cm⁻²) ou laissés dans l'obscurité. La DO est mesurée toutes les 30 minutes (flèche bleue **Schéma 9-4**).

Afin de quantifier plus précisément l'effet bactéricide, un test de clonogénie est réalisé. Il consiste à déposer 100 μL de la suspension bactérienne traitée (diluée 10⁵ fois) sur une boîte de Pétri gélosée et de dénombrer les colonies formées après incubation de la boîte à 37°C 24h. Cette méthode permet d'évaluer le nombre de bactéries viables et métaboliquement actives, capables de former une colonie. Ce chiffre est exprimé en Unité Formant Colonie (UFC/mL). Le nombre de colonies est issu de la moyenne de 9 comptages sur 4 expérimentations indépendantes. En comparant le nombre de colonies à celui obtenu pour un témoin, le pourcentage d'inhibition peut être calculé (flèche rouge **Schéma 9-4**).

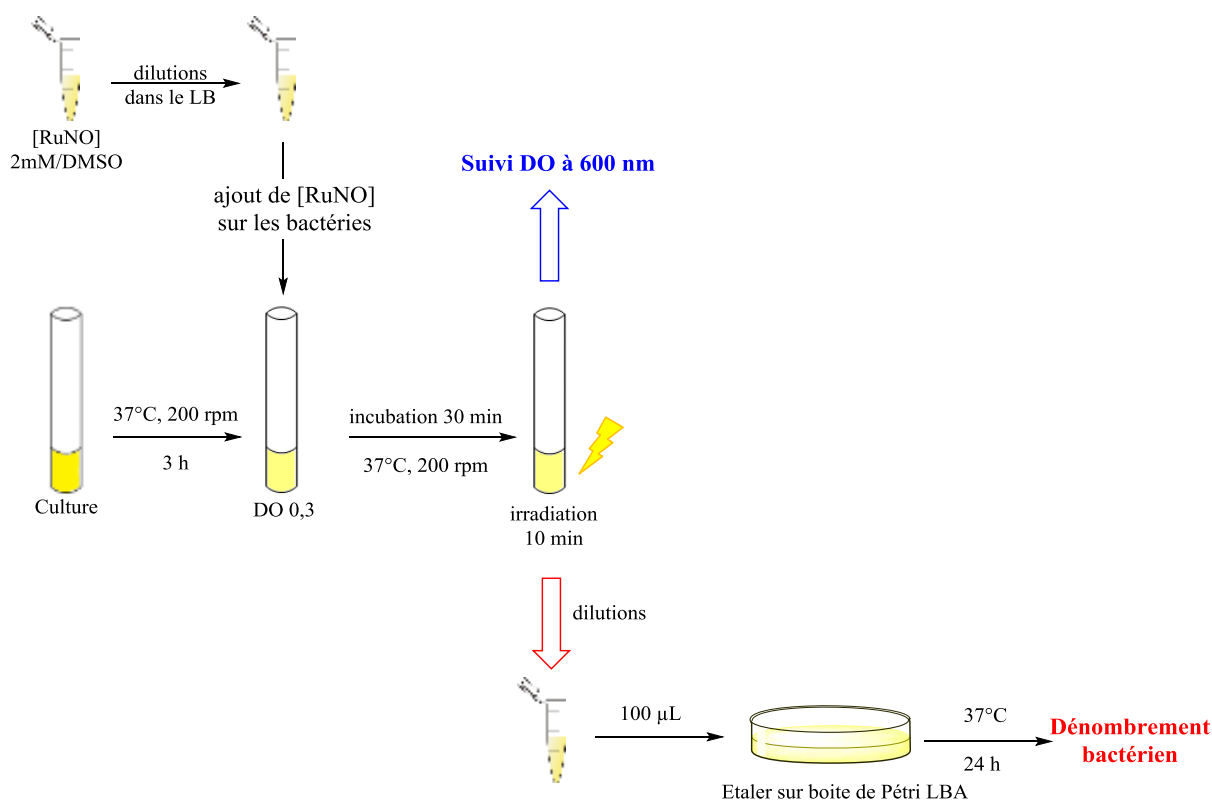


Schéma 9-4 : Protocole d'observation et quantification de l'effet bactéricide du [RuNO] irradié

Etude de l'effet de la méthicilline sur les souches ATCC 12228 et 35984

La solution mère de méthicilline (methicillin sodium salt, lot BCBR6817V, Sigma) est préparée en ajoutant 500 µL d'eau stérile sur les 50 mg de méthicilline sodium. Des aliquots de cette solution sont conservés à -20°C.

Pour mesurer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la méthicilline sur les deux souches, la méthode des « Broth dilution » a été utilisée, pour les cultures dans le LB et le MHB (Muller-Hinton Broth). Ce second milieu est également utilisé comme comparaison car il est le milieu de référence pour les tests de susceptibilité à un bactéricide.^{247,248}

Les bactéries sont déposées dans une plaque 96 puits et incubées avec 200 µL de milieu contenant différentes concentrations en méthicilline. Le volume de la suspension bactérienne introduit dans les puits est calculé pour avoir une DO de 0,1 au final dans chaque puits (phase de latence). La plaque est placée dans le lecteur d'absorbance (CLARIOstar, BMG Labtech) et la DO à 600 nm est suivie à 37°C pendant 15 heures (180 cycles de 300 s et 200 s d'agitation à 200 rpm avant chaque cycle). (**Schéma 9-5**) La CMI correspond à la plus

faible concentration de méthicilline pour laquelle la croissance est visiblement totalement inhibée, c'est-à-dire la plus faible concentration pour laquelle la DO n'augmente pas.

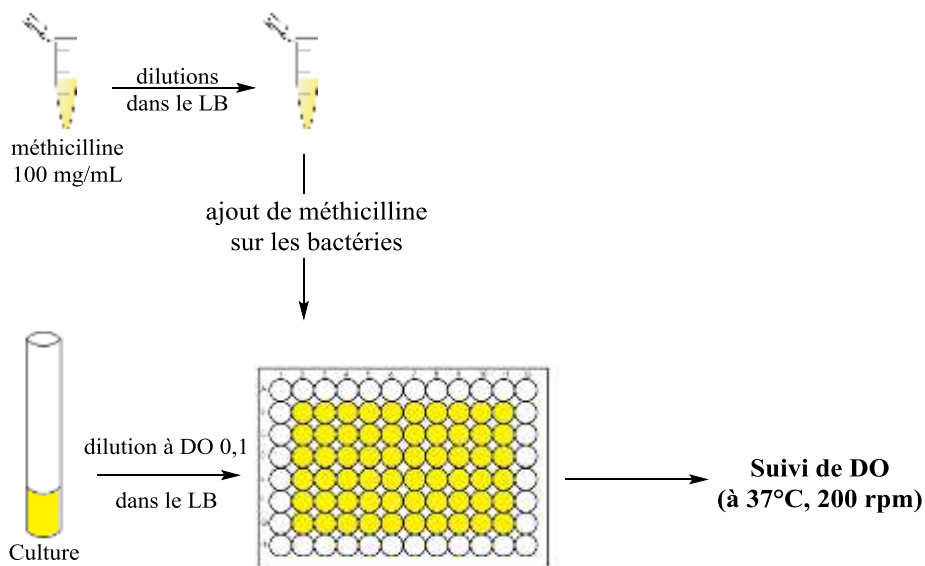


Schéma 9-5 : Protocole pour le suivi de DO des bactéries après leur traitement par différentes concentrations de méthicilline

Etude de l'effet combiné de la méthicilline et des complexes de ruthénium [RuNO]

De la même façon que précédemment, les bactéries sont traitées à DO 0,3 avec [RuNO] et les solutions sont irradiées. Elles sont ensuiteensemencées dans une plaque 96 puits, le volume ayant été calculé afin d'avoir une DO de 0,1 au final dans les puits, et incubées avec 200 μ L de milieu contenant les différentes concentrations en méthicilline. La DO est suivie sur 15 heures à 37°C avec le lecteur de plaques CLARIOstar. (**Schéma 9-6**)

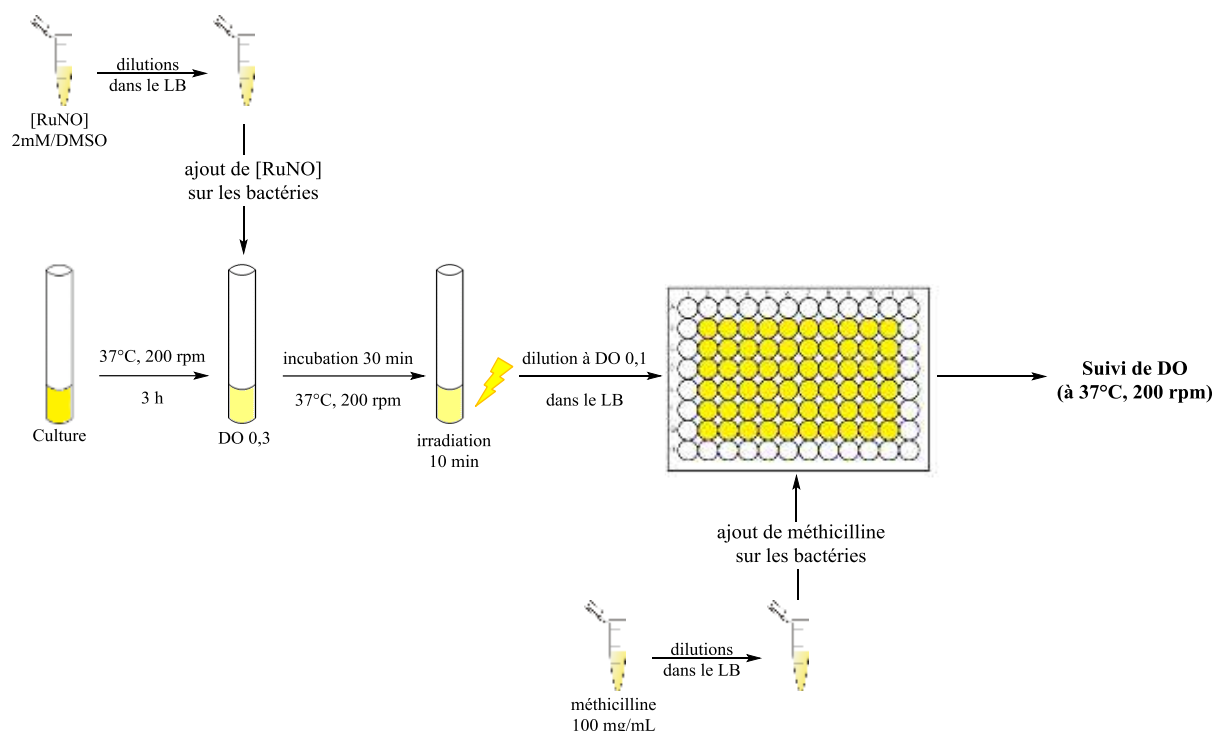


Schéma 9-6 : Protocole pour le suivi de DO des bactéries traitées par [RuNO], irradiées et mises en présence de différentes concentrations de méthicilline

Quantification de l'effet bactéricide du photoproduit de [RuNO]

Les solutions de [RuNO] de concentration 0,1 μM sont préparées dans le LB dans des tubes de culture et sont irradiées 10 min avec la lampe Hg. Les bactéries sont ensuite inoculées dans ces tubes puis 5 $\mu\text{g/mL}$ de méthicilline (correspondant à la CMI en présence de [RuNO] irradié) sont ajoutés dans les tubes correspondants. Les suspensions bactériennes sont alors étalées sur des boîtes de Pétri gélosées et incubées 24 heures à 37 °C. (**Schéma 9-7**)

Pour l'étude de l'effet des nitrites et nitrates, le même type d'expérimentation est réalisée. Les bactéries sont inoculées dans des tubes contenant NaNO_2 ou NaNO_3 à 0,01 μM dans le LB, puis 5 $\mu\text{g/mL}$ de méthicilline sont ajoutés. Les suspensions bactériennes sont diluées puis étalées sur boîtes de Pétri gélosées. (**Schéma 9-7**)

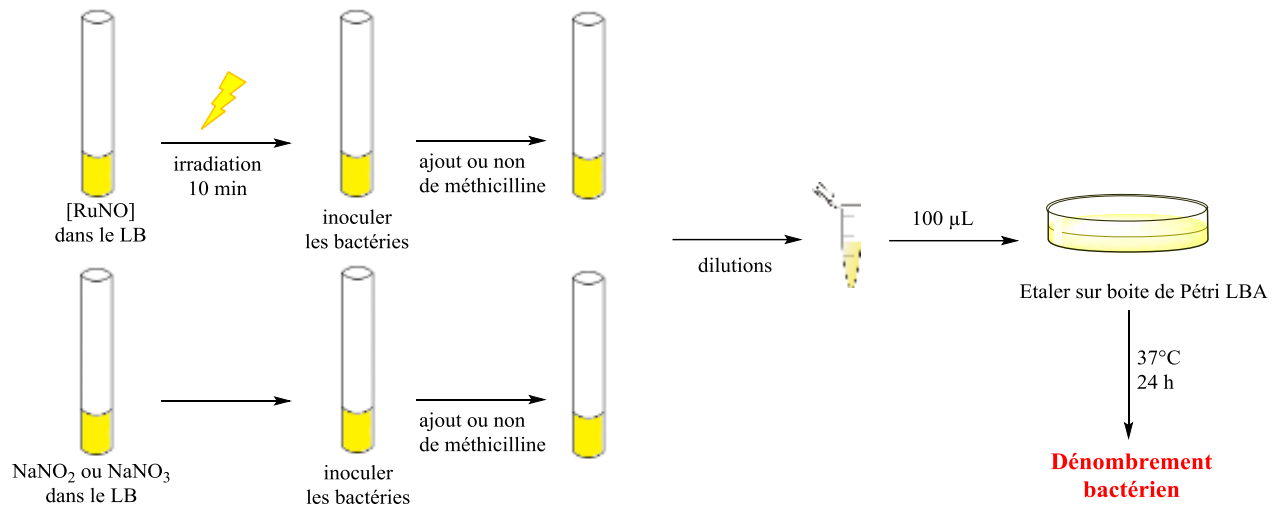


Schéma 9-7 : Protocole de quantification de l'effet bactéricide du photoproduit et des nitrites et nitrates

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- ¹ A.T. Dinh-Xuan, « Nobel 98 : la part belle au NO », *médecine/sciences*, **1998**, 14, 1297-300
- ² M. Kelm, « The L-arginine-nitric oxide pathway in hypertension », *Curr. Hypertens. Rep.*, **2003**, 5, 80–86.
- ³ H.Y. Yun, V.L. Dawson, T.M. Dawson, « Neurobiology of nitric oxide », *Crit. Rev. Neurobiol.*, **1996**, 10, 291–316.
- ⁴ S. Sasaki, T. Miura, S. Nishikawa, K. Yamada, M. Hirasue, A. Nakane, « Protective role of nitric oxide in Staphylococcus aureus infection in mice », *Infect. Immun.*, **1998**, 66, 1017-1022
- ⁵ J.A. Suwaidi, S. Hamasaki, S.T. Higano, R.A. Nishimura, D.R. Holmes Jr, A. Lerman, « Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. », *Circulation*, **2000**, 101, 948-954
- ⁶ B. Brüne, « Nitric oxide : NO apoptosis or turning it ON ? », *Cell Death Differ.*, **2003**, 10, 864-869
- ⁷ S. Choudhari, M. Chaudhary, S. Badge, A.R. Gadbail, V. Joshi, « Nitric Oxide and Cancer : a review », *World J. Surg. Oncol.*, **2013**, 118, 1-11
- ⁸ O. Traub, R. van Bibber, « Role of Nitric Oxide in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus-Related Vascular Complications », *West. J. Med.*, **1995**, 162, 439-445
- ⁹ F. Chiarelli, F. Cipollone, F. Romano, S. Tumini, F. Constantini, L. di Ricco, M. Pomilio, S.D. Pierdomenico, M. Marini, F. Cuccurullo, A. Mezzeti, « Increased Circulating Nitric Oxide in Young Patients With Type I Diabetes and Persistent Microalbuminuria », *Diabetes*, **2000**, 49, 1258-1263

-
- ¹⁰ H.G. Bernstein, B. Bogerts, G. Keilhoff, « The many faces of nitric oxide in schizophrenia. A review », *Schizophr. Res.*, **2005**, 78, 69-86
- ¹¹ R. Weller, R.J. Price, A.D. Ormerod, N. Benjamin, C. Leifert, « Antimicrobial effect of acidified nitrite on dermatophyte fungi, *Candida* and bacterial skin pathogens », *J. Appl. Microbiol.*, **2001**, 90, 648–652.
- ¹² A. Ghaffari, D.H. Neil, A. Ardakani, J. Road, A. Ghahary, C.C. Miller, « A direct nitric oxide gas delivery system for bacterial and mammalian cell cultures », *Nitric Oxide*, **2005**, 12, 129-140
- ¹³ S. Mocellin, V. Bronte, D. Nitti, « Nitric Oxide, a Double Edged Sword in Cancer Biology: Searching for Therapeutic Opportunities », *Med. Res. Rev.*, **2007**, 27(3), 317-352
- ¹⁴ J. O’neill, « Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report And Recommendations », *The Review On Antimicrobial Resistance*, **2016**
- ¹⁵ M.J. Rose, P.K. Mascharak, « Photoreactive Ruthenium Nitrosyls : Effect of Light and Potential Applications as NO Donors », *Coord. Chem. Rev.*, **2008**, 252, 2093-2114
- ¹⁶ E. Tfouni, M. Krieger, B.R. McGarvey, D.W. Franco, « Structure, chemical and photochemical reactivity and biological activity of some ruthenium amine nitrosyl complexes », *Coord. Chem. Rev.*, **2003**, 236, 57-69
- ¹⁷ N.L. Fry, P.K. Mascharak, « Photoactive Ruthenium Nitrosyls as NO Donors: How To Sensitize Them toward Visible Light », *Acc. Chem. Res.*, **2011**, 44(4),289–298
- ¹⁸ S. Weckslar, A. Mikhailovsky, P.C. Ford, « Photochemical Production of Nitric Oxide via Two-Photon Excitation with NIR Light », *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 13566-13567
- ¹⁹ R.F. Furchgott, J.V. Zawadzki, « The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine », *Nature*, **1980**, 288, 373-376

- ²⁰ W.P. Arnold, C.K. Mittal, S. Katsuki, F. Murad, « Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3'5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations », *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1977**, 74, 3203-3207
- ²¹ R.M. Rapoport, M.B. Draznin, F. Murad, « Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation », *Nature*, **1983**, 306, 174-176
- ²² L.J. Ignarro, R.E. Byrns, K.S. Wood, « Biochemical and pharmacological properties of endothelium-derived relaxing factor and its similarity to nitric oxide radical », New York, Raven Press, **1988**, 427-435
- ²³ L. Ignarro, G. Buga, K. Wood, R. Byrns, G. Chaudhuri, « Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide », *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1987**, 84, 9265-9269
- ²⁴ R.M.J. Palmer, A.G. Ferrige, S. Moncada, « Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor », *Nature*, **1987**, 327, 524-526
- ²⁵ I.G. Zacharia, W.M. Deen, « Diffusivity and solubility of nitric oxide in water and saline », *Ann. Biomed. Eng.*, **2005**, 33, 2, 214-222
- ²⁶ J.A. McCleverty, « Chemistry of nitric oxide relevant to biology », *Chem. Rev.*, **2004**, 104(2), 413-418
- ²⁷ J.S. Stamler, D.J. Singel, J. Loscalzo, « Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms », *Science*, **1992**, 258, 1898-1902
- ²⁸ D.M. Stanbury, « Reduction potentials involving inorganic free radicals in aqueous solution », *Adv. Inorg. Chem.*, **1989**, 33, 69-138
- ²⁹ M.D. Bartberger, W. Liu, E. Ford, K.M. Miranda, C. Switzer, J.M. Fukuto, P.J. Farmer, D.A. Wink, K.N. Houk, « The reduction potential of nitric oxide (NO) and its importance to NO biochemistry », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2002**, 99, 10958

- ³⁰ P. Natalis, J.E. Collin, J. Delwiche, G. Caprache, M.J. Hubin, « Ionization energy values for the transitions NO^+ , $X^1 \Sigma^+(v' = 0-34) \leftarrow \text{NO}$, $X^2 \Pi(v'' = 0)$ and molecular constants of nitric oxide ground ionic state, determined by Ne(I) (73.6 nm) photoelectron spectroscopy », *J. Electron. Spectrosc. Related. Phenom.*, **1979**, 17, 421
- ³¹ M.W. Siegel, R.J. Celotta, J.L. Hall, J. Levine, R.A. Bennett, « Molecular Photodetachment Spectrometry. I. The Electron Affinity of Nitric Oxide and the Molecular Constants of NO^- », *Phys. Rev. A.*, **1972**, 6, 607
- ³² J.M. Fukuto, « Chemistry of nitric oxide : biologically relevant aspects », in Nitric Oxide : Biochemistry, Molecular Biology and Therapeutic implications, Advances in Pharmacology, Academic Press Inc.
- ³³ W.K. Alderton, C.E. Cooper, R.G. Knowles, « Nitric oxide synthases : structure, function and inhibition », *Biochem. J.*, **2001**, 357, 593-615
- ³⁴ W. Xu, L.Z. Liu, M. Loizidou, M. Ahmed, I.G. Charles, « The role of nitric oxide in cancer », *Cell Research*, **2002**, 12(5-6), 311-320
- ³⁵ B.A. Patela, M. Moreaua, J. Widoma, H. Chenb, L. Yinb, Y. Huab, B.R. Cranea, « Endogenous nitric oxide regulates the recovery of the radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* from exposure to UV light », *PNAS*, **2009**, 106 (43), 18183–18188
- ³⁶ N.M. van Sorge, F.C. Beasley, I. Gusarov, D.J. Gonzalez, M. von Köckritz-Blickwede, S. Anik, A.W. Borkowski, P.C. Dorrestein, E. Nudler, V. Nizet, « Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Bacterial Nitric-oxide Synthase Affects Antibiotic Sensitivity and Skin Abscess Development », *J. Biol. Chem.*, **2013**, 288 (9), 6417-6426
- ³⁷ I. Gusarov, M. Starodubtseva, Z.Q.Wang, L. McQuade, S.J. Lippard, D.J. Stuehr, E. Nudler, « Bacterial Nitric-oxide Synthases Operate without a Dedicated Redox Partner », *J. Biol. Chem.*, **2008**, 283 (19), 13140-13147
- ³⁸ M. Kelm, « Nitric Oxide metabolism and breakdown », *Biochimica et Biophysica Acta*, **1999**, 1411, 273-289

- ³⁹ D.D. Thomas, L.A. Ridnour, J.S. Isenberg, W. Flores-Santana, C.H. Switzer, S. Donzelli, P. Hussain, C. Vecoli, N. Paolocci, S. Ambs, C.A. Colton, C.C. Harris, D.D. Roberts, D.A. Wink, « The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. », *Free Radic. Biol. M.*, **2008**, 45, 18-31
- ⁴⁰ C. Helms, D.B. Kim-Shapiro, « Hemoglobin-mediated nitric oxide signaling », *Free Radic. Biol. Med.*, **2013**, 464-472
- ⁴¹ R. Feil, S.M. Lohmann, H. de Jonge, U. Walter, F. Hofmann, « Cyclic GMP-Dependent Protein Kinases and the Cardiovascular System Insights From Genetically Modified Mice », *Circ. Res.*, **2003**, 93, 907-916
- ⁴² J.R. Steinert, T. Chernova, I.D. Forsythe, « Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. », *Neuroscientist.*, **2010**, 16(4), 435-52.
- ⁴³ J. Garthwaite, « Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission », *Eur J Neurosci.*, **2008**, 27(11), 2783–2802.
- ⁴⁴ J. Coleman, « Nitric oxide in immunity and inflammation », *Int. Immunopharmacol.*, **2001**, 1, 1397-1406
- ⁴⁵ R.S. Flannagan, G. Cosío, S. Grinstein, « Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies », *Nat. Rev. Microbiol.*, **2009**, 7(5), 355-66
- ⁴⁶ G. Ferrer-Sueta, R. Radi, « Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals », *ACS Chem. Biol.*, **2009**, 4(3), 161-177.
- ⁴⁷ J.C. Toledo Jr., O. Augusto, « Connecting the Chemical and Biological Properties of Nitric Oxide », *Chem. Res. Toxicol.*, **2012**, 25, 975–989
- ⁴⁸ T.L. Kinkel, S. Ramos-Montañez, J.M. Pand, D.V. Tade, E.N. Strom, S.J. Libby, F.C. Fang, « An essential role for bacterial nitric oxide synthase in *Staphylococcus aureus* electron transfer and colonization. », *Nat. Microbiol.*, **2016**, 2, 16224.

-
- ⁴⁹ I. Gusarov, K. Shatalin, M. Starodubtseva, E. Nudler, « Endogenous nitric oxide protects bacteria against a wide spectrum of antibiotics », *Science*, **2009**, 325, 1380–1384
- ⁵⁰ L. Kobzik, « Translating NO Biology into Clinical Advances Still Searching for the Right Dictionary ? », *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **2009**, 41, 9–13
- ⁵¹ K. Ikeyama, S. Fuziwara, M. Denda, « Topical Application of Neuronal Nitric Oxide Synthase Inhibitor Accelerates Cutaneous Barrier Recovery and Prevents Epidermal Hyperplasia Induced by Barrier Disruption », *J. Investig. Dermatol.*, **2007**, 127(7), 1713-1719
- ⁵² E.M. Hetrick, M.H. Schoenfisch, « Analytical Chemistry of Nitric Oxide », *Annu. Rev. Anal. Chem.*, **2009**, 2, 409-433
- ⁵³ T. Nagano, « Practical methods for detection of nitric oxide », *Luminescence*, **1999**, 14, 283-290
- ⁵⁴ D. Tsikas, « Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the l-arginine/nitric oxide area of research », *J. Chromatogr. B*, **2007**, 851, 51-70
- ⁵⁵ P.N. Coneski, M.H. Schoenfisch, « Nitric Oxide release : part III. Measurement and reporting », *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41, 3753-3758
- ⁵⁶ P. Griess, *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, **1879**, 12, 426-428
- ⁵⁷ M. Murphy, E. Noack, « Nitric oxide assay using hemoglobin method », *Methods Enzymol.*, **1994**, 233, 240-250
- ⁵⁸ N. Hogg, « Detection of nitric oxide by electron paramagnetic resonance spectroscopy », *Free Radic. Biol. Med.*, **2010**, 49, 122-129
- ⁵⁹ A.L. Kleschyov, P. Wenzel, T. Munzel, « Electron paramagnetic resonance (EPR) spin trapping of biological nitric oxide », *J. Chromatogr. B*, **2007**, 851, 12-20

- ⁶⁰ H. Kon, « Paramagnetic Resonance Study of Nitric Oxide Hemoglobin », *J. Biol. Chem.*, **1968**, 243, 4350-4357
- ⁶¹ B.J. Privett, J.H. Shin, M.H. Schoenfisch, « Electrochemical nitric oxide sensors for physiological measurements », *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 1925-1935
- ⁶² F. Bedioui, S. Griveauau, « Electrochemical Detection of Nitric Oxide: Assesment of Twenty Years of Strategies », *Electroanalysis*, **2013**, 25(3), 587-600
- ⁶³ E.L. Heinzen, G.M. Pollack, « Use of an electrochemical nitric oxide sensor to detect neuronal nitric oxide production in conscious, unrestrained rats », *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **2002**, 48, 139-146
- ⁶⁴ B.M. Bennet, D.C. Leitman, H. Schroder, J.H. Kawamoto, K. Nakatsu, F. Murad, « Relationship between biotransformation of glyceryl trinitrate and cyclic GMP accumulation in various culture cell lines », *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1989**, 250, 316-323
- ⁶⁵ P.G. Wang, M. Xian, X. Tang, X. Wu, Z. Wen, T. Cai, A.J. Janczuk, « Nitric Oxide Donors : Chemical Activities and Biological Applications », *Chem. Rev.*, **2002**, 102, 1091-1134
- ⁶⁶ M.R. Miller, I.L. Megson, « Recent developements in nitric oxide donor drugs », *Br. J. Pharmacol.*, **2007**, 151, 305-321
- ⁶⁷ J.A. Hrabie, L.K. Keefer, « Chemistry of the Nitric Oxide-releasing Diazeniumdiolate ("Nitrosohydroxylamine") Functional Group and its Oxygen-Substituted Derivatives », *Chem. Rev.*, **2002**, 102, 1135-1154
- ⁶⁸ W.M. Sharman, C.M. Allen, J.E. van Lier, « Photodynamic therapeutics : basic principles and clinical applications », *Drug Discov. Today*, **1999**, 4(11), 507-517
- ⁶⁹ P.G. Calzavara-Pinton, M. Venturini, R. Sada, « Photodynamic therapy : update 2006. Part I : Photochemsitry and photobiology », *JEADV*, **2007**, 21, 293-302

- ⁷⁰ G.M. Fioramonti Calixto, J. Bernegossi, L. Marise de Freitas, C. R. Fontana, M. Chorilli, « Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review », *Molecules*, **2016**, 21(3), 342
- ⁷¹ S. Bonnet, « Why develop PhotoActivated Chemotherapy ? », *Dalton Trans.*, **2018**, 47, 10330-10343
- ⁷² M. Schafer, C. Schmitz, R. Facius, G. Horneck, B. milow, K.H. Funken, J. Ortner, « Systematic study of parameters influencing the action of Rose Bengal with visible light on bacterial cells : comparison between the biological effect and singlet oxygen production », *Photochem. Photobiol.*, **2000**, 71, 514-523
- ⁷³ M. Bhatti, A. MacRobert, S. Meghji, B. Henderson, M. Wilson, « A study of the uptake of toluidine blue O by Porphyromonas Gingivalis and the mechanism of lethal photosensitization », *Photochem. Photobiol.*, **1998**, 68, 370-376
- ⁷⁴ K. Sahu, M. Sharma, H. Bansal, A. Dube, P. K. Gupta, « Topical photodynamic treatment with poly-L-lysine–chlorin p6 conjugate improves wound healing by reducing hyperinflammatory response in Pseudomonas aeruginosa-infected wounds of mice », *Lasers Med Sci*, **2013**, 28, 465–471
- ⁷⁵ A. Frei, R. Rubbiani, S. Tubafard, O. Blacque, P. Anstaett, A. Felgenträger, T. Maisch, L. Spicca, G. Gasser, « Synthesis, Characterization, And Biological Evaluation of New Ru(II) Polypyridyl Photosensitizers for Photodynamic therapy », *J. Med. Chem.*, **2014**, 57, 7280-7292
- ⁷⁶ J. Gil-Tomás, L. Dekker , N. Narband, I. P. Parkin, S. P. Nair, C. Street, M. Wilson, « Lethal photosensitisation of bacteria using a tin chlorin e6–glutathione–gold nanoparticle conjugate », *J. Mater. Chem.*, **2011**, 21, 4189-4196
- ⁷⁷ N. Chavain, C. Biot, « Organometallic complexes : new tools for chemotherapy », *Curr. Med. Chem. Rev.*, **2010**, 17, 2729-2745

- ⁷⁸ G. Gasser, N. Metzler-Nolte, « The potential of organometallic complexes in medicinal chemistry », *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2012**, 16, 84–91
- ⁷⁹ R.E. Mahnken, M.A. Billadeau, E.P. Nikonowicz, H. Morrison, « Reaction of d5-Dichlorobis(1,10-phenanthroline)rhodium(III) with Calf Thymus DNA, Nucleotides, and Nucleosides », *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 9253-9265
- ⁸⁰ A. Levina, A. Mitra, P.A. Lay, « Recent developments in ruthenium anticancer drugs », *Metallomics*, **2009**, 1, 458–470.
- ⁸¹ A. Bergamo, G. Sava, « Ruthenium anticancer compounds: myths and realities of the emerging metal-based drugs », *Dalton Trans.*, **2011**, 40, 7817–7823.
- ⁸² W.H. Ang, A. Casini, G. Sava, P.J. Dyson, « Organometallic ruthenium-based antitumor compounds with novel modes of action. », *J. Organomet. Chem.*, **2011**, 696, 989–998.
- ⁸³ N.L. Kilah, E. Meggers, « Sixty years young: the diverse biological activities of metal polypyridyl complexes pioneered by Francis P. Dwyer », *Aust. J. Chem.*, **2012**, 65, 1325–1332.
- ⁸⁴ C. Scolaro, A. Bergamo, L. Brescacin, R. Delfino, M. Cocchietto, G. Laurencyzy, T.J. Geldbach, G. Sava, P.J. Dyson, « In vitro and in vivo evaluation of ruthenium(II)–arene PTA complexes », *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 4161–4171.
- ⁸⁵ S.J. Dougan, A. Habtemariam, S.E. McHale, S. Parsons, P.J. Sadler, « Catalytic organometallic anticancer complexes », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2008**, 105, 11628–11633.
- ⁸⁶ N.J. Farrer, L. Salassa, P.J. Sadler, « Photoactivated chemotherapy (PACT) : the potential of excited-state d-block metals in medicine », *Dalton Trans.*, **2009**, 10690-10701
- ⁸⁷ B. Cormary, S. Ladeira, K. Jacob, P. G. Lacroix, T. Woike, D. Schaniel, I. Malfant, « Structural Influence on the Photochromic Response of a Series of Ruthenium Mononitrosyl Complexes », *Inorg. Chem.*, **2012**, 51, 7492–7501

- ⁸⁸ P. Gütlich, Y. Garcia, T. Woike, « Photoswitchable coordination compounds », *Coord. Chem. Rev.*, **2001**, 219–221, 839–879
- ⁸⁹ L. Khadeeva, W. Kaszub, M. Lorenc, I. Malfant, M. Buron-Le Cointe, « Two-step photon absorption driving the chemical reaction in the model ruthenium nitrosyl system [Ru(py)₄Cl(NO)](PF₆)₂·1/2H₂O », *Inorg. Chem.* **2016**, 55(9), 4117-4123
- ⁹⁰ J. Sanz García, F. Alary, M. Boggio-Pasqua, I. M. Dixon, I. Malfant, J.L. Heully, « Establishing the two-photon linkage isomerization mechanism in the nitrosyl complex *trans*-[RuCl(NO)(py)₄]²⁺ by DFT and TDDFT. », *Inorg Chem*, **2015**, 54, 8310-8318
- ⁹¹ J.H. Enemark, R.R. Feltham, « Principles of structure, bonding, and Reactivity for metal nitrosyl complexes », *Coord. Chem Rev.*, **1974**, 13, 339-406
- ⁹² N.J. Patmore, « Photophysical properties of metal complexes », *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. A*, **2008**, 104, 498-528
- ⁹³ K. Szaciłowski, W. Macyk, G. Stochel, Z. Stasicka, S. Sostero, O. Traverso, « Ligand and medium controlled photochemistry of iron and ruthenium mixed-ligand complexes: prospecting for versatile systems », *Coord. Chem. Rev.*, **2000**, 208, 277-297
- ⁹⁴ A.K. Patra, R. Afshar, M.M. Olmstead, P.K. Mascharak, « The First Non-Heme Iron(III) Complex with a Ligated Carboxamido Group That Exhibits Photolability of a Bound NO Ligand », *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 2512-2515
- ⁹⁵ G.M. Halpenny, K.R. Gandhi, P.K. Mascharak, « Eradication of Pathogenic Bacteria by Remote Delivery of NO via Light Triggering of Nitrosyl-Containing Materials », *ACS Med. Chem. Lett.*, **2010**, 1, 180-183
- ⁹⁶ R. Galvao de Lima, M. Gama Sauaia, D. Bonaventura, A.C. Tedesco, R.F. Vianna Lopez, L.M. Bendhack, R. Santana da Silva, « Controlled nitric oxide photo-release from nitro ruthenium complexes: The vasodilator response produced by UV light irradiation », *Inorg. Chim. Acta*, **2005**, 358, 2643–2650

- ⁹⁷ J. Bourassa, W. DeGraff, S. Kudo, D.A. Wink, J. B. Mitchell, P.C. Ford, « Photochemistry of Roussin's Red Salt, $\text{Na}_2[\text{Fe}_2\text{S}_2(\text{NO})_4]$, and of Roussin's Black Salt, $\text{NH}_4[\text{Fe}_4\text{S}_3(\text{NO})_7]$. *In Situ* Nitric Oxide Generation To Sensitize γ -Radiation Induced Cell Death », *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 2853-2860
- ⁹⁸ J. Bourassa, B. Lee, S. Bernard, J. Schoonover, P.C. Ford, « Flash Photolysis Studies of Roussin's Black Salt Anion: $\text{Fe}_4\text{S}_3(\text{NO})_7$ », *Inorg. Chem.*, **1999**, 38, 2947-2952
- ⁹⁹ K. Ghosh, A.A. Eroy-Reveles, B. Avila, T.R. Holman, M.M. Olmstead, P.K. Mascharak, « Reactions of NO with Mn(II) and Mn(III) Centers Coordinated to Carboxamido Nitrogen: Synthesis of a Manganese Nitrosyl with Photolabile NO », *Inorg. Chem.*, **2004**, 43, 2988-2997
- ¹⁰⁰ M.J. Clarke, « Ruthenium metallopharmaceuticals », *Coord. Chem. Rev.*, **2002**, 232, 69-93
- ¹⁰¹ F. Bottomley, M. Mukaida, « Electrophilic behaviour of nitrosyls: preparation and reactions of six-co-ordinate ruthenium tetra(pyridine) nitrosyl complexes », *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1982**, 10, 1933-1937
- ¹⁰² A.G. De Candia, J.P. Marcolongo, R. Etchenique, L.D. Slep, « Widely Differing Photochemical Behavior in Related Octahedral $\{\text{Ru}-\text{NO}\}^6$ Compounds: Intramolecular Redox Isomerism of the Excited State Controlling the Photodelivery of NO », *Inorg. Chem.*, **2010**, 49, 6925-6930
- ¹⁰³ B. Cormary, I. Malfant, M. Buron-Le Cointe, L. Toupet, B. Delley, D. Schaniel, N. Mockus, T. Woike, K. Fejfarova, V. Petricek, M. Dusek, « $[\text{Ru}(\text{py})_4\text{Cl}(\text{NO})](\text{PF}_6)_2 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$: a model system for structural determination and *ab initio* calculations of photo-induced linkage NO isomers », *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci.*, **2009**, 65, 612-623.
- ¹⁰⁴ M. Gama Sauaia, F. de Souza Oliveira, A.C. Tedesco, R. Santana da Silva, « Control of NO release by light irradiation from nitrosyl ruthenium complexes containing polypyridyl ligands », *Inorg. Chim. Acta*, **2003**, 355, 191-196

- ¹⁰⁵ Hasan Shamran Mohammed, « Photoisomerization and photo-induced nitric oxide release in ruthenium nitrosyl complexes with pyridyl and bipyridyl based ligands », *Chimie organométallique de coordination*, Université Toulouse III Paul Sabatier, septembre 2017
- ¹⁰⁶ K. Karidi, A. Garoufis, A. Tsipis, N. Hadjiliadis, H. den Dulk, J. Reedijk, « Synthesis, characterization, *in vitro* antitumor activity, DNA-binding properties and electronic structure (DFT) of the new complex *cis*-(Cl,Cl)[Ru^{II}Cl₂(NO⁺)(terpy)]Cl », *Dalton Trans.*, **2005**, 1176-1187
- ¹⁰⁷ J. Akl, I. Sasaki, P.G. Lacroix, I. Malfant, S. Mallet-Ladeira, P. Vicendo, N. Farfán, R. Santillan, « Comparative photo-release of nitric oxide from isomers of substituted terpyridinenitrosylruthenium(II) complexes: experimental and computational investigations », *Dalton Trans.*, **2014**, 43, 12721-12733
- ¹⁰⁸ S. Amabilino, M. Tassé, P.G. Lacroix, S. Mallet-Ladeira, V. Pimienta, J. Akl, I. Sasaki, I. Malfant, « Photorelease of nitric oxide (NO) on ruthenium nitrosyl complexes with phenyl substituted terpyridines », *New J. Chem.*, **2017**, 41, 7371
- ¹⁰⁹ R. Galvão de Lima, M. Gama Sauaia, D. Bonaventura, A.C. Tedesco, L. Maria Bendhack, R. Santana da Silva, « Influence of ancillary ligand L in the nitric oxide photorelease by the [Ru(L)(tpy)NO]₃⁺ complex and its vasodilator activity based on visible light irradiation », *Inorg. Chim. Acta*, **2006**, 359, 2543–2549
- ¹¹⁰ C.F. Works, C.J. Jocher, G.D. Bart, X. Bu, P.C. Ford, « Photochemical Nitric Oxide Precursors : Synthesis, Photochemistry, and Ligand Substitution Kinetics of Ruthenium Salen Nitrosyl and Ruthenium Salophen Nitrosyl Complexes », *Inorg. Chem.*, **2002**, 41, 3728-3739
- ¹¹¹ C.F. Works, P.C. Ford, « Photoreactivity of the Ruthenium Nitrosyl Complex, Ru(salen)(Cl)(NO). Solvent Effects on the Back Reaction of NO with the Lewis Acid Ru^{III}(salen)(Cl) », *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 7592-7593
- ¹¹² N.L. Fry, B.J. Heilman, P. K. Mascharak, « Dye-Tethered Ruthenium Nitrosyls Containing Planar Dicarboxamide Tetradentate N₄ Ligands: Effects of In-Plane Ligand Twist on NO Photolability », *Inorg. Chem.*, **2011**, 50, 317–324

- ¹¹³ A. K. Patra, M.J. Rose, K.A. Murphy, M.M. Olmstead, P.K. Mascharak, « Photolabile Ruthenium Nitrosyls with Planar Dicarboxamide Tetradentate N4 Ligands: Effects of In-Plane and Axial Ligand Strength on NO Release », *Inorg. Chem.*, **2004**, 43, 4487-4495
- ¹¹⁴ M.J. Rose, M.M. Olmstead, P.K. Mascharak, « Photoactive ruthenium nitrosyls derived from quinoline- and pyridine- based ligands : accelerated photorelease of NO due to quinoline ligation », *Polyhedron*, **2007**, 26, 4713-4718
- ¹¹⁵ A. Vogel, V. Venugopalan, « Mechanisms of Pulsed Laser Ablation of Biological Tissues », *Chem. Rev.*, **2003**, 103, 577-644
- ¹¹⁶ S.K. Lyons, P.S. Patrick, K.M. Brindle, « Imaging Mouse Cancer Models In Vivo Using Reporter Transgenes », *Cold Spring Harb. Protoc.*, **2013**, 8, 685-699
- ¹¹⁷ J. D'Orazio, S. Jarrett, A. Amaro-Ortiz, T. Scott, « UV Radiation and the Skin », *Int. J. Mol. Sci.*, **2013**, 14, 12222-12248
- ¹¹⁸ C. Xu, W.W. Webb, « Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm », *J. Opt. Soc. Am. B.*, **1996**, 13, 481-491
- ¹¹⁹ M. Sheik-Bahae, A.A. Said, T. Wei, D.J. Hagan, E.W. Van Stryland, « Sensitive Measurement of Optical Nonlinearities Using a Single Beam », *J. Quant. Elect.*, **1990**, 26, 481-491
- ¹²⁰ S.R. Weckler, A. Mikhailovsky, D. Korystov, P.C. Ford, « A Two-Photon Antenna for Photochemical Delivery of Nitric Oxide from a Water-Soluble, Dye-Derivatized Iron Nitrosyl Complex Using NIR Light », *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 3831-3837
- ¹²¹ J. Akl, I. Sasaki, P. G. Lacroix, V. Hugues, P. Vicendo, M. Bocé, S. Mallet-Ladeira, M. Blanchard-Desce, I. Malfant, « *trans*- and *cis*-(Cl,Cl)-[Ru^{II}(FT)Cl₂(NO)](PF₆): promising candidates for NO release in the NIR region », *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2016**, 15, 1484-1491

- ¹²² Joëlle Akl, « Photolibération de NO dans les complexes de ruthénium à ligand nitrosyle : nouvelles perspectives en thérapie photodynamique par absorption à deux photons », *Chimie Organométallique et de Coordination*, Université Paul Sabatier, Novembre 2014.
- ¹²³ A. Enriquez-Cabrera, P.G. Lacroix, I. Sasaki, S. Mallet-Ladeira, N. Farfan, R.M. Barba-Barba, G. Ramos-Ortiz, I. Malfant, « Comparison of Carbazole and Fluorene Donating Effects on the Two-Photon Absorption and Nitric Oxide Photorelease Capabilities of a Ruthenium–Nitrosyl Complex », *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2018**, 531–543
- ¹²⁴ C. Fowley, A.P. McHale, B. McCaughan, A. Fraix, S. Sortino, J.F. Callan, « Carbon Quantum dot-NO photoreleaser nanohybrids for two-photon phototherapy of hypoxic tumors », *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 81-84
- ¹²⁵ J.B. Godwin, T.J. Meyer, « The Preparation of Ruthenium Nitrosyl Complexes Containing 2,2'-Bipyridine and 1,10-Phenanthroline », *Inorg. Chem.*, **1971**, 10(3), 471-474
- ¹²⁶ S. Frantz, B. Sarkar, M. Sieger, W. Kaim, F. Roncaroli, J.A. Olabe, S. Zális, « EPR Insensitivity of the Metal-Nitrosyl Spin-Bearing Moiety in Complexes $[LnRuII-NO\cdot]^k$ », *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2004**, 2902-2907
- ¹²⁷ C.D. Bryan, T.A. Bryan, A.W. Cordes, B. Durham, D. Jeter, J.C. Yarbrough, « Structure of chlorohydroxynitrosyl(terpyridine)ruthenium(II) hexafluorophosphate », *J. Chem. Crystallog.*, **1997**, 27(7), 413-415
- ¹²⁸ J.R. Durig, W.A. McAllister, J.N. Willis Jr., E.E. Mercer, « Far infrared spectra of potassium and ammonium pentahalogenitrosylruthenates », *Spectrochim. Acta*, **1966**, 22, 1091-1100
- ¹²⁹ H. Nagao, K. Enomoto, Y. Wakabayashi, G. Komiya, T. Hirano, T. Oi, « Synthesis of Nitrosylruthenium Complexes Containing 2,2':6',2''-Terpyridine by Reactions of Alkoxo Complexes with Acids », *Inorg. Chem.*, **2007**, 46, 1431-1439
- ¹³⁰ T. Hirano, K. Ueda, M. Mukaida, H. Nagao, T. Oi, « Reactions of $[RuCl_2(NO)(terpy)]$ (terpy = 2,2':6',2''-terpyridine) with mono anions such as NO_2^- , Br^- and N_3^- , and structural

studies on terpyridineruthenium having a nitrosyl ligand », *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **2001**, 2341–2345

¹³¹ A.D. Chowdhury, P. De, S.M. Mobin, G.K. Lahiri, « Influence of nitrosyl coordination on the binding mode of quinaldate in selective ruthenium frameworks. Electronic structure and reactivity aspects », *RSC Advances*, **2012**, 2, 3437–3446

¹³² <http://www.e-cancer.fr/>

¹³³ L.L. Thomsen, F.G. Lawton, R.G. Knowles, J.E. Beesley, V. Riveros-Moreno, S. Moncada, « Nitric oxide synthase activity in human gynecological cancer », *Cancer Res.*, **1994**, 54, 1352-1354

¹³⁴ L.L. Thomsen, D.W. Miles, L. Happerfield, L.G. Bobrow, R.G. Knowles, S. Moncada, « Nitric oxide synthase activity in human breast cancer », *Br. J. Cancer*, **1995**, 72, 41-44

¹³⁵ P.K.M. Kim, R. Zamora, P. Petrosko, T.R. Billiar, « The regulatory role of nitric oxide in apoptosis », *Int. Immunopharmacol.*, **2001**, 1, 1421-1441

¹³⁶ B. Bonavida, H. Garban, « Nitric oxide-mediated sensitization of resistant tumor cells to apoptosis by chemo-immunotherapeutics », *Redox Biol.*, **2015**, 6, 486-494

¹³⁷ K. Xie, S. Huang, Z. Dong, « Transfection with the inducible nitric oxide synthase gene suppresses tumorigenicity and abrogates metastasis by K-1735 murine melanoma cells », *J. Exp. Med.*, **1995**, 181, 1333-1343

¹³⁸ M.J. Rose, N.L. Fry, R. Marlow, L. Hinck, P.K. Mascharak, « Sensitization of Ruthenium Nitrosyls to Visible Light via Direct Coordination of the Dye Resorufin : Trackable NO Donors for Light-Triggered NO Delivery to Cellular Targets », *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 8834-8846

¹³⁹ F.P. Rodrigues, Z.A. Carneiro, P. Mascharak, C. Curti, R.S. da Silva, « Incorporation of a ruthenium nitrosyl complex into liposomes, the nitric oxide released from these liposomes and HepG2 cell death mechanism », *Coor. Chem. Rev.*, **2016**, 306, 701-707

- ¹⁴⁰ H.J. Xiang, L. An, W.W. Tang, S.P. Yang, J.G. Liu, « Photo-controlled targeted intracellular delivery of both nitric oxide and singlet oxygen using a fluorescence-trackable ruthenium nitrosyl functional nanoplatfrom », *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 2555-2558
- ¹⁴¹ A.J. Gomes, E.M. Espreafico, E. Tfouni, « trans-[Ru(NO)Cl(cyclam)](PF₆)₂ and [Ru(NO)(Hedta)] Incorporated in PLGA Nanoparticles for the Delivery of Nitric Oxide to B16–F10 Cells: Cytotoxicity and Phototoxicity », *Mol. Pharmaceutics*, **2013**, 10, 3544–3554
- ¹⁴² D.A. Wink, J.A. Cook, D. Christodoulou, M.C. Krishna, R. Pacelli, S. Kim, W. DeGraff, J. Gamson, Y. Vodovotz, A. Russo, J.B. Mitchell, « Nitric oxide and some nitric oxide donor compounds enhance the cytotoxicity of cisplatin », *Nitric Oxide*, **1997**, 1, 88-94
- ¹⁴³ C.B. Evig, E.E. Kelley, C.J. Weydert, Y. Chu, G.R. Buettner, C.P. Burns, « Endogenous production and exogenous exposition to nitric oxide augment doxorubicin cytotoxicity for breast cancer cells but not cardiac myoblasts », *Nitric Oxide*, **2004**, 10, 119-129
- ¹⁴⁴ L. Jia, J. Schweizer, Y. Wang, C. Cerna, H. Wong, M. Revilla, « Effect of nitric oxide on cytotoxicity of Taxol : enhanced Taxol transcellular permeability », *Biochem. Pharmacol.*, **2003**, 66, 2193-2199
- ¹⁴⁵ <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/resistance-aux-antibiotiques>
- ¹⁴⁶ EK. Silbergeld, J Graham, L.B. Price, « Industrial Food Animal Production, Antimicrobial Resistance, and Human Health », *Annu. Rev. Public Health*, **2008**, 29, 151–69
- ¹⁴⁷ Collégiale des enseignants de bactériologie-virologie-hygiène, UMVF - Université Médicale Virtuelle Francophone, « Structure et physiologie de la bactérie : Anatomie – Structure », **2014**
- ¹⁴⁸ C. Walsh, « Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance », *Nature*, **2000**, 406, 775-781
- ¹⁴⁹ H.C. Flemming, J. Wingender, U. Szewzyk, P. Steinberg, S.A. Rice, S. Kjelleberg, « Biofilms: an emergent form of bacterial life », *Nat. Rev. Microbiol.*, **2016**, 14, 563-575

- ¹⁵⁰ N. Barraud, M.J. Kelso, S.A. Rice, S. Kjelleberg, « Nitric Oxide: A Key Mediator of Biofilm Dispersal with Applications in Infectious Diseases », *Curr. Pharm. Des.*, **2015**, 21, 31-42
- ¹⁵¹ N. Barraud, D. Schleheck, J. Klebensberger, J.S. Webb, D.J. Hassett, S.A. Rice, S. Kjelleberg, « Nitric oxide signaling in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal », *J. Bacteriol.*, **2009**, 191, 7333-7342
- ¹⁵² N. Barraud, D.J. Hassett, S.H. Hwang, S.A. Rice, S. Kjelleberg, J.S. Wenn, « Involvement of Nitric Oxide in Biofilm Dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* », *J. Bacteriol.*, **2006**, 188, 7344-7353
- ¹⁵³ A. Roux, J. M. Ghigo, « Les biofilms bactériens », *Bull. Acad. Vét. Fr.*, **2006**, 159, 261-268
- ¹⁵⁴ A.E. Namvar, S. Bastarahang, N. Abbasi, G.S. Ghehi, S. Farhadbakhtiaran, P. Arezi, M. Hosseini, S.Z. Baravati, Z. Jokar, S.G. Chermahin, « Clinical characteristics of *Staphylococcus epidermidis*: a systematic review », *GMS Hygiene and Infection Control* **2014**, 9(3), 2196-5226
- ¹⁵⁵ M. Otto, « Staphylococcal biofilms », *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **2008**, 322, 207-228
- ¹⁵⁶ H. Rohde, S. Frankenberger, U. Zähringer, D. Mack, « Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections », *Eur. J. Cell Biol.*, **2010**, 89, 103-111
- ¹⁵⁷ J.N. Anderl, M.J. Franklin, P.S. Stewart, « Role of Antibiotic Penetration Limitation in *Klebsiella pneumoniae* Biofilm Resistance to Ampicillin and Ciprofloxacin », *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **2000**, 44, 1818-1824

- ¹⁵⁸ P.S. Stewart, « Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms », *Int. Med. Microbiol.*, **2002**, 292, 107-113
- ¹⁵⁹ N. Høiby, T. Bjarnsholt, M. Givskov, S. Molin, O. Ciofu, « Antibiotic resistance of bacterial biofilms », *Int. J. Antimicrob. Agents*, **2010**, 35, 322-332
- ¹⁶⁰ P.S. Stewart, J.W. Costerton, « Antibiotic resistance of bacteria in biofilms », *Review The Lancet*, **2001**, 358, 135-138
- ¹⁶¹ H. Koo, R.N. Allan, R.P. Howlin, P. Stoodley, L. Hall-Stoodley, « Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies », *Nat. Rev. Microbiol.*, **2017**, 15, 740–755
- ¹⁶² N. Barraud, M.V Store, Z.P. Moore, J.S. Webb, S.A. Rice, S. Kjelleberg, « Nitric oxide-mediated dispersal in single- and multi-species biofilms of clinically and industrially relevant microorganisms », *Microb. Biotechnol.*, **2009**, 2(3), 370-378
- ¹⁶³ F.C. Fang, « Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species : concepts and controversies », *Nat. Rev. Microbiol.*, **2004**, 2(10), 820-32.
- ¹⁶⁴ F.C. Fang, « Mechanisms of Nitric Oxide-related Antimicrobial Activity », *J. Clin. Invest.*, **1997**, 99(12), 2818-2825
- ¹⁶⁵ A.Ghaffari, C.C. Miller, B. McMullin, et al, « Potential application of gaseous nitric oxide as topical antimicrobial agent », *Nitric Oxide*, **2006**, 14, 21-29
- ¹⁶⁶ S.A. Collins, M.J. Kelso, A. Rineh, N.R. Yepuri, J. Coles, C.L. Jackson, G.D. Halladay, W.T. Walker, J.S. Webb, L. Hall-Stoodley, G.J. Connett, M. Feelisch, S.N. Faust, J.S.A. Lucas, R.N. Allan, « Cephalosporin-3'-Diazeniumdiolate NO Donor Prodrug PYRRO-C3D Enhances Azithromycin Susceptibility of Nontypeable *Haemophilus influenzae* Biofilms », *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **2016**, 61, e02086-16

- ¹⁶⁷ B.J. Nablo, H.L. Prichard, R.D. Butler, B. Klitzman, M.H. Schoenfisch, « Inhibition of implant-associated infections via nitric oxide release », *Biomaterials*, **2005**, 26, 6984-6990
- ¹⁶⁸ G.M. Halpenny, R.C. Steinhardt, K.A. Okialda, P.K. Mascharak, « Characterization of pHEMA-based hydrogels that exhibit light-induced bactericidal effect via release of NO », *J. Mater. Sci. : Mater. Med.*, **2009**, 20, 2353-2360
- ¹⁶⁹ B. Heilman, P.K. Mascharak, « Light-triggered nitric oxide delivery to malignant sites and infection », *Phil. Trans. R Soc. A.*, **2013**, 371(1995), 20120368
- ¹⁷⁰ J. Dolansky, P. Henke, Z. Malá, L. Zarská, P. Kubát, J. Mosinger, « Antibacterial nitric oxide- and singlet oxygen- releasing polystyrene nanoparticles responsive to light and temperature triggers », *Nanoscale*, **2018**, 10, 2639-2648
- ¹⁷¹ S. Babaei, K. Teichert-Kuliszewska, J.C. Monge, F. Mohamed, M.P. Bendeck, D.J. Stewart, « Role of nitric oxide in the angiogenic response in vitro to basic fibroblast growth factor », *Circ. Res.*, **1998**, 82, 1007-1015
- ¹⁷² N. Barraud, B.G. Kardak, N.R. Yepuri, R.P. Howlin, J.S. Webb, S.N. Faust, S. Kjelleberg, S.A. Rice, M.J. Kelso, « Cephalosporin-3'-duaziumdiolates : Targeted NO-Donor Prodrug for Dispersing Bacterial Biofilms », *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51, 9057-9060
- ¹⁷³ J. Akl, C. Billot, P. G. Lacroix, I. Sasaki, S. Mallet-Ladeira, I. Malfant, R. Arcos-Ramos, M. Romero, N. Farfán, « Molecular materials for switchable nonlinear optics in the solid state, based on ruthenium-nitrosyl complexes », *New J. Chem.*, **2013**, 37, 3518-3527
- ¹⁷⁴ G. Ramos-Ortíz, J.L. Maldonado, M.C.G. Hernández, M.G. Zolotukhin, S. Fomine, N. Fröhlich, U. Scherf, F. Galbrecht, E. Preis, M. Salmon, J. Cárdenas, M.I. Chávez, « Synthesis, characterization and third-order non-linear optical properties of novel fluorene monomers and their cross-conjugated polymers », *Polymer*, **2010**, 51, 2351-2359
- ¹⁷⁵ O. Mongin, L. Porrès, M. Charlot, C. Katan, M. Blanchard-Desce, « Synthesis, Fluorescence, and Two-Photon Absorption of a Series of Elongated Rodlike and Banana-

Shaped Quadrupolar Fluorophores: A Comprehensive Study of Structure–Property Relationships », *Chem. Eur. J.*, **2007**, 13, 1481 – 1498

¹⁷⁶ K.R.J. Thomas, J.T. Lina, C.P. Chang, C.H. Chuen, C.C. Cheng, « Zinc(II) and Ruthenium(II) Complexes of Novel Fluorene Substituted Terpyridine Ligands: Synthesis, Spectroscopy and Electrochemistry », *J. Chin. Chem. Soc.*, **2002**, 49, 833-840

¹⁷⁷ F. Krohnke, « The Specific Synthesis of Pyridines and Oligopyridines », *Synthesis*, **1976**, 1, 1-24

¹⁷⁸ A.Enriquez-Cabrera, I. Sasaki, V. Bukhanko, M. Tassé, S. Mallet-Ladeira, P. G. Lacroix, R. M. Barba-Barba, G. Ramos, N. Farfán, Z. Voitenko, I. Malfant, « Replacing two Chloride Anions by a Bipyridine in Ruthenium Nitrosyl (NO) Complexes with NO Release Capabilities: a Comparative Study », *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2017**, 1446–1456

¹⁷⁹ A.F. Vanin, A. P. Poltorakov, V. D. Mikoyan, L. N. Kubrina and E. van Faassen, « Why iron-dithiocarbamates ensure detection of nitric oxide in cells and tissues », *Nitric Oxide*, **2006**, 15, 295–311

¹⁸⁰ J. Liu, Q. Duan, J. Wang, Z. Song, X. Qiao and H. Wang, «Photocontrolled nitric oxide release from two nitrosylruthenium isomer complexes and their potential biomedical applications », *J. Biomed. Opt.*, **2015**, 20(1), 015004-1–015004-7.

¹⁸¹ Gaussian 09, Revision E.01, M. J.Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S.

Dapprich, A.D. Daniels, Ö. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT (2009)

¹⁸² P.J. Hay, W.R. Wadt, «*Ab initio* effective core potentials for molecular calculations. Potentials for the transition metal atoms Sc to Hg », *J. Chem. Phys.*, **1985**, 82, 270-283

¹⁸³ W.R. Wadt, P.J. Hay, «*Ab initio* effective core potentials for molecular calculations. Potentials for main group elements Na to Bi. », *J. Chem. Phys.*, **1985**, 82, 284-298

¹⁸⁴ P.J. Hay, W. R Wadt., «*Ab initio* effective core potentials for molecular calculations. Potentials for K to Au including the outermost core orbitals. », *J. Chem. Phys.*, **1985**, 82, 299-310

¹⁸⁵ M.J. Rose, P.K. Mascharak, « Photosensitization of ruthenium nitrosyls to red light with an isoelectronic series of heavy-atom chromophores: Experimental and Density Functional Theory studies on the effects of O-, S- and Se-substituted coordinated dyes », *Inorg. Chem.*, **2009**, 48, 6904-6917

¹⁸⁶ P. Hirva, M. Haukka, M. Jakonen, « DFT tests for group 8 transition metal carbonyl complexes », *J. Mol. Model.*, **2008**, 14, 171-181

¹⁸⁷ <http://sites.Google.com/site/allouchear/Home/gabedit>

¹⁸⁸ J.S. García, F. Alary, M. Boggio-Pasqua, I.M. Dixon, J.L. Heuilly, « Is photoisomerization required for NO photorelease in ruthenium nitosyl complexes ? », *J. Mol. Model.*, **2016**, 22, 284

¹⁸⁹ M. Montalti, A. Credi, L. Prodi, M.T. Gandolfi, “Handbook of photochemistry – Chapter 12 : Chemical Actinometry”, *Taylor Group*, **2006**

¹⁹⁰ C.G. Hatchard and C.A. Parker, « A new sensitive chemical actinometer. II. Potassium ferrioxalate as a standard chemical actinometer », *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, **1956**, 235, 1203, 518-536

¹⁹¹ V. Pimienta, C. Frouté, M.H. Deniel, D. Lavabre, R. Guglielmetti, J. C. Micheau, « Kinetic modelling of the photochromism and photodegradation of a spiro[indoline-naphthoxazine] », *J. Photochem. Photobiol. A*, **1999**, 122, 199-204

¹⁹² Programme de Simulation et d'ajustement :
http://cinet.chim.pagespersoorange.fr/tele_sa/presentation_Sa.html

¹⁹³ R. Galvão de Lima, B. Rodrigues Silva, R. Santana da Silva, L. Maria Bendhack, « Ruthenium Complexes as NO Donors for Vascular Relaxation Induction », *Molecules*, **2014**, 19, 9628-9654

¹⁹⁴ M. Göppert-Mayer, « Elementary processes with two quantum transitions », *Ann. Phys.*, **1931**, 401, 273

¹⁹⁵ G.P. Das, A.T. Yeates, D.S. Dudis, « Computational model to predict two-photon absorption resonances », *J. Opt. Soc. Am. B*, **1997**, 14(9), 2325-2330

¹⁹⁶ F. Wang, H. Chen, S. Parsons, I. D. H. Oswald, J. E. Davidson, P. J. Sadler, « Kinetics of Aquation and Anation of Ruthenium(ii) Arene Anticancer Complexes, Acidity and X-ray Structures of Aqua Adducts », *Chem. Eur. J.*, **2003**, 9, 5810-5820

¹⁹⁷ M. Hirahara, S. Nagai, K. Takahashi, K. Saito, T. Yui, M. Yagi, « New Series of Dinuclear Ruthenium(II) Complexes Synthesized Using Photoisomerization for Efficient Water Oxidation Catalysis », *Inorg. Chem.*, **2015**, 54, 7627–7635

¹⁹⁸ M.B. Fairey, R.J. Irving, « The infra-red spectra of some ammine nitrosyl compounds of ruthenium », *Spectrochimica Acta*, **1966**, 22, 359-365

¹⁹⁹ A. G. De Candia, J. P. Marcolongo, R. Etchenique, L. D. Slep, « Widely Differing Photochemical Behavior in Related Octahedral {Ru-NO}⁶ Compounds : Intramolecular Redox Isomerism of the Excited State Controlling the Photodelivery of NO », *Inorg. Chem.*, **2010**, 49, 6925–6930

- ²⁰⁰ N. L. Fry, M. J. Rose, D. L. Rogow, C. Nyitray, M. Kaur, P. K. Mascharak, « Ruthenium Nitrosyls Derived from Tetradentate Ligands Containing Carboxamido-N and Phenolato-O Donors: Syntheses, Structures, Photolability, and Time Dependent Density Functional Theory Studies », *Inorg. Chem.* **2010**, 49, 1487–1495
- ²⁰¹ H.J. Xiang, M. Guo, L. An, S.P. Yang, Q.L. Zhang, J.G. Liu, « A multifunctional nanoplatform for lysosome targeted delivery of nitric oxide and photothermal therapy under 808 nm near-infrared light », *J. Mater. Chem. B*, **2016**, 4, 4667-4674
- ²⁰² J.P. Eiserich, J. Butler, A. van der Vliet, C.E. Cross, B. Halliwell, « Nitric oxide rapidly scavenges tyrosine and tryptophan radicals », *Biochem. J.*, **1995**, 310, 745-749
- ²⁰³ C. D. Reiter, R.J. Teng, J. S. Beckman, « Superoxide Reacts with Nitric Oxide to Nitrate Tyrosine at Physiological pH via Peroxynitrite », *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275(42), 32460–32466
- ²⁰⁴ Z. Ji, Y. Li, T.M. Pritchett, N.S. Makarov, J.E. Haley, Z. Li, M. Drobizhev, A. Rebane, W. Sun, « One-Photon Photophysics and Two-Photon Absorption of 4-[9,9-Di(2-ethylhexyl)-7-diphenylaminofluoren-2-yl]-2,2':6',2''-terpyridine and Their Platinum Chloride Complexes », *Chem. Eur. J.*, **2011**, 17, 2479-2491
- ²⁰⁵ N. Suzuki, T. Matsuda, T. Nagai, K. Yamazaki, M. Fujiki, « Investigation of the intra-CH/ π interaction in dibromo-9,9'-di-alkylfluorenes », *Cryst. Growth Des.*, **2016**, 16(11), 659-6599
- ²⁰⁶ M.Y. Yuen, S.C. F. Kui, K.H. Low, C.C. Kwok, S.S.Y. Chui, C.W. Ma, N. Zhu, C.M. Che, « Synthesis, Photophysical and Electrophosphorescent Properties of Fluorene-Based Platinum(II) Complexes », *Chem. Eur. J.*, **2010**, 16, 14131-14141
- ²⁰⁷ G. Kwok-Ming So, G. Cheng, J. Wang, X. Chang, C.C. Kwok, H. Zhang, C.M. Che, « Efficient Color-Tunable Copper(I) Complexes and Their Applications in Solution-Processed Organic Light-Emitting Diodes », *Chem. Asian J.*, **2017**, 12, 1490-1498

- ²⁰⁸ C. van der Pol, M.R. Bryce, M. Wielopolski, C. Atienza-Castellanos, D.M. Guldi, S. Filippone, N. Martín, « Energy Transfer in Oligofluorene-C60 and C60- Oligofluorene-C60 Donor-Acceptor Conjugates », *J. Org. Chem.*, **2007**, 72 (18), 6662-6671
- ²⁰⁹ R. Rumin, P. Courtot, « Influence de la nature du solvant sur le comportement photochimique de complexes trans- et cis-[PtCl₂(éthylène)-(amine)] », *J. Organomet. Chem.*, **1979**, 169, 225-237
- ²¹⁰ A. Deflandre, A. Lheureux, A. Rioual, J. Lemaire, « Comportement photochimique de cétones α,β -insaturées sous excitation directe », *Can. J. Chem.*, **1976**, 54, 2127-2134
- ²¹¹ A. W. Carpenter, M. H. Schoenfisch, « Nitric oxide release: Part II. Therapeutic applications », *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41, 3742–3752
- ²¹² M. Xu, D.J. McCanna, J.G. Sivak, « Use of the viability reagent PrestoBlue in comparison with alamarBlue and MTT to assess the viability of human corneal epithelial cells », *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **2005**, 71, 1-7
- ²¹³ « Processing absorbance data obtained using Presto-Blue™ viability reagent », life Technologies
- ²¹⁴ C.H. Park, B.C. Martinez, « Enhanced release of rosmarinic acid from *Coleus blumei* permeabilized by dimethyl sulfoxide (DMSO) while preserving cell viability and growth », *Biotechnol Bioeng.*, **1992**, 40, 459-464.
- ²¹⁵ U. Till, L. Gibot, P. Vicendo, M.P. Rols, M. Gaucher, F. Violleau, A.F. Mingotaud, « Crosslinked polymeric self-assemblies as an efficient strategy for photodynamic therapy on a 3D cell culture », *RSC Adv.*, **2016**, 6, 69984-69998
- ²¹⁶ A.J. Gomes, E.M. Espreafico, E. Tfouni, « Trans-[Ru(NO)Cl(cyclam)](PF₆)₂ and [Ru(NO)(Hedta)] Incorporated in PGLA Nanoparticles for the Delivery of Nitric Oxide to B16-F10 Cells: Cytotoxicity and Phototoxicity », *Mol. Pharm.*, **2013**, 10, 3544.

- ²¹⁷ H. Lodish, A. Berk, S.L. Zipursky, *Molecular Cell Biology*. 4th edition., **2000**. Section 15.2, «Overview of Membrane Transport Proteins »
- ²¹⁷ G.M. Cooper, *The Cell : A Molecular Approach*., 2nd edition., **2000**, « Endocytosis »
- ²¹⁸ H. Masuhara, H. Nakanishi, K. Sasaki, *Single Organic Nanoparticles*, **2003**, section I.2, «Reprecipitation method for organic nanocrystals », 17-18
- ²¹⁹ H. Kasai, H.S. Nalwa, H. Oikawa, S. Okada, H. Matsuda, N. Minami, A. Kakuta, K. Ono, A. Mukoh, H. Nakanishi, « A novel preparation method of organic microcrystals », *Jpn. J. Appl. Phys.*, **1992**, 31, L1132-L1134
- ²²¹ US Department of Health and Human Services, **1999**
- ²²² Wisplinghoff H., Seifert H., Wenzel RP., Edmond MB., « Current trends in the epidemiology of nosocomial bloodstream infections in patients with hematological malignancies and solid neoplasms in hospitals in the United States », *Clin Infect Dis.*, **2003**, 36(9), 1103-1110
- ²²³ E.A Izano, M.A. Amarante, W.B. Khe, J.B. Kaplan, « Differential Roles of Poly-N-Acetylglucosamine Surface Polysaccharide and Extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Biofilms », *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, 470-476
- ²²⁴ Q. Lou, T. Zhu, J. Hu, H. Ben, J. Yang, F. Yu, J. Liu, Y. Wu, A. Fischer, P. Francois, J. Schrenzel, D. Qu, « Role of the SaeRS two-component regulatory system in *Staphylococcus epidermidis* autolysis and biofilm formation”, *BMC Microbiology*, **2011**, 11, 146
- ²²⁵ S. Bernatová , O. Samek, Z. Pilát, M. Šerý, J. Ježek, P. Jákł, M. Šiler, V. Krzyžánek, P. Zemánek, V. Holá, M. Dvořáčková, F. Růžička, « Following the Mechanisms of Bacteriostatic versus Bactericidal Action Using Raman Spectroscopy », *Molecules*, **2013**, 18(11), 13188-13199
- ²²⁶ J. Haaber, M. T. Cohn, D. Frees, T. Joest Andersen, H. Ingmer, « Planktonic Aggregates of *Staphylococcus aureus* Protect against Common Antibiotics », *PLoS ONE*, **2012**, 7(7), e41075

- ²²⁷ L. Delhalle, G. Daube, Y. Adolphe, S. Crevecoeur, A. Clinquart, «Les modèles de croissance en microbiologie prévisionnelle pour la maîtrise de la sécurité des aliments (synthèse bibliographique) », *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **2012**, 16(3), 369-381
- ²²⁸ B. Gottenbos, HC. Van der Mei, HJ. Busscher, « Initial adhesion and surface growth of *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* on biomedical polymers », *J. Biomed. Mater. Res.*, **2000**, 50(2), 208-214.
- ²²⁹ C.T.M. Mascio, J.D. Alder, J. A. Silverman, « Bactericidal Action of Daptomycin against Stationary-Phase and Nondividing *Staphylococcus aureus* Cells », *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2007**, 51(12), 4255–4260
- ²³⁰ C.S. Enwemeka, D. Williams, S. K. Enwemeka, S. Hollosi, D. Yens, «Blue 470-nm Light Kills Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Vitro », *Photomed. Laser Surg.*, **2009**, 27(2), 221-226.
- ²³¹ A. Bolhuisa, L.Handa, J.E. Marshalla, A. D. Richards, A. Rodger, J. Aldrich-Wright, « Antimicrobial activity of ruthenium-based intercalators », *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2011**, 42, 313–317 ;
- ²³² F. Li, J., Collins, F. R. Keene, « Ruthenium complexes as antimicrobial agents », *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, 44, 2529-2542
- ²³³ G. Regev-Shoshani, M. Ko, C. Miller, Y. Av-Gay, « Slow Release of Nitric Oxide from Charged Catheters and Its Effect on Biofilm Formation by *Escherichia coli* », *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2010**, 54, 273-279
- ²³⁴ JM. Andrews, « Determination of minimum inhibitory concentrations », *J. Antimicrob. Chemother.*, **2001**, 48, Suppl. S1, 5-16
- ²³⁵ I. Wiegand, K. Hilpert, R.E.W.Hancock, « Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances », *Nature Protocols*, **2008**, 3(2), 163-175

- ²³⁶ H.F. Chambers, « Methicillin-Resistant Staphylococci », *Clin. Microbiol. Rev.*, **1988**, 173-186
- ²³⁷ X. Liu, B. testa, A. Fahr, « Lipophilicity and its relationship with passive drug permeation », *Pharm Res.*, **2011**, 28, 962-977
- ²³⁸ MR. Hamblin, T. Hasan, « Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? », *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2004**, 3, 436-450
- ²³⁹ F.O.N. Silva, S.X.B. Araújo, A.K.M. Holanda, E. Meyer, F.A.M. Sales, I.C.N. Diógenes, I.M.M. Carvalho, I.S. Moreira, L.G.F. Lopes, « Synthesis, Characterization, and NO Release Study of the *cis*- and *trans*-[Ru(Bpy)₂(SO₃)(NO)]⁺ Complexes », *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2006**, 2020-2026
- ²⁴⁰ E. Wong, J. Jeck, M. Grau, A.J.P. White G.J. P. Britovsek, « A strong-field pentadentate ligand in iron-based alkane oxidation catalysis and implications for iron(IV) oxo intermediates », *Catal. Sci. Technol.*, **2013**, 3, 1116-1122
- ²⁴¹ J. Xu, H. Chen, « Encapsulation of Hydrophobic Nanocrystals by Diblock Copolymers », 3rd International Nanoelectronics Conference (INEC), **2010**, 760-761
- ²⁴² Y.J. Dappe, « Encapsulation of organic molecules in carbon nanotubes: role of the van der Waals interactions », *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **2014**, 47, 083001
- ²⁴³ S.R. Gill, D.E. Fouts, G.L. Archer, E.F. Mongodin, R.T. DeBoy, J.Ravel, I.T. Paulsen, James F. Kolonay, L.Brinkac, M. Beanan, R.J. Dodson, S.C. Daugherty, R. Madupu, S.V. Angiuoli, A.S. Durkin, D.H. Haft, J. Vamathevan, H. Khouri, T. Utterback, C. Lee, G. Dimitrov, L. Jiang, H. Qin, J. Weidman, K. Tran, K. Kang, I.R. Hance, K.E. Nelson, C.M. Fraser, « Insights on Evolution of Virulence and Resistance from the Complete Genome Analysis of an Early Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain and a Biofilm-Producing Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Strain », *J. Bacteriol.*, **2005**, 187(7), 2426-2438

²⁴⁴ <http://www.simphotek.net/bckg/bckg.zscan.html>

²⁴⁵ A. Ajami, W. Husinsky, R. Liska, N. Pucher, « Two-photon absorption cross section measurements of various two-photon initiators for ultrashort laser radiation applying the Z-scan technique », *J. Opt. Soc. Am. B*, **2010**, 27(11), 2290-2297

²⁴⁶ L. Delhalle, G. Daube, Y. Adolphe, S. Crevecoeur, A. Clinquart, « Les modèles de croissance en microbiologie prévisionnelle pour la maîtrise de la sécurité des aliments (synthèse bibliographique) », *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **2012**, 16(3), 369-381

²⁴⁷ I. Wiegand, K. Hilpert, R.E.W.Hancock, « Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances », *Nature Protocols*, **2008**, 3(2), 163-175

²⁴⁸ H.F. Chambers, « Methicillin-Resistant Staphylococci », *Clin. Microbiol. Rev.*, **1988**, 173-186

Libération de NO[•] photocontrôlée : Complexes de ruthénium à ligand nitrosyle pour des applications innovantes en photothérapie

Le monoxyde d'azote NO[•] est impliqué dans de nombreux processus biologiques. Il intervient, entre autres, dans la vasodilatation, la neurotransmission, il peut impliquer le développement ou l'apoptose des cellules et possède également des propriétés bactéricides. Le contrôle de la libération de ce radical est donc de grand intérêt pour des applications biomédicales en chimiothérapie photo-activée (PACT) ainsi qu'en inactivation photo-dynamique (PDI). La stratégie ici est de synthétiser des complexes de ruthénium à ligand nitrosyle photoréactifs, qui sont capables de libérer NO[•] sous irradiation mono ou biphotonique. L'excitation à deux photons permet une irradiation dans la fenêtre thérapeutique, très focalisée et une pénétration du faisceau plus profonde qu'en monophotonique. Ces travaux de thèse sont consacrés à la synthèse et l'étude des propriétés photochimiques de complexes [RuNO] et à leurs applications en biologie. Le premier chapitre de cette thèse développe l'état de l'art dans le domaine des complexes de ruthénium à ligand nitrosyle et présente les enjeux biologiques. Le second chapitre présente les propriétés de photolibération de NO[•] de complexes possédant le ligand 4'-(2-fluorényl)-2,2':6',2''-terpyridine, sous excitation à un et à deux photons par des études spectroscopiques. Les photoproduits obtenus sont caractérisés par diffraction des rayons X. Dans un troisième chapitre, l'étude des complexes *cis* (Cl,Cl)- et *trans* (Cl,Cl)-[Ru^{II}(fluorène-terpyridine)Cl₂NO]PF₆ est menée dans l'eau. Les capacités de photolibération du *trans* (NO,OH)-[Ru^{II}(fluorène-terpyridine)(Cl)(OH)(NO)]PF₆ dans les conditions biologiques sont étudiées. Le quatrième chapitre s'intéresse à la synthèse de nouveaux complexes constitués de ligands dérivés du 4'-(2-fluorényl)-2,2':6',2''-terpyridine et à leurs propriétés de photolibération de NO[•]. Le cinquième chapitre s'intéresse aux propriétés phototoxiques de ces complexes envers des cellules cancéreuses (HCT 116 et FaDu). Enfin, dans le sixième chapitre, les propriétés remarquables de ces systèmes dans la levée de la résistance de *Staphylococcus epidermidis* aux antibiotiques sont exposées.

Mots-clés : complexe de ruthénium, monoxyde d'azote, photocinétique, chimiothérapie photoactivée, antibiorésistance.

Photocontrolled NO[•] release: Ruthenium nitrosyl complexes for innovative applications in phototherapy

Nitric oxide NO[•] is involved in numerous biological processes. It takes part to vasodilatation, neurotransmission, it can trigger cell proliferation or apoptosis and it also has bactericidal properties. Thus, NO[•] release control is of high interest for biomedical applications such as photo-activated chemotherapy (PACT) or photodynamic inactivation (PDI). The strategy here is to synthesize photoreactive ruthenium complexes with nitrosyl ligand which can release NO[•] under one and two-photon absorption. Compared with one-photon excitation, two-photon excitation allows high focalization and deep penetration of the beam, while exciting in the therapeutic window. This thesis is dedicated to the synthesis of [RuNO] complexes and their biological applications. The first chapter develops the state of the art in the field of ruthenium nitrosyl complexes and presents the biological issues. The second chapter presents the NO[•] photorelease properties of complexes with 4'-(2-fluorenyl)-2,2':6',2''-terpyridine ligand under one and two-photon excitation by spectroscopic studies. Photoproducts are characterized by X-ray diffraction. In a third chapter, *cis* (Cl,Cl)- and *trans* (Cl,Cl)-[Ru^{II}(2-fluorene-terpyridine)Cl₂NO]PF₆ are studied in water. The photorelease capacities of *trans* (NO,OH)-[Ru^{II}(fluorene-terpyridine)(Cl)(OH)(NO)]PF₆ are studied in biological conditions. The fourth chapter presents the synthesis of new complexes with 4'-(2-fluorenyl)-2,2':6',2''-terpyridine ligand derivatives and their photorelease properties. The fifth chapter describes the phototoxic studies of these complexes on cancer cells (HCT 116 and FaDu). Finally, in the sixth chapter, the outstanding properties of these systems in the falling of antibiotic resistance in *Staphylococcus epidermidis* are exposed.

Mots-clés : ruthenium complex, nitric oxide, photokinetics, photo-activated chemotherapy, antibiotic-resistance