



HAL
open science

Développement de sondes peptidiques à base de complexes de lanthanides luminescents destinés à l'imagerie optique de zinc(II) intra-cellulaire

Ji-Hyung Choi

► **To cite this version:**

Ji-Hyung Choi. Développement de sondes peptidiques à base de complexes de lanthanides luminescents destinés à l'imagerie optique de zinc(II) intra-cellulaire. Biochimie [q-bio.BM]. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2022. Français. NNT : 2022GRALV012 . tel-04213500

HAL Id: tel-04213500

<https://theses.hal.science/tel-04213500>

Submitted on 21 Sep 2023

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : Chimie Biologie

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Ji-Hyung CHOI

Thèse dirigée par **OLIVIER SENEQUE**

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

Développement de sondes peptidiques à base de complexes de lanthanides luminescents destinés à l'imagerie optique de zinc(II) intra-cellulaire

Luminescent Lanthanide-based bioprobes for zinc(II) detection for cellular imaging

Thèse soutenue publiquement le **11 février 2022**,
devant le jury composé de :

Monsieur OLIVIER SENEQUE

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS Laboratoire Chimie et Biologie
des Métaux CEA-Grenoble, Directeur de thèse

Monsieur Nicolas Delsuc

CHARGE DE RECHERCHE, ENS, Rapporteur

Madame Clémence Allain

DIRECTRICE DE RECHERCHE, CNRS ENS Paris-Saclay, Rapporteur

Madame May Morris

DIRECTEUR DE RECHERCHE, Institut des Biomolécules Max
Mousseron, Examinatrice

Madame Frédérique Loiseau

PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS, Université Grenoble Alpes,
Présidente du Jury

Monsieur Stéphane Petoud

DIRECTEUR DE RECHERCHE, Centre de Biophysique Moléculaire -
CNRS, Examineur



À mes parents.

Remerciements

Je voudrais remercier l'ensemble des personnes qui m'ont aidées à réaliser ces travaux de thèses. Je souhaite tout d'abord remercier chaleureusement les membres du jury qui ont accepté de juger ce travail. Je remercie la présidente du jury, Frédérique Loiseau, les rapporteurs, Clémence Allain et Nicolas Delsuc, et les examinateurs, May Morris et Stéphane Pétoud. J'espère que j'ai pu être claire dans mes propos.

Je souhaite remercier mon directeur de thèse, Olivier. Je te remercie de m'avoir accueilli au sein du laboratoire et de m'avoir guidé et fait confiance tout au long de ces trois ans et trois mois. Merci d'avoir été patient pendant la rédaction qui a pris plus de temps de prévu et pour tes relectures attentives. Je remercie ensuite Guillaume Frémy de m'avoir transmis tes connaissances à mon arrivée et m'avoir rafraîchi la mémoire sur les techniques de base de synthèse organique. Je remercie aussi Patrick Malikidogo pour ton partage de connaissance à mon arrivé. Ton départ a fait un petit vide dans le laboratoire. Je suis très contente que tu sois revenue deux ans plus tard accompagné de ta bonne humeur. Je remercie Thibault Charnay également pour tes conseils en synthèse organique et caractérisation. Ton aide a été précieuse et très appréciée. Merci aussi pour ta joie de vivre amenant du bruit et du son dans l'ensemble de l'aile C. Je remercie Junio Guimares pour ta rigueur dans les synthèses. Ton passage a été court mais apprécié. Je remercie Jacques Pécault pour les spectres ESI-MS, tes conseils et ta disponibilité. Je remercie Alexei Grichine pour ton aide, ta disponibilité pour les mesures en microscopie cellulaire. Je remercie Véronique Frachet et Sule Erbek pour vos conseils et vos disponibilités pour la culture cellulaire et les tests de cytotoxicité. Je vous ai beaucoup sollicité à la fin, j'espère que je ne vous ai pas trop gêné dans vos propres recherches. Je remercie Olivier Maury, Fabrice Thomas et Daniel Imbert pour avoir accepté de faire partie du comité de suivi de thèse et d'avoir jugé les débuts de mes travaux. Je remercie le CEA pour le financement (CFR) de la thèse.

Je tiens particulièrement à remercier toute l'équipe PMB (et toutes les personnes ayant été membres pendant ma thèse), permanent et non-permanent. Je remercie Geneviève Blondin pour ton soutien et particulièrement durant la crise COVID, Patrick Dubourdeaux pour ton humour, Claude Senebier, Amélie Kochem, Jean-Marc Latour, Ricardo Garcia, Ikram Yagoub et Jordan Donat (j'ai beaucoup regretté nos afterworks après ton départ!).

Ensuite, je voudrais remercier toutes les personnes qui ont participé à la vie de thèse. Je remercie Elodie Bidal pour m'avoir permis d'enseigner à l'IUT1 MPh. J'ai beaucoup appris pendant les heures d'enseignement autant en TP qu'en APP. Les APPs ont été une très bonne nouvelle expérience d'apprentissage. Je remercie Graziella pour les préparations de TP et ta sympathie. Je remercie Hermine Vincent pour le management de l'équipe des GJAs pour la mise en place du JSIAM 2020. Dommage qu'il a été annulé au dernier moment à cause du COVID-19. Je remercie Isabelle Forge Allegret, Marguerite Pometko, Capucine Mezeix d'avoir porté le projet Citizen Campus et je salue tous mes camarades de promo 2020 ayant rendu l'expérience inoubliable.

Enfin, je voudrais remercier mes amis et ma famille pour avoir toujours été là.

Table des matières

| | |
|---|-------------|
| Remerciements | iii |
| Liste des abréviations | xi |
| Liste des figures | xv |
| Liste des tableaux | xxiv |
| | |
| I Introduction générale | 1 |
| | |
| Quelques notions théoriques sur la spectroscopie de fluorescence | 2 |
| 1.1 Généralités | 2 |
| 1.1.1 Les termes spectroscopiques | 2 |
| 1.1.2 Absorption et émission | 2 |
| 1.2 Le rendement quantique | 4 |
| 1.3 Le temps de vie de fluorescence | 5 |
| 1.4 Les désactivations non-radiatives de la luminescence | 8 |
| 1.5 Les transferts d'énergie | 9 |
| 1.5.1 Transfert d'énergie par résonance de Dexter (DRET) | 9 |
| 1.5.2 Transfert d'énergie par résonance de Förster (FRET) | 10 |
| 1.5.3 FRET appliqué aux biopolymères | 12 |
| 1.6 L'imagerie cellulaire par microscopie de fluorescence | 13 |
| 1.6.1 L'imagerie cellulaire | 13 |
| 1.6.2 La microscopie confocale | 14 |
| 1.6.3 La microscopie multi-photon | 15 |
| | |
| La spectroscopie des lanthanides | 17 |
| 1.1 Les lanthanides | 17 |
| 1.2 L'effet antenne | 19 |
| 1.3 Design d'un complexe de lanthanide luminescent (CLLs) | 22 |
| 1.3.1 Idée générale | 22 |
| 1.3.2 Intérêt des sondes à base de lanthanide | 24 |

| | | |
|--|---|-----------|
| 1.3.3 | Exemples de complexes de lanthanides couplés à son antenne . . . | 25 |
| 1.3.4 | Exemple des sondes à base de CLL dans un système FRET . . . | 27 |
| Les sondes à zinc | | 32 |
| 1.1 | Le zinc | 32 |
| 1.2 | Chélater Zn^{2+} | 33 |
| 1.2.1 | Types de chélateurs de zinc | 33 |
| 1.3 | Les sondes à zinc | 35 |
| 1.3.1 | Des exemples de sondes ratiométriques | 35 |
| 1.3.2 | Des exemples de sondes à base de lanthanides | 37 |
| 1.3.3 | Des exemples de sondes à temps de vie | 39 |
| Projet de thèse | | 43 |
| 1.1 | Contexte du projet de thèse | 43 |
| 1.2 | Rappel des travaux précédents | 45 |
| 1.2.1 | Le peptide doigt de zinc pour une sonde responsive | 45 |
| 1.2.2 | Stratégie de Synthèse | 47 |
| 1.2.3 | Vers une application cellulaire | 49 |
| 1.2.4 | Vers des complexes de lanthanide plus luminescents pour de l'absorption 2P | 53 |
| 1.3 | Un nouveau principe de sonde responsive au zinc | 54 |
| 1.3.1 | Principe | 54 |
| 1.3.2 | Particularité du projet | 55 |
| 1.3.3 | Plan de thèse | 55 |
| II Des sondes à zinc à base de lanthanides en solution et in cellulo | | 57 |
| 1 Des complexes luminescents dans le visible et proche infrarouge <i>in vitro</i> | | 59 |
| 1.1 | Présentation générale des ligands | 59 |
| 1.1.1 | Une base commune | 60 |
| 1.1.2 | Une fonction de conjugaison au peptide | 62 |
| 1.2 | La voie de synthèse <i>tBu/Me</i> : « La voie <i>Me</i> » | 64 |
| 1.2.1 | Synthèse du pro-ligand $L_1^D-(OMe)_4, (OH)$ | 64 |
| 1.2.2 | Synthèse du pro-ligand $L_2^D-(OMe)_4, (OH)$ | 65 |
| 1.3 | Les propriétés spectroscopiques | 67 |
| 1.3.1 | Le complexe TbL_1^D | 67 |
| 1.3.2 | Le complexe EuL_2^D | 69 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1.4 | Le couplage du complexe sur peptide | 69 |
| 1.4.1 | Couplage sur peptide pour les pro-ligands suivant la voie de synthèse « Me » | 69 |
| 1.5 | La voie de synthèse Me/tBu : « la voie <i>tBu</i> » | 70 |
| 1.6 | Conclusion sur les ligands | 73 |
| 2 | Un nouveau modèle de sondes à zinc | 75 |
| 2.1 | Une responsivité par résonance entre un complexe de terbium et le naphthalène : SP–Nap–TbL ₁ | 75 |
| 2.1.1 | Présentation du système | 75 |
| 2.1.2 | Synthèse de la sonde SP–Nap–TbL ₁ | 76 |
| 2.1.3 | Études photophysiques | 77 |
| 2.1.4 | Caractérisation de la sonde | 85 |
| 2.1.5 | Discussion | 89 |
| 2.1.6 | Influence de la position du complexe | 90 |
| 2.1.7 | Conclusion | 96 |
| 2.2 | Une nouvelle sonde à zinc : l’azulène comme nouvel élément du système résonnant | 98 |
| 2.2.1 | Présentation | 98 |
| 2.2.2 | Synthèse | 99 |
| 2.2.3 | Études spectroscopiques | 99 |
| 2.2.4 | Caractérisation de la sonde : affinité et sélectivité | 112 |
| 2.2.5 | Modification de la position du complexe pour la sonde SP–Azu–TbL ₁ II | 112 |
| 2.2.6 | Discussion | 114 |
| 2.2.7 | SP–Azu–EuL ₁ | 116 |
| 2.2.8 | Conclusion | 120 |
| 2.2.9 | Sonde à base d’Eu ³⁺ : SP–Azu–EuL ₂ | 120 |
| 2.3 | Étude de de la sonde SP–NBD–TbL ₁ | 125 |
| 2.3.1 | Présentation | 125 |
| 2.3.2 | Synthèse | 125 |
| 2.3.3 | Résultat de l’étude spectroscopique | 126 |
| 2.3.4 | Caractérisation de la sonde | 133 |
| 2.3.5 | Modification de la position du complexe | 134 |
| 2.3.6 | Discussion | 135 |
| 2.4 | La sonde SP – NBD – TbL ₁ pour une application cellulaire | 137 |
| 2.4.1 | Internaliser un fluorophore par CPP : TAT – SP – NBD | 139 |
| 2.4.2 | Internaliser un complexe de lanthanide par CPP : TAT – SP – TbL ₁ | 143 |

| | | |
|-----|----------------------|-----|
| 2.5 | Conclusion | 145 |
|-----|----------------------|-----|

III Des complexes de lanthanides pour de l'imagerie cellulaire 149

3 Stratégie d'internalisation des complexes de lanthanides par CPP 151

| | | |
|-------|---|-----|
| 3.1 | Les voies de transduction | 151 |
| 3.1.1 | Mécanismes de transport | 151 |
| 3.1.2 | Les peptides de pénétration cellulaire | 153 |
| 3.2 | Un CPP en structure doigt de zinc : ZF5.3 | 155 |
| 3.2.1 | Introduction sur les travaux d'A. Shepartz | 155 |
| 3.2.2 | Adaptation à notre projet | 158 |
| 3.3 | Études spectroscopiques de ZF5.3(TbL ₁ ^D) | 158 |
| 3.4 | Étude d'internalisation de ZF5.3(TbL ₁ ^D) sur cellule HeLa | 162 |
| 3.4.1 | Une internalisation par diffusion passive : le CPP TP2 | 163 |
| 3.5 | Conclusion | 166 |

4 Améliorer l'absorption 2P et la pénétration cellulaire 167

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.1 | Une antenne sensibilisant l'euprium avec une meilleure absorption bi-photonique | 167 |
| 4.1.1 | Littérature | 167 |
| 4.1.2 | Une nouvelle antenne à absorption 2P : L ₃ | 173 |
| 4.1.3 | Conclusion sur m(EuL ₃)TAT | 179 |
| 4.1.4 | Effet d'un groupement ortho-Me : L ₄ | 180 |
| 4.1.5 | Discussion | 183 |
| 4.1.6 | Conclusion | 185 |
| 4.2 | Améliorer l'internalisation dans le cellules et la diffusion dans le cytosol 186 | |
| 4.2.1 | Travaux de J-P Pellois sur dfTAT | 187 |
| 4.2.2 | Adaptation à notre projet | 189 |
| 4.2.3 | Vérification des propriétés d'internalisation sur cellule vivante HeLa avec df(Liss)TAT | 190 |
| 4.2.4 | Études spectroscopiques et d'internalisation sur cellule de d(EuL ₃)TAT | 192 |
| 4.2.5 | Conclusion | 195 |
| 4.3 | Stratégie de co-incubation par dfTAT et dnfTAT | 195 |
| 4.3.1 | Co-incubation de m(EuL ₃)TAT avec df(Liss)TAT | 195 |
| 4.3.2 | Co-incubation de m(EuL ₃)TAT avec des dérivés d(X)TAT | 196 |
| 4.3.3 | Co-incubation de m(EuL ₄)TAT avec dLLTAT | 203 |
| 4.4 | Conclusion | 204 |

| | |
|--------------------------------|------------|
| Conclusion et perspectives | 207 |
| IV Experimental section | 211 |
| Références | 246 |

Liste des abréviations

| | |
|------------------------------------|---|
| δ | déplacement chimique RMN |
| λ | longueur d'onde |
| 2P | deux photons / bi-photonique |
| Ac ₂ O | anhydride acétique |
| BOC ₂ O | Di- <i>tert</i> -butyl dicarbonate |
| CDCl ₃ | chloroforme deutéré |
| Et ₂ O | diéthyle éther |
| Na ₂ HCO ₃ | carbonate de sodium |
| Na ₂ SO ₄ | sulfate de sodium |
| Pd(PPh ₃) ₄ | <i>tetrakis</i> (triphenylphosphine)palladium |
| AcOEt | acétate d'éthyle |
| AcOH | acide acétique |
| Alloc | allyloxycarbonyl |
| BOC | <i>tert</i> -butoxycarbonyl |
| BT | transfert inverse (<i>back transfer</i>) |
| LL | complexe de lanthanide luminescent |
| CsF | fluor de césium |
| CT | transfert de charge |
| DCM | dichlorométhane |
| DEPT | Distortionless Enhanced Polarization Transfer |
| DIEA | N,N-diisopropylethylamine |
| DMAc | N,N-diméthylacétamide |
| DMF | N,N-diméthylformamide |
| DMSO | diméthylsulfoxyde |

DO3A acide 1,4,7,10-*tetra*azacyclododecane-1,4,7-triacétique

DO3A(Me) acide tri-méthyl 1,4,7,10-*tetra*azacyclododecane-1,4,7-triacétique

DO3A(tBu) acide tri-*tert*-butyl 1,4,7,10-*tetra*azacyclododecane-1,4,7-triacétique

DOTA 1,4,7,10-*tetra*azacyclododecane-1,4,7,10-tétraacétique

DPA dipicolylamine

DTT dithiothréitol

EDTA éthylènediaminetétraacétique

ESI electrospray ionization

ET transfert d'énergie

eT transfert d'électron

EtOH éthanol

Fmoc N- α -Fluorenylmethoxycarbonyl

FRET Förster Resonance Energy Transfer

GSH glutathion

HCl acide chlorhydrique

HCTU O-(1H-6-Chlorobenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate
Novabiochem)

HEPES acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1pipérazine éthane sulfonique)

HPLC chromatography liquide haute pression à phase inverse

HR haute résolution

ICT transfert de charge interne

ILCT transfert de charge intra-ligand

ISC croisement inter-système

ISC croisement inter-système

J (Hz) constante de couplage en Hertz

LR basse résolution

M2P microscopie bi-photonique

MC microscopie confocale

MeCN acétonitrile

MeOH méthanol

MMT 4-methoxytrityl
MOF *metal-organic framework*
MOI Molécule d'intérêt
MPAA acide 4-mercaptopropionique
MS spectroscopie de masse
NaOH hydroxyde de sodium
NCL ligation chimique native
NIR proche infrarouge
PBS tampon phosphate salin
PEG polyéthylène glycol
ppm partie par million
PS polystyrène
PyBOP benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidino-phosphonium-hexafluorophosphate
RA rink amide
RMN résonnance magnétique nucléaire
RMSE Root Mean Square Error / erreur standard résiduelle
rt room temperature / température ambiante
SEA *bis*(2-sulfanylethyl)amido
SPPS synthèse peptidique sur phase solide
TBAF fluorure de N-tetrabutylammonium
TCEP tris(2-carboxyéthyl)phosphine
TEA triméthylamine
TFA acide trifluoroacétique
THF tétrahydrofurane
TICT transfert de charge interne twisté
TIS Triisopropylsilane
TLC chromatographie sur couche mince
TPA tripicolylamine (tris(2-pyridylmethyl)amine)
TPEN N,N,N',N' -tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenedi-amine
TSLIM *Temporal Sampling Lifetime Imaging Microscopy*
UV-Vis ultraviolet-visible

Table des figures

| | | |
|------|--|----|
| 1.1 | Exemple de diagramme de Jablonski ((template par Germain Salvato-Vallverdu)) | 4 |
| 1.2 | Représentation schématique du FRET et DRET entre l'HOMO du donneur et la LUMO de l'accepteur - figure de la publication [1] | 10 |
| 1.3 | Conditions pour un système FRET | 11 |
| 1.4 | Absorption du milieu biologique et représentation de la fenêtre de diagnostique entre 650 et 1300 nm- figure de la publication [2] | 14 |
| 1.5 | Différence entre la microscopie 1P et 2P | 16 |
| 1.6 | Différentes contributions des divisions des niveaux d'énergie $4f^6$ de l'euporium - figure de la publication [3] | 19 |
| 1.7 | Diagramme d'énergie des ions Ln^{III} d'un cristal type LaF_3 - figure de la publication [4] | 20 |
| 1.8 | Principe de l'effet antenne - figure de la publication [5] | 21 |
| 1.9 | Schéma du chemin énergétique d'un système antenne-lanthanide - figure de la publication [6] | 21 |
| 1.10 | Voies de sensibilisation du lanthanide k_{ET} par état singulet LnL_{S1}^* , triplet LnL_{T1}^* et ICT LnL_{ICT}^* ; voies de désactivation radiative de l'ICT et du triplet k_{rad} et du lanthanide k_{Ln^*} ; voies de désactivation non radiative par transfert inverse k_{BT} , par vibration k_{vib} , et par collision avec le dioxygène pour former de l'oxygène singulet $k_q[O_2]$ et transfert d'électron PeT k_{eT} - figure de la publication [7] | 24 |
| 1.11 | Principe de la détection en temps résolu - figure de la publication [8] | 25 |
| 1.12 | Structure du ligand macrobicyclique tris-bipyridinique -figure de la publication [9] | 26 |
| 1.13 | Structure du complexe IAM développé par K. Raymond et al. [10] | 26 |
| 1.14 | Structure de complexes luminescents d'euporium et de terbium | 28 |
| 1.15 | Principe d'une sonde TR-FRET entre le terbium est la GFP et résultats spectroscopiques en temps résolu -figure de la publication [11] | 29 |

| | | |
|------|--|----|
| 1.16 | Sonde FRET pour la détection d'ADN par hybridation entre un oligonucléotide comportant un complexe d'euporium (D) et un autre comportant l'accepteur ALEXA Fluor 545 (A) - figures de la publication [12] | 30 |
| 1.17 | Structures de quelques composés chélatant le Zinc(II) et (c) un exemple de composé combinant la partie chélateur et la partie fluorescente pour la détection de zinc | 34 |
| 1.18 | Structure d'un doigt de zinc dont le zinc est chélaté par deux histidines et deux cystéines - figure de la publication de [13] | 34 |
| 1.19 | Représentation de la sonde à zinc ratiométrique et de sa réponse en fluorescence durant la titration par le zinc : la fluorescence de la 7-hydroxycoumarine Hc ($\lambda_{ex} = 360nm$, $\lambda_{em} = 400 - 495nm$, en bleu) est constante et la fluorescence du Zinpyr-1 AP1 ($\lambda_{ex} = 485nm$, $\lambda_{em} = 495 - 650nm$, en vert) augmente par ajout de zinc. image de la publication [14] | 36 |
| 1.20 | Une protéine génétiquement codée pour une sonde à zinc basée sur un système FRET - figures de la publication [15] | 37 |
| 1.21 | Représentation de la sonde à zinc et de sa réponse en temps résolu à différentes concentrations de zinc dans de l'HEPES à $pH = 7.4$ à $50 \mu M$ excitée à ($\lambda_{ex} = 320nm$)- figure de la publication [16] | 38 |
| 1.22 | Une sonde à zinc peptidique basée sur la modulation de l'efficacité de l'effet antenne vers un complexe de lanthanide luminescent - figures de la publication [17] | 39 |
| 1.23 | Sonde à zinc avec un <i>turn on</i> de l'intensité de fluorescence et une inversion des amplitudes de la décroissance exponentielle mesurée - figure de la publication [18] | 40 |
| 1.24 | Sonde à zinc phosphorescence à base d'un complexe d'Iridium - figures de la publication [19] | 42 |
| 1.25 | Principe de la synthèse peptidique sur phase solide SPPS | 44 |
| 1.26 | Repliement du peptide doigt de zinc ZF | 45 |
| 1.27 | Sonde $SP_2[Tb^O]$ développé par M. Isaac - figures du manuscrit de thèse [20] | 46 |
| 1.28 | Propriétés photophysiques de la sonde $SP_2[Tb^O]$ développé par M. Isaac - figures du manuscrit de thèse [20] | 46 |
| 1.29 | Sonde intensiométrique au Zn^{2+} à base de lanthanide modifiée - figure [21] | 47 |
| 1.30 | Principe des sondes responsives ratiométriques au Zn^{2+} avec une antenne Cs124 commune pour deux lanthanides par C. Cepeda | 47 |

| | | |
|------|--|----|
| 1.31 | Principe de la ligation native chimique entre deux peptides déprotégés - figure de la publication [22] | 48 |
| 1.32 | Passage <i>SEA – on</i> en <i>SEA – off</i> | 49 |
| 1.33 | Stratégie de synthèse de sonde à zinc par ligation chimique native entre le fragment C comportant le complexe de lanthanide (bleu) et le fragment N contenant l’antenne sensibilisant le lanthanide (vert) . . . | 49 |
| 1.34 | Structure des antennes cs124 (à gauche) et acridone (à droite) | 50 |
| 1.35 | Structure du DO3A-pic (à gauche) et du DOTA (à droite) et leurs sphères de coordinations associées [23] | 50 |
| 1.36 | Stratégie de synthèse de sonde à zinc incorporant une séquence CPP - figure de la thèse [23]) | 52 |
| 1.37 | Image en transmission, fluorescence et superposition par microscopie confocale de TAT-SP3-Acri-DO3A-pic(Eu) incubé avec des cellules HEK $\lambda_{ex}= 405$ nm | 52 |
| 1.38 | Structure des complexes de terbium TbL_1^D (gauche) et d’euporium EuL_2^D (droite) développés par G. Frémy | 54 |
| 1.39 | Principe des nouvelles sondes à zinc | 55 |
| 1.1 | Schéma du complexe de lanthanide : le lanthanide est complexé dans un ligand macrocyclique conjugué à son antenne à absorption bi-photonique dont un fonction de bioconjugaison est disponible | 60 |
| 1.2 | Structure des complexes sur peptide étudiés | 61 |
| 1.3 | Schéma de synthèse du $DO3A(Me)(IPAMe)$ et $DO3A(tBu)(IPAMe)$ | 62 |
| 1.4 | Groupements protecteurs orthogonaux Alloc (haut) et MMT (bas) | 63 |
| 1.5 | Schéma de synthèse du ligand $L_1^D-(OMe)_4, (OH)$ | 64 |
| 1.6 | Réaction de Suzuki-Miyaura - figure du chapitre [24] | 65 |
| 1.7 | Schéma de synthèse du ligand $L_2^D-(OMe)_3, (OH)$ | 66 |
| 1.8 | Réaction de Sonogashira - figures de la publication [25] | 67 |
| 1.9 | Mesures spectroscopiques de TbL_1^D et EuL_1^D tirées de la thèse de G. Frémy [26] | 68 |
| 1.10 | Schéma de synthèse des composés finaux CPP+complexes de lanthanides avec exemples en voie Méthyle (a) et en voie <i>tert</i> -butyle (b) | 71 |
| 2.1 | 3-(1-naphthyl)-L-alanine | 76 |
| 2.2 | Représentation des étapes de synthèse des fragment N-terminal et C-terminal de la sonde SP–Nap– TbL_1 | 78 |
| 2.3 | Représentation de la ligation native chimique pour la synthèse de SP–Nap– TbL_1 | 78 |

| | | |
|------|--|-----|
| 2.4 | Caractérisation de la sonde $SP - Nap - TbL_1$. Masse calculée : 1010.2 [M+4H] ⁴⁺ , 808.4 [M+5H] ⁵⁺ , 673.8 [M+6H] ⁶⁺ , 577.7 [M+7H] ⁷⁺ pour M=C ₁₇₅ H ₂₆₈ N ₄₇ O ₄₉ S ₂ Tb | 79 |
| 2.5 | Propriétés photophysiques de la sonde $SP - Nap - TbL_1$ à 10 μ M, HEPES 10 mM, pH 7.4, TCEP 250 μ M | 80 |
| 2.6 | Évolution du temps de vie de luminescence à λ_{ex} =302 nm à λ_{em} =545 nm pendant le titrage par le Zn ²⁺ en mono-exponentiel | 81 |
| 2.7 | Décroissance du signal de luminescence expérimentale et modélisée en mono et bi-exponentielle de la sonde $SP - Nap - TbL_1$ (délai : 50 μ s) | 83 |
| 2.8 | Évolution du temps de vie de luminescence à λ_{ex} =302 nm à λ_{em} =545 nm pendant le titrage par le Zn ²⁺ en mono, bi-exponentiel et bi-exponentiel moyen | 84 |
| 2.9 | Représentation de la luminescence en fonction des ajouts de zinc pour différents valeurs de constantes d'association $K_{peptide}/K_{compétiteur}$ dans le cas d'un rapport stœchiométrique entre le peptide et le compétiteur | 86 |
| 2.10 | Détermination de la constante d'affinité K_a de la sonde $SP - nap - TbL_1$ par titrage en compétition avec l'EGTA à 1 éq. par mesure d'intensité du terbium en temps résolu en fonction des ajouts de Zn ²⁺ | 87 |
| 2.11 | Mesures des temps de vie de luminescence de la sonde $SP - Nap - TbL_1$ en présence de cations avant et après ajout de 2 équivalents de zinc (Na ⁺ , K ⁺ à 100mM, Mg ²⁺ , Ca ²⁺ à 10mM et Mn ²⁺ , Fe ²⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺ , Cu ²⁺ à 10 μ M) | 88 |
| 2.12 | Diagramme de Jablonski de la sonde $SP - Nap - TbL_1$ (pas à l'échelle) (template par Germain Salvato-Vallverdu) | 91 |
| 2.13 | Schéma de la sonde $SP - Nap - TbL_1 - II$ | 92 |
| 2.14 | Propriétés photophysiques de la sonde $SP - Nap - TbL_1 - II$ | 93 |
| 2.15 | Modélisations (ligne rouge) de la décroissance de luminescence (données expérimentales en ligne pointillée) de la sonde $SP - Nap - TbL_1 - II$ par deux modèles mesurée à λ_{ex} =302 nm à λ_{em} =615 nm | 95 |
| 2.16 | Propriété de l'azulène et moment dipolaire - tirée de la publication[27] | 98 |
| 2.17 | Schéma de synthèse du fragment N-terminal $SP - Azu - N - terminal$ | 99 |
| 2.18 | Schéma de synthèse NCL des sondes à zinc $SP - Azu - TbL_1$ | 100 |
| 2.19 | Caractérisation de la sonde $SP - Azu - TbL_1$. Masse calculée : 1021.0 [M+4H] ⁴⁺ , 817.0 [M+5H] ⁵⁺ , 681.0 [M+6H] ⁶⁺ , 583.8 [M+7H] ⁷⁺ pour M=C ₁₇₆ H ₂₆₉ N ₄₈ O ₅₀ S ₂ Tb | 100 |
| 2.20 | Études spectroscopiques de la sonde $SP - Azu - TbL_1$ à 10 μ M, HEPES 10mM, pH 7.4, TCEP 250 μ M | 101 |

| | | |
|------|--|-----|
| 2.21 | Études de la décroissance de luminescence en temps résolu (délai 50 μ s) de la sonde $SP - Azu - TbL_1$ excitée à $\lambda_{ex} = 302$ nm et mesurée à $\lambda_{em} = 545$ nm | 104 |
| 2.22 | Modélisation de la décroissance de luminescence de la sonde $SP - Azu - TbL_1$ en temps résolu par un modèle de décroissance exponentielle à variance pondérée | 105 |
| 2.23 | L'exponentielle étirée ou de Kohlrausch - figure de la publication [28] . | 106 |
| 2.24 | Modélisation de la décroissance de luminescence de la sonde $SP - Azu - TbL_1$ en temps résolu par un modèle exponentiel étiré | 108 |
| 2.25 | Luminescence en temps résolu du terbium et temps de vie de la sonde $SP - Azu - TbL_1$ à 10 μ M, HEPES 10mM, pH 7.4, TCEP 250 μ M, titrée par le Zn^{2+} en boîte à gant sans dioxygène | 111 |
| 2.26 | Mesures spectroscopiques de la sonde $SP - Azu - TbL_1 - II$ | 113 |
| 2.27 | Diagramme de Jablonski de la sonde $SP - Azu - TbL_1$ ((template par Germain Salvato-Vallverdu)) | 115 |
| 2.28 | Mesures spectroscopiques de la sonde $SP - Azu - EuL_1$ | 116 |
| 2.29 | Mesures spectroscopiques de la sonde $SP - Azu - EuL_1$ et présentation de deux modèles de la décroissance de luminescence : décroissance mono, double exponentielle | 117 |
| 2.30 | Mesures spectroscopiques de la sonde $SP - Azu - EuL_1$ et modélisation par une décroissance exponentielle étirée | 118 |
| 2.31 | Recouvrement de l'absorbance de la transition $S_0 \rightarrow S_1$ de l'azulène-CONH (ligne noir) et des spectres d'émission du Tb^{3+} (ligne verte) et de l' Eu^{3+} (ligne rouge) | 119 |
| 2.32 | Schéma des différentes conditions de ligations natives tentées entre le fragment SP-Azu-N-terminal et le fragment SP-EuL ₂ -C-terminal | 121 |
| 2.33 | Réaction entre un thiol libre et le DTNB - figure du site [29] | 122 |
| 2.34 | Dosage au DTNB pour mesurer la présence de thiol libre du peptide $SP - EuL_2$ -C-terminal | 124 |
| 2.35 | 4-chloro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole | 125 |
| 2.36 | Spectre d'émission du Tb^{3+} (ligne noir) et spectre d'absorption du NBD-NHR (ligne rouge) | 126 |
| 2.37 | Schéma de synthèse de la sonde à zinc $SP - NBD - TbL_1$ | 126 |
| 2.38 | Caractérisation de la sonde $SP - NBD - TbL_1$. Masse calculée : 1407.3 [M+3H] ³⁺ , 1055.7 [M+4H] ⁴⁺ , 844.8 [M+5H] ⁵⁺ , 704.2 [M+6H] ⁶⁺ pour M=C ₁₇₆ H ₂₇₂ N ₅₂ O ₅₅ S ₂ Tb | 127 |
| 2.39 | Mesures spectroscopiques de la sonde $SP - NBD - TbL_1$ | 128 |

| | | |
|------|--|-----|
| 2.40 | Décroissance de luminescence excitée à $\lambda_{ex}=302$ nm et mesurée à $\lambda_{em}=545$ nm, délai de 50 μ s et modélisation par décroissance exponentielle bi-exponentielle et exponentielle pondérée pour la sonde <i>SP – NBD – TbL₁</i> | 130 |
| 2.41 | Décroissance de luminescence excitée à $\lambda_{ex}=302$ nm et mesurée à $\lambda_{em}=545$ nm, délai de 50 μ s et modélisation par un modèle exponentiel étiré pour la sonde <i>SP – NBD – TbL₁</i> | 131 |
| 2.42 | Mesures spectroscopiques de la sonde <i>SP – NBD – TbL₁</i> sans présence de dioxygène | 133 |
| 2.43 | Mesures des temps de vie de luminescence de la sonde <i>SP – NBD – TbL₁</i> en présence de cations avant et après ajout de 2 équivalents de zinc | 134 |
| 2.44 | Mesures spectroscopiques de la sonde <i>SP – NBD – TbL₁ – II</i> | 136 |
| 2.45 | Diagramme de Jablonski de la sonde <i>SP – NBD – TbL₁^D</i> (pas à l'échelle) | 138 |
| 2.46 | Schéma de synthèse de TAT-SP-NBD | 140 |
| 2.47 | Incubation de <i>TAT – SP – NBD</i> à 10 μ M, $t= 40$ min, cellule HeLa, milieu DMEM, à $\lambda_{ex} = 488$ nm (à gauche, l'image en transmission ; au milieu, l'émission ; à droite, la superposition) | 141 |
| 2.48 | Cellules HeLa contrôles, milieu DMEM, $\lambda_{ex} = 488$ nm, (à gauche, l'image en transmission ; au milieu, l'émission ; à droite, la superposition) - les couleurs ont été « saturées » artificiellement pour faire ressortir l'émission de très faible intensité | 141 |
| 2.49 | Mode Spectral pour la sonde <i>TAT – SP – NBD</i> (en bleu) à une concentration de 10 μ M à $\lambda_{ex} = 490$ nm centré sur une granule et le contrôle (en rouge), Intensité normalisée, cellule HeLa, milieu DMEM | 142 |
| 2.50 | Spectre d'émission de fluorescence de <i>TAT – SP – NBD</i> à $\lambda_{ex}=475$ nm (haut) et Mode Spectral (bas) pour la sonde <i>TAT – SP – NBD</i> (en bleu) à une concentration de 10 μ M à $\lambda_{ex} = 900$ nm centré sur une granule d'une cellule, la sonde dans une goutte à 100 μ M (en vert) et le contrôle (en rouge) ; cellule HeLa, milieu DMEM | 143 |
| 2.51 | Incubation de <i>TAT – SP – TbL₁</i> à 10 μ M sur cellules HeLa, milieu DMEM, $\lambda_{ex}= 690$ nm (à gauche, l'image en transmission ; au milieu, l'émission ; à droite, la superposition) | 144 |
| 2.52 | Mode Spectral pour la sonde <i>TAT – SP – TbL₁</i> (en bleu) à une concentration de 10 μ M à $\lambda_{ex} = 690nm$ centré sur une granule, le peptide dans une goutte à 100 μ M (en vert) et et le contrôle (en rouge), Intensité normalisée, cellule HeLa, milieu DMEM | 144 |
| 3.1 | Différentes voies d'endocytoses et images par transmission et electron-scan associées - figure de la publication [30] | 152 |

| | | |
|-----|--|-----|
| 3.2 | Détermination des étapes d'endocytoses suivies par ZF5.3 grâce à différents inhibiteurs - figure de la publication [31] | 157 |
| 3.3 | Internalisation sur cellule d'une « grosse » molécule, ici la protéine SNAP labellisée par la rhodamine, par le CPP ZF5.3 comparé au CPP12; le composé avec ZF5.3 présente de meilleurs résultats que CPP12 : la concentration cytosolique augmente lorsque la concentration initiale d'incubation augmente et lorsque le temps d'incubation est prolongé - figures de la publication [32] | 159 |
| 3.4 | Schéma des composés étudiés ZF5.3(TbL ₁), ZF5.3(Si-Rhodamine) . . . | 160 |
| 3.5 | Propriétés photophysiques de la sonde ZF53(TbL ₁ ^D) | 161 |
| 3.6 | Image prise par microscopie, avec l'image en transmission (à gauche), l'émission (milieu), et la superposition (à droite) | 162 |
| 3.7 | (A) Cellules incubées avec 2 μM de Arg9-TAMRA à 37°C pendant 2 h montrant un signal ponctué et (B) TP2-TAMRA à 2 μM, 22°C température ambiante pendant 10 min montrant un signal diffus dans le cytosol par Microscopie confocale sur cellule CHO (<i>Chinese Hamster Ovary</i>) - tirée de la publication [33] | 164 |
| 3.8 | Schéma de TP2(EuL ₂) | 165 |
| 3.9 | Incubation de TP2(EuL ₂) sur cellule HeLa pendant 1 h à 2 μM excité à λ= 720 nm dans le PBS sans rinçage; à gauche, image en transmission; milieu, émission; à droite, image superposée | 165 |
| 4.1 | Structure du composé [Na][Eu(L ²)] - figure de la publication [34] . . . | 168 |
| 4.2 | Structure du composé [Eu(L ¹)] - figure de la publication [35] | 168 |
| 4.3 | Étude des propriétés 2P et d'internalisation sur cellule du complexe [EuL ¹] ⁺ - figures de la publication [36] | 169 |
| 4.4 | Section efficace 2P des complexes [Na][Eu(L ²)], [Eu(L ¹)], [EuL ¹] ⁺ présentés en fonction du nombre d'antenne et en fonction de la charge . | 171 |
| 4.5 | Structure des composés K ₃ [Eu(dipicCbz) ₃] et du ligand CPAD du composé K ₃ [Eu(CPAD) ₃] - figure des publications [37] et [38] | 173 |
| 4.6 | Schéma de synthèse du pro-ligand L ₃ -(OtBu) ₃ , (OH) | 174 |
| 4.7 | Caractérisation de m(EuL ₃)TAT. Masse calculée : 606.2 [M+4H] ³⁺ , 485.2 [M+5H] ⁴⁺ , 404.5 [M+6H] ⁶⁺ pour M=C ₁₀₂ H ₁₆₁ N ₄₀ O ₂₀ Eu | 175 |
| 4.8 | Mesures spectroscopiques de m(EuL ₃)TAT à 10 uM, HEPES 10 mM, pH 7.4 | 175 |
| 4.9 | Spectre d'émission en temps résolu de m(GdL ₃)TAT en temps résolu à 77K à λ _{ex} = 300 nm (noir) et déconvolution (en gris et la somme en rouge) | 177 |

| | | |
|------|---|-----|
| 4.10 | Évolution du rendement quantique de $m(\text{EuL}_3)\text{TAT}$ en fonction de la valeur de l' $E_T(30)$ du solvant de mesure | 177 |
| 4.11 | Spectre d'émission en temps résolu de $m(\text{TbL}_3)\text{TAT}$ en temps résolu à température ambiante (fente = 10-10, PM 850 V) (ligne pointillée) et à 77 K (fente 5-5, PM 700 V) (ligne noire) à $\lambda_{ex} = 300$ nm et spectre d'excitation à 77 K (tirets) à $\lambda_{em} = 500$ nm | 179 |
| 4.12 | Structure des composés $m(\text{EuL}_3)\text{TAT}$ et $m(\text{EuL}_4)\text{TAT}$ | 180 |
| 4.13 | Schéma de synthèse du ligand $\text{L}_4-(\text{OtBu})_3, (\text{OH})$ | 180 |
| 4.14 | Mécanisme proposé par l'équipe de Q. Song, figure tirée de la publication associée [39] | 182 |
| 4.15 | Comparaison des absorbances de $m(\text{EuL}_3)\text{TAT}$ (tirets) et $m(\text{EuL}_4)\text{TAT}$ (ligne pleine) | 182 |
| 4.16 | Mesures spectroscopiques de $m(\text{EuL}_4)\text{TAT}$ à 10 μM , HEPES 10 mM, pH 7.4 | 183 |
| 4.17 | Schéma de Jablonski du système D-A : D-A est excité à un niveau LE (<i>local excited state</i>) en conformation co-planaire ; après conversion interne, il peut y avoir fluorescence à partir du LE relaxé. Ou bien, le chemin d'excitation passe par le TICT en conformation perpendiculaire et émettre une fluorescence de cet état vers le niveau fondamental GS (<i>Ground State</i>) figure tirée de la publication [40] | 185 |
| 4.18 | Diagramme d'énergie du chemin de sensibilisation d'un lanthanide réductible : ET, transfert d'énergie de l'antenne vers le lanthanide (S_1 ou par T_1 après ISC) pour obtenir $\text{Ant}-\text{Ln}^{3+}$ ou eT, transfert d'électron pour obtenir $\text{Ant}^+ - \text{Ln}^{2+}$ -figure de la publication [41] | 186 |
| 4.19 | Structure de dfTAT et représentation des charges [42] et structure de 5-carboxyTMR à coupler sur l'amine de la chaîne latérale de la lysine | 187 |
| 4.20 | Diffusion de dfTAT dans le cytosol dans différentes lignées cellulaires (HeLa, Neuro-2-a et HDF) contre le monomère acfTAT. Localisation cellulaire de dfTAT (5 μM) et de son monomère (20 μM) par microscopie par fluorescence après 1h d'incubation. L'émission de TMR est mesurée à 560 nm,[43] | 188 |
| 4.21 | Internalisation d'une protéine par co-incubation avec dfTAT -figure de la publication [44] | 189 |
| 4.22 | Structure de df(Liss)TAT, avec la lissamine en fluorophore | 190 |
| 4.23 | df(Liss)TAT Spectre de fluorescence (ligne noire) et spectre d'excitation (tirets) respectivement à $\lambda_{ex} = 571$ nm et $\lambda_{em} = 594$ nm et spectre d'absorbance (ligne rouge) | 191 |
| 4.24 | Internalisation de df(Liss)TAT sur cellule HeLa en milieu PBS et mode spectral | 192 |

| | | |
|------|--|-----|
| 4.25 | Structure de d(EuL ₃)TAT avec le complexe EuL ₃ (b) | 192 |
| 4.26 | d(EuL ₃)TAT : Spectre de fluorescence (ligne noir) et spectre d'excitation (tirets) respectivement à $\lambda_{ex}=340$ nm et $\lambda_{em}=615$ nm et spectre d'absorbance (ligne rouge) | 193 |
| 4.27 | Internalisation de d(EuL ₃)TAT à 5 μ M HeLa sur cellule HeLa, incubation dans le milieu PBS sans rinçage (à gauche, l'image en transmission ; au milieu, l'émission ; à droite, la superposition) | 194 |
| 4.28 | Recouvrement des spectres pour FRET : spectre d'émission de l'euporium (ligne noir) et spectre d'absorbance de df(Liss)TAT (ligne rouge) et spectre d'émission (tirets) respectivement à $\lambda_{ex}= 571$ nm | 196 |
| 4.29 | Structure des dérivées des séquences TAT dimérisées | 197 |
| 4.30 | Schéma des expérimentations d'incubations des cellules avec un dimère dTAT comportant un complexe de lanthanide ou bien avec un monomère de TAT comportant un complexe de lanthanide en co-incubation avec un autre dTAT sans lanthanide | 198 |
| 4.31 | Co-incubation de m(EuL ₃)TAT (5 μ M) avec d(FITC)TAT (5 μ M) sur HeLa en milieu L-15 pendant 30 min | 199 |
| 4.32 | Co-incubation de m(EuL ₃)TAT (5 μ M) avec d(FmG)TAT (5 μ M) sur HeLa en milieu L-15 pendant 30 min | 200 |
| 4.33 | Incubation m(EuL ₃)TAT à 5 μ M pendant 1 h en milieu L-15 sur HeLa à $\lambda_{ex}= 800$ nm (à gauche, l'image en transmission ; au milieu, l'émission ; à droite, la superposition) | 201 |
| 4.34 | Image transmise et mode spectral après incubation avec du peptide m(EuL ₃)TAT à 5 μ M et dLLTAT à 5 μ M sur HeLa en milieu L-15 | 202 |
| 4.35 | Test de cytotoxicité au MTT de m(EuL ₃)TAT (5 and 10 μ M) avec ou sans dLLTAT (5 μ M) à 24h et 48h | 203 |
| 4.36 | Incubation de m(EuL ₄)TAT sur cellule HeLa à 5 μ M avec dLLTAT à 5 μ M pendant 20 min en PBS (à gauche, l'image en transmission ; au milieu, l'émission ; à droite, la superposition) | 204 |
| 4.37 | General scheme for synthesis of zinc probe with different quenchers (naphtalene, azulene and NBD) | 229 |
| 4.38 | Scheme of synthesis for TAT dimer | 239 |

Liste des tableaux

| | | |
|-----|---|-----|
| 1.1 | Contraste (différence d'intensité de luminescence entre la sonde libre et liée au Zn^{2+} et rendement quantique à $\lambda_{ex} = 400$ nm des sondes CPP-SP3-Acri-DO3A-pic(Eu) | 51 |
| 2.1 | Valeurs calculées selon le modèle FRET de la distance entre le donneur et l'accepteur r_{DA} et de l'efficacité de transfert E à partir du rayon de Förster R_0 et des temps de vie moyen (modèle bi-exponentiel) | 120 |
| 2.2 | Temps de vie de luminescence moyen issu de modèle bi-exponentiel et rendements quantiques des sondes à zinc | 146 |
| 2.3 | Temps de vie de luminescence moyen issu du modèle exponentiel étiré et rendements quantiques des sondes à zinc | 146 |
| 3.1 | Séquence peptidique des CPPs TAT, ZF, 5.3 et ZF5.3 | 156 |
| 4.1 | Propriétés spectroscopiques des composés présentés : $[EuL^2]^-$, $[EuL^1]$, $[EuL^1]^+$ publiés par l'équipe d'O. Maury et $[Eu(CPAD)3]^{3-}$ d'A. Bettencourt-Dias | 170 |
| 4.2 | Temps de vie de luminescence et rendements quantiques des composés $m(EuL_3)TAT$ et $m(EuL_4)TAT$ | 185 |
| 4.3 | Séquences peptidiques des CPPs présentés sur résine (les acides aminés sont protégés) | 191 |

Première partie

Introduction générale

Quelques notions théoriques sur la spectroscopie de fluorescence

1.1 Généralités

1.1.1 Les termes spectroscopiques

En spectroscopie, les niveaux d'énergie pour une molécule utilisent la nomenclatures $^{2S+1}L_J$ avec :

- L le moment angulaire orbitalaire. L est écrit par S, P, D, F, G, H etc qui correspond en chiffres à 0, 1, 2, 3, 4, 5 etc. $M_L = \Sigma m_{li}$ avec m_{li} le nombre quantique tertiaire ou magnétique de l'électron i . m_l varie entre $-L$ et $+L$ pour chaque valeur de L .
- S le moment angulaire du spin, $M_S = \Sigma m_{Si}$ avec m_{Si} le nombre quantique de la projection du spin de l'électron i .
- $2S + 1$ donne la multiplicité de spin
- ^{2S+1}L a $2J+1$ états, avec J le moment angulaire total. J prend des valeurs comprises entre $J_{max} = L + S$ à $J_{min} = |L - S|$.

L'état fondamental de $^{2S+1}L_J$ est donné par la règle de Hund :

- L'état de plus basse énergie correspond au terme avec la plus haute multiplicité $2S_{max} + 1$.
- Pour une même multiplicité, l'état de plus basse énergie est le terme avec la plus haute valeur de L .
- Si la couche est remplie à moins de la moitié, l'état de plus basse énergie correspond à la plus basse valeur de J . A l'inverse, si la couche est remplie à plus de la moitié, alors l'état de plus basse énergie correspond à la plus haute valeur de J .

1.1.2 Absorption et émission

Une onde incidente peut être partiellement absorbée par un système.

Introduction

Lorsqu'une molécule absorbe un photon, l'énergie du photon est transférée à un électron de la molécule qui, à partir de son niveau d'énergie initial E_i , peut accéder à de plus hauts niveaux d'énergies de la molécule E_f . Il revient à son niveau d'énergie initiale par désactivations non radiatives ou radiatives dont on peut produire un spectre d'émission. Les niveaux d'énergies initiales et finales sont liés par la relation suivante :

$$E_f - E_i = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (1.1)$$

Il existe différents types de transitions électroniques en fonction du types de liaisons, quelles soient une liaison électronique σ , π ou non-liante.

En fluorescence, la désexcitation s'effectue depuis un état singulet par émission d'un photon. La fluorescence est un processus rapide qui se produit sans changement de spin. Le temps de vie de la fluorescence est de l'ordre de la nanoseconde. Il peut se produire un changement de spin par croisement inter-système (ISC) : la molécule se trouve alors à un état triplet avec deux électrons aux spins parallèles dans deux orbitales. Le processus de désexcitation radiative à partir du triplet est appelé phosphorescence. La transition n'est pas autorisée résultant à un temps de vie long de la phosphorescence de l'ordre de la milliseconde, voire de la seconde. La luminescence est le terme général du phénomène d'émission de lumière d'une substance résultant d'un état électroniquement excité.

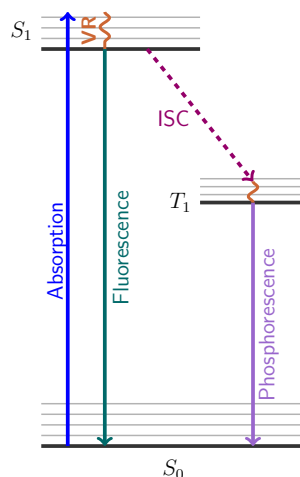
Le diagramme de Jablonski

Pr. Alexander Jablonski (1898-1980) est un physicien ukrainien ayant considérablement contribué à nos connaissances actuelles sur la spectroscopie de fluorescence.

Le diagramme de Jablonski permet de représenter schématiquement les processus d'absorption et d'émission. Les différents niveaux d'énergies sont appelées $S_0, S_1, S_2, \dots, S_n$ pour les états singulets et T_0, T_1, \dots, T_n pour les triplets excités. Ces niveaux se divisent en différents niveaux d'énergie vibrationnelle. L'espacement entre les niveaux d'énergie est corrélé aux maxima du spectre d'émission.

Le principe de Franck-Cordon est une approximation stipulant qu'une transition électronique ne modifie pas la position du noyau dans son environnement électronique. Les transitions sont donc représentées comme des lignes verticales.

Une représentation est donnée sur la fig. 1.1 à titre d'exemple : une molécule absorbe un photon et s'excite à un niveau excité S_1 . L'énergie se relaxe alors au plus bas état d'énergie vibrationnelle de S_1 par conversion interne. Ensuite, il se désexcite au plus haut niveau d'énergie vibrationnelle de l'état fondamental S_0 avant de complètement retourner au plus bas énergie de S_0 . Dans certain cas, le spin peut se convertir vers un état triplet de plus basse énergie T_1 par un processus



Légende

- .-> ISC Croisement Inter-Système
- ~> VR Relaxation Vibratoire

FIGURE 1.1 – Exemple de diagramme de Jablonski ((template par Germain Salvato-Vallverdu))

de croisement inter-système (ISC). L'ISC est possible par couplage spin-orbite, une interaction permettant le « mélange » des états singulet et triplet.

1.2 Le rendement quantique

Le rendement quantique ϕ est le rapport du nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés[6]. Il rend compte de la capacité de la molécule de convertir la lumière incidente en luminescence. Il peut être défini comme la vitesse du processus radiative par rapport à la somme des autres processus de désexcitation. Il est donné par la relation suivante :

$$\phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \tag{1.2}$$

k_r est la vitesse de désexcitation radiative. k_{nr} est la vitesse de désexcitation non-radiative.

Il existe deux méthodes pour mesurer le rendement quantique d'un fluorophore : la méthode absolue et la méthode comparative.

La méthode comparative La méthode comparative nécessite une référence standard dont le rendement quantique ϕ_R est connu et dont le spectre d'émission et d'absorption sont proches de l'échantillon à analyser. La relation suivante permet

Introduction

de calculer le rendement quantique ϕ de l'échantillon à analyser.

$$\phi = \phi_R \frac{E \cdot (1 - 10^{A_R(\lambda_R)}) \cdot I_R(\lambda_R) \cdot n^2}{E_R \cdot (1 - 10^{A(\lambda)}) \cdot I(\lambda) \cdot n_R^2} \quad (1.3)$$

avec E le spectre d'émission intégré et corrigé (diffraction du réseau, réponse du photomultiplicateur ou du détecteur), A l'absorbance à la longueur d'onde λ , I l'intensité de la source d'excitation à la longueur d'onde λ et n l'indice de réfraction. L'indice R indique la référence.

En excitant l'échantillon et la référence à la même longueur d'onde et dans le même solvant pour des absorbances inférieures à 0.1, l'équation se simplifie en :

$$\phi = \phi_R \frac{E \cdot A_R}{E_R \cdot A} \quad (1.4)$$

La méthode absolue La méthode absolue nécessite une sphere d'intégration qui empêche la lumière de se dissiper. Elle est recouverte d'une surface totalement réfléchive. Cette méthode permet alors de comparer directement le nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés. L'émission de fluorescence E de l'échantillon et l'intensité de la lumière d'excitation à travers l'échantillon L et du blanc (E_b et L_b) sont mesurées afin de calculer ϕ .

$$\phi = \frac{E - E_b}{L_b - L} \quad (1.5)$$

1.3 Le temps de vie de fluorescence

Le temps de vie d'un fluorophore correspond au temps moyen que passe la molécule à un état excité avant de retourner à l'état fondamental. Le temps de vie d'un fluorophore ne dépend pas de la longueur d'onde d'excitation ni de la méthode d'acquisition. Il est indépendant de la concentration de l'échantillon en fluorophore. Il sera en revanche sensible à d'autres facteurs tels que la structure du fluorophore, la température, la polarité ou la présence d'un désactivateur [45].

Modèle de décroissance exponentielle Lors d'une acquisition d'un spectre d'émission, on enregistre une intensité de fluorescence. Celle-ci est proportionnelle au nombre de molécules excitées à partir d'un temps t tel que la vitesse de désexcitation est définie par $k_r + k_{nr}$. On a donc la relation suivante :

$$\frac{dI(t)}{dt} = -(k_r + k_{nr})I(t) \quad (1.6)$$

Introduction

k_r est la vitesse de désexcitation radiative. k_{nr} est la vitesse de désexcitation non-radiative. soit

$$I(t) = I_0 \exp(-t/\tau) \quad (1.7)$$

avec

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (1.8)$$

Un modèle de décroissance exponentielle est obtenue : τ est le temps nécessaire pour que l'intensité du signal décroît au $1/e$ (environ 37%) de sa valeur initiale. Il est considéré comme une moyenne des temps de vie de la molécule excitée.

Modèle de décroissance multi-exponentielle La présence de plusieurs fluorophores dans l'échantillon ou bien d'un même fluorophore dans des environnements différents ou conformations différentes se traduit par une luminescence plus complexe qui peut se modéliser par une somme d'exponentielles. La décroissance de l'intensité de luminescence est alors décrite par :

$$I(t) = \sum_i^n A_i \exp^{-t/\tau_i} \quad (1.9)$$

Le facteur pré-exponentiel A_i correspond à l'amplitude de l'exponentielle i par rapport au signal total, soit autrement dit aux fractions du fluorophore à chaque différent environnement. S'il y a plusieurs fluorophores, alors A_i est plus délicat à interpréter car dépendant de plusieurs paramètres tels que la concentration, le rendement quantique etc. Par ailleurs, le nombre n d'exponentielles à utiliser peut être source d'erreur.

Enfin, il n'est pas inutile de calculer la contribution fractionnelle f_i de chacun des composants. f_i est un indicateur de la contribution de la composante exponentielle i à la fluorescence totale de la molécule ; elle se calcule par la relation suivante :

$$f_i = \frac{A_i \tau_i}{\sum_j A_j \tau_j} \quad (1.10)$$

Le temps de vie moyen se calcule avec les temps de vie en prenant compte de leurs contributions fractionnelles tel que :

$$\langle \tau \rangle = \sum_j f_j \tau_j \quad (1.11)$$

Analyse des données La décroissance de luminescence est mesurée à une longueur d'onde d'émission donnée λ_{em} lorsque la molécule d'intérêt est excitée à une longueur d'onde d'excitation λ_{ex} . L'analyse des données expérimentales s'effectue par plusieurs méthodes dont les principales sont : la méthodes des moindres carrés

Introduction

non linéaires (*Non-Linear Least Square NLLS*), la méthode des moments MEM ou la transformée de Laplace. La NLLS est la plus utilisée.

La NLLS sert à tester si le modèle mathématique est en adéquation avec les données et aussi de trouver les coefficients de ce modèle mathématique. Pour cela, on fait varier A_i et τ_i jusqu'à minimiser la paramètre χ^2 (proche de 1) :

$$\chi^2 = \sum_{k=1}^n \frac{1}{\sigma_k^2} [N(t_k) - N_c(t_k)]^2 = \sum_{k=1}^n \frac{[N(t_k) - N_c(t_k)]^2}{N(t_k)} \quad (1.12)$$

avec $N(t_k)$ données brutes, $N_c(t_k)$ données calculés, σ_k la déviation standard. Le choix de A_i et τ_i peut suivre plusieurs méthodes : la méthode de Gauss-Newton, Gauss-Newton modifiée et de Nelder-Mead (mais ne seront pas plus approfondies dans la suite).

L'interprétation se lit sur la valeur de χ^2 réduite car il peut y avoir un biais dû à la taille des données. χ_R^2 (R pour réduit) est calculé en divisant χ^2 par le degré de liberté ; sa valeur doit être proche de 1 :

$$\chi_R^2 = \frac{\chi^2}{n - p} \quad (1.13)$$

avec n le nombre de points et p le nombre de paramètres.

Cependant, la lecture du χ^2 ne permet pas de conclure sur la bonne adéquation du modèle car elle n'évalue pas la précision du modèle. Elle ne donne qu'une information de la dépendance entre la réponse et la variable avec la régression effectuée.

La déviation Pour juger un bon ajustement (*fit*) de manière visuelle, il faut d'abord regarder la superposition des données expérimentales et du modèle puis il faut observer le graphique de la déviation. La déviation est l'écart entre les données expérimentales et les données prédites telle que :

$$D_k = \frac{N(t_k) - N_c(t_k)}{\sqrt{N(t_k)}} \quad (1.14)$$

Un bon ajustement a une déviation distribuée aléatoirement sur un écart restreint autour de zéro. Si elle ne l'est pas, alors la courbe de la déviation possède une tendance : le modèle peut être soit trop haut ou trop bas par rapport aux points expérimentaux. Cela peut signifier qu'il manque des paramètres indépendants dans le modèle choisis ou des relations entre les paramètres. Il faut alors envisager de choisir un modèle plus complexe (ajouter des termes ou choisir un modèle non-linéaire). Toutefois, un modèle trop complexe peut artificiellement permettre d'obtenir une valeur de χ^2 proche de 1 et conclure, de manière erronée, que le modèle est bon [46].

Une autre mesure importante pour juger un fit est l'erreur standard résiduelle ou RMSE (Root Mean Square Error) :

$$RMSE = \sqrt{\sum_{k=1}^n \frac{[N(t_k) - N_c(t_k)]^2}{n - p}} \quad (1.15)$$

Le RMSE donne une mesure absolue sur la distance entre les points expérimentaux et le modèle. Un modèle parfaitement adéquat a un RMSE nul. L'avantage du RMSE est qu'il est possible de comparer deux modèles entre eux (linéaires ou non linéaires) pour un même jeu de donnée (le χ^2 ne s'y prête pas ; il ne sert qu'à accepter ou rejeter le modèle).

Il existe d'autres stratégies de modélisation comme la stratégie de l'analyse globale ou par la distributions des temps de vie. Le choix du modèle peut aboutir à des résultats et donc des interprétations du système étudié différentes. Il est impératif d'être prudent lors du choix du modèle et surtout de l'interprétation [47].

1.4 Les désactivations non-radiatives de la luminescence

La fluorescence d'une molécule est sensible à plusieurs facteurs de diminution de la fluorescence (*quenching*). Une rotation interne d'une molécule est synonyme de perte d'énergie non-radiative, d'où une diminution du temps de vie. On peut pallier ce problème en abaissant la température de travail, en augmentant la viscosité de la solution ou en rigidifiant la structure [48].

Désactivation par collision ou statique La désactivation peut également être due à une molécule extérieure, un désactivateur ou *quencher*. Elle est permise par contact entre les nuages électroniques (ou du moins à moins de 2 Å) du fluorophore et du désactivateur [48].

Par exemple, le dioxygène, étant paramagnétique, peut désactiver un fluorophore par son état triplet. Les aromatiques et les aliphatiques environnants peuvent aussi désactiver la fluorescence d'un fluorophore par transfert d'énergie.

La désactivation est décrit par l'équation de Stern-Volmer [49] :

Par collision :

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q] \quad (1.16)$$

F_0 la fluorescence sans *quencher*, F la fluorescence avec *quencher*, k_q la constante de *quench* bimoléculaire, τ_0 le temps de vie du fluorophore en l'absence de *quencher*,

Introduction

Q la concentration du *quencher*, K_D la constant de Stern-Volmer.

En Statique,

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_S[Q] \quad (1.17)$$

avec

$$K_S = \frac{[F - Q]}{[F][Q]} \quad (1.18)$$

$[F - Q]$ la concentration du complexe entre le fluorophore et le quencher, $[F]$ la concentration du fluorophore seul

Quenching intra-moléculaire Lorsque le *quencher* est lié au fluorophore par liaison covalente, l'équation de Stern-Volmer devient :

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q\tau_0 \quad (1.19)$$

soit

$$k_q = \frac{1}{\tau} - \frac{1}{\tau_0} \quad (1.20)$$

avec k_q la constante de vitesse unimolaire du quench.

1.5 Les transferts d'énergie

Les transferts d'énergie participent à la désactivation de la luminescence d'un fluorophore au profit d'un autre fluorophore. Il existe deux grands mécanismes connus de transfert d'énergie non-radiative entre une molécule donneur (D) et une molécule accepteur (A) d'énergie.

1.5.1 Transfert d'énergie par résonance de Dexter (DRET)

David L. Dexter a étudié un transfert d'énergie faisant intervenir un échange de deux électrons nécessitant un recouvrement des orbitales de D et de A. Le transfert d'électrons est schématisé sur la figure 1.2.

La vitesse de transfert se définit par la relation suivante [50] :

$$k_T = KJexp(-2R/L) \quad (1.21)$$

avec R la distance entre D et A, L le rayon de Van der Wals, K l'interaction orbitalaire, J le recouvrement des spectres normalisé.

L'efficacité de transfert décroît de manière exponentielle et devient quasi nulle pour des distances supérieurs à 3\AA . Le mécanisme Dexter correspond plus pour des molécules dont le donneur et l'accepteur sont liés de manière covalente.

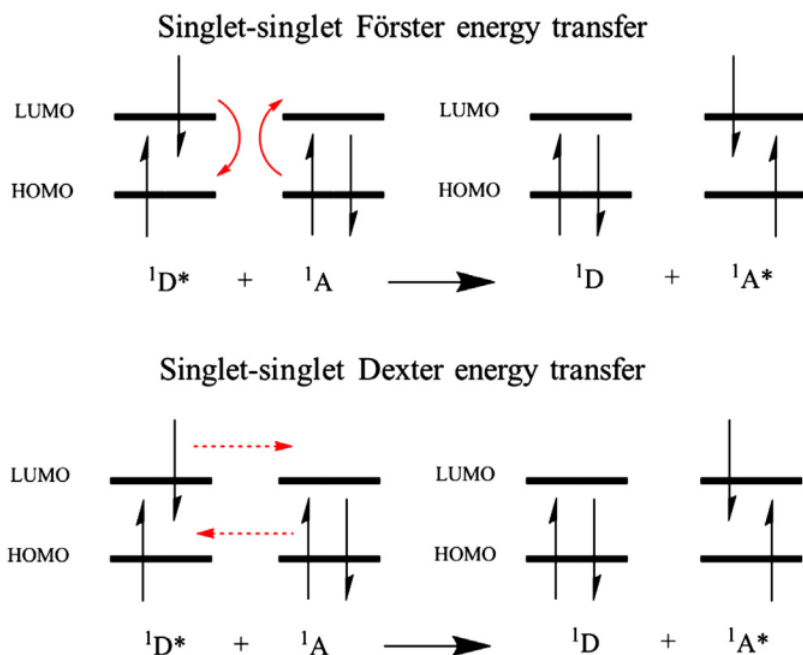


FIGURE 1.2 – Représentation schématique du FRET et DRET entre l’HOMO du donneur et la LUMO de l’accepteur - figure de la publication [1]

1.5.2 Transfert d’énergie par résonance de Förster (FRET)

Theodore Förster a étudié le transfert d’énergie non-radiative entre un donneur (D) et un accepteur (A) par une interaction longue distance dipôle-dipôle. Après photoexcitation, D passe dans un état excité D^* . Le retour à l’état fondamental excite simultanément A vers A^* . Lorsque D et A sont des fluorophores, la fluorescence de D diminue au profit de la fluorescence de A. Ce phénomène est appelé FRET pour *Förster Resonance Energy Transfer*. C’est aujourd’hui une technique commune pour étudier les interactions protéine-protéine.

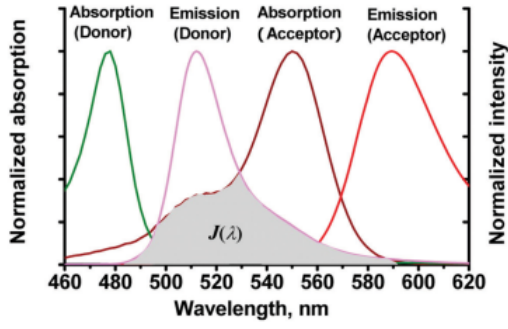
Le FRET est possible sous plusieurs conditions :

- Le donneur D et l’accepteur A sont proches spatialement de distance inférieure à 60-70 Å (fig1.3a).
- Les moments dipolaire de D et A sont orientés de manière favorable.
- Le fluorophore D a son spectre d’émission qui recouvre le spectre d’absorption du fluorophore A.

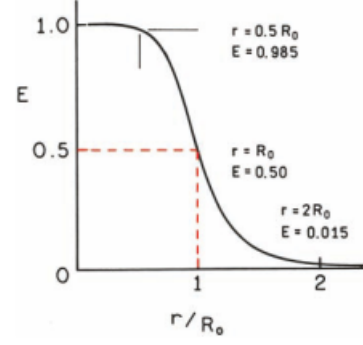
La vitesse de transfert d’énergie non-radiative k_T du FRET est décrite par [52] :

$$k_{ET} = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (1.22)$$

avec τ_D le temps de vie du donneur, R_0 la distance de Förster où 50% de l’énergie est transférée, r la distance entre le donneur et l’accepteur. La vitesse de transfert est donc dépendant en $1/r^6$.



(a) Recouvrement de l'émission du donneur et de l'absorption de l'accepteur dans un système FRET correspondant à $J(\lambda)$ - figure de la publication [51]



(b) Dépendance du transfert d'énergie E à la distance de Förster R_0 , distance pour laquelle le transfert d'énergie est efficace à 50% - figure du livre [52]

FIGURE 1.3 – Conditions pour un système FRET

L'efficacité de ce transfert d'énergie E se traduit par la part des photons absorbés par le donneur qui sont transférés à l'accepteur tel que :

$$E = \frac{k_{ET}(r)}{\tau_D^{-1} + k_{ET}(r)} \quad (1.23)$$

et

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (1.24)$$

La distance de Förster est théoriquement définie par :

$$R_0^6 = \frac{9000 \ln(10) \kappa^2 Q_{DO}}{128 \pi^5 N n^4} \int_0^\infty F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (1.25)$$

avec κ le facteur d'orientation (souvent considéré à $2/3$), Q_{DO} le rendement quantique du donneur seul, N le nombre d'Avogadro, n l'indice de réfraction du milieu, F_D le spectre d'émission du donneur corrigé normalisé, ϵ_A le coefficient d'extinction molaire de A à la longueur d'onde λ .

Pour définir le recouvrement des spectres entre le donneur et l'accepteur, on peut introduire :

$$J(\lambda) = \frac{\int_0^\infty F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty F_D(\lambda) d\lambda} \quad (1.26)$$

avec F_D le spectre d'émission du donneur corrigé.

L'équation se simplifie de la manière suivante si les longueurs d'onde sont en nanomètre nm et F_D en $M^{-1}cm^{-1}nm^4$ et R_0 est donnée en Angström :

$$R_0 = 0.211(\kappa^2 n^{-4} Q_{DO} J(\lambda))^{1/6} \quad (1.27)$$

Cette dernière équation permet de calculer R_0 théorique.

Expérimentalement, l'efficacité de transfert se calcule grâce aux temps de vie du donneur seul et en présence de l'accepteur tel que :

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (1.28)$$

Cette dernière équation s'applique pour des temps vies issus d'un modèle de décroissance mono-exponentiel. Si le composé FRET présente un profil multi-exponentiel, il faut prendre une moyenne des temps de vie donnée par la somme des $A_i\tau_i$, avec A l'amplitude de la composante [52].

1.5.3 FRET appliqué aux biopolymères

En travaillant avec un couple D-A lié à un biopolymère comme un peptide. Ce peptide peut prendre avoir un comportement conformationnel dynamique. Or, l'efficacité du FRET varie selon cette distance r . La mesure de ce temps de vie de fluorescence est de même impactée de telle manière qu'il est peu probable d'avoir un temps de vie unique pour décrire le peptide conjugué aux fluorophores D et A. La distance D-A r n'est alors pas fixe mais plutôt distribuée sur une plage de distances possibles que l'on peut exprimer par une fonction de probabilité $P(r)$. $P(r)$ se décrit généralement par une gaussienne :

$$P(r) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{1}{2}\left(\frac{\bar{r} - r}{\sigma}\right)^2\right] \quad (1.29)$$

avec \bar{r} la moyenne de la gaussienne et σ la déviation standard associée.

La décroissance de l'intensité en temps résolu du donneur doit alors considérer toutes les intensités de toutes les distances r possibles telle que :

$$I_{DA}(t) = \int_{r=0}^{\infty} P(r) I_{DA}(r, t) dr = \int_{r=0}^{\infty} P(r) I_D^0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_D} - tk_T(r)\right) dr \quad (1.30)$$

soit

$$I_{DA}(t) = \int_{r=0}^{\infty} P(r) I_D^0 \exp\left[-\frac{t}{\tau_D} \left(1 + \left(\frac{R_0}{r}\right)^6\right)\right] dr \quad (1.31)$$

Si l'on considère une protéine non repliée (à cause d'un dénaturant) comparé à sa version native, la distribution $P(r)$ sera large. La décroissance de luminescence ne pourra pas être modélisée par une décroissance exponentielle.

Si la protéine a une forme fonctionnelle structurée préférentielle, $P(r)$ est est étroit sur une distance r réduite. Il sera alors possible de modéliser la mesure de temps de

vie en temps résolu par une simple exponentielle telle que :

$$I_{DA}(t) = I_D^0 \exp(-t/\tau_{DA}) \quad (1.32)$$

et

$$\frac{1}{\tau_{DA}} = \frac{1}{\tau_D} + k_T(r) \quad (1.33)$$

avec $I_{DA}(r, t)$ l'intensité du donneur en présence de l'accepteur mesurée à distance r au temps t , I_D^0 , l'intensité à $t=0$, τ_{DA} le temps de vie en présence de l'accepteur, τ_D le temps de vie en l'absence de l'accepteur, $k_T(t)$ la vitesse de transfert de D-A donnée par la théorie de FRET de l'équation 1.22 à la page 10. Toutefois, la valeur de χ_R^2 sera plus élevée que 2 rendant compte de l'hétérogénéité.

1.6 L'imagerie cellulaire par microscopie de fluorescence

1.6.1 L'imagerie cellulaire

L'imagerie sur cellule vivante est d'intérêt majeur pour obtenir des informations sur la dynamique et les processus biologiques « en temps réel ». La fluorescence est une technique d'imagerie adaptée par sa haute sensibilité et sa résolution spatiale et temporelle.

Pour cela, les sondes fluorescentes doivent assumer une bonne sélectivité pour la molécule cible, une affinité adaptée, soit une bonne compatibilité générale avec le milieu cellulaire et la technique d'analyse, ici la microscopie de fluorescence.

Bio-compatibilité Une sonde destinée à l'imagerie cellulaire doit être non-toxique, soluble en solution aqueuse pour éviter les artefacts dus à l'agrégation [53]. L'application directe de la sonde sur cellule vivante doit éviter de compromettre le fonctionnement de la cellule. Par exemple, une sonde chélatant une molécule cible doit avoir une constante de dissociation, K_d , située dans les valeurs de concentrations physiologiques de la molécule cible. Si le K_d est bas, la molécule cible n'est plus disponible par la cellule ; si trop haute, la sonde ne peut pas jouer son rôle de sonde.

La difficulté à développer des sondes performantes provient de l'environnement très complexe des cellules qui influe sur la réponse des sondes fluorescentes. Le milieu cytosolique est généralement un milieu réducteur mais certains compartiments peuvent être oxydants, voir changer de potentiel rédox. Une sonde cellulaire (hormis celles destinées à mesurer le stress oxydant) ne doit pas voir ses propriétés photophysiques se modifier par oxydation.

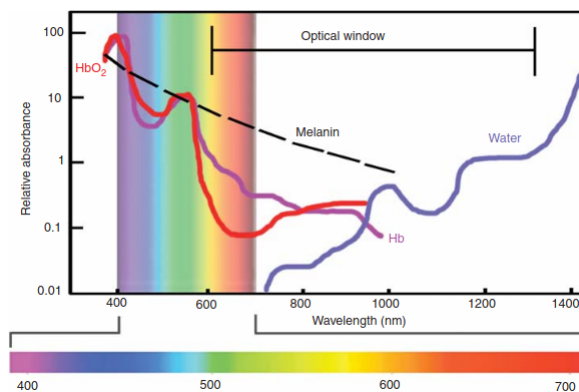


FIGURE 1.4 – Absorption du milieu biologique et représentation de la fenêtre de diagnostique entre 650 et 1300 nm- figure de la publication [2]

Inconvénients L'imagerie cellulaire peut être délicate car plusieurs inconvénients peuvent gêner la mesure :

- L'exposition à la lumière incidente induit une phototoxicité ; se placer dans le NIR (*Near-Infra-Red*), moins énergétique, peut réduire cet effet.
- Le fluorophore photo-blanchi sous excitation continue.
- La lumière est diffusée par l'échantillon (la lumière bleue, de courte longueur d'onde, est plus facilement diffusée que la lumière rouge, de plus haute longueur d'onde).
- La fluorescence des zones environnantes de l'échantillon hors focus participe à la fluorescence secondaire et au bruit.

Fenêtre de diagnostique Le milieu biologique a une forte absorption et une émission dans l'UV et dans le visible, notamment le NADH qui émet entre 400-500nm et la flavine FAD qui émet entre 500-600 nm.

Il existe une fenêtre de détection spécifique à l'imagerie cellulaire. En se plaçant dans celle-ci, il est possible de minimiser le pouvoir d'absorption du milieu biologique dû aux protéines et l'eau [54]. Cette fenêtre de détection se situe vers le proche infrarouge entre 700 nm et 1400 nm (voir Figure 1.4 p.14). Si l'excitation et l'émission de la sonde fluorescente se situent dans cette fenêtre, alors il est possible de minimiser à la fois l'autofluorescence et les dommages sur la cellule.

1.6.2 La microscopie confocale

La microscopie confocale est une technique de choix lors d'utilisation de sondes fluorescentes en particulier pour étudier les interactions protéines-protéines dans la cellule. Elle permet d'illuminer l'échantillon sur un point focal et seule l'émission provenant du plan focal est détectée par passage à travers un orifice *pinhole*. L'image obtenue est mieux résolue permettant de connaître précisément la provenance du signal

d'émission. Cet instrument est utile pour faire des images 3D résolues en scannant à chaque plan focal.

1.6.3 La microscopie multi-photon

Excitation biphotonique L'excitation 2P est théorisée par Maria Göppert-Mayer en 1931 mais n'est observée expérimentalement que 30 ans plus tard par Wolfgang Kaiser et Geoffrey B. Garret, après le développement des lasers.

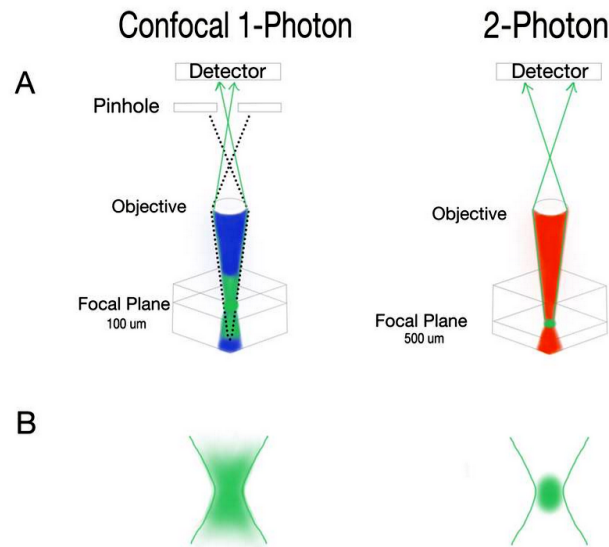
L'absorption à deux photons (A2P) signifie qu'un atome ou une molécule a la possibilité d'absorber « simultanément » deux photons (2P) de moitié d'énergie par rapport à l'absorption monophotonique (1P), c'est-à-dire du double de longueur d'onde. La valeur de la différence d'énergie entre l'état excité et l'état fondamental est la même qu'en 1P mais l'équation se modifie de la manière suivante par rapport à l'excitation 1P :

$$E_f - E_i = 2h\nu_{2P} = 2\frac{hc}{\lambda_{2P}} \quad (1.34)$$

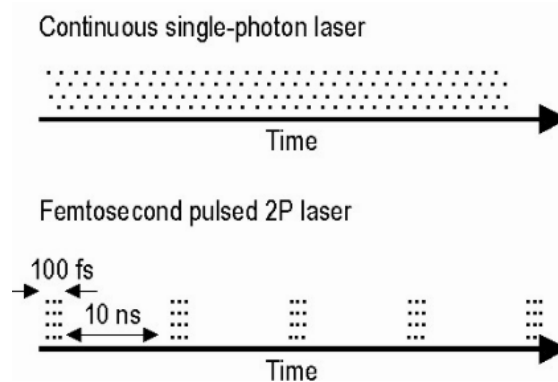
Multiphoton Laser Scanning Microscopy MLSM La microscopie à deux photons (M2P) est une technique de microscopie non-linéaire contrairement au 1P qui utilise ces propriétés A2P en excitant la molécule dans un petit volume donné. La M2P permet une meilleure résolution spatiale avec une fluorescence hors foyer diminuée améliorant la résolution signal sur bruit. Cette technique est avantageuse pour étudier les cellules vivantes en haute résolution sans pour autant être toxique à la cellule.

D'ailleurs, la microscopie confocale (MC) ne garde que le signal provenant du plan focal grâce au *pinhole* mais l'excitation et l'émission sont larges causant du photoblanchiment et des dommages sur les cellules. En revanche, la M2P n'a pas de fuseau « large » d'excitation et d'émission comme la confocale ; la puissance nécessaire pour l'excitation 2P n'est possible que sur le point focal (fig. 1.5a). Autrement dit, l'excitation se concentre sur un petit volume et l'émission provient de ce volume. Il y a donc moins de bruits dus aux émissions hors-focus. La résolution axiale (sur z) est nettement améliorée et ce type de microscopie à deux photons permet de faire des coupes optiques précises [55][56]. Le matériel cellulaire est également mieux préservé en M2P qu'en MC [57].

L'excitation bi-photonique est donc plus adaptée pour son utilisation sur des cellules vivantes car, en diminuant l'énergie de la lumière incidente, elle réduit la phototoxicité. Ainsi, il est possible de travailler avec les cellules vivantes sur de plus longues périodes. De plus, il devient plus simple d'exciter et d'émettre dans la fenêtre de diagnostique du milieu biologique, notamment en se plaçant dans



(a) (A) en 1P, l'échantillon est excité et les zones environnantes fluorescentes mais seule l'émission du plan focal est mesurée grâce au *pinhole*; (B) en 2P, l'excitation peut se faire plus profondément et le *pinhole* n'est pas nécessaire car l'émission provient seulement du plan focal - figure de [58] Victoria Sun



(b) Représentation schématisée du laser continu de la microscopie confocale et du laser pulsé Ti :Saphire pour la microscopie 2P - figure de [59]

FIGURE 1.5 – Différence entre la microscopie 1P et 2P

le proche-infrarouge. D'ailleurs, l'utilisation de longueur d'ondes NIR permet une imagerie plus profonde dans les tissus. Cependant, la spectroscopie à deux photons nécessite un laser pulsé puissant de l'ordre de la femtoseconde, assez coûteux (fig.1.5b).

La spectroscopie des lanthanides

Les lanthanides appartiennent à la famille des terres rares (avec l'yttrium et le scandium). Ils s'extraient des minerais de bastnasites $(Ln)FCO_3$ et de monazites $(Ln)PO_4$ qui contiennent environ 5-15% en masse en terres rares [3]. Les réserves de lanthanides ne sont pas rares comme le nom pourrait laisser croire. En revanche, ils sont peu concentrés donc nécessitent d'extraire beaucoup de tonnage de minerais pour obtenir une quantité suffisante de lanthanides. Aujourd'hui, les lanthanides se retrouvent dans de nombreux domaines et technologies de la vie courante comme les téléphones portables, les voitures électriques, l'imagerie médicale etc [60]. Aujourd'hui, la demande en terre rares continue d'augmenter de 5% par an notamment avec l'accroissement du secteur des énergies. Les turbines des éoliennes contiennent par exemple 600 kg de terre rares. Une voiture électrique en contient environ 5 à 10 kg [60]. L'utilisation des lanthanides consiste donc en un vaste thème de recherche dans le monde scientifique.

En science bio-analytique, les techniques par luminescence permettent une meilleure compréhension du vivant à l'échelle moléculaire. Les fluorophores organiques sont largement exploités pour cette application mais les propriétés luminescentes des complexes de lanthanides se sont révélées être intéressantes à exploiter.

Les raies d'émissions sont fines et distinctes permettant de discriminer facilement chaque lanthanide. Leur long temps de vie de luminescence permet de travailler en temps résolu, ce qui est un avantage pour s'affranchir de l'auto-fluorescence du milieu biologique. On peut ainsi espérer une meilleure sensibilité de la part des sondes utilisant les complexes de lanthanides luminescents. Les complexes de lanthanides luminescents (CLLs) ont déjà prouvé leur efficacité dans plusieurs kits commerciaux de bioanalyse utilisés en laboratoire (Lumiphore [61], Cisbio [62]).

1.1 Les lanthanides

La configuration électronique

Les lanthanides comprennent 15 éléments du tableau périodique entre le lanthane ($Z=57$) et le lutécium ($Z=71$). Leur configuration électronique est : $[Xe]4f^n6s^2$ ou

Introduction

$4f^{n-1}5d^16s^2$ ($n=1-14$) pour le lanthane, cérium, gadolinium et lutécium [4]. Les lanthanides sont stables au degré d'oxydation +III.

Les propriétés spectroscopiques particulières des lanthanides sont dues aux orbitales 4f ($n = 4$ et $l = 3$) qui peuvent contenir 14 électrons au maximum. Les orbitales 4f sont moins étendues que les orbitales 5s 5p 5d et 6s et sont donc peu sensibles aux changements de l'environnement chimique. Cela en fait d'ailleurs un élément difficile à purifier à l'issue de son extraction.

Les transitions optiques

Les émissions des lanthanides recouvrent tout le spectre électromagnétique de l'UV au NIR et proviennent des transitions 4f-4f. En bioanalytique, l'euprécium(+III) et le terbium (+III) sont les plus utilisés étant les plus émissifs dans le domaine du visible. Le néodyme (+III), l'erbium(+III) et l'ytterbium(+III) sont utilisés pour leurs émissions dans le NIR.

La règle de sélection de Laporte La règle de sélection de Laporte décrit que les niveaux de même parité ne peuvent interagir par des transitions de type dipôle électrique.

Les transitions f-f par l'opérateur dipôle électrique (ED) sont donc interdites. Cependant, cette interdiction est partiellement levée sous l'influence d'un champ du ligand ; on parle alors de transitions ED induites ou forcées. Les raies f-f sont ainsi fines et caractéristiques de chaque lanthanide. De plus, cette nature partiellement interdite explique le temps de vie long des transitions f-f.

Les transitions peuvent être promues par d'autres opérateurs : l'opérateur dipôle magnétique (MD), de faible intensité, et l'opérateur quadrupôle électrique, encore plus faible.

À titre d'exemple, les raies d'émission de l' Eu^{3+} résultant de la transition électronique ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_n$ ont été représentées sur la figure 1.6. Le terme de l'état fondamental est celui ayant la plus grande multiplicité de spin (soit $2S+1=7$ pour l'euprécium et la plus grande multiplicité de l'orbital (soit F). Le couplage spin-orbite le divise de 7F_0 à 7F_6 en commençant par $J = J_{min} = 0$ car la couche est remplie à moins de la moitié (dans le cas contraire, le niveau le plus bas aurait été $J = J_{max}$). Enfin, au sein d'un ligand, un champ du cristal subdivise chaque niveau des couplages spin-orbite mais toutefois faiblement pour les orbitales 4f.

Un diagramme d'énergie des ions Ln^{3+} est représenté dans la figure 1.7 [4] [3].

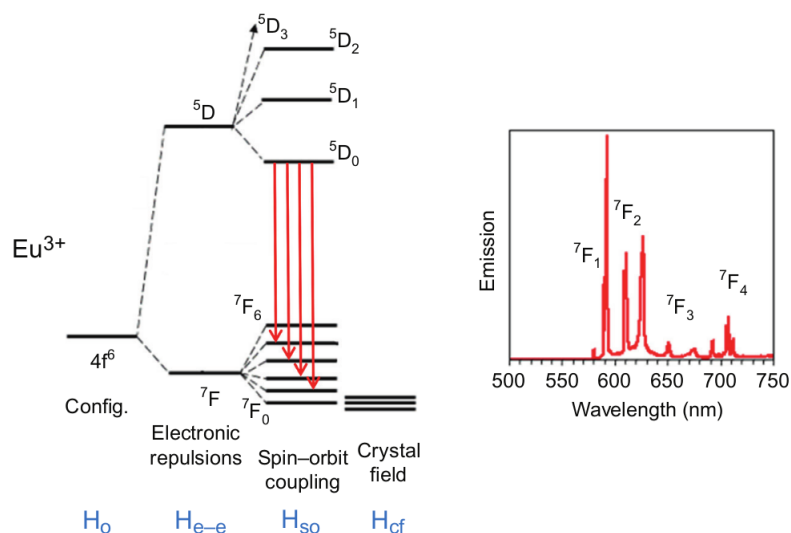


FIGURE 1.6 – Différentes contributions des divisions des niveaux d'énergie $4f^6$ de l'euporium - figure de la publication [3]

1.2 L'effet antenne

Le coefficient d'extinction molaire ϵ des lanthanides est faible, de l'ordre de $0.1 - 10 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Pour pallier ce problème, l'excitation peut s'effectuer, non pas directement par les transitions f-f du lanthanide, mais par un composé aromatique possédant un meilleur coefficient d'extinction molaire. Il aura pour rôle de capter la lumière incidente puis de transférer l'énergie acquise pour peupler les niveaux excités du lanthanide (fig. 1.8).

Le schéma énergétique de l'effet antenne peut être généralisé par trois grandes étapes : l'absorption, le transfert d'énergie du ligand au lanthanide et l'émission. Le chemin énergétique du système est schématisé dans la figure suivante 1.9.

Plus précisément, le ligand absorbe la lumière d'excitation (10^{-15} secondes). Un électron du ligand est excité vers de plus hauts niveaux d'énergie puis se relaxe au S_1 par conversion interne (IC). Du niveau S_1 , il est transféré à un état donneur D du ligand. Ce niveau donneur peut être l'état triplet associé par croisement inter-système (D peut aussi être un état singulet); la désexcitation radiative est alors de spin interdite et donc bien plus lente. De ce fait, la désexcitation non-radiative peut entrer en compétition et être favorable. Une désexcitation utile ici est bien sûr le transfert d'énergie de l'antenne vers le lanthanide [63]. Après transfert à un niveau excité accepteur A du lanthanide, l'électron est de nouveau relaxé par IC à un état E susceptible d'une émission radiative du lanthanide. Enfin, il y a émission de lumière.

Par exemple, l' Eu^{3+} a pour état accepteur les niveaux $5D_1$ et $5D_2$ et comme état

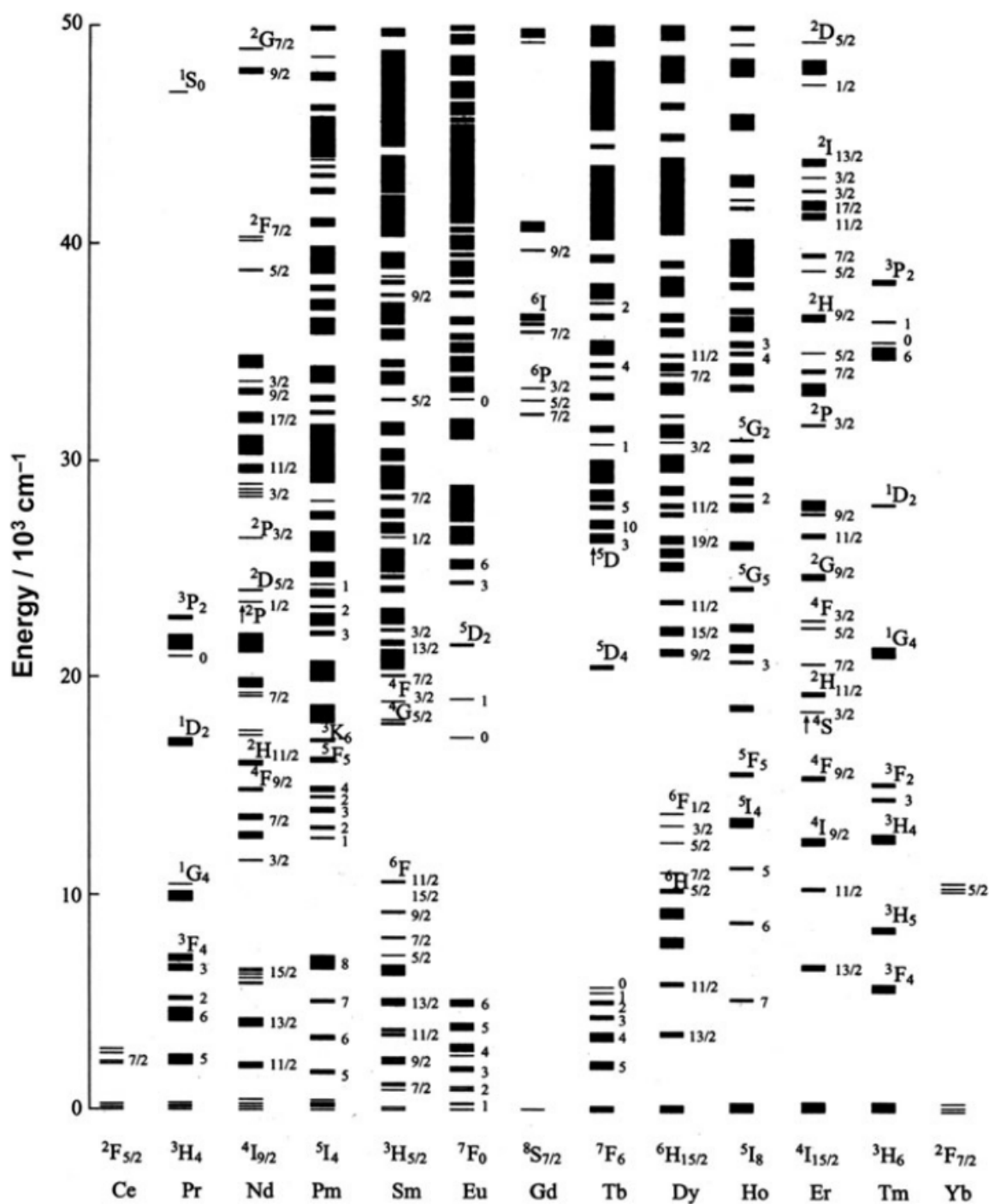


FIGURE 1.7 – Diagramme d'énergie des ions Ln^{III} d'un cristal type LaF_3 - figure de la publication [4]

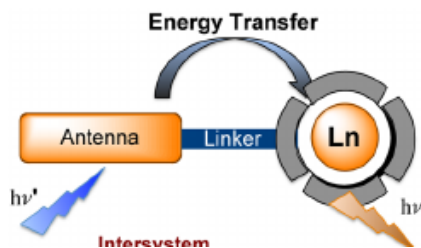


FIGURE 1.8 – Principe de l’effet antenne - figure de la publication [5]

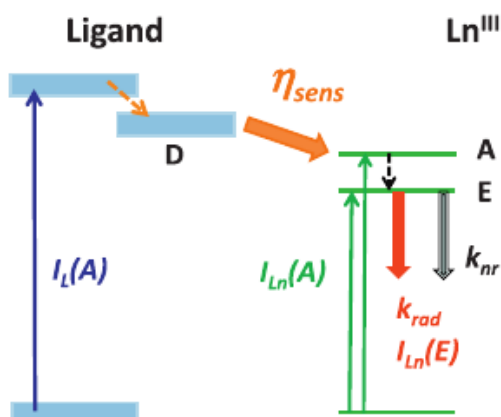


FIGURE 1.9 – Schéma du chemin énergétique d’un système antenne-lanthanide - figure de la publication [6]

émetteur le niveau 5D_0 . Quant au Tb^{3+} , l’état accepteur est confondu avec son état émetteur qui est le 5D_4 .

L’absorption se fait au niveau du ligand et l’émission au niveau du lanthanide. Cela se traduit par un grand écart entre le spectre d’absorption et d’émission du système que l’on peut appeler « un déplacement de Stokes induit par le ligand » (ou déplacement de Richardson).

Transfert d’énergie

Le transfert type Dexter ou Förster (décrits précédemment dans la partie 1.5) peuvent intervenir dans l’effet antenne. C’est pourquoi l’efficacité de transfert est dépendant de la distance entre l’antenne et le lanthanide.

Pour rappel, le DRET implique que l’électron de l’antenne est transféré à l’état accepteur A du lanthanide en même temps qu’un électron de l’orbitale 4f du lanthanide est transféré au niveau S_0 de l’antenne. Le FRET implique que l’électron excité de l’état donneur D retourne à son orbitale initiale tandis qu’un électron de l’orbitale 4f est excité à un niveau haut en énergie.

Plus généralement, le niveau donneur D a un long temps de vie pour permettre un transfert efficace, comme le triplet. D’autres niveaux D existent comme les niveaux

de transfert de charge CT (ILCT, LMCT ; MLCT). Le niveau 1S peut aussi être un niveau D mais il n'a été prouvé que tardivement [6] [64].

Rendement quantique

Il faut redéfinir le rendement quantique ϕ dans ce type de système. Il est déterminé par le nombre de photon émis par le lanthanide sur le nombre de photons absorbés par le ligand. Il est possible de préciser le rendement quantique vu au chapitre précédent. Le rendement quantique est alors le produit de l'efficacité de sensibilisation η_{sens} par le rendement quantique intrinsèque du lanthanide ϕ_{Ln}^{Ln} . ϕ_{Ln}^{Ln} correspond au rendement quantique du lanthanide si excité directement par ses niveaux excités 4f.

$$\phi_{total} = \phi_{Ln}^L = \eta_{sens} \times \phi_{Ln}^{Ln} \quad (1.35)$$

Brillance Une haute brillance est un paramètre important pour obtenir des images contrastées avec peu de bruit de fond. La brillance de la luminescence du lanthanide se définit par le produit du rendement quantique et du coefficient d'absorption molaire telle que :

$$B = \phi_{total} \times \epsilon \quad (1.36)$$

avec ϵ le coefficient d'extinction molaire.

1.3 Design d'un complexe de lanthanide luminescent (CLLs)

1.3.1 Idée générale

Un bon système d'effet antenne nécessite de manière générale :

- un haut coefficient d'absorption de l'antenne
- une bonne efficacité de transfert entre le ligand et le lanthanide
- une minimisation des processus de désactivations non radiatives.

Ces principes ont été résumés par J.C.G Bünzli et présentés dans plusieurs de ses livres et ses revues [4] [65] [6].

Quelques points sont présentés ci-dessous.

La coordination des lanthanides Un ligand a pour rôle de complexer le lanthanide avec une bonne constante de stabilité afin qu'il ne soit pas relargué : le lanthanide est toxique pour les organismes vivants.

Il sert également à le protéger du solvant et à minimiser les possibles voies de désexcitations. En effet, les oscillateurs O-H de l'eau sont une voie de désexcitation des lanthanides réduisant fortement le temps de vie de luminescence de ceux-ci (fig. 1.9 p. 21, en gris).

La sphère de coordination est saturée pour 8-10 coordinations avec le lanthanide qui peuvent provenir des groupements donneurs comme des carboxylates ou amines ou bien des phosphonates etc.

Le nombre de molécule d'eau peut être estimé grâce aux mesures de temps de vie de luminescence. L'énergie vibrationnelle de l'eau est $\tilde{\nu} = 3600 \text{ cm}^{-1}$ et celui de l'eau deutérée est $\tilde{\nu} = 2200 \text{ cm}^{-1}$. La relation empirique entre le temps de vie et le nombre de molécule d'eau q est la suivante [66] [67] [6] :

$$q = A \times (\Delta k_{obs} - B) \quad (1.37)$$

avec

$$\Delta k_{obs} = k_{H_2O} - k_{D_2O} = \frac{1}{\tau_{H_2O}} - \frac{1}{\tau_{D_2O}} \quad (1.38)$$

et A et B deux paramètres empiriques des processus de désactivations par le solvant. Pour l'euporium, ils valent :

$$q = 1.11 \times (\Delta k_{obs} - 0.31) \quad (1.39)$$

Pour le terbium, ils valent :

$$q = 5 \times (\Delta k_{obs} - 0.06) \quad (1.40)$$

Cette relation est applicable quand le processus de désactivation par l'eau est le processus majoritaire [66].

Écart des niveaux d'énergie L'efficacité de transfert entre le ligand et le lanthanide est régie de manière critique par les positions des états donneurs du ligand D et accepteur du lanthanide A. Des écarts optimums ont pu être déterminés [6] : l'écart entre l'état triplet donneur T_1 d'un ligand et du niveau émissif 5D_4 du Tb^{III} ou 5D_0 pour l' Eu^{3+} doit être compris entre 2000-4000 cm^{-1} . En dessous, le transfert inverse (BT) sera fortement favorisé. Au dessus, le transfert est peu efficace.

Différentes voies de sensibilisation du lanthanide et de désactivation

La difficulté d'obtenir des CLLs très luminescent provient des nombreuses voies de transfert d'énergie et transfert inverse ou de désactivations radiatives et non radiatives qui peuvent intervenir. La figure 1.10 tirée de la revue de D. Parker résume bien ces nombreuses voies. Trois niveaux d'états excité de l'antenne L qui peuvent sensibiliser

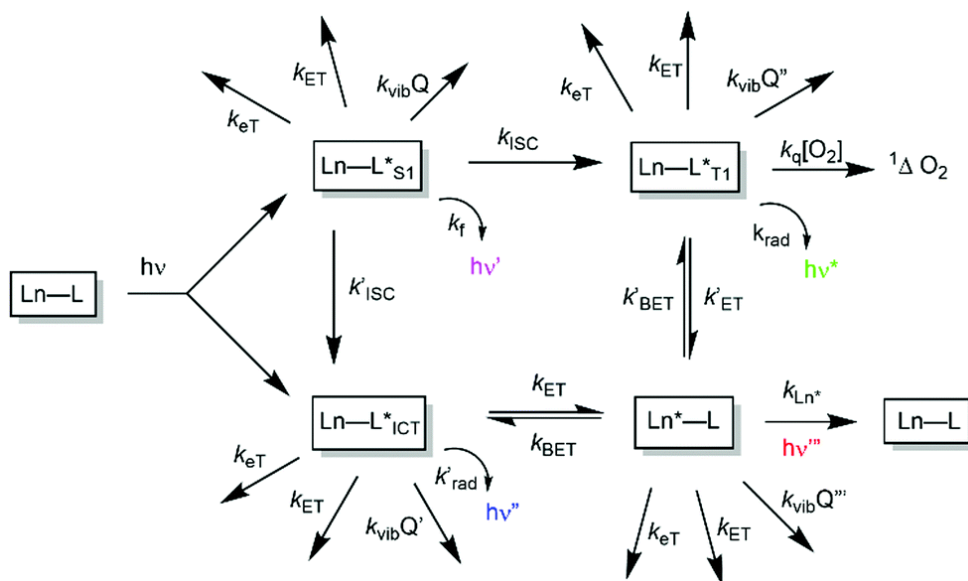


FIGURE 1.10 – Voies de sensibilisation du lanthanide k_{ET} par état singlet LnL_{S1}^* , triplet LnL_{T1}^* et ICT LnL_{ICT}^* ; voies de désactivation radiative de l’ICT et du triplet k_{rad} et du lanthanide k_{Ln^*} ; voies de désactivation non radiative par transfert inverse k_{BT} , par vibration k_{vib} , et par collision avec le dioxygène pour former de l’oxygène singlet $k_q[O_2]$ et transfert d’électron PeT k_{eT} - figure de la publication [7]

le lanthanide Ln^* ont été représentés : le niveau singlet S_1 , triplet T_1 et l’ICT.

1.3.2 Intérêt des sondes à base de lanthanide

Les propriétés des lanthanides rendent leurs utilisations prometteuses pour le développement de biosondes luminescentes pour un usage *in vivo*. Comme dit précédemment, chaque lanthanide se distingue par des raies d’émission fines et caractéristiques et se distingue des émissions des fluorophores organiques classiques de formes larges. La nécessité d’une antenne pour exciter le lanthanide de manière indirecte a pour conséquence une bonne séparation des longueurs d’ondes d’excitation et d’émission. Enfin, l’émission provient de la transition des orbitales internes $f-f$ qui, de par leur nature interdite par la règle de Laporte, ont une longue vie de luminescence. Le temps de vie de luminescence d’un lanthanide est de l’ordre de la μs (Dy, Yb, Nd) et de la ms (Eu, Tb) alors que celui de l’autofluorescence du milieu biologique est de l’ordre de 1-10 ns. Cette particularité peut être mise à profit pour des mesures à détection en temps résolu.

La détection en temps résolu La détection en temps résolu (TR) signifie que le signal de luminescence est enregistré après un délai de temps défini. Par ce moyen, la fluorescence à temps de vie court est filtrée et seule les émissions à long temps de vie sont mesurées. Le rapport signal sur bruit est ainsi nettement amélioré.

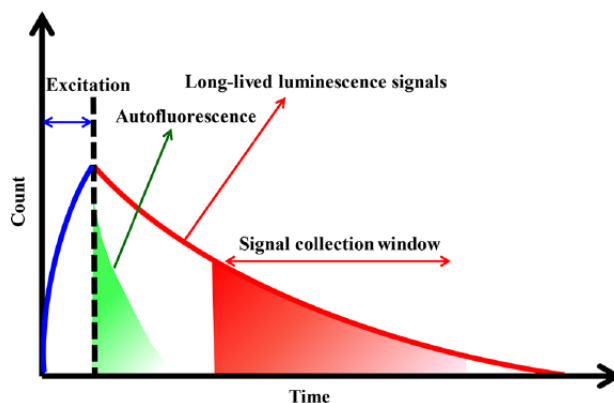


FIGURE 1.11 – Principe de la détection en temps résolu - figure de la publication [8]

Phosphorescence Lifetime Imaging Microscopy : PLIM Une technique d'imagerie cellulaire découle de l'utilisation des temps de vie : la mesure des temps de vie est possible par technique PLIM. Par PLIM, l'échantillon est excité par des courtes impulsions répétées qui sont chacune suivies de l'acquisition de l'intensité de luminescence. Cependant, la source d'excitation doit être plus lente. L'expérience a donc pour défaut de durer plus longtemps [68]. En plus d'une étude de la luminescence, l'imagerie par temps de vie est avantageuse pour plusieurs raisons : elle est indépendante de la concentration locale de la sonde dans la cellule contrairement à l'intensité de luminescence et aussi de l'intensité de la puissance laser.

1.3.3 Exemples de complexes de lanthanides couplés à son antenne

Complexe historique

Dans la publication de B. Alpha de 1987 [69], un ligand macrobicyclique tris-bipyridinique (bpy) pour l' Eu^{3+} et le Tb^{3+} a été étudié. Ce ligand sature la sphère de coordination du lanthanide et permet de minimiser les voies de désactivations par le solvant. De plus, le bpy joue le rôle d'antenne qui transfère l'énergie de l'état excité π, π^* vers les niveaux excités de l' Eu^{3+} et le Tb^{3+} . Ainsi, en excitant le bpy à 300 nm, on retrouve l'émission caractéristique du lanthanide coordonné avec un temps de vie de 0.34 ms.

Complexe commercial

L'équipe de K. Raymond a décrit un complexe de terbium commercial des plus luminescents. Le terbium est complexé par quatre 2-hydroxyisophtalamide (IAM) [10] (Figure 1.13). Ce complexe est très luminescent avec un rendement quantique à 59% au maximum d'absorption à 340 nm dans l'eau, un coefficient d'absorption de 27 300

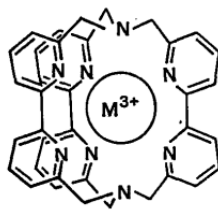


FIGURE 1.12 – Structure du ligand macrobicyclique tris-bipyridinique -figure de la publication [9]

$M^{-1}cm^{-1}$ ce qui donne une brillance de $15\,000\,M^{-1}cm^{-1}$. Le temps de vie est long de 2.45 ms.

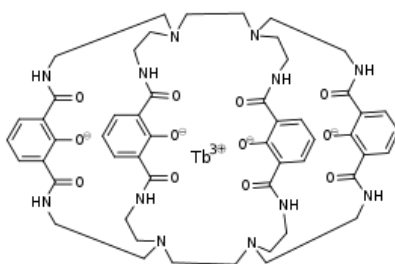


FIGURE 1.13 – Structure du complexe IAM développé par K. Raymond et al. [10]

Sensibilisation par l'ILCT (*Intra-Ligand Charge Transfer*) de l'antenne

Historiquement, une sensibilisation par le triplet est proposée pour la sensibilisation du lanthanide mais ce n'est pas la seule voie de sensibilisation. De nouvelles antennes ont été développées au cours des dix dernières années pour permettre une sensibilisation par un état de transfert intra-ligand, ILCT. Le CT (*Charge Transfer*) a l'avantage d'introduire un plus grand coefficient d'absorption, un déplacement de l'absorbance vers les plus hautes longueurs d'onde et une possibilité de propriété d'absorption bi-photonique [64].

Pour obtenir ce CT, il faut deux groupements dont un à caractère électro-donneur (EDG) et un à caractère électro-accepteur (EWG) : ce sont des antennes de type « push-pull » [70]. Le transfert de charge intra-ligand est initié par le groupement électro-donneur et se dirige vers le groupement électro-attracteur.

Takalo et al [71] ont développé plusieurs complexes d'euprium soluble dans l'eau. Le ligand est une structure triazacyclononane trispicolinate (TACN) couplée avec trois antennes alcyne-aryliques permettant d'étendre la π -conjugaison (fig. 1.14a). Il présente un rendement quantique 18%, un coefficient d'extinction molaire $10\,900\,M^{-1}cm^{-1}$ à 320 nm dans le tampon borate.

Les équipes de D. Parker et O. Maury ont travaillé également sur ces types de complexes et les ont améliorés [34] [72] [73]. Le niveau d'énergie de l'état donneur CT est relativement accessible et peut être modifié par l'ajout de groupements donneurs tel que des donneurs faibles alkyl, alkoxy ou donneurs plutôt forts, alkylthio ou dialkylamino. L'effet donneur se voit sur leur spectre d'absorption par effet bathochrome. Le maximum d'absorption se déplace vers les hautes longueurs d'onde.

Un exemple est donné sur la figure 1.14b : un groupement donneur -OMe a été rajouté sur le groupe électro-donneur et a permis d'améliorer la brillance. Ce complexe d'euporium démontre des propriétés luminescentes intenses mais avec une solubilité dans l'eau faible. Les mesures ont été effectuées dans le méthanol : son rendement quantique est de 25%, une brillance de $28\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ à 338 nm [74].

Pour aider la solubilisation, le groupement zwitterionique sulfobetaine a été ajouté sur le groupement électro-donneur. Le composé est parfaitement soluble dans l'eau mais les propriétés luminescentes sont diminuées avec un rendement quantique de 18%, une brillance de $5700\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ à 337 nm, [75] (Figure 1.14c). Le caractère donneur a donc un effet sur la population du CT et donc sur l'efficacité de sensibilisation de l'euporium.

Pour sensibiliser le terbium, il faut une antenne avec un CT plus haut en énergie car le niveau accepteur est plus haut que celui de l'euporium. L'équipe d'O. Maury a proposé un bi-phényle, avec une π conjugaison diminuée par rapport à l'antenne précédente. Il porte un groupement donneur dont la rotation des deux phényles sont contraints par un méthyl [76] (Figure 1.14d). Il a été mesuré un rendement quantique exceptionnel de 74% et une brillance similaire du composé de K. Raymond (IAM), à $16\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

En général, un état donneur assez haut en énergie ($22400\text{-}24400\text{ cm}^{-1}$) pourra sensibiliser le terbium, celui à énergie modérée ($19800\text{-}21800\text{ cm}^{-1}$) sensibilisera l'euporium. Comme vu précédemment, l'écart énergétique entre le niveau donneur du ligand et le niveau accepteur du lanthanide est très important pour bénéficier des propriétés spectroscopiques des complexes de lanthanides.

1.3.4 Exemple des sondes à base de CLL dans un système FRET

Le complexe de lanthanide peut prendre le rôle de donneur dans un système FRET. Un fluorophore organique prend alors le rôle d'accepteur d'énergie. D'ailleurs, il est possible d'utiliser la dénomination LRET pour *Luminescence resonance energy transfer* lorsque l'émission n'est pas de la fluorescence

La particularité de ce système repose sur le long temps de vie de luminescence du

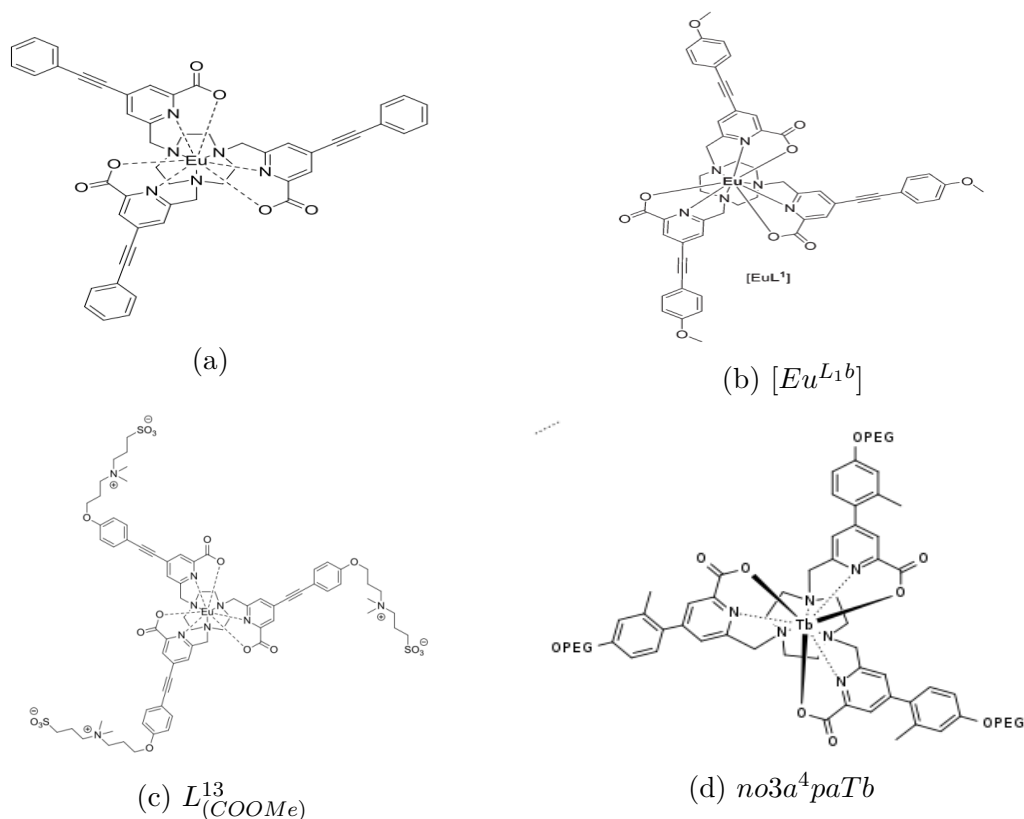


FIGURE 1.14 – Structure de complexes luminescents d’europium et de terbium

donneur et la possibilité de faire du temps résolue, TR-FRET.

TR-FRET Un FRET en temps résolu nécessite un donneur à temps de vie de luminescence long avec un accepteur de la famille des fluorophores organiques à temps de vie court. Par TR-FRET, le temps de vie de l’accepteur dépendra du temps de vie du donneur et de l’efficacité de transfert. Ainsi, il serait possible de mesurer l’émission de l’accepteur organique en temps résolu.

Voici un exemple. L’équipe de Tero Soukka a publié un système TR-FRET pour tester l’activité de la caspase-3. La caspase-3 est une enzyme clé dans la cascade proteolytique pendant l’apoptose. Le schéma du principe de ce système est donné dans la figure 1.15. La sonde est constituée d’un Tb^{3+} -LBP (*Lanthanide-Binding Protein*) donneur, dont l’antenne est un tryptophane sur la séquence d’acides aminés, et de la protéine fluorescente GFP accepteur [11] ; ils sont couplés par une séquence peptidique contenant une séquence reconnue pour l’activité de la caspase-3.

Sans activité enzymatique, on mesure l’émission de la GFP en TR-LRET car le terbium est assez proche de la GFP pour permettre un LRET. En présence de l’enzyme, la séquence cible est clivée : l’émission de la GFP n’est plus visible au profit de l’émission du terbium (fig. 1.15b).

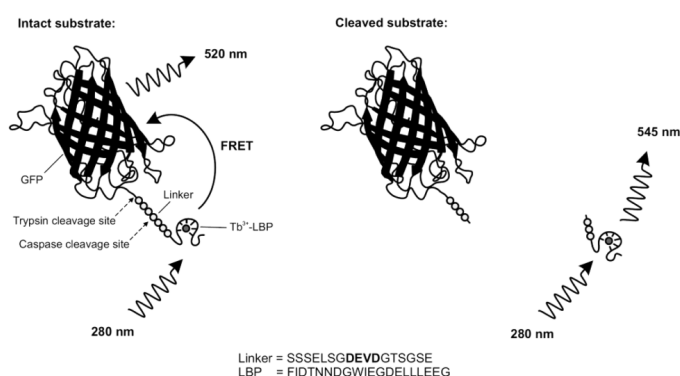
Quant au temps de vie, le temps de vie du terbium avant clivage est de 0.95 ms

Introduction

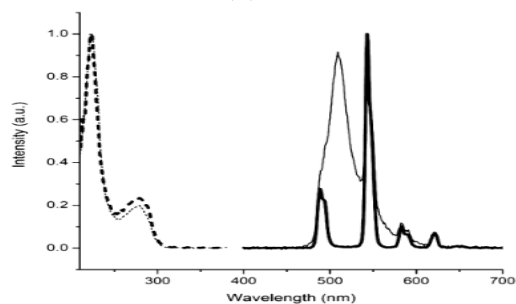
et après clivage de 2.49 ms (fig. 1.15c). Le temps de vie du terbium augmente car la GFP n'est plus à proximité et le LRET n'est pas possible.

L'émission et le temps de vie mesurés du GFP provient forcément d'un transfert LRET du terbium car sinon ils ne seraient pas visible en temps résolu (fluorescence < 3ns).

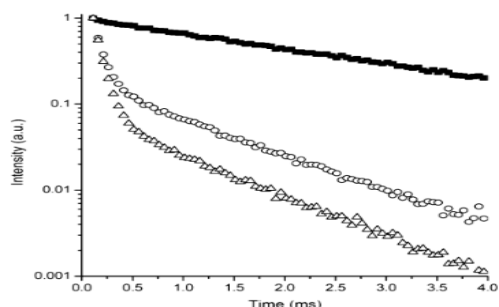
Il faut noter que la longueur d'onde d'excitation de cette sonde se situe dans l'UV à 280 nm, ce qui est peu adapté pour une utilisation *in vivo* à cause de la forte absorption du milieu cellulaire dans l'UV et la haute énergie de la lumière incidente pouvant endommager le matériel biologique. De plus, cette sonde n'est probablement pas perméable à la membrane cellulaire et doit donc être modifiée si une utilisation *in cellulo* est envisagée.



(a) Principe de la sonde de test d'activité de la caspase-3



(b) Spectre d'émission (ligne noire fine) à $\lambda_{ex} = 280$ nm et d'excitation (tirets fins) $\lambda_{em} = 520$ nm de la sonde avant clivage et après clivage (ligne et tirets gras) $\lambda_{em} = 545$ nm en temps résolu



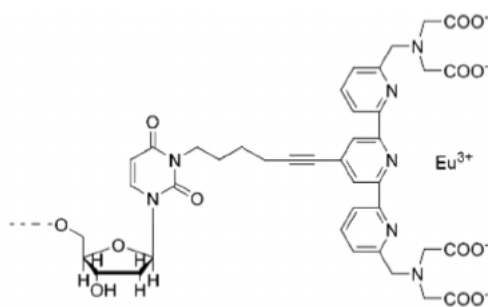
(c) Décroissance de la luminescence en temps résolu du GFP avant clivage (triangle) à $\lambda_{em} = 520$ nm et du terbium ($\lambda_{em} = 545$ nm) avant (cercle) et après clivage (carré noir)

FIGURE 1.15 – Principe d'une sonde TR-FRET entre le terbium est la GFP et résultats spectroscopiques en temps résolu -figure de la publication [11]

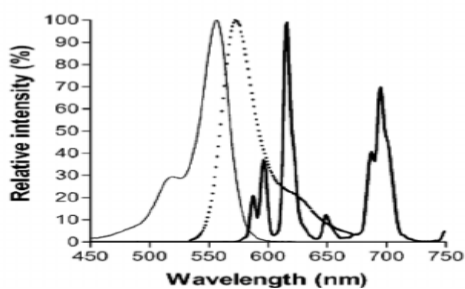
nFRET Le FRET se caractérise par le recouvrement du spectre d'émission du donneur et le spectre d'excitation de l'accepteur. Un autre type de FRET a été déterminé avec l'utilisation des CLLs (d'euprium) qui ne respecte pas cette condition de recouvrement de spectre, d'après des études de l'équipe d'Hemmilä [12].

Introduction

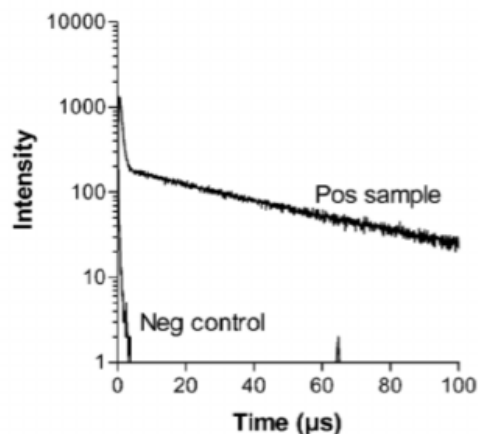
V. Laitala publie en 2005 un modèle de sonde qui cible spécifiquement une séquence d'ADN par hybridation entre deux oligonucléotides dont un comporte le chélate d'euporium (fig. 1.16a) et l'autre, un fluorophore accepteur, ALEXA Fluor 546 [12]. La figure 1.16b montre qu'il n'y a que très peu de recouvrement de spectre d'émission de l'euporium (en gras) et le spectre d'excitation d'ALEXA (ligne pleine) ; le transfert FRET devrait être très peu efficace. Or, le signal de décroissance de fluorescence d'Alexa en présence d'ADN, qui a été modélisé par une double exponentielle, donne une composante de temps de vie courte à 0.64 μ s et une longue à 48.4 μ s (fig.1.16c). Sans ADN, le temps de vie du fluorophore est inférieur à 10 ns. Ce long temps de vie de l'accepteur est alors dû au transfert d'énergie par l' Eu^{3+} (temps de vie de l'ordre de la milliseconde) [12].



(a) Structure terpyridinique du complexe d'Euporium conjugué au 3' de l'oligonucléotide par un groupement phosphoramidite



(b) Spectre d'émission normalisé de l'Eu donneur (gras) et spectre d'excitation (ligne) et d'émission (pointillée) de l'accepteur Alexa Fluor



(c) Courbe de décroissance de la fluorescence d'Alexa Fluor 546 de la sonde accepteur mesuré à 572 nm en présence de la sonde donneur et de l'ADN cible contre le contrôle négatif sans l'ADN cible

FIGURE 1.16 – Sonde FRET pour la détection d'ADN par hybridation entre un oligonucléotide comportant un complexe d'euporium (D) et un autre comportant l'accepteur ALEXA Fluor 545 (A) - figures de la publication [12]

L'auteur a réitéré ses expériences avec d'autres fluorophores accepteurs, variants d'Alexa dont leurs niveaux accepteurs se situent entre les niveaux 5D_2 et 5D_0 de

Introduction

l'euporium. Des temps de vie longs ont également pu être mesurés pour ces fluorophores organique. L'auteur propose que le transfert d'énergie est possible à partir des états excités 5D_2 et 5D_1 de l'euporium.

V. Laitala décrit ce phénomène comme un *anti-Stokes shift* FRET car l'émission de l'accepteur émet à des longueurs d'ondes inférieures à celles de l'émission du donneur et a appelé ce processus nFRET pour *non-overlapping* FRET.

Conclusion

Quelques exemples de complexes de lanthanides ont été présentés dans cette partie de manière non-exhaustives. Nous avons présentés deux premiers exemples dont le ligand joue à la fois le rôle de chélateur et d'antenne, puis des complexes comportant un nouveau type d'antenne *push-pull* couplé sur le ligand. Enfin, nous avons choisis de présenter deux exemples d'utilisation de lanthanide dans un système FRET. Depuis les complexes de l'équipe de J-M Lehn, de nombreux complexes de lanthanides ont été développés pour obtenir de meilleures brillances et de meilleures stabilités en conditions physiologiques.

Les sondes à zinc

1.1 Le zinc

Le zinc est le deuxième métal le plus abondant dans le corps humain après le fer. Sous forme ionique Zn^{2+} , il participe à de nombreuses fonctions telles que des fonctions catalytiques, structurelles et de signalisation. Il intervient dans de nombreuses phases de la vie d'une cellule que ce soit durant la division cellulaire ou durant la mort de la cellule. Il se retrouve sous forme complexée dans au moins 3000 métalloprotéines connues à ce jours ou bien sous forme d'un ion libre [77] [78][79].

La concentration de Zn^{2+} dans le milieu extracellulaire est de 1-10 μM mais peut fortement augmenter localement due à la sécrétion de Zn^{2+} par certaines cellules telles que les neurones, les cellules de la prostate et du pancréas en réponse à un stimulus [80][81].

Dans une cellule, le zinc se trouve dans tous les compartiments (noyau, ER, Goldi, mitochondries...) et atteindrait une concentration totale estimée à 200 μM dans une cellule eukaryote [82]. Le zinc(II) est majoritairement stocké dans les mitochondries. Une importante activité du zinc se passe dans le noyau notamment grâce aux métalloprotéines interagissant avec l'ADN qui participe à la régulation de la division cellulaire. Dans le Réticulum Endoplasmique (ER), il est sous forme libre ou bien complexé par des métalloprotéines transporteurs de zinc (comme les ZIP7, ZIP9...). Dans l'appareil de Golgi, les protéines synthétisées par l'ER finissent de mûrir, de recevoir des modifications post-traductionnelles puis sécrétées. Le zinc contenu dans l'appareil Golgi a probablement un rôle régulateur et catalytique. Une faible fraction est mise à disposition sous forme de zinc « libre », ou du moins faiblement complexé, appelé zinc « labile ». La concentration de zinc labile est estimée entre 10^{-11} et 10^{-9} M.

L'homéostasie du zinc est contrôlée dans le corps mais la globalité de ces mécanismes n'est pas encore connue de nos jours. Une activité forte a été localisée dans le cerveau, le pancréas, la prostate et les glandes mammaires et une dérégulation du zinc dans ces parties est associée à des maladies telles que l'Alzheimer le diabète, [83] ou le cancer de la prostate et du sein [84]. Le zinc peut être un biomarqueur

de ces maladies et sa détection présente donc un intérêt pour la compréhension et le diagnostique de maladie.

Pour mieux comprendre les processus biologiques impliquant le zinc, il nous manque une « carte » de la répartition du zinc dans la cellule et les différents compartiments cellulaires (RE, Golgi, noyau, mitochondrie) [77] en temps réel. Plusieurs sondes à zinc ont été publiées au cours de ces dernières années qui ont permis de le détecter par fluorescence [85][86].

1.2 Chélater Zn^{2+}

Il existe plusieurs structures permettant de chélater le Zn^{2+} : des petites molécules organiques, des métallopeptides synthétiques ou des protéines génétiquement codées.

1.2.1 Types de chélateurs de zinc

Les molécules organiques ont l'avantage d'incorporer des groupements fonctionnels divers et sont souvent perméables à la membrane cellulaire (si soluble) mais il est difficile de prévoir sa localisation subcellulaire.

Parmi les petites molécules organiques utilisées pour chélater le zinc, il y a le dipicolylamine (DPA). Un de ses dérivés est le N,N,N,N-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenedi-amine connue sous le nom de TPEN (fig.1.17b) qui présente une très forte affinité pour le zinc ($Kd = 2.6 * 10^{-16}M$). La famille de composés Zinpyr (ZP1, ZP3, ZP4, ZP1B, ZPP1) (voir fig. 1.17c) développée par l'équipe de Stephen J. Lippard, dont certains sont commerciaux, intègre ces groupement pyridine/pyrazine combinés à une fluorescéine pour donner une sonde à zinc fluorescente [87]. Un autre chélateur connu est le tripicolylamine (TPA) (fig. 1.17d). Le désavantage de ses chélateurs est qu'ils sont peu sélectifs par rapport au cuivre. Cela n'est pas problématique pour une utilisation intra-cellulaire car le cuivre(II) n'y est pas sous forme libre mais cela le devient en milieu extra-cellulaire.

Les métalloprotéines natives peuvent être utilisées pour chélater le zinc. La plus connue est la protéine doigt de zinc [88] (fig. 1.18). Les protéines peuvent être génétiquement codées par la cellule. Pour en faire une sonde, il faut ajouter une séquence pour une protéine fluorescente comme la GFP. Cependant, le choix est limité sur les fluorophores génétiquement codés à disposition et la marge de manœuvre pour modifier la sonde est réduite [89]. Les peptides synthétiques ont l'avantage, d'une part d'être synthétisables rapidement et facilement avec un important catalogue d'acides aminés naturels et non-naturels et, d'autre part, de pouvoir être couplés facilement à des fluorophores.

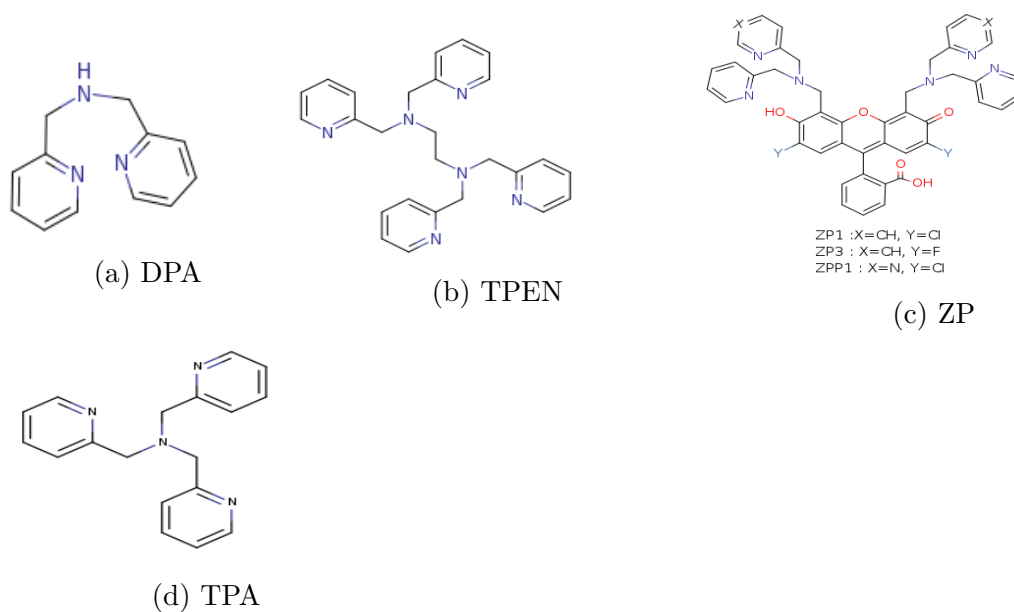


FIGURE 1.17 – Structures de quelques composés chélatant le Zinc(II) et (c) un exemple de composé combinant la partie chélateur et la partie fluorescente pour la détection de zinc

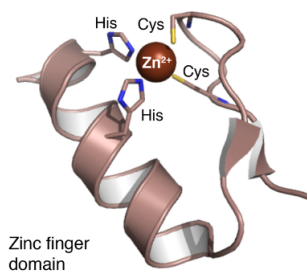


FIGURE 1.18 – Structure d'un doigt de zinc dont le zinc est chélaté par deux histidines et deux cystéines - figure de la publication de [13]

Les doigts de zinc Ce motif doigt de zinc se retrouve dans les facteurs de transcription eucaryotes qui se lient spécifiquement à une séquence d'ADN. Il a été identifié chez le facteur de transcription TFIIIA du *Xenopus laevis* oocytes, d'abord identifié par Engelke et al [90] puis une séquence consensus a pu être identifiée [91] [88] [92]. Elle est composée d'environ 20 à 30 acide aminés de conformation caractéristique : souvent représentée sous sa forme $\beta\beta\alpha$ soit deux feuillets β et une hélice α .

La séquence consensus est la suivante : $(Tyr/Phe) - Xaa - Cys - Xaa_{2,4} - Cys - Xaa_3 - Phe - Xaa_5 - Leu - Xaa_2 - His - Xaa_{3,5} - His$, où Xaa peut correspondre à n'importe quel acide aminé [93].

Parmi cette séquence, sept acides aminés sont indispensables : 2 Cys et 2 His coordonnant le zinc de manière tétraédrique et Tyr,Phe,Leu formant un cœur hydrophobe.

1.3 Les sondes à zinc

Une bonne sonde peut se définir par plusieurs critères : la stabilité, la sélectivité et l'affinité adéquate au métal, le signal de fluorescence induite et une réponse rapide.

Plusieurs stratégies différentes sont possibles pour le développement de sonde à zinc luminescente :

Les sondes intensiométriques utilisent une stratégie par laquelle l'intensité de fluorescence s'allume ou s'éteint suite à la reconnaissance de la cible. Une autre stratégie possible repose sur la modification de la longueur d'onde de fluorescence de la molécule ou sur un transfert d'énergie vers un autre fluorophore par le FRET.

L'intensité de fluorescence seule permet seulement de détecter la présence ou non de zinc. La détection ratiométrique est nécessaire pour déterminer la concentration. Le principe repose sur la mesure de deux bandes d'émission dont l'une varie en fonction de la reconnaissance de la molécule cible et dont l'autre varie différemment. On peut alors calculer le ratio des intensités au deux longueurs d'onde.

Nous présenterons dans la suite quelques exemples de sonde de détection de zinc présentant des natures et stratégies de détection différentes.

1.3.1 Des exemples de sondes ratiométriques

Deux fluorophores organiques La sonde HcZ9, a été publiée par Daniel Y. Zhang en 2014 [14] [94]. Sur un court peptide de 10 résidus, sont couplés deux fluorophores dont l'un est sensible au zinc (Zinpyr-1, ZP-1) et l'autre non (7-hydroxycoumarine, Hc). ZP-1 possède une affinité pour le zinc en dessous du nanomolaire. Le peptide sert comme un espaceur rigide entre les deux fluorophores.

Le titrage par du zinc a mis en évidence une augmentation de l'intensité de

Introduction

fluorescence du ZP1 tandis que celle d'Hc reste constante (fig. 1.19 p.36). Après ajout d'un excès de zinc, le ratio entre de l'émission de ZP1 intégrée entre 495-650 nm et l'émission de Hc intégrée entre 365-495 nm augmente de 5.3 fois.

Cette sonde est utile pour mesurer le zinc libre d'un extrait de cellule; seule la concentration globale est mesurée. Il n'est pas utilisé sur cellule vivante donc la concentration par compartiment cellulaire n'est pas connue.

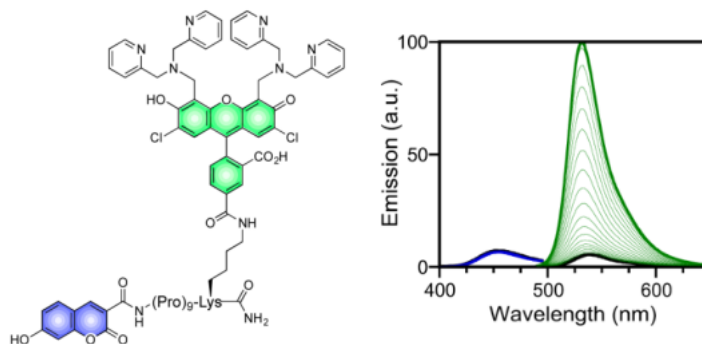


FIGURE 1.19 – Représentation de la sonde à zinc ratiométrique et de sa réponse en fluorescence durant la titration par le zinc : la fluorescence de la 7-hydroxycoumarine Hc ($\lambda_{ex} = 360nm$, $\lambda_{em} = 400 - 495nm$, en bleu) est constante et la fluorescence du Zinpyr-1 AP1 ($\lambda_{ex} = 485nm$, $\lambda_{em} = 495 - 650nm$, en vert) augmente par ajout de zinc. image de la publication [14]

FRET avec deux fluorophores codés génétiquement L'équipe de Maarten Merkx a travaillé sur des sondes à zinc basées sur un système FRET dont les fluorophores sont codés génétiquement et sur un système eCALWY [95][96][15]. eCALWY possède deux domaines de chélation du métal appelés Atox1 et WD4. Ils sont reliés par une séquence peptidique longue et flexible (Fig. 1.20a). Cerulean et Citrine sont deux protéines fluorescentes fusionnées à eCALWY et jouent le rôle de donneur et d'accepteur d'un couple FRET. La sonde étant génétiquement codée, le problème assez récurrent de pénétration cellulaire n'est plus posé.

Le principe de la sonde se base sur la modification de l'efficacité du transfert FRET par une modification de la distance entre D et A du couple FRET induite par la chélation du zinc. L'efficacité de transfert est élevée en l'absence de Zn^{2+} . Au contraire, en ajoutant du Zn^{2+} , la distance entre les deux fluorophores augmente ce qui a pour conséquence de diminuer l'efficacité FRET : on peut voir la diminution de l'intensité de fluorescence à 525 nm sur la figure 1.20b. Cependant, la différence d'intensité n'est pas si marquée. Ce n'est pas un système FRET *off-on* performant.

Cette sonde permet de mesurer le Zn^{2+} libre à des concentrations faibles et la sonde a une affinité qui peut se modifier de l'ordre du pico au nanomolaire par mutation de certaines acides aminés. En plus de la faible différence d'intensité, un autre désavantage

Introduction

du système est que les longueurs d'ondes d'émission et d'excitation sont proches ce qui peut générer un signal parasite en microscopie. Il n'est alors pas certain que le signal puisse être assez résolu par rapport au bruit.

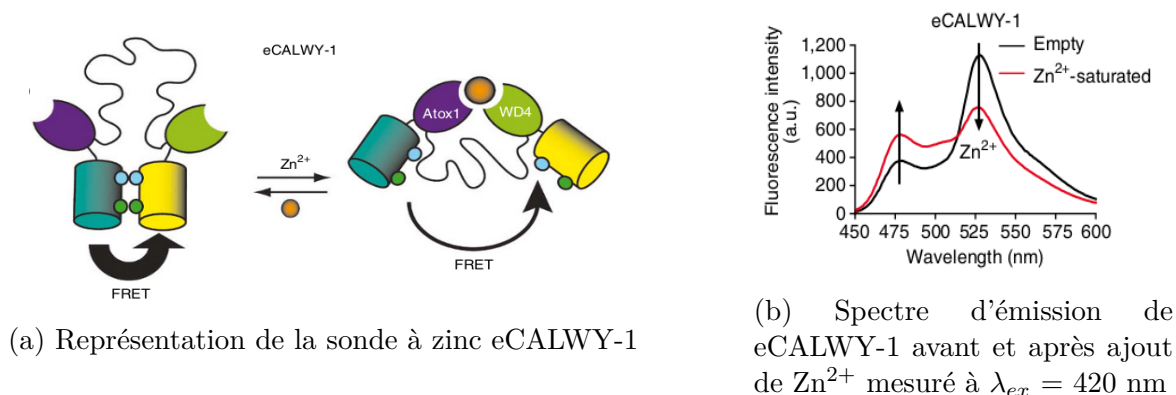


FIGURE 1.20 – Une protéine génétiquement codée pour une sonde à zinc basée sur un système FRET - figures de la publication [15]

1.3.2 Des exemples de sondes à base de lanthanides

D'autres sondes à zinc ont été publiées utilisant la luminescence d'un métal : les complexes de lanthanides ont l'avantage d'avoir une luminescence avec des raies fines et des temps de vie long. Ils peuvent être avantageux pour développer des sondes avec un meilleur rapport signal sur bruit par rapport à l'auto-fluorescence du milieu biologique.

À base d'un chélateur TPA et d'un CLL d'euporium L'équipe de T. Nagano a publié en 2004 une sonde à zinc à base de lanthanide composée d'un chélatant de zinc de type TPA et d'un chélatant de l'euporium, le DTPA. Une des pyridines du TPA est modifié en un chromophore, la quinoline (fig.1.21) [97].

La quinoline joue le rôle d'antenne pour le lanthanide et de ligand pour le zinc. Le principe de cette sonde repose sur la modulation de l'effet antenne de la quinoline vers l'euporium par la chélation du zinc.

La luminescence de la sonde nommée [Eu-7] a été étudiée en temps résolu en excitant à $\lambda_{ex} = 320$ nm. La réponse en luminescence s'accroît de 8.5 fois de la luminescence initiale au cours du titrage par du zinc (fig.1.21). Cette sonde a une bonne différence d'intensité entre la sonde libre et la sonde liée au zinc et est soluble dans l'eau. Elle semble donc bien adaptée à une application biologique.

Ils ont même réussi à mesurer la luminescence sur cellules HeLa mais la sonde a été injectée par un système de micro-injection. Ils n'ont pas présenté de résultats en incubation sur cellule vivante. Il se peut que cette sonde soit imperméable à la membrane cellulaire.

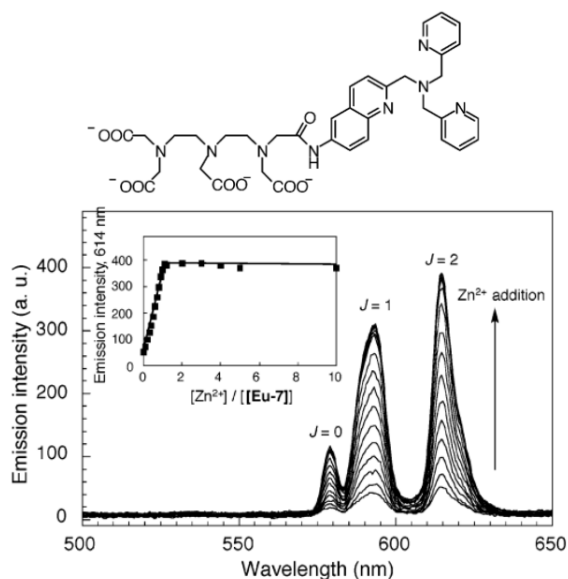


FIGURE 1.21 – Représentation de la sonde à zinc et de sa réponse en temps résolu à différentes concentrations de zinc dans de l’HEPES à $pH = 7.4$ à $50 \mu M$ excitée à ($\lambda_{ex} = 320nm$)- figure de la publication [16]

À base peptidique L’équipe de Yukio Yamamoto a publié sur une sonde à zinc à base peptidique de 10 acides aminés comportant un domaine chélatant le zinc (voir figure 1.22a). Ce domaine est défini par deux trimers d’histidine séparés par une Proline et une Glycine qui permettent un β -turn.

Cette sonde comporte le carbostyryl 124 (cs124) en C-terminal qui joue le rôle d’antenne pour le complexe DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetate) de terbium en N-terminal. Le principe de cette sonde se base sur la modulation de l’efficacité de transfert d’énergie de l’antenne au lanthanide en fonction de la distance séparant l’antenne du lanthanide. La distance entre l’antenne et le lanthanide varie par la chélation du zinc.

Lorsque le zinc(II) est complexé, le cs124 et le Tb^{3+} se rapprochent induisant un meilleur transfert d’énergie et donc on observe une augmentation de l’intensité d’émission. La sonde est excitée à 330 nm et le cs124 émet à 365 nm et le Tb^{3+} émet par ses longueurs d’ondes caractéristiques (490, 545, 583 nm). L’ajout de Zn^{2+} a pour effet de décroître l’émission à 365 nm de cs124 et d’augmenter celle du Tb^{3+} (voir figure 1.22b). Il est ainsi possible de faire un ratio entre les deux émissions.

Cette sonde est sélective également au Zn^{2+} mais présente une affinité de $160 \mu M$ donc ne peut être utilisée pour une détection de zinc cytosolique (de l’ordre du picomolaire).

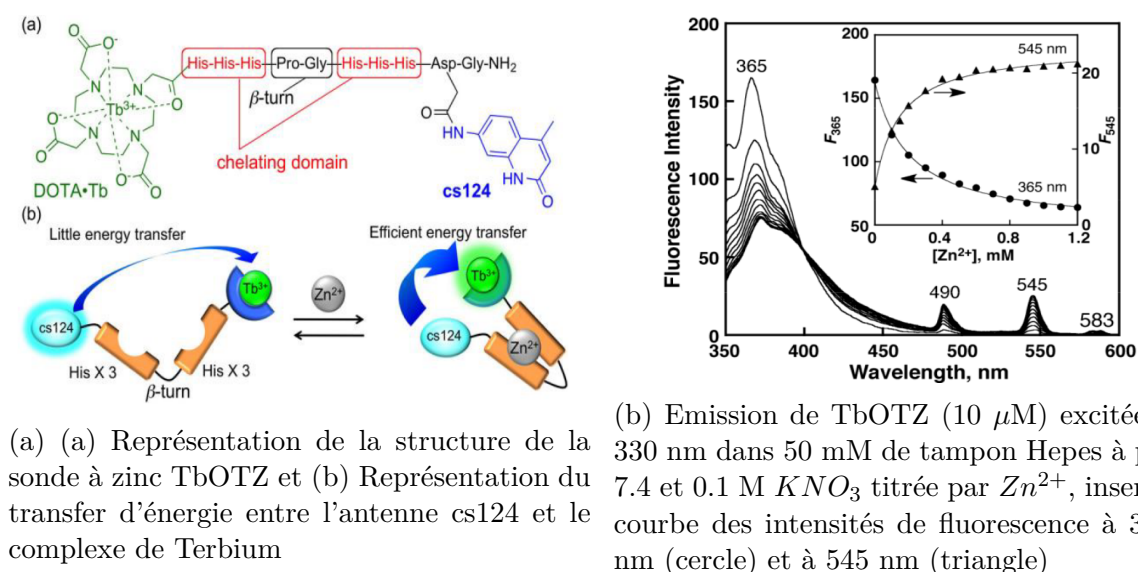


FIGURE 1.22 – Une sonde à zinc peptidique basée sur la modulation de l'efficacité de l'effet antenne vers un complexe de lanthanide luminescent - figures de la publication [17]

1.3.3 Des exemples de sondes à temps de vie

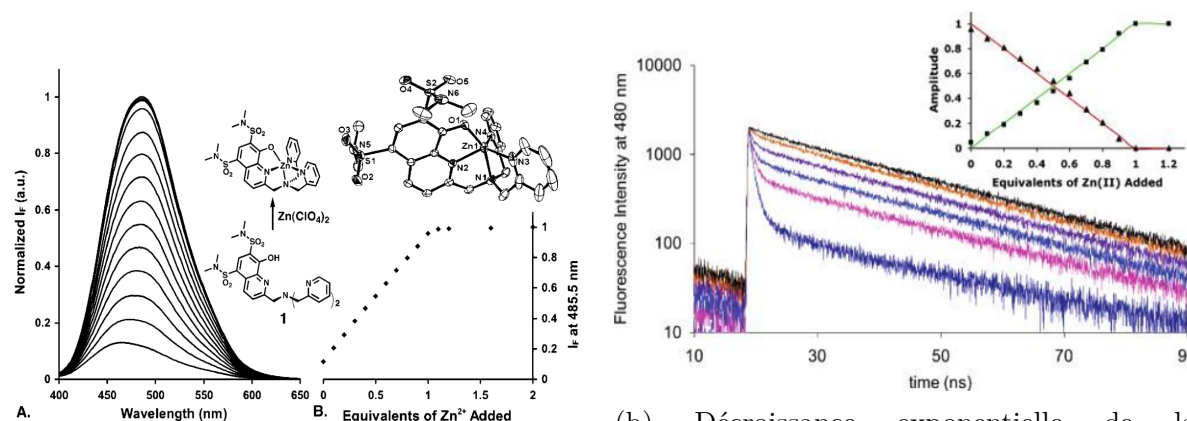
Les sondes qui ont été présentées ont leur principe de fonctionnement basé sur la détection de l'intensité de fluorescence ou un ratio de fluorescence entre deux émetteurs. Un autre paramètre spectroscopique exploitable est le temps de vie de luminescence. En effet, le temps de vie a l'avantage d'être indépendant de la concentration locale de la sonde et de la brillance de la luminescence (le facteur limitant étant le seuil de détection). De plus, il n'est pas sensible au photoblanchiment et à la diffraction de la lumière. C'est pourquoi les sondes à temps de vie peuvent être une solution potentielle pour surmonter ces inconvénients. Il devient donc intéressant de relier le temps de vie de luminescence à la concentration de la molécule cible. Toutefois, il est sensible à d'autres facteurs environnementaux tels que la présence de *quencher* à proximité.

Fluorescence d'une petite molécule organique M. Royzen a publié sur une sonde à zinc adaptée à la mesure de fluorescence en temps résolu. Elle est constituée du groupe chélatant TPA, et du chromophore, 8-hydroxyquinaldine (voir figure 1.23). Ce chromophore est au départ peu fluorescent à cause d'un *quench* de fluorescence par transfert d'électron photo-induit, PeT (*Photo-induced electron transfert*) du doublet non liant de l'azote tertiaire. Le donneur d'électron transfère un électron à l'HOMO du fluorophore inhibant sa fluorescence.

L'ajout de zinc(II) augmente considérablement la fluorescence du composé car ce doublet participe alors à la coordination du métal, supprimant le PeT. Le rendement

Introduction

quantique de la sonde progresse de 2% au départ à 24.4% avec l'ajout de Zn^{2+} .



(a) Représentation de la sonde à zinc et de sa réponse en fluorescence en temps résolu à $\lambda_{ex}=340$ nm à différentes concentrations de $Zn(ClO_4)_2$ dans une solution aqueuse de 0.1M KNO_3 , 50mM HEPES, pH 7.0 et (B.) la fluorescence titrée mesurée à 485 nm

(b) Décroissance exponentielle de la fluorescence à différentes concentration de Zn^{2+} (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 μ M, à partir de la courbe bleue sans zinc vers le haut) mesurée au maximum d'émission à $\lambda_{em}=430$ nm; inset : amplitude A_f (triangle) et A_{zn} (carré) de la double décroissance exponentielle en fonction de Zn^{2+} ajouté

FIGURE 1.23 – Sonde à zinc avec un *turn on* de l'intensité de fluorescence et une inversion des amplitudes de la décroissance exponentielle mesurée - figure de a publication [18]

Le temps de vie de a été déterminé par une double exponentielle décroissante dont le premier terme correspond à la sonde libre « *f* » et le deuxième à la sonde liée au Zn^{2+} « *zn* » tel que :

$$I(t) = A_f \exp(-t/\tau_f) + A_{zn} \exp(-t/\tau_{zn}) \quad (1.41)$$

avec A_f et A_{zn} les contributions relatives des deux composantes et τ_f et τ_{zn} .

Le temps court τ_f a été mesuré à 0.64 ns et le temps long τ_{zn} à 24.9 ns. La contribution du temps court est majoritaire à 96% de la fluorescence au départ du titrage puis diminue graduellement au profit de A_{zn} . À 1 éq de Zn^{2+} ajouté, la sonde liée est la seule contributrice de la luminescence [18].

Cette sonde à zinc possède une affinité de l'ordre du picomolaire donc elle pourrait servir à mesurer le zinc libre cytosolique. Cependant, la mesure de temps de vie de l'ordre de la nanoseconde n'est pas le plus adaptée à une utilisation cellulaire car elle se différencie peu de la fluorescence due au milieu biologique.

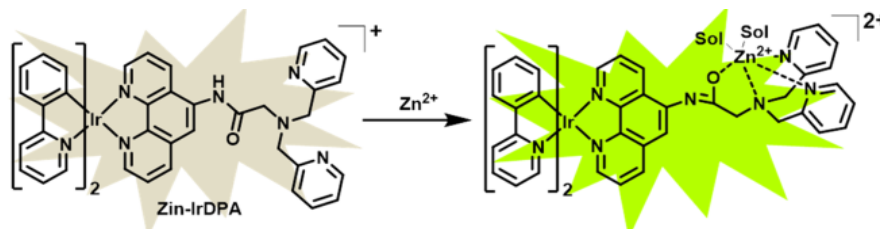
Phosphorescence d'un complexe d'Iridium C. Zhang a publié en 2018 une sonde à zinc (voir figure 1.24a) dont le temps de vie de phosphorescence est mesuré par PLIM (*Phosphorescence Lifetime Imaging Microscopy*) Il est intéressant de mesurer la phosphorescence car elle a un temps de vie plus long que la fluorescence. Appelé

Introduction

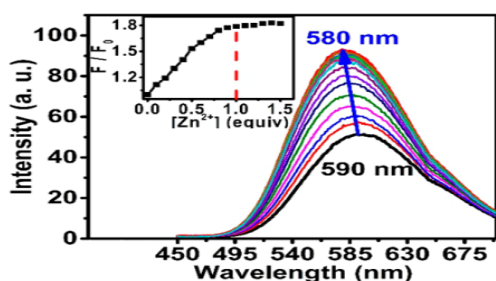
Zin-IrDPA, cette sonde présente une phosphorescence qui « s'allume » (*turn-on*) lors de la chélation du zinc(II) par le groupe chélateur DPA (bis(pyridin-2-ylmethyl)-amine) car le processus PeT (*Photo-induced electron Transfer*) du DPA vers l'iridium excité est bloqué. Les mesures ont été effectuées dans du tampon PBS (10 mM), pH 7.4, 1% éthanol. Le maximum d'émission est à 590 nm avec pour longueur d'onde d'excitation de 372 nm. La chélation du zinc induit une augmentation de 1.8 et un déplacement de l'émission à 580 nm (voir figure 1.24b). Le rendement quantique a été mesuré à 4.7% seul et 7.1% avec Zn^{2+} . Quant au temps de vie, il a été mesuré à 66.4 ns au départ puis, double à 123.5 ns avec l'ajout de Zn^{2+} (figure 1.24c).

Zin-IrDPA a pu être incubée et internalisée sur cellule MCF-7 (cellule tumorale mammaire humaine). Il est à noter que 1% d'éthanol a été ajouté dans le milieu d'incubation (PBS) qui a probablement servi à mieux solubiliser le composé. L'éthanol est toxique pour les cellules à partir d'une certaine concentration et peut aussi influencer sur la capacité d'internalisation de la molécule d'intérêt. L'équipe de recherche a observé que Zin-IrDPA se localise dans les mitochondries par colocalisation avec le marqueur mitochondrial Mito 633. Ensuite, par PLIM, ils ont mesuré le temps de vie sur cellules traitées avec un ajout artificiel de Zn^{2+} et sur cellule dont le zinc libre a été chélaté par l'ajout de TPEN dans le milieu d'incubation. Sur la figure 1.24d, les couleurs indiquent le temps de vie moyen des cellules traitées. Au départ, le temps de vie de phosphorescence est estimée à 627 ns; l'ajout de Zn^{2+} le fait augmenter à 722 ns; puis, l'ajout de TPEN le fait diminuer à 561 ns. Ainsi, la technique PLIM a permis de mesurer l'augmentation et la diminution de la quantité de Zn^{2+} . Pour autant, il reste une interrogation de la calibration entre les mesures PLIM et la concentration de Zn^{2+} libre intra-cellulaire.

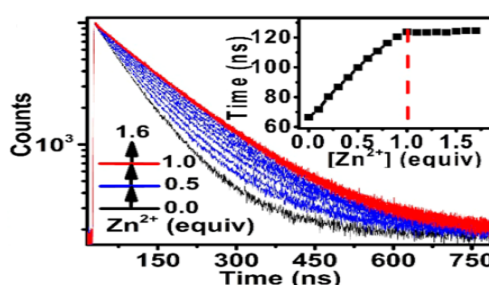
Des exemples de sondes à zinc basées sur la mesure de temps de vie sont peu nombreux dans la littérature [18][19] [98][99][100]. Or, l'utilisation de temps de vie de luminescence longs de l'ordre de la milliseconde a plusieurs avantages comme mentionné précédemment (indépendance de la concentration locale, photoblanchiment ...) dont la possibilité de faire de la microscopie en temps résolu. Si le dernier exemple présenté a des résultats prometteurs, les temps de vies restent en dessous de la microseconde et l'émission ne se trouve pas dans la fenêtre de diagnostique. Une solution intéressante à investiguer est l'utilisation des lanthanides : les temps de vie peuvent être de l'ordre de la milliseconde et plusieurs lanthanides ont des émissions supérieures à 600 nm.



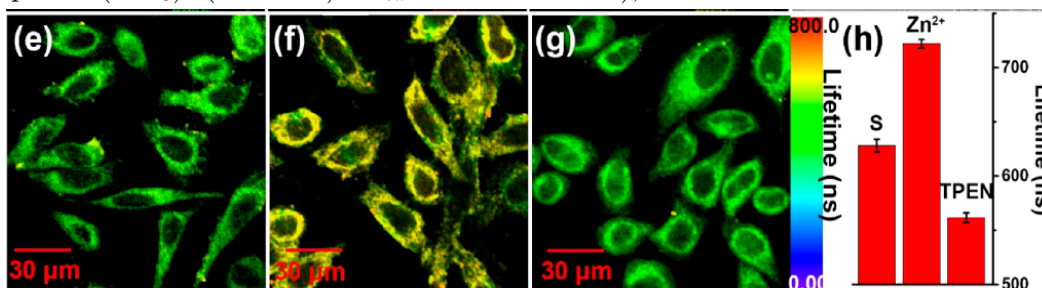
(a) Représentation de la sonde à zinc Zin-IrDPA - figure de la publication [19]



(b) Spectre d'émission de Zin-IrDPA (10 μ M), Tampon PBS (10mM, pH 7.4, 1% éthanol) titré par $Zn(NO_3)_2$ (1.25 mM) à $\lambda_{ex} = 372$ nm



(c) Décroissance de la Phosphorescence de Zin-IrDPA (10 μ M) titré par $Zn(NO_3)_2$ (1.25 mM), excité à $\lambda_{ex} = 372$ nm



(d) PIIM sur cellule MCF-7 (e) incubé avec Zin-IrDPA (10 μ M) pendant 30 min (f) ajout de $Zn(NO_3)_2$ /pyrithione 1 :1 (10 μ M) (g) cellules traité avec 25 μ M de TPEN (h) histogramme des temps de vie moyen dans (e) noté S, (f) noté Zn^{2+} et (g) noté TPEN

FIGURE 1.24 – Sonde à zinc phosphorescence à base d'un complexe d'Iridium - figures de la publication [19]

Projet de thèse

1.1 Contexte du projet de thèse

La microscopie par fluorescence est une technique incontournable pour l'imagerie cellulaire. Il est devenu accessible techniquement et financièrement de coupler des fluorophores sur des molécules par des stratégies diverses (synthétiques ou génétiquement codées) dans le but d'étudier des interactions entre deux biomolécules, de suivre des réactions chimiques par fluorescence et de localiser la molécule cible dans des compartiments cellulaires spécifiques.

Notre projet de thèse s'inscrit dans cette voie pour développer des outils de localisation et de quantification de biomolécules par microscopie de fluorescence dans la cellule. Pour cela, nous nous sommes fondés sur une combinaison de plusieurs techniques.

Nous avons apporté le savoir-faire du laboratoire sur les complexes de lanthanides. Leur luminescence est un atout pour travailler en milieu biologique car leurs raies d'émissions sont fines et facilement distinguables des autres émissions de fluorescence larges et car leur long temps de vie permet de s'affranchir de l'auto-fluorescence de ce milieu et de gagner en ratio signal sur bruit. Ajouté à cela, l'expertise du laboratoire en métalloprotéine et métallopeptide apporte un savoir-faire en synthèse peptidique qui est une structure versatile compatible avec le milieu biologique.

La ligne directrice de notre travail est de cibler, de détecter et de quantifier le zinc dans les cellules. Plus précisément, notre objectif est de développer une sonde luminescente à base de lanthanide pour la détection de zinc dans la cellule vivante. La reconnaissance du zinc sera effectuée par un peptide doigt de zinc qui sera le squelette principal des sondes à développer.

Une sonde à base peptidique

L'utilisation de peptide pour faire une sonde peut être avantageux car il combine les avantages des petites molécules organiques et des protéines plus larges génétiquement codées. Les petites molécules organiques ont l'avantage d'être en général stables,

Introduction

perméables à la membrane cellulaire avec une bonne bio-disponibilité mais parfois avec des problèmes de solubilité. Les protéines, plus grosses, permettent une bonne sélectivité et activité. La nature présente déjà un pool de protéines sélectives mais peuvent être immunogéniques. Les peptides sont une solution intermédiaire pour construire une sonde à haute spécificité compatible à l'utilisation *in cellulo* et *in vivo* risquant moins d'être toxique.

Synthèse peptidique sur phase solide (SPPS) La synthèse de peptide est maîtrisée et robuste grâce à l'invention d'une synthèse peptidique sur phase solide (SPPS) développée par B. Merrifield en 1963 (prix Nobel en 1984)[101].

La phase solide fait référence à l'utilisation d'un support solide insoluble fait d'une résine réticulée. Le peptide se construit par couplage d'acide aminé les uns à la suite des autres. Chaque acide aminé incorporé possède une chaîne latérale protégée par un groupement protecteur et leur groupement amine protégé par un autre groupement protecteur orthogonal à celui de la chaîne latérale. Le principe est schématisé sur la fig.1.25.

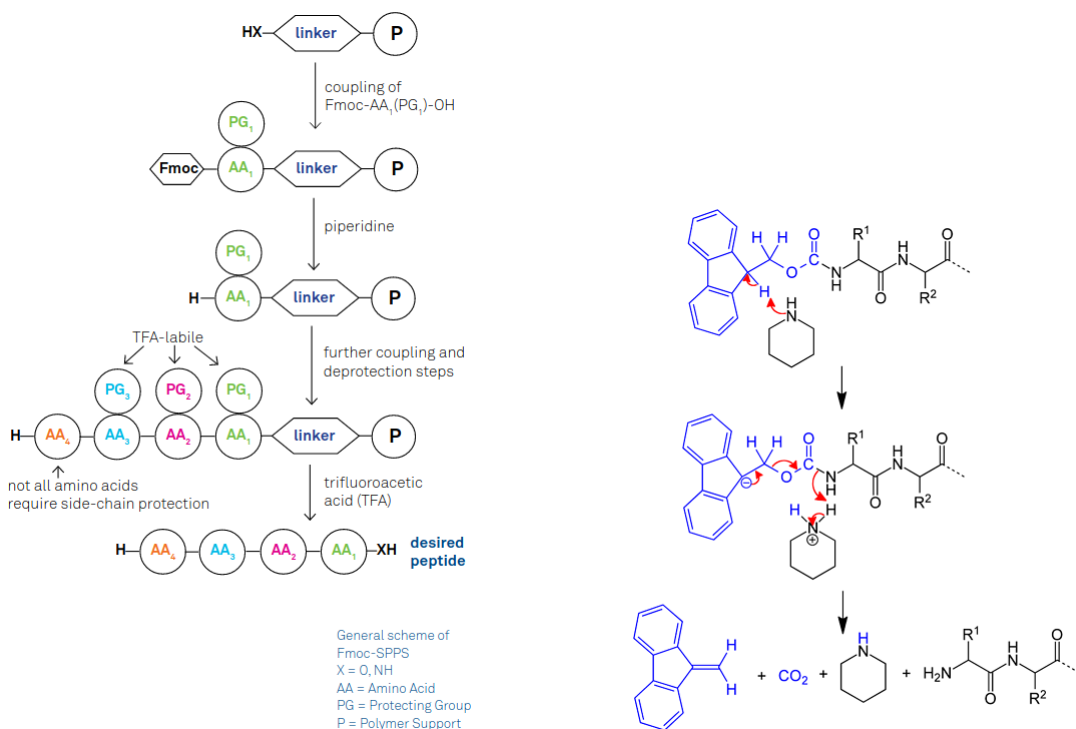


FIGURE 1.25 – Principe de la synthèse peptidique sur phase solide SPPS

L'amine est aujourd'hui plus généralement protégée par du Fmoc (9-fluorenylmethyl carbonyl). Le groupement Fmoc est déprotégé par une base à 20% de piperidine après chaque couplage pour libérer l'amine servant à coupler le

prochain acide aminé. Le peptide est coupé de la résine et déprotégé de toutes ses groupements protecteurs des chaînes latérales dans de l'acide trifluoroacétique à la fin de la synthèse.

1.2 Rappel des travaux précédents

1.2.1 Le peptide doigt de zinc pour une sonde responsive

Les sondes à zinc développées au laboratoire reposent sur la modulation de transfert d'énergie entre deux composants dont un est luminescent. Les deux composantes sont l'antenne et son complexe de lanthanide conjugués à différentes positions sur la séquence peptidique. La modulation est rendue possible grâce au repliement du peptide doigt de zinc après coordination de l'ion Zn^{2+} (voir fig. 1.26).

Sans zinc, le peptide n'a pas de structure définie et l'antenne est trop éloigné du complexe de lanthanide pour un transfert d'énergie efficace par effet antenne. La coordination du Zn^{2+} au doigt de zinc impose le repliement du peptide avec une structure définie $\beta\beta\alpha$ qui rapproche les deux composants permettant la sensibilisation du lanthanide.

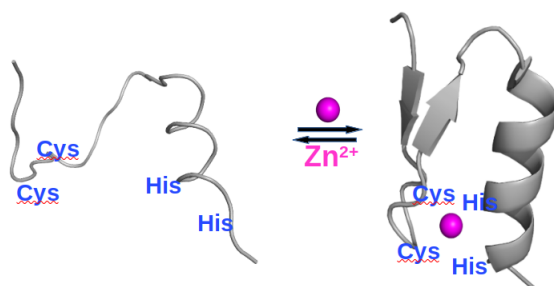
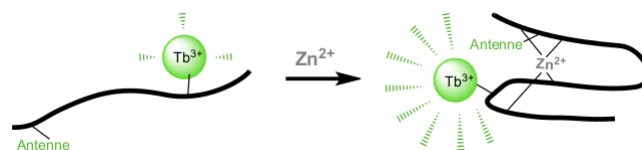


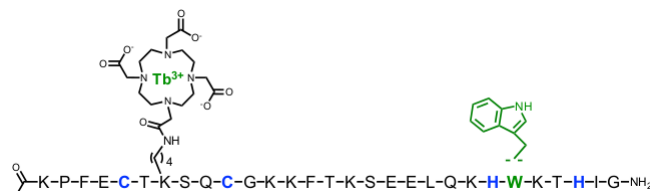
FIGURE 1.26 – Repliement du peptide doigt de zinc ZF

Plus précisément, une des premières sondes synthétisées avait pour antenne un tryptophane, positionné sur l'hélice α , et un complexe de terbium lié au macrocycle DOTA sur le feuillet β . Le principe est représenté sur les figures 1.27 tirées des travaux de Manon Isaac [20]. Cette première sonde présentait un mode de fonction *turn-on* dont la luminescence était multipliée par 30 par rapport à son intensité initiale (fig. 1.28a) et était sélective pour le zinc(II) par rapport à d'autres cations métalliques en conditions physiologiques (fig. 1.28b). Cependant, la constante de dissociation est très basse (10^{-14} M) ce qui n'est pas adaptée pour une sonde sur cellule.

Ensuite, plusieurs améliorations ont permis la mise en place d'une structure mère robuste et stable avec une constante de dissociation adaptée à des applications cellulaires soit entre 10^{-11} – 10^{-9} M. Les cystéines ont été séparées par quatre acides

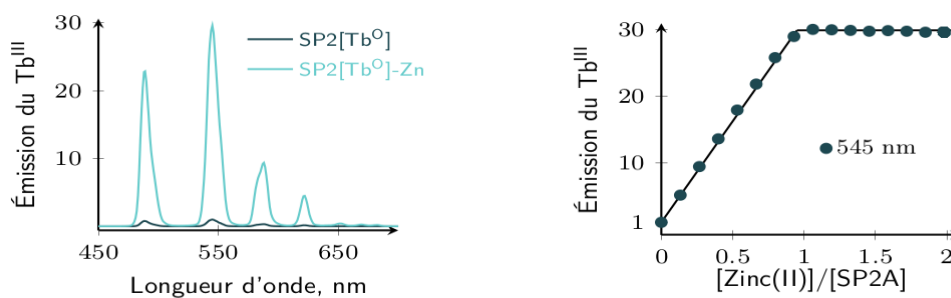


(a) Principe

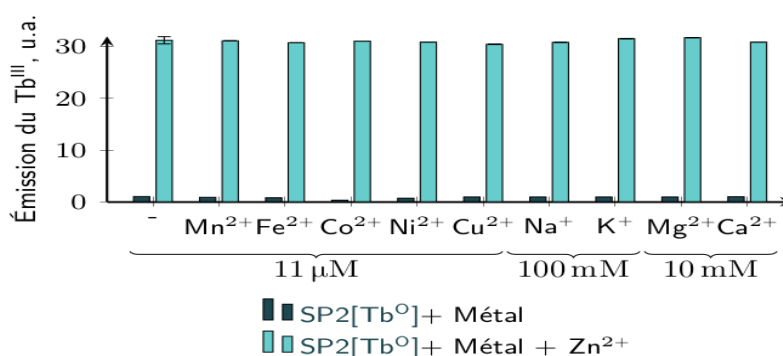


(b) Séquence

FIGURE 1.27 – Sonde $SP_2[Tb^O]$ développé par M. Isaac - figures du manuscrit de thèse [20]



(a) Spectre d'émission en temps résolu du peptide $SP_2[Tb^O]$ 10 μM et titrage par $ZnCl_2$ dans 10 mM HEPES pH 7.5, 150 μM TCEP, $\lambda_{ex} = 280$ nm, délai 200 μs , temps d'intégration 2 ms, PM 670V, fentes 10-5



(b) Diagramme de sélectivité du peptide 10 μM montrant la luminescence en temps résolu en absence et en présence de Zn^{2+} (10 μM) après l'addition de différents cations Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} (10 μM), Na^+ , K^+ (50 mM), Mg^{2+} , Ca^{2+} (10 mM)

FIGURE 1.28 – Propriétés photophysiques de la sonde $SP_2[Tb^O]$ développé par M. Isaac - figures du manuscrit de thèse [20]

Introduction

aminés au lieu de deux et la phénylalanine participant à la constitution du cœur hydrophobe des doigts de zinc a été changée pour un acide aminée « antenne » rendant le *packing* de ce cœur moins optimal (fig. 1.29). Par conséquent, le K_D devient plus haut (de 3 à 5 ordre de grandeur).

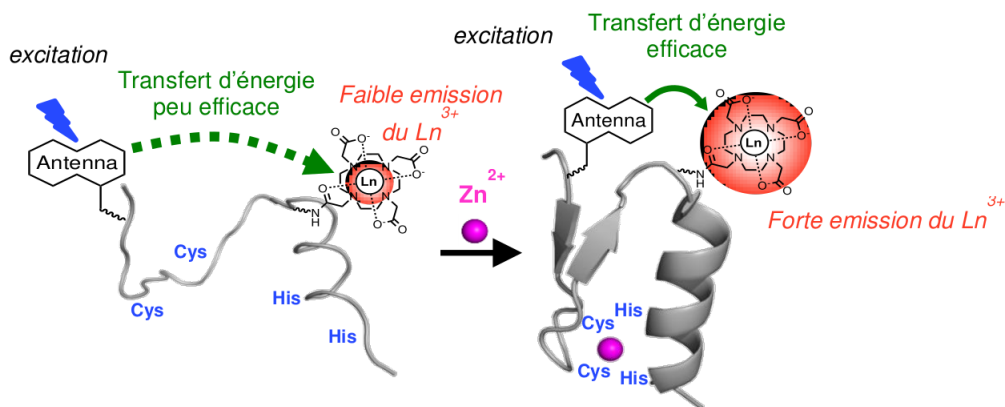


FIGURE 1.29 – Sonde intensiométrique au Zn^{2+} à base de lanthanide modifiée - figure [21]

En parallèle, des efforts ont été investis dans le développement de sondes permettant une quantification précise grâce à un système ratiométrique avec l'introduction d'un deuxième complexe de lanthanide, différent du premier, mais sensibilisable par la même antenne (voir fig. 1.30). La difficulté de cette technique réside dans le choix de l'antenne sensibilisant deux lanthanides différents.

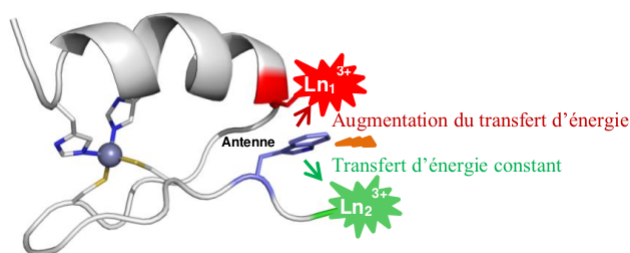


FIGURE 1.30 – Principe des sondes responsives ratiométriques au Zn^{2+} avec une antenne Cs124 commune pour deux lanthanides par C. Cepeda

1.2.2 Stratégie de Synthèse

Les différents travaux du laboratoire ont permis la mise en place d'une stratégie de synthèse divergente des sondes. Deux fragments peptidiques dont l'un comporte l'antenne et l'autre le complexe de lanthanide sont assemblés pour former une sonde. L'avantage de la stratégie adoptée est qu'il est possible de synthétiser une multitude

Introduction

de sondes à partir de la combinaison des fragments avec moins d'effort synthétique. La diversité des sondes synthétisées provient de la variation des antennes et des complexes de lanthanides sur les différents fragments. L'assemblage des peptides s'effectue par une réaction sélective. C'est Laurent Raibault, ancien post-doc de l'équipe, qui a contribué à apporter au laboratoire cette stratégie de synthèse par ligation native chimique entre plusieurs fragments peptidiques.

La ligation chimique native (NCL)

La ligation chimique native ou NCL (*Native Chemical Ligation*) permet de former une liaison peptidique entre deux peptides déprotégés de manière régiosélective [104].

Principe mécanistique La réaction s'effectue entre un peptide ayant un thio-ester activé en C-terminal et un peptide comportant une cystéine en N-terminal. Le groupement thiol de la cystéine agit sur le thioester par thio-transestérification qui se fait en conditions douces dans l'eau à pH 6.8 – 7. Cette thio-transestérification est réversible dans ces conditions et peut donc agir sur d'autre cystéine du peptide. En revanche, la réaction qui suit est irréversible : il consiste en un réarrangement intra-moléculaire de transfert d'acyl S-N par l'intermédiaire un cycle à 5 chaînons. Ainsi, seule la cystéine terminale est concernée par cette réaction conférant le caractère régiosélectif de la réaction *NCL*. On obtient alors la liaison peptidique native entre ces deux peptides (voir la figure 1.31 page 48).

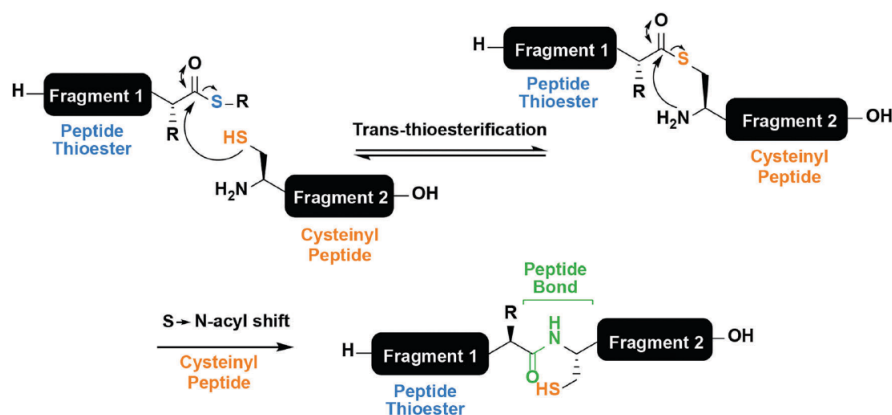


FIGURE 1.31 – Principe de la ligation native chimique entre deux peptides déprotégés - figure de la publication [22]

Durant la réaction, il est possible de rajouter de la guanidine-HCl (0.5-1.5 M) qui est un chaotrope réduisant les effets d'agrégation et de précipitation du peptide. Il peut aussi être nécessaire de réduire les ponts disulfure en ajoutant un réducteur ou en travaillant en milieu sans oxygène.

Masquer le thioester C-terminal La fonction thioester, intrinsèquement peu stable, est souvent masquée afin de pouvoir l'activer de manière contrôlée. Il existe plusieurs manières d'obtenir le thioester activé pour la réaction de ligation.

Pour obtenir un thioester masqué, l'équipe d'O. Melnyk a développé une résine permettant d'obtenir le groupe amide bis(2-sulfanylethyl) (SEA) au C-terminal d'un peptide après coupure. Le groupe SEA a pour avantage d'avoir une bonne réactivité à pH légèrement acide et une propriété redox qui lui permet de changer d'une forme active *SEA-on* à une forme inactive *SEA-off* par une oxydation douce (voir fig. 1.32) [105]. La réaction est réversible avec un réducteur hydrosoluble commun, la tris(2-carboxyethyl) phosphine (TCEP).

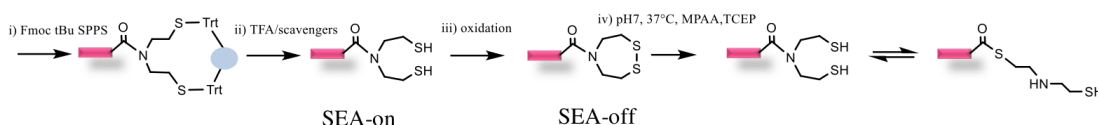


FIGURE 1.32 – Passage *SEA-on* en *SEA-off*

Sur la figure 1.33, est représentée la ligation chimique native entre le fragment comportant le complexe de lanthanide (fragment C en bleu) sur un peptide avec une cystéine terminale et le fragment comportant l'antenne (fragment N en vert).

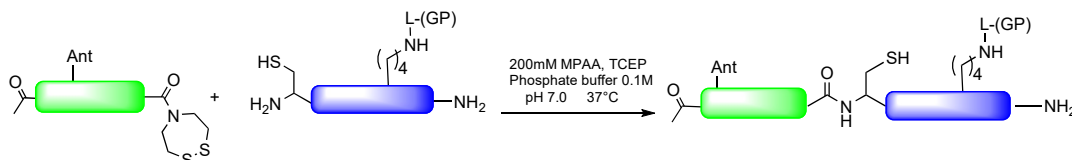


FIGURE 1.33 – Stratégie de synthèse de sonde à zinc par ligation chimique native entre le fragment C comportant le complexe de lanthanide (bleu) et le fragment N contenant l'antenne sensibilisant le lanthanide (vert)

1.2.3 Vers une application cellulaire

Les efforts ont été fournis vers le développement des sondes à zinc avec une antenne dont l'excitation est déplacée vers le visible avec une excitation au dessus de 400 nm compatible avec la microscopie confocal, notamment le microscopie Zeiss LSM710, utilisée à l'IAB (*Institut of Advanced Bioscience*), là où sont réalisés les tests cellulaires en collaboration de Véronique Frachet et Sule Erbek pour la culture cellulaire et Alexei Grichine pour la microscopie.

Introduction

Vers le visible Les sondes à zinc ont été améliorées dans l'optique d'une application cellulaire par C. Cépéda qui a été en thèse au laboratoire. Elle a utilisé le cs124 pour sensibiliser le terbium qui possède une absorbance à des longueurs d'ondes plus élevé que le tryptophane (280 nm), avec un maximum d'absorption à 350 nm. Le niveau accepteur 5D_4 étant élevé, l'antenne du terbium est forcément excité dans l'UV. Au dessus de 400 nm, la bande d'absorption est peu intense et l'émission du terbium se situe dans l'émission de l'auto-fluorescence de la cellule donc il est impossible de mesurer sa luminescence sur cellule.

Pour une utilisation cellulaire des sondes, l'utilisation de l'euprium est plus adaptée car son niveau accepteur 5D_0 est plus bas donc l'antenne peut être excité dans le visible.

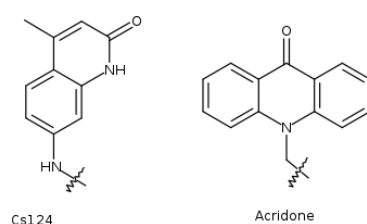


FIGURE 1.34 – Structure des antennes cs124 (à gauche) et acridone (à droite)

C. Cépéda a alors choisi d'utiliser l'acridone [106] pour sensibiliser l'euprium qui a son maximum d'absorption à 400 nm (à la limite des possibilités du microscope). À ce stade, elle a introduit une deuxième amélioration : le ligand DOTA a été modifié en *DO3Apic* (fig.1.35). Le complexe DOTA-Ln a le désavantage d'incorporer une molécule d'eau dans sa sphère de coordination ce qui a pour conséquence des désactivations non-radiatives vibrationnelles des liaisons O-H affaiblissant la luminescence du lanthanide. Le *DO3Apic* possède trois bras carboxylates et un bras picolinate qui rajoute un site de coordination par l'azote complétant le nombre de site de coordination à 9.

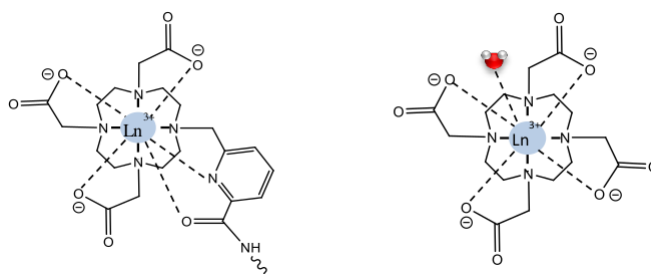


FIGURE 1.35 – Structure du DO3A-pic (à gauche) et du DOTA (à droite) et leurs sphères de coordinations associées [23]

La nouvelle sonde est nommée SP3-Acri-LysDO3Apic(Eu) [23]. La sonde répond au zinc par l'augmentation de l'intensité de luminescence de l'euprium et un rendement

Introduction

| Peptide sonde | Séquence CPP | Contraste | ϕ_{400} % | ϕ_{Zn} % |
|---------------------------|------------------|-----------|----------------|---------------|
| SP3-Acri-DO3A-pic(Eu) | - | 8.4 | 0.23 | 1.9 |
| Tat-SP3-Acri-DO3A-pic(Eu) | GRKKRRQRRRPPQ | 7 | 0.1 | 0.7 |
| Pen-SP3-Acri-DO3A-pic(Eu) | RQIKIWFQNRRMKWKK | 7 | 0.06 | 0.4 |
| RWR-SP3-Acri-DO3A-pic(Eu) | RRRRWWWWRRRR | 4 | 0.02 | 0.09 |

TABLE 1.1 – Contraste (différence d’intensité de luminescence entre la sonde libre et liée au Zn^{2+} et rendement quantique à $\lambda_{ex} = 400$ nm des sondes CPP-SP3-Acri-DO3A-pic(Eu)

quantique de 0.2% qui augmente à 1.9% après coordination de Zn^{2+} (voir tableau 1.1). Ensuite, C. Cépéda a ajouté une séquence de pénétration cellulaire (voir fig. 1.36) afin d’utiliser la sonde *in cellulo*.

Peptide de pénétration cellulaire (CPP) Les CPPs (*cell penetrating peptides*) sont des solutions prometteuses pour le transport de molécules à travers la membrane. Les CPP sont des courtes séquences peptidiques qui permettent de franchir la membrane. Ils sont généralement cationiques pour interagir sur la membrane bilipidique chargée négativement. Le premier identifié a été une séquence courte entre les acides aminés 47-57 de la protéine TAT du VIH. Depuis d’autres ont été identifiés dont la polyarginine, l’antennapedia...[107].

Les CPPs entrent dans la cellule par endocytose ou par diffusion passive. Le mécanisme d’entrée n’est pas totalement élucidé mais on considère que les deux voies d’entrées sont possibles en même temps.

Plusieurs paramètres peuvent influencer sur les résultats et aboutir à une mauvaise interprétation des résultats des tests d’internalisation des CPP. Par exemple, fixer les cellules en utilisant du formaldéhyde ou du méthanol peuvent induire un relargage des peptides hors des endosomes en dépit des propriétés inhérentes aux CPPs. De même, le laser très intense utilisé en microscopie a ce même effet pouvant fausser les résultats.

Ajout d’un CPP sur la sonde à zinc La séquence CPP est ajoutée en N-ter du peptide et est liée par cycloaddition de Huisen qui fait intervenir un azoture et un alcyne en présence de cuivre(II), de THPTA, sodium ascorbate dans un mélange DMF/py/ACN. Plusieurs CPPs ont été testés : TAT, Penetratin, RWR (voir tableau 1.1). Ils ont été incorporés sur la sonde CPP-SP3-Acri-DO3A-pic(Eu).

Ces nouvelles sondes-cpp ont été testées sur le microscope confocal à l’IAB. Les composés ont été incubés pendant 10 min sur des cellules HEK dans du PBS. Les images ont été prises en excitant à $\lambda_{ex} = 405$ nm. C. Cepeda a obtenu des résultats encourageants pour la sonde Tat-SP3-Acri-DO3A-pic(Eu) qui a pu être internalisée comme le montre un signal d’émission provenant de vésicules dans les cellules avec,

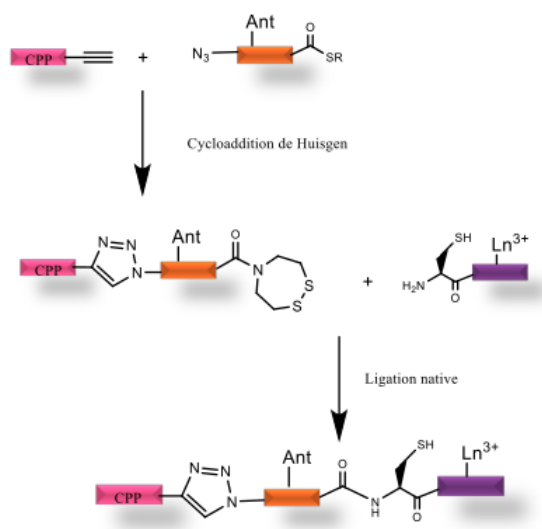


FIGURE 1.36 – Stratégie de synthèse de sonde à zinc incorporant une séquence CPP - figure de la thèse [23])

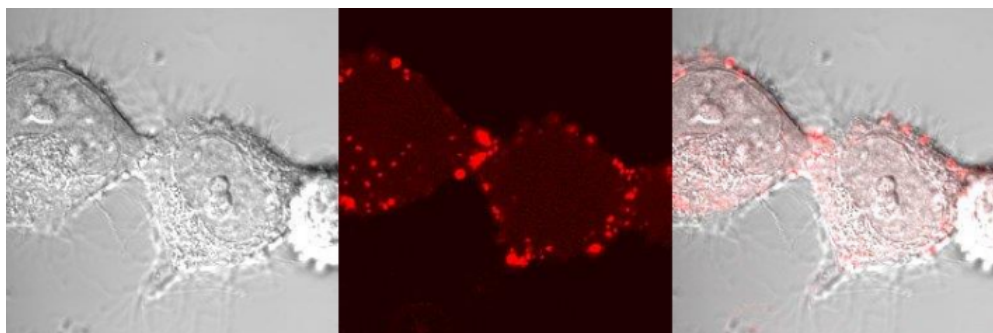


FIGURE 1.37 – Image en transmission, fluorescence et superposition par microscopie confocale de TAT-SP3-Acri-DO3A-pic(Eu) incubé avec des cellules HEK $\lambda_{ex} = 405$ nm

en plus, un signal diffus dans le cytoplasme, bien que faible. Le mode spectral a pu confirmer la signature de fluorescence de l'acridone centrée à $\lambda_{em} = 450$ nm mais le signal de l'euporium n'a pas pu être identifié. L'émission de l'euporium était peut être dans le bruit de l'image enregistrée avec le microscope confocal ou bien, la sonde a pu être protéolysée et l'euporium n'est plus sensibilisé par l'acridone.

Les résultats de ses recherches sont encourageants même s'il n'a pas été possible de confirmer la présence de la sonde intacte dans la cellule. Il faudrait réduire l'autofluorescence pour potentiellement voir l'euporium en augmentant la longueur d'onde d'excitation. Mais en choisissant une antenne s'excitant à plus de 400 nm, le transfert retour (BT) de l'euporium vers l'antenne sera possible et diminuera davantage sa luminescence. Une solution pour augmenter la longueur d'onde d'excitation sans problème de BT serait d'exciter en bi-photonique. Par conséquent, il faut d'une part des CLLs plus luminescents et d'autre part des antennes à absorption bi-photonique.

1.2.4 Vers des complexes de lanthanide plus luminescents pour de l'absorption 2P

G. Frémy a conduit ses travaux de thèse dans l'équipe et a contribué aux développements de nouveaux complexes de lanthanide. Il avait pour but de développer des sondes pour la détection séquence spécifique d'ADN double brin reposant sur un système FRET dont le donneur est un CLL. Pour un FRET efficace, un CLL à haut rendement quantique est nécessaire. Nous présentons dans cette partie deux complexes qu'il a développés possédant de très bons rendements quantiques, dotés d'une fonction de bioconjugaison pour coupler le complexe sur peptide.

Antenne à absorption bi-photonique G. Frémy s'est inspiré des travaux d'O. Maury sur les composés triazacyclononane TACN comportant trois antennes à transfert de charge type *push-pull* aryle-alcyne-picolinate EuL^2 (présenté en Introduction partie 1.3.3) ayant un maximum d'absorption à 338 nm, un temps de vie de 0.95 ms, un rendement quantique de 48% dans $H_2O/MeOH$ 3 :1 et une section efficace d'absorption 2P à 49 GM à 700 nm [35]. Ses composés ont l'avantage de présenter des propriétés d'absorptions bi-photoniques (vers 700 nm).

G. Frémy s'est également beaucoup intéressé à l'antenne aryle-picolinate du complexe $no3A^4paTb$ qui a son maximum d'absorption à 302 m, un temps de vie de 1.36 ms, un rendement quantique de 74% dans l'eau [76]. La bande de transfert de charge s'étend jusqu'à 350 nm dans l'UV permettant une excitation bi-photonique à 690 nm qui est la limite basse de la plage d'utilisation des lasers Ti :saphire classiquement utilisés pour l'excitation 2P.

Les complexes que G. Frémy a développés sont représentés sur la figure 1.38. Ils seront présentés en détails dans le chapitre suivant.

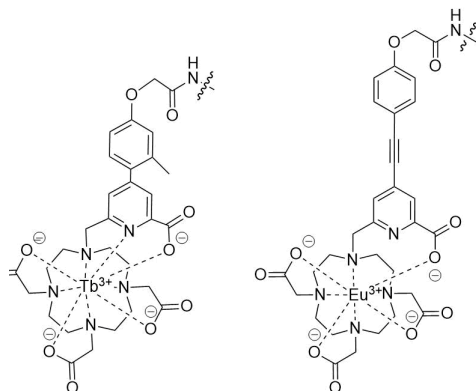


FIGURE 1.38 – Structure des complexes de terbium TbL₁^D (gauche) et d’euprium EuL₂^D (droite) développés par G. Frémy

1.3 Un nouveau principe de sonde responsive au zinc

1.3.1 Principe

Les nouvelles sondes responsives au zinc développées au cours de cette thèse reprennent les travaux de C. Cépéda mais sont améliorées avec les complexes à absorption 2P développés par G. Frémy afin d’obtenir une longueur d’onde d’excitation et d’émission des sondes dans la fenêtre de transparence du milieu cellulaire [108].

L’idée est de coupler ces complexes-antennes très luminescents sur le peptide doigt de zinc pour maximiser nos chances d’obtenir une sonde finale avec un rendement quantique élevé. La responsivité de la sonde à la détection de Zn²⁺ ne provient donc plus de la modulation de l’efficacité d’énergie transférée de l’antenne vers la lanthanide car l’antenne est directement couplé au ligand.

La modulation se fera entre le complexe de lanthanide et un autre composé aromatique pouvant échanger de l’énergie. Ce composé sera appelé un *quencher* pour faciliter la compréhension. Le *quencher* est positionné sur le feuillet β et le complexe en extrémité de l’hélice α de tel sorte qu’il y ait changement de distance lors du repliement du peptide. La figure 1.39 schématise le principe des nouvelles sondes à zinc qui seront présentées par la suite.

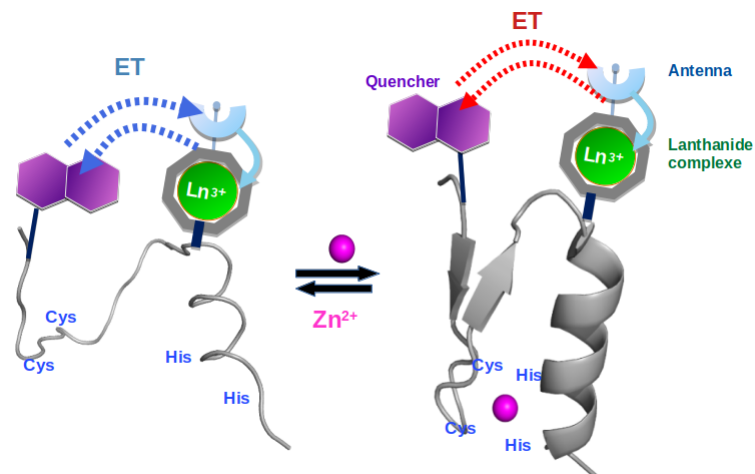


FIGURE 1.39 – Principe des nouvelles sondes à zinc

1.3.2 Particularité du projet

Nous souhaitons donc étudier la modulation des propriétés photophysiques de nos sondes lors de la détection du zinc. Plus précisément, la réponse en temps de vie de luminescence sera mesurée car il est indépendant de la concentration locale contrairement aux mesures des intensités de luminescence ; on peut donc utiliser le temps de vie pour des mesures quantitatives.

1.3.3 Plan de thèse

D'abord, nous présenterons nos efforts pour développer des complexes de lanthanides luminescents conjugables à un peptide, puis le développement des sondes à zinc et ses analyses spectroscopiques ; trois *quencher* ont été testés, associés à un complexe de terbium. Enfin, nous présenterons nos recherches d'une stratégie d'internalisation dans les cellules vivantes par CPP. Pour le moment, il existe peu d'exemples dans la littérature de sondes à base de complexe de lanthanide capables de s'internaliser dans les cellules vivantes, en se localisant ailleurs que dans les lysosomes ou sur la paroi des mitochondries.

Deuxième partie

Des sondes à zinc à base de lanthanides en solution et in cellulo

Chapitre 1

Des complexes luminescents dans le visible et proche infrarouge *in vitro*

1.1 Présentation générale des ligands

Notre équipe travaille sur les doigts de zinc pour développer des sondes pour la détection de zinc ou d'ADN. Elles fonctionnent sur le principe de la modulation de la distance entre l'antenne et le lanthanide ; nous avons obtenus des résultats *in vitro* très encourageants mais la luminescence était trop faible pour être détectable en microscopie confocale sur cellule. Grâce aux différents travaux précédents menés par l'équipe, nous étions arrivés à un stade où nous devons retravailler notre approche de l'utilisation des complexes de lanthanides. Les nouveaux complexes que nous voulions obtenir devaient être plus luminescents avec des temps de vie de l'ordre de la milliseconde et compatibles avec l'utilisation en imagerie en milieu biologique.

Nous avons alors travaillé sur des nouveaux complexes de lanthanide dont l'antenne est directement coordonnée au ligand. L'avantage est que l'on peut obtenir de meilleurs rendements quantiques et ces antennes ont été choisies pour leurs propriétés d'absorption bi-photonique permettant de se positionner dans la fenêtre de transparence du milieu biologique (entre 700 nm et 1400 nm). Enfin la particularité du projet impose un couplage d'un complexe de lanthanide sur un peptide : ces nouveaux complexes devaient être adaptés à la chimie des peptides et aux conditions de couplage peptidique.

La littérature (voir la partie [1.3.3](#)) nous a conduit à travailler sur des antennes de type « *push-pull* » possédant des propriétés d'absorption bi-photonique. Ces antennes sont constituées d'un groupement donneur et un groupement accepteur d'électron permettant un transfert de charge intra-ligand.

Nous allons présenter dans cette partie plusieurs complexes de lanthanides avec leur synthèse et leurs propriétés spectroscopiques en solution.

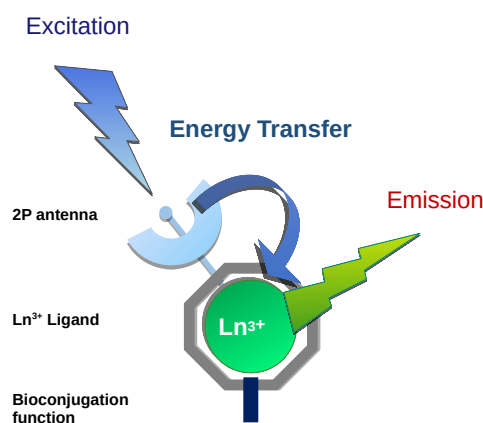


FIGURE 1.1 – Schéma du complexe de lanthanide : le lanthanide est complexé dans un ligand macrocyclique conjugué à son antenne à absorption bi-photonique dont un fonction de bioconjugaison est disponible

1.1.1 Une base commune

G. Frémy a mis au point la synthèse des complexes TbL_1^D et EuL_2^D . Ces nouveaux complexes sont constitués d'un macrocycle complexant le lanthanide, l'antenne et la fonction de bio-conjugaison pour le rattachement au peptide (fig. 1.1).

Les noms sont donnés de la manière suivante : LnL_i^D avec Ln indiquant le lanthanide, L_i le ligand (i un entier) et l'exposant D indiquant que le ligand est rattaché au peptide par la partie donneur (D) de l'antenne *push-pull*.

Le ligand L_1^D a été développé pour obtenir un complexe permettant de sensibiliser le terbium avec une bonne efficacité. Le niveau donneur de l'antenne devrait se situer proche du niveau 5D_4 du Tb^{3+} avec un écart $\Delta E=2000-4000\text{ cm}^{-1}$.

Le ligand L_2^D permet quant à lui de sensibiliser l' Eu^{3+} qui possède des niveaux accepteurs 5D_1 et 5D_0 plus bas que le Tb^{3+} .

Sur ses composés, le ligand est constitué d'un macrocycle DO3A (acide 1,4,7,10-tétraazacyclododecane-1,4,7-triacétique) qui possède trois bras acétates additionnés d'un bras picolinate, qui sert notamment pour compléter la sphère de coordination des lanthanides [109]. Quant à l'antenne, le groupement donneur est un aryle comportant un substituant donneur et le groupement accepteur est le picolinate rattaché au macrocyle.

Les différentes fonctions des composés pourraient compliquer la synthèse ; mais, la stratégie de synthèse repose sur une stratégie de synthèse divergente qui permet de synthétiser plusieurs composés différents à partir d'une base commune.

Cette base commune est le DO3A picolinate ou $DO3A(PA)$. Sur ce $DO3A(PA)$, différentes antennes y seront accrochées en position *para* du picolinate. Les composés sont représentés sur la figure 1.2 à la page 61.

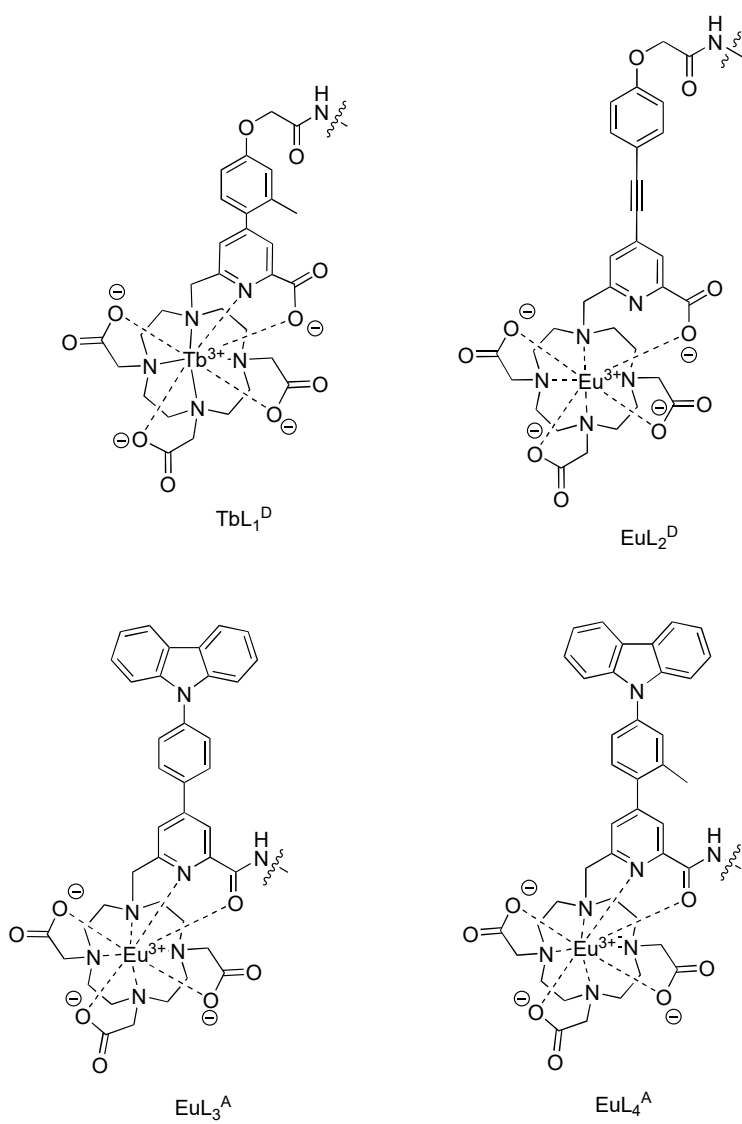


FIGURE 1.2 – Structure des complexes sur peptide étudiés

Synthèse du macrocyle protégé $DO3(AMe)(IPAMe)$

Les étapes de la synthèse sont présentées sur la figure 1.3. En partant de l'acide chélidamique (1) commercial, la réaction de Vilsmeier-Haack permet la chloration de la fonction alcool puis les acides subissent une estérification en milieu acide pour obtenir le diester (2). L'atome de chlore est ensuite substitué par de l'iode par substitution nucléophile aromatique (3). Enfin, le composé (5) est obtenu par monoréduction contrôlée à basse température du (3) au borohydrure de sodium puis activation de l'alcool (4) par le chlorure de mésyle [110].

Le composé (5) est de suite utilisé pour le coupler au $DO3(AMe)$ (7) en présence de carbonate de sodium dans de l'acétonitrile pour enfin obtenir le composé attendu (8).

Le $DO3(AMe)$ a été précédemment synthétisé à partir du cyclen commercial et de 3 équivalents de bromoacétate de méthyle dans du DMF en présence d'acétate de sodium avec un rendement de 61% [111].

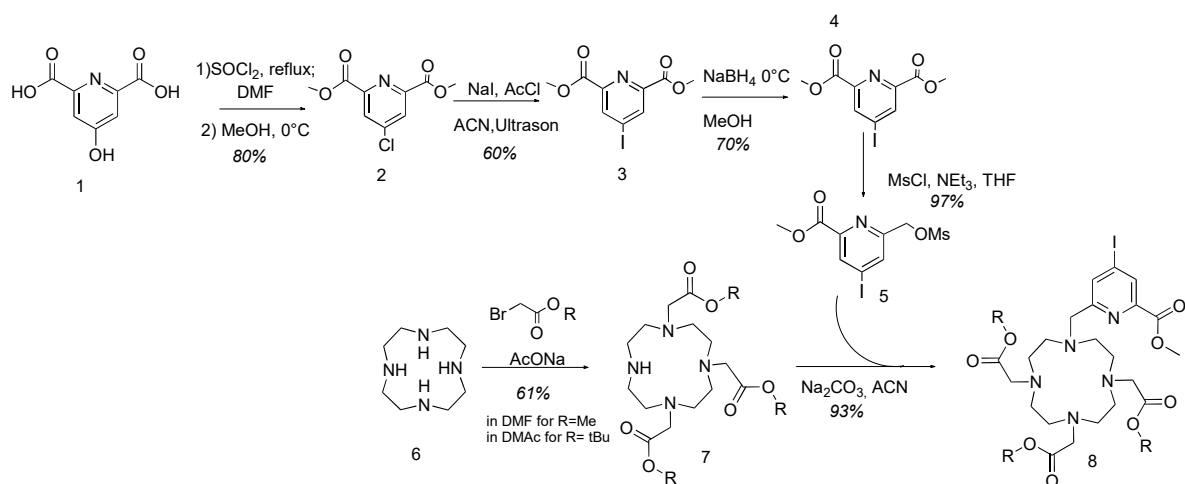


FIGURE 1.3 – Schéma de synthèse du $DO3A(Me)(IPAMe)$ et $DO3A(tBu)(IPAMe)$

1.1.2 Une fonction de conjugaison au peptide

Pour la bioconjugaison sur peptide, le groupement acide carboxylique a été choisi car il peut former un lien peptidique avec une fonction amine libre du peptide. La position de cette fonction acide a été choisie sur le groupement électro-donneur de l'antenne et espacée d'un groupement $-CH_2$.

Sur le peptide, la position amine choisie se situe sur la chaîne latérale d'une lysine protégée de manière orthogonale aux acides aminés usuels en stratégie *Fmoc*. Il est possible d'utiliser le groupement protecteur (GP) *Alloc* (allyloxycarbonyl) qui se déprotège sélectivement au Pd(0) (dans ce cas, Pd(PPh₃)₄ est utilisé) en quantité catalytique en présence de phénylsilane PhSiH₃. Le groupement *MMT* (4-methoxytrityl) est un autre groupement protecteur de l'amine qui se déprotège avec 1% de TFA dans du dichlorométhane (fig.1.4) en présence de 2% de TIS (triisopropylsilane).

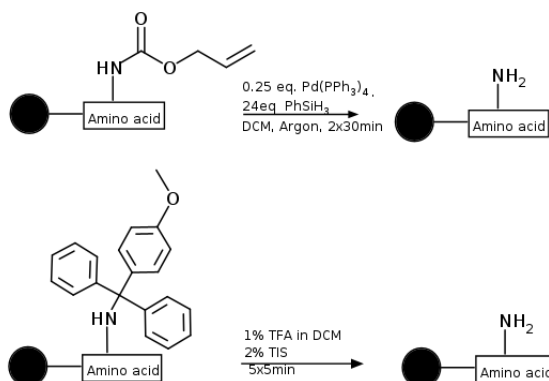


FIGURE 1.4 – Groupements protecteurs orthogonaux Alloc (haut) et MMT (bas)

Il ne faut pas oublier les autres fonctions acides carboxyliques du ligand intervenant dans la coordination du lanthanide qui doivent donc être protégées d'une autre manière en prenant en compte l'ordre des déprotections sélectives. Pour notre synthèse, le ligand est d'abord couplé sur le peptide ; puis, le peptide est coupé de la résine. Enfin, il est métallé avec des sels de lanthanide LnCl₃. Le choix de coupler le ligand libre sur le peptide s'explique par le fait que le complexe métallé n'était pas soluble dans le DMF en condition de couplage peptidique. De ce fait, les autres fonctions acides du macrocyle et du picolinate sont déprotégées après couplage du pro-ligand sur le peptide.

Donc, le GP de la fonction de bioconjugaison doit pouvoir être déprotégé sans toucher les autres GPs du ligand.

Choix des GP L'acide carboxylique de la fonction de bioconjugaison a alors été protégé par un groupement *t*Bu qui est labile en condition acide. Le groupement *t*Bu est donc déprotégé sélectivement en premier afin de coupler le pro-ligand protégé au peptide. Les autres fonctions acides sont protégés par des méthyles qui se déprotègent en condition basique à la soude.

1.2 La voie de synthèse *t*Bu/Me : « La voie *Me* »

Cette voie de synthèse que l'on appelle « La voie *Me* » a été développée par G. Frémy et est utilisée pour les complexes TbL_1^{D} et EuL_2^{D} sur peptide.

1.2.1 Synthèse du pro-ligand $\text{L}_1^{\text{D}}-(\text{OMe})_4, (\text{OH})$

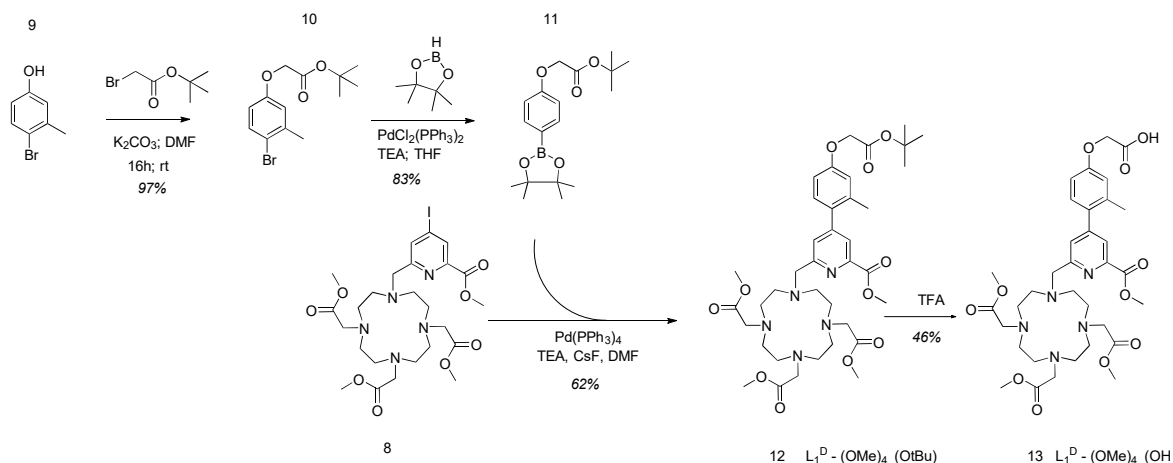
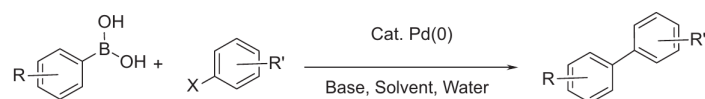


FIGURE 1.5 – Schéma de synthèse du ligand $\text{L}_1^{\text{D}}-(\text{OMe})_4, (\text{OH})$

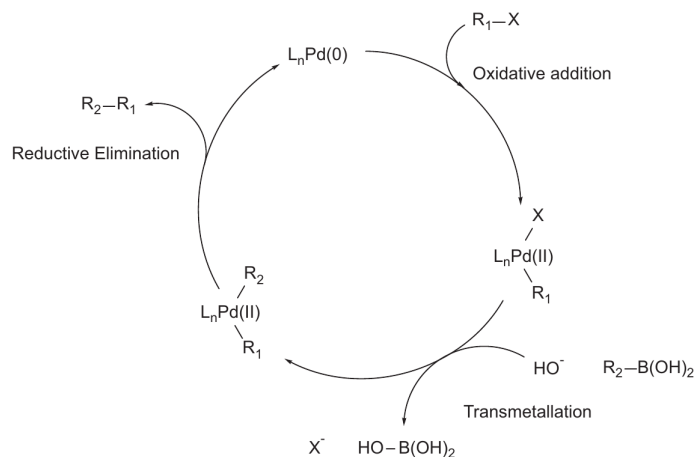
Ester boronique (11) L'ester boronique (11) présenté sur la figure 1.5 est obtenu à partir du 3-méthyl-4-bromophénol (9). Avant la borylation, on y introduit la fonction qui nous servira pour la bioconjugaison à l'aide du bromoacétate de *tert*-butyle suivant la réaction d'alkylation de Williamson (10). Ensuite, la réaction de Suzuki-Miyaura permet de convertir le dérivé halogéné en ester boronique.

Pro-ligand $\text{L}_1^{\text{D}}-(\text{OMe})_4, (\text{OH})$ (13) Pour obtenir le pro-ligand L_1 protégé (12), le macrocycle (8) et le substituant (11) sont couplés par réaction de Suzuki-Miyaura modifiée en présence de 0.1 éq $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, 30 éq TEA et 3 éq CsF dans du DMF à 90°C pendant une nuit.

La réaction de Suzuki-Miyaura est une réaction qui a permis à ses auteurs de recevoir un prix Nobel de chimie en 2010. Elle permet de former une liaison carbone-carbone catalysée par un métal de transition. Elle est très utilisée pour la formation de biaryle à partir d'un aryle halogéné et d'un ester boronique en présence de $\text{Pd}(0)$ (fig. 1.6a). Le cycle catalytique de la réaction est représenté sur la figure suivante 1.6b tirée de la revue écrite par David Backlemore à ce sujet [24] (le schéma ne représente pas un ester boronique mais un boronate; le principe est le même).



(a) Réaction de Suzuki-Miyaura



(b) Schéma du cycle catalytique de la réaction de Suzuki-Miyaura

FIGURE 1.6 – Réaction de Suzuki-Miyaura - figure du chapitre [24]

L'aryle halogéné $Ar_1 - X$ s'additione par addition oxydante sur le Pd(0) pour donner le $Ar_1 - Pd(II) - X$. En général, les composés iodés sont plus réactifs que les composés bromés eux-même plus réactifs que les chlorés. Ensuite, la transmétallation échange l'halogène avec le deuxième Ar_2 sur l'ester boronique. La réaction est favorisée par des boronates riches en électron. Enfin, l'élimination réductrice du Pd(II) en Pd(0) permet d'obtenir le biaryle désiré $Ar_1 - Ar_2$.

Un bon rendement est obtenu avec l'ajout de fluorure de césium comme additif pour générer une trifluoroborate plus réactif que l'ester boronique [112]. La réaction est contrôlée par CCM. Le produit n'est pas purifié avant de passer à l'étape suivante : en reprenant dans de l'éther diéthylique froid puis en triturant le mélange, seule le surnageant est récupéré après centrifugation puis évaporé. Pour finir, le groupement protecteur *tert*-butyle est déprotégé au TFA puis le composé est purifié par HPLC préparative. On obtient le produit (13) (fig. 1.5). L'acide carboxylique est donc disponible pour être couplé à un peptide. L'étape de métallation arrivera plus tard une fois que le ligand sera couplé sur le peptide puis coupé de la résine et déprotégé.

1.2.2 Synthèse du pro-ligand $L_2^D - (OMe)_4, (OH)$

Le ligand L_2^D a une antenne de type aryl-alcyne-aryl et est similaire à des composés d'Olivier Maury. Avec le même type d'antenne couplé trois fois sur un macrocyle triazacyclononane (TACN), il a pu faire de l'imagerie avec excitation bi-photonique

sur cellules fixées [35].

La synthèse du ligand L_2 protégé est représentée sur la figure 1.7.

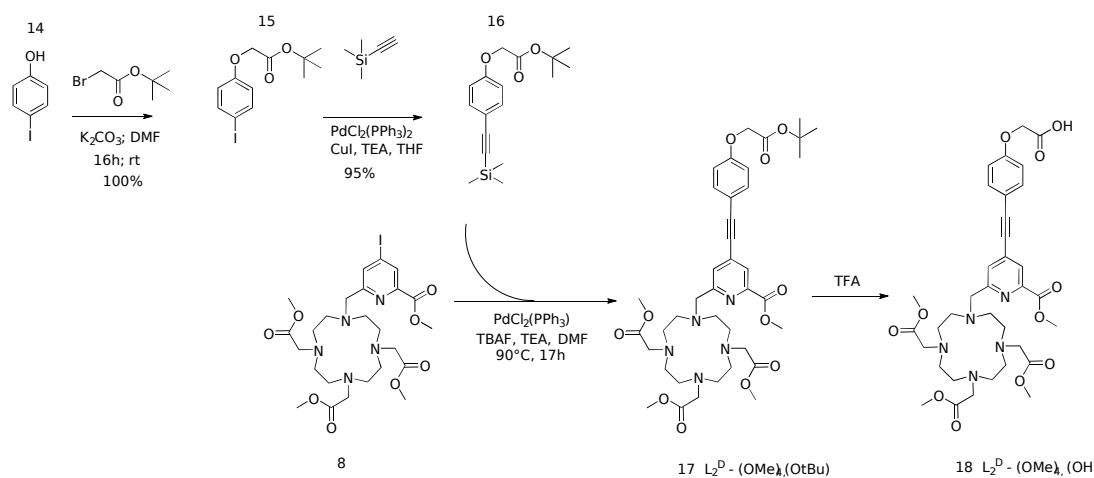


FIGURE 1.7 – Schéma de synthèse du ligand $L_2^D-(OMe)_3,(OH)$

Composé (3) (fig.1.7) L'aryl-éthynyl-triméthylsilane (3) est obtenu à partir de l'iodophénol, qui a d'abord été alkylé par du bromoacétate de *tert*-butyle pour obtenir le composé (2) et mis en réaction avec l'éthynyltriméthylsilane par couplage de Sonogashira en présence de palladium *bis*(triphénylphosphine) dichlorure ($PdCl_2(PPh_3)_2$), de triéthyleamine (TEA), iodure de cuivre(I) (CuI) à température ambiante.

Le couplage de Sonogashira est un outil puissant pour la formation de liaison carbone(sp^2)-carbone(sp^2) développé par Kenkichi Sonogashira en 1975. Le couplage s'effectue entre un alcyne terminal et un aryle halogéné R-X en présence de catalyseur, Pd(0), de co-catalyseur Cu(I) et une amine en base (fig.1.8a). Une suggestion de mécanisme est représentée sur la figure 1.8b. Le composé R-X s'additionne de manière oxydante sur le PdL_2 tandis que l'alcyne terminal participe à un cycle co-catalytique en présence de CuI pour former un acétylène de cuivre. La transmétallation avec le composé alcyne-Cu est l'étape limitante pour former le composé alcyne-palladium(II). Puis l'élimination réductive permet d'obtenir le composé attendu entre l'aryle couplé à l'alcyne. Le Pd(0) est régénéré.

Pro-ligand $L_2^D-(OMe)_4,(OH)$ Le composé (3) et le macrocyle commun (8) sont couplés par réaction de Sonogashira avec déprotection *in situ* de l'alcyne par des fluorures (TBAF) [113].

Contrairement aux conditions classiques de couplage de Sonogashira, le cuivre Cu(I) n'est pas utilisé [75]. Le proton de l'alcyne est suffisamment acide pour être

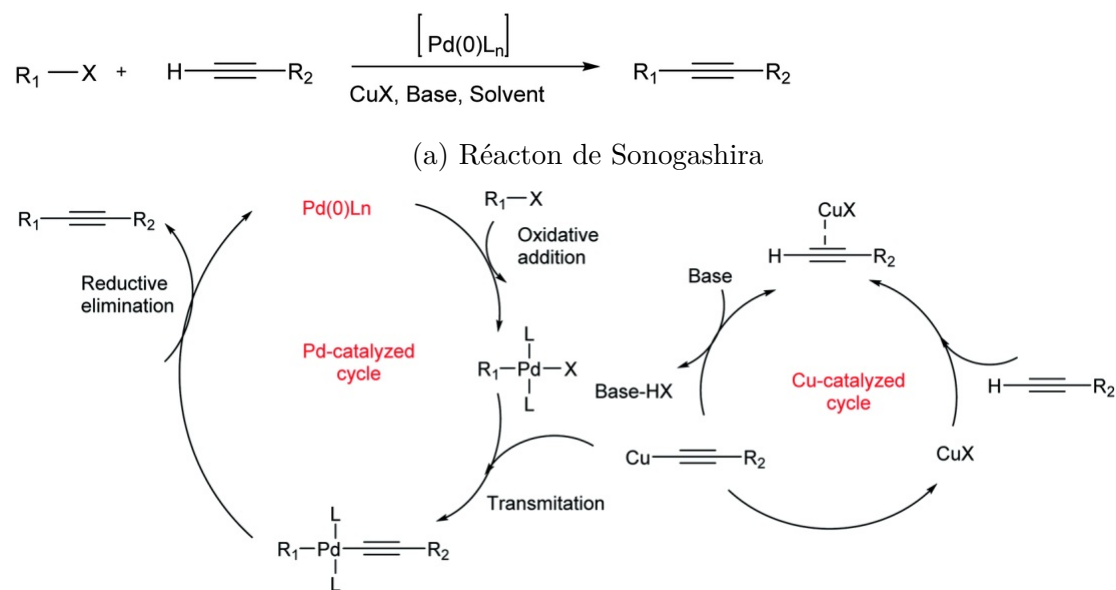


FIGURE 1.8 – Réaction de Sonogashira - figures de la publication [25]

déprotoné sans aide du Cu(I) ou l'ion fluorure génère l'alkyne déprotonée [75][114]. Le groupement protecteur tBu de la fonction de bioconjugaison est déprotégé par du TFA pendant 2h à température ambiante. On obtient le ligand $L_2^D-(OMe)_4, (OH)$, composé (5) de la figure 1.7.

1.3 Les propriétés spectroscopiques

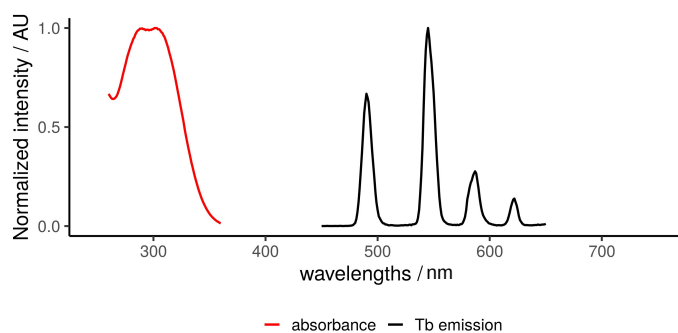
Les mesures spectroscopiques ont été réalisées sur les complexes TbL_1^D et EuL_2^D . Les résultats de G. Frémy sont synthétisés ci-dessous et présentés sur la figure 1.9 à la page 68.

Les mesures ont été effectuées avec les complexes dans une solution d'HEPES à pH 7.5. Les spectres d'émission et le spectre d'absorbance du ligand sont représentés sur la figure 1.9 extraite de son manuscrit de thèse (sous le nom de $[Tb(DO3ApicAr1)]Na$ et $[Eu(DO3ApicAr2)]Na$).

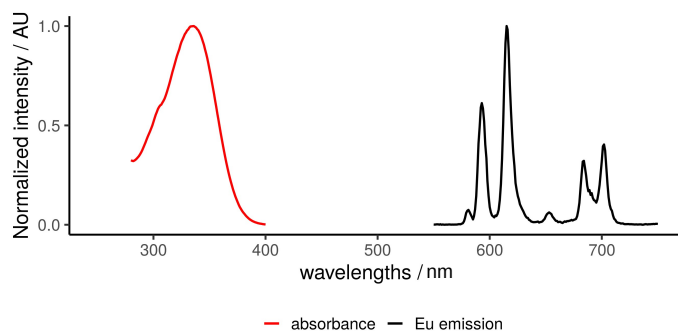
1.3.1 Le complexe TbL_1^D

Absorption Le spectre d'absorption du complexe TbL_1^D présente deux transitions, à 280 nm et 305 nm. Elles ont été attribuées respectivement à la transition $\pi - \pi^*$ et à l'ILCT. La bande de transfert de charge s'étend jusqu'à 350 nm.

Spectre d'émission L'excitation de l'antenne à 306 nm résulte en l'émission du spectre caractéristique du Tb^{III} . Les transitions $^5D_4 \rightarrow ^7F_J$ ($J = 6-3$) sont situées



(a) Spectre d'absorption (trait rouge), spectre d'émission (trait noir) en temps résolu à $\lambda_{ex}=305$ nm du complexe TbL₁^D



(b) Spectre d'absorption (trait rouge), spectre d'émission (trait noir) en temps résolu à $\lambda_{ex}=311$ nm du complexe EuL₁^D

FIGURE 1.9 – Mesures spectroscopiques de TbL₁^D et EuL₁^D tirées de la thèse de G. Frémy [26]

respectivement à 490, 545, 585, 620 nm.

Temps de vie de luminescence et rendement quantique Le temps de vie du complexe est de 2.35 ms, ce qui est particulièrement long, et le rendement quantique s'élève à 62%. Avec un coefficient d'extinction molaire à $12000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ à 302 nm, il possède donc une brillance de $7440 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

1.3.2 Le complexe EuL_2^{D}

Spectre d'émission Le spectre d'émission est obtenu en excitant au maximum d'absorption à $\lambda_{ex} = 345 \text{ nm}$. Les transitions caractéristiques de l'euporium, ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_J$ ($J = 0-4$), sont situées à 580, 593, 615, 653, 702 nm.

Temps de vie et rendement quantique Le temps de vie a été mesuré à 1.10 ms soit du même ordre de grandeur que le composé développé par O. Maury avec les trois antennes type aryl-alcyne-aryle (0.95 ms) [35]. Le rendement quantique est de 17%, soit plus faible que le complexe TbL_1^{D} . Néanmoins, il est compensé par le haut coefficient d'extinction molaire à $28200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ donnant une brillance générale de $4790 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ à 345 nm.

Le complexe EuL_2^{D} affiche donc des propriétés intéressantes avec un maximum d'absorption bien décalé à 345 nm, idéal pour pouvoir exciter dans le proche infra-rouge en bi-photonique. Il semble suffisamment brillant pour qu'il reste visible *in cellulose*. Sa bioconjugaison a été développée selon la « voie *Me* » avec un pro-ligand méthylé sur la macrocycle et *tert*-butylé au niveau du donneur.

1.4 Le couplage du complexe sur peptide

Les complexes de lanthanides que nous avons présentés seront utilisés sur des peptides. Or, le couplage peptidique se fait dans du DMF ; mais il s'est avéré que le complexe n'était pas soluble dans ce solvant. Ce n'est donc pas le complexe directement qui est couplé au peptide mais le ligand sans lanthanide. Les étapes pour arriver au peptide-complexe sont décrites ci-dessous.

1.4.1 Couplage sur peptide pour les pro-ligands suivant la voie de synthèse « Me »

Les étapes sont présentées sur la figure 1.10a.

Le peptide est synthétisé par SPPS sur résine rink amide par robot automatisé. Une lysine *K(Alloc)* est introduite sur la séquence peptidique. Le groupe *Alloc* protège la fonction amine de la chaîne latérale de la lysine.

Lorsque tous les acides aminés ont été couplés, le *Fmoc* terminal est déprotégé puis l'amine terminal est acétylée. Ou bien, le dernier acide aminé ajouté possède un groupement protecteur *Boc* (*tert*-butoxycarbonyl) sur la fonction amine terminale qui se déprotège durant la coupure du peptide de la résine en même temps que les GP des autres acides aminés (ceci permet d'obtenir une fonction amine libre en N-terminal du peptide).

Le GP de cette lysine est déprotégé par du Pd(0) en présence de phénylsilane dans du DCM comme décrit précédemment. Seule l'amine de la chaîne latérale de la lysine est donc libre sur ce peptide-résine à ce stade de la synthèse.

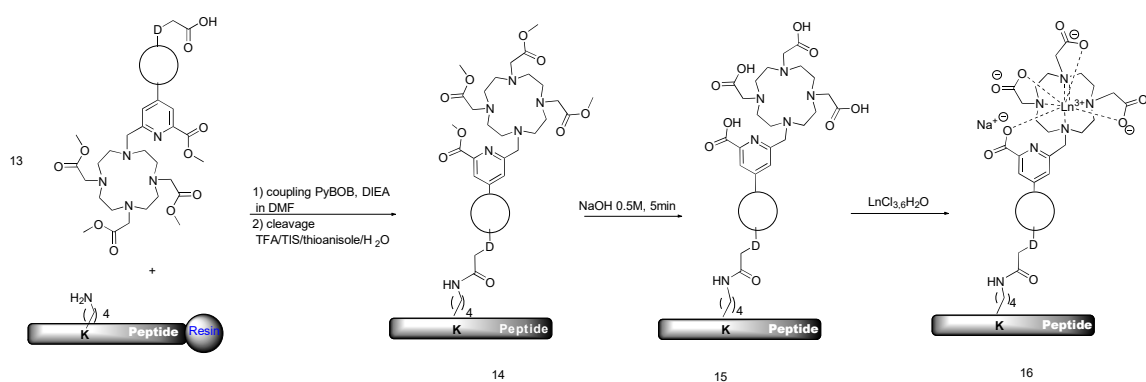
Ensuite, le ligand méthylé est couplé sur le peptide-résine par sa fonction acide libre dans des conditions de couplages peptidiques (4 éq de PyBop et 8 éq DIEA pour 1.5 équivalent de ligand). L'acide carboxylique forme un lien amide avec l'amine de la chaîne latérale de la lysine.

Puis, le peptide est coupé de la résine par un mélange TFA/H₂O/TIS/thioanisole (91.7/3.3/3.3/1.7). Au bout des 2 à 4h de coupure, le peptide est alors précipité dans de l'éther froid pendant 30 min puis isolé par centrifugation, purifié par HPLC préparative puis lyophilisé.

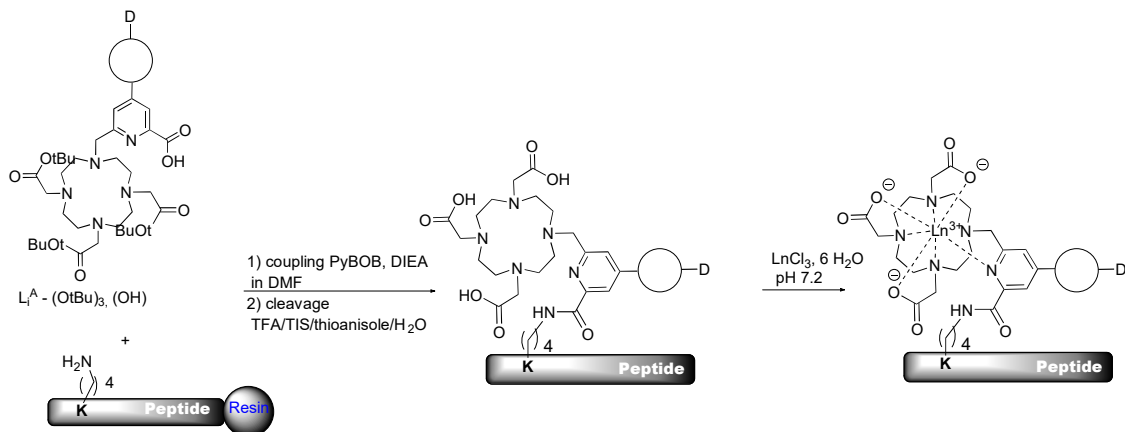
Enfin, les esters méthyliques sont déprotégés par la soude à 0.5 M pendant 5 à 20 min en fonction de la séquence peptidique, puis le peptide est purifié. La métallation se fait ensuite à pH 9 dans de l'eau avec 10 éq de sels de lanthanides pendant 10h sous agitation. L'excès de sels est éliminé par centrifugation et le peptide est purifié puis lyophilisé.

1.5 La voie de synthèse Me/*t*Bu : « la voie *t*Bu »

Amélioration J'ai eu la chance de participer à l'encadrement de Junio A. Guimaraes qui a effectué son stage de M2 au laboratoire (interrompu avec l'arrivée des mesures contre le virus de la COVID-19) durant lequel il a pu travailler sur une modification des ligands et le développement d'une autre voie de synthèse. L'objectif était de pouvoir coupler les ligands par le groupe électro-attracteur de l'antenne et non plus par le groupe électro-donneur. J'ai pu reprendre le début de ses travaux et le finaliser pour mettre en place cette nouvelle voie. Cette nouvelle position de bio-conjugaison pourrait être avantageuse pour améliorer le transfert de charge en évitant d'appauvrir le groupe méthoxy donneur de l'antenne à cause du lien peptidique amide et en diminuant la charge du site du lanthanide. De plus, cette position était utile pour de potentiels nouvelles antennes qui ne pouvaient pas ou difficilement être rattachées par le groupement électro-donneur. Ces pro-ligands diffèrent donc par la position de la fonction de bio-conjugaison et les groupements



(a) Voie Méthyle (exemple avec un complexe LnL^D)



(b) Voie Tert-butyle (exemple avec un complexe LnL^A)

FIGURE 1.10 – Schéma de synthèse des composés finaux CPP+complexes de lanthanides avec exemples en voie Méthyle (a) et en voie *tert*-butyle (b)

protecteurs. Ils portent un nom différent : LnL_i^{A} avec l'exposant A indiquant que le ligand est rattaché au peptide par la partie accepteur A de l'antenne *push-pull*.

Cette nouvelle voie de synthèse est appelé « la voie *tBu* ». En effet, les GP du DO3A sont remplacés par des groupes *tert*-butyles (*tBu*). Quant à la fonction de bioconjugaison nouvellement positionnée sur le picolinate, elle est protégée sous forme d'ester méthylique.

Synthèse La synthèse de cette voie nécessite de modifier légèrement le schéma de synthèse du macrocycle commun. On souhaite obtenir le $\text{DO3}(\text{AtBu})(\text{IPAMe})$. Le bromoacétate de méthyle, utilisé pour passer du cyclen au composé 7 par la voie *Me* (fig.1.3), est remplacé par du bromure d'acétate de *tert*-butyle et la réaction se fait dans du diméthylacétamide (DMAc)[115].

Le macrocycle $\text{DO3}(\text{AtBu})(\text{IPAMe})$ est ensuite couplé à une antenne par un couplage Suzuki-Miyaura modifié pour former le pro-ligand $\text{L}^{\text{A}}-(\text{OMe})_4, (\text{OtBu})$ Puis l'ester méthylique picolinate est hydrolysé par de la soude à 0.2M dans de l'éthanol pendant 10-30 min. La réaction peut être suivie par HPLC pour vérifier la fin de la réaction.

Ensuite, le pro-ligand est couplé sur un peptide dans les conditions de couplage peptidique comme présenté sur la figure 1.10b. Puis le peptide-complexe est coupé de la résine et déprotégé en condition acide TFA/TIS/ H_2O /thioanisole pendant 2h. Le peptide est précipité dans de l'éther froid et centrifugé puis de nouveau déprotégé dans du TFA pur afin de déprotéger les *tBu*s restants pour 2h. Sans ce traitement au TFA supplémentaire, le brut contient un mélange de peptides comportant 0, 1, 2 ou 3 *tBu* situé sur le macrocycle. Ils sont reconnaissables par une masse supplémentaire de $M+56$.

L'intérêt de cette voie est que le groupe *tBu* est déprotégé pendant la coupure du peptide de sa résine au TFA. On supprime donc une étape de synthèse par rapport à la voie *Me*. Cette voie a été appliquée aux complexes L_3^{A} et L_4^{A} (fig. 1.2 61) que nous décrirons plus loin.

En réalité, l'utilisation des *tBu* avait déjà été explorée avant de développer la voie Méthyle; le problème résidait sur une déprotection incomplète des *tBu* sur DO3A lorsque le ligand était couplé au peptide, ceci justifiant pourquoi son utilisation avait été en partie délaissée. L'étape de déprotection a été améliorée mais on soupçonne que la déprotection incomplète puisse être séquence (peptidique) dépendante.

Pour résumer, l'avantage de cette nouvelle voie est la réduction du nombre d'étapes de synthèse et surtout de purification HPLC du peptide-complexe, l'application à des antennes non-fonctionnalisables sur le groupe donneur et enfin une éventuelle

possibilité d'améliorer les propriétés bi-photoniques.

1.6 Conclusion sur les ligands

Les ligands synthétisés sont constitués d'une partie dédiée à la coordination du lanthanide et d'une partie antenne pour la sensibilisation du lanthanide. Ils reposent sur un système conjugué « *push-pull* » entre un groupement électro-donneur vers un groupement électro-accepteur. Ceci permet de déplacer la bande d'absorption vers le rouge et ainsi d'obtenir une absorption plus basse en énergie avec un transfert de charge intra-ligand (ILCT). Ce principe est avantageux pour développer des complexes de lanthanides compatibles avec la microscopie cellulaire : une excitation plus basse en énergie est moins nocive pour les cellules vivantes.

Parmi les ligands présentés, il existe deux types principaux qui diffèrent par leur stratégie de synthèse. Les ligands « voie Me » ont leur fonction de bioconjugaison sur attaché à la fonction électron donneur. Les premiers ligands utilisés suivent cette première voie. Les ligands « voie tBu » ont la leur sur la fonction électron attracteur et ces ligands ont été développés plus tard au cours de la thèse.

Chapitre 2

Un nouveau modèle de sondes à zinc

2.1 Une responsivité par résonance entre un complexe de terbium et le naphthalène : SP–Nap–TbL₁

2.1.1 Présentation du système

Comme présenté en introduction, notre sonde à zinc comporte trois unités principale : le doigt de zinc, le complexe de lanthanide et le *quencher*.

La séquence peptidique du doigt de zinc est la suivante : KPXECKSACGKKFTKZEELQKHAKTHTG avec X la position du *quencher* et Z la position du complexe de lanthanide.

Choix du complexe de lanthanide Pour tester la faisabilité de ce nouveau type de sonde, nous avons décidé d'utiliser le complexe de terbium développé par G. Frémy. Le terbium a été beaucoup utilisé au laboratoire ; ce complexe TbL₁^D a le plus haut rendement quantique et sa synthèse est bien maîtrisée même sur l'échelle du gramme.

Choix du *quencher* Pour le *quencher*, notre choix s'est porté sur le naphthalène. Le naphthalène est un composé aromatique composé de deux cycles à six et il est incolore. Il absorbe dans l'UV vers 280 nm pour la transition $S_0 - S_1$. Il fluoresce vers 320 nm. Le niveau S_1 se situe à 32 000 cm⁻¹ et son niveau triplet T_1 se situe à 21 300 cm⁻¹ [116][117].

Le triplet T_1 du naphthalène et le niveau 5D_4 du Tb³⁺ sont à énergie quasiment équivalente : l'échange d'énergie peut être bidirectionnel. Le naphthalène peut servir d'antenne pour sensibiliser le terbium [118] mais l'effet antenne à travers l'espace devrait être faible en comparaison d'une sensibilisation par l'antenne coordonnée au

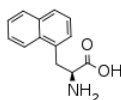


FIGURE 2.1 – 3-(1-naphthyl)-L-alanine

lanthanide.

Il peut donc être utilisé comme *un quencher* de la luminescence du Tb pour nos sondes par un processus de transfert d'énergie. Modulée par la distance entre le composé naphthalène et le complexe de terbium, nous nous attendons à une sonde sensible au zinc dont on peut mesurer la modulation du temps de vie de luminescence du lanthanide [119] [67].

Sonde Nous présenterons dans la suite la synthèse de cette nouvelle sonde à zinc comportant le complexe de Terbium TbL_1^D et le *quencher* naphthalène. La sonde sera appelé SP–Nap– TbL_1 .

2.1.2 Synthèse de la sonde SP–Nap– TbL_1

La sonde SP–Nap– TbL_1 est obtenue par la ligation native du fragment N-terminal comportant le naphthalène et du fragment C-terminal comportant le complexe TbL_1^D (voir fig. 2.3).

Fragment N-terminal La synthèse SPPS est conduite sur une résine SEA-PS (SEA = *bis*(2-Sulfanylethyl)amino, PS = trityl polystyren) développé par O. Melnyk [105]. Cette résine est obtenue en fonctionnalisant par SEA en méthode SPPS une résine classique 2-chlorotrityl.

La résine est gonflée pendant 30 min dans du DCM puis rincée trois fois par du DMF. Chaque acide aminé est couplé par 4 éq. de PyBOP, 8 éq DIEA pendant 30 min dans le DMF. Le couplage est répété deux fois. L'acide aminé non-naturel comportant le naphthalène en chaîne latérale est commercial : Fmoc-(1-naphthyl)-L-alanine (fig. 2.1). Il est facile de l'intégrer sur la séquence peptidique.

La cystéine qui est sur ce fragment est protégée par un groupement S-tBu qui ne se déprotège pas lors du décrochage du peptide de la résine au TFA. Ce groupement protège de l'oxydation de la fonction thiol lors du passage de la forme *SEA – on* en *SEA – off* en condition oxydante. Il est déprotégé lors de la NCL ultérieurement qui se déroule en milieu réducteur. L'acide glutamique E (position placée entre la cystéine et la position X de la séquence habituelle utilisée au laboratoire) a été oublié par erreur lors de la synthèse. Cela a été découvert tardivement lors de la thèse. Mais comme il

n'est pas un acide aminé crucial pour la formation du doigt de zinc, ceci n'a pas de conséquence dramatique et n'empêche pas le fonctionnement de la sonde.

Le dernier acide aminé est acétylé en N-terminal par un mélange DMF/anyhydride acétique/pyridine pendant 10 min. Le peptide est coupé dans un mélange TFA/TIS/H₂O/thioanisole puis précipité dans l'éther froid. Le peptide est redissout dans une solution aqueuse à 10% d'acide acétique puis traité avec une solution d'I₂ à 200mM dans du DMSO pour oxyder la fonction SEA. Le diode en excès est neutralisé en rajoutant quelques grains de DTT. Le peptide est ensuite purifié par HPLC préparative et caractérisé par HPLC analytique et ESI/MS.

Fragment C-terminal Le fragment C-terminal est synthétisé par SPPS avec assistance en micro-onde. Il comporte une lysine avec un *Alloc* pour groupement protecteur de la chaîne latérale. Le dernier acide aminé est une cystéine donc l'amine terminale est protégé par un groupement Boc pour éviter son acylation lors de l'étape de greffage du pro-ligand. La synthèse suit la description donnée précédemment en 1.4.1 à la p. 69.

Les esters méthyliques du DO3A sont hydrolysés par de la soude à 0.5 M pendant 20 min en vérifiant par HPLC. Le ligand est ensuite métallé par un excès de TbCl₃. Le peptide est de nouveau purifié sur HPLC préparative avec ajout au préalable de quelque grains de TCEP pour réduire les ponts disulfures qui ont pu se former entre les cystéines lors de la manipulation du peptide.

Ligation native chimique NCL La ligation entre le fragment N-terminal et C-terminal s'effectue en boîte à gant pour protéger les cystéines de l'oxydation. La ligation native s'effectue dans du tampon Phosphate 0.1M à pH 7.5 à 37°C en présence de 200mM MPAA et 200 mM TCEP. La réaction se déroule sur une nuit et la fin de réaction est contrôlée par HPLC. Le produit de ligation est purifié par HPLC préparative. La figure 2.4 montre le chromatogramme HPLC et le spectre de masse afin de juger de la pureté des composés obtenus.

2.1.3 Études photophysiques

Spectre d'absorption Le spectre d'absorption de la sonde est représenté en ligne pleine sur la figure 2.5a. Il comporte deux composantes : l'absorption du naphthalène (ligne point-tiret) avec un maximum absorption à 283 nm et l'absorption de l'antenne (ligne tiret). Le maximum d'absorption de l'antenne seule se situe à 302 nm. On peut noter une légère déformation de l'absorbance entre le complexe TbL₁^D et le complexe couplé sur le peptide *SP*. Le risque d'une superposition des absorbances de plusieurs composés est la perte de photons disponible pour le système d'excitation de l'antenne. Cependant, en excitant à 302 nm, on excite au pied de la bande de naphthalène et donc,

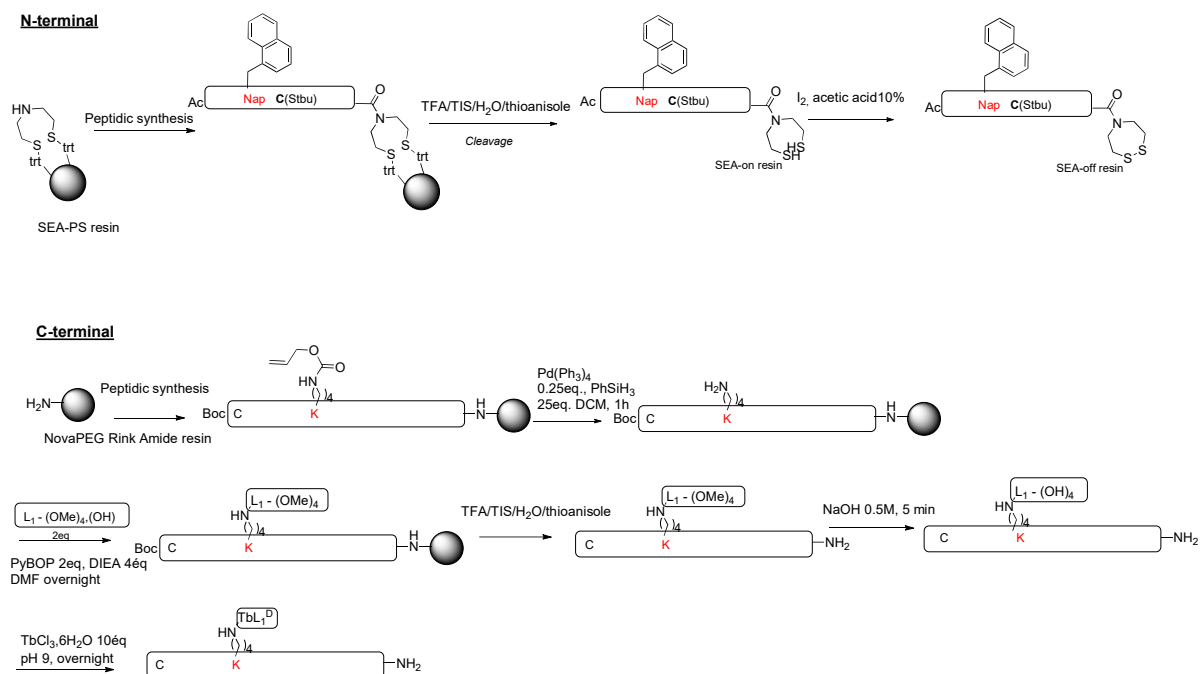


FIGURE 2.2 – Représentation des étapes de synthèse des fragment N-terminal et C-terminal de la sonde SP–Nap–TbL₁

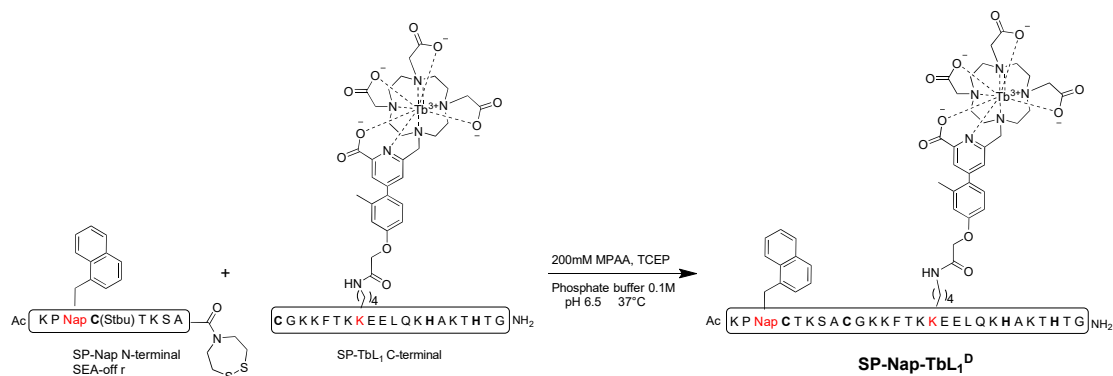


FIGURE 2.3 – Représentation de la ligation native chimique pour la synthèse de SP–Nap–TbL₁

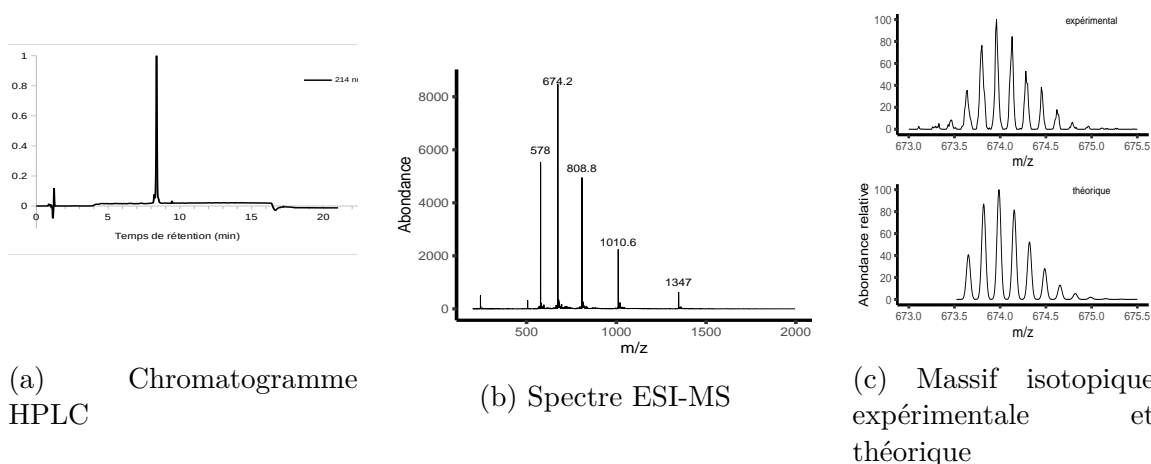


FIGURE 2.4 – Caractérisation de la sonde $SP - Nap - TbL_1$. Masse calculée : 1010.2 $[M+4H]^{4+}$, 808.4 $[M+5H]^{5+}$, 673.8 $[M+6H]^{6+}$, 577.7 $[M+7H]^{7+}$ pour $M=C_{175}H_{268}N_{47}O_{49}S_2Tb$

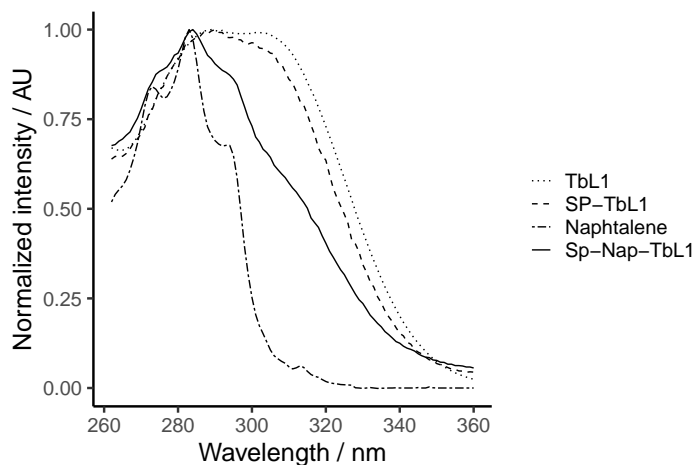
la perte en photon par absorption par le naphthalène est minimisée, ce qui doit garantir une excitation quasi exclusive par l'antenne L_1 .

Spectre d'émission en temps résolu En excitant à 302 nm, on retrouve le spectre d'émission caractéristique du Tb^{3+} avec les transitions $^5D_4 \rightarrow ^7F_{6-3}$ présentées sur la figure 2.5c. Le spectre d'excitation est représenté sur la même figure en ligne pointillée avec celui de l'absorption. Le spectre d'excitation est caractéristique de l'antenne TbL_1 sans contribution du naphthalène, ce qui confirme l'excitation par L_1 uniquement.

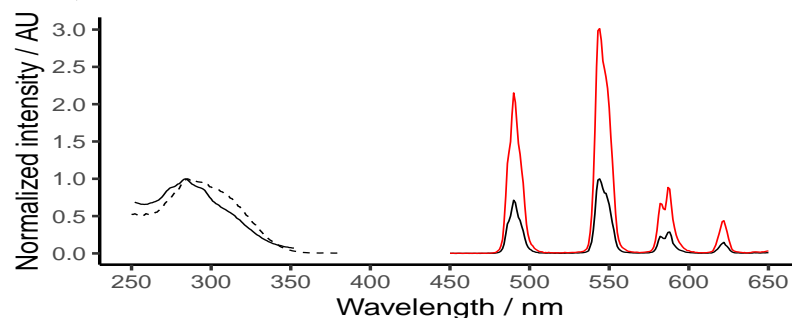
Complexe 1 :1 avec le Zinc(II) La formation du complexe 1 :1 Sonde-Zn est confirmée par la titrage par Zn^{2+} . L'émission du terbium augmente à chaque ajout de zinc puis atteint un plateau lorsqu'un équivalent de zinc par rapport à la sonde a été ajouté. Deux équivalents de zinc au total ont été ajoutés pour mieux observer ce plateau. Le maximum d'intensité d'émission du terbium à 545 nm est multiplié par trois après coordination au zinc (figure 2.5c).

Spectre de fluorescence La figure 2.5d montre l'émission du naphthalène après excitation au maximum d'absorption du naphthalène à 280 nm avant (ligne noir) puis après ajout de zinc (ligne rouge) avec un spectromètre en lampe pulsée. L'émission du naphthalène diminue lors du titrage. On retrouve le spectre d'excitation caractéristique du naphthalène (figure 2.5e ligne pointillée) à $\lambda_{em} = 330$ nm.

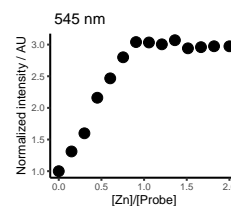
Temps de vie Pour enregistrer la décroissance de la luminescence du lanthanide en fonction du temps, le composé est excité à 302 nm et la luminescence est mesurée au maximum d'émission du lanthanide à 545 nm pour le terbium après un délais de 50



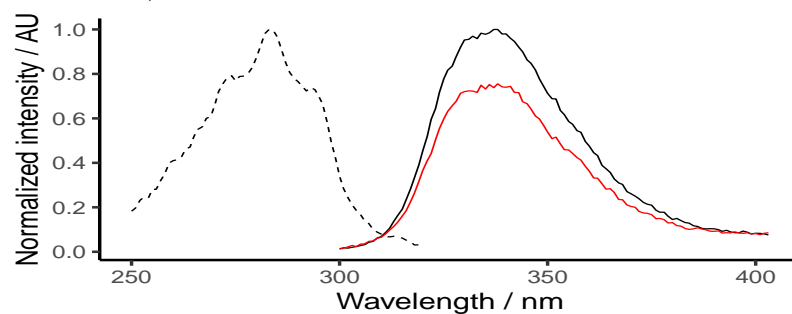
(a) Comparaison des absorbances du complexe TbL_1 (ligne pointillée), du complexe conjugué sur peptide SP (tirets), du naphthalène (points tirets) et de la sonde SP-Nap-TbL₁ (ligne pleine)



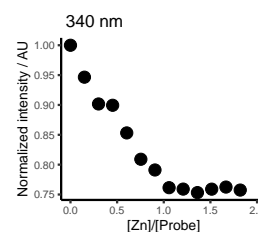
(b) Spectre d'émission en temps résolu (délai 100 μ s) à λ_{ex} = 302 nm pour la sonde libre (ligne noire) et la sonde liée au Zn^{2+} (ligne rouge) (fentes 10-2.5, PM 600 V); Spectre d'absorption (ligne pleine noire), spectre d'excitation du terbium à λ_{em} = 545 nm



(c) Évolution du maximum d'intensité normalisé λ_{em} = 545 nm pendant la titrage par le Zn^{2+}



(d) Spectre de fluorescence à λ_{ex} = 280 nm pour la sonde libre (ligne noire) et la sonde liée au Zn^{2+} (ligne rouge) (fentes 2.5-10, PM 650 V) et spectre d'excitation à λ_{em} = 340 nm (ligne pointillée)



(e) Évolution du maximum d'intensité de fluorescence normalisé λ_{em} = 340 nm pendant la titrage par le Zn^{2+}

FIGURE 2.5 – Propriétés photophysiques de la sonde $SP - Nap - TbL_1$ à 10 μ M, HEPES 10 mM, pH 7.4, TCEP 250 μ M

μs . Trois acquisitions sont enregistrées pour moyennner le signal. On enregistre le signal pour chaque ajout de zinc dans l'échantillon contenant $10\ \mu\text{M}$ du composé dans $10\ \text{mM}$ d'HEPES à pH 7.4 et $250\ \mu\text{M}$ de TCEP-HCL.

Une première inspection visuelle montre que le signal acquis décroît d'une manière qui s'assimile à une décroissance exponentielle. De ce fait, le signal expérimental est modélisé par une décroissance mono-exponentielle de type $y = A * \exp(-t/\tau) + C$ avec A le facteur pré-exponentielle, t le temps, τ le temps de vie et C une constante.

La figure 2.7 représente la courbe expérimentale de la décroissance de la luminescence du terbium en ligne pointillée et le modèle en ligne rouge : la luminescence décroît de manière très rapide au départ suggérant déjà un temps de vie court. Sur le graphique du dessous, la déviation, ou l'écart résiduel, est représentée comme un nuage de points répartie autour de zéro. La déviation est l'écart entre les données expérimentales et les données prédites. Un bon « fit » a une déviation distribuée aléatoirement sur un écart restreint autour de zéro. Or, elle n'est ici pas complètement aléatoirement distribuée suggérant que le *fit* n'est pas optimal mais elle reste proche de zéro. Le RMSE (voir introduction 1.3) sont compris entre 0.6 et 2.0. Les données sont proches du modèle choisi, mais la valeur du RMSE augmente au fur et à mesure des ajouts de Zn^{2+} à 2.0; le modèle devient de moins en moins proche des données mais reste bon.

Le temps de vie de la sonde à l'état initial a été calculé à $88\ \mu\text{s}$. À 2 équivalents de zinc, il augmente à $166\ \mu\text{s}$ soit un écart absolue de $78\ \mu\text{s}$. L'évolution du temps de vie de luminescence du terbium est représenté sur le graphique 2.6 à la page 81. Il évolue de manière linéaire avec un plateau à partir d'un équivalent de zinc ajouté. La complexation du zinc peut donc être suivi par le temps de vie. Nous avons donc bien une sonde répondant en temps de vie de luminescence.

Ces temps de vies sont particulièrement courts pour des temps de vie de terbium. Pour rappel, le complexe de terbium TbL_1 a un temps de vie de $2.35\ \text{ms}$.

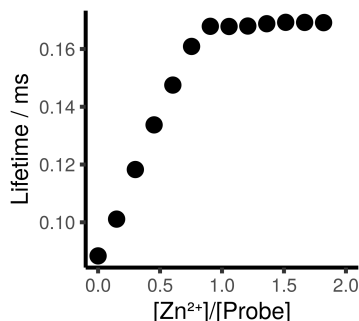


FIGURE 2.6 – Évolution du temps de vie de luminescence à $\lambda_{ex}=302\ \text{nm}$ à $\lambda_{em}=545\ \text{nm}$ pendant le titrage par le Zn^{2+} en mono-exponentiel

Rendement quantique Le rendement quantique du complexe TbL_1 est de 62%. D'ailleurs, un modèle peptique avec la même séquence d'acides aminés, sans naphthalène mais avec seulement le complexe de terbium, a également été synthétisé. Le rendement quantique de ce peptide était à 60% sans zinc et 53% après coordination de zinc. Le peptide en lui-même influe peu sur la luminescence du lanthanide. À l'inverse, la présence du naphthalène « quench » particulièrement la luminescence du terbium : le rendement quantique de notre sonde a été déterminé à 1.4% sans zinc et 1.7% avec zinc. La brillance du composé est de $220 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (avec zinc). Le système est donc quenché sans et avec zinc.

Modèle bi-exponentiel Pour notre sonde $SP - Nap - TbL_1$, le modèle de décroissance en mono-exponentielle semble au départ correct avec un modèle (en ligne rouge sur la fig. 2.7a) superposé aux points expérimentaux (ligne pointillée). Mais après ajout de zinc, les points expérimentaux passent en dessous de la ligne du modèle (rouge) puis au dessus à partir de 0.9 ms signifiant qu'ils décroissent plus vite au départ mais atteint moins vite le zéro suggérant un deuxième temps de vie plus long. La différence est plus visible à 2 éq. Cela ouvre une possibilité de modéliser par une décroissance bi-exponentielle de type $y = A_1 * \exp(-t/\tau_1) + A_2 * \exp(-t/\tau_2) + C$.

Après application du modèle bi-exponentiel, on observe que le modèle et les données expérimentales se superposent parfaitement et que la déviation semble plus aléatoirement distribuée. Les valeurs des temps de vie τ_1 et τ_2 ont pu être calculées et ont été représentées sur la figure 2.8a en fonction de l'ajout de Zn^{2+} . On observe un temps « long » τ_2 stable au cours du titrage autour de 0.5 ms. La première valeur de τ_2 diffère à 0.9 ms. L'ajout d'un minimum de zinc modifie peut être rapidement l'environnement chimique autour de la sonde et l'influence dans son comportement. Le temps « court » τ_1 se situe aux alentours des mêmes valeurs que les temps de vie calculés par le modèle mono-exponentiel, ici entre $85 \mu s$ à 0 éq. et 0.135 ms à 2 éq. de Zn^{2+} . Les contributions fractionnelles indiquent aussi que la part du temps court τ_1 contribue majoritairement à la luminescence à hauteur de 70%. Seule cette contribution répond en temps de vie à l'ajout de zinc de manière linéaire jusqu'à 1 éq. Ceci nous suggèrent l'existence de deux populations de sondes qui diffèrent en temps de vie. La différence mesurée peut être l'expression de deux populations d'excitation différentes.

Il existe une autre façon de représenter les temps de vie qui permet de manière artificielle d'utiliser seulement un seul et *long* temps de vie : en utilisant de nouveau les valeurs données par le modèle bi-exponentiel, on calcule les valeurs de temps de vie

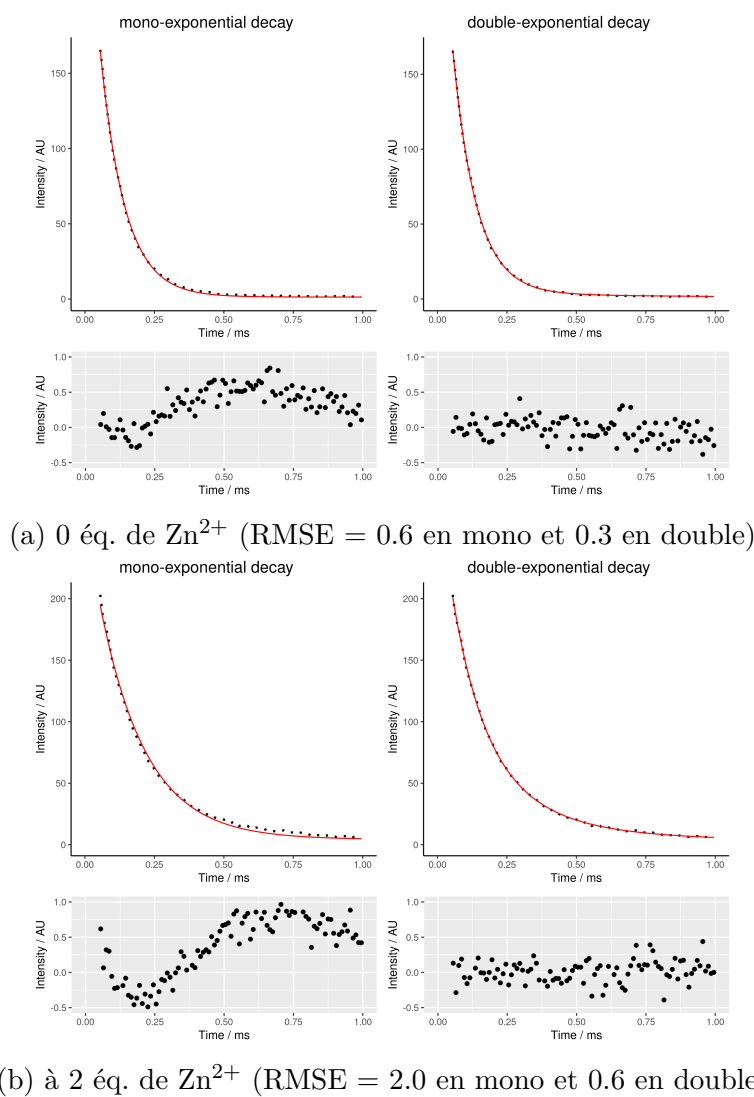


FIGURE 2.7 – Décroissance du signal de luminescence expérimentale et modélisée en mono et bi-exponentielle de la sonde $SP - Nap - Tbl_1$ (délai : 50 μs)

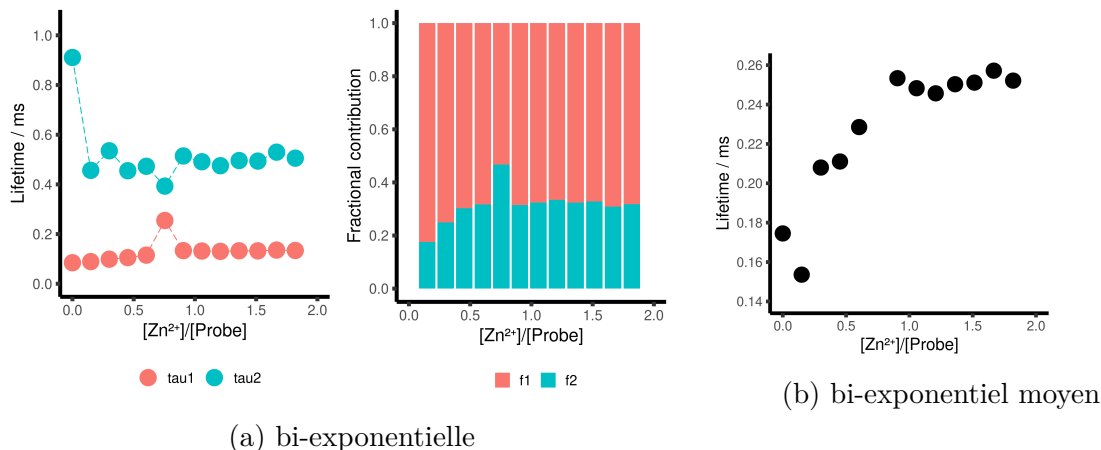


FIGURE 2.8 – Évolution du temps de vie de luminescence à $\lambda_{ex}=302$ nm à $\lambda_{em}=545$ nm pendant le titrage par le Zn^{2+} en mono, bi-exponentiel et bi-exponentiel moyen

moyen tel que :

$$\tau_{average} = \sum_i^n f_i \tau_i \quad (2.1)$$

avec i un entier, n le nombre de composantes du modèle de décroissance multi-exponentielle, f_i la contribution fractionnelle de la composante i et τ_i le temps de vie de la composante i .

Les temps de vie moyens sont représentés sur la fig.2.8b. La première valeur est plus haute que la deuxième à cause de la haute valeur de τ_2 au début du titrage. L'augmentation n'est pas complètement linéaire mais on devine un temps de vie qui augmente de 0.15 ms à 0.25 ms soit un écart absolu de 0.100 ms.

Avant toute considération mathématique, J. R. Lakowicz conseille de privilégier une analyse visuelle. Lorsque le modèle est proche des données expérimentales sans être forcément superposé parfaitement, la différence peut provenir d'erreur systématique de la mesure. Les deux modèles se superposent bien aux données expérimentales mais le modèle mono-exponentiel dévie un peu pendant le titrage tandis que le modèle bi-exponentiel se superpose toujours bien aux valeurs expérimentales. Cette analyse visuelle est confirmée par les RMSE du bi-exponentiel inférieurs à ceux du mono-exponentiel. Toutefois, la déviation reste centrée vers zéro dans un écart restreint entre -0.5 et 1 a.u. Ainsi, le modèle bi-exponentiel est meilleur en considérant ces critères (visuel et RMSE) mais pour une simplification, il nous a semblé que l'utilisation du modèle mono-exponentiel n'est pas totalement erronée. Il est suffisant pour mesurer les propriétés « responsives » de la sonde pour le zinc qui répond de manière linéaire comme le montre très clairement la figure 2.6 d'évolution des temps de vie.

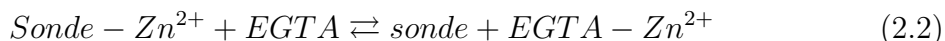
2.1.4 Caractérisation de la sonde

Affinité En vue d'une utilisation cellulaire, la constante d'association K_d de la sonde pour le Zn^{2+} doit être du même ordre de grandeur que la concentration de zinc circulant dans la cellule, soit entre 10^{-11} et 10^{-9} M. Si l'affinité de notre sonde est trop forte, elle démétallerait les métalloprotéines présentes dans la cellule ce qui aurait des conséquences sur le fonctionnement cellulaire. Si trop faible, la sonde ne serait pas capable de lier le zinc et ne servirait pas de sonde.

K_a est déterminée par titrage par le Zn^{2+} en compétition avec l'EGTA à affinité pour Zn^{2+} connue et quantité connue. L'EGTA a une affinité pour le Zn^{2+} de $\log(K_a)=9.2$ à pH 7.5.

Expérimentalement, on prépare une cuve contenant la sonde et l'EGTA à 1 équivalent et on mesure l'intensité de luminescence à chaque ajout de Zn^{2+} .

L'équilibre est la suivante :



Plusieurs cas limites sont possibles (voir fig. 2.9 à la page 86) :

- $K_{\text{peptide}}/K_{\text{compétiteur}} > 1000$: la sonde a une bien meilleure affinité pour le zinc que le compétiteur EGTA. La luminescence de la sonde augmente graduellement puis la sonde est saturée à 1 éq de zinc.

- $K_{\text{peptide}}/K_{\text{compétiteur}} < 0.001$: la sonde a une bien moins bonne affinité pour le zinc que le compétiteur EGTA. L'EGTA complexe le Zn^{2+} en premier puis la sonde complexe le Zn^{2+} et la luminescence augmente graduellement.

- $K_{\text{peptide}}/K_{\text{compétiteur}} = 1$: la sonde et l'EGTA ont la même affinité. La luminescence augmente linéairement jusqu'à 2 éq. de Zn^{2+} .

Pour calculer l'affinité, on utilise K_c la constante de réaction de la réaction 2.2 qui vaut :

$$K_c = \frac{K_{a_{EGTA-Zn^{2+}}}}{K_{a_{Sonde-Zn^{2+}}}} = \frac{[EGTA]_{Zn^{2+}-li} * [Sonde]}{[EGTA] * [Sonde]_{Zn^{2+}-lie}} \quad (2.3)$$

On cherche à calculer $K_{d_{Sonde-Zn}}$ pour trouver l'affinité de la sonde pour le Zn^{2+} .

Par conservation de la matière, on a :

$$[Sonde]_{total} = [Sonde]_{libre} + [Sonde]_{Zn^{2+}-lie} \quad (2.4)$$

$$[Zn^{2+}]_{total} = [Zn^{2+}]_{libre} + [Sonde]_{Zn^{2+}-lie} + [EGTA]_{Zn^{2+}-lie} \quad (2.5)$$

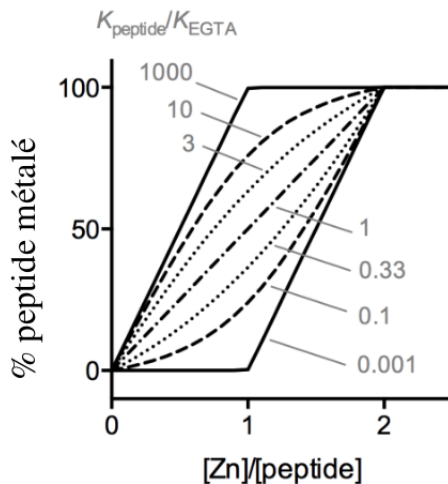


FIGURE 2.9 – Représentation de la luminescence en fonction des ajouts de zinc pour différentes valeurs de constantes d’association $K_{\text{peptide}}/K_{\text{compétiteur}}$ dans le cas d’un rapport stœchiométrique entre le peptide et le compétiteur

$$[EGTA]_{\text{total}} = [EGTA]_{\text{libre}} + [EGTA]_{\text{Zn}^{2+}\text{-lié}} \quad (2.6)$$

En combinant 2.3 et les équations ci-dessus, on peut donc déterminer une formule pour $[Sonde]_{\text{Zn}^{2+}\text{-lié}}$ qui est la solution de l’équation de second degré suivante :

$$a * [Sonde]_{\text{Zn}^{2+}\text{-lié}}^2 + b * [Sonde]_{\text{Zn}^{2+}\text{-lié}} + c = 0 \quad (2.7)$$

avec $a = K_c - 1$

$b = -K_c[Sonde]_{\text{total}} - K_c[Zn^{2+}]_{\text{total}} - [EGTA]_{\text{total}} + [Zn^{2+}]_{\text{total}}$

$c = K_c[Zn^{2+}]_{\text{total}}[Sonde]_{\text{total}}$

La solution est la suivante :

$$[Sonde]_{\text{Zn}^{2+}\text{-lié}} = \frac{-b - \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a} \quad (2.8)$$

On peut poser alors $r = \frac{[Zn^{2+}]}{[Sonde]_{\text{total}}}$ tel que :

$a = K_c - 1$

$b = r[Sonde]_{\text{total}} - K_c r[Sonde]_{\text{total}} - K_c[Sonde]_{\text{total}} - [EGTA]_{\text{total}}$

$c = K_c r[Sonde]_{\text{total}}^2$

De plus, l’émission peut être traduite par la relation suivante :

$$I * [Sonde]_{\text{total}} = I_0 * [Sonde]_{\text{libre}} + I_{\text{max}} * [Sonde]_{\text{Zn}^{2+}\text{-lié}} \quad (2.9)$$

avec I l’intensité d’émission, I_{max} le maximum d’intensité d’émission, I_0 l’intensité d’émission initiale sans addition de Zn^{2+} et $[Zn^{2+}]_{\text{free}}$ la concentration de Zn^{2+} libre.

Ainsi, l'intensité de luminescence du terbium vs la concentration de Zn^{2+} est modélisée par l'équation suivante :

$$I = I_0 + \frac{(I_{max} - I_0)}{[Sonde]_{total}} * [Sonde]_{Zn-li} \quad (2.10)$$

$$I = I_0 + \frac{(I_{max} - I_0)}{[Sonde]_{total}} * \frac{-b - \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a} \quad (2.11)$$

quand $[Zn^{2+}]_{total} < [Sonde]_{total} + [EGTA]_{total}$

et $I = I_{max}$ quand $[Zn^{2+}]_{total} > [Sonde]_{total} + [EGTA]_{total}$

Pour la sonde $SP - Nap - TbL_1$, on obtient un $-\log K_a$ de 9.8 ± 0.4 ce qui rentre dans l'intervalle de concentration de zinc libre dans une cellule.

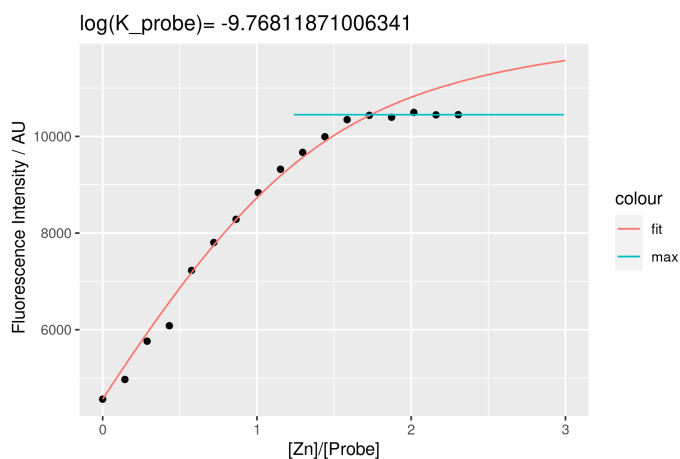


FIGURE 2.10 – Détermination de la constante d'affinité K_a de la sonde $SP - nap - TbL_1$ par titrage en compétition avec l'EGTA à 1 éq. par mesure d'intensité du terbium en temps résolu en fonction des ajouts de Zn^{2+}

Sélectivité Des cations alcalins et alcalino-terreux sont présents en quantité importante dans la cellule ; il est donc important de vérifier si notre sonde n'est pas perturbée par leur présence. Des métaux de transition sont aussi présents dans le milieu biologique mais pas sous forme d'ions libre. La sélectivité de notre sonde a quand même été étudiée en présence de ces métaux biologiques. La sélectivité a été contrôlée par des mesures de temps de vie de la sonde seule (10 μ M) en présence de différents cations puis après ajout de zinc (2 éq) dans une solution tamponnée par l'HEPES (10 mM pH 7.5).

Les cations alcalins sont ajustés à 100 mM, les cations alcalino-terreux à 10 mM et les métaux de transition à 10 μ M. Les temps de vie en présence des cations alcalins et alcalino-terreux diffèrent peu des valeurs en leur absence. Pour les métaux de

transitions Manganèse(II), Nickel(II), Cobalt(II), Cuivre(II) les temps de vie semblent plus hauts mais restent dans un intervalle inférieur à 20 μs . On remarque que le Fer(II) fait augmenter significativement le temps de vie initial de la sonde seule. Toutefois ce n'est pas un problème car comme mentionné précédemment, les métaux de transitions ne sont pas disponible en ion libre et ou en faible quantité en milieu cellulaire. La sonde conserve donc une bonne sélectivité pour le Zn^{2+} et peut être utilisée en milieu cellulaire.

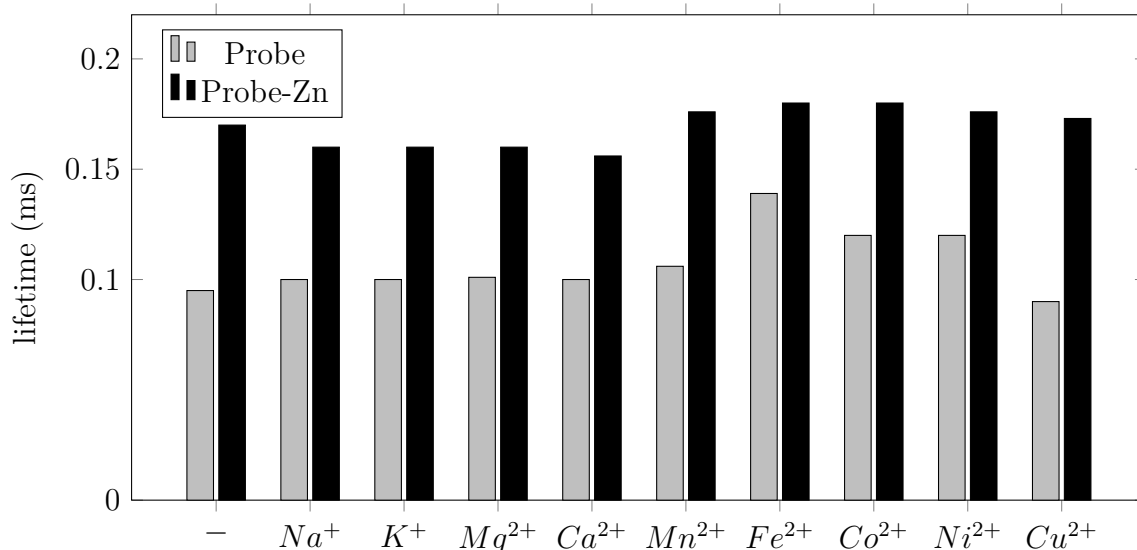


FIGURE 2.11 – Mesures des temps de vie de luminescence de la sonde $SP-Nap-TbL_1$ en présence de cations avant et après ajout de 2 équivalents de zinc (Na^+ , K^+ à 100mM, Mg^{2+} , Ca^{2+} à 10mM et Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} à 10 μM)

Influence du dioxygène En considérant les niveaux d'énergie, celui du $^5\text{D}_4$ du Tb^{3+} se situe à 20 500 cm^{-1} et est proche de celui de l'état triplet du naphthalène vers 22 000 cm^{-1} . Il peut y avoir un transfert d'énergie dans les deux directions. Or, un état triplet peut interagir avec le dioxygène et peut produire de l'oxygène singulet. Pour vérifier l'influence du dioxygène, une étude spectroscopique a été conduite en boîte à gant sans présence de dioxygène.

Les résultats de ces mesures en boîte à gant ont montré que la sonde ne répondait plus aux ajouts de zinc. L'intensité de luminescence du Tb^{3+} n'est plus modifiée et le temps de vie a été mesuré à 2.4 ms ce qui correspond au temps de vie du complexe TbL_1 seul. La sonde $SP-Nap-TbL_1$ n'est donc pas une sonde à zinc dans un environnement en condition anaérobie.

Ainsi, la désexcitation du Tb^{3+} est probablement favorisée par le dioxygène par l'intermédiaire de l'état triplet du naphthalène. Le dioxygène est un désactivateur qui participe au fonctionnement de notre sonde.

Le système de notre sonde peut résonner par d'autres niveaux. Il y a une possibilité de transfert d'énergie entre le triplet du naphthalène et le triplet de l'antenne qui se situe à $22\,000\text{ cm}^{-1}$. Or, O. Maury et al, a observé que le triplet de ce type d'antenne biarylique avec *ortho*-Me ne participait pas à une désactivation de la luminescence par le dioxygène. Le groupe *ortho*-Me est assez volumineux pour « twister » l'antenne et ainsi réduire la rotation libre de la liaison carbone-carbone.

Pour une application cellulaire, la sonde doit éviter d'être sensible au dioxygène car la concentration de dioxygène n'est pas uniforme dans la cellule et perturbe la quantification de la molécule cible par la sonde. Nous pouvons nous demander quelle est la concentration limite de dioxygène pour lequel notre sonde est sensible mais nous n'avons pas conduit d'expérimentation allant dans ce sens.

Par ailleurs, il n'a pas été possible de mesurer le nombre de molécule d'eau coordonnée au complexe de lanthanide de cette sonde. La relation donnée par Horrocks (eq.1.40 p.23) n'est pas applicable lorsque les désactivations vibrationnelles par l'eau n'est pas majoritaire. Ici, le dioxygène est le désactivateur principal.

2.1.5 Discussion

La sonde développée est « responsive » au zinc par son intensité de luminescence et par son temps de vie. On gagne en luminescence et en temps de vie du terbium par coordination du zinc. L'augmentation du temps de vie suggère également que le Tb^{3+} reste plus longtemps à un état excité avant de se désexciter et donc qu'il y a une diminution des désactivations non radiatives lors du titrage au zinc. Sachant qu'il y a sûrement une voie de désexcitation par le naphthalène, cette désexcitation qui passe par le naphthalène est alors moins favorisée avec le repliement du peptide. Le repliement induit probablement une modification des distances et/ou position des deux acteurs de telle sorte que le changement de conformation du peptide semble éloigner le Tb^{3+} du naphthalène. La rigidification du peptide impose alors une certaine distance entre les deux alors que le peptide libre permet une certaine liberté de position et le rapprochement des deux acteurs. Ce rapprochement est dû à des interactions hydrophobes et/ou par *stacking* de leur groupement aromatique.

La modification de l'intensité de fluorescence du naphthalène est aussi un indicateur du comportement de la sonde. L'intensité de fluorescence, excitée à 280 nm, décroît pendant l'ajout de Zn^{2+} (voir fig. 2.5d). Le naphthalène est sûrement mieux solvato par l'eau environnant ce qui augmente les désactivations non-radiatives par vibration oscillatoire des liaisons hydrogène.

Enfin, la mesure en l'absence de dioxygène ont permis de montrer que le dioxygène

est un désactivateur du système. La coordination du zinc à la sonde influe la population de ce triplet du naphthalène modulant ainsi le temps de vie de luminescence du terbium.

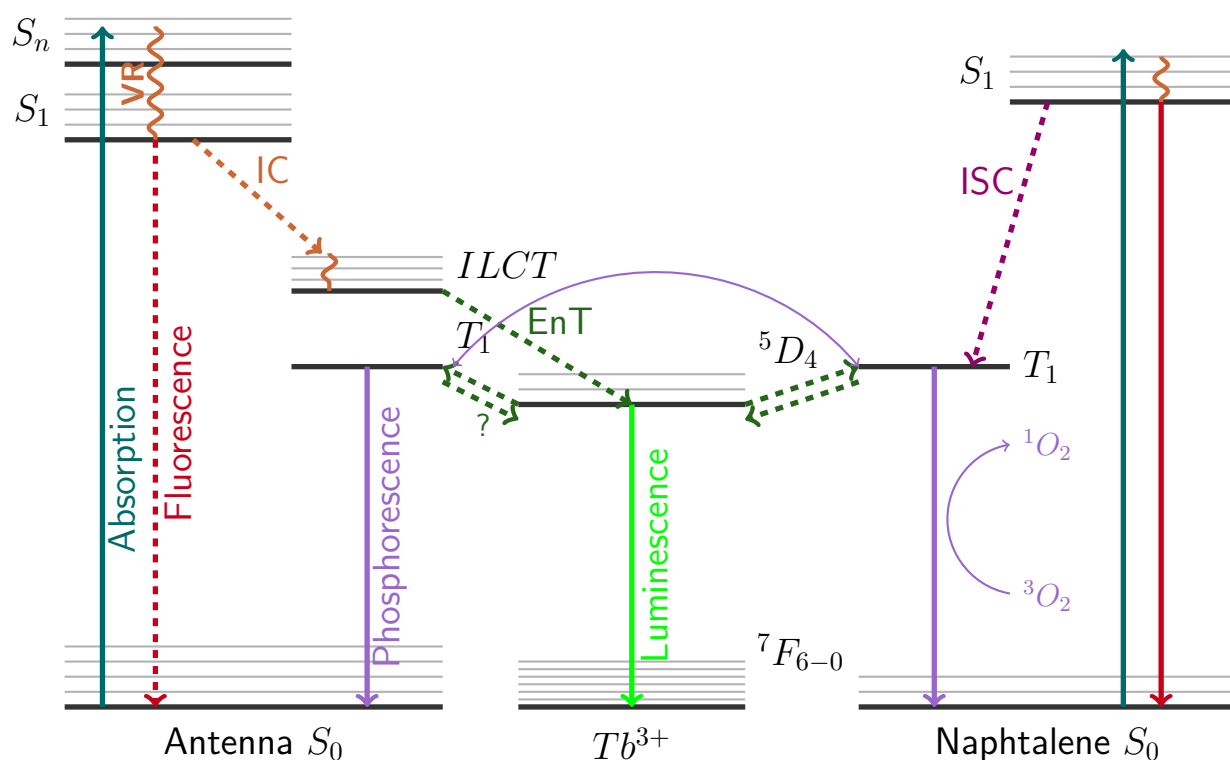
Quelques voies sont représentées sur la figure 2.12. Après absorption de la lumière incidente, l'antenne est excitée à un niveau ILCT, le niveau donneur pour le niveau accepteur du terbium 5D_4 . Le transfert d'énergie vers le niveau proche du naphthalène est bidirectionnel. Le dioxygène est un « moteur » pour une désexcitation par le triplet (la mesure d'oxygène singulet n'a pas été effectuée). Le triplet de l'antenne ($22\ 500\text{ cm}^{-1}$) peut aussi intervenir par transfert inverse du 5D_4 ou par résonance avec le triplet du naphthalène ($21\ 300\text{ cm}^{-1}$). Le comportement de la sonde ne peut pas être rationalisé sur la base simple d'un transfert d'énergie du Tb^{3+} vers le naphthalène mais il faut plutôt le considérer comme un système résonnant impliquant plusieurs éléments (antenne, Tb^{3+} , naphthalène) capables d'échanger de l'énergie. Par conséquent, une petite modification d'un paramètre peut déstabiliser le système.

Bien que la sonde ne soit pas utilisable en condition cellulaire à cause de la perte de réponse au zinc sans dioxygène, la sonde $SP - Nap - TbL_1$ présente des résultats prometteurs pour développer par la suite des sondes plus performantes fondées sur ce principe de mesure de temps de vie en temps résolu.

2.1.6 Influence de la position du complexe

Le transfert d'énergie est dépendant de la distance entre le composé donneur et le composé accepteur. Si notre sonde répond au zinc suite à une modification de la distance entre le complexe et le naphthalène provoquée par le repliement du peptide, alors il peut être possible d'améliorer la sonde en augmentant la différence de cette distance sur la sonde libre et la sonde liée. La sonde libre présenterait une luminescence plus *quenchée* que ce que nous avons obtenue et/ou la luminescence de la sonde liée sera plus lumineuse. Pour cela, nous pouvons modifier la position d'un des acteurs sur le peptide.

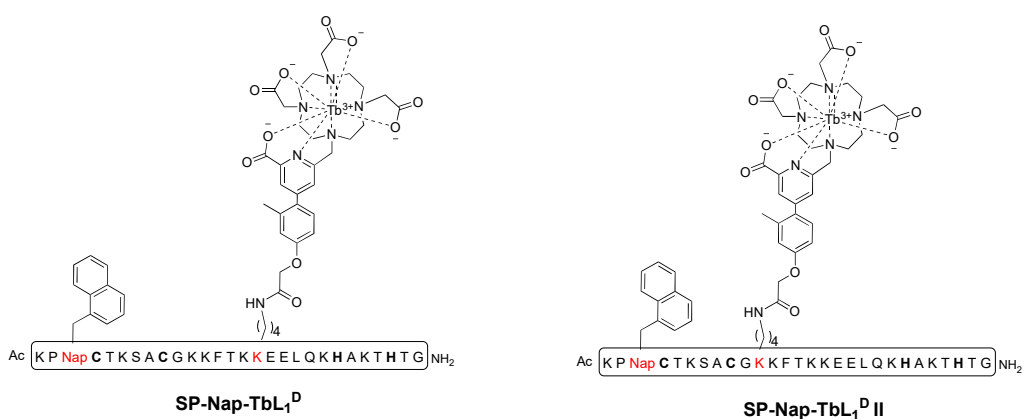
Le complexe se situe sur une lysine du fragment C-ter. Il est facile de déplacer ce complexe sur le peptide car il y a plusieurs autres lysines disponibles. La synthèse de ce nouveau fragment C-ter, appelons-le C-ter(II) se fait facilement en SPPS en modifiant la position de la lysine $K(\text{Alloc})$ comme indiqué sur la figure 2.13a. Le reste de la synthèse ne change pas. La position choisie est plus proche du naphthalène mais on espère que le repliement de la sonde liée au Zn^{2+} forcera une plus grande distanciation spatiale avec le complexe. Une représentation schématique est présentée sur la figure 2.13b. Ainsi, on espère mesurer un plus grand écart entre le temps de vie de la sonde libre et la sonde liée avec cette nouvelle sonde $SP - Nap - TbL_1 - II$.



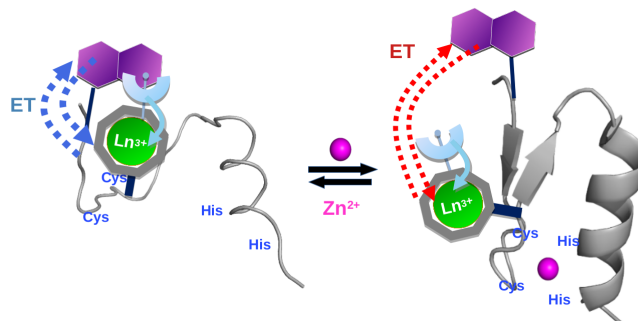
Legend

- IC Internal Conversion, non radiative transition.
- EnT Energy Transfer, non radiative transition.
- ISC InterSystem Crossing, $S_i \rightarrow T_j$ non radiative transition.
- RV Vibrational Relaxation.

FIGURE 2.12 – Diagramme de Jablonski de la sonde $SP - Nap - TbL^1$ (pas à l'échelle) (template par Germain Salvato-Vallverdu)



(a) Structure des sondes $SP - Nap - TbL_1$ et $SP - Nap - TbL_1 - II$



(b) Principe de la sonde avec la position du complexe de lanthanide modifiée, plus proche du naphthalène dans la séquence

FIGURE 2.13 – Schéma de la sonde $SP - Nap - TbL_1 - II$

Les résultats des analyses spectroscopiques de la sonde $SP - Nap - TbL_1 - II$ sont présentés sur la figure 2.14 à la page p.93. Ils ont semblé de premier abord encourageant mais ce sont avérés plus complexes. La luminescence du terbium en temps résolu présente un comportement des sondes de type *turn-on* entre la sonde libre et la sonde liée au Zn^{2+} . L'intensité est multipliée par 5 pour cette sonde-ci alors qu'elle était multipliée par 3 pour la sonde précédente (fig. 2.14b). Cet écart de luminescence est un premier indice montrant la pertinence de la modification de la position du complexe sur la séquence.

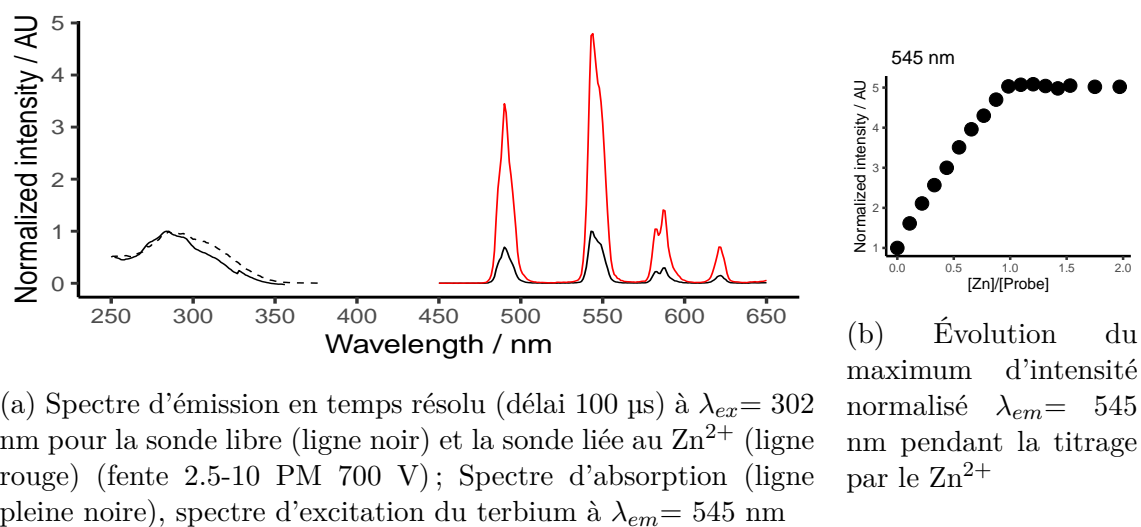


FIGURE 2.14 – Propriétés photophysiques de la sonde $SP - Nap - TbL_1 - II$

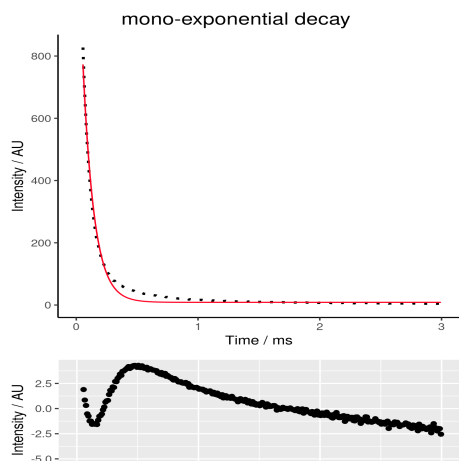
Quant aux mesures de temps de vies, la sonde $SP - Nap - TbL_1 - II$ est plus complexe à analyser. La décroissance de luminescence se modélise imparfaitement par un modèle de décroissance mono-exponentielle avec des χ_R^2 supérieurs à 5. Le modèle (ligne rouge fig. 2.15a) se superpose imparfaitement avec les valeurs expérimentales (ligne pointillée), ce qui est confirmé par la forte déviation. Le modèle de décroissance double-exponentielle semble alors de premiers abords meilleur (fig. 2.15c). Le modèle se superpose bien aux valeurs expérimentales avec une déviation petite centrée vers zéro; les valeurs de RMSE sont situées entre 0.9 et 1.9 soit un peu dispersé autour de 1 : le modèle bi-exponentiel s'adapte aux données expérimentales. Les deux temps de vie sont mesurées à $\tau_1 = 65 \mu s$ et $\tau_2 = 0.93$ ms pour la sonde libre et à $\tau_1 = 90 \mu s$ et $\tau_2 = 0.350$ ms pour la sonde liée (fig. 2.15d). Le temps de vie τ_1 croît de manière régulière et se stabilise lorsque 1 éq. de Zn^{2+} a été ajouté. En revanche, le temps long ne répond pas au zinc de manière linéaire. Il décroît très fortement en début de titrage et moins à la fin. Nous ne savons pas pourquoi la sonde présente ce comportement : il y a peut-être un arrangement particulier de nos peptides en solution que le zinc « casse » au fur et à mesure pour former un complexe 1 :1 à la fin. D'ailleurs, sur la figure

présentant les temps de vie moyens (fig.2.15e), on observe l'augmentation des temps de vie de 0.21 ms à 0.29 ms soit un écart absolu de 90 μ s sans compter le premier point qui est supérieur au deuxième à cause du premier τ_2 long ; de plus, on peut remarquer deux pentes séparées à 0.5 éq, la première plus forte que la deuxième partie avant de se stabiliser à 0.30 ms après 1 éq. Il y a donc bien un autre paramètre qui influence sur le temps de vie. S'il y a un effet de « stacking », nous aurions pu vérifier si l'on retrouve ce même comportement de temps en condition très diluée et/ou en présence de chaotropes. La formation d'un complexe 2 :1 en début de titrage (observée pour des doigts de zinc à faible affinité) pourrait également expliquer ces deux pentes.

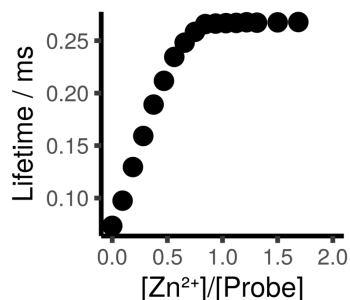
Les contributions fractionnelles montrent que le temps court est dominant jusqu'à 0.4 éq. de Zn^{2+} puis laisse la place au temps long qui domine à 80% la luminescence à la fin du titrage. Autrement dit, la sonde II favorise la contribution par le temps long alors que la sonde I a un temps de vie dominé par le temps court. Il y a donc des différences de populations des états excités entre la sonde $SP - Nap - TbL_1$ et $SP - Nap - TbL_1 - II$. Toutefois, la luminescence d'un composé peut ne pas être modélisée par une décroissance exponentielle ou une somme de décroissances exponentielles surtout en présence d'un désactivateur par collision ou dans des cas de transfert d'énergie comme nous l'indique J.R. Lakowicz [45]. Les fluorophores proches des désactivateurs vont se désactiver rapidement contrairement à des fluorophores plus éloignés qui vont restés plus longtemps à un état excité. Nous nous plaçons dans ce cas car notre sonde est sensible à la désactivation par le dioxygène et repose sur un système résonnant avec le naphthalène. C'est pourquoi, même si nous modélisons les données par une décroissance bi-exponentielle, il peut être difficile de relier les τ_i et A_i à de réels paramètres moléculaires.

En application cellulaire, les mesures de temps de vie sont mesurées par TSLIM qui privilégie les premiers points de la décroissance de luminescence compte tenu de la sensibilité du microscope. Si l'on se place dans ces conditions, nous pourrions obtenir un meilleur ajustement avec le mono-exponentiel. Nous avons essayé de tronquer les données jusqu'à 200 μ s sans meilleur résultat. La mauvaise superposition entre les données expérimentales et le modèle est bien visible et les temps de vie sont similaires à ceux calculé précédemment et se situent entre 70 μ s et 200 μ s.

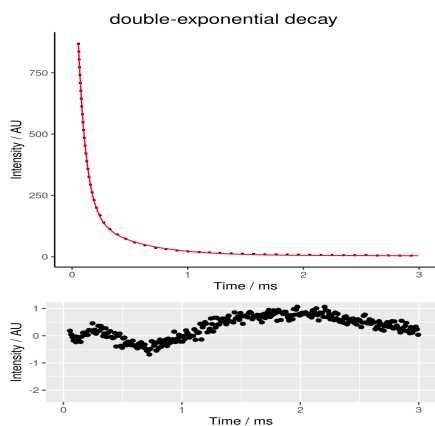
Concernant les rendements quantiques, celui de la sonde II libre est de même ordre de grandeur que la première sonde (0.8% contre 1.4%). Liée au Zinc, elle a un rendement quantique de 1.5% (contre 1.7% pour la première sonde). L'écart de rendement quantique entre la sonde libre et liée est un peu plus important avec la sonde II sans pour autant gagner en rendement quantique.



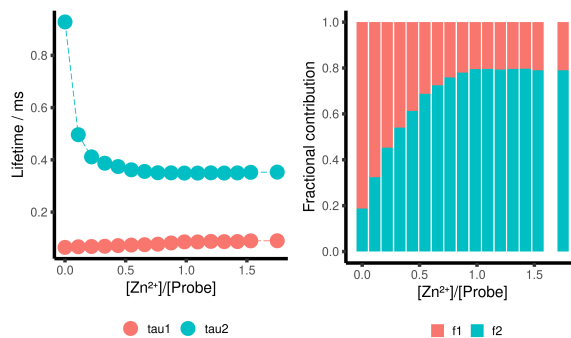
(a) Modélisation par un modèle mono-exponentiel (ligne rouge) et sa déviation (bas)



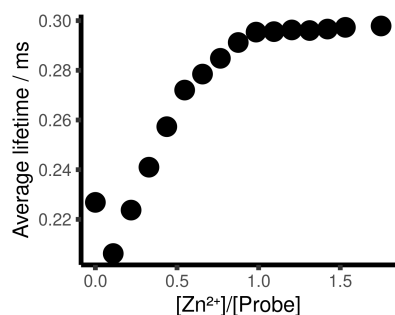
(b) Évolution des temps de vie par un modèle mono-exponentiel



(c) Modélisation par un modèle bi-exponentiel (ligne rouge) et sa déviation (bas)



(d) Évolution des temps de vie par un modèle bi-exponentiel et ses contributions fractionnelles associées.



(e) Évolution des temps de vie moyen par un modèle bi-exponentiel et ses contributions fractionnelles associées

FIGURE 2.15 – Modélisations (ligne rouge) de la décroissance de luminescence (données expérimentales en ligne pointillée) de la sonde $SP-Nap-TbL_1-II$ par deux modèles mesurée à $\lambda_{ex}=302$ nm à $\lambda_{em}=615$ nm

Pour récapituler, la nouvelle position du complexe sur la séquence peptidique a un comportement similaire (augmentation de l'intensité de luminescence et augmentation du temps de vie) à la première sonde sans pour autant l'améliorer de manière significative. L'écart de l'intensité de luminescence est plus grand avec la sonde II avec un rendement quantique de la forme libre de la sonde II plus faible en terme de rendement quantique que celle de la sonde I mais un rendement quantique de la forme liée similaire pour les deux sondes I et II.

Quant au temps de vie, la sonde I se modélise bien avec une mono-exponentielle alors que la sonde l'est bien moins obligeant l'utilisation du modèle double-exponentiel. Pour comparer, en considérant les temps de vie moyens (modèle double exponentiel), la sonde a un temps de vie qui varie de 155 μs à 250 μs durant le titrage au zinc ; la sonde II varie entre 210 μs et 300 μs . Les écarts absolues sont donc similaires (95 μs contre 90 μs) Ainsi, les temps de vie sont plus longs pour la sonde II suggérant une moins forte désexcitation de la luminescence du terbium mais la différence due au changement de position du complexe de lanthanide reste très modeste : la nouvelle position du complexe n'induit pas un allongement marquée de la distance avec le naphthalène lorsque le peptide se replie.

2.1.7 Conclusion

Notre but était de vérifier si le principe d'échange d'énergie avec un autre chromophore était compatible avec notre nouveau complexe TbL_1 et nous nous sommes intéressés aux réponses spectroscopiques au cours du titrage par le zinc. Il a été possible de mesurer une réponse en temps de vie pour les sondes $SP - Nap - \text{TbL}_1$ et $SP - Nap - \text{TbL}_1 - II$ qui diffèrent par la position du complexe de lanthanide sur la séquence peptidique.

La sonde $SP - Nap - \text{TbL}_1$ est un système globalement peu luminescent, hyper *quenché* avec un temps de vie faible, inférieur à 0.20 ms. Donc l'ajout du naphthalène désactive très efficacement la luminescence du Tb^{3+} . La sonde répond au Zn^{2+} par une modification du temps de vie de luminescence. Toutefois, la présence de dioxygène est nécessaire à la réponse de la sonde ; ceci indique que le dioxygène est un moteur de la désexcitation par le triplet (ici celui du naphthalène). Ainsi, le naphthalène participe à la désactivation de la luminescence du terbium par son état triplet.

La sonde $SP - Nap - \text{TbL}_1 - II$ a été conçu dans l'optique d'augmenter l'écart des temps de vie entre la forme libre et et la forme liée au Zn^{2+} . Le complexe de lanthanide a été déplacé de telle sorte qu'il soit proche du naphthalène mais que la distance augmente avec le repliement et la rigidification du peptide après coordination du zinc. Expérimentalement, il y a une influence sur l'intensité de luminescence et les temps de vie. La luminescence de la sonde II augmente par 5 au lieu de 3 pour la sonde

I mais les rendements quantiques sont similaires ; il y a une inversion de population des temps de vie avec le temps de vie long qui devient majoritaire mais l'écart de temps est similaire. Les changements ne sont pas assez importants pour affecter le comportement de la sonde en terme de distance. Les deux modèles utilisés (décroissance mono et bi-exponentiel) ne sont pas parfaitement satisfaisant pour la sonde II. Au vue de ces résultats, il aurait fallu trouver une autre équation qui permet de prendre en compte la désactivation par collision par le dioxygène mais nous n'avons pas continué dans cette voie car nous avons préféré synthétiser une autre sonde avec un autre *quencher* qui ne serait pas sensible à l'oxygène. Il serait alors possible de retrouver des temps longs proches de la milliseconde et de plus fort rendements quantiques. C'est ce que nous développerons dans la partie suivante.

2.2 Une nouvelle sonde à zinc : l'azulène comme nouvel élément du système résonnant

Une première approche pour améliorer la sonde naphthalène est d'éviter le passage par l'état triplet. Il nous faut alors un composé qui possède un niveau singulet capable de résonner avec le donneur du terbium. Un candidat potentiel est l'azulène. Il est assez particulier avec un niveau S_1 suffisamment bas en énergie pour être proche du niveau 5D_4 du terbium.

2.2.1 Présentation

L'azulène est un composé aromatique $C_{10}H_8$, isomère du naphthalène, avec un cycle à sept carbones et un cycle à cinq carbones. Le cycle à 5 est riche en électron et le cycle à 7 est déficient en électron induisant un moment dipolaire significatif au sein de la molécule (fig. 2.16). La position 1 est d'ailleurs basique et se protone pour former l'azulenium (AzH^+ sur la fig. 2.16) [27]. Il possède des propriétés photophysiques atypiques. Il se caractérise par un grand écart énergétique entre les niveaux S_1 et S_2 ($14\ 000\text{ cm}^{-1}$) et un petit écart entre les niveaux S_0 et S_1 . Cette particularité a pour conséquence une désexcitation radiative à partir du niveau S_2 au lieu du S_1 car la vitesse de conversion interne $S_2 \rightarrow S_1$ est plus lente que la vitesse de désexcitation radiative $S_2 \rightarrow S_0$. L'azulène a été le premier composé découvert qui ne suit pas la règle de Kasha. Pour rappel, la règle de Kasha indique qu'une molécule fluoresce à partir du plus bas état excité.

Ce petit écart entre $S_0 \rightarrow S_1$ fait que la transition se situe dans le visible entre 550 et 700 nm mais le coefficient d'extinction molaire est faible ($470\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). La transition $S_0 \rightarrow S_2$ se situe vers 330 nm avec un coefficient d'extinction molaire plus grand de $8200\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$.

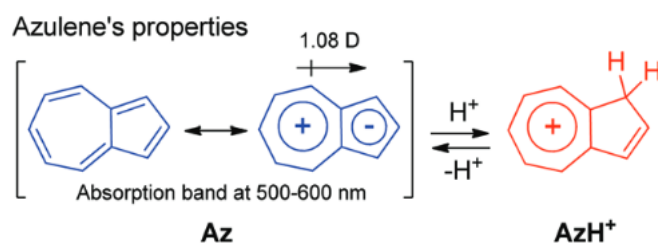


FIGURE 2.16 – Propriété de l'azulène et moment dipolaire - tirée de la publication[27]

Pour notre projet, l'azulène est potentiellement un *quencher* pour notre système par résonance avec le S_2 ou le S_1 .

Cependant, le niveau S_1 est très proche du niveau T_1 (écart $< 400 \text{ cm}^{-1}$). On ne peut pas complètement négliger des transferts vers les triplets T_1 ($13\,800 \text{ cm}^{-1}$) et T_2 ($18\,200 \text{ cm}^{-1}$) qui est proche du triplet de l'antenne. Il faudra donc vérifier la sensibilité au dioxygène pour cette nouvelle sonde.

Avec l'azulène atypique, on espère pouvoir obtenir une sonde « responsive » au zinc, non sensible à l'oxygène et retrouver des temps de vie plus long de l'ordre de la milliseconde.

2.2.2 Synthèse

La synthèse est similaire à celle de la sonde $SP - Nap - TbL_1$. La seule différence se trouve sur l'introduction de l'azulène sur le fragment N-terminal. O. Sénèque a synthétisé l'acide (1-azulényl)-carboxylique [120]. Il est greffé par couplage peptidique avec l'amine de la chaîne latérale de l'acide aminé non naturel Dap (diamino proprionic acid), un analogue de la lysine à chaîne courte (CH_2NH_2 contre $(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$). La synthèse de ce fragment est représentée sur la figure 2.17.

La figure 2.18 représente l'étape de ligation chimique native entre le fragment N-terminal contenant l'azulène et le fragment C-terminal comportant le complexe de Terbium TbL_1 . La sonde a été purifiée par HPLC préparative et caractérisée par HPLC analytique et MS (fig.2.19).

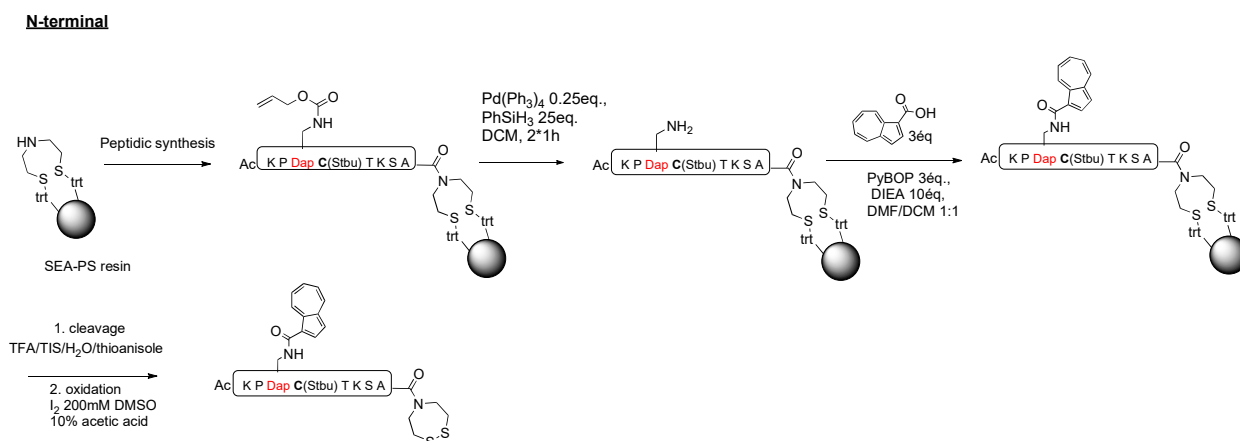


FIGURE 2.17 – Schéma de synthèse du fragment N-terminal $SP - Azu - N - terminal$

2.2.3 Études spectroscopiques

Les mesures ont été effectuées avec la sonde à $10 \mu\text{M}$ dans de l'eau tamponnée par l'HEPES à 10mM pH 7.4 et $250 \mu\text{M}$ de TCEP.

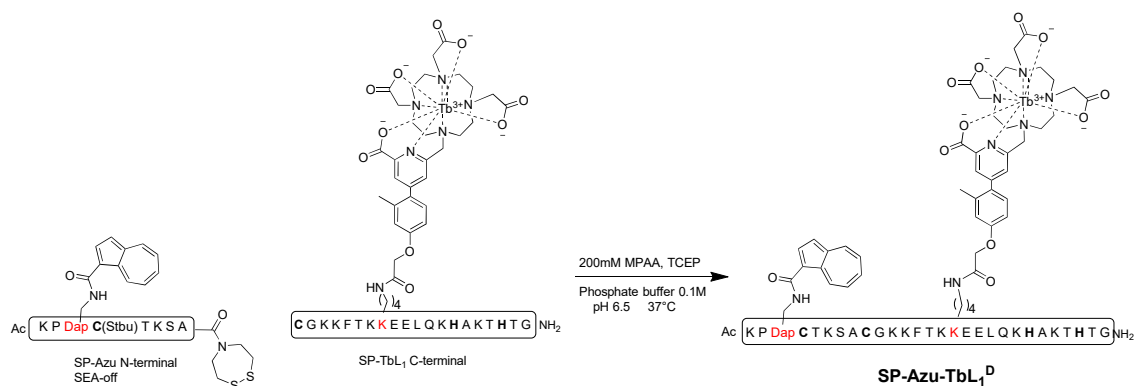


FIGURE 2.18 – Schéma de synthèse NCL des sondes à zinc *SP – Azu – TbL₁*

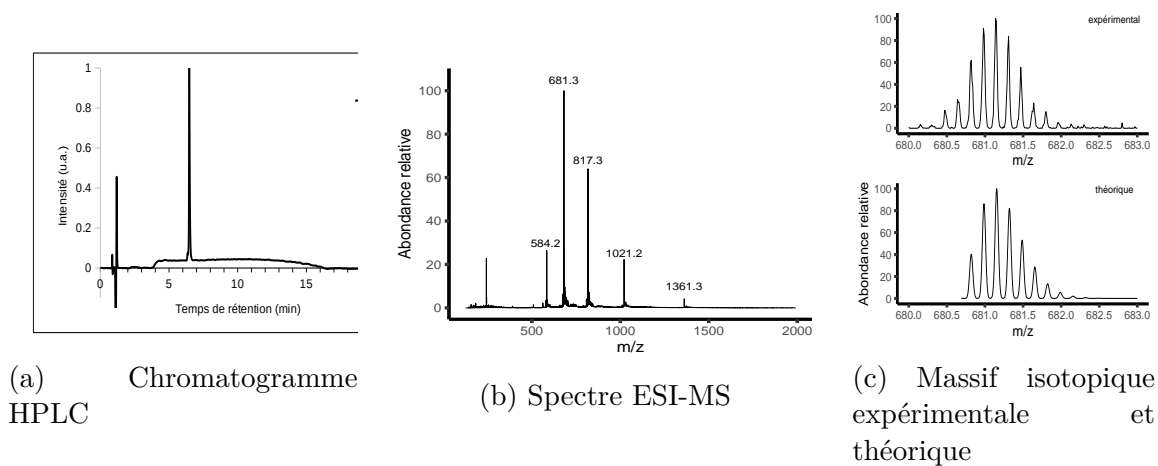
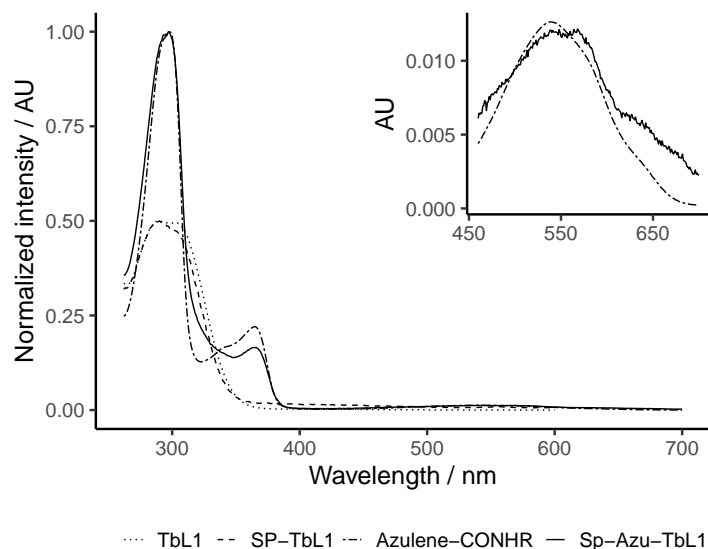
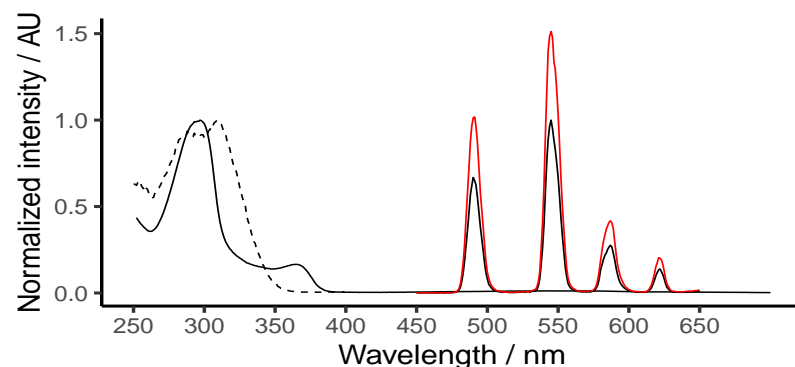


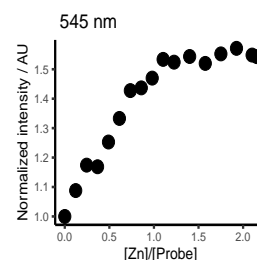
FIGURE 2.19 – Caractérisation de la sonde *SP – Azu – TbL₁*. Masse calculée : 1021.0 $[M+4H]^{4+}$, 817.0 $[M+5H]^{5+}$, 681.0 $[M+6H]^{6+}$, 583.8 $[M+7H]^{7+}$ pour $M=C_{176}H_{269}N_{48}O_{50}S_2Tb$



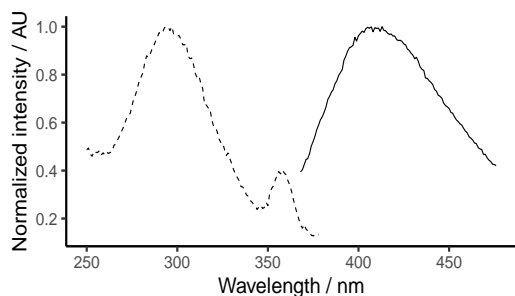
(a) Comparaison des absorbances du complexe TbL_1 (ligne pointillée), du complexe conjugué sur peptide SP $SP-TbL_1$ (tirets), de l'azulène-OCNR (points tirets) et de la sonde $SP-Azu-TbL_1$ (ligne pleine)- les intensités des absorbances de TbL_1 et de $SP-TbL_1$ ont été divisées par deux par soucis de clareté



(b) Spectre d'émission en temps résolu (délai 100 μs) à $\lambda_{ex}=302$ nm pour la sonde libre (ligne noire) et la sonde liée au Zn^{2+} (ligne rouge) (fentes 10-5 PM 700V) ; Spectre d'absorption (ligne pleine noire), spectre d'excitation du terbium à $\lambda_{em}=545$ nm



(c) Évolution du maximum d'intensité normalisé $\lambda_{em}=545$ nm pendant la titrage par le Zn^{2+}



(d) Spectre de fluorescence à $\lambda_{ex}=295$ nm (ligne pleine) et spectre d'excitation à $\lambda_{em}=410$ nm (ligne pointillée)

FIGURE 2.20 – Études spectroscopiques de la sonde $SP-Azu-TbL_1$ à 10 μM , HEPES 10mM, pH 7.4, TCEP 250 μM

Spectre d'absorption Le spectre d'absorption de la sonde est représenté sur la figure 2.20b (p.101) et est tracé en ligne noire pleine. On observe un maximum d'absorption à 300 nm correspondant à la transition $S_0 \rightarrow S_3$ et un autre maximum local à 360 nm correspondant à la transition $S_0 \rightarrow S_2$. Une autre bande large se situe entre 480 et 600 nm et correspond à la transition $S_0 \rightarrow S_1$. L'absorption de la transition $S_0 \rightarrow S_2$ est déplacée vers de plus hautes longueurs d'onde que l'azulène nu et l'absorption de la transition $S_0 \rightarrow S_1$ est déplacée vers de plus petites longueurs d'ondes. Ce déplacement s'explique par l'ajout d'un groupement électro-attracteur sur le carbone 1 qui stabilise cette position nucléophile et augmente l'écart $S_0 - S_1$ [121].

Le spectre d'absorption de l'antenne se situe dans la zone du maximum d'absorption de l'azulène. Le coefficient d'extinction molaire de l'azulène à 300 nm est de $35\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ alors que celui de l'antenne biaryle est de $12\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Les 2/3 des photons lors de l'excitation sont donc « perdu » au profit de l'azulène.

Spectre d'émission en temps résolu L'émission en temps résolu de la sonde $SP - Azu - TbL_1$ excitée au maximum d'absorption de l'antenne à $\lambda_{ex} = 302\text{ nm}$ correspond bien aux émissions du Tb^{3+} . L'intensité de luminescence du Tb^{3+} augmente avec l'ajout progressif de Zn^{2+} . Elle augmente d'au moins 1.5 fois de son intensité initiale avant de stagner au bout de 1 équivalent de Zn^{2+} ajouté (voir figure 2.20c) confirmant la formation d'un complexe 1 :1 $SP - Azu - TbL_1 - Zn^{2+}$.

Le spectre d'excitation à $\lambda_{em} = 545\text{ nm}$ est présenté sur la figure 2.20b en ligne pointillée. Sa forme est similaire au spectre d'absorption de l'antenne ce qui indique que la luminescence est bien due à l'excitation par l'antenne et que l'azulène ne contribue pas à l'excitation du Tb^{3+} .

Spectre de fluorescence Lorsque que l'on excite à 295 nm en lampe pulsée, le maximum d'émission observé à $\lambda_{em} = 415\text{ nm}$ correspond à l'émission caractéristique de l'azulène-CONHR de la transition $S_2 \rightarrow S_0$, en ligne pleine sur la figure 2.20d. En émission totale, la fluorescence de l'azulène est présente mais son intensité est très faible par rapport à l'émission du terbium. De plus, l'intensité d'émission n'est pas modifiée après ajout de Zn^{2+} . Le spectre d'excitation associé correspond à l'absorbance de l'azulène-CONHR (tirets).

Temps de vie En modélisant par une décroissance mono-exponentielle (fig. 2.21a à gauche), le modèle (ligne rouge) ne se superpose pas aux données expérimentales (ligne pointillée). La ligne pointillée décroît au départ plus rapidement que le modèle mais atteint zéro moins rapidement. Le graphique de la déviation (figure juste en dessous) montre cette tendance. Les valeurs sont éloignées de zéro. Le modèle

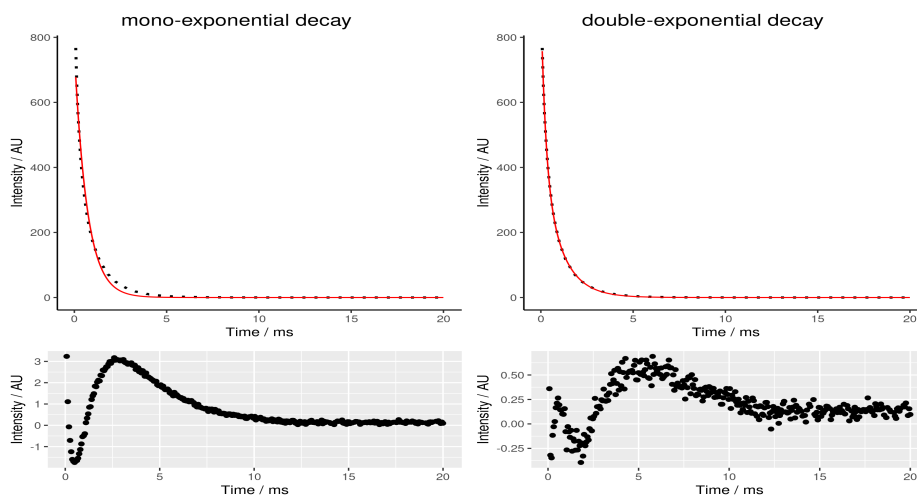
mono-exponentielle n'est pas satisfaisant car il semble y avoir deux composantes de temps de vie.

De ce fait, la décroissance de luminescence au cours du temps a alors été modélisée par une double décroissance exponentielle de type $y = A_1 * \exp(-t/\tau_1) + A_2 * \exp(-t/\tau_2) + C$ (fig. 2.21a à droite). Le modèle est bien mieux superposé visuellement ; la déviation est bien plus centrée autour de zéro mais le début n'est toujours pas aléatoirement distribuée autour de zéro.

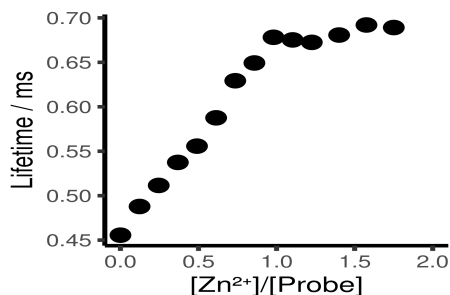
On a pu différencier un temps court τ_1 d'un temps relativement long τ_2 dont on a suivi l'évolution lors des ajouts successifs de Zn^{2+} (présentée sur la figure 2.21c à la page 104). Le temps court τ_1 est mesuré vers 0.21 ms et semble très légèrement augmenter jusqu'à 0.24 ms au court de la titrage par le zinc. Le temps long τ_2 est mesuré à 0.84 ms pour la sonde libre et augmente graduellement jusqu'à 1.00 ms lors des ajouts successifs de Zn^{2+} . De manière similaire à la luminescence, τ_2 stagne à 1.00 ms après 1 équivalent de Zn^{2+} ajouté ce qui confirme une fois de plus la formation du complexe 1 : 1 $SP - Azu - TbL_1 - Zn^{2+}$. Concernant les contributions fractionnelles, le temps long τ_2 est dominant à 70% pour la sonde libre et jusqu'à 80% pour la sonde liée. Bien que le modèle soit plus complexe pour la sonde $SP - Azu - TbL_1$, on a pu obtenir au moins une composante à temps long ce qui conserve en partie les avantages intrinsèques des propriétés des lanthanides en spectroscopie. Les deux temps de vie sont peut-être associés à deux conformations principales ou deux populations principales. En utilisant les temps de vie moyens, on obtient la courbe d'évolution représentée sur la figure 2.21d. Les temps de vie augmentent graduellement à chaque ajout de Zn^{2+} de 0.63 ms à 0.85 ms. Cette méthode pour obtenir un temps de vie « global » est simple mais artificielle ; elle peut suffire pour relier le temps de vie à la concentration de zinc.

Un autre modèle de temps de vie : le modèle de fit pondéré Le modèle multi-exponentiel est souvent employé par la communauté scientifique lorsque le modèle mono-exponentiel n'est pas adéquat. On peut se demander la pertinence de ce modèle par rapport au phénomène réel. Y a-t-il réellement deux temps de vie majoritaires pour notre sonde ? Si notre sonde était une molécule organique simple, cela aurait pu être vrai. Or, dans notre cas, nous avons un peptide de 33 acides aminés qui est flexible, animé de mouvements conformationnels. De ce fait, nous avons essayé d'autres modélisations de la décroissance de luminescence pour cette sonde.

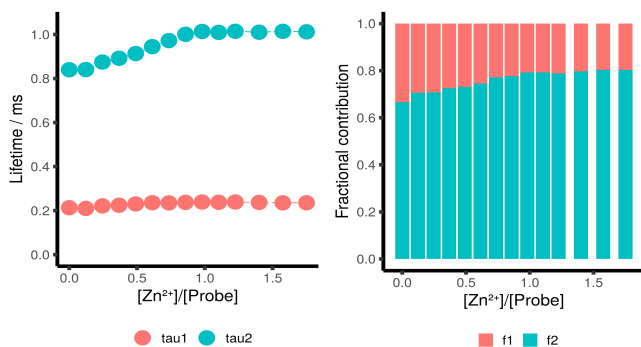
Une première manière d'améliorer notre modélisation est d'utiliser une pondération de la variance. En pondérant, on réfute l'hypothèse d'une variance constante des erreurs



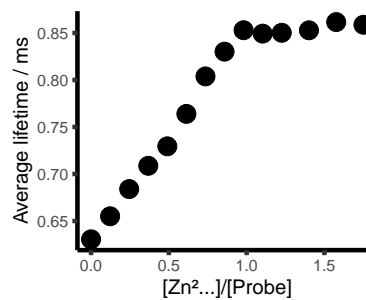
(a) Décroissance du signal de luminescence expérimentale et modélisée en mono et bi-exponentielle de la sonde $SP - Azu - TbL_1$ à 2 éq de Zn^{2+}



(b) Évolution des valeurs des temps de vies τ issus du modèle de décroissance mono-exponentielle lors du titrage par le Zn^{2+}

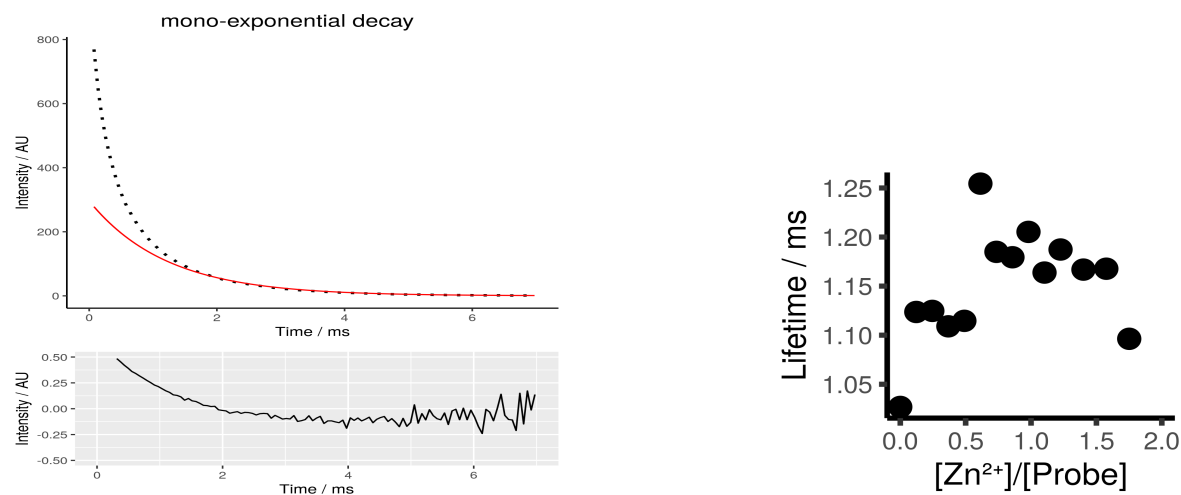


(c) Évolution des valeurs des temps de vies τ_1 et τ_2 issus du modèle de décroissance double exponentielle et des contributions fractionnelles associées lors du titrage par le Zn^{2+}



(d) Évolution des temps de vie moyen par titrage par du Zn^{2+} calculés à partir du modèle bi-exponentiel

FIGURE 2.21 – Études de la décroissance de luminescence en temps résolu (délai 50 μs) de la sonde $SP - Azu - TbL_1$ excitée à $\lambda_{ex} = 302$ nm et mesurée à $\lambda_{em} = 545$ nm



(a) Décroissance de la luminescence (ligne pointillée) et le modèle (ligne rouge) et représentation de la déviation (bas)

(b) Évolution des temps de vie

FIGURE 2.22 – Modélisation de la décroissance de luminescence de la sonde *SP – Azu – TbL₁* en temps résolu par un modèle de décroissance exponentielle à variance pondérée

afin de donner moins d'« importance » aux mesures moins précises et plus d'importance aux mesures plus précises. Autrement dit, plus de poids est donné au temps longs qui possèdent plus de points expérimentaux qu'aux temps courts qui ne sont calculés que sur très peu de points expérimentaux du début de la courbe.

Sur la figure 2.22a en ligne rouge, on peut clairement remarquer que la courbe de fit en rouge ne se superpose pas avec les premiers points de la courbe expérimentale mais le reste est très bon. La déviation est répartie autour de 0 et les valeurs de RMSE se trouvent entre 0.5 et 0.7. Il résulte de ce fit pondéré des temps de vie longs aux alentours de 1.10 ms et 1.20 ms (2.22b). On y devine une tendance croissante des valeurs de temps de vie durant la titrage par le zinc mais ces augmentations ne sont pas très régulières. Le fit pondéré n'est donc pas satisfaisant.

Encore un autre modèle de temps de vie : l'exponentielle étirée (*Stretched exponential*) Il existe un autre modèle qui prend en compte une somme d'exponentielles d'abord utilisée pour décrire la décharge des condensateurs et qui a plutôt été utilisée en matériaux [122] comportant des surfaces hétérogènes couplées à des fluorophores ou dans des micelles avec des transferts d'énergies entre différents fluorophores. Ce modèle prend en compte une distribution de vitesse et pourrait donc convenir à notre système. La distribution de vitesse provient des mouvements conformationnels permis par la flexibilité du peptide

La décroissance de luminescence est décrite alors par la relation suivante :

$$I(t) = \int_0^\infty H(k) \exp^{-kt} dk \quad (2.12)$$

avec $I(0) = 1$, $H(k)$ appelé *eigenvalue spectrum* peut être considéré comme la distribution des constantes de vitesses.

La difficulté repose sur la détermination de $H(k)$ qui est sensible aux petites variations des données. Pour pallier ce problème, $H(k)$ est approximé en considérant une distribution continue des constantes de vitesses par des fonctions de Lorentz ou Gauss.

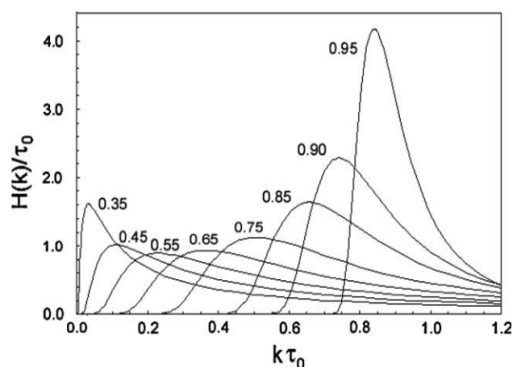
La fonction qui en découle est le modèle exponentiel étiré ou l'équation de Kohlrausch qui est de la forme :

$$I(t) = \exp(-(t/\tau_0)^\beta) \quad (2.13)$$

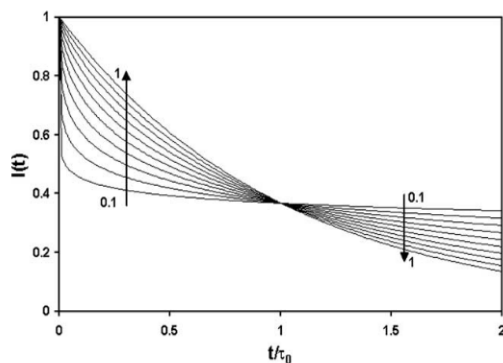
avec τ_0 le temps de vie et β qui permet d'exprimer une distribution des temps de vie tel que $0 < \beta \leq 1$ [28].

Sur la figure 2.23a, l'allure de la distribution des constantes de vitesse déterminée par $H(k)$ a été représenté. la distribution s'élargit quand β diminue.

La figure 2.23b montre le changement de l'allure de l'exponentielle en fonction du β . Le modèle étiré présente deux « régimes de vitesse » : une première qui décroît plus rapidement qu'une mono-exponentielle pour $t < \tau_0$ et une deuxième plus lente pour $t > \tau_0$. Plus β est petit, plus cette différence est marqué. Au contraire, pour $\beta = 1$, on retrouve une mono-exponentielle.



(a) Distribution des constantes de vitesse d'un modèle exponentiel étiré pour plusieurs valeurs de β



(b) Allures d'une exponentielle étirée pour plusieurs valeurs de β entre 0.1 et 1.

FIGURE 2.23 – L'exponentielle étirée ou de Kohlrausch - figure de la publication [28]

Sachant que nous avons obtenu avec la sonde présentée une décroissance de luminescence comportant un première partie rapide et une deuxième partie plus lente, il est donc très probable que nos données se modélisent mieux avec ce modèle étiré.

D'ailleurs, les travaux de M.N. Berbaran-Santos mentionnent que plusieurs valeurs empiriques de β ($< 1/2$) sont reliées à des types d'interactions dans le cas d'étude de désactivation de luminescence. Par exemple, une valeur de $\beta = 1/2$ est associée à une désactivation de luminescence par collision. Ce modèle paraît donc intéressant pour notre système basé sur la modulation du *quench* de luminescence. Toutefois, il faut pouvoir déterminer si un modèle multi-exponentiel ou un modèle exponentiel étiré est plus adapté.

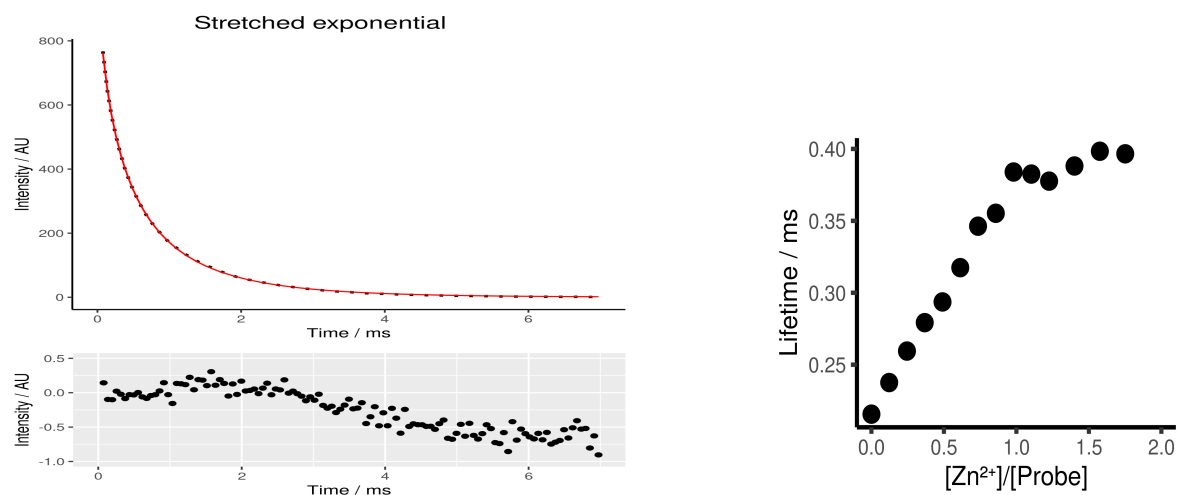
Les résultats obtenus par ce modèle sont donnés sur la figure (voir figure 2.24a). Le modèle se superpose bien visuellement avec les données expérimentales et la déviation est nettement plus restreinte qu'avec le modèle mono-exponentiel et un peu plus que le modèle double exponentiel. Le RMSE de ce modèle se situe aux alentours de 0.7 contre 0.9 pour la double exponentielle (vers 8 pour le mono-exponentiel). L'exponentielle étirée est donc un meilleur modèle pour un plus petit nombre de paramètres. Quant aux temps de vie de luminescence, ils évoluent de manière régulière et linéaire entre 0.20 ms pour la sonde libre et 0.38 ms pour la sonde liée de Zn^{2+} . Les temps de vie sont assez courts par rapport au temps de vie du complexe seul mais les temps de vie sont deux fois plus longs par rapport à ceux mesurés pour la sonde $SP - Nap - TbL_1$. Toutefois, les modèles utilisés sont différents ; donc, il n'est pas judicieux de comparer en temps de vie les différents sondes entre elles. Nous pouvons calculer le temps moyen pour ce modèle dépendant de β pour avoir une idée plus « globale » des temps de vie. Ce temps de vie moyen se calcule par l'équation suivante :

$$\langle \tau \rangle = \tau_0 \Gamma(1 + 1/\beta) \quad (2.14)$$

L'évolution des temps de vie moyen est donnée sur la figure 2.24c : $\langle \tau \rangle$ est comprise entre 0.33 et 0.55 ms soit un écart de 0.20 ms.

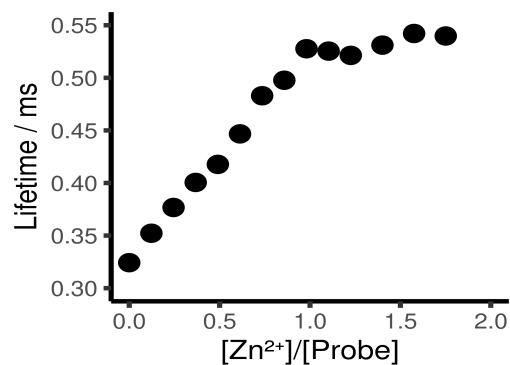
Le coefficient β se situe vers 0.6-0.65 tout au long du titrage exprimant un étalement moyen des différents temps de vie (probablement du à la flexibilité du peptide).

Pour comparer le modèle étiré avec le modèle bi-exponentiel d'une manière autre que le RMSE, nous avons appliqué le test statistique d'analyse de la variance ANOVA et le test AIC, *Aikake's an information Criterion* [123]. Le test ANOVA compare si la réduction de la déviation standard résiduel est statistiquement significative ou non. Le *p-value* était nettement supérieur à 0.05 donc l'hypothèse nulle H_0 (l'interprétation de H_0 peut se simplifier par la phrase suivante : la différence n'est pas significative) n'est pas rejetée. Le modèle de la décroissance double-exponentielle et celui de l'exponentielle étirée ne sont donc pas statistiquement différents. Le test AIC est un critère qui aide à choisir entre deux modèles en privilégiant le modèle permettant de

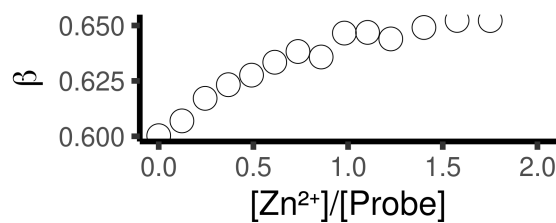


(a) Courbes de décroissance de la luminescence expérimentale et modélisé par une exponentielle décroissante Stretched et représentation de la déviation

(b) Évolution des temps de vie par un modèle de décroissance exponentielle étirée durant le titrage par Zn^{2+}



(c) Évolution des temps de vie moyens durant le titrage par Zn^{2+}



(d) Évolution des coefficients β durant le titrage par Zn^{2+}

FIGURE 2.24 – Modélisation de la décroissance de luminescence de la sonde $SP - Azu - TbL_1$ en temps résolu par un modèle exponentiel étiré

décrire au mieux les données avec le plus petit nombre de paramètres possible. Le modèle ayant le plus petit AIC est choisi. Pour obtenir le test AIC, les courbes ont été modélisées sur le logiciel R puis la fonction AIC a été appliquée dont la formule est :

$$AIC = 2K - 2\ln(L) \quad (2.15)$$

avec K le nombre de variables indépendantes utilisées ($K > 2$) et L l'estimation de la vraisemblance en log (*log-likelihood*).

Dans notre cas, le modèle étiré gagne toujours un plus petit score que le modèle bi-exponentiel. Donc, le modèle étiré est meilleur que le modèle bi-exponentiel avec moins de paramètres d'après le critère AIC.

Ce que nous pouvons en déduire de ces critères (visuel, RMSE, AIC) est qu'il n'est pas faux de choisir l'un ou l'autre modèle. Cependant, si le modèle de décroissance bi-exponentielle était choisi, il nous serait difficile d'interpréter à ce stade la réalité derrière l'existence de deux temps de vie bien distincts. Le modèle étiré permet d'uniformiser en un seul temps de vie et d'avoir un critère bien distinct β pour appréhender notre système très mouvant. Mais de la même manière, il faudrait avoir la possibilité d'interpréter correctement les valeurs de β . Quand β augmente et s'approche de 1, nous savons que la dispersion des temps de vie devient plus restreinte. Cette dispersion peut être due à de multiples facteurs géométriques et/ou énergétiques. Toutefois, l'augmentation du facteur β avec l'ajout de zinc est cohérent avec la rigidification de la structure du peptide. Donc l'utilisation du modèle de l'exponentielle étirée semble cohérent avec notre système.

Pour résumer l'ensemble, nous écartons un modèle mono-exponentiel pour modéliser nos données. Le calcul pondéré privilégie seulement les temps longs mais on exclut la possibilité d'utiliser également le modèle pondéré au vue des mauvaises valeurs calculées (fig. 2.22a). Pour finir, le modèle de décroissance double-exponentielle et le modèle de l'exponentielle étirée semblent équivalent pour modéliser les données.

Face à la difficulté de représenter justement le temps de vie, nous accompagnerons toujours les résultats du modèle de décroissance multi-exponentielle, plus commun dans la littérature, avec les résultats du modèle exponentiel étiré. Dans notre cas, nous préférons tout de même ce dernier modèle qui permet de travailler avec qu'un seul temps de vie et un coefficient β qui aide à appréhender la dispersion des valeurs.

Rendement quantique Le rendement quantique de la sonde a été mesuré à 1.9% pour la sonde libre et à 2.9% pour la sonde liée au zinc. Nous avons espéré un meilleur rendement quantique que la sonde *SP-Nap-TbL₁* mais il demeure faible. Cependant,

en multipliant par le coefficient d'extinction molaire à 302 nm, on obtient une brillance de $1300 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

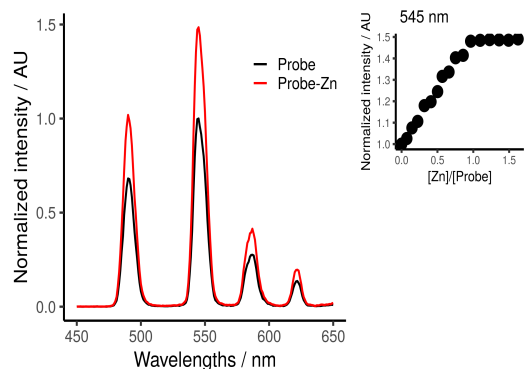
Condition d'anaérobie

Les propriétés spectroscopiques de la sonde $SP - Azu - TbL_1$ ont été mesurées en condition d'anaérobie; la solution a été préparée en boîte à gant à $10 \mu\text{M}$ dans du tampon HEPES 10mM pH 7.4 avec du TCEP ($250 \mu\text{M}$) et les ajouts successives de Zn^{2+} ont été effectuées en boîte à gant également (voir figure 2.25a). Dans ces conditions, l'intensité de luminescence du Tb^{3+} augmente de 1.5 fois de manière similaire lors de la titration par le Zn^{2+} par rapport aux résultats précédents. Ceci est une première indication que la sonde n'est sûrement pas sensible au dioxygène. Le modèle de fit appliqué a également été un modèle en décroissance double-exponentielle pour calculer un τ_1 et un τ_2 (voir figure 2.25b). Le temps court τ_1 est similaire au τ_1 de la sonde exposée au dioxygène. Le temps long τ_2 l'est également sauf qu'il s'arrête à 0.90 ms à 1 éq de zinc (contre 1.0 ms pour la sonde en condition aérée). On retrouve une différence sur l'évolution de temps de vie moyen issu du modèle bi-exponentiel (fig 2.25c) qui augmente de 0.71 à 0.81 ms (contre 0.63 et 0.85 ms en condition aérée).

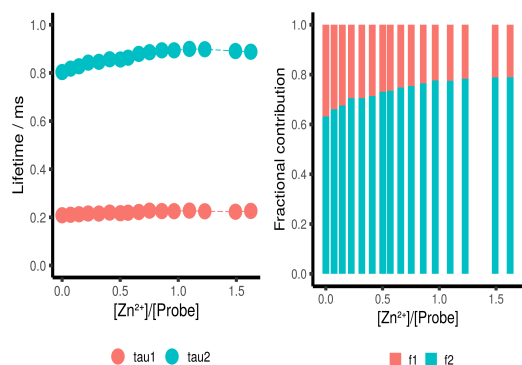
Une différence de $100 \mu\text{s}$ est observée entre les mesures en condition aérée et en anaérobie mais ce n'est pas aussi radical que ce que nous avons observé avec la sonde naphthalène. D'autres paramètres autre que l'influence du dioxygène pourraient expliquer la différence.

Avec le modèle étiré, l'évolution du temps de vie moyen en anaérobie (voir fig. 2.25d) débute à 0.30 ms et augmente jusqu'à 0.47 ms (contre 0.33 et 0.55 ms en condition aérée). Le coefficient β se situe entre 0.6 - 0.66 mettant en évidence des temps de vie modérément « étalés ». Les temps de vie en modèle étiré sont donc également un peu plus courts mais l'écart relatif est identique à 23% entre ces deux conditions.

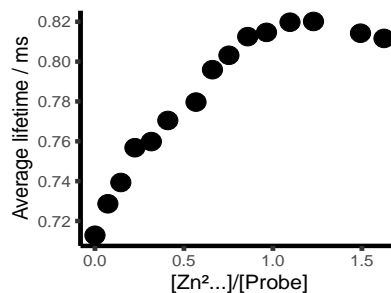
Les différences sont peut-être dues au conditionnement des données : les mesures ont été effectuées à des périodes différentes avec une solution de tampon HEPES et de zinc différentes des premières mesures. Il faudra travailler un peu plus sur la méthodologie pour une bonne reproductibilité des expérimentations mais, lors des travaux, j'ai choisi d'étudier le comportement global. Donc, que ce soit le modèle bi-exponentiel ou étiré appliqué, nous avons conclu avec prudence que la sonde $SP - Azu - TbL_1$ conserve des propriétés similaires en conditions aérées et non-aérées. Il faudrait faire une gamme de concentration d'oxygène pour déterminer à partir de quelle concentration de dioxygène la sonde subit ces effets. Cela n'a pas pu être envisagé n'ayant pas de sonde à oxygène.



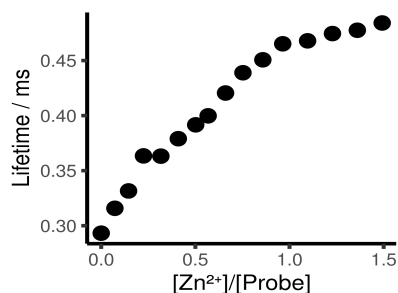
(a) Luminescence à 545 nm de la sonde $SP - azu - L_1^{Tb}$ titrée par le Zn^{2+}



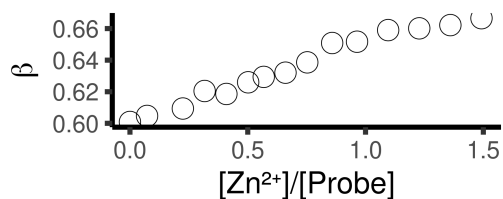
(b) Évolution du temps de vie durant la titrage par Zn^{2+} modélisé par une double exponentielle décroissante et sa contribution fractionnelle associée



(c) Évolution des temps de vie moyen par titrage par Zn^{2+} calculés à partir du modèle bi-exponentiel



(d) Évolution du temps de vie moyen durant la titrage par le Zn^{2+} modélisé par une exponentielle décroissante étiré



(e) Évolution du coefficient β durant le titrage par le Zn^{2+}

FIGURE 2.25 – Luminescence en temps résolu du terbium et temps de vie de la sonde $SP - Azu - TbL_1$ à 10 μM , HEPES 10mM, pH 7.4, TCEP 250 μM , titrée par le Zn^{2+} en boîte à gant sans dioxygène

2.2.4 Caractérisation de la sonde : affinité et sélectivité

Comme pour la sonde $SP-Nap-TbL_1$, la constante d'association K_a a été mesurée par mesure en compétition avec l'EGTA. La valeur de K_a a ainsi été déterminée à $10^{10.3}$, compris dans l'ordre de grandeur de la concentration du zinc libre cellulaire, entre 10^{-11} et 10^{-9} M. Donc notre sonde est adaptée à l'utilisation *in cellulo*. La sélectivité par rapport à d'autres cations a été effectuée comme pour la sonde naphthalène. Cependant, l'émission du terbium n'était pas stable, elle augmentait même sans ajout de zinc. Ayant peu de produit, les expérimentations n'ont pas pu être refaites.

2.2.5 Modification de la position du complexe pour la sonde $SP-Azu-TbL_1$ II

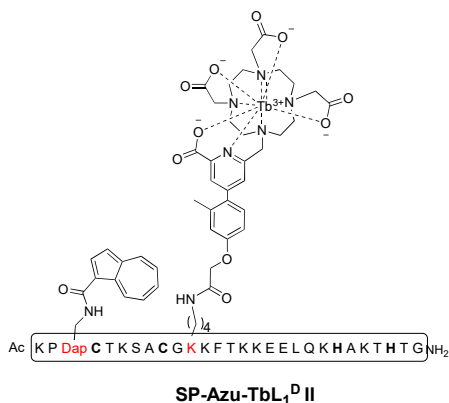
En s'inspirant des résultats pour la sonde $SP-Nap-TbL_1-II$, la sonde $SP-Azu-TbL_1-II$ a été synthétisée en modifiant également la position du complexe de terbium, dans l'optique d'agrandir l'écart en intensité de luminescence et en temps de vie entre la sonde libre et la sonde liée. Les résultats spectroscopiques sont présentés sur la fig. 2.26.

L'augmentation de luminescence après ajout de Zn^{2+} est de 1.4 fois sa valeur initiale (peu différente de la première sonde $SP-azu-TbL_1$). Quant aux temps de vie de luminescence, la décroissance de luminescence a été modélisée par un modèle bi-exponentiel et un modèle exponentiel étiré. Les tests d'AIC et χ^2 donnent de meilleurs résultats pour le modèle bi-exponentiel mais les deux résultats sont donnés sur la figure 2.26.

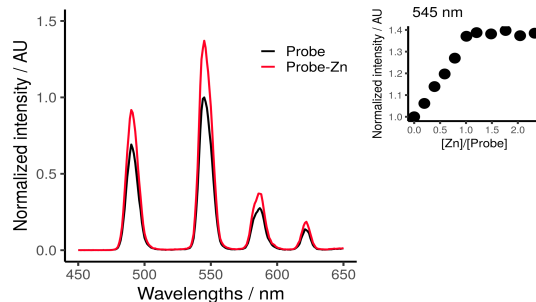
Pour ce composé II, les temps de vie moyen du modèle bi-exponentiel varient entre 0.85 et 1.15 ms soit un écart absolue de 0.30 ms (contre 0.63 et 0.85 ms pour la sonde I soit un écart de 0.22 ms) et les temps de vie moyen en étiré varient entre 0.55 et 0.75 ms soit un écart de 0.20 ms (contre 0.33 et 0.53 ms pour la sonde I) avec des valeurs de β comprises entre 0.67 et 0.69 (contre 0.6 et 0.65 pour la sonde I). On remarque par ailleurs de nouveau deux pentes différentes dans l'évolution des temps de vie.

Nous avons pu obtenir de plus longs temps de vie en modifiant la position du complexe; en revanche, il n'a pas été possible d'agrandir significativement l'écart maximum pour mieux discriminer les temps de vie de la sonde libre et liée. En modifiant la position du complexe, on en déduit que l'efficacité de l'échange est moins efficace que ce soit pour la sonde liée ou la sonde libre. Néanmoins, nous savons que ces deux positions sont disponibles sur la séquence pour permettre une responsivité au zinc.

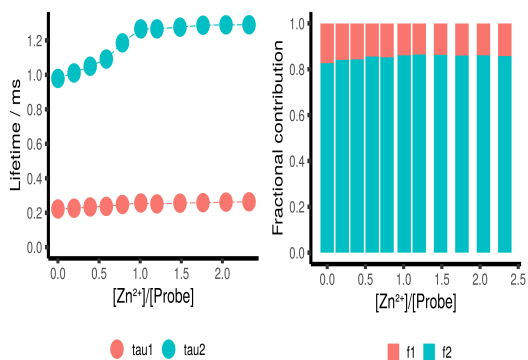
La tendance est quelque peu similaire avec $SP-Nap-TbL_1-II$: la distance entre les deux entités est peut-être rallongée pour la sonde II. Cependant, étant donné que l'on conserve le même écart absolu de temps de vie, la différence de distance entre



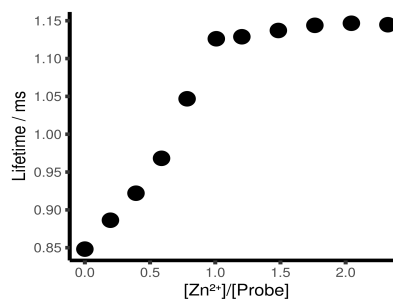
(a) schéma de *SP – Azu – TbL₁ – II*



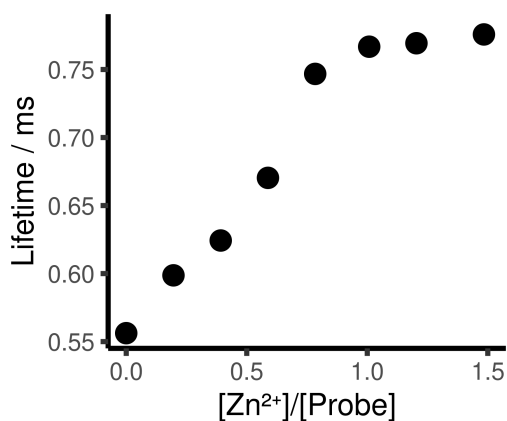
(b) Émission en temps résolution de la sonde libre (ligne noir) et liée (ligne rouge) (fente 10-5, PM 700 V) et évolution de l'intensité de luminescence lors du titrage par le Zn^{2+} mesurée à 545 nm



(c) Évolution du temps de vie durant le titrage par Zn^{2+} modélisé par une double exponentielle décroissante et sa contribution fractionnelle associée



(d) Évolution des temps de vie moyen durant le titrage par Zn^{2+} calculés à partir du modèle bi-exponentiel



(e) Évolution du temps de vie modélisé par un modèle exponentiel étiré

FIGURE 2.26 – Mesures spectroscopiques de la sonde *SP – Azu – TbL₁ – II*

la conformation libre et lié semble peu changée.

2.2.6 Discussion

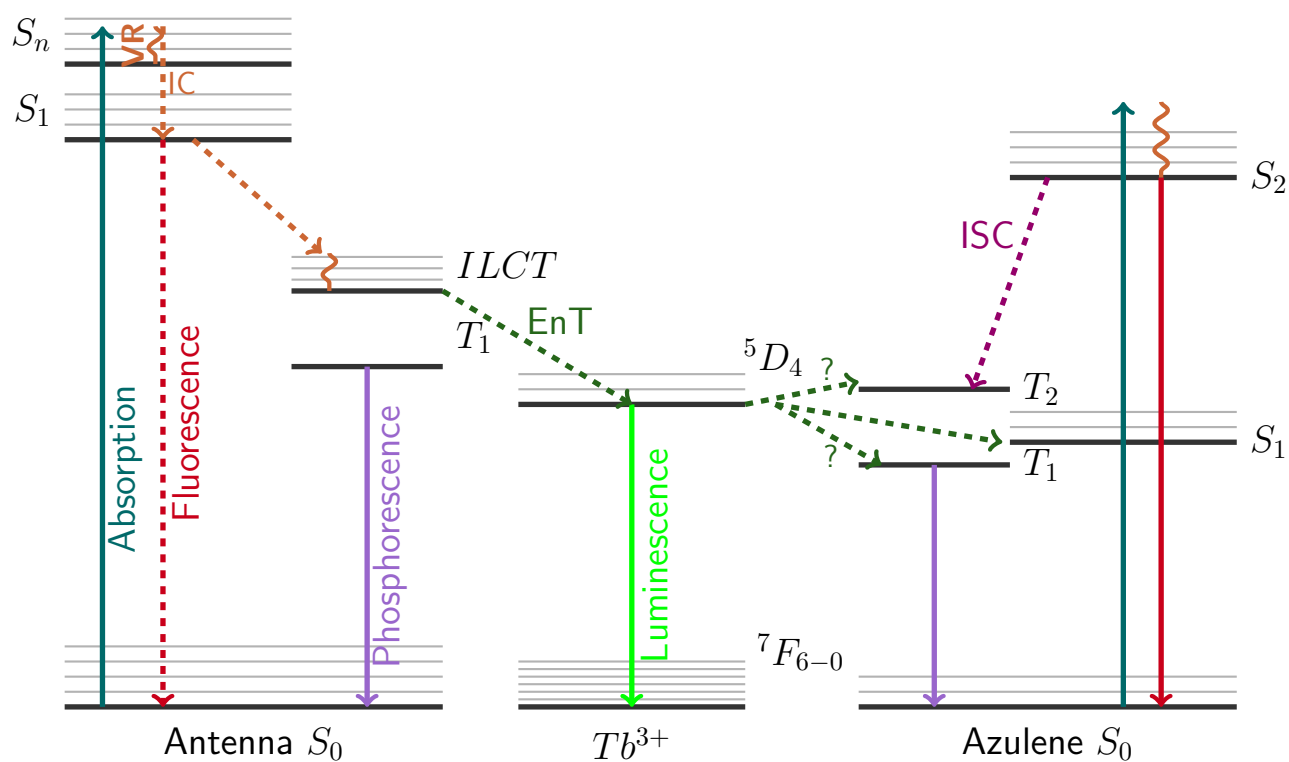
La sonde $SP - Azu - TbL_1$ est « responsive » au zinc par une modification de sa luminescence et de son temps de vie. La réponse en temps de vie moyen augmente linéairement à chaque ajout de Zn^{2+} . Cette réponse est améliorée par rapport à la sonde précédente $SP - Nap - TbL_1$ qui était très « quenchée » avec des temps de vie de 0.09 ms à 0.16 ms (en modèle mono-exponentiel). D'ailleurs, les données de la décroissance de luminescence de la sonde $SP - Nap - TbL_1$ ne se modélisaient pas par un modèle de type étiré nous obligeant à conserver le modèle mono-exponentiel. Cette nouvelle sonde a permis d'obtenir des temps de vie plus longs et un écart absolu plus grand que la sonde naphthalène (0.22 ms contre 0.10 ms).

Concernant la sensibilité au dioxygène, les mesures en boîte à gant en l'absence de dioxygène ont montré que la sonde présentait des résultats similaires qu'en condition aérée et restait sensible à la coordination de Zn^{2+} . La voie de désexcitation ne passe probablement pas par un phénomène de désactivation par le dioxygène d'un niveau triplet du fluorophore contrairement à la sonde naphthalène mais les mesures restent à être affinées.

La responsivité de notre sonde peut passer par plusieurs voies différentes. Un schéma des différents voies sont représentées sur le diagramme de Jablonski fig.2.27. Le lanthanide peut résonner avec l'azulène par le niveau S_1 . Même si l'effet du dioxygène n'a pas été explicite, on ne peut pas encore tout à fait exclure le passage par T_1 ou T_2 . Enfin, un transfert retour (BT) vers l'antenne est également possible. Le niveau 5D_4 de Tb^{3+} est situé à $20\,400\text{ cm}^{-1}$ et est proche du niveau donneur de l'antenne à $25\,000\text{ cm}^{-1}$ et de son niveau triplet. En passant par ce triplet de l'antenne, il est possible d'imaginer un autre transfert de triplet à triplet de l'azulène mais les autres désactivations peuvent être plus rapides que la vitesse de l'ISC vers le triplet. Ces multiples chemins complexifient le comportement de la sonde.

Le repliement du peptide et le changement de distance entre les acteurs des transferts résonnants peuvent modifier l'efficacité et les vitesses de transferts et de désactivations radiatives ou non-radiatives.

Pour le moment, nous travaillons avec le complexe très luminescent TbL_1 mais à l'avenir il sera plus judicieux de travailler avec des sondes comportant un complexe d'euporium (émission dans la fenêtre de détection biologique). Il apparaît donc intéressant d'essayer de remplacer le terbium de notre sonde par de l'euporium car on sait que le ligand L_1 sensibilise également l' Eu^{3+} . La synthèse de la sonde $Sp - Azu - EuL_1$ n'est pas longue car il suffit de métaller le fragment C-terminal par de l'Euporium et de le lier par NCL au fragment N-terminal azulène déjà disponible.



Legend

- IC Internal Conversion, non radiative transition.
- EnT Energy Transfer, non radiative transition.
- ISC InterSystem Crossing, $S_i \rightarrow T_j$ non radiative transition.
- RV Vibrational Relaxation.

FIGURE 2.27 – Diagramme de Jablonski de la sonde $SP - Azu - TbL_1$ ((template par Germain Salvato-Vallverdu))

Nous vérifierons en même temps si la combinaison avec l'azulène permet toujours d'obtenir une sonde « responsive » au zinc. D'ailleurs, si l'on utilise l'euprium, les niveaux donneurs 5D_1 et 5D_0 , respectivement à $19\,000\text{ cm}^{-1}$ et $17\,250\text{ cm}^{-1}$, sont trop éloignés du niveau excité de l'antenne à $22\,500\text{ cm}^{-1}$ pour permettre un BT et repeupler ce niveau. En supprimant ce BT, nous pourrions obtenir un meilleur rendement quantique.

2.2.7 SP – Azu – EuL₁

La nouvelle sonde *SP – Azu – EuL₁* a alors été synthétisée et étudiée dans les conditions identiques à la sonde *SP – Azu – TbL₁*. Ses données spectroscopiques sont présentées sur la figure 2.29 à la page 117.

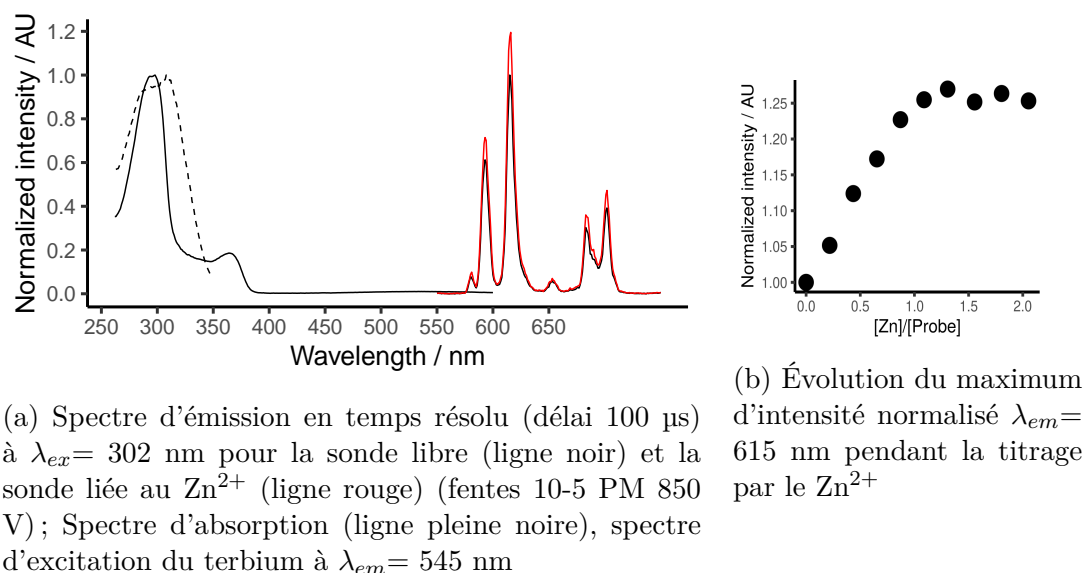
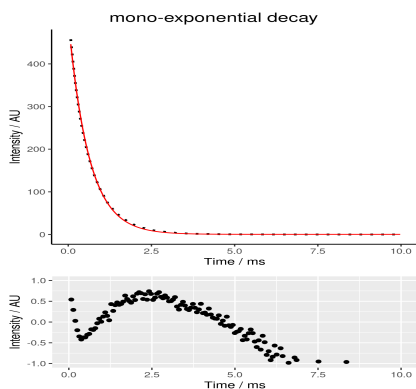


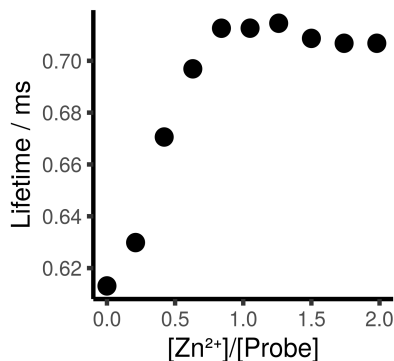
FIGURE 2.28 – Mesures spectroscopiques de la sonde *SP – Azu – EuL₁*

La sonde *SP – Azu – EuL₁* est également une sonde « responsive » au zinc avec une augmentation modeste de la luminescence de 1.2 fois sa valeur initiale mesurée à 615 nm (fig. 2.28a) et une augmentation de son temps de vie en fonction de l'ajout de Zn^{2+} . Le modèle de décroissance mono-exponentielle s'ajuste aux données de manière visuelle. La déviation est peu dispersée autour de zéro bien qu'elle ne soit pas aléatoirement distribuée (fig.2.29a). Les valeurs de RMSE sont faible autour de 1.5 au. On obtient des valeurs autour de 0.61 et 0.71 µs (fig.2.29b).

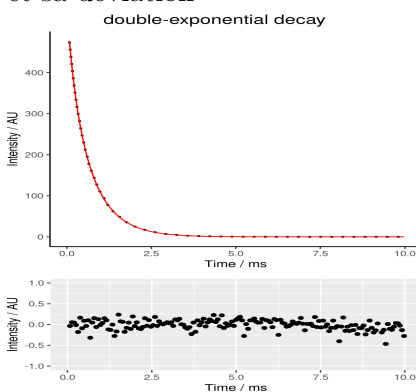
Le modèle double exponentiel modélise parfaitement les données expérimentales (fig.2.29c) et la déviation est très proche de zéro et aléatoirement distribuée. Le temps court τ_1 est à 0.23 ms et diminue à 0.13 ms tandis que le temps long commence à 0.66 ms et augmente jusqu'à 0.76 ms. Les contributions fractionnelles montrent clairement une dominance du temps long τ_2 à 95%. En passant sur les temps moyens, on retrouve des



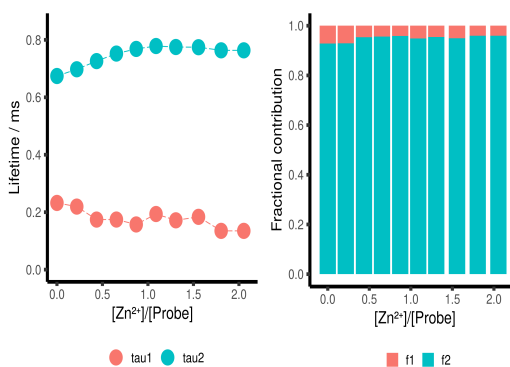
(a) Décroissance de la luminescence de l'Eu³⁺ modélisée par un modèle de décroissance mono-exponentielle et sa déviation



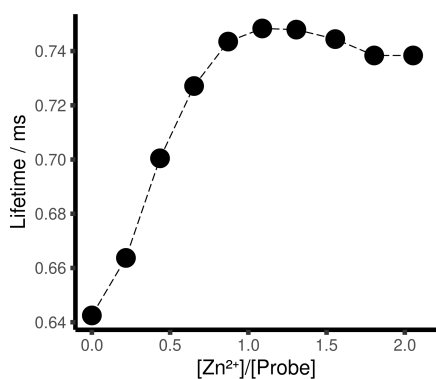
(b) Évolution du temps de vie issu du modèle mono-exponentiel lors du titrage par le Zn²⁺



(c) Décroissance de la luminescence de l'Eu³⁺ modélisée par un modèle de décroissance double-exponentielle et sa déviation

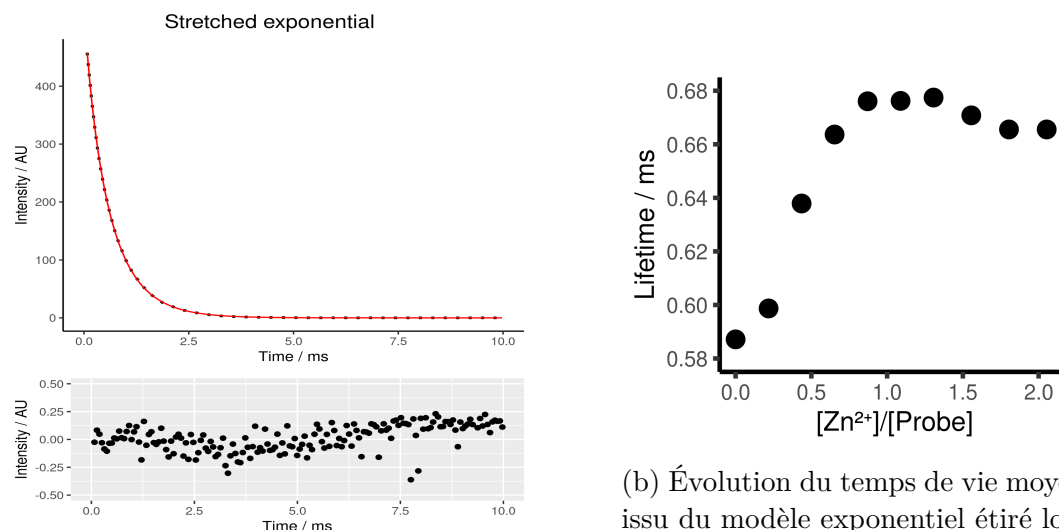


(d) Evolution du temps de vie issu du modèle bi-exponentiel lors de la titrage par le Zn²⁺ et sa contribution fractionnelle associée



(e) Évolution du temps de vie moyen lors de la titrage par le Zn²⁺

FIGURE 2.29 – Mesures spectroscopiques de la sonde *SP – Azu – EuL₁* et présentation de deux modèles de la décroissance de luminescence : décroissance mono, double exponentielle



(a) Décroissance de la luminescence de l'Eu³⁺ modélisée par un modèle de décroissance exponentielle étirée et sa déviation

(b) Évolution du temps de vie moyen issu du modèle exponentiel étiré lors de la titrage par le Zn²⁺ par modèle exponentiel étiré

FIGURE 2.30 – Mesures spectroscopiques de la sonde $SP - Azu - EuL_1$ et modélisation par une décroissance exponentielle étirée

valeurs proches du modèle en mono-exponentiel (fig.2.29e). Ce modèle est visuellement bien meilleur que le mono-exponentiel, est significativement différent par test ANOVA et la valeur d'AIC est également inférieure (environ 1400 vs 200).

Enfin, les données ont été modélisées avec le modèle exponentiel étiré pour pouvoir comparer avec les résultats précédents mais il n'est pas différent significativement du modèle double exponentielle. Les temps de vie moyens augmentent de 0.58 à 0.67 ms (fig. 2.30b).

La responsivité est conservée avec cette sonde $SP - Azu - EuL_1$: il est donc possible d'utiliser l'azulène en association avec l'euporium. De plus, étant donné qu'il n'y pas de possibilité d'un transfert retour du lanthanide à l'antenne lorsque l'on utilise l'euporium, la désactivation passe donc forcément par résonance avec l'azulène.

Dans l'ensemble, le rapport du temps de vie de la sonde $SP - AZU - EuL_1$ sur le temps de vie du complexe seule EuL_1 est supérieur au rapport entre le temps de vie de $SP - AZU - TbL_1$ sur celui de TbL_1 , respectivement environ 62% ($\frac{0.68}{1.10}$) et 37% ($\frac{0.820}{2.20}$) (avec zinc). Cela signifie que l'efficacité de transfert d'énergie est moins efficace avec l'euporium. Une explication éventuelle est possible par le modèle FRET. L'absorbance du S_1 de l'azulène recouvre l'émission du terbium et une partie de l'émission de l'euporium.

Théoriquement un FRET est possible (voir partie 1.5.2) : il y a un recouvrement de l'absorbance de la transition $S_0 \rightarrow S_1$ de l'azulène-CONH et des spectres d'émission du Tb^{3+} et de l' Eu^{3+} (voir fig. 2.31). Le recouvrement spectral n'est toutefois pas optimal car le coefficient d'extinction molaire de l'azulène vers 550 nm n'est que d'environ 450

$\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. En revanche, le rendement quantique de TbL_1 est de 62% contre 6.4% pour EuL_1 . Donc l'efficacité de transfert est forcément inférieure avec EuL_1 .

En calculant le recouvrement de l'émission du donneur et l'absorption de l'accepteur, le rayon de Förster de $SP - Azu - \text{TbL}_1$ a été déterminé à 25.8 Å et le rayon de Förster de $SP - Azu - \text{EuL}_1$ a été déterminé à 20.8 Å. Pour rappel, le rayon de Förster R_0 est la distance pour laquelle l'efficacité du transfert est de 50%. $SP - Azu - \text{EuL}_1$ nécessite donc une plus petite distance D-A par rapport à son analogue terbium pour avoir au minimum 50% de transfert d'énergie.

Si on calcule les distances D-A pour $SP - Azu - \text{TbL}_1$ selon le modèle FRET en utilisant les temps moyens issus du modèle bi-exponentiel, les distances D-A sont estimées entre 21.8 Å pour la sonde libre et 23.6 Å pour la sonde liée correspondant à une efficacité de respectivement 73% et 63%. Les distances sont inférieures à rayon de Förster. Pour $SP - Azu - \text{EuL}_1$, la distance D-A a été estimée à 22.8 Å pour la sonde libre et 24.7 Å pour la sonde liée (en utilisant les temps de vie moyen du modèle bi-exponentiel), respectivement d'efficacité de transfert d'énergie de 36% et 26%. Les efficacités de transfert d'énergie de $SP - Azu - \text{EuL}_1$ sont donc bien inférieures à celles de $SP - Azu - \text{TbL}_1$. D'ailleurs, on remarque que l'efficacité de transfert diminue avec la sonde liée au zinc ce qui explique l'augmentation des temps de vie de luminescence et on remarque également que l'écart de distance entre la sonde libre et la sonde liée sont similaires pour les deux sondes à environ 1.8 Å ce qui peut suggérer que les formes libres et liées sont similaires. Cependant, la taille du peptide doigt de zinc est d'une longueur d'environ 25 Å. Il semble donc curieux d'obtenir une distance D-A de la forme liée au zinc proche de 25 Å. Il y a un doute sur la capacité du modèle FRET à refléter le comportement de notre sonde donc ces calculs sont à interpréter avec précaution.

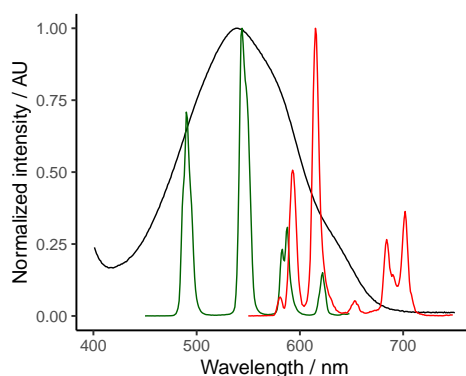


FIGURE 2.31 – Recouvrement de l'absorbance de la transition $S_0 \rightarrow S_1$ de l'azulène-CONH (ligne noire) et des spectres d'émission du Tb^{3+} (ligne verte) et de l' Eu^{3+} (ligne rouge)

| Name | τ / ms | R_0 / Å | r_{DA} / Å | E |
|-----------------------------|-------------|-----------|--------------|-----|
| SP-Azu-TbL ₁ -Zn | 0.82 | 25.8 | 23.6 | 63% |
| SP-Azu-EuL ₁ -Zn | 0.74 | 20.8 | 24.7 | 26% |
| TbL ₁ | 2.30 | - | - | - |
| EuL ₁ | 1.10 | - | - | - |

TABLE 2.1 – Valeurs calculées selon le modèle FRET de la distance entre le donneur et l’accepteur r_{DA} et de l’efficacité de transfert E à partir du rayon de Förster R_0 et des temps de vie moyen (modèle bi-exponentiel)

2.2.8 Conclusion

L’azulène n’est pas un fluorophore commun et a un comportement complexe. Les résultats spectroscopiques de la sonde sont très encourageants et s’annoncent déjà comme une première étape d’amélioration par rapport à la sonde naphthalène grâce à ces temps de vie environ deux fois plus élevés. Cependant, le rendement quantique reste faible en partie due à l’absorption d’une grande partie des photons d’excitation par l’azulène, en défaveur de l’excitation de lanthanide. Une voie possible de modification est alors de trouver un fluorophore qui n’absorbe moins ou pas dans la zone des longueurs d’excitation de l’antenne.

L’acquisition des temps de vie par un spectromètre en temps résolu donne des données parfois variables : avec le même composé et dans les mêmes conditions d’analyses, les résultats de la modélisation peuvent diverger. Ceci est dû par l’analyse de temps de vie qui est par nature mal préparée (dépendance entre le problème numérique et l’expérience) pouvant provenir des artefacts provenant de la lumière pulsée, du bruit résiduel, du calcul mathématique du modèle en lui-même... Ceci est tout un pan de travail mathématique.

2.2.9 Sonde à base d’Eu³⁺ : SP-Azu-EuL₂

Comme il a été mentionné précédemment, une amélioration des sondes actuelles est de passer en sonde à base d’euporium plus adaptée pour la microscopie cellulaire. Le principe de sonde avec TbL₁ étant vérifié, nous avons souhaité transposer le système avec les sondes euporium en passant par l’antenne alcyne arylique L_2^D . L’antenne alcyne aryle L_2 permet l’excitation efficace de l’euporium et absorbe aux alentours de 335 nm avec un coefficient d’absorption molaire de 25 000 M⁻¹cm⁻¹. L’azulène absorbe peu dans cette région avec un coefficient d’absorption molaire vers 5 000 M⁻¹cm⁻¹. L’excitation à 335 nm de EuL₂ devient plus intéressante que l’excitation à 305 nm pour TbL₁. De plus, EuL₂ permet une excitation bi-photonique à des longueurs d’ondes supérieures à 750 nm, plus adaptée à la microscopie cellulaire.

La sonde $SP - Azu - EuL_2$ devrait conserver ses propriétés « responsives »

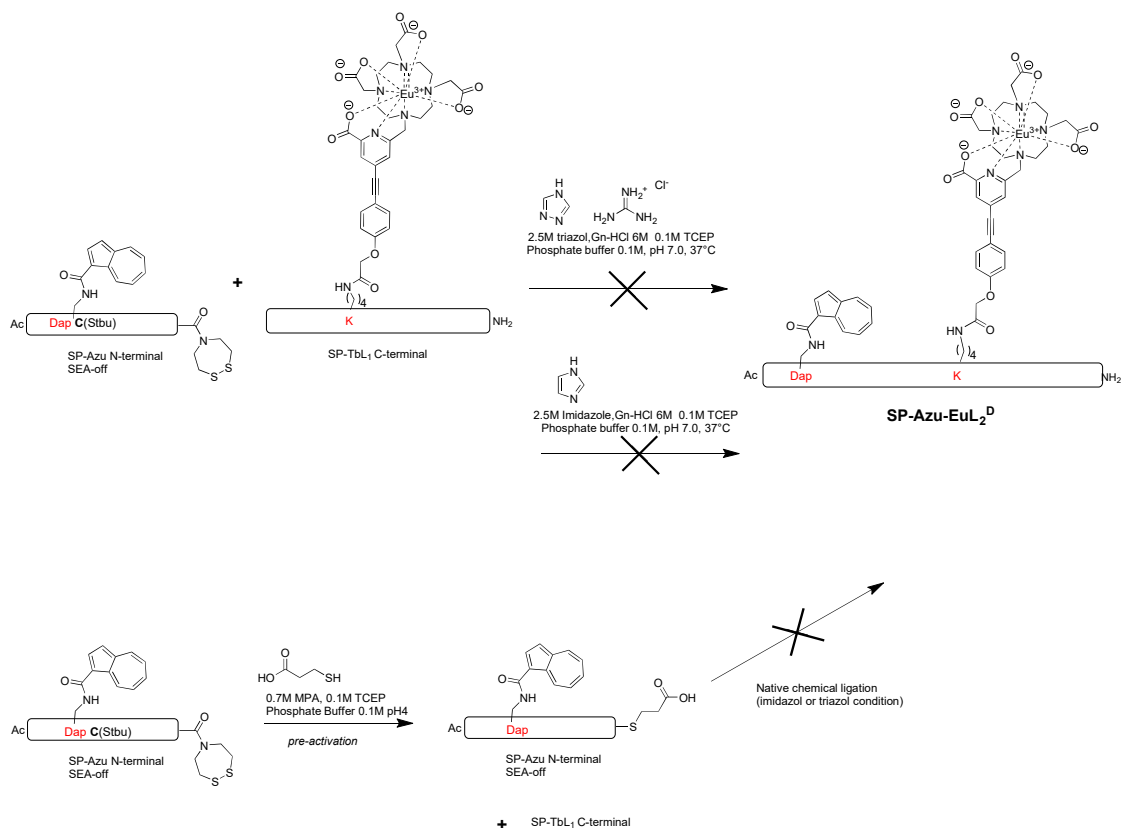


FIGURE 2.32 – Schéma des différentes conditions de ligations natives tentées entre le fragment SP-Azu-N-terminal et le fragment SP-EuL₂-C-terminal

comme nous avons pu le vérifier entre l'azulène et EuL₁. Nous avons ainsi tenté de synthétiser cette nouvelle sonde. Le principe de synthèse est le même que pour les sondes précédentes.

Synthèse Le peptide C-ter est synthétisé et couplé avec le ligand L₂, puis il est métallé avec de l'EuCl₃. Il est ligué au peptide N-ter comportant l'azulène par NCL dans les conditions : Triazole 2.5M, Gn_nHCl 6M, TCEP/HCl, Tampon phosphate pH 7.0 à 37°C pendant 16h. Ces conditions ont été définies par des travaux précédents dans l'équipe du laboratoire [26]. Le MPAA n'est pas utilisé mais remplacé par le triazole car le MPAA s'additionne sur la triple liaison de l'antenne.

À cette étape, nous n'avons pas pu observer de ligation entre les deux fragments de peptides par LCMS et même après 5 jours de réaction (le fragment C-ter commence à se détériorer également). Le fragment N-ter perd -86 en MS qui correspond à la perte du -StBu, groupe protecteur de la cystéine par réduction par le TCEP et réduction du groupe SEA en *off*. La NCL a été testée également avec de l'imidazole en remplacement du triazole mais sans meilleur résultat (voir fig.2.32).

Une autre tentative de NCL a été testée en activant au préalable le fragment

N-terminal par le MPA (3-mercaptopropionic acid). Le fragment N-ter avec le groupement SEA_{off} est mis en présence de MPA, TCEP HCl dans du tampon Phosphate en boîte à gant à 37°C pour 24h. La réaction est arrêtée par 10% TFA puis l'excès de MPA est extrait par de l'éther diéthylique. Cependant, même en activant au préalable au MPA, la ligation NCL n'était pas concluante que ce soit en présence de triazole ou imidazole bien que nous ayons pu détecté un pic minime en MS qui correspond au peptide complet ligué avec +249 de masse en plus (total de 4333 m/z au lieu de 4083). Cette masse supplémentaire peut correspondre à la masse du TCEP. Une addition du TCEP a pu peut-être se faire sur la triple liaison de l'antenne EuL_2 .

La ligation entre le fragment N-ter (en terminal SEA et MPA) et le fragment C-ter sans complexe se fait en revanche sans problème. Il y a donc bien un problème avec notre complexe d'euprium EuL_2 . Une hypothèse est que la cystéine terminale du fragment C-ter n'est plus disponible pour la ligation native. La cystéine possède une fonction thiol qui a pu s'additionner sur la triple liaison de l'antenne comme aurait pu le faire le MPAA qui possède également une fonction thiol. En MS, il n'est pas possible de voir cette différence.

Un test DTNB a été réalisé pour vérifier si des thiols sont libres ou non. Si libres, l'ajout de DTNB colore la solution en orange mesurable en absorbance.

Principe du test DTNB Le test DTNB utilise le réactif d'Ellman, 5,5'-dithio-bis-[acide 2-nitrobenzoïque] ou DTNB, et sert à doser les groupes thiols. La réaction entre le thiol et le DTNB donne deux produits : le disulfide avec le TNB (2-nitro-5-thiobenzoïque) et le dianion TNB^{2-} dont on mesure l'absorbance à 412 nm pour un ϵ valant 14 150 L mol⁻¹ cm⁻¹ [124][125].

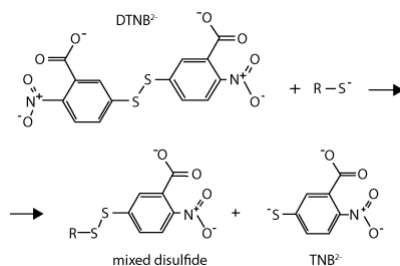


FIGURE 2.33 – Réaction entre un thiol libre et le DTNB - figure du site [29]

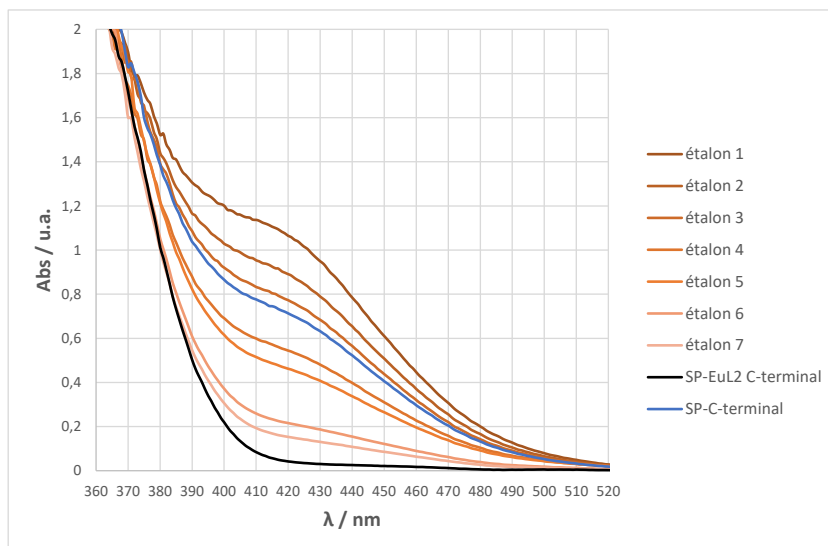
Pour plus de précision, plusieurs étalons avec différentes concentrations de cystéines ont été préparés pour établir une courbe d'étalonnage reliant la concentration et l'absorbance à 412 nm. Les peptides étudiés sont le $SP - EuL_2 - C - terminal$ et $SP - C - terminal$ sans complexe. Les mesures ont été faites en boîte à gant pour éviter une éventuelle oxydation des thiols. Si, selon nos hypothèses, la cystéine n'est pas libre,

alors nous devrions pas mesurer d'absorbance à 412 nm pour *SP-EuL₂-C-terminal* contrairement à *SP-C-terminal* qui joue ici un rôle de contrôle positif. Les absorbance des étalons et des peptides (*SP-EuL₂-C-terminal* en noir et *SP-C-terminal* en bleu clair) ont été mesurées et présentées sur la figure 2.34a et la courbe d'étalonnage associée est présentée sur la figure 2.34b.

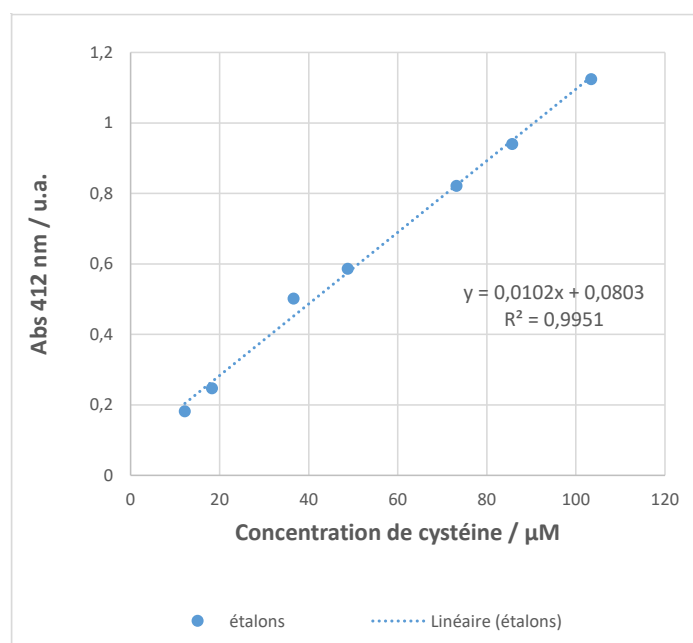
On observe que *SP-EuL₂-C-terminal* ne présente effectivement pas d'absorbance à 412 nm, il n'y a donc pas de thiol libre sur ce peptide. La cystéine n'est donc pas libre.

En réalité, il était envisagé de développer plusieurs sondes à zinc avec le complexe *EuL₂*. Ces tentatives de synthétiser la sonde *SP-Azu-EuL₂* ont démontré que le principe NCL n'était pas compatible avec les ligands *L₂*.

À la suite de ces résultats, nous avons choisis de travailler sur le développement d'autres ligands sensibilisant Eu^{3+} compatible avec la chimie peptidique (voir partie 4.1.2). Dans la partie suivante, nous présenterons un derniers cas d'étude de sonde à zinc à base du complexe *TbL₁* en association avec un autre fluorophore.



(a) Absorbance des étalons et absorbance des échantillons contenant le peptide *SP* – *EuL₂*-Nterminal et *SP*-N-terminal sans complexe



(b) Courbe d'étalonnage de l'absorbance à 412 nm en fonction de la concentration de cystéine des étalons

FIGURE 2.34 – Dosage au DTNB pour mesurer la présence de thiol libre du peptide *SP* – *EuL₂*-C-terminal

2.3 Étude de de la sonde SP–NBD–TbL₁

2.3.1 Présentation

Nous souhaitons développer dans cette partie une nouvelle sonde « responsive » au zinc avec un principe FRET. Cette nouvelle sonde que nous allons décrire ici possède le même complexe TbL₁ que les autres sondes présentées précédemment mais elle diffère par son *quencher* : le fluorophore NBD.

La molécule 4-chloro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole ou NBD-Cl, qui est commerciale, n'est pas fluorescente. Elle gagne des propriétés fluorescentes par substitution électrophile aromatique avec une amine aliphatique (fig. 2.35) ou un thiol. La molécule 4-amino-nitrobenzofurazane (NBD) est fluorescente et notamment connue pour être sensible à son environnement. Elle possède à la fois un donneur (l'amine ou le thiol) et un accepteur d'électron (le groupe nitro). Cette distribution de charge distincte augmente le moment dipolaire de la molécule excitée et permet un transfert de charge intra-moléculaire (ICT) [126] [127]. Cet état ICT explique pourquoi la molécule est solvatochromique. Plus précisément, le NBD a une plus forte intensité de fluorescence dans des solvants organiques apolaires que dans de l'eau et le maximum d'émission se décale vers de plus hautes longueurs d'onde avec la polarité du solvant. Le spectre d'absorption du NBD possède une bande large de transfert de charge vers 400-550 nm qui se superpose au pic d'émission du Tb³⁺ de la transition $^5D_4 \rightarrow ^7F_6$ (fig.2.36). Plus le recouvrement est important, plus le transfert est efficace.

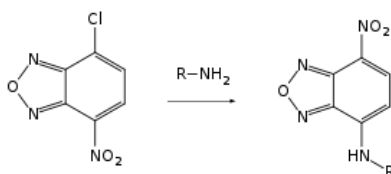


FIGURE 2.35 – 4-chloro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole

2.3.2 Synthèse

La synthèse par ligation native chimique de la sonde SP – NBD – TbL₁ est similaire à la synthèse de la sonde azulène (fig.2.37). Le fragment N-ter était déjà disponible au laboratoire (synthétisé par L. Raibault) : l'antenne NBD est introduite par substitution nucléophile aromatique du chlore du NBD-Cl

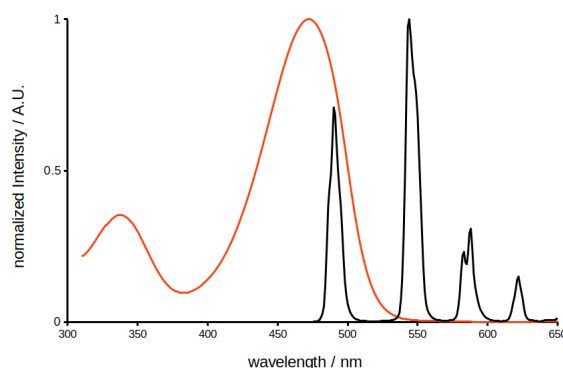


FIGURE 2.36 – Spectre d'émission du Tb^{3+} (ligne noire) et spectre d'absorption du NBD-NHR (ligne rouge)

(4-chloro-7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazole) par l'amine de la chaîne latérale de l'acide aminé $H_2N-Dap-OH$ [128]. La séquence est donc différente des sondes précédentes à cause de la présence de l'acide glutamique E. Il faudra garder en mémoire cette différence lors de la comparaison des résultats entre les différentes sondes. Pendant la ligation native entre le fragment N-terminal et C-terminal, le TCEP a été remplacé par du DTT car il a été remarqué une dégradation du NBD en présence de TCEP. La sonde est également purifiée par HPLC préparative.

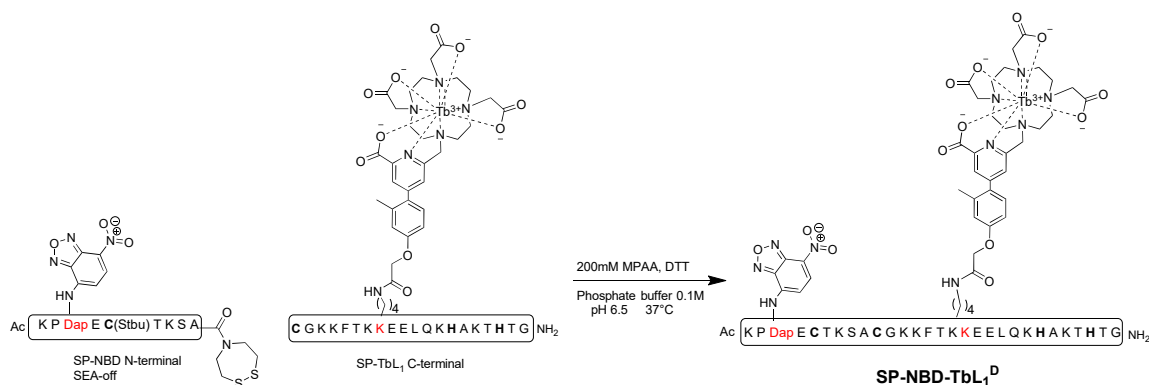


FIGURE 2.37 – Schéma de synthèse de la sonde à zinc $SP-NBD-TbL_1^D$

2.3.3 Résultat de l'étude spectroscopique

Spectre d'absorption Le spectre d'absorption de la sonde $SP-NBD-TbL_1$ présente l'absorption caractéristique du complexe TbL_1 (ligne pointillée) vers 300 nm avec un épaulement en plus vers 350 nm qui correspond à l'absorption caractéristique du NBD avec un maximum local d'absorption vers 350 nm et un autre maximum vers 490 nm (voir ligne pleine sur la figure 2.39a à la page 128).

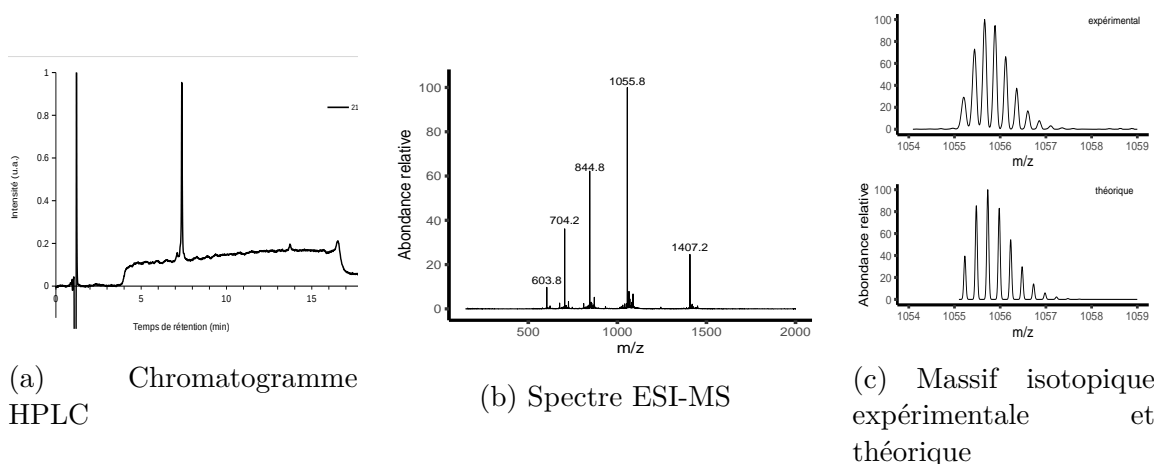
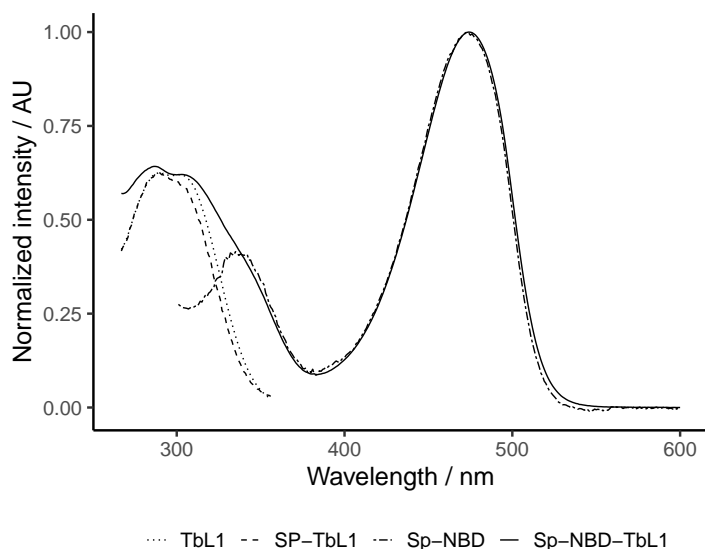


FIGURE 2.38 – Caractérisation de la sonde $SP - NBD - TbL_1$. Masse calculée : 1407.3 $[M+3H]^{3+}$, 1055.7 $[M+4H]^{4+}$, 844.8 $[M+5H]^{5+}$, 704.2 $[M+6H]^{6+}$ pour $M=C_{176}H_{272}N_{52}O_{55}S_2Tb$

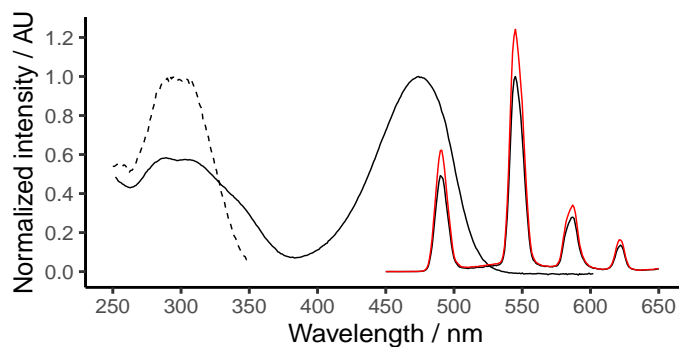
Spectre d'émission Le spectre d'émission du terbium a été mesuré en temps résolu entre 400 et 650 nm en excitant à 302 nm au maximum d'absorption de l'antenne L_1 (fig.2.39b). On retrouve l'émission caractéristique du terbium. De même pour les sondes présentées précédemment, l'émission du terbium a été suivie lors du titrage par le Zn^{2+} . Une augmentation de 1.25 fois a été mesurée entre la sonde libre et la sonde liée au Zn^{2+} (fig.2.39c). La sonde $SP - NBD - TbL_1$ est donc également « responsive » en luminescence au zinc et forme un complexe 1 :1.

FRET Entre 400 nm et 650 nm sur le spectre d'émission en temps résolu, on observe que la ligne de base n'est pas totalement horizontale. L'émission sous-jacente est l'émission du NBD avec un maximum d'émission vers 540 nm. L'émission totale de la figure 2.39d permet de mieux observer la fluorescence du NBD superposée à l'émission du terbium.

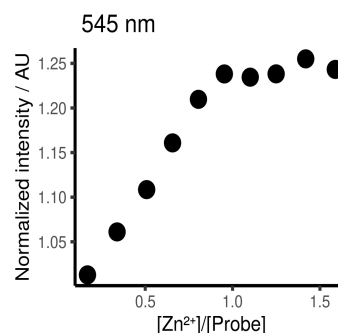
Sachant que le temps de vie d'émission du NBD est très court (ns) comme beaucoup de fluorophore organique classique, ce spectre d'émission en temps résolu nous indique que la fluorescence du NBD acquiert un temps de vie assez long pour être mesurable en temps résolu. Cette observation ne peut être permise seulement s'il y a un transfert d'énergie du terbium vers le NBD. Il est probable que nous ayons affaire à un phénomène FRET entre le donneur Tb^{3+} et l'accepteur NBD comme prévu. Le rayon de Förster a été calculé à 35 Å, grâce à l'équation 1.27 (p.11) en prenant la valeur de 62% pour le rendement quantique du donneur seul TbL_1 . Nous pourrions mesurer les distances séparant le donneur de l'accepteur pour la sonde libre et liée grâce aux mesures des temps de vie.



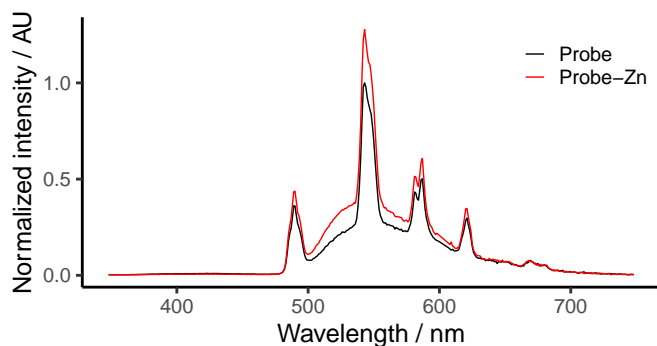
(a) Comparaison des absorbances du complexe TbL_1 (ligne pointillée), du complexe conjugué sur peptide SP (tirets), de SP-NBD (points tirets) et de la sonde SP-NBD- TbL_1 (ligne pleine)



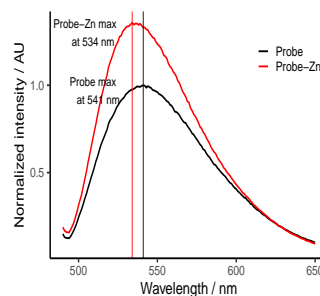
(b) Spectre d'émission en temps résolu (délai 100 μs) à $\lambda_{ex} = 302$ nm pour la sonde libre (ligne noire) et la sonde liée au Zn^{2+} (ligne rouge) (fentes 10-2.5 PM 750 V); Spectre d'absorption (ligne pleine noire), spectre d'excitation du terbium à $\lambda_{em} = 545$ nm



(c) Évolution du maximum d'intensité normalisé $\lambda_{em} = 545$ nm pendant la titrage par le Zn^{2+}



(d) Émission totale de la sonde libre (ligne noire) et liée au Zn^{2+} (ligne rouge)



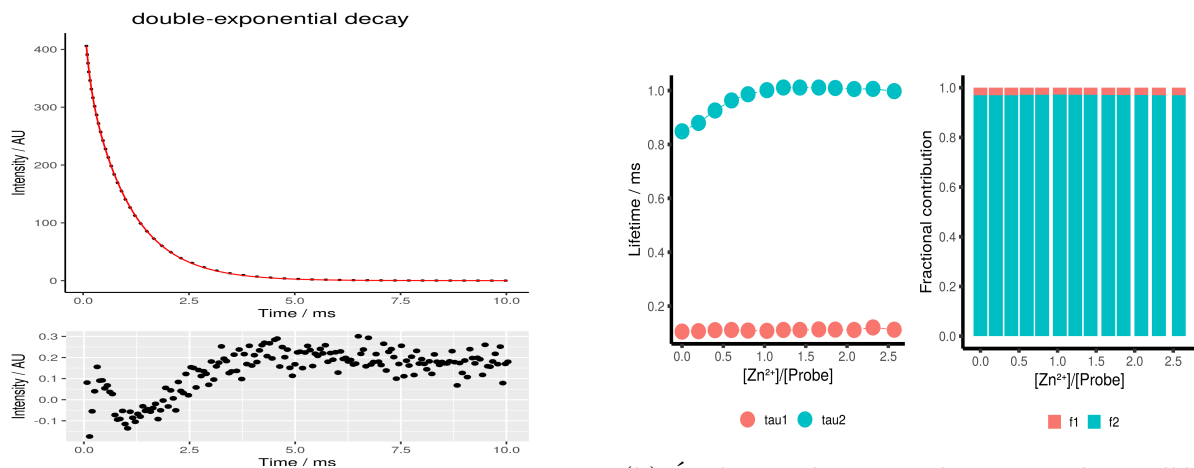
(e) Spectre d'émission de fluorescence à $\lambda_{ex} = 475$ nm pour la sonde libre (ligne noire) et la sonde lié (ligne rouge) en lampe pulsée

FIGURE 2.39 – Mesures spectroscopiques de la sonde $SP - NBD - TbL_1$

Temps de vie Le temps de vie a été calculé grâce à une modélisation de la décroissance de luminescence sur le temps par une décroissance double exponentielle (la modélisation en décroissance mono-exponentielle n'étant pas adaptée) à $\lambda_{em} = 545$ nm. Les RMSE sont petits (vers 0.4) indiquant une bonne adéquation du modèle aux données expérimentales. Deux temps de vies ont pu être mis en évidence avec un temps court τ_1 et un temps long τ_2 (fig.2.40b). Le temps court τ_1 reste aux alentours de 0.11 ms durant la totalité du titrage par le Zn^{2+} . Le temps long τ_2 vaut 0.85 ms pour la sonde libre et augmente graduellement à 1.00 ms pour 1 éq. de Zn^{2+} lié et reste stable en ajoutant un excès de Zn^{2+} . Le calcul du temps de vie moyen donne des temps de vie débutant à 0.83 ms et augmentant jusqu'à 0.99 ms soit un écart absolu de 0.16 ms (fig.2.40c). Cet écart est similaire à ceux obtenus avec les sondes précédentes. Concernant la contribution fractionnelle de chacun des temps de vie, le temps long est largement majoritaire à 98% et le temps court τ_1 , très minoritaire. Nous avons essayé de mesurer les temps de vie à 490 nm correspondant au pic de transition $^5D_4 - ^7F_6$ et 520 nm qui se situe entre les transitions 7F_6 et 7F_5 mais qui mesurerait la fluorescence issue du NBD. Nous n'avons pas vu de grande différence lorsque la luminescence est mesurée à 490 nm. En revanche, en mesurant à 520 nm, les contributions fractionnelles du temps court augmentent à 30%. Les temps courts pourraient peut-être correspondre au temps de vie du NBD.

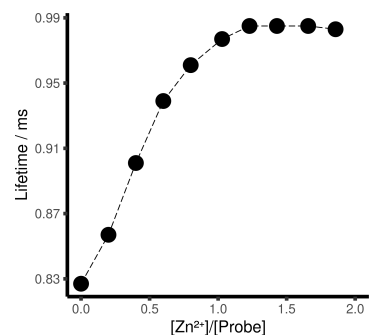
Modèle FRET Selon les temps de vie moyens du modèle bi-exponentiel, la distance r entre le donneur et l'accepteur pour la sonde libre a été calculée à 32.1Å et 33.7 Å pour la sonde liée soit une efficacité de transfert de respectivement 64% et 57%. Or, un doigt de zinc mesure environ 25Å qui correspondrait à une efficacité de transfert de 88%. Il y a donc une incompatibilité entre les mesures expérimentales et la théorie Förster. Ce dernier n'est donc pas applicable à notre système très résonnant. Ainsi, il y a bien un transfert d'énergie vers le NBD mais le modèle FRET ne peut pas décrire à lui seul le fonctionnement du système. Ce résultat est un autre indice indiquant que nous avons affaire à un système résonnant par multiples états; il peut par exemple y avoir, en plus d'un transfert du Tb^{3+} vers le NBD, un transfert passant par le CT de l'antenne vers le NBD (S_1 ou T_1).

Temps de vie par un modèle mono-exponentiel à variance pondérée Ayant un temps long largement majoritaire avec le modèle précédent, il est possible de négliger le temps court en appliquant le modèle de décroissance mono-exponentielle à variance pondéré sur $1/y^2$. En appliquant une pondération, la courbe du modèle (ligne rouge) se juxtapose convenablement avec les données expérimentales (ligne pointillée) comme montrée sur la figure 2.40d, sauf les premiers points, ce qui est attendu. La sonde libre a un temps de vie de 0.88 ms et augmente graduellement jusqu'à 1.06

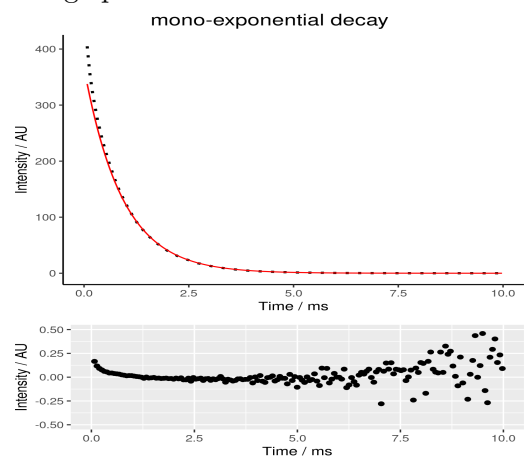


(a) Décroissance de la luminescence terbium modélisée par un modèle de décroissance double-exponentielle et sa déviation

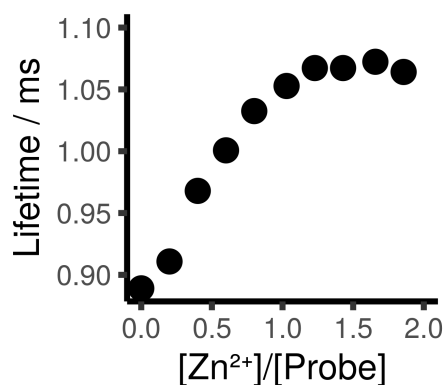
(b) Évolution du temps de vie issu du modèle bi-exponentiel lors du titrage par le Zn^{2+} et sa contribution fractionnelle associée



(c) Évolution du temps de vie moyen lors du titrage par le Zn^{2+}

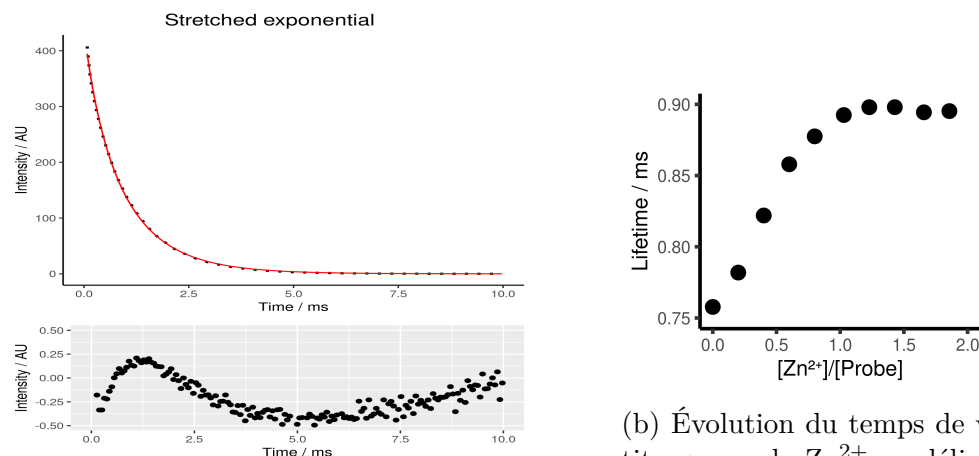


(d) Décroissance de la luminescence modélisée par un modèle de décroissance mono-exponentielle à variance pondérée en $1/y^2$ et sa déviation



(e) Évolution du temps de vie lors du titrage par le Zn^{2+} modélisée par un modèle de décroissance mono-exponentielle à variance pondérée

FIGURE 2.40 – Décroissance de luminescence excitée à $\lambda_{ex}=302$ nm et mesurée à $\lambda_{em}=545$ nm, délai de $50\mu s$ et modélisation par décroissance exponentielle bi-exponentielle et exponentielle pondérée pour la sonde $SP - NBD - TbL_1$



(a) Décroissance de la luminescence modélisée par un modèle de décroissance exponentielle étirée et sa déviation

(b) Évolution du temps de vie moyen lors du titrage par le Zn^{2+} modélisée par un modèle de décroissance exponentielle étirée

FIGURE 2.41 – Décroissance de luminescence excitée à $\lambda_{ex}=302$ nm et mesurée à $\lambda_{em}=545$ nm, délai de $50\mu s$ et modélisation par un modèle exponentiel étiré pour la sonde $SP - NBD - TbL_1$

ms pour la sonde liée au zinc (voir fig. 2.40e) soit un écart absolu de 0.18 ms. Les temps de vie longs sont privilégiés avec ce modèle et on retrouve les valeurs similaires au τ_2 issus du modèle bi-exponentiel. Les RMSE sont proches de 0.1 montrant que le modèle est en adéquation avec les données. Le test statistique χ^2 pour comparer le modèle pondéré et le bi-exponentiel affirme que la différence entre les deux modèles n'est pas différente significativement.

Temps de vie par modèle exponentiel étiré Avec le modèle étiré (fig.2.41a), les valeurs de RMSE sont plus élevées qu'avec le modèle pondéré et bi-exponentiel mais restent comprises entre 1 et 1.4. Le test statistique met en évidence que le modèle exponentiel étiré est significativement différent du modèle bi-exponentiel et le critères d'AIC donne des valeurs plus élevées. Le modèle bi-exponentiel reste donc meilleur que le modèle étiré pour cette sonde. Les valeurs de temps de vie moyen sont quand même données sur la figure 2.41b : ils débutent à 0.76 ms et augmente graduellement jusqu'à 0.89 ms soit un écart absolu de 0.13 ms et les coefficients β oscillent entre 0.88 et 0.87. Ces derniers sont plus élevés que pour la sonde azulène ; les temps de vie sont moins dispersés et ceux-ci confirment qu'il y un temps de vie nettement majoritaire.

Choix du modèle Pour la sonde $SP - NBD - TbL_1$, nous avons tenté de modéliser par trois modèles différents : le modèle double-exponentiel, mono-exponentiel pondéré et étiré. Le modèle mono-exponentiel à variance pondéré est le plus adapté à ce système. Choisir des modèles différents pour chacune de nos sondes n'est pas un

mauvais choix en lui-même car il est mieux de trouver le modèle le plus représentatif à chaque système ; mais il est vrai que cela rend la comparaison plus difficile. Le modèle pondéré est le meilleur mais nous pouvons utiliser le modèle double exponentiel qui a été utilisé pour les sondes précédentes pour comparer les valeurs de temps de vie moyen.

Rendement quantique Le rendement quantique de la sonde a été mesuré à 6.5% pour la sonde libre et augmente à 7.6% pour la sonde liée. Cette sonde $SP - NBD - TbL_1$ a le meilleur rendement quantique parmi les trois sondes synthétisées mais reste faible par rapport au rendement quantique du complexe de lanthanide initial (61%). Le NBD absorbe également dans la même région que l'antenne ; le problème est similaire à la sonde $SP - Azu - TbL_1$. Le coefficient d'absorption molaire du NBD à 302 nm est de $5700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ et celle de l'antenne est de $12\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. On peut ainsi calculer une bonne brillance de $1150 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ pour la sonde libre et 1345 pour la sonde liée.

Émission de fluorescence La fluorescence a été mesurée sur lampe pulsée pour observer seulement la fluorescence du NBD excité à 475 nm. On observe que le maximum de fluorescence se déplace de 541 nm vers 534 nm avec la coordination du zinc (2.39e). Le NBD est connu comme étant un fluorophore sensible à son environnement chimique proche. Cet effet hypsochrome peut suggérer que l'environnement proche du NBD devient moins polaire. D'ailleurs, l'intensité de fluorescence augmente également en accord avec les propriétés particulières du NBD. Le NBD est peut-être plus orienté vers la poche hydrophobe du doigt de zinc lorsque le peptide est replié. Lorsque le peptide est libre, le NBD est alors dans un environnement plus en contact avec le solvant. L'éloignement avec le complexe a également aussi pour effet de diminuer les processus de désactivations par transfert retour.

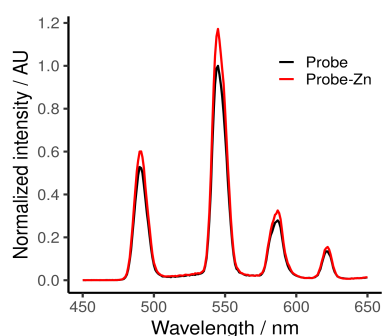
Condition d'anaérobie

La sonde a été étudiée en solution dégazée tout comme les sondes précédentes. Les résultats sont présentées sur la figure 2.42. L'intensité de luminescence du Tb^{3+} (fig.2.42a) augmente de 1.2 fois sa valeur initiale (similaire à l'étude en condition aérée).

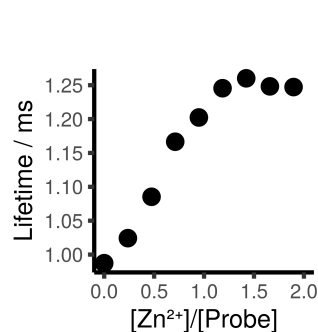
En revanche, il semble y avoir une influence du dioxygène sur la réponse en temps de vie de la sonde. Les temps de vie sont supérieurs à ceux mesurés en condition aérée. Les temps de vie issus du modèle exponentiel pondéré (fig.2.42b) sont compris entre 0.99 et 1.23 ms (contre 0.89 et 1.06 en condition aéré). De même, pour les temps de vie moyens (bi-exponentiel) : le temps de vie débute à 1.03 ms et augmente linéairement

jusqu'à environ 1.28 ms (contre 0.83 ms et 0.98 ms en condition aérée). L'écart absolue entre le temps de vie moyen de la sonde libre et liée augmente : 0.25 ms (contre 0.15 ms en condition aérée).

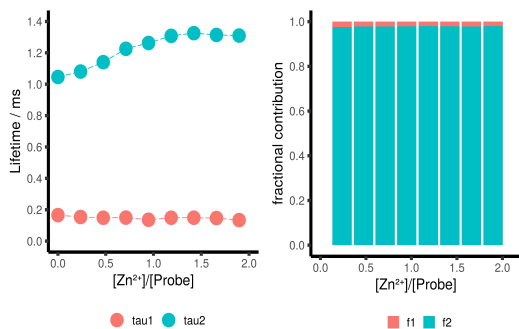
L'effet du dioxygène est léger mais existe : l'absence de dioxygène enlèverait une voie de désexcitation non-radiative permettant d'obtenir de plus long temps de vie. Cette voie de désexcitation est peut-être un passage par un état triplet du NBD (ce qui contribue au fait que le modèle Förster n'est pas bon). Nous n'avons pas vérifié la formation d'oxygène singulet.



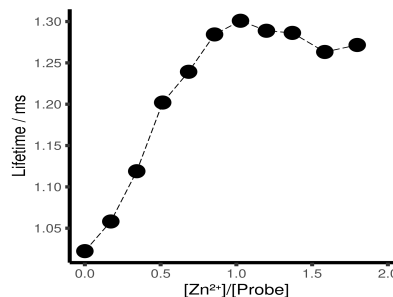
(a) Émission en temps résolution de la sonde libre (ligne noire) et liée (ligne rouge) et évolution de l'intensité de luminescence lors du titrage par le Zn^{2+} mesurée à 545 nm (fente 10-5 PM 700 V)



(b) Évolution du temps de vie lors du titrage par le Zn^{2+} modélisée par un modèle de décroissance mono-exponentielle à variance pondérée



(c) Évolution du temps de vie modélisé par modèle bi-exponentiel excitée à $\lambda_{ex}=302$ nm et mesurée à $\lambda_{em}=545$ nm



(d) Évolution du temps de vie moyens excitée à $\lambda_{ex}=302$ nm et mesurée à $\lambda_{em}=545$ nm

FIGURE 2.42 – Mesures spectroscopiques de la sonde $SP-NBD-TbL_1$ sans présence de dioxygène

2.3.4 Caractérisation de la sonde

De même que pour les sondes précédents, la constante d'association K_a a été mesurée grâce à un titrage en compétition avec l'EGTA. La sonde possède une constante d'association adaptée à l'utilisation *in cellulo* avec un $\log(K_a)$ de 10.4 ± 0.2 .

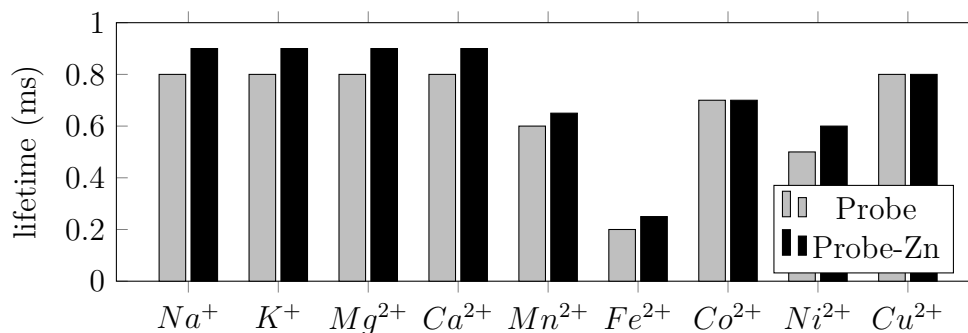


FIGURE 2.43 – Mesures des temps de vie de luminescence de la sonde $SP-NBD-TbL_1$ en présence de cations avant et après ajout de 2 équivalents de zinc

La sélectivité par rapport à d'autres cations (alcalins, alcalino-terreux et métalliques) a été vérifiée. En mesurant les temps de vie (moyens issus du bi-exponentiel), le temps de vie de la sonde augmente avec l'ajout de zinc de manière similaire aux résultats précédents avec une différence d'environ 0.13 ms entre le temps de vie de la sonde libre (avec cations) et de la sonde liée au zinc. La sonde reste donc « responsive » en présence de cations alcalins et alcalino-terreux. Elle est donc adaptée à une utilisation *in cellulo*. Cependant, ce n'est moins le cas avec les cations métalliques manganèse, fer, cobalt, nickel et cuivre (fig. 2.43). Pour rappel, ces derniers cations ne sont pas sous forme libre dans la cellule donc ne gêneraient pas l'utilisation de la sonde. Toutefois, ces mesures demandent à être refaites pour confirmation.

2.3.5 Modification de la position du complexe

Avec la sonde azulène, en modifiant la position du complexe et le rapprochant spatialement du *quencher*, nous avons conservé les propriétés « responsives » et obtenu une sonde avec des temps de vie plus longs dans l'ensemble. Afin de vérifier si nous obtenons des résultats similaires avec la sonde NBD, nous avons déplacé le complexe TbL_1 à la même position que pour les sondes précédentes.

Cette sonde $SP-NBD-TbL_1-II$ présente une augmentation de l'intensité de luminescence similaire à la première sonde $SP-NBD-TbL_1$, montrée sur le spectre d'émission en temps résolu (fig. 2.44a). Cependant, le rendement quantique est légèrement inférieur et a été mesuré à 4% pour la sonde libre et 6% pour la sonde liée.

Quant à la décroissance de la luminescence, elles ont été modélisées par un modèle de décroissance bi-exponentielle (fig. 2.44b). Le temps de vie court τ_1 reste vers 40 μs et le temps de vie long τ_2 augmente de 0.80 ms à seulement 0.88 ms ; la variation est très faible. On peut mieux suivre le titrage par le Zn^{2+} avec les résultats des contributions fractionnelles. La contribution de τ_2 est au départ de 95% puis diminue graduellement

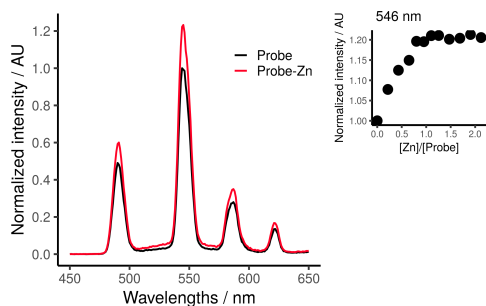
jusqu'à 69% sans complètement stagner après 1 éq de zinc ajouté. La contribution du temps court augmente au cours du titrage. Le chemin de désexcitation non-radiative induisant le temps court devient plus favorisé au cours du titrage. Ainsi, le temps moyen diminue également au cours de la titrage (fig.2.44c) de 0.75 ms à 0.60 ms. Les données ne se modélisaient moins bien avec le modèle exponentiel étiré mais les résultats sont similaires aux temps moyens du bi-exponentiel : le temps de vie diminue entre 0.70 et 0.50 ms sans parvenir à un plateau et le coefficient β diminuait également de 0.90 à 0.60. La diminution du coefficient β au cours du titrage pourrait illustrer une déstabilisation du repliement du doigt de zinc donnant une plus grande dispersion des temps de vie. Cette deuxième position pour le complexe semble, en fin de compte, être une position qui déstabilise le doigt de zinc.

De ce résultats, nous en déduisons que la sonde II n'est pas seulement modifiée par le repliement du au zinc mais d'autres paramètres semblent intervenir empêchant une réponse linéaire entre le temps de vie et la concentration de zinc comme par exemple les liaisons hydrogènes.

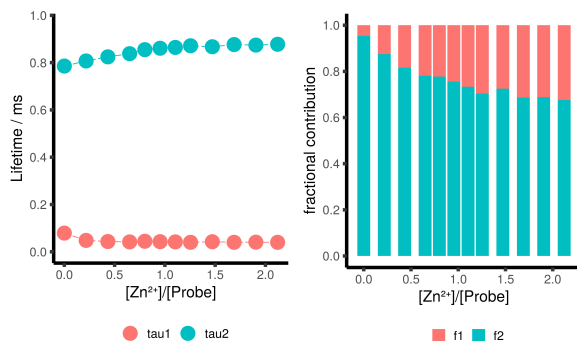
Cette sonde $SP - NBD - TbL_1 - II$ ne reproduit pas les même résultats que la sonde $SP - Azu - TbL_1 - II$. Ici, le déplacement du complexe n'apporte pas d'amélioration.

2.3.6 Discussion

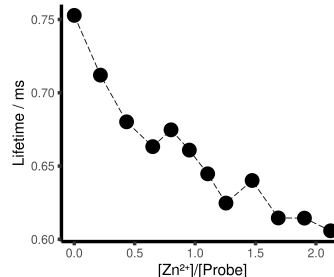
Le nouveau système obtenu reste un système assez « quenché » par rapport au complexe seul mais il répond au zinc en temps de vie de luminescence. On a observé également une augmentation de l'intensité de luminescence mais la différence reste très modeste ; on ne peut donc pas en faire une sonde intensiométrique. En revanche, nous avons obtenu une sonde répondante en temps de vie au zinc(II) : le temps de vie augmente lors du titrage confirmant une diminution des transferts d'énergie entre les deux acteurs pour la sonde liée par rapport à la sonde libre. Nous avons également observé l'émission du NBD en temps résolu indiquant un transfert d'énergie entre le complexe TbL_1 et le NBD. Nous pensions que ce transfert d'énergie serait régi par un système FRET. Or, le modèle de Förster n'a pas donné des résultats en cohérence avec les dimensions réelles du peptide doigt de zinc. Ce modèle s'applique mal à notre système. En effet, il faut y ajouter un effet du dioxygène probablement à travers l'implication d'un état triplet. Notre système est un système résonnant par le Tb^{3+} , l'antenne (T_1) et le NBD (S_1, T_1). Par ailleurs, sa réponse est légèrement modifiée en présence de dioxygène. Le triplet du NBD peut peut-être intervenir dans le processus de désactivation. Un schéma des différents niveaux d'énergie est présenté sur la figure 2.45 à la p. 138. L'influence du dioxygène que nous avons observé n'est pas à notre avantage pour développer une sonde utilisable en milieu cellulaire mais elle ne l'est



(a) Émission en temps résolution de la sonde libre (ligne noir) et liée (ligne rouge) et évolution de l'intensité de luminescence lors du titrage par le Zn²⁺ mesurée à 545 nm (fente 10-5 PM 700 V)



(b) Évolution du temps de vie issu du modèle double exponentiel en fonction de l'ajout de zinc et sa contribution fractionnelle associée



(c) Évolution du temps de vie moyen issu du modèle bi-exponentiel

FIGURE 2.44 – Mesures spectroscopiques de la sonde *SP – NBD – Tbl₁ – II*

pas autant que la sonde $SP - Nap - TbL_1$ qui perdait toute réponse pour le zinc. Cette sonde NBD reste donc un système amélioré par rapport à la première sonde naphthalène.

Ainsi, la sonde $SP - NBD - TbL_1$ est « responsive » au zinc par temps de vie de luminescence du Tb^{3+} . Nous avons obtenu les meilleurs rendements quantiques et les temps de vie calculés sont les plus longs parmi les trois sondes présentées. En conservant des temps longs proches de la milliseconde, cette sonde permet d'utiliser les avantages des propriétés intrinsèques des lanthanides. Si elle était utilisée en milieu cellulaire, nous pourrions donc faire des mesures en temps résolue pour s'affranchir de l'auto fluorescence du milieu.

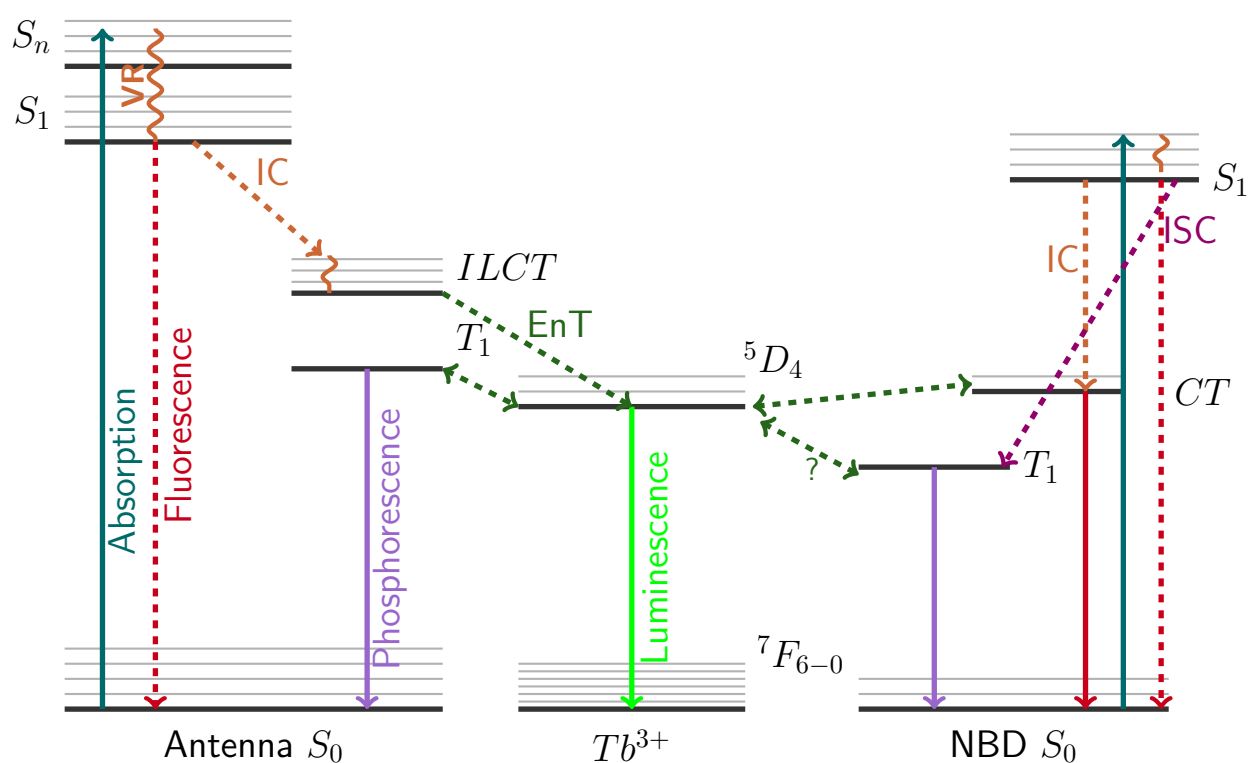
Cette sonde, possédant le plus grand rendement quantique, semble être le plus adéquat pour poursuivre notre travail. Pour la transposer vers une application en cellule, il suffirait d'ajouter une séquence de pénétration cellulaire. C'est ce que nous verrons dans la section suivante.

2.4 La sonde $SP - NBD - TbL_1$ pour une application cellulaire

Comme dit dans la partie 1.2.3, la séquence de pénétration cellulaire TAT avait été utilisée par C. Cépéda. En s'inspirant de ses premiers résultats, nous avons souhaité utiliser cette même séquence TAT.

Séquence TAT La séquence TAT a été découverte dans les années 80. C'est un facteur de transcription du virus du VIH, long de 80 acides aminés. La séquence TAT^{48-60} (GRKKRRQRRRPPQ) cationique, riche en arginine, est la séquence présentant des propriétés de CPP. Ce CPP TAT a déjà fait ses preuves pour faire passer différents molécules imperméables à la membrane cellulaire comme des protéines ou des acides nucléiques à travers la membrane cellulaire (tel que β -galactosidase, RNase) [129] [130].

Le mécanisme d'entrée de TAT n'est pas complètement élucidé mais il semble que l'internalisation peut s'effectuer autant par diffusion passive que par endocytose de manière énergie-dépendant [131]. Le nombre d'arginine semble important dans l'efficacité d'internalisation par rapport à d'autres acides aminées cationiques (lysine, histidine). Le groupe guanidinium de l'arginine permet des interactions ioniques et forme des liaisons hydrogène avec la membrane. Par diffusion passive, les charges cationiques interagissent avec les charges anioniques de la membrane pour la traverser ; ou encore, les phospholipides se réarrangent pour former une micelle inversée avec une poche hydrophobe. Expérimentalement, baisser la température à 4°C permet



Légende





-  Internal Conversion, non radiative transition.
-  Energy Transfer, non radiative transition.
-  InterSystem Crossing, $S_i \rightarrow T_j$ non radiative transition.
-  Vibrational Relaxation.

FIGURE 2.45 – Diagramme de Jablonski de la sonde $SP-NBD-TbL_1^D$ (pas à l'échelle)

d'inhiber les mécanismes par endocytose et n'observer que des diffusions passives énergie-indépendantes. Ce mécanisme d'entrée s'applique plus pour des petites molécules plutôt que des grosses protéines qui s'internalisent probablement plus par endocytose énergie-dépendante.

Pour un premier test, nous avons synthétisé le peptide comportant seulement le fluorophore NBD et la séquence de pénétration cellulaire TAT.

Le nouveau peptide est nommé $TAT - SP - NBD$. Le NBD fluoresce en milieu biologique, facilement observable en microscopie confocale avec une excitation à des longueurs d'ondes supérieures à 400 nm. Nous avons choisis le peptide TAT ayant déjà été utilisée par C. Cépéda (ancienne doctorante du laboratoire).

En parallèle, le peptide comportant seulement le complexe TbL_1 a été synthétisé, $TAT - SP - TbL_1$ qui permet de vérifier si le Tb^{3+} est visible dans les conditions de mesures en microscopie cellulaire et en excitation 2P.

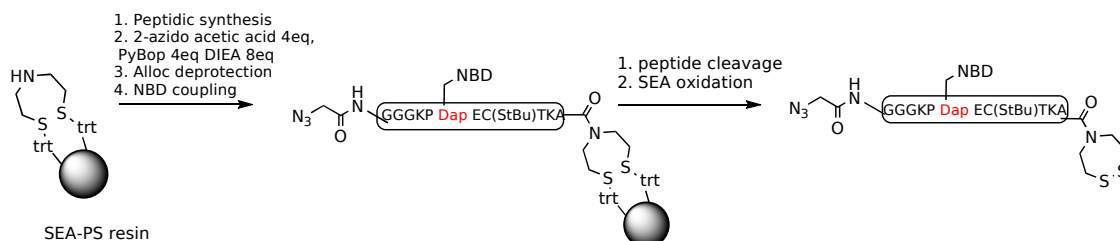
2.4.1 Internaliser un fluorophore par CPP : $TAT - SP - NBD$

Synthèse Le peptide $TAT - SP - NBD$ a été synthétisé par assemblage de trois fragments peptidiques (fig.1.36, p.52). Le fragment TAT est couplé au fragment N-ter contenant le NBD par couplage Huisgen qui est ensuite couplé par ligation native au fragment C-ter (sans ligand).

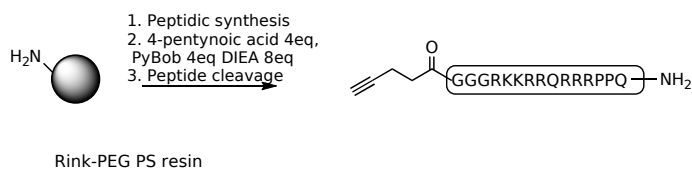
Le fragment TAT avait été synthétisé par C. Cépéda par SPPS au robot synthétiseur. L'alcyne nécessaire au couplage de Huisgen a été introduit grâce à l'acide 4-pentynoïque par couplage peptidique standard en N-terminal du fragment TAT. Le fragment N-ter a été synthétisé manuellement puis la fonction azoture est introduite grâce à l'acide 2-azido acétique en condition de couplage peptidique. Ensuite, le NBD est introduit par réaction de NBD-Cl avec la chaîne latérale de l'acide aminé Dap dont son groupement protecteur *Alloc* a été préalablement déprotégé.

Les conditions de la réaction de Huisgen n'ont pas été reprises des travaux de C. Cépéda mais ont été adaptées du protocole publié par S.I. Presolski [132]. En boîte à gant, le sulfate de cuivre (0.040mmol) est dissous dans 100 μ L de tampon sodium phosphate dégazé (100 mM pH 7.0). Le ligand THPTA (0.025mmol) est dissout séparément dans 50 μ L de tampon et le sodium ascorbate (0.100 mmol) est également dissous séparément dans 50 μ L de tampon. Puis, le fragment TAT (0.9 μ M) et le fragment N-ter NBD (1.1 μ M) sont dissous séparément dans le tampon. Ensuite, 5 éq de sulfate de cuivre est pre-mélangé avec 10 éq de THPTA avant d'être mélangé avec la solution contenant les fragments peptidiques. 100 éq d'ascorbate de sodium est ensuite ajouté. La réaction est quasi-instantanée mais elle est laissée par précaution sous agitation pendant 30 min. La réaction est arrêtée en ajoutant de l'EDTA pour complexer le cuivre(II) éventuellement formé. Le produit attendu est purifié par

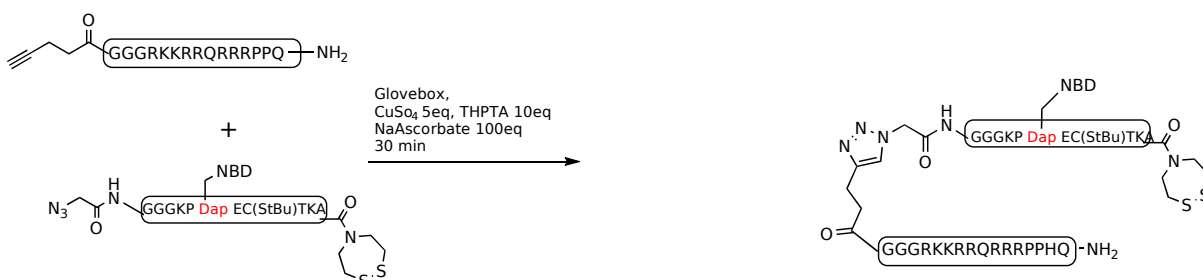
SP-NBD-Nter-SEA_{off}



alkyne-TAT



Huisgen Reaction: TAT-SP-NBD-Nterminal



Native Chemical Ligation

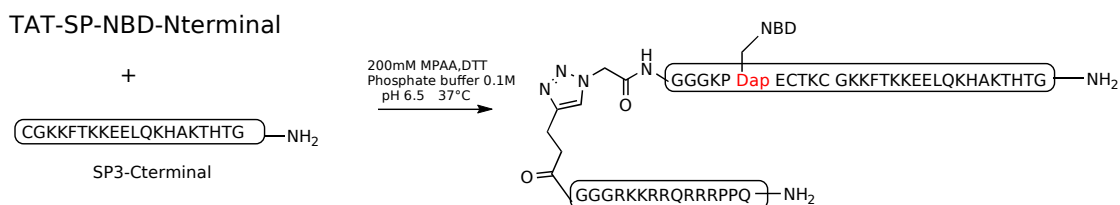


FIGURE 2.46 – Schéma de synthèse de TAT-SP-NBD

HPLC préparative.

Ensuite, la ligation chimique native avec le fragment C-terminal sans complexe s'effectue dans les mêmes conditions précédemment décrites pour $SP - NBS - Tbl_1$. On obtient ainsi le peptide $TAT - SP - NBD$.

Condition d'expérimentation Les cellules HeLa ont été mise en culture 24h avant le jour des mesures, en milieu RPMI avec SVF, 37°C, 5% CO₂, dans des plaques Labteks à 8-puits. Le puits utilisé est rincé trois fois avec le milieu DMEM; puis le peptide est incubé à 10 μM dans du tampon PBS pendant 10 à 40 min le temps de faire les mesures sous microscope. Les puits n'ont pas été rincés.

Résultats Les résultats sont présentés sur la figure 2.47.

Une fluorescence a été observée sous forme de granules dans les cellules. Les images se distinguent clairement des cellules contrôles HeLa qui n'ont pas été incubées avec le peptide $TAT - SP - NBD$ (voir figure 2.48) : la fluorescence des cellules contrôle est très faible et est concentrée sur une zone proche de la membrane nucléaire. La localisation de la fluorescence semble donc bien distincte.

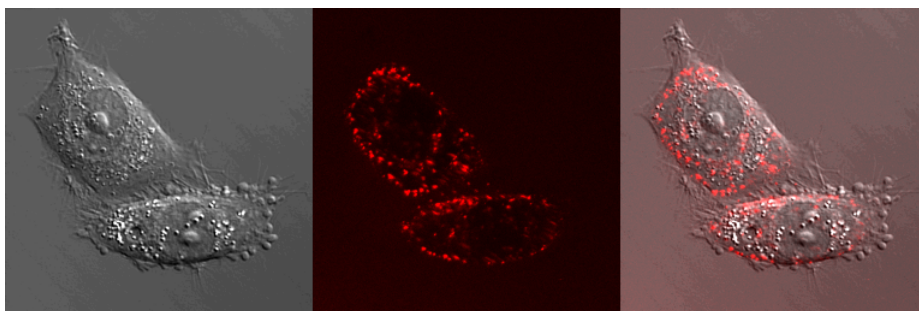


FIGURE 2.47 – Incubation de $TAT - SP - NBD$ à 10μM, $t= 40$ min, cellule HeLa, milieu DMEM, à $\lambda_{ex} = 488$ nm (à gauche, l'image en transmission; au milieu, l'émission; à droite, la superposition)

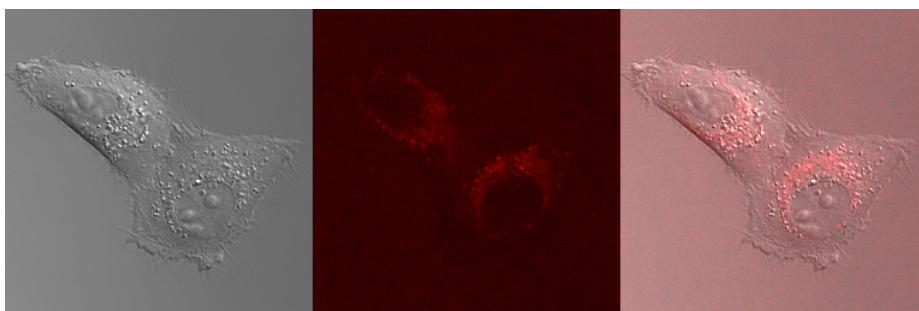


FIGURE 2.48 – Cellules HeLa contrôles, milieu DMEM, $\lambda_{ex} = 488$ nm, (à gauche, l'image en transmission; au milieu, l'émission; à droite, la superposition) - les couleurs ont été « saturées » artificiellement pour faire ressortir l'émission de très faible intensité

En passant en mode spectral, nous pouvons contrôler la signature spectrale la fluorescence observée. En se positionnant sur une granule bien visible et en excitant à $\lambda_{ex} = 488$ nm, le mode spectral nous confirme l'existence d'une fluorescence centrée vers 560 nm s'apparentant à la fluorescence émise par le NBD (540 nm pour la sonde $SP - NBD - TbL_1$). Malheureusement, celle-ci se distingue peu de la fluorescence émise par les cellules contrôles comme on peut le voir sur la figure 2.49. La fluorescence observée n'est donc pas due à l'émission du NBD ; sinon, sa fluorescence est masquée ou se superpose à l'auto-fluorescence de la cellule. Pourtant les intensités sont bien différentes.

Nous avons testé si le NBD pouvait absorber en bi-photonique en excitant à $\lambda_{ex} = 900$ nm dans le but de mieux distinguer la fluorescence de l'autofluorescence. Les résultats du mode spectral sont représentés sur la figure 2.50. La fluorescence des cellules incubées possède un signal (ligne bleue) centré au même endroit que le contrôle (ligne rouge) mais plus étroit. De plus, il se superpose bien avec le signal enregistré dans une goutte de PBS avec 100 μ M de peptide (ligne verte). Ainsi, grâce à l'excitation à 900 nm, nous pouvons déduire que le NBD est bien présent à l'intérieur des vésicules dans la cellule. La séquence TAT permet donc d'internaliser le peptide SP contenant un fluorophore.

Pour résumer, le peptide $TAT - SP - NBD$ nous a semblé s'être internalisé dans des vésicules sans parvenir dans le cytoplasme et le mode spectral en excitation bi-photonique a permis de le vérifier.

Nous pouvons vérifier de même avec le peptide $TAT - SP - TbL_1$ qui ne contient pas de fluorophore mais seulement le complexe de terbium. C'est ce que nous allons présenter dans la suite.

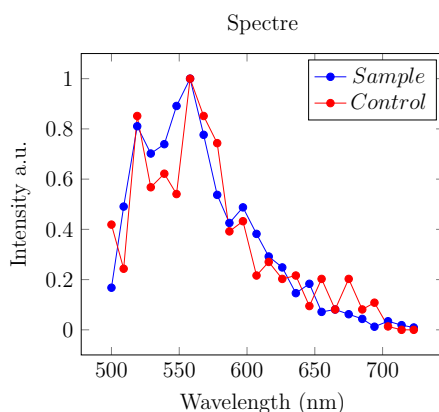


FIGURE 2.49 – Mode Spectral pour la sonde $TAT - SP - NBD$ (en bleu) à une concentration de 10 μ M à $\lambda_{ex} = 490$ nm centré sur une granule et le contrôle (en rouge), Intensité normalisée, cellule HeLa, milieu DMEM

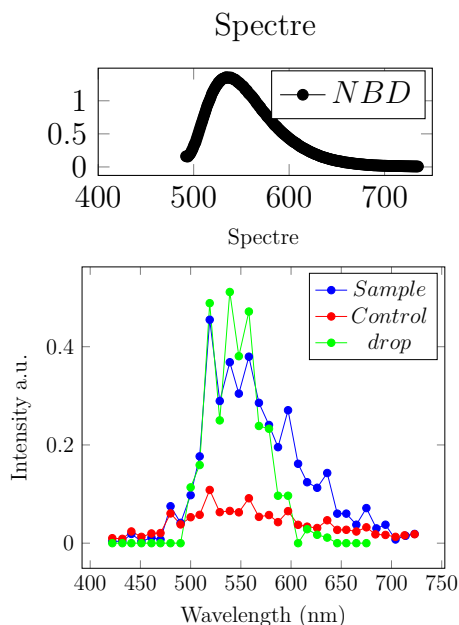


FIGURE 2.50 – Spectre d’émission de fluorescence de $TAT - SP - NBD$ à $\lambda_{ex}=475$ nm (haut) et Mode Spectral (bas) pour la sonde $TAT - SP - NBD$ (en bleu) à une concentration de $10\mu\text{M}$ à $\lambda_{ex} = 900$ nm centré sur une granule d’une cellule, la sonde dans une goutte à $100 \mu\text{M}$ (en vert) et le contrôle (en rouge); cellule HeLa, milieu DMEM

2.4.2 Internaliser un complexe de lanthanide par CPP : $TAT - SP - TbL_1$

La longueur d’onde minimale possible par le dynascope pour faire de l’excitation biphotonique avec un laser Ti :saphire est vers 690-700 nm mais la puissance laser est faible à ces longueurs d’ondes. Or, le complexe de Terbium TbL_1 est probablement peu excité à cette longueur d’onde car, à 350 nm, on se trouve dans le pied de la bande d’absorption qui ne représente que 8% de l’absorbance par rapport à l’absorbance à 302 nm.

Les résultats au microscope avec une excitation à 690 nm (2P) sont représentés sur les images de la figure 2.51. On observe une fluorescence faible ponctuée répartie dans le cytoplasme de la cellule mais le mode spectral donne un signal centré à 490 nm (fig. 2.52); certaines pics pourraient correspondre à certains transition du terbium mais le signal est trop faible et se démarque peu du signal dans le milieu. Même le signal mesuré dans une goutte de PBS à $100 \mu\text{M}$ est assez faible.

Le complexe TbL_1 ne semble pas ou semble faiblement détectable au microscope. L’absorption bi-photonique de l’antenne n’est pas assez efficace et/ou la puissance laser est trop faible à ces longueurs d’ondes. Ou alors, il faudrait changer l’antenne pour qu’elle puisse être excitée à de plus hautes longueurs d’onde. Mais si le niveau donneur de l’antenne devient trop bas, on favorise alors les transferts inverses ce qui

défavorise une bonne sensibilisation du terbium.

Malheureusement, nous avons donc décidé de ne pas incuber nos cellules avec le peptide complet, $TAT - SP3 - NBD - TbL_1$. Il était certain que, dans la mesure où l'on ne détecte pas le peptide avec le complexe seule, alors il serait encore moins probable de voir la sonde complète avec un rendement quantique bien plus faible.

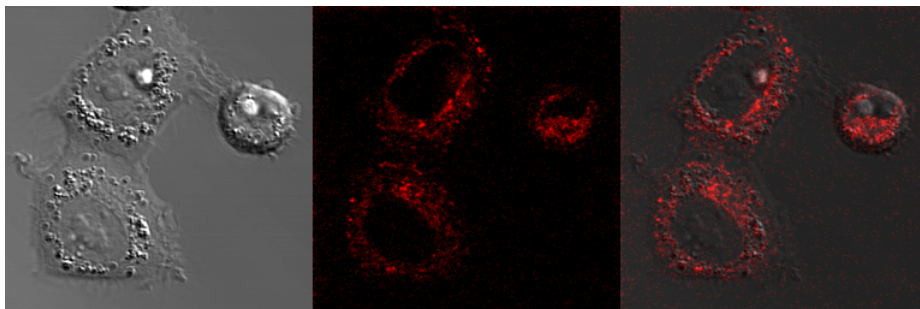


FIGURE 2.51 – Incubation de $TAT - SP - TbL_1$ à $10\mu\text{M}$ sur cellules HeLa, milieu DMEM, $\lambda_{ex} = 690 \text{ nm}$ (à gauche, l'image en transmission; au milieu, l'émission; à droite, la superposition)

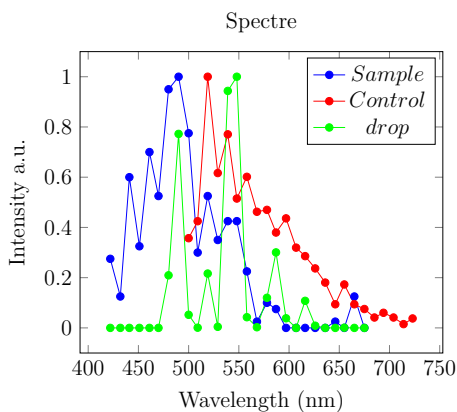


FIGURE 2.52 – Mode Spectral pour la sonde $TAT - SP - TbL_1$ (en bleu) à une concentration de $10\mu\text{M}$ à $\lambda_{ex} = 690\text{nm}$ centré sur une granule, le peptide dans une goutte à $100 \mu\text{M}$ (en vert) et et le contrôle (en rouge), Intensité normalisée, cellule HeLa, milieu DMEM

2.5 Conclusion

En plus de la sonde $SP - Nap - TbL_1$, nous avons présenté deux sondes supplémentaires répondantes en temps de vie de luminescence du terbium, la sonde $SP - Azu - TbL_1$ et la sonde $SP - NBD - TbL_1$. L'azulène et le NBD ont été choisis dans l'optique d'éviter une désexcitation par un niveau triplet du *quencher* et de favoriser un passage par un niveau singulet afin d'obtenir une sonde insensible au dioxygène. De plus, une partie de leur absorbance se superpose avec l'émission du terbium permettant d'envisager une possibilité de modèle FRET.

Le pari est en partie réussi. Dans les deux cas, l'intensité en luminescence augmente avec la reconnaissance du zinc et les temps de vie augmentent avec l'ajout de zinc et la sonde forme un complexe 1 : 1 avec le zinc. Toutefois, notre système est complexe : c'est un système résonnant entre l'antenne, le lanthanide et le *quencher*. Les temps de vie ont pu être calculés par plusieurs modélisations de la décroissance de luminescence. Le modèle choisi pour la sonde $SP - Nap - TbL_1$ a été le modèle de décroissance mono-exponentielle ; puis pour les sondes suivantes, d'autres types de modèles ont été testés au vue des mauvaises modélisations par ce modèle. Le modèle bi-exponentiel parvient à décrire les données expérimentales mais d'autres modèles semblaient mieux correspondre. Pour la sonde $SP - Azu - TbL_1$, un modèle exponentielle étiré est le plus adapté et pour la sonde $SP - NBD - TbL_1$, un modèle de décroissance mono-exponentielle pondéré. Pour comparer les différents sondes, nous avons utilisé les temps de vie moyens issus du modèle de décroissance exponentielle bi-exponentielle. Les tableaux 2.2 et 2.3 récapitulent respectivement les temps de vie moyen en modèle bi-exponentiel et les temps de vie moyen en modèle d'exponentielle étirée. Cette augmentation du temps de vie pendant le titrage au zinc reflète la modulation des transferts d'énergie entre les partenaires du système résonnant due au repliement du doigt de zinc. Autrement dit, le transfert deviendrait moins efficace et l'émission du terbium est moins soumise à cette désactivation augmentant ainsi son temps de vie mesuré. Dans un modèle FRET, l'efficacité du transfert est dépendant de la distance séparant le donneur de l'accepteur, ce qui aurait permis de conjecturer que le repliement du peptide éloignerait le complexe de terbium du *quencher*. Or, le calcul du rayon de Förster $SP - NBD - TbL_1$ a donné des distances supérieurs à la longueur du peptide. Donc, le modèle ne semble pas applicable à notre système. Ce résultat corrobore l'idée que notre système est un système résonnant par plusieurs niveaux.

Les deux nouvelles sondes conservent leur responsivité en condition d'anaérobie pendant les mesures en boîtes à gant (environ 5 ppm d'O₂) contrairement à la sonde naphthalène. Toutefois, une différence de -100 µs est mesurée pour la sonde azulène et de + 200 µs pour la sonde NBD. Un rôle du dioxygène n'est pas totalement exclu mais un système résonnant peut être influencé par d'autres paramètres. D'ailleurs,

nous avons parfois mesurer des différences de temps de vie de 50 à 100 μs entre les duplicats, qui n'ont parfois pas été effectué avec le même lot de peptide ou la même solution de tampon HEPES ou TCEP, mais les écarts absolus du temps de vie entre la sonde libre et la sonde liée au zinc restent similaires. De ce fait, une calibration par une gamme de concentration de zinc sera donc nécessaire lors de l'utilisation de la sonde sur cellule.

| Probe | $\tau \pm 0.05$ (ms) | τ_{Zn} | $\phi \pm 10$ % | ϕ_{Zn} | B_{Zn} | $\log(K_a) \pm 0.3$ |
|----------------------------|----------------------|-------------|-----------------|-------------|----------|---------------------|
| SP-Nap-TbL ₁ | 0.15 | 0.25 | 1.4 | 1.7 | 220 | 9.8 |
| SP-Nap-TbL ₁ II | 0.20 | 0.30 | 0.8 | 1.5 | 194 | 9.3 |
| SP-Azu-TbL ₁ | 0.64 | 0.85 | 1.5 | 2.7 | 1240 | 10.3 |
| SP-Azu-TbL ₁ II | 0.72 | 0.82 | - | - | - | - |
| SP-Azu-EuL ₁ | 0.64 | 0.74 | - | - | - | - |
| SP-NBD-TbL ₁ | 0.83 | 0.99 | 6.5 | 7.6 | 1300 | 10.4 |
| SP-NBD-TbL ₁ II | 0.75 | 0.60 | 3.5 | 5 | 860 | - |

TABLE 2.2 – Temps de vie de luminescence moyen issu de modèle bi-exponentiel et rendements quantiques des sondes à zinc

Enfin, nous avons présenté les résultats d'une sonde dont la position du complexe de lanthanide a été déplacée plus proche du *quencher* pour voir si nous pouvions augmenter l'écart de temps de vie entre la sonde libre et la sonde liée. Cependant, les écarts restent similaires entre les premières sondes et les sondes II mais on obtient des valeurs plus longues en générale. Cette deuxième position est donc disponible si l'on souhaite travailler avec de plus long temps de vie. En revanche, la sonde *SP-NBD-TbL₁-II* est moins intéressante car les temps de vie sont plus courts et diminuent avec l'ajout de zinc. Chaque sonde II présente des résultats différents. Il n'y a donc

| Probe | τ (ms) | τ_{Zn} (ms) | β (Zn) |
|----------------------------|-------------|------------------|--------------|
| SP-Nap-TbL ₁ | - | - | - |
| SP-Nap-TbL ₁ II | - | - | - |
| SP-Azu-TbL ₁ | 0.30 | 0.47 | 0.66 |
| SP-Azu-TbL ₁ II | 0.55 | 0.75 | 0.60 |
| SP-Azu-EuL ₁ | 0.58 | 0.67 | 0.88 |
| SP-NBD-TbL ₁ | 0.76 | 0.89 | 0.87 |
| SP-NBD-TbL ₁ II | 0.78 | 0.50 | 0.6 |

TABLE 2.3 – Temps de vie de luminescence moyen issu du modèle exponentiel étiré et rendements quantiques des sondes à zinc

pas une tendance globale associée à la position du complexe par rapport au *quencher*.

Enfin, étant donné que la sonde NBD possédait les meilleurs rendements quantiques, nous avons souhaité l'adapter pour une internalisation dans des cellules HeLa grâce à la séquence de pénétration cellulaire, TAT. Dans un premier temps, nous avons vérifié la détection de la fluorescence du NBD par le peptide *TAT-SP-NBD* par la microscope confocale sur cellule HeLa; sa fluorescence était visible sous forme vésiculaire dans les cellules. En revanche, l'émission du terbium du composé *TAT-SP-TbL₁*, sans *quencher*, n'était pas ou peu visible dans les cellules. Une raison serait du fait que nous excitions trop au pied de bande d'absorption et/ou l'absorption bi-photonique n'est peut-être pas optimale. Le laser ne permet pas une excitation en dessous de 690 nm et la puissance laser est faible à cette longueur d'onde. De ce fait, nous avons conclu que le développement de sonde à base de ce complexe de terbium TbL_1 n'est pas judicieux mais les sondes présentées apportent une preuve qu'il est possible de faire des sondes résonnants à temps de vie. Il est donc nécessaire de changer de complexe pour la suite et de privilégier des complexes d'euporium permettant une excitation à de plus hautes longueurs d'onde avec une bonne brillance et des temps de vie longs que l'on pourra associer avec un *quencher*.

Par ailleurs, nous avons remarqué que le TAT permettait une internalisation dans des vésicules, probablement endosomales, mais se diffusait peu dans le cytoplasme. Or, une sonde cellulaire devrait pouvoir sortir des endosomes et se répartir dans la cellule. De plus, avec une bonne efficacité de pénétration cellulaire, il est possible d'augmenter la quantité de sondes à l'intérieur des cellules. C'est pourquoi nous avons ajouté un axe d'étude à notre projet de thèse : trouver un système de pénétration cellulaire avec une bonne efficacité de sortie d'endosomes sans dégradation par les lysosomes.

Troisième partie

Des complexes de lanthanides pour de l'imagerie cellulaire

Chapitre 3

Stratégie d'internalisation des complexes de lanthanides par CPP

3.1 Les voies de transduction

La membrane cellulaire est une membrane partiellement perméable qui ne laisse pas passer toutes les molécules. Elle est constituée d'une bi-couche lipidique. L'intérieur de la membrane est alors hydrophobe alors que la surface extérieure est hydrophile. Ce cœur hydrophobe est déjà une première barrière qui limite le nombre de molécule pouvant passer à travers mais il existe plusieurs manières de franchir la membrane [133].

Trouver des stratégies pour franchir cette barrière naturelle sans déstabiliser l'équilibre de la cellule a un grand intérêt scientifique. Ces stratégies permettent par exemple de transporter de manière contrôlée une molécule thérapeutique, active, sans corrompre le fonctionnement, ni la viabilité de la cellule. Actuellement, les voies de transduction de protéines publiées passent beaucoup par voie endocytaire mais une partie (parfois la majorité) des protéines internalisées est piégée sans pouvoir sortir des endosomes qui sont recyclés sur la membrane ou bien leur contenu est dégradé après maturation des endosomes en lysosomes.

3.1.1 Mécanismes de transport

Diffusion passive

De petites molécules organiques peuvent passer à travers la membrane par diffusion passive. La diffusion passive est régie par l'équilibre thermodynamique entre deux environnements à différents potentiels chimiques. Cette diffusion n'utilise pas d'énergie de la cellule. A titre d'exemple, les molécules amphiphiles, qui possèdent à la fois une partie hydrophobe et une partie hydrophile, peuvent diffuser à travers la membrane par interaction de Van der Waals.

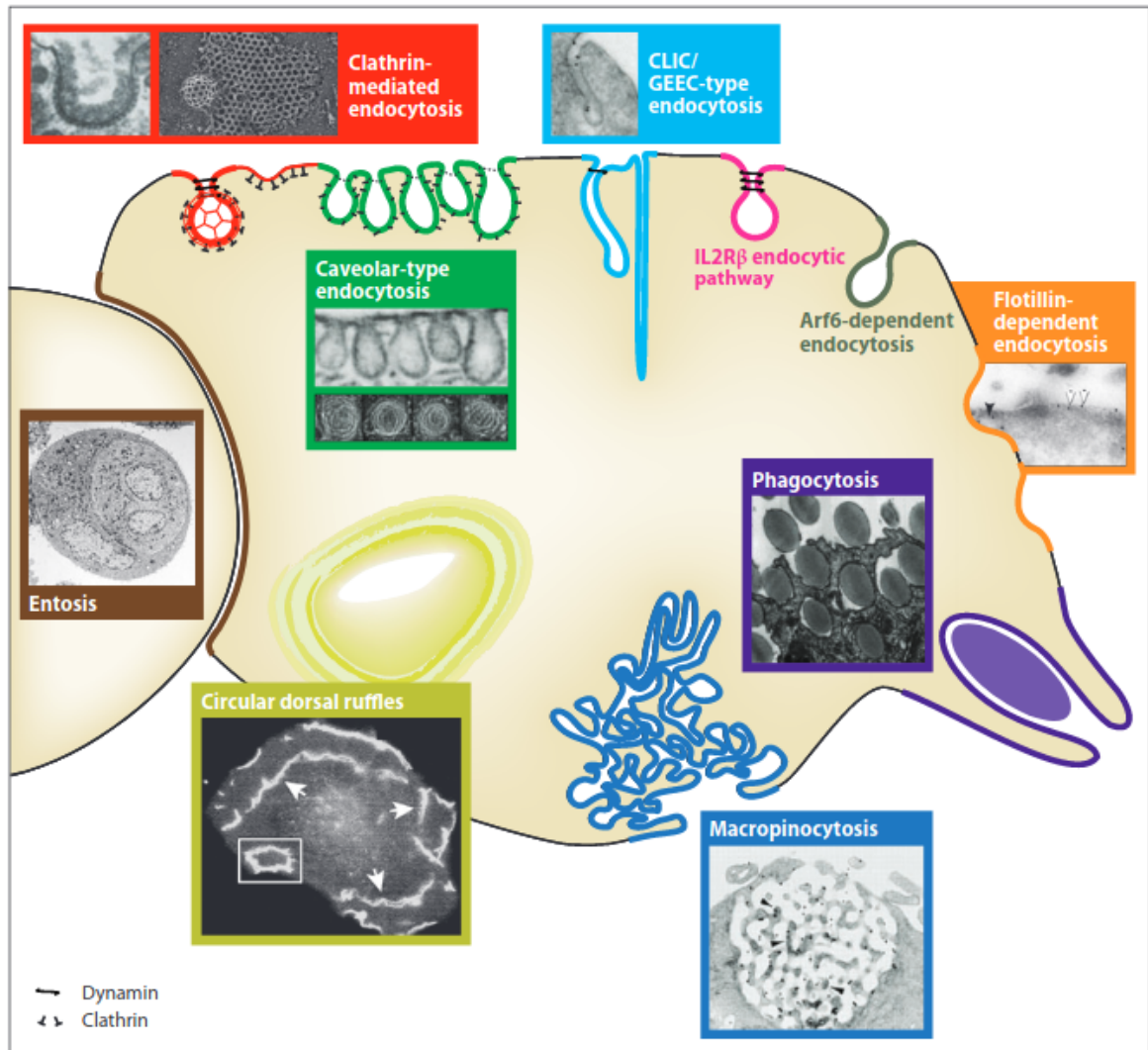


Figure 1

FIGURE 3.1 – Différentes voies d'endocytoses et images par transmission et electron-scan associées - figure de la publication [30]

Diffusion active

On parle de diffusion active lorsque l'énergie de la cellule, comme celle de l'ATP, est utilisée pour permettre le passage à travers la membrane cellulaire. Il existe différentes voies d'endocytoses comme représentées dans la figure 3.1 à la page 152 tirée de *Annual Review of Biochemistry* par G. J. Doherty, H. T. McMahon [30] . Voici quelques exemples avec une description succincte et simplifiée :

Phagocytose Une des voies les plus connues, la phagocytose est utilisée par les cellules du système immunitaire qui "ingèrent" les micro-organismes étrangers pour s'en débarrasser. La clathrine est une protéine qui s'attachent à la membrane intérieure de la cellule immunitaire pour préparer la phagocytose. La membrane va alors entourer le micro-organisme et l'englober pour former une vésicule qui de suite fusionnera avec un lysosome pour le digérer.

Endocytose par récepteur Des récepteurs se trouvent sur la membrane extérieure de la cellule. Lorsque le récepteur reconnaît son ligand propre, des clathrines s'attachent au niveau de la membrane interne et la membrane englobe le récepteur et son ligand pour former une vésicule plutôt large.

Pinocytose par caveoline La caveoline s'attache aussi à la partie intérieure de la membrane et va former une vésicule par invagination pour entourer le fluide extra-cellulaire. Les vésicules formées sont généralement petites par rapport à un endosome formé par endocytose par récepteur ou phagocytose.

Macropinocytose La membrane se « froisse » sous l'effet de l'actine cortical et des kinases (comme PAK1, RAC1, PI3K, PKC...) dans le but d'ingérer un grand volume de fluide extra-cellulaire.

Après endocytose, les molécules dans les vésicules ne sont pas tout de suite relarguées. L'endosome précoce peut subir différentes étapes de maturation jusqu'à devenir un endosome tardif sous l'action de différentes protéines et de modifications de pH.

3.1.2 Les peptides de pénétration cellulaire

Principes des CPPs

Les CPPs (*cell penetrating peptides*) sont des solutions prometteuses pour le transport de molécules à travers la membrane. Les CPP sont des courtes séquences peptidiques qui permettent de franchir la membrane. Il existe plusieurs catégories de

CPPs. Ils sont généralement cationiques pour interagir sur la membrane bilipidique chargée négativement. Le premier identifié a été une séquence courte entre les acides aminés 47-57 de la protéine TAT du VIH. Depuis d'autres ont été identifiés dont la polyarginine, l'antennapedia...[107]. D'autres CPPs sont classés comme étant amphiphiliques car ils contiennent des régions polaires et non-polaires et possèdent une structure secondaire (hélice α ou feuillet β).

Les CPPs entrent dans la cellule par endocytose ou par diffusion passive. Le mécanisme d'entrée n'est pas totalement élucidé mais on considère que les deux voies d'entrées sont possible en même temps. Les propriétés des CPPs peuvent être difficiles à étudier car beaucoup de facteurs peuvent influencer les résultats. Plusieurs paramètres peuvent influencer sur les résultats et aboutir à une mauvaise interprétation des résultats des tests d'internalisation des CPP. Par exemple, la fixation des cellules en utilisant du formaldéhyde ou du méthanol peut induire un relargage des peptides hors des endosomes en dépit des propriétés inhérents aux CPPs. De même, le laser très intense utilisé en microscopie a ce même effet, pouvant fausser les résultats.

En effet, un problème récurrent lors de l'utilisation des CPPs est le relargage peu efficace hors des endosomes. Pourtant, cette étape est cruciale car sinon la molécule d'intérêt est détruite par acidification de l'endosome en lysosome. Pour aider le relargage, une stratégie simple est de mettre plusieurs copies du CPP choisi [134]. Une stratégie de synthèse assez complexe doit alors être mise en place.

Nous nous sommes intéressés à la séquence TAT car elle était la plus connue mais il existe bien d'autres séquences. C. Cépéda a déjà testé la séquence penetratin (RQIKIWFQNRRMKWKK) issue de l'homéodomaine d'Antennapedia qui est une protéine de la drosophile [135]. Elle a également testé la séquence RWR (RRRRWWWR) qui est une séquence non naturelle développée par Rydberg et al. Elle dérive d'une autre séquence de CPP connue, R₈. L'intérêt d'insérer des tryptophanes est de faciliter la synthèse et la purification de R₈. Ils ont démontré pour ce composé une bonne internalisation cellulaire et une faible cytotoxicité [136]. Cependant, ces séquences avaient montré de moins bons résultats que la séquence TAT pour les peptides de C. Cépéda. Comme montré dans la partie précédente, nous avons testé l'internalisation du peptide *TAT – SP – NBD* mais ce dernier s'internalisait puis restait sous forme vésiculaire ce qui limitait la diffusion dans le cytosol.

C'est pourquoi nous voulions trouver une autre séquence avec une efficacité de pénétration et diffusion dans le cytosol qui, de plus, serait compatible avec la chimie de nos sondes à zinc. C'est ce que nous présenterons dans cette partie.

Conditions expérimentales sur cellule Les cellules sont préparées la veille des manipulations à 37°C et 5% CO₂. Elles sont déposées sur des Labteks à 8 puits de 200 μ L avec un nombre de 30 000 cellules en moyenne dans du milieu DMEM ou RPMI sans

rouge de phénol.

Les conditions expérimentales pour tester les CPPs qui seront présentées dans cette partie peuvent être parfois différentes. Les mesures sur cellules n'ont pas été faites dans la même période au cours de la thèse et ont évolué en fonction des avancées. Les conditions seront donc précisées sous chaque image.

3.2 Un CPP en structure doigt de zinc : ZF5.3

3.2.1 Introduction sur les travaux d'A. Shepartz

Nous nous sommes intéressé à un autre CPP nommé ZF5.3 qui a été publié par l'équipe d'Alanna Shepartz. Ce CPP a été choisi car il a une structure de doigt de zinc et que notre projet de développement des sondes à zinc utilise cette structure doigt de zinc. Le ZF5.3 est donc un candidat potentiel pour transposer les sondes *in vitro* en *in cellulo* car il peut jouer à la fois un rôle de chélateur spécifique de Zn^{2+} et un rôle de CPP.

Travaux d'A. Shepartz L'équipe d'Alanna Schepartz a montré que des petites protéines cationiques avec une structure secondaire définie pouvaient avoir une meilleure efficacité d'internalisation que les séquences TAT. Ils se sont basés sur un peptide long de 36 acides aminés avec une structure secondaire en hélices α et hélices PPII (*Poly-Proline*) repliés en *épingle à cheveux*. En construisant plusieurs modèles avec différents positions des arginines et avec une rhodamine (R) en fluorophore, ils ont distingué une séquence, nommée 5.3^R , qui possèdent 5 arginines sur la même face de l'hélice α et 2 arginines proches du C-terminal et qui présentait une internalisation deux fois plus efficace que la séquence TAT ou R_8 . Ils ont pu confirmer que la pénétration s'effectuait par endocytose par le même mécanisme que TAT mais que 5.3^R , sortait plus tôt avant la maturation des endosomes Rab5+ [31]. La séquence est donnée dans le tableau 3.1.

Au vue de ces résultats, ils ont transposé la séquence sur un doigt de zinc (ZF) pour vérifier si ce dernier acquiert les propriétés de pénétration cellulaire de la séquence 5.3^R . La séquence modifiée est appelée ZF5.3 (tableau 3.1). Ils ont pu démontrer que le ZF5.3 s'internalise également dans les cellules par endocytose à une concentration de 1 μ M et se libère également tôt des endosomes Rab5+ [31]. De plus, le peptide $ZF_5 \cdot 3^R$ sort intact des endosomes, sans être protéolysé.

Pour montrer que ce CPP parvient jusqu'au cytosol, les cellules ont été incubées avec du $ZF5.3^{Dex}$. Dex (peptoid-dexaméthasone) interagit avec le récepteur de glucocortinoïde cytosolique (GR) et les cellules utilisées expriment le récepteur GR-GFP (*green fluorescent protein fusion*). L'interaction avec le *Dex* induit la

| nom | séquence |
|-------|---|
| TAT | GRKKRRQRRPPQG |
| 5.3 | GPSQPTYPGDDAPV RDLIRFYRDLRRY LN VVTRHRY |
| ZF | WYSCNVC G KAFVLSAHLN QHLAVHATQAT |
| ZF5.3 | WYSCNVC G KAFVLS RHLNRHLRVHRRAT |

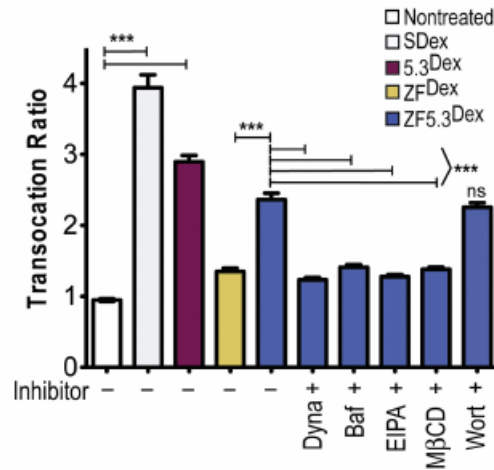
TABLE 3.1 – Séquence peptidique des CPPs TAT, ZF, 5.3 et ZF5.3

translocation de la GFP dans le noyau. Autrement dit, l'ajout de *Dex* induit une diminution du signal de GFP dans le cytosol en faveur d'une accumulation dans le noyau. *Dex* est un moyen de vérifier que ZF5.3^{*Dex*} se retrouve bien dans le cytosol et non piégé dans les endosomes. Cette méthode a permis de vérifier que TAT^{*Dex*}, Arg₈^{*Dex*} et ZF5.3^{*Dex*} arrivent bien dans le cytosol [31].

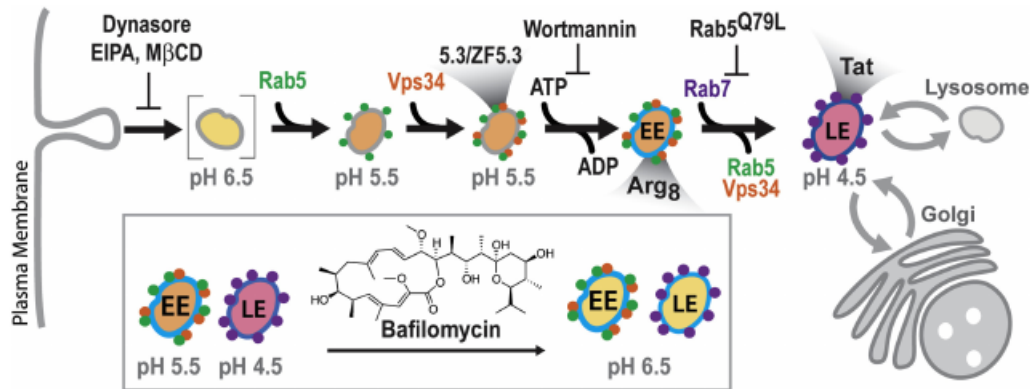
Pour étudier le mécanisme de ce CPP, ils ont incubés le peptide avec différents inhibiteurs de mécanismes d'endocytoses (fig.3.2a) : par exemple, la molécule dynasore inhibe la dynamine nécessaire à l'endocytose par clathrin et par calveolin; la molécule N-ethyl-isopropyl amiloride (EIPA) inhibe des mécanismes endocytiques indépendantes de la dynamine. Sur la figure, on peut voir que la ratio de translocation de ZF5.3^{*Dex*} est à environ 2.5 sans inhibiteur. En présence de dynamin, bafilomycine, EIPA et MβCD, le niveau du ratio se retrouve au même niveau que le contrôle (cellule non traitée sans peptide) alors qu'en présence de wortmannin, la valeur du ratio reste au même niveau que pour ZF5.3^{*Dex*} sans inhibiteur. La wortmannin n'empêche donc pas la transcription de la GFP dans le noyau. Grâce à cela, ils ont montré que le mécanisme d'endocytose était dynamine-dépendant et ils ont pu montrer que ZF5.3^{*Dex*} peut s'échapper dès l'état précoce pour se retrouver dans le cytosol [31].

Ils ont pu corroborer les résultats par une analyse par spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS). La FCS "mesure la diffusion de translation de molécules fluorescentes qui diffusent à travers un petit volume d'observation", autrement dit, elle mesure "la fluctuation d'intensité de fluorescence qui correspondent aux 'entrées-sorties' des espèces à travers ce volume" [137]. La FCS permet donc de mesurer une concentration locale, ici la concentration dans le cytosol. Ils ont pu mesurer une efficacité de transfert cytosolique supérieure à 50% pour ZF5.3^{*R*} contrairement à TAT^{*R*} qui est à 2% [138].

Changement de fluorophore Étant donné que A. Schepartz et al. développent de nouvelles méthodes de transports des protéines dans le cytosol, ils ont testé leur



(a) Translocation de GR-GFP après incubation de 1 μ M des peptides labélisés par *Dex* (SDex=Dex seul, peptide 5.3, ZF et ZF5.3) en présence et en l'absence d'inhibiteur (ratio de translocation : signal dans le noyau sur signal median dans le cytosol à $<2\mu$ m) du noyau



(b) Schéma du chemin d'endocytose de 5.3, ZF5.3, Tat et R₈

FIGURE 3.2 – Détermination des étapes d'endocytoses suivies par ZF5.3 grâce à différents inhibiteurs - figure de la publication [31]

séquence CPP avec une plus grosse molécule à internaliser [32]. La rhodamine a été remplacée par la protéine SNAP-tag qui a la possibilité de « s'auto-labéliser » (fig.3.3a). Le SNAP-tag (O^6 -alkylguanine–DNA–alkyl–transerase) réagit avec BG (O^6 benzylguanine) conjugué à un fluorophore (ici, la rhodamine R) : il se forme une liaison entre le fluorophore et SNAP. Avec ZF5.3(Snap-R), ils ont atteint une concentration cytosolique de 250 nM de SNAP-R pour une concentration initiale de 3 μ M, soit une efficacité d'entrée de 8% (en rose (B) fig.3.3b). Ils l'on comparé à un autre peptide CPP connu, CPP12 (CPP cyclique) mais les mesures de cytométrie en flux ou FCS sont bien plus faibles(en orange sur la figure). L'efficacité de ZF5.3 s'est donc avérée être entre 2 et 6 fois plus qu'avec les autres CPPs testés.

3.2.2 Adaptation à notre projet

La séquence donnée par Shepartz a été légèrement modifiée. En effet, le tryptophane et la tyrosine, qui se trouvent en N-terminal, possèdent des propriétés fluorescentes et ont été remplacés par une alanine et une phénylalanine.

En effet, nous avons observé au cours de cette thèse qu'à proximité d'un tryptophane ou d'une tyrosine, le complexe TbL_1 avait un temps de vie de luminescence court. Le complexe était soumis à des processus de désexcitations par transfert d'énergie retour vers le triplet de l'antenne ($22\ 500\text{ cm}^{-1}$) et le triplet des acides aminés en cause (tryptophane : $24\ 600\text{ cm}^{-1}$, tyrosine : $26\ 500\text{ cm}^{-1}$, phénylalanine : $28\ 500\text{ cm}^{-1}$).

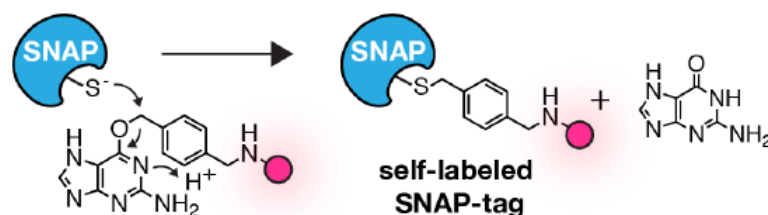
La séquence que l'on synthétisera sera donc la suivante : **KAF**SCNVCGKAFVLSRHLNRHLRVHRRAT. Les acides aminés modifiés sont marqués en vert et la lysine signalée en rouge est celle choisie pour l'accrochage du complexe de lanthanide.

ZF5.3(TbL_1^D) Nous avons couplé le complexe TbL_1^D à ce CPP car il a été utilisé pour les sondes à zinc présentées et a le plus fort rendement quantique. Si ce CPP est efficace, nous pourrions transposer les sondes à zinc développées à cette séquence contenant ce motif penta-arginine.

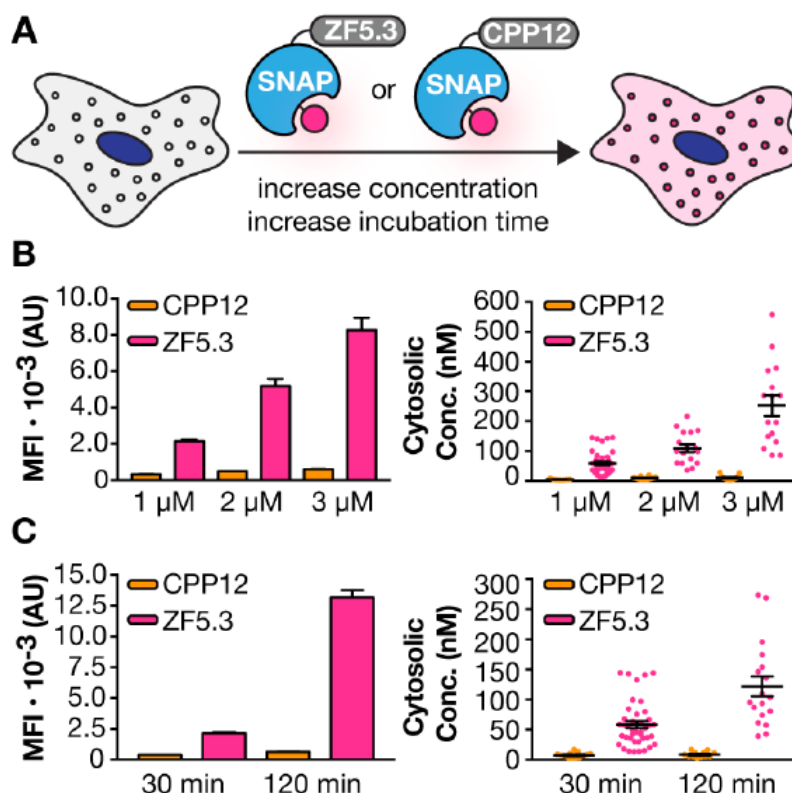
Le schéma de ces composés est présenté sur la fig. 3.4. La synthèse suit la stratégie « voie Me » entre le ligand L_1 et le peptide ZF5.3 (voir détails en partie expérimentale et caractérisation MS).

3.3 Études spectroscopiques de ZF5.3(TbL_1^D)

Les mesures ont été effectuées à 10 μ M de peptide dans de l'eau tamponnée à l'HEPES 10mM pH 7.4 en présence de 250 μ M de TCEP.



(a) Principe de l'« auto-labellisation » de la protéine SNAP-tag avec la benzylguanine (BG) conjugué à un fluorophore



(b) (A) Schéma de l'évaluation de l'internalisation de ZF5.3-SNAP-R et CPP12-SNAP-R par cytométrie de flux (CF) et par FCS (*FLuorescence Correlation Spectroscopy*) (B) Influence de la concentration initiale de CPP incubée sur la pénétration cellulaire mesurée par CF (gauche) et la concentration cytosolique mesurée par FCS (C) Influence du temps d'incubation (concentration 1 μM; MFI : Intensité de fluorescence médian)

FIGURE 3.3 – Internalisation sur cellule d'une « grosse » molécule, ici la protéine SNAP labellisée par la rhodamine, par le CPP ZF5.3 comparé au CPP12; le composé avec ZF5.3 présente de meilleurs résultats que CPP12 : la concentration cytosolique augmente lorsque la concentration initiale d'incubation augmente et lorsque le temps d'incubation est prolongé - figures de la publication [32]

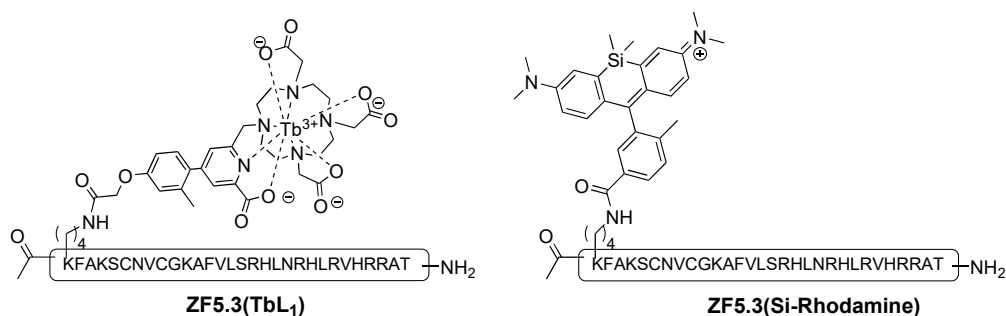


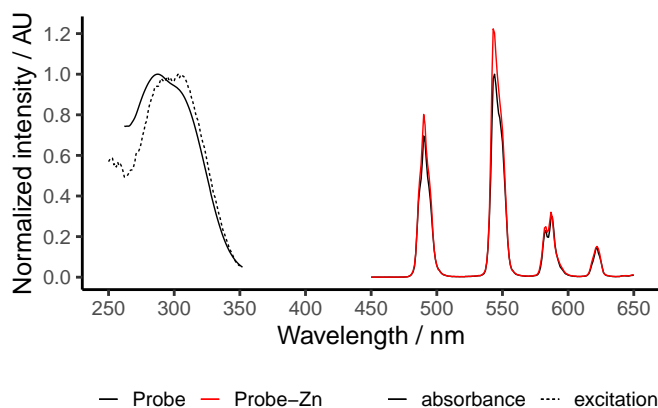
FIGURE 3.4 – Schéma des composés étudiés ZF5.3(TbL₁), ZF5.3(Si-Rhodamine)

Spectre d'émission en temps résolu et spectre d'excitation L'émission en temps résolue de Tb³⁺ de ZF5.3(L₁^{Tb}) est mesurée pour le peptide doigt de zinc libre (en noir sur la fig. 3.5b) et liée au Zn²⁺ (en rouge). L'émission de Tb³⁺ augmente très légèrement après coordination au Zn²⁺. Le spectre d'excitation (trait tiret fig. 3.5a) correspond au spectre d'excitation de l'antenne. L'émission du Tb³⁺ est donc bien issue de l'excitation de l'antenne biarylique L₁.

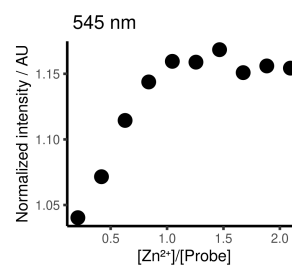
Temps de vie de luminescence et rendement quantique Le temps de vie a été calculé à partir de la décroissance de luminescence de Tb³⁺ dans le temps sous excitation à $\lambda_{ex} = 302$ nm et mesurée pour $\lambda_{em} = 545$ nm. La figure 3.5d représente en trait pointillé la courbe expérimentale, en ligne rouge la courbe modélisée par une décroissance mono-exponentielle et en dessous, la déviation associée. Le modèle correspond bien aux données expérimentales et les RMSE sont proches de 1. Le modèle mono-exponentiel est donc adapté. Les valeurs de temps de vie sont montrées sur la figure 3.5c. Le temps de vie de ZF5.3(TbL₁) libre est de 1.9 ms et celui de ZF5.3(TbL₁)–Zn²⁺ augmente à 2.3 ms. Le temps de vie augmente graduellement pendant le titrage par le ZnCl₂ et stagne après 1 éq. confirmant la complexation 1 : 1 avec le Zn²⁺.

Le rendement quantique a été calculé à 57% pour le peptide ZF5.3(TbL₁) et 65% pour le peptide lié ZF5.3(TbL₁)–Zn²⁺.

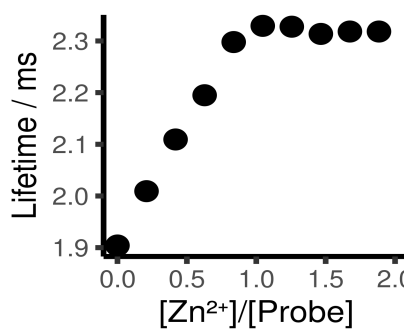
ZF5.3(TbL₁)–Zn²⁺ présente des propriétés similaires au complexe TbL₁ notamment pour les valeurs de temps de vie et rendement quantique. ZF5.3(TbL₁) a un temps de vie un peu plus court et un rendement quantique diminué. Les interactions entre l'antenne et l'acide aminé aromatique (F) affecte peut être l'efficacité de transfert énergétique. Autre explication, les multiples arginines de la séquence peptidique peuvent contribuer à plus de liaisons hydrogène et vibrations N-H à proximité créant des voies de désexcitations non-radiatives dans la forme non-métallée au Zn²⁺ qui est flexible.



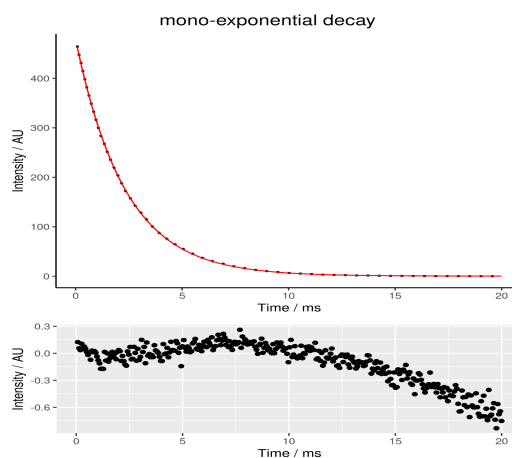
(a) Spectre d'émission en temps résolu (délai 100 μ s) à λ_{ex} = 302 nm pour la sonde libre (ligne noire) et la sonde liée au Zn²⁺ (ligne rouge) (fentes 5-2.5 PM 600 V); Spectre d'absorption (ligne pleine noire), spectre d'excitation à λ_{em} = 545 nm



(b) Évolution du maximum d'intensité normalisé λ_{em} = 545 nm pendant la titrage par le Zn²⁺



(c) Évolution du temps de vie de luminescence mesuré à λ_{ex} = 545 nm au cours du titrage



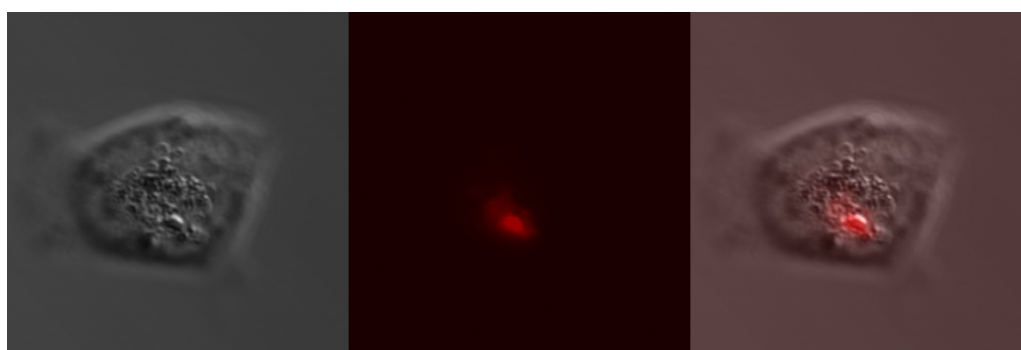
(d) Décroissance de la luminescence (ligne pointillée) en temps résolu mesuré à λ_{em} = 545 nm excité à λ_{ex} = 302 nm, modèle en décroissance mono-exponentielle (ligne rouge) et dessous, la déviation

FIGURE 3.5 – Propriétés photophysiques de la sonde ZF53(TbL₁^D)

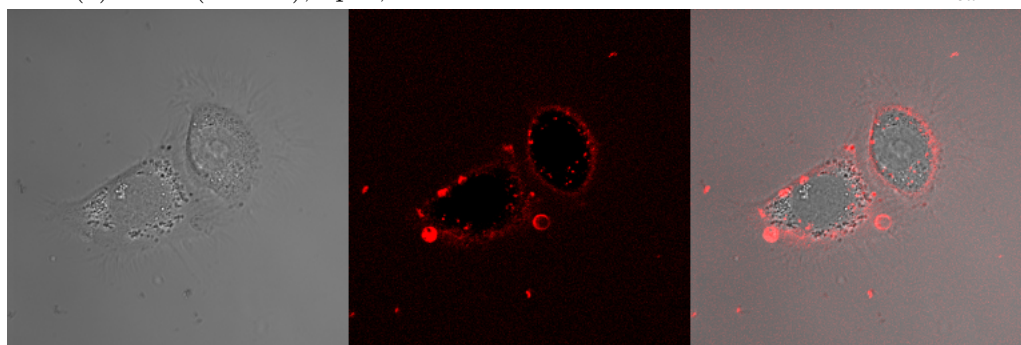
3.4 Étude d'internalisation de ZF5.3(TbL₁^D) sur cellule HeLa

Conditions Les cellules HeLa ont été préparées la veille sur une plaque Labtek 8 puits à environ 30 000 cellules par puit dans du RPMI sans rouge de phénol et 10% SVF. Les cellules sont lavées trois fois par du milieu DMEM puis incubées avec 2 μM du composé ZF5.3(TbL₁)–Zn²⁺ à 37°C pendant 1 h dans du PBS. Le composé a été excité à 690 nm en 2P.

Résultats et Discussion Les résultats sont montrés sur la figure 3.6a.



(a) ZF5.3(TbL₁^D), 2 μM , 1h d'incubation sur HeLA dans du PBS à λ_{ex} = 690 nm



(b) ZF5.3(Si-R), 5 μM , 25 min d'incubation sur HeLA, dans du PBS à λ_{ex} = 633 nm

FIGURE 3.6 – Image prise par microscopie, avec l'image en transmission (à gauche), l'émission (milieu), et la superposition (à droite)

Nous avons observé peu de signal provenant de notre complexe. Le signal de l'émission (en rouge sur la figure 3.6a) enregistré se situe sur un plan focal à la surface de la cellule et est sous forme d'un agrégat. Il semblerait que ZF5.3(TbL₁)–Zn²⁺ s'internalise peu dans les cellules. Le complexe perturbe peut-être les propriétés de CPP de ZF5.3. L'émission du Tb³⁺ peut ne pas être visible à cause de cette mauvaise efficacité d'internalisation, d'où une concentration trop faible dans les cellules. De plus, si le complexe a une mauvaise absorption 2P, alors il y a encore moins de chance de pouvoir mesurer l'émission du Tb³⁺ dans la cellule.

Nous avons synthétisé le peptide ZF5.3 avec une Si-rhodamine en fluorophore pour vérifier s'il y a internalisation dans nos conditions (fig. 3.6b). Avec ce composé ZF5.3(Si-R)-Zn²⁺, nous avons observé un signal de fluorescence assez diffus proche de la membrane cellulaire et sous forme vésiculaire autour du noyau. Il semble être internalisé mais nous n'avons pas effectué un mode spectral sur ce composé.

La distribution du signal du composé ZF5.3(Si-R)-Zn²⁺ est donc différente de celle du composé ZF5.3(TbL₁)-Zn²⁺ : le premier semble s'être internalisé sous forme vésiculaire contrairement au second. Le problème semble donc provenir de notre complexe TbL₁ dont l'absorption 2P est peut-être inefficace. Une première alternative aurait été d'utiliser le complexe EuL₂ qui permet une excitation à de plus hautes longueurs d'onde. Cependant, nous avons rencontré le même problème que pour le peptide *SP - EuL₂*. Le spectre d'absorption du composé ZF5.3(EuL₂) est décalé vers le rouge par rapport à celui du complexe EuL₂ et le test DTNB n'a pas permis de doser les groupements thiols. C'est pourquoi nous avons choisis de changer de CPP pour étudier l'internalisation du CPP conjugué aux complexes de lanthanide sur cellule vivante.

3.4.1 Une internalisation par diffusion passive : le CPP TP2

Une autre voie d'internalisation, différente de l'endocytose, est la diffusion passive. Elle peut être une bonne alternative car la molécule d'intérêt traverse la membrane et atteint directement le cytosol ; on élimine le problème de l'emprisonnement dans les endosomes puis dégradation dans les lysosomes.

La molécule d'intérêt diffuse à travers la membrane en s'insérant et rompant la membrane et/ou par réorganisation de la membrane lipidique.

Travaux de W.C. Wimley L'équipe de W. C. Wimley a utilisé une technique de *screening à haut débit* pour sélectionner des peptides qui s'internalisent par diffusion, appelés SMTP (*spontaneous membrane translocating peptide*) [139].

Sur une librairie de plus de 10 000 séquences de 12 acides aminés avec des résidus hydrophobes et cationiques, ils ont déterminé une séquence consensus minimale, LRLLR aux positions 5-9 pour des SMTPs.

La séquence TP2 identifiée a la séquence suivante : PLIYLRLLRGQF [140]. Le fluorophore 6-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) a été couplé en C-terminal du peptide. TAMRA est un fluorophore de 430 Da, zwitterionique, ne pouvant pas traverser la membrane. Le TP2 a pu s'internaliser dans les cellules à faible concentration (< 2 μM) à 22°C (l'endocytose est peu sollicitée à cette température). On peut voir sur la fig. 3.7 (B) un signal diffus cytosolique du composé TP2-TAMRA contrairement au composé Arg9-TAMRA qui présente un signal ponctué correspondant à des endosomes.

La concentration d'incubation du composé est faible car il semblerait qu'il ait besoin de sa forme monomérique pour s'internaliser [33]. Leurs études sur les SMTPs ont permis d'observer qu'un ratio de trois leucines pour 2 arginines permettait une translocation directe [141].

Plus tard, nous avons lu que les travaux de S. Macchi [142] n'ont pas aboutit aux mêmes résultats que ceux présentés par l'équipe de Wimley. Le TP2 couplé au fluorophore TAMRA (appelé TM9-TAMRA dans la publication) ne permettait pas une internalisation par diffusion passive mais plutôt par endocytose : la fluorescence de TAMRA restait sous forme ponctuelle dans la cellule. Ce n'est qu'en solubilisant dans du DMSO au préalable que le peptide s'internalise par diffusion passive (1% DMSO dans le puits).

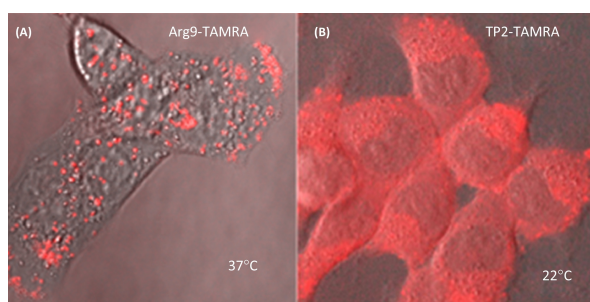
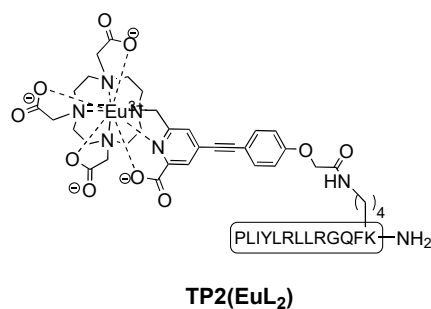
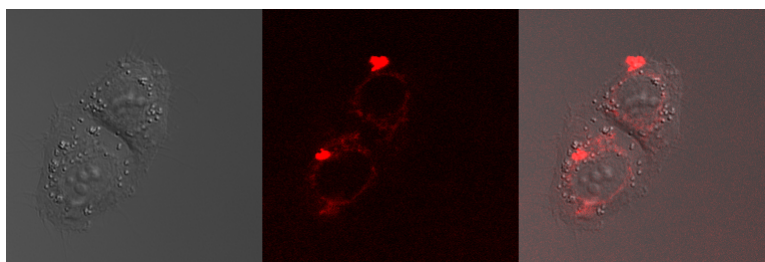


FIGURE 3.7 – (A) Cellules incubées avec 2 μM de Arg9-TAMRA à 37°C pendant 2 h montrant un signal ponctué et (B) TP2-TAMRA à 2 μM , 22°C température ambiante pendant 10 min montrant un signal diffus dans le cytosol par Microscopie confocale sur cellule CHO (*Chinese Hamster Ovary*) - tirée de la publication [33]

Il est peu probable que ce TP2 puisse permettre la translocation de plus gros cargo tel que les sondes que nous développons. Néanmoins, il serait possible de faire internaliser des complexes de lanthanides.

Nous avons donc utilisé le TP2 qui présente des propriétés de translocation membranaire en y couplant le complexe de EuL_2 sur une amine libre d'une lysine ajoutée en début de séquence (fig.3.8). Le complexe EuL_2 a un maximum d'absorption à 331 nm et une brillance de $4794 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($7440 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ pour TbL_1). Il a l'avantage de permettre une excitation bi-photonique jusqu'à 750 nm alors que le complexe TbL_1 était sur la limite des possibilités du laser Ti :saphire à 690-700 nm. Ce composé est appelé TP2(EuL_2^{D}).

Résultats Malheureusement ces composés se sont révélés être peu solubles dans le PBS. L'ajout de DMSO est nécessaire. Or, cela est contraire à notre objectif qui est de travailler sur cellules vivantes sans ajout d'additifs. Nous avons tout de même incubé les cellules HeLa avec du TP2(EuL_2^{D}), préalablement dissout dans du DMSO, sans dépasser 2% de DMSO dans le puits d'incubation.

FIGURE 3.8 – Schéma de TP2(EuL₂)FIGURE 3.9 – Incubation de TP2(EuL₂) sur cellule HeLa pendant 1 h à 2 μ M excité à $\lambda = 720$ nm dans le PBS sans rinçage ; à gauche, image en transmission ; milieu, émission ; à droite, image superposée

Cependant, la fluorescence que l'on observe dans la zone péri-nucléaire est similaire à celle des cellules contrôle avec un maximum d'émission vers 460 nm. En mode spectral, l'émission de l'europium est visible seulement dans les quelques agrégats se trouvant dans le milieu ou proche de la surface des cellules (signal saturé en *spot* sur la fig. 3.9).

Soit le TP2(EuL₂) n'est pas internalisé, soit la concentration de peptide dans les cellules est trop faible pour que l'émission de l'europium puisse être détectée distinctement, soit l'excitation 2P n'est pas efficace. Il faudrait faire les mêmes mesures mais en excitation 1P. Ces expériences n'ont pas été effectuées.

Par ailleurs, la polarité du fluorophore semble avoir son importance pour les propriétés d'internalisation du TP2. Dans les travaux de S. Macchi [142], le TP2 a été couplé à un fluorophore apolaire ATTO 425 (TAMRA étant polaire) pour comparer leur internalisation dans les mêmes conditions. TP2-ATTO 425 présente un signal diffus contrairement à TP2-TAMRA qui présente un signal ponctué. Un fluorophore apolaire semble donc participer au propriété d'internalisation par diffusion passive alors qu'un fluorophore polaire l'inhibe. Or, dans notre cas, le complexe EuL₂ est moins aromatique que les fluorophores ATTO425 et TAMRA et polaire. Cela expliquerait pourquoi le conjugué TP2(EuL₂) n'est pas efficace. Nous avons choisi le TP2 pour ses propriétés de translocation directe. Le TP2 n'est donc pas le bon candidat.

3.5 Conclusion

Deux CPP ont été testés dans cette partie.

Le complexe TbL_1 a été conjugué sur la séquence ZF5.3 (modifiée) d'A. Shepartz et EuL_2 sur TP2 de W. Wimley. Leur capacité d'internalisation du complexe sur cellule HeLa ont été testées grâce à la détection de l'émission du lanthanide en excitation 2P. Le composé TP2(TbL_1) avait également été synthétisé mais n'a pas abouti à de meilleurs résultats, donc il n'a pas été présenté. Pour ZF5.3, l'émission du terbium n'a pas pu être mesuré, probablement à cause d'une puissance laser trop faible ou d'une mauvaise absorption 2P de l'antenne ou d'une trop faible accumulation dans la cellule. Pour TP2, sa mauvaise solubilité dans le PBS et le milieu de culture cellulaire ne permet pas de tester son internalisation dans les conditions de cellules vivantes sans additifs. De plus, l'émission de l'euporium n'a pas non plus pu être détectée à l'intérieur des cellules avec du DMSO (1%) dans le milieu d'incubation pour reproduire les conditions de Wimley.

Les résultats des tests cellulaires n'étant pas concluants, nous n'avons pas tenté d'adapter les sondes à zinc présentées en partie précédente avec ces CPPs.

C'est pourquoi nous avons orienté nos recherches dans le développement de nouveaux complexes avec des antennes qui pourraient présenter une meilleure absorption 2P, en particulier pour l'euporium; et en parallèle, nous avons continué à chercher une stratégie de pénétration cellulaire possédant une meilleure efficacité d'internalisation.

Chapitre 4

Améliorer l'absorption 2P et la pénétration cellulaire

4.1 Une antenne sensibilisant l'euporium avec une meilleure absorption bi-photonique

Nous nous sommes intéressés, en particulier, aux travaux d'O. Maury et al. ; ils ont synthétisé plusieurs composés avec l'antenne 2P aryle-alcyne, sur les dix dernières années, mais chacun possédant des propriétés d'absorption bi-photonique variables. Des exemples de leurs complexes d'euporium sont décrits dans la suite.

4.1.1 Littérature

À 5 GM par antenne Anthony d'Aléo a travaillé sur un complexe d'euporium basé sur la macrocycle DO3A et un bras picolinate fonctionnalisé par un aryle-alcyne avec un groupe PEG pour permettre la solubilité du composé en solution aqueuse. Le composé est chargé négativement et est nommé $[Na][Eu(L^2)]$ [34] (voir fig. 4.1). Le groupe électro-donneur et la conjugaison π permettent une sensibilisation de l'euporium passant par une transfert de charge intra-ligand. Le composé est similaire à notre complexe EuL_2 mais avec un donneur soufré au lieu d'un donneur oxygéné. Le composé présente un maximum d'absorption à 338 nm, un temps de vie de 1.39 ms. Le coefficient d'absorption molaire est excellent, à $36\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ et le rendement quantique est de 28% conférant un bonne brillance de $10\,220\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ à 338 nm (tableau 4.1). Cependant, la section efficace en absorption 2P mesurée s'est avérée faible, à 4 GM. Ils avaient précédemment publié un composé d'euporium avec un ligand tris-dipicolinate possédant une section efficace plus élevée, à environ 30 GM par antenne mais qui n'était pas adapté à une utilisation *in vivo* [143].

À 16 GM par antenne Virginie Placide a étudié une antenne aryl-alcyne picolinate avec un groupement methoxy comme donneur couplée sur les trois amines du

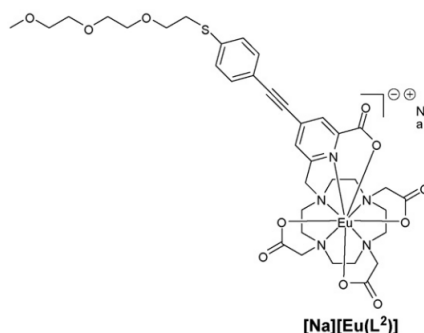


FIGURE 4.1 – Structure du composé $[Na][Eu(L^2)]$ - figure de la publication [34]

macrocycle tris-picolinate-triazacyclononane (TACN) (fig.4.2). Ce composé est appelé $[EuL^1]$ dans la publication [35]. Cette structure permet d'obtenir un complexe neutre. Les propriétés spectroscopiques sont récapitulées dans le tableau 4.1 à la p. 170. Ce complexe est un des plus brillants et possède une section efficace 2P de 49 GM, soit 16 GM par antenne ce qui est mieux que le complexe présenté précédemment $[Na][Eu(L^2)]$.

Ce complexe n'est cependant pas soluble dans l'eau mais des images sur cellules fixées par paraformaldehyde (PFA) ont pu être réalisées en solubilisant le composé dans du DMSO/PBS.

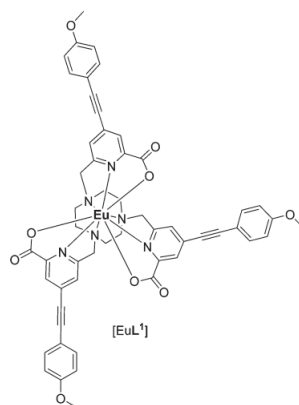
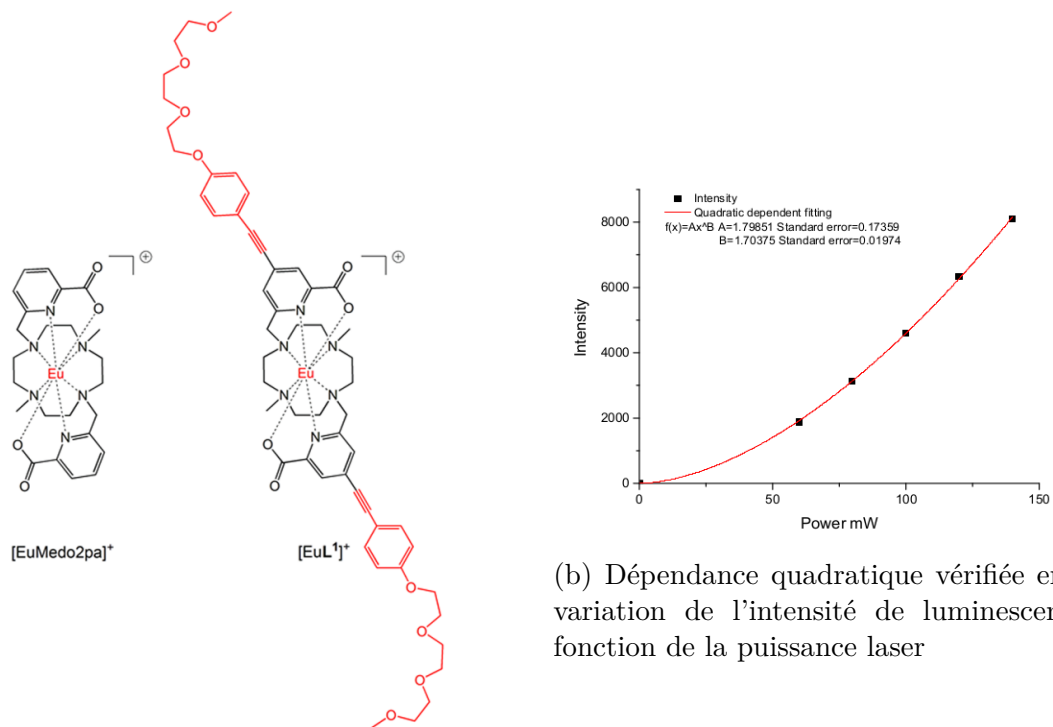


FIGURE 4.2 – Structure du composé $[Eu(L^1)]$ - figure de la publication [35]

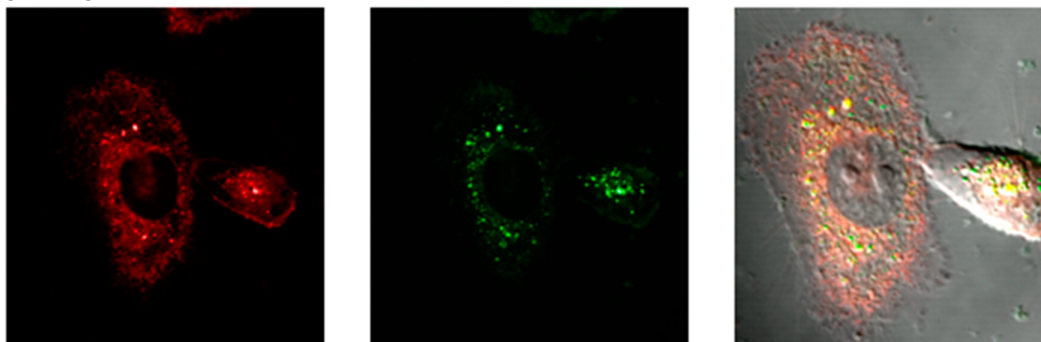
À 50 GM par antenne À partir d'un macrocyle publié en 2012 par l'équipe de C. Platas-Iglesias, $[EuMedo2pa]^+$ [144], Ahn Thy Bui a publié un nouveau complexe de lanthanide, cationique, présentant une très bonne absorption 2P, $[EuL^1]^+$ présenté sur la fig. 4.3a. Le lanthanide est complexé dans une structure H2Me-DODPA (= 6,6 -((4,10-diméthyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,7-diyl)bis(méthylène))dipicolinic acid). L'antenne est fortement π -conjuguée et est PEGylée pour rendre le complexe soluble en solution aqueuse.

Les propriétés d'absorption 2P ont été mesurées dans le méthanol avec une source



(b) Dépendance quadratique vérifiée entre la variation de l'intensité de luminescence en fonction de la puissance laser

(a) Structure des complexes [EuMedo2pa]⁺ et [EuL¹]⁺



(c) Imagerie confocale de cellules T24 incubées avec, à gauche, [EuL¹]⁺ pendant 4h à 10 μM excité à λ_{ex} = 780 nm ; au milieu, localisation de Nile Red à 10 μM excité à λ_{ex} = 561 nm (1P) qui colore les membranes lipophiles vésiculaires ; à droite, colocalisation et superposition avec l'image transmise

FIGURE 4.3 – Étude des propriétés 2P et d'internalisation sur cellule du complexe [EuL¹]⁺ - figures de la publication [36]

laser Ti/sapphire (700-900 nm). En excitant à 750 nm, la variation de l'intensité d'émission de l'euporium est mesurée en fonction de l'intensité de laser et une dépendance quadratique, caractéristique du 2P, a été vérifiée (voir fig. 4.3b).

En incubant les cellules T24 avec ce composé, ils ont observé une internalisation dans les cellules de forme vésiculaire. La figure 4.3c montre une colocalisation du *tracker* Nile Red, qui colore les membranes lipophiles vésiculaires, avec le complexe d'euporium. $[EuL^1]^+$ semble s'internaliser par une voie endocytique ou pinocytique. Ce résultat concorde avec les recherches de D. Parker sur l'internalisation des complexes de lanthanides : les complexes cationiques s'internalisent mieux par macropinocytose que les complexes anioniques ou neutres souvent imperméables à la membrane cellulaire [145].

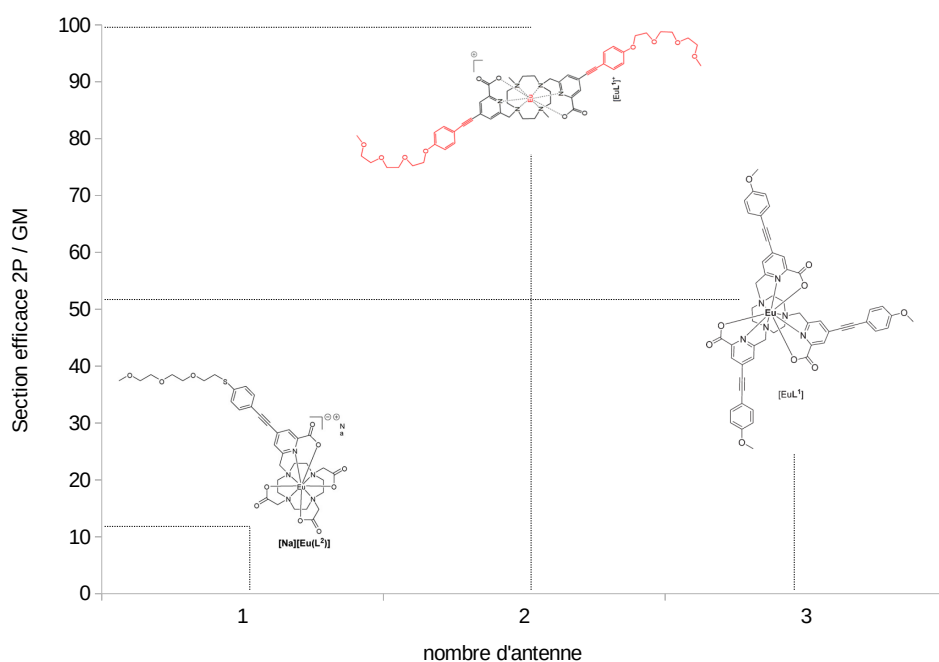
La section efficace 2P a été mesurée à 100 GM à 700 nm pour le composé soit 50 GM par antenne.

Sur ces trois exemples, une antenne similaire sensibilise l'euporium mais chaque composé possède des macrocycles différents et un nombre d'antennes couplées sur le macrocycle différent. On remarque que la section efficace 2P n'augmente pas en fonction du nombre d'antenne (fig.4.4a). Il y donc une possibilité de trouver un complexe avec une seule antenne, comme nos précédents complexes, mais avec de meilleures propriétés 2P.

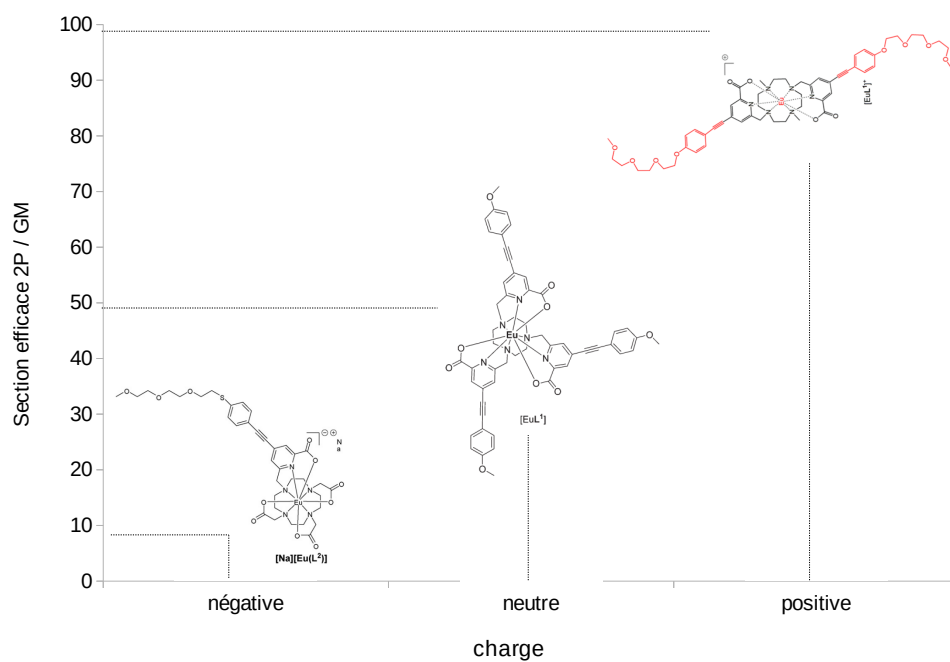
Ces composés se différencient également par leur charge : le premier présenté est anionique, le second neutre et le dernier cationique. Ils sont présentés en ordre croissant de la valeur de leur section efficace 2P. Il se peut qu'il y ait une corrélation entre la charge et la section efficace (fig.4.4b). Nos premiers complexes $LnL_1 LnL_2$ sont chargées négativement : ils ont alors, sous cette conjecture, probablement une mauvaise absorption 2P. Le développement de nouveaux complexes neutres ou cationiques permettra peut-être d'obtenir une meilleure absorption 2P.

| Complexe | λ_{ex} / nm | ϵ / $M^{-1}cm^{-1}$ | ϕ | B / $M^{-1}cm^{-1}$ | Section efficace 2P / GM |
|---------------------------|------------------------|---------------------------------|--------|------------------------|-----------------------------|
| $[EuL^2]^- (H_2O)$ | 338 | 36000 | 0.28 | 10220 | 4 |
| $[EuL^1] (MeOH)$ | 338 | 58 000 | 0.48 | 27840 | 49 |
| $[EuL^1]^+ (MeOH)$ | 345 | 47000 | 0.07 | 3290 | 100 |
| $[Eu(CPAD)3]^{3-} (DMSO)$ | 360 | - | 0.32 | - | 857 |

TABLE 4.1 – Propriétés spectroscopiques des composés présentés : $[EuL^2]^-$, $[EuL^1]$, $[EuL^1]^+$ publiés par l'équipe d'O. Maury et $[Eu(CPAD)3]^{3-}$ d'A. Bettencourt-Dias



(a) en fonction du nombre d'antenne



(b) fonction de la charge

FIGURE 4.4 – Section efficace 2P des complexes $[Na][Eu(L^2)]$, $[Eu(L^1)]$, $[EuL^1]^+$ présentés en fonction du nombre d'antenne et en fonction de la charge

Travaux d'A. de Bettencourt-Dias et al.

Au cours de nos recherches, nous avons trouvé les travaux d'Ana de Bettencourt-Dias particulièrement intéressants pour notre objectif de trouver une autre antenne avec une meilleure absorption 2P.

Son équipe a travaillé sur le carbazole (Cz) qui semble connu pour ses bonnes propriétés 2P. Le groupement Cz est constitué d'un hétérocycle à 5 carbones avec un azote intracyclique qui constitue un pont entre les deux phényles situés de part et d'autre de ce cycle.

L'équipe de De Bettencourt-Dias a d'abord travaillé sur le carbazole couplé à un dipicolinate pour une utilisation en tant qu'antenne pour l'Eu³⁺ et le Tb³⁺.

Leur composé K₃[Ln(dipicCbz)₃] (dipicCbz : 4-(9H-carbazol-9-yl) pyridine-2,6-dicarboxylic acid) est représenté sur la figure 4.5a. Le spectre d'absorption s'étale de 280 nm jusqu'à 410 nm. Ils ont mesuré le niveau d'énergie singulet à 26 030 cm⁻¹ et le niveau triplet à 23 460 ± 350 cm⁻¹. Le composé sensibilise bien le Tb³⁺ [37] et également l'Eu³⁺ [146]. Pour rappel, le niveau ⁵D₄ du Tb³⁺ se situe à 20 400 cm⁻¹ et le niveau ⁵D₀ de l'Eu³⁺ se situe à 17 300 cm⁻¹.

En 2020, ils ont adapté le composé K₃[Ln(dipicCbz)₃] pour qu'il puisse acquérir des propriétés d'absorption bi-photonique en augmentant la π-conjugaison de l'antenne. L'ajout d'un phényle supplémentaire et d'un alcyne vont dans ce sens. Ces nouveaux composés sont constitués d'une antenne Cz-phenylalcyne sur le dipicolinate, CPAD²⁻ (4-((4-(9H-carbazol-9-yl)phenyl)ethynyl)pyridine-2,6-dicarboxylate) ou sur CPAP⁴⁻ (2,2-(4-((4-(9H-carbazol-9-yl)phenyl)(pyridine-2,6-diyl)bis(methylene)dimalonate) représentés sur la fig. 4.5b.

[Eu(CPAD)₃]³⁻ sensibilise bien l'euporium et le complexe d'euporium a un rendement quantique de 31.7% dans le DMSO. Les études en 2P ont montré une très bonne absorption 2P : la section efficace a été mesurée à 857 GM pour ce composé K₃[Eu(CPAD)₃] dans du DMSO à λ_{ex} = 750 nm [38] soit 285 GM par antenne. Cependant, le composé ne semble soluble que dans le DMSO et la structure dipic n'est pas adaptée à une utilisation *in vivo*. Pour le composé [Eu(CPAP)]⁻, son rendement quantique a été mesuré à 35.8% dans le DMSO mais est seulement 2.7% dans l'eau contenant 10% DMSO que l'auteur considère être à cause des vibrations O-H (deux molécules d'eau dans la sphère de coordination). En revanche, la section efficace 2P reste assez haute dans l'eau (10% DMSO) et dans le DMSO, elle a été mesurée à 228 GM. Ce complexe pourrait être utilisé pour de l'imagerie 2PA en biologie mais il nécessite une solubilisation par au moins 10% de DMSO

Néanmoins, cette idée d'antenne avec le phénylcarbazol peut être intéressante pour notre projet d'améliorer l'absorption 2P mais couplé sur un macrocycle.

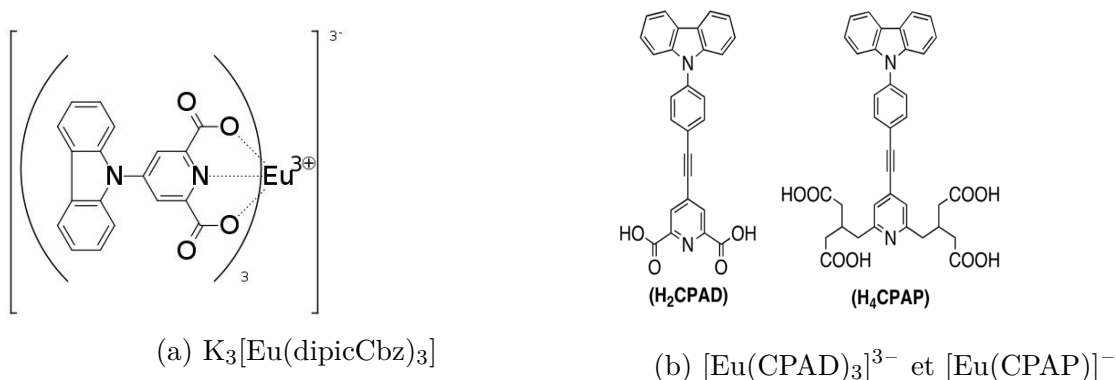


FIGURE 4.5 – Structure des composés $K_3[Eu(dipicCbz)_3]$ et du ligand CPAD du composé $K_3[Eu(CPAD)_3]$ - figure des publications [37] et [38]

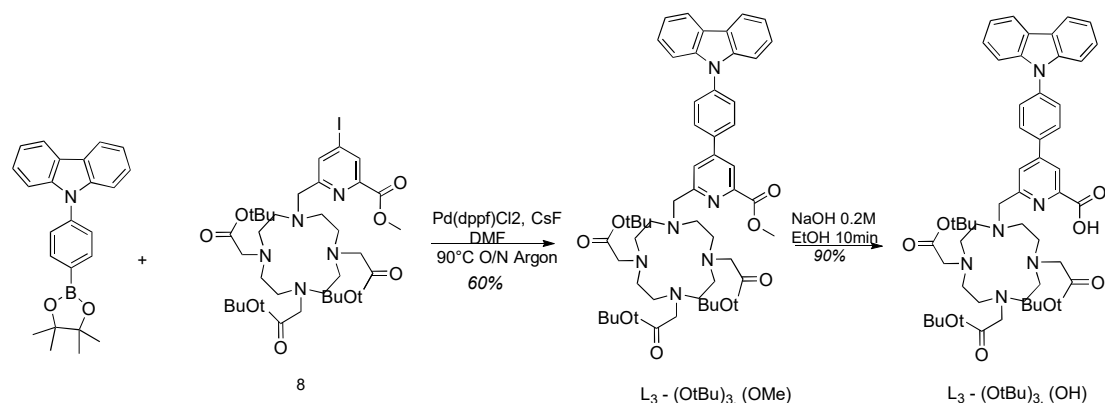
4.1.2 Une nouvelle antenne à absorption 2P : L_3

Un composé intermédiaire entre le composé de de Bettencourt-Dias et le ligand L_1 qui serait capable de sensibiliser l'euprium, a été développé. L'alcyne a été supprimé au vu des problèmes mentionnés précédemment (addition du thiol de la cystéine sur la triple liaison ; voir fig.2.2.9 p.122). Le carbazole prend le rôle de donneur d'électron et le picolinate prend le rôle d'accepteur d'électron. Ce nouveau ligand est appelé L_3 .

Synthèse de $m(EuL_3)TAT$

Synthèse du pro-ligand $L_3-(OtBu)_3, (OH)$ La synthèse est représentée sur la figure 4.6 et suit une stratégie par voie « tBu ». Le phénylcarbazole sous forme d'ester boronique est commercial. Il est couplé au $DO3(AtBu)IPA(Me)$ (8) par réaction type Suzuki-Miyaura avec ajout de CsF (comme pour la synthèse de L_1) avec un rendement de 60%. L'ester méthylique du picolinate est ensuite déprotégé par de la soude 0.2M dans de l'éthanol pendant 10 min à température ambiante (rendement de 90%). Le composé est purifié sur HPLC préparative. On obtient le pro-ligand protégé désiré $L_3-(tBu)_3, (OH)$ prêt à être couplé sur peptide.

Couplage sur peptide TAT et métallation Le ligand déprotégé et complexé au lanthanide n'est pas soluble dans l'eau ; il est donc impossible de coupler le complexe directement sur peptide. Nous avons choisi de coupler le pro-ligand sur le peptide encore sur résine. Le peptide choisi est le peptide TAT qui est un peptide chargé positif et court, rapide à synthétiser, dont ses propriétés CPP seront utiles pour des tests cellulaires d'internalisation. Le pro-ligand $L_3-(tBu)_3, (OH)$ est alors couplé sur une lysine additionnelle en N-terminal de la séquence TAT selon la méthode décrite pour la voie « tBu » (partie 1.5) puis le conjugué est métallé à l' $EuCl_3$ dans l'eau à pH 7 puis purifié en éluant sur une colonne Oasis (HLB, Waters) l'excès de sels à l'eau puis en éluant le peptide par de l'acétonitrile et eau (9 :1, 0.1%TFA).

FIGURE 4.6 – Schéma de synthèse du pro-ligand $L_3-(OtBu)_3,(OH)$

Nous obtenons le peptide $m(EuL_3)TAT$ caractérisé par HPLC analytique et MS (fig.4.7).

Propriétés spectroscopiques de $m(EuL_3)TAT$

Le peptide $m(EuL_3)TAT$ a été solubilisé à $10 \mu M$ dans une solution tampon HEPES à $10 mM$ à pH 7.4.

Spectre d'absorption Le spectre d'absorption est représenté en ligne rouge sur la figure 4.8a et montre un maximum vers 290 nm et une bande large centrée vers 350 nm qui s'étend jusqu'à 450 nm qui est due au transfert de charge intra-ligand (ILCT) ; une petite structure étroite est présente à 340 nm qui correspond également à un état électroniquement excité du carbazole [147] [148]. Sur la figure 4.8b, l'évolution du spectre d'absorbance au cours des différents ajouts d' $EuCl_3$ sur $m(L_3)TAT$ est représentée. Le spectre est au départ assez étroit autour de 340 nm ; pendant le titrage, la large bande de transfert de charge apparaît. Le CT se déplace vers le rouge avec la complexation de l'euprium ce qui est en accord avec l'acidité de Eu^{3+} qui polarise d'avantage l'antenne. Le coefficient d'extinction molaire a été calculé à $14\,500 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Spectre d'émission en temps résolu et d'excitation En excitant au maximum d'absorption à $\lambda_{ex}=340 \text{ nm}$, le spectre d'émission montre les transitions caractéristiques de l' Eu^{3+} ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_J$ ($J = 0-4$).

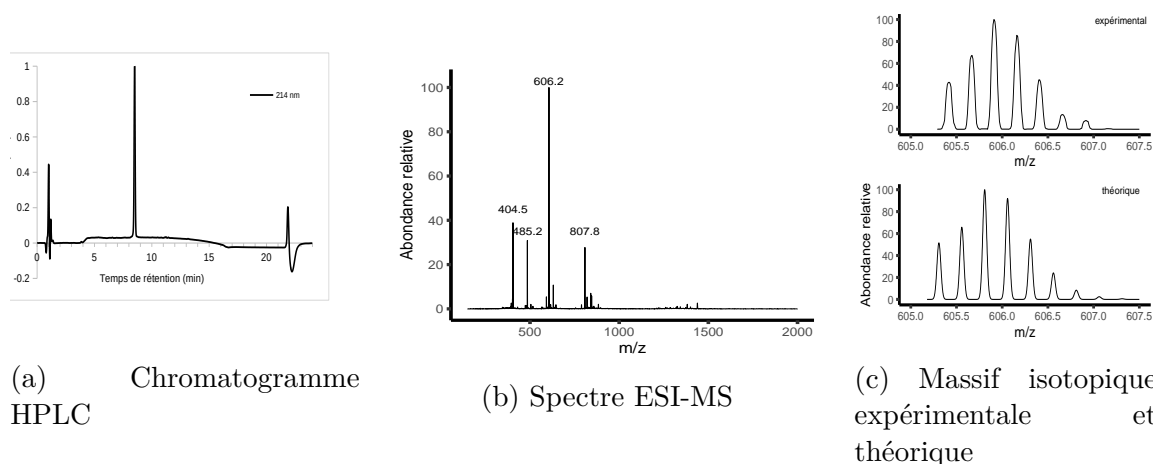


FIGURE 4.7 – Caractérisation de $m(\text{EuL}_3)\text{TAT}$. Masse calculée : $606.2 [\text{M}+4\text{H}]^{3+}$, $485.2 [\text{M}+5\text{H}]^{4+}$, $404.5 [\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ pour $\text{M}=\text{C}_{102}\text{H}_{161}\text{N}_{40}\text{O}_{20}\text{Eu}$

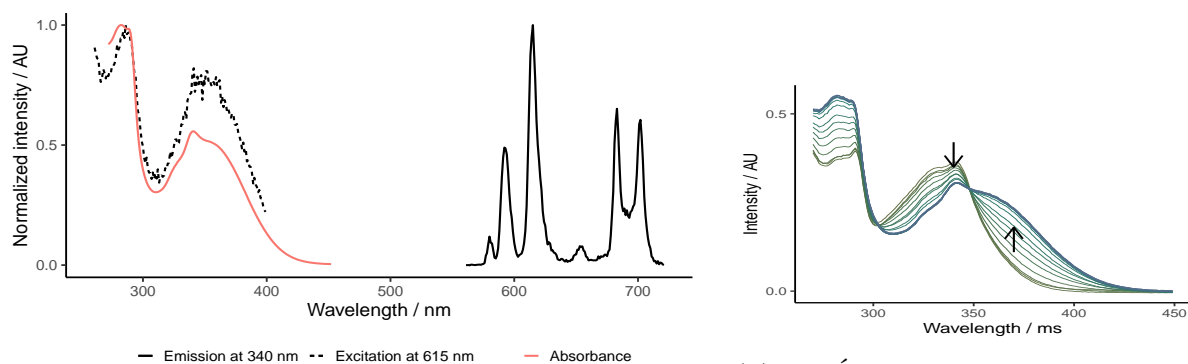


FIGURE 4.8 – Mesures spectroscopiques de $m(\text{EuL}_3)\text{TAT}$ à 10 uM , HEPES 10 mM , pH 7.4

Le spectre d'excitation pour $\lambda_{em} = 615 \text{ nm}$ correspond au spectre d'absorption confirmant que l'antenne carbazole-aryl-picolinate est bien responsable de la luminescence de l'Europium.

Temps de vie La décroissance de luminescence à $\lambda_{em} = 615 \text{ nm}$ a été mesurée puis modélisée par une décroissance mono-exponentielle. Le temps de vie calculé est de 0.74 ms , ce qui est plus court que le temps de vie du complexe $[\text{DO3A}(\text{IPA})\text{Eu}]$ (1.1 ms). On peut suspecter la présence d'une molécule d'eau dans la sphère de coordination de l'europium qui contribuerait à une désactivation non-radiative vibrationnelle. Le temps de vie du composé a alors été mesuré dans l'eau deutéré et vaut 0.97 ms . En utilisant la formule empirique de Beeby [149] (eq.4.1), on ne trouve aucune molécule

d'eau.

$$q_{Eu}(H_2O) = 1.2\left(\frac{1}{\tau(H_2O)} - \frac{1}{\tau(D_2O)} - 0.25 - 0.075\right) \quad (4.1)$$

Donc ce temps de vie plus court n'est pas expliqué par la présence d'une molécule d'eau.

Une autre explication potentielle serait un transfert inverse de l'euporium vers le triplet de l'antenne qui ajouterait une voie de désexcitation pour l'euporium. Cependant, les mesures en boîte à gant avec des solutions dégazées n'ont pas montré de variation de temps de vie par rapport à celles réalisées en condition aérée.

Par ailleurs, nous avons tenté de mesurer le niveau triplet grâce au composé $m(\text{GdL}_3)\text{TAT}$.

Spectre d'émission de $m(\text{GdL}_3)\text{TAT}$ Remplacer l'euporium par le gadolinium permet d'étudier l'émission du ligand sous les conditions d'un atome lourd à proximité (*Heavy atom effect*) sans avoir de transfert d'énergie du fluorophore au lanthanide. En effet, le Gadolinium (3+) a son niveau excité S_1 élevé à $32\,000\text{ cm}^{-1}$. Il ne peut alors pas recevoir de transfert d'énergie de la part d'un fluorophore. On a ainsi la possibilité de mesurer l'émission des niveaux intermédiaires de transfert de charge.

Le spectre d'émission de $m(\text{GdL}_3)\text{TAT}$ en temps résolu est donnée sur la figure 4.9 à la page 177. Le spectre d'émission a été mesuré à 77 K. On observe une phosphorescence du triplet (temps de vie long). La déconvolution permet, par convention, d'estimer le niveau du triplet vers $20\,700\text{ cm}^{-1}$ (première déconvolution en Gaussienne). Il est à 3400 cm^{-1} au dessus du niveau accepteur de l'euporium 5D_0 . Il a été proposé qu'un écart énergétique de 2000-4000 est optimum pour un bon transfert d'énergie. Le triplet se place dans cet écart. Donc, le niveau triplet peut être le niveau donneur en plus du niveau CT mais il reste trop haut pour accepter un transfert inverse. Un transfert d'énergie inverse vers le triplet n'est donc pas non plus la cause principale de ce temps de vie un peu plus faible que prévu.

Enfin, nous avons vérifié si des désactivations ne proviendraient pas de la rotation libre entre les liaisons C-C comme entre le phényle-carbazole et entre le phényle et le picolinate. Empêcher cette rotation est une première solution pour améliorer notre ligand. En effet, les rotations peuvent jouer à deux niveaux : l'effet antenne est moins bon à cause d'une désactivation non radiative par l'antenne ou bien le niveau CT peut être plus bas en énergie avec une antenne *twistée* ce qui favoriserait les transferts d'énergie retours. Pour ralentir les rotations, nous avons mesuré les temps de vie dans une solution à 20% glycérol (HEPES 10mM pH 7.4) : le temps de vie dans un milieu plus visqueux reste à des valeurs similaires aux mesures sans glycérol ($\tau_{glycerol} = 0.75\text{ms}$ à $\lambda_{ex} = 360\text{ nm}$). Donc, les désactivations rotationnelles ne sont pas en cause.

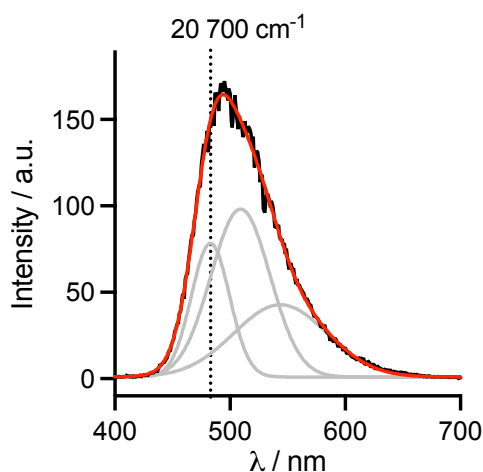


FIGURE 4.9 – Spectre d'émission en temps résolu de $m(\text{GdL}_3)\text{TAT}$ en temps résolu à 77K à $\lambda_{ex}=300$ nm (noir) et déconvolution (en gris et la somme en rouge)

Rendement quantique Le rendement quantique a été mesuré à 0.2% à $\lambda_{ex}=360$ nm. Cette valeur est très faible par rapport aux complexes TbL_1 et EuL_2 (respectivement à 62% et 17%). Notre nouvelle antenne semble être, en fin de compte, un mauvais sensibilisateur de l'euprium.

Des mesures supplémentaires ont été réalisées par O. Sénèque sur le EuL_3 dans un mélange dioxane/eau 4 :1 et dans du DMF pour voir si le rendement quantique change comme le composé de Bettancourt-Dias. Le rendement quantique a été mesuré à 5.8% ($\tau_{\text{dioxane:eau}}=1.10$ ms) et 13% ($\tau_{\text{DMF}}=1.25$ ms) respectivement. L'évolution du rendement quantique a été liée au paramètre empirique de polarité du solvant $E_T(30)$ (en kcalmol⁻¹). L' $E_T(30)$ de l'eau est de 63.1, celui du dioxane/eau 4 :1 est de 48.9 et celui du DMF de 43.7 kcalmol⁻¹ [150]. Le rendement quantique augmente donc lorsque l' $E_T(30)$ diminue (fig.4.10).

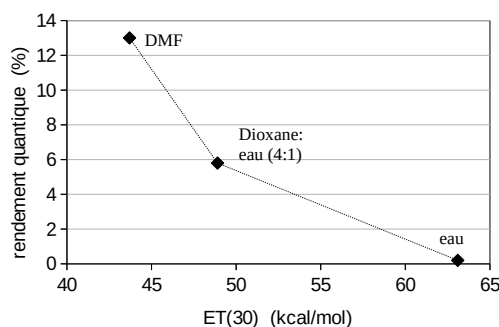


FIGURE 4.10 – Évolution du rendement quantique de $m(\text{EuL}_3)\text{TAT}$ en fonction de la valeur de l' $E_T(30)$ du solvant de mesure

Cette sensibilité au solvant est un signe que la sensibilisation passe par un niveau intermédiaire CT qui est plus ou moins stabilisé par solvatation. Nous avons donc un

composé solvatochromique.

Rendement quantique intrinsèque Le rendement quantique intrinsèque de l'Eu³⁺, ϕ_{Eu}^{Eu} est calculable à partir de l'équation 4.2 grâce à son spectre d'émission et à τ_R , le temps de vie radiative pure, qui est à déterminer à partir de l'équation 4.3 [109].

$$\phi_{Eu}^{Eu} = \frac{\tau_{Eu}}{\tau_R} \quad (4.2)$$

$$\frac{1}{\tau_R^{-1}} = A_{MD,0} n^3 \frac{I_{tot}}{I_{MD}} \quad (4.3)$$

avec $A_{MD,0}$ la probabilité d'émission spontanée de la transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ qui vaut 14.65 s^{-1} , n l'indice de réfraction du milieu (la valeur est prise à 1.33 pour l'eau), I_{tot} l'aire totale de l'émission corrigée de Eu³⁺ et I_{MD} l'aire de la bande de transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$.

A partir du rendement intrinsèque, on peut déterminer l'efficacité de sensibilisation de l'antenne, $\eta_{sens}^{antenna}$, à partir de l'équation 4.4. Cette valeur permet de quantifier le transfert d'énergie de l'antenne vers l'Eu³⁺.

$$\phi_{Eu}^{antenna} = \eta_{Eu}^{antenna} \phi_{Eu}^{Eu} \quad (4.4)$$

Pour m(EuL₂)TAT, τ_R a été calculé à 4.8 ms ; le rendement quantique intrinsèque a été déterminé à 19% et une efficacité de transfert de 1.4%. A titre de comparaison, le [DO3A(PA)Eu] sur peptide (qui est notamment un doigt de zinc) dans la publication de G. Frémy possède un rendement quantique intrasèque de ϕ_{Eu}^{Eu} de 20.5% (et une efficacité de transfert depuis l'antenne de $\eta_{sens}^{acridone} = 0.8\%$) [109]. Or dans ce cas, l'antenne n'est pas couplé directement sur le ligand mais se trouve sur la séquence peptidique éloigné du complexe. Un autre exemple de la publication de M. Regueiro [151] présente un complexe [DO3A(PA)Eu] avec une antenne conjuguée au ligand et possède un rendement quantique intrinsèque de l'ordre de 20% et une efficacité de transfert quantitative. Dans notre cas, le rendement quantique intrinsèque est donc similaire aux valeurs de la littérature reflétant un environnement de coordination similaire ; mais le transfert d'énergie de l'antenne vers l'Eu³⁺ est mauvais par rapport au composé de M. Regueiro.

m(TbL₃)TAT Par curiosité, nous avons également métallé notre composé avec du Tb³⁺ (même condition que pour EuCl₃). Les niveaux donneurs de l'antenne et accepteurs du Tb³⁺ (5D_4 à $20\,400 \text{ cm}^{-1}$) sont trop proches favorisant les transferts inverses. Effectivement, l'intensité de luminescence du terbium est très faible mais

délectable (fig.4.11, ligne pointillée). Par ailleurs, l'écart énergétique favorable diminue à 800 cm^{-1} quand la température est diminuée à 100 K [6]. Nous avons alors réalisé les mesures d'émission en abaissant la température à l'azote liquide (77 K). L'émission de terbium était effectivement plus forte à 77 K (ligne pleine) ; les paramètres d'acquisition sont différents par rapport aux mesures en température ambiante : les fentes et la tension du photomultiplicateur sont plus petites mais l'intensité de luminescence du terbium reste bien supérieure.

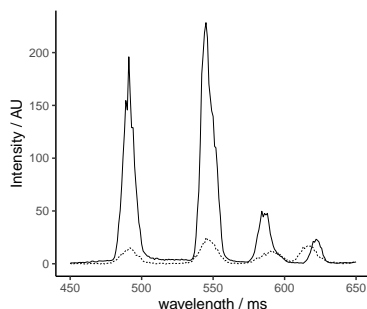
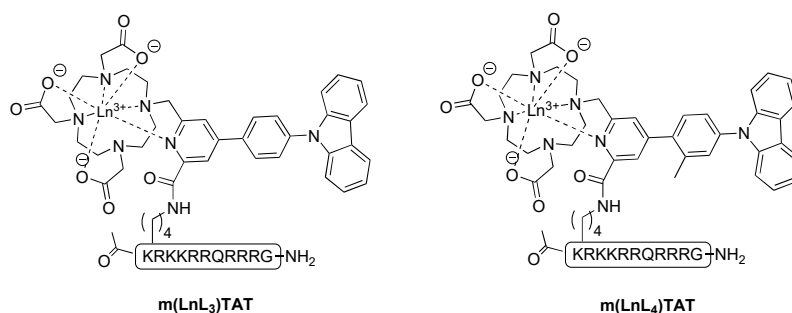


FIGURE 4.11 – Spectre d'émission en temps résolu de $m(\text{TbL}_3)\text{TAT}$ en temps résolu à température ambiante (fente = 10-10, PM 850 V) (ligne pointillée) et à 77 K (fente 5-5, PM 700 V) (ligne noire) à $\lambda_{ex} = 300\text{ nm}$ et spectre d'excitation à 77 K (tirets) à $\lambda_{em} = 500\text{ nm}$

4.1.3 Conclusion sur $m(\text{EuL}_3)\text{TAT}$

Ce nouveau ligand sensibilise mal l'euporium. Ce rendement trop faible ne permet pas d'envisager une mesure de la section efficace et il se peut qu'on ne puisse pas détecter l'émission en microscopie 2P lorsque l'on travaillera *in cellulo*. La désactivation de la luminescence de l'euporium ne provient pas d'une molécule d'eau dans la sphère de coordination ; les mesures en boîte à gant sans présence de dioxygène n'ont pas non plus montré d'influence du dioxygène ; les mesures dans le glycérol n'ont pas non plus permis d'obtenir de meilleur résultat. Le temps de vie étant inférieur au temps de vie de $[\text{DO3A}(\text{PA})\text{Eu}]$, il doit y avoir un processus de désactivation comme un retour transfert vers le CT.

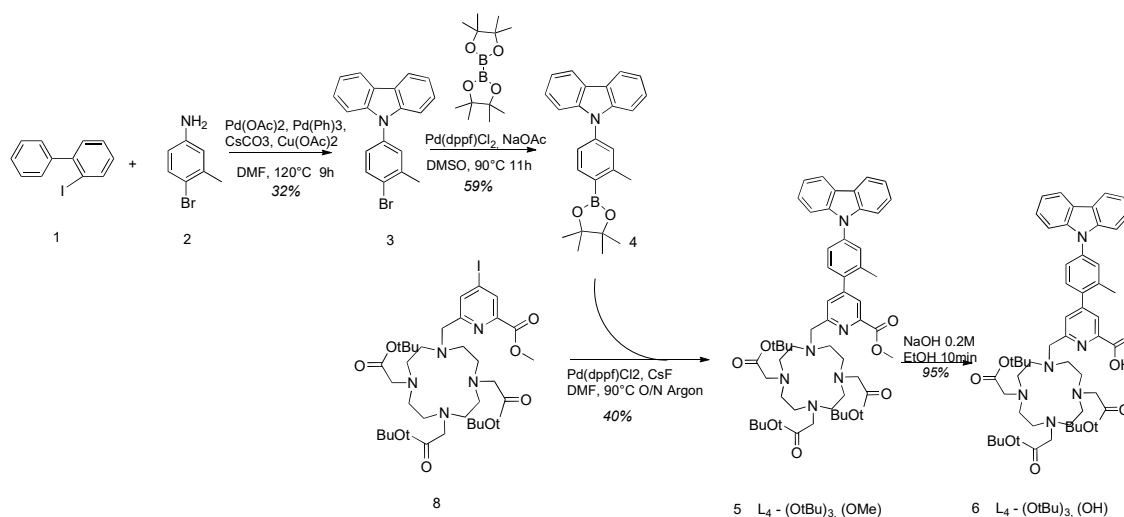
En s'inspirant du ligand L_1 et des travaux associés [112], les propriétés de l'antenne constituée d'un biaryle avient été améliorées par l'ajout d'un groupe ortho-Me sur le phényle. Le rendement quantique est au départ de 30% et augmente à 74% avec cette modification. L'idée est de réduire la rotation libre aryle-aryle qui peut être responsable de désactivation non-radiative. En rajoutant un groupe méthyle, la gêne stérique pourra forcer le maintien d'une torsion entre le phénylcarbazole et le picolinate. Nous avons donc décidé de synthétiser un nouveau ligand similaire au L_3 mais avec un groupe ortho-Me. Ce ligand est appelé L_4 .

FIGURE 4.12 – Structure des composés $m(\text{EuL}_3)\text{TAT}$ et $m(\text{EuL}_4)\text{TAT}$

4.1.4 Effet d'un groupement ortho-Me : L_4

Synthèse du composé $m(\text{EuL}_4)\text{TAT}$

Synthèse du pro-ligand $L_4-(\text{OtBu})_3, (\text{OH})$ Le principe de la synthèse du composé (3) de la fig. 4.13 est adapté des travaux de Liu [39] qui fait intervenir l'activation d'une liaison C-H par une réaction catalysée par le palladium. Les conditions de réaction sont modifiées pour diminuer la part des sous produits formés. Le 2-iodobiphényl (1) réagit avec le 4-Bromo-3-méthylaniline (2) en présence de 5 mol% d'acétate de palladium, de 10 mol% triphénylphosphine, d'acétate de cuivre et de la base césium carbonate dans du DMF à 90°C pendant 24h. On forme le produit (3) 9-(4-bromo-3-méthylphényl)-9H-carbazole qui est purifié par colonne sur silice. Le rendement est modeste (32%).

FIGURE 4.13 – Schéma de synthèse du ligand $L_4-(\text{OtBu})_3, (\text{OH})$

Mécanisme de réaction : L'auteur propose deux mécanismes de réaction présentés

sur la figure 4.14 à la page 182 tirée de sa publication [39]. Le premier mécanisme proposé est nommé « Path A » sur la figure 4.14, commence par une addition oxydante de l'iodobiphényle sur le Pd(0) pour former le composé A. Le Pd(0) est oxydé en Pd(II). Il est formé un palladacycle B qui est oxydé par Cu(OAc)₂ pour former le palladacycle C. L'aniline se coordine au Pd pour formé l'intermédiaire D puis le composé final est obtenu par élimination réductrice. Le deuxième mécanisme, nommé « Path B », passe par le cross-couplage intermoléculaire entre le composé A et l'aniline. Le Pd(OAc) se lie à l'amine de l'aniline et permet l'activation de la liaison C-H du phényle pour former le composé E. La perte des OAc donne le composé F qui permet d'obtenir le composé désiré après élimination réductrice.

A partir du produit (3) de la fig. 4.13, le composé (4) (9-(3-méthyl-4-(4,4,5,5-tetraméthyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phényl)-9H-carbazole) est synthétisé par borylation avec 1.5 éq. de bis(pinacolato)diboron [152] en présence de 5 mol% de bis(diphénylphosphino)ferrocène palladium(II)dichlorure Pd(dppf)Cl₂, 2 éq. d'acétate de potassium dans du DMSO à 90°C pendant 8h avec un rendement de 59%. Le composé (4) est couplé au composé DO3(*AtBu*)(*IPA*)*Me* (8) par réaction de type Suzuki-Miyaura (modifiée) dans du DMF pour obtenir le composé (5) avec un rendement de 40%. Le composé est solubilisé dans du diéthyle éther pour éliminer l'oxyde de phosphine insoluble par centrifugation. Sans purification supplémentaire, l'ester méthylique du picolinate est hydrolysé par la soude 0.2M dans de l'éthanol en 10 min (rendement 95%). On obtient le ligand protégé L₄-(tBu)₃, (OH) qui est purifié sur HPLC préparative. Cette synthèse a l'avantage d'éviter plusieurs purifications sur silice.

Couplage sur peptide et métallation De même que pour m(EuL₃)TAT, la synthèse suit la voie « tBu » sur le peptide TAT monomérique.

Propriétés spectroscopiques

Spectre d'absorbance Le spectre d'absorbance du peptide m(EuL₄)TAT (fig.4.15, ligne pleine) a un profil similaire au spectre d'absorbance d'un phénylcarbazole avec une bande structurée vers 290 nm et une autre bande structurée à 328 nm et un épaulement large vers 360 nm attribué au CT. Ici, la bande de CT est déplacée vers le bleu rapport à EuL₃ (fig.4.15, ligne pointillée). Le composé m(L₄)TAT a été titré à l'EuCl₃ et l'absorbance a été mesurée à chaque ajout (fig. 4.16b). La dernière bande s'élargit légèrement (voir figure 4.16b) avec la coordination du lanthanide montrant que l'antenne subit les effets de l'acidité de l'Eu³⁺. On observe le déplacement du CT vers de plus hautes longueurs d'onde. Le coefficient d'absorption molaire a été calculé par ce titrage à 17 500 L mol⁻¹ cm⁻¹.

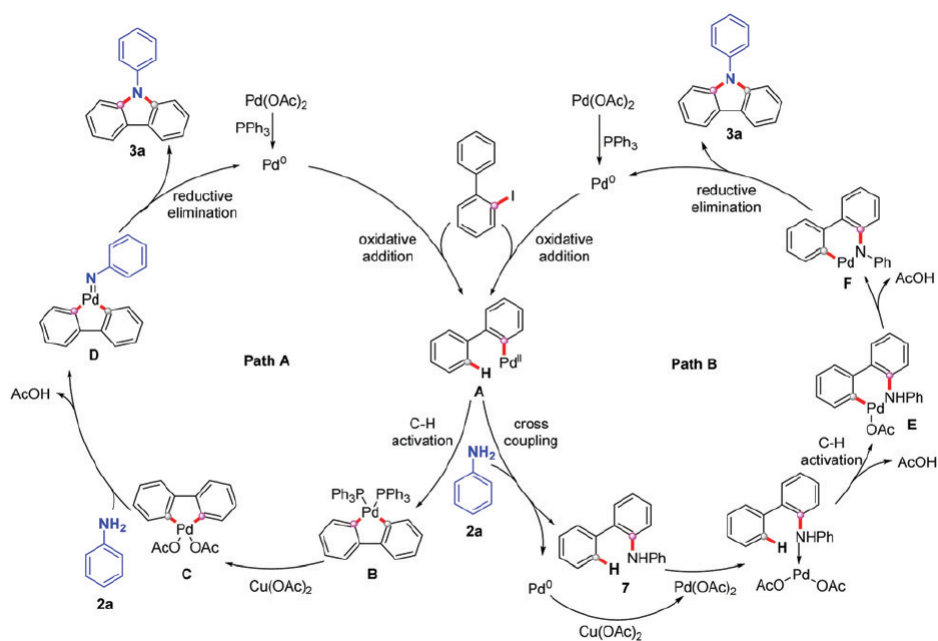


FIGURE 4.14 – Mécanisme proposé par l'équipe de Q. Song, figure tirée de la publication associée [39]

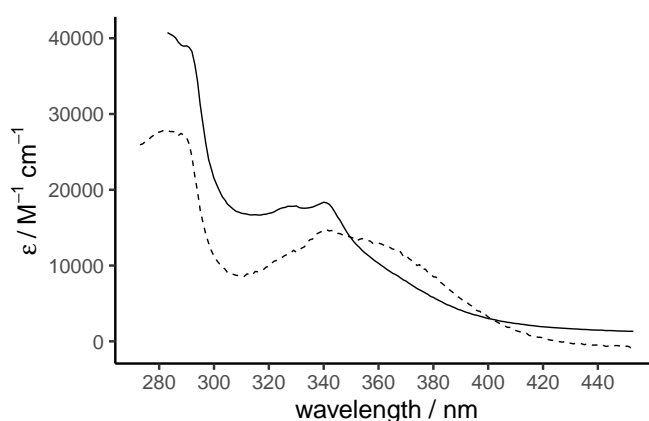
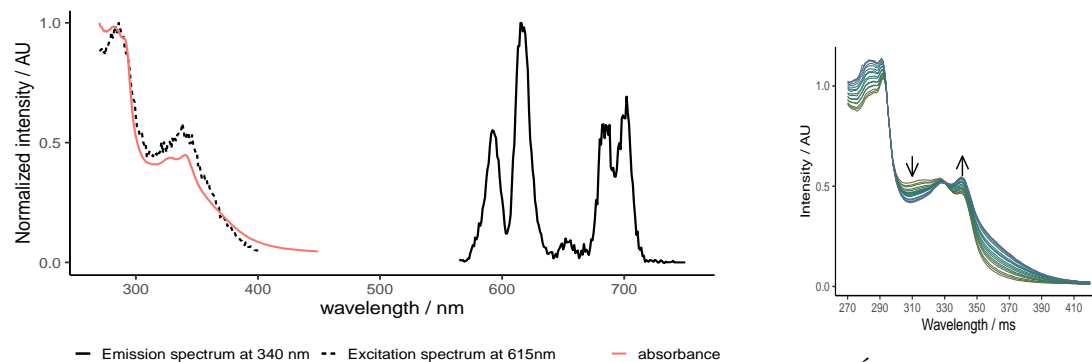


FIGURE 4.15 – Comparaison des absorbances de m(EuL₃)TAT (tirets) et m(EuL₄)TAT (ligne pleine)



(a) Spectre d'émission en temps résolu (ligne pleine) (fente 10-5 PM 850 V) et spectre d'excitation de l' Eu^{3+} (tirets) respectivement à $\lambda_{ex}=340\text{nm}$ et $\lambda_{em}=615\text{nm}$, absorbance (rouge)

(b) Évolution du spectre d'absorbance durant la titration par l' EuCl_3 jusqu'à 2 éq.

FIGURE 4.16 – Mesures spectroscopiques de $m(\text{EuL}_4)\text{TAT}$ à $10\ \mu\text{M}$, HEPES $10\ \text{mM}$, pH 7.4

Spectre d'émission en temps résolu et d'excitation Le spectre d'émission en temps résolu sur la figure 4.16a montre les transitions caractéristiques de l'euporium et le spectre d'excitation a un profil similaire au spectre d'absorption indiquant que l'émission de l'euporium a bien été sensibilisée par l'antenne.

Temps de vie et rendement quantique La décroissance de luminescence à $\lambda_{em}=615\ \text{nm}$ a été modélisée par une décroissance mono-exponentielle : le temps de vie est calculé à $0.47\ \text{ms}$, inférieur à celui $m(\text{EuL}_3)\text{TAT}$ ($0.74\ \text{ms}$). Cependant, le modèle mono-exponentiel n'était visuellement pas proche des données expérimentales ($\text{RMSE} > 2$). Nous avons alors essayé également de modéliser par une double exponentielle qui semblait être plus adaptée aux données expérimentales ($\text{RMSE} 0.5$) que la simple exponentielle. On obtient un temps court $\tau_1 = 0.13\ \text{ms}$ et un temps long $\tau_2 = 0.75\ \text{ms}$ avec des amplitudes équivalentes. Il y a donc potentiellement deux chemins de désexcitation radiatives pour l'euporium. On retrouve avec ce deuxième modèle un temps long proche du temps de vie du composé $m(\text{EuL}_3)\text{TAT}$. Néanmoins, les temps de vie restent inférieurs à $1.1\ \text{ms}$, temps de vie obtenu pour un euporium dans un ligand DO3A(PA). Quant au rendement quantique, il est estimé à 0.3% à $340\ \text{nm}$. Il se différencie peu du rendement quantique de $m(\text{EuL}_3)\text{TAT}$. Les mesures en condition d'anaérobie n'ont pas été réalisées par manque de produit.

4.1.5 Discussion

L'introduction d'un ortho-Me avait pour but d'améliorer la sensibilisation de l'euporium par l'antenne de L_3 . En bloquant la rotation autour de la liaison C-C, une voie de désexcitation non-radiative aurait été supprimée.

Le rendement quantique n'a pas été amélioré selon nos espérances pour le composé $m(\text{EuL}_4)\text{TAT}$. Au contraire, le transfert de charge a été défavorisé comme on le voit sur le spectre d'absorbance avec le CT déplacé vers le bleu par rapport à EuL_3 . Cela est dû à une diminution de la conjugaison π par un arrangement probablement perpendiculaire du phényle et de la pyridine. L'ortho-Me ajoute par ailleurs une torsion entre le phényle et le carbazole et entre le phényle et le picolinate. L'angle entre le carbazole et un phényle non substitué est de 47.66° d'après les études de Shimin Hu et al [152]. L'ajout de méthyle sur le phényle (comme sur le L_4) ajoute une répulsion stérique en plus et augmente l'angle de 13.77° . Cette forte torsion rend les groupements davantage perpendiculaire et réduit la conjugaison π .

D'ailleurs, la revue de Shunsuke Sasaki et al.[40] expliquent que les molécules comportant un groupe électro-donneur et un groupe électro-accepteur séparés par une liaison C-C font intervenir deux processus en compétition : la désactivation à partir d'un état excité local LE ou à partir d'un état excité TICT (*Twisted Internal Charge Transfer*), plus bas en énergie. Ces deux chemins sont représentés sur la figure 4.17. La nature du CT (*Charge Transfer*) dépend de l'angle entre le donneur et l'accepteur. Plus précisément, la conformation co-planaire correspond au LE et la conformation perpendiculaire correspond au TICT. En effet, la co-planéité permet la délocalisation π . A l'inverse, la conformation perpendiculaire impose une séparation des charges et rend le processus de transfert électronique eT (*electron transfert*) favorable. Un électron est transféré de l'HOMO du donneur vers la LUMO de l'accepteur après photoexcitation formant deux radicaux.

De ce fait, LnL_3 et LnL_4 peuvent être décrits par un état excité LE ou TICT. D'ailleurs, le LE sera dans notre cas l'ICT étant donné la nature *push-pull* de notre antenne. Pour LnL_3 , la sensibilisation passe par l'ICT, illustrée par la présence de la bande de transfert de charge sur le spectre d'absorbance, mais le passage par le TICT n'est pas exclu car la rotation autour de la liaison C-C entre le phényl et le picolinate n'est pas bloquée. Quant à LnL_4 , l'encombrement stérique imposé par l'ortho-Me favorise le passage par le TICT permettant un transfert électronique. Or, l'euporium est un lanthanide qui est susceptible à la réduction. Ainsi, la faible luminescence du lanthanide peut s'expliquer par l' Eu^{3+} qui est réduit en Eu^{2+} par PeT (*Photoinduced electron transfer*). En effet, lorsque l'état $\text{Ant}^+/\text{Eu}^{2+}$ est proche en énergie de l'état $\text{Ant}/\text{Eu}^{3+*}$ (voir fig.4.18), le retour à l'état fondamental peut passer par l'état excité de l' Eu^{3+} mais peut majoritairement par l'état Eu^{2+} . Le système se désactive de manière non-radiative. On observe peu de luminescence de l' Eu^{3+} [41].

Enfin, les mesures de rendements quantiques diffèrent en fonction du solvant utilisé (eau, mélange dioxane :eau ou DMF). Dans l'eau, solvant polaire, l'état TICT et la séparation des charges par transfert d'électron est plus favorable permettant le *quench* de la luminescence par PeT alors que dans le DMF, l'état TICT l'est moins en faveur

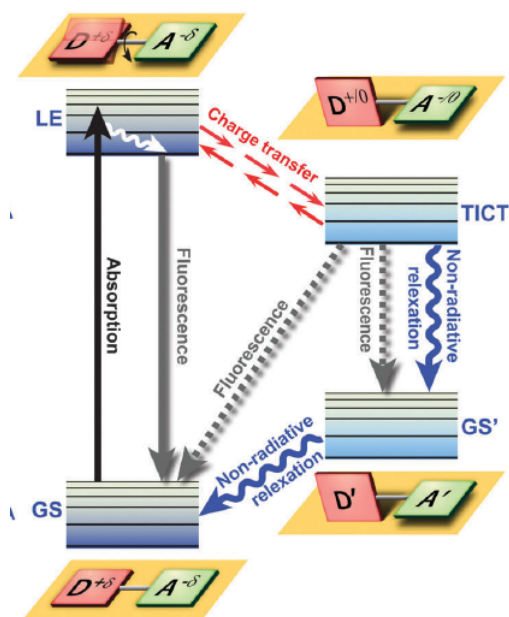


FIGURE 4.17 – Schéma de Jablonski du système D-A : D-A est excité à un niveau LE (*local excited state*) en conformation co-planaire ; après conversion interne, il peut y avoir fluorescence à partir du LE relaxé. Ou bien, le chemin d'excitation passe par le TICT en conformation perpendiculaire et émettre une fluorescence de cet état vers le niveau fondamental GS (*Ground State*) figure tirée de la publication [40]

| Sample | λ_{ex} / nm | τ / ms | ϕ / % | q | ϵ / $M^{-1}cm^{-1}$ | B |
|-------------------------|---------------------|-------------|------------|------|------------------------------|----|
| m(EuL ₃)TAT | 340 | 0.74 | 0.2 | -0.1 | 14500 | 29 |
| m(EuL ₄)TAT | 340 | 0.42 | 0.3 | - | 18900 | 56 |

TABLE 4.2 – Temps de vie de luminescence et rendements quantiques des composés m(EuL₃)TAT et m(EuL₄)TAT

de la luminescence par le LE.

4.1.6 Conclusion

Deux nouveaux complexes d'euprimum ont été synthétisés et couplés sur peptide TAT, m(EuL₃)TAT et m(EuL₄)TAT. L'antenne utilisée est un phénylcarbazole connu pour ses très bonnes propriétés d'absorption bi-photonique. La différence entre les deux composés est le groupe ortho-Me sur le phényle pour m(EuL₄)TAT.

La sensibilisation pour l'euprimum n'est pas bonne : le rendement quantique est très faible <1% rendant compte des processus de désactivations efficaces. Il peut y avoir des phénomènes de transfert retour vers l'antenne ou bien du PeT diminuant la luminescence de l'Eu³⁺.

Néanmoins, sachant que le milieu cellulaire est plus visqueux et plus lipophile

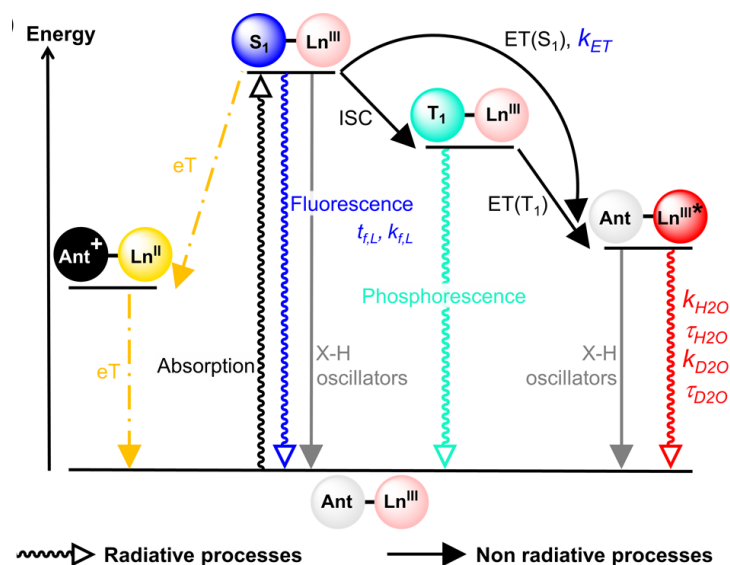


FIGURE 4.18 – Diagramme d’énergie du chemin de sensibilisation d’un lanthanide réductible : ET, transfert d’énergie de l’antenne vers le lanthanide (S_1 ou par T_1 après ISC) pour obtenir $Ant - Ln^{3+}$ ou eT, transfert d’électron pour obtenir $Ant^+ - Ln^{2+}$ -figure de la publication [41]

et moins polaire que l’eau, il y a un espoir que nous puissions observer l’émission de l’euprimum par ces nouvelles antennes dans la cellule. C’est pourquoi nous avons tester $m(EuL_3)TAT$ et $m(EuL_4)TAT$ en milieu cellulaire malgré le mauvais rendement quantique.

En revanche, nous savons que le peptide TAT n’est pas suffisant pour une internalisation efficace. Dans la partie suivante, nous montrerons une autre stratégie d’internalisation mais utilisant toujours la séquence TAT.

4.2 Améliorer l’internalisation dans le cellules et la diffusion dans le cytosol

Les séquences CPPs que nous avons utilisées n’ont pas présenté des résultats concluants mais nous nous sommes intéressés à des dérivés du TAT car il reste un peptide CPP toujours étudié avec une littérature fournie. On sait que la séquence TAT reste majoritairement piégée dans les endosomes ; environ 2% atteint le cytosol. Des études ont montré que les TAT multimériques amélioreraient le relargage hors des endosomes avec comme facteur limitant, l’accroissement de la cytotoxicité en fonction du nombre de copies de TAT [153].

En lisant la revue de Brock [153], nous avons découvert les travaux de l’équipe de recherche de Jean-Philippe Pellois sur un dimer de TAT qui possède une haute efficacité de relargage dans le cytosol, dTAT. Il nous a semblé adapter à notre projet : une bien meilleure efficacité de diffusion dans le cytosol et une très faible toxicité pour

la cellule.

4.2.1 Travaux de J-P Pellois sur dfTAT

Le dfTAT est un dimer de TAT couplé à un fluorophore, la tétraméthylrhodamine (TMR, $\lambda_{ex} = 544$ nm, $\lambda_{em} = 570$ nm). Il est formé par liaison di-sulfure des cystéines ajoutées en N-terminal de la séquence originale de TAT. Ce dimer est cationique avec 18 charges positives (fig. 4.19).

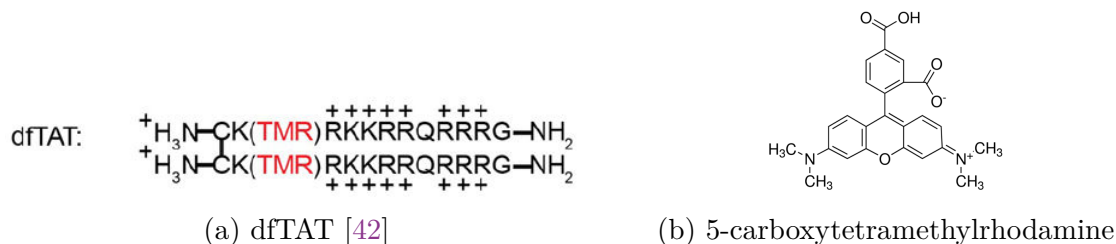


FIGURE 4.19 – Structure de dfTAT et représentation des charges [42] et structure de 5-carboxyTMR à coupler sur l'amine de la chaîne latérale de la lysine

Le dfTAT, dimérisé, et son analogue non dimérisé, acfTAT (par alkylation des cystéines, acfTAT sur fig.4.20) ont été incubés pendant 1 h sur cellule (HeLa, Neuro-2a, HDF) puis leur signature de fluorescence a été observée par microscopie de fluorescence. Le signal de fluorescence de dfTAT est diffus dans la cellule HeLa contrairement à acfTAT qui présente un signal ponctué pouvant illustrer l'emprisonnement dans les endosomes (fig. 4.20 p.188). Les résultats du dfTAT ont été reproduits avec succès sur des lignées cellulaires autres que HeLa (sur la fig.4.20, Neuro-2a et HDF) [43].

Bien que seulement 2.8% des molécules soient internalisées dans les cellules par rapport à la quantité initiale incubée, son efficacité de relargage hors des endosomes est bien plus supérieure au TAT : après une heure d'incubation, le rendement de sortie de l'endosome vers le cytosol a été estimé entre 50-90%, pour une concentration extracellulaire initiale entre 2 μM et 5 μM .

Par ailleurs, les stratégies d'internalisation peuvent altérer la viabilité de la cellule mais l'action de dfTAT s'est avérée être bénigne pour la cellule jusqu'à plus de 10 μM . Les cellules restent vivantes et prolifèrent.

Pour étudier le mécanisme de pénétration, l'influence de plusieurs inhibiteurs de l'endocytose a été étudiée. La pénétration de la dfTAT est inhibée par un inhibiteur de la macropinocytose (amiloride), et un inhibiteur de la V-ATPase (bafilomycin), tandis qu'un inhibiteur de la voie caveolae (filipin) et celle de la clathrin (chlorpromazine) n'ont eu que peu d'effets. La voie par macropinocytose et l'acidification des endosomes sont donc des étapes importantes pour la pénétration de dfTAT.

Le dfTAT passe donc par une voie macropinocytique ; le peptide se trouve dans les endosomes primitifs qui mûrissent en endosomes tardifs puis s'en échappent à

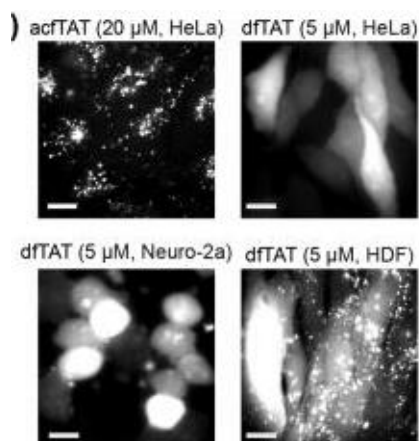


FIGURE 4.20 – Diffusion de dfTAT dans le cytosol dans différentes lignées cellulaires (HeLA, Neuro-2-a et HDF) contre le monomère acfTAT. Localisation cellulaire de dfTAT (5 μ M) et de son monomère (20 μ M) par microscopie par fluorescence après 1h d'incubation. L'émission de TMR est mesurée à 560 nm,[43]

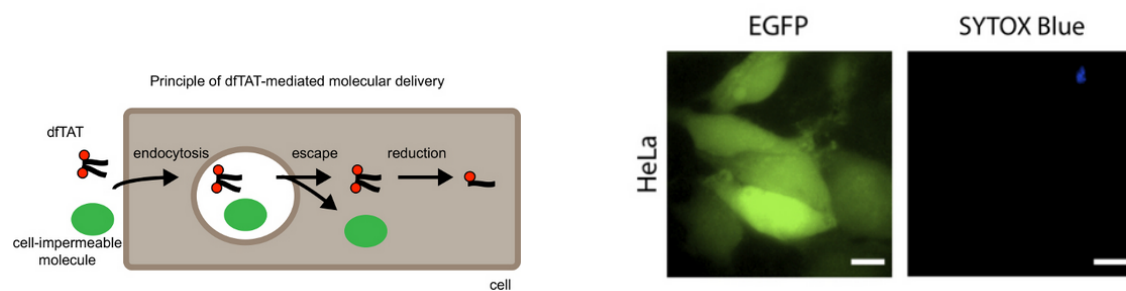
condition d'atteindre une certaine concentration seuil. Il a aussi besoin de lipides anioniques *bis*(monoacylglycero)phosphate (BMP) qui se trouvent sur la membrane des endosomes tardifs [43].

Translocation de protéine Une propriété très intéressante du dfTAT est qu'il est possible d'internaliser des molécules d'intérêt (MOI : molécule d'intérêt) par co-incubation. La MOI n'a donc pas forcément besoin d'être couplé à un CPP.

Les étapes sont schématisées sur la figure 4.21a. Les deux composés, dfTAT et MOI, sont internalisés par la cellule dans des endosomes ; la MOI suit les mêmes étapes avant relargage hors des endosomes tardifs. Le dfTAT est réduit lorsqu'il atteint le cytosol qui est un milieu réducteur.

De « grosses » molécules ont pu être internalisées par cette stratégie de co-incubation, comme l'EGFP qui ne peut pas traverser la membrane cellulaire ainsi que des MOF (*metal organic framework*)[44] [154] [155]. La figure 4.21b montre un signal de fluorescence de l'EGFP diffus dans le cytosol et le noyau, après une heure de co-incubation avec le dfTAT. L'EGFP a donc bien été internalisée grâce à cette stratégie. L'absence de coloration bleue par le Sytox Blue (indicateur de cellules mortes [156]) montre que la viabilité des cellules n'a pas été altérée par l'internalisation des deux composés.

Toutefois, les auteurs de l'étude rappellent que chaque MOI est différente et peut donner des résultats variés ; il est déconseillé d'utiliser le dfTAT avec un composé chargé négativement au risque de s'agréger avec le dfTAT.



(a) Schéma du principe d'internalisation du dfTAT et d'une molécule par co-incubation

(b) à gauche, image en microscopie de fluorescence de la co-incubation d'EGFP (10 μ M) et dfTAT (5 μ M) sur cellules HeLa pendant 1 h ; à droite, Sytox Blue

FIGURE 4.21 – Internalisation d'une protéine par co-incubation avec dfTAT -figure de la publication [44]

4.2.2 Adaptation à notre projet

Le dfTAT semble être une bonne piste car il est bien plus efficace que d'autres CPPs pour s'échapper des endosomes, et car on peut utiliser la stratégie de co-incubation.

Pour rappel, l'objectif de la thèse est de développer des sondes peptidiques pour le Zn^{2+} basées sur la luminescence des lanthanides et utilisables *in cellulo*. L'utilisation du dfTAT en co-incubation serait un atout car il permet d'internaliser une plus grande quantité de molécules que le TAT et de pouvoir s'échapper efficacement des endosomes.

D'abord, nous avons synthétisé ce dfTAT pour vérifier ses propriétés. Le fluorophore utilisé est la lissamine, directement disponible au laboratoire. La lissamine est une sulforhodamine vendu sous forme de chlorure de sulfonyle. Il est représenté sur la figure 4.22.

Dans un second temps, nous avons remplacé le fluorophore organique par un de nos complexes de lanthanides et vérifié que le dfTAT modifié conserve ses propriétés d'internalisation malgré la modification du fluorophore. En effet, les propriétés de polarité, d'hydrophobicité du groupement fluorophore participe aux propriétés de pénétration [142] [131]. De plus, l'internalisation de complexes de lanthanide à propriété d'absorption 2P sur cellule vivante est encore peu documentée dans la littérature. Cette structure dimère pourrait donc être un nouveau moyen pour internaliser des complexes de lanthanides 2P.

Enfin, nous avons testé la méthode dfTAT en co-incubation pour internaliser des complexes de lanthanides couplés sur un peptide TAT monomérique (mTAT).

Cependant, le fluorophore organique du dfTAT peut gêner la luminescence des lanthanides, par exemple par un échange d'énergie comme de type Förster. C'est pourquoi il est devenu intéressant d'adapter le dfTAT pour le rendre non-fluorescent. Nous détaillerons nos recherches dans ce sens.

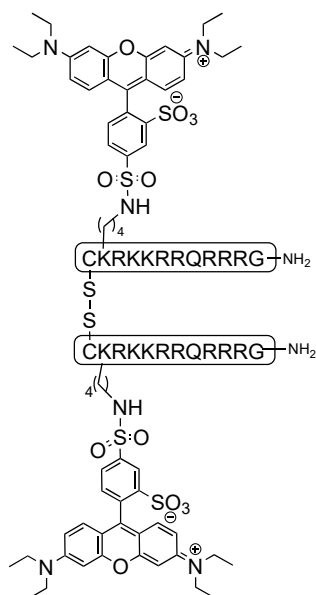


FIGURE 4.22 – Structure de df(Liss)TAT, avec la lissamine en fluorophore

4.2.3 Vérification des propriétés d'internalisation sur cellule vivante HeLa avec df(Liss)TAT

Nous ne disposions pas du fluorophore TMR pour la synthèse du dfTAT mais d'un analogue, la lissamine TMR sulfonée.

Synthèse du df(Liss)TAT

La synthèse du peptide TAT permettant de former le dimère se déroule par SPPS sur la résine MBHA. On y ajoute une lysine avec un groupement protecteur, MTT, orthogonal aux autres acides aminés. Le dernier acide aminé est une cystéine dont l'amine est protégée par un groupement Boc qui sera déprotégé au moment de la coupure du peptide de la résine au TFA.

Après déprotection du MTT par 1% TFA dans DCM, le fluorophore commercial sous forme de chlorure de sulfonyl est couplé à cette amine libre en présence de 1.5 éq de DIEA pendant une nuit. Enfin, le peptide est coupé de la résine au TFA/TIS/H₂O/thioanisole (91.5/3.5/3.5/1.5), précipité à l'éther froid puis purifié par HPLC préparative. La dimérisation par formation d'un pont disulfure entre les thiols des cystéines s'effectue dans du tampon PBS pendant 1 nuit. Le composé est purifié puis lyophilisé.

Les différentes séquences sont résumées dans le tableau 4.3 à la page 191.

| nom | séquence |
|--------------------|---|
| ZF5.3 | <i>AcK(Alloc)AFSCNVCCKAFVLSRHLNRHLRVHRRAT-resin</i> |
| mTAT pour monomère | <i>AcK(MMT)GRKKRRQRRPPQG-resin</i> |
| TAT pour dimère | <i>(Boc)CK(MMT)GRKKRRQRRPPQG-resin</i> |

TABLE 4.3 – Séquences peptidiques des CPPs présentés sur résine (les acides aminés sont protégés)

Propriétés spectroscopiques de df(Liss)TAT

Les spectre d'émission et d'excitation et le spectre d'absorbance sont représentés sur la figure 4.23. Ils concordent avec celle de la lissamine. La dimérisation a une influence sur l'absorbance avec l'exaltation d'un pic plus haut en énergie à 540 nm mais ce dernier disparaît en réduisant la liaison disulfure qui forme le dimère [157].

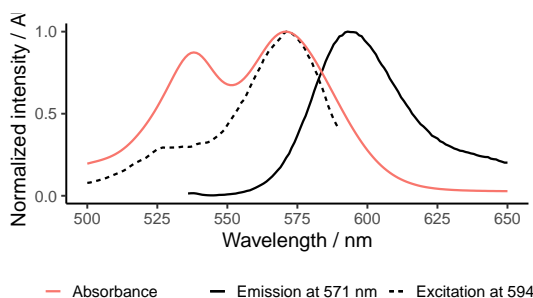
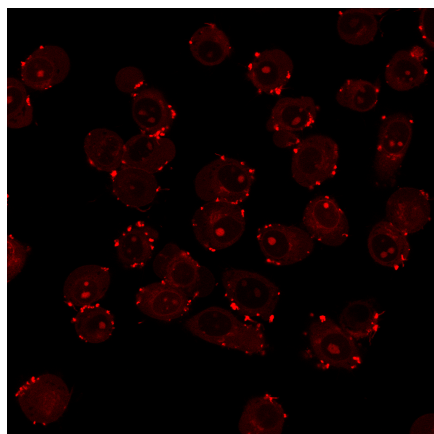


FIGURE 4.23 – df(Liss)TAT Spectre de fluorescence (ligne noire) et spectre d'excitation (tirets) respectivement à $\lambda_{ex} = 571$ nm et $\lambda_{em} = 594$ nm et spectre d'absorbance (ligne rouge)

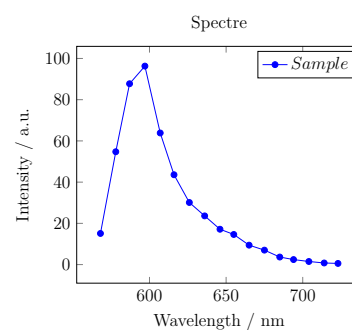
Internalisation sur cellule HeLa

Les cellules ont été incubées avec 5 μ M de df(Liss)TAT en milieu PBS. Après seulement 5 min d'incubation, nous avons observé une émission diffuse dans le cytosol et parfois un marquage des nucléoles (voir fig. 4.24a). Ce comportement est similaire au dfTAT décrit par J-P Pellois. Le mode spectral (fig. 4.24b) nous a permis de confirmer que le signal observé provient bien de la lissamine avec un maximum à 597 nm. L'internalisation de ce dimère est différente comparée à ce qui a été observée précédemment avec le TAT monomérique.

Le comportement de df(Liss)TAT ayant été vérifié, la lissamine a été remplacée par un complexe de lanthanide (fig. 4.25). Nous avons choisi le complexe EuL_3 qui a été développé en même temps que ce df(Liss)TAT.



(a) df(Liss)TAT HeLa $\lambda_{ex}=561$ nm à 5 μ M après 5 min d'incubation dans du PBS sans rinçage



(b) Mode spectral excité à $\lambda_{ex}=561$ nm

FIGURE 4.24 – Internalisation de df(Liss)TAT sur cellule HeLa en milieu PBS et mode spectral

4.2.4 Études spectroscopiques et d'internalisation sur cellule de d(EuL₃)TAT

Synthèse Le TAT dimérisé avec le complexe EuL₃ est appelé d(EuL₃)TAT. Le pro-ligand L₃ est couplé sur la lysine du peptide-résine dans les conditions de synthèse peptidique (PyBOP 1.5 éq, DIEA 4 éq. DMF, une nuit) puis le peptide est coupé de la résine dans les conditions classiques et purifié. Le ligand sur peptide est ensuite métallé par un excès de EuCl₃ dans l'eau à pH 7.5 pendant une nuit ; le pont disulfure est également formé. Le peptide est purifié sur colonne pour enlever les sels.

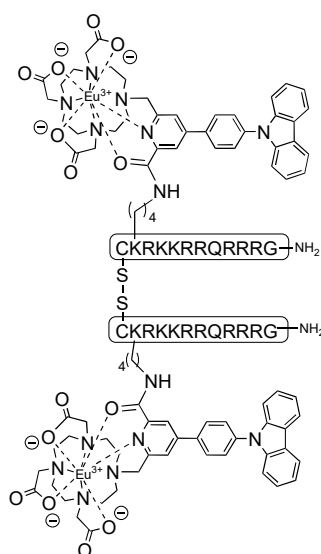


FIGURE 4.25 – Structure de d(EuL₃)TAT avec le complexe EuL₃ (b)

Études spectroscopiques Les spectres de $d(\text{EuL}_3)\text{TAT}$ sont globalement identiques au monomère (voir fig. 4.26 p.193). Le rendement quantique est à 0.3% (similaire à son analogue monomère). Le temps de vie a été mesuré à 650 μs soit 100 μs de moins que son analogue monomérique. Le rapprochement des antennes peut participer à des échanges d'énergie entre EuL_3 à proximité ajoutant des voies de désactivations ou du PeT ce qui expliquerait une petite diminution du temps de vie de luminescence du dimère par rapport au monomère.

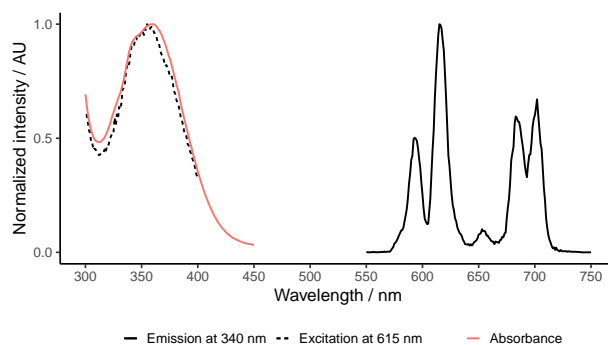


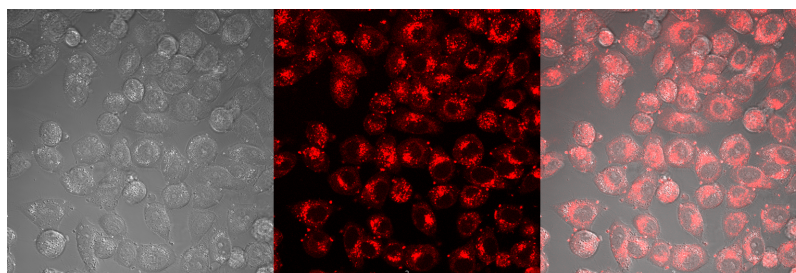
FIGURE 4.26 – $d(\text{EuL}_3)\text{TAT}$: Spectre de fluorescence (ligne noire) et spectre d'excitation (tirets) respectivement à $\lambda_{ex}=340$ nm et $\lambda_{em}=615$ nm et spectre d'absorbance (ligne rouge)

Condition d'internalisation sur cellule HeLa Les cellules HeLa ont été préparées la veille sur Labtek 8 puits à environ 30 000 cellules par puits dans du RPMI sans rouge de phénol et 10% FBS. Les cellules sont lavées trois fois par du PBS puis incubées avec le composé à 37°C. Les temps d'incubation et le milieu seront précisés sous chaque image présentée par la suite.

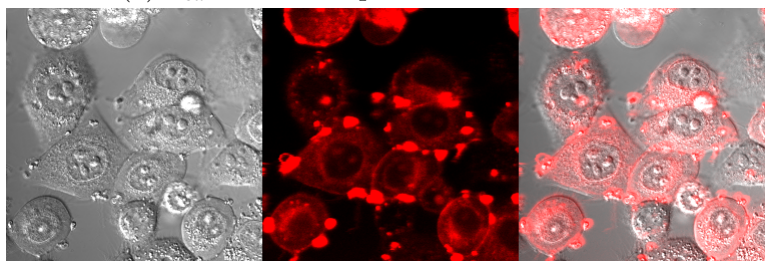
Résultats Les cellules ont été excitées à $\lambda_{ex}=405$ nm en 1P. Un signal de luminescence est observée dans le cytoplasme dès 5 min d'incubation à 5 μM (fig.4.27a). Ensuite, elles ont été excitées en 2P à $\lambda_{ex}= 800$ nm. Le signal de luminescence s'intensifie au cours du temps et commence même à se situer dans le nucléole (fig.4.27b) mais pas dans le reste du noyau. La distribution de la luminescence est homogène dans le cytosol mais le signal est plus marqué autour du noyau. De plus, les cellules semblent arrondies : le composé semble déstabiliser les cellules et pourrait être toxique. Les cellules mortes, complètement rondes et flottantes, saturent également le signal de l'émission. Le mode spectral (fig.4.27c) confirme que le signal diffus dans le cytosol provient de la luminescence de l' Eu^{3+} : on distingue les émissions à 590 nm et 615 nm bien visibles, caractéristiques de l' Eu^{3+} . Le spectre présente toujours une fluorescence inhérente à la cellule centrée vers 490 nm.

Une mesure de temps de vie a été expérimentée par une technique appelée TSLIM (*Temporal Sampling Lifetime Imaging Microscopy*) par A. Grichine (décrite dans

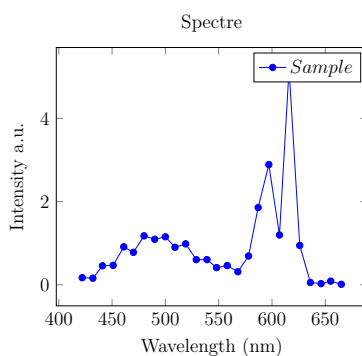
[158]). Sur la partie diffuse dans le cytoplasme, le temps de vie de l'euporium est de 0.60 ms. Dans les spots intenses à la surface, le temps de vie mesuré est de 0.73 ms. Ces temps de vie sont proches des valeurs obtenus *in vitro* donc cohérents.



(a) $\lambda_{ex} = 405$ nm après 5 min d'incubation



(b) $\lambda_{ex} = 800$ nm après 20 min d'incubation



(c) Mode spectral à $\lambda_{ex} = 750$ nm

FIGURE 4.27 – Internalisation de $d(\text{EuL}_3)\text{TAT}$ à $5 \mu\text{M}$ HeLa sur cellule HeLa, incubation dans le milieu PBS sans rinçage (à gauche, l'image en transmission ; au milieu, l'émission ; à droite, la superposition)

Nos images prises présentent malheureusement plusieurs gros amas de peptide qui fluorescent de manière intense car les cellules sur la fig 4.27b n'ont pas été lavées après incubation. On peut remarquer que même sans rinçage, la luminescence de l'euporium n'est visible que dans la cellule et non dans le milieu. Ceci peut s'expliquer par la différence de polarité et la capacité « turn-on » de notre antenne comme vu lors des études de rendement quantique de $m(\text{EuL}_3\text{TAT})$ dans des solvants de valeurs d' $E_T(30)$ différents.

4.2.5 Conclusion

Nous avons souhaité étudier une meilleure stratégie d'internalisation que le peptide TAT seul en nous basant sur les travaux de J-P Pellois sur le dimère de TAT, dfTAT, décrite comme possédant une meilleure efficacité d'internalisation ainsi qu'une meilleure capacité à s'échapper des endosomes et atteindre le cytosol. Un analogue a été synthétisé au laboratoire : le df(Liss)TAT : l'internalisation de df(Liss)TAT dans les cellules HeLa était évidente avec une fluorescence se présentant de manière diffuse dans le cytoplasme. La distribution de la fluorescence dans les cellules a pu être reproduite avec d(EuL₃)TAT. Nous avons mesuré le signal de l'euporium du peptide d(EuL₃)TAT par excitation 2P à $\lambda_{ex} = 800$ nm sur cellule vivante HeLa ainsi que son temps de vie de luminescence.

Nous avons ainsi vérifié que le dfTAT était un CPP efficace qui conserve ses propriétés après changement du fluorophore organique par un complexe de lanthanide. Il n'existe que peu d'exemple dans la littérature de complexes de lanthanide ayant des propriétés d'absorption bi-photonique capable de s'internaliser sur cellule vivante. Toutefois, les cellules semblent être affectées par le peptide. Il faudrait alors vérifier la viabilité et la prolifération des cellules après incubation avec le peptide.

4.3 Stratégie de co-incubation par dfTAT et dnfTAT

La propriété de dfTAT qui nous intéresse le plus est sa capacité à internaliser d'autres molécules par co-incubation, comme montré dans les travaux de J-P Pellois. C'est ce que nous voulons tester.

4.3.1 Co-incubation de m(EuL₃)TAT avec df(Liss)TAT

Les peptides m(EuL₃)TAT avec df(Liss)TAT ont été incubés sur cellules HeLa, chacun à 5 μ M.

Un signal diffus dans la cellule a été observé mais le mode spectral nous a indiqué que le signal est issu principalement de la lissamine avec un maximum d'émission à 597 nm (nous avons oublié d'enregistrer les images). Le signal de l'euporium n'est pas détecté.

Par TSLIM, le temps de vie a été estimé à 100 μ s lorsque l'on excite la lissamine. La seule possibilité pour que la lissamine puisse posséder un temps de vie « long » est une excitation via un donneur d'énergie à temps de vie long. Ce donneur d'énergie doit forcément être l'Eu³⁺. Il y a donc un transfert FRET à l'intérieur des cellules entre EuL₃ et la lissamine. En effet, l'émission de l'Eu³⁺ se superpose sur la fin de la bande

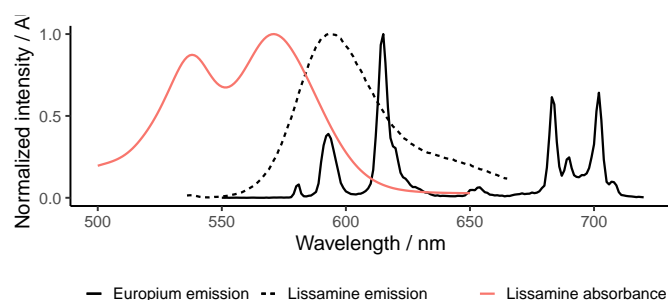


FIGURE 4.28 – Recouvrement des spectres pour FRET : spectre d'émission de l'europium (ligne noire) et spectre d'absorbance de df(Liss)TAT (ligne rouge) et spectre d'émission (tirets) respectivement à $\lambda_{ex} = 571$ nm

d'absorption de la lissamine (voir fig 4.28). Ce temps de vie mesuré long de l'ordre de la centième de μ s est donc une preuve que le df(Liss)TAT et le m(EuL₃)TAT ont été internalisés dans la cellule puis délivré dans le cytosol.

4.3.2 Co-incubation de m(EuL₃)TAT avec des dérivés d(X)TAT

La capacité de co-incubation a pu être vérifiée grâce au TSLIM mais l'émission de l'Eu³⁺ n'a pas pu être détectée.

Cependant, le transfert d'énergie entre le « vecteur » (dfTAT) et la molécule d'intérêt à vectoriser (ici, m(EuL₃)TAT) est désavantageux pour la suite de notre projet. Il n'est pas dans notre intérêt de réduire la luminescence du lanthanide, d'autant plus si la molécule d'intérêt est une sonde luminescente. Notre but étant de trouver une bonne stratégie pour internaliser des complexes de lanthanides 2P et des sondes à base de lanthanide, le df(Liss)TAT ne peut donc pas être utilisé tel qu'il est.

De ce fait, nous avons souhaité travailler sur un dfTAT qui ne se recouvre pas à l'émission de l'europium ou un dnfTAT non fluorescent qui serait plus approprié pour notre projet. Sachant que le fluorophore participe à l'internalisation de dfTAT par ses interactions avec la membrane cellulaire, il faudrait une molécule qui ressemble à la rhodamine par sa structure. Nous présentons dans cette partie plusieurs choix de composés.

D'abord, un dfTAT avec la fluorescéine FITC a été synthétisé, d(FITC)TAT (fig.4.29a) : son maximum d'absorption est situé à 500 nm et ne se recouvre pas avec l'émission de l'europium.

Nous proposons également de placer à la place du fluorophore une entité Fmoc-Gly (voir figure 4.29b page 197) pour obtenir le composé d(FmG)TAT. Le *Fmoc* a une structure qui ressemble grossièrement au carbazole et à la rhodamine avec ses trois aryles conjugués. Son absorption et émission se trouvent dans l'UV et ne gêneraient

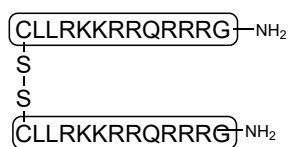
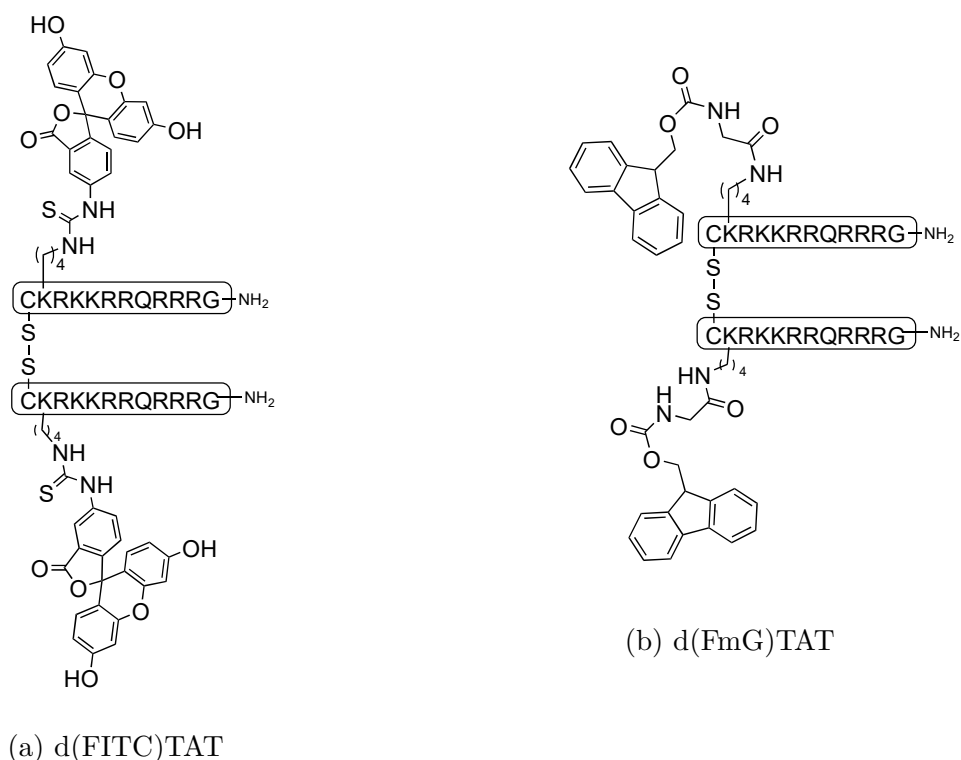


FIGURE 4.29 – Structure des dérivées des séquences TAT dimérisées

donc pas l'émission du lanthanide

Enfin, Jean-Philippe Pellois nous a conseillé un dimère non-fluorescent sur lequel il est actuellement en train de travailler. L'acide aminé K(TMR) du dF_{TAT} a été remplacé par deux leucines, dLLTAT (voir figure 4.29c page 197). Il a observé que ce dLLTAT possédait les mêmes propriétés d'internalisation que le dF_{TAT}. Il n'est pas toxique dans les concentrations d'utilisation (à 5 μ M) bien qu'il commence à présenter une toxicité sur les cellules au-delà contrairement au dF_{TAT}.

Condition d'internalisation Les cellules, préparées la veille, ont été rincées trois fois au PBS puis le peptide(complexe) m(EuL₃)TAT a été incubé à 5 μ M en présence de d(FITC)TAT ou d(FmG)TAT ou dLLTAT pendant au minimum 30 min dans du milieu L-15. Les cellules ont été rincées au PBS puis remises dans du milieu L-15 avant

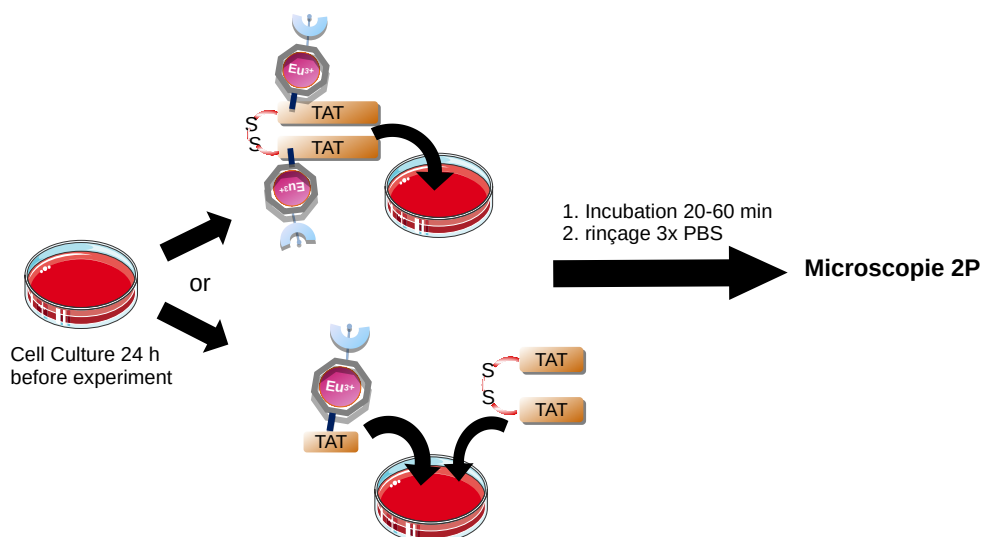


FIGURE 4.30 – Schéma des expérimentations d'incubations des cellules avec un dimère dTAT comportant un complexe de lanthanide ou bien avec un monomère de TAT comportant un complexe de lanthanide en co-incubation avec un autre dTAT sans lanthanide

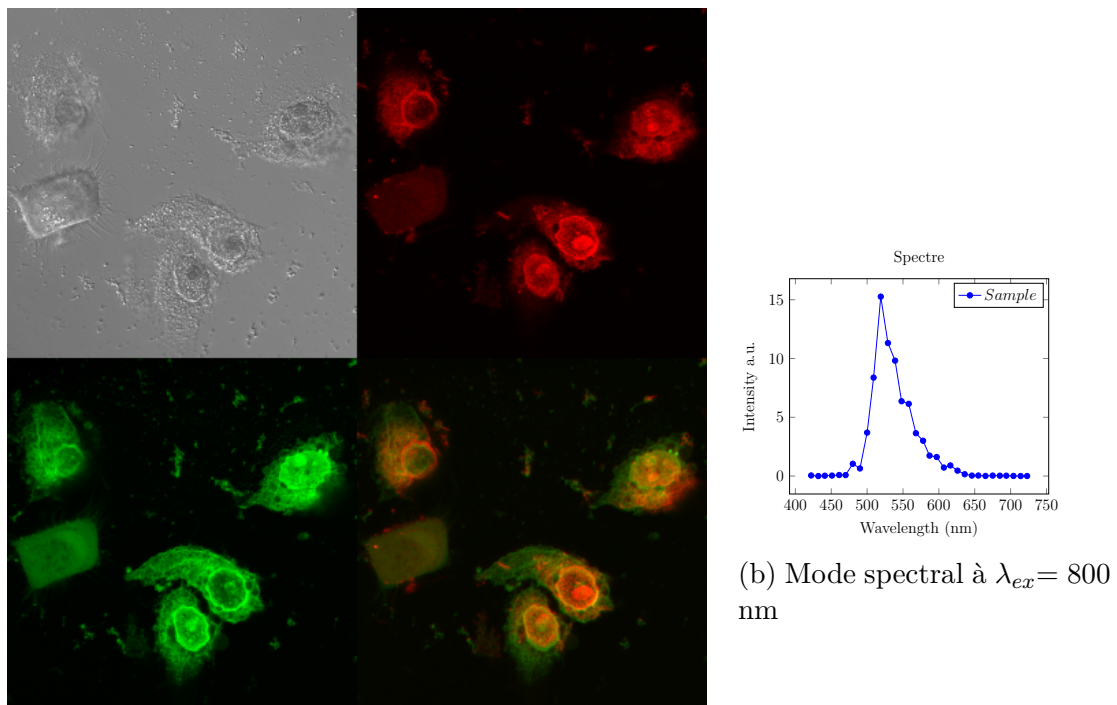
d'être analysées.

Résultats

d(FITC)TAT Les résultats de la co-incubation sont montrés sur la figure 4.31a. L'image en transmission (en haut à gauche) montre beaucoup de débris cellulaires et les membranes des cellules restantes sont très endommagées. Le d(FITC)TAT est sûrement cytotoxique. L'émission est intense et diffuse dans le cytosol et le noyau qui se démarque de l'auto-fluorescence de la cellule (en bas à gauche, vert) ; le mode spectral montre qu'il provient essentiellement d'un signal centré vers 520 nm correspondant probablement à l'émission du FITC (fig.4.31b).

La signature du lanthanide est faible en comparaison de celle de la FITC voire quasiment inexistante. La décomposition du signal n'est pas optimale à cause de la très faible émission de l'euprium mais a tout de même été tentée : on observe que l'émission de l'euprium (4.31a, en haut à droite, en rouge) semble se concentrer dans la zone péri-nucléaire ou dans les nucléoles. L'euprium est donc présent dans la cellule hors des endosomes. Cependant, la diffusion du complexe d'euprium est probablement causée par la désorganisation subie par la cellule et la destruction de la membrane cellulaire.

Le vecteur d(FITC)TAT n'est pas un bon candidat à cause de sa cytotoxicité.



(a) *Linear unmixing* à $\lambda_{ex} = 800$ nm : en haut à gauche, image en transmission ; en haut à droite, émission de l'euporium ; en bas à gauche, émission de FITC ; en bas à droite, superposition

FIGURE 4.31 – Co-incubation de $m(\text{EuL}_3)\text{TAT}$ ($5 \mu\text{M}$) avec $d(\text{FITC})\text{TAT}$ ($5 \mu\text{M}$) sur HeLa en milieu L-15 pendant 30 min

d(FmG)TAT Les résultats de la co-incubation avec d(FmG)TAT sont présentés sur la fig.4.32a. Les cellules ne semblent pas être affectées par la présence du peptide. Le signal est faible et plutôt ponctué et aussi légèrement diffus. Le mode spectral indique l'auto-fluorescence et le signal de l'euporium avec des transitions reconnaissables à 590 nm et 615 nm. Bien que le signal soit faible, le temps de vie du signal dans les vésicules a pu être estimé par TSLIM à environ 0.50 ms ; ce signal « long » ne peut que provenir de l'euporium.

Le composé m(EuL₃)TAT a été internalisé dans les cellules en présence du vecteur d(FmG)TAT mais l'internalisation semble plutôt due au TAT monomère qui reste également majoritaire piégé dans les endosomes. d(FmG)TAT ne semble donc pas permettre la lyse des endosomes comme dFTAT.

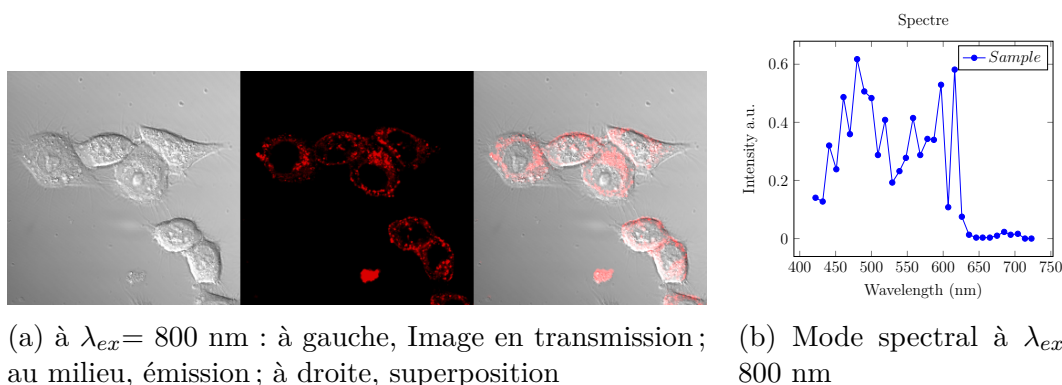


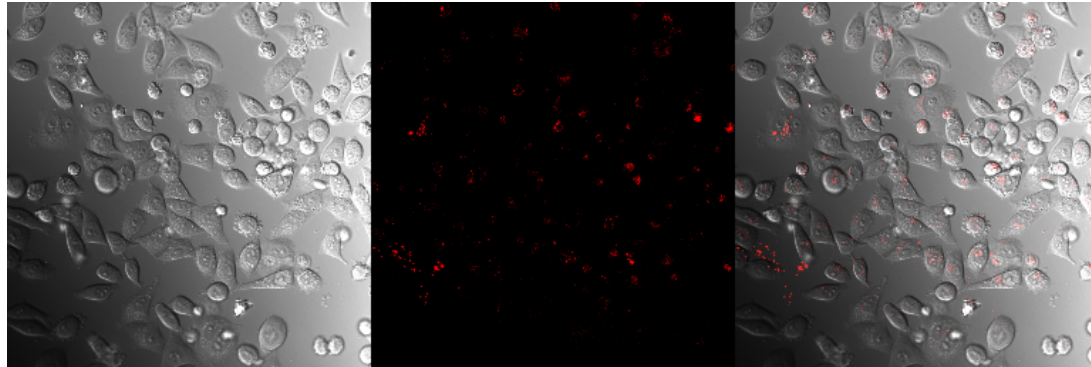
FIGURE 4.32 – Co-incubation de m(EuL₃)TAT (5 μ M) avec d(FmG)TAT (5 μ M) sur HeLa en milieu L-15 pendant 30 min

dLLTAT La figure 4.33b et 4.33c représentent respectivement le résultat de l'incubation des cellules avec 5 μ M de m(EuL₃)TAT sans et avec dLLTAT ; les cellules de la fig. 4.33a, dites contrôles, n'ont pas été incubées avec les peptides.

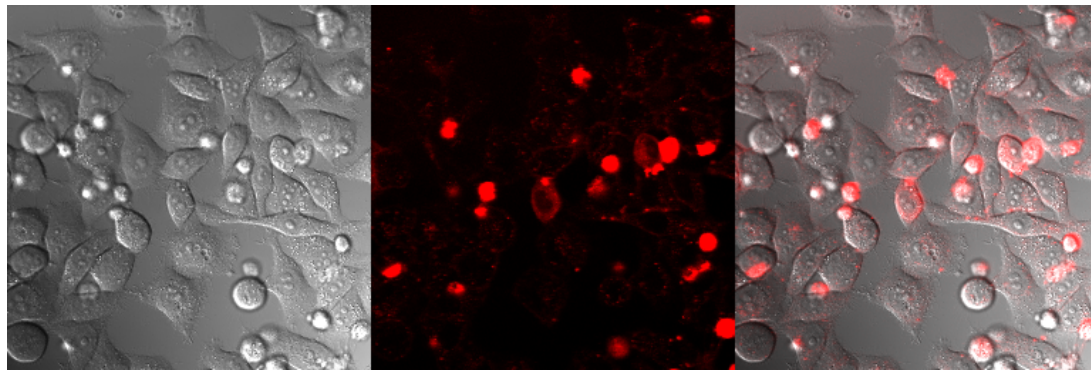
Les cellules HeLa incubées avec m(EuL₃)TAT ne semblent pas être déstabilisées ; elles restent étalées. La distribution de la fluorescence n'est pas homogène. Quelques rares cellules ont un signal de fluorescence très diffus dans le cytoplasme. Les signaux saturés correspondent à des cellules mortes qui ont absorbées beaucoup de peptides et à des agrégats de peptides. La majorité des cellules observées a un marquage de fluorescence proche de la membrane plasmique ou nucléaire qui est nettement moins diffus mais plus localisé dans des granules. Les cellules semblent donc dans l'ensemble avoir internaliser un peu de peptide sans qu'il ait atteint le cytosol.

En co-incubant avec du peptide dLLTAT, les cellules sont toujours bien étalées et la signature de l'émission est clairement différente. On observe plus de cellules présentant une forte fluorescence avec un signal bien diffus dans le cytosol mais également dans le nucléole qui est marqué comme vu précédemment avec le d(EuL₃)TAT. Quelques rares cellules en revanche n'ont pas internalisées de peptides au bout de 30 min. En

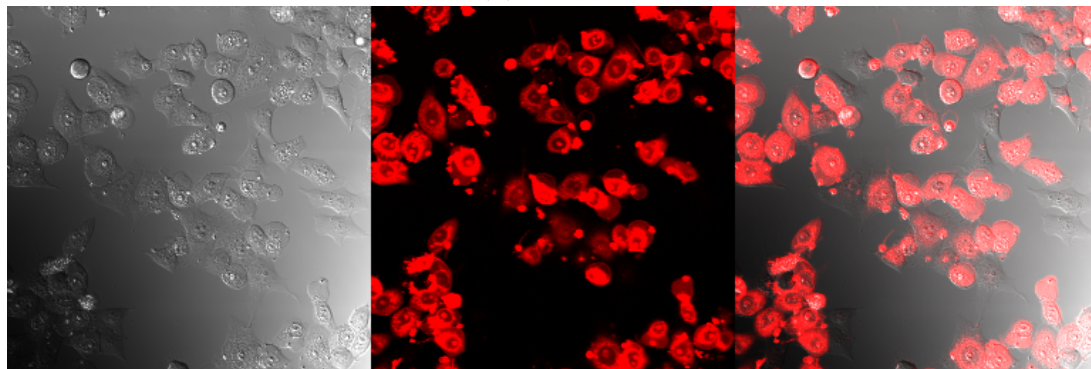
mode spectral, l'émission caractéristique de l'euprimum a été identifiée (voir fig.4.34a en bleu) dans la cellule qui se distingue clairement de l'auto-fluorescence de la cellule (en rouge) centrée à 480 nm. Le temps de vie est mesuré par TSLIM et est estimé à 0.70 ms ce qui correspond aux valeurs mesurées *in vitro*.



(a) contrôle



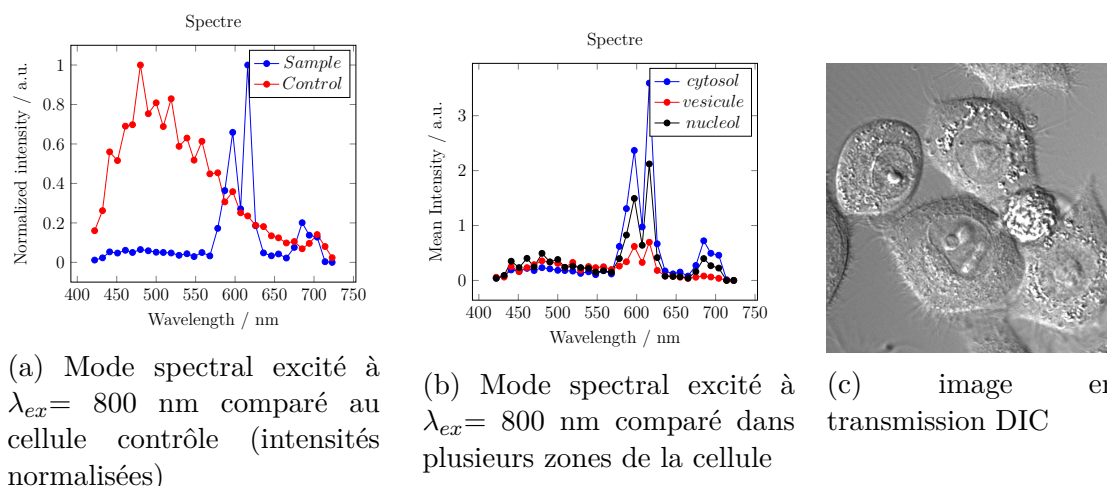
(b) sans dLLTAT



(c) avec dLLTAT

FIGURE 4.33 – Incubation $m(\text{EuL}_3)\text{TAT}$ à 5 μM pendant 1 h en milieu L-15 sur HeLA à $\lambda_{ex} = 800$ nm (à gauche, l'image en transmission ; au milieu, l'émission ; à droite, la superposition)

Les résultats sont concluants et se démarquent des autres vecteurs testés, $d(\text{FITC})\text{TAT}$ et $d(\text{FmG})\text{TAT}$. Le vecteur $d\text{LLTAT}$ conseillé par J-P Pellois permet une bonne internalisation des peptides(complexes) et une diffusion dans le cytosol et le nucléole.



(a) Mode spectral excité à $\lambda_{ex} = 800$ nm comparé au cellule contrôle (intensités normalisées)

(b) Mode spectral excité à $\lambda_{ex} = 800$ nm comparé dans plusieurs zones de la cellule

(c) image en transmission DIC

FIGURE 4.34 – Image transmise et mode spectral après incubation avec du peptide m(EuL₃)TAT à 5 μ M et dLLTAT à 5 μ M sur HeLa en milieu L-15

Cytotoxicité Néanmoins, il faut noter que les cellules sont parfois un peu plus arrondis que les cellules contrôles et forment des *blebs* ou bien la membrane nucléaire est bien plus marquée (fig.4.34c) qui peut être un signe d'une contraction de cette membrane. La viabilité et la capacité de prolifération des cellules ont été testées par test de cytotoxicité au MTT. Le MTT est métabolisé par les mitochondries pour former une espèce colorée bleue. Il est un moyen pour doser les cellules vivantes.

Deux concentrations ont été testées : à 5 et 10 μ M avec ou sans dLLTAT. Les mesures ont été réalisées en triplicat. Les cellules ont été mises en culture sur des plaques 96 puits dans du RPMI + 10% SVF. Elles ont été rincées trois fois par du milieu L-15 puis incubées pendant 30 min dans le milieu L-15 avec le ou les composés ; elles ont été ensuite rincées trois fois au PBS puis remises dans du milieu de culture et incubées à 37°C à 5% CO₂. Les tests ont été réalisés à 24h et 48h. L'absorbance est mesurée à 570 nm.

Résultat Les résultats du test MTT sont présentés sur le graphique 4.35. Les puits de contrôles n'ont pas été incubés avec des composés. L'absorbance à 48h (rouge) est environ 2 fois supérieure aux valeurs à 24h (bleue) montrant l'activité des cellules. Les cellules se sont multipliées entre 24h (bleu) et 48h (rouge). Sur la figure, les absorbances ont été en revanche toutes normalisées par rapport à leur contrôle (CT). En incubant avec m(EuL₃)TAT à 5 μ M, l'absorbance est inférieure au contrôle. À 10 μ M, elle est encore plus faibles.

Le conjugué peptide(complexe) montre donc des effets négatifs sur la viabilité des cellules. En incubant en présence de dLLTAT, les intensités sont similaires au précédente. Donc, dLLTAT n'ajoute pas plus d'effet cytotoxique. J-P Pellois nous avait également indiqué que dLLTAT ne provoquait pas de cytotoxicité à cette concentration.

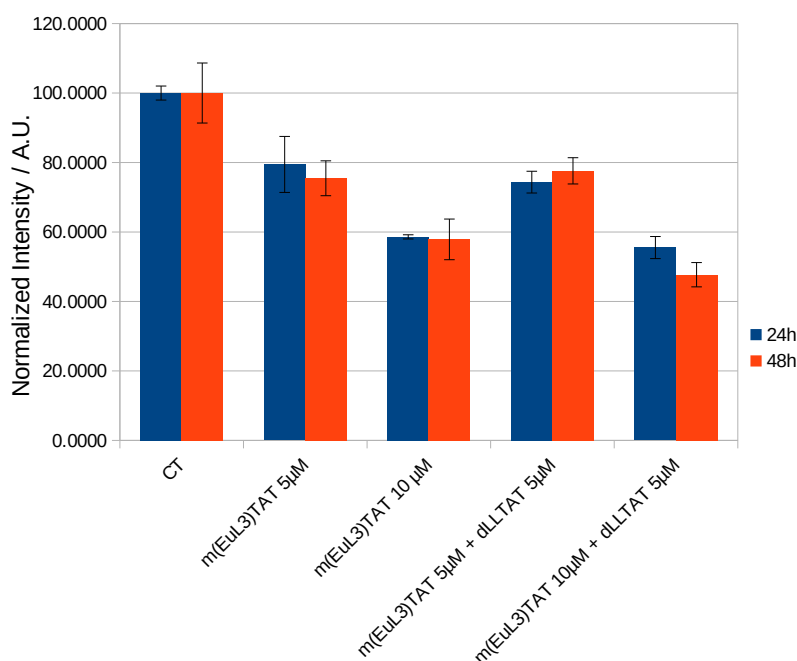


FIGURE 4.35 – Test de cytotoxicité au MTT de m(EuL₃)TAT (5 and 10 µM) avec ou sans dLLTAT (5 µM) à 24h et 48h

Ainsi, nous en déduisons que la stratégie d'internalisation cellulaire par dLLTAT provoque peu de cytotoxicité sur les cellules et est donc adaptée à notre projet. En revanche, la cytotoxicité provient plutôt de m(EuL₃)TAT probablement à cause de l'antenne phényle-carbazole.

4.3.3 Co-incubation de m(EuL₄)TAT avec dLLTAT

Confiant de nos résultats avec dLLTAT, le composé m(EuL₄)TAT a également été étudié sur cellules HeLa en présence de dLLTAT. Les peptides ont été incubés sur cellules HeLa dans du PBS pendant 20 min.

m(EuL₄)TAT Les cellules sont présentées sur la figure 4.36. Elles restent vivantes après l'incubation et présentent un signal d'émission diffus dans le cytosol. Les cellules les plus déstabilisées avec un fort marquage de la membrane nucléaire ont leurs nucléoles marqués également. L'image en zoom (fig.4.36b) montre un signal diffus dans toute la cellule autour du noyau mais plus intense dans la zone péri-nucléaire et aussi des signaux plus intenses sous forme granulaires. Le mode spectral confirme la présence de l'euprimum (fig.4.36c) dans la partie diffuse. Les cellules ont bien internalisées le peptide. Le complexe EuL₄ est donc visible en 2P en milieu cellulaire malgré son rendement quantique peu élevé.

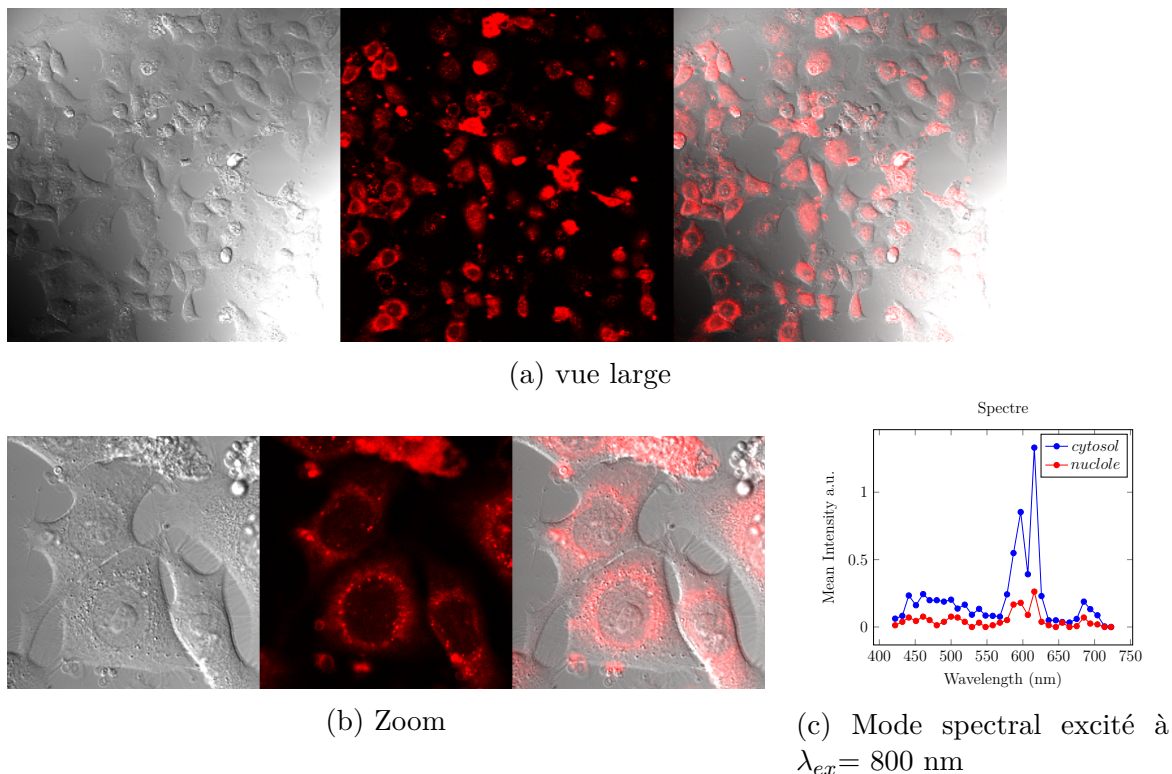


FIGURE 4.36 – Incubation de $m(\text{EuL}_4)\text{TAT}$ sur cellule HeLa à $5 \mu\text{M}$ avec $d\text{LLTAT}$ à $5 \mu\text{M}$ pendant 20 min en PBS (à gauche, l'image en transmission ; au milieu, l'émission ; à droite, la superposition)

4.4 Conclusion

Nos premiers tests cellulaires pour internaliser des complexes de lanthanides sur CPP ont été réalisés avec $\text{ZF5.3}(\text{TbL}_1)\text{-Zn}^{2+}$. Malheureusement, l'émission du terbium n'a pas pu être mesurée dans les cellules, sans doute à cause de mauvaises propriétés d'absorption bi-photonique de L_1 ; l'internalisation de ZF5.3 avec la Si-Rhodamine en fluorophore restait sous forme vésiculaire. Le complexe EuL2 est quant à lui non compatible avec l'utilisation du peptide doigt de zinc à cause de la présence des cystéines qui peuvent s'additionner sur l'alcyne.

C'est pourquoi des nouveaux complexes de lanthanide avec des propriétés d'absorption 2P ont été développés ainsi qu'une nouvelle stratégie de pénétration cellulaire de complexes de lanthanide qui repose sur une stratégie de co-incubation avec la séquence TAT dimérisée. Le $d\text{TAT}$ fluorescent, dont sa capacité de co-internaliser une macromolécule d'intérêt a été démontré par J-P Pellois, a été modifié pour le rendre non-fluorescent en remplaçant le fluorophore par deux leucines.

La nouvelle antenne est constituée du phénylcarbazole possédant de bonnes propriétés d'absorption 2P couplée à la structure commune $\text{DO3A}(\text{PA})$ dont la fonction de bioconjugaison a été déplacé sur le picolinate. Deux nouveaux complexes

ont été présentés, LnL₃ et LnL₄ qui se différencient par un groupe additionnel ortho-Me sur le phényle. Ces deux nouveaux complexes sont peu solubles dans l'eau mais la conjugaison sur un peptide, notamment le CPP TAT, a permis de rendre les composés solubles pour les études spectroscopiques en milieu aqueux. Cependant, les rendements quantiques se sont avérés faibles. En effet, trois phénomènes sont en compétition : la sensibilisation de l'Eu³⁺ via l'antenne par transfert de charge, le transfert retour vers l'antenne et le transfert électronique par PeT. Le transfert retour et le PeT sont des phénomènes efficaces qui contribuent à diminuer significativement le rendement quantique dans l'eau.

Les composées m(EuL₃)TAT et m(EuL₄)TAT en présence de dLLTAT ont été internalisés et diffusés avec succès dans les cellules HeLA vivantes en milieu de culture L-15 ou en PBS. Le temps de vie a été calculé par TSLIM et estimé vers 0.70 ms et l'émission du lanthanide a pu être détectée par excitation bi-photonique en microscopie malgré une brillance globale faible. Les propriétés 2P du phénylcarbazole ainsi que la polarité du milieu contribueraient à la détection du lanthanide en milieu cellulaire.

Les résultats obtenus sont encourageants pour la suite. Toutefois, une étude plus complète sur la cytotoxicité du composé devra être effectuée. Nous souhaitons également mesurer les potentiels redox des complexes pour confirmer le PeT et confirmer que la réduction de l'Eu³⁺ contribue à la désactivation de la luminescence. Enfin, la bioconjugaison par le donneur de l'antenne influence probablement les propriétés de transfert de charge : les premiers complexes TbL₁ et EuL₁, qui ont leur fonction de bioconjugaison sur l'accepteur de l'antenne, peuvent être modifiés pour suivre une synthèse voie tBu. Nous espérons avoir ainsi un *pool* de ligands avec des antennes 2P sensibilisant le terbium et l'euporium.

Conclusion et perspectives

Le travail de cette thèse avait pour but de développer de nouvelles sondes de détection de biomolécules fondées sur la mesure de temps de vie de luminescence d'un complexe de lanthanide, en particulier des sondes pour la détection de zinc(II). Nous avons souhaité mettre à profit les raies fines d'émission des lanthanides et leur temps de vie longs dans l'optique d'une application en microscopie cellulaire en temps résolue.

Les nouvelles sondes à zinc développées dans ce travail reposent sur la modulation des échanges d'énergie entre un complexe de terbium(III) couplé à son antenne à propriété d'absorption bi-photonique et un composé aromatique choisi pour résonner avec le niveau émissif du terbium 5D_4 , appelé *quencher*. La reconnaissance du zinc(II) est permise par une séquence doigt de zinc dont la constante de dissociation pour le zinc est bien comprise entre 10^{-9} et 10^{-11} M en adéquation avec la concentration environnant de zinc(II) libre dans la cellule et dont la sélectivité au zinc(II) face aux cations alcalins et alcalino-terreux présents dans la cellule a été vérifiée.

La stratégie de synthèse de ces sondes a la particularité de reposer sur une stratégie convergente : le peptide est formé par la ligation entre deux fragments comportant soit le *quencher* soit le complexe de lanthanide TbL_1 . Ce dernier fragment comporte un plus grand nombre d'étapes de synthèse mais, grâce à cette stratégie, le même est utilisé pour former les différentes sondes réduisant les efforts synthétiques et permettant une stratégie également divergente.

Trois sondes différentes ont été étudiées : $SP - Nap - TbL_1$, $SP - Azu - TbL_1$ et $SP - NBD - TbL_1$ avec pour *quencher* respectivement le naphthalène, l'azulène et le NBD possédant des niveaux d'énergies proches de 5D_4 . Ces trois sondes répondent en temps de vie de luminescence du terbium(III) qui augmente avec la coordination du zinc. Cette augmentation reflète une diminution des processus de désactivation de l'état excité du terbium.

La première sonde synthétisée, $SP - Nap - TbL_1$, doit sa réponse à la présence du dioxygène. Ce résultat donne un indice sur le mécanisme des échanges d'énergie : il passe probablement par le triplet du naphthalène, sensible à la désactivation par le dioxygène.

Pour les sondes $SP - Azu - TbL_1$ et $SP - NBD - TbL_1$, ces *quencher*s ont été sélectionnés pour privilégier une résonance avec un niveau singulet et non triplet. Ces sondes sont toujours « responsives » au zinc avec ou sans présence de dioxygène bien que les temps de vie diffèrent de 100 à 200 μ s près. La sonde $SP - NBD - TbL_1$ se démarque parmi les trois sondes avec ses plus hauts temps de vie et valeurs de brillance. Des sondes analogues ont été synthétisées en déplaçant la position du complexe TbL_1 sur la séquence peptidique ; des différences ont été observées mais n'améliorent pas particulièrement les propriétés « responsives » des sondes pour notre projet.

Une attention particulière a été donnée sur les analyses de décroissance de luminescence en temps résolue pour les trois sondes. Plusieurs modèles ont été testés : la décroissance mono-exponentielle, mono-exponentielle pondérée, double-exponentielle et exponentielle étirée. La décroissance bi-exponentielle a été privilégiée pour comparer les temps de vie moyens des trois sondes mais en réalité, chaque sonde a un modèle le plus adapté différent. Ce travail m'a permis de comprendre la difficulté de modéliser et comparer des modèles pour analyser les temps de vie. Une amélioration du modèle devrait alors prendre en compte la désactivation de la luminescence par collision par du dioxygène.

L'application cellulaire a été envisagée grâce à l'utilisation de peptide de pénétration cellulaire (CPP) notamment la séquence TAT. La séquence TAT monomérique induit une internalisation vésiculaire et peu diffuse dans le milieu cytoplasmique. Une nouvelle stratégie d'internalisation a été mise en place grâce à l'utilisation d'une séquence dimérique de TAT par liaison disulfure entre deux cystéines qui s'est montrée bien plus efficace. Par ce dimère, il a été possible d'internaliser sur cellule vivante de nouveaux complexes d'euprotium portant une antenne phénylcarbazole à absorption 2P (EuL_3 et EuL_4), d'observer une bonne diffusion du signal dans le cytoplasme et le noyau et enfin, de mesurer le temps de vie de l'euprotium intra-cellulaire. Ces composées permettent ainsi une excitation à des longueurs d'ondes supérieures à 750 nm et une détection de l'euprotium entre 550 et 750 nm : on se place ainsi au début de la fenêtre de diagnostic, idéale pour faire de l'imagerie cellulaire. Ces résultats sont intéressants car l'internalisation diffuse de complexe de lanthanide 2P est encore peu documentée dans la littérature.

Une autre propriété intéressante est que la luminescence des composés (EuL_3 et EuL_4) est influencée par la polarité du milieu due à une voie de sensibilisation du lanthanide passant par un niveau TICT. C'est pourquoi, même si les rendements quantiques sont faibles dans l'eau *in vitro*, la luminescence de l'euprotium(III) des composés est visible dans les cellules. Cette propriété pourrait être mise en valeur pour développer d'autres types de sondes actives. En revanche, les antennes phénylcarbazoles semblent avoir une certaine cytotoxicité pour la cellule. nous ne

savons pas encore ce qui provoque cette cytotoxicité. Nous souhaitons également transposer les antennes phénylcarbazoles pour faire des complexes d'ytterbium qui permettraient d'utiliser le transfert électronique en faveur de la luminescence de l'ytterbium.

Ces nouveaux complexes d'euporium ont été synthétisés par une voie différente des complexes de terbium(III) de nos premières sondes (TbL_1) : la conjugaison s'effectue par le groupement accepteur d'électron de l'antenne et non par le côté comportant le groupement donneur. Cette modification ne semble pas anodine et semble au contraire améliorer les propriétés 2P. C'est pourquoi nous avons synthétisé un analogue du complexe de terbium TbL_1^D en TbL_1^A . Les résultats préliminaires n'ont pas été mentionnés dans le manuscrit mais sont prometteurs : l'émission du terbium(III) du complexe TbL_1^A a été clairement identifiée par microscopie 2P sur cellule HeLa vivante contrairement à TbL_1^D . La limite des complexes $TbL_1^{D,A}$ est que la longueur d'onde de l'excitation bi-photonique se situe sur la limite basse des capacités du microscope où la puissance laser est faible. C'est pourquoi il est plus intéressant de travailler avec des complexes d'euporium avec de plus hautes longueurs d'ondes d'excitation 2P. De nouveaux complexes de terbium et d'euporium sont ainsi en cours de développement suivant cette nouvelle position de bioconjugaison.

Quatrième partie
Experimental section

Materials and methods

Solvents and reagents : Fmoc-protected amino acids for peptide synthesis, PyBOP and HCTU coupling reagents were purchased from Novabiochem or Iris Biotech. SEA-PS, NovaPEG Rink Amide resin were purchased from X'prochem and Novabiochem. Other reagents for peptide synthesis, solvents, buffers and metal salts were purchased from Sigma-Aldrich. All buffers or zinc solutions were prepared with MilliQ water (Millipore). Buffer solutions were treated with Chelex 100 resin (Biorad) to remove metal traces [26].

Analytical HPLC : analytical separations were performed on Agilent Infinity 1200 system using Waters XBridge BEH130 C18 (2.5 μm , 75 mm x 4.6 mm) column at 1 mL/min. The Mobile phase is a gradient of solvent A (0.1% TFA in H_2O) and B (0.1% TFA in MeCN/ H_2O 9 :1).

Method Xb50 was programmed as 1 min of 5% of buffer B followed by a gradient from 5% to 50% of buffer B in 14 min at 1 mL/min on the Waters XBridge BEH130 C18 column. Eluate was monitored by electronic absorption at 214, 254, 280, 331, 365, 560, 650 nm. Method Xb100 is similar : the gradient goes from 5% to 100% of buffer B in 14min at 1mL/min.

Analytical LC-MS : analytical separations monitored by mass spectroscopy were performed on Agilent 1260 Infinity II HPLC system equipped with a 6125 ESI-MS detector.

Preparative HPLC : separations for purification were performed on a VWR LaPrep Σ system using Waters XBridge Peptide BEH130 C18 (5 μm , 150 mm x 19 mm) column at 14 mL/min, or Waters XBridge Peptide BEH130 C18 (5 μm , 150 mm x 10 mm) column at 6 mL/min. Mobile phase consisted in a gradient of solvent A (0.1% TFA in H_2O) and B (0.1% TFA in MeCN/ H_2O 9 :1).

Optical spectroscopy : UV-Vis absorption spectra were recorded on a Perkin-Elmer Lambda 35 spectrophotometer. Luminescence spectra were recorded on a Varian Cary Eclipse spectrometer or on a modular Fluorolog FL3-22 spectrometer from Horiba-Jobin Yvon-Spex equipped with a double-grating excitation

monochromator and an iHR320 imaging spectrometer coupled to an R928P Hamamatsu photomultiplier. All spectra were corrected for detection and optical spectral response (instrumental functions) of the spectrofluorimeters. Phosphorescence lifetimes were measured in time-resolved mode on a Cary Eclipse spectrometer. UV-Vis, and Cary Eclipse luminescence spectrometers are equipped with a thermo-regulated cell holder and spectra were recorded at 298 K. Quantum yields were determined using a Fluorolog-3 (Jobin Yvon) spectrofluorometer with iHR-320.

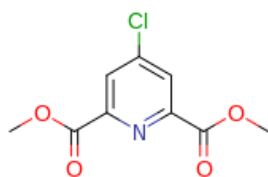
NMR : ^1H , ^{13}C and DEPT spectra were recorded at 400 MHz with Varian Avance III 400 spectrometer, at 298 K unless mentioned. All shifts for ^1H and ^{13}C spectra were calibrated to the residual solvent peak (CDCl_3 $\delta_H = 7.26$ ppm and $\delta_C = 77.2$ ppm; D_2O $\delta_H = 4.79$ ppm at 298 K and 4.20 ppm at 353 K). Abbreviations were used to explain multiplicities : s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, dd = doublet of doublet, m = multiplet. Coupling constants (J) are measured in hertz and are given with 0.5 Hz accuracy and the chemical shifts δ are measured in ppm.

Mass spectrometry : LR-MS(ESI+) analysis were performed on Thermo Scientific LXQ spectrometer.

Automated peptide synthesis : Solid-Phase Peptide Synthesis (SPPS) was performed with CEM Liberty 1 peptide synthesizer. Peptide elongation was performed using standard SPPS protocols using Fmoc/tBu chemistry with the automated peptide synthesizer (CEM Liberty1 Microwave Peptide Synthesizer). Double couplings (30 min) needed 4-fold molar excess of Fmoc-L-amino acid, 3.8-fold molar excess of HCTU and 8-fold molar excess of DIEA at room temperature. A capping step was performed after coupling with Ac_2O /DIEA in DMF (5 min). Fmoc protecting group was removed with 20% piperidine in DMF (2×10 min) while Fmoc UV monitoring [159].

Chromatography : Commercial Pre-coated TLC sheets ALUGRAM SIL G/UV 254 (from Macherey-Nagel) were used to monitor reactions by thin layer chromatography (TLC). TLC spots were visible under ultraviolet light (254 nm). Compounds were purified using silica gels from Merck silica gel 60 ; 0.063-0.200 mm) for flash column chromatography.

Organic Synthesis



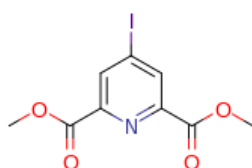
2

Dimethyl 4-chloropyridine-2,6-dicarboxylate (2) [160] : DMF (11 mL) was added to a suspension of chelidamic acid (11.2 g, 56 μmol) in thionyl chloride (81 mL). The mixture was heated to reflux for 16 h and solvents were removed under vacuum. Residues were dissolved in DCM (50 mL) and methanol (50 mL) was added dropwise at 0°C. After 1h, solvents were removed under vacuum. The residue was dissolved in DCM and washed with saturated aqueous NaHCO_3 and water. The organic layer was dried over Na_2SO_4 and the solvent removed under reduced pressure to afford a slightly brown powder (12.4 g, 97%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) = 8.29 (s, 2H), 4.03 (s, 6H).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) = 164.2 (C_{quat}), 149.6 (C_{quat}), 147.0 (C_{quat}), 128.4 (CH), 53.6 (CH_3).

LR-MS (ESI+) : monoisotopic m/z = 252.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 268.0 $[\text{M}+\text{K}]^+$, 496.6 $[2\text{M}+\text{K}]^+$ (calculated monoisotopic m/z = 252.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 267.98 $[\text{M}+\text{K}]^+$, 496.99 $[2\text{M}+\text{K}]^+$ for $\text{M} = \text{C}_9\text{H}_8\text{ClNO}_4$).



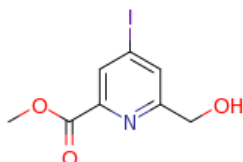
3

Dimethyl 4-iodopyridine-2,6-dicarboxylate (3) [160] : To a solution of **2** (12 g, 52 mmol) in acetonitrile was added sodium iodide (15.7 g, 105 mmol) and acetyl chloride (11.2 mL, 157 mmol). The mixture was sonicated for 2 h then diluted with DCM and washed successively by saturated aq. NaHCO_3 and aq. sodium thiosulfate (0.1 M) until no color changes are observed and, finally, washed with brine. The organic layer was dried over Na_2SO_4 and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was dissolved in a minimal volume of DCM and crystallized by diffusion in methanol to afford white crystals (12.9 g, 77%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) = 8.62 (s, 2H), 3.98 (s, 6H).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) = 163.9 (C_{quat}), 148.3 (C_{quat}), 137.2 (CH), 107.0 (C_{quat}), 53.5 (CH_3).

LR-MS (ESI+) : monoisotopic m/z = 344.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 360.0 $[\text{M}+\text{K}]^+$, 680.4 $[2\text{M}+\text{K}]^+$ (calculated monoisotopic m/z = 343.94 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 359.92 $[\text{M}+\text{K}]^+$, 680.86 $[2\text{M}+\text{H}]^+$ for $\text{M} = \text{C}_9\text{H}_8\text{INO}_4$).



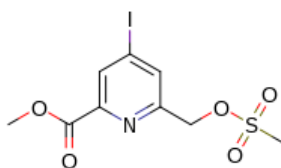
4

Methyl 6-(hydroxymethyl)-4-iodopicolinate (4) [161] : Compound **3** (1 g, 3.1 mmol) was dissolved in a DCM/MeOH (2 :3 v/v, 12 mL) mixture cooled at 0°C . NaBH_4 (60 mg, 1.5 mmol) was added by portions and the mixture was stirred at 0°C for 45 min. A second amount of NaBH_4 (60 mg, 1.5 mmol) was added and the reaction was monitored by TLC. When the di-reduced compound was clearly detected by TLC, the reaction was quenched by addition of 0.5 M aq. HCl (6 mL). The organic solvents were evaporated under reduced pressure and the resulting aq. phase was extracted with AcOEt. The organic phase was dried over Na_2SO_4 and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography (silica gel, DCM/MeOH 95 :5) to give a white powder (496 mg, 56%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) = 8.37 (d, $J_4 = 1.5\text{Hz}$, 1H), 7.97 (d, $J_4 = 1.5\text{Hz}$, 1H), 4.81 (s, 2H), 3.98 (s, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) = 164.4 (C_{quat}), 161.3 (C_{quat}), 147.4 (C_{quat}), 133.3 (CH), 133.1 (CH), 106.9 (C_{quat}), 64.3 (CH_2), 53.3 (CH_3).

LR-MS (ESI+) : monoisotopic m/z = 294.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 316.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 332.1 $[\text{M}+\text{K}]^+$ (calculated monoisotopic m/z = 293.96 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 315.94 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 331.92 $[\text{M}+\text{K}]^+$ for $\text{M} = \text{C}_8\text{H}_8\text{INO}_3$).

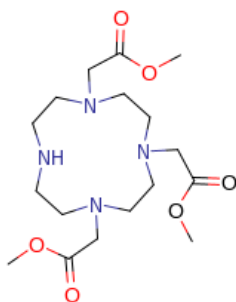


5

Methyl 4-iodo-6-(((methylsulfonyl)oxy)methyl)picolinate (5) [35] : To a solution of **4** (20 mg, 0.68 mmol) in THF (3 mL) was added trimethylamine (317 μ L, 2.04 mmol) and mesylchloride (84 μ L, 1.1 mmol). The mixture was stirred for 25 min and solvents were evaporated. The residue was dissolved in DCM and washed with saturated aq. NaHCO₃ and water. The organic phase was dried over Na₂SO₄ and the solvent was removed under reduced pressure to give a white solid (216 mg, 86%). The product is immediately used without further purification.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 8.38 (d, J₄ = 1.5Hz, 1H), 7.98 (d, J₄ = 1.5Hz, 1H), 5.30 (s, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.12 (s, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 163.8 (C_{quat}), 155.0 (C_{quat}), 147.7 (C_{quat}), 134.0 (CH), 107.1 (C_{quat}), 69.8 (CH₂), 53.2 (CH₃), 38.0 (CH₃).



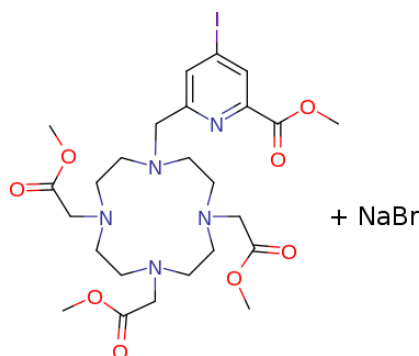
7 DO3(AMe)

4,7,10 - tris(2-methoxy-2-oxoethyl) -1,4,7,10- tetraazacyclododecane hydrobromide (DO3(AMe)) [111] : To a suspension of sodium acetate (1.58 g, 19.3 mmol) and cyclen (1.0 g, 5.8 mmol, in DMF (8 mL) at -20°C, was added a solution of methyl bromoacetate (1.7 mL, 17.4 mmol) in DMF (4 mL). The reaction was stirred for 6 h at room temperature. The solution was diluted with DCM (100 mL) and the precipitate was removed by filtration over Celite. Solvents were evaporated under vacuum. The residue was precipitated in AcOEt and centrifuged. The supernatant was evaporated and purified by flash chromatography (silica gel, DCM/MeOH 95 :5) to give an orange oil. After sonication in Et₂O, a white powder (1.70 g, 61%) is obtained.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 9.98 (s, 1H), 3.70 (s, 9H), 3.49 (s, 4H), 3.43 (s, 2H), 3.15-2.81 (m, 16H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 171.6 (C_{quat}), 170.8 (C_{quat}), 57.1 (CH₂), 51.7 (CH₃), 51.5 (CH₂), 49.4 (CH₂), 48.5 (CH₂), 47.3 (CH₂).

LR-MS (ESI+) : monoisotopic m/z = 389.4 [M+H]⁺, 411.4 [M+Na]⁺ (calculated monoisotopic m/z = 389.24 [M+H]⁺, 411.22 [M+Na]⁺ for M = C₇H₃₂N₄O₆).



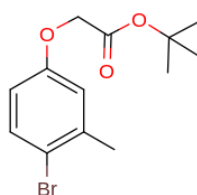
DO3(AMe)(IPAMe) NaBr

$[NaDO3(AMe)(IPAMe)]^+Br^-$: To a solution of *DO3(AMe)* (1.3 g, 3.3 mmol) in acetonitrile (20 mL), was added Na_2CO_3 (1.5 g, 14.0 mmol) and then a solution of **4** (1.04 g, 2.8 mmol) in acetonitrile (10 mL). The mixture was heated to reflux for 22 h. The mixture was cooled down to room temperature and filtered. The filtrate was evaporated and the residue was triturated in AcOEt to give a white powder (3.29 g, 99%) to $[NaDO3(AMe)(IPAMe)]^+Br^-$ complex.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 8.33 (d, $J_4 = 1.4$ Hz, 1H), 7.91 (d, $J_4 = 1.4$ Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.62, (s, 6H), 3.37-2.26 (m, 24H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 173.8 (C_{quat}), 172.7 (C_{quat}), 164.4 (C_{quat}), 160.0 (C_{quat}), 147.8 (C_{quat}), 136.7 (CH), 133.0 (CH), 107.9 (C_{quat}), 58.9 (CH_2), 55.4 (CH_2), 55.2 (CH_2), 53.2 (CH_3), 52.2 (CH_3), 52.1 (CH_3), 50.6 (CH_2).

LR-MS : monoisotopic m/z = 686.3 $[M+Na]^+$, 702.3 $[M+K]^+$, (calculated monoisotopic m/z = 686.17 $[M+Na]^+$, 702.14 $[M+K]^+$ for $M = C_{25}H_{38}IN_5O_8$).



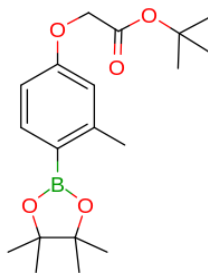
10

tert-butyl 2-(4-bromo-3-methylphenoxy)acetate (10) : To a solution of 4-bromo-3-methylphenol (2.0 g, 10.7 mmol) in DMF (20 mL) was added potassium carbonate (4.44 g, 32.1 mmol) and tert-butyl bromoacetate (1.9 μ L, 12.8 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 17 h and then filtrated. The solvent was removed under reduced pressure. The oily residue was dissolved in DCM and washed with water. The organic layer was dried over Na_2SO_4 and evaporated under reduced pressure to give a colorless oil (3.12 g, 97%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) = 7.38 (d, $J_3 = 8.7\text{Hz}$, 1H), 6.79 (d, $J_4 = 3.0\text{Hz}$, 2H), 6.59 (dd, $J_3 = 2.9\text{Hz}$, $J_4 = 8.7\text{Hz}$, 1H), 4.47 (s, 2H), 2.34 (s, 3H), 1.48 (s, 9H).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) = 167.8 (C_{quat}), 157.2 (C_{quat}), 139.0 (C_{quat}), 132.9 (CH), 117.4 (CH), 116.4 (C_{quat}), 113.5 (C_{quat}), 82.5 (C_{quat}), 65.8 (CH_2), 28.1 (CH_3), 23.3 (CH_3).

LR-MS (ESI+) : monoisotopic $m/z = 323.0$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 339.0 $[\text{M}+\text{K}]^+$ (calculated monoisotopic $m/z = 323.03$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 339.00 $[\text{M}+\text{K}]^+$ for $\text{M} = \text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{BrO}_3$).



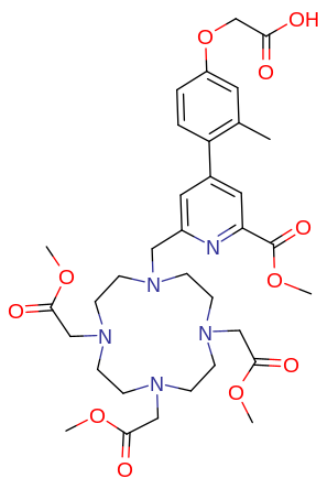
11

***tert*-butyl 2-(3-methyl-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenoxy)acetate (11)** : To a degassed solution of **10** (1.0 g, 3.86 mmol) and *bis*(triphenylphosphine)palladium(II) dichloride (271 mg, 0.39 mmol) in dioxane (10 mL) was added under an inert atmosphere 4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborane (1.7 mL, 11.5 mmol) and triethylamine (3.2 mL, 23.1 mmol). The mixture was heated at 95°C for 17 h. Solvents were removed under reduced pressure and the residue was dissolved in AcOEt and washed with saturated aq. NaHCO_3 and brine. The organic layer was dried over Na_2SO_4 and the solvent was removed under reduced pressure to give a dark oil. The crude product was purified by flash chromatography (silica gel, DCM) to give a yellow oil (1.0 g, 98%) that crystallizes after a few days.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) = 7.71 (d, $J_3 = 8.2$ Hz, 1H), 6.71 (d, $J_4 = 2.5$ Hz, 1H), 6.67 (dd, $J_3 = 8.0$ Hz, $J_4 = 2.3$ Hz, 1H), 4.51 (s, 2H), 2.51 (s, 3H), 1.48 (s, 9H), 1.32 (s, 12H).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) = 168.1(C_{quat}), 160.1 (C_{quat}), 147.4 (C_{quat}), 137.9 (CH), 116.3 (CH), 110.7 (CH), 83.3 (C_{quat}), 82.4 (C_{quat}), 65.5 (CH_2), 28.2 (CH_3), 25.0 (CH_3), 22.5 (CH_3).

LR-MS (ESI+) : monoisotopic $m/z = 371.2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 387.2 $[\text{M}+\text{K}]^+$ (calculated monoisotopic $m/z = 371.20$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 387.17 $[\text{M}+\text{K}]^+$ for $\text{M} = \text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{BO}_5$).



$L_1 - (OMe)_4, (OH)$

13 $L_1 - (OMe)_4, (OH)$: To a degassed solution of **DO3(AMe)(IPAMe)** (300 mg, 0.40 mmol) and **6** (170 mg, 0.45 mmol) in DMF (4 mL) was added *tetrakis*(triphenylphosphin)palladium(0) (35 mg, 0.030 mmol) and cesium fluoride (137 mg, 0.90 mmol). The mixture was stirred at 90°C for 17 h. Solvents were removed under reduced pressure. The oily residue was dissolved in DCM and washed with water. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and evaporated under reduced pressure. Cold diethyl ether was added and the crude was sonicated for 5 min while scratching the vessel with a spatula and the mixture was centrifugated. The precipitate $L_1 - (OMe)_4, (OtBu)$ was collected as an oil (176mg, 75%). This product was identified by LC/MS but not characterized in depth due to the instability of the *tert*-butyl ester. It was used without further purification. Removal of tBu protecting group of $L_1 - (OMe)_4, (OtBu)$ (150 mg, 0.20mmol) was performed in TFA (5mL) at room temperature for 2 h. TFA was evaporated under reduced pressure and the crude was dissolved in buffer A (water 0.1% TFA) and purified on HPLC and lyophilized to give a slightly yellow oil (68 mg, 46%) after lyophilization.

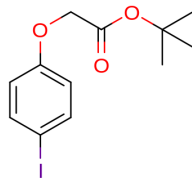
¹H NMR (400 MHz, D₂O 353K) : δ (ppm) = 8.06 (d, $J_4 = 1.5\text{Hz}$, 1H), 7.83 (d, $J_4 = 1.5\text{Hz}$, 1H), 7.21 (d, $J_3 = 8.5\text{Hz}$, 1H), 6.95 (d, $J_4 = 2.7\text{Hz}$, 1H), 6.90 (dd, $J_3 = 8.5\text{Hz}$, $J_4 = 2.7\text{Hz}$, 1H), 4.75 (s, 2H), 4.58 (s, 2H), 4.06 (s, 2H), 4.01 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 3.59 (s, 4H), 3.48 (s, 6H), 3.80-2.98 (m, 16H), 2.23 (s, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, D₂O 353K) : δ (ppm) = 173.1 (C_{quat}), 172.5 (C_{quat}), 168.7 (C_{quat}), 166.8 (C_{quat}), 158.7 (C_{quat}), 153.1 (C_{quat}), 152.5 (C_{quat}), 148.0 (C_{quat}), 138.2 (C_{quat}), 131.5 (CH), 131.4 (C_{quat}), 129.7 (CH), 126.5 (CH), 117.7 (CH), 113.3 (CH), 65.7 (CH₂), 58.9 (CH₂), 54.9 (CH₂), 54.0 (CH₃), 53.2 (CH₂), 53.0 (CH₃), 52.9 (CH₃), 52.3 (CH₂), 52.2 (CH₂), 49.6 (CH₂), 49.1 (CH₂), 20.1 (CH₃).

LR-MS (ESI+) : monoisotopic m/z = 702.4 [M+H]⁺, 724.4 [M+Na]⁺, 740.3 [M+K]⁺
+ (calculated monoisotopic m/z = 702.33 [M+H]⁺, 724.32 [M+Na]⁺, 740.29 [M+K]⁺)

for $M = C_{34}H_{47}N_5O_{11}$).

HRMS (ESI+) : $m/z = 702.3328$ (+) (calculated $m/z = 702.3345$ $[M+H]^+$ for $M = C_{34}H_{47}N_5O_{11}$).



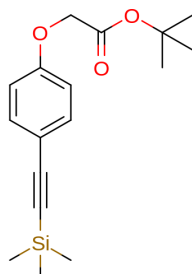
15

tert-butyl 2-(4-iodophenoxy)acetate To a solution of 4-iodophenol (3.0 g, 13.6 mmol) in DMF (30 mL) was added potassium carbonate (10 g, 106 mmol), and *tert*-butyl bromoacetate (6 mL, 40.5 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 16 h and then filtrated. The solvent was removed under reduced pressure. The oily residue was dissolved in DCM and washed with water then brine. The organic layer was dried over Na_2SO_4 and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (silica gel, DCM) to give a pale red liquid (3.43 g, 75%).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 7.51 (d, $J_3 = 9$ Hz, 2H), 6.63 (d, $J_3 = 9$ Hz, 2H), 4.44 (s, 2H), 1.45 (s, 9H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 167.6 (C_{quat}), 157.8 (C_{quat}), 138.3 (CH), 117.0 (CH), 83.8 (C_{quat}), 82.6 (C_{quat}), 65.7 (CH_2), 28.0 (CH_3).

LR-MS (ESI+) : monoisotopic $m/z = 357.0$ $[M+Na]^+$, 373.0 $[M+K]^+$ (calculated monoisotopic $m/z = 357.00$ $[M+Na]^+$, 372.97 $[M+K]^+$ for $M = C_{12}H_{15}IO_3$).



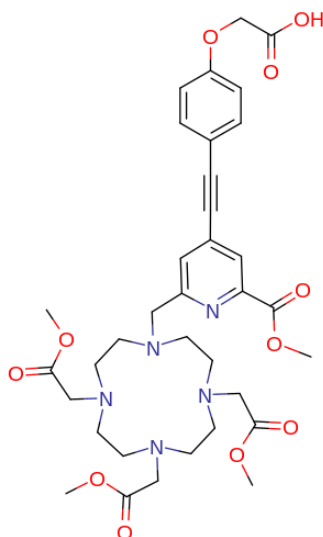
16

tert-butyl 2-(4-((trimethylsilyl)ethynyl)phenoxy)acetate : To a degassed solution of **7** (1.0 g, 3.0 mmol) and triethylamine (1.3 mL, 9.3 mmol) in DMF (1.3 mL) was added under an inert atmosphere bis(triphenylphosphine) palladium(II) dichloride

(84 mg, 0.12 mmol), copper iodide (114 mg, 0.6 mmol) and ethynyltrimethylsilane (1.5 mL, 10.5 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 15 h. Solvents were removed under reduced pressure. The residue was dissolved in DCM and washed with saturated aq. NH_4Cl and water. The organic layer was dried over Na_2SO_4 and the solvent was removed under reduced pressure to give a dark oil. The crude product was purified by flash chromatography (silica gel, cyclohexane/AcOEt 95 :5) to give brown crystals (900 mg, 99%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) = 7.39 (d, $J_3 = 9.0$ Hz, 2H), 6.80 (d, $J_3 = 9.0$ Hz, 2H), 4.50 (s, 2H), 1.47 (s, 9H), 0.23 (s, 9H).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) : 167.8 (C_{quat}), 158.2 (C_{quat}), 133.6 (CH), 116.3 (C_{quat}), 114.6 (CH), 105.0 (C_{quat}), 92.9 (C_{quat}), 82.7 (C_{quat}), 65.8 (CH), 28.1 (CH_3), 0.16 (CH_3).



18 $L_2 - (\text{OMe})_4, (\text{OH})$

$L_2 - (\text{OMe})_4, (\text{OH})$ **5** (fig.1.7) : To a degassed solution of $\text{DO3}(\text{AMe})(\text{IPAMe})$ (100 mg, 0.13 mmol) and **8** (33 mg, 0.11 mmol) in DMF (1.1 mL) was added triethylamine (425 μL , 3.05 mmol), *bis*(triphenylphosphin)palladium(II) dichloride (8 mg, 11.4 μmol) and tetrabutylammonium fluoride 1M (130 μL , 130 μmol). The mixture was stirred at 90°C for 17 h. Solvents were removed under reduced pressure. The oily residue was dissolved in DCM and washed with water. The organic layer was dried over Na_2SO_4 and evaporated under reduced pressure. Water (16 mL) was added to the crude and the suspension was sonicated for 20 min then centrifuged. The supernatant was lyophilized to give $L_2 - (\text{OMe})_4, (\text{OtBu})$ as a brown oil (70 mg, 69%).

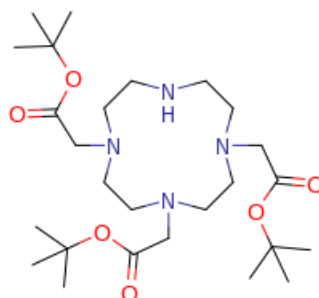
Removal of *t*Bu from $L_2 - (\text{OMe})_4, (\text{OtBu})$ was performed in TFA (5 mL) at rt for 2 h. TFA was evaporated under reduced pressure and the crude was dissolved in buffer A and purified on HPLC and lyophilized to give a brown oil (38.6 mg, 55%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) = 8.16 (d, $J_4=0.1\text{Hz}$, 1H), 7.87 (d, $J_4=1.0\text{Hz}$, 1H), 7.54 (d, $J_3=8.8\text{Hz}$, 2H), 7.02 (d, $J_3=8.8\text{Hz}$, 2H), 4.76 (s, 2H), 4.45 (s, 2H), 4.03 (s, 3H), 4.01 (s, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.66 (s, 4H), 3.61 (s, 6H), 3.54-3.02 (m, 16H).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) = 173.3 (C_{quat}), 172.0 (C_{quat}), 169.5 (C_{quat}), 166.4 (C_{quat}), 159.5 (C_{quat}), 148.2 (C_{quat}), 135.3 (C_{quat}), 134.5 (C_{quat}), 134.4 (CH), 130.9 (CH), 127.4 (CH), 115.9 (CH), 114.7 (C_{quat}), 97.4 (C_{quat}), 85.5 (C_{quat}), 65.9 (CH_2), 58.5 (CH_2), 54.8 (CH_2), 54.1 (CH_3), 53.9 (CH_3), 53.3 (CH_2), 53.2 (CH_3), 52.0 (CH_2), 51.8 (CH_2), 50.0 (CH_2), 49.6 (CH_2).

LR-MS (ESI+) : monoisotopic m/z = 712.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 734.6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 750.6 $[\text{M}+\text{K}]^+$ (calculated monoisotopic m/z = 712.32 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 734.30 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 750.27 $[\text{M}+\text{K}]^+$ for $\text{M} = \text{C}_{35}\text{H}_{45}\text{N}_5\text{O}_{11}$).

HRMS (ESI+) : m/z = 712.3174 (+) (calculated m/z = 712.3188 $[\text{M}+\text{H}]^+$ for $\text{M} = \text{C}_{35}\text{H}_{45}\text{N}_5\text{O}_{11}$).

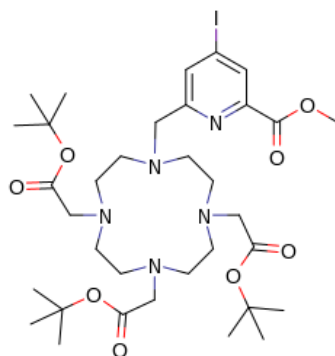


DO3(AtBu)

4,7,10-tris(2-)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane [115] : To a suspension of Na_2CO_3 (7.86 g, 96 mmol) and cyclen (5 g, 29 mmol, in DMAc (60 mL) at -20°C , was added dropwise a solution of *tert*-butyle acetate (14.1 mL, 96 mmol) in 20 mL of DMAc. The reaction was stirred 25h at room temperature. The solution was poured into water to give a clear solution. KHCO_3 was added until precipitation. The precipitate was collected by filtration then dissolved in chloroform. The mixture was washed twice with water. The organic layer was dried over Na_2SO_4 and the mixture was concentrated under reduced pressure. diethyl ether was added to precipitate the product as a white solid (11.7 g, 79%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) = 1.45 (s, 9H), 1.46 (s, 18H), 2.87 (m, 4H), 2.93 (m, 8H), 3.10 (m, 4H), 3.29 (s, 2H), 3.38 (s, 4H), 10.03 (br s, 1H)

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) [115] : δ (ppm) = 28.1, 28.2, 47.4, 48.7, 49.1, 51.2, 51.3, 58.1, 81.6, 81.8, 169.5, 170.4



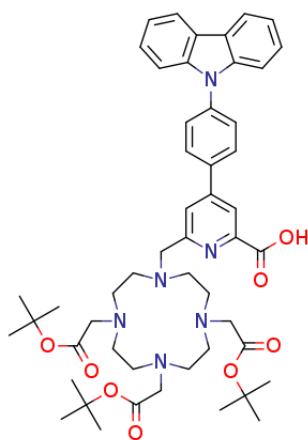
DO3(AtBu)(IPAMe)

DO3(AtBu)(IPAMe) : To a solution of *DO3(AtBu)* (1.8 g, 3.6 mmol) in MeCN (20 mL), was added Na_2CO_3 (1.58 g, 15.0 mmol) and a solution of **4** (1.1 g, 3.0 mmol) dissolved in MeCN (10 mL). The mixture was heated to reflux for 20 h. The mixture was cooled down to room temperature and filtered. The filtrate was evaporated and the residue was triturated in AcOEt to give a white powder (2.34 g, 80%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) = 8.32 (d, $J=1.35\text{Hz}$, 1H), 7.96 (d, $J=1.35\text{Hz}$, 1H), 3.90 (s, 3H), 2.84 (s, 2H), 3.40-2.20, (m, 16H), 1.46 (s, 16H), 1.34 (s, 27H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) = 169.26 (C_{quat}), 168.37 (C_{quat}), 163.94 (C_{quat}), 161.42 (C_{quat}), 161.06 (C_{quat}), 160.70 (C_{quat}), 160.33 (C_{quat}), 154.86 (C_{quat}), 137.10 ((CH), 134.23 (CH), 120.64 (C_{quat}), 117.74 (C_{quat}), 114.85 (C_{quat}), 111.96 (C_{quat}), 107.42 (C_{quat}), 83.30 (C_{quat}), 82.92 (C_{quat}), 57.32 (CH_2), 55.62 (CH_2), 55.45 (CH_2), 53.26 (CH_3), 51.22 (CH_2), 51.12 (CH_2), 50.41 (CH_2), 50.81 (CH_2), 29.84 (CH_2), 28.15 (CH_2)

LR-MS (ESI+) : monoisotopic $m/z = 790.3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calculated monoisotopic $m/z = 790.3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ for $\text{M} = \text{C}_{34}\text{H}_{56}\text{N}_5\text{O}_8\text{I}$).

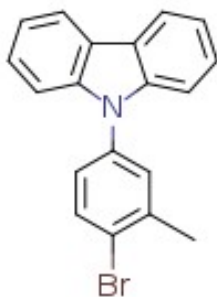


L3 - (OtBu), (OH) :

L3 – (*OtBu*), (*OH*) : Phenylcarbazole boronic ester (9H-carbazole-9-(4-phenyl) boronic acid pinacol ester) (25 mg, 0.067 mmol) and *DO3A(tBu)IPA(Me)* (60 mg, 0.075 mmol) were dissolved in DMF with CsF (32 mg, 0.21 mmol) and Pd(PPh₃)₄ (8 mg, 0.007 mmol) and stirred overnight at 90°C. The solvent was evaporated under reduced pressure. The mixture was dissolved in DCM and washed twice with water. The organic layers were dried over Na₂SO₄. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography (silica gel, DCM/MeOH 98 :2). The methyl ester was hydrolysed by a solution of NaOH 6M (0.4 mL) diluted in EtOH (2 mL) for 30min. The pH was neutralized with a solution of HCl 2 M. EtOH was evaporated under reduced pressure and the water layer was extracted with DCM three times. The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporated to give the desired product (45 mg, 75%)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 8.51 (d, J₄=1.48 Hz, 1H), 8.15 (d, J₃=8.02 Hz, 2H), 7.97 (d, J₃=8.28 Hz, 2H), 7.93 (s, 1H), 7.74 (d, J₃=8.32 Hz, 2H), 7.48 - 7.41 (m, 4H), 7.31 (td, J₃=7.41 Hz, J₃=5.69 Hz, J₄=1.36 Hz, 2H), 3.30 – 2.25 (br, 24H), 1.47 (s, 9H), 1.41 (s, 18H)

LR-MS (ESI+) : monoisotopic *m/z* = 913.6 [M+Na]⁺ (calculated monoisotopic *m/z* = 913.6 [M+Na]⁺ for M = C₅₁H₆₆N₆O₈Na).

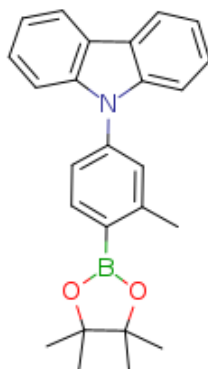


9

9-(4-bromo-3-methylphenyl)-9H-carbazole : In a sealed tube, 2-iodobiphenyl (50 mg, 0.18 mmol) and 4-Bromo,3-Methylaniline (33 mg, 0.21 mmol) were dissolved in DMF (1 mL) with Pd(OAc)₂ (2 mg, 0.09 mmol), PPh₃ (4.6 mg, 0.017 mmol), CsCO₃ (58 mg, 0.20 mmol), Cu(OAc)₂ (32 mg, 0.17 mmol). The mixture was stirred overnight at 90°C. The solvent was evaporated under reduced pressure. Ethyl acetate was added, then washed twice with brine. The organic layers were dried over Na₂SO₄ and evaporated. The crude was purified by column chromatography (silica gel, petroleum ether) to give the desired product (15 mg, 23%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 8.15 (d, J₃ = 8 Hz, 2H), 7.77 (d, J₃ = 8.5 Hz, 1H), 7.47–7.38 (m, 5H), 7.33–7.27 (m, 3H), 2.52 (s, 3H). [152]

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) [152] : δ (ppm) = 140.7, 139.8, 136.8, 133.7, 129.2, 125.9, 123.4, 120.3, 120.1, 109.6, 23.1.



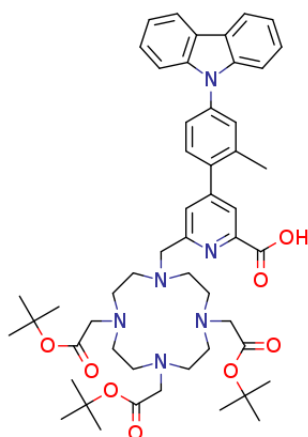
10

9-(3-methyl-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)

-9H-carbazole : A mixture of **9** (54 mg, 0.162 mmol), *bis*(pinacolato)diboron (60 mg, 0.24 mmol), 1,1'-*bis*(diphenylphosphino)ferrocene palladium(II)dichloride (8 mg, 0.01 mmol) and potassium acetate (87 g, 0.89 mmol) was added in DMSO in a sealed tube. The reaction mixture was heated for 10 h at 95°C. After cooling down to room temperature, ethyl acetate was added to the mixture, then the mixture was washed successively with water, brine and water. The organic layer was dried over Na_2SO_4 and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/DCM 95 :5). We obtained a white solid (35 mg, 59%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) = 8.14 (d, $J_3 = 8$ Hz, 2H), 8.00 (d, $J_3 = 8.5$ Hz, 1H), 7.45–7.38 (m, 5H), 7.29–7.26 (m, 3H), 2.565 (s, 3H), 1.40 (s, 12H)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) [152] : δ (ppm) = 146.99, 140.6, 139.8, 137.4, 127.9, 125.9, 123.443, 123.1, 120.3, 119.9, 109.9, 83.7, 24.9, 22.3



L4 – (*OtBu*), (*OH*)

L4–(*OtBu*), (*OH*) : Compound **10** (100 mg, 0.26 mmol) and *DO3(AtBu)IPA(OH)* (227 mg, 0.29 mmol) were dissolved in DMF with CsF (118 mg, 0.78 mmol) and Pd(PPh₃)₄ (20 mg, 0.027 mmol) and stirred overnight at 90°C under Argon. The solvent was evaporated under reduced pressure. The mixture was dissolved in a minimum of MeOH then centrifugated to remove part of palladium adducts. The solvent was evaporated then the mixture was dissolved in ethyl acetate and washed twice with water. The organic layers were dried over Na₂SO₄. The methyl ester was hydrolysed by a solution of NaOH 6 M (0.5 mL) diluted in EtOH (2.5 mL) for 10 min. The pH was neutralized with a solution of HCl 2M. EtOH was evaporated under reduced pressure and the water layer was extracted with DCM three times. The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄. The oily product was dissolved in 90% of Buffer B and was purified on preparative HPLC to give the desired product (75 mg, 32%)

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) : δ (ppm) = 8.32 (s, 1H), 8.15 (d, J₃=8.02 Hz, 2H), 7.89 (s, 1H), 7.61 (d, J₄=1.4 Hz, 2H), 7.48 - 7.44 (m, 4H), 7.32 (td, J₃=7.1 Hz, J₃=6.64 Hz, J₄=2.4 Hz, 2H), 4.00 – 3.25 (br, 24H), 2.51 (s, 3H), 1.51 (s, 9H), 1.43 (s, 18H)

LR-MS (ESI+) : monoisotopic *m/z* = 905.7 [M+H]⁺ (calculated monoisotopic *m/z* = 905.5 [M+H]⁺ for M = C₅₂H₆₈N₆O₈)

Peptidic synthesis

Peptidic sequences on resin

* means the amino acid's side chain is protected.

SP-SEA-N-terminus.Resin : Ac – K^{**}P^{**}Dap^{**}(alloc)C^{***}(StBu)TKSA^{***} – SEA.Resin

SP-Nap-N-terminus.Resin : Ac – K^{**}P^{**}Nap^{**}C^{***}(StBu)TKSA^{***} – SEA.Resin

SP.K(Alloc)-C-terminus-Resin : (Boc)^{*}CGK^{*}K^{*}FTK^{*}K^{*}(alloc)^{*}EELQKHAKTHTG^{*} – Resin

SPII.K(alloc)-C-terminus-Resin : (Boc)^{*}CGK^{*}(alloc)^{*}K^{*}FTK^{*}KEELQKHAKTHTG^{*} – Resin

ZF5.3 -Resin : Ac – K(alloc)^{*}AFSCNVCGK^{*}AFVLSRHLNRHLRVHRRAT^{*} – Resin

TP2-Resin : ^{*}PLIYL^{*}RLL^{*}RG^{*}QFK^{*}(alloc) – Resin

mTAT -Resin : AcK^{*}(MMT)^{*}RK^{*}KRR^{*}QRRR^{*}PPQ^{*}G – Resin

dTAT -Resin : Boc – ^{*}CK^{*}(MMT)^{*}RK^{*}KRR^{*}QRRR^{*}PPQ^{*}G – Resin

dLLTAT-Resin : Boc – ^{*}CLLRK^{*}KRR^{*}QRRR^{*}PPQ^{*}G – Resin

Peptides

SP-TbL₁-C-terminus : CTKSACGKKFTKK(**TbL1**)EELQKHAKTHTG – NH₂

SP-EuL₁-C-terminus : CTKSACGKKFTKK(**EuL1**)EELQKHAKTHTG – NH₂

SPII-TbL₁-C-terminus : CTKSACGK(**TbL1**)KFTKKEELQKHAKTHTG – NH₂

SP-Nap-SEA_{off}-N-terminus : Ac – KPNapC(StBu)TKSA – SEA_{off}

SP-Azu-SEA_{off}-N-terminus : Ac – KPDap(Azu)C(StBu)TKSA – SEA_{off}

SP-NBD-SEA_{off}-N-terminus : Ac – KPDap(NBD)EC(StBu)TKSA – SEA_{off}

SP-Ala-Nter-SEA_{off}-N-terminus : Ac – KPAC(StBu)TKSA – SEA_{off}

azide-NBD-Nter-SEA_{off}-N-terminus : N₃ – KPDap(NBD)EC(StBu)TKSA – SEA_{off}

SP-Nap-TbL₁ :

Ac – KPNapCTKSACGKKFTKK(**TbL1**)EELQKHAKTHTG – NH₂

SP-Azu-TbL₁ :

Ac – KPDap(Azu)CTKSACGKKFTKK(**TbL1**)EELQKHAKTHTG – NH₂

SP-Azu-EuL₁ :

Ac – KPDap(Azu)CTKSACGKKFTKK(**EuL1**)EELQKHAKTHTG – NH₂

SP-NBD-TbL₁ :

Ac – KPDap(NBD)ECTKSACGKKFTKK(**TbL1**)EELQKHAKTHTG – NH₂

SP-Ala-TbL₁ :

Ac – KPACTKSACGKKFTKK(TbL₁)EELQKHAKTHTG – NH₂

SPII-Nap-TbL₁ :

Ac – KPNapCTKSACGK(**TbL1**)KFTKKEELQKHAKTHTG – NH₂

SPII-Azu-TbL₁ :

Ac – KPDap(Azu)CTKSACGK(**TbL1**)KFTKKEELQKHAKTHTG – NH₂

SPII-NBD-TbL₁ :

Ac – KPDap(NBD)ECTKSACGK(**TbL1**)KFTKKEELQKHAKTHTG – NH₂

Alkyne-TAT : HCC(CH₂)₂CO – GGGRKKRRRQRRRPPQ – NH₂

TAT-SP-NBD-SEA_{off}-N-terminus :

$H_2N - QPPRRRQRRKKRGGG - C_2H_3N_3 - GGGKPDap(NBD)EC(StBu)TKSA - SEA_{off}$

TAT-SP-NBD :

$H_2N - QPPRRRQRRKKRGGG - C_2H_3N_3 - GGGKPDap(NBD)ECTKSACGKKFTKKEELQKHAKTHTG - NH_2$

TAT-SP-SEA_{off}-Nterminus :

$H_2N - QPPRRRQRRKKRGGG - C_2H_3N_3 - GGGKPFEC(StBu)TKSA - SEA_{off}$

TAT-SP :

$H_2N - QPPRRRQRRKKRGGG - C_2H_3N_3 - GGGKPFECTKSACGKKFTKKEELQKHAKTHTG - NH_2$

ZF5.3(TbL₁) :

$Ac - K(\mathbf{TbL1})AFYSCNVCGKAFVLSRHLNRHLRVHRRAT - NH_2$

ZF5.3(EuL₂) :

$Ac - K(\mathbf{EuL2})AFYSCNVCGKAFVLSRHLNRHLRVHRRAT - NH_2$

TP2 (TbL₁) : $PLIYLRLLRGQFK(\mathbf{TbL1}) - NH_2$

TP2 (EuL₂) : $PLIYLRLLRGQFK(\mathbf{EuL2}) - NH_2$

mTAT(EuL₃) : $Ac - K(\mathbf{EuL3})RKKRRQRRRG - NH_2$

mTAT(EuL₄) : $Ac - K(\mathbf{EuL4})RKKRRQRRRG - NH_2$

mTAT(TbL₃) : $Ac - K(\mathbf{TbL3})RKKRRQRRRG - NH_2$

dTAT(EuL₃) : $CK(\mathbf{EuL3})RKKRRQRRRG - NH_2$

dTAT(Liss) : $CK(\mathbf{Lissamine})RKKRRQRRRG - NH_2$

dTAT(FITC) : $CK(\mathbf{FITC})RKKRRQRRRG - NH_2$

dTAT(Fmoc-Gly) : $CK(\mathbf{Fmoc - Gly})RKKRRQRRRG - NH_2$

dLLTAT : $CLLRKKRRQRRRG - NH_2$

Peptides Synthesis Methods

N-terminus

SP-Nap-SEA_{off}-N-terminus : Peptide elongation was performed manually on a SEA-PS resin (0.16 mmol/g). Coupling reactions of Fmoc-protected amino acids were performed by double manual coupling (2x30 min) using 4 eq. of Fmoc-X-OH, 4 eq. of PyBOP and 8 eq. of DIEA in DMF with 5min of pre-activation. Fmoc-1-Naphthtyl-alanine-OH was coupled in the same condition. Fmoc protecting group was removed

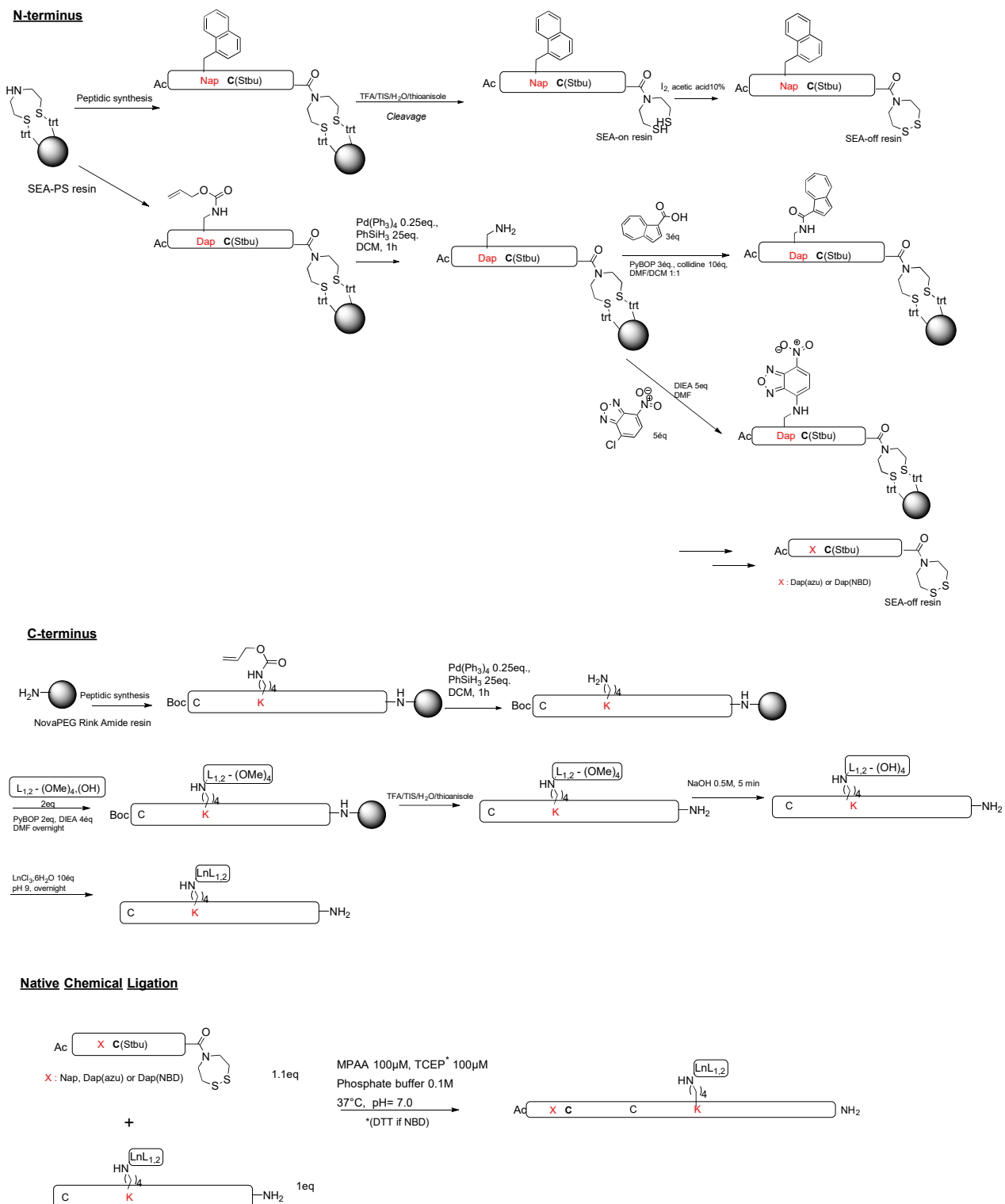


FIGURE 4.37 – General scheme for synthesis of zinc probe with different quenchers (naphtalene, azulene and NBD)

using 20% piperidine in DMF (3x3min each) with UV monitoring. The Peptide was capped using Ac₂O/DIEA/DCM (2 :1 :7 v/v/v, 3 min). The resin was washed with DMF, DCM. Removal of acid-labile side chain protecting groups and cleavage of the peptidyl resin was performed with a mixture of TFA/H₂O/TIS/thioanisole (92.5/3/3/1.5, v/v/v/v, 7.5 mL) during 2h. TFA was evaporated, and the peptide was then precipitated in ice-cold Et₂O, dissolved in deionized water, and lyophilized. The peptide was dissolved in acetic acid solution (10%) and treated with 200 mM I₂ in DMSO to oxidize the C-terminal SEA_{on} group into SEA_{off} group. DTT was finally added to quench the excess of iodine, and the oxidized peptide was immediately purified by HPLC to give SP-Nap-SEA^{off}-N-terminus.

LR-MS (ESI+) : average $m/z = 1780.5(+)$, 590.8 (2+), 394.2 (3+) / calculated average $m/z = 1180.5 [M+H]^+$, 590.8 $[M+2H]^{2+}$, 394.2 $[M+3H]^{3+}$, for M = C₅₂H₈₁N₁₁O₁₂S₄; deconvoluted mass found = 1179.8 / expected mass = 1180.1 (average isotopic composition)

SP-Azu-SEA_{off}-N-terminus : Peptide elongation was performed manually on a SEA-PS resin (0.16 mmol/g). Coupling reactions of Fmoc-protected amino acids were performed by double manual coupling (2x30 min) using 4 eq. of Fmoc-X-OH, 4 eq. of PyBOP and 8 eq. of DIEA in DMF with 5min of pre-activation. Fmoc-Dap(Alloc)-alanine-OH was coupled in the same condition. Fmoc protecting group was removed using 20% piperidine in DMF (3x3min each) with UV monitoring. The Peptide was capped using Ac₂O/DIEA/DCM (2 :1 :7 v/v/v, 3 min). The resin was washed with DMF, DCM. Alloc protecting group of Dap(Alloc) was removed using Pd(PPh₃)₄ (13 μmol, 0.5 eq., 14 mg) and phenylsilane (0.7 mmol, 25 eq., 80 μL) in degassed DCM (10 mL) for 1h. The process was repeated twice. The resin was then washed successively with DCM (x2), DMF (x2), 1% H₂O in DMF (3min), DMF (x2), 1% DIEA in DMF (3min), DMF (x2), 0.12 M sodium diethyldithiocarbamate in DMF (3min).

Azulane-1-carboxylic acid (40μmol, 3eq, 7mg for 10μmol of peptide-resin) was coupled to the free Dap side chain using PyBOP (40 μmol, 3eq, 21mg), Collidine (130 μmol, 10eq, 17 μL) in DMF/DCM (1 :1) for 17h.

Removal of acid-labile side chain protecting groups and cleavage of the peptidyl resin was performed with a mixture of TFA/H₂O/TIS/thioanisole (92.5/3/3/1.5, v/v/v/v, 7.5 mL) during 2h. TFA was evaporated, and the peptide was then precipitated in ice-cold Et₂O, dissolved in deionized water, and lyophilized. The peptide was dissolved in acetic acid solution (10%) and treated with 200 mM I₂ in DMSO to oxidize the C-terminal SEA_{on} group into SEA_{off} group. DTT was finally added to quench the excess of iodine, and the oxidized peptide was immediately purified by HPLC to give SP-Azu-SEA^{off}-N-terminus. LR-MS (ESI+) : average $m/z =$

1221.6(+), 611.3 (2+) / calculated average $m/z = 1221.5 [M+H]^+$, 611.3 $[M+2H]^{2+}$, for $M = C_{54}H_{84}N_{32}O_{32}S_4$; deconvoluted mass found = 1221.8 / expected mass = 1221.58 (average isotopic composition)

SP-NBD-SEA_{off}-N-terminus : Peptide elongation was performed manually on a SEA-PS resin (0.16 mmol/g). Coupling reactions of Fmoc-protected amino acids were performed by double manual coupling (2x30 min) using 4 eq. of Fmoc-X-OH, 4 eq. of PyBOP and 8 eq. of DIEA in DMF with 5min of pre-activation. Fmoc-Dap(Alloc)-alanine-OH was coupled in the same condition. Fmoc protecting group was removed using 20% piperidine in DMF (3x3min each) with UV monitoring. The Peptide was capped using Ac₂O/DIEA/DCM (2 :1 :7 v/v/v, 3 min). The resin was washed with DMF, DCM. Alloc protecting group of Dap(Alloc) was removed using Pd(PPh₃)₄ (13 μmol, 0.5 eq., 14 mg) and phenylsilane (0.7 mmol, 25 eq., 80 μL) in degassed DCM (10 mL) for 1h. The process was repeated twice. The resin was then washed successively with DCM (x2), DMF (x2), 1% H₂O in DMF (3min), DMF (x2), 1% DIEA in DMF (3min), DMF (x2), 0.12 M sodium diethyldithiocarbamate in DMF (3min).

4-chloro -7- nitrobenzofurazan (0.1 mmol, 5 eq, 20 mg for 23 μmol of peptide resin) is coupled to the free Dap side chain with DIEA (0.04 mmol, 2 eq, 7 μL) in 4 mL DMF for overnight.

Removal of acid-labile side chain protecting groups and cleavage of the peptidyl resin was performed with a mixture of TFA/H₂O/TIS/thioanisole (92.5/3/3/1.5, v/v/v/v, 7.5 mL) during 2h. TFA was evaporated, and the peptide was then precipitated in ice-cold Et₂O, dissolved in deionized water, and lyophilized. The peptide was dissolved in acetic acid solution (10%) and treated with 200 mM I₂ in DMSO to oxidize the C-terminal SEA_{on} group into SEA_{off} group. DTT was finally added to quench the excess of iodine, and the oxidized peptide was immediately purified by HPLC to give SP-NBD-SEA^{off}-N-terminus.

C-terminus

SP(or SPII).K(alloc)-Cterminus-Resin : The peptide synthesis was performed by solid-phase peptide synthesis (SPPS) on NovaPEG Rink amide resin (substitution 0.37 mmol/g, 330 mg, 0.12 mmol) using Fmoc chemistry. The coupling of the first amino acid was performed manually as followed. Fmoc-Gly-OH (0.36 mmol, 108 mg), PyBOP (0.36 mmol, 190 mg), DIEA (0.76 mmol, 150 μL) were dissolved in DMF (8 mL). The capping treatment was performed with a mixture of Ac₂O/pyridine/DMF 2 :1 :7 v/v/v, 10 mL, 3 min) at room temperature. Fmoc removal was performed by three successive treatments with 20% piperidine in DMF (8 mL) for 3 min at room temperature. The peptide was assembled on a CEM Corporation Liberty1 peptide synthesizer as

described before. The final amino acids Boc-Cys(trt)-OH was introduced manually. Alloc protecting group of K(alloc) was removed using Pd(PPh₃)₄ (13 μmol, 0.5 eq., 14 mg) and phenylsilane (0.7 mmol, 25 eq., 80 μL) in degassed anhydrous DCM (10 mL) for 1 h protected from light. The process was repeated twice. The resin was then washed successively with DCM (x2), DMF (x2), 1% H₂O in DMF (3 min), DMF (x2), 1% DIEA in DMF (3min), DMF (x2), 0.12 M sodium diethyldithiocarbamate in DMF (3 min). The resin was finally washed with DMF, DCM, Et₂O.

Coupling of L₁ – (OMe)₃, (OH) : The chelate was coupled on 20 μmol of peptide-resin SP(or SPII)-C-terminus by a classical peptidic coupling : L₁ – (OMe)₃, (OH) (0.04 mmol, 28 mg), PyBOP (0.08 mmol, 41 mg), DIEA (0.16 mmol, 27 μL) in DMF (3 mL). The solution was stirred overnight at room temperature. The resin was washed with DMF, DCM, Et₂O and dried. Removal of acid-labile side chain protecting groups and cleavage of the peptidyl resin was performed with a mixture of TFA/H₂O/TIS/thioanisole (92.5/3/3/1.5 v/v/v/v, 7.5 mL) during 2h. TFA was evaporated, and the peptide was then precipitated in ice-cold Et₂O, dissolved in deionized water, and lyophilized. The crude peptide is purified on HPLC.

Methyl Ester hydrolysis Methyl esters of the ligand have been hydrolysed in NaOH 0.5M for 5min. The reaction is monitored on HPLC and the solution is acidified to pH 6 before purification on HPLC. The purified peptide is lyophilised.

Metallation by Ln³⁺ The peptide (10 mg, 3.7 μmol) was dissolved in deionized water (1 mL) and terbium(III) (or europium(III)) chloride hexahydrate (11 mg, 29 μmol) was added. The pH was adjusted to 9 using 1 M aq. NaOH and the solution was degassed 20 min. The pH was controlled and adjusted to 9 if required. The mixture was degassed 15 min more and then stirred at r.t. overnight under argon atmosphere. The solution was diluted with water (2 mL) and a small amount of TCEP was added before purification on HPLC (method Xb50).

SP-TbL₁-C-terminus : LR-MS (ESI+) : average m/z = 1028.7(3+), 771.8 (4+) / calculated average m/z = 1028.1 [M+3H]³⁺ , 771.4 [M+2H]⁴⁺ , for M = C₁₃₀H₂₀₂N₃₇O₃₈S₁Tb₁ ; deconvoluted mass found = 3083.4 / expected mass = 3082.24 (average isotopic composition)

SP-EuL₁-C-terminus : LR-MS (ESI+) : average m/z = 1538.4(2+), 1026.2(3+), 770.0(4+) / calculated average m/z = 1538.7 [M+2H]²⁺ , 1026.1[M+3H]³⁺ , 769.9[M+4H]⁴⁺ for M = C₁₃₀H₂₀₂N₃₇O₃₈S₁Eu₁ ; deconvoluted mass found = 3075.9 / expected mass = 3075.41 (average isotopic composition)

Native Chemical Ligation

SP-X-LnL_{1,2}

A solution of TCEP/MPAA was prepared by dissolving TCEP (29 mg, 0.1 mmol), MPAA (17 mg, 0.1 mmol) in 0.5 mL of sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.5). The pH of the solution was adjusted to 6.5 using 1 M aq. NaOH then the solution was degassed. In a glove box, N-terminal peptide (0.6 mg, 0.43 μ mol, 1.1 eq.) and C-terminal peptide (1.6 mg, 0.39 μ mol, 1.0 eq.) were dissolved in the TCEP/MPAA buffer solution (111 μ L, final peptide concentration 3.5 μ M). The solution was stirred at 37°C in the glove box and the ligation was monitored by HPLC. After 17 h the ligation was completed. The reaction mixture was diluted with water (1 mL), acidified with 10% aq. TFA (1 mL) and extracted with Et₂O to remove the excess of MPAA. The crude product was directly purified by HPLC (method xB100).

SP-Nap-TbL₁ : LR-MS (ESI+) : average $m/z = 1010.4(4+)$, $808.5(5+)$ / calculated average $m/z = 1010.2 [M+4H]^{4+}$, $808.4[M+5H]^{5+}$ for $M = C_{175}H_{268}N_{47}O_{49}S_2Tb_1$; deconvoluted mass found = 4037.5 / expected mass = 4037.34 (average isotopic composition)

SPII-Nap-TbL₁ : LR-MS (ESI+) : average $m/z = 1010.5(4+)$, $808.6(5+)$ / calculated average $m/z = 1010.2 [M+4H]^{4+}$, $808.4[M+5H]^{5+}$ for $M = C_{175}H_{268}N_{47}O_{49}S_2Tb_1$; deconvoluted mass found = 4037.5 / expected mass = 4037.34 (average isotopic composition)

SP-Azu-TbL₁ : LR-MS (ESI+) : average $m/z = 1021.0(4+)$, $817.0(5+)$ / calculated average $m/z = 1021.0 [M+4H]^{4+}$, $817.0[M+5H]^{5+}$ for $M = C_{176}H_{269}N_{48}O_{50}S_2Tb_1$; deconvoluted mass found = 4081.7 / expected mass = 4081.41 (average isotopic composition)

SPII-Azu-TbL₁ : LR-MS (ESI+) : average $m/z = 1021.2(4+)$, $817.2(5+)$ / calculated average $m/z = 1021.0 [M+4H]^{4+}$, $817.0[M+5H]^{5+}$ for $M = C_{176}H_{269}N_{48}O_{50}S_2Tb_1$; deconvoluted mass found = 4081.7 / expected mass = 4081.41 (average isotopic composition)

SP-Azu-EuL₁ : LR-MS (ESI+) : average $m/z = 1359.1(3+)$, $1019.6(4+)$, $815.8(+5)$ / calculated average $m/z = 1358.6 [M+3H]^+$, $1019.2[M+4H]^{4+}$, $815.6[M+5H]^{5+}$ for $M = C_{176}H_{269}N_{48}O_{50}S_2Tb_1$; deconvoluted mass found = 4073.5 / expected mass = 4073.46 (average isotopic composition)

SP-NBD-TbL₁ : TCEP must be avoided with NBD (reaction with NBD). A solution of DTT/MPAA/Gn-HCl was prepared by dissolving DTT (29 mg, 0.1 mmol), MPAA (17 mg, 0.1 mmol) in 0.5 mL of sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0). The pH of the solution was adjusted to 6.5 using 1 M aq. NaOH then the solution was degassed. In a glove box, peptide SP-NBD-SEA_{off}-N-terminal (0.4 mg, 0.24 μmol, 1.1 eq.) and peptide SP-TbL₁-C-terminal (1.0 mg, 0.26 μmol, 1.0 eq.) were dissolved in the DTT/MPAA buffer solution (70 μL, final peptide concentration 3.5 μM). The solution was stirred at 37°C in the glove box and the ligation was monitored by HPLC. After 17h the ligation was completed. The reaction mixture was diluted with water (1 mL), acidified with 10% aq. TFA (1 mL) and extracted with Et₂O to remove the excess of MPAA. The crude product was directly purified by HPLC (method xB100).

LR-MS (ESI+) : average $m/z = 1407.2(3+)$, $1055.6(4+)$, $844.9(5+)$ / calculated average $m/z = 1407.3 [M+3H]^{3+}$, $1055.7 [M+4H]^{4+}$, $844.8 [M+5H]^{5+}$ for $M = C_{176}H_{272}N_{52}O_{55}S_2Tb_1$; deconvoluted mass found = 4219.2 / expected mass = 4219.47 (average isotopic composition)

SPII-NBD-TbL₁ : LR-MS (ESI+) : average $m/z = 1407.2(3+)$, $1055.6(4+)$, $844.7(5+)$ / calculated average $m/z = 1407.3 [M+3H]^{3+}$, $1055.7 [M+4H]^{4+}$, $844.8 [M+5H]^{5+}$ for $M = C_{176}H_{272}N_{52}O_{55}S_2Tb_1$; deconvoluted mass found = 4219.2 / expected mass = 4219.47 (average isotopic composition)

azide-NBD-Nter-SEA_{off}-N-terminal : Peptide elongation was performed manually on a SEA-PS resin (0.16 mmol/g) in the same condition as described before for manual peptide synthesis. Azide function was introduced by coupling 2-azido acetic acid (4eq.) in the same condition as amino acids couplings.

Alloc protecting group of Dap(Alloc) was removed using Pd(PPh₃)₄ (13 μmol, 0.5 eq., 14 mg) and phenylsilane (0.7 mmol, 25 eq., 80 μL) in degassed DCM (10 mL) for 1h. The process was repeated twice. The resin was then washed successively with DCM (x2), DMF (x2), 1% H₂O in DMF (3min), DMF (x2), 1% DIEA in DMF (3min), DMF (x2), 0.12 M sodium diethyldithiocarbamate in DMF (3min).

4-chloro -7- nitrobenzofurazan (0.125 mmol, 5 eq) is coupled to the free Dap side chain with DIEA (0.04 mmol, 2 eq) in 4mL DMF for overnight.

The peptide was cleaved from the resin in TFA/H₂O/TIS/thioanisole (92.5 :2.5 :2.5 :2.5 v/v/v/v, 10 mL), precipitated in Et₂O and purified on HPLC.

LR-MS (ESI+) : average $m/z = 1572.8(1+)$, $786.4(2+)$ / calculated average $m/z = 1571.6 [M+H]^+$, $786.3[M+2H]^{2+}$ for $M = C_{60}H_{94}N_{22}O_{20}S_4$; deconvoluted mass found = 1572.9 / expected mass = 1571.79 (average isotopic composition)

alkyne-TAT : Peptide elongation was performed as described above using a peptide synthesizer on Rink-PEG-PS resin (Nova PEG Rink Amide, 0.1 mmol, 0.45 mmol/g) after attachment of the first amino acid by single manual coupling (30 min) using 2-fold excess of Fmoc-Gly-OH, 2-fold excess of PyBOP and 6-fold excess of DIEA in DMF followed by acetylation using (Ac₂O/pyridine/DMF 1 :2 :7 (v/v/v), 10 mL, 5 min). Non-standard 4- pentynoic acid was introduced manually in N-terminal to insert alkyne function using a standard coupling. The resin was dried with Et₂O. Removal of acid-labile side chain protecting groups and cleavage were performed using TFA/H₂O/TIS/thioanisole (92.5 :2.5 :2.5 :2.5 v/v/v/v, 10 mL) for 4 h. The peptide was precipitated in cold Et₂O/heptane (1 :1 v/v, 150 mL), centrifuged, dissolved in deionized water, lyophilized and purified by HPLC.

LR-MS (ESI+) : average $m/z = 383.4(5+)$, $319.7(6+)$ / calculated average $m/z = 383.4[M+5H]^{5+}$, $319.7[M+6H]^{6+}$ for $M = C_{79}H_{142}N_{38}O_{18}$; deconvoluted mass found = 1912.2 / expected mass = 1912.25(average isotopic composition)

TAT-SP-NBD-SEA_{off}-N-terminus

Huisgen ligation In a glovebox, CuSO₄(0.04mmol, 6.3mg) was dissolved in 100 μ L of degassed sodium phosphate buffer. THPTA (0.025mmol, 10.9mg) was dissolved in 50 μ L of degassed sodium phosphate buffer. Sodium Ascorbate (0.1 mmol, 19.8mg) was dissolved in 50 μ L of degassed sodium phosphate buffer. One equivalent of alkyne peptide alkyne-TAT (0.9 μ mol , 1.8 mg) and 1.2 equivalent of azido peptide azide-NBD-Nter-SEA_{off}-N-terminus (1.1 μ mol , 1.8 mg) were dissolved in 51.8 μ L of degassed sodium phosphate buffer. 11.7 μ L of CuSO₄ (5eq) solution and 18.8 μ L of THPTA (10eq) were mixed together first and then added to the peptide solution. 47 μ L of sodium ascorbate (100eq) was added to the mix at the end. The reaction was complete instantaneously but the mix was stirred at r.t. for 30 min. The solution mix was quenched with EDTA then purified on hplc.

LR-MS (ESI+) : average $m/z = 872.1(4+)$, $697.9(5+)$ / calculated average $m/z = 871.9 [M+4H]^{4+}$, $697.8 [M+5H]^{5+}$ for $M = C_{139}H_{236}N_{60}O_{38}S_4$; deconvoluted mass found = 3485.1/ expected mass = 3484.04(average isotopic composition)

TAT-SP-NBD-TbL₁ :

Native chemical ligation A solution of DTT/MPAA was prepared by dissolving DTT (29 mg, 0.1 mmol), MPAA (17 mg, 0.1 mmol) in 0.5 mL of sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.5). The pH of the solution was adjusted to 6.5 using 1 M aq. NaOH then the solution was degassed. In a glove box,

peptide TAT-SP-NBD-SEA_{off}-N-terminus (0.73 mg, 0.18 μmol , 1.1 eq.) and peptide SP-TbL₁-C-terminus (0.6 mg, 0.16 μmol , 1.0 eq.) were dissolved in the DTT/MPAA buffer solution (45 μL , final peptide concentration 3.5 μM). The solution was stirred at 37°C in the glove box and the ligation was monitored by HPLC. After 20h the ligation was completed. The reaction mixture was diluted with water (1 mL), acidified with 10% aq. TFA (1 mL) and extracted with Et₂O to remove the excess of MPAA. The crude product was directly purified by HPLC (method xB100) to give TAT-SP3-NBD-TbL₁.

LR-MS (ESI+) : average m/z = 1058.1(6+), 907.1(7+) / calculated average m/z = 1058.0 [M+6H]⁶⁺ , 907.0 [M+7H]⁷⁺ for M = C₂₆₁H₄₂₁N₉₆O₇₆S₂Tb₁ ; deconvoluted mass found = 6344 / expected mass = 6342.87 (average isotopic composition)

TAT-SP-SEA_{off}-N-terminus : LR-MS (ESI+) : average m/z = 564.9(6+), 484.4(7+) / calculated average m/z = 545.8[M+6H]⁶⁺ , 484.3 [M+7H]⁷⁺ for M = C₁₃₉H₂₃₈N₅₆O₃₅S₄Tb₁ ; deconvoluted mass found = 3383.4 / expected mass = 3382.03 (average isotopic composition)

TAT-SP-TbL₁ : LR-MS (ESI+) : average m/z = 1249.1(5+), 781.1(8+), 694.4(9+) / calculated average m/z = 1249.0 [M+5H]⁵⁺ , 781.1[M+8H]⁸⁺ , 694.4 [M+9H]⁹⁺ for M = C₂₆₁H₄₂₃N₉₂O₇₃S₂Tb₁ ; deconvoluted mass found = 6240.5 / expected mass = 6239.86 (average isotopic composition)

Functionalization of CPP peptide

ZF5.3(TbL₁) :

Peptide Synthesis ZF5.3-Resin : The peptide synthesis was performed by solid-phase peptide synthesis (SPPS) on NovaPEG Rink amid resin (substitution 0.37 mmol/g, 330 mg, 0.12 mmol) using Fmoc chemistry. The coupling of the first amino acid was performed manually as followed. Fmoc-Thr-OH (0.36 mmol, 108 mg), PyBOP (0.36 mmol, 190 mg), DIEA (0.76 mmol, 150 μL) were dissolved in DMF (8 mL). The capping treatment was performed with a mixture of Ac₂O/pyridine/DMF 2 : 1 : 7 v/v/v, 10 mL, 3 min) at room temperature. Fmoc removal was performed by three successive treatments with 20% piperidine in DMF (8 mL) for 3 min at room temperature. The peptide was assembled on a CEM Corporation Liberty1 peptide synthesizer. The automated peptide synthesis were performed as described before. The Fmoc-Lys(alloc)-OH was introduced manually. Fmoc was removed and the peptide was acetylated. Alloc protecting group of K(alloc) was removed using Pd(PPh₃)₄ (13 μmol , 0.5 eq., 14 mg) and phenylsilane (0.7 mmol, 25 eq., 80 μL) in degassed anhydrous DCM

(10 mL) for 1 h protected from light. The process was repeated twice. The resin was then washed successively with DCM (x2), DMF (x2), 1% H₂O in DMF (3min), DMF (x2), 1% DIEA in DMF (3min), DMF (x2), 0.12 M sodium diethyldithiocarbamate in DMF (3min). The resin was finally washed with DMF, DCM, Et₂O and dried to be stored for further coupling reaction on the free amine.

Coupling of L₁-(OMe)₄, (OH) and cleavage of peptide The chelate was coupled on 20 μmol of peptide-resin by a classical peptidic coupling : LnL_{1,2} (0.02 mmol, 11 mg), PyBOP (0.08 mmol, 42 mg), DIEA (0.16 mmol, 27 μL) in DMF (3 mL). The solution was stirred overnight at room temperature. The resin was washed with DMF, DCM, Et₂O and dried. Removal of acid-labile side chain protecting groups and cleavage of the peptidyl resin was performed with a mixture of TFA/H₂O/TIS/thioanisole (92.5/2.5/2.5/2.5 v/v/v/v, 4mL) during 2h. TFA was evaporated, and the peptide was then precipitated in ice-cold Et₂O. The crude product was directly purified by HPLC (method xB100), then lyophilized.

Methyl Ester hydrolysis Methyl esters of the ligand have been hydrolysed in NaOH 0.3 M for 20 min. The pH was acidified to 6 before purification preparative HPLC.

Metallation The peptide (10 mg, 3.7 μmol) was dissolved in deionized water (1 mL) and terbium(III) (or europium) chloride hexahydrate (7 mg, 23 μmol) was added. The pH was adjusted to 9 using 1 M aq. NaOH and the solution was degassed 20 min. The pH was controlled and adjusted to 9 if required. The mixture was degassed 15 min more and then stirred at r.t. overnight under Argon atmosphere. The solution was diluted with water (2 mL) and purified by HPLC (method Xb100).

LR-MS : average m/z = 1403.3(3+), 1052.4(4+), 842.2(5+) / calculated average m/z = 1403.0[M+3H]³⁺, 1052.5 [M+4H]⁴⁺, 842.2[M+5H]⁵⁺ for M = C₁₇₉H₂₇₈N₆₀O₄₅S₂Eu₁; deconvoluted mass found = 4206.4 / expected mass = 4205.64 (average isotopic composition)

TP2 (EuL₂) :

Synthesis : The peptide synthesis was performed manually by solid-phase peptide synthesis (SPPS) on NovaPEG Rink amid resin (substitution 0.37 mmol/g) using Fmoc chemistry. Coupling reactions of Fmoc-protected amino acids were performed by double manual coupling (2x30 min) using 4 eq. of Fmoc-X-OH, 4 eq. of PyBOP and 8 eq. of DIEA in DMF with 5 min of pre-activation. The N-terminus was protected by a BOC group by reaction with BOC₂O 1.2 eq in DCM. The pro-ligand was coupled

in peptidic coupling condition. Then the peptide was cleaved from the resin with a mixture of TFA/H₂O/DTT(94/3/3 v/v/v, 4 mL) during 2h. Methyl esters hydrolysis and metallation are performed identically to ZF5.3(TbL₁) described above.

LR-MS : average $m/z = 1202.2(2+)$, $801.8(3+)$ / calculated average $m/z = 1202.1[M+2H]^{2+}$, $801.7 [M+3H]^{3+}$ for $M = C_{108}H_{164}N_{27}O_{25}Eu_1$; deconvoluted mass found = 2403.6 / expected mass = 2402.62 (average isotopic composition)

m(EuL₃)TAT :

Peptide Synthesis : The peptide synthesis was performed by solid-phase peptide synthesis (SPPS) on MBHA Rink amid resin (substitution 0.58 mmol/g, 200 mg, 0.12 mmol) using Fmoc chemistry. The coupling of the first amino acid was performed manually as followed. Fmoc-Gly-OH (0.36 mmol, 108 mg), PyBOP (0.36 mmol, 190 mg), DIEA (0.76 mmol, 150 μ L) were dissolved in DMF (8 mL). Fmoc removal was performed with 20% piperidine in DMF (8 mL) for 3 min (3 times) at room temperature. The peptide was assembled on a CEM Corporation Liberty1 peptide synthesizer. The coupling condition was described before.

The final amino acids Fmoc-Lys(MMT)-OH was introduced manually. Fmoc was removed and the peptide was capped (Ac₂O/pyridine/DMF 2 :1 :7 v/v/v, 10 mL, 3 min)). MMT protecting group was removed by 1% of TFA in DCM with 2% TIS during 5 min and the process was repeated 4 times. To verify that MMT was fully deprotected, the peptide resin was incubated 3 min in 1% TFA in DCM without TIS. If fully deprotected, the solution will appear colourless; if not, the solution has a yellow color because of the removal of MTT. The resin was finally washed with DMF, DCM, Et₂O and dried to be stocked for further couplings reaction on the free amine.

Coupling of L_{3,4}-(OtBu)₃, (OH) and cleavage of peptide The pro-ligand (0.03 mmol, 30 mg) was coupled on 20 μ mol of peptide-resin by a classical peptidic coupling : PyBOP (0.08 mmol, 42 mg), DIEA (0.16 mmol, 27 μ L) in DMF (3 mL). The solution was stirred overnight at room temperature. The resin was washed with DMF, DCM, Et₂O and dried. Removal of acid-labile side chain protecting groups and cleavage of the peptidyl resin was performed with a mixture of TFA/H₂O/TIS/thioanisole (92.5 :2.5 :2.5 :2.5 v/v/v/v, 1mL) during 4 h. TFA was evaporated, and the peptide was then precipitated in ice-cold Et₂O. The crude peptide was deprotected again in fresh TFA to remove undeprotected tBu groups of the pro-ligand. TFA was evaporated, and the peptide was then precipitated in ice-cold Et₂O. The crude was purified on HPLC and lyophilized.

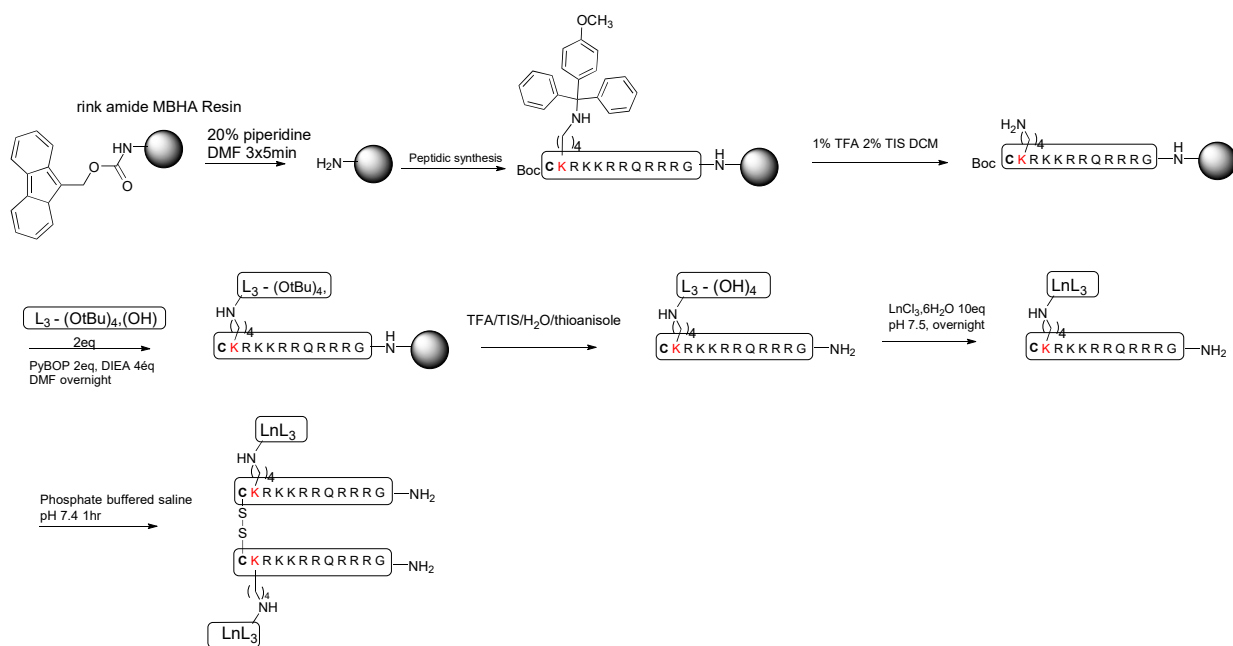


FIGURE 4.38 – Scheme of synthesis for TAT dimer

Metallation of Ln^{3+} The peptide (10 mg, 3.7 μmol) was dissolved in deionized water (1 mL) and terbium(III) (or europium) chloride hexahydrate (7 mg, 26 μmol) was added. The pH was adjusted to 7.5 using 1 M aq. NaOH. The mixture stirred at r.t. overnight. The solution was diluted with water (1.5 mL) and salts was remove with solid phase extraction Oasis cartridge (HLB, Waters).

LR-MS (ESI+) : average $m/z = 807.5(3+)$, 605.9(4+), 485.0 (5+), 404.3 (6+) / calculated average $m/z = 807.4[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, 605.8 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$, 484.9 $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$, 404.2 $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ for $\text{M} = \text{C}_{103}\text{H}_{163}\text{N}_{39}\text{O}_{20}\text{Eu}_1$; deconvoluted mass found = 2421.2 / expected mass = 2421.9 (average isotopic composition)

$\underline{m(\text{TbL}_3)\text{TAT}}$: LR-MS (ESI+) : average $m/z = 809.9(3+)$, 607.7(4+), 486.4 (5+), 405.5 (6+) / calculated average $m/z = 809.7[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, 607.6 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$, 486.2 $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$, 405.4 $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ for $\text{M} = \text{C}_{103}\text{H}_{161}\text{N}_{40}\text{O}_{20}\text{Tb}_1$; deconvoluted mass found = 2427.2 / expected mass = 2426.6 (average isotopic composition)

$\underline{m(\text{EuL}_4)\text{TAT}}$: LR-MS (ESI+) : average $m/z = 812.3(3+)$, 609.5(4+), 487.8 (5+)/ calculated average $m/z = 811.7[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, 609.1 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$, 487.4 $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$, for $\text{M} = \text{C}_{103}\text{H}_{162}\text{N}_{40}\text{O}_{20}\text{Eu}_1$; deconvoluted mass found = 2433.9 / expected mass = 2433.66 (average isotopic composition)

Dimerization of TAT peptide

d(Liss)TAT :

Peptide Synthesis The peptide synthesis was performed by solid-phase peptide synthesis (SPPS) on MBHA Rink amid resin (substitution 0.58 mmol/g, 200 mg, 0.12 mmol) using Fmoc chemistry. The coupling of the first amino acid was performed manually as followed. Fmoc-Gly-OH (0.36 mmol, 108 mg), PyBOP (0.36 mmol, 190 mg), DIEA (0.76 mmol, 150 μ L) were dissolved in DMF (8 mL). Fmoc removal was performed with 20% piperidine in DMF (8 mL) for 3 min (3 times) at room temperature. The peptide was assembled on a CEM Corporation Liberty1 peptide synthesizer. The coupling condition was described before. The Fmoc-Lys(MMT)-OH was introduced manually. MMT protecting group was removed by 1% of TFA in DCM with 2% TIS during 5 min and the process was repeated 4 times. To verify that MMT was fully deprotected, the peptide resin was incubated 3 min in 1% TFA in DCM without TIS. If fully deprotected, the solution will appear colourless; if not, the solution has a yellow color because of the removal of MTT. The resin was finally washed with DMF, DCM, Et₂O and dried to be stocked for further couplings reaction on the free amine.

Coupling of Lissamine Lissamine (0.02 mmol, 40 mg) was coupled on 20 μ mol with DIEA (0.16 mmol, 27 μ L) in DMF (3 mL). The solution was stirred overnight at room temperature. The resin was washed with DMF, DCM, Et₂O and dried. Removal of acid-labile side chain protecting groups and cleavage of the peptidyl resin was performed with a mixture of TFA/H₂O/TIS/thioanisole (92.5 :2.5 :2.5 :2.5 by vol., 2 mL) during 4 h. TFA was evaporated, and the peptide was then precipitated in ice-cold Et₂O. The crude was purified on HPLC and lyophilized.

Dimerization The peptide was dissolved in PBS buffer and let stirred overnight to make disulfide bond between free thiol groups of terminal cysteines. The peptide dimer was purified on HPLC (Xb100).

LR-MS : average m/z = 867.6(5+), 723.2(6+), 620.1(7+) / calculated average m/z = 867.5 [M+5H]⁵⁺, 723.1 [M+6H]⁶⁺, 620.0 [M+7H]⁷⁺, for M = C₁₈₂H₃₀₈N₇₄O₃₈S₈; deconvoluted mass found = 4332.8 / expected mass = 2333.31 (average isotopic composition)

d(Fmoc-Gly)TAT : LR-MS : average m/z = 763.2(5+), 636.2(6+), 545.5(7+), 477.4(8+) / calculated average m/z = 763.0 [M+5H]⁵⁺, 636.0[M+6H]⁶⁺, 545.3 [M+7H]⁷⁺, 477.3 [M+8H]⁸⁺, for M = C₁₆₂H₂₇₈N₇₂O₃₂S₂; deconvoluted mass found =

3811.8 / expected mass = 3810.60 (average isotopic composition)

dLLTAT : LR-MS (ESI+) : average m/z = 690.8(5+), 575.8(6+), 493.7(7+), 432.2(8+) / calculated average m/z = 690.6 [M+5H]⁵⁺, 545.5[M+6H]⁶⁺, 493.5[M+7H]⁷⁺, 431.9 [M+8H]⁸⁺, for M = C₁₄₀H₂₇₂N₇₀O₂₈S₂; deconvoluted mass found = 3449.6 / expected mass = 3448.3 (average isotopic composition)

d(LnL_{3,4})TAT : The synthesis is similar to m(EuL₃)TAT : with the addition of the dimerization step by disulfide bond. The peptide was dissolved in PBS buffer and let stirred overnight to make disulfide bond between free thiol group of terminal cysteine. The peptide dimer was purified on HPLC (Xb100).

d(EuL₃)TAT : LR-MS (ESI+) : average m/z = 827.5(6+), 709.6(7+), 620.9(8+), 552.0 (9+) / calculated average m/z = 827.2 [M+6H]⁶⁺, 709.2[M+7H]⁷⁺, 620.7 [M+8H]⁸⁺, 551.8 [M+9H]⁹⁺, for M = C₂₀₈H₃₂₈N₈₀O₄₀S₂Eu₂; deconvoluted mass found = 4961.6 / expected mass = 4959.93 (average isotopic composition)

Spectroscopic measurements

The stock solution of HEPES buffer was prepared at a concentration of 100 mM, pH 7.5 with miliQ water. Residual metals were removed by ion exchange chromatography Chelex resin. A stock solution of Zn(ClO₄)₂(H₂O)₆ was prepared at a concentration of 2 mM. The precise concentration was measured by colorimetric titration against EDTA 5 mM with orange xylenol. A precise volume of 5 mL of zinc stock solution was mixed with 5 mL of acetate/acetic acid buffer (1 :1, 0.1 M). Few drops of orange xylenol was added to the mixture. EDTA solution was added dropwise with a graduated burette until the solution's color changes from purple to yellow. Titration was repeated three times.

SP-X-TbL₁ zinc titration

The peptide is dissolved in water and the absorbance is measured in 1 mL quartz cell (1 cm path length) to determine the concentration of stock solution. Sample for titration was prepared in 1 mL quartz cell at 10 μM in HEPES buffer (10 mM pH 7.5) with TCEP (250 μM).

The sample's spectroscopic measurements were recorded after each addition of zinc solution until 2 eq of peptide amount. At the end of the titration, 2 eq of EDTA solution was added to verify the return to the initial state.

Quantum Yield measurement

Quantum yield measurement was determined by relative method with quinine sulphate in 0.5 M H₂SO₄ as standards [162]. The peptide (with or without zinc) was dissolved in HEPES buffer (10 mM pH 7.5) with TCEP (250 μM). 4 different concentrations are prepared for the sample and for the standard [163]. The absorbance of the samples and the standards at the chosen wavelength lie between 0 and 0.1 a.u. The emission spectra are recorded with the same parameters. The integrated corrected emission intensity is plotted against the absorbance to determine the slope for the sample plot and for the standard plot. The quantum yield of the sample is determined by the following equation :

$$\phi_{sample} = \phi_{standard} \left(\frac{Slope_{sample}}{Slope_{standard}} \right) \left(\frac{\eta_{sample}^2}{\eta_{standard}^2} \right) \quad (4.5)$$

(η the refractive index of the solvent).

Determination of water molecule coordinated to the lanthanide, q

The sample was prepared in a HEPES buffer (10 mM, pH 7.5) containing TCEP (250 μM) with various H₂O/D₂O mixtures (25, 50, 75 and 100% of H₂O). The lifetimes were recorded for each preparation. Lifetimes in 100% D₂O were extrapolated from the plot of lifetimes against the fraction of H₂O in H₂O/D₂O mixtures. The number of coordinated water molecules (q) for terbium complex was determined using $q = 5(1/\tau_{H_2O} - 1/\tau_{D_2O} - 0.06)$ and for europium complex using $q = 1.2(1/\tau_{H_2O} - 1/\tau_{D_2O} - 0.25 - 0.075)$ [149].

Influence of metal cations

Time-gated emission spectra and lifetime were recorded before and after addition of concentrated stock solutions of metal cations corresponding to 2 eq. vs zinc probes for Mn²⁺, Fe²⁺, Co²⁺, Ni²⁺ or Cu²⁺ (sulphate salts), 50 mM for Na⁺ or K⁺ (perchlorate salts) and 10 mM for Mg²⁺ and Ca²⁺ (perchlorate salts).

Determination of binding constants

The binding constants were determined using EGTA. The apparent Zn²⁺ binding constant of EGTA at pH 7.5 was reported in the literature : $-\log(K_a(Zn - EGTA)) = 9.2$. The dilution could be neglected. The emission spectrum was recorded after each addition of Zn²⁺ solution and the intensity against the Zn²⁺/peptide ratio (r) was

fitted to the equilibrium $\text{Probe} \cdot \text{Zn}^{2+} + \text{EGTA} \rightleftharpoons \text{Probe} + \text{Zn}^{2+} \cdot \text{EGTA}$. by equations below (4.6) which I_0 and I_{max} are the emission intensities at the beginning and the end of the titration, $[\text{Probe}]_{total}$, $[\text{EGTA}]_{total}$ and $[\text{Zn}^{2+}]_{total}$ the total concentrations of the sample, EGTA and Zn^{2+} added in the solution.

$$I = I_0 + \frac{(I_{max} - I_0)}{[\text{Probe}]_{total}} * \frac{-b - \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a} \quad (4.6)$$

when $[\text{Zn}^{2+}]_{total} < [\text{Probe}]_{total} + [\text{EGTA}]_{total}$

and $I = I_{max}$ when $[\text{Zn}^{2+}]_{total} > [\text{Probe}]_{total} + [\text{EGTA}]_{total}$

$$\text{with } r = \frac{[\text{Zn}^{2+}]}{[\text{Probe}]_{total}}$$

$$a = K_c - 1$$

$$b = r[\text{Probe}]_{total} - K_c r [\text{Probe}]_{total} - K_c [\text{Probe}]_{total} - [\text{EGTA}]_{total}$$

$$c = K_c r [\text{Probe}]_{total}^2$$

$$K_c = \frac{K_{a_{\text{Sonde-Zn}^{2+}}}}{K_{a_{\text{EGTA-Zn}^{2+}}}}$$

DTNB measurement

The reaction buffer was prepared at 0.1 sodium phosphate at pH 8.0 containing 1 mM EDTA. The buffer was degazed and stored in glovebox. The Ellman's reagent solution was prepared by dissolving 4 mg of Ellman's reagent in 1 mL of reaction buffer.

The concentration of the sample can be determined by measuring the absorbance at 412 nm divided by the molar extinction coefficient ($14\ 150\ \text{L mol}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$) after reaction with Ellman's reagent or by a standard curve as explained in the following :

A stock solution of cysteine was prepared at 1 mM in 10 mL of buffer. The standards of cysteine were prepared with 50 μL of Ellman's reagent solution qsp 1mL of reaction buffer for a final concentration in the range of 0-150 μM in a 1 mL cuvette. The solution was mix and incubated for 15 min at r.t. before measuring the absorbance at 412 nm. The blank cuvette does not contain cysteine. The sample was prepared similarly. The sample concentration must be in the range of standards preparations. The absorbance of the standards are plotted against its concentration to generate a standard curve in order to determine the sample concentration.

Cellular experiment

Cell culture

Cell preparations were done by collaborators at IAB (Institute of Advanced Biosciences). HeLa cells were cultured in a culture flask at 37°C with 5% CO₂. 24 h before experiment, cells were seeded in Labtek 8-wells at about 30 000 cells per well in RPMI with 10% SVF.

Cell preparation for cell microscopy

The stock solution of the compounds to analyse were prepared prior to cell experiment in order to obtain 200 µM in 25 µL PBS buffer. Then the sample solutions were prepared by dilution of the stock solutions at the target concentration for a final volume of 200 µL . HeLa cells were washed 3 times with PBS (or DMEM or L-15) before being incubated with the sample solution. The cells were directly analyzed under the microscope or let incubated for a chosen incubation time then washed three times with PBS before adding fresh medium.

Confocal spectroscopy

: Confocal 2P experiments were performed by using a LSMDuoScan-Confocor3 NLO microscope (Carl Zeiss) composed of a LSM710 confocal module and an inverted motorized stand (AxioObserver) equipped with an on-stage cell incubator. Excitation was provided by a Ti :Sa femtosecond laser (Chameleon, Ultra II, Coherent) featuring chirp precompensation. The C-apochromat 40×/ 1.2 water-immersion objective was used throughout experiments. The pinhole was open during 2P acquisition in descanned detection mode. The spectral PMT detector (Quasar) or avalanche photodiodes were used to register the emission signal in each pixel of the confocal image [158].

2P microscopy : TSLIM

The TSLIM was performed as described in the following cited paper [158] : The time series acquisition for TSLIM was configured in a single spot (LSM710) using the standard FRAP module of Zen2010 software. The sampling laser was deactivated, while the ‘bleaching’ laser was allowed to produce a single low intensity pulse (few ms) for the excitation light source. Decay sampling started immediately after the excitation pulse with 7.56 ms (LSM710) temporal resolution. The whole procedure was repeated 100 times (total time per spot/line ~ 1 s) and the average decay was registered as a separate

file. The lifetime analysis was performed by nonlinear fitting with single-exponential model.

MTT proliferation assay

Inhibition of cell proliferation by molecules was measured by a MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. HeLa cells were seeded into 96-well plates (3×10^3 cells per well) in 100 μL of culture medium. After 24 h, cells were washed with PBS 3 times then treated with compounds at various concentrations during 20 min. In parallel, a control with culture medium alone was done. Following incubation of the cells with the samples, the solution was discarded and the cells were washed twice with PBS. Fresh culture medium was then added and cells were incubated for 24 h or 48 h. At the end of the incubation, 10 μL of a MTT (Euromedex, Mundolsheim, France) stock solution in PBS at 5 mg mL^{-1} was added in each well and the plates were incubated at 37°C for 3 h. Plates were then centrifugated for 5 min at 400 g before the medium was discarded and replaced with DMSO (100 μL per well) to solubilize water-insoluble purple formazan crystals. After 15 min under shaking, absorbance was measured on an ELISA reader (Tecan, Männedorf, Switzerland) at a test wavelength of 570 nm and a reference wavelength of 650 nm. Absorbance obtained by cells in control medium was rated as 100% cell survival. Each data point is the average of three independent experiments.

Bibliographie

- [1] J. Zhu, W. A. Maza, and A. J. Morris, “Light-harvesting and energy transfer in ruthenium(II)-polypyridyl doped zirconium(IV) metal-organic frameworks : A look toward solar cell applications,” *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry*, vol. 344, pp. 64–77, Jul. 2017.
- [2] S. K. Lyons, P. S. Patrick, and K. M. Brindle, “Imaging Mouse Cancer Models In Vivo Using Reporter Transgenes,” *Cold Spring Harbor Protocols*, vol. 2013, no. 8, p. pdb.top069864, Jan. 2013.
- [3] J. Lucas, P. Lucas, T. Le Mercier, A. Rollat, and W. Davenport, “Chapter 8 - Rare Earth Electronic Structures and Trends in Properties,” in *Rare Earths*, J. Lucas, P. Lucas, T. Le Mercier, A. Rollat, and W. Davenport, Eds. Amsterdam : Elsevier, Jan. 2015, pp. 123–139.
- [4] J.-C. G. Bünzli and S. V. Eliseeva, “Basics of Lanthanide Photophysics,” in *Lanthanide Luminescence : Photophysical, Analytical and Biological Aspects*, ser. Springer Series on Fluorescence, P. Hänninen and H. Härmä, Eds. Berlin, Heidelberg : Springer, 2011, pp. 1–45.
- [5] M. C. Heffern, L. M. Matosziuk, and T. J. Meade, “Lanthanide Probes for Bioresponsive Imaging,” *Chemical Reviews*, vol. 114, no. 8, pp. 4496–4539, Apr. 2014.
- [6] J.-C. G. Bünzli, “On the design of highly luminescent lanthanide complexes,” *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 293–294, pp. 19–47, Jun. 2015.
- [7] D. Parker, J. D. Fradgley, and K.-L. Wong, “The design of responsive luminescent lanthanide probes and sensors,” *Chemical Society Reviews*, vol. 50, no. 14, pp. 8193–8213, Jul. 2021.
- [8] K. Y. Zhang, Q. Yu, H. Wei, S. Liu, Q. Zhao, and W. Huang, “Long-Lived Emissive Probes for Time-Resolved Photoluminescence Bioimaging and Biosensing,” *Chemical Reviews*, vol. 118, no. 4, pp. 1770–1839, Feb. 2018.

- [9] B. Alpha, R. Ballardini, V. Balzani, J.-M. Lehn, S. Perathoner, and N. Sabbatini, "Antenna effect in luminescent lanthanide cryptates : A photophysical study," *Photochemistry and Photobiology*, vol. 52, no. 2, pp. 299–306, Aug. 1990.
- [10] J. Xu, T. M. Corneillie, E. G. Moore, G.-L. Law, N. G. Butlin, and K. N. Raymond, "Octadentate Cages of Tb(III) 2-Hydroxyisophthalamides : A New Standard for Luminescent Lanthanide Labels," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 133, no. 49, pp. 19900–19910, Dec. 2011.
- [11] J. Vuojola, M. Syrj np  , U. Lamminm  ki, and T. Soukka, "Genetically Encoded Protease Substrate Based on Lanthanide-Binding Peptide for Time-Gated Fluorescence Detection," *Analytical Chemistry*, vol. 85, no. 3, pp. 1367–1373, Feb. 2013.
- [12] V. L. and I. Hemmil  , "Homogeneous Assay Based on Anti-Stokes' Shift Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy-Transfer Measurement," <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac048414o>, Jan. 2005.
- [13] C. A. Gersbach, T. Gaj, and C. F. Barbas, "Synthetic Zinc Finger Proteins : The Advent of Targeted Gene Regulation and Genome Modification Technologies," *Accounts of Chemical Research*, vol. 47, no. 8, pp. 2309–2318, Aug. 2014.
- [14] D. Y. Zhang, M. Azrad, W. Demark-Wahnefried, C. J. Frederickson, S. J. Lippard, and R. J. Radford, "Peptide-Based, Two-Fluorophore, Ratiometric Probe for Quantifying Mobile Zinc in Biological Solutions," *ACS Chemical Biology*, vol. 10, no. 2, pp. 385–389, Feb. 2015.
- [15] J. L. Vinkenborg, T. J. Nicolson, E. A. Bellomo, M. S. Koay, G. A. Rutter, and M. Merkx, "Genetically encoded FRET sensors to monitor intracellular Zn ²⁺ homeostasis," *Nature Methods*, vol. 6, no. 10, pp. 737–740, Oct. 2009.
- [16] K. Hanaoka, K. Kikuchi, H. Kojima, Y. Urano, and T. Nagano, "Development of a Zinc Ion-Selective Luminescent Lanthanide Chemosensor for Biological Applications," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 126, no. 39, pp. 12470–12476, Oct. 2004.
- [17] T. Hirayama, M. Taki, K. Akaoka, and Y. Yamamoto, "Development of a dual functional luminescent sensor for zinc ion based on a peptidic architecture," *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, vol. 22, no. 24, pp. 7410–7413, Dec. 2012.
- [18] M. Royzen, A. Durandin, V. G. Young, N. E. Geacintov, and J. W. Canary, "A Sensitive Probe for the Detection of Zn(II) by Time-Resolved Fluorescence,"

- Journal of the American Chemical Society*, vol. 128, no. 12, pp. 3854–3855, Mar. 2006.
- [19] C. Zhang, M. Liu, S. Liu, H. Yang, Q. Zhao, Z. Liu, and W. He, “Phosphorescence Lifetime Imaging of Labile Zn²⁺ in Mitochondria via a Phosphorescent Iridium(III) Complex,” *Inorganic Chemistry*, vol. 57, no. 17, pp. 10 625–10 632, Sep. 2018.
- [20] M. Isaac, “Synthèse et caractérisation de sondes peptidiques luminescentes pour l’imagerie biologique du cuivre (I) et du zinc (II),” These de Doctorat, Université Grenoble Alpes (ComUE), Dec. 2015.
- [21] M. Isaac, L. Raibaut, C. Cepeda, A. Roux, D. Boturn, S. V. Eliseeva, S. Petoud, and O. Sénèque, “Luminescent Zinc Fingers : Zn-Responsive Neodymium Near-Infrared Emission in Water,” *Chemistry - A European Journal*, vol. 23, no. 46, pp. 10 992–10 996, Aug. 2017.
- [22] A. C. Conibear, E. E. Watson, R. J. Payne, and C. F. W. Becker, “Native chemical ligation in protein synthesis and semi-synthesis,” *Chemical Society Reviews*, vol. 47, no. 24, pp. 9046–9068, Dec. 2018.
- [23] C. Cepeda, “Synthèse et caractérisation de sondes luminescentes peptidiques pour l’imagerie de cations,” These de Doctorat, Université Grenoble Alpes (ComUE), Nov. 2017.
- [24] D. Blakemore, “Chapter 1 :Suzuki–Miyaura Coupling,” in *Synthetic Methods in Drug Discovery*. The Royal Society of Chemistry, May 2016, vol. 1, pp. 1–69.
- [25] F. Mohajer, M. M. Heravi, V. Zadsirjan, and N. Poormohammad, “Copper-free Sonogashira cross-coupling reactions : An overview,” *RSC Advances*, vol. 11, no. 12, pp. 6885–6925, 2021.
- [26] G. Frémy, “Synthèse de sondes luminescentes pour la détection séquence spécifique d’ADN double brin,” These de Doctorat, Université Grenoble Alpes (ComUE), Dec. 2019.
- [27] A. G. Lvov and A. Bredihhin, “Azulene as an ingredient for visible-light- and stimuli-responsive photoswitches,” *Organic & Biomolecular Chemistry*, vol. 19, no. 20, pp. 4460–4468, May 2021.
- [28] M. N. Berberan-Santos, E. N. Bodunov, and B. Valeur, “Mathematical functions for the analysis of luminescence decays with underlying distributions 1. Kohlrausch decay function (stretched exponential),” *Chemical Physics*, vol. 315, pp. 171–182, Aug. 2005.

- [29] “Ellman’s assay for in-solution quantification of sulfhydryl groups,” <https://www.bmglabtech.com>.
- [30] G. J. Doherty and H. T. McMahon, “Mechanisms of Endocytosis,” *Annual Review of Biochemistry*, vol. 78, no. 1, pp. 857–902, 2009.
- [31] J. S. Appelbaum, J. R. LaRoche, B. A. Smith, D. M. Balkin, J. M. Holub, and A. Schepartz, “Arginine Topology Controls Escape of Minimally Cationic Proteins from Early Endosomes to the Cytoplasm,” *Chemistry & Biology*, vol. 19, no. 7, pp. 819–830, Jul. 2012.
- [32] R. F. Wissner, A. Steinauer, S. L. Knox, A. D. Thompson, and A. Schepartz, “Fluorescence Correlation Spectroscopy Reveals Efficient Cytosolic Delivery of Protein Cargo by Cell-Permeant Miniature Proteins,” *ACS Central Science*, vol. 4, no. 10, pp. 1379–1393, Oct. 2018.
- [33] W. B. Kauffman, T. Fuselier, J. He, and W. C. Wimley, “Mechanism Matters : A Taxonomy of Cell Penetrating Peptides,” *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 40, no. 12, pp. 749–764, Dec. 2015.
- [34] A. D’Aléo, M. Allali, A. Picot, P. L. Baldeck, L. Toupet, C. Andraud, and O. Maury, “Sensitization of Eu(III) luminescence by donor-phenylethynyl-functionalized DTPA and DO3A macrocycles,” *Comptes Rendus Chimie*, vol. 13, no. 6, pp. 681–690, Jun. 2010.
- [35] V. Placide, A. T. Bui, A. Grichine, A. Duperray, D. Pitrat, C. Andraud, and O. Maury, “Two-photon multiplexing bio-imaging using a combination of Eu- and Tb-bioprobes,” *Dalton Transactions*, vol. 44, no. 11, pp. 4918–4924, Mar. 2015.
- [36] A. T. Bui, M. Beyler, Y.-Y. Liao, A. Grichine, A. Duperray, J.-C. Mulatier, B. L. Guennic, C. Andraud, O. Maury, and R. Tripier, “Cationic Two-Photon Lanthanide Bioprobes Able to Accumulate in Live Cells,” *Inorganic Chemistry*, vol. 55, no. 14, pp. 7020–7025, Jul. 2016.
- [37] J. H. Monteiro, F. A. Sigoli, and A. de Bettencourt-Dias, “A water-soluble Tb(III) complex as a temperature-sensitive luminescent probe,” *Canadian Journal of Chemistry*, vol. 96, no. 9, pp. 859–864, Sep. 2018.
- [38] J. H. S. K. Monteiro, N. R. Fetto, M. J. Tucker, and A. de Bettencourt-Dias, “Luminescent Carbazole-Based Eu(III) and Yb(III) Complexes with a High Two-Photon Absorption Cross-Section Enable Viscosity Sensing in the Visible and Near IR with One- and Two-Photon Excitation,” *Inorganic Chemistry*, vol. 59, no. 5, pp. 3193–3199, Mar. 2020.

- [39] X. Liu, H. Sheng, Y. Zhou, and Q. Song, "Palladium-catalyzed C–H bond activation for the assembly of *N*-aryl carbazoles with aromatic amines as nitrogen sources," *Chemical Communications*, vol. 56, no. 11, pp. 1665–1668, 2020.
- [40] S. Sasaki, G. P. C. Drummen, and G.-i. Konishi, "Recent advances in twisted intramolecular charge transfer (TICT) fluorescence and related phenomena in materials chemistry," *Journal of Materials Chemistry C*, vol. 4, no. 14, pp. 2731–2743, Mar. 2016.
- [41] D. Kovacs, E. Mathieu, S. R. Kiraev, J. A. L. Wells, E. Demeyere, A. Sipos, and K. E. Borbas, "Coordination Environment-Controlled Photoinduced Electron Transfer Quenching in Luminescent Europium Complexes," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 142, no. 30, pp. 13 190–13 200, Jul. 2020.
- [42] K. Najjar, A. Erazo-Oliveras, J. W. Mosior, M. J. Whitlock, I. Rostane, J. M. Cinclair, and J.-P. Pellois, "Unlocking Endosomal Entrapment with Supercharged Arginine-Rich Peptides," *Bioconjugate Chemistry*, vol. 28, no. 12, pp. 2932–2941, Dec. 2017.
- [43] A. Erazo-Oliveras, K. Najjar, L. Dayani, T.-Y. Wang, G. A. Johnson, and J.-P. Pellois, "Protein delivery into live cells by incubation with an endosomolytic agent," *Nature methods*, vol. 11, no. 8, pp. 861–867, Aug. 2014.
- [44] K. Najjar, A. Erazo-Oliveras, and J.-P. Pellois, "Delivery of Proteins, Peptides or Cell-impermeable Small Molecules into Live Cells by Incubation with the Endosomolytic Reagent dfTAT," *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, vol. 103, no. 103, p. e53175, Sep. 2015.
- [45] "Time-Domain Lifetime Measurements," in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, J. R. Lakowicz, Ed. Boston, MA : Springer US, 2006, pp. 97–155.
- [46] "How To Interpret R-squared in Regression Analysis," Apr. 2017.
- [47] "Fluorescence Correlation Spectroscopy," in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, J. R. Lakowicz, Ed. Boston, MA : Springer US, 2006, pp. 797–840.
- [48] "Quenching of Fluorescence," in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, J. R. Lakowicz, Ed. Boston, MA : Springer US, 2006, pp. 277–330.
- [49] "Introduction to Fluorescence," in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, J. R. Lakowicz, Ed. Boston, MA : Springer US, 2006, pp. 1–26.

- [50] L.-J. Fan and W. E. Jones Jr., “Energy Transfer and Electronic Energy Migration Processes,” in *Photochemistry and Photophysics of Polymer Materials*. John Wiley & Sons, Ltd, 2010, ch. 1, pp. 1–39.
- [51] L. Yuan, W. Lin, K. Zheng, and S. Zhu, “FRET-Based Small-Molecule Fluorescent Probes : Rational Design and Bioimaging Applications,” *Accounts of Chemical Research*, vol. 46, no. 7, pp. 1462–1473, Jul. 2013.
- [52] “Energy Transfer,” in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, J. R. Lakowicz, Ed. Boston, MA : Springer US, 2006, pp. 443–475.
- [53] M. T. Morgan, P. Bagchi, and C. J. Fahrni, “Designed To Dissolve : Suppression of Colloidal Aggregation of Cu(I)-Selective Fluorescent Probes in Aqueous Buffer and In-Gel Detection of a Metallochaperone,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 133, no. 40, pp. 15 906–15 909, Oct. 2011.
- [54] A. Vogel and V. Venugopalan, “Mechanisms of Pulsed Laser Ablation of Biological Tissues,” *Chemical Reviews*, vol. 103, no. 2, pp. 577–644, Feb. 2003.
- [55] W. Denk, J. H. Strickler, and W. W. Webb, “Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy,” *Science, New Series*, vol. 248, no. 4951, pp. 73–76, 1990.
- [56] P. T. C. So, C. Y. Dong, B. R. Masters, and K. M. Berland, “Two-Photon Excitation Fluorescence Microscopy,” *Annual Review of Biomedical Engineering*, vol. 2, no. 1, pp. 399–429, Aug. 2000.
- [57] B. Rk and P. Dw, “Two-photon excitation microscopy for the study of living cells and tissues,” *Current protocols in cell biology*, vol. Chapter 4, Jun. 2013.
- [58] V. Sun, “Dissecting Two-Photon Microscopy,” <http://www.signaltonoisemag.com/>.
- [59] G. Smith, M. Reynolds, F. Burton, and O. J. Kemi, “Confocal and multiphoton imaging of intracellular Ca(2+),” *Methods in Cell Biology*, vol. 99, pp. 225–261, 2010.
- [60] “A whole new world for rare earths | August 28, 2017 Issue - Vol. 95 Issue 34 | Chemical & Engineering News,” <https://cen.acs.org/articles/95/i34/whole-new-world-rare-earth.html>.
- [61] “Lumiphore Inc. | IPIRA,” <https://ipira.berkeley.edu/lumiphore-inc>.
- [62] “Basics on DELFIA assays | Cisbio,” <https://fr.cisbio.eu/content/delfia-technology-basics/>.

- [63] G. A. Crosby, R. E. Whan, and R. M. Alire, "Intramolecular Energy Transfer in Rare Earth Chelates. Role of the Triplet State," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 34, no. 3, pp. 743–748, Mar. 1961.
- [64] A. D'Aléo, F. Pointillart, L. Ouahab, C. Andraud, and O. Maury, "Charge transfer excited states sensitization of lanthanide emitting from the visible to the near-infra-red," *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 256, no. 15, pp. 1604–1620, Aug. 2012.
- [65] J.-C. G. Bünzli, S. Comby, A.-S. Chauvin, and C. D. B. Vandevyver, "New Opportunities for Lanthanide Luminescence," *Journal of Rare Earths*, vol. 25, no. 3, pp. 257–274, Jun. 2007.
- [66] R. M. Supkowski and W. D. Horrocks, "On the determination of the number of water molecules, q , coordinated to europium(III) ions in solution from luminescence decay lifetimes," *Inorganica Chimica Acta*, vol. 340, pp. 44–48, Nov. 2002.
- [67] A. Beeby, D. Parker, and J. A. G. Williams, "Photochemical investigations of functionalised 1,4,7,10-tetraazacyclododecane ligands incorporating naphthyl chromophores," *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, no. 8, pp. 1565–1579, Jan. 1996.
- [68] H. Wallrabe and A. Periasamy, "Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 16, no. 1, pp. 19–27, Feb. 2005.
- [69] B. Alpha, J.-M. Lehn, and G. Mathis, "Energy Transfer Luminescence of Europium(III) and Terbium(III) Cryptates of Macrobicyclic Polypyridine Ligands," *Angewandte Chemie International Edition in English*, vol. 26, no. 3, pp. 266–267, 1987.
- [70] A. D'Aléo, A. Picot, A. Beeby, J. A. G. Williams, B. L. Guennic, C. Andraud, and O. Maury, "Efficient Sensitization of Europium, Ytterbium, and Neodymium Functionalized Tris-Dipicolinate Lanthanide Complexes through Tunable Charge-Transfer Excited States," <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ic8012969>, Oct. 2008.
- [71] H. Takalo, I. Hemmilä, T. Sutela, and M. Latva, "Synthesis and Luminescence of Novel Eu(III) Complexing Agents and Labels with 4-(Phenylethynyl)pyridine Subunits," *Helvetica Chimica Acta*, vol. 79, no. 3, pp. 789–802, 1996.

- [72] M. Soulié, F. Latzko, E. Bourrier, V. Placide, S. J. Butler, R. Pal, J. W. Walton, P. L. Baldeck, B. Le Guennic, C. Andraud, J. M. Zwier, L. Lamarque, D. Parker, and O. Maury, “Comparative Analysis of Conjugated Alkynyl Chromophore–Triazacyclononane Ligands for Sensitized Emission of Europium and Terbium,” *Chemistry – A European Journal*, vol. 20, no. 28, pp. 8636–8646, 2014.
- [73] J. W. Walton, A. Bourdolle, S. J. Butler, M. Soulie, M. Delbianco, B. K. McMahon, R. Pal, H. Puschmann, J. M. Zwier, L. Lamarque, O. Maury, C. Andraud, and D. Parker, “Very bright europium complexes that stain cellular mitochondria,” *Chemical Communications*, vol. 49, no. 16, pp. 1600–1602, 2013.
- [74] —, “Very bright europium complexes that stain cellular mitochondria,” *Chemical Communications*, vol. 49, no. 16, pp. 1600–1602, 2013.
- [75] V. Placide, D. Pitrat, A. Grichine, A. Duperray, C. Andraud, and O. Maury, “Design and synthesis of europium luminescent bio-probes featuring sulfobetaine moieties,” *Tetrahedron Letters*, vol. 55, no. 7, pp. 1357–1361, Feb. 2014.
- [76] A. T. Bui, A. Roux, A. Grichine, A. Duperray, C. Andraud, and O. Maury, “Twisted Charge-Transfer Antennae for Ultra-Bright Terbium(III) and Dysprosium(III) Bioprobes,” *Chemistry – A European Journal*, vol. 24, no. 14, pp. 3408–3412, 2018.
- [77] Q. Lu, H. Haragopal, K. G. Slepchenko, C. Stork, and Y. V. Li, “Intracellular zinc distribution in mitochondria, ER and the Golgi apparatus,” *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, vol. 8, no. 1, pp. 35–43, Apr. 2016.
- [78] D. Beyersmann and H. Haase, “Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells,” in *Zinc Biochemistry, Physiology, and Homeostasis : Recent Insights and Current Trends*, W. Maret, Ed. Dordrecht : Springer Netherlands, 2001, pp. 145–155.
- [79] N. F. Krebs and K. M. Hambidge, “Zinc metabolism and homeostasis : The application of tracer techniques to human zinc physiology,” in *Zinc Biochemistry, Physiology, and Homeostasis : Recent Insights and Current Trends*, W. Maret, Ed. Dordrecht : Springer Netherlands, 2001, pp. 211–226.
- [80] S. L. Kelleher, N. H. McCormick, V. Velasquez, and V. Lopez, “Zinc in specialized secretory tissues : Roles in the pancreas, prostate, and mammary gland,” *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)*, vol. 2, no. 2, pp. 101–111, Mar. 2011.

- [81] C. J. Frederickson and A. I. Bush, "Synaptically released zinc : Physiological functions and pathological effects," in *Zinc Biochemistry, Physiology, and Homeostasis : Recent Insights and Current Trends*, W. Maret, Ed. Dordrecht : Springer Netherlands, 2001, pp. 167–180.
- [82] L. A. Gaither and D. J. Eide, "Eukaryotic zinc transporters and their regulation," in *Zinc Biochemistry, Physiology, and Homeostasis : Recent Insights and Current Trends*, W. Maret, Ed. Dordrecht : Springer Netherlands, 2001, pp. 65–84.
- [83] S. L. Sensi, P. Paoletti, J.-Y. Koh, E. Aizenman, A. I. Bush, and M. Hershfinkel, "The Neurophysiology and Pathology of Brain Zinc," *Journal of Neuroscience*, vol. 31, no. 45, pp. 16 076–16 085, Nov. 2011.
- [84] S. K. Ghosh, P. Kim, X.-a. Zhang, S.-H. Yun, A. Moore, S. J. Lippard, and Z. Medarova, "A Novel Imaging Approach for Early Detection of Prostate Cancer Based on Endogenous Zinc Sensing," *Cancer research*, vol. 70, no. 15, pp. 6119–6127, Aug. 2010.
- [85] L. Fang and M. Watkinson, "Subcellular localised small molecule fluorescent probes to image mobile Zn ²⁺," *Chemical Science*, vol. 11, no. 42, pp. 11 366–11 379, 2020.
- [86] P. Jiang and Z. Guo, "Fluorescent detection of zinc in biological systems : Recent development on the design of chemosensors and biosensors," *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 248, no. 1, pp. 205–229, Jan. 2004.
- [87] Z. Huang and S. J. Lippard, "Illuminating mobile zinc with fluorescence : From cuvettes to live cells and tissues," *Methods in Enzymology*, vol. 505, pp. 445–468, 2012.
- [88] J. Miller, A. D. McLachlan, and A. Klug, "Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes." *The EMBO Journal*, vol. 4, no. 6, pp. 1609–1614, Jun. 1985.
- [89] Y. Chen, Y. Bai, Z. Han, W. He, and Z. Guo, "Photoluminescence imaging of Zn²⁺ in living systems," *Chemical Society Reviews*, vol. 44, no. 14, pp. 4517–4546, Jul. 2015.
- [90] D. R. Engelke, S.-Y. Ng, B. S. Shastry, and R. G. Roeder, "Specific interaction of a purified transcription factor with an internal control region of 5S RNA genes," *Cell*, vol. 19, no. 3, pp. 717–728, Mar. 1980.

- [91] J. S. Hanas, D. J. Hazuda, D. F. Bogenhagen, F. Y. Wu, and C. W. Wu, "Xenopus transcription factor A requires zinc for binding to the 5 S RNA gene." *Journal of Biological Chemistry*, vol. 258, no. 23, pp. 14 120–14 125, Dec. 1983.
- [92] J. M. Berg, "Zinc Finger Domains : Hypotheses and Current Knowledge," *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, vol. 19, no. 1, pp. 405–421, 1990.
- [93] B. A. Krizek, B. T. Amann, V. J. Kilfoil, D. L. Merkle, and J. M. Berg, "A consensus zinc finger peptide : Design, high-affinity metal binding, a pH-dependent structure, and a His to Cys sequence variant," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 113, no. 12, pp. 4518–4523, Jun. 1991.
- [94] S.-H. Park, N. Kwon, J.-H. Lee, J. Yoon, and I. Shin, "Synthetic ratiometric fluorescent probes for detection of ions," *Chemical Society Reviews*, vol. 49, no. 1, pp. 143–179, 2020.
- [95] E. M. W. M. van Dongen, T. H. Evers, L. M. Dekkers, E. W. Meijer, L. W. J. Klomp, and M. Merkx, "Variation of Linker Length in Ratiometric Fluorescent Sensor Proteins Allows Rational Tuning of Zn(II) Affinity in the Picomolar to Femtomolar Range," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 129, no. 12, pp. 3494–3495, Mar. 2007.
- [96] J. L. Vinkenborg, T. H. Evers, S. W. A. Reulen, E. W. Meijer, and M. Merkx, "Enhanced Sensitivity of FRET-Based Protease Sensors by Redesign of the GFP Dimerization Interface," *ChemBioChem*, vol. 8, no. 10, pp. 1119–1121, 2007.
- [97] T. Terai and T. Nagano, "Fluorescent probes for bioimaging applications," *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 12, no. 5, pp. 515–521, Oct. 2008.
- [98] Y. You, S. Cho, and W. Nam, "Cyclometalated Iridium(III) Complexes for Phosphorescence Sensing of Biological Metal Ions," *Inorganic Chemistry*, vol. 53, no. 4, pp. 1804–1815, Feb. 2014.
- [99] C. E. Felton, L. P. Harding, J. E. Jones, B. M. Kariuki, S. J. A. Pope, and C. R. Rice, "A wavelength and lifetime responsive cryptate-containing fluorescent probe for zinc ions in water," *Chemical Communications*, vol. 0, no. 46, pp. 6185–6187, Nov. 2008.
- [100] H. Woo, S. Cho, Y. Han, W.-S. Chae, D.-R. Ahn, Y. You, and W. Nam, "Synthetic Control Over Photoinduced Electron Transfer in Phosphorescence Zinc Sensors," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 135, no. 12, pp. 4771–4787, Mar. 2013.

- [101] R. B. Merrifield, "Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 85, no. 14, pp. 2149–2154, Jul. 1963.
- [102] B. Quade, "Solid Phase Peptide Synthesis, Strategies and Resins," p. 12.
- [103] E. Denton, "What is solid phase peptide synthesis?" <https://selekt.biotage.com/peptideblogs/what-is-solid-phase-peptide-synthesis>.
- [104] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, and S. B. Kent, "Synthesis of proteins by native chemical ligation," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 266, no. 5186, pp. 776–779, Nov. 1994.
- [105] N. Ollivier, L. Raibaut, A. Blanpain, R. Desmet, J. Dheur, R. Mhidia, E. Boll, H. Drobecq, S. L. Pira, and O. Melnyk, "Tidbits for the synthesis of bis(2-sulfanylethyl)amido (SEA) polystyrene resin, SEA peptides and peptide thioesters," *Journal of Peptide Science*, vol. 20, no. 2, pp. 92–97, 2014.
- [106] A. Dadabhoy, S. Faulkner, and P. G. Sammes, "Long wavelength sensitizers for europium(III) luminescence based on acridone derivatives," *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, no. 2, pp. 348–357, Jan. 2002, publisher : The Royal Society of Chemistry.
- [107] S. W. Jones, R. Christison, K. Bundell, C. J. Voyce, S. M. V. Brockbank, P. Newham, and M. A. Lindsay, "Characterisation of cell-penetrating peptide-mediated peptide delivery," *British Journal of Pharmacology*, vol. 145, no. 8, pp. 1093–1102, 2005.
- [108] M. C. Heffern, L. M. Matosziuk, and T. J. Meade, "Lanthanide Probes for Bioresponsive Imaging - Chemical Reviews (ACS Publications)," *Chemical Review*, pp. 4496–4539, 2013.
- [109] G. Fremy, L. Raibaut, C. Cepeda, M. Sanson, M. Boujut, and O. S en eque, "A novel DOTA-like building block with a picolinate arm for the synthesis of lanthanide complex-peptide conjugates with improved luminescence properties," *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 213, p. 111257, Dec. 2020.
- [110] A. Bourdolle, M. Allali, J.-C. Mulatier, B. Le Guennic, J. M. Zwier, P. L. Baldeck, J.-C. G. B unzli, C. Andraud, L. Lamarque, and O. Maury, "Modulating the Photophysical Properties of Azamacrocyclic Europium Complexes with Charge-Transfer Antenna Chromophores," *Inorganic Chemistry*, vol. 50, no. 11, pp. 4987–4999, Jun. 2011.

- [111] B. Jagadish, T. J. Ozumerzifon, S. A. Roberts, G. B. Hall, E. A. Mash, and N. Raghunand, "Improved Synthesis of 10-(2-Alkylamino-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triacetic Acid Derivatives Bearing Acid-Sensitive Linkers," *Synthetic Communications*, vol. 44, no. 3, pp. 441–449, Feb. 2014.
- [112] A. T. Bui, A. Roux, A. Grichine, A. Duperray, C. Andraud, and O. Maury, "Twisted Charge-Transfer Antennae for Ultra-Bright Terbium(III) and Dysprosium(III) Bioprobes," *Chemistry – A European Journal*, vol. 24, no. 14, pp. 3408–3412, 2018.
- [113] J. S. Capani, J. E. Cochran, and J. C. Liang, "CsF-Mediated in Situ Desilylation of TMS-Alkynes for Sonogashira Reaction," *The Journal of Organic Chemistry*, vol. 84, no. 14, pp. 9378–9384, Jul. 2019.
- [114] M. Gazvoda, M. Virant, B. Pinter, and J. Košmrlj, "Mechanism of copper-free Sonogashira reaction operates through palladium-palladium transmetallation," *Nature Communications*, vol. 9, no. 1, p. 4814, Nov. 2018.
- [115] B. Jagadish, G. L. Brickert-Albrecht, G. S. Nichol, E. A. Mash, and N. Raghunand, "On the Synthesis of 1,4,7-Tris(tert-butoxycarbonylmethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane," *Tetrahedron letters*, vol. 52, no. 17, pp. 2058–2061, Apr. 2011.
- [116] H. Gattermann and M. Stockburger, "Spectroscopic studies on naphthalene in the vapor phase. III. Phosphorescence and intersystem crossing yields of single vibronic levels," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 63, no. 10, pp. 4541–4545, Nov. 1975.
- [117] P. M. Johnson and T. J. Sears, "Photo-assisted intersystem crossing : The predominant triplet formation mechanism in some isolated polycyclic aromatic molecules excited with pulsed lasers," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 143, no. 4, p. 044305, Jul. 2015.
- [118] T. J. Sørensen, A. M. Kenwright, and S. Faulkner, "Bimetallic lanthanide complexes that display a ratiometric response to oxygen concentrations," *Chemical Science*, vol. 6, no. 3, pp. 2054–2059, Feb. 2015.
- [119] D. Parker and J. A. G. Williams, "Luminescence behaviour of cadmium, lead, zinc, copper, nickel and lanthanide complexes of octadentate macrocyclic ligands bearing naphthyl chromophores," *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, no. 7, pp. 1305–1314, Jan. 1995.

- [120] A. G. Anderson and R. G. Anderson, "The Reaction of Azulenes with Trifluoro- and Trichloroacetic Anhydride^{1,2}," *The Journal of Organic Chemistry*, vol. 27, no. 10, pp. 3578–3581, Oct. 1962.
- [121] L. C. Murfin and S. E. Lewis, "Azulene—A Bright Core for Sensing and Imaging," *Molecules*, vol. 26, no. 2, p. 353, Jan. 2021.
- [122] R. Métivier, I. Leray, J.-P. Lefèvre, M. Roy-Auberger, N. Zanier-Szydłowski, and B. Valeur, "Characterization of alumina surfaces by fluorescence spectroscopy," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 5, no. 4, pp. 758–766, Jan. 2003.
- [123] "An introduction to the Akaike information criterion," <https://www.scribbr.com/statistics/akaike-information-criterion/>, Mar. 2020.
- [124] "DTNB (Ellman's Reagent) (5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)," <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/22582>.
- [125] G. L. Ellman, "Tissue sulfhydryl groups," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 82, no. 1, pp. 70–77, May 1959.
- [126] S. Fery-Forgues, J.-P. Fayet, and A. Lopez, "Drastic changes in the fluorescence properties of NBD probes with the polarity of the medium : Involvement of a TICT state?" *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry*, vol. 70, no. 3, pp. 229–243, Mar. 1993.
- [127] S. Uchiyama, T. Santa, and K. Imai, "Fluorescence characteristics of six 4,7-disubstituted benzofurazan compounds : An experimental and semi-empirical MO study," *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, vol. 0, no. 11, pp. 2525–2532, 1999.
- [128] J. Maity, D. Honcharenko, and R. Strömberg, "Synthesis of fluorescent d-amino acids with 4-acetamidobiphenyl and 4-N,N-dimethylamino-1,8-naphthalimido containing side chains," *Tetrahedron Letters*, vol. 56, no. 33, pp. 4780–4783, Aug. 2015.
- [129] S. Fawell, J. Seery, Y. Daikh, C. Moore, L. L. Chen, B. Pepinsky, and J. Barsoum, "Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 91, no. 2, pp. 664–668, Jan. 1994.
- [130] V. Sebbage, "Cell-penetrating peptides and their therapeutic applications," *Bioscience Horizons : The International Journal of Student Research*, vol. 2, no. 1, pp. 64–72, Mar. 2009.

- [131] H. Brooks, B. Lebleu, and E. Vivès, “Tat peptide-mediated cellular delivery : Back to basics,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 57, no. 4, pp. 559–577, Feb. 2005.
- [132] S. I. Presolski, V. P. Hong, and M. Finn, “Copper-Catalyzed Azide–Alkyne Click Chemistry for Bioconjugation,” *Current Protocols in Chemical Biology*, vol. 3, no. 4, pp. 153–162, Dec. 2011.
- [133] P. L. Yeagle, “Chapter 13 - Membrane Transport,” in *The Membranes of Cells (Third Edition)*, P. L. Yeagle, Ed. Boston : Academic Press, Jan. 2016, pp. 335–378.
- [134] A. Erazo-Oliveras, N. Muthukrishnan, R. Baker, T.-Y. Wang, and J.-P. Pellois, “Improving the Endosomal Escape of Cell-Penetrating Peptides and Their Cargos : Strategies and Challenges,” *Pharmaceuticals*, vol. 5, no. 11, pp. 1177–1209, Nov. 2012.
- [135] D. Derossi, S. Calvet, A. Trembleau, A. Brunissen, G. Chassaing, and A. Prochiantz, “Cell Internalization of the Third Helix of the Antennapedia Homeodomain Is Receptor-independent *,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, no. 30, pp. 18 188–18 193, Jul. 1996.
- [136] H. A. Rydberg, N. Carlsson, and B. Nordén, “Membrane interaction and secondary structure of de novo designed arginine-and tryptophan peptides with dual function,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 427, no. 2, pp. 261–265, Oct. 2012.
- [137] “ENS Cachan - Laboratoire de biologie et de pharmacologie appliquée (LBPA) - Spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) sous excitation biphotonique,” <http://lbpa.ens-paris-saclay.fr/>.
- [138] J. R. LaRochelle, G. B. Cobb, A. Steinauer, E. Rhoades, and A. Schepartz, “Fluorescence Correlation Spectroscopy Reveals Highly Efficient Cytosolic Delivery of Certain Penta-Arg Proteins and Stapled Peptides,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 137, no. 7, pp. 2536–2541, Feb. 2015.
- [139] W. B. Kauffman, S. Guha, and W. C. Wimley, “Synthetic molecular evolution of hybrid cell penetrating peptides,” *Nature Communications*, vol. 9, no. 1, p. 2568, Jul. 2018.
- [140] J. R. Marks, J. Placone, K. Hristova, and W. C. Wimley, “Spontaneous Membrane-Translocating Peptides by Orthogonal High-Throughput Screening,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 133, no. 23, pp. 8995–9004, Jun. 2011.

- [141] T. Fuselier and W. C. Wimley, "Spontaneous Membrane Translocating Peptides : The Role of Leucine-Arginine Consensus Motifs," *Biophysical Journal*, vol. 113, no. 4, pp. 835–846, Aug. 2017.
- [142] S. Macchi, G. Signore, C. Boccardi, C. Di Rienzo, F. Beltram, and F. Cardarelli, "Spontaneous membrane-translocating peptides : Influence of peptide self-aggregation and cargo polarity," *Scientific Reports*, vol. 5, no. 1, p. 16914, Nov. 2015.
- [143] A. Picot, A. D'Aléo, P. L. Baldeck, A. Grichine, A. Duperray, C. Andraud, and O. Maury, "Long-Lived Two-Photon Excited Luminescence of Water-Soluble Europium Complex : Applications in Biological Imaging Using Two-Photon Scanning Microscopy," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 130, no. 5, pp. 1532–1533, Feb. 2008.
- [144] A. Rodríguez-Rodríguez, D. Esteban-Gómez, A. de Blas, T. Rodríguez-Blas, M. Botta, R. Tripier, and C. Platas-Iglesias, "Solution Structure of Ln(III) Complexes with Macrocyclic Ligands Through Theoretical Evaluation of ^1H NMR Contact Shifts," *Inorganic Chemistry*, vol. 51, no. 24, pp. 13 419–13 429, Dec. 2012.
- [145] E. J. New and D. Parker, "The mechanism of cell uptake for luminescent lanthanide optical probes : The role of macropinocytosis and the effect of enhanced membrane permeability on compartmentalisation," *Organic & Biomolecular Chemistry*, vol. 7, no. 5, pp. 851–855, Feb. 2009.
- [146] J. H. S. K. Monteiro, A. de Bettencourt-Dias, and F. A. Sigoli, "Estimating the Donor–Acceptor Distance To Tune the Emission Efficiency of Luminescent Lanthanide Compounds," *Inorganic Chemistry*, vol. 56, no. 2, pp. 709–712, Jan. 2017.
- [147] Y.-J. Cho, K.-R. Wee, H.-J. Son, D. W. Cho, and S. O. Kang, "A detailed investigation of light-harvesting efficiency of blue color emitting divergent iridium dendrimers with peripheral phenylcarbazole units," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 16, no. 10, pp. 4510–4521, Feb. 2014.
- [148] J. R. Platt, "Classification of Spectra of Cata-Condensed Hydrocarbons," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 17, no. 5, pp. 484–495, May 1949.
- [149] A. Beeby, I. M. Clarkson, R. S. Dickins, S. Faulkner, D. Parker, L. Royle, A. S. de Sousa, J. A. G. Williams, and M. Woods, "Non-radiative deactivation of the excited states of europium, terbium and ytterbium complexes by proximate energy-matched OH, NH and CH oscillators : An improved luminescence method

- for establishing solution hydration states,” *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, no. 3, pp. 493–504, Jan. 1999.
- [150] F. G. Sánchez, A. N. Díaz, M. Algarra, J. Lovillo, and A. Aguilar, “Time resolved spectroscopy of 2-(dimethylamine)fluorene. Solvent effects and photophysical behavior,” *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 83, no. 1, pp. 88–93, Dec. 2011.
- [151] M. Regueiro-Figueroa, B. Bensenane, E. Ruscsák, D. Esteban-Gómez, L. J. Charbonnière, G. Tircsó, I. Tóth, A. de Blas, T. Rodríguez-Blas, and C. Platas-Iglesias, “Lanthanide dota-like Complexes Containing a Picolinate Pendant : Structural Entry for the Design of LnIII-Based Luminescent Probes,” *Inorganic Chemistry*, vol. 50, no. 9, pp. 4125–4141, May 2011.
- [152] S. Hu, J. Zeng, X. Zhu, J. Guo, S. Chen, Z. Zhao, and B. Z. Tang, “Universal Bipolar Host Materials for Blue, Green, and Red Phosphorescent OLEDs with Excellent Efficiencies and Small-Efficiency Roll-Off,” *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 11, no. 30, pp. 27 134–27 144, Jul. 2019.
- [153] D. J. Brock, H. M. Kondow-McConaghy, E. C. Hager, and J.-P. Pellois, “Endosomal Escape and Cytosolic Penetration of Macromolecules Mediated by Synthetic Delivery Agents,” *Bioconjugate Chemistry*, vol. 30, no. 2, pp. 293–304, Feb. 2019.
- [154] H. M. Kondow-McConaghy, N. Muthukrishnan, A. Erazo-Oliveras, K. Najjar, R. L. Juliano, and J.-P. Pellois, “Impact of the Endosomal Escape Activity of Cell-Penetrating Peptides on the Endocytic Pathway,” *ACS Chemical Biology*, vol. 15, no. 9, pp. 2355–2363, Sep. 2020.
- [155] X. Lian, A. Erazo-Oliveras, J.-P. Pellois, and H.-C. Zhou, “High efficiency and long-term intracellular activity of an enzymatic nanofactory based on metal-organic frameworks,” *Nature Communications*, vol. 8, no. 1, p. 2075, Dec. 2017.
- [156] “Colorant bleu pour cellules mortes SYTOX™, pour cytométrie en flux,” <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/S34857>.
- [157] M. Chapman and W. B. Euler, “Rhodamine 6G Structural Changes in Water/Ethanol Mixed Solvent,” *Journal of Fluorescence*, vol. 28, no. 6, pp. 1431–1437, Nov. 2018.
- [158] A. Grichine, A. Haefele, S. Pascal, A. Duperray, R. Michel, C. Andraud, and O. Maury, “Millisecond lifetime imaging with a europium complex using a

- commercial confocal microscope under one or two-photon excitation,” *Chemical Science*, vol. 5, no. 9, pp. 3475–3485, Jul. 2014.
- [159] C. C, R. L, F. G, E. Sv, R. A, P. J, B. D, P. S, and S. O, “Using Native Chemical Ligation for Site-Specific Synthesis of Hetero-bis-lanthanide Peptide Conjugates : Application to Ratiometric Visible or Near-Infrared Detection of Zn 2,” <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32608532/>, Oct. 2020.
- [160] G. Chessa, L. Canovese, F. Visentin, C. Santo, and R. Seraglia, “Synthesis of poly(pyridylthioether) dendrimers incorporating a Fe₂(CO)₆ cluster core,” *Tetrahedron*, vol. 61, no. 7, pp. 1755–1763, Feb. 2005.
- [161] A. Bourdolle, M. Allali, J.-C. Mulatier, B. Le Guennic, J. M. Zwier, P. L. Baldeck, J.-C. G. Bünzli, C. Andraud, L. Lamarque, and O. Maury, “Modulating the Photophysical Properties of Azamacrocyclic Europium Complexes with Charge-Transfer Antenna Chromophores,” *Inorganic Chemistry*, vol. 50, no. 11, pp. 4987–4999, Jun. 2011.
- [162] A. M. Brouwer, “Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC Technical Report),” *Pure and Applied Chemistry*, vol. 83, no. 12, pp. 2213–2228, Aug. 2011.
- [163] H. Scientific, “A Guide to Recording Fluorescence Quantum Yields,” p. 6.

Résumé

La microscopie de fluorescence est une technique de choix pour étudier des processus biologiques moléculaires de par sa sensibilité et sa haute résolution temporelle et spatiale. Au laboratoire LCBM, diverses sondes pour la détection de biomolécules sont développées et elles reposent sur l'utilisation d'une structure principale peptidique qui joue le rôle de reconnaissance spécifique de la molécule cible et sur la luminescence d'un complexe de lanthanide. Les lanthanides possèdent des émissions sur tout le spectre électromagnétique, les raies sont fines et caractéristiques à chacun des lanthanides et enfin, leurs longs temps de vie de luminescence permettent une détection en temps résolu. Ces propriétés sont avantageuses pour l'utilisation en milieu biologique car il est possible de se placer sur le domaine de transparence du milieu cellulaire qui s'étend de 650 nm à 1300 nm et de s'affranchir de l'auto-fluorescence à durée de vie très courte par rapport à la luminescence des lanthanides. Mon projet de thèse consiste à développer des sondes à base d'un complexe de lanthanide luminescent permettant la détection du zinc(II) dans les cellules vivantes par microscopie. Le zinc est un élément essentiel de l'organisme vivant et sa concentration est finement régulée mais la compréhension de son rôle et sa dynamique ne sont pas totalement comprises notamment son implication dans des maladies telles que le cancer ou l'Alzheimer. Les sondes à zinc à développer reposent sur la modulation de la luminescence du lanthanide par transfert d'énergie avec un autre composé aromatique. Plus précisément, la réponse des sondes à zinc sera mesurée sur le temps de vie de luminescence du lanthanide car le temps de vie peut être utilisé pour des mesures quantitatives étant indépendant de la concentration locale contrairement aux mesures des intensités de luminescence. Nous présenterons nos efforts pour développer des complexes de lanthanides luminescents conjugables à un peptide, et le développement des sondes à zinc et ses analyses spectroscopiques ; enfin, nous présenterons nos recherches d'une stratégie d'internalisation de complexes de lanthanides à propriétés d'absorption bi-photonique dans les cellules vivantes. Notre ouverture sur la chimie des peptides nous ont conduit à étudier des séquences peptidiques connues pour leur propriété de pénétration cellulaire.

Abstract

Deducing molecular mechanisms of biological functions in living cells requires non-invasive analytical tools that can monitor cell dynamics with high spatial and temporal resolution. In our laboratory, we aim to develop detection tools of various biomolecules such as copper(II), zinc(II) and DNA. Our bioprobes have a peptidic backbone that can recognize the target molecule with high specificity and have a lanthanide luminescent complexes suited for targeted biological imaging. Lanthanides' unique photophysical properties make them advantageous for biological imaging by allowing time-gated luminescence microscopy at millisecond-long scale . Time-gated microscopy overcomes common problems due to background noise from the short-lifetime autofluorescence of biological samples. In cellular imaging, the auto-fluorescence can be minimized by choosing the excitation and emission wavelength in the diagnostic window which starts from 650 nm to 1300 nm. Here, we present our strategy to develop a responsive bioprobe for zinc(II) in living cells by luminescence lifetime modulation based on energy exchange between the lanthanide complex and an aromatic compound taking the role of a quencher of luminescence. We will describe in this thesis the synthesis of conjugatable lanthanide complexes and the spectroscopic properties of several lanthanide luminescent bioprobes synthesized in our laboratory. We will also present our effort to develop a strategy involving several cell penetrating peptides to internalize 2P-lanthanide complexes into living cells.

Keywords : Zinc bioprobe; Lanthanide luminescence; lifetime analysis; Cell imaging.