



HAL
open science

Sondes multimodales Re(CO) pour la détection intracellulaire : synthèse, étude physico-chimique et sur cellules

Lucas Henry

► **To cite this version:**

Lucas Henry. Sondes multimodales Re(CO) pour la détection intracellulaire : synthèse, étude physico-chimique et sur cellules. Chimie organique. Université Paris sciences et lettres, 2019. Français. NNT : 2019PSLEE026 . tel-04860569

HAL Id: tel-04860569

<https://theses.hal.science/tel-04860569v1>

Submitted on 1 Jan 2025

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 DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PSL

Préparée à l'École normale supérieure

**Sondes $\text{Re}(\text{CO})_3$ pour la détection intracellulaire :
synthèse, étude physico-chimique et sur cellules**

Soutenue par

Lucas HENRY

Le 28 mai 2019

École doctorale n°406

**Chimie moléculaire Paris
Centre**

Spécialité

Chimie biophysique

Composition du jury :

Florence MAHUTEAU-BETZER
Directrice de recherche, Institut Curie *Présidente*

Kevin LAM
Professeur, University of Greenwich *Rapporteur*

Matthieu RÉFRÉGIERS
Responsable de ligne, Synchrotron SOLEIL *Rapporteur*

Clotilde POLICAR
Professeur, École normale supérieure *Directrice de thèse*

Nicolas DELSUC
Chargé de recherche, École normale supérieure *Invité*

Table des matières

Liste des abréviations	v
Remerciements	ix
I Discussion	1
1 Introduction	3
1.1 Les SCoMPI et l'imagerie multimodale	3
1.1.1 Les SCoMPI comme sondes luminescentes	4
1.1.2 Les SCoMPI pour la détection par spectroscopie infrarouge	5
1.1.3 Les SCoMPI comme sondes de fluorescence X	10
1.2 Applications choisies des SCoMPI	11
1.2.1 Développement du concept	11
1.2.2 Première application biologique : couplage à un œstrogène pour l'étude en milieu cellulaire	13
1.2.3 Propriétés d'un SCoMPI lié à un peptide dans des cellules	15
1.2.4 Marquage et imagerie de protéines par fluorescence X	17
1.3 Conclusion	20
2 Targeting of organelles by metal complexes	21
2.1 Structure of a cell	21
2.2 Targeting mitochondria	21
2.2.1 Structure of mitochondria	21
2.2.2 Conjugation to lipophilic cations	24
2.2.3 Conjugation to mitochondria-targeted peptides	27
2.2.4 Metal-carbonyl complexes going to mitochondria	28
2.3 Targeting the nucleus	34
2.3.1 Use of nuclear localization signals (NLSs)	35
2.3.2 Conjugation to nucleic acid binding group	38
2.3.3 Imaging of nucleus by a turn-on luminescent complex	39
2.4 Targeting of the endoplasmic reticulum	40
2.5 Targeting of the Golgi apparatus	44
2.6 Conclusion	49

3	Marquage et pénétration de l'acide hyaluronique	51
3.1	Introduction	51
3.1.1	L'acide hyaluronique et ses applications	51
3.1.2	Structure de la peau	52
3.1.3	Pénétration percutanée de l'acide hyaluronique	55
3.1.4	Stratégie de marquage	57
3.2	Synthèse et caractérisation de la sonde Re-tricarbonyle	60
3.2.1	Synthèse de la sonde amine	60
3.2.2	Caractérisation physico-chimique des sondes $\text{Re}(\text{CO})_3$	61
3.3	Marquage de l'acide hyaluronique sur l'aldéhyde terminal	63
3.4	Marquage sur les fonctions acide carboxylique	64
3.4.1	Par une réaction d'amidation	64
3.4.2	Par une réaction multicomposant de UGI	65
3.5	Pénétration percutanée et imagerie multimodale	72
3.5.1	Pénétration de la molécule à travers la peau (expérience réalisée par Cécile LAUGEL)	72
3.5.2	Imagerie infrarouge et de fluorescence	72
3.5.3	Résultats	73
3.6	Conclusion	76
4	L'AFM-IR et ses applications	79
4.1	Présentation d'une méthode d'imagerie : l'AFM-IR	79
4.1.1	La microscopie à force atomique (AFM)	79
4.1.2	Les différents modes de fonctionnement	79
4.1.3	Couplage de la microscopie à force atomique (AFM) et de la spectroscopie infrarouge (IR) : AFM-IR	80
4.2	Étude par IR de ferrocifènes marqués par une sonde $\text{Re}(\text{CO})_3$	83
4.2.1	Développement de complexes organométalliques pour le traitement du cancer du sein	83
4.2.2	Étude précédente sur des dérivés du tamoxifène	84
4.2.3	Synthèse et étude de toxicité de ferrocifènes marqués	87
4.2.4	Localisation intracellulaire	88
4.2.5	Conclusion	99
4.3	Étude par AFM-IR de billes de polystyrène fonctionnalisées	99
4.3.1	Introduction et contexte	99
4.3.2	Utilisation de l'AFM-IR en mode <i>tapping</i>	100
4.3.3	Utilisation de billes de polystyrène en synthèse peptidique sur support	103
4.3.4	Analyse de la distribution de la fixation de sondes sur et dans les billes de polystyrène	107
4.3.5	Conclusion	117
4.4	Annexe : images supplémentaires	118
5	Sondes $\text{Re}(\text{CO})_3$ pour le marquage d'organites	121
5.1	Introduction	121
5.2	Marquage des mitochondries	123
5.2.1	Par un cation triphénylphosphonium	123
5.2.2	Par un peptide mitochondrial	131

5.3	Marquage du noyau	141
5.3.1	Par une liaison à l'acridine	141
5.3.2	Par une liaison à l'anthracène	149
5.4	Marquage des membranes	151
5.5	Conclusion	156
6	Conclusion générale	157
II	Experimental part	159
	General considerations	161
3	Marquage et pénétration de l'acide hyaluronique	165
4	L'AFM-IR et ses applications	173
5	Sondes $\text{Re}(\text{CO})_3$ pour le marquage d'organites	175
5.1	Marquage des mitochondries	175
5.1.1	Par un cation triphénylphosphonium	175
5.1.2	Par un peptide mitochondrial	181
5.2	Marquage du noyau	185
5.3	Marquage des membranes	193
	Bibliographie	195

TABLE DES MATIÈRES

Liste des abréviations

ACN	acétonitrile
ADN	acide désoxyribonucléique
AFM	microscopie à force atomique (atomic force microscopy)
ATP	adenosine triphosphate
ATR	réflexion totale atténuée
Boc	tert-butoxycarbone
CCM	chromatographie sur couche mince
CMIA	carbonylmetal-immunoassay
Cp	cyclopentadiényl
CPP	peptide pénétrant (cell penetrating peptide)
CTMR	5,6-carboxy-tétraméthyl-rhodamine
CuAAC	copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition
DAPI	4,6-diamidino-2-phénylindole
DCC	<i>N,N'</i> -dicyclohexylcarbodiimide
DCM	dichlorométhane
DDSA	dodecyl succinic anhydride
DIEA/DIPEA	diisopropyléthylamine
DIP	4,7-diphényl-1,10 phénanthroline
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium (milieu de culture cellulaire)
DMF	diméthylformamide
DMP-30	epoxy embedding medium, accélérateur de résine
DMSO	diméthylsulfoxyde
DNA	deoxyribose nucleic acid
DOPG	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol
DPBS	Dubelcco's phosphate buffer saline
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
ER	nuclear estrogen receptor
ER	endoplasmic reticulum
ESI	electrospray ionization
FADH ₂	flavin adenine dinucleotide
FITC	fluorescein isothiocyanate
Fmoc	fluorénylméthoxycarbone
FPA	focal plane array
FTIR	spectroscopie infrarouge à transformée de FOURIER

LISTE DES ABRÉVIATIONS

GTP	guanosine triphosphate
HA	acide hyaluronique
HBTU	hexafluorophosphate benzotriazole tetramethyl uronium
HOBt	hydroxybenzotriazole
HR-MS	high resolution mass spectrometry
IC50	half maximal inhibitory concentration
ICP-AEC	inductively coupled plasma - atomic emission spectrometry
IR	infrarouge
MALDI-TOF-MS	matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight-mass spectroscopy
MBHA	4-méthylbenzhydrylamine
MLCT	transfert de charge métal-ligand (metal-to-ligand charge transfer)
MPP	mitochondria penetrating peptide
MW	masse molaire (molecular weight)
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide
NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
NLS	signal de localisation nucléaire (nuclear localization signal)
NMA	nadic methyl anhydride
NMP	<i>N</i> -méthyl-2-pyrrolidone
NMR	nuclear magnetic resonance
NPs	nanoparticules
NPC	pores nucléaires (nuclear pore complex)
OPO	oscillateur paramétrique optique
PBS	phosphate buffer saline
PEG	polyéthylène glycol
PFA	paraformaldéhyde
pH	potentiel hydrogène
phen	phenanthroline
PLA	acide polylactique
PLGA	acide poly(lactique-co-glycolique)
PNA	peptide nuclei acid
PS	polystyrène
PS-P2VP	polystyrène-poly(2-vinylpyridine)
PVA	poly(acétate de vinyle)
Pyta	pyridine triazole 4-(2-pyridyl)-1,2,3-triazole
QCL	laser à cascade quantique
r.t.	room temperature
Rf	rapport frontal (ou retarding factor)
RMN	résonance magnétique nucléaire
RNA	ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species (espèces réactives de l'oxygène)
SC	<i>stratum corneum</i>
SCoMPI	single core multimodal probe for imaging
SM	spectromicroscopy

SMIS	Spectroscopy and Microscopy in the Infrared using Synchrotron (IR beamline, SOLEIL synchrotron, France)
SOD	superoxide dismutase
SOLEIL	Source Optimisée de Lumière d'Énergie Intermédiaire du LURE
SPIONs	nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétique
SPPS	synthèse peptidique sur support solide (solid phase peptide synthesis)
SR	synchrotron radiation
TFA	acide trifluoroacétique (trifluoroacetic acid)
TIS	triisopropylsilane
TLC	thin layer chromatography
TMRE	tetramethyl rhodamine methyl ester
TPP	triphénylphosphonium
UV	ultraviolets
XRF	spectroscopie de fluorescence X (X-ray fluorescence)

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Remerciements

Cette thèse n'aurait jamais pu voir le jour sans l'aide des nombreuses personnes qui y ont contribué en collaborant à ce projet ou simplement par leur soutien sans faille. Ce fut une grande aventure de presque quatre ans que je suis heureux d'avoir pu partager avec vous tous.

Tout d'abord, je souhaite remercier l'École normale supérieure et en particulier le département de chimie qui, après m'avoir formé, m'a permis de réaliser ma thèse avec un financement d'agrégé préparateur. Je tiens à remercier le Dr. Anne BOUTIN, directrice du département de chimie.

J'adresse mes remerciements aux Dr. Sandrine SAGAN et Jean-Maurice MALLET pour m'avoir accueilli au sein du Laboratoire des BioMolécules et de l'équipe « Peptides, glycoconjugués et métaux en biologie ».

Je suis très reconnaissant au Pr. Kevin LAM et au Dr. Matthieu RÉFRÉGIERS d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse, ainsi qu'au Dr. Florence MAHUTEAU-BETZER qui me fait l'honneur d'être la présidente du jury qui évalue ce travail.

Je tiens à remercier mon comité de suivi de thèse, le Dr. Astrid WALRANT et le Dr. Bich-Thuy DOAN pour leurs encouragements et leurs conseils tout au long de ma thèse, ainsi que le Pr. Anna PROUST, précédente directrice de l'École doctorale qui a toujours été disponible pour ses doctorants.

Cette belle aventure scientifique n'aurait évidemment pas été possible sans le soutien de mes encadrants. Un grand merci au Pr. Clotilde POLICAR, ma directrice de thèse qui fut aussi ma tutrice pédagogique pendant ma scolarité à l'ENS, dont le dynamisme et l'esprit critique incontestables nous permettent d'avancer efficacement dans notre recherche. Je te remercie de m'avoir permis de faire ma thèse à l'interface chimie-physique-biologie avec un bon équilibre entre ces domaines et de nombreuses collaborations toujours pertinentes. Merci aussi pour nos nombreuses discussions scientifiques, autant en recherche qu'en enseignement (en particulier la détermination de termes spectroscopiques!). Un grand merci au Dr. Nicolas DELSUC, notre papa à tous, toujours disponible, optimiste, dynamique et dont les conseils et les encouragements sont précieux au quotidien. Merci au Dr. François LAMBERT pour son optimisme et les nombreuses discussions autour de ma thèse mais aussi sur l'enseignement. Tu ne viens jamais au labo sans avoir quelque chose d'étonnant à me montrer, c'est toujours un plaisir de pouvoir partager avec toi des « petites manip ». Merci au Dr. Hélène BERTRAND avec qui j'ai également collaboré, j'apprécie énormément

REMERCIEMENTS

ta capacité à garder une grande rigueur scientifique tout en restant ouverte à la discussion.

J'ai eu la chance de travailler au sein d'un laboratoire multidisciplinaire et en collaboration avec des chimistes, des biologistes et des physiciens, que je souhaiterais remercier chaleureusement pour leur professionnalisme et le temps qu'ils m'ont consacré.

Merci aux biologistes de l'ex-équipe 4 du LBM « Micro-organismes et physiopathologie intestinale » et en particulier à son responsable, le Pr. Philippe SEKSIK, pour m'avoir accueilli dans leurs locaux comme si j'y étais chez moi. Un immense merci à Loïc BROT qui a été ma nounou de cellules pendant ma thèse et qui a été très patient lorsque je promettais de venir manipuler « la semaine prochaine » pendant plusieurs semaines (et non la chimie ne marche pas toujours comme on le souhaite!).

J'en profite pour remercier le Dr. Élodie QUÉVRAIN, qui m'a formé à la biologie cellulaire en M2, formation très efficace qui m'a permis d'être complètement autonome dans ce domaine pendant mes quatre ans de thèse. Merci pour ta gentillesse, ta patience face aux questions idiotes des chimistes et ton optimisme. Merci aussi à Élodie TAUZIET pour sa bonne humeur permanente : j'ai adoré ton accueil toujours si enthousiaste à St-Antoine et espère que ma ville t'a accueillie avec autant de joie et de bonne humeur !

Je suis très reconnaissant au Synchrotron SOLEIL de m'avoir permis l'accès à ses locaux lors de projets sur les lignes SMIS et Nanoscopium. J'adresse tous mes remerciements aux équipes de ces deux lignes pour leur accueil chaleureux. Merci en particulier au Pr. Alexandre DAZZI, aux Dr. Ariane DENISET et Christophe SANDT de la ligne SMIS et aux Dr. Kadda MEDJOUBI et Andrea SOMOGYI de la ligne Nanoscopium pour leur accueil, leurs conseils et les discussions passionnantes que l'on a à chaque fois. Les journées (et nuits) à SOLEIL vont énormément me manquer. Je remercie aussi très chaleureusement le Dr. Zohar GUEROUI et son équipe (en particulier Alexandra, Marina et Mary) de m'avoir permis d'utiliser leur microscope de fluorescence (parfois un peu au dernier moment).

Je remercie Sylvain CLÈDE et Sarah HOSTACHY, mes prédécesseurs sur le projet SCoMPI qui, même absents du laboratoire, ont toujours été présents lorsque j'avais des questions pendant ma thèse. Merci aussi à mes stagiaires Lisa GOURDON et Elli VICHOU pour leur aide sur le projet, en espérant que ces quelques semaines de stage vous auront donné une vocation pour la recherche. Merci aux techniciens et ingénieurs pour leur aide sur les appareils : Gilles CLODIC pour la spectrométrie de masse, Bernard GOETZ pour la RMN, Rodrigue MARQUANT et Sylvie MAURIN pour la HPLC, Éric AÏT-YAHIAÏÈNE pour la gestion du spectromètre IR et bien sûr un grand merci à Géraldine GAZZAH pour l'aide en synthèse, les commandes et la gestion du laboratoire au quotidien.

Je tiens également à remercier les personnels administratifs passés et présents du département de chimie, qui font en sorte que la maison tourne, et en particulier Nathalie ÉTIENNE, Anne HALLOPÉ, Stéphanie BEN ABRIA et Marie CHAYLA.

Je tiens bien sûr à remercier tous les membres présents et passés du LBM, sans qui ces années de thèse n'auraient certainement pas été les mêmes... Un grand merci donc à Amandine, ma binôme de thèse avec toujours d'excellentes histoires à raconter (j'adore

quand tu me dis qu'on va aller boire un café!), Émilie, toujours positive, de bonne humeur et qui a toujours du chocolat, Vincent, Sarah, Paul, Menglan, Julien, Martha, Antoine, Koudedja, Nicolas, Manon, Audrey, Dounia, Laurent, Blaise, Roxane, Agathe, Sylvestre, Éva, Benjamin, Sébastien ..., sans oublier les nombreux stagiaires qui nous ont apporté de la bonne humeur lors de leur (court) passage mais qui se rendent indispensables à la vie du labo : merci à Gabrielle, Félix, Antoine, Glen, Eva, Carla, Pauline, Anna, Jennifer, Mesut, Azalea, Scott, Noemi, Clara, Viani. Merci à vous tous pour votre joyeuse compagnie, les « glouglous » après une grosse journée de manips, les escape game ou les parties de Molkky dans le jardin.

Après presque deux pages de remerciements, je n'ai remercié que la moitié des personnes avec qui j'ai travaillé. Car qui dit agrégé préparateur dit enseignement... donc c'est reparti!

Je souhaite avant tout remercier le Pr. Jean-Bernard BAUDIN, précédent directeur des études, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Merci de m'avoir permis d'étudier dans cette École, de m'avoir fait confiance pendant toutes ces années et d'avoir toujours été présent, que ce soit en tant que professeur lorsque j'étais étudiant ou en tant que collègue pendant mes années de thèse. Il y a huit ans, je passais l'entretien qui allait changer ma vie et je ne l'oublierai jamais. Merci également au Dr. Ludovic JULLIEN, précédent directeur du département de chimie avec qui j'ai régulièrement des discussions passionnantes au sujet des olympiades de la chimie et plus généralement sur l'éducation.

J'ai évidemment une pensée toute particulière pour le « Gang » de Montrouge, avec en premier lieu le grand gourou Nicolas LÉVY, organisateur des fameuses soirées montrougeoises et excellent professeur. Je suis désormais prêt à agir de manière éthique et responsable en lycée. Merci à Anne-Sophie BERNARD, qui m'a accompagné d'abord en stage de M2 puis en enseignement depuis la prépa agreg. Merci à Marlène, Soumaly, Amélie et Yvon qui font ou ont fait en sorte que le site de Montrouge tourne bien. Merci à tous les agrégés préparateurs avec qui j'ai eu l'occasion de travailler : Baptiste, qui est notre référence à tous dans tous les domaines de la chimie, Hugo mon binôme de TP de concours, Aurélien mon binôme de correction de copies, Sandrine, Jérôme et tous les AgPr de physique, ainsi qu'aux non-agrégés quand même dans le gang et qui se reconnaîtront... Merci à tous les étudiants du département de chimie des promotions 2015 à 2018 qui ont confirmé ma passion pour l'enseignement pendant ces quatre années, que ce soit au magistère ou à l'agrégation. J'espère que les lycéens seront aussi adorables que vous!

J'en profite pour remercier également toutes les personnes que j'ai rencontrées dans le cadre des olympiades de la chimie (nationales et internationales) et les nombreux élèves que j'ai eu la chance d'encadrer et qui ont contribué à ma passion pour l'enseignement.

Merci à tous mes amis et en particulier à ma promo d'ENS et ma promo d'agreg pour les bons moments passés ensemble. Merci à ceux que j'ai continué à voir régulièrement pendant ma thèse, et en particulier les « Thésards crevards ». Tout d'abord Natan, mon binôme d'agreg et de nourriture depuis la L3 et les De Clercq/Golo/jap hebdomadaires. Merci à Félix pour les batailles de poke, les soirées moto-Porto-Muscat et ton humour de manière générale. Arrête de mettre la pression et va passer l'agreg mon petit Félix! Merci

REMERCIEMENTS

à la meilleure concierge, Thibault, aussi présent aux soirées Porto-Muscat et toujours à jour dans les potins. Et merci à Pauline qui complète cette équipe, avec qui j'ai partagé de bons moments et notamment beaucoup de japs !

Je termine par remercier les personnes les plus importantes à mes yeux qui sont ma famille. Tout d'abord merci à mes parents pour m'avoir toujours soutenu, encouragé et permis de faire les études que j'ai voulu faire. Vous êtes les meilleurs parents du monde et je vous dois tout. Merci à Angéline pour m'avoir soutenu (et surtout supporté) pendant ces quatre ans de thèse, et pour les dernières relectures qui m'ont permis de corriger « quelques » fautes de frappe. Un énorme merci à mes frères adorés : Loïs, grand homme d'affaire qui n'a jamais perdu son âme et qui a toujours du cœur et Enzo qui passe son premier examen lorsque je passe mon dernier...

Merci à tous du fond du cœur.

Lucas

Première partie

Discussion

Chapitre 1

Introduction

1.1 Les SCoMPI et l'imagerie multimodale

Les complexes de Re(I) tricarbonyle présentent un grand intérêt pour l'imagerie multimodale. Depuis quelques années, l'équipe de Clotilde POLICAR développe de tels complexes pour le marquage de molécules d'intérêt qui sont détectables par plusieurs techniques spectroscopiques. Ces complexes ont été nommés SCoMPI pour Single Core Multimodal Probe for Imaging. Leur structure générale est présentée FIGURE 1.1.

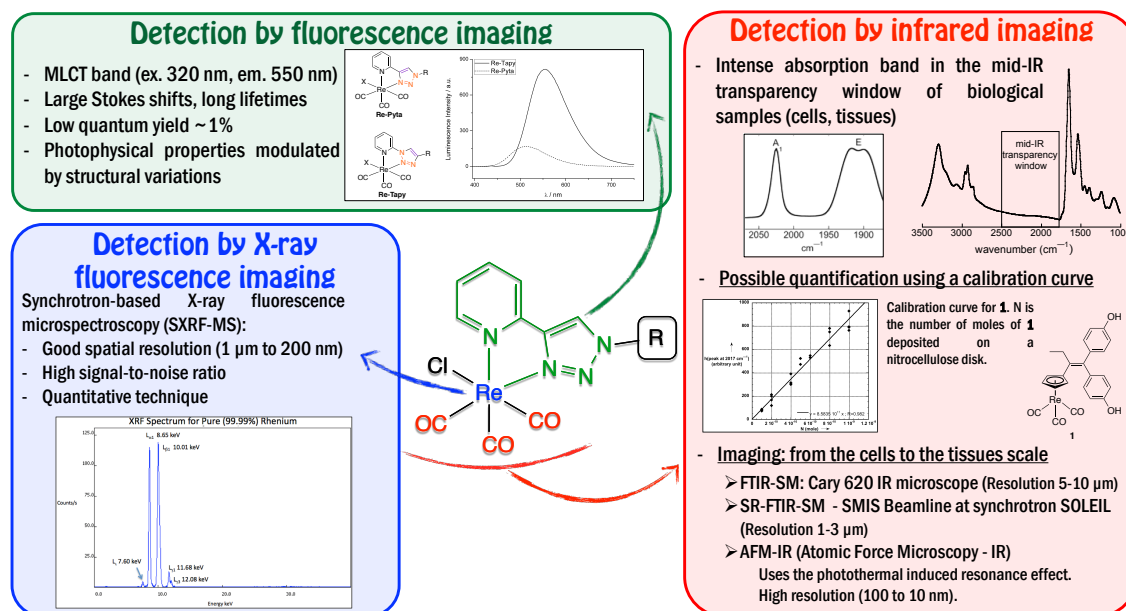


FIGURE 1.1 – Les SCoMPI et l'imagerie multimodale.

Ces sondes possèdent plusieurs modalités : elles peuvent être détectées par imagerie de luminescence, par spectroscopies vibrationnelles (IR et RAMAN) et par fluorescence X, dont nous allons détailler les caractéristiques.

1.1.1 Les SCoMPI comme sondes luminescentes

Les complexes de type $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{L})\text{X}]$, où L est un ligand avec des orbitales π^* basses en énergie et X un halogénure ou une pyridine, ont des propriétés de luminescence communes, étudiées depuis les années 1970,^{1,2} et largement décrites dans la littérature depuis.³⁻¹¹ Leur spectre d'absorption présente une large bande correspondant à une bande de transfert de charge métal-vers-ligand (MLCT), et leur spectre d'émission une bande d'émission d'états $^3\text{MLCT}$ issus d'une conversion inter-système. Bien qu'impropre, le terme de fluorescence est le plus couramment utilisé. Pour les complexes de rhénium de ce type, il s'agit d'un phénomène de phosphorescence qui se produit, comme nous allons le montrer. Nous utiliserons donc indifféremment les termes de luminescence et de fluorescence pour décrire cette émission.

Dans ces complexes, le rhénium est au degré d'oxydation +I et possède une configuration électronique $6s^1 5d^5$ donc c'est un ion d^6 et une transition des orbitales d vers les orbitales des ligands est possible. Ce genre de transition est typiquement observé pour des ligands possédant une orbitale π^* basse en énergie (de type α -diimine, comme la bipyridine) car les orbitales $d\pi$ du métal et π^* du ligand sont alors proches et partiellement remplies. Afin de rationaliser ces transferts électroniques responsables des bandes observées en spectroscopie, un diagramme de PERRIN-JABLONSKI est représenté FIGURE 1.2.

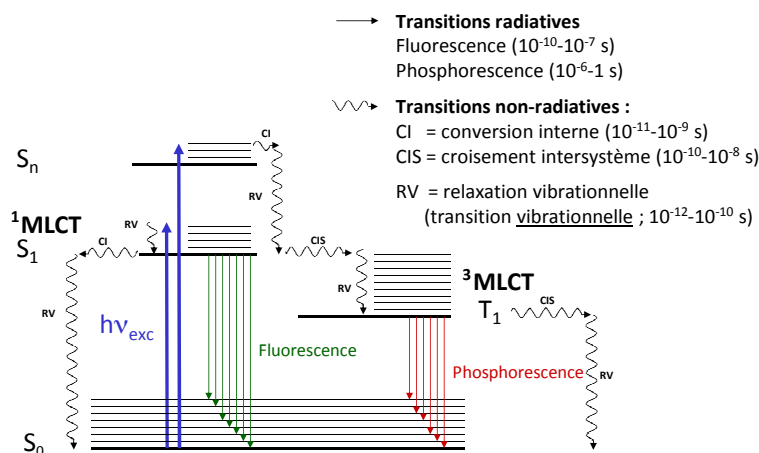


FIGURE 1.2 – Diagramme de PERRIN-JABLONSKI (extrait du cours du Dr. Agathe ESPAGNE, École normale supérieure).

L'état fondamental est noté S_0 , le premier état excité $^1\text{MLCT}$ est un état singulet S_1 et le premier état excité $^3\text{MLCT}$ est un état triplet T_1 . Après absorption, une relaxation vibrationnelle (RV) permet de passer de l'état excité $^1\text{MLCT}$ vers l'état vibrationnel fondamental $\nu' = 0$ (10^{-12} - 10^{-10} s). Ensuite, différents processus peuvent se produire. L'émission radiative qui permet de retourner à l'état électronique fondamental ($S_1 \rightarrow S_0$, fluorescence, 10^{-10} - 10^{-7} s) est en compétition cinétique avec des processus non radiatifs :

- La conversion interne (IC) qui couple un état vibrationnel de S_1 ($S_1, \nu' = 0$) avec un état de même énergie de l'état électronique fondamental (S_0, ν'') en raison de l'énergie cinétique des noyaux (10^{-11} - 10^{-9} s).
- Le croisement inter-système qui couple l'état ($S_1, \nu' = 0$) à l'état (T_1, ν'') par couplage spin-orbite (10^{-10} - 10^{-8} s)

La phosphorescence étant une transition radiative interdite ($T_1 \rightarrow S_0$, $\Delta S \neq 0$), les états triplets ont des temps de vie plus longs que les états singulets. Pour l'imagerie, ces longs temps de vie peuvent être mis à profit pour s'affranchir de l'autofluorescence des cellules (courts temps de vie) si la fluorescence est enregistrée après un délai. Pour les complexes de rhénium-tricarbonyle, des valeurs de l'ordre de 0,3 à 10 μ s à température ambiante ont été mesurées.^{12,13} Par ailleurs, les états $^3\text{MLCT}$ des complexes de type $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{N}^{\wedge}\text{N})\text{X}]$ ayant une énergie plus faible que les états $^1\text{MLCT}$, ils possèdent de grands déplacements de STOKES,^{14,15} ce qui est intéressant pour éviter une extinction de luminescence par ré-absorption et obtenir un meilleur rapport signal sur bruit. Des transferts de charge du ligand halogénure X vers le ligand de type diimine L ($^3\text{XLCT}$) ou intraligand ($^3\text{LLCT}$) peuvent également se produire.^{15,16}

Les inconvénients de ces complexes sont les faibles rendements quantiques, qui varient entre 0,1 et quelques pourcents en fonction du solvant, et la faible longueur d'onde d'excitation ($\lambda < 400$ nm). Un grand nombre de complexes avec différents ligands provenant de modifications de la 2,2'-bipyridine ou de la phénanthroline par augmentation de la surface de délocalisation, l'ajout de groupements donneurs ou accepteurs¹⁷⁻¹⁹ voire en faisant varier les ligands de type diimine²⁰⁻²⁵ ont été décrits dans la littérature pour améliorer ces propriétés. L'influence de la nature du ligand X a également été étudiée. Par exemple, le remplacement d'un ligand halogénure par une pyridine donne un complexe chargé positivement qui induit un déplacement vers le bleu de la bande d'absorption en raison de la stabilisation de l'orbitale $d\pi$ du rhénium.²⁶ Au contraire, le remplacement d'un ligand halogénure par un alcyne mène à un déplacement vers le rouge de la bande d'absorption en raison du caractère σ -donneur du ligand.²⁷⁻²⁹

La FIGURE 1.3 présente une sélection de ligands testés pour modifier les propriétés spectroscopiques de complexes de Re(I) tricarbonyle, présentées dans le TABLEAU 1.1.

1.1.2 Les SCoMPI pour la détection par spectroscopie infrarouge

La spectroscopie vibrationnelle en infrarouge est particulièrement intéressante pour l'imagerie en contexte biologique car contrairement à la spectroscopie UV-visible, elle n'implique aucune transition électronique et donc des énergies plus faibles.³⁶⁻³⁹ Seuls les niveaux vibrationnels sont alors peuplés dans l'état excité et on n'accède pas aux niveaux électroniques excités qui, en raison d'une distribution électronique différente du niveau fondamental, ont potentiellement une réactivité différente : c'est de cette réactivité particulière que résulte une chimie qui est responsable du blanchiment des sondes fluorescentes. Par conséquent, dans le cas de sondes IR, aucun photoblanchiment n'est observé.^{40,41}

En outre, l'absorption en infrarouge étant spécifique d'une liaison chimique donnée, la microspectroscopie IR peut être utilisée pour sonder directement l'environnement local sans utiliser de marqueur et donne accès à une cartographie « chimique » (distribution spatiale des fonctions chimiques). L'imagerie infrarouge permet de cartographier autant des composés endogènes (amide, phosphate)⁴²⁻⁴⁴ que des composés exogènes tels que les dérivés de complexes métal-carbonyle.⁴⁵⁻⁴⁹

Les complexes de métal-carbonyle sont des complexes organométalliques formés d'un ion métallique sur lequel sont coordonnés des ligands carbonyle $\text{C}\equiv\text{O}$. Un grand nombre

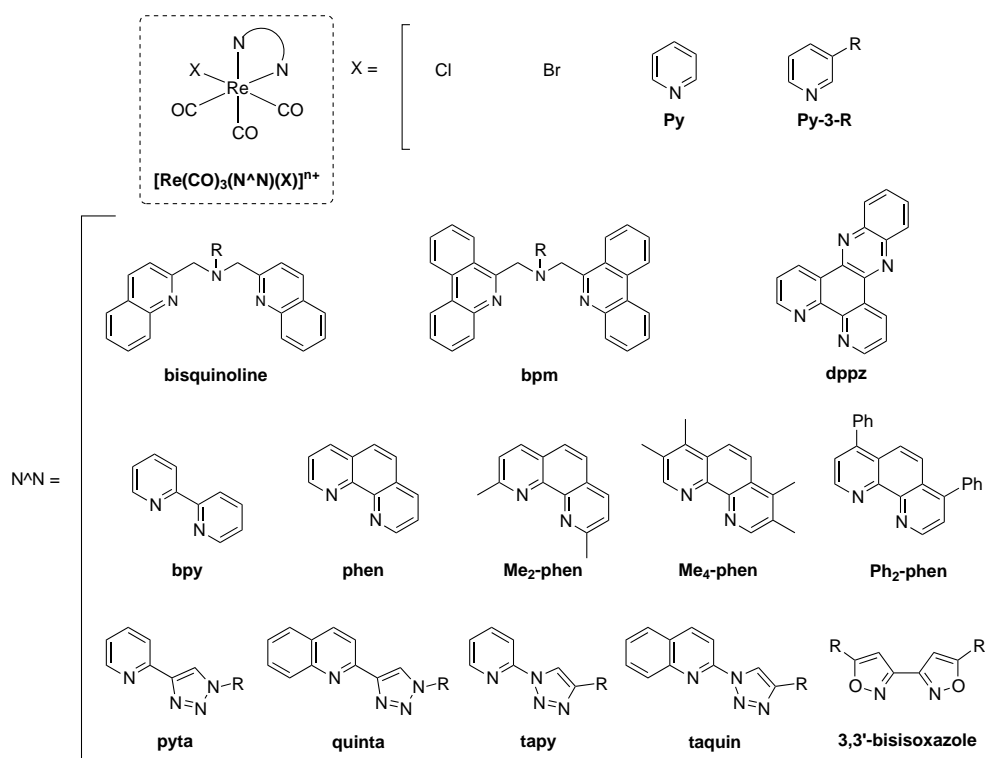


FIGURE 1.3 – Sélection de ligands testés pour modifier les propriétés spectroscopiques de complexes de Re(I) tricarbonyle (adapté de la littérature).¹⁷

TABLEAU 1.1 – Exemples de propriétés photophysiques pour des complexes de Re(I) tricarbonyle dans l'acétonitrile (adapté de la littérature).¹⁷

$\text{N}^{\wedge}\text{N}$ ligand	X ligand	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Φ_{em} (%)	Référence
bisquinoline ¹	–	366	425, 580	0,44	30
bpm	–	350	570 – 575	N.A.	31
bpy	Cl	355	633	0.27	32
bpy	Py-3-C(O)NH ₂	343	551	15,6	33
phen	Py-3-C(O)NH ₂	368	546	12,2	33
phen	Py-3-C(O)NH ₂	355	548	33	34
Me_2 -phen	Py-3-C(O)NH ₂	355	536	30	34
Me_4 -phen	Py-3-C(O)NH ₂	355	515	54	34
Ph_2 -phen	Py-3-C(O)NH ₂	355	560	34	34
dppz	Py-CH ₂ -NH ₂ Biotin	> 350	556, 599	0,16	31
pyta (R = Bn)	Cl	355	538	0,33	32
pyta (R = chaîne alkyle)	Cl	332	522	0,1	35
quinta ²	Br	N.E. ²	N.E. ²	–	35
tapy	Cl	360	569	0,19	35
tapy	Br	360	564	0,17	35
taquin	Br	380	617	0,06	35

¹ Mesures réalisées dans l'éthylène glycol à la place de l'acétonitrile pour cet exemple.

² Les complexes $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{Quinta})(\text{Br})]$ n'ont pas de bande d'émission dans l'acétonitrile mais possèdent une bande de transfert de charge métal-ligand en solution aqueuse (contenant du DMSO). Pour ces complexes, $\lambda_{ex} \sim 335\text{-}345$ nm, $\lambda_{em} \sim 580\text{-}600$ nm et $\Phi \sim 0,2\text{-}0,6\%$.³⁵

de complexes a été développé depuis les années 1980 pour réaliser de l'imagerie en milieu biologique. Les bandes de vibration d'élongation de la liaison $C\equiv O$ apparaissent vers 2000 cm^{-1} , une région où peu de fonctions organiques ou inorganiques résonnent. Cette zone est couramment appelée la fenêtre transparente des cellules (FIGURE 1.4(a)).^{45,50}

Le signal des complexes de *fac*-métal-tricarbonyle en symétrie C_{3v} est constitué d'une bande notée A_1 correspondant à la vibration symétrique des ligands $C\equiv O$ et une bande notée E correspondant aux vibrations antisymétriques. Un abaissement de symétrie conduit à un dédoublement des bandes E , comme observé sur la FIGURE 1.4 dans le cas où L est un Pyta. L'intensité de ces deux bandes est remarquable, car elle peut être 8 à 10 fois supérieure à celle de fonctions organiques classiques.^{51,52}

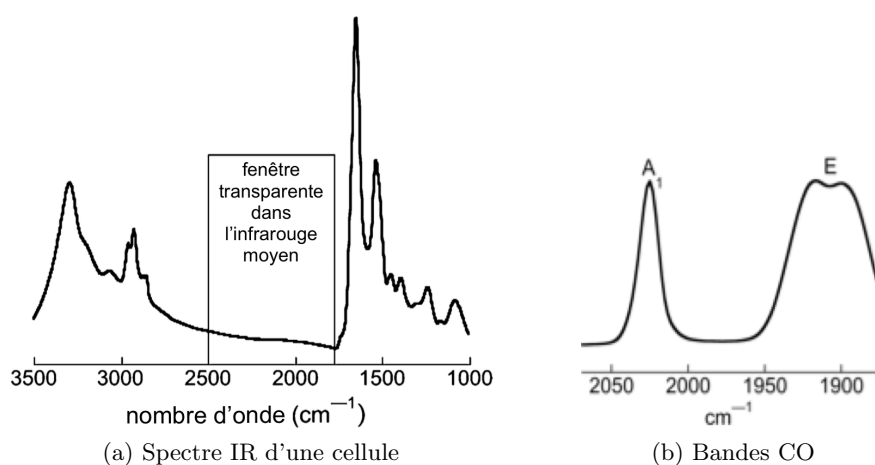


FIGURE 1.4 – (a) Spectre typique d'une cellule. Le spectre présenté est celui d'une cellule MCF-7, enregistré par spectromicroscopie SR-FITR (adapté de la littérature).⁵³ (b) Bandes de vibration d'élongation en infrarouge des liaisons CO pour un complexe $M(CO)_3$.

La position relative des deux bandes dépend du solvant et de sa polarité, mais leur intensité en est peu dépendante, comme démontré par R. STEPHENSON (FIGURE 1.5).⁵²

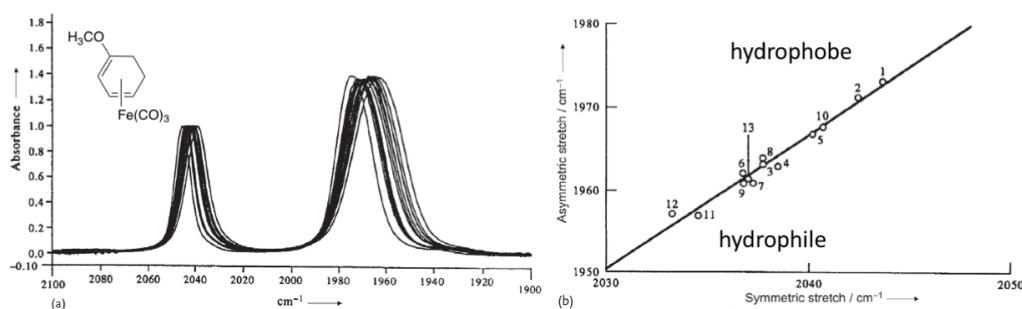


FIGURE 1.5 – (a) Spectre FTIR d'un complexe de fer-tricarbonyle dans différents solvants (normalisé en mettant les maxima à la même intensité), (b) Tracé du nombre d'onde de la vibration antisymétrique en fonction du nombre d'onde de la vibration symétrique.⁵²

On constate un déplacement des nombres d'onde en fonction de la polarité du solvant dans lequel les spectres ont été enregistrés. Les nombres d'onde sont plus élevés pour les solvants hydrophobes que pour les solvants hydrophiles.

Le groupe de Gérard JAOUEN a été le premier à utiliser les propriétés des métaux carbonyle pour la détection en milieu biologique.⁵⁴ Dans cette étude, les auteurs ont été capables de détecter la bande caractéristique d'un complexe de chrome-tricarbonyle conjugué à l'œstradiol, qui se lie au récepteur de l'œstrogène présent dans le cytosol de cellules d'utérus d'agneau, ce qui a mené au développement d'une méthode bioanalytique permettant la détection de biomolécules, appelée *carbonylmetal-immunoassay* (CMIA).⁵⁵ D'autres complexes de métal-carbonyle tels que $\text{Co}_2(\text{CO})_6$, $\text{CpMn}(\text{CO})_3$ ou $\text{CpFe}(\text{CO})_2$ ont été utilisés comme traceurs en CMIA et la méthode a été développée pour la détection de composés dans des extraits biologiques à une concentration de l'ordre de $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$.^{56,57}

La pertinence des bandes de vibration d'élongation des liaisons $\text{C}\equiv\text{O}$ pour l'imagerie en milieu cellulaire avec des microscopes à infrarouge a été démontrée plus récemment. Les premiers travaux de ce type ont été publiés en 2007 par le groupe de Weng Kee LEONG.⁵⁸ Dans leurs travaux, un cluster de trois complexes d'osmium-carbonyle a été utilisé en tant que sonde infrarouge pour marquer des acides gras ainsi qu'une lécithine. Ces bioconjugués ont pu pénétrer facilement dans les cellules, et les vibrations d'élongation des liaisons $\text{C}\equiv\text{O}$ ont présenté des signaux intenses, ce qui prouve la pertinence de l'étude de ces bandes pour l'imagerie à l'échelle de la cellule, à l'aide d'un microscope IR.

Enfin, alors que les rendements quantiques de fluorescence sont dépendants de l'environnement de l'espèce, avec des grandes variations selon la polarité ou des extinctions possibles à haute concentration,⁵⁹⁻⁶¹ l'imagerie infrarouge permet de réaliser des quantifications précises.^{51,62,63} En effet, si les nombres d'onde des bandes IR des $\text{C}\equiv\text{O}$ peuvent dépendre de l'environnement de la sonde, l'aire et la hauteur de ces bandes, quant à elles, varient peu.⁵² Des courbes d'étalonnage avec des quantités connues de complexe $\text{Re}(\text{CO})_3$ peuvent alors être tracées pour déterminer la quantité de complexe en milieu cellulaire en mesurant l'aire ou la hauteur de la bande infrarouge d'intérêt, comme déjà décrit dans notre groupe (FIGURE 1.6).⁴⁰

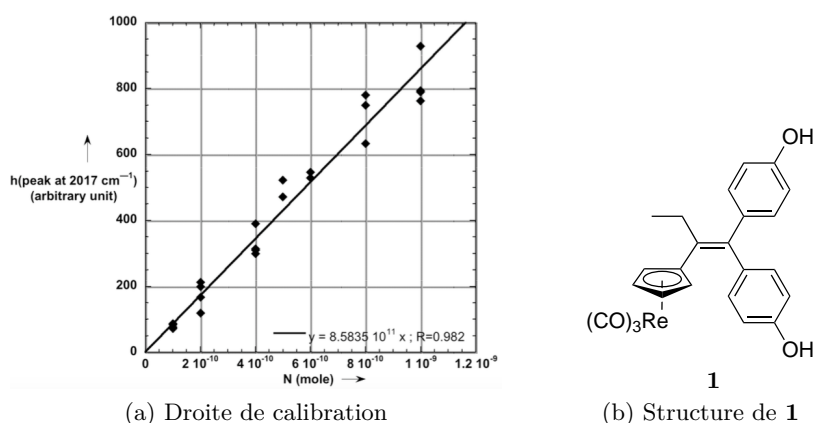


FIGURE 1.6 – (a) Droite de calibration obtenue pour le complexe de $\text{Re}(\text{CO})_3$ **1**. N est la quantité de matière de complexe déposée sur une membrane de nitrocellulose.⁴⁰ (b) Structure de **1**, dérivé du tamoxifène marqué par une unité $[(\text{Cp})\text{Re}(\text{CO})_3]$.

Les principaux inconvénients de la microspectroscopie infrarouge sont les limites de performances dues à une faible brillance des sources thermiques et à une mauvaise résolution spatiale due à la diffraction de la lumière (limite de ABBE) dans le cas d'une

détection optique. La résolution spatiale d est la capacité à séparer deux objets ponctuels adjacents.⁶⁴ La microscopie optique est généralement limitée par une diffraction spatiale de l'ordre de $\frac{\lambda}{2}$, où λ est la longueur d'onde du rayonnement utilisé. La plupart des microscopes infrarouge à transformée de FOURIER commerciaux qui utilisent des sources IR thermiques ont en pratique une résolution spatiale comprise entre λ et 3λ . Pour une onde à $\sigma = 2000 \text{ cm}^{-1}$, on atteint une résolution spatiale de 5 à 15 μm en fonction de la technique et de la configuration employées, ce qui constitue un inconvénient majeur pour des applications sur cellules, dont le diamètre est généralement compris entre 10 et 20 μm .⁶⁵⁻⁶⁷

Les microscopes FTIR peuvent être couplés à des rayonnements synchrotrons possédant une brillance et une cohérence élevées et de meilleures performances pour la limite de diffraction.⁶⁴ Des améliorations de l'optique et des détecteurs des microscopes ont permis d'atteindre une résolution spatiale proche de $\frac{\lambda}{2}$, même avec une source thermique.⁶⁶ Une autre limite de cette technique est le rapport signal sur bruit. Pour détecter des changements subtils dans les spectres IR, un nombre suffisant de photons doit être collecté pour sonder une surface spécifique de manière efficace. Cela nécessite soit d'augmenter l'ouverture numérique, soit de moyennner le signal de plusieurs pixels.^{65,68,69} Avec une source thermique et une détection point par point, une ouverture numérique inférieure à $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ n'est pas efficace en raison de la faible brillance de la source, alors qu'avec un rayonnement synchrotron, la taille de l'ouverture peut descendre jusqu'à $3 \times 3 \mu\text{m}^2$.⁷⁰⁻⁷² La brillance élevée du rayonnement synchrotron permet de focaliser 100 photons de plus sur une zone de quelques micromètres carrés.⁶⁹

Une autre technique d'imagerie vibrationnelle employée est l'imagerie RAMAN. Elle implique des énergies d'excitation supérieures à l'infrarouge, classiquement dans le visible ou l'UV et permet donc d'obtenir une meilleure résolution spatiale que la spectromicroscopie IR (environ 2,5 μm à 2000 cm^{-1} pour l'imagerie optique IR contre 1 μm en imagerie RAMAN). Il existe dans la littérature quelques exemples de complexes de métal-carbonyle imagés par microscopie confocale RAMAN : les premiers ont été décrits par HAVENITH *et al.* en 2010.⁴⁶

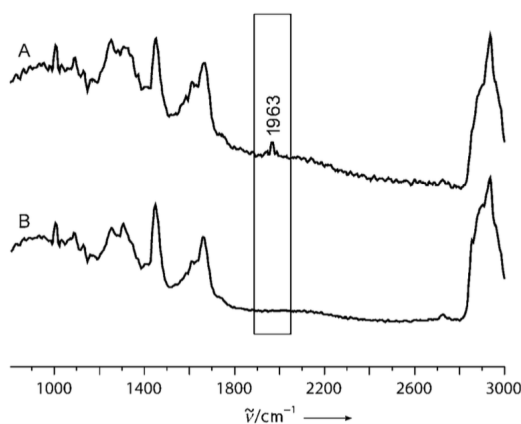


FIGURE 1.7 – (A) Spectre RAMAN moyen du signal maximal du complexe $[\text{Mn}-(\text{tpm})(\text{CO})_3]\text{Cl}$ dans des cellules HT29, (B) Spectre RAMAN d'une zone de la cellule sans complexe métallique.⁴⁶

Les auteurs se sont intéressés à la détection d'un complexe de $\text{Mn}(\text{CO})_3$. Le spectre RAMAN fait apparaître deux bandes de vibration à environ 1950 et 2050 cm^{-1} , qui sont plus faibles que les bandes observées en IR (FIGURE 1.7). L'inconvénient de cette technique est donc la nécessité d'avoir des concentrations de l'ordre de $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$.

1.1.3 Les SCoMPI comme sondes de fluorescence X

La spectroscopie de fluorescence X (XRF) est une technique résolue spatialement permettant d'imager des atomes lourds ($Z \geq 14$), comme le rhénium. Lorsqu'un atome est irradié par des rayons X, des électrons de cœur sont éjectés, ce qui forme des trous, comblés par des électrons des couches supérieures. Il en résulte l'émission de rayons X dont l'énergie dépend de l'élément irradié et de son degré d'oxydoréduction, et l'intensité de la concentration en cet élément. La distribution de plusieurs éléments peut être déterminée par une seule expérience, avec une résolution spatiale et une sensibilité élevées si un rayonnement synchrotron très focalisé est utilisé.⁷³ En effet, des rayons X avec une énergie supérieure à 8-10 keV peuvent pénétrer les tissus biologiques et donnent la distribution des éléments pour des échantillons jusqu'à environ 100 μm d'épaisseur à une résolution spatiale allant de 1 μm à 10 nm.⁷³⁻⁷⁵

Enfin, la spectroscopie de fluorescence X donne une information quantitative des éléments ionisés par la radiation incidente. Ainsi, la quantification des éléments détectés dans les échantillons biologiques peut être réalisée en utilisant des standards commerciaux.^{73,75}

L'élément qui nous intéresse tout particulièrement est le rhénium. Il possède deux signaux intenses à 8,6 et 10,28 keV, ce qui correspond aux bandes L (FIGURE 1.8).

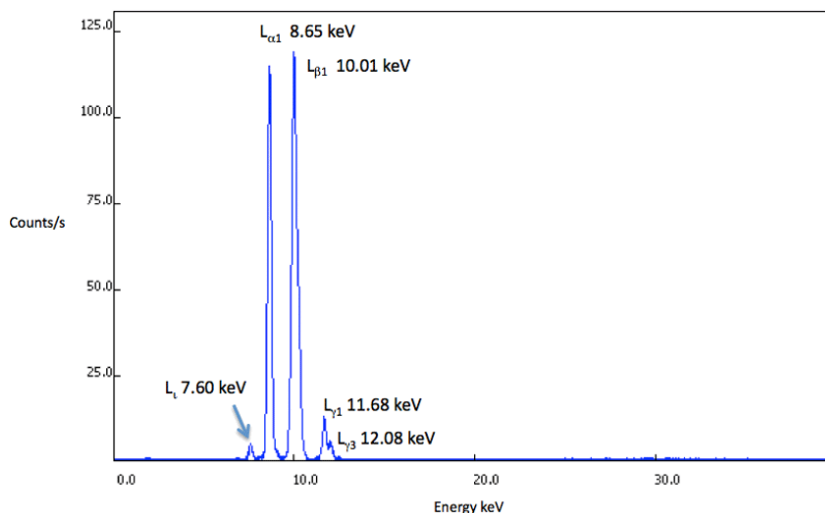


FIGURE 1.8 – Spectre de fluorescence X pour du rhénium pur (99,99%). D'après <http://www.xrfresearch.com/xrf-spectrum-rhenium/>.

Le rhénium possède une faible abondance dans les milieux biologiques,⁷⁶ ce qui facilite la détection des molécules marquées par nos sondes avec un bon rapport signal sur bruit. Dans le cadre des SCoMPI, cette méthode est d'autant plus intéressante qu'elle peut être utilisée en complément d'autres techniques, comme la spectroscopie infrarouge. Ainsi, l'intégrité de la sonde en milieu biologique, révélée par son spectre IR sensible à la symétrie

et la coïncidence des cartes IR, de fluorescence classique et X, peut être confirmée. Une telle méthode corrélative a été utilisée récemment dans notre groupe.⁷⁷

Récemment, MASSI et HARRIS ont associé la microscopie d'épifluorescence à la fluorescence X pour mettre en évidence la stabilité d'un complexe de rhénium en milieu cellulaire.⁷⁸ Dans notre équipe, cette technique a également été utilisée pour le marquage de protéines peu abondantes, telles que l'anhydrase carbonique (protéine membranaire) ou l'homéodomaine d'*engrailed* (protéine exogène).⁷⁵ Alors que ces protéines marquées par une sonde n'ont pas pu être détectées par spectromicroscopie infrarouge ni par microscopie de fluorescence, le rhénium a pu être cartographié par fluorescence X, ce qui montre la grande sensibilité de cette technique.

1.2 Applications choisies des SCoMPI

1.2.1 Développement du concept

Le terme SCoMPI a été employé pour la première fois en 2012.⁴⁸ Un complexe de rhénium tricarbonyle **2**, détectable par infrarouge et microscopie de fluorescence, a été étudié en milieu cellulaire (FIGURE 1.9). Cette étude était la première qui couplait les deux modes de détection.

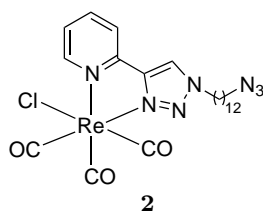


FIGURE 1.9 – Structure du composé **2**.

Le complexe **2** a d'abord été caractérisé par spectroscopie infrarouge à transformée de FOURIER. Le spectre, représenté FIGURE 1.12, présente les deux bandes E et A₁ caractéristiques du motif Re(CO)₃, à 1920 et 2025 cm⁻¹, respectivement. Le spectre d'absorption UV-visible présente une bande d'absorption à 300 nm, due à des transitions π-π* (LLCT), et une large bande entre 320 et 350 nm, attribuée à une bande de transfert de charge métal-vers-ligand (MLCT). L'irradiation à cette longueur d'onde donne une bande d'émission à environ 510 nm, caractérisée par un rendement quantique de 0,19% dans un mélange eau/éthanol 1:1 v:v à température ambiante.

Des cellules MDA-MB-231 ont été incubées en présence du complexe **2** à une concentration de 25 μmol · L⁻¹ pendant 1 h. L'étude par microscopie de fluorescence a mis en évidence la pénétration du complexe **2** dans les cellules et une localisation à proximité du noyau. Une accumulation à l'appareil de GOLGI a été identifiée par corrélation avec des images réalisées avec un marqueur commercial de cet organite (FIGURE 1.10).

D'autres cellules ont été étudiées par spectromicroscopie infrarouge à transformée de FOURIER utilisant le rayonnement synchrotron (SR-FTIR-SM). Les maxima d'absorption (ou « points chauds »), qui correspondent à la zone où l'aire de la bande IR correspondante est plus de 80% de la valeur maximale, sont représentés sur la FIGURE 1.11.

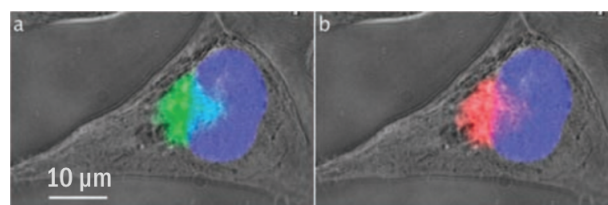


FIGURE 1.10 – Cellule MDA-MB-231 incubée avec **2** ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h) et un marqueur commercial d'appareil de GOLGI. Image visible superposée aux images d'épifluorescence de (a) **2** (vert) et du DAPI (bleu), (b) Marqueur de GOLGI (BODIPY TR C5-ceramide, rouge) et DAPI (bleu).⁴⁸

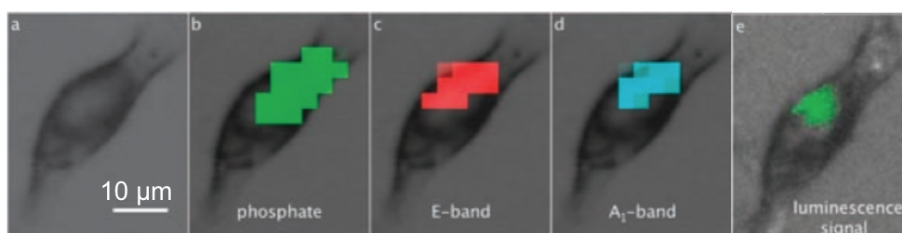


FIGURE 1.11 – Cellule MDA-MB-231 incubée avec **2** ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h). (a) Image visible, (b-d) Points chauds de l'intégrale de la bande IR indiquée sur la figure, (e) Image de fluorescence montrant la localisation de **2** (vert, ex. 350/50x, em. 460/50m).⁴⁸

Les points chauds pour les bandes E et A_1 des fonctions carbonyle de **2** correspondent bien, ce qui montre que les deux bandes peuvent être utilisées indifféremment. Par ailleurs, le signal de fluorescence de **2** mesuré sur la même cellule correspond au maximum d'intensité pour les bandes E et A_1 , ce qui montre la stabilité de la sonde ainsi que la pertinence de l'imagerie bimodale.

Pour confirmer l'attribution des cartes IR et de fluorescence, des spectres ont été enregistrés pour une collection de cellules (FTIR) et à la surface des cellules (SR-FTIR et SR-UV-SM) et sont présentés FIGURE 1.12.

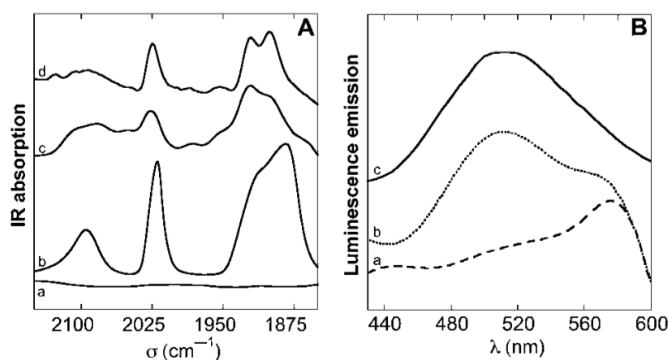


FIGURE 1.12 – (A) Spectres IR enregistrés dans la fenêtre transparente des cellules. (a) Spectre FTIR de cellules témoins déposées sur une membrane de nitrocellulose, (b) Spectre FTIR du composé **2** sous forme solide, (c) Spectre FTIR de cellules incubées avec **2** ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h) déposées sur une membrane de nitrocellulose, (d) Spectre SR-FTIR-SM enregistré sur une cellule incubée avec **2**. (B) Spectres d'émission (ex. 350 nm) (a) d'une cellule contrôle, (b) d'une cellule incubée avec **2** ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h), (c) d'une solution de **2** dans un mélange eau/éthanol 1:1.⁴⁸

Le signal infrarouge de **2** a été observé en déposant des cellules sur une membrane de nitrocellulose (FIGURE 1.12(A-c)). Le spectre présenté FIGURE 1.12(A-d) a été enregistré sur un point chaud pour la bande CO de la cellule présentée FIGURE 1.11. De même, le spectre d'émission de fluorescence des cellules incubées avec **2** est bien similaire au produit pur et peu d'autofluorescence a été observée (FIGURE 1.12(B)).

Cette première application a permis de montrer que les complexes $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{Pyta})]$ peuvent être utilisés comme sondes bimodales pour réaliser de l'imagerie cellulaire. Les deux modalités, fluorescence et infrarouge, ont conduit aux mêmes résultats. En outre, le complexe **2** présente une répartition hétérogène à l'intérieur des cellules et est localisé dans l'appareil de GOLGI. Ce composé pourrait donc être considéré comme un premier marqueur de l'appareil de GOLGI pour la fluorescence X.

1.2.2 Première application biologique : couplage à un œstrogène pour l'étude en milieu cellulaire

Une fois la pertinence des complexes $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{Pyta})]$ en tant que sonde bimodale démontrée, l'objectif suivant a été de greffer ce type de sonde sur une molécule afin de la suivre dans des cellules. En collaboration avec l'équipe de Anne VESSIÈRES et Gérard JAOUEN, un SCoMPI a été couplé à un œstrogène, le mestranol, pour donner le composé **3**, présenté FIGURE 1.13, et sa localisation dans les cellules a été étudiée.⁴⁹

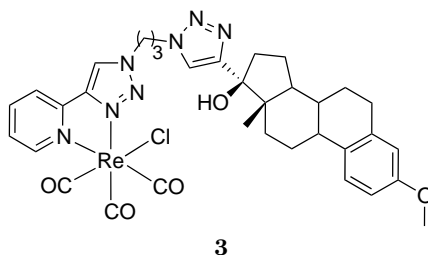


FIGURE 1.13 – Structure du composé **3**.

Le composé **3** a d'abord été caractérisé : il présente bien les trois bandes caractéristiques en IR entre 1800 et 2200 cm^{-1} et une bande de transfert de charge métal-ligand en spectroscopie d'absorption UV-visible active en émission de fluorescence. Les caractéristiques spectroscopiques de **3** en IR et fluorescence sont présentées FIGURE 1.14.

La FIGURE 1.14 présente aussi les spectres du composé détecté à l'intérieur des cellules. Au point 1, une émission de fluorescence intense de **3** a été enregistrée (ex. 350 nm , FIGURE 1.14(C), spectre 1). Le spectre correspond bien à celui du composé pur (FIGURE 1.14(C), spectre 3). Au point 2, un signal plus faible a été enregistré (FIGURE 1.14(C), spectre 2). Pour obtenir une carte de **3**, la bande de luminescence a été intégrée entre 450 et 550 nm , ce qui donne les pixels verts présentés FIGURE 1.14(A). Une localisation similaire a été obtenue par spectroscopie infrarouge (FIGURE 1.14(B), spectres 1 et 2).

Comme pour le composé **2**, une étude corrélative a été réalisée : des cartes ont été enregistrées en infrarouge par intégration de bandes de vibration caractéristiques et les points chauds ont été représentés sur la FIGURE 1.15. La bande E correspond au composé **3** alors que le rapport des bandes CH_3/CH_2 représente le noyau.⁴⁷ En effet, le noyau

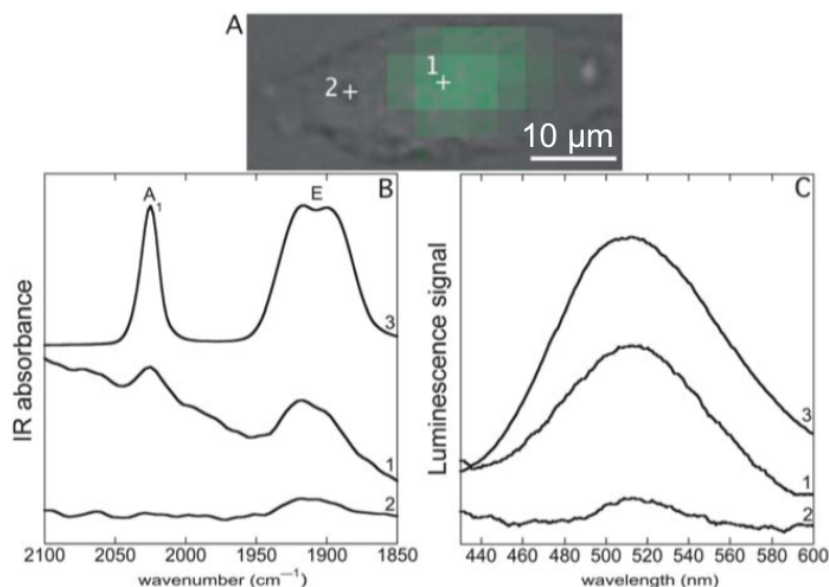


FIGURE 1.14 – Cellule MDA-MB-231 incubée avec **3** ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h). (A) Image visible superposée à l'intensité de l'aire de la bande d'émission de **3** (450-550 nm enregistrée par SR-UV-SM après excitation à 350 nm), (B) Spectres SR-FTIR-SM enregistrés aux points 1 et 2 dans la cellule et spectre FTIR du composé pur (**3**), (C) Spectres SR-UV-SM et spectre d'émission du composé en solution dans un mélange DMSO/eau 1:1 (**3**).⁴⁹

est une zone riche en groupements CH_3 , présents sur la thymine dans l'ADN et dans les protéines (Thr, Ala, Ile, Leu, Met, Val) très denses aux noyaux, tandis que les organites cytosoliques sont riches en membranes et donc en groupements CH_2 (longues chaînes des lipides).

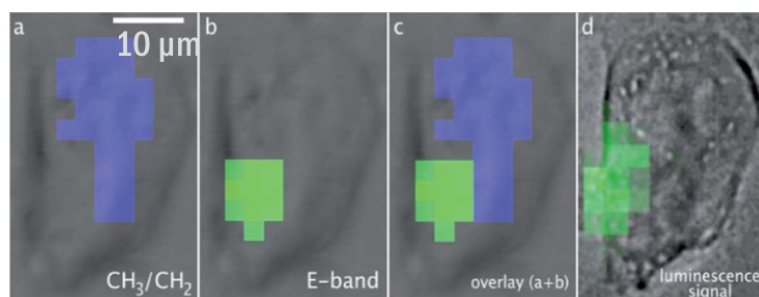


FIGURE 1.15 – Cellule MCF-7 incubée en présence de **3** ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h). Points chauds de l'intégrale de bandes IR caractéristiques : (a) Rapport CH_3/CH_2 (CH_3 2986-2948 cm^{-1} , CH_2 2948-2897 cm^{-1}), (b) Bande E des CO (1940-1879 cm^{-1}), (c) Superposition des deux, (d) Intégration de la bande de luminescence (450-550 nm) enregistrée par SR-UV-SM (ex. 350 nm).⁴⁹

La carte IR, enregistrée à l'aide de la bande E de **3**, correspond bien au signal de fluorescence de **3**. Par ailleurs, le rapport des bandes CH_3/CH_2 permet de localiser le noyau des cellules et donc de conclure que le composé **3** semble localisé à proximité du noyau, ce qui rappelle l'appareil de GOLGI. Pour confirmer cette localisation, une co-localisation avec un marqueur commercial de l'appareil de GOLGI a été réalisée pour deux lignées cellulaires (FIGURE 1.16).

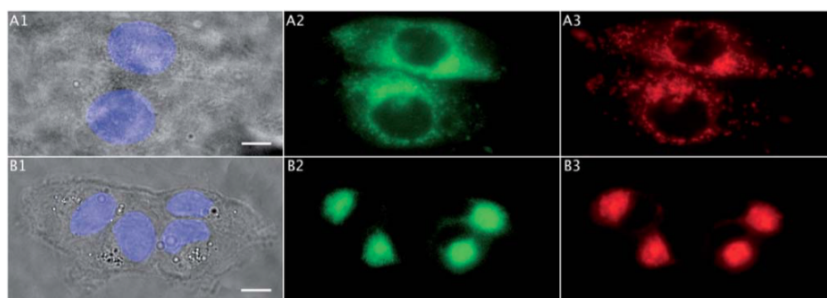


FIGURE 1.16 – Étude de colocalisation. (A) Cellules MCF-7 incubées en présence de **3** ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h) : (A1) Image visible et marquage du noyau par du DAPI, (A2) Fluorescence de **3** en vert, (A3) Fluorescence du marqueur de GOLGI en rouge. Coefficient de PEARSON = 0,90. (B) Cellules MDA-MB-231 incubées en présence de **3** ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h) : (B1) Image visible et marquage du noyau par du DAPI, (B2) Fluorescence de **3** en vert, (B3) Fluorescence du marqueur de GOLGI en rouge. Coefficient de PEARSON = 0,95.⁴⁹

La FIGURE 1.16 montre une accumulation du composé **3** à l'extérieur du noyau. La colocalisation avec le marqueur de GOLGI commercial (FIGURE 1.16(A2- A3) et (B2-B3)) présente un bon coefficient de corrélation de PEARSON pour les deux lignées.

Un marqueur SCoMPI a donc pu être efficacement greffé à une molécule dont la localisation a été étudiée dans différentes lignées cellulaires. Les mêmes cellules ont pu être imagées avec différentes techniques qui ont donné le même résultat. Une localisation péri-nucléaire de **4** a été observée et une colocalisation avec un marqueur commercial a permis de conclure à une localisation du conjugué dans l'appareil de GOLGI.

1.2.3 Propriétés d'un SCoMPI lié à un peptide dans des cellules

Afin d'étudier le comportement de sondes Re-tricarbonyle à travers des membranes, deux complexes possédant une fonction acide carboxylique ont été synthétisés pour être greffés sur l'extrémité *N*-terminale de deux CPP (*cell penetrating peptide*, peptide pénétrant) : R9 et R6W3. L'un des complexes possède un ligand chlorure (**5**) alors que l'autre possède un ligand pyridine (**6**, FIGURE 1.17). Leurs analogues méthylés, notés **7** et **8** ont également été synthétisés. Ils ont été étudiés avec des vésicules de DOPG (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol) comme mimes des membranes cellulaires.

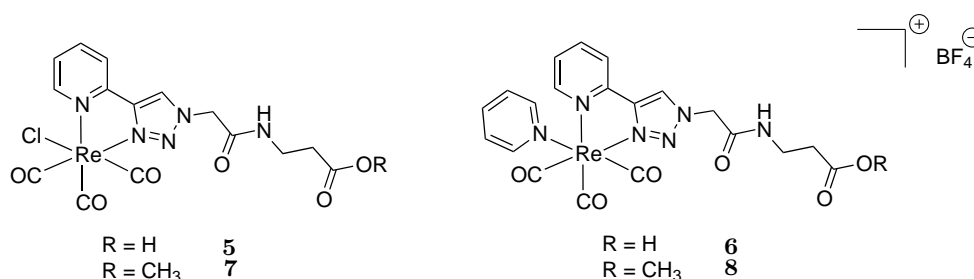
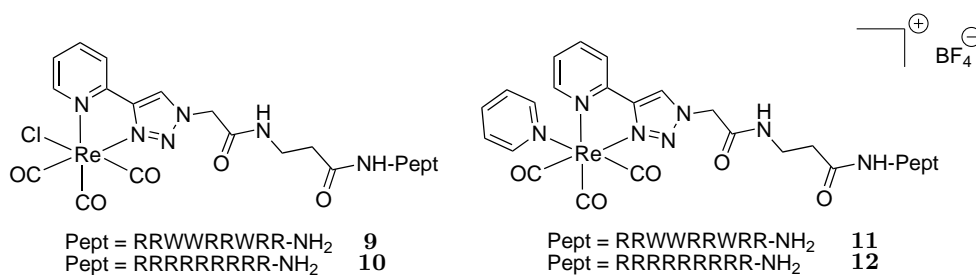


FIGURE 1.17 – Structure des deux SCoMPI synthétisés.⁷⁹

La réaction entre la sonde et le peptide a été réalisée en solution (EDC ou DCC/NHS). Quatre peptides ont donc été obtenus : **9**, **10**, **11** et **12**, représentés FIGURE 1.18.


 FIGURE 1.18 – Structure des quatre conjugués peptide-SCoMPI synthétisés. ⁷⁹

Les propriétés spectroscopiques de ces quatre complexes ont été étudiées (TABLEAU 1.2).

 TABLEAU 1.2 – Propriétés spectroscopiques des SCoMPI synthétisés et des conjugués SCoMPI-peptide (adapté de la thèse de Sarah HOSTACHY). ⁸⁰

Composé	ϵ_0^{350} (L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹)	λ_{em}^{ex350}	Φ (%) [*]
7	$1,8 \times 10^3$	550	$0,049 \pm 0,001$
8	$2,0 \times 10^3$	495	$0,92 \pm 0,02$
9	$1,8 \times 10^3$	550	$0,13 \pm 0,01$
10	$1,8 \times 10^3$	550	$0,17 \pm 0,02$
11	$2,0 \times 10^3$	495	$0,14 \pm 0,02$
12	$2,0 \times 10^3$	495	$0,69 \pm 0,05$

* L'erreur correspond à l'écart type de deux expériences indépendantes.

Les spectres d'absorption et d'émission de solution des complexes sous forme d'ester méthylique ont été enregistrés dans l'eau, contenant 2 % de DMSO. L'émission est plus intense dans le cas des complexes possédant un ligand pyridine, qui présentent un meilleur rendement quantique en solution. Les peptides R9 présentent une émission supérieure aux complexes R6W3. Cette extinction de fluorescence peut être expliquée par un transfert d'électron photo-induit du complexe de rhénium vers les tryptophanes.

Dans le modèle de vésicules de DOPG, le comportement des sondes est différent selon le ligand employé. Lorsque le ligand est une pyridine, une faible variation d'intensité de la fluorescence est observée quand le peptide est lié aux membranes alors que lorsque le ligand est un chlorure, l'intensité d'émission du dérivé augmente d'un facteur 5 quand il est lié aux membranes.

Pour confirmer ces résultats, les peptides marqués par une sonde **12** et **10** ont été incubés sur des cellules CHO, et les résultats sont présentés FIGURE 1.19. L'intensité de fluorescence est plus élevée pour les cellules incubées avec **10** que pour celles incubées avec **12**. Afin de comparer la quantité de chaque composé dans les cellules, la bande A₁ des fonctions carbonyle de la sonde a été intégrée et divisée par la bande des fonctions amide I (pour se ramener à une même quantité de cellules). La différence d'intensité n'est pas aussi élevée que celle observée en fluorescence. Les différences observées par fluorescence sont donc bien dues à une exaltation de la fluorescence pour **10** car les deux peptides conjugués sont présents à des concentrations comparables dans les cellules. Cela montre l'importance de pouvoir quantifier de façon précise en utilisant l'IR.

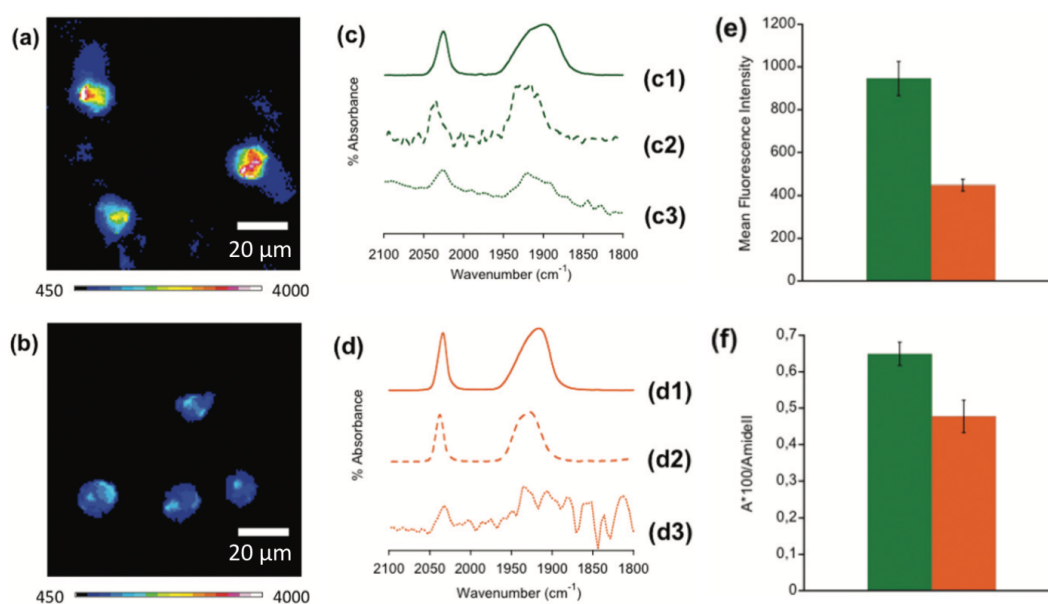


FIGURE 1.19 – Comparaison des signaux de fluorescence et infrarouge de cellules CHO incubées avec un peptide R9 marqué par un SCoMPI. (a-b) Cellules CHO incubées pendant 1 h à 37 °C à une concentration de $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ en **10** (a) ou **12** (b). (c) Spectre IR de **13** pur (c1), de **10** (c2), de **10** dans les cellules. (d) Spectre IR de **8** pur (d1), de **12** (d2), de **12** dans les cellules (d3). (e) Intensité de fluorescence moyenne mesurée pour des cellules CHO incubées avec **10** (vert, gauche), ou **12** (orange, droite). (f) Intensité de la bande A_1 en infrarouge mesurée pour des cellules CHO incubées avec **10** (vert, gauche), ou **12** (orange, droite).⁷⁹

Il est donc possible, à l'aide d'une sonde multimodale de type $\text{Re}(\text{CO})_3$, de marquer des peptides de pénétration et de les étudier dans des cellules. Le même peptide R9 avait également été marqué par une sonde $\text{Re}(\text{CO})_3$ et sa pénétration étudiée à travers des biopsies de peau.⁸¹ Cette application sera détaillée dans le chapitre 3.

1.2.4 Marquage et imagerie de protéines par fluorescence X

Toutes ces applications des SCoMPI ont poussé le groupe de Clotilde POLICAR à aller plus loin et à marquer des protéines pour les imager à l'intérieur des cellules, ce qui représente un défi car les protéines sont présentes en faible quantité dans les cellules. Pour ce faire, deux approches ont été explorées (SCHÉMA 1.1).⁷⁵

- Marquage *in vitro* de protéines pouvant être internalisées dans les cellules : les homéodomaines (HD) sont de bons candidats puisqu'ils peuvent être produits, purifiés, marqués *in vitro* et internalisés dans les cellules.
- Marquage de protéines endogènes liées aux membranes dans les cellules (exemple de l'anhydrase carbonique).

Pour la première approche, c'est l'homéodomaine d'*engrailed* qui a été choisi. Les homéodomaines constituent une séquence de 60 acides aminés capables de pénétrer les cellules. Cette séquence est partagée par les homéoprotéines, qui sont une famille de facteurs de transcription.^{82,83} L'homéodomaine d'*engrailed* a été utilisé en particulier pour l'étude des mécanismes de translocation des homéodomaines.^{82,84-87} Une cystéine a été ajoutée sur l'extrémité *N*-terminale de la séquence, sachant que l'homéodomaine n'en contient pas

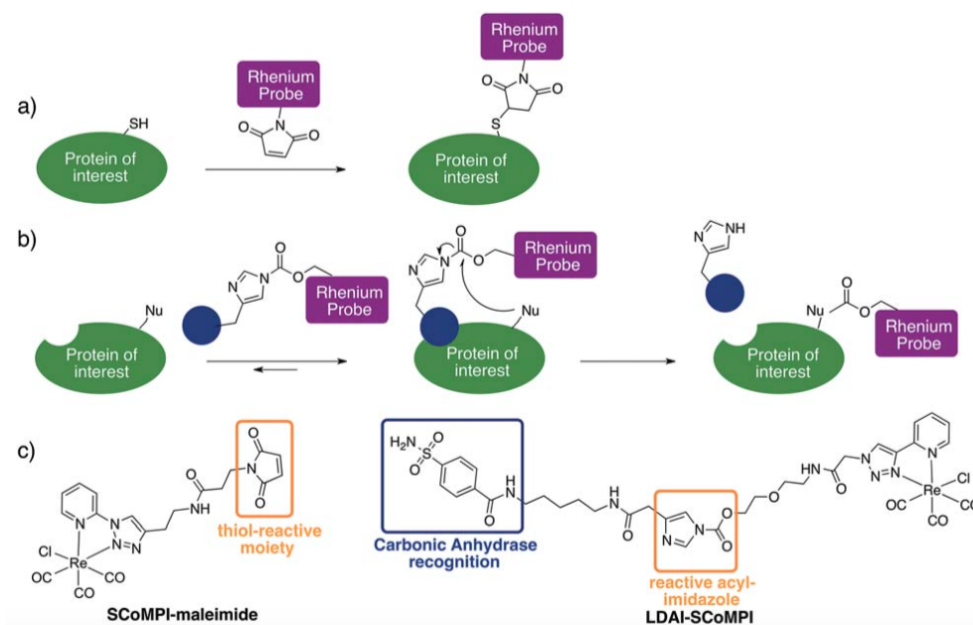


SCHÉMA 1.1 – Marquage de protéines avec un SCoMPI. (a) Marquage d’une protéine exogène *via* une réaction de couplage thiol-maléimide. (b) Marquage d’une protéine endogène en utilisant la chimie « *Ligand-Directed Acyl Imidazole* ». Le cercle bleu représente un ligand de la protéine. (c) Gauche : structure du SCoMPI-maléimide et Droite : Structure du LDAI-SCoMPI pour le marquage de l’anhydrase carbonique endogène.⁷⁵

d’autre, et un SCoMPI possédant une fonction maléimide a été synthétisé pour le coupler sur la cystéine (Re-HD) sélectivement. Une autre version de cette protéine possédant une séquence NLS supplémentaire (*nuclear localization signal*, signal de localisation nucléaire) a également été produite (Re-NLS-HD). La stratégie de synthèse est présentée dans le SCHÉMA 1.1.

Les deux protéines marquées par des SCoMPI notées Re-HD et Re-NLS-HD ont été incubées avec des cellules CHO ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h, 37°C) et leur pénétration étudiée par microscopie de fluorescence. Malheureusement aucune des protéines marquées par le SCoMPI n’a pu être détectée par fluorescence. Cela est dû au faible rendement quantique de ce type de sonde et à la faible pénétration de l’homéodomaine. La microspectroscopie infrarouge a donc été envisagée pour détecter ces protéines dans les cellules mais une fois de plus, aucun signal attribué à la sonde $\text{Re}(\text{CO})_3$ n’a été observé. La spectroscopie IR n’est donc pas assez sensible pour ce type d’application.

Cette expérience montre les limites des sondes bimodales et la nécessité d’une troisième modalité est apparue : la fluorescence X. En effet, le rhénium a pu être détecté et cartographié par microspectroscopie de fluorescence X à rayonnement synchrotron. Cette technique est donc plus sensible que la fluorescence et l’infrarouge et la pertinence des sondes Re-SCoMPI pour l’imagerie est validée. Le signal de Re-HD et Re-NLS-HD a été détecté dans toute la cellule avec une légère accumulation dans le noyau pour Re-NLS-HD, comme montré par comparaison avec le zinc, connu pour être plus abondant dans le noyau (FIGURE 1.20).

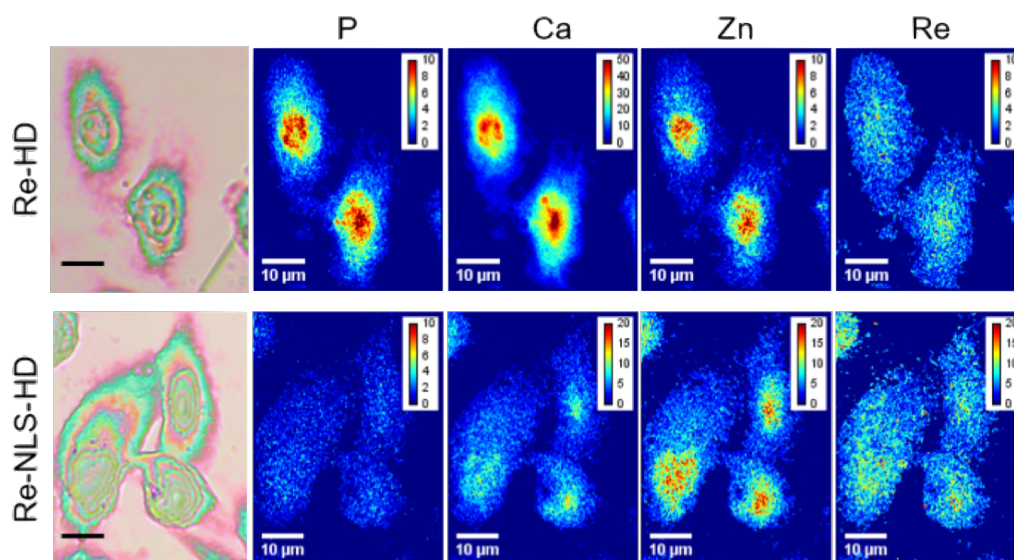


FIGURE 1.20 – Imagerie de fluorescence X de cellules CHO incubées avec Re-HD et Re-NLS-HD ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h, 37°C). Image visible et distribution de différents éléments (P, Ca, Zn, Re) dans les cellules (13,5 keV, taille de faisceau $300 \times 300 \text{ nm}^2$). L'intensité est donnée en nombre de coups par seconde.⁷⁵

Enfin, la détection de protéines endogènes selon le même procédé a été envisagée. C'est l'anhydrase carbonique qui a été choisie. Ces protéines ont été très étudiées et sont impliquées dans beaucoup de processus biologiques tels que la respiration, l'équilibre acide/base ou le métabolisme.⁸⁸ En outre, ces protéines membranaires peuvent être surexprimées lorsque les cellules sont placées en conditions anaérobies.

Afin de sélectivement marquer ces protéines, la sonde rhénium a été conjuguée avec un ligand de la protéine par un lien clivable selon la stratégie *Ligand Directed Acyl Imidazole* (LDAI) développée dans le groupe de I. HAMACHI.⁸⁹ Une sonde $\text{Re}(\text{CO})_3$ possédant une fonction carbonate activée par un NHS a alors été couplée au motif ligand-imidazole pour former le réactif LDAI (SCHÉMA 1.1(b)). Suite à la reconnaissance du ligand, une chaîne latérale nucléophile de la protéine située à proximité du site de liaison attaque le lien clivable et la sonde qui est alors liée de manière covalente à la protéine. Des cellules A549 ont donc été placées dans des conditions hypoxiques pour surexprimer l'anhydrase carbonique, puis incubées en présence de LDAI-SCoMPI ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), lavées et fixées au PFA. Ces cellules ont ensuite été étudiées par microscopie de fluorescence X (FIGURE 1.21).

Le signal du rhénium a été détecté dans toute la cellule avec une légère accumulation dans le noyau, là où la cellule est la plus épaisse. Aucun Re n'a en revanche été détecté lorsque les cellules ont été co-incubées avec le SCoMPI-LDAI et un ligand plus affiné de la protéine, montrant ainsi la sélectivité du marquage.

Les complexes à base de rhénium sont donc tout à fait adaptés au marquage de protéines exogènes ou endogènes et la nouvelle modalité, la fluorescence X, permet d'élargir les perspectives d'utilisation des sondes multimodales.

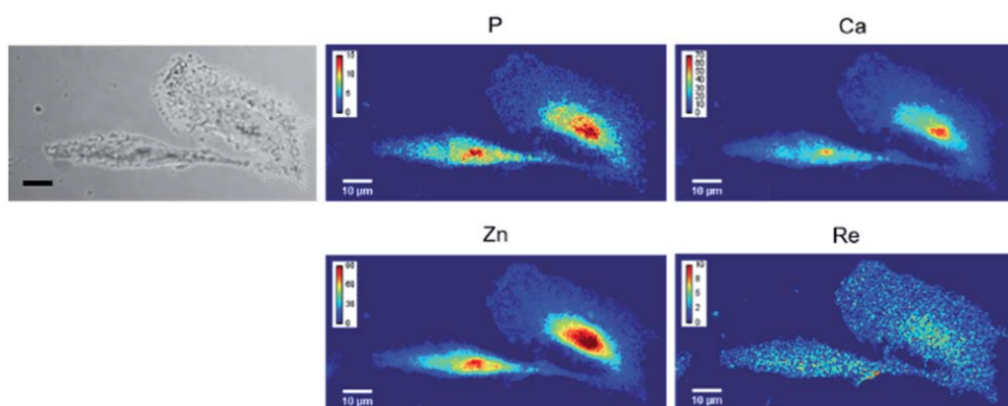


FIGURE 1.21 – Imagerie de fluorescence X de l’anhydrase carbonique. Des cellules A549 ont été placées dans des conditions hypoxiques pendant 24 h puis incubées en présence de LDAI-SCoMPI ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 3 h, 37°C). Image visible et distribution de différents éléments (P, Ca, Zn, Re) dans les cellules ($13,5 \text{ keV}$, taille de faisceau $300 \times 300 \text{ nm}^2$). L’intensité est donnée en nombre de coups par seconde.⁷⁵

1.3 Conclusion

Les SCoMPI sont donc des outils intéressants pour réaliser de l’imagerie multimodale. D’abord utilisés pour leurs propriétés de fluorescence et leurs signaux en infrarouge, l’utilisation de la fluorescence X comme troisième modalité a ouvert les perspectives d’applications. Leurs deux principales applications qui font l’objet de ce travail sont :

- Le greffage d’une sonde de type SCoMPI sur une molécule d’intérêt, afin de suivre sa pénétration et sa localisation dans des cellules (chapitre 4) ou dans des tissus (chapitre 3).
- La modification de la sonde par des groupements ciblant des organites (mitochondries, noyau...) pour obtenir des marqueurs de fluorescence X de ces organites (chapitre 5).

D’autres complexes organométalliques ont déjà été décrits dans la littérature pour cibler sélectivement des organites, et leur description fait l’objet du chapitre 2.

Chapter 2

Literature: The cell and the targeting of its organelles by metal complexes

2.1 Structure of a cell

Eukaryotic cells contain a defined membrane-bound nucleus and extensive internal membranes that enclose other compartments called organelles, comprising mitochondria, endoplasmic reticulum, GOLGI apparatus, lysosomes, vesicles, etc. (Figure 2.1). The region of the cell lying between the plasma membrane and the nucleus is the cytoplasm, comprising the cytosol (aqueous phase) and organelles.

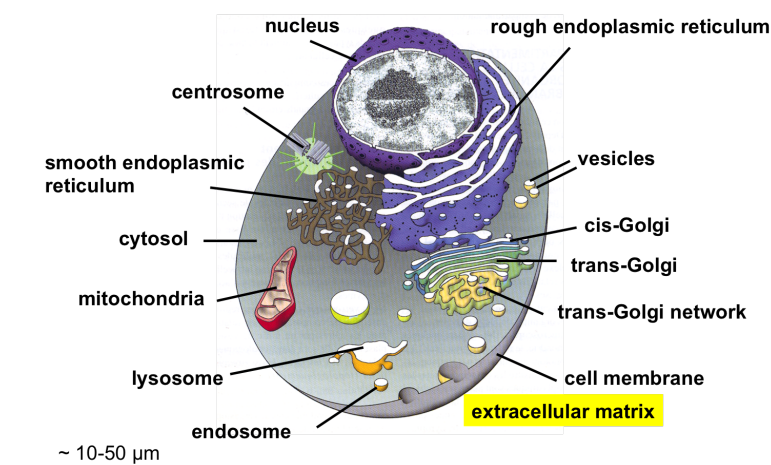


Figure 2.1 – Structure of an eukaryotic cell.⁹⁰

The aim of this chapter is to see how it is possible to target various organelles in the cell and have an overview of the metal complexes used for this purpose.

2.2 Targeting mitochondria

2.2.1 Structure of mitochondria

Mitochondria are organelles found in all eukaryotic cells. They are highly dynamic organelles, observed to undergo fusion and fission events continuously and that can take

different morphologies, from fragmented states to continuous network.⁹¹ The terminology mitochondrion refers to the continuous network form whereas the more common terminology mitochondria refers to the fragmented state. When in fragmented state, they are commonly between 0.5 and 3 μm in diameter and occupying up to 25 % of the volume of the cytoplasm. They contain two very different membranes: an outer one about 7 nm thick and an inner one, separated by the intermembrane of 8 to 10 nm wide. The outer membrane is composed of half lipids and half proteins. These proteins render the membrane permeable to molecules with high molecular weights (10,000 Da or less). The inner membrane is less permeable and is made of about 20 % of lipids and 80 % of proteins. There is a membrane potential across this membrane due to the action of the enzymes involved in the electron transport chain. Infoldings of the inner membrane, also called cristae, increase its surface in the central large cavity called the matrix (see Figure 2.2).⁹²

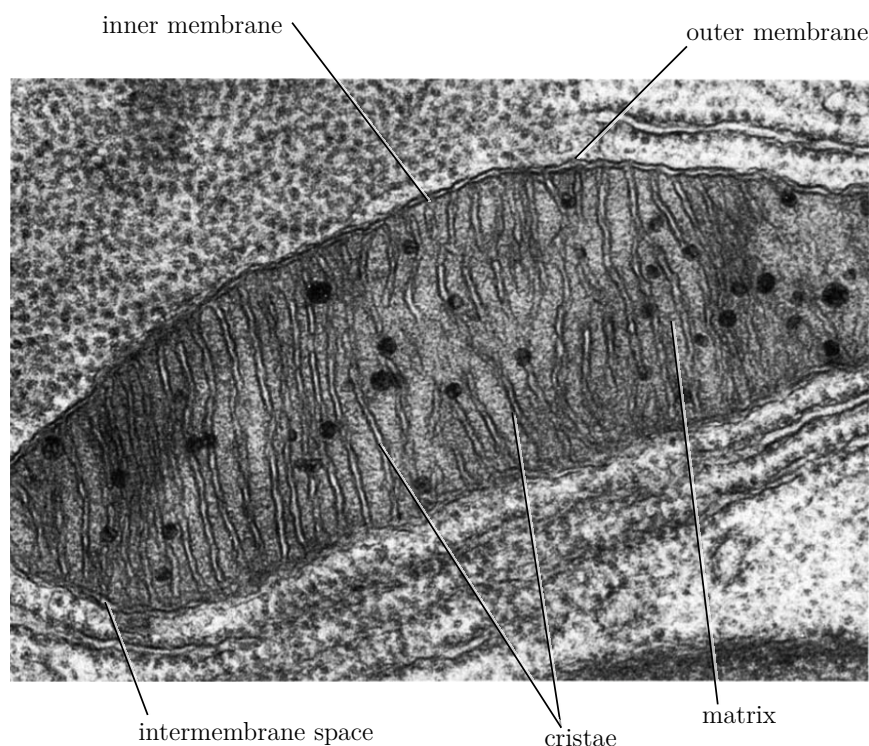
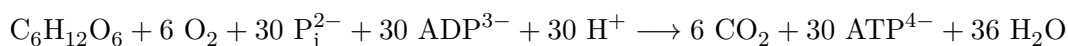


Figure 2.2 – Electron micrograph of a mitochondrion of bat pancreas (adapted from literature).⁹²

Mitochondria are described as the "powerhouse of the cell" as they are responsible for the formation of adenosine triphosphate (ATP) through aerobic respiration, which is a source of chemical energy used for metabolic processes in cells.⁹⁰ The aerobic oxidation of one molecule of glucose leads to the formation of thirty molecules of ATP:

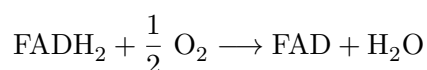
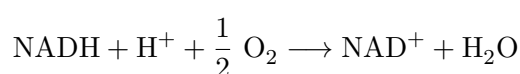


where P_i refers to inorganic phosphate, which is at physiological pH HPO_4^{2-} .

In the first step, glycolysis takes place in the cytosol and produces pyruvate, a three-carbon molecule, a low amount of ATP, and reduces two molecules of NAD^+ into NADH (oxidized and reduced nicotinamide adenine dinucleotide). Pyruvate is transported across

the inner mitochondrial membrane and into the matrix, where it is oxidized by O_2 into acetyl-coenzyme A and CO_2 . The inner membrane permits electron transport and ATP synthesis.

In the second step, the acetyl group of acetyl-CoA is then oxidized to CO_2 by the citric acid cycle: each turn of the citric acid cycle releases two molecules of CO_2 and generates three NADH molecules, one $FADH_2$ (flavin adenine dinucleotide) molecule, and one GTP (guanosine triphosphate). Most of the energy released in these two steps of glucose oxidation is converted into high-energy electrons in the reduced coenzymes NADH and $FADH_2$. In a third step, this energy stored in NADH and $FADH_2$ is converted by an electron-transport chain, called the respiratory chain, into the so-called "proton-motive force" (Figure 2.3). During electron transport, electrons are released from NADH and $FADH_2$ after oxidation to reduce O_2 into H_2O :



The challenge for mitochondria is to convert the energy released by these oxidations into energy stored in a chemical form in ATP. To do so, mitochondria convert energy of the previous oxidations into the proton-motive force. Electron transfers between an electron donor and an electron acceptor release energy, that is used for the pumping of protons from the mitochondrial matrix across the inner membrane, which results in a proton concentration gradient and thus an electrochemical gradient through the inner membrane. This gradient is then used by ATP synthase to produce ATP. As the outer membrane is permeable to protons, this pumping increases the pH of the mitochondrial matrix compared to the cytosol and the intermembrane space. Therefore the matrix becomes more electrically negative.⁹³

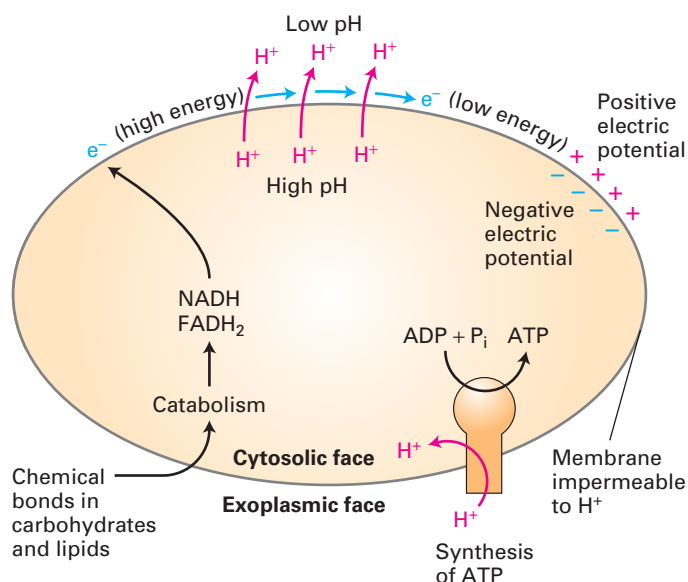
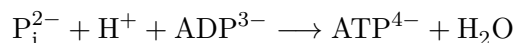


Figure 2.3 – The proton-motive force powers ATP synthesis (adapted from literature).⁹⁴

This proton-motive force is then responsible for the movement of protons back across the inner membrane, that makes the synthesis of ATP from ADP and P_i by ATP synthase

possible:



This is the major source of ATP in cells.

The electrical potential across the inner membrane $\Delta\Psi_m$ can be estimated by addition of radioactive $^{42}K^+$ and traces of valinomycin, a lipid-soluble ionophore that selectively binds a specific cation, in a suspension of mitochondria, and measured by the radioactivity in the matrix. The inner membrane is impermeable to K^+ , but valinomycin selectively binds K^+ and drives it across the membrane. The measure of the concentration of $^{42}K^+$ at equilibrium is 500 fold greater in the matrix than outside, which is in accordance with the negative charge of the matrix. According to the NERNST equation, the potential across the inner membrane can be determined:

$$\Delta\Psi_m = -59 \log \frac{[K_{in}]}{[K_{out}]} = -59 \log 500 = -160 \text{ mV}$$

Only a fraction of the energy released by the oxidation of respiratory substrates drives ATP synthesis: a significant proportion of the energy is released as heat, as demonstrated recently by RUSTIN *et al.*⁹⁵ The authors were able to measure mitochondrial temperature in situ under different physiological conditions using a temperature-sensitive fluorescent probe. They showed that mitochondria were more than 10 °C warmer when the respiratory chain was functional in human embryonic kidney cells and primary skin fibroblasts.

In addition, mitochondria play key roles in apoptosis in mammalian cells, which is the process of programmed cell death. There are two major apoptotic pathways: the extrinsic and intrinsic pathways. The latter is also called the mitochondrial pathway. Proteins are released from the space between inner and outer membranes of mitochondria: once in the cytosol, these proteins activate caspase (cysteine- aspartic acid protease), responsible for cell death by cleaving a variety of substrates.⁹⁶

The malfunctioning of mitochondria is involved in many diseases (obesity, diabetes, PARKINSON'S, blindness, infertility) and somatic mutations in the mitochondrial genome may be involved in neuromuscular diseases, neurodegenerative diseases or cancer. Known treatments are the use of antioxidants to protect mitochondria from oxidative stress, proapoptotic drugs to trigger apoptosis in tumor cells and proteins and peptides.⁹⁷ Thus, driving a molecule to mitochondria has a great interest and there are many ways to do so.

2.2.2 Conjugation to lipophilic cations

Lipophilic cations are commonly used to target mitochondria, as their positive charge is delocalized over a large and hydrophobic surface area (ex: triphenylphosphonium (TPP) conjugates). They are lipid-soluble and can pass easily through phospholipid bilayers, whereas the crossing of the negative barrier at the membrane (phospholipids) is favored by their positive charge. Then, they can accumulate into the mitochondrial matrix in response to the membrane potential. Consequently, their uptake depends on the potential of the membrane: for example, the inner membrane of mitochondria is comprised between -150 and -180 mV whereas the plasma membrane is comprised between -30 and -60 mV (Figure 2.4).⁹⁸

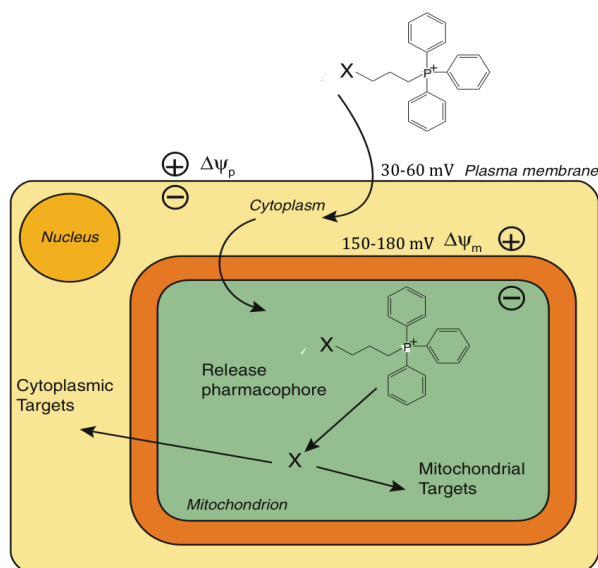


Figure 2.4 – Release of a pharmacophore from a mitochondria-targeted pro-drug molecule (adapted from literature).⁹⁸

Quantification of the amount of compound going into the mitochondrion can be achieved using the NERNST equation:

$$\Delta\Psi = \frac{RT}{\mathcal{F}} \ln \frac{[\text{cation}]_{in}}{[\text{cation}]_{out}} = \frac{2.303RT}{\mathcal{F}} \log \frac{[\text{cation}]_{in}}{[\text{cation}]_{out}}$$

with $\frac{2.303RT}{\mathcal{F}} \approx 61.5 \text{ mV (37 }^\circ\text{C)}$.

The NERNST equation means that for every 61.5 mV increase in $\Delta\Psi$, there is a 10-fold accumulation of the cation within mitochondria. The triphenylphosphonium cation attached to the moiety to be delivered to mitochondria is first accumulated 5-10-fold in the cytoplasm, driven by the plasma membrane potential ($\Delta\Psi_p$) and then further accumulated (100-500-fold) by the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$).⁹⁹

Historically, a lipophilic cationic dye (Janus Green B) was used as a stain to visualize mitochondria for light microscopy.¹⁰⁰ Rhodamine 123 is now routinely employed for this purpose (Figure 2.5).

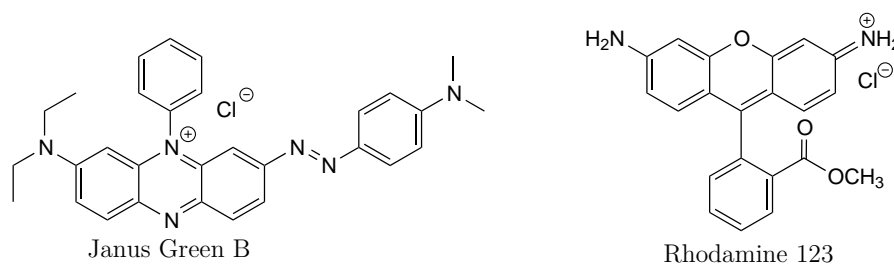


Figure 2.5 – Structures of Janus Green B and Rhodamine 123.

Many compounds have been functionalized with TPP to address them to the mitochondria. Three examples are represented in Figure 2.6.^{101–103}

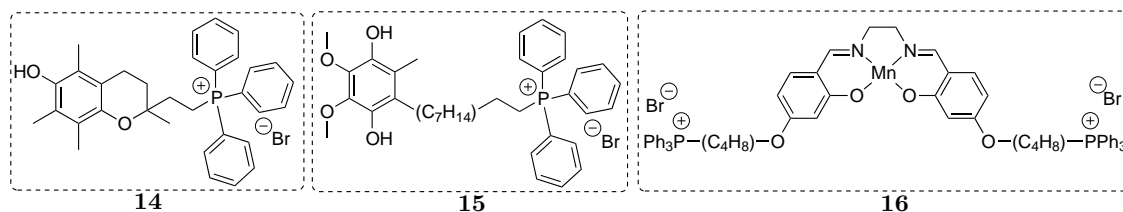


Figure 2.6 – Examples of active molecules bearing a TPP moiety.

Vitamin E for example is known to diminish the amount of reactive oxygen species (ROS) but its main problem is that it cannot accumulate within mitochondria, which limits its effectiveness. A TPP was linked to vitamin E to give compound **14**, that shows effects on the protection of rat liver mitochondria from oxidative damage.¹⁰¹ Compound **15** is a redox-active compound based on ubiquinol, that protects mitochondria against cardiac ischemia-reperfusion oxidative injury.¹⁰² Compound **16** is a Mn complex with a superoxide dismutase (SOD) activity, whose role is to prevent mitochondrial oxidative damage.¹⁰³ Moreover, many compounds bearing a triphenylphosphonium and a *N*-oxide moiety have been designed in order to scavenge ROS.^{98,104,105}

Recently, Ching-Hsuan TUNG's group developed a novel mitochondria-labeling and non toxic compound (**17**), that is fluorescent after cellular hydrolysis and conversion into **18** (Figure 2.7).¹⁰⁶

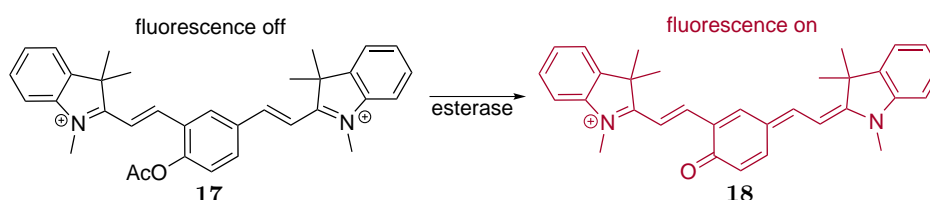


Figure 2.7 – Fluorogenic probe **17** and the proposed intracellular hydrolysis.¹⁰⁶

The specific binding of the hydrolyzed compound **18** to mitochondria was proven by co-staining with different organelle trackers in various cell lines. A good co-localization was observed between **18** and the MitoTracker Green FM[®] (Figure 2.8).

The tropism of this compound for mitochondria can be explained by the 1,2,3,3-tetramethyl-3H-indolium moiety, that is highly hydrophobic and positively charged and thus, as described for TPP, can be driven by the membrane potential to mitochondria.

The main features for the targeting of the mitochondria are lipophilicity and positive charge. Peptides can be designed with these characteristics, making them MPP, or mitochondrial targeting peptides.

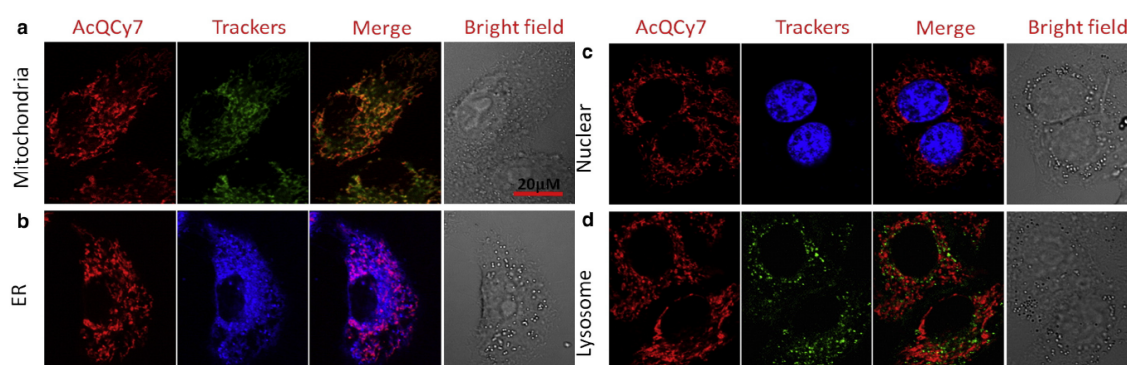


Figure 2.8 – Subcellular fluorescence signals produced by the hydrolyzed compound **18**. HeLa cells were co-incubated with **17** ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$) and organelle trackers (a) MTG (250 nmol L^{-1}) for mitochondria, (b) ER-TrackerTM Blue-White (500 nmol L^{-1}) for the ER, (c) Hoechst 33324 (200 nmol L^{-1}) for the nucleus, (d) Lyso TrackerTM Green (500 nmol L^{-1}) for lysosomes. The pictures from left to right are the compound **18** (AcQC77) fluorescence images and organelle trackers images, as well as merged fluorescence images and bright field images, respectively.¹⁰⁶

2.2.3 Conjugation to mitochondria-targeted peptides

The use of mitochondria-targeted peptides is another approach to target mitochondria. The first peptides designed were the SZETO-SCHILLER (SS)-peptides, antioxidants that selectively protect mitochondria and cells from oxidative damages. They are made of four amino acids (standard or not) with alternating aromatic and basic moieties with a D-amino acid at the first or second position, and amidation of the C-terminus to increase stability (compounds **19** and **20** presented in Figure 2.9).¹⁰⁷

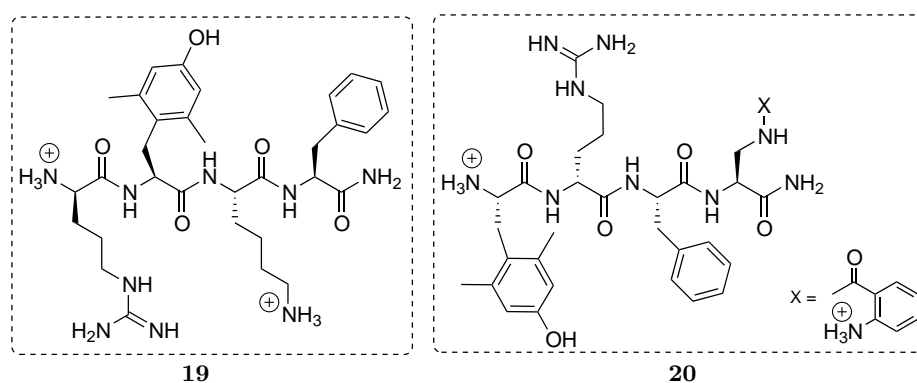


Figure 2.9 – Structure of two SS-peptides.¹⁰⁷

At physiological pH, they bear a charge of +3 so that they can bind to the inner membrane of mitochondria, using a process which is independent of the membrane potential. **20** was linked to a fluorescent moiety in order to compare the fluorescence of this peptide to the fluorescence of tetramethylrhodamine (TMRM), which is a mito-tracker:^{108,109} an accumulation to mitochondria of the peptide was evidenced, as expected (Figure 2.10).¹⁰⁷

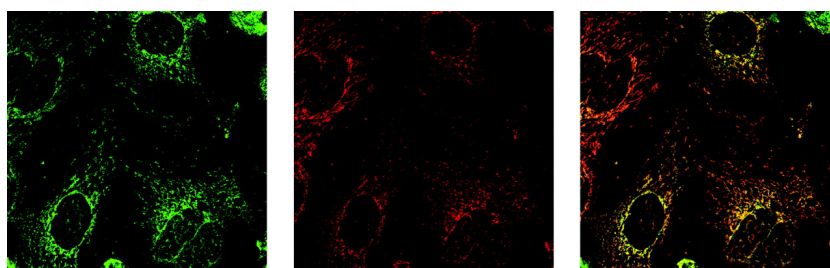


Figure 2.10 – Caco-2 cells incubated with a fluorescent analogue of **20** ($0.1 \mu\text{mol L}^{-1}$) and TMRM (20 nmol L^{-1}) at 37°C for 30 min. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) was carried out with excitation/emission set at 320/420 nm for **20** and 550/575 nm for TMRM. Left, green-fluorescent **20**; middle, red-fluorescent TMRM; right, overlay of the two images shows co-localization of **20** and TMRM.¹⁰⁷

Another class of peptides with a structure similar to the SS-peptides has been developed by the KELLEY laboratory. They are made of four to eight amino acids residues, with alternating alkyl and basic moieties, including nonstandard amino acids (for example, cyclohexylalanine) along with D-arginine to increase proteolytic stability. Figure 2.11 shows a mitochondria-penetrating peptide made of three parts: (a) a fluorophore to be able to track the molecule inside cells, (b) the mitochondria-targeting peptide made of eight amino acids and (c) the cargo, which is the molecule of interest.¹¹⁰ Due to their charge between +3 and +5, such compounds are taken up rapidly by mitochondria within cells. Their uptake is driven by the membrane potential, dependent on the balance between their molecular charge and hydrophobicity, as for TPP.

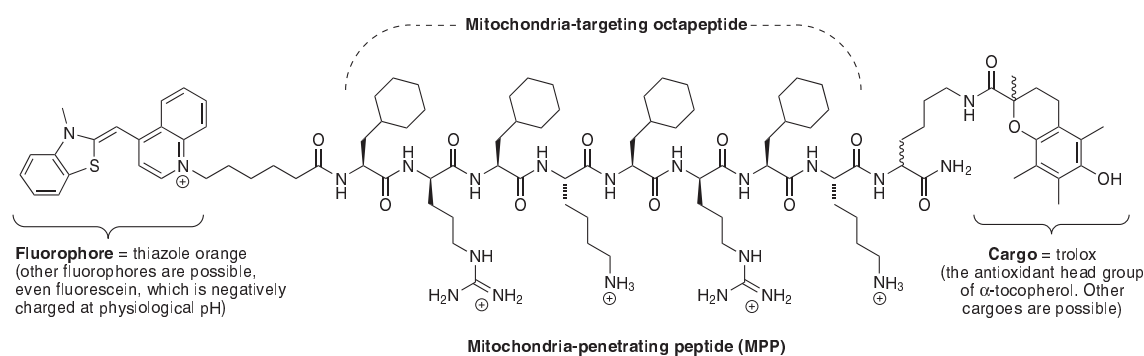


Figure 2.11 – Mitochondria-penetrating peptide from the KELLEY laboratory.⁹⁸

Here we selected two major ways to target mitochondria but many others have already been described in the literature.⁹⁷ In this chapter, we are particularly interested in metal complexes going to mitochondria.

2.2.4 Metal-carbonyl complexes going to mitochondria

As said in the first part, being able to target mitochondria is of great importance as this organelles generate most of the cell's energy and have various important roles in cell life and death and therefore a lot of probes have been developed for this purpose.

By chemical ligation in mitochondria

MitoTracker probes, containing a chloromethyl group have been described to specifically stain mitochondria.¹¹¹ This is due to the specific reaction of the chloromethyl moiety with thiols, that are known to be accumulated in mitochondria.^{112,113} Angelo AMOROSO *et al.* got inspiration from the structure of these probes to functionalize rhenium tricarbonyl bisimine complexes.¹¹⁴ These complexes are also well known to have luminescent properties with a large STOKES shift and long lifetimes, making them attractive candidates for biological imaging applications. The *fac*-3-chloromethylpyridine rhenium tricarbonyl bipyridyl complex (**21**, presented Figure 2.12) was chosen.

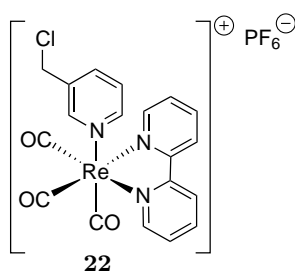


Figure 2.12 – Structure of complex **21**.

This complex showed a maximal absorbance at 364 nm, emission at 551 nm and a fluorescence lifetime of 131 ns. Confocal microscopy was performed: compound **21** was incubated in MCF-7 cells and was co-localized with TMRE (tetramethyl rhodamine methyl ester, Figure 2.13).

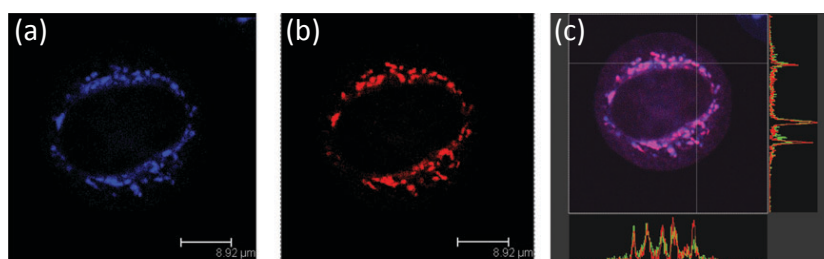
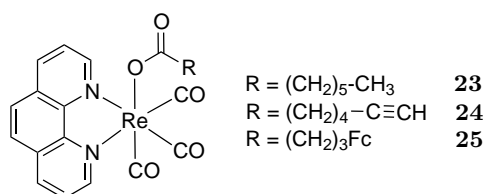


Figure 2.13 – Co-localization experiment in MCF-7 cells ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$). (a) Fluorescence microscopy of **21** (405 nm laser excitation), (b) TMRE (543 nm laser excitation), (c) Overlay with cross-sections of intensity (adapted from literature).¹¹⁴

The experiment showed good co-localization of compound **21** with TMRE and the cross-sections of intensity showed good agreement with the visual inspection. The accumulation of **21** in mitochondria is consistent with the reactivity of the chloromethyl moiety with thiols present in high concentration in this organelle.^{112,113}

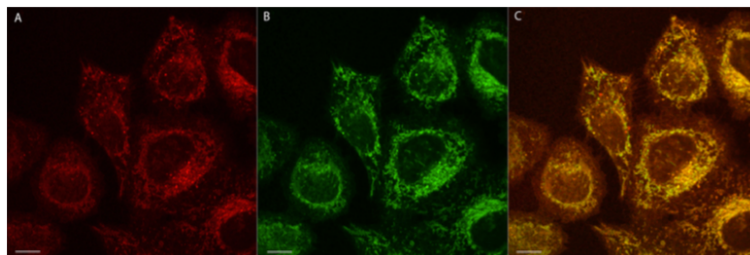
By ligand dissociation

Recently, Konrad KOWALSKI's group described the synthesis, the spectroscopic properties and the study in cellular environment of three rhenium complexes, presented in Figure 2.14.¹¹⁵

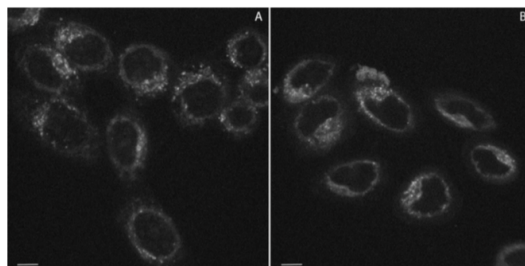
Figure 2.14 – Structure of the compounds. ¹¹⁵

As compound **25** bears a ferrocenyl moiety, it is not luminescent due to quenching mediated by the ferrocenyl moiety. ¹¹⁶ Complexes **23** and **24** display an orange luminescence, which is characteristic for the $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{phen})]$ unit, with an MLCT absorption band at 375 nm and an emission around 630 nm. ^{117,118}

Compounds **23**, **24** and **25** were tested *in vitro* in HeLa cells and their localization was probed by confocal microscopy bioimaging. The authors showed an accumulation of the probe in mitochondria, as confirmed by a co-localization study for **24** (Figure 2.15).

Figure 2.15 – HeLa cells incubated with **24** (200 nmol L^{-1} , 15 min). (A) Fluorescence of **24** (red), (B) Fluorescence of the Mito Tracker Green FM[®] (green), (C) Merged image of (A) and (B). Scale bar: 10 μm . ¹¹⁵

As expected, the localization of compound **23** was similar to **24**. They localized in mitochondria although they are not positively charged. The authors postulated a mechanism in which complexes **23** and **24** dissociate in the cell to form positively charged species able to reach mitochondria with a mechanism dependent on the membrane potential similar to what we described above for TPP and other lipophilic cations. To verify this hypothesis, they study the compound **25**, that is not fluorescent, in the same conditions and compared the fluorescence image to the images obtained for cells incubated with **23** (Figure 2.16).

Figure 2.16 – (A) Confocal luminescence image of living HeLa cells incubated with **23**. (B) Confocal luminescence image of living HeLa cells incubated with **25**. Scale bar: 10 μm . ¹¹⁵

A similar pattern with a punctuated accumulation around the nucleus was observed for **25** and **23**. As **25** is luminescent in the cell, it cannot be intact and the rhenium complex underwent a ligand dissociation in the cell, with a loss of the ferrocen quencher. As a result, complex *fac*-[Re(CO)₃(phen)⁺] is luminescent and targets mitochondria: the same mechanism probably happened for complexes **23** and **24**.

M(CO)₃ complexes for therapy

The development of metal-complexes going specifically to organelles can also be relevant for therapy. Zong-Wan MAO *et al.* recently described the synthesis of rhenium(I) tricarbonyl complexes as anticancer drug candidates: two mononuclear (**26** and **27**) and the two corresponding binuclear (**28** and **29**) rhenium complexes (Figure 2.17) bearing a phenanthroline (phen) or a 4,7-diphenyl-1,10 phenanthroline (DIP) ligand and they analyzed their accumulation in live cells.¹¹⁹

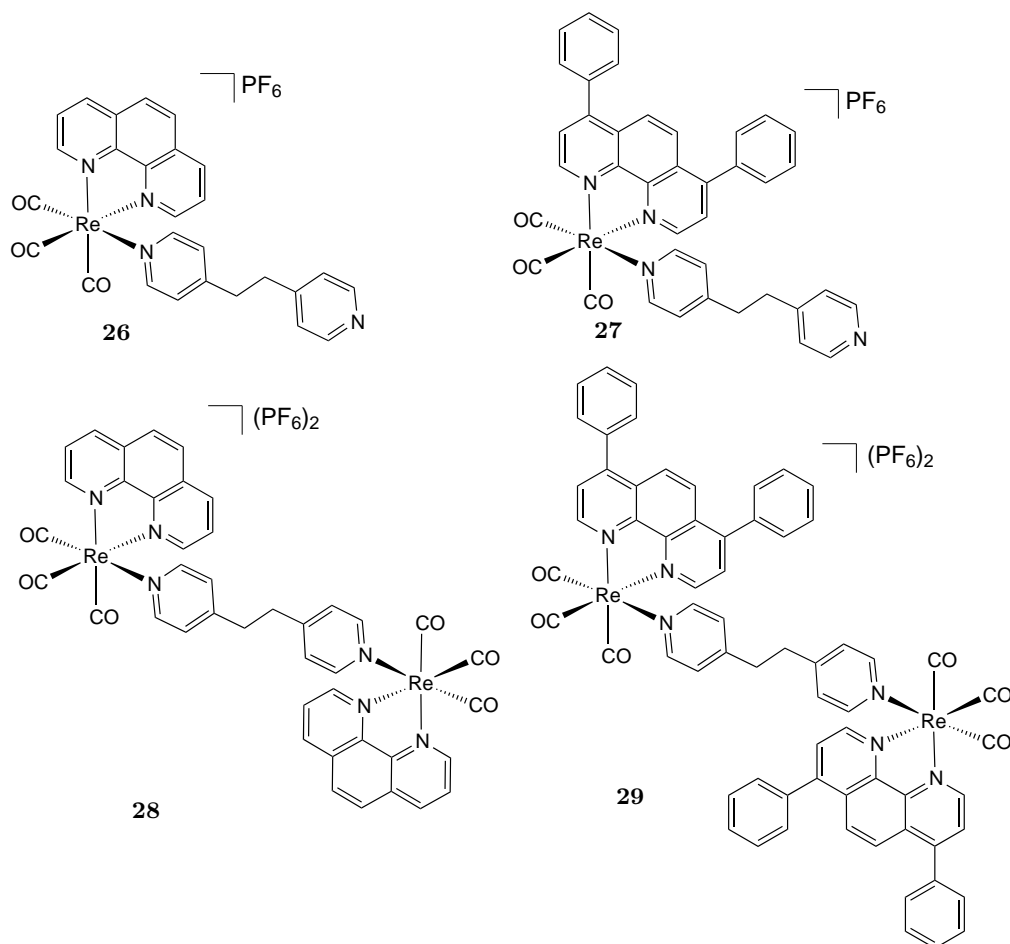


Figure 2.17 – Structures of the compounds **26-29**.¹¹⁹

The lipophilicity of the complexes affects their cellular uptake and localization. In this case, the uptake increases with the lipophilicity of bidentate ligands (with phen leading to a weaker penetration than DIP) and the dinuclear complexes are more lipophilic than

the corresponding mononuclear complexes. The accumulation of these complexes in the cells follows the order: **26** < **28** and **27** < **28**. Complexes with lower lipophilicity (**26** and **28**) were located in lysosomes and induce caspase-independent apoptosis whereas the ones with higher lipophilicity (**27** and **29**) accumulated specifically in mitochondria and were able to induce caspase-independent paraptosis in cancer cells. The co-localization images are shown in Figure 2.18.

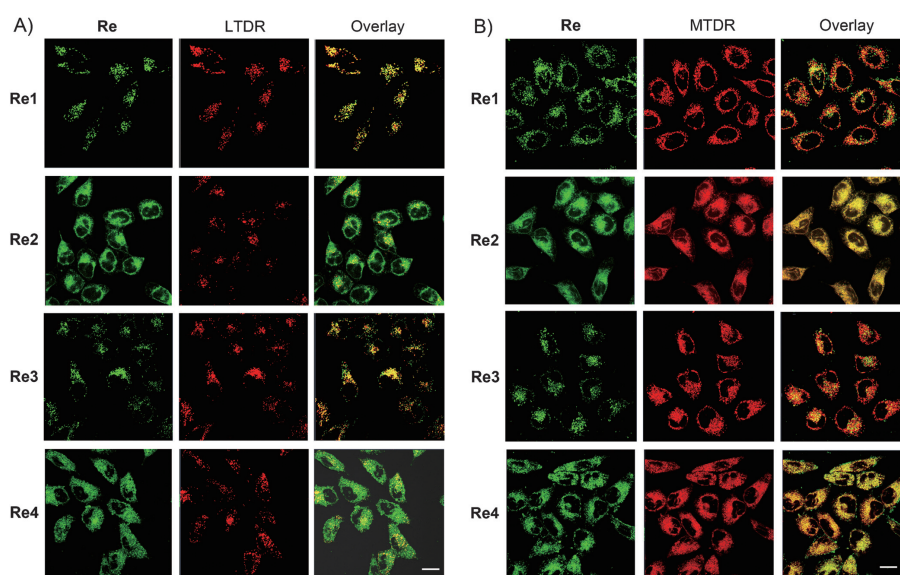


Figure 2.18 – (A) Confocal microscopy images of HeLa cells co-incubated with **26-29** (denoted Re1-Re4, $20 \mu\text{mol L}^{-1}$, 2 h) and LysoTracker LTDR (50 nmol L^{-1} , 0.5 h). (B) Confocal microscopy images of HeLa cells co-incubated with **26-29** ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$, 2 h) and MitoTracker MTDR (150 nmol L^{-1} , 0.5 h). Scale bar: $20 \mu\text{m}$.¹¹⁹

One characteristic behavior of rapidly growing cancer cells is the increased uptake of glucose, associated with their energy needs higher than normal cells and due to the over-expression of glucose transporters (written GLUTs).¹²⁰ Rhenium(I) glucose complexes such as **30** (Figure 2.19) have been synthesized and characterized in the group of Kenneth Kam-Wing LO,¹²¹ in order to monitor the glucose utilization in cancer cells.

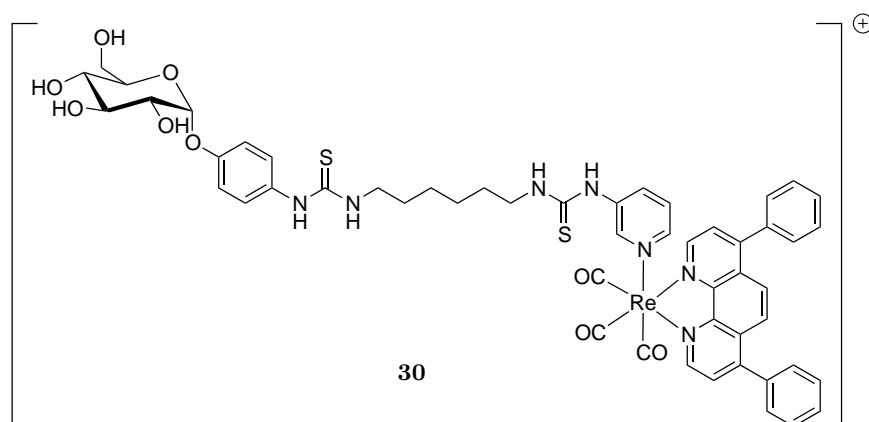


Figure 2.19 – Structure of compound **30**.¹²¹

Upon irradiation, complex **30** shows the characteristic MLCT band at 545-550 nm. The uptake of this complex by HeLa cells was shown to be inhibited by D-glucose and deoxyglucose, but not by L-glucose. The authors showed that **30** was internalized *via* a GLUT-mediated pathway. Co-staining experiments showed that **30** was localized in mitochondria of HeLa cells (Figure 2.20), which is due to its cationic and lipophilic structure.

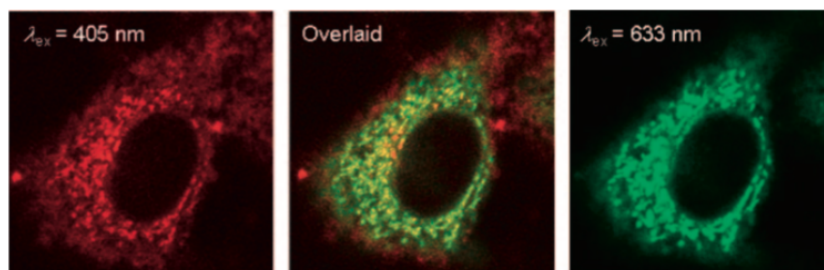


Figure 2.20 – Laser-scanning confocal microscopy images of a HeLa cell upon incubation successively with MitoTracker Deep Red FM (100 nmol L^{-1} , 20 min, $\lambda_{ex} = 633 \text{ nm}$) and complex **30** ($100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, 5 min, $\lambda_{ex} = 405 \text{ nm}$) in a glucose-free medium at $37 \text{ }^\circ\text{C}$.¹²¹

By modification of a nuclear-targeting moiety

We showed above that design of a metal complex targeting mitochondria according to the structure of the ligands is possible. Similarly, as we will delineate later, moieties can be designed to target the nucleus. It was observed that small modifications of a structure can unexpectedly alter their cellular localization: Roger ALBERTO's group described the conjugation of Doxorubicin (Dox), a chemotherapeutic agent known to accumulate in the cell nucleus, to two organometallic rhenium cyclopentadienyl (Cp) complexes, which resulted in a redirection of the molecule to the mitochondria.¹²² The metalloconjugates, denoted **31**, **32** and **33**, are presented in Figure 2.21.

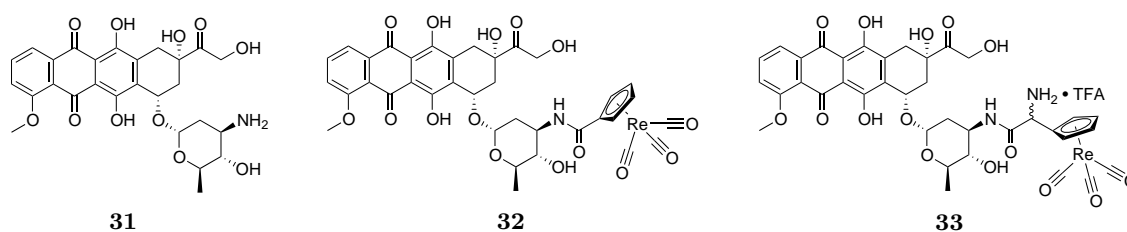


Figure 2.21 – Structures of Dox and conjugates.¹²²

These complexes were incubated with HeLa cells: while compound **31** accumulated in nuclei as expected, compounds **32** and **33** showed cytoplasmic staining only. Co-staining of both compounds with a MitoTracker exhibited a good overlay (Figure 2.22).

32 and **33** are lipophilic and **33** is protonated at physiological pH, which may explain the mitochondrial uptake as described previously. The authors showed that **32** selectively stained the mitochondrial membrane rather than its matrix, which suggests a lipophilic interaction with the membrane and is consistent with the fact that **32** is uncharged.¹²²

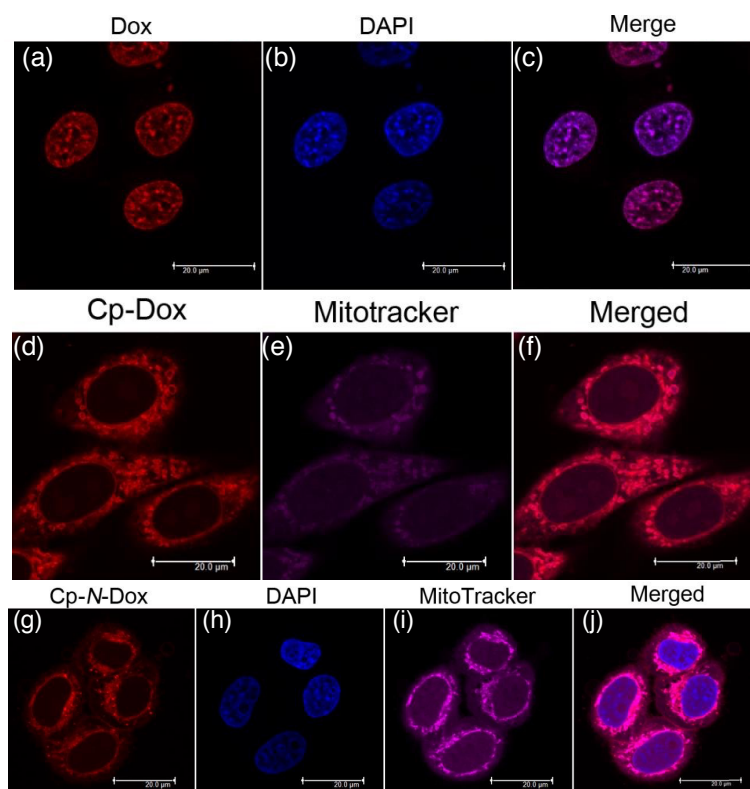
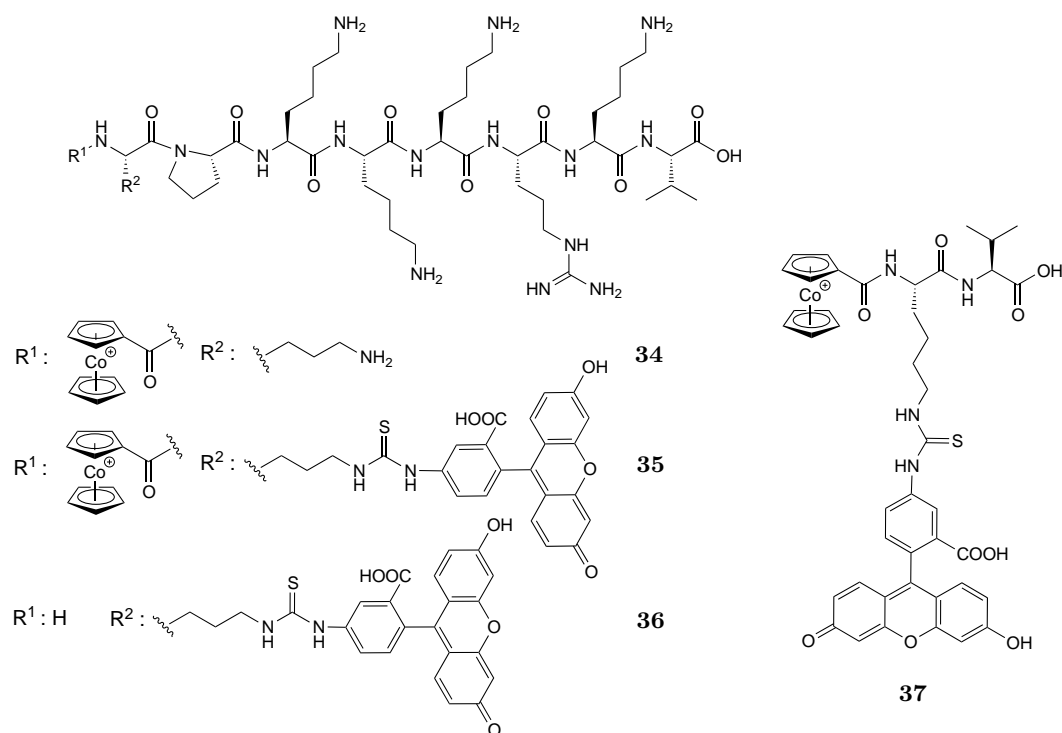


Figure 2.22 – Confocal fluorescence microscopy in HeLa cells after incubation of **31** ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$, 2 h) (a) Red: **31** fluorescence (ex. 488 nm, em. > 600 nm), (b) Blue: DAPI nucleus (DNA)-selective probe, (c) Merged image. Incubation of **32** ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$, 2 h) (d) Red: **32** fluorescence (ex. 488 nm, em. > 600 nm), (e) Magenta: MitoTracker[®] DeepRed FM (100 nmol L^{-1} , 45 min, ex. 644 nm, em. 665 nm), (f) Merged image. Incubation of **33** ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$, 2 h) (g) Red: **33** fluorescence (488 nm, em. > 600 nm), (h) Blue: DAPI, (i) Magenta: MitoTracker[®] DeepRed FM (100 nmol L^{-1} , 45 min, ex. 644 nm, em. 665 nm), (j) Merged image (adapted from literature).¹²²

2.3 Targeting the nucleus

The nucleus is the control center of the eukaryotic cell: it contains the genetic material and is responsible for the regulation of gene expression and other cellular processes through selective translocation of proteins between the nucleus and the cytoplasm. The interior of the nucleus contains the nucleolus, responsible for the assembly of ribosomes, and chromosomes, which carry heredity information and instructions for the development of the cell. They are organized into long structures called chromatin (when a cell is not dividing). The nucleus is highly protected by a three-membranes barrier: the cell membrane, the endosomal membrane and the nuclear membrane, which render the transport of compounds into the nucleus very difficult.¹²³ For instance, only 0.1 % of free plasmids from cytosol are able to translocate into the nucleus by crossing the nuclear membrane.¹²⁴ Targeting this highly protected organelle for imaging is a major challenge and transport across the nuclear membrane has been studied intensely, with a focus on mechanistic details.^{125,126}

Figure 2.25 – Compounds prepared and used in this study.¹²³

HepG2 cells incubated with **35** showed a weak fluorescence in the cytoplasm, but a very intense one in the nuclei (Figure 2.26(A)). Figure 2.26(B) shows the localization of the endosomes using an endosome marker and (C) the nucleus using Hoechst 3342. Figure 2.26(D) and (E) are merged images. Compound **35** is co-localized with the endosome marker, which suggests an entry mechanism by endocytosis. The conjugated complex then accumulates in the nucleus after its release in the cytoplasm from the endosomes. Figure 2.26(F-G) shows that the compound **36** is trapped in endosomes and is hardly released in the cytoplasm. Therefore a weak fluorescence is recorded in the cytoplasm, and with a more intense signal in the nucleus. Figure 2.26(H-I) shows that compound **37** seems to enter the cells, probably by passive diffusion, but it is not able to reach the nucleus.

For the three compounds, it seems that they attach to the cell surface, which is the first step in cell uptake for cationic cell penetrating peptides (CPP). The membrane is a strong barrier for compound **37** while compound **36** cannot escape from the endosomes. Nuclear delivery using NLS is efficient from the cytoplasm. Therefore, the release of the compounds from the endosomes is necessary for the translocation of NLS bioconjugate into the nucleus. In this example, the organometallic moiety is thus essential for the release of the conjugate into the cytoplasm and for the NLS being active for the nuclear penetration.

NLSs promote active transport through the nuclear pore complex, but as they must reach the cytoplasm to access the nuclear import machinery, their use does not guarantee nuclear uptake. This example shows that if the NLS conjugates are taken up into cells by endocytosis, they could be trapped in endosomes.

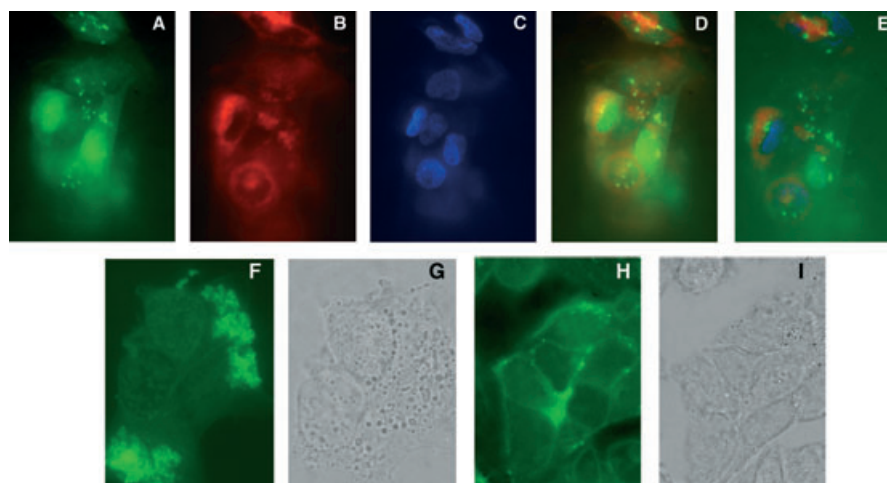


Figure 2.26 – Localization of the fluorescent-labeled cobaltocenium-NLS **35** in living HepG2 cells (A-E) and distribution of conjugates **36** and **37** in living HepG2 cells (F-I). HepG2 cells were incubated with bioconjugates **35-37** (1 mmol L^{-1}), Hoechst 3342 dye (25 mg mL^{-1} , 5 min) and with the endosomal marker FM 4-64 ($10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, 15 min). (A) Bioconjugate **35** in unfixed cells (green fluorescence), (B) FM 4-64 in unfixed cells (red fluorescence), (C) Nuclear staining by Hoechst 3342 dye (blue fluorescence), (D) Co-localization of bioconjugate **35** and FM 4-64 (merged images (A) and (B)), (E) Co-localization of bioconjugate **35**, FM 4-64, and Hoechst 33342 dye (merged images (A), (B), and (C)), (F) Conjugate **36** in unfixed HepG2 cells, (G) Light microscopy image of cells in (F), (H) Conjugate **37** in unfixed HepG2 cells, (I) Light microscopy image of cells in (H).¹²³

Jacqueline K. BARTON's group is interested in the use of metal complexes in cells. They have described the targeting of a ruthenium complex to the nucleus with shorter peptides.¹³⁰ They have already delivered complexes to nucleus with covalent attachment to D-octaarginine, which allowed a better uptake and nuclear localization.^{131,132} Without the peptide, these compounds localized in the cytoplasm. But the positive charge (+8) increases the nonspecific DNA binding due to electrostatic association, which limits the activity of this chemotherapeutic agent.

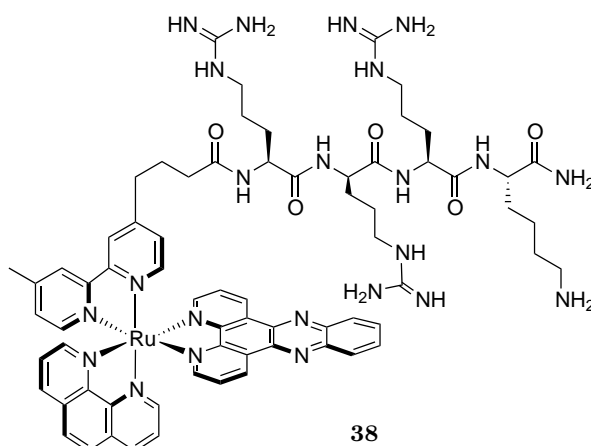


Figure 2.27 – Structure of the conjugated ruthenium complex **38**.¹³⁰

To tackle this issue, they have grafted a luminescent ruthenium complex Ru(phen)(bpy')

(dppz)²⁺ to peptides of shorter sequence and lower charge. For example, the tetrapeptide RrRK (r = D-arginine) facilitates nuclear localization of the ruthenium complex above a threshold concentration, although the threshold is higher for Ru-RrRK (**38**, Figure 2.27) than for Ru-D-r8.

HeLa cells were incubated for 2 h with compound **38** at incubation concentrations ranging from 5 (only punctate cytoplasmic luminescence but no staining of the nucleus) to 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (nucleus stained in 74% of cells, Figure 2.28).

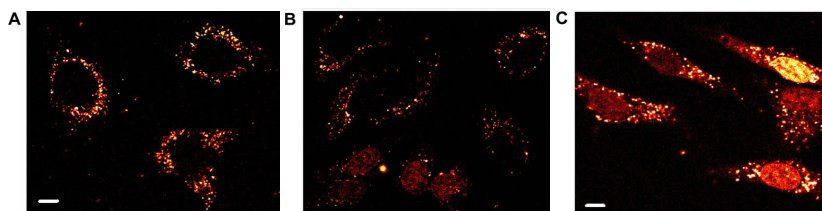


Figure 2.28 – Subcellular distribution of **38**. HeLa were incubated with (A) 20, (B) 40, or (C) 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of **38** in complete medium for 2 h. Scale bar: 10 μm .¹³⁰

The experiments showed that the complex reached the nucleus only at high incubation concentrations.

2.3.2 Conjugation to nucleic acid binding group

Targeting metal complexes to the nucleus can be achieved by introducing a nucleic acid binding groups. These groups can be either coordinated to the metal (extended planar diimine ligand),^{133–136} or linked to the metal *via* a spacer.^{137–140} The four complexes presented in Figure 2.29 contain an extended planar ligand: anthracene (**39**), pyrene (**40**) or acridine (**41** and **42**). The planar ligands were shown to intercalate into DNA.^{137–140}

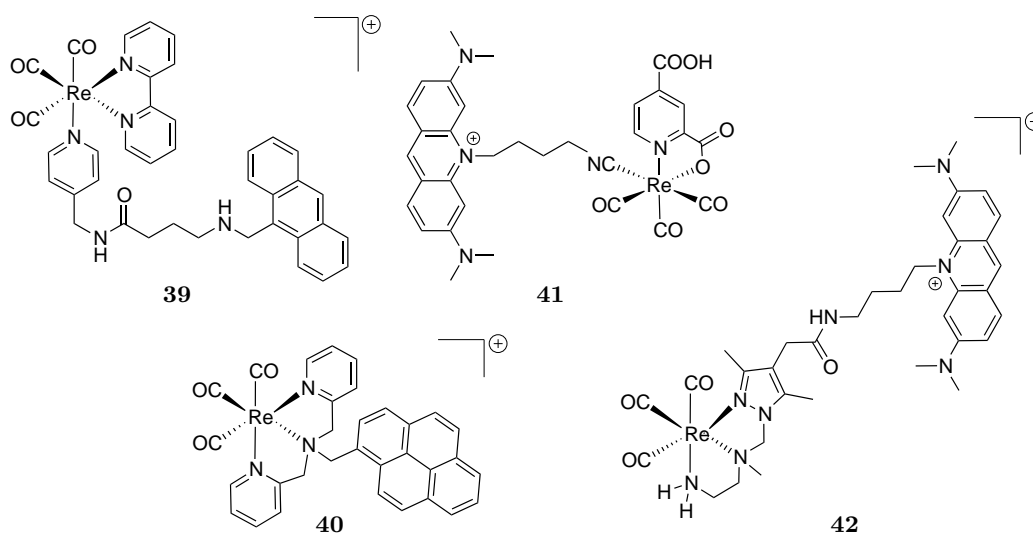


Figure 2.29 – Structure of four complexes bearing an extended planar ligand.^{137–140}

Peptide nucleic acid (PNA) is a neutral DNA mimic,¹⁴¹ which exhibits in general

stronger and more selective affinity for complementary nuclei acid (DNA and RNA) strands than natural nucleic acids because of its neutral chain.¹⁴² LICANDRO *et al.* have used PNA to design a luminescent dinuclear rhenium(I) complex that stains nuclei.¹⁴³ The complex **43**, presented in Figure 2.30, has been synthesized by a solid-phase synthetic methodology using standard Boc-procedure conditions.

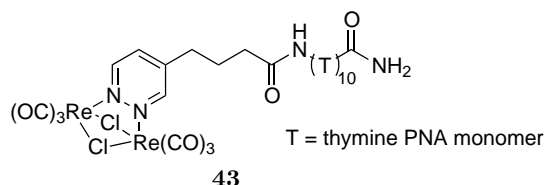


Figure 2.30 – Structure of complex **43**, a dinuclear rhenium(I) tricarbonyl complex-PNA conjugate.¹⁴³

The authors investigated the ability of **43** to penetrate cells. After incubation of **43** ($3 \mu\text{mol L}^{-1}$, 10 min), live cells were imaged using two photons excitation at 770 nm and the luminescence of the complex was determined through 485/30 and 600/40 band filters (Figure 2.31).

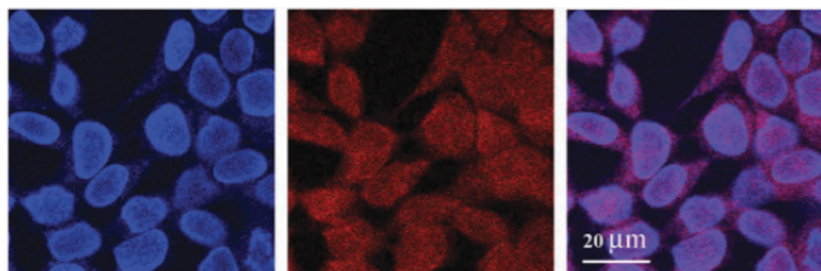
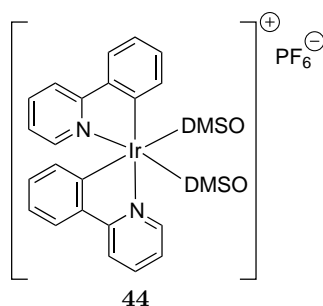
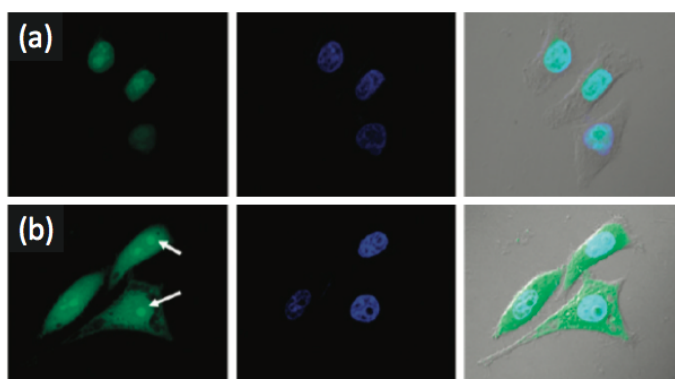


Figure 2.31 – Images of HEK-293 cells incubated with **43**, recorded 10 min after the addition of the complex, through a 485/30 (left) and a 600/40 (center) band pass filter and their superimposition (right).¹⁴³

A whole-cell staining was observed with a blueshifted emission in the nucleus with respect to that in the cytoplasm, which was explained by the more hydrophobic character of the nucleus or the reduced mobility of the Re complex.¹⁴³

2.3.3 Imaging of nucleus by a turn-on luminescent complex

A few years ago, LI *et al.* described the synthesis and the penetration of a non-emissive cyclometalated iridium(III) solvent complex (**44**, Figure 2.32).¹⁴⁴ This complex displays a selective turn-on luminescence in living cells nuclei, by reacting with histidine and histidine-rich proteins that are mainly found in the cell nucleus (Figure 2.33(a)). The staining observed here is not to intercalation into DNA but to a reaction of the compound **44** with histidine to form a luminescent emissive product in the nucleus. Although a high degree of specificity was observed for cells nuclei, the authors wondered if **44** accumulated in cells or if it was homogeneously distributed in cells but showed only high luminescence in nuclei.

Figure 2.32 – Structure of the complex **44**.¹⁴⁴Figure 2.33 – Confocal luminescence images of (a) living HeLa cells incubated with **44** in DMSO/PBS 1:99, v:v ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$, 10 min, 37°C) and then further incubated with Hoechst 33258. (b) Fixed HeLa cells stained with **44** and Hoechst 33258 under the same conditions. Arrows point to the nucleolus of HeLa cells (adapted from literature).¹⁴⁴

To address this question, they determined the amounts of iridium by ICP-AEC measurements in the cytoplasm and in the nucleus. They showed an accumulation in the nucleus.

Moreover, this complex displays an exclusive nuclear staining of living cells over fixed cells: when HeLa cells were first fixed and then incubated with **44**, an homogeneously distribution of **44** was observed (Figure 2.33(b)). This observation can be explained by the fact that when the cells are fixed, both the plasma and the nuclear membranes are permeable to **44**. Therefore, **44** is evenly distributed and converted into its luminescent form in the whole cell.

The very short staining time (< 6 min), the low toxicity and the high amount of complex in the nucleus promise potential applications of **44**.

2.4 Targeting of the endoplasmic reticulum

The endoplasmic reticulum (ER) is present in all eukaryotic cells and represents more than half of the total membrane of an animal cell.¹⁴⁵ The ER constitutes a network made of branching tubules and flattened sacs that are interconnected. In most cell, the ER and the outer nuclear membrane form a continuous sheet enclosing the so-called ER lumen (or cisternal space, Figure 2.34).¹⁴⁶

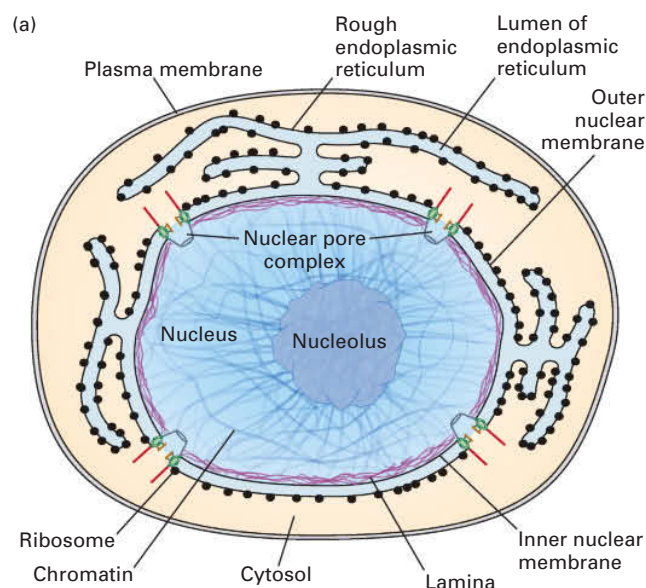


Figure 2.34 – Structure of a cell nucleus and the connection of the outer nuclear membrane with the rough ER.¹⁴⁶

The ER membrane is essential for the synthesis of transmembrane proteins and lipids for cell organelles such as the GOLGI apparatus, lysosomes, endosomes, secretory vesicles, and the plasma membrane.¹⁴⁷ The endoplasmic reticulum is divided into two main parts: the smooth ER (not granular), responsible for the synthesis of fatty acids and phospholipids, and the rough ER (granular), which is coated by membrane-bound ribosomes, responsible for the synthesis of proteins translocated into the ER.¹⁴⁸ Several minutes after the proteins production in the rough ER, most of them leave the organelle within small membrane-bounded transport vesicles.¹⁴⁷ As the membrane of the ER is lipophilic, lipophilic ligands bearing a positive charge are required to target this organelle.

In order to deliver small molecules to the ER, Blake R. PETERSON's group published the synthesis and the penetration study of analogues of the fluorophore rhodol, that accumulates in the ER of mammalian cells.¹⁴⁹ For example, the compound **45** was obtained by adding fluorine atoms at the 2' and 7'-positions to get photophysical properties compatible with cellular studies (abs.512 nm, em. 532 nm, $\Phi = 0,85$), and the polar carboxylate and amine of rhodol were exchanged with a methyl group and dimethylmethoxy group, respectively, to favor association with cellular membranes (Figure 2.35).

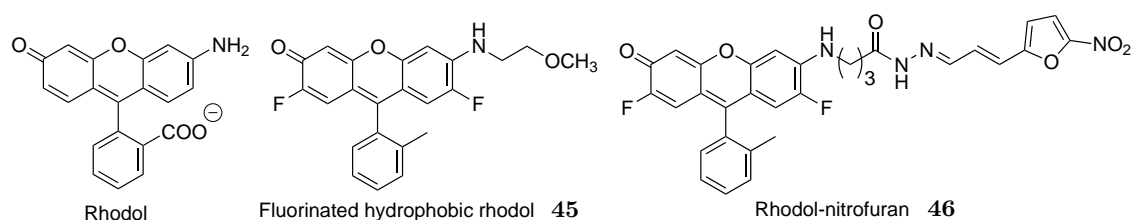


Figure 2.35 – Structures of the rhodol and derivatives **45** and **46**.¹⁴⁹

As classically observed for rhodol derivatives,¹⁵⁰ compound **45** was shown to be fluorescent, so it could be used for imaging studies. The subcellular distribution of compounds **45** and **46** was studied in HeLa cells by confocal laser scanning microscopy. Figure 2.36 shows the accumulation of **45** and **46** in tubular structures, which were identified as the ER by co-localization with the commercially available organelle marker ER-TrackerTM Blue-White (Figure 2.36).

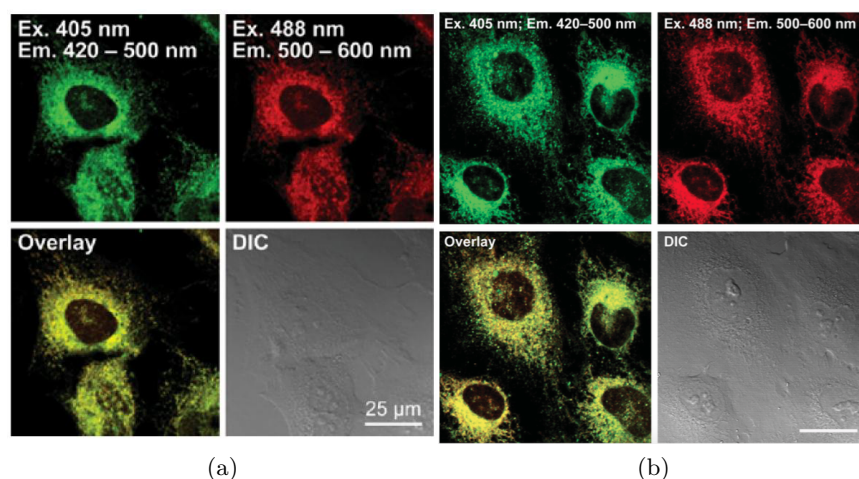


Figure 2.36 – Confocal laser scanning and differential interference contrast (DIC) micrographs of living HeLa cells treated with ER-TrackerTM Blue-White DPX ($0.1 \mu\text{mol L}^{-1}$, 0.5 h) and (a) **45** or (b) **46** ($0.5 \mu\text{mol L}^{-1}$, 0.5 h). For both compounds overlay is shown in yellow.¹⁴⁹

More recently, Nils METZLER-NOLTE's group developed a novel series of Re(I) complexes based on tridentate phenanthridinyl-containing ligands (**47**, **48** and **49**, presented in Figure 2.37).¹⁵¹

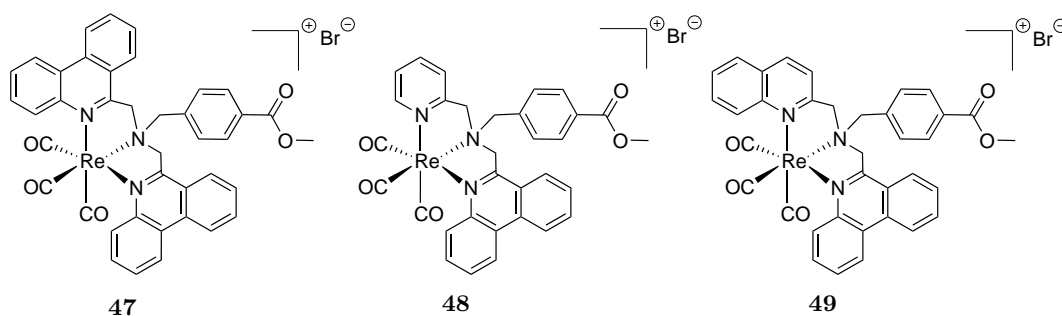


Figure 2.37 – Novel rhenium tricarbonyl complexes **47-49**.¹⁵¹

These ligands were chosen because the complexes exhibit interesting characteristics for imaging applications: the π -system of phen gives MLCT or ILCT transitions. Moreover, they can be conjugated to biologically active molecules or drug by hydrolysis of the ester function, which is of great interest for tracing. An accumulation of complexes **47** and **49** around the nucleus was observed. Co-localization studies with commercially organelle stains confirmed their localization within the endoplasmic reticulum (ER), as the degree of co-localization was higher with the ER stain than with GOLGI and mitochondria trackers (Figure 2.38).

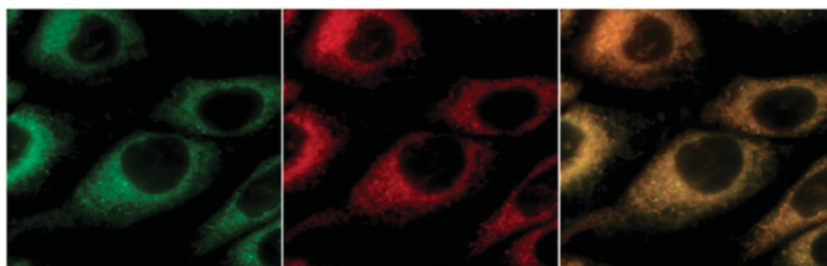


Figure 2.38 – Co-localization experiments with **49** on IMIM-PC2 cells, 600 × magnification. Left: **49**, middle: commercial ER stain ER-ID red, and right: merged image.¹⁵¹

This co-localization experiment has been performed for IMIM-PCS, PT45, MCF-7, HT29 and Hep G2 cell lines, which showed that the selectivity for ER was not specific of a cell line (Figure 2.39).

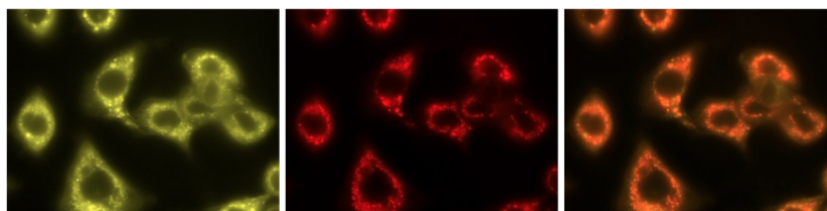


Figure 2.39 – MCF-7 cells (600× magnification) incubated with **47** ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$, 5 h, 37 °C) and ER-ID red. Left: luminescence of **47**, middle: commercial stain ER-ID red, right: merged image.¹⁵¹

Last year, Shaikh M. MOBIN's group published the synthesis of a fluorescent Pd(II) complex as an endoplasmic reticulum tracker in live cells, denoted **50**, whose structure is presented in Figure 2.40.¹⁵²

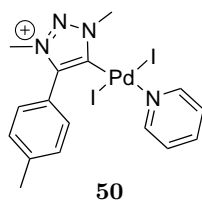


Figure 2.40 – Structure of compound **50**.¹⁵²

Complex **50** was shown to be highly fluorescent, leading the authors to explore its role in live cells. As the complex showed no toxicity, HeLa cells were incubated in the presence of **50** and co-staining with commercially available red fluorescent organelles trackers (ER-tracker Red for endoplasmic reticulum, MitiTracker Red CMXRos for mitochondria and LysoTracker Red DND99 for lysosome) was performed. The results are presented in Figure 2.41

The co-localization experiment indicated that **50** had the best PEARSON's coefficient with ER-tracker Red, with a value of 0.75, but only 0.44 and 0.49 for mitochondria and lysosome, respectively. This demonstrates that **50** is accumulated in the endoplasmic reticulum.

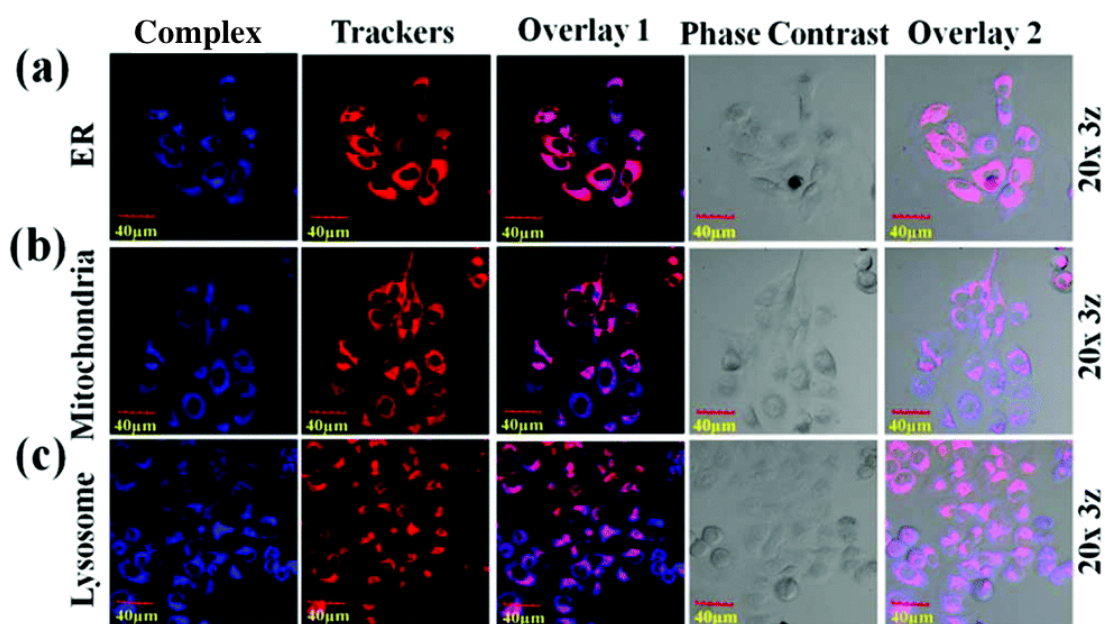


Figure 2.41 – Co-incubation of HeLa cells with **50** ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$, ex. 405 nm, em. 415-470 nm) and organelles trackers. (a) ER-Tracker Red for Endoplasmic Reticulum ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$), (b) MitoTracker Red CMXRos (80 nmol L^{-1}) for mitochondria, (c) LysoTracker Red DND-99 (100 nmol L^{-1}) for lysosomes. From left to right: **50**, organelles trackers, phase contrast, overlay 1 (**50** and trackers), overlay 2 (phase contrast and overlay 1). Scale bar: $40 \mu\text{m}$.¹⁵²

2.5 Targeting of the Golgi apparatus

The GOLGI apparatus was discovered in 1898 by Camillo GOLGI.¹⁵³ The GOLGI apparatus is a phospholipid membrane-based organelle found in most eukaryotic cells, which is made up of flattened compartments consisting of three defined regions: the *cis*, the medial and the *trans* GOLGI network (Figure 2.42).

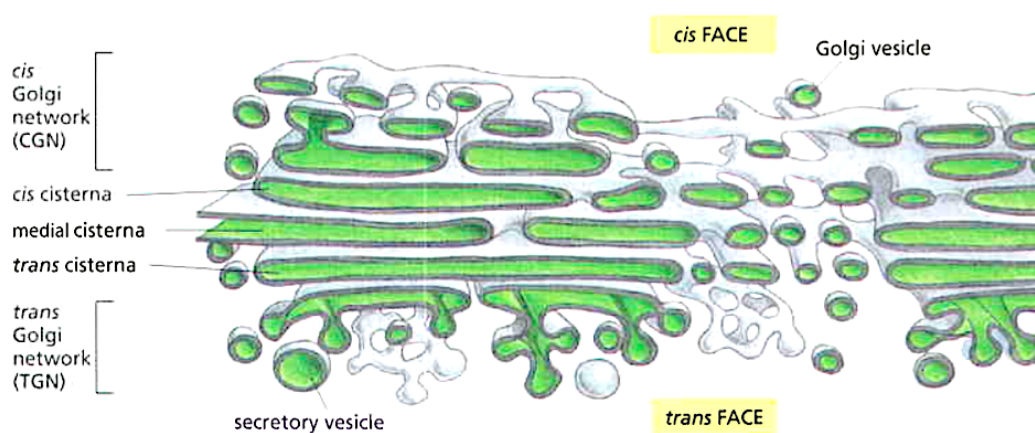


Figure 2.42 – Three-dimensional reconstruction from electron micrographs of the GOLGI apparatus in a secretory animal cell.¹⁴⁵

The GOLGI apparatus, located near the nucleus in many cells, is known as a "post office" in live cells. Its role is to collect and modify proteins and lipids from the endoplasmic reticulum to transport them to other organelles.¹⁵⁴ Transfer vesicles from the rough endoplasmic reticulum fuse with the *cis* GOLGI network to give a collection of flattened membrane-enclosed disks known as *cisternae* (or dictyosomes).¹⁵⁵ These *cisternae* progress from the medial to the *trans* compartment. After proteins modifications in the GOLGI apparatus, which process oligosaccharide side chains on newly synthesized glycoproteins and glycolipids,¹⁵⁶ they are packaged into vesicles and transported out of the complex destined for the plasma membrane or for lysosomes.¹⁴⁶ GOLGI apparatus targeting metal complexes are scarce in the literature. It seems that no specific strategy has been developed yet to target this organelle and their discovery is serendipitous.

A Re(I) tricarbonyl complex targeting the GOLGI apparatus has already been described in our group.⁴⁸ A C12 chain was grafted to the triazole ring to improve the cellular uptake of the SCoMPI (compound **2**), as presented in Chapter 1.

In 2012, the WONG research group designed an amphiphilic water-soluble cationic porphyrin conjugated cyclen-based ytterbium complex **51** that selectively targets the GOLGI apparatus (Figure 2.43).¹⁵⁷

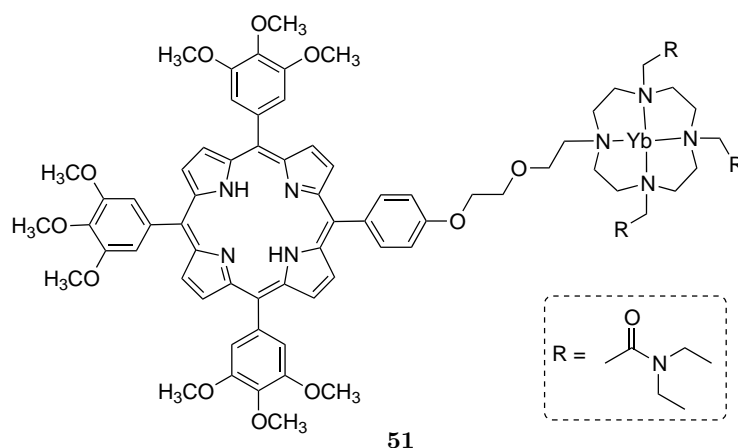


Figure 2.43 – Structure of complex **51**.¹⁵⁷

Upon photoexcitation at 430 nm, this complex displays a strong red ($\lambda_{em} = 657$ nm) and a near-infrared ($\lambda_{em} = 720$ nm) emission band and its one- and two-photon induced emission spectra are almost identical. **51** has a two-photon absorption cross-section value of 82 GM^1 . Co-localization of **51** with green emission of commercially available GOLGI trackers shows the co-staining of **51** and the commercial GOLGI marker, as demonstrated in Figure 2.44.

This complex is particularly interesting as a two-photon molecular probe, as most of the commercially available trackers work under UV-Vis excitation. The major drawback of UV irradiation is the low light penetration depth in tissues.^{158,159}

1. $1 \text{ GM (GOEPPERT-MAYER unit)} = 10^{-50} \text{ cm}^4 \cdot \text{s} \cdot \text{photon}^{-1} \cdot \text{molecule}^{-1}$

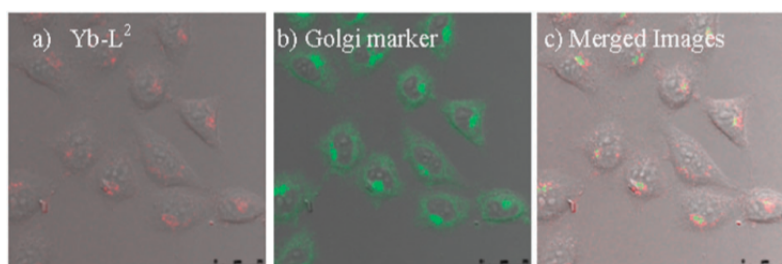


Figure 2.44 – (a) Linear confocal microscopy images of the red emission from **51** (10 mmol L^{-1} , $\lambda_{\text{ex}} = 430 \text{ nm}$, 30 min) in HeLa cells, (b) Green GOLGI marker (1 mmol L^{-1} , $\lambda_{\text{ex}} = 457 \text{ nm}$, 3 min) in HeLa cells, (c) Merged image.¹⁵⁷

The same year, WONG and coworkers synthesized a new heteroleptic iridium(III) complex (**53** with low toxicity, a near-infrared excitation and a large two-photon absorption cross section (350 GM , Figure 2.45).¹⁶⁰

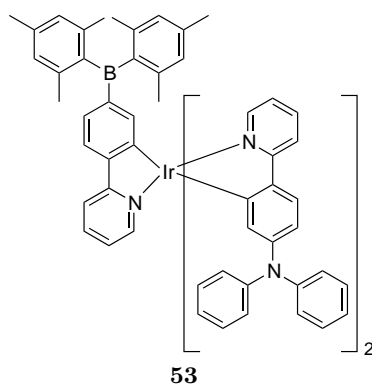


Figure 2.45 – Structure of complex **53**.

Complex **53** showed a strong two-photon induced emission and was specifically localized in the GOLGI apparatus of carcinoma cell lines with low cytotoxicity. After 20 min of dosage time, under excitation at 700 nm a strong green emission was observed in the GOLGI apparatus of the HeLa and A549 cells (Figure 2.46). This localization was confirmed by a co-staining with a commercial GOLGI marker (Alexa Fluor 647 conjugates of HPA, 1 mg mL^{-1}).

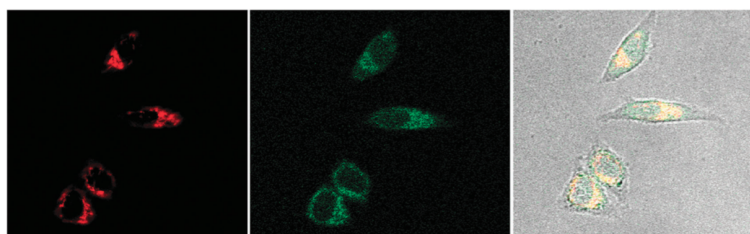


Figure 2.46 – (a) GOLGI marker Alexa Fluor 647 conjugates of HPA (Invitrogen L32452) ($\lambda_{\text{ex}} = 647 \text{ nm}$, band pass filter = 650-750 nm, 10 min) in HeLa cells, (b) Two-photon confocal microscopy images of complex **53** ($\lambda_{\text{ex}} = 700 \text{ nm}$, for excitation: long pass emission intensity varies with the titration of a certain amount of HSA wavelength filter $> 710 \text{ nm}$, for emission: band pass filter = 500-640 nm), (c) Merged image (concentration $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).¹⁶⁰

Another way to target the GOLGI apparatus is the conjugation of a biomolecule to biotin. Such modifications are frequent since interactions between biotin and avidin are strong and rapid.¹⁶¹ Kenneth Kam-Wing LO describes the synthesis of a rhenium(I) complex containing a biotin unit and an isothiocyanate moiety, which was reacted with ethylamine to give a thiourea complex (**54**, Figure 2.47).¹⁶²

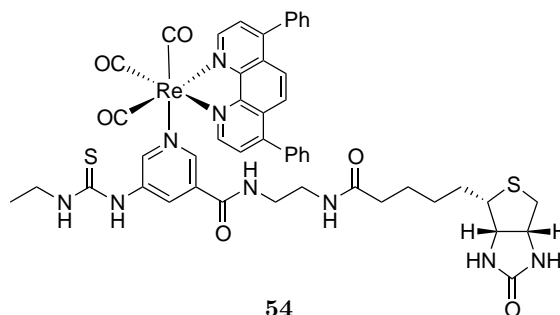


Figure 2.47 – Structure of complex **54**.¹⁶²

Fluorescence microscopy revealed that **54** was localized in the GOLGI apparatus (Figure 2.48).¹⁶²

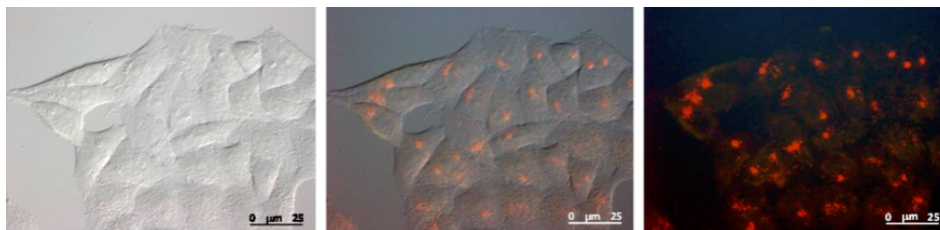


Figure 2.48 – (left) Bright-field microscopy, (middle) Overlay, (right) Fluorescence microscopy images of HeLa cells incubated with complex **54** ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$, 24 h). Scale bar: 25 μm .¹⁶²

The development of probes are of great interest for the staining of GOLGI apparatus, but also to monitor dynamic vesicle trafficking. The group of ZHANG recently reported a novel approach based on metal-induced coordination between the phosphate anions of phospholipids and the metal center of a luminescent complex, which can monitor vesicle trafficking pathways from the GOLGI apparatus to the lysosomes in living cells.¹⁵⁴ This strategy is presented in Figure 2.49.

The authors replaced the divalent Zn^{2+} ion in a neutral Zn-salen complex² which targets the endoplasmic reticulum with the trivalent Al^{3+} cation, which gives a cationic Al-salen complex, called AIL. This complex exhibits a high affinity to negatively charged phospholipids with a binding constant up to 1.2×10^6 .

In order to investigate the localization of AIL, the complex was co-incubated with Hoechst 33342, pECFP-Golgi, and LysoTrackerTM Deep Red, which are markers for the nucleus, GOLGI apparatus and lysosomes, respectively (Figure 2.50).

2. salen = *N,N*-bis(2-hydroxy-4-(pyrrolidin-1-yl)benzylidene)-1,2-dicyano-1,2-ethenediamine

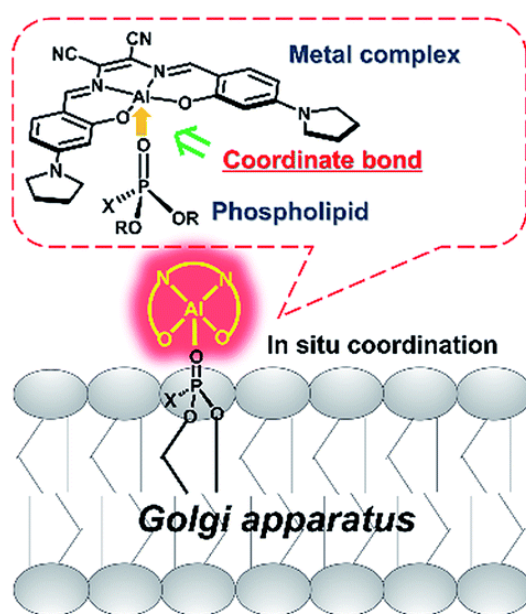


Figure 2.49 – Schematic illustration of the coordination bond strategy: *in situ* coordination of an endogenous lipid to a metal complex.¹⁵⁴

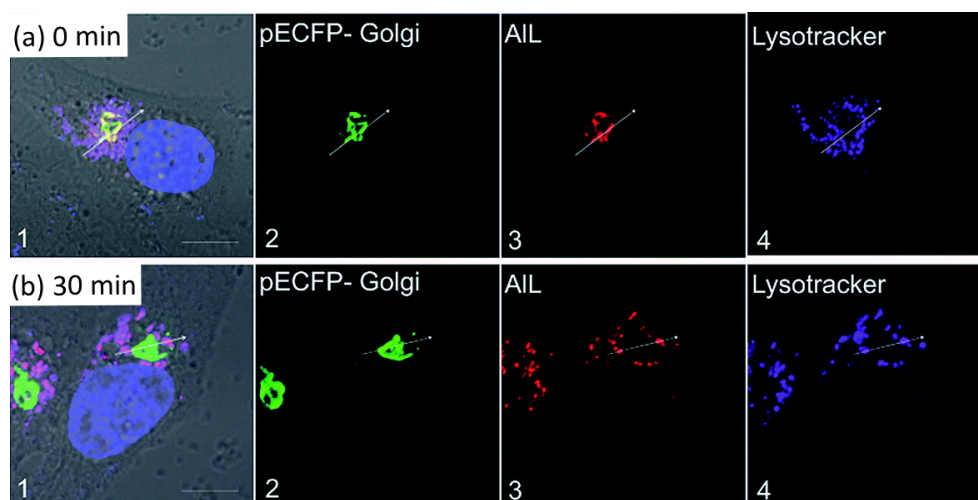


Figure 2.50 – Co-localization of AIL (red) with pECFP-Golgi (green) and LysoTrackerTM Deep Red (purple) in HeLa cells. The nucleus was stained with Hoechst 33342 (blue). HeLa cells were incubated with $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ of AIL for 5 min and monitored by confocal imaging (adapted from literature).¹⁵⁴

These results show that AIL was initially located in the GOLGI apparatus. After AIL diffused into the cells, it was driven to the GOLGI apparatus along microtubules through vesicle trafficking. After 30 min of incubation, AIL coordinated to negatively mono-charged phospholipids moved to lysosomes *via* membrane vesicle trafficking. In addition, AIL has a large two-photon absorption cross section ($\approx 180 \text{ GM}$) at 840 nm, it can also be used as a two-photon bioprobe.

2.6 Conclusion

In this chapter, we reviewed many examples of metal complexes that are able to target specific organelles in order to deliver therapeutic or imaging agents. The knowledge of the mechanisms involved in the penetration is of great importance because by modulating the structure of the ligands or adding biomolecules, complexes can easily be directed to the target (Figure 2.51). This domain has gain more and more attention in recent years.

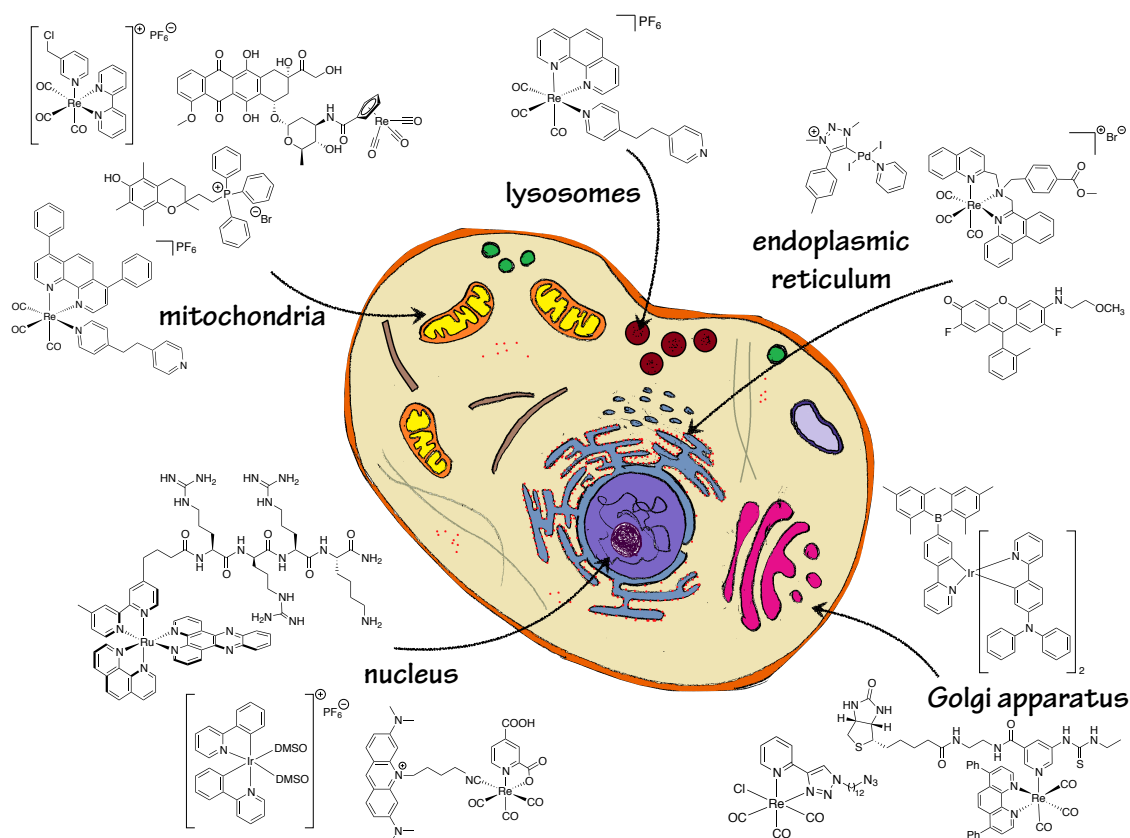


Figure 2.51 – Molecules going to organelles in cells.

The complexes described in this chapter are very often luminescent and are thus detected by fluorescence imaging. But as they are metal-complexes, they could be detected by X-ray fluorescence. In our group, we aim to develop such complexes with the same $\text{Re}(\text{CO})_3$ core but with various ligands going to specific organelles, in order to build a library of multimodal probes detectable by fluorescence, infrared and X-ray fluorescence imaging.

Chapitre 3

Marquage de l'acide hyaluronique par une sonde Re-tricarbonyle et étude de la pénétration percutanée par imagerie multimodale dans la peau humaine

3.1 Introduction

3.1.1 L'acide hyaluronique et ses applications

L'acide hyaluronique est un polymère de dissacharides d'acide D-glucuronique et de D-N-acétylglucosamine liés par des liaisons glycosidiques β -1,4 et β -1,3 alternées,¹⁶³ avec des masses molaires pouvant atteindre 10^7 Da (FIGURE 3.1).

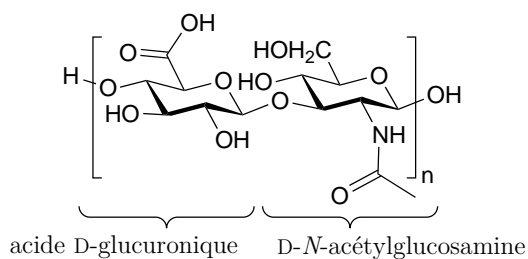


FIGURE 3.1 – Structure de l'acide hyaluronique.

L'acide hyaluronique est naturellement présent dans les tissus et fluides de presque tous les organismes vivants.¹⁶⁴ Très hydrophile, cette molécule est capable d'absorber jusqu'à mille fois son volume en eau¹⁶⁵ et est par conséquent très utilisée en médecine pour maintenir les taux d'hydratation des tissus. Tout d'abord, l'acide hyaluronique peut être utilisé en injection pour le traitement de l'arthrose, maladie dégénérative du cartilage et de l'os qui entraîne douleurs et raideur dans les articulations, et de la polyarthrite rhumatoïde, qui est une maladie inflammatoire chronique dans laquelle la douleur dans les articulations est accompagnée de changements dégénératifs de certains organes, tels que les poumons, le cœur ou encore des vaisseaux sanguins.¹⁶⁶ Les acides hyaluroniques de haute masse molaire peuvent également être utilisés comme

agents comblants par injection transcutanée¹⁶⁵ : des gels à base d'acide hyaluronique, très élastiques, se sont révélés plus efficaces que des produits à base de collagène.¹⁶⁶ Les acides hyaluroniques de plus faible masse molaire ne sont utilisés que pour l'hydratation de l'épiderme après une application topique. En application topique, l'acide hyaluronique est considéré comme un produit cosmétique, d'après la définition donnée par la directive 76/768/CEE : "On entend par produit cosmétique toute substance ou préparation destinée à être mise en contact avec les diverses parties superficielles du corps humain (épiderme, systèmes pileux et capillaire, ongles, lèvres et organes génitaux externes) ou avec les dents et les muqueuses buccales, en vue exclusivement ou principalement de les nettoyer, de les parfumer et de les protéger afin de les maintenir en bon état, d'en modifier l'aspect ou de corriger les odeurs corporelles" (art. L 5131-2 du CSP). On oppose ici la notion de produit cosmétique à celle de médicament, qui est une substance ou produit pouvant être administré pour établir un diagnostic médical ou pour restaurer, corriger ou modifier des fonctions organiques. La différence majeure entre un cosmétique et un médicament est que le cosmétique est destiné à une peau saine et non au traitement d'une maladie de peau.¹⁶⁷

3.1.2 Structure de la peau

La peau est constituée de différentes couches, qui permettent de protéger l'intérieur du corps de l'environnement extérieur (FIGURE 3.2). La couche la plus superficielle est l'épiderme, épais de 100 µm en moyenne, puis le derme forme la couche la plus épaisse de la peau et enfin, l'hypoderme est la couche la plus profonde.¹⁶⁸

L'épiderme est constitué de plusieurs couches de kératinocytes, dont deux principales : le *stratum corneum* et l'épiderme viable.

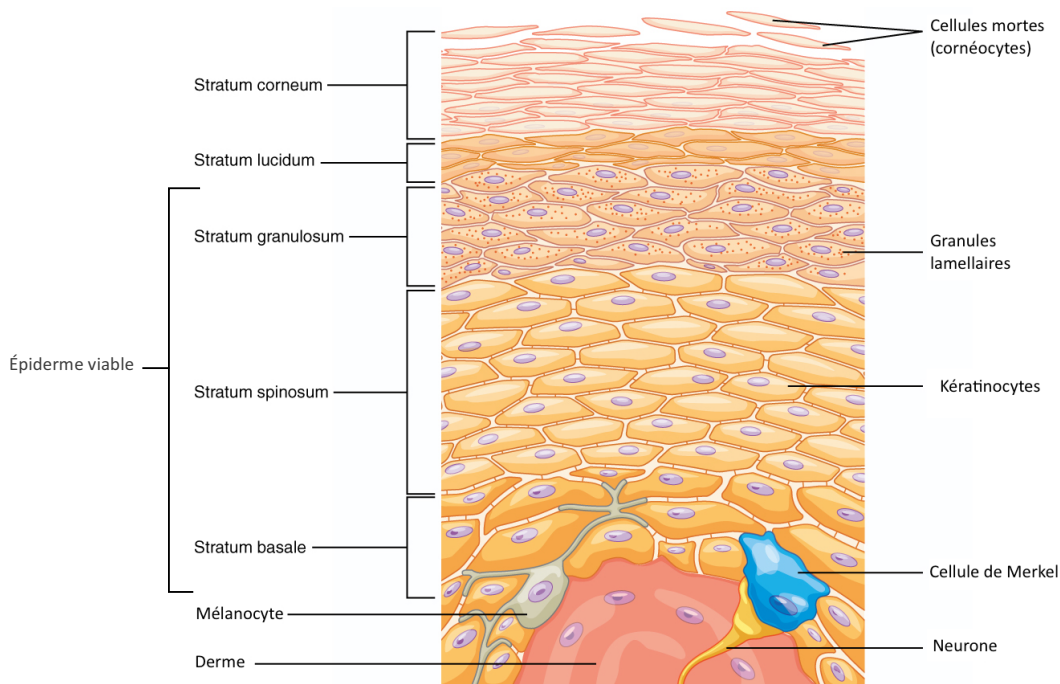


FIGURE 3.2 – Structure de la peau (adapté de la littérature).^{168,169}

Le *stratum corneum*, dont l'épaisseur varie de 10 à 20 μm , est une couche constituée de cellules mortes appelées cornéocytes organisées en multicouches, entre lesquelles se trouve une matrice de lipides. Il s'agit donc d'une couche lipophile, contrairement aux suivantes (épiderme et derme) qui sont plus hydrophiles.¹⁷⁰

Deux mécanismes peuvent être envisagés pour expliquer le passage d'un composé à travers le *stratum corneum* (FIGURE 3.3) : par voie intercellulaire (voie 1) ou trans-cellulaire (voie 2).

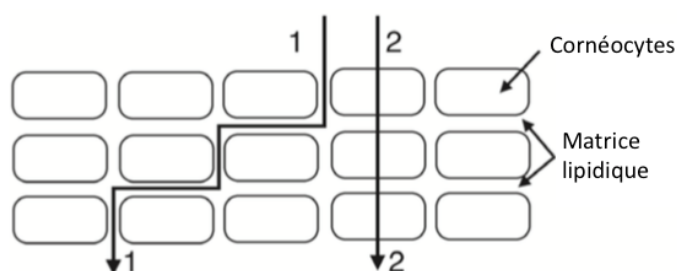


FIGURE 3.3 – Voies de passage cutanées. Voie 1 : intercellulaire, voie 2 : trans-cellulaire.¹⁷⁰

La spectroscopie infrarouge à transformée de FOURIER (FTIR) est couramment utilisée pour étudier l'organisation des lipides du *stratum corneum in vitro*, après extraction des lipides par un solvant.¹⁷¹ Une variante de cette méthode consiste à utiliser la spectroscopie infrarouge à transformée de FOURIER en mode réflexion totale atténuée (ATR-FTIR) directement sur la peau et de retirer les couches externes de la peau par *tape-stripping* (FIGURE 3.4(a)).¹⁷² Ces expériences peuvent aussi être réalisées *ex vivo* sur des coupes de peau par spectromicroscopie infrarouge (FIGURE 3.4(b)). Cette technique présente l'avantage d'avoir une vision verticale de l'organisation des couches qui constituent la peau alors que l'ATR ne permet que de sonder la surface.

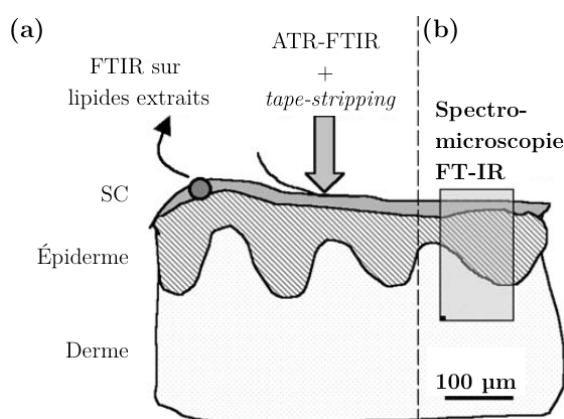


FIGURE 3.4 – Différentes approches pour des études d'échantillons de peau par FTIR. (a) Techniques précédemment employées : ATR directement sur la peau ou extraction des lipides par un solvant, suivie d'une analyse FTIR ou arrachage des couches externes par *tape-stripping*, (b) Microscopie FTIR utilisant le rayonnement synchrotron sur une coupe de peau entière, où le carré noir en bas à gauche représente la taille du faisceau (adapté de la littérature).¹⁷²

La spectromicroscopie infrarouge peut fournir des informations précises sur le *stratum corneum* comme son épaisseur et l'organisation des lipides. Un spectre typique est présenté FIGURE 3.5.

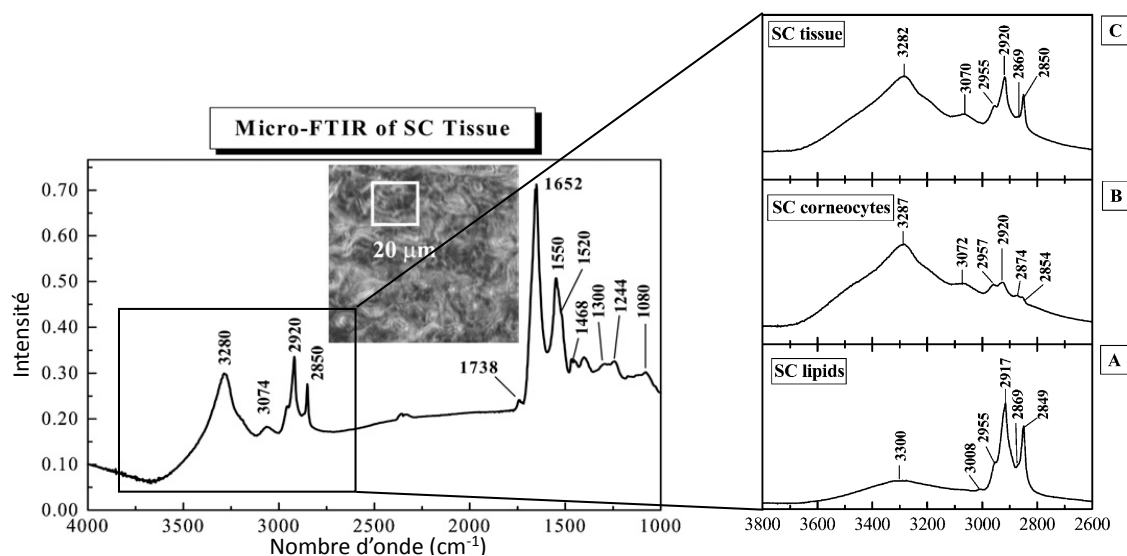


FIGURE 3.5 – Spectre FTIR du *stratum corneum* issu d'une biopsie de peau humaine séchée à l'air (la région analysée est indiquée par un cadre blanc) et spectre ATR-FTIR de différentes fractions du *stratum corneum* entre 2600 et 3800 cm^{-1} . (a) Fraction lipidique, (b) Fraction contenant les cornéocytes après extraction par un solvant organique, (c) Couche complète du *stratum corneum* (adapté de la littérature).¹⁷³

La bande d'absorption observée entre 3000 et 2700 cm^{-1} est due aux vibrations d'élongation des liaisons C–H des groupements alkyle présents dans les lipides, constituées de 4 bandes fines à 2850 cm^{-1} ($\nu_{\text{S}}(\text{CH}_2)$), 2920 cm^{-1} ($\nu_{\text{AS}}(\text{CH}_2)$), 2870 cm^{-1} ($\nu_{\text{S}}(\text{CH}_3)$) et 2955 cm^{-1} ($\nu_{\text{AS}}(\text{CH}_3)$).¹⁷⁴ Ces bandes sont attribuées aux longues chaînes alkyle des céramides, cholestérol et acides gras, les composants majoritaires du *stratum corneum*. Les deux bandes intenses autour de 1650 cm^{-1} (amide I) et 1550 cm^{-1} (amide II) sont attribuées aux protéines et proviennent respectivement de vibrations d'élongation des liaisons C=O et de déformation des liaisons N–H des groupements amide. Les amides I et II sont sensibles à la conformation des protéines dans les tissus, ce qui permet d'étudier leur composition par IR.¹⁷⁵ Par exemple, un épaulement à 1634 cm^{-1} est caractéristique de structures secondaires en feuillets β alors que la bande à 1655 cm^{-1} est attribuée à une structure secondaire en hélice α .¹⁷²

La deuxième couche de l'épiderme, parfois séparée du *stratum corneum* par le *stratum lucidum*, est appelée épiderme viable : elle comprend la couche basale, la couche muqueuse, la couche granuleuse mais aussi des mélanocytes, des cellules de MERKEL ou des cellules de LANGERHANS (voir FIGURE 3.2). L'épiderme viable peut être révélé par marquage des noyaux des kératinocytes. Pour ce faire, différents marqueurs fluorescents d'organites sont disponibles dans le commerce et le noyau peut par exemple être marqué par du 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI)¹⁷⁶ ou par des bis-benzimidés comme les colorants de type Hoechst,¹⁷⁷ dont quelques structures sont présentées FIGURE 3.6.

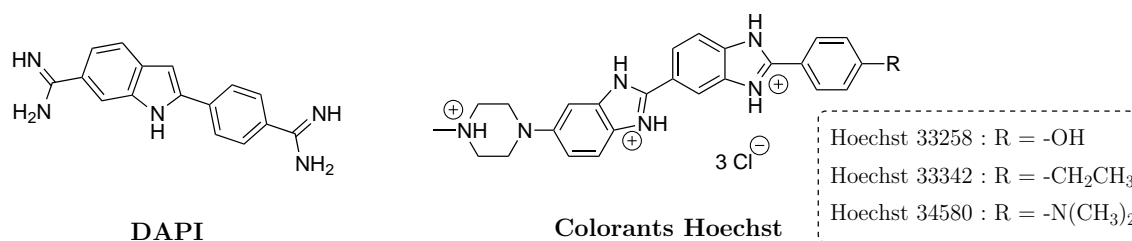


FIGURE 3.6 – Structure du DAPI et de quelques colorants Hoechst.

Ces colorants émettent à environ 460 nm après excitation à 350 nm, comme présenté pour le DAPI et le Hoechst 33342 sur la FIGURE 3.7.

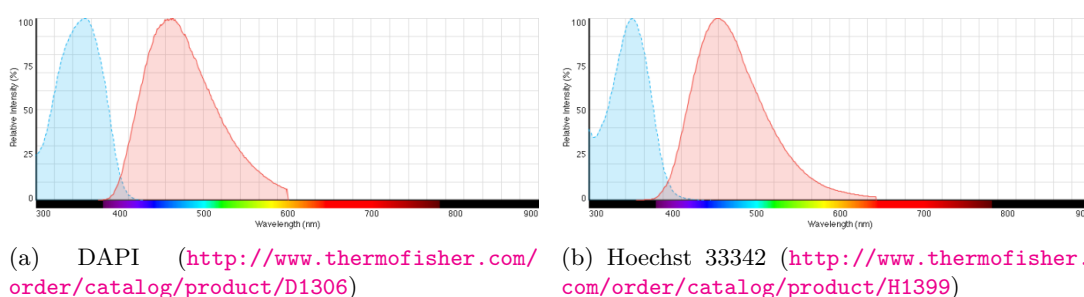


FIGURE 3.7 – Spectres d'absorption (bleu) et d'émission (rouge) de marqueurs fluorescents du noyau.

Ces composés s'intercalent avec l'ADN, avec une préférence pour les clusters adénine-thymine dans le sillon mineur. Une augmentation d'un facteur 20 de l'intensité de fluorescence est observée pour le DAPI une fois lié à un double brin d'ADN.¹⁷⁸

3.1.3 Pénétration percutanée de l'acide hyaluronique

Nous nous intéressons ici à la pénétration percutanée de l'acide hyaluronique. Ce travail résulte d'une collaboration avec l'équipe d'Arlette BAILLET-GUFFROY et Cécile LAUGEL et a donné lieu à un article.¹⁷⁹ La peau utilisée pour cette étude provient essentiellement de prélèvements issus de la chirurgie plastique abdominale. Des coupes de peau humaine peuvent être montées sur une cellule de FRANZ, laissée ouverte à l'air libre pendant l'expérience (FIGURE 3.8). Ce dispositif, mis au point par Tom FRANZ il y a une quarantaine d'années, est constitué de deux chambres séparées par une membrane sur laquelle la biopsie de peau est déposée. Le composé étudié est introduit par la chambre du haut (*donor chamber*). La chambre du bas (*receptor chamber*) contient de l'eau distillée avec 0,85 % de NaCl et 0,01 % d'albumine de sérum bovin, qui peut être récupérée pour analyse.

Afin d'étudier leur pénétration à travers la peau, des acides hyaluroniques de deux gammes de masse molaire différentes (10 et 400–1000 kDa) ont été marqués avec une sonde multimodale rhénium-tricarbonyle. Des acides hyaluroniques de 400–1000 et de 1800–2200 kDa ont d'abord été envisagés mais, pour des raisons de solubilité, l'étude a été réalisée dans un premier temps sur un composé de 10 kDa, puis sur celui de 400–1000 kDa une fois la synthèse maîtrisée.

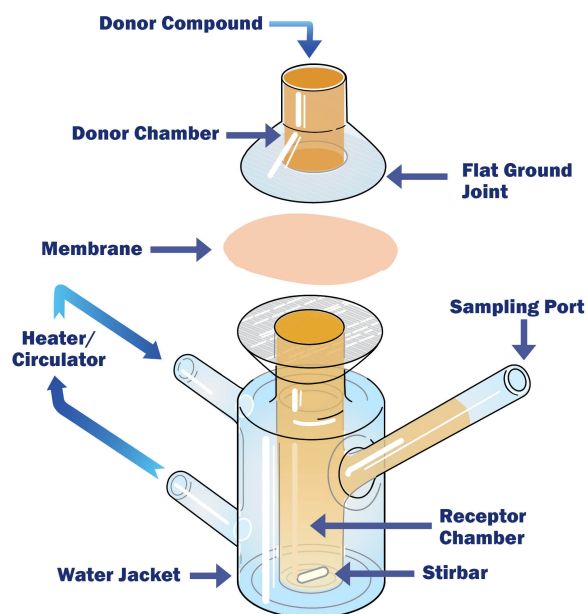


FIGURE 3.8 – Dispositif de la cellule de FRANZ (<http://permegear.com/franz-cells/>).

Le marquage de l'acide hyaluronique à l'aide d'une sonde est indispensable, car il ne peut pas être détecté par fluorescence et ne possède pas de bande caractéristique en infrarouge que l'on pourrait différencier facilement du signal de la peau, comme mis en évidence FIGURE 3.9.

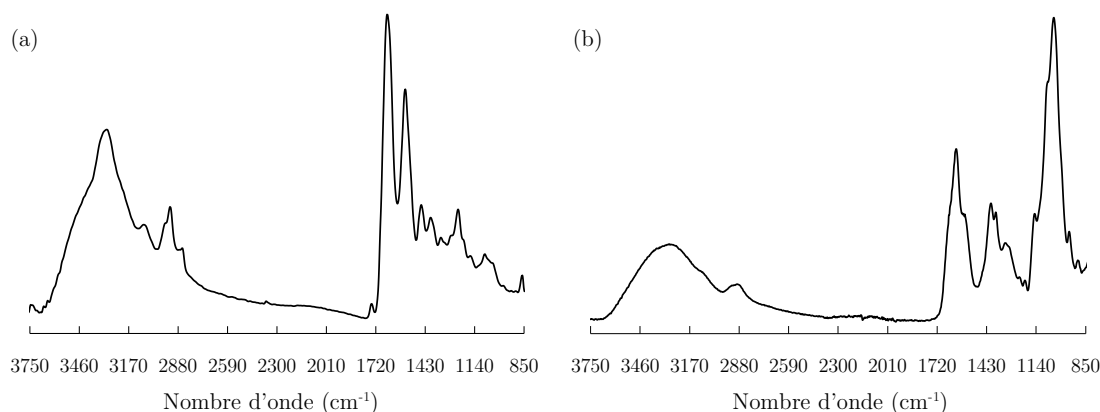
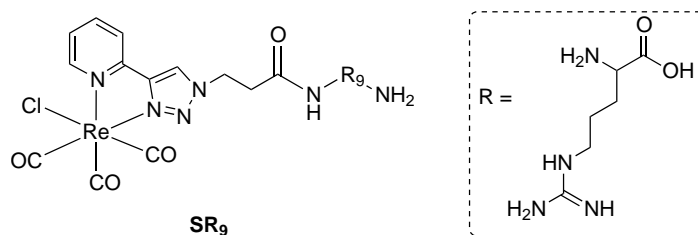


FIGURE 3.9 – Spectres infrarouge d'un échantillon de peau obtenu par FTIR-SM (a) et de l'acide hyaluronique obtenu par FTIR en mode ATR (b).

Une telle stratégie a déjà été utilisée dans le cadre de la thèse de Sylvain CLÈDE pour marquer un peptide pénétrant (CPP) et étudier sa pénétration après application sur des biopsies de peau.⁵³ Pour ce faire, un SCoMPI portant une fonction acide carboxylique a été couplé à un peptide nona-arginine (R₉) pour donner la molécule SR₉ (FIGURE 3.10). Cette dernière a été appliquée en solution dans l'eau ($2 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) sur la surface de biopsies de peau humaine montées sur une cellule de diffusion de FRANZ. Après 6 ou 24 h de percolation, les cryosections d'épaisseur 10 μm ont été préparées et imagées.

FIGURE 3.10 – Structure de la molécule SR_9 .⁵³

Une bonne corrélation a été obtenue entre les signaux observés par infrarouge et par la fluorescence de la sonde. En outre, une solution de DAPI a été appliquée sur les coupes de peau afin de marquer les noyaux des kératinocytes et révéler l'épiderme viable.¹⁸⁰ On constate qu'après 24 h, le composé SR_9 pénètre bien dans la peau et est situé dans tout l'épiderme, du *stratum corneum* au *stratum basale* (FIGURE 3.11).

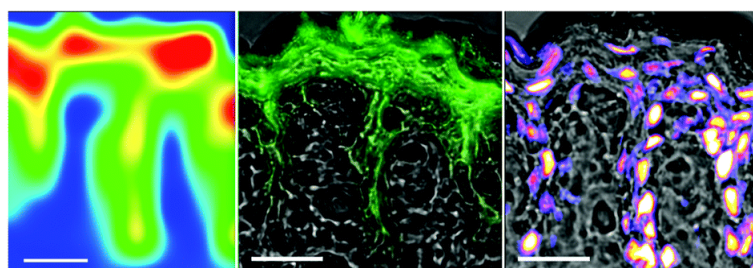


FIGURE 3.11 – Coupes de peau après une exposition de 24 h à des solutions aqueuses de SR_9 à $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Gauche : cartographie de l'intégrale de l'absorbance de la bande A_1 ($2040\text{--}2000 \text{ cm}^{-1}$). Milieu : image visible superposée à la luminescence de SR_9 (ex. 500-550 nm). Droite : image visible superposée au marquage des noyaux par du DAPI (ex. 450-470 nm). Barre d'échelle : 20 mm.⁵³

La même stratégie est utilisée ici : une sonde Re-tricarbone multimodale est couplée à l'acide hyaluronique. Contrairement au CPP R_9 , la molécule possède différents sites de liaison susceptibles d'être marqués.

3.1.4 Stratégie de marquage

La FIGURE 3.12 indique les différents sites de greffage covalent pour la sonde sur l'acide hyaluronique.

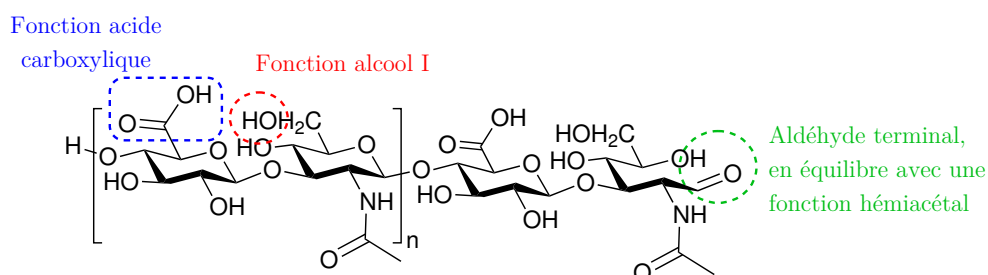


FIGURE 3.12 – Sites potentiels de greffage de la sonde sur l'acide hyaluronique.

L'acide hyaluronique possède une fonction hémiacétal terminale, en équilibre avec une fonction aldéhyde, qu'il est possible de marquer avec une sonde possédant une fonction amine par réaction d'amination réductrice. Cette stratégie a déjà été utilisée plusieurs fois dans la littérature. Par exemple, en 2015, le groupe de Sang Hyun PARK a conjugué une molécule d'acide hyaluronique à une molécule de tyramine, afin de marquer le conjugué obtenu par des radioisotopes.¹⁸¹ Le groupement tyramine a été introduit par amination réductrice en présence d'un excès de tyramine et de cyanoborohydrure de sodium (SCHÉMA 3.1).

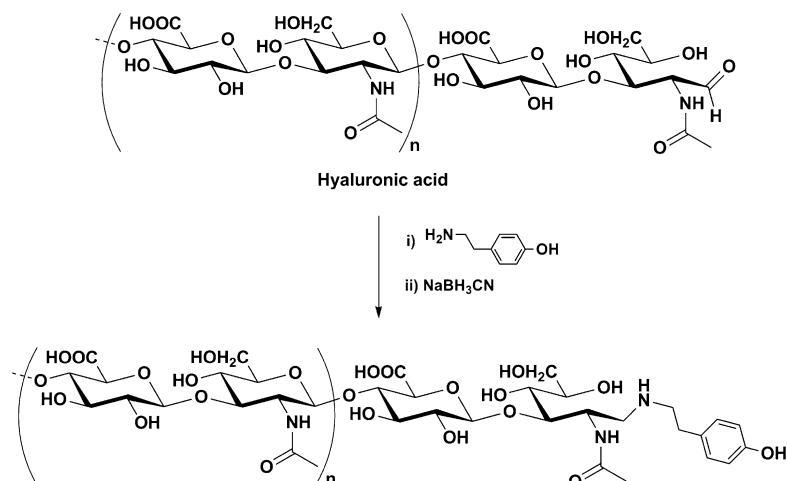


SCHÉMA 3.1 – Synthèse du conjugué acide hyaluronique-tyramine.¹⁸¹

Les avantages de cette réaction sont nombreux : tout d'abord, elle est site-spécifique par rapport à l'acide hyaluronique car l'amine ne peut réagir qu'avec sa fonction aldéhyde terminale dans les conditions choisies. Ensuite, la synthèse est décrite comme quantitative et peut être réalisée à température ambiante. Une réaction similaire a été utilisée par le groupe de Jun Li pour le greffage de cyclodextrines sur l'acide hyaluronique, avec un rendement de 70 % (SCHÉMA 3.2).¹⁸²

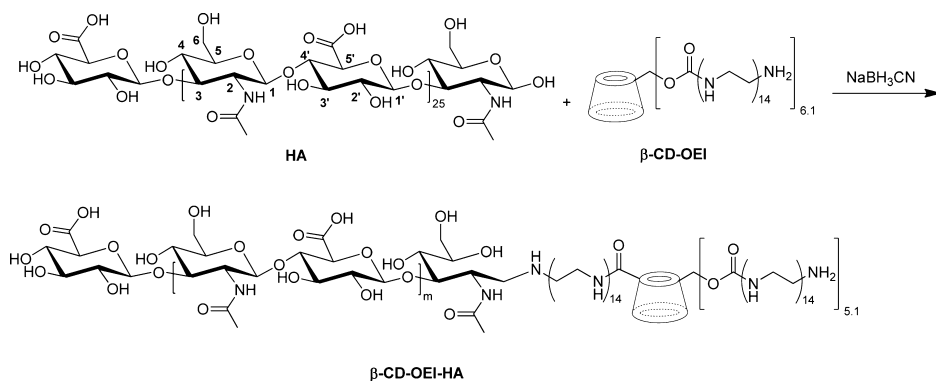


SCHÉMA 3.2 – Synthèse de β-CD-OEI-HA.¹⁸²

Un inconvénient de cette stratégie est qu'elle permet de ne greffer qu'une molécule par polymère, ce qui pourrait poser des problèmes de sensibilité pour la détection d'acides hyaluroniques de haute masse molaire.

Il est également possible de marquer les fonctions alcool de l'acide hyaluronique, en formant des fonctions étheroxyde, hémiacétal, ester ou carbamate.¹⁸³

La dernière voie envisageable est de faire réagir les fonctions acide carboxylique des sous-unités acide D-glucuronique. C'est cette voie qui est la plus souhaitable, car elle permet de fonctionnaliser l'acide hyaluronique tout en maintenant ses propriétés biologiques.¹⁸³ La formation d'amide est particulièrement aisée : la méthode la plus standard est l'activation des groupements acide carboxylique de l'acide hyaluronique avec du 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC), soluble dans l'eau, et du *N*-hydroxysuccinimide (NHS) pour un couplage avec une amine. Une des limites de ce couplage est la nécessité d'un contrôle du pH de manière précise. La formation de l'ester activé de l'acide hyaluronique nécessite une solution acide (pH entre 3,5 et 4,5) alors que l'addition nucléophile de l'amine n'est possible qu'en conditions basiques pour éviter la formation d'ammonium, pH pour lesquels l'ester activé risque d'être hydrolysé. Par conséquent, il est nécessaire de trouver un bon compromis pour réaliser cette transformation : la modification de pH durant la réaction la rend plus complexe à mettre en œuvre et moins efficace.¹⁸⁴

Enfin, il est possible de greffer une molécule possédant une fonction amine sur les fonctions acide carboxylique de l'acide hyaluronique par couplage de UGI, réaction largement décrite dans la littérature, notamment pour des réactions de réticulation,^{183,185-187} comme présenté sur le SCHÉMA 3.3. Dans cet exemple, une diamine est utilisée comme agent de réticulation pour former des liens diamide entre deux chaînes d'acide hyaluronique. Cette réaction a été réalisée dans l'eau à pH = 3 en présence de formaldéhyde et de cyclohexylisonitrile.

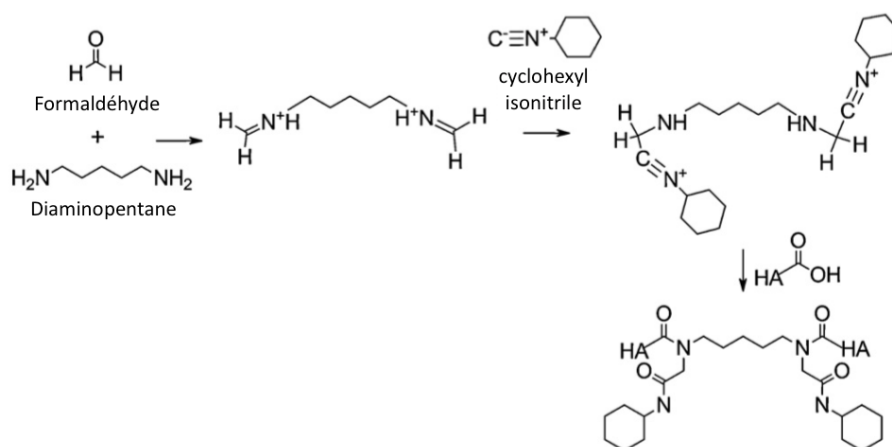


SCHÉMA 3.3 – Réticulation de l'acide hyaluronique par réaction de UGI.^{183,185}

L'utilisation de la condensation de UGI n'est pas limitée aux réactions de réticulation. En 2011, le groupe de Ignacy GRZYNSKI a décrit le marquage de l'acide hyaluronique par couplage des fonctions amine de la fluorescéine et de la rhodamine B sur les fonctions acide carboxylique de l'acide hyaluronique, en présence de cyclohexylisonitrile et d'acétaldéhyde.¹⁸⁸ Cette réaction très efficace avait déjà été décrite et étudiée en 1975 par A. DE BELDER et K. OVE WIK : l'analyse physico-chimique de l'acide hyaluronique marqué

par la fluorescéine a mis en évidence une très faible dégradation du produit durant le marquage, qui s'est révélé uniforme : le produit marqué a alors pu être utilisé pour des études biologiques.¹⁸⁹

On constate que pour la plupart des stratégies envisagées, une fonction amine est nécessaire pour marquer l'acide hyaluronique : par conséquent, il est indispensable de synthétiser une sonde Re-tricarbone possédant une fonction amine terminale.

3.2 Synthèse et caractérisation de la sonde Re-tricarbone

3.2.1 Synthèse de la sonde amine

Afin de marquer l'acide hyaluronique, une sonde $\text{Re}(\text{CO})_3$ possédant une fonction amine a été synthétisée en cinq étapes (SCHÉMA 3.4).

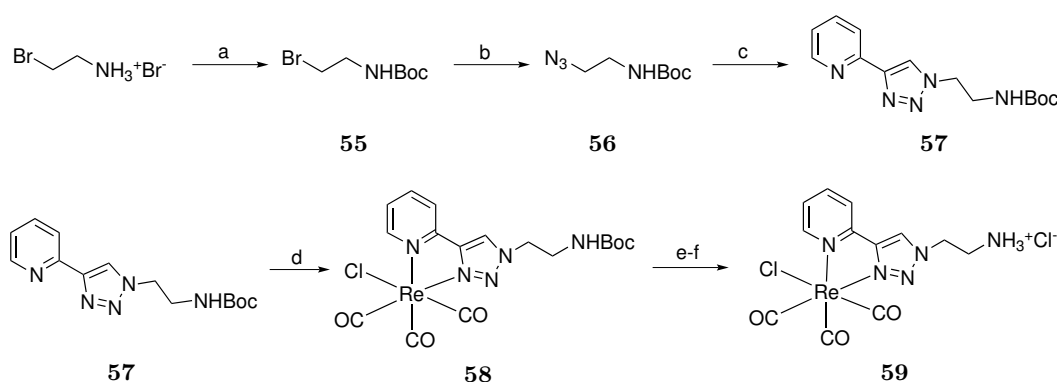


SCHÉMA 3.4 – Synthèse de la sonde **59**. (a) Boc_2O , DIPEA, THF, 1 h, t.a., quantitatif. (b) NaN_3 , NaI, acétone/ H_2O , 40 h, 35°C , 66 %. (c) 2-éthynylpyridine, CuSO_4 , ascorbate de sodium, acétone/ H_2O , 3 h, t.a., 62 %. (d) $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}$, toluène, 1,5 h, 80°C , 88 %. (e) CH_2Cl_2 , TFA, 1 h, 25°C . (f) CH_3OH , HCl, 10 min, 25°C , 95 %.

Du bromure de 2-bromoéthylammonium a d'abord été protégé par un groupement *tert*-butoxycarbone (Boc) pour donner le composé **55**. Cette protection a été suivie d'une substitution nucléophile du bromure de **55** par un groupement azoture en présence d'azoture de sodium et d'iodure de sodium, afin d'obtenir **56**. L'iodure de sodium est ici important pour accélérer la réaction : en effet, l'ion iodure est un meilleur nucléophile et un meilleur nucléofuge que l'ion bromure. Une substitution du bromure par l'iodure se fait dans un premier temps, avant la substitution par l'azoture. L'avancement de la réaction a été suivi par chromatographie sur couche mince et la molécule finale a été caractérisée par RMN du proton et du carbone ainsi que par spectroscopie infrarouge, en raison de l'apparition d'une bande de vibration d'élongation caractéristique de la fonction azoture à 2098 cm^{-1} .

Le ligand Pyta (pyridine triazole) protégé **57** a été ensuite obtenu par une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de HUISGEN catalysée par le cuivre entre l'azoture de **56** et de la 2-éthynylpyridine. Le spectre de RMN du proton du composé **57** fait apparaître des signaux caractéristiques dans la région des aromatiques (7–9 ppm) attribués au ligand Pyta alors créé.

Le complexe de rhénium-tricarbonyle a ensuite été obtenu par complexation du ligand Pyta sur du pentacarbonylchlororhénium $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}$ dans le toluène, qui mène à la précipitation de la sonde amine protégée (**58**). Enfin, la déprotection de l'amine a été réalisée avec de l'acide trifluoroacétique (TFA) dans le dichlorométhane, suivie d'une évaporation puis d'une redissolution dans le méthanol en présence d'acide chlorhydrique concentré ($12 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dans l'eau) pour coordonner le ligand chlorure éventuellement échangé avec le TFA lors de l'étape de déprotection. La sonde ammonium **59** ainsi obtenue peut alors être utilisée pour marquer l'acide hyaluronique à différentes positions.

3.2.2 Caractérisation physico-chimique des sondes $\text{Re}(\text{CO})_3$

Les sondes $\text{Re}(\text{CO})_3$ peuvent être caractérisées par des techniques variées. Tout d'abord, les spectres d'absorption des composés **58** et **59** en solution à $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dans l'eau contenant 10 % de DMSO ont été enregistrés. Ils ont mis en évidence la présence d'un épaulement autour de 320 nm, typique des bandes de transfert de charge métal-ligand dans les complexes de type $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{Pyta})$ ($\epsilon \approx 5 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$),⁴⁸ comme présenté FIGURE 3.13.

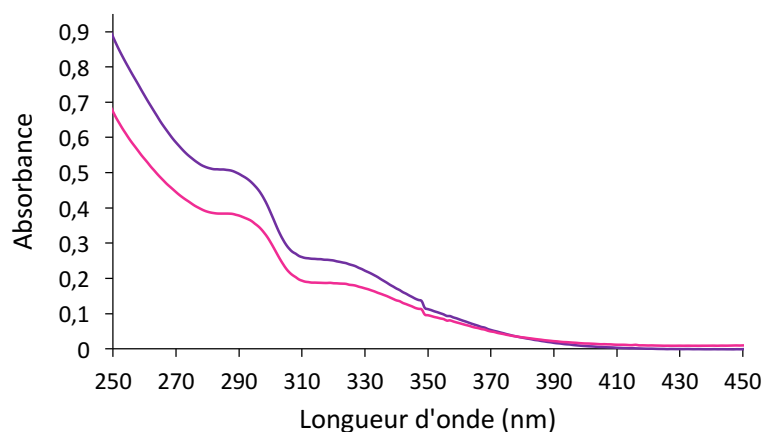


FIGURE 3.13 – Spectres d'absorption UV-Vis des composés **58** (violet) et **59** (rose) en solution à $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dans un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ 90:10 v.v.

En dessous de 300 nm, des bandes attribuées à des transferts de charge ligand-ligand (290 nm, $\pi(\text{Cl}) \rightarrow \pi^*(\text{L})$, $\epsilon \approx 10^2 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et à des transferts de charge intraligand (240 nm, $\pi(\text{L}) \rightarrow \pi^*(\text{L})$) sont observées.

L'irradiation de la bande à 320 nm a mis en évidence la présence d'une bande d'émission autour de 530 nm (FIGURE 3.14). Les rendements quantiques de fluorescence ont été mesurés dans l'eau contenant 4 % de DMSO et sont présentés TABLEAU 3.1.

TABLEAU 3.1 – Rendements quantiques des composés **58** et **59**.

Composé	ϵ^{320} ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	$\lambda_{\text{em}}^{320}$ (nm)	Φ (%)
58	5×10^3	530	0,04
59	5×10^3	530	0,02

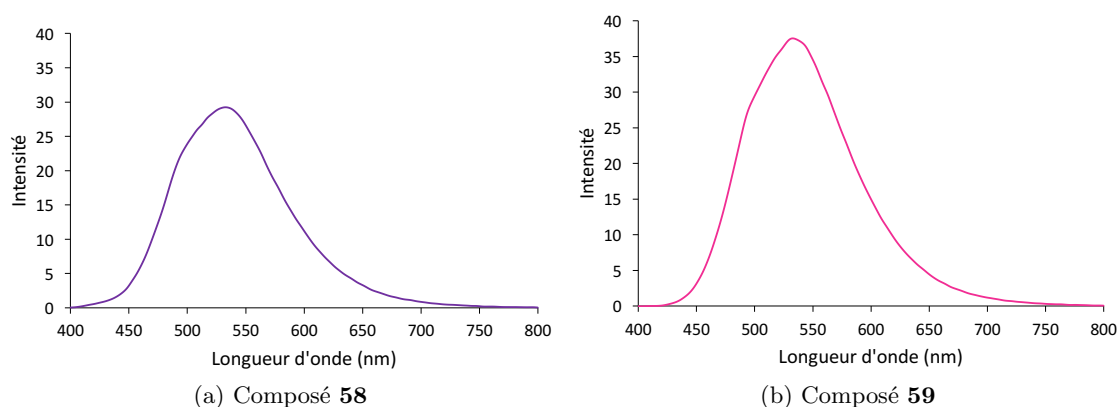


FIGURE 3.14 – Spectres d'émission de fluorescence des composés **58** et **59** en solution à $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dans le DMSO (ex. 320 nm)

Des spectres infrarouge des composés sous forme solide (poudre) ont été enregistrés en mode ATR : ils ont mis en évidence la présence de bandes de vibration d'élongation des liaisons $\text{C}\equiv\text{O}$, caractéristiques des complexes de métal-tricarbonyle. Les spectres infrarouge des composés **58** et **59** ont ensuite été enregistrés dans différents solvants. Ils présentent les deux bandes caractéristiques dans la région de 2000 cm^{-1} .

La FIGURE 3.15 et le TABLEAU 3.2 montrent que la position des bandes A_1 et E est modifiée selon la nature du solvant, avec des déplacements pouvant atteindre 10 à 20 cm^{-1} .

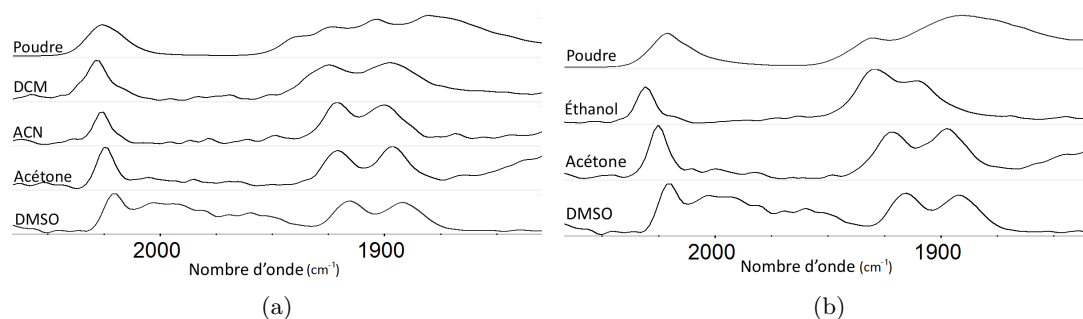


FIGURE 3.15 – Spectres infrarouge de (a) **58** et (b) **59** dans différents solvants ($2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, voir TABLEAU 3.2) obtenus en mode réflexion totale atténuée (ATR) entre 1820 et 2075 cm^{-1}

TABLEAU 3.2 – Nombre d'onde des bandes de vibration d'élongation des liaisons CO mises en évidence FIGURE 3.15

Solvant	Composé 58			Composé 59		
	Bande A_1	Bandes E		Bande A_1	Bandes E	
EtOH	Insoluble			2031	1929	1911
DCM	2028	1925	1897	Insoluble		
Acétonitrile	2026	1921	1900	Insoluble		
Acétone	2024	1921	1896	2025	1921	1887
DMSO	2020	1916	1892	2020	1916	1892

3.3 Marquage de l'acide hyaluronique sur l'aldéhyde terminal

L'avantage de cette stratégie est de modifier faiblement les propriétés physico-chimiques de l'acide hyaluronique, puisqu'une seule sonde par molécule sera greffée,¹⁸¹ mais des problèmes de sensibilité pour la détection pourront se poser. La synthèse a été menée comme suit : la sonde **59** a été dissoute dans une solution d'acétate de sodium à 5 %. Après addition d'acide hyaluronique ($M \approx 1800 - 2200$ kDa) dans la solution, le milieu réactionnel a été agité à température ambiante pendant 2 jours durant lesquelles une fonction iminium a été formée. Enfin, du cyanoborohydrure de sodium a été ajouté au milieu réactionnel, laissé sous agitation pendant 3 jours. Le solvant a ensuite été évaporé et le produit purifié par dialyse pendant 3 jours (SCHÉMA 3.5).

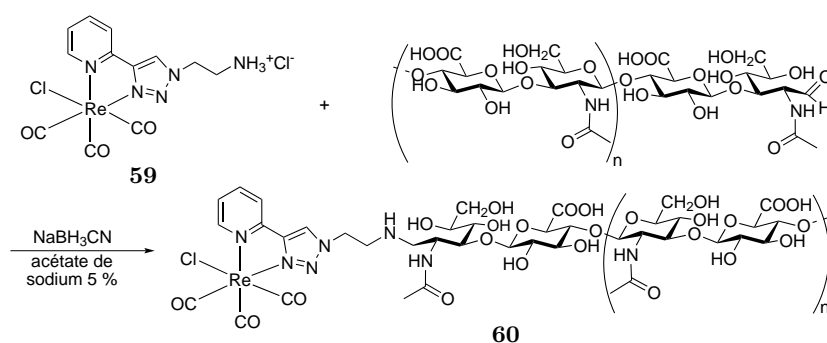


SCHÉMA 3.5 – Marquage de l'acide hyaluronique sur la fonction aldéhyde terminale.

En raison du caractère électro attracteur du groupement cyano lié au bore, le cyanoborohydrure de sodium est un réducteur doux qui permet, dans des conditions spécifiques de pH, de réduire sélectivement les fonctions iminium sans réagir avec les autres fonctions carbonylées (cétones et aldéhydes), comme le ferait le tétrahydroborate de sodium (NaBH_4) par exemple. Ainsi, pour un pH maintenu entre 5,5 et 7, seul l'iminium formé après réaction avec l'amine est réduit, sans que l'aldéhyde qui n'a pas encore réagi soit touché, alors que si le pH est abaissé à 3-4, la réduction des aldéhydes est également possible.¹⁹⁰

Le problème majeur de cette méthode a été la caractérisation du produit. Après purification par dialyse dans l'eau, la solution contenant l'acide hyaluronique marqué a été lyophilisée et le solide alors obtenu a été caractérisé par ATR-FTIR (FIGURE 3.16a). Des bandes de vibration d'élongation caractéristiques des liaisons $\text{C}\equiv\text{O}$ ont pu être mises en évidence, ce qui est *a priori* encourageant. En revanche, ces bandes semblent trop intenses par rapport à la quantité de sonde supposée liée : en effet, avec cette méthode seule une sonde est greffée par molécule d'acide hyaluronique ($M \approx 1800 - 2200$ kDa). Il semblerait donc que le signal observé soit attribué à la sonde amine libre qui n'aurait pas été éliminée lors de la purification, sans doute en raison de sa faible solubilité dans l'eau. Pour vérifier cette hypothèse, l'acide hyaluronique marqué **60** a été lavé par du méthanol, solvant dans lequel la sonde amine est soluble. Après lavage au méthanol et séchage du produit, le spectre ATR-FTIR a été enregistré de nouveau (FIGURE 3.16b) : le signal attribué aux $\text{C}\equiv\text{O}$ n'est plus présent. Cela signifie soit que le couplage n'a pas fonctionné, soit que la détection des bandes de vibration d'élongation des ligands $\text{C}\equiv\text{O}$ n'est pas possible pour les molécules de haute masse molaire.

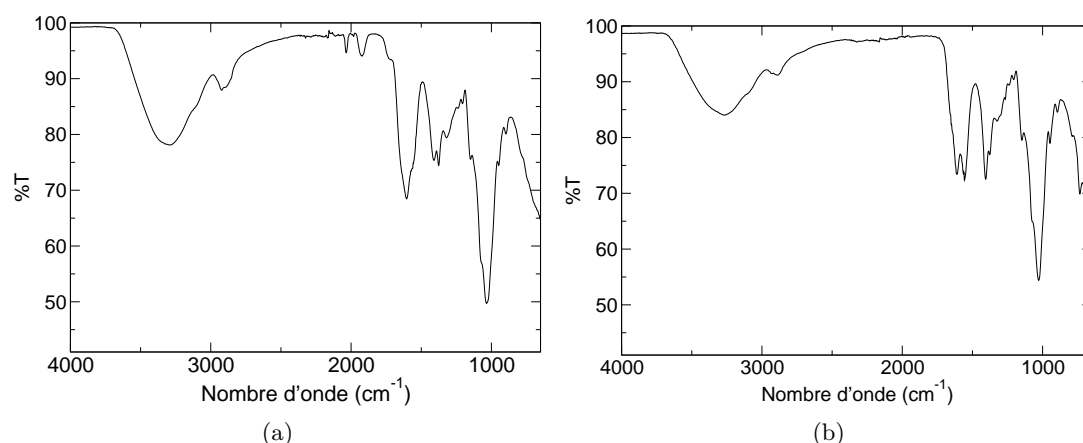


FIGURE 3.16 – Spectres infrarouge du composé **60** purifié par dialyse obtenus en mode réflexion totale atténuée (ATR) entre 650 et 4000 cm^{-1} : (a) Avant lavage au méthanol, (b) Après lavage au méthanol.

Il a donc fallu envisager une autre stratégie qui permette de greffer plus d'équivalents de sondes sur une même molécule afin de mieux suivre la réaction. Une fonction qui se répète régulièrement dans le polymère est la fonction acide carboxylique de l'unité acide D-glucuronique. Deux voies ont été sélectionnées pour marquer l'acide hyaluronique sur les groupements acide carboxylique, et les réactions ont été réalisées en parallèle.

3.4 Marquage de l'acide hyaluronique sur les fonctions acide carboxylique

3.4.1 Par une réaction d'amidation

Le moyen le plus classique de fonctionnaliser une molécule sur les groupements acide carboxylique avec des fonctions amine est de réaliser une réaction d'amidation en présence d'agents de couplage. En raison de la nécessité de travailler dans l'eau, un couplage à l'aide d'EDC et de NHS a été sélectionné, comme décrit dans la littérature et présenté SCHÉMA 3.6.¹⁸⁴

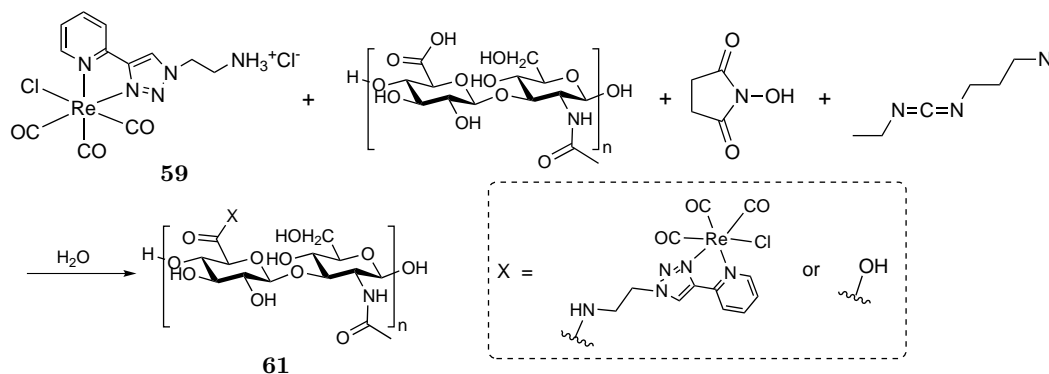


SCHÉMA 3.6 – Marquage de l'acide hyaluronique sur les fonctions acide carboxylique par une réaction d'amidation.

3.4. MARQUAGE SUR LES FONCTIONS ACIDE CARBOXYLIQUE

L'acide hyaluronique (10 kDa) et la sonde **59** ont été mis à réagir en présence d'EDC et de NHS dans l'eau, et le pH a été ajusté à 5,5. En effet, la génération de l'ester activé nécessite un milieu acide. Après 2 h, le pH a été élevé à 7,3 par addition d'une solution d'hydroxyde de sodium pour permettre d'addition nucléophile de l'amine. L'avancement de la réaction a été suivi par chromatographie sur couche mince. Après 5 jours, la tache correspondant au composé **59** ayant disparu, le mélange a été purifié par filtration et lavage à l'éthanol à 96 % sur une membrane perméable aux molécules de moins de $3000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. La fraction contenant l'acide hyaluronique a ensuite été lyophilisée. Le spectre infrarouge du composé **61** est présenté FIGURE 3.17.

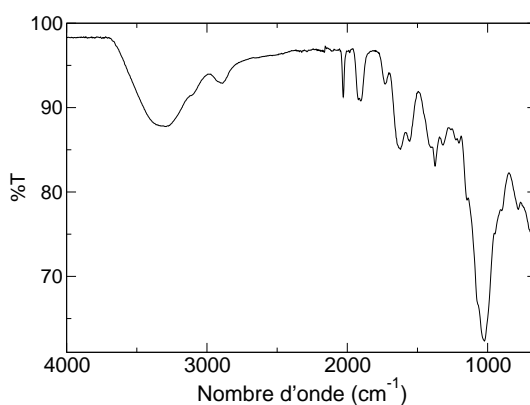


FIGURE 3.17 – Spectre infrarouge du composé **61** purifié obtenu en mode réflexion totale atténuée (ATR) entre 650 et 4000 cm^{-1} après lavage à l'éthanol.

Même si cette réaction a fonctionné, il existe un risque qu'une réaction parasite se produise entre l'ester activé et les fonctions alcool présentes sur l'acide hyaluronique. Nous avons donc envisagé une autre stratégie de couplage, plus sélective de la sonde amine.

3.4.2 Par une réaction multicomposant de Ugi

Généralités

Nous avons choisi d'essayer de marquer les acides carboxyliques de l'acide hyaluronique par une réaction multicomposant de UGI,¹⁸⁸ déjà largement décrite dans la littérature et bien connue dans l'équipe de Laurence GRIMAUD. Elle possède une grande efficacité dans l'eau,^{191,192} qui est le solvant le plus approprié pour dissoudre l'acide hyaluronique. Le mécanisme de cette réaction est donné sur le SCHÉMA 3.7.

Un des avantages de cette réaction est que le seul sous-produit de réaction est de l'eau, qui est également un des solvants. Cette réaction est décrite comme étant totale : en effet, bien que chaque étape du mécanisme soit renversable, il existe une grande barrière énergétique à franchir lors de l'étape d'addition de l'isonitrile sur l'iminium. C'est cette étape qui permet de tirer l'équilibre vers la formation des produits.¹⁹²

Synthèse et suivi

Dans le cas du marquage de l'acide hyaluronique, l'amine **59** a été mise à réagir avec les fonctions acide carboxylique de l'acide hyaluronique, avec du cyclohexylisonitrile et de l'isobutyraldéhyde (SCHÉMA 3.8).

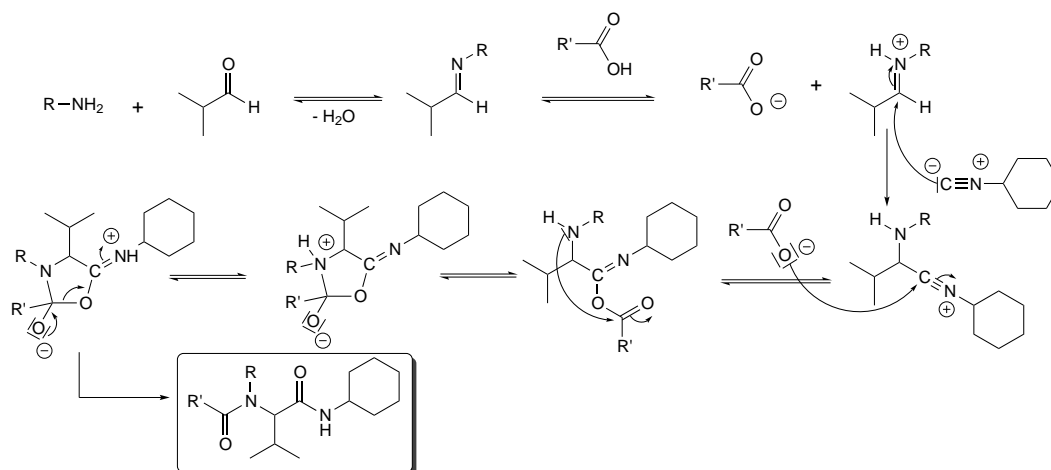


SCHÉMA 3.7 – Mécanisme de la réaction de UGI avec l'isobutyraldéhyde et le cyclohexylisonitrile.

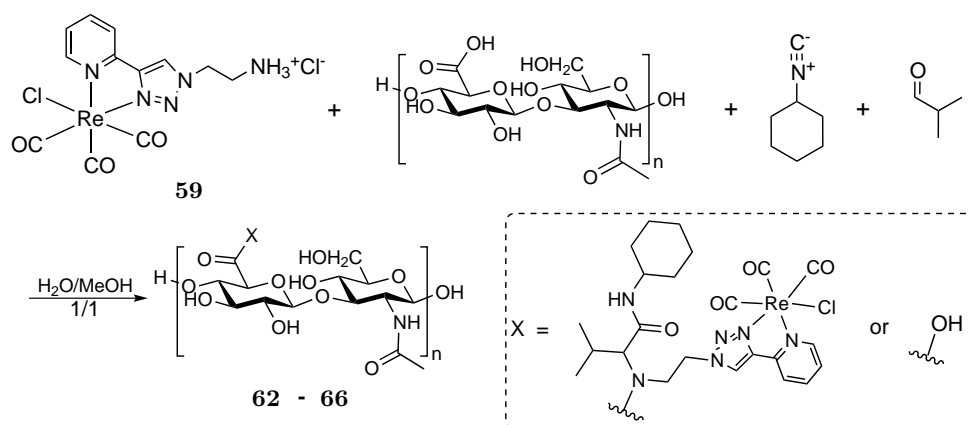


SCHÉMA 3.8 – Marquage de l'acide hyaluronique sur les fonctions acide carboxylique par une réaction de condensation de UGI.

L'isobutyraldéhyde a été choisi car, contrairement à d'autres aldéhydes comme l'acétaldéhyde ou le formaldéhyde, il ne risque pas de se condenser avec l'èneamine durant la réaction. C'est également un aldéhyde assez stable vis-à-vis de l'oxydation, qui engendrerait des réactions parasites. Le cyclohexylisonitrile a été choisi car c'est l'un des seuls isonitriles disponibles dans le commerce et il est assez nucléophile et assez encombré pour éviter des réactions de polymérisation avec d'autres molécules d'isonitrile. C'est un bon compromis car il est plus flexible que le *tert*-butylisonitrile par exemple, trop encombré et par conséquent moins réactif. Le cyclohexylisonitrile possède en outre un proton en α du groupement isonitrile facilement repérable en RMN ¹H car son déplacement chimique (autour de 3,7 ppm) change dans le produit, ce qui est un atout pour suivre la réaction.

Des acides hyaluroniques dans deux gammes différentes de masses molaires ont été utilisés (10 kDa et 400 – 1000 kDa) et différents taux de marquage ont été obtenus en faisant varier les quantités de matière des réactifs, comme décrit dans le TABLEAU 3.3. La détermination du pourcentage de marquage est décrite dans le paragraphe 3.4.2 page 83.

3.4. MARQUAGE SUR LES FONCTIONS ACIDE CARBOXYLIQUE

TABLEAU 3.3 – Molécules synthétisées.

Molécule	MW HA (kDa)	% de marquage (IR) ^a	% de marquage (RMN) ^b
62	10	5 %	3–4 %
63	10	20 %	20 %
64	10	40 %	–
65	400 – 1000	20 %	–
66	400 – 1000	5 %	–

a : % de fonctionnalisation des acides carboxyliques déterminés par IR
b : % de fonctionnalisation des acides carboxyliques déterminés par RMN ¹H

Pour suivre l'avancement de la réaction facilement, la synthèse a été réalisée dans un solvant deutéré (D₂O/CD₃OD 1:1 v:v) et l'avancement suivi par RMN du proton. La FIGURE 3.18 présente les spectres de RMN de l'acide hyaluronique non marqué ainsi que de la sonde **59**.

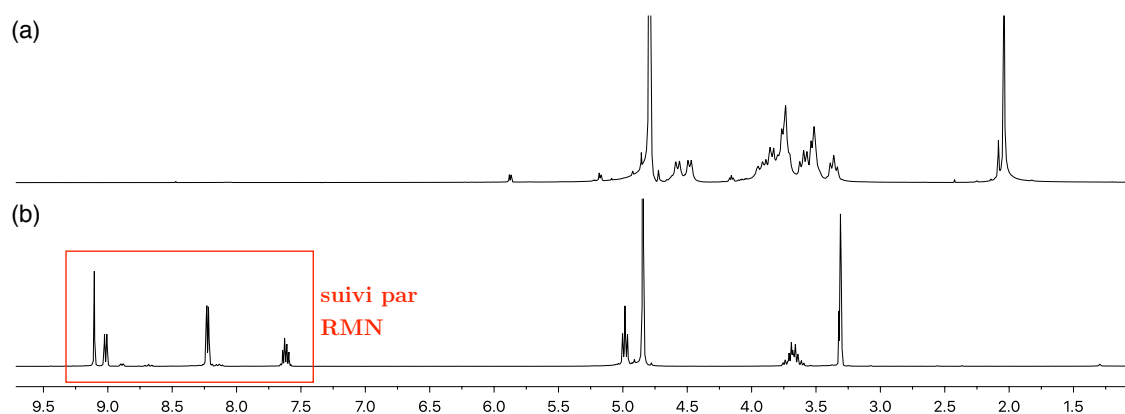


FIGURE 3.18 – Spectre de RMN ¹H (a) de l'acide hyaluronique non marqué (10 kDa) dans D₂O (b) de la sonde **59** dans CD₃OD.

L'évolution des signaux dans la région des protons aromatiques (7,5–9,5 ppm) attribués à la sonde a été suivie en fonction du temps (FIGURE 3.19).

La RMN a mis en évidence l'apparition de signaux élargis attribués à la sonde liée, alors que les signaux attribués à la sonde libre disparaissent, ce qui indique que la sonde a bien été couplée à l'acide hyaluronique. L'intensité de ces bandes en comparaison à celle des bandes attribuées au composé **59** a été suivie par RMN. Quand aucune évolution n'est observée, l'acide hyaluronique marqué a été purifié par filtration et lavage au méthanol sur une membrane perméable aux molécules de moins de 3000 g · mol⁻¹, afin d'éliminer les réactifs de faible masse molaire. La fraction contenant les acides hyaluroniques a ensuite été lyophilisée.

Caractérisations physico-chimiques

Les acides hyaluroniques marqués ont ensuite été caractérisés par spectroscopie infra-rouge : ils possèdent tous les bandes de vibration d'élongation caractéristiques des liaisons C≡O, appelées bandes E et A₁ autour de 1920 et 2025 cm⁻¹, correspondant respectivement aux vibrations antisymétrique et symétrique d'élongation.

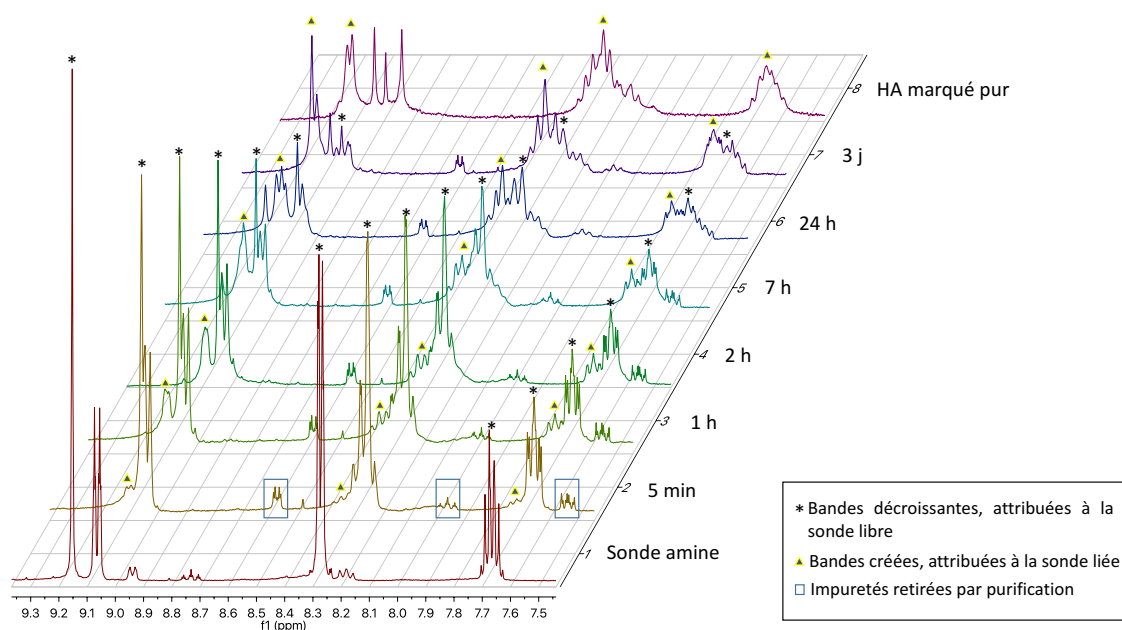


FIGURE 3.19 – Suivi par RMN de l'avancement de la réaction de UGI lors de la synthèse de **63**.

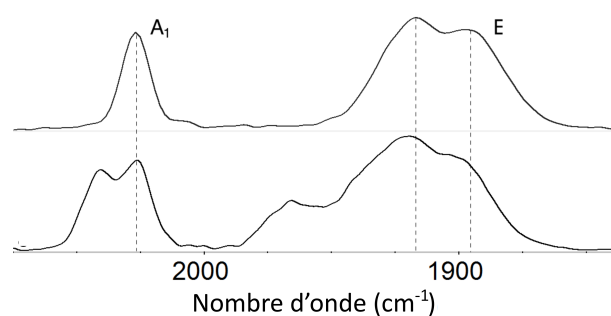


FIGURE 3.20 – Spectres infrarouge de **59** dans l'acétone (haut) et de **63** dans l'eau ($2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, bas) obtenus en mode réflexion totale atténuée (ATR) entre 1820 et 2075 cm^{-1} .

On observe la présence de plusieurs ensembles de bandes A_1 et E, comme indiqué FIGURE 3.20 dans le cas de **63**. Dans le cas des acides hyaluroniques marqués, il est tout à fait possible que la sonde SCoMPI une fois greffée se trouve dans différents environnements, selon qu'elle est enfouie ou à la surface du polymère.^{52,56} On a montré précédemment que la valeur du nombre d'onde en infrarouge dépend de la nature du solvant dans lequel se trouve la sonde. Cette variation est connue dans la littérature, avec des fréquences supérieures dans les environnements hydrophobes par rapport à des environnements hydrophiles.¹⁹³

Détermination de la quantité de sondes par acide hyaluronique

Le nombre de sondes greffées par unité monomérique (un acide D-glucuronique et une D-N-acétylglucosamine) a été évalué par RMN. La FIGURE 3.21 présente le spectre de RMN du composé **63** dans l'eau deutérée.

3.4. MARQUAGE SUR LES FONCTIONS ACIDE CARBOXYLIQUE

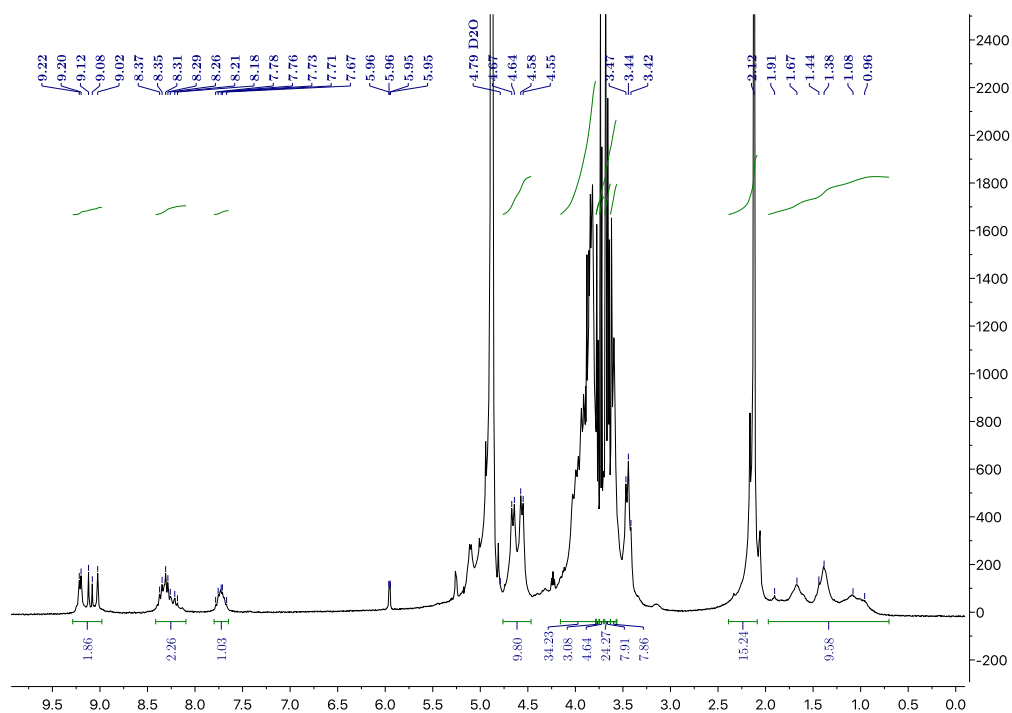


FIGURE 3.21 – Spectre de RMN ^1H du composé **63** dans l'eau deutérée après purification.

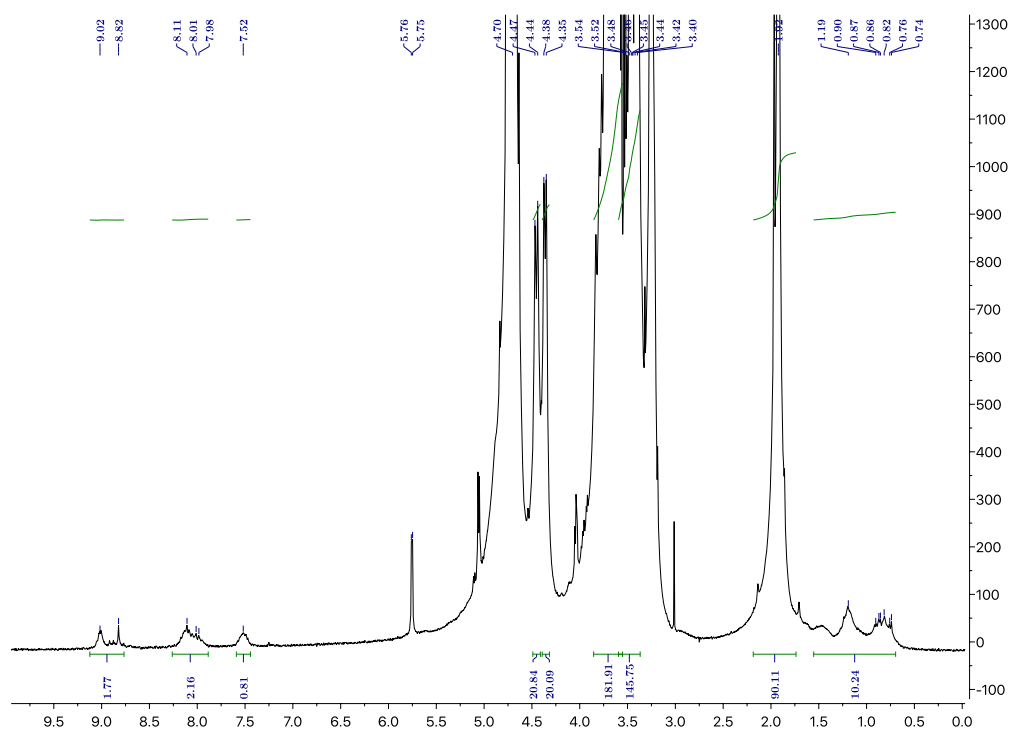


FIGURE 3.22 – Spectre de RMN ^1H du composé **62** dans l'eau deutérée après purification.

Afin de déterminer le taux de sondes par unité monomérique d'acide hyaluronique, chaque proton aromatique (7,5–9,5 ppm) attribué au ligand Pyta de la sonde $\text{Re}(\text{CO})_3$ a été intégré à 1. Les protons attribués au cyclohexyl (0,8–1,9 ppm) donnent une intégrale de 10, ce qui est concordant avec la structure de la molécule. Enfin, les signaux attribués à l'acide hyaluronique ont pu être déterminés par RMN : le signal le plus facile à étudier est celui attribué aux groupements méthyle CH_3 des fonctions amide des unités D-N-acétylglucosamine, obtenu sous la forme d'un singulet à 2,12 ppm. Dans le cas du composé **63**, l'intégration de ce signal donne une valeur de 15 ($5 \times \text{CH}_3$), ce qui signifie qu'en moyenne, la molécule possède une sonde $\text{Re}(\text{CO})_3$ pour 5 unités monomériques d'acide hyaluronique : cela correspond à un taux de marquage de 20 %.

Dans le cas du composé **62** (FIGURE 3.22), le signal attribué au groupement méthyle des fonctions amide indique une valeur de 90 ($30 \times \text{CH}_3$), ce qui indique un taux de marquage de 3,3%. En raison du faible taux de marquage de cette molécule, les signaux attribués à la sonde étaient peu intenses, ce qui rend la mesure moins précise.

En raison de la plus faible solubilité des autres composés (**64**, **65** et **66**), les signaux obtenus par RMN du proton étaient trop difficiles à interpréter. Par conséquent, une quantification par spectroscopie infrarouge à transformée de FOURIER (FTIR) a été réalisée.

Une courbe de calibration a été réalisée en mélangeant de l'acide hyaluronique de 10 kDa et l'amine **59** dans un mélange eau/éthanol en différentes proportions molaires en unité monomérique de HA/**59** : 99/1, 97/3, 95/5, 90/10, 75/25, 50/50 et 0/100. Pour chaque mélange, une goutte a été déposée sur l'ATR et le spectre IR correspondant a été enregistré après évaporation du solvant. Le rapport entre l'aire de la bande A_1 des fonctions carbonyle et celle des C-O des fonctions alcool et acétal a été mesuré (FIGURE 3.23), puis tracé en fonction du pourcentage molaire de **59** dans les différents mélanges (FIGURE 3.24). La même approche quantitative a déjà été utilisée.^{40,59}

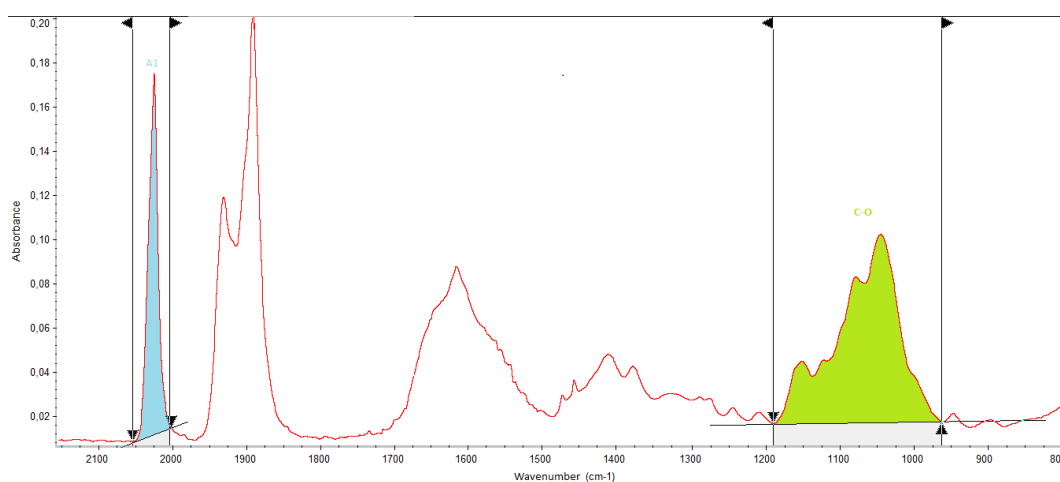


FIGURE 3.23 – Spectre infrarouge d'un mélange **59**/HA 50/50 déposé en mode ATR et évaporé, et intégration des bandes A_1 des fonctions carbonyle et C-O des fonctions alcool et acétal à l'aide du logiciel Omnic.

3.4. MARQUAGE SUR LES FONCTIONS ACIDE CARBOXYLIQUE

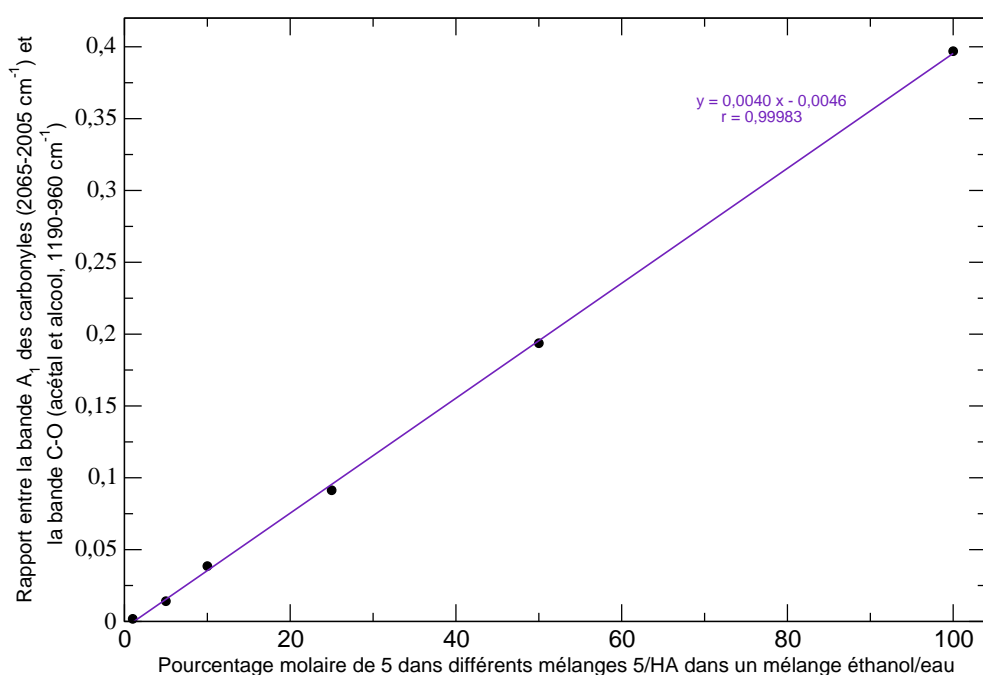


FIGURE 3.24 – Droite de calibration pour la détermination du nombre de sondes greffées sur l'acide hyaluronique : représentation graphique du rapport entre l'intégration de la bande de vibration d'élongation A₁ dans **59** et la bande C-O (1190–960 cm⁻¹) attribuée aux fonctions alcool et acétal de l'acide hyaluronique en fonction du % molaire de **59** dans différents mélanges **59**/HA dans un mélange eau/éthanol.

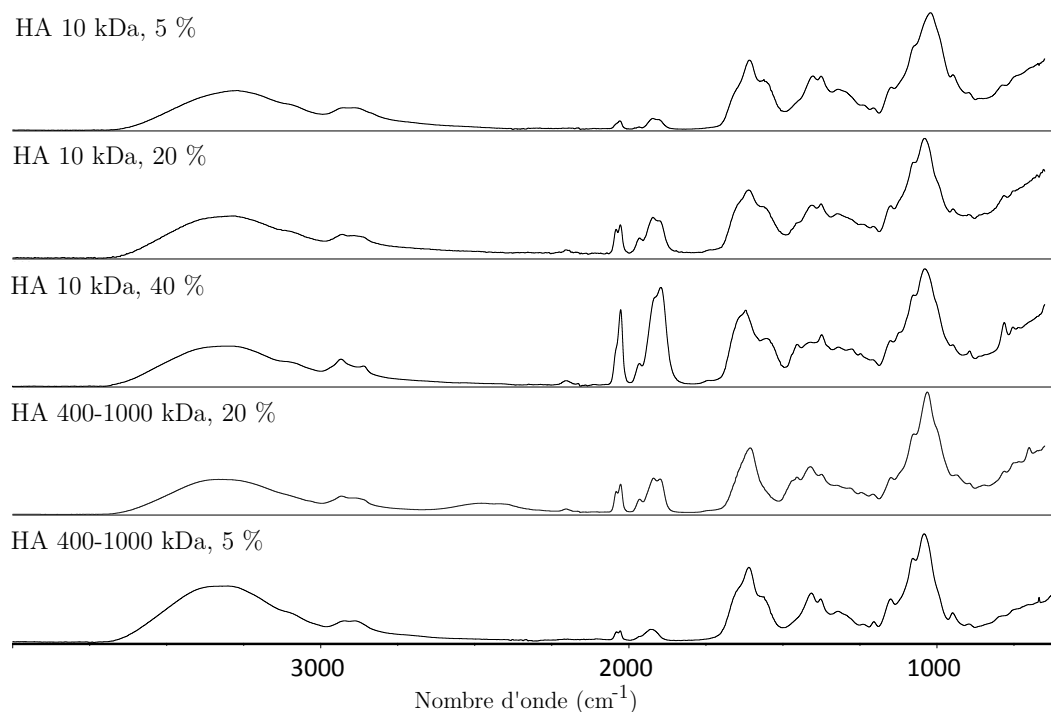


FIGURE 3.25 – Spectres infrarouge des acides hyaluroniques marqués.

La région des bandes de vibration d'élongation des liaisons simples C-O a été choisie car ces fonctions ne sont pas modifiées par le couplage de UGI. Les spectres IR des acides hyaluroniques marqués lyophilisés ont ensuite été enregistrés (FIGURE 3.25) et les rapports des aires des deux zones d'intérêt permettent de remonter au taux de marquage grâce à la droite de calibration.

Dans le cas des molécules **62** et **63**, les taux de marquage déterminés par infrarouge étaient concordants avec les signaux obtenus par RMN du proton, ce qui valide cette approche (FIGURE 3.21 et FIGURE 3.22). Cette méthode a donc été appliquée aux acides hyaluroniques moins solubles pour lesquels la quantification par RMN n'était pas possible.

3.5 Pénétration percutanée et imagerie multimodale

3.5.1 Pénétration de la molécule à travers la peau (expérience réalisée par Cécile Laugel)

Les molécules d'acide hyaluronique marqué ont été dissoutes dans de l'eau distillée à une concentration de $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ et $200 \mu\text{L}$ ont été déposés sur la surface de biopsies de peau. Après une exposition de 7 ou 24 heures, les échantillons de peau ont été collectés et lavés avec un coton imbibé de $200 \mu\text{L}$ de liquide récepteur (voir description de la cellule de FRANZ paragraphe 3.1.3 page 66). Les biopsies ont ensuite été congelées à -20°C et des coupes d'épaisseur $10 \mu\text{m}$ ont été réalisées. Ces dernières ont été montées sur des lamelles de fluorure de calcium (CaF_2) et séchées quelques jours à l'air avant les mesures de spectromicroscopie FTIR.

3.5.2 Imagerie infrarouge et de fluorescence

La distribution des acides hyaluroniques marqués a été étudiée par spectromicroscopie FTIR (FTIR-SM) avec ou sans rayonnement synchrotron à la ligne SMIS du synchrotron SOLEIL, en collaboration avec Christophe SANDT. Pour les échantillons imagés avec le rayonnement synchrotron, l'abréviation SR- pour *synchrotron radiation* sera utilisée (SR-FTIR-SM).

Pour chaque échantillon, des spectres de 128 scans avec une résolution spectrale de 8 cm^{-1} entre 800 et 4000 cm^{-1} ont été enregistrés sur une zone d'intérêt de la peau et des cartes ont été générées par intégration de bandes spécifiques : la bande A_1 des fonctions de type carbonyle ($2065-2005 \text{ cm}^{-1}$) pour localiser les acides hyaluroniques marqués et la bande correspondant à la vibration d'élongation des liaisons C-H des groupements CH_2 ($2868-2838 \text{ cm}^{-1}$). En effet, les zones possédant une forte concentration en CH_2 sont caractéristiques d'une couche riche en lipides, qui correspond au *stratum corneum*.^{53,194} Les aires des pics ont été intégrées avec le logiciel Omnic, comme sur la FIGURE 3.26 qui illustre l'intégration de la bande A_1 des fonctions carbonyle. Le même procédé a été utilisé pour les bandes CH_2 et les fonctions amide.

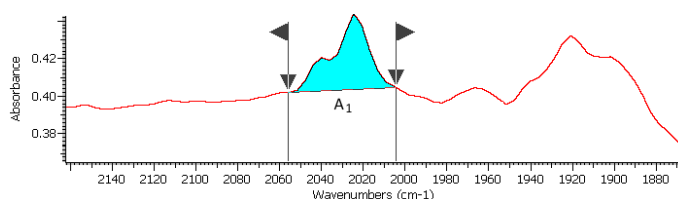


FIGURE 3.26 – Spectre infrarouge à transformée de FOURIER du composé **63** lyophilisé et intégration de la bande A₁ des carbonyle dans le composé **63** à l'aide du logiciel Omnic.

Après avoir été étudiées par (SR)-FTIR-SM, les coupes de peau ont été imagées en microscopie de fluorescence (ex. 350/50x, em. 560/80m), puis 2 μ L d'une solution de Hoechst ont été déposés sur les zones imagées afin de mettre en évidence les noyaux présents dans l'épiderme viable (ex. 350/50x, em. 460/50m).¹⁸⁰ Le Hoechst a été choisi en raison de son spectre d'émission (maximum à 461 nm, voir FIGURE 3.7b page 66) qui possède un faible recouvrement avec le SCoMPI (maximum vers 530 nm).

3.5.3 Résultats

Après une exposition de 24 heures, le composé **62** était difficilement détectable par spectroscopie infrarouge mais a pu être détecté par microscopie de fluorescence en certains points. Son accumulation est faible et non homogène (FIGURE 3.27).

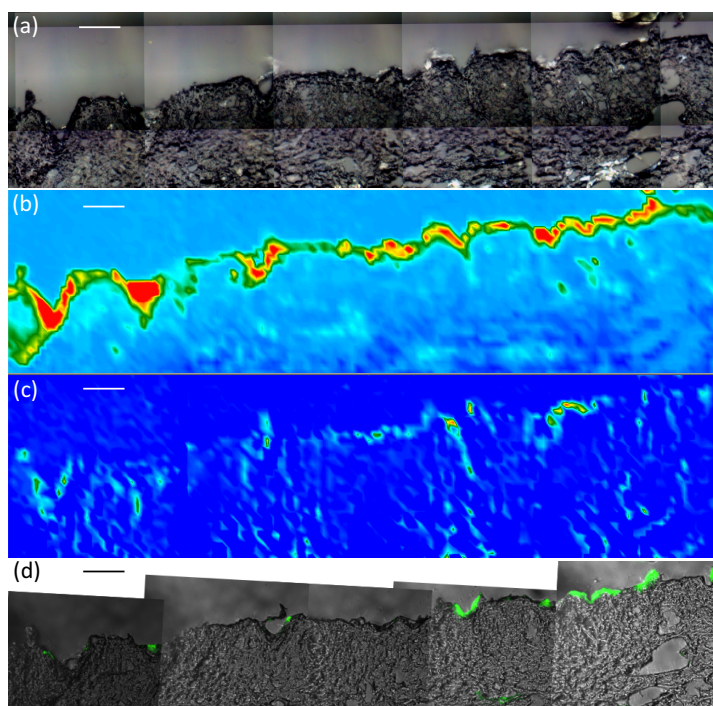


FIGURE 3.27 – Carte d'une coupe de peau de 10 μ m d'épaisseur après une exposition de 24 heures au composé **62**, puis montée sur une lamelle de CaF₂ (Barre d'échelle = 100 μ m). (a) Image visible, (b-c) Images FTIR-SM obtenues par intégration de bandes d'absorption spécifiques : (b) CH₂ (2868–2838 cm⁻¹), (c) Bande A₁ (2055–2005 cm⁻¹), le code couleur allant du bleu (faible intensité) au rouge (forte intensité), (d) Image visible superposée au signal de fluorescence de **62** (ex. 350/50x, em. 560/80m).

Le taux de marquage de ce composé (5%) et sa concentration étaient probablement trop faibles pour qu'il soit détecté par infrarouge. Par conséquent, le composé **63**, avec un taux de marquage environ 4 fois plus important, a été étudié. Sa distribution dans la peau après une exposition de 7 heures a pu être déterminée et s'est révélée inhomogène : en effet, des zones de forte accumulation ainsi que de larges zones sans produit ont été mises en évidence (FIGURE 3.28).

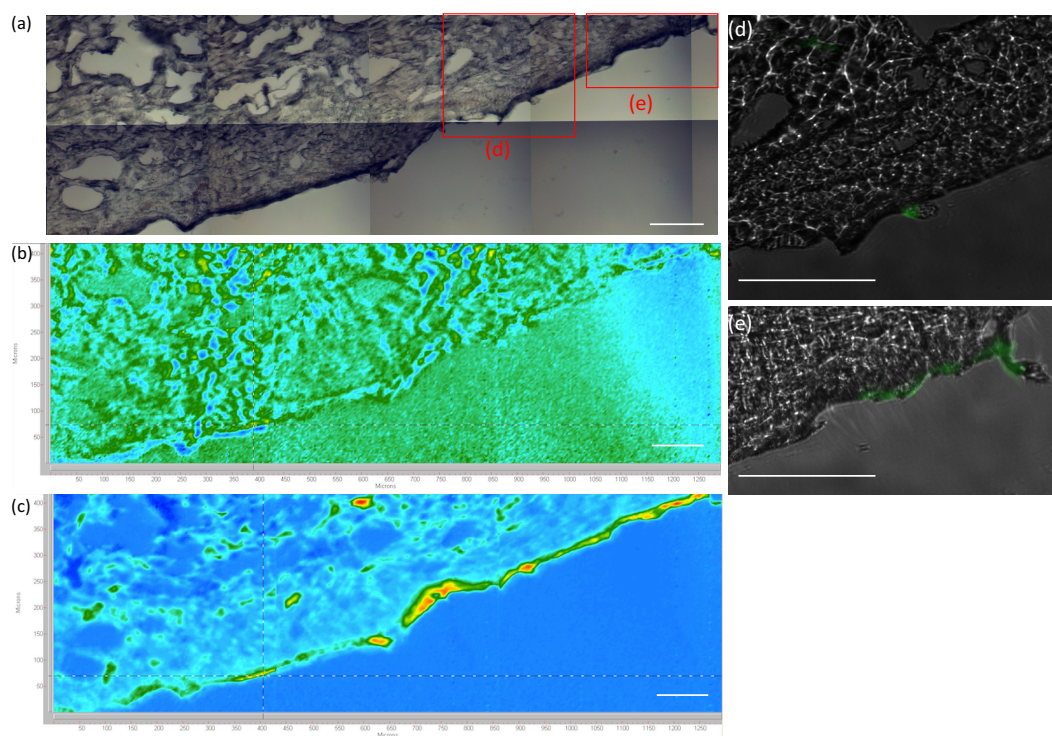


FIGURE 3.28 – Carte d'une coupe de peau de 10 µm d'épaisseur après une exposition de 7 heures au composé **63**, puis montée sur une lamelle de CaF₂ (Barre d'échelle = 100 µm). (a) Image visible, (b-c) Images FTIR-SM obtenues par intégration de bandes d'absorption spécifiques : (b) Bande A₁ (2055–2005 cm⁻¹), (c) CH₂ (2868–2838 cm⁻¹), le code couleur allant du bleu (faible intensité) au rouge (forte intensité), (d-e) Image visible superposée au signal de fluorescence de **63** (ex. 350/50x, em. 560/80m).

En revanche, après 24 heures, un signal intense et homogène a été observé dans le *stratum corneum* par imagerie de fluorescence et par imagerie IR, mis en évidence par intégration des bandes attribuées aux vibrations d'élongation des liaisons C-H des CH₂ (autour de 2850 cm⁻¹). Un signal d'intensité plus faible a été observé dans l'épiderme viable, marqué à l'aide d'une solution de Hoechst (FIGURE 3.29).

L'analogue de plus grande masse molaire (400–1000 kDa), avec un pourcentage de marquage de 5% (composé **66**), a été étudié et a montré une répartition inhomogène du produit après 24 heures (FIGURE 3.30), sans doute liée à une faible solubilité.

Les composés **64** et **65** n'étaient pas assez solubles dans l'eau pour une application cutanée.

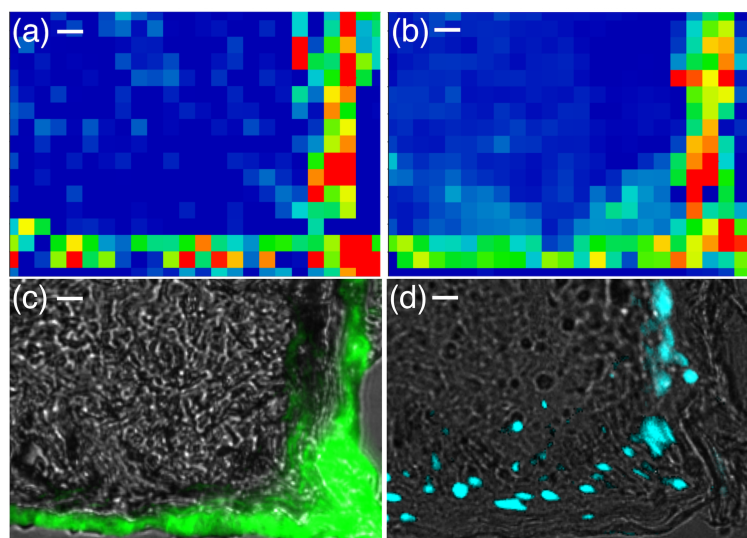


FIGURE 3.29 – Carte d’une coupe de peau de 10 µm d’épaisseur après une exposition de 24 heures au composé **63**, puis montée sur une lamelle de CaF₂ (Barre d’échelle = 10 µm). (a-b) Images SR-FTIR-SM obtenues par intégration de bandes d’absorption spécifiques : (a) Bande A₁ (2055–2005 cm⁻¹), (b) CH₂ (2868–2838 cm⁻¹), le code couleur allant du bleu (faible intensité) au rouge (forte intensité), (c-d) Image visible superposée avec (c) Le signal de fluorescence de **62** (ex. 350/50x, em. 560/80m) et (d) Marquage des noyaux (Hoechst, bleu, ex. 350/50x em. 460/50m).

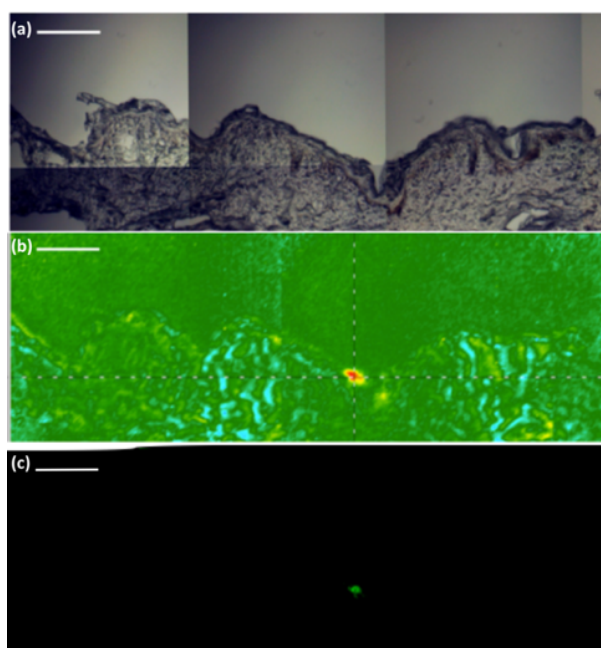


FIGURE 3.30 – Carte d’une coupe de peau de 10 µm d’épaisseur après une exposition de 24 heures au composé **66**, puis montée sur une lamelle de CaF₂ (Barre d’échelle = 100 µm). (a) Image visible, (b) Image FTIR-SM obtenue par intégration de la bande A₁ (2055–2005 cm⁻¹), le code couleur allant du bleu (faible intensité) au rouge (forte intensité), (c) Signal de fluorescence de **66** (ex. 350/50x, em. 560/80m).

La spectromicroscopie infrarouge à transformée de FOURIER peut aussi être utilisée pour étudier des modifications de la structure des lipides ou des protéines dans les zones de forte concentration en acide hyaluronique, après pénétration de **63**. La bande autour de 2850 cm^{-1} (CH_2) attribuée aux chaînes lipidiques est spécifique de l'organisation des lipides,^{171,172} alors que la bande amide I peut être analysée pour mettre en évidence une modification de la structure des protéines.¹⁹⁵ Des spectres ont été enregistrés à la surface de la peau exposée à **63** pendant 24 heures, à des points correspondant à des intensités variables de la bande A_1 (FIGURE 3.31a), ainsi qu'à la surface de coupes de peau non exposées à l'acide hyaluronique (FIGURE 3.31b). Il est indispensable de mesurer des spectres sur plusieurs zones afin d'être représentatif de la structure moyenne du *stratum corneum*, car ce dernier peut présenter des inhomogénéités.

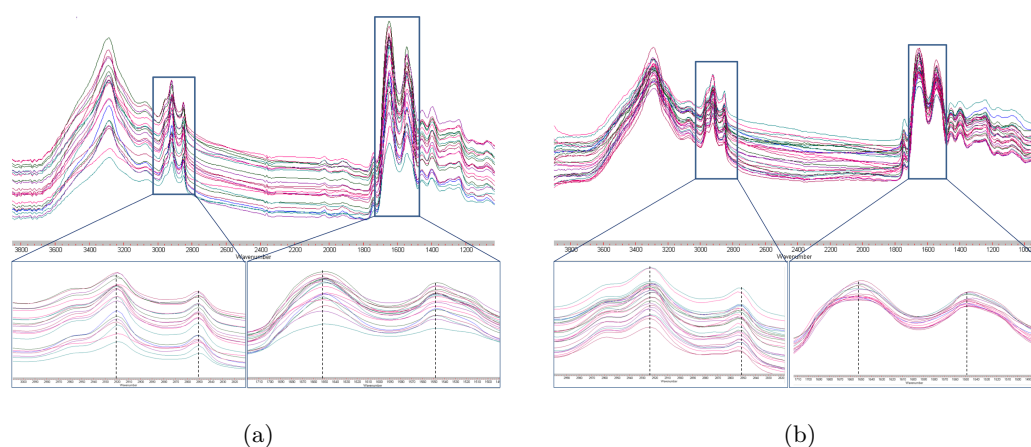


FIGURE 3.31 – Spectres IR enregistrés dans le *stratum corneum* d'une coupe de peau de $10\ \mu\text{m}$ d'épaisseur montée sur lamelle de CaF_2 , entre 1000 et 3800 cm^{-1} et agrandissement dans les régions $2820\text{--}2990\text{ cm}^{-1}$ (lipides) et $1500\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ (protéines) (a) après une exposition de 24 heures au composé **63**, (b) non exposée à l'acide hyaluronique.

Aucune variation ni dans la position ni dans la forme de la bande n'a pu être observée à 2850 et $1500\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$, ce qui indique que **63** n'induit aucune modification de l'organisation des lipides et des protéines repérable en spectroscopie infrarouge.

3.6 Conclusion

Des acides hyaluroniques de différentes masses molaires ont pu être marqués par un SCoMPI avec différents taux de marquage grâce à une réaction de UGI, qui présente l'avantage d'être quantitative dans l'eau et de ne produire aucun sous-produit. Leur pénétration à travers des biopsies de peau humaine a pu être étudiée par imagerie multimodale. Le taux de marquage s'est avéré être un paramètre important pour détecter le produit. Un autre paramètre à considérer concerne les propriétés physico-chimiques. Si le taux de marquage est trop faible, la molécule ne peut être détectée (cas de **62**, 10 kDa , $3\text{--}4\%$) mais s'il est trop élevé, la molécule n'est alors plus soluble dans l'eau et ne peut plus pénétrer dans la peau (cas de **64**, 10 kDa , 40% et **65**, $400\text{--}1000\text{ kDa}$, 20%). Après une exposition de 7 heures, **63** (10 kDa , 20%) n'a été localisé qu'à certains points du *stratum corneum* alors que **66** ($400\text{--}1000\text{ kDa}$, 5%) n'était pas détecté. En revanche,

après 24 heures, **63** était distribué de manière homogène dans le *stratum corneum* et très légèrement observé dans l'épiderme viable, mais n'a pas été détecté dans les couches plus profondes de la peau, alors que **66** n'a pu être détecté que dans certaines zones du *stratum corneum*. Ces résultats sont récapitulés dans le TABLEAU 3.4.

La pénétration est donc largement dépendante de la taille de l'acide hyaluronique. Elle semble n'induire aucune modification de la structure de la peau d'après le suivi des bandes des lipides et des amides en infrarouge. La molécule pénètre dans le *stratum corneum*, mais n'atteint pas le derme, ce qui en fait un agent intéressant pour une application cosmétique.

TABLEAU 3.4 – Distribution des différents composés dans la peau.

Molécule (MW HA, % de marquage)	Soluble dans l'eau	Après 7 h	Après 24 h
62 (10 kDa, 5 %)	Oui	Non observé	Points chauds observés par IR et fluorescence dans le SC
63 (10 kDa, 20 %)	Oui	À peine détectable en IR, points chauds observés par fluorescence dans le SC	Répartition homogène dans le SC et faible quantité dans l'épiderme viable
64 (10 kDa, 40 %)	Non	–	–
65 (400-1000 kDa, 20 %)	Non	–	–
66 (400-1000 kDa, 5 %)	Oui	Non observé	Répartition inhomogène, points chauds dans le SC

Chapitre 4

L'AFM-IR et ses applications

4.1 Présentation d'une méthode d'imagerie : l'AFM-IR

4.1.1 La microscopie à force atomique (AFM)

La microscopie à force atomique est une microscopie à sonde locale à très haute résolution inventée en 1986 par les chercheurs d'IBM Gerd BINNIG, Calvin QUATE et Christoph GERBER. L'AFM permet l'analyse point par point d'une surface par une sonde constituée d'une pointe nanométrique, positionnée à l'extrémité d'un micro-levier flexible, ce qui permet d'observer des objets à très grande échelle.¹⁹⁶⁻¹⁹⁸

Le principe de cette technique est de mesurer l'interaction (attractive ou répulsive) entre les atomes qui constituent la pointe et ceux à la surface d'un échantillon. Cette interaction est responsable de la déviation du levier, qui est analysée à l'aide d'un laser (FIGURE 4.1).¹⁹⁹

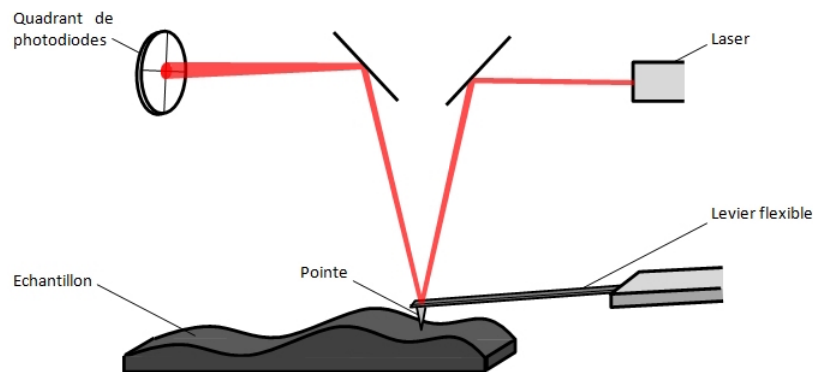


FIGURE 4.1 – Dispositif d'un microscope AFM.

4.1.2 Les différents modes de fonctionnement

Le mode contact utilise les forces répulsives. La pointe appuie légèrement sur la surface, elle est donc repoussée du fait du principe de PAULI et le levier est infléchi. L'appareil mesure alors la déviation, ce qui donne accès à la hauteur de l'échantillon et permet d'effectuer la rétroaction, utilisée en AFM pour garder le levier à une position constante.^{199,200}

Le mode *tapping* ou contact intermittent est le plus utilisé : il s'agit de faire vibrer le levier à sa fréquence propre de résonance (de l'ordre de 50-100 kHz), avec une certaine amplitude. Lorsque la pointe interagit avec la surface, l'amplitude d'oscillation du levier diminue. L'appareil mesure cette différence d'amplitude, ce qui permet d'obtenir des informations sur l'échantillon à analyser comme sa hauteur locale. Un rétrocontrôle est ensuite effectué pour ajuster la hauteur de l'échantillon et poursuivre les mesures afin de minimiser l'usure de la pointe.^{199,200}

Le mode non contact ou modulation de fréquence utilise les forces attractives. La pointe ne touche pas l'échantillon et le levier oscille avec une fréquence proche de ou égale à sa fréquence de résonance. La pointe est gardée à une distance fixe de l'échantillon et la déviation du levier n'est due qu'aux interactions attractives entre la pointe et l'échantillon. C'est un mode de fonctionnement essentiellement utilisé sous vide.^{199,200}

4.1.3 Couplage de la microscopie à force atomique (AFM) et de la spectroscopie infrarouge (IR) : AFM-IR

La spectroscopie infrarouge est l'une des techniques d'analyse les plus puissantes et les plus utilisées. Elle permet de sonder les vibrations moléculaires d'une large variété d'échantillons, permettant ainsi d'identifier des fonctions chimiques particulières. Historiquement, la spectroscopie IR est souvent couplée à la microscopie optique pour réaliser des mesures localisées dans l'espace, mais comme précisé dans le chapitre 1, l'inconvénient majeur de la microspectroscopie infrarouge est la mauvaise résolution spatiale due à la diffraction de la lumière.

Il y a une dizaine d'années, une nouvelle technique, appelée AFM-IR, a été développée et brevetée par Alexandre DAZZI.^{201,202} Elle permet de coupler la résolution spatiale de la microscopie à force atomique (AFM) et la capacité d'analyse chimique de la spectroscopie infrarouge (IR).^{66,202-204} Cette technique permet de localiser des composés grâce à leur signature IR avec une résolution qui est celle de l'AFM (10 à 50 nm).^{66,205-208} Cette technique permet de réaliser de l'imagerie chimique en traçant des cartes d'absorption dans l'IR à une longueur d'onde donnée. Elle permet aussi d'enregistrer des spectres infrarouge locaux en des points fixes (FIGURE 4.2).

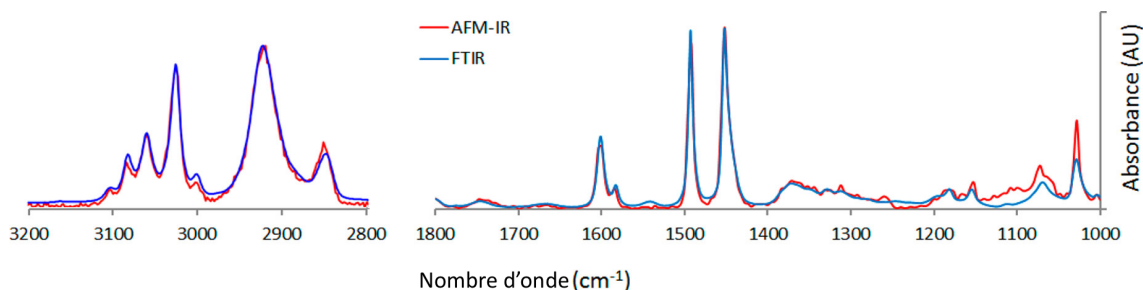


FIGURE 4.2 – Comparaison de spectres de polystyrène obtenus par AFM-IR (rouge) et FT-IR (bleu).^{66,204}

L'équipe d'Alexandre DAZZI l'a particulièrement développée pour cartographier des systèmes biologiques à l'échelle de la cellule unique en réalisant des cartes de composés endogènes (ADN, protéines, lipides, virus) dans des échantillons biologiques (cellules, bactéries).^{43,203,209-211} Avec l'équipe de Clotilde POLICAR, ils ont aussi montré en 2011 la possibilité de cartographier des molécules exogènes internalisées après incubation.⁴⁰

Cette technique met à profit l'effet photothermique. Un échantillon d'intérêt est illuminé grâce à un laser IR pulsé à une longueur d'onde correspondant à une bande d'absorption de l'objet à imager. Lorsque l'onde IR est absorbée par une molécule, celle-ci passe dans un état vibrationnel excité. La seule dissipation est alors thermique : c'est l'effet photothermique, qui se traduit par une augmentation locale de la température.²⁰⁴ Ce phénomène provoque une dilatation instantanée locale et une déformation que l'on détecte en AFM-IR par une pointe AFM. La dilatation thermique augmente jusqu'à la fin de l'impulsion laser : la pointe AFM subit un choc et le levier se met alors à osciller selon ses modes propres. Puis la température de l'échantillon décroît de manière exponentielle jusqu'à atteindre la température ambiante, à une vitesse qui dépend des propriétés thermiques de l'échantillon (FIGURE 4.3).⁶⁶ Le levier revient au repos avant une nouvelle impulsion du laser qui opère à une fréquence de 1 kHz à 1 MHz selon le laser.

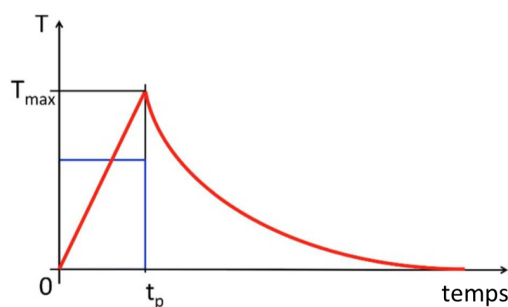


FIGURE 4.3 – Évolution de la température de l'échantillon (rouge) illuminé par une impulsion laser (bleu), dans le cas où la dilatation thermique est plus longue que l'illumination par le laser. L'augmentation de température est linéaire durant l'impulsion puis décroît de manière exponentielle.⁶⁶

L'analyse des oscillations du levier permet de déduire l'absorption locale de l'échantillon. L'amplitude de ces oscillations est directement liée à la quantité de radiations infrarouge absorbées par l'échantillon.^{204,206,212} Ainsi, les spectres d'absorption obtenus par cette technique sont similaires à ceux obtenus en transmission (FT-IR), car la technique AFM-IR mesure la même chose - à savoir la quantité de lumière absorbée - comme indiqué FIGURE 4.2.

Deux dispositifs existent actuellement. Dans le premier, appelé nanoIR1, l'échantillon est monté sur un prisme en sélénure de zinc (ZnSe), transparent au rayonnement infrarouge, afin qu'il puisse être excité par une onde évanescente à un angle de 45° par rapport à la surface. Comme pour la technique ATR (réflexion totale atténuée), l'échantillon est illuminé en réflexion totale interne (FIGURE 4.4). L'échantillon peut aussi être préparé sur une lamelle de fluorure de calcium (CaF_2), transparente elle aussi dans l'IR, que l'on met au contact du prisme : cela est plus simple pour préparer des échantillons de cellules en culture.⁴⁹

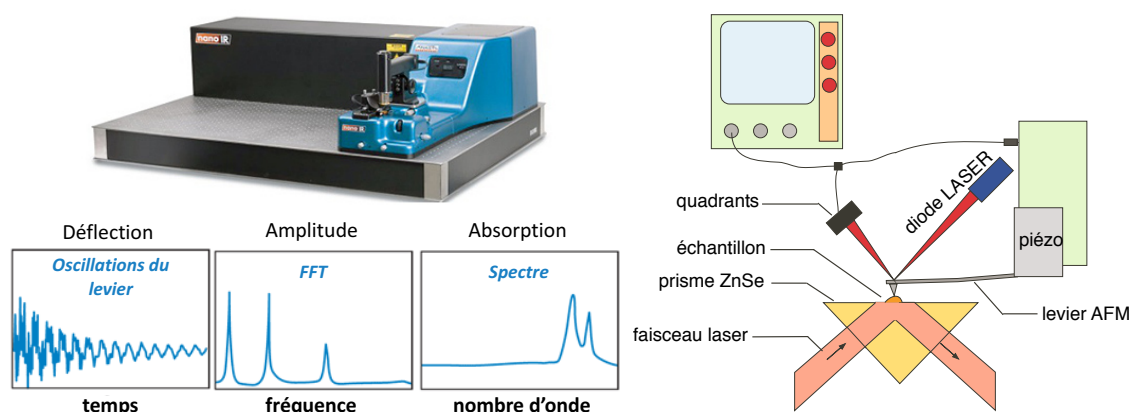


FIGURE 4.4 – Dispositif du nanoIR1 (adapté de la littérature).²¹⁰ L'instrument utilise une source laser infrarouge pulsée fondée sur un oscillateur paramétrique optique (OPO). Si la longueur d'onde du laser correspond à une bande d'absorption en infrarouge, la lumière absorbée induit un effet photothermique.^{66,203,204}

Différentes sources peuvent être utilisées : le rayonnement synchrotron, un laser constitué d'un oscillateur paramétrique optique (OPO), ou un laser à cascade quantique (QCL) qui est un laser à semi-conducteur. La source OPO ($4000-1000\text{ cm}^{-1}$) permet l'observation d'échantillons de l'ordre de 50 à 100 nm avec une résolution spectrale de l'ordre de $4-8\text{ cm}^{-1}$. Une pulsation de 5 à 20 ns est produite avec une fréquence de 1 kHz maximum. La durée de la pulsation et le temps de relaxation associé à la diffusion thermique sont inférieurs au temps de réponse du levier ($10-50\text{ }\mu\text{s}$). La fréquence de 1 kHz correspond à une excitation du levier toutes les 1 ms. Étant donné que le levier retourne à sa position initiale au bout de 0,5 ms, chaque pulsation agit de manière indépendante sur le levier, comme expliqué plus haut.

La source QCL peut émettre de l'infrarouge moyen à l'infrarouge lointain ($1960-1350\text{ cm}^{-1}$) avec une résolution spectrale inférieure à 1 cm^{-1} . Bien que sa plage de nombres d'ondes accessibles soit plus limitée ($1960-1350\text{ cm}^{-1}$), le laser QCL est très intéressant pour l'AFM-IR car il possède une fréquence élevée (1 MHz). Ainsi, il est possible de synchroniser sa fréquence avec les fréquences de résonance du levier : c'est le mode résonant. Avec ces conditions, le levier oscille de manière continue à la fréquence choisie, ce qui produit une excitation plus efficace et par conséquent permet d'obtenir une meilleure sensibilité.

Les inconvénients du nanoIR1 sont que ce dispositif n'est optimal que pour des échantillons de moins de $1\text{ }\mu\text{m}$ d'épaisseur s'ils sont montés sur le prisme de ZnSe (mais sans limite d'épaisseur sur lamelles de CaF_2) et une bonne adhésion de l'échantillon au prisme ou aux lamelles de CaF_2 est nécessaire car l'utilisation se fait en mode contact : la pointe peut entraîner un échantillon qui a une mauvaise adhérence. Récemment, un nouveau dispositif appelé nanoIR2 et qui permet une illumination directe par le laser par le dessus a été développé (FIGURE 4.5). Un de ses avantages est qu'il possède un mode *tapping*, ce qui est idéal pour des échantillons épais ou pour des nanoparticules qui peuvent se déplacer sous la pointe en mode contact.

4.2. ÉTUDE PAR IR DE FERROCIFÈNES MARQUÉS PAR UNE SONDE $\text{Re}(\text{CO})_3$



FIGURE 4.5 – Dispositif du nanoIR2 (d'après une présentation de A. DAZZI).

4.2 Marquage de ferrocifènes par une unité $\text{Re}(\text{CO})_3$ et étude par spectroscopie infrarouge

4.2.1 Développement de complexes organométalliques pour le traitement du cancer du sein

Le cancer du sein est un des cancers féminins les plus fréquents : il touche une femme sur 8 et 60000 nouveaux cas sont recensés chaque année en France.²¹³ Le tamoxifène (*Z*-2-[4-(1,2-diphényl-1-butényl)phénoxy]-*N,N*-diméthyléthanamine), découvert à la fin des années 1950 par Arthur WALPOLE, est la molécule la plus souvent prescrite à des patientes diagnostiquées d'un cancer du sein hormono-dépendant, c'est-à-dire un cancer dans lequel le récepteur de l'œstrogène (ER) est impliqué (ER+). L'action antiproliférative de la forme hydroxylée du tamoxifène, l'hydroxytamoxifène, provient d'un effet anticœstrogénique dû à une liaison compétitive au récepteur de l'œstrogène, qui réprime la transcription de l'ADN provoquée par l'œstradiol (FIGURE 4.6).²¹⁴

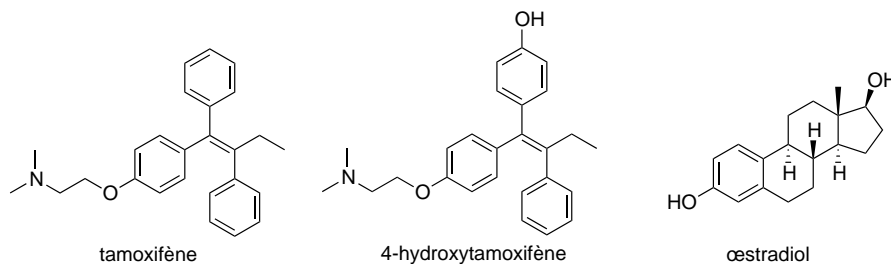


FIGURE 4.6 – Structures du tamoxifène, de l'hydroxytamoxifène et de l'œstradiol.

Malheureusement, certaines cellules cancéreuses du sein sont résistantes au tamoxifène, soit parce qu'elles n'expriment pas le récepteur de l'œstrogène (ER-), soit parce qu'elles ont développé une résistance en raison d'une exposition prolongée aux molécules cytotoxiques.²¹⁵

La découverte des propriétés anticancéreuses du *cis*-platine ($\text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$) dans les années 1960 a révolutionné le traitement du cancer des testicules²¹⁶ et a mené à une augmentation de la recherche de complexes organométalliques servant d'agents antitumoraux.²¹⁷⁻²²⁰ En revanche, le *cis*-platine n'est jamais prescrit pour le traitement du cancer du sein en raison de sa faible efficacité sur ce type de cellules. Ainsi, des complexes dérivés du *cis*-platine et possédant une bonne affinité pour le récepteur à l'œstrogène ont été synthétisés (FIGURE 4.7).²²¹⁻²²³

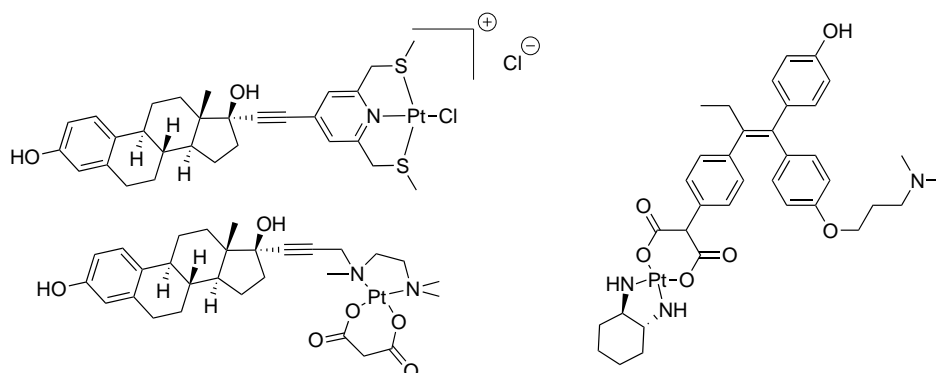


FIGURE 4.7 – Composés dérivés du *cis*-platine et possédant une bonne affinité pour le récepteur à l'œstrogène. ²²¹⁻²²³

Cependant, aucun de ces complexes n'a produit d'effet positif quant au ciblage de cellules de cancer du sein hormono-dépendant.

Pour lutter contre les deux formes de cancer du sein, des molécules possédant les deux fonctions (anti-œstrogénécité et cytotoxicité indépendante des œstrogènes) ont été développées. Ainsi, lorsqu'un groupement phényle d'un composé de type tamoxifène est remplacé par un ferrocène (FIGURE 4.8), l'hydroxyferrocifène alors obtenu possède une toxicité supérieure à l'hydroxytamoxifène correspondant, en raison de la cytotoxicité du cation ferrocénium $\text{Fc}^{\bullet+}$. ²²⁴

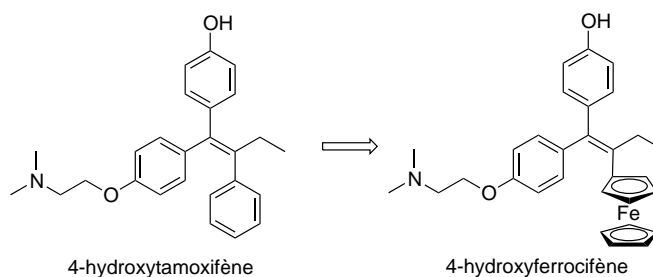


FIGURE 4.8 – Remplacement d'un groupement phényle du 4-hydroxyferrocifène par un ferrocène. ²²⁴

Le métal de l'unité organométallique peut être modifié : des dérivés avec du ruthénium ²²⁵ ou du rhénium ²²⁶ ont également été synthétisés. Ces complexes organométalliques sont stables en milieu biologique et sont solubles dans l'éthanol et le DMSO, ce qui est intéressant pour des applications biologiques. Ils ont une bonne affinité pour les deux formes du récepteur de l'œstrogène et possèdent une lipophilicité supérieure à l'œstradiol ou à l'hydroxytamoxifène.

4.2.2 Étude précédente sur des dérivés du tamoxifène

Dans la famille des ferrocifènes, le complexe diphenol **67** (FIGURE 4.9) a été décrit comme l'une des molécules les plus efficaces ayant un effet antiprolifératif, à la fois *in vitro* sur différentes lignées cellulaires ($\text{IC}_{50} = 0,65 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dans des cellules cancéreuses MDA-MB-231) et *in vivo* sur l'inhibition de la croissance de gliomes. ²²⁷

4.2. ÉTUDE PAR IR DE FERROCIFÈNES MARQUÉS PAR UNE SONDRE $\text{RE}(\text{CO})_3$

Plus récemment, un autre complexe, l'hydroxypropylferrociphénol **69** (FIGURE 4.9), a montré un effet antiprolifératif *in vitro* sur cellules MDA-MB-231 supérieur à celui de **67** ($\text{IC}_{50} = 0,11 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).²²⁸ Cependant, même si de nombreuses études ont mis en avant l'activité biologique des ferrocifènes, leur mécanisme d'action n'est toujours pas totalement élucidé. Une étude récente a montré que différents mécanismes d'action pouvaient être mis en jeu.²²⁹

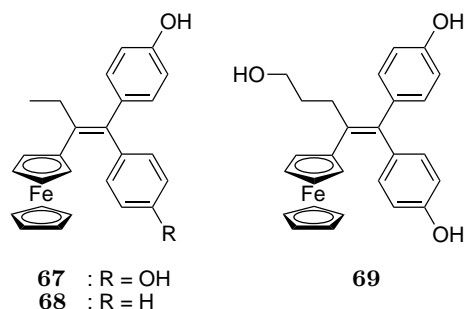


FIGURE 4.9 – Structures de ferrociphénols (**67** et **68**) et de l'hydroxypropylferrociphénol (**69**).

Afin de détecter des molécules d'intérêt dans des cellules, de nombreux marqueurs greffables ont été développés; la plupart d'entre eux sont des marqueurs fluorescents.²³⁰ Cependant, les ferrocènes sont connus pour éteindre la luminescence,¹¹⁶ ce qui peut empêcher l'application de cette méthode dans ce cas. D'autres techniques spectroscopiques d'imagerie n'impliquant pas l'émission d'états excités peuvent être envisagées. C'est le cas de la spectroscopie infrarouge qui se révèle être une méthode de choix.^{17,53} L'équipe de Clotilde POLICAR a développé l'utilisation de la spectroscopie IR et des sondes IR utilisables dans ce contexte. Elle a montré que l'utilisation de groupements de type métal-tricarbylène permet de marquer et de localiser des composés d'intérêt en milieu cellulaire, en raison des bandes de vibrations d'élongation symétrique (bande A_1) et antisymétrique (bande E dédoublée) situées dans la fenêtre transparente des cellules (entre 1800 et 2100 cm^{-1}).^{40,45} Cette méthode a été initialement appliquée au 1,1-di(4-hydroxyphényl)-2-cyrhétrenylbut-1-ène,⁴⁹ un conjugué organométallique dans lequel une unité $[(\text{Cp})\text{Re}(\text{CO})_3]$ est liée à une structure de type hydroxytamoxifène (composé **1**, FIGURE 4.10).

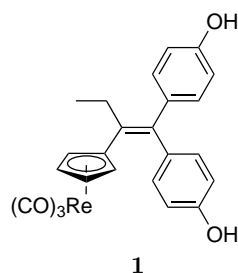


FIGURE 4.10 – Structure du dérivé du tamoxifène marqué par une unité $[(\text{Cp})\text{Re}(\text{CO})_3]$.

Le dérivé marqué du tamoxifène **1** a été incubé dans des cellules MDA-MB-231 (cancer du sein) à une concentration d'incubation de $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ et les cellules ont été imagées d'abord par AFM-IR,⁴⁰ puis par spectromicroscopie FTIR utilisant le rayonnement synchrotron (SR-FTIR-SM).⁴⁹

Pour voir la distribution du composé **1** par AFM-IR, les cellules incubées et les cellules témoins ont été déposées sur un prisme de ZnSe. Elles ont d'abord été identifiées par la topographie (FIGURE 4.11(a)) puis des cartes ont été enregistrées à différents nombres d'onde (FIGURE 4.11(b-f)) : 1240 cm^{-1} (phosphate), 1650 cm^{-1} (amide I), 1925 et 2017 cm^{-1} (tricarboxyl) et 2200 cm^{-1} (aucune bande).

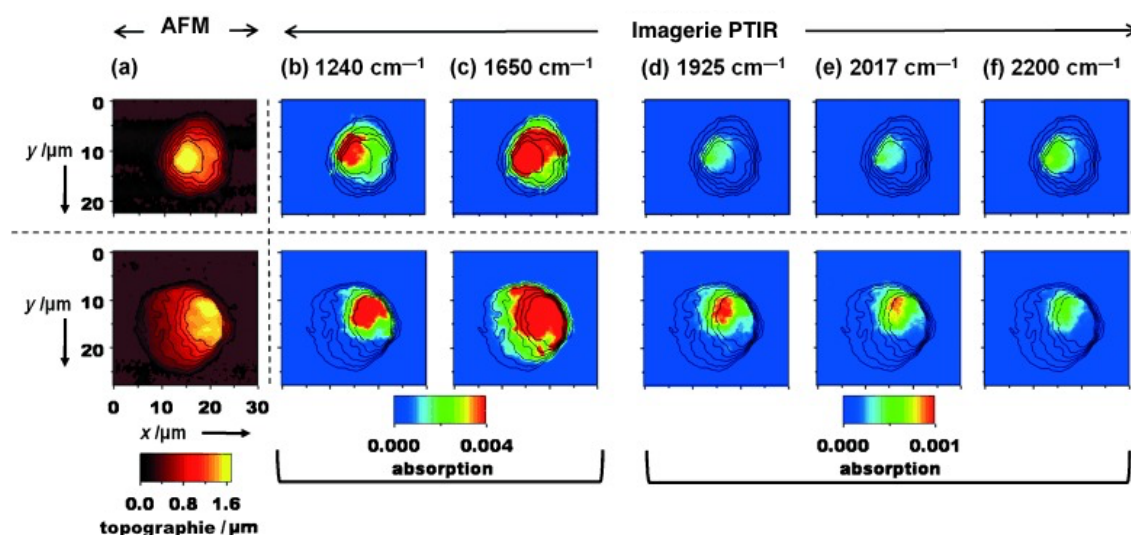


FIGURE 4.11 – Cellule MDA-MB-231 non incubée (haut) et incubée avec le composé **1** ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 1 h, 37°C , bas) (a) Topographie AFM, (b-f) Cartes enregistrées en AFM-IR à (b) 1240 cm^{-1} (phosphate), (c) 1650 cm^{-1} (amide I), (d) 1925 cm^{-1} , (e) 2017 cm^{-1} (tricarboxyl), (f) 2200 cm^{-1} (en dehors d'une bande).⁴⁰

Les cellules témoins présentent un très faible signal à ces trois derniers nombres d'onde, qui est attribué à l'absorption de l'eau. En revanche, pour les cellules traitées, des signaux importants attribués à **1** ont été enregistrés à 1925 et 2017 cm^{-1} , ce qui confirme que le produit a été internalisé. Le signal de **1** étant co-localisé avec celui des bandes à 1240 (vibration d'élongation antisymétrique de PO_2^-) et à 1650 cm^{-1} (bande amide I), des signaux caractéristiques du noyau, les auteurs ont conclu à une localisation nucléaire pour ce dérivé du tamoxifène.²³¹

Afin de mettre en évidence la pertinence de cette technique innovante et de confirmer les résultats obtenus, des expériences similaires ont été réalisées par SR-FTIR-SM et imagerie de fluorescence.²³² Des cartes ont été enregistrées par intégration de bandes infrarouge spécifiques : la bande E ($1939\text{-}1902\text{ cm}^{-1}$) correspond aux vibrations d'élongation antisymétriques des fonctions $\text{C}\equiv\text{O}$ et la bande amide-I ($1711\text{-}1583\text{ cm}^{-1}$) est caractéristique du noyau.^{47,231} L'aire de ces deux bandes est maximale au même endroit dans la cellule : les auteurs ont confirmé par SR-FTIR-SM la localisation nucléaire pour ce dérivé du tamoxifène (FIGURE 4.12).

Enfin, les noyaux ont été marqués par une solution de DAPI et observés par microscopie de fluorescence (excitation : $350\text{ nm}/50\times$, émission : $460\text{ nm}/50\times$), ce qui a permis de confirmer l'accumulation du composé **1** dans le noyau des cellules (FIGURE 4.13).

4.2. ÉTUDE PAR IR DE FERROCIFÈNES MARQUÉS PAR UNE SONDRE $\text{Re}(\text{CO})_3$

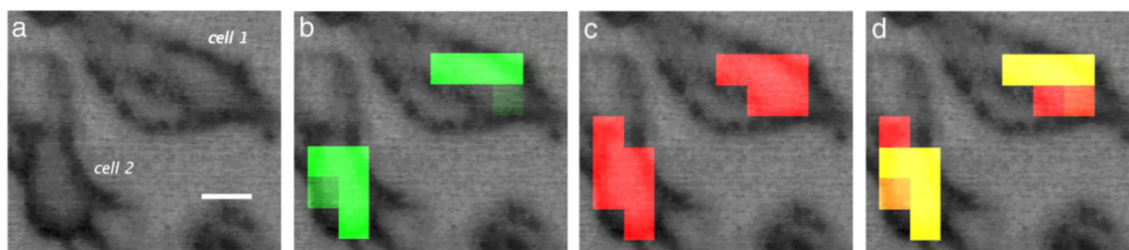


FIGURE 4.12 – Deux cellules MDA-MB-231 incubées avec le composé **1** ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h, 37°C) (a) Image visible (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$), Cartes SR-FTIR-SM : (b) Bande E des fonctions carbonyle (vert), (c) Bande des fonctions amide-I (rouge), (d) Superposition des deux signaux.²³²

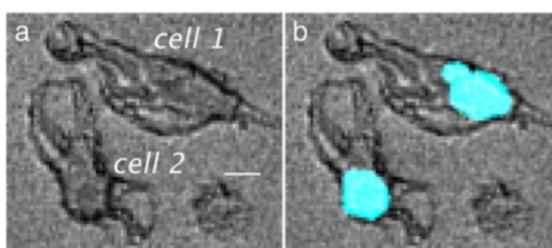


FIGURE 4.13 – Cellules MDA-MB-231 incubées avec le composé **1** ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h, 37°C). (a) Image visible (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$), (b) Marquage des noyaux par du DAPI (microscopie d'épifluorescence).²³²

4.2.3 Synthèse et étude de toxicité de ferrocifènes marqués

Cette étude résulte d'une collaboration avec l'équipe d'Anne VESSIÈRES et Michèle SALMAIN et a donné lieu à un article.²³³

Ces expériences sur le composé **1** ont permis de valider cette approche. En revanche, le dérivé **1** est beaucoup moins cytotoxique que le composé **67**, en raison du remplacement du ferrocène par une sonde $[(\text{Cp})\text{Re}(\text{CO})_3]$. Par conséquent, trois nouveaux complexes de type ferrocényl ont été synthétisés pour pallier cet inconvénient (synthèse réalisée au sein de l'équipe d'Anne VESSIÈRES et Michèle SALMAIN par Franz HEINEMANN). Ces complexes ont eux aussi été marqués par une unité $[(\text{Cp})\text{Re}(\text{CO})_3]$ mais possèdent le motif de type ferrocène - double liaison - paraphénol, indispensable pour l'obtention d'une cytotoxicité importante *in vitro* (FIGURE 4.14).²³⁴

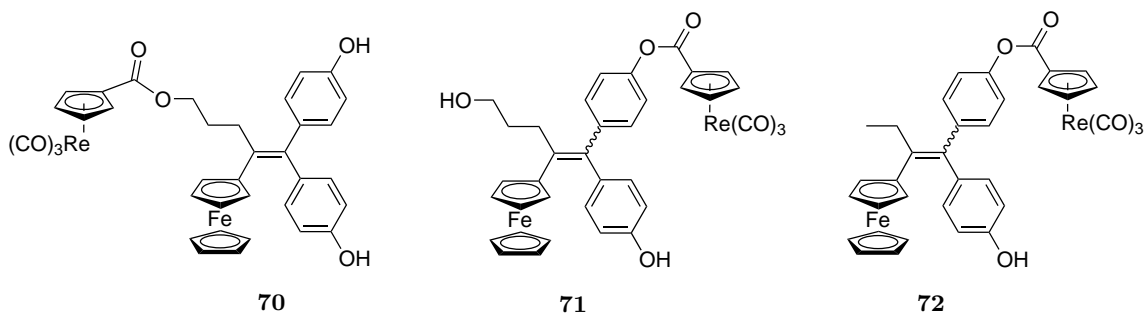


FIGURE 4.14 – Structures des ferrocifènes marqués (**70**, **71** et **72**).

Leur activité antiproliférative sur les cellules cancéreuses MDA-MB-231 est indiquée dans le TABLEAU 4.1 avec des valeurs de IC_{50} comprises entre $0,32$ et $2,5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (tests d'activité réalisés au sein de l'équipe d'Anne VESSIÈRES et Michèle SALMAIN par Yong WANG).²³³

TABLEAU 4.1 – IC_{50} des complexes étudiés dans des cellules cancéreuses MDA-MB-231.

Complexe	IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$)
67	$0,65 \pm 0,06$ ²³⁵
69	$0,11 \pm 0,02$ ²¹⁴
70	$2,5 \pm 0,4$
71	$0,32 \pm 0,03$
72	$2,3 \pm 0,3$
4-hydroxytamoxifène	29 ± 3 ²¹⁵
tamoxifène	34 ± 3 ²¹⁵

De la même manière que pour le composé **1**, dérivé du tamoxifène, ces composés ont été étudiés en milieu cellulaire par AFM-IR.

4.2.4 Localisation intracellulaire

Étude par AFM-IR

Des cellules MDA-MB-231, cultivées sur lamelles de CaF_2 (diamètre : 10 mm, épaisseur : 0,1 mm), ont été incubées en présence des complexes **70** et **71** pendant 1 h à une concentration d'incubation de $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Après des lavages successifs et une fixation au paraformaldéhyde (PFA), leur localisation a été étudiée par AFM-IR. Pour cela, les lamelles ont été déposées sur un prisme de CaF_2 . Dans un premier temps, les cellules ont été localisées grâce à la topographie fournie par la pointe AFM, puis une carte a été enregistrée grâce à l'AFM-IR à différentes longueurs d'onde.

Composé 70 : À une concentration d'incubation de $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, nous avons observé la présence de cristaux sur l'image de la topographie (FIGURE 4.15).

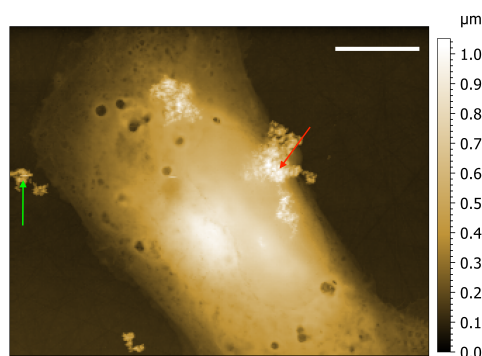


FIGURE 4.15 – Topographie par AFM d'une cellule MDA-MB-231 incubée avec le composé **70** ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h), fixée au PFA et séchée à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$).

Un spectre infrarouge a donc été enregistré sur ces cristaux à la surface d'une cellule (flèche rouge) et à l'extérieur d'une cellule (flèche verte) pour déterminer leur composition

4.2. ÉTUDE PAR IR DE FERROCIFÈNES MARQUÉS PAR UNE SONDE $\text{Re}(\text{CO})_3$

(FIGURE 4.16). Dans les deux cas, le spectre infrarouge possède les deux bandes caractéristiques des métaux carbonyle à 1950 et 2050 cm^{-1} , ce qui montre que du produit a cristallisé sur les lamelles et les cellules. Cette cristallisation a pu se produire lors de la dissolution de la solution stock dans le milieu de culture, la concentration d'incubation semble donc un peu élevée.

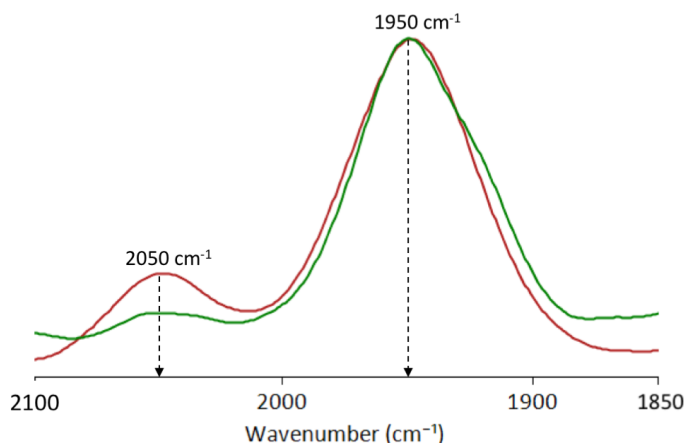


FIGURE 4.16 – Spectres IR enregistrés sur des cristaux à la surface d'une cellule (rouge) et à l'extérieur d'une cellule (vert) incubée avec le composé **70** ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h).

Des cartes infrarouge ont tout de même pu être enregistrées sur des cellules possédant moins de cristaux à leur surface. Pour chaque cellule, trois bandes de vibration d'élongation caractéristiques ont été étudiées : 1080 cm^{-1} (bande des fonctions phosphate des acides nucléiques, FIGURE 4.17(b)), 1640 cm^{-1} (bandes des amide I des protéines, FIGURE 4.17(c)) et 1950 cm^{-1} (bande E des $\text{C}\equiv\text{O}$, FIGURE 4.17(d)). La distribution du composé **70** est donnée par la carte enregistrée à 1950 cm^{-1} alors que les bandes à 1640 cm^{-1} et à 1080 cm^{-1} correspondent à une zone dense en fonctions amide et phosphate qui pourrait indiquer le noyau.⁴⁰

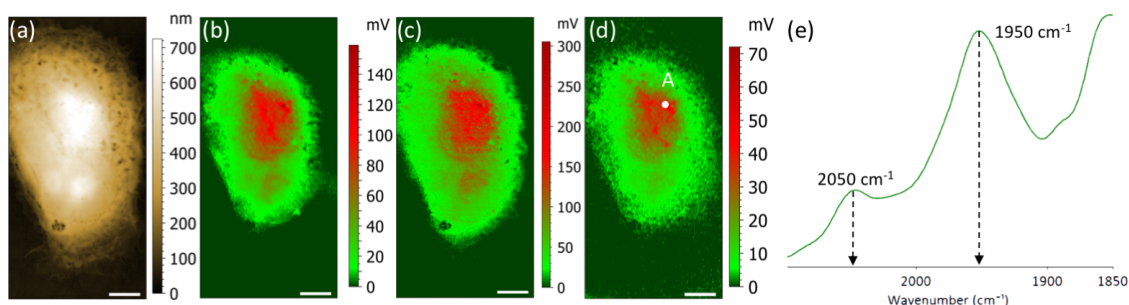


FIGURE 4.17 – Cellule MDA-MB-231 incubée en présence du composé **70** ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h), fixée au PFA et séchée à l'air (Barre d'échelle = $5 \mu\text{m}$). (a) Topographie AFM, (b-d) Cartes enregistrées en AFM-IR à (b) 1080 cm^{-1} (phosphate), (c) 1640 cm^{-1} (amide I) et (d) 1950 cm^{-1} ($\text{Re}(\text{CO})_3$ de **70**), (e) Spectre IR enregistré entre 1850 et 2100 cm^{-1} sur un point chaud pour la bande des fonctions carbonyle, indiqué par la lettre A sur la figure (d).

Le composé **70** possède donc la même répartition que des zones d'intensités élevées en fonctions amide et phosphate, ce qui indique une localisation proche du noyau du composé **70**. Les deux bandes de vibration d'élongation caractéristiques des fonctions carbonyle ont

été mises en évidence dans le spectre IR, enregistré dans la fenêtre transparente des cellules en un point (FIGURE 4.17(e), indiqué par la flèche FIGURE 4.17(d)) : le spectre est bien identique à ceux enregistrés sur le précipité observé FIGURE 4.16.

La FIGURE 4.18 présente une autre cellule incubée en présence du composé **70**.

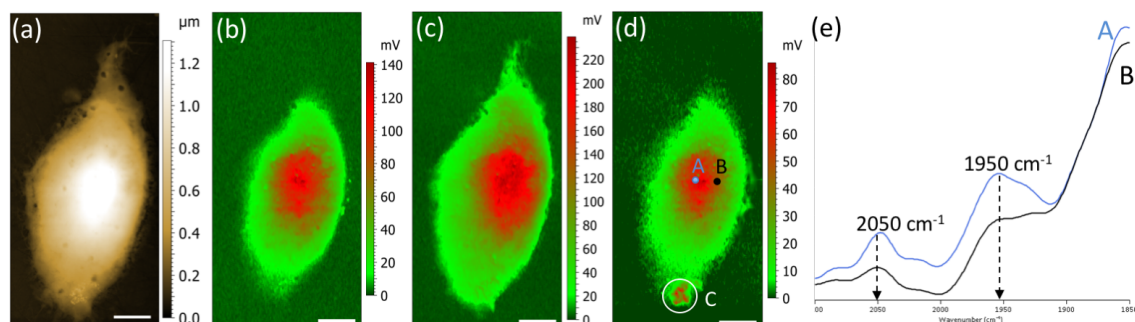


FIGURE 4.18 – Cellule MDA-MB-231 incubée en présence du composé **70** ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h), fixée au PFA et séchée à l'air (Barre d'échelle = $5 \mu\text{m}$). (a) Topographie AFM, (b-d) Cartes enregistrées en AFM-IR à (b) 1080 cm^{-1} (phosphate), (c) 1640 cm^{-1} (amide I) et (d) 1950 cm^{-1} ($\text{Re}(\text{CO})_3$ de **70**), (e) Spectres IR enregistrés entre 1850 et 2100 cm^{-1} sur les points indiqués par les lettres A et B sur la figure (d).

Les mêmes bandes de vibration ont été étudiées pour localiser le produit. Des spectres ont été enregistrés en A et B (FIGURE 4.18(d)) et montrent sans ambiguïté la signature du composé **70**. Ce dernier semble localisé dans une zone proche du noyau d'après la comparaison avec les cartes des bandes de vibration d'élongation des fonctions phosphate (FIGURE 4.18(b)) et amide I (FIGURE 4.18(c)), même si elles ne correspondent pas totalement. La cellule présente une autre zone de haute intensité pour la bande à 1950 cm^{-1} (point C) mais celle-ci correspond à du produit pur ayant précipité *a priori* sur la cellule.

Composé 71 : La pénétration de ce composé a été étudiée dans les mêmes conditions que pour le composé **70**. À $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, on observe moins de produit précipité, donc il semble plus soluble dans le milieu de culture.

La FIGURE 4.19 présente des cartes enregistrées pour les mêmes bandes de vibration que précédemment. La distribution du composé **71** est donnée par la carte enregistrée à 1950 cm^{-1} . Un spectre IR a été enregistré sur un « point chaud », noté A, qui correspond à une zone de grande intensité du signal. Ce spectre permet de mettre en évidence les deux bandes caractéristiques des fonctions carbonyle (FIGURE 4.19(e)).

Du produit ayant précipité une fois dissous dans le milieu de culture à une concentration de $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pour les deux composés, des expériences similaires ont été réalisées à une concentration en complexe de 5 puis $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, afin de voir si l'AFM-IR permettait de détecter le composé même à de plus faibles concentrations. La FIGURE 4.20 présente la topographie d'une cellule incubée avec le composé **70** à $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ainsi que la carte enregistrée à 1950 cm^{-1} .

Cette carte met en évidence une distribution toujours inhomogène du composé et un spectre IR a été mesuré sur un point chaud (point A, FIGURE 4.20(b)). Le spectre, représenté FIGURE 4.20(c), met bien en évidence la présence de deux bandes intenses, caractéristiques des liaisons $\text{C}\equiv\text{O}$ à 2046 et 1950 cm^{-1} .

4.2. ÉTUDE PAR IR DE FERROCIFÈNES MARQUÉS PAR UNE SONDRE $\text{Re}(\text{CO})_3$

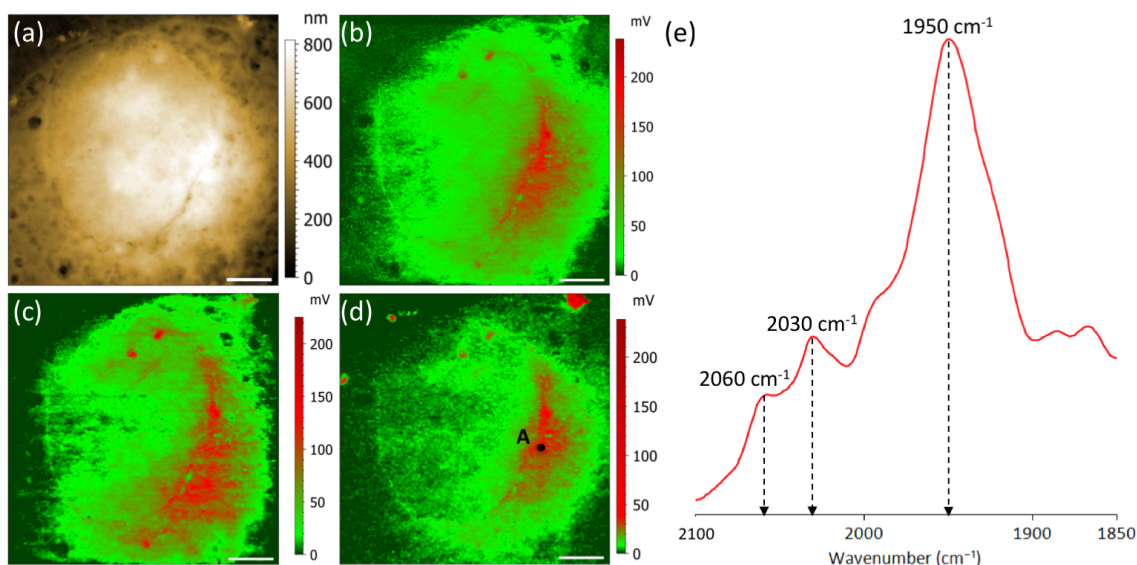


FIGURE 4.19 – Cellule MDA-MB-231 incubée en présence du composé **71** ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h), fixée au PFA et séchée à l'air (Barre d'échelle = $5 \mu\text{m}$). (a) Topographie AFM, (b-d) Cartes enregistrées en AFM-IR à (b) 1080 cm^{-1} (phosphate), (c) 1640 cm^{-1} (amide I) et (d) 1950 cm^{-1} ($\text{Re}(\text{CO})_3$ de **71**), (e) Spectre IR enregistré entre 1850 et 2100 cm^{-1} sur un point chaud pour la bande des fonctions carbonyle, indiqué par la lettre A sur la figure (d).

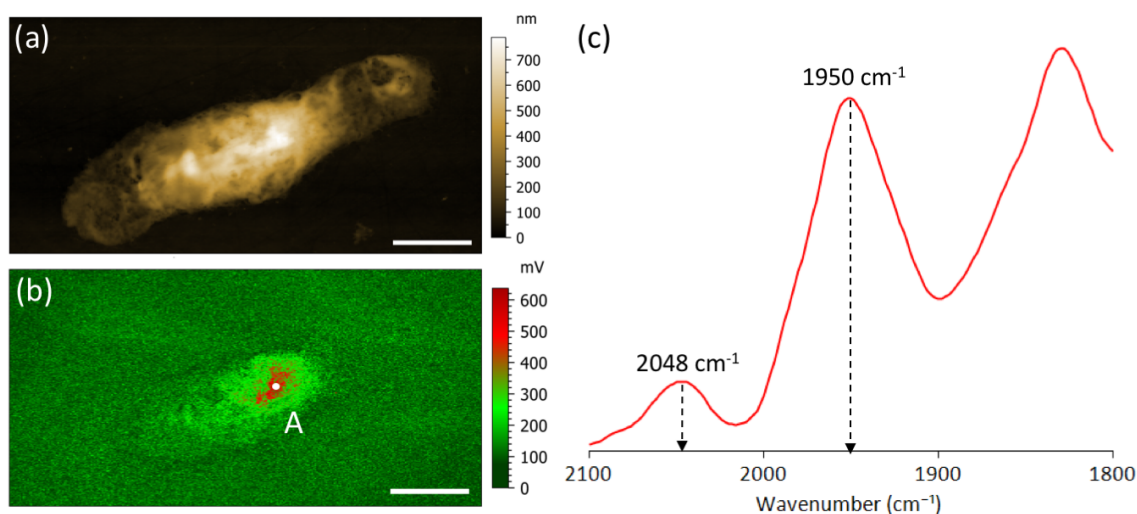


FIGURE 4.20 – Cellule MDA-MB-231 incubée en présence du composé **70** ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h), fixée au PFA et séchée à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a) Topographie AFM, (b) Carte enregistrée en AFM-IR à 1950 cm^{-1} ($\text{Re}(\text{CO})_3$ de **70**), (c) Spectre IR enregistré entre 1800 et 2100 cm^{-1} sur un point chaud pour la bande des fonctions carbonyle, indiqué par la lettre A sur la figure (b).

Des composés marqués par une sonde de type $\text{Re}(\text{CO})_3$ peuvent donc être détectés dans des cellules par AFM-IR à une concentration d'incubation de $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Cela montre que le composé pénètre assez bien dans les cellules. Pour voir la limite de détection, la même expérience a également été réalisée à une concentration d'incubation de $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (FIGURE 4.21 et FIGURE 4.22). Trois cellules ont été étudiées à cette concentration.

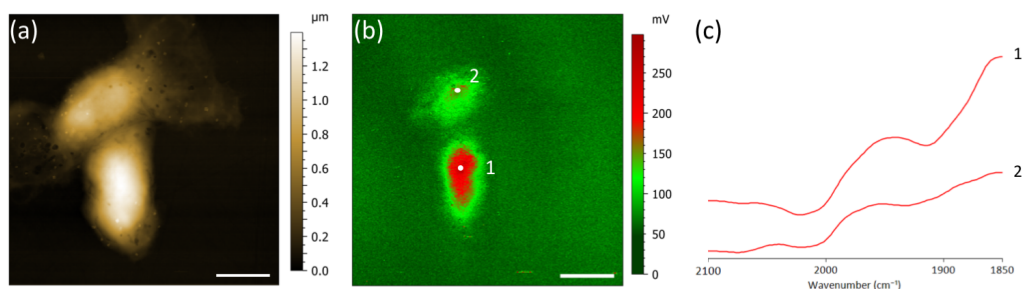


FIGURE 4.21 – Cellules MDA-MB-231 incubées en présence du composé **70** ($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h), fixées au PFA et séchées à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a) Topographie AFM, (b) Carte enregistrée en AFM-IR à 1950 cm^{-1} ($\text{Re}(\text{CO})_3$ de **70**), (c) Spectres IR enregistrés entre 1800 et 2100 cm^{-1} sur les points indiqués par les numéros 1 et 2 sur la figure (b).

La FIGURE 4.21(b) met en évidence la présence de points chauds, attribuée à une plus grande concentration en composé **70**. Le composé semble localisé dans une zone particulière de la cellule, sa distribution n'est pas homogène. Quand la concentration d'incubation est diminuée, la répartition du composé à l'intérieur de la cellule ne semble donc pas modifiée. La présence de l'unité $\text{Re}(\text{CO})_3$ a été confirmée par l'enregistrement de spectres IR en deux points, qui exhibent deux bandes de vibration d'élongation de la liaison $\text{C}\equiv\text{O}$ à environ 1950 et 2050 cm^{-1} (FIGURE 4.21(b) et (c)). Ces bandes sont plus larges et moins intenses que celles obtenues pour des concentrations de 10 et $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, ce qui rend la détermination du nombre d'onde moins précise.

Afin de déterminer la localisation de **70** dans les cellules, des cartes ont été enregistrées à 1080 et 1640 cm^{-1} , nombres d'onde qui correspondent aux fonctions phosphate des acides nucléiques et amide I des protéines, respectivement (FIGURE 4.22(c-d)).

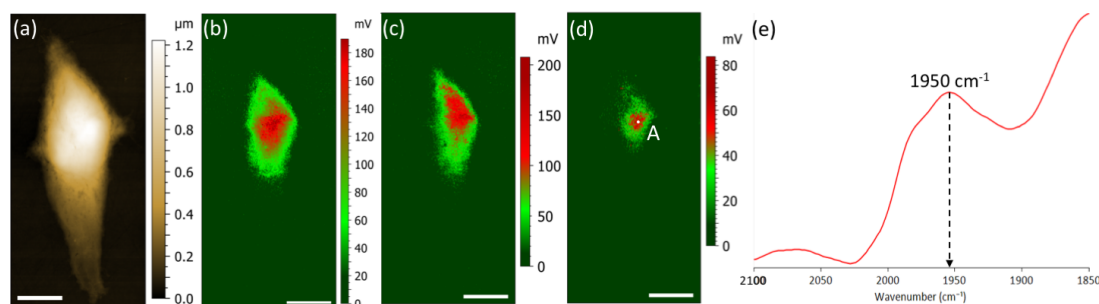


FIGURE 4.22 – Cellule MDA-MB-231 incubée en présence du composé **70** ($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h), fixée au PFA et séchée à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a) Topographie AFM, (b-d) Cartes enregistrées en AFM-IR à (b) 1080 cm^{-1} (phosphate), (c) 1640 cm^{-1} (amide I), (d) 1950 cm^{-1} ($\text{Re}(\text{CO})_3$ de **70**), (e) Spectre IR enregistré entre 1850 et 2100 cm^{-1} sur un point chaud pour la bande des fonctions carbonyle, indiqué par la lettre A sur la figure (d).

Ces images fournissent plusieurs informations. Tout d'abord, comme pour l'étude réalisée à $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, on constate une corrélation entre la localisation du composé **70** et les zones denses en phosphate et amide (acides nucléiques et protéines), ce qui indique une localisation nucléaire ou proche du noyau. En revanche, le spectre infrarouge donné FIGURE 4.22(e) montre que l'intensité de la bande A_1 est faible et peut donc être confondue avec la ligne de base à $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. On est ici proche de la limite de détection.

4.2. ÉTUDE PAR IR DE FERROCIFÈNES MARQUÉS PAR UNE SONDRE $\text{Re}(\text{CO})_3$

La pénétration du composé **71** a également été étudiée à $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Une carte a été enregistrée à 1950 cm^{-1} (FIGURE 4.23) et montre une répartition inhomogène de **71** à l'intérieur de la cellule. Des spectres IR ont été mesurés sur deux points chauds (notés A et B) et permettent de mettre en évidence la présence des deux bandes de vibration caractéristiques des ligands $\text{C}\equiv\text{O}$, ce qui confirme la pénétration de **71** et la capacité de le détecter même à une concentration d'incubation de $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

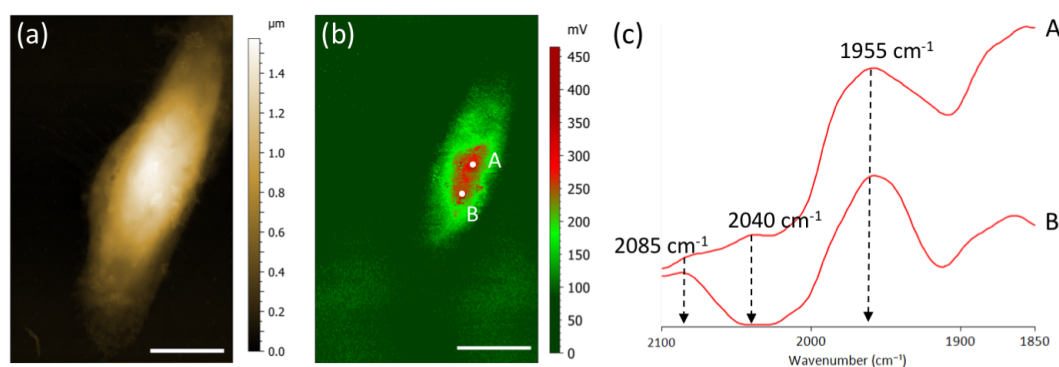


FIGURE 4.23 – Cellule MDA-MB-231 incubée en présence du composé **71** ($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h), fixée au PFA et séchée à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a) Topographie AFM, (b) Carte enregistrée en AFM-IR à 1950 cm^{-1} ($\text{Re}(\text{CO})_3$ de **71**), (c) Spectres IR enregistrés entre 1850 et 2100 cm^{-1} sur deux points chauds pour la bande des fonctions carbonyle, indiqués par les lettres A et B sur la figure (b).

Étude par rayonnement synchrotron

En parallèle de ces expériences d'imagerie par AFM-IR, des expériences similaires ont été réalisées sur la ligne SMIS du synchrotron SOLEIL. Des cellules MDA-MB-231, cultivées sur lamelles de CaF_2 (diamètre : 10 mm , épaisseur : $0,1 \text{ mm}$), ont été incubées en présence des complexes **70**, **71** et **72** pendant 1 h à une concentration d'incubation de $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Malgré les problèmes de solubilité observés précédemment, cette concentration a été choisie supérieure à celle utilisée pour les études en AFM-IR en raison de la plus faible sensibilité de la microscopie FTIR avec rayonnement synchrotron par rapport à celle de l'AFM-IR. Après des lavages successifs et une fixation au paraformaldéhyde (PFA), des cartes IR ont été enregistrées par spectromicroscopie FTIR utilisant le rayonnement synchrotron (SR-FTIR-SM).

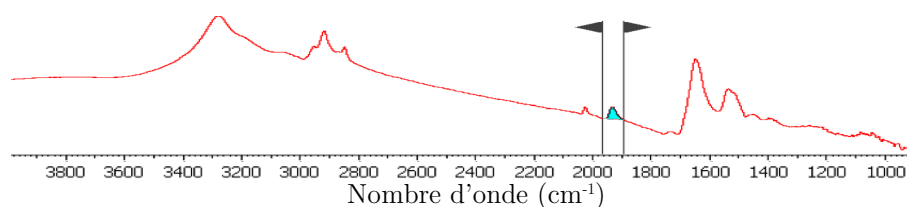


FIGURE 4.24 – Spectre SR-FTIR-SM en un point chaud d'une cellule MDA-MB-231 incubée avec le composé **70** ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h), fixée au PFA et séchée à l'air. Indication de la limite d'intégration pour la bande E ($1960\text{-}1910 \text{ cm}^{-1}$).

La localisation intracellulaire du composé a été déterminée à l'aide de l'intégration de

la bande E des fonctions carbonyle ($1960-1910\text{ cm}^{-1}$, FIGURE 4.24). Les cartes obtenues sont représentées avec un code couleur allant du bleu (faible intensité) au rouge (forte intensité), comme déjà réalisé dans des études précédentes.^{48,49,53}

Composé 70 : Dans un premier temps, une zone d'intérêt a été repérée à l'aide de l'image optique des cellules. À une concentration d'incubation de $25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, des points noirs sont présents sur les lamelles : ils sont attribués à du composé qui aurait précipité, ce qui n'est pas surprenant car du précipité avait déjà été observé à $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Afin de confirmer la nature de ce précipité, une carte IR a été enregistrée dans la région contenant ces points noirs (FIGURE 4.25).

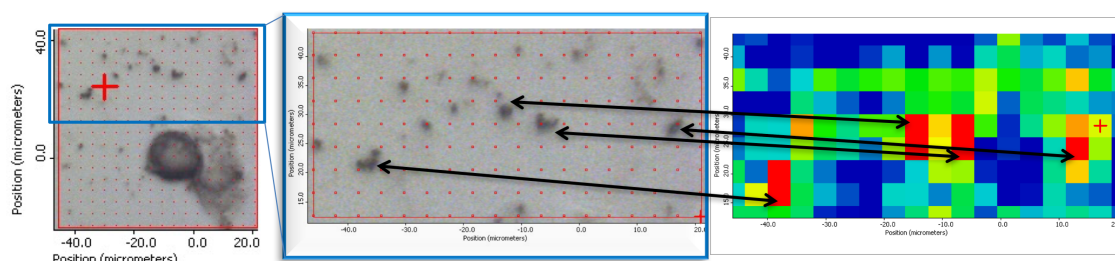


FIGURE 4.25 – Cellules MDA-MB-231 incubées avec le composé **70** ($25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 1 h), fixées au PFA et séchées à l'air. Mise en évidence de points noirs sur la lamelle, et image SR-FTIR-SM obtenue par intégration de la bande E ($1960-1910\text{ cm}^{-1}$), le code couleur allant du bleu (faible intensité) au rouge (forte intensité).

On constate qu'ils correspondent à des zones d'intensité élevée pour la bande E des fonctions carbonyle. Le spectre IR obtenu sur ces points noirs et présenté FIGURE 4.26 met en évidence la présence de deux bandes autour de 2000 cm^{-1} , attribuées aux fonctions carbonyle du complexe $\text{Re}(\text{CO})_3$. On peut donc conclure que le composé **70** a précipité lors de l'incubation.

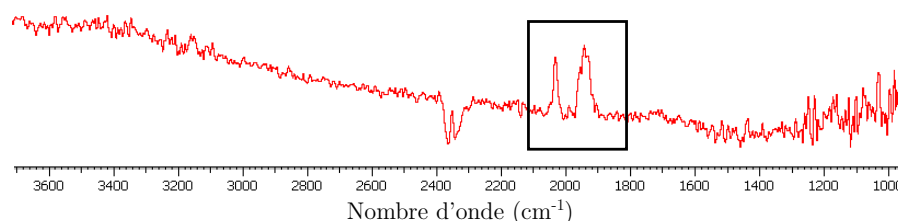


FIGURE 4.26 – Spectre SR-FTIR-SM enregistré sur une zone d'intensité élevée pour la bande E des fonctions carbonyle, attribué à du produit **70** ayant précipité.

Afin de mettre en évidence la présence de complexe à l'intérieur des cellules, des spectres infrarouge ont été enregistrés ponctuellement dans des cellules. Une fois le signal des complexes de type $\text{Re}(\text{CO})_3$ identifié, des cartes ont été générées par intégration de la bande E des fonctions carbonyle ($1960-1910\text{ cm}^{-1}$) pour différentes cellules afin de localiser le composé **70** à l'intérieur des cellules. Une fois les cellules cartographiées par SR-FTIR-SM, leurs noyaux ont été marqués avec une solution de Hoechst et imagés en microscopie d'épifluorescence (ex. 350/50x, em. 460/50m) afin de déterminer la localisation du noyau dans les cellules, comme présenté FIGURE 4.27.²³⁶

4.2. ÉTUDE PAR IR DE FERROCIFÈNES MARQUÉS PAR UNE SONDRE $\text{RE}(\text{CO})_3$

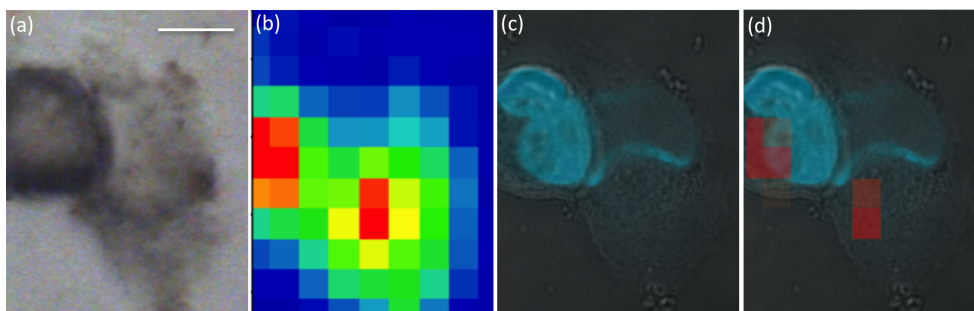


FIGURE 4.27 – Cellules MDA-MB-231 incubées avec le composé **70** ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h), fixées au PFA et séchées à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a) Image visible, (b) Image SR-FTIR-SM obtenue par intégration de la bande E ($1960\text{-}1910 \text{ cm}^{-1}$), le code couleur allant du bleu (faible intensité) au rouge (forte intensité), (c) Marquage des noyaux (Hoechst, bleu, ex. $350/50\text{x}$ em. $460/50\text{m}$), (d) Superposition du point chaud obtenu en IR et de la fluorescence du Hoechst.

La carte générée en infrarouge permet de mettre en évidence la présence de points chauds (pixels rouges). Le composé **70** n'est donc pas réparti de manière homogène dans la cellule, ce qui confirme les observations réalisées en AFM-IR. Le marquage par une solution de Hoechst montre que **70** est localisé à proximité du noyau, mais dans des zones qui s'étendent de manière périnucléaire. Cette constatation permet d'affiner les observations réalisées par AFM-IR, où les noyaux avaient été localisés par les régions denses en phosphate et amide. Cela signifie que l'étude des bandes des fonctions amide I et des fonctions phosphate n'était pas la plus pertinente pour la localisation du noyau.

En revanche, on peut montrer que le rapport des aires des bandes de vibration d'élongation des liaisons C-H $\text{CH}_3:\text{CH}_2$ (symétriques et antisymétriques) est corrélé au caractère lipidique d'un compartiment cellulaire.⁴⁷ De faibles valeurs de ce rapport indiquent que l'absorption des CH_2 est élevée en raison d'une densité élevée en lipides, porteurs de longues chaînes $-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$, ce qui correspond principalement à des organites riches en membranes tels que l'appareil de GOLGI, les mitochondries ou le réticulum endoplasmique. Au contraire, un rapport $\text{CH}_3:\text{CH}_2$ élevé correspond au noyau, qui contient une densité élevée en histones (protéines) et en ADN, porteurs de nombreux groupements CH_3 (acides aminés et acides nucléiques).

Les aires des bandes correspondant aux vibrations d'élongation des liaisons C-H de CH_3 et CH_2 ont été mesurées et une carte a été générée en utilisant ce rapport, qui est comparé à la localisation du composé **70** et aux zones riches en fonctions amide (FIGURE 4.28 (b) à (d)). Comme pour la première cellule, le noyau a été marqué *a posteriori* par une solution de Hoechst et imagé par épifluorescence (FIGURE 4.28(e)).

Ces cartes nous montrent que :

- La carte des fonctions amide est proche du marquage du noyau par la solution de Hoechst mais pas parfaitement co-localisée.
- La carte $\text{CH}_3:\text{CH}_2$ se localise mieux avec le marquage du Hoechst et est donc un meilleur marqueur du noyau comme précédemment montré.⁴⁷
- Le composé **70** est donc localisé dans une région qui recouvre partiellement le noyau mais aussi périnucléaire. Cela pourrait correspondre à l'appareil de GOLGI ou à d'autres organites.

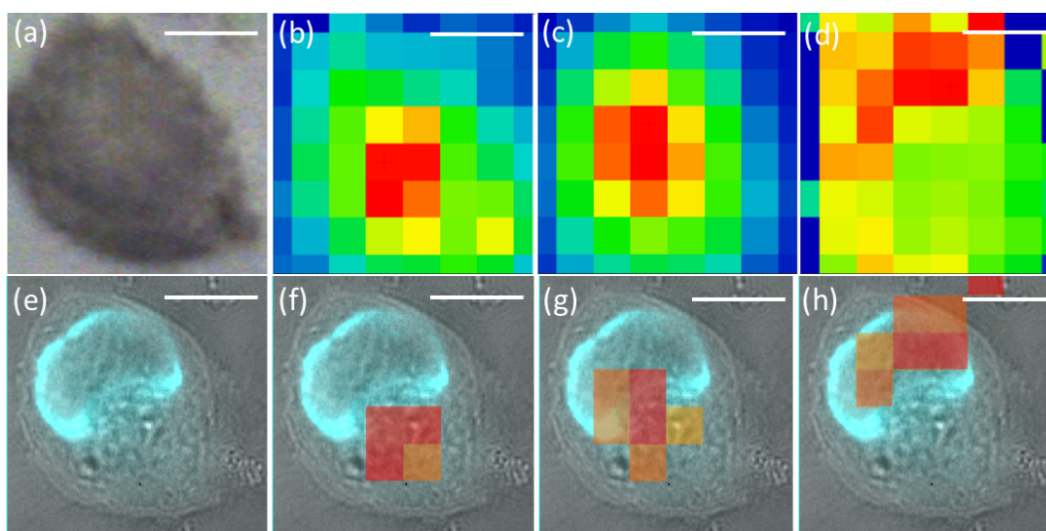


FIGURE 4.28 – Cellule MDA-MB-231 incubée avec le composé **70** ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h), fixée au PFA et séchée à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a) Image visible, (b-d) Image SR-FTIR-SM obtenue par intégration de (b) La bande E ($1960\text{-}1910 \text{ cm}^{-1}$), (c) La bande amide I ($1705\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$), (d) Le rapport $\text{CH}_3\text{:CH}_2$ en utilisant les vibrations antisymétriques de CH_3 ($2975\text{-}2945 \text{ cm}^{-1}$) et CH_2 ($2945\text{-}2905 \text{ cm}^{-1}$), le code couleur allant du bleu (faible intensité) au rouge (forte intensité), (e) Fluorescence du Hoechst (bleu, ex. $350/50\text{x}$ em. $460/50\text{m}$), (f-h) Superposition de la fluorescence du Hoechst et du point chaud obtenu en IR pour l'absorption de la bande E (f), la bande amide I (g) et le rapport $\text{CH}_3\text{:CH}_2$ (h).

Un spectre infrarouge a été enregistré sur un point chaud pour la bande E (FIGURE 4.29) : ce spectre présente les bandes caractéristiques des fonctions carbonyle de la sonde $\text{Re}(\text{CO})_3$ (bandes A_1 et E).

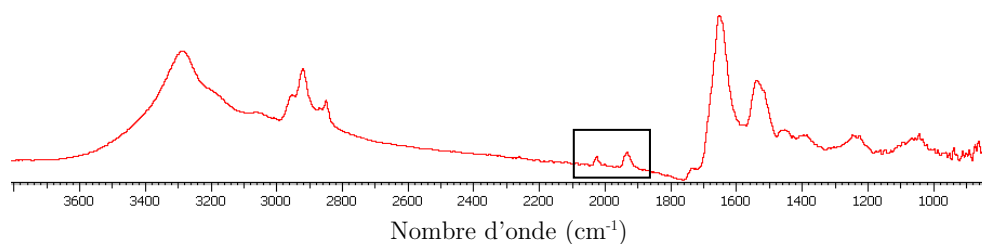


FIGURE 4.29 – Spectre SR-FTIR-SM de cellules MDA-MB-231 incubées avec le composé **70** ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h), fixées au PFA et séchées à l'air, enregistré sur un point chaud pour la bande E.

Ces données nous permettent de confirmer que le composé **70** est localisé majoritairement dans la région périnucléaire et faiblement dans le noyau des cellules. Pour ce composé, six cellules ont été étudiées et ont présenté le même résultat (en annexe partie 4.4, page 150).

Composé 71 : La même méthode a été appliquée à l'étude de la localisation intracellulaire du composé **71**. Pour ce composé, quatre cellules ont été étudiées (en annexe). Sur la FIGURE 4.30, la cellule de gauche présente un point chaud pour la bande E (rouge) à l'extrémité basse de la cellule, ce qui correspond à du composé ayant précipité comme vu

4.2. ÉTUDE PAR IR DE FERROCIFÈNES MARQUÉS PAR UNE SONDRE $\text{RE}(\text{CO})_3$

sur l'image visible (cadre noir). À l'intérieur de la cellule, le composé est mis en évidence par une zone pour laquelle l'intensité de la bande de vibration de la liaison $\text{C}\equiv\text{O}$ des carbonyle est plus élevée (en jaune). On constate que pour les deux cellules, le composé **71** est majoritairement localisé à proximité du noyau des cellules avec des zones de recouvrement, ce qui peut correspondre par exemple à l'appareil de GOLGI ou aux mitochondries.

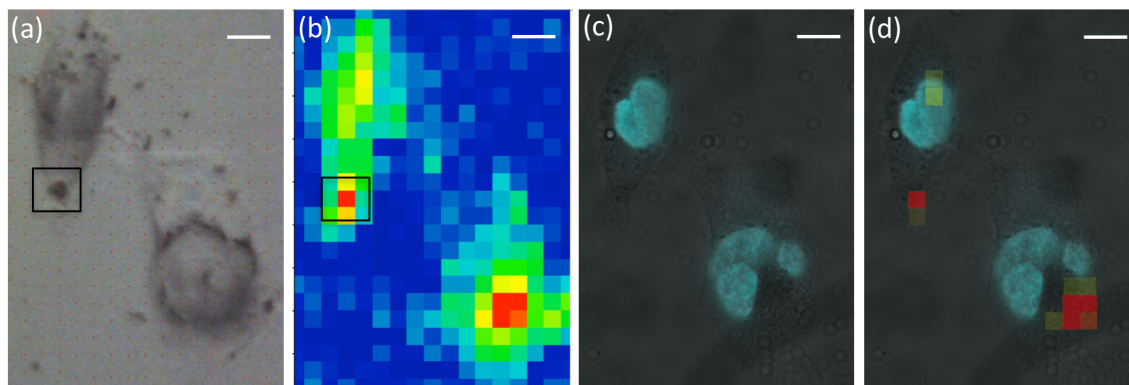


FIGURE 4.30 – Cellules MDA-MB-231 incubées avec le composé **71** ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h), fixées au PFA et séchées à l'air (Barre d'échelle = 10 μm). (a) Image visible, (b) Image SR-FTIR-SM obtenue par intégration de la bande E ($1960\text{-}1910 \text{ cm}^{-1}$), le code couleur allant du bleu (faible intensité) au rouge (forte intensité), (c) Marquage des noyaux (Hoechst, bleu, ex. 350/50x em. 460/50m), (d) Superposition du point chaud obtenu en IR et de la fluorescence du Hoechst.

Un spectre infrarouge enregistré sur un point chaud pour la bande E permet de confirmer la présence des bandes des fonctions carbonyle de la sonde $\text{Re}(\text{CO})_3$ (FIGURE 4.31).

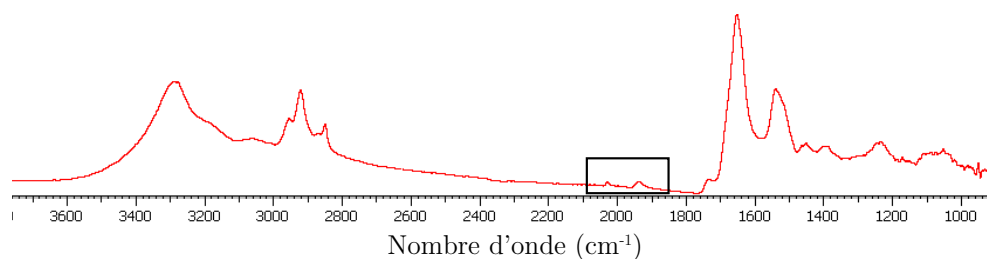


FIGURE 4.31 – Spectre SR-FTIR-SM de cellules MDA-MB-231 incubées avec le composé **71** ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h), fixées au PFA et séchées à l'air, enregistré sur un point chaud pour la bande E.

Composé 72 : Comme pour les composés précédents, des cartes ont été enregistrées par intégration de la bande E des fonctions carbonyle (FIGURE 4.32(b)), par intégration de la bande des fonctions amide-I (FIGURE 4.32(c)) et par mesure du rapport $\text{CH}_3:\text{CH}_2$ des bandes de vibration d'élongation antisymétrique des liaisons $\text{C}-\text{H}$ (FIGURE 4.32(d)). Enfin, un marquage par une solution de Hoechst a été réalisé pour déterminer la localisation des noyaux par fluorescence (FIGURE 4.32(e)). Les points chauds pour les bandes de vibration d'élongation des trois fonctions étudiées ont été superposés à la fluorescence du Hoechst (FIGURE 4.32(f-h)).

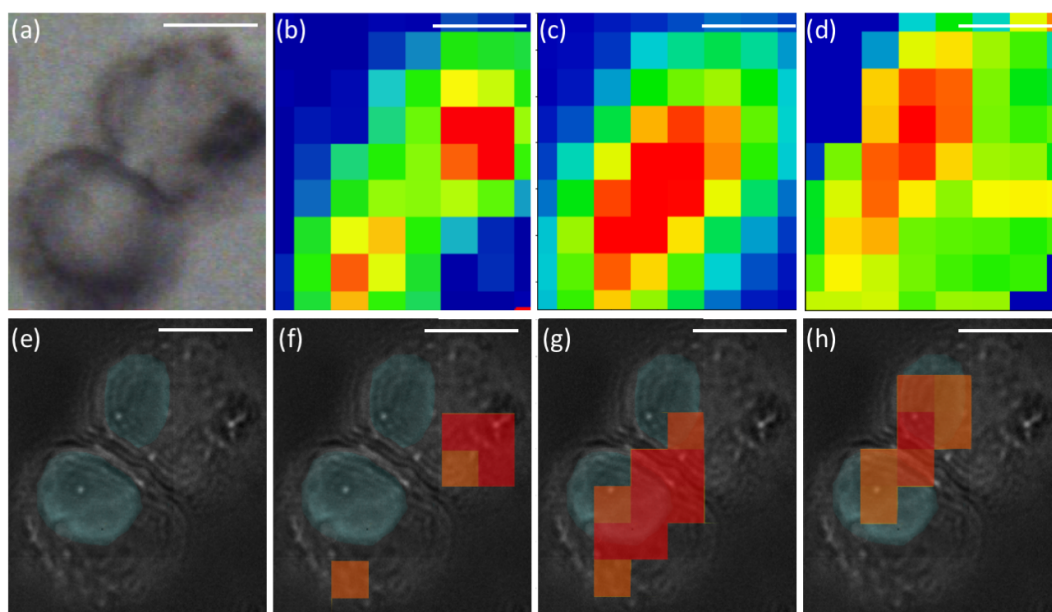


FIGURE 4.32 – Cellules MDA-MB-231 incubées avec le composé **72** ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h), fixées au PFA et séchées à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a) Image visible, (b-d) Images SR-FTIR-SM obtenues par intégration de (b) La bande E ($1960\text{-}1910 \text{ cm}^{-1}$), (c) La bande amide I ($1705\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$), (d) Le rapport $\text{CH}_3\text{:CH}_2$ en utilisant les vibrations antisymétriques de CH_3 ($2975\text{-}2945 \text{ cm}^{-1}$) et CH_2 ($2945\text{-}2905 \text{ cm}^{-1}$), le code couleur allant du bleu (faible intensité) au rouge (forte intensité), (e) Fluorescence du Hoechst (bleu, ex 350/50x em 460/50m), (e) Fluorescence du Hoechst (bleu, ex. 350/50x em. 460/50m), (f-h) Superposition de la fluorescence du Hoechst et du point chaud obtenu en IR pour l'absorption de la bande E (f), la bande amide I (g) et le rapport $\text{CH}_3\text{:CH}_2$ (h).

Le composé **72** est réparti de manière inhomogène à l'intérieur de la cellule, mais avec une localisation plus éloignée du noyau que pour les composés précédents. En revanche, alors que les complexes **70** et **71** ont été observés dans toutes les cellules imagées, le composé **72** a montré une pénétration inhomogène car toutes les cellules analysées ne l'ont pas internalisé, comme en témoigne la carte enregistrée sur une cellule présentée FIGURE 4.33. Comme pour les cellules précédentes, la carte a été obtenue par intégration de la bande E des fonctions carbonyle ($1960\text{-}1910 \text{ cm}^{-1}$) et un point chaud, en rouge, semble apparaître.

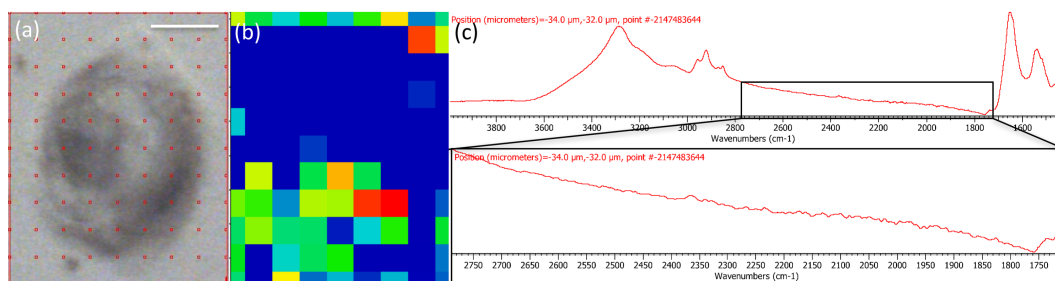


FIGURE 4.33 – Cellule MDA-MB-231 incubée avec le composé **72** ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h), fixée au PFA et séchée à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a) Image visible, (b) Image SR-FTIR-SM obtenue par intégration de la bande E ($1960\text{-}1910 \text{ cm}^{-1}$), (c) Spectre infrarouge enregistré sur un point chaud, montrant l'absence de bande de vibration de la liaison CO des fonctions carbonyle.

4.3. ÉTUDE PAR AFM-IR DE BILLES DE POLYSTYRÈNE FONCTIONNALISÉES

Un spectre a été enregistré sur ce point (FIGURE 4.33(c)) et un agrandissement de la région correspondant à la fenêtre transparente des cellules ($2800-1700\text{ cm}^{-1}$) montre l'absence de bande de vibration d'élongation de la liaison $\text{C}\equiv\text{O}$: le complexe **72** n'est pas assez concentré pour être vu dans cette cellule.

Par ailleurs, nous avons montré à nouveau que l'étude du rapport des bandes de vibration d'élongation des liaisons $\text{C}-\text{H}$ $\text{CH}_3:\text{CH}_2$ est pertinente car ce signal se superpose à celui obtenu par fluorescence du Hoechst. Nous utilisons auparavant la fonction amide I pour localiser le noyau, mais comme montré dans la FIGURE 4.32, c'est bien le rapport $\text{CH}_3:\text{CH}_2$ qui est similaire à la fluorescence du Hoechst.

4.2.5 Conclusion

Ces expériences ont permis de montrer la pénétration cellulaire de trois ferrocifènes marqués par une sonde $\text{Re}(\text{CO})_3$ dans des cellules de cancer du sein (MDA-MB-231). La présence de ces complexes à l'intérieur des cellules dépend de leur structure : en effet, si le composé est trop hydrophobe, il n'est pas assez soluble et par conséquent il n'est pas présent dans toutes les cellules imagées (**72**). Les trois complexes ont montré une répartition non homogène à l'intérieur des cellules avec une localisation proche du noyau mais aussi périmoléculaire : cela peut correspondre à une localisation dans l'appareil de GOLGI, qui est situé à proximité du noyau avec un recouvrement partiel de celui-ci.

Alors que les études à 25 et $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ont mis en évidence la précipitation de produit sur les lamelles, le complexe semblait totalement soluble à 1 et $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ et toujours détectable dans les cellules ce qui est très encourageant pour une future application pharmaceutique.

Par ailleurs, cette étude a permis de montrer la pertinence de l'étude du rapport $\text{CH}_3:\text{CH}_2$ en infrarouge pour localiser le noyau des cellules : cette localisation a été confirmée par comparaison avec la fluorescence du Hoechst, colorant classiquement utilisé pour visualiser les noyaux des cellules.

4.3 Fonctionnalisation de billes de polystyrène par une sonde de type $\text{Re}(\text{CO})_3$ et étude par AFM-IR en mode *tapping*

4.3.1 Introduction et contexte

Comme vu précédemment, les complexes de rhénium tricarbonyle peuvent être détectés par AFM-IR du fait de l'effet photothermique engendré par l'irradiation avec un laser IR dans la bande d'absorption des CO. Nous envisageons de tirer parti de ces propriétés tout à fait intéressantes pour développer des particules décorées par ces complexes pour le traitement de tumeurs par hyperthermie. En effet, le relargage contrôlé de chaleur au sein d'une tumeur fait l'objet d'une attention particulière pour le traitement de cancers.²³⁷ Une augmentation de la température jusqu'à $40-45^\circ\text{C}$ conduit les cellules cancéreuses à l'apoptose et donc à leur mort.²³⁸ À ce jour, trois grandes familles de nanoparticules ont été étudiées pour leur capacité à augmenter localement la température : les nanoparticules d'or, les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétique (SPIONs) et les nanotubes de

carbone.²³⁹ Ces nanoparticules dissipent leur énergie sous forme de chaleur après l'application, soit d'un rayonnement lumineux dans le visible ou le proche infrarouge, soit d'un champ magnétique alternatif. Ces nanoparticules ont donc l'inconvénient de nécessiter de hautes concentrations locales ou un rayonnement très énergétique qui ne pénètre pas en profondeur. Pour pallier ces inconvénients, nous souhaitons décorer des nanoparticules de silice avec des complexes de rhénium-carbonyle. Ainsi, sous l'effet d'un rayonnement IR (qui pénètre en profondeur dans les tissus), il sera possible d'exciter sélectivement ces complexes de rhénium qui dégageront alors localement de la chaleur.¹⁷ Des nanoparticules de silice ont été envisagées car leur synthèse est relativement simple et permet un bon contrôle de leur taille. Par ailleurs, il est possible de modifier les fonctions présentes à leur surface pour greffer des biomolécules tout en préservant leurs propriétés de reconnaissance moléculaire, par exemple pour favoriser leur internalisation cellulaire.²⁴⁰ Il a par ailleurs été montré que de telles nanoparticules ont tendance à s'accumuler dans les cellules cancéreuses et à y être retenues, ce qui en fait des candidats intéressants pour le ciblage de cellules cancéreuses.²⁴¹ Enfin, en jouant sur des paramètres tels que leur taille ou leur charge il est également possible, selon les applications, de limiter leur toxicité ou de moduler leur pénétration cellulaire.²⁴²

Préalablement à la synthèse et à l'étude de tels objets, nous avons étudié le greffage de complexes de rhénium sur des particules de plus grosse taille, à savoir des billes de polystyrène, plus facilement manipulables. Nous avons également essayé de caractériser ces objets en utilisant plusieurs techniques et en particulier l'AFM-IR en mode *tapping*.

4.3.2 Utilisation de l'AFM-IR en mode *tapping*

Le mode contact de l'AFM-IR a prouvé son efficacité lors de nombreuses applications. Cependant, ce mode de fonctionnement n'est pas adapté pour des échantillons mous dans lesquels la pointe peut rester piégée, ou qui n'adhèrent pas à la surface et qui sont alors entraînés par la pointe. C'est le cas des nanoparticules (NPs), qui ont pourtant un grand intérêt et sont utilisées pour de nombreuses applications biologiques. Comme indiqué en introduction, en mode *tapping*, la pointe n'est pas en contact permanent avec la surface de l'échantillon mais seulement par intermittence.²⁴³

Dans ce mode, le levier de l'AFM vibre à sa fréquence de résonance fondamentale et la pointe de l'AFM est abaissée jusqu'à l'échantillon de telle sorte que l'amplitude soit limitée par le contact avec la surface de l'échantillon. La pointe parcourt ensuite la surface de l'échantillon pour enregistrer sa topographie, tout en maintenant une amplitude d'oscillation constante. Par ailleurs, le laser IR irradiant l'échantillon est pulsé à une fréquence supérieure à celle de résonance de la pointe. Si le nombre d'onde du laser correspond à une bande d'absorption de l'échantillon, le rayonnement IR est absorbé, induisant une excitation dans les niveaux vibrationnels. Cette excitation est ensuite dissipée sous forme de chaleur, ce qui provoque un échauffement local et une expansion de l'échantillon puis un retour à l'équilibre une fois la chaleur dissipée. Puisque le laser est pulsé, cette expansion est périodique (FIGURE 4.34), modifiant ainsi l'amplitude de résonance de la pointe. Le signal (c'est-à-dire l'oscillation du levier induite par l'effet photothermique) serait fortement amplifié si le laser était pulsé à la fréquence propre du levier qui entrerait alors en résonance : dans ce cas, l'amplitude d'oscillation serait augmentée du facteur de qualité

4.3. ÉTUDE PAR AFM-IR DE BILLES DE POLYSTYRÈNE FONCTIONNALISÉES

du mode de vibration du levier de l'AFM. Cependant, en raison de la faible absorption du signal IR par le levier ainsi que d'une contribution à l'échauffement non local de l'échantillon dû à la largeur du faisceau IR, ce mode de fonctionnement est difficile à réaliser pour extraire seulement l'effet photothermique lié uniquement à l'absorption de l'échantillon.

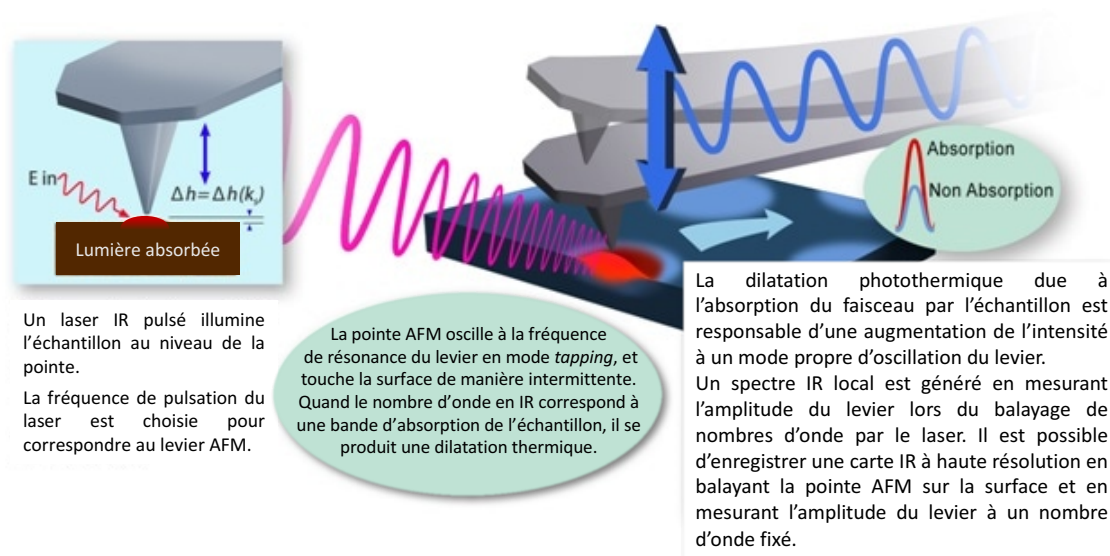


FIGURE 4.34 – Technique de l'AFM-IR en mode *tapping* (adapté de la littérature).²⁴⁴

Afin de pouvoir réaliser des mesures locales, une approche hétérodyne est alors employée. L'hétérodyne est une méthode de détection d'un signal qui est fondée sur la multiplication de plusieurs fréquences. La fréquence du laser est réglée de telle sorte qu'elle soit égale à la différence entre les fréquences des modes fondamental et secondaire du levier AFM. La non linéarité de l'interaction en mode *tapping* permet de combiner l'oscillation du levier avec la dilatation photothermique de l'échantillon à une fréquence qui est la somme des deux, c'est-à-dire la fréquence du deuxième mode de vibration du levier.

Une autre méthode consiste à faire osciller le levier à son second mode et à détecter l'absorption IR en utilisant le mode fondamental. Dans les deux cas, le signal est dominé par le signal local lors du contact entre la pointe et l'échantillon et seule la taille de la pointe AFM limite la résolution spatiale. Des mesures effectuées avec cette technique ont présenté une résolution spatiale de 10 nm (FIGURE 4.35).²⁴⁵

Ce mode de fonctionnement a déjà été utilisé pour l'étude de nanoparticules de polymères de moins de 200 nm de diamètre, qui ont un grand intérêt pour des applications biomédicales.²⁴⁵ Ces nanoparticules possèdent une structure de type cœur-coquille (FIGURE 4.36), avec un cœur composé de PLA (acide polylactique) ou PLGA (acide poly(lactique-co-glycolique)) et une coquille en PVA (poly(acétate de vinyle)) (structures FIGURE 4.37).

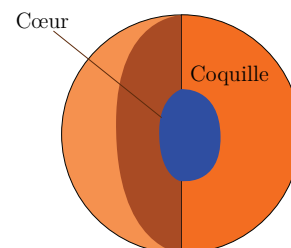


FIGURE 4.36 – Structure de type cœur-coquille.²⁴⁶

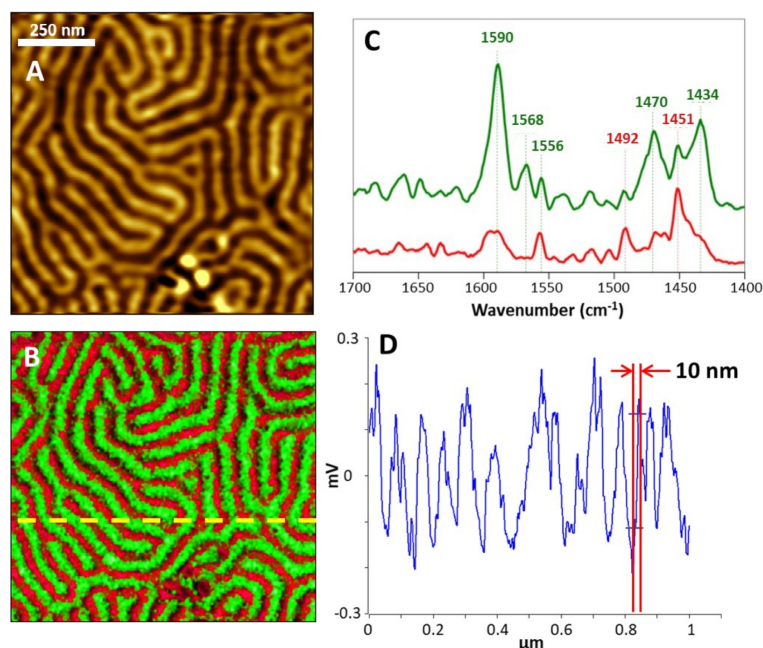


FIGURE 4.35 – Images obtenues en mode *tapping* AFM-IR et spectres d'un échantillon de polymères en bloc polystyrène-poly(2-vinylpyridine) (PS-P2VP) montrant la haute résolution de cette technique. L'échantillon de PS-P2VP a été imagé avec une taille de faisceau de $1 \times 1 \mu\text{m}^2$. (A) Topographie, qui montre la présence de deux composants dans l'échantillon, (B) Images AFM-IR en mode *tapping* obtenues pour deux bandes d'absorption spécifiques du PS (1492 cm^{-1} , rouge) et du P2VP (1588 cm^{-1} , vert), (C) Spectres obtenus en *tapping* AFM-IR pour les deux composés, (D) Coupe transversale réalisée sur une des cartes, mettant en évidence une résolution inférieure à 10 nm. Pour l'estimation de la résolution ici, les auteurs ont choisi la plus petite caractéristique de l'image chimique et ont mesuré la distance pour laquelle le signal passe de 90 à 10%.²⁴⁵

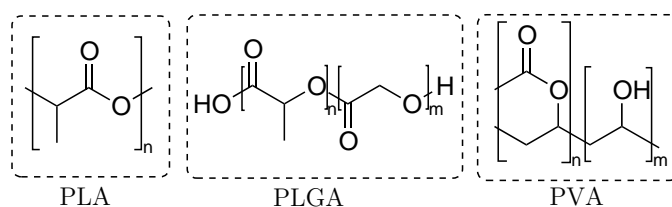


FIGURE 4.37 – Structures du PLA, du PLGA et du PVA

L'utilisation du mode *tapping* permet d'imager les nanoparticules sphériques sans les déformer ou les déplacer et de localiser chacun des constituants.

Les nanoparticules de PLA ont été imagées par AFM-IR en mode contact et en mode *tapping*. Lorsque le mode contact est utilisé, les particules sont repoussées ou écrasées par la pointe, même en diminuant la force appliquée (FIGURE 4.38(A)).²⁴⁵

En revanche, en mode *tapping*, une image fidèle de la forme sphérique des nanoparticules sans aucune déformation est observée (FIGURE 4.38(B) et (C)). L'image B présente en rouge l'absorption correspondant aux bandes de vibration d'élongation des liaisons C=O des fonctions ester du PLA à 1760 cm^{-1} , qui constitue le cœur de la nanoparticule. Dans l'image C, le bleu correspond aux bandes de déformation des liaisons C-H du PVA,

4.3. ÉTUDE PAR AFM-IR DE BILLES DE POLYSTYRÈNE FONCTIONNALISÉES

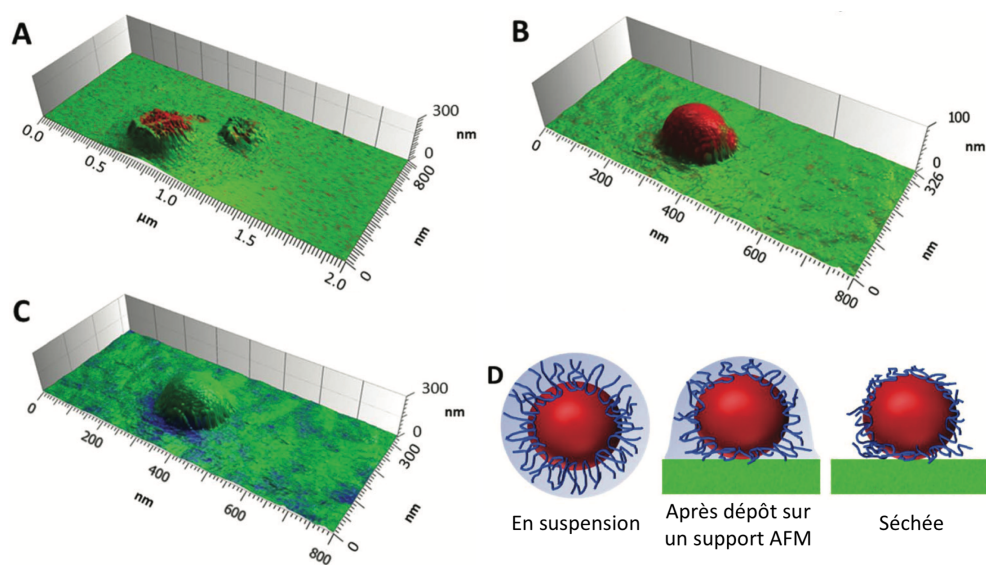


FIGURE 4.38 – Comparaison de l’AFM-IR en mode contact (A) et *tapping* (B, C). Pour les figures A et B, la couleur rouge correspond à des absorptions élevées pour la bande de vibration d’élongation de la liaison C=O des fonctions ester du PLA à 1760 cm^{-1} alors que pour C, le bleu correspond à des absorptions élevées pour la bande de vibration de déformation de la liaison C–H du PVA à 1415 cm^{-1} . D : Vue schématique pour illustrer le processus de séchage des billes sur le support. Le cœur et la coquille sont représentés schématiquement en rouge et bleu, respectivement.²⁴⁵

qui constitue la coquille des nanoparticules. On constate que cette couche ne fait que 15 à 20 nm d’épaisseur et n’est présente que sur les bords de la nanoparticule. Cela peut s’expliquer par le processus de séchage présenté sur la figure D : les chaînes de PVA sont progressivement déshydratées au cours du séchage et ainsi s’aplatissent à la surface de la nanoparticule. Les chaînes de PVA qui s’accumulent dans l’espace entre la nanoparticule et le support AFM sont ainsi plus facilement détectables alors que les chaînes de PVA au sommet des nanoparticules forment une couche trop mince pour être détectée.

La pertinence du mode *tapping* ayant été établie, nous avons voulu utiliser ce mode de fonctionnement pour l’étude de billes de polystyrène marquées par une sonde de type $\text{Re}(\text{CO})_3$.

4.3.3 Utilisation de billes de polystyrène en synthèse peptidique sur support

Les billes de polystyrène ont été intensivement utilisées depuis les années 1950 pour la synthèse peptidique sur support solide (SPPS), qui a été inventée par Robert Bruce MERRIFIELD en 1959. Ce dernier reçut un prix NOBEL en 1984 pour cette invention.²⁴⁷ Cette méthode a été développée pour synthétiser rapidement des chaînes de peptides et permet de réaliser des synthèses itératives sur un support solide. Par un jeu de protection, d’activation et de lavage, une synthèse de peptide avec de bons rendements et une grande pureté peut être réalisée.^{248–250} Ce type de synthèse a conduit au développement de synthétiseurs automatiques permettant la préparation d’oligomères de centaines de monomères. Le groupe de Peter H. SEEBERGER a ainsi développé le premier synthétiseur de polysaccharides en 2001.²⁵¹

Les résines les plus utilisées sont des polystyrènes réticulés par du divinylbenzène et partiellement fonctionnalisés par un groupe fonctionnel permettant la liaison covalente d'un premier acide aminé.^{252,253}

Afin d'exploiter tout le potentiel de cette technique, il est important de comprendre la nature du support et son rôle dans la synthèse. Sa caractéristique fondamentale est qu'il doit être insoluble afin de réaliser une purification par simple filtration à chaque ajout d'acide aminé. Pour maximiser le contact entre le milieu réactionnel et les sites réactifs sur la résine, il est intéressant d'avoir un gonflement maximal. En effet, les billes, qui sont poreuses et peuvent changer de taille en fonction du solvant dans lequel elles sont utilisées, doivent être imprégnées de ce solvant et de réactif pour garantir l'efficacité de la réaction.²⁵⁴ Les résines peuvent gonfler jusqu'à dix fois par rapport à leur volume à sec si le solvant est correctement choisi, afin de favoriser la diffusion des réactifs présents en solution vers les sites réactionnels.²⁵⁵

Quand la résine est sèche, les chaînes de polymère sont en contact les unes avec les autres, ce qui résulte en une très faible surface spécifique.²⁵⁶ La diffusion de toute molécule à travers cet état vitreux est très lente. Lorsque le polymère entre en contact avec un solvant de polarité similaire à la sienne, il commence à s'imbiber de solvant et à gonfler. Le gonflement d'un polymère réticulé équivaut à la solvataion d'un polymère linéaire. Au lieu de se dissoudre et de former une solution, les chaînes de polymère individuelles restent liées de manière covalente les unes aux autres mais s'éloignent en incorporant le solvant (FIGURE 4.39).

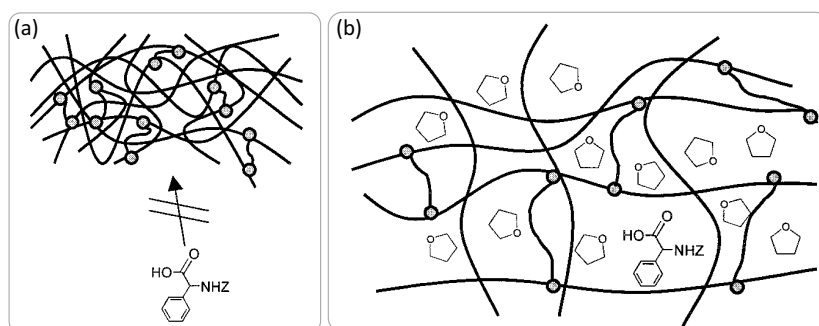


FIGURE 4.39 – Illustration montrant la capacité des composés à pénétrer à l'intérieur d'un polymère réticulé (a) non gonflé (b) gonflé.²⁵²

En conséquence, le polymère réticulé absorbe le solvant, ce qui entraîne une augmentation de volume lorsque les molécules de solvant occupent des positions situées entre les chaînes du polymère (FIGURE 4.39).²⁵²

Le gonflement d'un polymère dans un solvant donné est très fortement dépendant de sa réticulation et de son taux de fonctionnalisation. Plus la réticulation est faible, plus le polymère présente de bonnes propriétés de gonflement alors que les polymères fortement réticulés, bien que plus résistants mécaniquement, ne gonflent pas beaucoup, même dans les bons solvants.²⁵⁴ En effet, le volume maximal de gonflement du polymère est inversement proportionnel au carré du pourcentage de réticulation. Dans le modèle utilisé, une résine de copoly(styrène-divinylbenzène) forme un réseau tétraédrique régulier et est donc isomorphe du diamant. Par ailleurs, on considère qu'il n'y a pas d'interpénétration

4.3. ÉTUDE PAR AFM-IR DE BILLES DE POLYSTYRÈNE FONCTIONNALISÉES

des chaînes. À partir de la densité du diamant ($3,51 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$) et de la distance carbone-carbone ($1,54 \text{ \AA}$), le nombre de sites tétraédriques par millilitre a été calculé. La distance C-C a été remplacée par la distance entre les nœuds de réticulation et la densité de la résine a pu être calculée selon l'expression :

$$G_{\max} = V_d \left(\frac{E_d}{E_s n} \right) \left(\frac{r_s n}{2r_d} \right)^3$$

avec

- G_{\max} le gonflement maximal par gramme de résine ;
- V_d l'inverse de la densité du diamant ;
- E_d la masse molaire du diamant ($12,0 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) ;
- E_s la masse molaire du polystyrène ($104 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) ;
- r_d la distance C-C du diamant ($1,54 \text{ \AA}$) ;
- r_s la distance entre deux nœuds ($2,6 \text{ \AA}$) ;
- n la quantité de matière de polystyrène par rapport à celle de divinylbenzène.

Les résultats obtenus sont présentés dans le TABLEAU 4.2.²⁵⁴

TABLEAU 4.2 – Calcul du gonflement maximal du polystyrène réticulé.²⁵⁴

% de réticulation	Distance entre deux nœuds (Å)	Gonflement maximal vol/g (mL)
Diamant	1,54	0,285
2	65	49
1	130	196
0,5	260	784
0,25	520	3136

Par ailleurs, le volume des billes augmente avec la masse de peptide greffé à l'intérieur des billes, comme indiqué FIGURE 4.40.

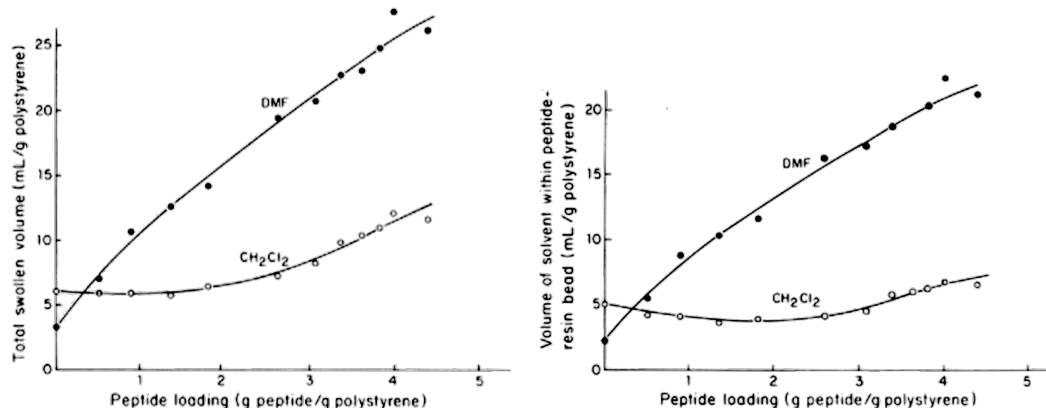


FIGURE 4.40 – Gauche : volume total de gonflement de billes obtenu par mesure du diamètre des billes en fonction de la masse de peptide greffé ; Droite : Volume de solvant à l'intérieur des billes en fonction de la masse de peptide greffé.²⁵⁴

Les propriétés de gonflement du couple peptide protégé-résine sont influencées par chaque composant du système. Durant la synthèse peptidique sur un polystyrène réticulé, la solvataion est initialement une propriété du polymère qui compose les billes, alors qu'à la fin d'une longue synthèse, la solvataion est influencée par le peptide protégé, qui est mieux solvatoé que s'il n'avait pas été attaché sur un support solide. Ainsi, à la fois le polymère et le peptide protégé exercent un effet de solubilisation complémentaire l'un sur l'autre et ils déterminent tous les deux le gonflement de la bille dans un solvant donné.

Il n'existe pas d'échelle universelle de polarité permettant d'interpréter globalement tous les effets des solvants,²⁵⁷ et la performance d'un solvant doit être évaluée de manière expérimentale.²⁵⁸⁻²⁶⁰ Pour le polystyrène initial, le dichlorométhane est un meilleur solvant de gonflement alors que le DMF est meilleur pour les résines recouvertes de peptides protégés (FIGURE 4.41).

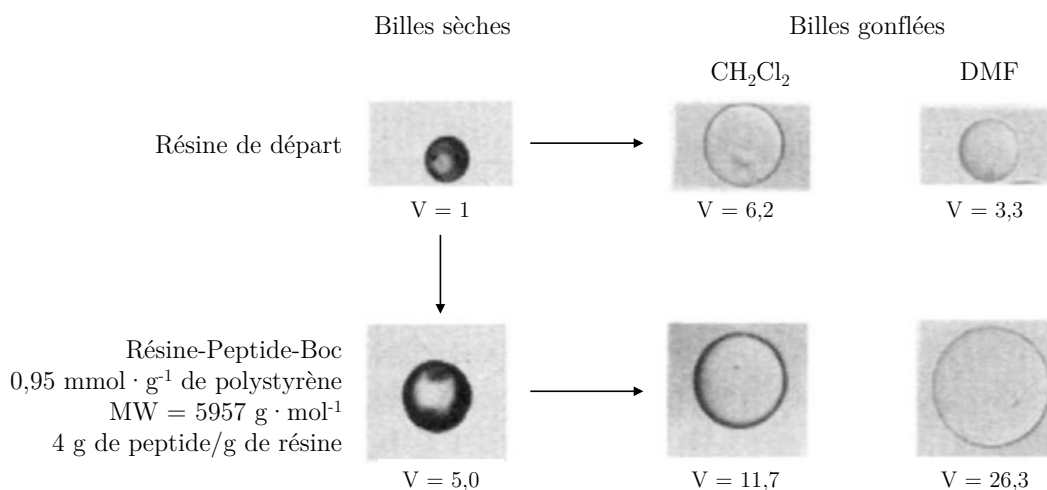


FIGURE 4.41 – Résine de départ (polystyrène) et effet du solvant et du greffage d'un peptide sur le gonflement.²⁵⁴

En outre, il n'a pas été montré qu'il existe un volume limite de gonflement, qui correspondrait à un remplissage progressif par le peptide de tous les sites disponibles à l'intérieur des billes : au contraire, l'espace disponible augmente au fur et à mesure que le peptide est allongé (FIGURE 4.40).

Intérêts de l'étude de la localisation des sites de fixation dans les billes de polystyrène :

Une conviction forte chez les chimistes réalisant des synthèses sur support solide est que la réactivité des sites est répartie à l'intérieur et en surface des billes. Cette conviction s'appuie notamment sur la quantité de matière de molécules pouvant être fixée par bille, ce nombre dépassant souvent le nombre de sites de surface. Il faut noter cependant que la plupart des schémas représentant cette synthèse ne considèrent que les sites de surface. L'observation des billes par microscopie induit l'idée de billes dures et réactives principalement par leurs surfaces. L'optimisation de la synthèse sur support solide nécessite une bonne connaissance de l'accessibilité des groupements d'attache présents sur le polymère ainsi que la maîtrise de la cinétique de la fixation des acides aminés.

4.3.4 Analyse de la distribution de la fixation de sondes sur et dans les billes de polystyrène

Par autoradiographie

Les premières études de coupes de billes ont été réalisées par autoradiographie par MERRIFIELD *et al.*^{254,261} L'échantillon étudié est un acide aminé lié à une résine qui contient 70 % de peptide en masse et dont les valines ont été marquées au tritium. Les billes ont ensuite été coupées par un microtome puis analysées par transfert sur émulsion photographique. La résolution de cette technique est de 0,5 μm . On constate que la distribution du peptide dans la bille est uniforme, ce qui indique que la synthèse a bien lieu dans toute la bille (FIGURE 4.42). Les auteurs concluent que plus de 99 % des sites actifs sont à l'intérieur des billes.²⁶¹

Cependant, cette méthode n'a jamais été utilisée pour suivre l'avancement d'une réaction en raison de la nécessité d'effectuer un marquage radioactif. D'autres techniques de microscopie optique plus accessibles, comme la microscopie de fluorescence, ont permis d'améliorer la connaissance des réactions sur support solide, afin par exemple de concevoir des résines améliorées pour la synthèse et d'autres applications en phase solide.

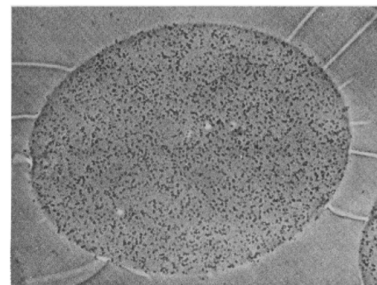


FIGURE 4.42 – Autoradiographie d'une coupe de bille contenant un peptide greffé au polymère. Le diamètre de la bille est d'environ 70 μm . La section circulaire a été distordue pendant le processus de fixation et les lignes radiales sont des artefacts du séchage de l'émulsion photographique.²⁵⁴

Par microscopie de fluorescence confocale

L'homogénéité de la distribution des sites fonctionnels est un paramètre important des billes pour assurer une fonctionnalisation élevée et une réactivité identique sur tous les sites. Pour prouver cette hypothèse, RADEMANN *et al.* ont étudié des billes de polystyrène réticulé à 1 % par du divinylbenzène ($1 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$, 200 ± 400 mesh) et possédant des groupements méthylamine, qu'ils ont fonctionnalisées par de la 5,6-carboxy-tétraméthylrhodamine (CTMR). Les billes de polymère ont été étudiées par microscopie de fluorescence confocale et les résultats sont présentés sur la FIGURE 4.43(a-b).²⁶²

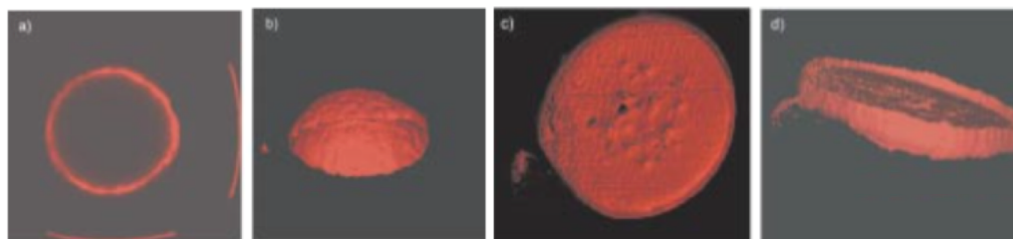


FIGURE 4.43 – Bille de aminométhyl 1 %-divinylbenzène-polystyrène ($1 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$, 200 ± 400 mesh) acylée avec 1 équivalent de CTMR et étudiée par microscopie de fluorescence confocale. (a) Coupe optique, (b) Reconstruction en trois dimensions obtenue à partir de plusieurs coupes. (c-d) Coupe d'une bille au microtome (150 μm de diamètre et 5 μm d'épaisseur).²⁶²

Ces billes ont présenté une fluorescence intense à la surface, mais aucun signal n'a été détecté à l'intérieur des coupes. Dans la littérature, un résultat similaire avait amené

les auteurs à conclure que les sites fonctionnels étaient distribués de manière hétérogène dans les billes.²⁶³ En revanche, comme ces observations semblent contredire les résultats obtenus par autoradiographie, RADEMANN *et al.* ont décidé d'observer également des billes coupées au microtome. Dans ce cas, la fluorescence des billes est bien homogène sur toute la coupe de la bille, comme présenté FIGURE 4.43 (c-d). La répartition en surface de la fluorescence n'est donc pas due à une répartition hétérogène des sites actifs mais à une extinction de fluorescence dans le cas où la concentration en CTMR est trop élevée, ce qui limite l'utilisation de cette technique.

Par microscopie infrarouge

Afin de s'affranchir de ces phénomènes d'extinction de fluorescence due à une trop grande accumulation, l'utilisation de la microscopie infrarouge pourrait se révéler très pertinente. Dans cette étude, nous avons fonctionnalisé des billes de résine Rink-Amide-MBHA par un complexe de rhénium tricarbonyle. Ces billes ont ensuite été fixées dans une résine d'inclusion époxy puis coupées en coupes de 150 à 500 nm d'épaisseur à l'aide d'un ultramicrotome.

Fonctionnalisation : Des billes de type Fmoc-Rink-Amide-4-méthylbenzhydrylamine (Fmoc-Rink-Amide-MBHA, 100-200 mesh, $0,69 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$, FIGURE 4.44)²⁶⁴ ont été fonctionnalisées par une sonde, selon un protocole classique de synthèse peptidique que nous allons détailler ci-dessous.

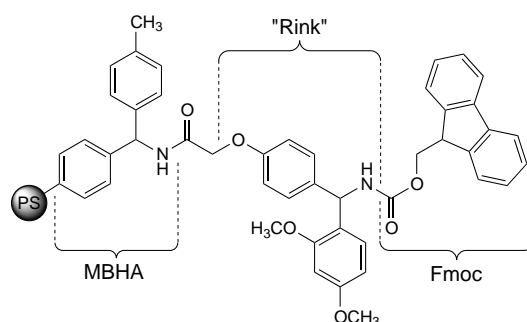


FIGURE 4.44 – Structure des groupements espaceur de la résine de type Fmoc-Rink-Amide-MBHA.

Le mesh est une convention américaine de mesure de maille d'un tamis, qui est l'inverse de la taille d'une maille : la valeur en mesh est d'autant plus élevée que la taille de la maille est faible, même si la correspondance n'est pas parfaitement proportionnelle. Ainsi, une taille de mesh de 100 correspond à une taille de tamis de $149 \mu\text{m}$ (c'est-à-dire que le tamis laisse passer des particules jusqu'à $149 \mu\text{m}$) et une taille de mesh de 200 à une taille de tamis $74 \mu\text{m}$.

Dans un premier temps, les billes décorées par des fonctions amine protégées par un Fmoc (71,9 mg, 0,05 mmol) ont été mises à gonfler dans 2 mL de dichlorométhane (DCM) pendant 10 min. Après des rinçages au diméthylformamide (DMF), le groupement Fmoc a été éliminé par addition d'une solution de pipéridine à 20 % en volume dans la *N*-méthylpyrrolidone (NMP, 2 mL, agitation pendant 1 min, rinçage et ajout de 2 mL, agitation pendant 15 min), selon le mécanisme décrit SCHÉMA 4.1.

4.3. ÉTUDE PAR AFM-IR DE BILLES DE POLYSTYRÈNE FONCTIONNALISÉES

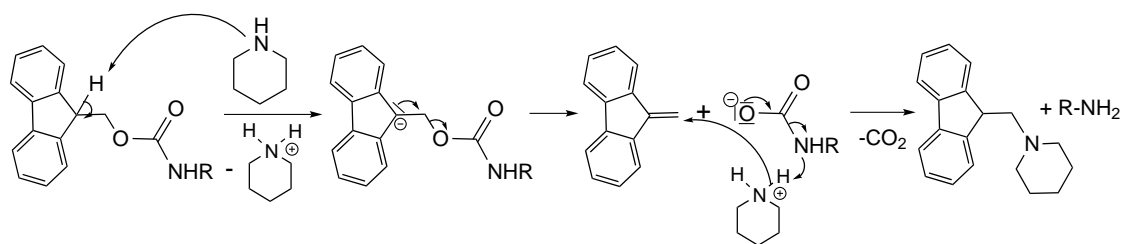


SCHÉMA 4.1 – Mécanisme de déprotection d'une amine protégée par un groupement Fmoc par la pipéridine.

Les fonctions amine libres ont été mises à réagir avec le composé **5** (3 eq.) dans le DMF en présence de HOBt (hydroxybenzotriazole, 3 eq.), HBTU (hexafluorophosphate benzotriazole tetraméthyl uronium, 3 eq.) et DIEA (diisopropyléthylamine, 6 eq.) pendant 30 min (SCHÉMA 4.2). Après rinçage au DMF, au dichlorométhane puis au méthanol, les billes fonctionnalisées, notées **73**, ont été séchées sous vide.

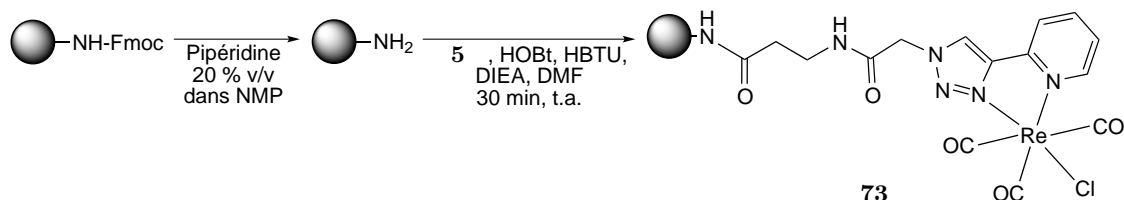


SCHÉMA 4.2 – Fonctionnalisation des billes de polystyrène par une sonde possédant une fonction acide carboxylique.

Un spectre IR des billes fonctionnalisées a été enregistré et a été comparé au spectre IR des billes non fonctionnalisées (FIGURE 4.45). Ce spectre fait apparaître les bandes de vibration d'élongation des fonctions carbonyle $C=O$ de la sonde fixée, vers 1900 (bande E dédoublée correspondant aux vibrations antisymétriques) et 2023 cm^{-1} (bande A_1 correspondant à la vibration symétrique).

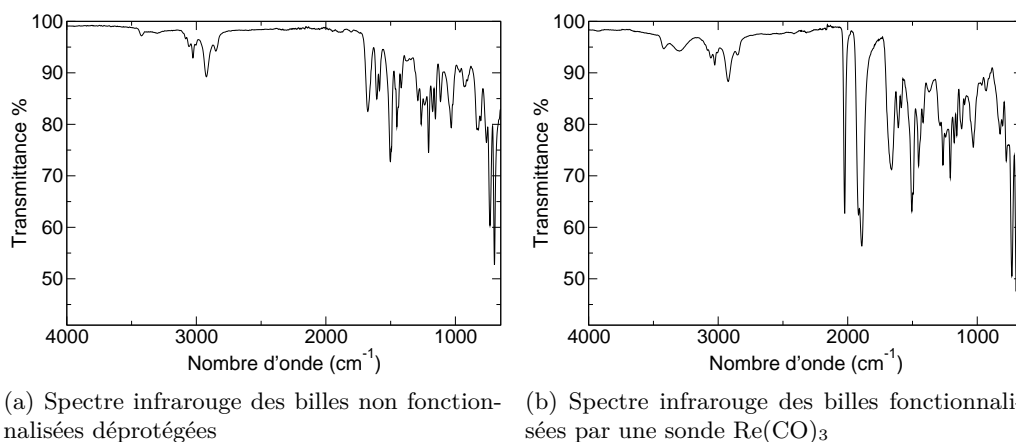


FIGURE 4.45 – Spectres FTIR enregistrés en mode ATR des billes de polystyrène libres (a) et possédant une sonde de type $\text{Re}(\text{CO})_3$ (b).

Inclusion dans la résine (réalisée par Sylvain TRÉPOUT à l'Institut CURIE, Orsay) :

Les billes ont été rincées par de l'éthanol absolu, centrifugées et le surnageant retiré. Cette étape a été réalisée deux fois. Les billes ont été mises à sécher dans une étuve à 40 °C. De la résine EMBED 812 (résine d'inclusion), mélangée à du DDSA (anhydride dodécényl succinique), du NMA et du DMP-30, a été ajoutée aux billes sèches dans une gélule en plastique et le mélange billes + résine agité pendant 10 minutes à température ambiante. La gélule en plastique a été chauffée pendant 48 h à 60 °C. Une pyramide a été taillée et des coupes de différentes épaisseurs ont été réalisées à l'aide d'un ultramicrotome (Leica UltraCut UCT). La photographie FIGURE 4.46 présente une gélule en plastique contenant des billes dans la résine. Les coupes ont ensuite été déposées sur des lamelles de fluorure de calcium (CaF_2 , diamètre 13 mm, épaisseur 0,2 mm).

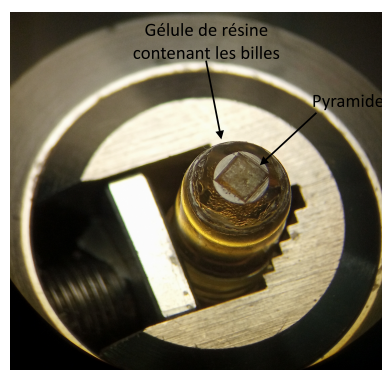


FIGURE 4.46 – Photographie d'une gélule de résine contenant des billes, au travers de l'oculaire du Leica UltraCut UCT (réalisée par Sylvain TRÉPOUT).

Étude par FTIR : Les billes fixées dans la résine d'inclusion époxy ont d'abord été étudiées par spectromicroscopie infrarouge (FTIR-SM) sur le microscope Agilent Cary 620, au département de chimie de l'ENS. Pour chaque échantillon, des spectres de 128 scans avec une résolution spectrale de 4 cm^{-1} entre 800 et 4000 cm^{-1} ont été enregistrés sur une zone d'intérêt et des cartes ont été générées par intégration de bandes spécifiques : la bande A_1 des fonctions carbonyle des CO coordonnés au rhénium ($2065\text{--}2005\text{ cm}^{-1}$) pour localiser les billes marquées, la bande correspondant à la vibration d'élongation des liaisons C-H aromatiques (3020 cm^{-1}), caractéristiques du polystyrène des billes et la bande entre 1705 et 1765 cm^{-1} , caractéristique de la résine d'inclusion époxy (FIGURE 4.47).

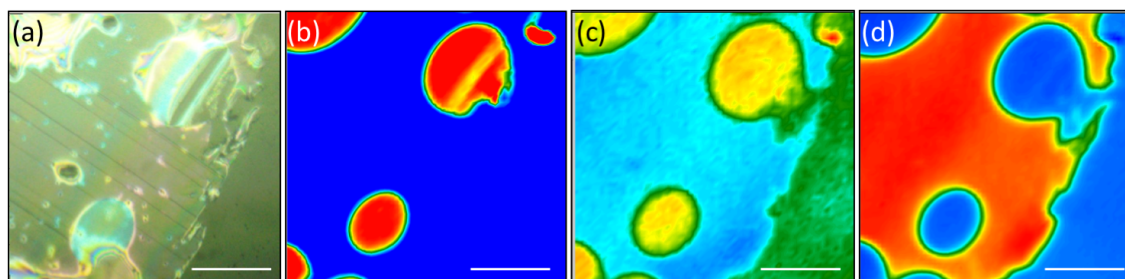


FIGURE 4.47 – Coupe de billes de polystyrène fonctionnalisées par une sonde de type $\text{Re}(\text{CO})_3$ et incluses dans une résine d'inclusion époxy, de 500 nm d'épaisseur et montée sur une lamelle de CaF_2 (Barre d'échelle = $100\text{ }\mu\text{m}$). (a) Image visible, (b-d) Images FTIR-SM obtenues par intégration de (b) la bande A_1 ($2055\text{--}2005\text{ cm}^{-1}$), (c) la bande à 3020 cm^{-1} , caractéristique des vibrations d'élongation des liaisons CH aromatiques, (d) la bande de vibration d'élongation des liaisons $\text{C}=\text{O}$ ($1765\text{--}1705\text{ cm}^{-1}$), le code couleur allant du bleu (faible intensité) au rouge (forte intensité).

On constate que l'intégration de ces bandes est pertinente car elles permettent d'identifier les différents composants de ces coupes. En outre, ces images montrent que le signal des bandes de vibration d'élongation des liaisons $\text{C}\equiv\text{O}$ est homogène dans la bille, ce qui indique une répartition uniforme des sites de fixation à l'intérieur des billes poreuses. Des

4.3. ÉTUDE PAR AFM-IR DE BILLES DE POLYSTYRÈNE FONCTIONNALISÉES

spectres IR ont été enregistrés dans les billes et dans la résine d'inclusion (FIGURE 4.48).

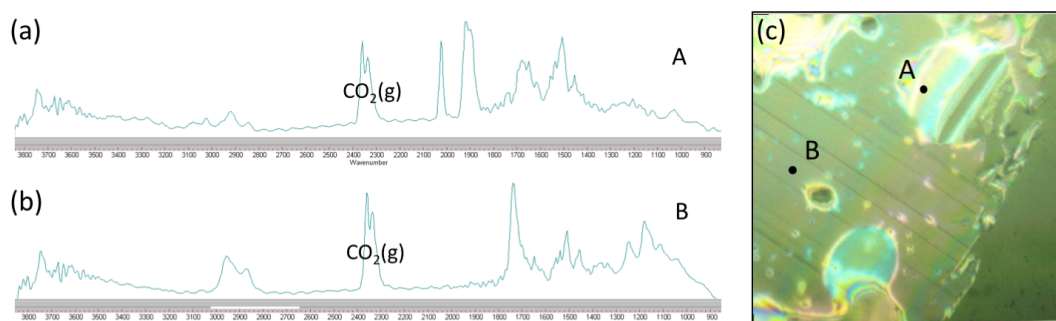


FIGURE 4.48 – Coupe de billes de polystyrène fonctionnalisées par une sonde de type $\text{Re}(\text{CO})_3$, incluses dans une résine d'inclusion époxy, de 500 nm d'épaisseur et montée sur une lamelle de CaF_2 (Barre d'échelle = 100 μm). (a-b) Spectres IR enregistrés entre 900 et 3800 cm^{-1} sur (a) un point correspondant à une bille (point A), (b) la résine d'inclusion époxy (point B), (c) Image visible.

Ces spectres nous confirment la pertinence du choix des bandes pour la cartographie. En effet, on constate que les billes possèdent bien les bandes intenses caractéristiques de la sonde $\text{Re}(\text{CO})_3$ ainsi qu'un signal au-delà de 3000 cm^{-1} (spectre (b)), qui n'est pas visible dans la résine d'inclusion époxy (spectre (c)). Cependant ce dernier signal est assez faible donc les bandes de vibration d'élongation des liaisons $\text{C}\equiv\text{O}$ sont plus pertinentes pour cette étude. Au contraire, la résine d'inclusion époxy possède une bande intense à 1730 cm^{-1} , attribuée aux fonctions ester de la résine d'inclusion et qui n'est pas présente dans les billes. Nous avons donc une signature caractéristique pour chacune des deux composantes de ces coupes.

Une carte plus grande a été enregistrée dans une autre région de la coupe avec les mêmes limites d'intégration, et de la même manière (FIGURE 4.49), des spectres IR représentatifs de chacune des zones ont été obtenus (FIGURE 4.50). Ces spectres sont en accord avec ceux obtenus précédemment et confirment la validité de notre approche.

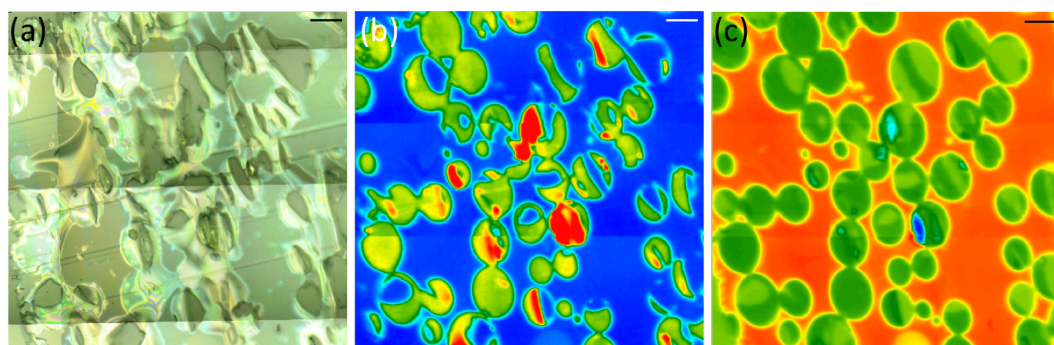


FIGURE 4.49 – Coupe de billes de polystyrène fonctionnalisées par une sonde de type $\text{Re}(\text{CO})_3$ et incluses dans une résine d'inclusion époxy, de 500 nm d'épaisseur et montée sur une lamelle de CaF_2 (Barre d'échelle = 100 μm). (a) Image visible, (b-c) Images FTIR-SM obtenues par intégration de (b) la bande A_1 (2055–2005 cm^{-1}), (c) la bande de vibration d'élongation des liaisons $\text{C}=\text{O}$ (1765–1705 cm^{-1}), le code couleur allant du bleu (faible intensité) au rouge (forte intensité).

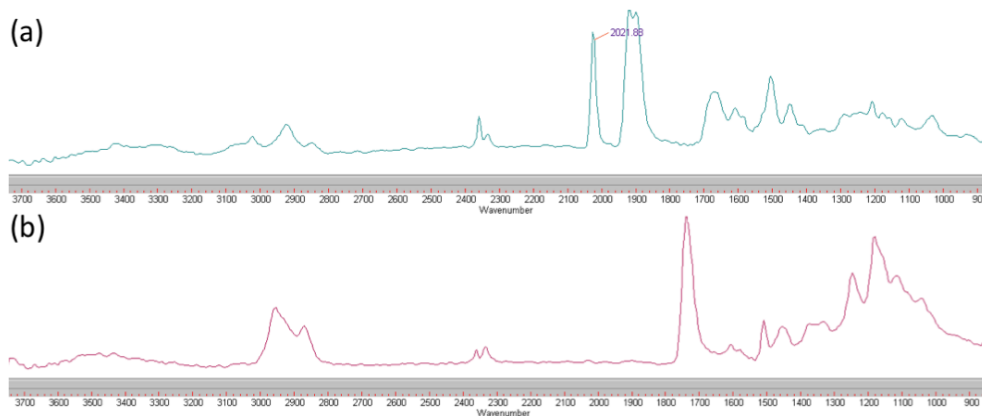


FIGURE 4.50 – Coupe de billes de polystyrène fonctionnalisées par une sonde de type $\text{Re}(\text{CO})_3$ et incluses dans une résine d’inclusion époxy, de 500 nm d’épaisseur et montée sur une lamelle de CaF_2 (Barre d’échelle = 100 μm). Spectres IR enregistrés entre 900 et 3800 cm^{-1} sur (a) un point correspondant à une bille, (b) la résine d’inclusion époxy.

Après avoir montré que les sites étaient répartis de manière homogène dans les billes et non pas uniquement à la surface, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la frontière entre la bille de polystyrène et la résine d’inclusion époxy. Pour ce faire, une bonne résolution spatiale est requise, ce qui n’est pas possible avec les méthodes de microscopie classiques mettant en jeu une détection optique en raison de la limite de diffraction. Par conséquent, l’AFM-IR est une méthode de choix pour ce type d’étude.

Comme présenté en introduction, l’AFM-IR peut être réalisé avec deux modes : contact ou *tapping*. Le mode contact est moins sensible que le mode *tapping*. Pour des billes libres, seul le mode *tapping* convient en raison de leur faible adhérence à la surface mais les deux méthodes peuvent être employées pour les billes incluses dans la résine d’inclusion. Nous avons utilisé les deux modes ici pour les comparer.

Tout d’abord, une coupe de bille de 150 μm d’épaisseur a été étudiée en mode contact. La FIGURE 4.51 présente la topographie obtenue par la pointe AFM ainsi que cinq spectres IR tracés sur la coupe dans la résine d’inclusion et dans la bille. Comme pour les images obtenues en microscopie infrarouge classique, on observe les mêmes signaux caractéristiques pour la résine d’inclusion époxy (bande de vibration d’élongation de liaison $\text{C}=\text{O}$ à 1730 cm^{-1} , spectres 1 et 2) et pour la sonde $\text{Re}(\text{CO})_3$ (bande E dédoublée correspondant aux vibrations d’élongation antisymétriques des liaisons $\text{C}\equiv\text{O}$ vers 1900 cm^{-1} , spectres 3, 4 et 5). Les spectres enregistrés aux points 1 et 2 présentent également un faible signal attribué à la sonde vers 1900 cm^{-1} , qui est dû à un effet photoacoustique. En effet, le faisceau IR étant plus large que la pointe, il illumine aussi la zone située sous le levier, donc on enregistre majoritairement le signal sous la pointe mais il y a aussi une faible contribution d’un signal sous le levier.

4.3. ÉTUDE PAR AFM-IR DE BILLES DE POLYSTYRÈNE FONCTIONNnalisÉES

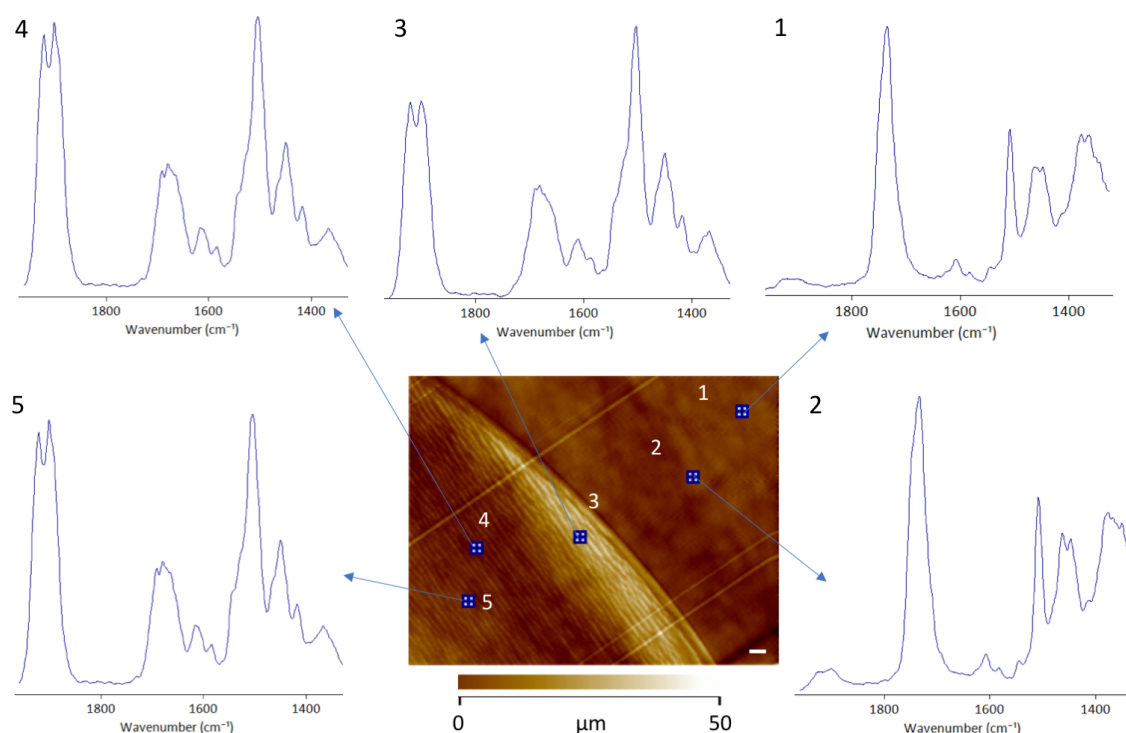


FIGURE 4.51 – Coupe de bille de polystyrène fonctionnalis e par une sonde de type $\text{Re}(\text{CO})_3$ et incluse dans une résine d’inclusion  poxyle, de 150 nm d’épaisseur et mont e sur une lamelle de CaF_2 (Barre d’échelle = 1 μm). Topographie AFM (au centre) et spectres IR enregistrés entre 1300 et 2000 cm^{-1} (plage accessible avec le laser) sur des points dans la résine d’inclusion (1 et 2) et à l’intérieur de la bille (3, 4 et 5).

Pour mieux visualiser la frontière entre la bille et la résine d’inclusion, une carte sur une zone agrandie a été enregistr e (FIGURE 4.52) et un code couleur diff rent a été utilis e pour visualiser l’intensité de la bande E (rouge, FIGURE 4.52(b)) et de la bande correspondant à la résine d’inclusion  poxyle (vert, FIGURE 4.52(c)).

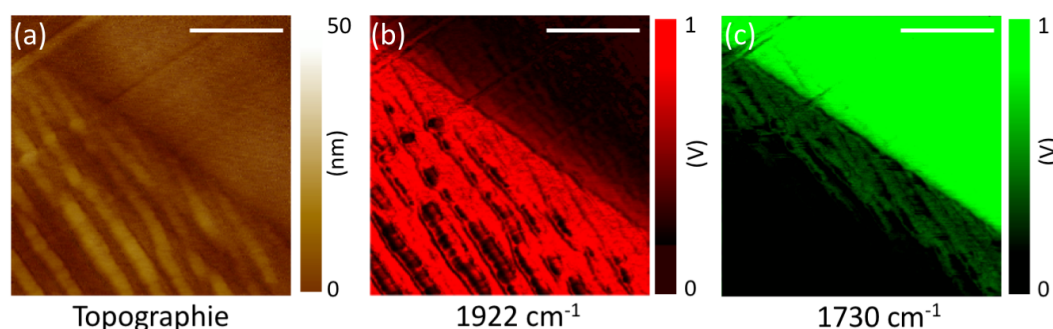


FIGURE 4.52 – Coupe de bille de polystyrène fonctionnalis e par une sonde de type $\text{Re}(\text{CO})_3$ et incluse dans une résine d’inclusion  poxyle, de 150 nm d’épaisseur et mont e sur une lamelle de CaF_2 (Barre d’échelle = 1 μm). (a) Topographie AFM, (b) Carte enregistr e en AFM-IR en mode contact à 1922 cm^{-1} ($\text{Re}(\text{CO})_3$ de **73**), (c) Carte enregistr e en AFM-IR en mode contact à 1730 cm^{-1} .

La frontière entre la bille et la résine semble assez nette. Cependant, il y a un signal faible de la résine à l’intérieur de la bille, ce qui pourrait indiquer que la résine a p n tr e à

l'intérieur de la bille de la même manière qu'un solvant qui permet son gonflement, mais on observe aussi un signal faible mais non nul de la sonde dans la résine d'inclusion, ce qui est plus surprenant. Cela pourrait être dû soit à des chaînes de polymère portant la sonde en surface, non agrégées en raison d'un gonflement partiel de la bille dû à la résine, soit à des effets physiques. Pour mieux étudier ce phénomène, une carte similaire a été réalisée en mode *tapping*, technique qui permet d'obtenir une meilleure résolution spatiale.

La FIGURE 4.53 présente la topographie de la coupe de bille ainsi qu'une carte enregistrée à 1922 cm^{-1} , qui correspond à un nombre d'onde d'absorption pour les ligands carbonyle de la sonde (bande E).

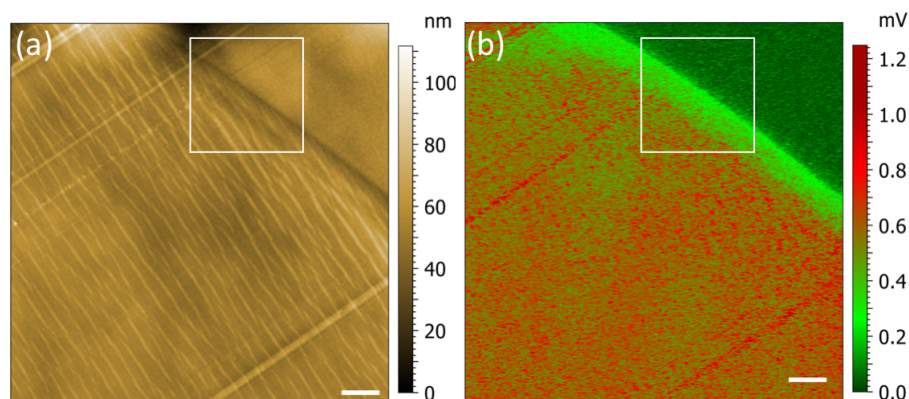


FIGURE 4.53 – Coupe de bille de polystyrène fonctionnalisée par une sonde de type $\text{Re}(\text{CO})_3$ et incluse dans une résine d'inclusion époxy, de 150 nm d'épaisseur et montée sur une lamelle de CaF_2 (Barre d'échelle = $1\ \mu\text{m}$). (a) Topographie AFM, (b) Carte enregistrée en AFM-IR en mode *tapping* à 1922 cm^{-1} ($\text{Re}(\text{CO})_3$ de **73**).

La carte enregistrée à 1922 cm^{-1} montre qu'à l'intérieur de la bille, l'intensité est globalement homogène, ce qui confirme que les sites de fixation sont bien uniformément répartis. En revanche, à la frontière entre la bille de polystyrène et la résine d'inclusion époxy, on constate la présence d'une région où l'intensité du signal semble plus faible. Nous avons alors enregistré à nouveau cette zone de transition (cadre blanc sur la FIGURE 4.53) entre la bille et la résine d'inclusion avec une meilleure résolution (FIGURE 4.54).

La carte enregistrée à 1922 cm^{-1} permet de confirmer la présence de trois zones distinctes. La zone notée 1 correspond à une absorption nulle pour la bande de vibration d'élongation des fonctions carbonyle (1922 cm^{-1}), ce qui est normal car cette région correspond à de la résine d'inclusion sans bille de polystyrène. La zone notée 3 correspond à une région d'absorption maximale pour la bande à 1922 cm^{-1} , c'est-à-dire à l'intérieur des billes marquées par la sonde $\text{Re}(\text{CO})_3$. Ce qui est plus surprenant, c'est la présence d'une zone intermédiaire, notée 2, qui forme une couronne autour de la zone 3 et pour laquelle l'intensité de la bande de vibration d'élongation de la liaison $\text{C}\equiv\text{O}$ est plus faible mais non nulle. Par comparaison avec l'image topographique, on constate que cette région est bien située à l'intérieur de la bille de polystyrène (zone striée sur l'image AFM). Cette région intermédiaire n'avait pas été observée en mode contact. Il semblerait donc que, même si l'intensité de la bande de vibration d'élongation des liaisons $\text{C}\equiv\text{O}$ est homogène au cœur de la bille, il existe un gradient de concentration entre la résine et la bille jusqu'à atteindre une valeur maximale qui correspond au cœur de la bille.

4.3. ÉTUDE PAR AFM-IR DE BILLES DE POLYSTYRÈNE FONCTIONNALISÉES

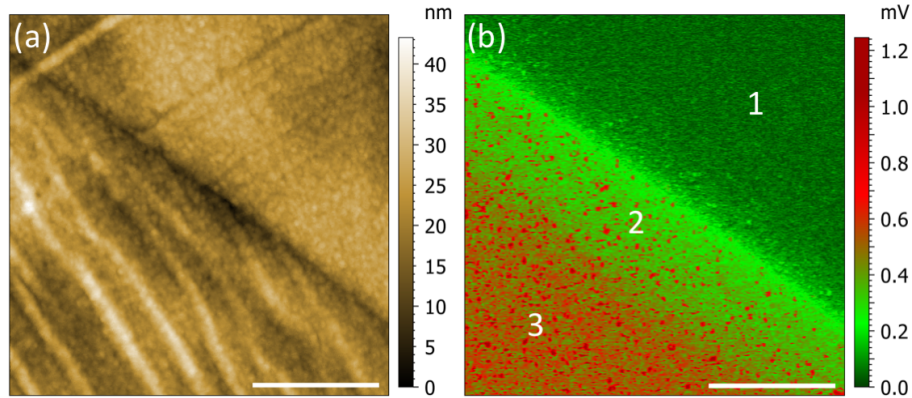


FIGURE 4.54 – Coupe de bille de polystyrène fonctionnalisée par une sonde de type $\text{Re}(\text{CO})_3$ et incluse dans une résine d’inclusion époxy, de 150 nm d’épaisseur et montée sur une lamelle de CaF_2 (Barre d’échelle = 1 μm). (a) Topographie AFM, (b) Carte enregistrée en AFM-IR en mode *tapping* à 1922 cm^{-1} ($\text{Re}(\text{CO})_3$ de **73**).

Une ligne horizontale a été tracée sur cette carte et des spectres IR ont été enregistrés à intervalles réguliers, indiqués par des croix sur la FIGURE 4.55. Une attention toute particulière a été portée à l’évolution des bandes situées à 1900 et 1730 cm^{-1} .

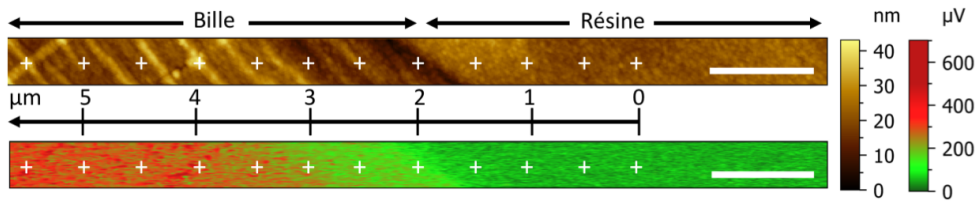


FIGURE 4.55 – Topographie AFM et carte enregistrée en AFM-IR en mode *tapping* à 1922 cm^{-1} d’une bille marquée (Barre d’échelle = 1 μm), enregistrement de spectres IR à intervalles réguliers sur une ligne (indiqués par des croix blanches).

Les spectres IR enregistrés sur ces points sont présentés FIGURE 4.56(a). Pour chaque point, l’intensité de la bande à 1922 et celle à 1730 cm^{-1} ont été relevées et tracées en fonction d’une longueur arbitraire qui correspond à la distance en μm entre le point considéré et le premier point, situé dans la résine. Le graphique est présenté FIGURE 4.56(b).

On constate que dans la résine, l’intensité de la bande à 1730 cm^{-1} est constante et que celle à 1922 cm^{-1} est nulle. À $2\text{ }\mu\text{m}$, on passe dans la zone 2, qui est caractérisée par une augmentation progressive de la bande à 1922 cm^{-1} en même temps qu’une diminution de celle à 1730 cm^{-1} jusqu’à atteindre une valeur limite vers $5\text{ }\mu\text{m}$ où l’intensité de la bande correspondant aux $\text{C}\equiv\text{O}$ est maximale. L’intensité de la bande à 1730 cm^{-1} correspondant à la résine d’inclusion est très faible mais non nulle à cette distance, ce qui est cohérent avec l’hypothèse d’un gonflement de la bille, laissant la résine pénétrer à la manière d’un solvant. En revanche, comme vu sur la FIGURE 4.51, à une certaine profondeur dans le cœur de la bille, l’intensité de cette bande est bien nulle, ce qui montre que seules les couches externes sont dilatées, les sites présents à l’intérieur de la bille sont plus difficiles d’accès.

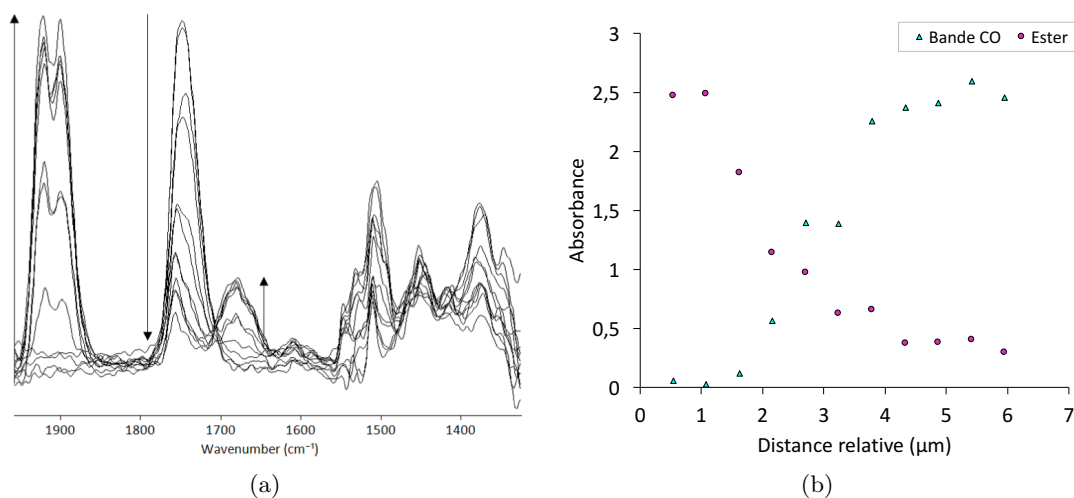


FIGURE 4.56 – (a) Spectres IR enregistrés à intervalles réguliers sur les points indiqués par des croix blanches FIGURE 4.55 (b) Évolution de l'intensité de la bande à 1730 cm^{-1} , attribuée aux fonctions ester de la résine d'inclusion époxy (rond rose) et de la bande à 1922 cm^{-1} , attribuée aux fonctions CO de la sonde (triangle bleu) le long de la ligne transversale indiquée FIGURE 4.55.

Remarques techniques : la carte présente deux particularités qui n'ont pas été discutées et qui sont présentées FIGURE 4.57.

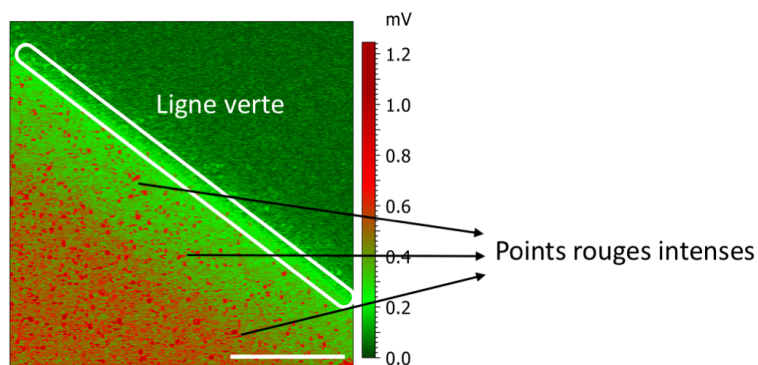


FIGURE 4.57 – Coupe de bille de polystyrène fonctionnalisée par une sonde de type $\text{Re}(\text{CO})_3$ et incluse dans une résine d'inclusion époxy, de 150 nm d'épaisseur et montée sur une lamelle de CaF_2 (Barre d'échelle = $1\text{ }\mu\text{m}$). Carte enregistrée en AFM-IR en mode *tapping* à 1922 cm^{-1} ($\text{Re}(\text{CO})_3$ de **73**). Mise en évidence de la présence d'une ligne vert clair à l'interface bille-résine et de points d'intensité élevée dans la bille.

Tout d'abord, une bande vert clair apparaît à la frontière entre la bille et la résine. On pourrait penser que cela est dû à la présence de composé en surface de la bille, mais en réalité, cette bande n'a pas d'interprétation chimique. Lors de l'illumination de l'échantillon par le faisceau laser, il se produit une expansion thermique de la bille de polystyrène verticalement, mais aussi latéralement en raison de la faible épaisseur de l'échantillon. Par conséquent, il se forme un bourrelet au niveau de la transition entre les deux solides suite à cette dilatation.

4.3. ÉTUDE PAR AFM-IR DE BILLES DE POLYSTYRÈNE FONCTIONNALISÉES

En outre, la carte présente des points rouges d'intensité élevée que l'on pourrait attribuer à une hétérogénéité des sites de fixation de la sonde ou à des chaînes de polymère agrégées entre elles. Une fois encore, ces points rouges n'ont pas d'interprétation chimique mais sont dus à des points de variation de la phase de vibration de la pointe.

4.3.5 Conclusion

Dans cette étude, nous avons montré qu'il est possible de fonctionnaliser des particules de façon homogène et de les caractériser grâce à l'AFM-IR. Nous allons maintenant mesurer sur ces coupes l'augmentation de chaleur sous irradiation IR grâce à une pointe AFM-IR sur laquelle est présent un thermocouple. Ainsi nous pourrions avoir une idée de l'augmentation de chaleur à la surface. Nous utiliserons ensuite des nanoparticules de silice fonctionnalisées par le même type de sonde $\text{Re}(\text{CO})_3$ pour voir l'effet de l'irradiation IR sur ces particules de taille plus faible afin de les étudier par la suite en milieu cellulaire.

4.4 Annexe : images supplémentaires

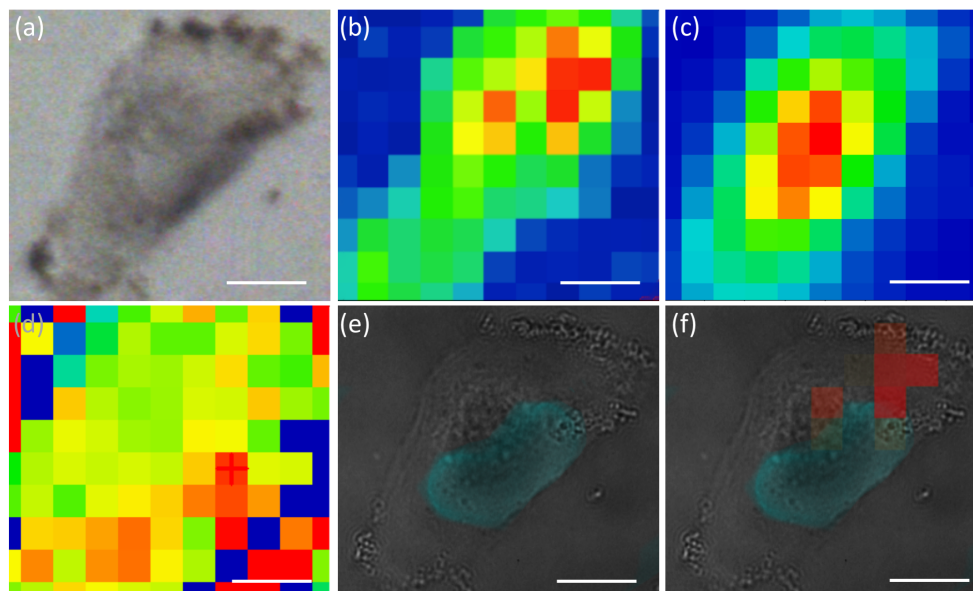


FIGURE 4.58 – Cellule MDA-MB-231 incubée avec le composé **70** ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h), fixée au PFA et séchée à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a) Image visible, (b-d) Images SR-FTIR-SM obtenues par intégration de (b) la bande E ($1960\text{-}1910 \text{ cm}^{-1}$), (c) la bande amide I ($1705\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$), (d) le rapport $\text{CH}_3\text{:CH}_2$ en utilisant les vibrations antisymétriques de CH_3 ($2975\text{-}2945 \text{ cm}^{-1}$) et CH_2 ($2945\text{-}2905 \text{ cm}^{-1}$), le code couleur allant du bleu (faible intensité) au rouge (forte intensité), (e) Marquage des noyaux (Hoechst, bleu, ex 350/50x em 460/50m), (f) Superposition du point chaud obtenu en IR et de la fluorescence du Hoechst (bleu, ex 350/50x em 460/50m).

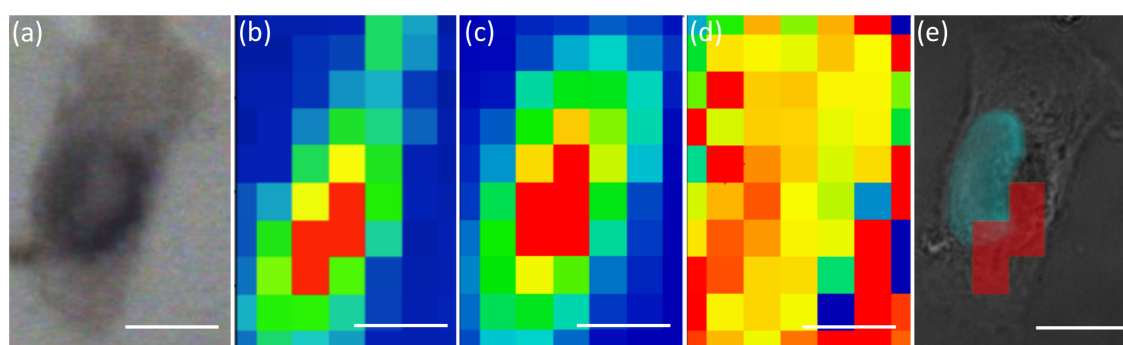


FIGURE 4.59 – Cellule MDA-MB-231 incubée avec le composé **70** ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h), fixée au PFA et séchée à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a) Image visible, (b-d) Images SR-FTIR-SM obtenues par intégration de (b) la bande E ($1960\text{-}1910 \text{ cm}^{-1}$), (c) la bande amide I ($1705\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$), (d) le rapport $\text{CH}_3\text{:CH}_2$ en utilisant les vibrations antisymétriques de CH_3 ($2975\text{-}2945 \text{ cm}^{-1}$) et CH_2 ($2945\text{-}2905 \text{ cm}^{-1}$), le code couleur allant du bleu (faible intensité) au rouge (forte intensité), (e) Superposition du point chaud obtenu en IR et de la fluorescence du Hoechst (bleu, ex 350/50x em 460/50m).

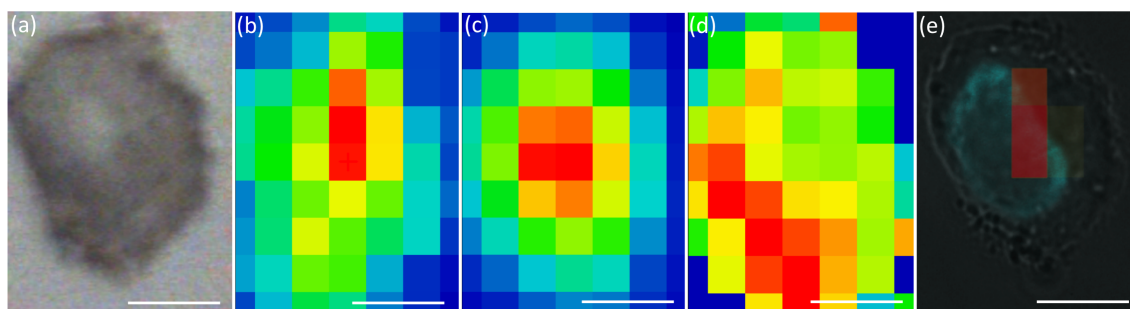


FIGURE 4.60 – Cellule MDA-MB-231 incubée avec le composé **70** ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h), fixée au PFA et séchée à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a) Image visible, (b-d) Images SR-FTIR-SM obtenues par intégration de (b) la bande E ($1960\text{-}1910 \text{ cm}^{-1}$), (c) la bande amide I ($1705\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$), (d) le rapport $\text{CH}_3\text{:CH}_2$ en utilisant les vibrations antisymétriques de CH_3 ($2975\text{-}2945 \text{ cm}^{-1}$) et CH_2 ($2945\text{-}2905 \text{ cm}^{-1}$), le code couleur allant du bleu (faible intensité) au rouge (forte intensité), (e) Superposition du point chaud obtenu en IR et de la fluorescence du Hoechst (bleu, ex 350/50x em 460/50m).

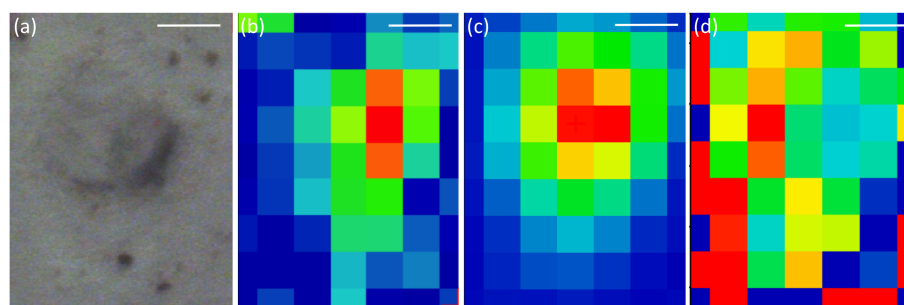


FIGURE 4.61 – Cellule MDA-MB-231 incubée avec le composé **71** ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h), fixée au PFA et séchée à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a) Image visible, (b-d) Images SR-FTIR-SM obtenues par intégration de (b) la bande E ($1960\text{-}1910 \text{ cm}^{-1}$), (c) la bande amide I ($1705\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$), (d) le rapport $\text{CH}_3\text{:CH}_2$ en utilisant les vibrations antisymétriques de CH_3 ($2975\text{-}2945 \text{ cm}^{-1}$) et CH_2 ($2945\text{-}2905 \text{ cm}^{-1}$), le code couleur allant du bleu (faible intensité) au rouge (forte intensité).

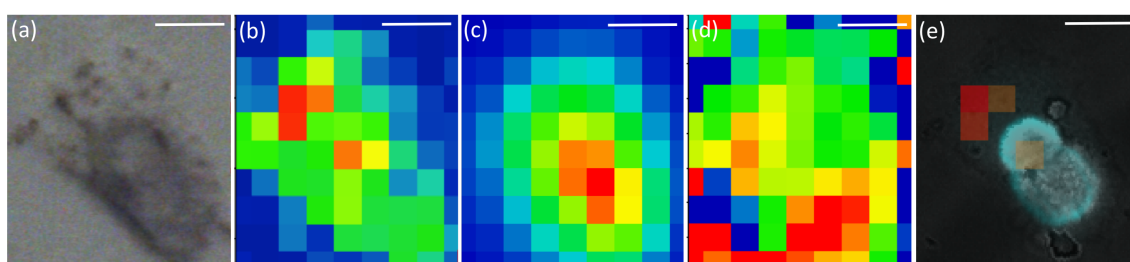


FIGURE 4.62 – Cellule MDA-MB-231 incubée avec le composé **71** ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h), fixée au PFA et séchée à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a) Image visible, (b-d) Images SR-FTIR-SM obtenues par intégration de (b) la bande E ($1960\text{-}1910 \text{ cm}^{-1}$), (c) la bande amide I ($1705\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$), (d) le rapport $\text{CH}_3\text{:CH}_2$ en utilisant les vibrations antisymétriques de CH_3 ($2975\text{-}2945 \text{ cm}^{-1}$) et CH_2 ($2945\text{-}2905 \text{ cm}^{-1}$), le code couleur allant du bleu (faible intensité) au rouge (forte intensité), (e) Superposition du point chaud obtenu en IR et de la fluorescence du Hoechst (bleu, ex 350/50x em 460/50m).

Chapitre 5

Fonctionnalisation de sondes $\text{Re}(\text{CO})_3$ pour le marquage d'organites

5.1 Introduction

Les sondes multimodales permettent de combiner les avantages de différentes techniques sur une même molécule. Les complexes de métal-carbonyle présentent de nombreux avantages pour réaliser de l'imagerie en contexte cellulaire. En particulier, les complexes de la forme $(\text{L})\text{Re}(\text{CO})_3$ possèdent trois modalités. Ils sont luminescents, en raison d'une bande de transfert de charge entre le rhénium et le ligand L de type bipyridine, détectables en infrarouge, grâce aux bandes $\text{C}\equiv\text{O}$, mais aussi détectables par fluorescence X grâce au rhénium.

L'objectif du travail qui suit est de synthétiser des sondes ciblant différents organites dans les cellules. Un complexe de $\text{Re}(\text{I})$ tricarbonyle ciblant l'appareil de GOLGI a déjà été décrit dans l'équipe de Clotilde POLICAR.⁴⁸ Une chaîne C12 a été liée au triazole afin de favoriser la pénétration cellulaire du SCoMPI (composé **2**, FIGURE 5.1).

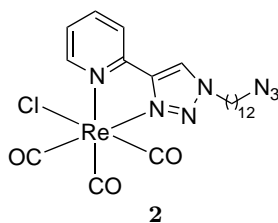


FIGURE 5.1 – Structure du composé **2**.

Nous souhaitons généraliser cette approche pour développer une bibliothèque de marqueurs d'organites pour l'imagerie de fluorescence X. Cette technique est une technique d'imagerie couramment employée dans le domaine des matériaux et qui est de plus en plus utilisée en biologie pour le marquage quantitatif d'éléments lourds à l'échelle de la cellule.²⁶⁵ Cela est rendu possible par le développement de lignes de rayonnement synchrotron qui permettent un grand nombre d'applications avec à la fois une grande sensibilité (de l'ordre de $0,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ pour la plupart des éléments) et une bonne résolution spatiale (100 nm), compatible avec des études cellulaires.²⁶⁶⁻²⁶⁸

La fluorescence X peut fournir entre autres des informations sur la distribution de cations métalliques dans les cellules : même s'ils pouvaient déjà être détectés par fluorescence classique en utilisant des sondes fluorescentes liées à ces cations, cette méthode ne donnait qu'une détection indirecte et impliquait des compétitions entre les éléments déjà liés à des molécules endogènes et la sonde.²⁶⁹ En outre, cette méthode indirecte n'est pas applicable pour la plupart des éléments présents dans les cellules : en effet, un fluorophore peut se lier aux autres métaux présents dans les compartiments de la cellule et de nombreux facteurs tels que l'auto-fluorescence des cellules rendent la quantification difficile. La cartographie par imagerie de fluorescence X est complémentaire : tandis que la méthode utilisant des sondes fluorescentes donne accès à la localisation de cations échangeables (le seuil dépendant de la constante d'association de la sonde avec le cation), la cartographie par fluorescence X donne la distribution total en cation métallique (libre, échangeable, lié aux biomolécules). D'autre part, avec la microscopie de fluorescence X, la signature de tous les éléments présents dans une cellule peut être obtenue de manière simultanée et les cations métalliques peuvent être quantifiés, quelle que soit leur forme chimique.²⁶⁹

Le principe physique de la fluorescence X est simple : l'élément est excité avec un photon possédant une énergie élevée ($> 200 \text{ eV}$), ce qui conduit à l'éjection d'un électron de cœur (typiquement des couches 1s ou parfois des couches 2s ou 2p, FIGURE 5.2(a)). Le trou ainsi créé est rempli par un électron d'une couche supérieure, comme présenté FIGURE 5.2(b). Le mécanisme de relaxation implique ainsi l'émission d'un photon très énergétique (dans le domaine des rayons X).

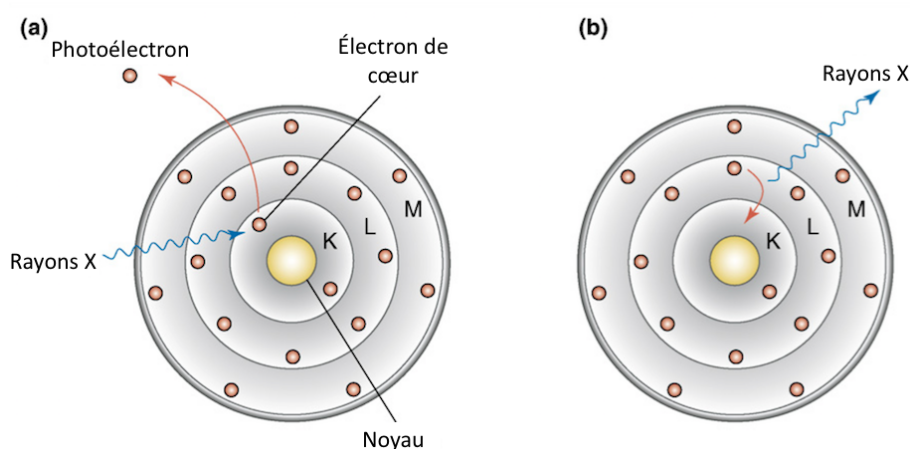


FIGURE 5.2 – Modèle de l'atome de BOHR illustrant le principe de la fluorescence X.²⁶⁹

Étant donné que l'énergie de liaison électronique est proportionnelle au carré de la charge du noyau, le photon émis et par conséquent le signal de fluorescence des rayons X (son énergie) sont caractéristiques de chaque élément (l'énergie dépend aussi, dans une moindre mesure du reste du cortège électronique et donc du degré d'oxydation du cation) et son intensité est proportionnelle à la quantité de métal. La FIGURE 5.3 présente certains éléments présents dans une cellule incubée avec un complexe de rhénium ainsi que l'énergie associée à ces éléments en fluorescence X.

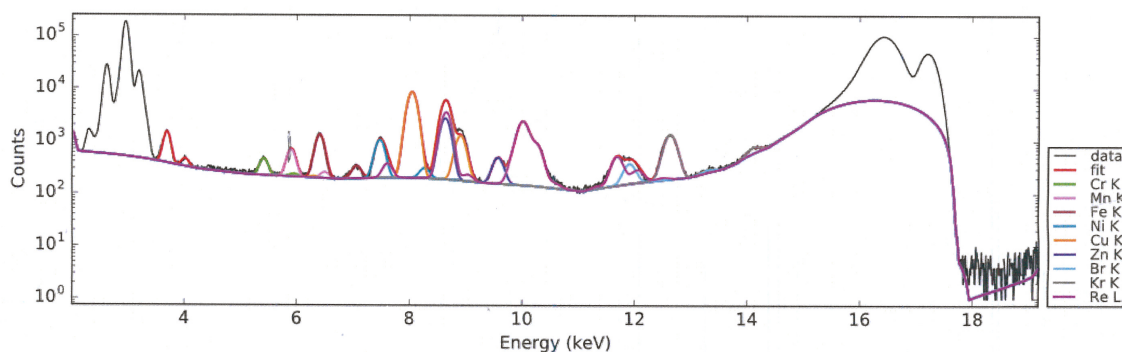


FIGURE 5.3 – Éléments détectés dans une cellule incubée avec un complexe de rhénium par fluorescence X.

Le rhénium possède deux signaux intenses à 8,6 et 10,3 keV, qui correspondent à ses bandes L. Pour éviter un recouvrement avec le signal du zinc (FIGURE 5.4), seul le signal à 10,3 keV du rhénium sera observé. Le rhénium a une faible abondance naturelle,⁷⁶ ce qui facilite la détection de molécules marquées par nos sondes.

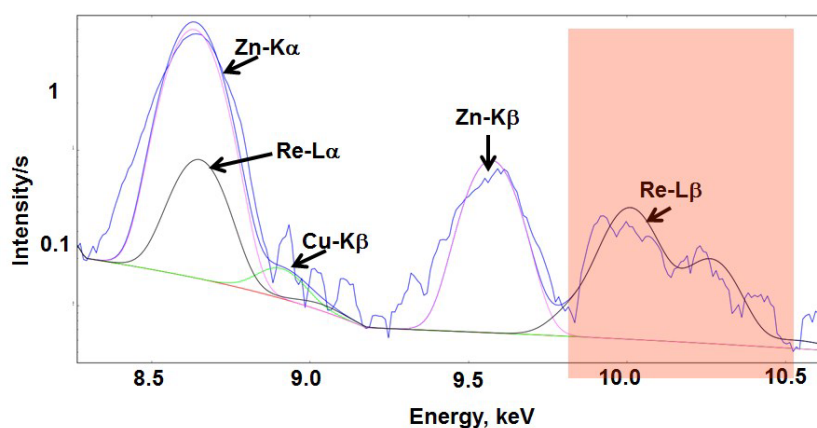
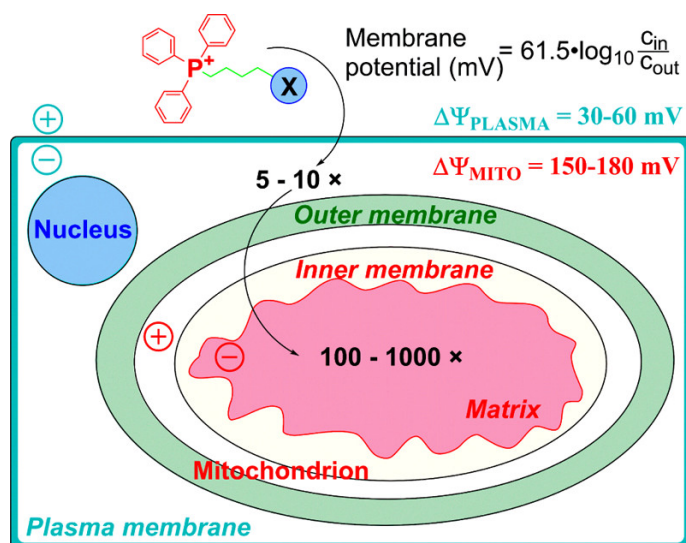


FIGURE 5.4 – Agrandissement de la région entre 8,5 et 10,5 keV correspondant aux signaux du Cu, Zn et Re dans le spectre de fluorescence X moyen d'une cellule incubée avec le composé Re-HD, obtenu avec le logiciel PyMCA.⁷⁵

5.2 Marquage des mitochondries

5.2.1 Par un cation triphénylphosphonium

Les cations lipophiles comme le groupe fonctionnel triphénylphosphonium (TPP) ont une charge positive très délocalisée.^{99,270} Des porteurs de telles fonctions peuvent passer facilement à travers la membrane plasmique puis mitochondriale et s'accumuler à l'intérieur de la matrice mitochondriale en réponse au potentiel de membrane négatif de cette dernière.²⁷¹ Par conséquent, cette pénétration dépend du potentiel de membrane : par exemple, la membrane interne des mitochondries a un potentiel de l'ordre de -150 à -180 mV alors qu'il est de -30 à -60 mV pour la membrane plasmique (FIGURE 5.5).^{98,272}


 FIGURE 5.5 – Pénétration d'un TPP dans les mitochondries.²⁷¹

La quantité de composé dans les mitochondries peut être déterminée en utilisant la relation de NERNST :

$$\Delta\Psi = \frac{RT}{\mathcal{F}} \ln \frac{[\text{cation}]_{in}}{[\text{cation}]_{out}} = 61,5 \times \log \frac{[\text{cation}]_{in}}{[\text{cation}]_{out}} \quad \text{à } 37^\circ\text{C}$$

Cela signifie que pour toute augmentation de $\Delta\Psi$ de 61,5 mV, la quantité de cation s'accumulant dans les mitochondries augmente d'un facteur 10. Par conséquent, le cation triphénylphosphonium est d'abord accumulé 5 à 10 fois dans le cytoplasme ($\Delta\Psi_p$) puis 100 à 500 fois dans les mitochondries ($\Delta\Psi_m$).⁹⁹ Par exemple, un alkyltriphénylphosphonium ajouté dans le milieu extracellulaire à une concentration de $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ peut atteindre une concentration de l'ordre de $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dans les mitochondries.²⁷¹

Les exemples de molécules modifiées par des groupements triphénylphosphonium sont nombreux dans la littérature, dans le but de relarguer ces molécules à leur cible.²⁷¹

Des études ont montré que l'hydrophobicité des conjugués TPP-principe actif peut être modifiée en allongeant la chaîne alkyle entre le TPP et le principe actif. Cet allongement résulte en une plus grande accumulation du composé d'intérêt à l'intérieur des mitochondries.^{273,274} Dans un article publié en 2017, l'équipe de Felipe GARCÍA a synthétisé des dérivés de triphénylphosphonium méthylés sur les fonctions phényle pour voir l'effet de cette modification, non encore étudiée auparavant, sur la pénétration des TPP.²⁷⁵ Cette modification est intéressante, car elle n'affecte pas l'espaceur entre la molécule d'intérêt et le TPP, qui peut aussi jouer un rôle dans le relargage, tout en augmentant la lipophilie. Ces dérivés présentent une amélioration significative de l'accumulation du TPP dans les mitochondries lorsque la substitution des groupements phényle augmente. Pour le montrer, les auteurs ont greffé trois TPP à de l'hexachlorofluorescéine, qui seule ne présente aucune accumulation dans les cellules. Les résultats sont présentés dans la FIGURE 5.6.

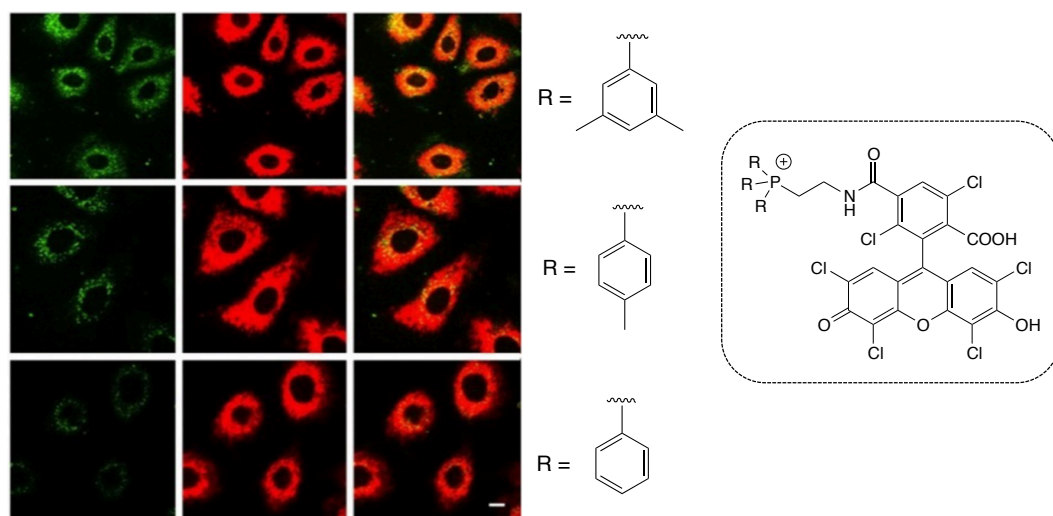


FIGURE 5.6 – Images de microscopie de fluorescence confocale de cellules FU97 incubées avec les dérivés de TPP. À gauche, fluorescence à une longueur d'onde d'excitation de 543 nm du colorant lié au TPP, au centre, excitation du MitoTrackerTM Deep Red FM à 633 nm et à droite, superposition des deux signaux. Barre d'échelle = 20 μm .²⁷⁵

L'utilisation du TPP le plus hydrophobe permet d'obtenir une meilleure pénétration dans les mitochondries. Afin de mettre en évidence l'effet de la fonctionnalisation, trois composés de type $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_2-\text{PPh}_3^+$ où les fonctions triphénylphosphonium possèdent chacune 0, 1 ou 2 groupements méthyle (notés respectivement **74**, **75** et **76** et présentés FIGURE 5.7) ont été synthétisés. Les composés **75** et **76** ont été synthétisés par l'équipe de Felipe GARCÍA (en collaboration avec Hélène BERTRAND).

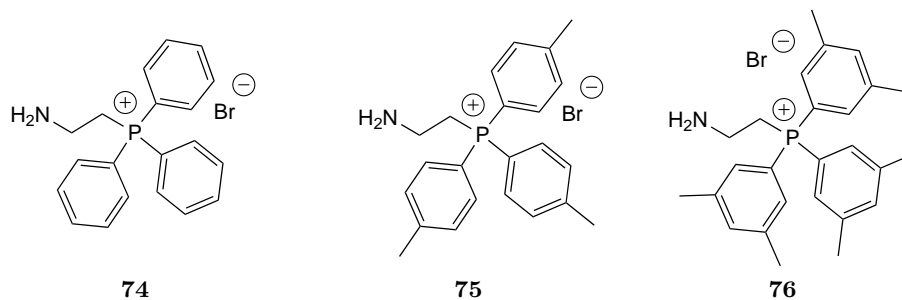
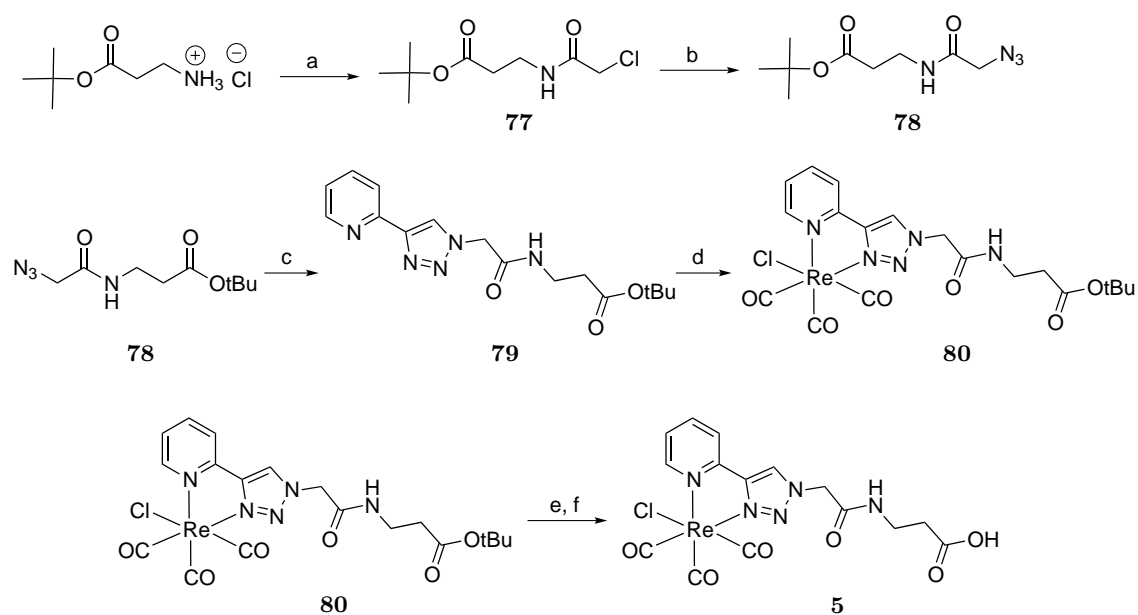


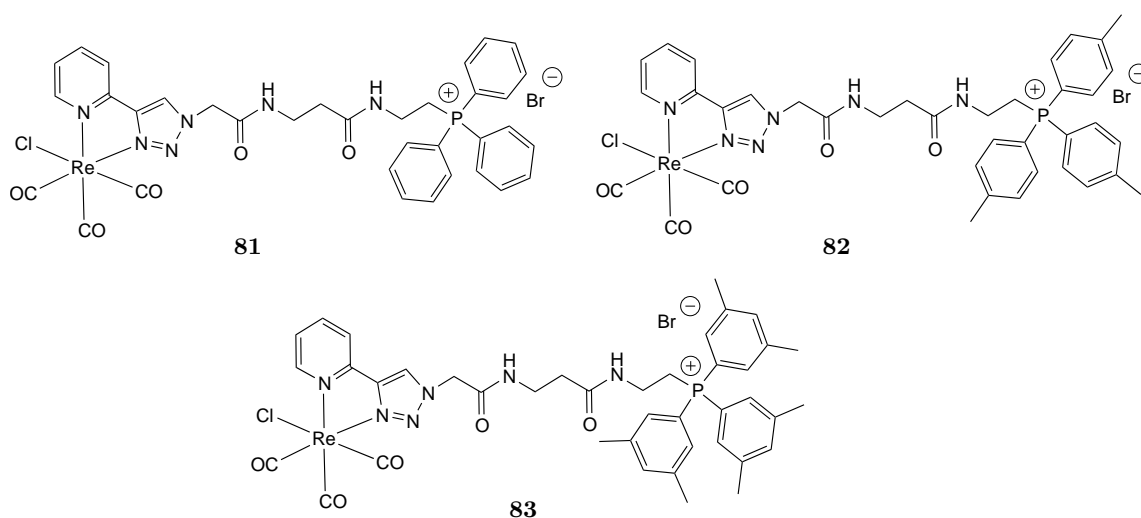
FIGURE 5.7 – Structures des trois composés TPP conjugués à la sonde rhénium tricarbonyle.

Pour étudier leur localisation intracellulaire, une sonde $\text{Re}(\text{CO})_3$ possédant une fonction acide carboxylique terminale a été greffée à ces composés. Elle a été obtenue en 5 étapes, décrites dans le SCHÉMA 5.1.

Dans un premier temps, de l'hydrochlorure de β -alanine tertio-butyl ester a été mis à réagir avec du chlorure de chloroacétyle en présence de *N,N*-diisopropyléthylamine (DIEA) pour former le composé **77**, allongé de deux carbones. La fonction chlorure de ce dernier a été substituée par un azoture pour former le composé **78**. Ce dernier présente bien la bande de vibration d'élongation caractéristique des fonctions azoture à 2100 cm^{-1} . Ce composé a été mis à réagir avec de la 2-éthynylpyridine, du sulfate de cuivre (II) et de l'ascorbate de sodium, pour donner le ligand Pyta **79** (pyridine triazole) *via* une réaction de cycloaddition



1,3-dipolaire de HUISGEN. La bande à 2100 cm^{-1} en infrarouge a disparu et le spectre de RMN du proton de **79** présente bien les 5 protons aromatiques caractéristiques du motif Pyta. Ce ligand a été mis à réagir avec du $[\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}]$ pour donner le complexe **80**, qui a ensuite été déprotégé en milieu acide. La sonde acide carboxylique **5** est ensuite obtenue par hydrolyse acide et mise à réagir avec les dérivés de TPP présentés FIGURE 5.7 en présence de HOBt et de EDC·HCl dans le DMF pendant 24 à 48 h, pour donner les trois conjugués Re-TPP présentés FIGURE 5.8. Ils ont été caractérisés par RMN, IR et spectrométrie de masse et leur pureté confirmée par HPLC avant une étude sur cellules.



Leur pénétration à l'intérieur de cellules A549 a été étudiée par fluorescence et fluorescence X et leur localisation cellulaire a été comparée à la fluorescence d'un marqueur de mitochondries commercial, le MitoTracker™ Deep Red FM.

La pénétration du composé **81** a d'abord été étudiée par microscopie d'épifluorescence et comparée à la fluorescence du MitoTracker™ Deep Red FM, qui est un colorant rouge fluorescent (abs. 644 nm, em. 665 nm) qui permet de marquer et de localiser les mitochondries dans les cellules vivantes (FIGURE 5.9). La localisation de ce colorant n'est pas modifiée après une fixation au paraformaldéhyde.

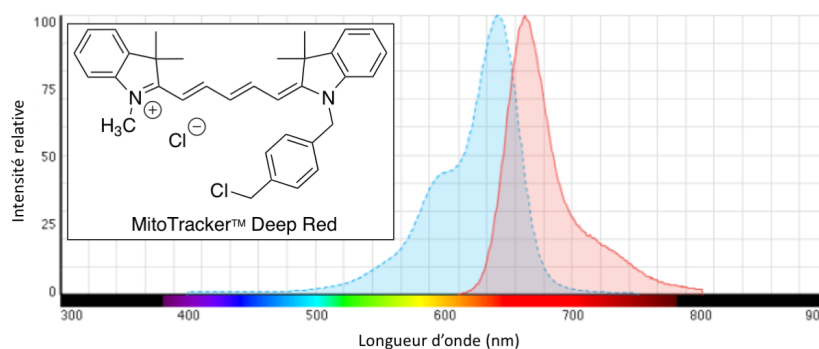


FIGURE 5.9 – Spectres d'absorption (bleu) et d'émission (rouge) du MitoTracker™ Deep Red FM, marqueur commercial des mitochondries (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/M22426>).

Pour ce faire, des cellules A549 ont étéensemencées sur lamelle de verre, puis après 48 h, elles ont été incubées en présence du composé **81** à une concentration d'incubation de $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pendant 1 h. Les cellules ont ensuite été rincées au PBS et incubées pendant 30 min avec du MitoTracker™ Deep Red FM à une concentration de $200 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, préparée à partir d'une solution stock dans le DMSO à $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Après lavage, les cellules ont été fixées au PFA (4 %, 8 min), lavées et séchées à l'air libre. La fluorescence du composé **81** est présentée FIGURE 5.10(b) et celle du marqueur de mitochondries commercial FIGURE 5.10(c).

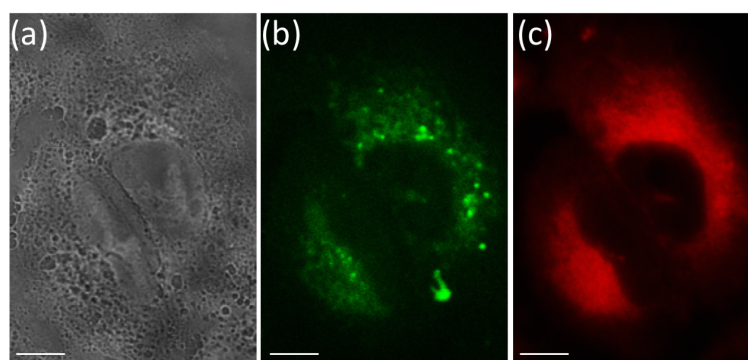


FIGURE 5.10 – Cellules A549 incubées en présence du composé **81** ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h, 37°C), fixées au PFA (4 %, 8 min) et séchées à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a) Image visible, (b) Signal de fluorescence de **81** (ex. 350/50x, em. 560/80m), (c) Signal de fluorescence du MitoTracker™ Deep Red FM.

On constate un bon recouvrement du signal de fluorescence du composé **81** et de celui du MitoTrackerTM Deep Red FM. Le coefficient de PEARSON a été calculé et est égal 0,78. Le coefficient de corrélation selon la méthode de VAN STEENSEL a également été obtenu à l'aide du *plugin* JACoP pour le logiciel ImageJ (FIGURE 5.11).

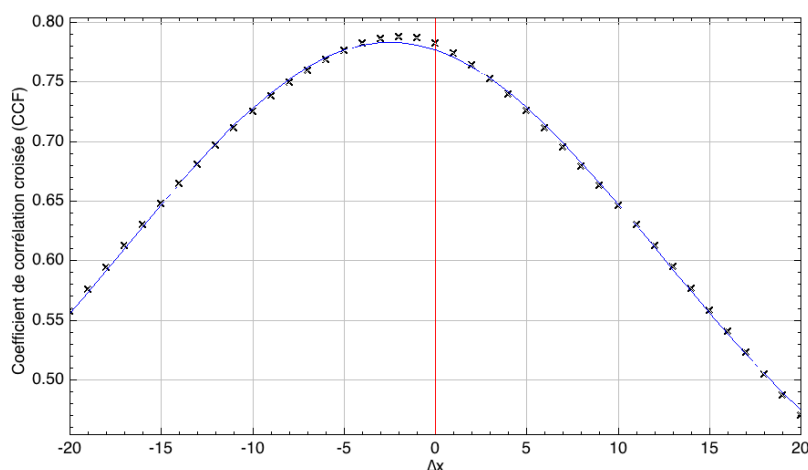


FIGURE 5.11 – Étude de co-localisation réalisée à l'aide du *plugin* JACoP, en utilisant la méthode de VAN STEENSEL. Les fonctions de corrélation croisée ont été calculées avec un déplacement de $\Delta x = \pm 20$. Le coefficient de PEARSON maximal a été obtenu pour $\Delta x = -2$ et est égal à 0,78.

Cette première observation nous a encouragés à réaliser la même expérience pour une étude par fluorescence X. Des cellules A549 ont donc été cultivées sur lamelles de nitrure de silicium Si_3N_4 et traitées de la même manière que les cellules sur lamelle de verre. La fluorescence de la sonde a été comparée à la fluorescence du MitotrackerTM commercial et est présentée FIGURE 5.12.

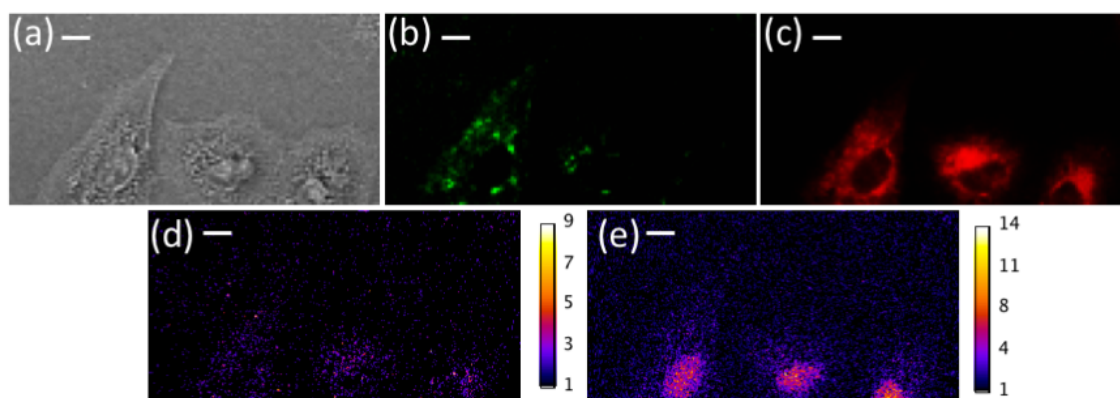


FIGURE 5.12 – Cellules A549 incubées en présence du composé **81** ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h, 37°C), fixées au PFA (4%, 8 min) et séchées à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a) Image visible, (b) Signal de fluorescence de **81** (ex. 350/50x, em. 560/80m), (c) Signal de fluorescence du MitoTrackerTM Deep Red FM, (d-e) Imagerie de fluorescence X (d) du rhénium (10,0 et 10,3 keV, temps d'intégration de 300 ms), (e) du zinc (9,6 keV, temps d'intégration de 300 ms), l'échelle de couleur reflète les coups collectés pour le signal du zinc et du rhénium.

On constate que le signal de fluorescence de la sonde est faible et est difficile à différencier du bruit de fond pour les deux cellules de droite (FIGURE 5.12(b)). Cela s'explique par le fait qu'un objectif avec un plus faible grossissement (20X) que pour les images sur lamelles de verre (60X) a été utilisé pour l'enregistrement de ces images, ce qui a pour conséquence une illumination moindre de la lamelle. En particulier, seules les deux premières cellules ont été illuminées donc le signal de la cellule de droite n'est pas visible. Cependant, il semblerait que le composé présente bien une répartition similaire à celle observée pour le marqueur de mitochondries commercial (FIGURE 5.12(c))

Ces mêmes cellules ont été étudiées par fluorescence X. En utilisant cette technique, nous avons pu localiser la présence de zinc (FIGURE 5.12(e)), qui est très dense au noyau, ce qui permet de repérer cet organite,^{78,276} et de rhénium, caractéristique de la sonde du composé **81** (FIGURE 5.12(d)). Le signal de fluorescence X du zinc est très intense et permet de mettre en évidence la présence des noyaux des cellules. L'imagerie de fluorescence X du rhénium a été comparée à la fluorescence du MitoTrackerTM Deep Red FM. Même si le signal du rhénium est très faible, indiquant que la sonde pénètre assez peu dans les cellules, on constate qu'il est localisé dans les mêmes zones que le MitoTrackerTM Deep Red FM, ce qui confirme les observations réalisées par microscopie de fluorescence.

Comme pour le composé **81**, la pénétration du composé **82** a d'abord été étudiée par microscopie de fluorescence, comme présenté FIGURE 5.13. On constate que la fluorescence de **82** se recouvre assez bien avec la fluorescence du marqueur de mitochondries commercial. La courbe de VAN STEENSEL permet d'estimer le coefficient de corrélation à 0,77. Cependant, quelques points lumineux sont visibles en dehors des mitochondries : ils peuvent correspondre à du composé qui aurait précipité.

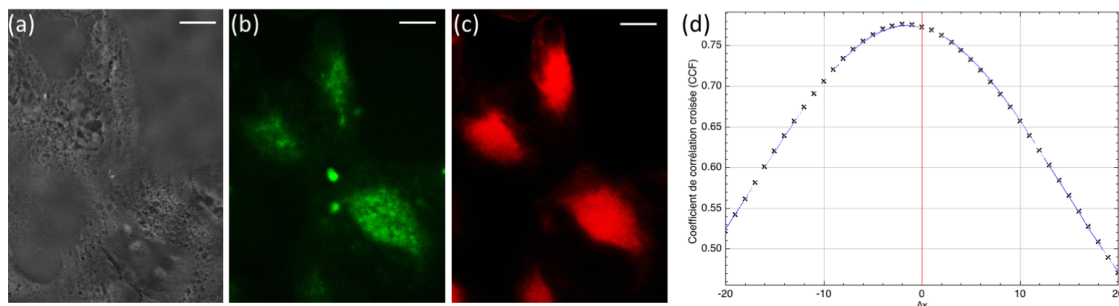


FIGURE 5.13 – Cellules A549 incubées en présence du composé **82** ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h, 37°C), fixées au PFA (4%, 8 min) et séchées à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a) Image visible, (b) Signal de fluorescence de **82** (ex. 350/50x, em. 560/80m), (c) Signal de fluorescence du MitoTrackerTM Deep Red FM, (d) Co-localisation réalisée à l'aide du *plugin* JACoP, en utilisant la méthode de VAN STEENSEL. Les fonctions de corrélation croisée ont été calculées avec un déplacement de $\Delta x = \pm 20$. Le coefficient de PEARSON maximal a été obtenu pour $\Delta x = -2$ et est égal à 0,77.

La pénétration de **82** a donc aussi été étudiée par fluorescence X, en cartographiant la présence du rhénium dans les cellules. Le résultat est présenté FIGURE 5.14(c).

On constate la présence de points très intenses sur les cellules et en dehors des cellules, qui correspondent à une grande concentration en rhénium. Cela est dû à du composé qui a précipité, la concentration d'incubation étant sans doute trop élevée. Cependant, un signal plus faible et inhomogène est visible à l'intérieur des cellules et est superposable

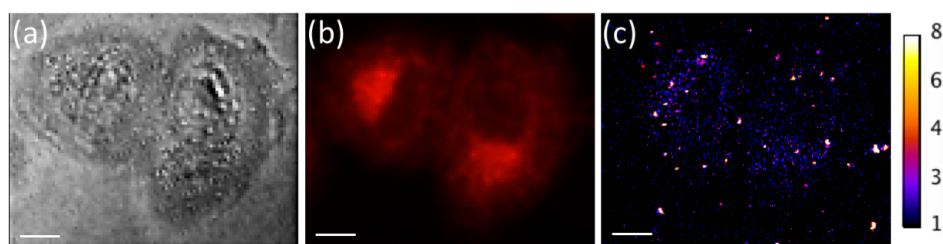


FIGURE 5.14 – Cellules A549 incubées en présence du composé **82** ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h, 37°C), fixées au PFA (4%, 8 min) et séchées à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a) Image visible, (b) Signal de fluorescence du MitoTrackerTM Deep Red FM, (c) Imagerie de fluorescence X du rhénium (10,0 et 10,3 keV, temps d'intégration de 200 ms), l'échelle de couleur reflète les coups collectés pour le signal de rhénium.

à la fluorescence du MitotrackerTM, présentée FIGURE 5.14(b). Le composé **82** pénètre donc dans les cellules et semble localisé au niveau des mitochondries. En revanche, alors que le composé **81** était soluble à une concentration d'incubation de $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, le composé **82** précipite sur les lamelles, ce qui peut s'expliquer par l'ajout de trois groupements méthyle qui augmentent la lipophilie globale de la molécule et donc diminuent sa solubilité en milieu aqueux.

Enfin, comme pour les composés **81** et **82**, la pénétration et la localisation du composé **83** ont été étudiées par spectroscopie d'épifluorescence (FIGURE 5.15(b)). La comparaison avec la fluorescence du marqueur de mitochondries commercial (FIGURE 5.15(c)) montre bien une localisation du composé à la mitochondrie (coefficient de corrélation de PEARSON de 0,79). Cependant, de nombreux points lumineux apparaissent sur la lamelle en raison de la faible solubilité du composé.

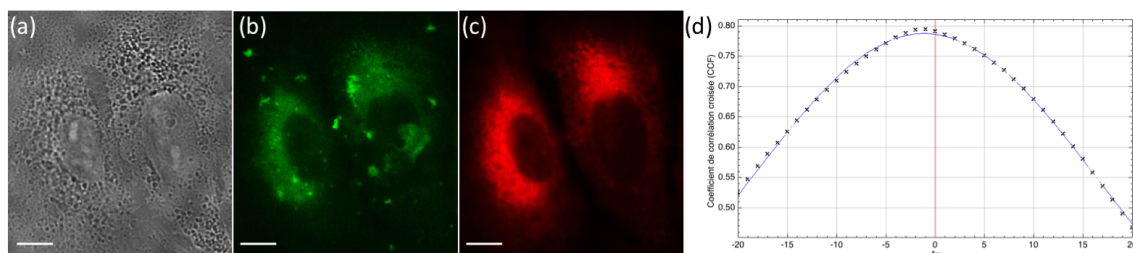


FIGURE 5.15 – Cellules A549 incubées en présence du composé **83** ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h, 37°C), fixées au PFA (4%, 8 min) et séchées à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a) Image visible, (b) Signal de fluorescence de **83** (ex. 350/50x, em. 560/80m), (c) Signal de fluorescence du MitoTrackerTM Deep Red FM, (d) Colocalisation réalisée à l'aide du *plugin* JACoP, en utilisant la méthode de VAN STEENSEL. Les fonctions de corrélation croisée ont été calculées avec un déplacement de $\Delta x = \pm 20$. Le coefficient de PEARSON maximal a été obtenu pour $\Delta x = -2$ et est égal à 0,79.

Une cellule a été imagée en fluorescence X et la localisation du rhénium comparée à la fluorescence du MitoTrackerTM Deep Red FM (FIGURE 5.16). Une fois de plus, on constate un recouvrement entre la sonde, indiquée par le signal de fluorescence X du rhénium, et le MitoTrackerTM commercial, ce qui indique que le composé **83** est bien localisé aux mitochondries. Cependant, des points très intenses, dus à la précipitation du composé, sont toujours visibles et sont plus nombreux que pour le composé **82**. Cela est cohérent,

car ce composé possède trois fonctions méthyle supplémentaires, ce qui a pour conséquence une augmentation de la lipophilicité. Une étude à plus faible concentration devra donc être réalisée.

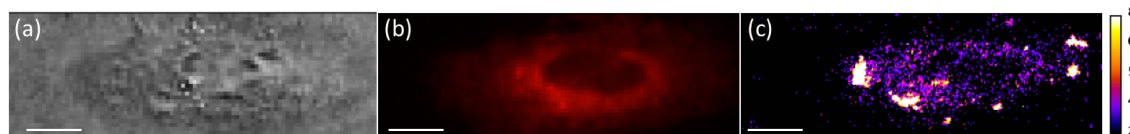


FIGURE 5.16 – Cellule A549 incubée en présence du composé **83** ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h, 37°C), fixée au PFA (4%, 8 min) et séchée à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a) Image visible, (b) Signal de fluorescence du MitoTrackerTM Deep Red FM, (c) Imagerie de fluorescence X du rhénium (10,0 et 10,3 keV, temps d'intégration de 200 ms), l'échelle de couleur reflète les coups collectés pour le signal de rhénium.

Les trois composés possédant une fonction triphénylphosphonium ont donc présenté une localisation mitochondriale. La fonctionnalisation du PPh_3 par des fonctions méthyle modifiait la solubilité du produit. Par ailleurs, on souhaite savoir si cette modification permet d'augmenter la pénétration du composé dans les cellules ou non. Pour ce faire, l'intensité de fluorescence X dans les mitochondries a été mesurée pour les trois échantillons et les résultats sont présentés TABLEAU 5.1.

TABLEAU 5.1 – Intensité du signal de fluorescence X du rhénium dans les mitochondries des cellules incubées avec les composés **81**, **82** ou **83**. Les régions présentant du précipité ont été exclues.

Composé	Intensité du signal du rhénium
81	1,14
82	1,15
83	2,13

On constate que l'ajout d'un méthyle a peu d'influence sur la pénétration du composé, mais l'ajout de deux groupes méthyle augmente la pénétration d'un facteur deux. Le résultat est cohérent avec ce qui était attendu : même si l'ajout de fonctions méthyle sur le triphénylphosphonium a tendance à abaisser la solubilité du composé dans le milieu de culture, il permet également d'avoir une meilleure pénétration dans les mitochondries en raison de la lipophilie des membranes cellulaire et mitochondriale.

5.2.2 Par un peptide mitochondrial

L'utilisation de peptides pour cibler les mitochondries est une autre approche qui a été souvent employée, comme exposé dans le chapitre 2.^{277–279} Des études ont montré que des peptides possédant des arginines pénétraient facilement à l'intérieur des cellules en raison de leur charge positive.²⁸⁰ La membrane mitochondriale étant une interface énergiquement similaire, l'incorporation de résidus cationiques dans les séquences devrait permettre de faciliter le passage à travers les deux membranes.

Cependant, en raison de la plus grande hydrophobie de la membrane mitochondriale, une plus grande lipophilicité du peptide est nécessaire pour optimiser la pénétration. Les premiers peptides développés ciblant la mitochondrie sont les peptides de SZETO-SCHILLER (SS), qui sont des antioxydants qui protègent sélectivement les mitochondries et les cellules

des dommages oxydatifs.^{98,281} Ils sont composés de quatre acides aminés (standards ou non) avec une alternance de motifs aromatiques et basiques, un acide aminé D à la première ou seconde position et une fonction amide à l'extrémité C-terminale pour augmenter la stabilité.¹⁰⁷ À titre d'exemple, les composés **19** et **20** sont représentés FIGURE 5.17.

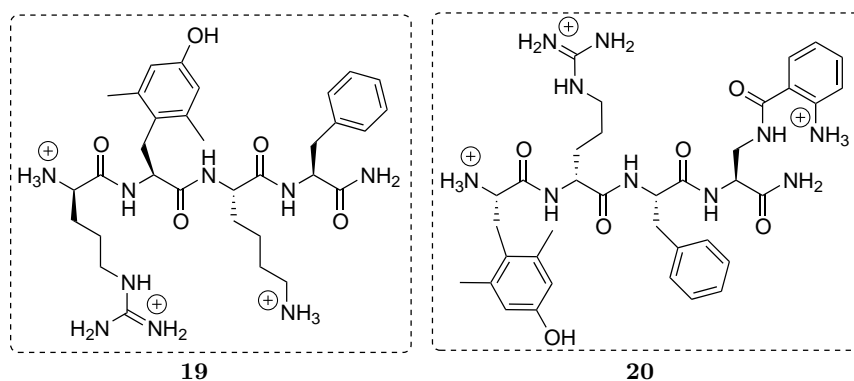


FIGURE 5.17 – Structures des peptides SS31 (**19**) et SS19 (**20**).¹⁰⁷

À pH physiologique, ces peptides possèdent une charge de +3, de telle sorte qu'ils peuvent se lier à la membrane interne des mitochondries *via* un processus indépendant du potentiel de membrane.²⁸² En effet, grâce à des interactions électrostatiques et hydrophobes, ils se lient sélectivement à la cardiolipine. La cardiolipine, représentée FIGURE 5.18, est un lipide présent sur la membrane interne de la mitochondrie et responsable de la forte imperméabilité de la membrane aux protons en les fixant aux groupements phosphate, ainsi que de la jonction entre les deux membranes de la mitochondrie pour faire passer des protéines.^{281,283}

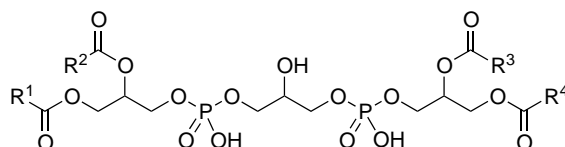


FIGURE 5.18 – Structure de la cardiolipine, qui comporte quatre chaînes hydrophobes d'acides gras, notées Rⁱ.

L'avantage des peptides SS à pénétrer de manière indépendante du potentiel de membrane mitochondrial réside dans le fait que la délivrance de composés d'intérêt à des mitochondries pathologiques, pour lesquelles le potentiel est réduit, n'est alors pas affectée. Il a été prouvé que ces peptides ne sont pas toxiques à une concentration de l'ordre de $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, qu'ils ont des effets protecteurs contre l'oxydation par H_2O_2 , qu'ils réduisent la production de ROS et empêchent la mort cellulaire.^{107,281}

Pour mettre en évidence la localisation de tels composés, le composé **20** a été lié à un groupement fluorescent, pour comparer la fluorescence du conjugué ainsi obtenu et celle de la tétraméthylrhodamine (TMRM), un marqueur de mitochondries commercial : une accumulation à la mitochondrie du peptide a été observée (FIGURE 5.19).¹⁰⁷

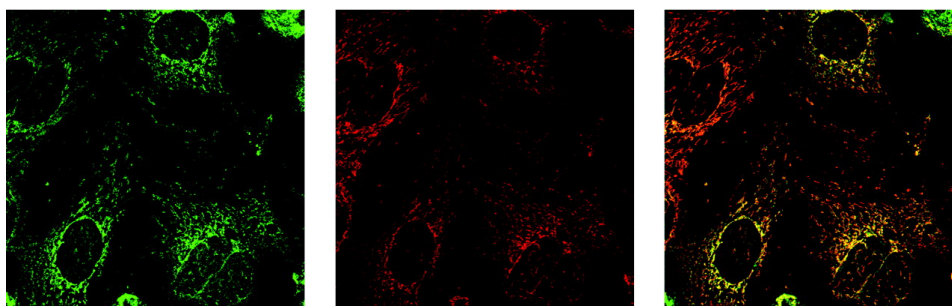


FIGURE 5.19 – Internalisation et ciblage aux mitochondries du composé **20** lié à un groupement fluorescent dans des cellules vivantes. Des cellules Caco-2 ont été incubées avec ce dérivé fluorescent ($0,1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) et du TMRM ($20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) à 37°C pendant 30 min. La microscopie confocale à balayage laser a été réalisée avec les conditions suivantes : excitation/émission 320/420 nm pour **20** et 550/575 nm pour TMRM.¹⁰⁷

L'équipe de Shana O. KELLEY a été la première à rationaliser à la fois les niveaux de lipophilicité nécessaires à la pénétration de peptides aux mitochondries, et le nombre de charges requises.¹¹⁰ Des séquences de MPPs (pour *mitochondria penetrating peptide*) ont été choisies parce qu'elles possèdent les deux propriétés importantes pour le passage à travers les membranes : les charges positives, qui permettent le passage à travers les membranes plasmique et mitochondriale en raison de la force électrostatique, et le caractère lipophile, qui facilite le passage à travers la membrane mitochondriale. La lysine (K) et l'arginine (R) ont été choisies pour leur charge positive, alors que la phénylalanine (F) et la cyclohexylalanine (F_x) ont été choisies pour leur caractère lipophile. Des peptides de 4 à 8 résidus ont été synthétisés et marqués par un fluorophore, le thiazole orange (noté *to*, FIGURE 5.20(A)), tout comme le peptide Tat, qui est un peptide pénétrant (CPP, pour *cell penetrating peptide*).

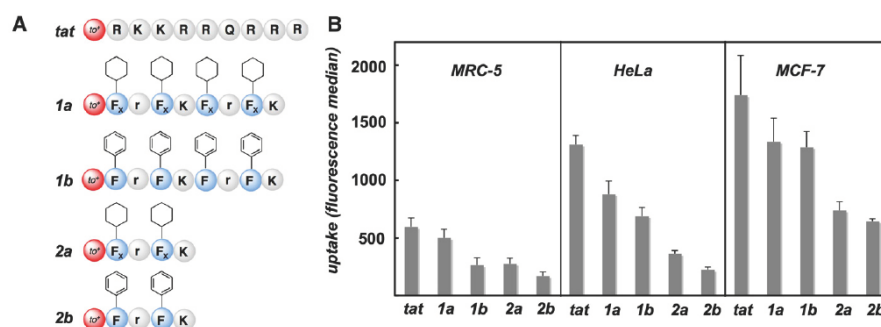


FIGURE 5.20 – (A) Structure des peptides utilisés pour l'analyse, liés à un fluorophore noté *to*. (B) Pénétration des MPPs dans des cellules humaines, mesurée par cytométrie en flux ($2,5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 90 min).¹¹⁰

La pénétration et la localisation des peptides ont été étudiées par cytométrie en flux et microscopie confocale dans trois lignées cellulaires humaines : MCF-7 (cellules tumorales mammaires), MRC-5 (fibroblastes embryonnaires des poumons) et HeLa (cellules de cancer du col de l'utérus). Dans ces différentes lignées cellulaires, la pénétration des MPPs est proche de celle du peptide Tat, ce qui indique un transport efficace de ces peptides à travers la membrane plasmique (FIGURE 5.20(B)).

L'analyse de la localisation des peptides dans les cellules HeLa a montré que même si la pénétration à travers la membrane plasmique était similaire pour toutes les molécules, leur localisation s'est révélée profondément différente. En réalisant une co-incubation des peptides avec le Mitotracker CMXRos et en comparant les images de fluorescence, le coefficient de corrélation de PEARSON (R_r) a été calculé pour quantifier la co-localisation aux mitochondries (FIGURE 5.21).

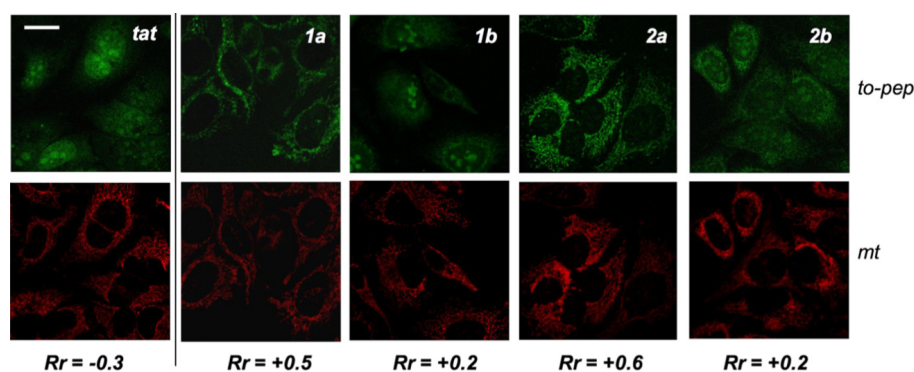


FIGURE 5.21 – Cellules HeLa incubées avec les différents peptides pendant 90 min et avec le Mitotracker CMXRos pendant 15 min. Les images en vert correspondent aux peptides et en rouge au Mitotracker (Barre d'échelle = 10 μ m).¹¹⁰

Les deux peptides possédant un résidu cyclohexylalanine ont un taux de co-localisation avec les mitochondries plutôt élevé ($R_r = 0,5$ à $0,6$) alors que ceux possédant un résidu phénylalanine n'y sont pas localisés ($R_r = 0,2$). Les auteurs ont donc été capables d'obtenir des peptides allant sélectivement aux mitochondries, mais un faible changement dans la structure peut avoir des effets significatifs sur la localisation de la molécule. Pour rationaliser cette localisation, l'équipe de KELLEY a synthétisé d'autres composés avec une grande diversité de groupements fonctionnels pour avoir une grande gamme en terme d'hydrophobicité : diphenyl (DiF), naphthyl (Nap), hexyl (Hex), phénylalanine fluoré (F_F), tyrosine méthylée (Y_{Me}) ou tyrosine (Y) (FIGURE 5.22).

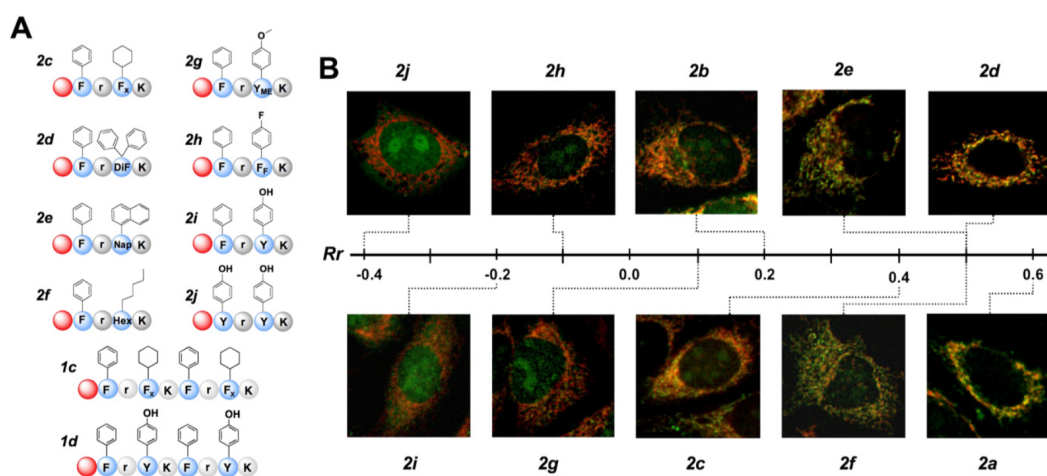


FIGURE 5.22 – (A) Structures des peptides utilisés pour l'analyse, (B) Quantification de la localisation aux mitochondries par le calcul de R_r pour les peptides chargés +3.¹¹⁰

Ils ont montré que parmi les peptides possédant la même charge nette, certains présentent une localisation exclusivement mitochondriale, alors que d'autres sont localisés à la fois aux mitochondries et au noyau et certains sont même totalement absents des mitochondries.

Les auteurs ont trouvé une tendance en étudiant la corrélation entre une bonne localisation mitochondriale (R_r) et la lipophilicité ($\log P$) des peptides (FIGURE 5.23).¹¹⁰

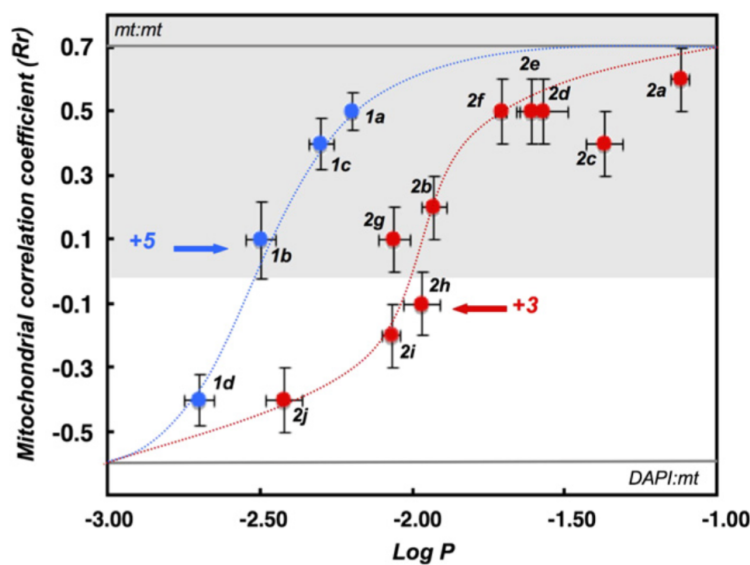


FIGURE 5.23 – Représentation graphique des valeurs de R_r en fonction de la valeur de $\log P$. Les composés chargés +3 sont représentés en rouge, et ceux possédant une charge de +5 sont en bleu. La ligne grise à +0,7 et notée *mt:mt* correspond au recouvrement de deux marqueurs de mitochondries et la ligne à -0,6 notée *DAPI:mt* correspond au recouvrement d'un marqueur de mitochondries avec le DAPI, un marqueur du noyau.¹¹⁰

En effet, des peptides avec une valeur de $\log P$ supérieure à $-1,7$ étaient localisés dans les mitochondries alors que les peptides avec une valeur de $\log P$ inférieure à $-2,0$ étaient localisés dans les noyaux et le cytoplasme. Les peptides avec des valeurs de $\log P$ comprises entre $-1,7$ et $-2,0$ ont montré une localisation mixte dans les cellules. Les auteurs ont conclu qu'il existe une gamme de lipophilie permettant au peptide de pénétrer dans les mitochondries.

Enfin, l'équipe de KELLEY s'est intéressée au mécanisme mis en jeu. Il s'avère que comme pour les TPPs, les MPPs pénètrent la mitochondrie *via* un mécanisme dépendant du potentiel de membrane.¹¹⁰

Dans cette étude, le peptide qui a présenté le meilleur coefficient de corrélation avec un marqueur de mitochondries commercial est celui possédant la séquence F_x-r-F_x-K . Afin d'obtenir un marqueur de mitochondries en fluorescence X, notre objectif a été de greffer une sonde de type $Re(CO)_3$ sur ce MPP.

Dans un premier temps, le peptide a été obtenu par synthèse sur support solide (SPPS), en utilisant une stratégie de type Fmoc. Le principe de ce type de synthèse est simple : des

billes de polystyrène réticulé possédant des fonctions amine protégées par un groupement Fmoc sont mises à gonfler dans un solvant adapté pour rendre disponibles les sites de fixation enfouis dans les billes (voir chapitre 4). Dans un premier temps, les groupements Fmoc des fonctions amine sont retirés par ajout d'une solution de pipéridine dans le DMF.

Ensuite, des acides aminés possédant une fonction acide carboxylique libre et des fonctions amine protégées par un Fmoc sont greffés successivement sur ce support solide, par couplage peptidique (HOBt, DIC dans le DMF), selon le mécanisme présenté SCHÉMA 5.2.

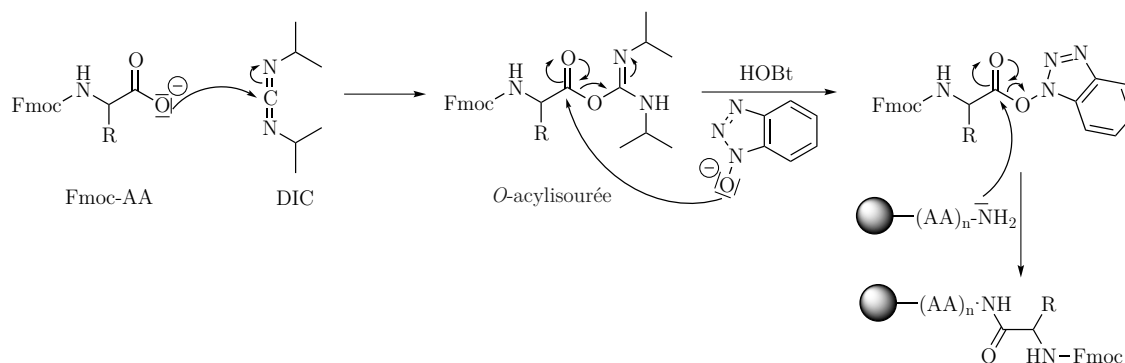


SCHÉMA 5.2 – Mécanisme de couplage peptidique (DIC, HOBt).

Les chaînes latérales de ces acides aminés sont protégées par des groupements non sensibles à la pipéridine pour éviter des réactions parasites. À chaque étape, un nouvel acide aminé est greffé sur la fonction amine, puis la nouvelle fonction amine protégée est déprotégée pour permettre de greffer un nouvel acide aminé, etc. Une fois la séquence obtenue, le peptide est clivé de la résine par ajout d'une solution de TFA/Eau/TIS en proportions 95/2,5/2,5 (en volume), qui permet également de déprotéger les chaînes latérales du peptide. La SCHÉMA 5.3 résume ce mode de synthèse.

Les avantages de la synthèse peptidique sur support solide sont multiples : ²⁵⁵

- La résine est séparée de la phase liquide par simple filtration, ce qui permet de simplifier l'étape de purification du produit.
- Les rendements sont optimisés en utilisant des réactifs en excès, car l'excès restant dans la phase liquide, il est éliminé à chaque étape.
- Possibilité de régénérer le polymère dans le cas d'utilisation de substrats chiraux coûteux.
- Utilisation d'une large gamme de conditions réactionnelles (température, acidobasicité) en raison de la stabilité des supports. Par ailleurs, les supports solides ne nécessitent pas de conditions de stockage particulières (ni réfrigération, ni atmosphère inerte).
- Les réactions multi-étapes peuvent être automatisées et on peut utiliser ces résines sous formes de billes en chimie combinatoire et obtenir des bibliothèques de molécules à tester.

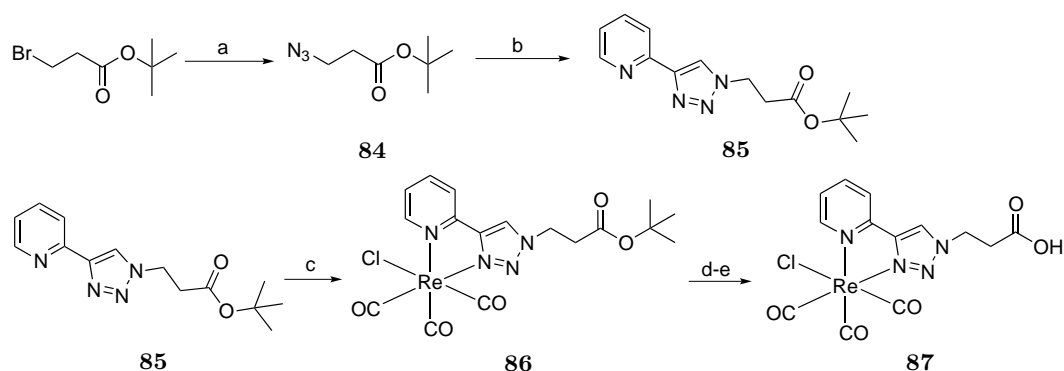


SCHÉMA 5.4 – Synthèse de la sonde **87**. (a) NaN_3 , acétone/ H_2O , 24 h, 50°C , 80 %. (b) 2-éthynylpyridine, CuSO_4 , ascorbate de sodium, acétone/ H_2O , 2 h, 25°C , 64 %. (c) $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}$, toluène, 1,5 h, 80°C , 70 %. (d) CH_2Cl_2 , TFA, 2,5 h, 25°C . (e) CH_2Cl_2 , HCl , 10 min, 25°C , 96 %.

Du 3-bromopropanoate de tertibutyle a été mis à réagir avec de l'azoture de sodium pour obtenir **84** après substitution nucléophile du bromure par l'azoture. Le produit final a été caractérisé par RMN du proton et du carbone, ainsi que par spectroscopie infrarouge, en raison de l'apparition de la bande de vibration caractéristique des fonctions N_3 vers 2100 cm^{-1} . L'azoture ainsi obtenu a été mis à réagir avec de la 2-éthynylpyridine, du sulfate de cuivre (II) et de l'ascorbate de sodium, pour donner le ligand Pyta **85** (pyridine triazole) *via* une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de HUISGEN. Le spectre de RMN du proton de **85** présente les 5 protons aromatiques caractéristiques du motif Pyta. En spectroscopie infrarouge, la bande de vibration d'élongation de la fonction azoture a bien disparu, ce qui permet de confirmer que la réaction a bien eu lieu.

Le complexe de rhénium-tricarbonyle a ensuite été obtenu par complexation du ligand Pyta **85** avec du $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}$ dans le toluène, qui mène à la précipitation du composé **86**, sonde acide carboxylique protégée par un groupement tertibutyle. Le spectre infrarouge fait apparaître les deux bandes caractéristiques des fonctions carbonyle $\text{C}\equiv\text{O}$ à 2016 (bande A_1) ainsi qu'à 1923 et 1893 cm^{-1} (bande E dédoublée en raison d'une symétrie inférieure à C_{3v}). L'acide carboxylique a été déprotégé par de l'acide trifluoroacétique (TFA) dans le dichlorométhane, puis re-suspendu après évaporation du solvant dans du dichlorométhane en présence d'acide chlorhydrique concentré ($12\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dans l'eau) pour coordonner le ligand chlorure éventuellement échangé avec le TFA lors de l'étape de déprotection. La sonde acide carboxylique **87** ainsi obtenue a alors pu être greffée sur le peptide mitochondrial.

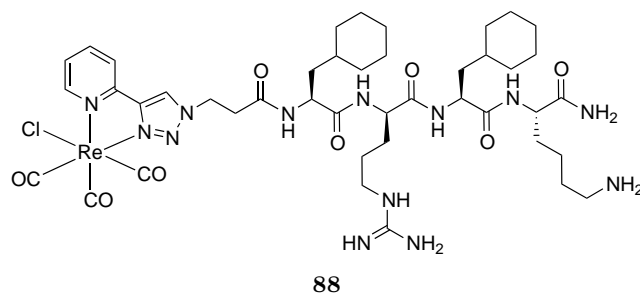


FIGURE 5.25 – Structure du composé Re-MPP (**88**).

Après clivage, le peptide marqué ainsi obtenu (**88**, représenté FIGURE 5.25) a été purifié par HPLC et caractérisé par spectrométrie de masse MALDI, technique couramment utilisée pour les peptides et leurs conjugués. Ce complexe de rhénium donne un signal avec un massif isotopique très caractéristique qui contient quatre pics : ils proviennent de l'existence de deux principaux isotopes naturels pour le rhénium et le carbone. Les abondances sont les suivantes : ^{185}Re : 37 %, ^{187}Re : 63 %, ^{12}C : 99 % et ^{13}C : 1 %. Un complexe organométallique de rhénium a donc l'allure suivante (FIGURE 5.26).

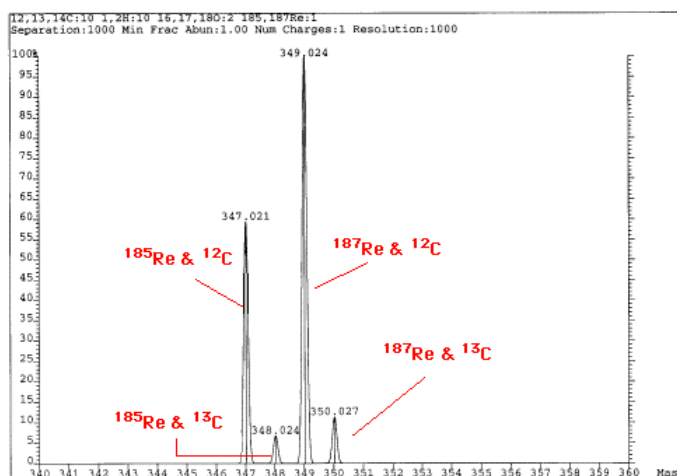


FIGURE 5.26 – Exemple de spectre de masse obtenu pour le cluster isotopique $\text{CpRe}(\text{CO})_2(\text{h}^3\text{-allyl})$.²⁸⁴

Le spectre de masse obtenu pour le composé **88** est le suivant (FIGURE 5.27) :

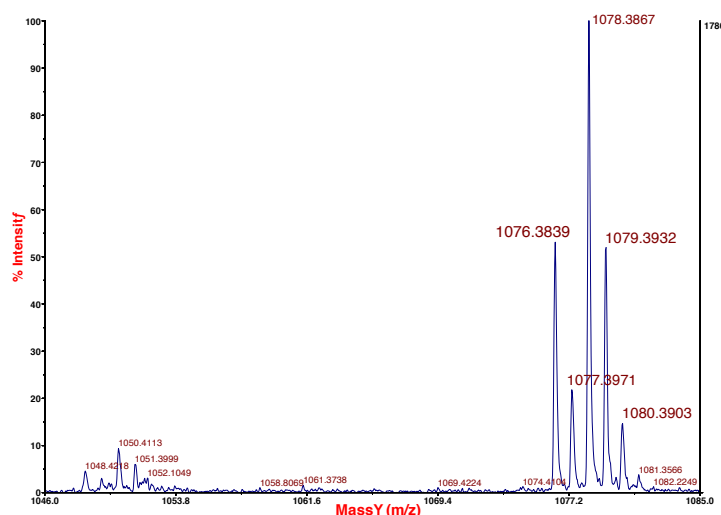


FIGURE 5.27 – Spectre de masse obtenu en MALDI-TOF du composé **88**.

Le pic majoritaire à 1078,39 correspond à l'isotope majoritaire (^{187}Re et ^{12}C) ayant perdu un chlorure comme il est toujours observé dans les conditions d'ionisation par MALDI. Le signal à 1050,41 correspond à la perte d'un ligand carbonyle $\text{C}\equiv\text{O}$.

Ce composé a d'abord été étudié dans des cellules MA104 et sa localisation comparée à un marqueur de mitochondries commercial, le MitoTracker™ Deep Red FM (FIGURE 5.28).

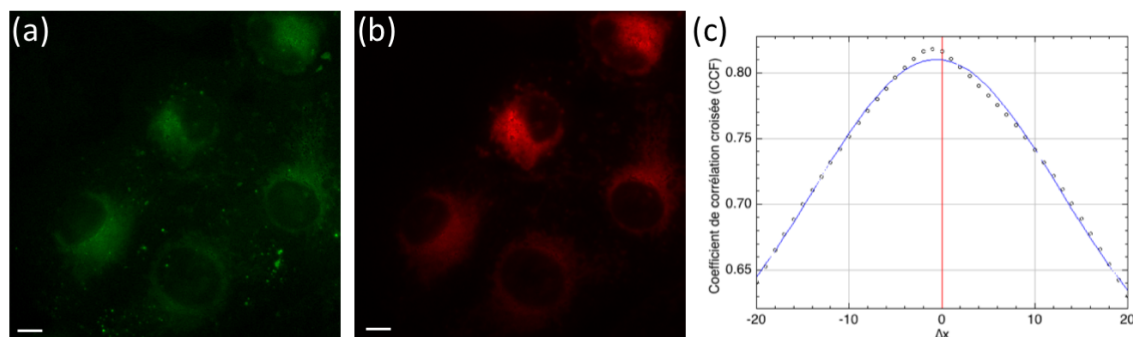


FIGURE 5.28 – Cellules MA104 incubées en présence du composé **88** ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h, 37°C), fixées au PFA (4 %, 8 min) et séchées à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a) Signal de fluorescence du composé **88** (ex. 350/50x, em. 560/80m), (b) Signal de fluorescence du MitoTracker™ Deep Red FM, (c) Colocalisation réalisée à l'aide du *plugin* JACoP, en utilisant la méthode de VAN STEENSEL. Les fonctions de corrélation croisée ont été calculées avec un déplacement de $\Delta x = \pm 20$. Le coefficient de PEARSON maximal a été obtenu pour $\Delta x = -1$ et est égal à 0,82.

On constate que le composé est bien localisé aux mitochondries comme espéré, avec un coefficient de PEARSON de 0,82. Cette observation nous a encouragés à confirmer cette localisation en comparant la luminescence du même marqueur commercial à la distribution du rhénium à l'intérieur des cellules par fluorescence X. Cette étude a été réalisée sur deux lignées cellulaires : des cellules MDA-MB-231 et des cellules A549.

Le résultat pour les cellules MDA-MB-231 est présenté FIGURE 5.29.

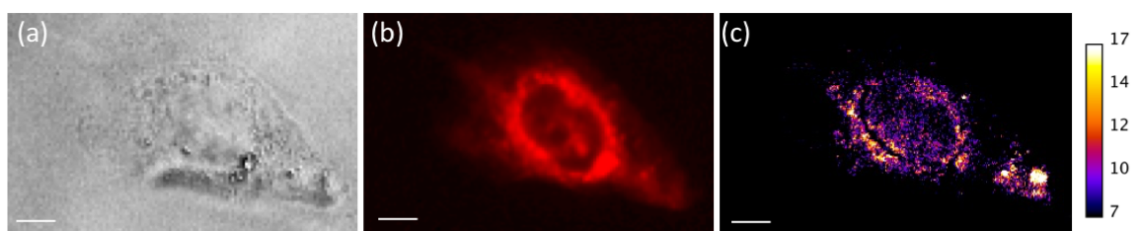


FIGURE 5.29 – Cellule MDA-MB-231 incubée en présence du composé **88** ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h, 37°C), fixée au PFA (4 %, 8 min) et séchée à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a) Image visible, (b) Signal de fluorescence du MitoTracker™ Deep Red FM, (c) Imagerie de fluorescence X du rhénium (10,0 et 10,3 keV, temps d'intégration de 300 ms), l'échelle de couleur reflète les coups collectés pour le signal du rhénium.

La comparaison entre la fluorescence du MitoTracker et le signal de fluorescence X du rhénium permet de confirmer que le composé **88** est majoritairement localisé aux mitochondries. Cependant, on constate sur la FIGURE 5.29(c) un point chaud pour le rhénium, qui ne correspond pas aux mitochondries. Cela peut être dû soit à du composé qui a précipité, soit qui a été excrété par la cellule.

Le résultat pour les cellules A549 est présenté FIGURE 5.30.

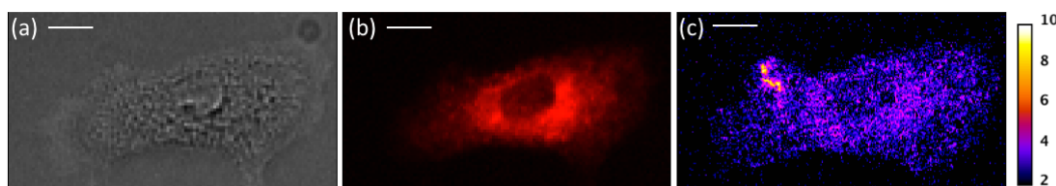


FIGURE 5.30 – Cellule A549 incubée en présence du composé **88** ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h, 37°C), fixée au PFA (4%, 8 min) et séchée à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a) Image visible, (b) Signal de fluorescence du MitoTrackerTM Deep Red FM, (c) Imagerie de fluorescence X du rhénium (10,0 et 10,3 keV, temps d'intégration de 300 ms), l'échelle de couleur reflète les coups collectés pour le signal du rhénium.

Une fois encore, le composé **88** semble bien localisé aux mitochondries, mais la quantité de rhénium dans la cellule est plus faible. Comme sur la FIGURE 5.29, on constate la présence d'un point intense sur le bord de la cellule, qui semble être du composé précipité ou excrété par cette dernière.

Ces expériences ont donc montré qu'il est possible de greffer un peptide ciblant la mitochondrie à une sonde de type rhénium-tricarbonyle, sans modifier la localisation du conjugué. La localisation du composé a pu être déterminée par différentes méthodes à savoir la microscopie de fluorescence et la fluorescence X. L'utilisation de ces deux méthodes permet de confirmer la stabilité de la sonde en milieu cellulaire. Ces expériences ouvrent de nombreuses perspectives en fluorescence X, car l'obtention d'une sonde de fluorescence X marquant spécifiquement la mitochondrie peut servir à réaliser des expériences de co-localisation avec d'autres composés que l'on souhaite voir cibler cet organelle. Toujours avec l'objectif d'obtenir une bibliothèque de sondes de fluorescence X, nous avons aussi essayé de marquer spécifiquement le noyau par différentes méthodes.

5.3 Marquage du noyau

5.3.1 Par une liaison à l'acridine

L'acridine (FIGURE 5.31) et ses dérivés sont connus pour se lier à l'ADN et l'ARN en raison de leur capacité à s'intercaler de manière covalente.²⁸⁵ L'acridine orange par exemple interagit avec l'ADN et l'ARN en s'intercalant et stabilise les complexes pigment-ADN par neutralisation de la charge du groupe phosphate du squelette de l'ADN.²⁸⁶ Les intercalants sont couramment constitués de cycles polyaromatiques, comme l'acridine ou l'anthracène (FIGURE 5.31).

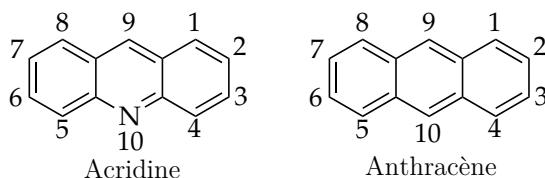


FIGURE 5.31 – Structures et numérotations des atomes de l'acridine et de l'anthracène.

Ainsi, ils s'associent aux bases nucléotidiques de l'hélice de l'ADN et sont stabilisés par des interactions de π -stacking.²⁸⁷ Ces composés sont très fluorescents et solubles dans

l'eau, par conséquent ils sont couramment utilisés pour marquer le noyau des cellules.²⁸⁸

Les composés organiques dérivés de l'acridine peuvent servir de cargo moléculaire pour faire pénétrer des molécules d'intérêt dans le noyau. Pour ce faire, l'acridine peut être fonctionnalisée à différentes positions, sans pour autant perdre sa capacité à atteindre le noyau.¹³⁸ Par exemple, AGORASTOS *et al.* ont publié la synthèse d'un dérivé de l'acridine obtenu par fonctionnalisation sur l'azote 10 de l'acridine orange : le complexe **41** est représenté sur la FIGURE 5.32.¹³⁸

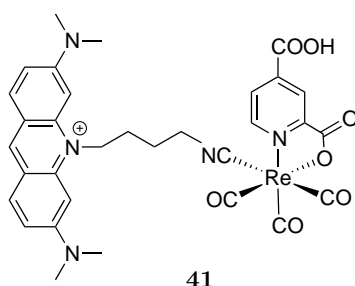


FIGURE 5.32 – Structure du complexe **41**.¹³⁸

La pénétration du complexe **41** a été étudiée dans ces cellules B16-F1 (mélanome de souris) et **41** a été détecté par imagerie de fluorescence ($\lambda_{em} = 530 \text{ nm}$). Le noyau a été marqué avec un marqueur commercial, le DAPI (FIGURE 5.33). L'étude montre clairement une accumulation dans le noyau.

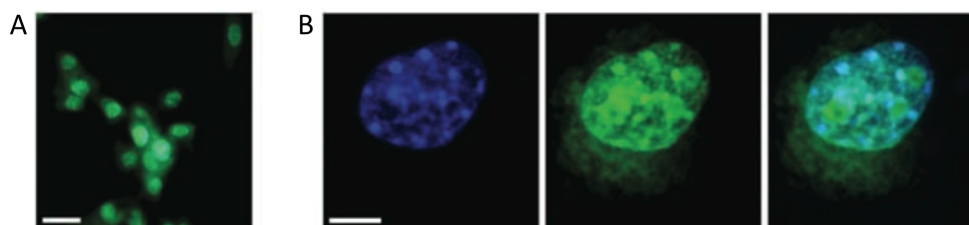


FIGURE 5.33 – Pénétration du composé **41** dans des cellules B16-F1 étudiée par microscopie d'immunofluorescence. Les cellules ont été incubées avec le complexe **41** ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h), fixées et les noyaux marqués par du DAPI. (A) Vue globale des cellules B16-F1 montrant la pénétration de **41** (vert) dans le cytoplasme (Barre d'échelle = $20 \mu\text{m}$). (B) Cellule individuelle, pour laquelle la localisation de **41** dans le noyau est visible. Marquage du noyau par le DAPI (bleu, à gauche), fluorescence du composé **41** (vert, au centre) et superposition (à droite). Les images représentent des sections optiques des cellules d'épaisseur $3 \mu\text{m}$ (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$).¹³⁸

Le composé **41** peut donc s'accumuler rapidement dans le noyau, malgré la présence du complexe de rhénium. D'autres dérivés de l'acridine sont décrits dans la littérature, avec une modification de l'acridine sur la position 9, *via* une substitution nucléophile aromatique sur la 9-chloro-acridine.^{289,290} C'est cette position que nous avons choisi de fonctionnaliser par une sonde.

Dans un premier temps, du 1,8-dibromooctane a été mis à réagir en présence d'azoture de sodium dans le diméthylformamide (DMF) pour donner le composé 1,8-diazidooctane

89. Ce composé a été mis à réagir avec de la triphénylphosphine en milieu acide pour réduire une des fonctions azoture en amine selon une réaction de STAUDINGER, qui donne le composé **90**. Ce dernier, après réaction avec de la 9-chloroacridine dans le DMF selon un mécanisme de type substitution nucléophile aromatique, mène au *N*-(8-azidoocetyl)acridine-9-amine (**91**, SCHÉMA 5.5).

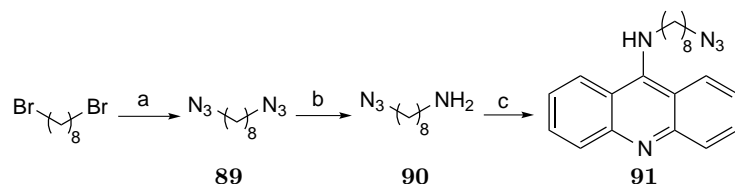


SCHÉMA 5.5 – Synthèse du composé **91**. (a) NaN_3 , DMF, 15 h, 60°C , quantitatif. (b) PPh_3 , HCl, Heptane/AcOEt, 15 h, r.t., quantitatif. (c) 9-chloroacridine, DMF, 2,5 h, 120°C , 81 %.

Le ligand Pyta (pyridine triazole) **92** a été ensuite obtenu par une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de HUISGEN catalysée par le cuivre entre la fonction azoture de **91** et la 2-éthynylpyridine. Le complexe de rhénium-tricarbonyle **93** a enfin été obtenu par complexation de **92** avec du chlorure de pentacarbonyle rhénium (SCHÉMA 5.6).

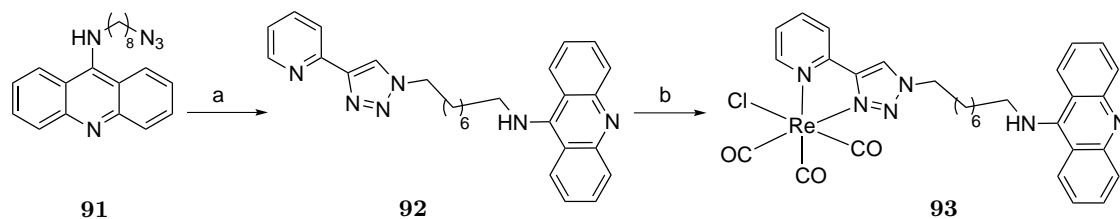


SCHÉMA 5.6 – Synthèse de la sonde **93**. (a) 2-éthynylpyridine, CuSO_4 , ascorbate de sodium, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$, 15 h, 25°C , 98 %. (b) $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}$, toluène/ CH_2Cl_2 , 6 h, 80°C , 39 %.

La chaîne en C8 qui relie l'acridine au complexe de rhénium peut être modifiée si l'on part d'un composé dibromé modifié par un polyéthylène glycol (PEG). Ainsi, deux dérivés avec une chaîne PEG 400 ($400\text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) et PEG 600 ($600\text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) ont également été synthétisés (FIGURE 5.34).

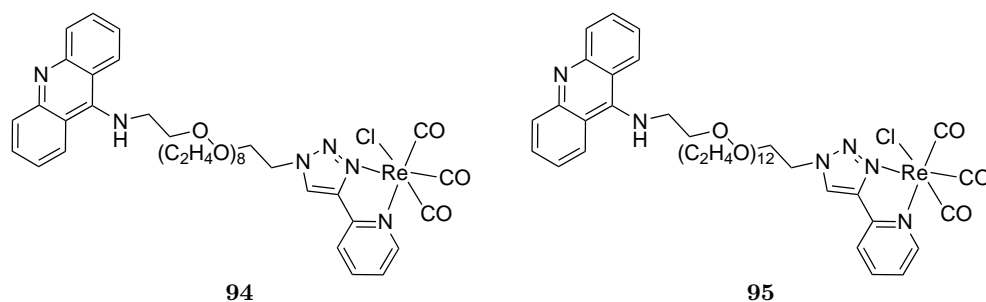


FIGURE 5.34 – Structures des composés **94** et **95**, pour lesquels la sonde $\text{Re}(\text{CO})_3$ est reliée à l'acridine par une chaîne PEG 400 et PEG 600, respectivement.

La pénétration de **93** a été étudiée dans des cellules HaCaT (kératinocytes) à une concentration d'incubation de $50\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Cette pénétration a été étudiée dans un premier temps par microscopie d'épifluorescence, puis par AFM-IR. L'image en microscopie de fluorescence, présentée FIGURE 5.35 montre la pénétration du composé **93** à l'intérieur des cellules, mais aussi la présence de précipité sur les cellules et la lamelle de verre. Par conséquent, le produit ne devait pas être assez soluble à cette concentration.

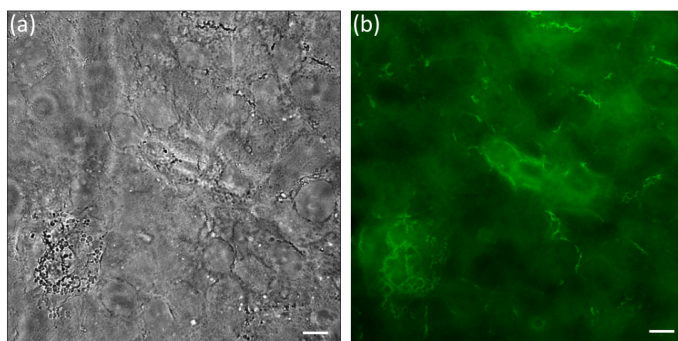


FIGURE 5.35 – Cellules HaCaT incubées en présence du composé **93** ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h), fixées au PFA et séchées à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a) Image visible, (b) Signal de fluorescence de **93** (ex. $350/50\text{x}$, em. $560/80\text{m}$).

La pénétration de ce composé a également été étudiée par AFM-IR, à l'échelle de la cellule unique en réalisant une carte à 1920 cm^{-1} , qui correspond aux bandes de vibrations d'élongation antisymétriques des ligands carbonyle de la sonde (bande E). Deux zones d'intérêt ont été isolées.

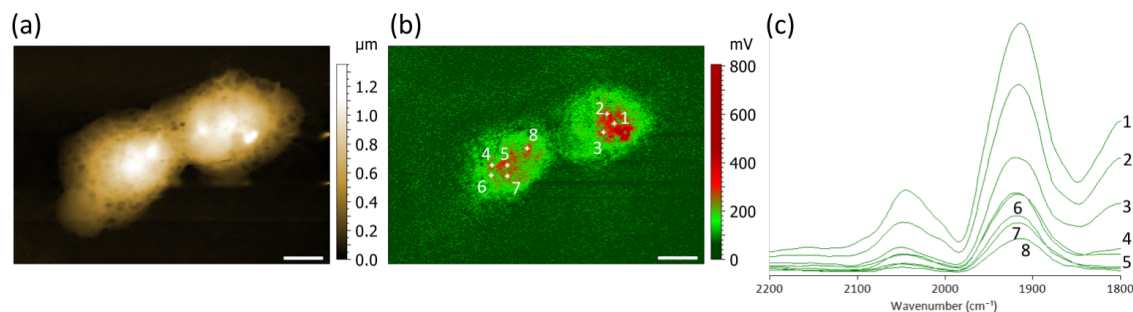


FIGURE 5.36 – Cellules HaCaT incubées en présence du composé **93** ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h), fixées au PFA et séchées à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a) Topographie AFM, (b) Carte enregistrée en AFM-IR à 1920 cm^{-1} ($\text{Re}(\text{CO})_3$ de **93**), (c) Spectres IR enregistrés entre 1800 et 2200 cm^{-1} sur les points indiqués sur la figure (b).

Sur la FIGURE 5.36, nous constatons que l'intensité de la bande E n'est pas homogène dans toute la cellule. Des spectres ont été enregistrés entre 1800 et 2200 cm^{-1} sur des points de haute intensité pour la bande E et sont présentés FIGURE 5.36(c). Ces spectres IR permettent de confirmer la présence du produit car ils possèdent les deux bandes caractéristiques de la sonde $\text{Re}(\text{CO})_3$ à 1920 (bande E) et 2050 cm^{-1} (bande A_1). Le produit semble bien présent dans toutes les cellules, cependant l'intensité des spectres est différente selon les points où ils ont été enregistrés, donc la répartition du composé est bien hétérogène.

Une autre région d'intérêt, comportant quatre cellules, a été cartographiée et est présentée FIGURE 5.37. Le même résultat est obtenu ici : les cellules présentent bien le signal de la sonde $\text{Re}(\text{CO})_3$ mais la répartition du composé à l'intérieur des cellules n'est pas uniforme.

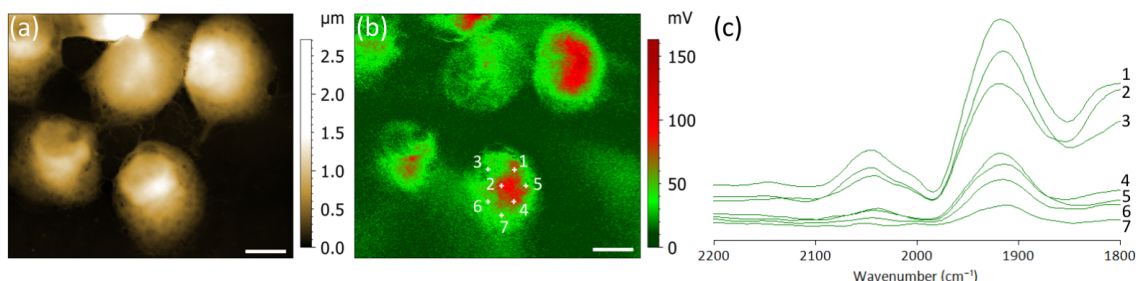


FIGURE 5.37 – Cellules HaCaT incubées en présence du composé **93** ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h), fixées au PFA et séchées à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a) Topographie AFM, (b) Carte enregistrée en AFM-IR à 1920 cm^{-1} ($\text{Re}(\text{CO})_3$ de **93**), (c) Spectres IR enregistrés entre 1800 et 2200 cm^{-1} sur les points indiqués sur la figure (b).

Les deux composés possédant des groupements PEG ont été étudiés dans des conditions similaires et ont présenté des résultats différents. Tout d'abord, aucun problème de solubilité n'a été rencontré. Cela s'explique par la plus grande solubilité en milieu aqueux des groupements PEG par rapport à une chaîne alkyle apolaire.

La pénétration de ces composés a d'abord été étudiée par microscopie d'épifluorescence. La FIGURE 5.38 présente la localisation du composé **95** (PEG600) à l'intérieur de cellules HaCaT, incubées 1 h à une concentration de $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, ainsi que le marquage des noyaux *a posteriori* par une solution de Hoechst. On constate que contrairement à ce qui était espéré, le composé **95** n'est pas visible à l'intérieur du noyau et semble localisé autour du noyau.

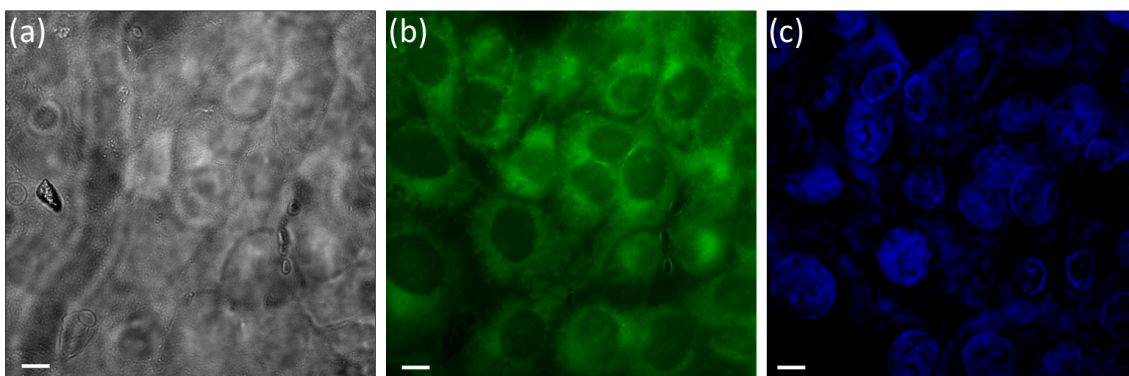


FIGURE 5.38 – Cellules HaCaT incubées en présence du composé **95** ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h), fixées au PFA et séchées à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a) Image visible, (b) Signal de fluorescence de **95** (ex. $350/50\text{x}$, em. $560/80\text{m}$), (c) Marquage des noyaux (Hoechst, ex. $350/50\text{x}$, em. $460/50\text{m}$).

En revanche, dans le cas de la chaîne PEG400, la distribution du composé à l'intérieur des cellules semble plutôt homogène, avec un marquage du noyau mais également du cytoplasme (FIGURE 5.39).

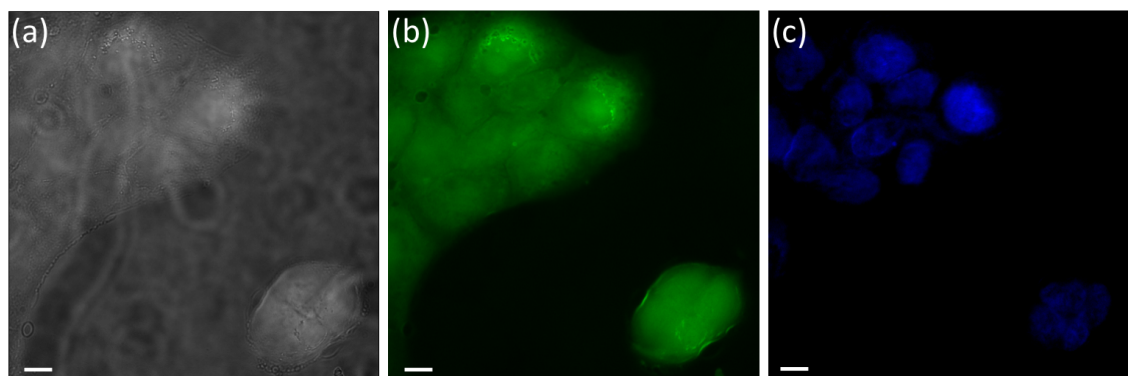


FIGURE 5.39 – Cellules HaCaT incubées en présence du composé **94** ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h), fixées au PFA et séchées à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a) Image visible, (b) Signal de fluorescence de **94** (ex. $350/50\text{x}$, em. $560/80\text{m}$), (c) Marquage des noyaux (Hoechst, ex. $350/50\text{x}$, em. $460/50\text{m}$).

La pénétration de ce dernier composé a également été étudiée par AFM-IR, comme présenté sur la FIGURE 5.40. Le spectre IR enregistré sur une cellule permet de mettre en évidence des signaux distincts pour la sonde $\text{Re}(\text{CO})_3$. Le composé a donc pénétré dans ces cellules et la répartition du composé semble homogène, ce qui confirme l'observation réalisée par microscopie d'épifluorescence.

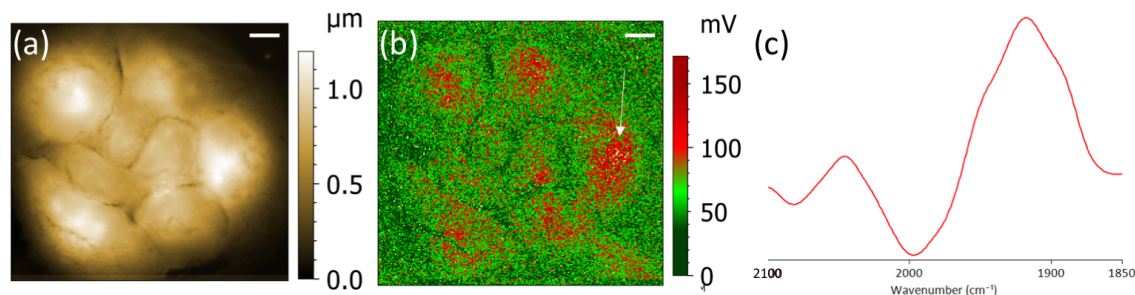


FIGURE 5.40 – Cellules HaCaT incubées en présence du composé **94** ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h), fixées au PFA et séchées à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a) Topographie AFM, (b) Carte enregistrée en AFM-IR à 1920cm^{-1} ($\text{Re}(\text{CO})_3$ de **94**), (c) Spectre IR enregistré entre 1850 et 2100cm^{-1} sur le point indiqué par une flèche sur la figure (b).

Il semblerait donc que le composé **94** soit réparti de manière homogène dans les cellules, mais sa pénétration est plus limitée que pour le composé possédant une chaîne alkyle (**93**). En effet, la membrane plasmique étant hydrophobe, la chaîne alkyle favorise la pénétration du produit à l'intérieur des cellules par rapport aux composés possédant un PEG.

En raison des problèmes de solubilité du composé **93** à $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, ce dernier a été testé à une concentration de $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (FIGURE 5.41). À cette concentration d'incubation, il n'y a plus de problème de précipitation du composé. Ce dernier rentre bien dans les cellules, mais il semble localisé dans le cytoplasme et pas dans le noyau.

Pour confirmer cette observation, nous avons sondé la présence de produit par AFM-IR (FIGURE 5.42). Le produit est bien présent à l'intérieur des cellules et le spectre IR enregistré entre 1850 et 2100cm^{-1} met clairement en évidence la présence des deux bandes de vibration d'élongation des fonctions carbonyle, caractéristiques du complexe $\text{Re}(\text{CO})_3$.

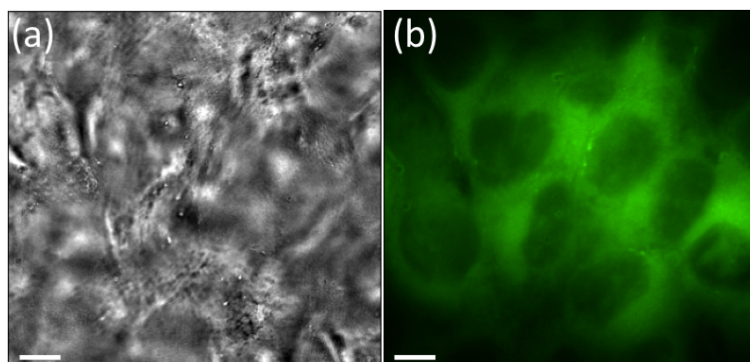


FIGURE 5.41 – Cellules HaCaT incubées en présence du composé **93** ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h, 37°C), fixées au PFA et séchées à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a) Image visible, (b) Signal de fluorescence de **93** (ex. $350/50\text{x}$, em. $560/80\text{m}$).

Cependant, si le composé pénètre à l'intérieur des cellules, il ne parvient pas à franchir la membrane nucléaire dans ces conditions.

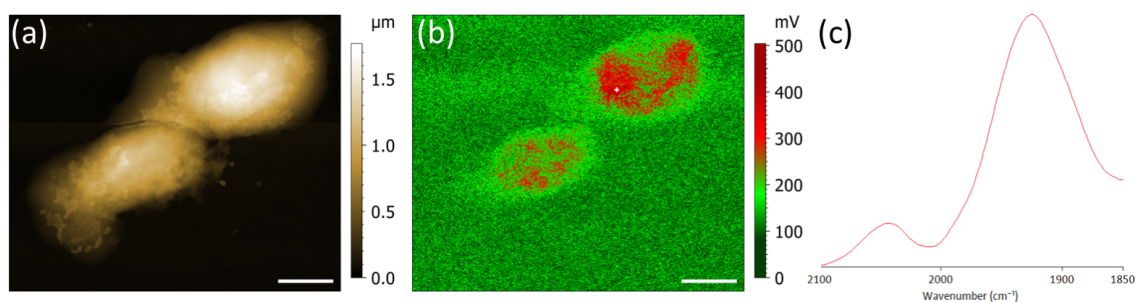


FIGURE 5.42 – Cellules HaCaT incubées en présence du composé **93** ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h, 37°C), fixées au PFA et séchées à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a) Topographie AFM, (b) Carte enregistrée en AFM-IR à 1925cm^{-1} ($\text{Re}(\text{CO})_3$ de **93**), (c) Spectre IR enregistré entre 1850 et 2100cm^{-1} sur le point indiqué par une croix blanche sur la figure (b).

Enfin, nous avons voulu déterminer l'effet du temps d'incubation sur la pénétration de **93** dans les cellules et savoir si en cellules vivantes, le composé serait localisé au noyau. Par conséquent, des cellules HT29 ont été incubées avec le composé **93** pendant 1 h ou 4 h à une concentration d'incubation de $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ et la pénétration de **93** étudiée par microscopie confocale sur cellules vivantes (imagerie réalisée en collaboration avec Florent POYER à l'Institut CURIE, Orsay).

Dans le cas des cellules incubées pendant 1 h (FIGURE 5.43), le composé semble localisé autour du noyau, où des points très intenses sont observés, avec un signal plus diffus dans le cytoplasme, ce qui est cohérent avec les précédentes observations. En revanche, au bout de 4 h d'incubation (FIGURE 5.44), le composé est présent dans tout le cytoplasme, mais ne pénètre cependant pas dans le noyau.

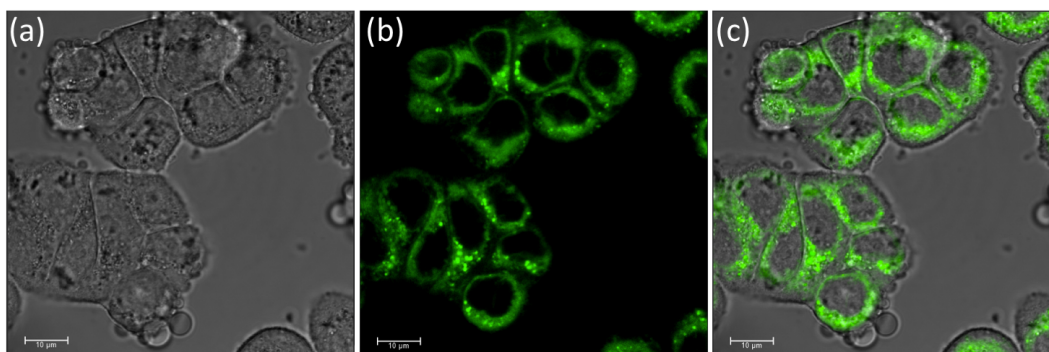


FIGURE 5.43 – Cellules HT29 incubées en présence du composé **93** ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h), (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a) Image visible, (b) Signal de fluorescence de **93** (ex. 405 nm, em. 415-600 nm), (c) Superposition de l'image visible et du signal de fluorescence.

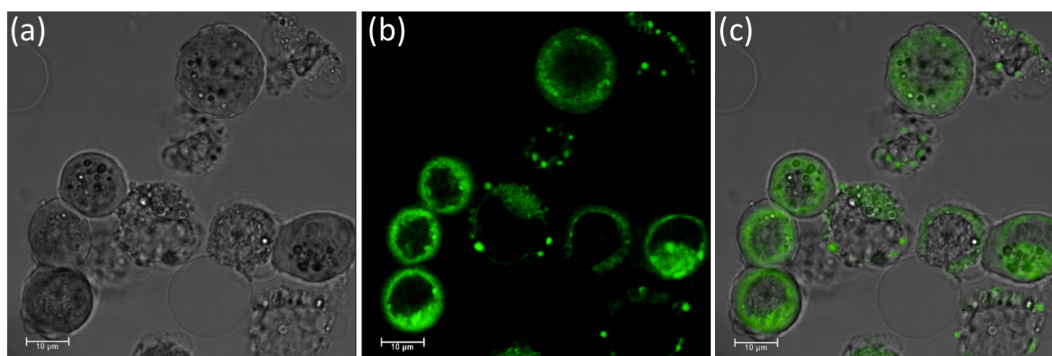


FIGURE 5.44 – Cellules HT29 incubées en présence du composé **93** ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 4 h) (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a) Image visible, (b) Signal de fluorescence de **93** (ex. 405 nm, em. 415-600 nm), (c) Superposition de l'image visible et du signal de fluorescence.

Même dans des cellules vivantes et en augmentant le temps d'incubation, le composé **93** n'est pas présent pas dans le noyau. Il semble localisé majoritairement dans une région proche du noyau qui fait penser à une localisation mitochondriale. Par conséquent, **93** a été co-incubé avec du MitoTrackerTM et leur localisation a été comparée (FIGURE 5.45).

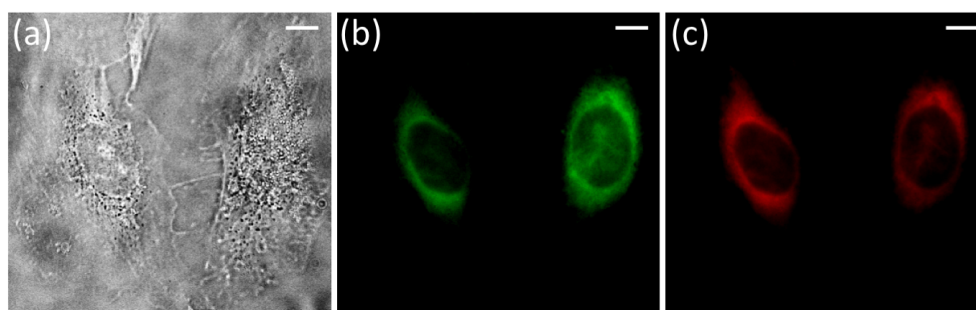


FIGURE 5.45 – Cellules HeLa incubées en présence du composé **93** ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h, 37°C), fixées au PFA et séchées à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a) Image visible, (b) Signal de fluorescence de **93** (ex. 350/50x, em. 560/80m), (c) Signal de fluorescence du MitoTrackerTM Deep Red FM, coefficient de PEARSON = 0,93.

On constate un bon recouvrement entre la fluorescence de **93** et du MitoTrackerTM commercial (coefficient de PEARSON = 0,93). Alors que l'acridine est connue pour marquer sélectivement le noyau, le conjugué acridine-sonde est relocalisé aux mitochondries. Un résultat similaire avait déjà été publié par l'équipe de Roger ALBERTO.¹²² En effet, un complexe de rhénium avait été couplé à de la doxorubicine (Dox), connue pour marquer le noyau, et les deux conjugués obtenus, notés Cp-Dox et Cp-*N*-Dox ont été étudiés en milieu cellulaire. Alors que la doxorubicine marquait bien les noyaux des cellules, les conjugués alors obtenus étaient re-localisés aux mitochondries (FIGURE 5.46).

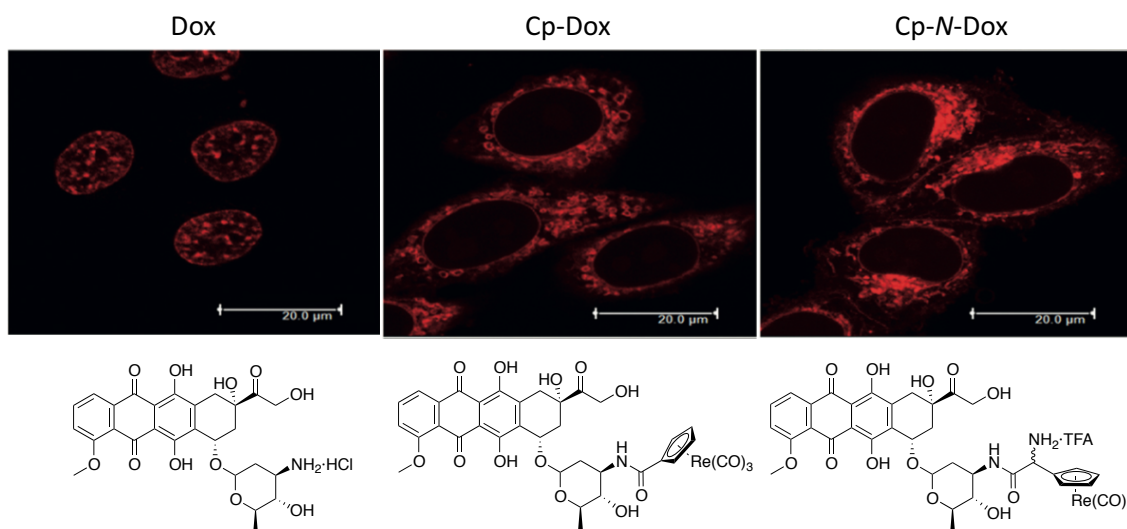


FIGURE 5.46 – Images de microscopie confocale de fluorescence de Dox ($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), Cp-Dox et Cp-*N*-Dox ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) dans des cellules HeLa après une incubation de 2 h (ex. 488 nm, em. 600 nm). Barre d'échelle = 20 μm .¹²²

5.3.2 Par une liaison à l'anthracène

En 2007, l'équipe de Paul DYSON a conjugué des complexes organométalliques de ruthénium (II) ayant des propriétés antitumorales à différents ligands dans le but d'améliorer leur toxicité.²⁹¹ Cette étude a montré que le complexe présentant la meilleure toxicité était le complexe conjugué à l'anthracène (**96**, représenté FIGURE 5.47), qui induit la mort des cellules en inhibant la synthèse de l'ADN.

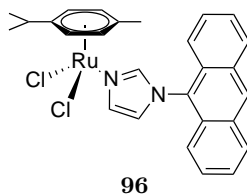


FIGURE 5.47 – Structure du conjugué $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymène})\text{Cl}_2(\text{L})]$, où L est un ligand de type anthracène.²⁹¹

L'amélioration est due à une accélération de la pénétration du complexe et à une accumulation dans le noyau. Les expériences de localisation en milieu cellulaire sont présentées FIGURE 5.48.

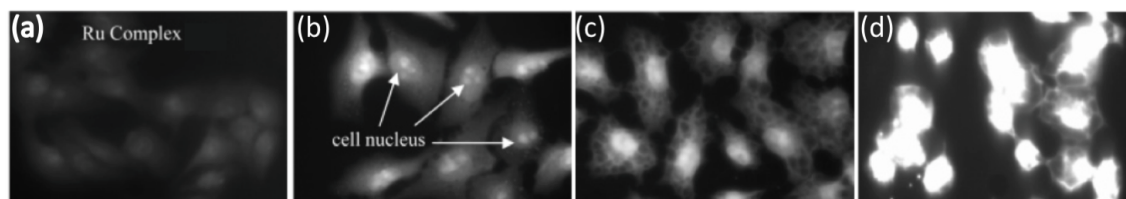


FIGURE 5.48 – Images de microscopie de fluorescence de cellules A549 exposées au composé **96** ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) pendant 30 min, 1 h, 2 h ou 4 h (de gauche à droite). Ex. 365 nm.²⁹¹

Les auteurs notent une pénétration du composé **96** dès 30 minutes d'incubation, avec une accumulation dans le noyau au bout d'une heure. En revanche, le ligand seul ne présente pas de pénétration nucléaire mais une localisation cytoplasmique.

En 2008, l'équipe d'Isabel SANTOS a conjugué l'antracène à un ligand tridentate de type pyrazolyl, complexé à du rhénium tricarbonyle, qui a donné un complexe chargé positivement et possédant ainsi une bonne solubilité dans l'eau (FIGURE 5.49).²⁹²

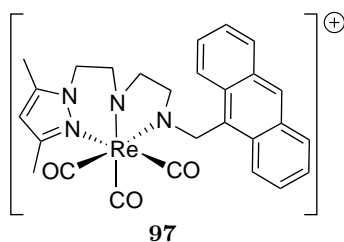


FIGURE 5.49 – Structure du conjugué **97**.²⁹²

Les auteurs ont montré une grande affinité de ce complexe pour l'ADN par différentes méthodes spectroscopiques, ce qui a confirmé le mécanisme par intercalation.²⁹²

Encouragés par la capacité de l'antracène à s'accumuler dans le noyau des cellules et à s'intercaler à l'ADN, nous avons synthétisé deux complexes de $\text{Re}(\text{CO})_3$ possédant un groupement terminal anthracène (FIGURE 5.50). Le premier, le composé **98**, est relié à l'antracène par trois carbones et une fonction ester alors que le deuxième, le composé **99**, possède une chaîne de huit carbones et une fonction amine.

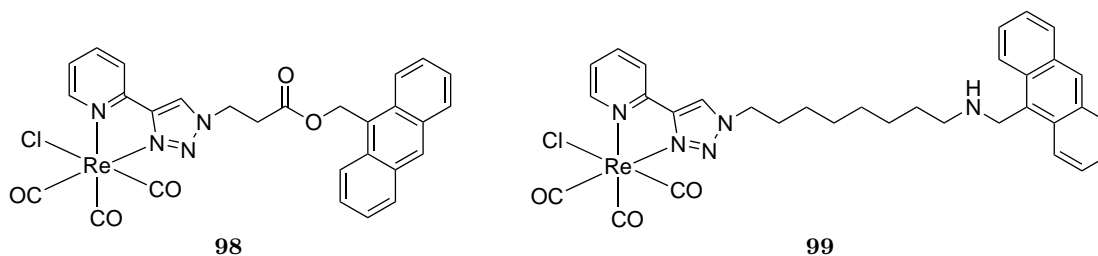


FIGURE 5.50 – Structures des composés de type $\text{Re}(\text{CO})_3$ -anthracène synthétisés.

Ces deux composés ont été étudiés en milieu cellulaire par microscopie de fluorescence et les images sont présentées FIGURE 5.51 (composé **98**) et FIGURE 5.52 (**99**).

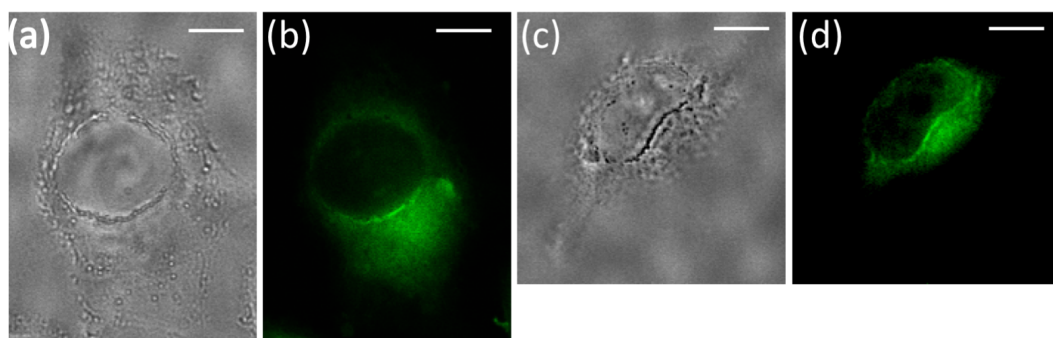


FIGURE 5.51 – Cellules HeLa incubées en présence du composé **98** ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h, 37°C), fixées au PFA et séchées à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a-c) Image visible, (b-d) Signal de fluorescence du composé **100** (ex. 350/50x, em. 560/80m).

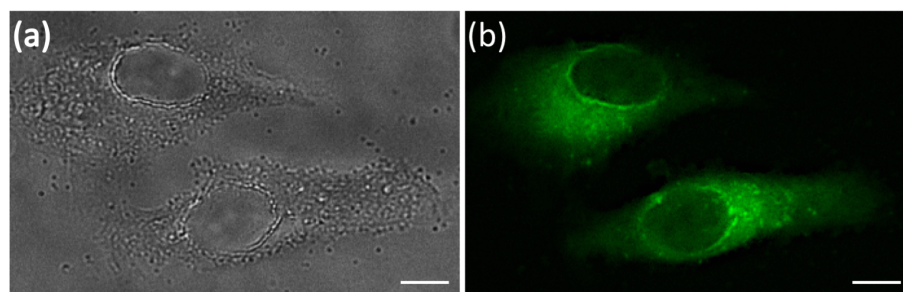


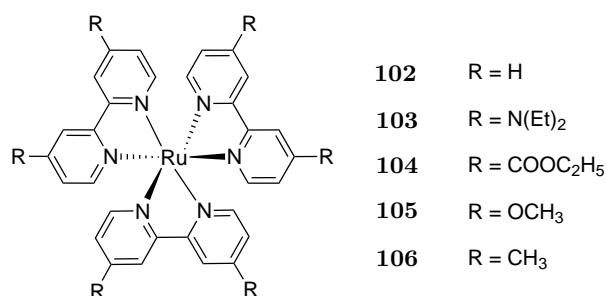
FIGURE 5.52 – Cellules HeLa incubées en présence du composé **99** ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h, 37°C), fixées au PFA et séchées à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a) Image visible, (b) Signal de fluorescence du composé **99** (ex. 350/50x, em. 560/80m).

Ils pénètrent bien à l'intérieur des cellules mais aucun marquage nucléaire n'a pu être observé. Le composé **98** semble localisé dans une région proche du noyau qui pourrait être l'appareil de GOLGI alors que la localisation du composé **101** est plus diffuse dans le cytoplasme et ressemble à une localisation mitochondriale.

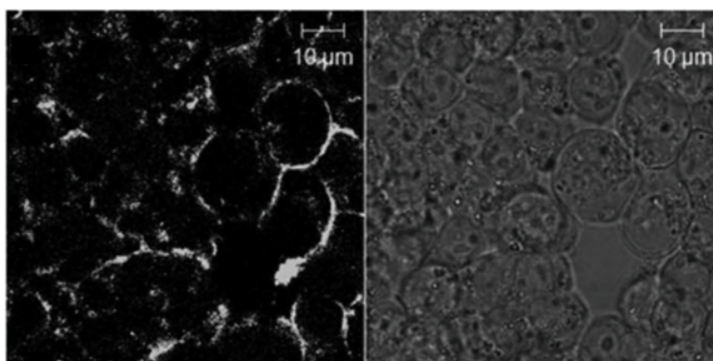
Alors que les composés intercalants tels que l'acridine et l'anthracène sont décrits pour se lier à l'ADN et par conséquent marquer sélectivement le noyau, la pénétration des complexes dans les noyaux reste donc difficile même après avoir franchi la membrane plasmique.

5.4 Marquage des membranes

Enfin, nous nous sommes intéressés au marquage de la membrane plasmique des cellules, qui est leur première barrière protectrice. Il y a une dizaine d'années, l'équipe de Paul J. DYSON a synthétisé cinq complexes de ruthénium (**102**, **103**, **104**, **105**, **106**, FIGURE 5.53) avec pour objectif de les utiliser comme pigments photosensibles dans des cellules solaires, mais ces complexes ont présenté des propriétés de toxicité et de ciblage cellulaire intéressantes.²⁹³

FIGURE 5.53 – Structures des cinq complexes synthétisés.²⁹³

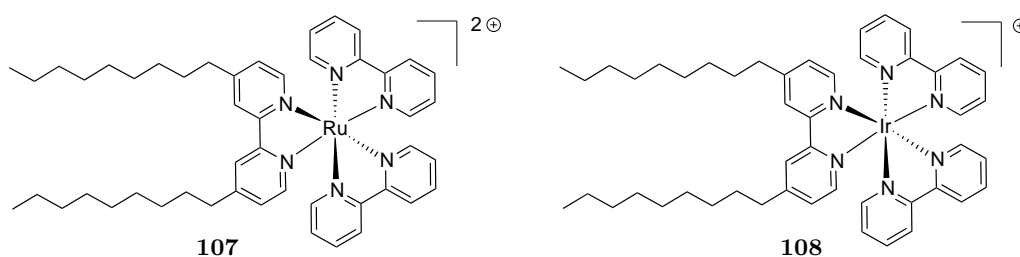
Ces cinq complexes ont été étudiés en milieu cellulaire (24 h, 37 °C). Le complexe **102** n'a présenté aucune accumulation dans les cellules. Les complexes **104**, **105** et **106** ont présenté une localisation ponctuelle dans les cellules, qui pourrait correspondre à une pénétration par endocytose. En revanche, pour le composé **103**, les auteurs constatent une localisation membranaire à une concentration d'incubation de $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (FIGURE 5.54) ou à basse température (4 °C), alors que le composé semble présent dans le cytoplasme à $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ à 37 °C.

FIGURE 5.54 – Microscopie de fluorescence confocale. Cellules incubées avec **103** ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 24 h, 37 °C). À gauche, la fluorescence du composé et à droite, la lumière transmise.²⁹³

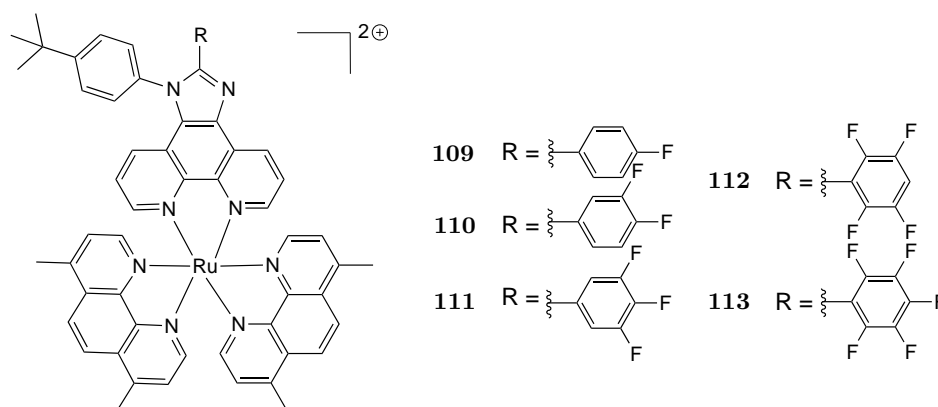
Le mécanisme suivant est postulé par les auteurs : une adsorption passive de **103** sur la membrane a d'abord lieu en raison de sa lipophilicité, suivie d'une internalisation active, limitée à basse température ou dans le cas où la membrane est saturée (à haute concentration).

Un autre exemple de complexe marquant spécifiquement les membranes et inspiré du complexe de DYSON a été décrit il y a quelques années par le groupe de F. HOGAN.²⁹⁴ Les auteurs ont décrit deux complexes de ruthénium (**107**) et d'iridium (**108**) comme mimes lipidiques de métallo-surfactants (FIGURE 5.55). Ces complexes présentent une structure similaire aux phospholipides qui peuvent se lier aux membranes de manière non covalente. En outre, ils possèdent des propriétés spectroscopiques intéressantes : grand déplacement de STOKES, luminescence intense et long temps de vie.

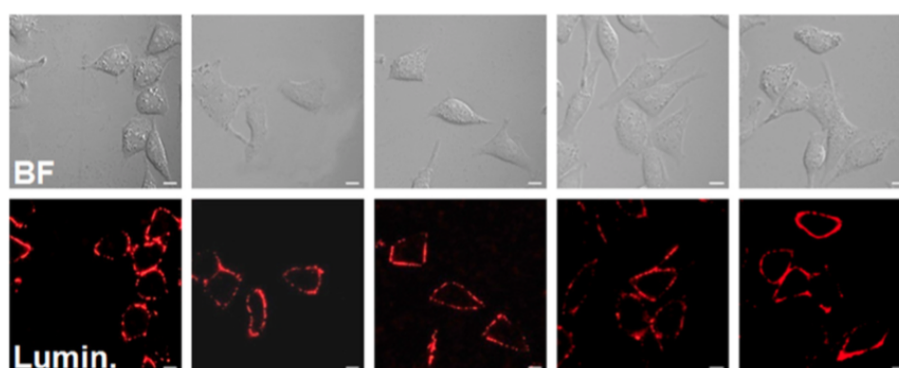
Les auteurs ont montré par diffusion des rayons X aux petits angles par des expériences dans des liposomes de dimyristoylphosphatidylcholine que les deux composés sont des bons mimes lipidiques.

FIGURE 5.55 – Structures des deux complexes synthétisés.²⁹⁴

Un autre exemple a été décrit en 2017 par Hui CHAO *et al.*. Dans leur article, les auteurs présentent une méthode efficace pour tuer des cellules cancéreuses : détruire la membrane. Pour cela, les auteurs ont synthétisé cinq complexes de ruthénium, qui possèdent des ligands fluorés avec de bonnes propriétés d'absorption biphotonique (FIGURE 5.56), qu'ils ont incubés sur des cellules HeLa.²⁹⁵

FIGURE 5.56 – Structures des cinq complexes synthétisés.²⁹⁵

Ces complexes se sont révélés capables de marquer la membrane de cellules HeLa après 30 minutes d'incubation et une diffusion vers les mitochondries a été observée au bout de 4 heures (FIGURE 5.57). Les cellules ont été ensuite tuées par irradiation à deux photons.

FIGURE 5.57 – Imagerie de fluorescence biphotonique de cellules HeLa marquées, de gauche à droite, par les complexes **109**, **110**, **111**, **112** et **113** (ex. 825 nm, em. 630 ± 20 nm) (Barre d'échelle = 20 μ m).²⁹⁵

La plupart des molécules décrites pour marquer les membranes cellulaires possèdent une longue chaîne lipidique, qui a ainsi une bonne affinité avec la bicouche lipidique qui compose les membranes des cellules.^{294,296}

Afin de marquer les membranes à l'aide de SCoMPI, nous nous sommes inspirés de ces exemples issus de la littérature et de la structure en bicouche lipidique des membranes pour synthétiser un composé possédant deux motifs $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{Cl})(\text{Pyta})$ séparés par une chaîne lipophile de huit carbones. Ce composé a été synthétisé à partir du 1,8-dibromooctane en trois étapes, détaillées dans le SCHÉMA 5.7.

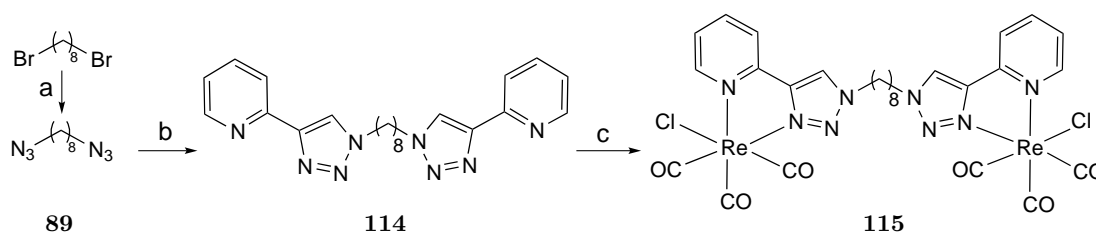


SCHÉMA 5.7 – Synthèse de la sonde **115**. (a) NaN_3 , DMF, 15 h, 60°C , quantitatif. (b) 2-éthynylpyridine, CuSO_4 , ascorbate de sodium, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$, 12 h, 25°C , 85 %. (c) $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}$, toluène, 1 h, 80°C , 76 %.

Dans un premier temps, le 1,8-dibromooctane a été mis à réagir avec un excès d'azoture de sodium, pour former le 1,8-diazidooctane. Ce dernier a été mis à réagir avec de la 2-éthynylpyridine en présence de sulfate de cuivre et d'ascorbate de sodium et une cycloaddition 1,3-dipolaire de HUISGEN a été réalisée pour former le composé **114**, qui possède deux motifs de type Pyta. Après réaction avec deux équivalents de $[\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}]$, le di-complexe **115** a été obtenu.

115 a d'abord été étudié par microscopie d'épifluorescence sur différentes lignées cellulaires : des cellules Caco2-TC7 (FIGURE 5.58) et HeLa (FIGURE 5.59).

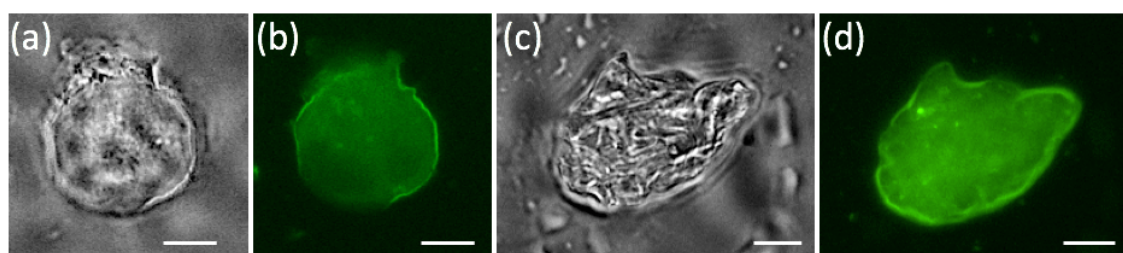


FIGURE 5.58 – Cellules Caco2-TC7 incubées en présence du composé **115** ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h, 37°C), fixées au PFA et séchées à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a,c) Image visible, (b,d) Signal de fluorescence du composé **115** (ex. 350/50x, em. 560/80m).

On constate pour les deux lignées cellulaires étudiées une répartition assez homogène du composé : il n'y a pas d'accumulation dans des organites spécifiques et le composé semble réparti en une couche homogène, comme s'il était simplement inclus dans la membrane. La localisation de **115** a également été étudiée par AFM-IR et par fluorescence X.

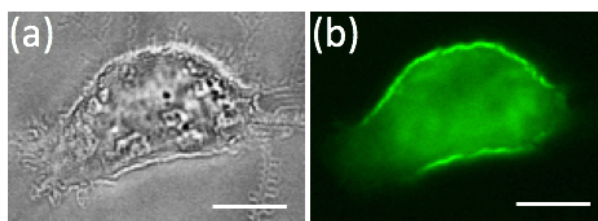


FIGURE 5.59 – Cellule HeLa incubée en présence du composé **115** ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h, 37°C), fixée au PFA et séchée à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a) Image visible, (b) Signal de fluorescence du composé **115** (ex. 350/50x, em. 560/80m).

Par AFM-IR, une carte a été enregistrée à 1920 cm^{-1} , qui correspond à la bande E des fonctions carbonyle du complexe $\text{Re}(\text{CO})_3$ (FIGURE 5.60).

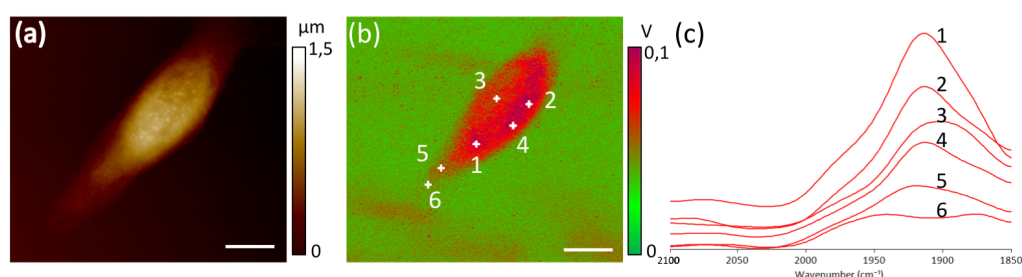


FIGURE 5.60 – Cellule HaCaT incubée en présence du composé **115** ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h, 37°C), fixée au PFA et séchée à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a) Topographie AFM, (b) Carte enregistrée en AFM-IR à 1920 cm^{-1} ($\text{Re}(\text{CO})_3$ de **115**), (c) Spectres IR enregistrés entre 1850 et 2100 cm^{-1} sur les points indiqués sur la figure (b).

La carte de la FIGURE 5.60(b) indique que le composé **115** semble présent dans toute la cellule ou sur toute la surface des cellules, mais aucune accumulation au niveau des membranes n'est visible. Des spectres ont été enregistrés entre 1850 et 2100 cm^{-1} sur certains points et présentent les deux bandes caractéristiques des fonctions $\text{C}\equiv\text{O}$, ce qui confirme la présence du complexe.

Enfin, ce composé a aussi été étudié par fluorescence X (FIGURE 5.61). Étant donné que le composé s'est révélé faiblement soluble dans le milieu de culture, la concentration d'incubation a été abaissée à $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

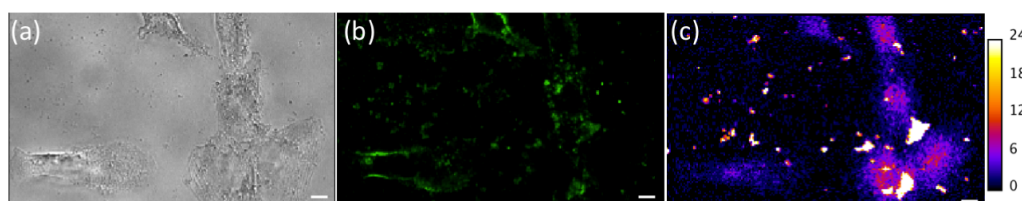


FIGURE 5.61 – Cellules MDA-MB-231 incubées en présence du composé **115** ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1 h, 37°C), fixées au PFA et séchées à l'air (Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$). (a) Image visible, (b) Signal de fluorescence du composé **115** (ex. 350/50x, em. 560/80m), (c) Imagerie de fluorescence X du rhénium (10,0 et 10,3 keV, temps d'intégration de 300 ms), l'échelle de couleur reflète les coups collectés pour le signal du rhénium.

La carte obtenue par fluorescence X a montré que du composé avait tout de même précipité sur les lamelles, puisque des points avec une intensité très élevée ont été observés à l'extérieur des cellules (FIGURE 5.61(c)). La carte met aussi en évidence une distribution homogène du rhénium, ce qui est en accord avec l'imagerie d'épifluorescence et l'AFM-IR.

Deux hypothèses se présentent : soit le composé est distribué de manière homogène dans la cellule, soit il est présent uniquement à la surface des cellules. S'il était distribué de manière homogène à l'intérieur de la cellule, on n'observerait pas un tel signal, car des différences de densité dans les cellules, notamment au noyau, auraient pour conséquence l'apparition de différences notables d'intensité du signal de fluorescence, de fluorescence X ou infrarouge en fonction des organites dans lesquels le composé est accumulé. On peut donc supposer que le composé a tendance à rester fixé au niveau de la membrane plasmique, ce qui explique qu'il soit réparti de manière homogène sur toute la cellule. En microscopie d'épifluorescence, en fonction du focus du microscope, on peut mettre en évidence une plus grande intensité sur les bords de la cellule.

Cette hypothèse est également appuyée par la structure de **115**, qui possède une chaîne lipophile avec deux complexes métalliques chargés positivement (par échange du Cl^-) de part et d'autre qui devrait permettre une bonne affinité avec la membrane.

Une étude par microscopie confocale de fluorescence pourrait confirmer cette localisation, mais nous sommes limités par les longueurs d'onde disponibles (longueur d'onde minimale d'excitation à 405 nm).

5.5 Conclusion

Dans cette partie, nous avons montré qu'il était possible de fonctionnaliser les sondes multimodales SCoMPI par des molécules de notre choix afin de modifier la localisation des sondes en milieu cellulaire dans l'objectif de marquer des organites. La diversité des fonctionnalisations possibles de ces sondes ouvre de grandes perspectives. Nous avons pu mettre en évidence la localisation mitochondriale de deux types de composés :

- Des triphénylphosphonium, avec une pénétration plus ou moins importante en fonction de l'encombrement de la molécule.
- Un peptide ciblant les mitochondries, ou MPP.

Par ailleurs, en utilisant une chaîne hydrophobe reliant deux motifs $\text{Re}(\text{CO})_3$, nous avons été capables de marquer les membranes des cellules et d'observer cette localisation par trois méthodes différentes : en fluorescence classique, en AFM-IR et en fluorescence X, ce qui montre la pertinence des trois modalités portées par les SCoMPI et la stabilité de ces sondes en milieu biologique.

Enfin, avec l'objectif d'obtenir une bibliothèque de marqueurs d'organites en fluorescence X, nous avons essayé de greffer des molécules ayant une grande affinité pour le noyau sur des sondes. Malheureusement, aucune des méthodes employées n'a été probante, les conjugués étant re-localisés à l'intérieur des cellules vers d'autres organites sans pénétrer le noyau.

Chapitre 6

Conclusion générale

Dans ce travail, nous avons développé des sondes multimodales, appelées SCoMPI, pour marquer des molécules d'intérêt et les suivre en milieu biologique, ou pour cibler des organites par modification chimique de la sonde. Des sondes $\text{Re}(\text{CO})_3$ possédant différents groupes fonctionnels peuvent être obtenues grâce au ligand Pyta :

- sonde amine pour marquer les fonctions acide carboxylique ou aldéhyde de l'acide hyaluronique.
- sonde acide carboxylique pour greffer sur l'extrémité *N*-terminale de peptides ou pour coupler à des molécules possédant une fonction amine (triphénylphosphonium).
- le ligand pyta peut être modifié directement par des groupements d'intérêt (acridine, anthracène) pour être ensuite complexé au rhénium.

Ce travail a montré la capacité des sondes $\text{Re}(\text{CO})_3$ à marquer des molécules d'intérêt et la possibilité de les étudier dans des cellules, comme des ferrocifènes. Ces composés possédant un ferrocène, ils ne sont pas fluorescents mais la présence de bandes de vibration d'élongation des liaisons $\text{C}\equiv\text{O}$, caractéristiques de ces sondes, permet tout de même de détecter le composé car elles apparaissent dans la fenêtre transparente des cellules. La microscopie infrarouge nous a permis de localiser non seulement le composé marqué, mais aussi des organites particuliers tels que le noyau, déterminé par mesure du rapport des bandes $\text{CH}_3:\text{CH}_2$.

Les SCoMPI ont aussi été pertinents pour marquer un produit cosmétique, l'acide hyaluronique, et pour en étudier la pénétration à travers des biopsies de peau. Deux modalités de la sonde ont été utilisées, la fluorescence et l'infrarouge. Les deux techniques ont montré une bonne corrélation et ont permis de localiser l'acide hyaluronique marqué dans le *stratum corneum* après 24 h d'exposition.

Enfin, la dernière partie de ce travail concernait le marquage d'organites dans des cellules. Nous avons couplé un peptide mitochondrial (MPP) à une sonde et montré que le conjugué obtenu était bien localisé aux mitochondries. Un SCoMPI possédant une fonction acide carboxylique a aussi été couplé à des dérivés de triphénylphosphonium : les composés ont également présenté une localisation mitochondriale, avec une pénétration différente selon l'encombrement de la sonde. La localisation a été déterminée par microscopie de fluorescence et fluorescence X.

Nous avons aussi réussi à marquer les membranes des cellules grâce à une sonde bimétallique possédant deux cœurs $\text{Re}(\text{CO})_3$ séparés par une chaîne lipophile.

Enfin, nous souhaitons marquer le noyau des cellules pour compléter notre bibliothèque de marqueurs d'organites : pour ce faire, des conjugués SCoMPI-acridine et SCoMPI-anthracène ont été synthétisés mais aucune localisation au noyau n'a pu être démontrée. Ces composés, connus pour s'intercaler avec l'ADN, semblent s'accumuler dans d'autres organites lorsqu'ils sont conjugués à un complexe métallique de type $\text{Re}(\text{CO})_3$.

Un autre moyen d'imager le noyau des cellules consiste à coupler un SCoMPI à un facteur de localisation nucléaire (NLS), séquence peptidique ciblant spécifiquement le noyau. Nous avons envisagé cette fonctionnalité, mais même si le NLS permet de pénétrer le noyau des cellules, le composé n'a pas pu passer la membrane plasmique. Il faudrait donc coupler la sonde à la fois à une molécule capable de pénétrer la cellule comme un CPP, et à la séquence NLS pour observer une localisation nucléaire. Ces travaux sont toujours en cours.

Part II

Experimental part

General considerations

Chemicals and solvents: All chemicals and solvents were purchased from commercial sources (Sigma-Aldrich, Acros, Alfa-Aesar, TCI, Strem, Iris, VWR, Creative PEGWorks) and were used as received. Dulbeccoss modified Eagle medium (DMEM) and penicillin-streptomycin were from Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Fetal bovine serum was from GE Healthcare Life Sciences (South Logan, Utah, USA). Dulbeccoss phosphate Buffered Saline (10X, DPBS) was from Gibco (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

Characterization: For Re(I) complexes and hyaluronic acid, the numbering showed in Figure 1 is used.

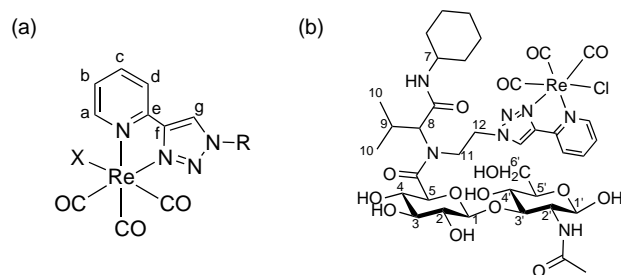


Figure 1 – Numbering used for NMR assignment in the case of (a) the SCoMPI probes and (b) hyaluronic acid.

Instrumentation and analysis: ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker DRX300 spectrometer. The chemical shifts (δ/ppm) were calibrated relative to residual solvent signals. The following abbreviations are used: singlet (s), doublet (d), doublet of doublets (dd), triplet (t), triplet of doublets (td) and multiplet (m). High resolution mass spectra (HR-MS) were obtained on a Bruker hybride APEX spectrometer (electrospray) at the ICMMO (Institut de chimie et des matériaux d'Orsay). Peptides were characterized by MALDI-TOF-MS in the positive ion reflector mode on an ABI Voyager DE-Pro MALDI-TOF mass spectrometer (Applied Biosystems) using as matrix a saturated solution of CHCA in AcN/H₂O/TFA (50:50:0.1 v:v:v). Analytical HPLC was performed on an Agilent 1200 series equipped with a quaternary pump using a Proto 200 C18 from Higgins Analytical Inc (particles size 3 μm , 100 \times 4.6 mm column). Preparative HLC was performed on an Agilent 1260 Infinity using a Nucleodur C18 HTech column from Macherey-Nagel Inc. (particles size 5 μm , 250 \times 16 mm column). UV-visible absorption spectra were recorded on a Varian Cary 300 Bio spectrophotometer, luminescence emis-

sion spectra on a Jasco FP-8300 spectrofluorimeter. Infrared spectra were recorded on a Perkin Elmer Spectrum 100 in ATR mode (background on air) and analyzed using the Omnic software. The following abbreviations are used: weak (w), strong (S), broad (br).

FTIR spectromicroscopy: CaF₂ slides were purchased from Crystran (diameter 13 mm, thickness 0.2 or 1 mm).

SR-FTIR-SM (Synchrotron radiation FTIR spectromicroscopy): Infrared spectra were recorded at the SMIS beamline (Synchrotron SOLEIL) which exploits the edge and bending radiations of a bending magnet. Spectra were recorded in transmission on a Nicolet Continuum XL microscope (Thermo Fischer) equipped with a 50×50 μm² liquid nitrogen cooled MCT/A detector, a 32X/NA 0.65 Schwarzschild objective, a Prior XYZ motorised stage, and coupled to a Nicolet 5700 spectrometer (Thermo Fischer) equipped with a Michelson interferometer, and a KBr beam splitter. The confocal aperture was set at 6×6 μm² and the microscope was operated in semi-confocal mode. Spectra were recorded with 128 scans at 8 cm⁻¹ resolution in the 800–4000 cm⁻¹ range. Maps were recorded by scanning the samples with steps of 6 μm in X and in Y with 128 scans at 8 cm⁻¹ resolution in each square. Peak areas were integrated using Omnic software.

FTIR-SM (FTIR spectromicroscopy): Infrared spectral images were recorded at the SMIS beamline on a Cary 620 infrared microscope equipped with a 128×128 pixels Stingray MCT detector. The images were taken with a 25X magnification 0.81 numerical aperture objective giving a field of view of 422×422 μm² at standard mag and a projected pixel size of 3×3 μm² at standard magnification.

The microscope was coupled to a Cary 670 spectrometer equipped with a KBr beamsplitter and a Michelson interferometer. Spectra were recorded at 8 cm⁻¹ resolution between 800 and 4000 cm⁻¹ with 128 co-added scans at 2.5 Hz mirror speed.

Luminescence microscopy Fluorescence imaging was performed using an Olympus X71 microscope equipped with a C9100-02 camera (Hamamatsu Corporation, Sewickley, PA), a X20 objective and a Hg lamp (100 W) attenuated by a neutral density filter (ND-1). Luminescence signal of SCoMPIs was detected using the following filter set: excitation D350/50x; beam splitter 400DCLP; emission HQ560/80m; Chroma Technology. Image analysis was performed using ImageJ software.

Measurements of quantum yields Luminescence quantum yields were measured using a Jasco FP-8300 spectrofluorimeter. Emission spectra were recorded upon excitation at 320 nm for both compounds. The quantum yields were calculated according to the following equation²⁹⁷ :

$$Q_x = Q_r \left(\frac{A_r(\lambda_r)}{A_x(\lambda_x)} \right) \left(\frac{I_r(\lambda_r)}{I_x(\lambda_x)} \right) \left(\frac{n_x^2}{n_r^2} \right) \left(\frac{D_x}{D_r} \right)$$

In this equation, Q_r is the quantum yield of the reference, $I(\lambda)$ is the relative intensity of the exciting light at wavelength λ (here $I_r(\lambda_r)$ and $I_x(\lambda_x)$ are considered equal) n is the average refractive index of the solution to the luminescence, D is the integrated area under the emission spectrum, and $A(\lambda)$ is the absorbance of the solution at the

exciting wavelength. The subscripts x and r refer to the unknown and reference solutions, respectively. Quinine sulfate in 0.1 N sulfuric acid was used as the standard with a known emission quantum yield of 0.546 (exc 320 nm).

Cell culture and samples for imaging Cells were cultured in DMEM supplemented with 10% of heat-inactivated FBS, and 1% of penicillin-streptomycin ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) at 37°C in a 5% CO_2 /air atmosphere.

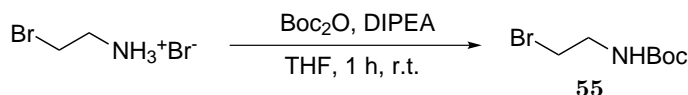
For the preparation of samples for imaging, cells were grown on glass (fluorescence), CaF_2 (infrared) or Si_3N_4 (X-ray fluorescence) slides in a 6-well plate (48 h before the experiment at 37°C under an atmosphere of 95% air/5% CO_2). Medium was removed and fresh growth medium (2 mL DMEM) was added to each flask of control cells. In the case of treated cells, 2 mL of a solution of compound in fresh growth medium (typically $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ prepared from a 10 mmol L^{-1} stock solution in DMSO, concentrations will be specified) was added. The cells were incubated at 37°C under an atmosphere of 95% air/5% CO_2 for 1 h. After 1 h, the medium was removed. In the case of incubation with a MitoTrackerTM, 2 mL of a $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ solution of MitoTrackerTM Deep Red FM in fresh growth medium was added (200 nmol L^{-1} , prepared from a 1 mmol L^{-1} stock solution in DMSO) and the cells were incubated 30 additional minutes. They were washed twice with 2 mL of 1X PBS, fixed with 4% PFA for 8 min at room temperature and washed twice with PBS, and twice with milliQ water. Slides were air-dried.

Synchrotron X-ray fluorescence microspectroscopy Si_3N_4 slides were purchased from Silson Ltd. Samples were examined on the new Nanoscopium beamline at SOLEIL synchrotron. Spectra and maps were recorded using a 13.5 keV incident beam energy. The X-ray beam was focused by a Kirckpatrick-Baez nano-focusing mirror to $0.3 \times 0.3 \mu\text{m}^2$ size at the sample position. The intensity of the focused X-ray beam was measured by a Si diode and was $6 \times 10^9 \text{ photons}\cdot\text{s}^{-1}$. For the maps the FLYSCAN continuous scanning mode was used with $0.3 \mu\text{m}$ image pixel-size. The full XRF spectra were collected in each pixel by two Si-drift detectors (Ketek) in order to increase the solid angle of detection. Due to the varying Re concentrations the accumulation time/pixel depended on the compound (between 200 and 300 ms/pixel). The XRF spectra of the two detectors were added and the sum was used for calculating the elemental maps.

Chapter 3

Marquage de l'acide hyaluronique par une sonde Re-tricarbonyle et étude de la pénétration percutanée par imagerie multimodale dans la peau humaine

Synthesis of *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-2-bromoethylamine (**55**) (adapted from literature²⁹⁸)



2-Bromoethylamine hydrobromide salt (5.00 g, 24.4 mmol, 1 eq.) was suspended in THF (400 mL). Di-*tert*-butyl dicarbonate (Boc_2O) (6.10 g, 27.9 mmol, 1.1 eq.) was then added. The mixture was cooled down in an ice bath and diisopropylethylamine (DIPEA, 8.0 mL, 49.7 mmol, 2 eq.) was added dropwise. The reaction mixture was stirred for one hour at room temperature (ca. 25 °C) and the completion of the reaction was monitored by TLC (silica, cyclohexane/ethylacetate 90:10 + 1% trimethylamine v:v, $R_f(\mathbf{55}) = 0.31$). After completion, the solvent was removed under reduced pressure and a yellow solid was obtained, which was dissolved in ethylacetate (30 mL) and washed once with a solution of 10% of potassium carbonate (K_2CO_3 , 30 mL) and once with brine (30 mL). The organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate (Na_2SO_4), filtered and evaporated to dryness to give the desired compound (**55**) as a pale yellow oil.

Yield: 6.30 g (quantitative)

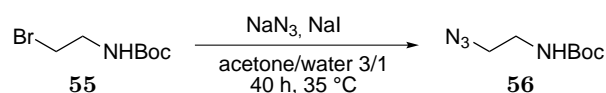
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 4.96 (broad s, 1H, *NHBoc*), 3.52 (t, 2H, $^3J = 5.9$ Hz, $\text{Br}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 3.45 (m, 2H, $\text{Br}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 1.42 (s, 9H, $-\text{C}-(\text{CH}_3)_3$).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 146.6 (C=O), 85.0 ($-\text{C}-(\text{CH}_3)_3$), 42.3 ($\text{Br}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 28.2 ($\text{Br}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 27.2 ($-\text{C}-(\text{CH}_3)_3$).

IR: 3348 (br, N-H), 2979 (w, C-H), 1809 (w, C=O), 1758 (s, C=O), 1692, 1505.

NMR Data in agreement with literature.²⁹⁸

Synthesis of *tert*-butyl(2-azidoethyl)carbamate (**56**) (adapted from literature²⁹⁹)



N-(*tert*-butoxycarbonyl)-2-bromoethylamine (**55**) (3.09 g, 13.8 mmol, 1 eq.) was dissolved in a mixture of acetone and water (50 mL, acetone/water 3:1 v:v). Sodium azide (1.80 g, 27.8 mmol, 2 eq.) and sodium iodide (1.78 g, 11.9 mmol, 0.9 eq.) were added. The mixture was stirred at 35 °C and monitored by TLC (silica, cyclohexane/ethylacetate 80:20 v:v, Rf(**56**) = 0.38). After 15 h, the reaction was not complete, as indicated by the presence of compound **55** on the TLC. One more equivalent of sodium azide (0.90 g, 13.8 mmol, 1 eq.) was then added and the reaction was shown to be completed after an additional 24 h using TLC. Dichloromethane (75 mL) and water (25 mL) were added to the mixture that was decanted. The aqueous layer was extracted with dichloromethane (3×25 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate (Na₂SO₄) and filtered. Dichloromethane was removed under reduced pressure to give the product **56** as a yellow oil.

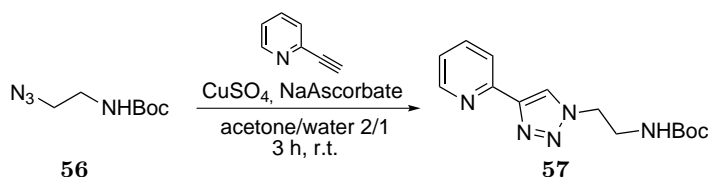
Yield: 1.705 g (66 %)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 4.89 (broad s, 1H, NHBoc), 3.40 (t, 2H, ³J = 5.7 Hz, N₃-CH₂-CH₂-), 3.29 (t, 2H, ³J = 5.7 Hz, N₃-CH₂-CH₂-), 1.43 (s, 9H, -C-(CH₃)₃).
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 155.8 (C=O), 79.9 (-C-(CH₃)₃), 51.3 (N₃-CH₂-CH₂-), 40.2 (N₃-CH₂-CH₂-), 28.5 (-C-(CH₃)₃).

IR: 3346 (br, NH), 2978 (w, CH), 2098 (s, N₃), 1690, 1512.

NMR Data in agreement with literature.²⁹⁹

Synthesis of 2-(1-[*N*-*tert*-butoxycarbonyl]ethanamine)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)pyridine (Pyta-(CH₂)₂-NHBoc, **57**) (adapted from literature⁸¹)



tert-butyl(2-azidoethyl)carbamate (**56**) (1.14 g, 6.10 mmol, 1 eq.) was dissolved in a mixture of acetone and water (60 mL, acetone/water 2:1 v:v). Anhydrous copper sulfate (262.7 mg, 1.64 mmol, 0.27 eq.), sodium ascorbate (317.6 mg, 1.60 mmol, 0.26 eq.) and 2-ethynylpyridine (620 μL, 6.14 mmol, 1 eq.) were added. The mixture was sonicated for a few minutes, stirred at room temperature and monitored by TLC (silica, ethylacetate, Rf(**57**) = 0.44) until completion (3 h). The solution became light brown and a yellow precipitate appeared. Acetone was evaporated. Dichloromethane was added to the reaction mixture (20 mL) and copper was removed by washing with a solution of ammonia (28 %,

20 mL). The aqueous layer was extracted three times with dichloromethane. Combined organic layers were dried over anhydrous sodium sulfate and filtered. Dichloromethane was removed by rotary evaporation. The resulting brown oil was purified by column chromatography (silica, ethylacetate) to give the desired compound (**57**) as a white solid after evaporation to dryness.

Yield: 1.093 g (62%)

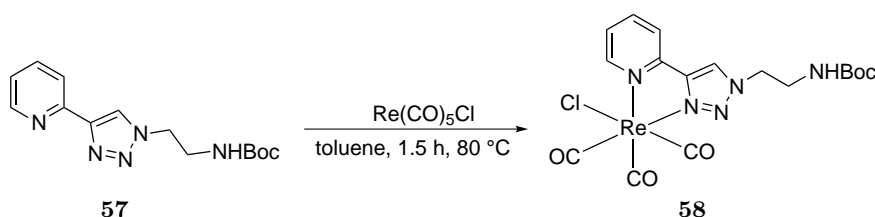
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.59 (m, 1H, *H^a* pyta), 8.17 (m, 1H, *H^d* pyta), 8.15 (s, 1H, *H^g* pyta), 7.79 (td, 1H, ³*J* = 7.7 Hz, ⁴*J* = 1.8 Hz, *H^c* pyta), 7.22 (m, 1H, *H^b* pyta), 4.87 (broad s, 1H, *NHBoc*), 4.55 (t, 2H, ³*J* = 5.6 Hz, Pyta-CH₂-CH₂), 3.70 (m, 2H, Pyta-CH₂-CH₂), 1.43 (s, 9H, -C-(CH₃)₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 150.3 (*C=O*), 149.6 (*C^e* pyta), 149.0 (*C^a* pyta), 148.6 (*C^f* pyta), 137.1 (*C^c* pyta), 123.1 (*C^g* pyta), 122.9 (*C^b* pyta), 120.4 (*C^d* pyta), 77.4 (-C-(CH₃)₃), 50.5 (Pyta-CH₂-CH₂-), 40.8 (Pyta-CH₂-CH₂-), 28.5 (-C-(CH₃)₃).

IR: 3220 (br, NH), 2935 (w, CH), 1709 (s, C=O), 1598, 1540.

HR-MS (ESI+): *m/z* calculated for [C₁₄H₁₉N₅O₂ + Na]⁺: 312.1431, found: 312.1416, error: 4.5 ppm.

Synthesis of [Re(CO)₃Cl(Pyta-(CH₂)₂-NHBoc)] (**58**) (adapted from literature⁴⁸)



Pyta-(CH₂)₂-NHBoc (**57**) (301.8 mg, 1.04 mmol, 1 eq.) was dissolved in hot toluene (60 °C, 30 mL) and Re(CO)₅Cl (405.0 mg, 1.12 mmol, 1.1 eq.) was then added. The reaction mixture was stirred at 80 °C for 1.5 hour. A precipitate appeared. The reaction completion was monitored by TLC (silica, ethyl acetate, R_f(**58**) = 0.14). The solid was filtered off and washed with ice-cold toluene to afford a pale yellow solid (**58**).

Yield: 546.7 mg (88%)

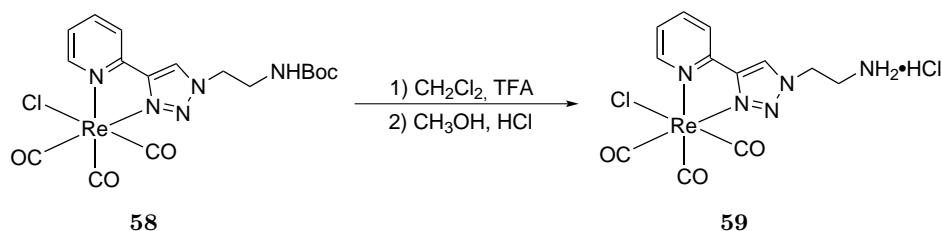
¹H NMR (300 MHz, CD₃OD/CDCl₃): δ (ppm) 8.97 (m, 1H, *H^a* pyta), 8.71 (s, 1H, *H^g* pyta), 8.08 (td, 1H, ³*J* = 7.7 Hz, ⁴*J* = 1.5 Hz, *H^c* pyta), 8.03-8.00 (m, 1H, *H^d* pyta), 7.51-7.47 (m, 1H, *H^b* pyta), 4.62 (t, 2H, ³*J* = 5.8 Hz, Pyta-CH₂-CH₂), 3.63 (t, 2H, ³*J* = 5.8 Hz, Pyta-CH₂-CH₂), 1.40 (s, 9H, -C-(CH₃)₃).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD/CDCl₃): δ (ppm) 157.2 (*C=O*), 153.5 (*C^f* pyta), 149.7 (*C^e* pyta), 149.2 (*C^a* pyta), 140.1 (*C^c* pyta), 126.3 (*C^b* pyta), 125.2 (*C^d* pyta), 122.5 (*C^g* pyta), 80.4 (C(CH₃)₃), 52.2 (Pyta-CH₂), 40.3 (CH₂-NHBoc), 28.4 (C(CH₃)₃).

IR: 3317 (br, NH), 3098 (w, CH), 2930 (w, CH), 2026 (s, CO A₁), 1924 and 1903 (s, CO E), 1880 (s, C=O), 1699, 1529.

HR-MS (ESI+): *m/z* calculated for [C₁₇H₁₉ClN₅O₅Re + Na]⁺: 618.0516, found: 618.0503, error: 2.0 ppm.

Synthesis of $[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{Pyta}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2 \cdot \text{HCl})]$ (**59**)



$[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{Pyta}-(\text{CH}_2)_2-\text{NHBoc})]$ (**58**) (300.0 mg, 504.2 μmol , 1 eq.) was suspended in dichloromethane (2.5 mL), and trifluoroacetic acid (2.5 mL, 32.7 mmol, 62 eq.) was added dropwise to the stirred solution. The mixture became transparent. The reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature (ca. 25 °C) and the reaction completion was monitored by TLC (silica, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 80:20 v:v), then solvents were removed by rotary evaporation. The solid was dissolved in a minimum amount of methanol (2 mL) and concentrated HCl (37 %) was added (3 mL). The mixture was stirred for 10 min, solvents were removed by rotary evaporation under reduced pressure and the product **59** dried under vacuum.

Yield: 255.0 mg (95 %)

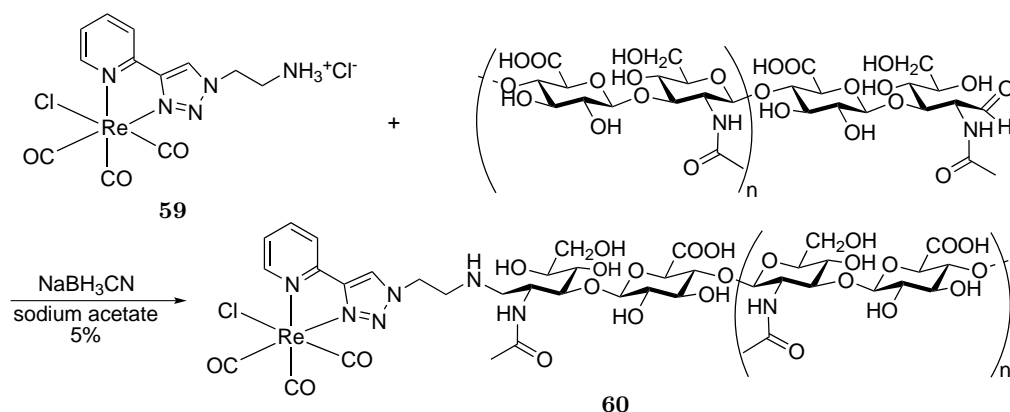
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$): δ (ppm) 9.11 (s, 1H, H^g pyta), 9.02 (dt, 1H, $^3J = 5.5$, $^4J = 1.2$ Hz, H^a), 8.24-8.22 (m, 2H, $H^d + H^c$ pyta), 7.66-7.58 (m, 1H, H^b pyta), 4.99 (t, 2H, $^3J = 5.7$ Hz, Pyta- CH_2), 3.76-3.59 (m, 2H, $\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$): δ (ppm) 154.3 (C^a pyta), 150.7 (C^f pyta), 150.2 (C^e pyta), 141.3 (C^c pyta), 127.5 (C^g pyta), 127.1 (C^b pyta), 123.8 (C^d pyta), 50.28 (Pyta- CH_2), 39.9 ($\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$).

IR: 3076 - 2023 (br, NH), 1930 (S, CO A_1), 1885 (br, CO E).

HR-MS (ESI+): m/z calculated for $[\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_3\text{Re}]^+$: 460.0414, found: 460.0422, error: 1.7 ppm.

Synthesis of HA-Re(CO) $_3$ (**60**)¹⁸¹

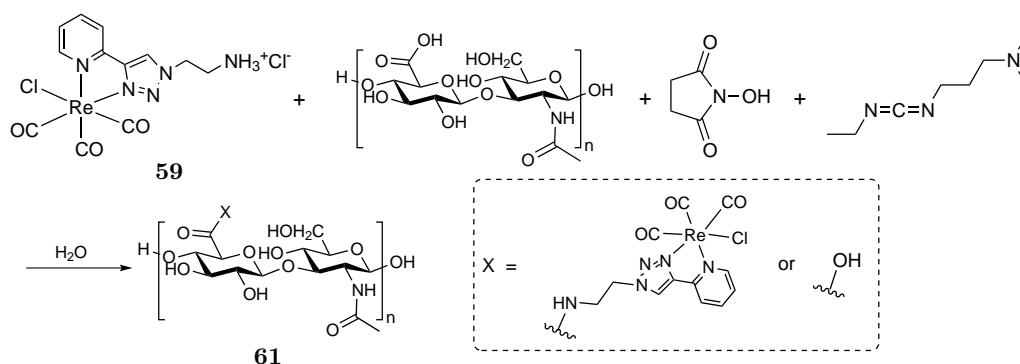


$[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{Pyta}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_3\text{Cl})]$ (**59**) (100.0 mg, 188.2 μmol) was dissolved in a 5% sodium acetate solution (10 mL). After addition of hyaluronic acid (100 mg, $M \approx 1800-2200$ kDa) into the solution, the reaction mixture was stirred at room temperature for 48 h and monitored by TLC (silica, MeOH). Sodium cyanoborohydride (100 mg,

1.6 mmol) was then added to the reaction vial and the reaction mixture was kept at room temperature for additional 96 h. The solvent was then evaporated under reduced pressure. The product was dissolved in water (10 mL) and was purified by dialysis against milliQ water for 3 d during which the water was change every day. The solution was then removed from the cassette and freeze-dried for 3 d. The resulting solid was washed with dichloromethane and with methanol.

IR: 3270 (br, OH), 2903 (w, CH), 1610, 1557 (C=O amide).

Labeling of hyaluronic acid using an amidation (116) ¹⁸⁴

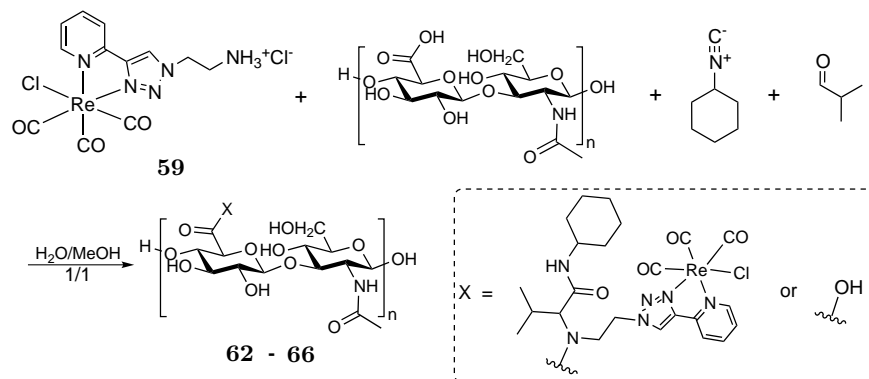


$[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{Pyta}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_3\text{Cl})]$ (**59**) (36.7 mg, 69.1 μmol) and hyaluronic acid (50.0 mg, 131 μmol of repetition unit composed of one D-glucuronic acid and one D-N-acetylglucosamine moiety) was dissolved in water (5 mL). N-Hydroxysuccinimide (8.8 mg, 76 μmol) and 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (14.4 mg, 75.6 μmol) were added to the mixture and the pH was set at 5.5 ± 0.3 . After 2 h, the pH was raised to 7.3 ± 0.3 , the mixture was stirred for 5 d and the completion monitored by TLC (silica, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 60:40 v:v).

When the spot corresponding to compound **59** was no longer observed, the reaction was stopped and the gel was washed with 96 % ethanol. The product was filtered and dried under vacuum to get a pale yellow solid.

IR: 3270 (br, OH), 2903 (w, CH), 1610, 1557 (C=O amide).

Labeling of hyaluronic acid using a multicomponent Ugi condensation (62-66) (inspired by literature¹⁸⁸)



The protocols below were inspired from literature,¹⁸⁸ describing the conjugation of fluorescein amine and rhodamine B amine to HA. Compounds **7-11** are described in table TABLEAU 3.3. The labeling percentage indicated was measured by FTIR using a calibration curve (see below) or by $^1\text{H-NMR}$ when possible (compounds **62** and **63**). With compounds **64**, **65** and **66**, signals obtained by $^1\text{H-NMR}$ were too weak for a reliable quantification.

Synthesis of compound 62 (10 kDa, 5%)

In this protocol, deuterated solvents were used for an easy monitoring by $^1\text{H NMR}$ (aliquots of 500 μL , re-introduced after NMR analysis).

10 kDa-HA (100.0 mg, 2.62×10^{-4} mol of repetition unit composed of one D-glucuronic acid and one D-N-acetylglucosamine moiety) was dissolved in 1 mL of D_2O .

$[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{Pyta}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2 \cdot \text{HCl})]$ (**59**) (7.0 mg, 1.4×10^{-5} mol), isobutyraldehyde (1.2 μL , 1.3×10^{-5} mol) and cyclohexyl isocyanide (1.6 μL , 1.3×10^{-5} mol) were dissolved in 500 μL of deuterated methanol (CD_3OD) and the mixture was added to hyaluronic acid. The reaction mixture was stirred at room temperature (ca. 25 °C) until reaction completion (7 d), as evidenced by NMR. The product was purified by filtration over an ultra-centrifugal filter with a 3000 MW cut-off membrane (Amicon®Ultra-15 3000 MW, 5000 g, 10 min) and washed three times with a 50:50 v:v mixture of methanol and water. The filtrate was discarded and the resulting solution was concentrated by rotary evaporation and freeze-dried to obtain a white solid.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, D_2O): δ (ppm) 9.10-8.91 (m, 2H, $H^{a,g}$ pyta), 8.26-8.07 (m, 2H, $H^{c,d}$ pyta), 7.66-7.55 (m, 1H, H^b pyta), 4.54 (d, 30H, $30 \times H^1$, $^3J = 8.5$ Hz), 4.45 (d, 30H, $30 \times H^1$, $^3J = 7.5$ Hz), 4.08-3.70 (m, 184H, $30 \times H^{2',4,4',5,6'a,6'b} + H^{7,8,12}$), 3.55-3.37 (m, 129H, $30 \times H^{3,3',5'} + H^{9,10,11} + 30 \times H^2$), 2.01 (s, 90H, $30 \times \text{CH}_3$ amide), 1.79-0.83 (m, 10H, cyclohexyl).

IR: 3270 (br, OH), 2926 (w, CH), 2890 (w, CH), 2029 (S, CO A₁), 1921 (S, CO E), 1903 (S, CO E), 1608 (C=O amide).

Synthesis of compound 63 (10 kDa, 20 %)

In this protocol, deuterated solvents were used for an easy monitoring of the reaction by ^1H NMR.

10 kDa-HA (51.9 mg, 1.36×10^{-4} mol of repetition units composed of one D-glucuronic acid and one D-*N*-acetylglucosamine moiety) was dissolved in 600 μL of D_2O .

$[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{Pyta}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2 \cdot \text{HCl})]$ (**59**) (18 mg, 3.6×10^{-5} mol), isobutyraldehyde (3.3 μL , 3.6×10^{-5} mol) and cyclohexyl isocyanide (4.5 μL , 3.6×10^{-5} mol) were dissolved in 600 μL of CD_3OD and the mixture was added to the aqueous solution of 10 kDa-HA. The reaction mixture was stirred at room temperature (ca. 25 °C) until completion (3 d), as indicated by NMR. The product was purified by filtration over an ultra-centrifugal filter with a 3000 MW cut-off membrane (Amicon®Ultra-15 3000 MW, 5000 g, 10 min) and washed three times with a 50:50 v:v mixture of methanol and water. The filtrate was discarded and the resulting solution was concentrated by rotary evaporation and freeze-dried to obtain a pale yellow solid.

^1H NMR (300 MHz, D_2O): δ (ppm) 9.13-8.94 (m, 2H, $H^{a,g}$ pyta), 8.29-8.10 (m, 2H, $H^{c,d}$ pyta), 7.70-7.58 (m, 1H, H^b pyta), 4.57 (d, 5H, $5 \times H^{1'}$, $^3J = 8.4$ Hz), 4.48 (d, 5H, $5 \times H^1$, $^3J = 7.7$ Hz), 4.08-3.70 (m, 34H, $5 \times H^{2',4,4',5,6'a,6'b} + H^{7,8,12}$), 3.80-3.40 (m, 24H, $5 \times H^{3,3',5'} + H^{9,10,11}$), 3.38-3.33 (t, 5H, $5 \times H^2$, $^3J = 7.7$ Hz), 2.03 (s, 15H, $5 \times \text{CH}_3$ amide), 1.82-0.87 (m, 10H, cyclohexyl).

IR: 3278.0 (br, OH), 2929 (w, CH), 2891 (w, CH), 2041 (S, CO A_1), 2027 (S, CO A_1), 1965 (S, CO E), 1922 (S, CO E), 1611 (C=O amide).

Synthesis of compound 64 (10 kDa, 40 %)

10 kDa-HA (51.5 mg, 1.36×10^{-4} mol of repetition unit composed of one D-glucuronic acid and one D-*N*-acetylglucosamine moiety) was dissolved in 1 mL of D_2O .

$[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{Pyta}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2 \cdot \text{HCl})]$ (**59**) (61 mg, 1.2×10^{-4} mol), isobutyraldehyde (10.5 μL , 1.2×10^{-4} mol) and cyclohexyl isocyanide (13.5 μL , 1.2×10^{-4} mol) were dissolved in 1 mL of CD_3OD and the mixture was added to HA. A precipitate was observed and discarded. The supernatant was kept and stirred at room temperature (ca. 25 °C) for 3 d. The product was purified by filtration over an ultra-centrifugal filter with a 3000 MW cut-off membrane (Amicon®Ultra-15 3000 MW, 5000 g, 10 min) and washed three times with a 50:50 v:v mixture of methanol and water. The filtrate was discarded and the resulting solution was freeze-dried to obtain a white solid.

IR: 3288 (OH), 2934, 2861 (CH), 2026 (CO A_1), 1965, 1896 (CO E), 1620 (C=O).

Synthesis of compound 65 (400-1000 kDa, 20 %)

400-800 kDa HA (54.3 mg, 1.43×10^{-4} mol of repetition unit composed of one D-glucuronic acid and one D-*N*-acetylglucosamine moiety) was dissolved in 2 mL of D_2O .

$[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{Pyta}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2 \cdot \text{HCl})]$ (**59**) (19.5 mg, 3.94×10^{-5} mol), isobutyraldehyde (3.6 μL , 3.94×10^{-5} mol) and cyclohexyl isocyanide (4.9 μL , 3.94×10^{-5} mol) were dissolved in 2 mL of CD_3OD and the mixture was added to HA. The mixture was sonicated and heated (40 °C) for 1 h to dissolve **65**. The reaction mixture was stirred at room temperature (ca. 25 °C) for 3 d. The product was purified by filtration over an ultra-centrifugal

filter with a 3000 MW cut-off membrane (Amicon®Ultra-15 3000 MW, 5000 g, 10 min) and washed three times with a 50:50 v:v mixture of methanol and water. The filtrate was discarded and the resulting solution was freeze-dried to obtain a white solid.

IR: 3331 (OH), 2933 (CH), 2026, 2040 (CO A₁), 1694, 1919, 1898 (CO E), 1606 (C=O).

Synthesis of compound 66 (400-1000 kDa, 5 %)

400-800 kDa HA (50.0 mg, 1.32×10^{-4} mol of repetition unit composed of one D-glucuronic acid and one D-*N*-acetylglucosamine moiety) was dissolved in 2 mL of D₂O. [Re(CO)₃Cl(Pyta-(CH₂)₂-NH₂ · HCl)] (**59**) (6.5 mg, 1.3×10^{-5} mol) was dissolved in 1 mL of CD₃OD. Isobutyraldehyde (12.0 μL, 1.3×10^{-4} mol) and cyclohexyl isocyanide (16.4 μL, 1.3×10^{-4} mol) were dissolved in 1 mL of deuterated methanol. 500 μL of the amine solution (6.55×10^{-6} mol), and 50 μL of the aldehyde and isocyanide solution were diluted in 2 mL of CD₃OD and the resulting mixture was added to hyaluronic acid. The reaction mixture was stirred at room temperature (ca. 25 °C) for 3 d. The product was purified by filtration over an ultra-centrifugal filter with a 3000 MW cut-off membrane (Amicon®Ultra-15 3000 MW, 5000 g, 10 min) and washed three times with a 50:50 v:v mixture of methanol and water. The filtrate was discarded and the resulting solution was concentrated by rotary evaporation to get a viscous solution.

IR: 3339 (OH), 2928, 2893 (CH), 2042, 2029 (CO A₁), 1967, 1922, 1903 (CO E), 1608 (C=O).

Skin preparation (performed by Cécile Laugel)

Human skin biopsies were prepared as previously described⁸¹ and mounted on FRANZ cells. 200 μL of a solution of labeled HA (**62-66**) in water at a concentration of 2 mg mL⁻¹ were dropped onto the skin surface. During the experiment, FRANZ cells were not occluded but left open to the air. After 7 or 24 h, skin samples were collected. Each skin surface was washed with a cotton swab on which 200 μL of liquid receptor (distilled water containing 0.85 % NaCl and 0.01 % of bovine serum albumin) were dropped. The skin was then frozen at -20 °C. Biopsies were cryotomed at -20 °C with a thickness of 10 μm and mounted on CaF₂ windows a couple of days before SR-FTIR-SM and FTIR-SM measurements.

Chapter 4

L'AFM-IR et ses applications

Marquage de ferrocifènes par une unité $\text{Re}(\text{CO})_3$ et étude par spectroscopie infrarouge

MDA-MB-231 cells were grown on CaF_2 thin slides (from Crystran, diameter 10 mm; thickness 0.1 mm), then incubated at 37 °C for 1 h in the presence of 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ solution of 6 (final volume of DMSO = 0.1 %) under an atmosphere of 95 % air/5 % CO_2 . At the end of the incubation, the medium was removed and the cells were washed twice with phosphate buffer (D-PBS, 2 \times 2 mL). The cells were fixed with 4 % *para*-formaldehyde (1.5 mL) for 8 min at room temperature and washed once with D-PBS (1 \times 2 mL) and once with milliQ water. Slides were air-dried and laid on the upper surface of a CaF_2 prism (angle 50°) with paraffin oil in between to make a good optical contact and avoid evanescent waves in the air gap. All measurements have been done by the nanoIR1™ (Anasys Instruments), a microscope based on the AFM-IR technique.

The spatial resolution of the AFM-IR microscope is around 10-100 nm and the spectral resolution as determined by the natural line-width of the pulsed IR laser source is about 6 cm^{-1} . Technical characteristics of the AFM-IR system are the following: the IR laser is an optical parametric oscillator (OPO) which produces 10 ns pulses tunable between 4000 and 1000 cm^{-1} with a repetition rate of 1 kHz. Between 1800 and 1500 cm^{-1} , the laser spot size was around 50 μm , and the power was fixed at 3 μJ per pulse. Local spectra were collected using a 2 cm^{-1} step size, and an average of 256 pulses were co-added for each data point. Topographic images were acquired in contact mode with cantilevers of 0.03 N m^{-1} ($\mu\text{masch HQ}$: CSC/AlBS).

Fonctionnalisation de billes de polystyrène par une sonde de type $\text{Re}(\text{CO})_3$ et étude par AFM-IR en mode *tapping*

The AFM-IR data reported in this part were obtained using a NanoIR2s™ (Anasys Instruments) coupled with a multichip QCL source (MIRcat, Daylight Solutions; tunable repetition rate range of 0-500 kHz; spectral resolution of 0.1 cm^{-1}) covering the range from 1325 cm^{-1} to 1960 cm^{-1} of the mid-IR region with a tunable repetition rate (around 400 kHz). A Au-coated silicon probe (tapping AFM-IR cantilever, Anasys Instruments - spring constant 1-3 nN m^{-1}) was employed to avoid effects linked to IR absorption of the silicon cantilever. Topography and IR maps were generated using the MountainsMap 7.3 software.

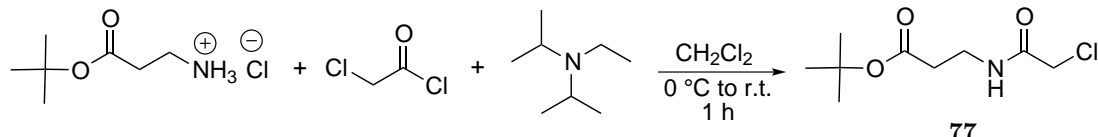
Chapter 5

Fonctionnalisation de sondes $\text{Re}(\text{CO})_3$ pour le marquage d'organites

5.1 Marquage des mitochondries

5.1.1 Par un cation triphénylphosphonium

Synthesis of β -alanine(*N*-2-chloroacetyl)*tert*-butyl ester (**77**)



β -alanine tertbutyl ester hydrochloride (1.50 g, 8.26 mmol, 1.2 eq.) was suspended in dichloromethane (15 mL) under argon. Dry DIPEA (2.9 mL, 17.2 mmol, 2.5 eq.) was added and the suspension was cooled down in an ice bath. Chloroacetyl chloride (0.6 mL, 6.9 mmol, 1 eq.) was added dropwise and the reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature (ca. 25 °C). The reaction completion was monitored by TLC (silica, cyclohexane/ethyl acetate 70:30 v:v, revealed by KMnO_4 , $R_f(\mathbf{77}) = 0.28$).

The organic layer was then diluted with dichloromethane (15 mL), washed once with HCl aqueous solution (0.1 mol L^{-1} , 30 mL), once with a 10 % NaHCO_3 aqueous solution (30 mL) and once with brine (30 mL). The organic layer was then dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated to yield compound **77** as a pale-yellow oil.

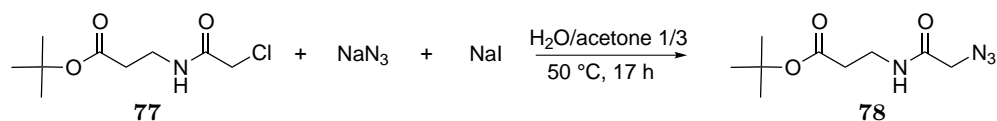
Yield: 1.61 g (quantitative)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.16 (broad s, 1H, NH), 3.92 (s, 2H, Cl- CH_2), 3.41 (q, 2H, $^3J = 6.1$ Hz, CONH- CH_2), 2.36 (t, 2H, $^3J = 6.1$ Hz, CH_2 -COOtBu), 1.34 (s, 9H, - $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 172.1 (COOtBu), 165.8 (CONH), 81.1 (- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 42.5 (Cl- CH_2), 35.3 (NH- CH_2), 34.8 (NH- CH_2 - CH_2), 27.9 (- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

HR-MS (ESI+): m/z calculated for $[\text{C}_9\text{H}_{16}\text{ClNO}_3 + \text{Na}]^+$: 244.0711, found: 244.0722, error: 4.5 ppm.

Synthesis of *tert*-butyl 3-(2-azidoacetamido)propanoate (**78**)



Compound **77** (1.02 g, 4.58 mmol, 1 eq.) was dissolved in a 3:1 v:v mixture of acetone (15 mL) and water (5 mL). NaN_3 (587.1 mg, 9.03 mmol, 2 eq.) and NaI (69.1 mg, 461 μmol , 0.1 eq.) were added and the reaction mixture was stirred for 17 h at 50 °C. The reaction completion was monitored by TLC (silica, cyclohexane/ethyl acetate 70:30 v:v, revealed by KMnO_4 , $R_f(\mathbf{78}) = 0.22$). After 17 h, 0.1 eq. of NaI were added and the reaction was over after one additional hour.

Acetone was removed by rotary evaporation under reduced pressure, and the mixture was diluted with dichloromethane (15 mL) and water (5 mL). The mixture was decanted, the aqueous layer was extracted with dichloromethane (3×10 mL) and the combined organic layers were dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated to afford compound **78** as a pale-yellow oil.

Yield: 0.93 g (89%)

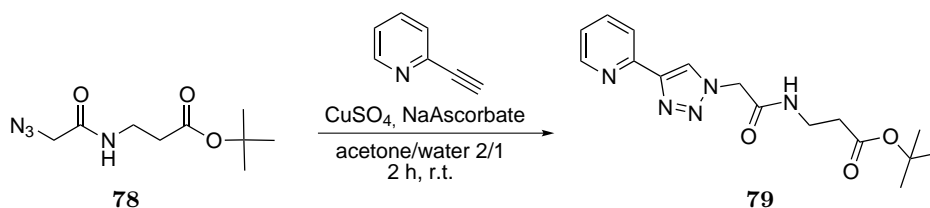
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.00 (broad s, 1H, NH), 3.79 (s, 2H, $\text{N}_3\text{-CH}_2$), 3.35 (q, 2H, $^3J = 6.2$ Hz, NH- CH_2), 2.32 (t, 2H, $^3J = 6.2$ Hz, NH- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 1.30 (s, 9H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 171.1 (COOtBu), 166.6 (CONH), 80.9 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 52.2 ($\text{N}_3\text{-CH}_2$), 34.7 (NH- CH_2), 34.8 (NH- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 27.7 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

IR: 3304 (br, NH), 2980 (w, CH), 2102 (S, N_3), 1723, 1659 (S, C=O).

HR-MS (ESI+): m/z calculated for $[\text{C}_9\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_3 + \text{Na}]^+$: 251.1115, found: 251.1118, error: 1.2 ppm.

Synthesis of Pyta- $\text{CH}_2\text{-CONH-(CH}_2)_2\text{-COOtBu}$ (**79**)



Compound **78** (485 mg, 2.12 mmol, 1 eq.) was dissolved in a 2:1 v:v mixture of acetone (20 mL) and water (10 mL). 2-ethynylpyridine (264 mg, 2.56 mmol, 1.2 eq.), copper sulfate (87.7 mg, 549 μmol , 0.26 eq.) and sodium ascorbate (434 mg, 2.19 mmol, 1 eq.) were then added and the suspension was sonicated for a few minutes, during which a light brownish precipitate formed. The reaction mixture was then stirred for 2 h at room temperature (ca. 25 °C) and the reaction completion was monitored by TLC (silica, ethyl acetate, $R_f(\mathbf{79}) = 0.23$).

Acetone was removed by rotary evaporation under reduced pressure. The mixture was diluted with dichloromethane (30 mL), the resulting solution was then poured into a 28% ammonia solution (30 mL) and extracted with dichloromethane (3×10 mL). The organic layers were combined, dried over sodium sulfate, filtered and concentrated. The resulting

brown solid was purified by silica gel column chromatography (ethyl acetate/cyclohexane 60:40 to 100:0 v:v) to yield compound **79** as a white solid.

Yield: 598.4 mg (85 %)

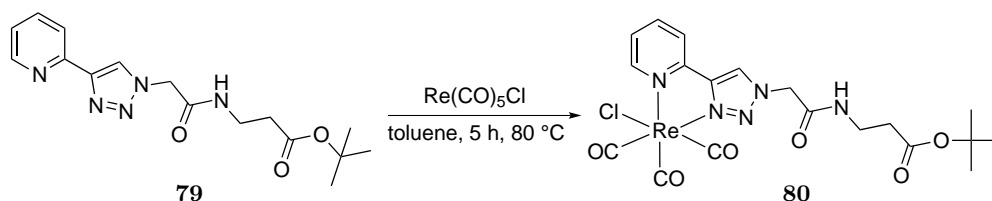
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8.59 (d, 1H, $^3J = 5.0$ Hz, H^a pyta), 8.37 (s, 1H, H^g pyta), 8.19 (d, 1H, $^3J = 7.9$ Hz, H^d pyta), 7.82 (td, 1H, $^3J = 7.9$ Hz, $^4J = 1.8$ Hz, H^c pyta), 7.33-7.27 (m, 1H, H^b pyta), 6.60 (broad s, 1H, NH), 5.11 (s, 2H, Pyta- CH_2), 3.50 (q, 2H, $^3J = 6.2$ Hz, CONH- CH_2), 2.43 (t, 2H, $^3J = 6.2$ Hz, CH_2 -COOtBu), 1.38 (s, 9H, -C(CH_3) $_3$).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 171.5 (COOtBu), 164.9 (CONH), 149.4 (C^e pyta), 148.9 (C^a pyta), 148.3 (C^f pyta), 137.8 (C^c pyta), 124.1 (C^g pyta), 123.4 (C^b pyta), 120.7 (C^d pyta), 81.6 (-C(CH_3) $_3$), 53.3 (Pyta- CH_2), 35.5 (NH- CH_2), 34.9 (NH- CH_2 - CH_2), 28.1 (-C(CH_3) $_3$).

IR: 3357 (S, CH aromatic), 2985 (w, CH aliphatic), 1712, 1681 (S, C=O).

HR-MS (ESI+): m/z calculated for $[\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_3 + \text{Na}]^+$: 354.1537, found: 354.1529, error: -2.1 ppm.

Synthesis of $\text{Re}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{Pyta}(\text{CH}_2)\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{COOtBu})$ (**80**)



Compound **79** (399.8 mg, 1.21 mmol, 1 eq.) was dissolved in hot toluene (60 °C, 20 mL), then $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}$ (484.1 mg, 1.34 mmol, 1.1 eq.) was added and the reaction mixture was refluxed for 5 h. The reaction completion was monitored by TLC (silica, ethyl acetate, $R_f(\mathbf{80}) = 0.34$). A yellow solid precipitated, was filtered and washed with cold toluene (0 °C, 10 mL).

Yield: 0.88 g (99 %)

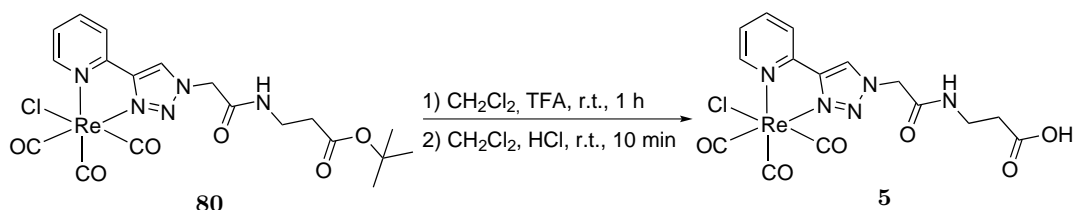
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 9.02 (ddd, 1H, $^3J = 5.6$ Hz, $^4J = 1.5$ Hz, $^5J = 0.8$ Hz, H^a pyta), 8.54 (s, 1H, H^g pyta), 8.06 (td, 1H, $^3J = 7.8$ Hz, $^4J = 1.5$ Hz, H^c pyta), 7.91 (dt, $^3J = 7.8$ Hz, $^4J = 1.2$ Hz, 1H, H^d pyta), 7.47 (ddd, 1H, $^3J = 7.8$, 5.6 Hz, $^4J = 1.2$ Hz, H^b pyta), 7.19 (t, 1H, $^3J = 5.8$ Hz, NH), 5.22-4.89 (m, 2H, Pyta- CH_2), 3.52 (qd, 2H, $^3J = 6.6$, 2.2 Hz, NH- CH_2), 2.48 (t, 2H, $^3J = 6.6$ Hz, CH_2 -COOtBu), 1.46 (s, 9H, -C(CH_3) $_3$).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 172.6 (COOtBu), 166.5 (CONH), 154.3 (C^f pyta), 150.8 (C^e pyta), 150.2 (C^a pyta), 141.4 (C^c pyta), 127.9 (C^g pyta), 127.3 (C^b pyta), 123.6 (C^d pyta), 82.1 (-C(CH_3) $_3$), 54.3 (Pyta- CH_2), 36.9 (NH- CH_2), 35.9 (NH- CH_2 - CH_2), 28.4 (-C(CH_3) $_3$).

IR: 3288 (br, NH), 2980 (w, CH), 2021 (s, CO A_1), 1883 (s, CO E), 1681 (s, C=O), 1153 (S, C-O).

HR-MS (ESI+): m/z calculated for $[\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{ClN}_5\text{NaO}_6\text{Re} + \text{Na}]^+$: 635.9657, found: 635.9355, error: 3.0 ppm.

Synthesis of Re(CO)₃Cl(Pyta-CH₂-CONH-(CH₂)₂-COOH) (**5**)



Compound **80** (880 mg, 1.38 mmol, 1 eq.) was dissolved in dichloromethane (4 mL) and trifluoroacetic acid (4 mL, 52 mmol, 35 eq.) was added slowly. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. The reaction completion was monitored by TLC (CH₂Cl₂/EtOH 75:25 v: + 1% v:v CH₃COOH, Rf(**5**) = 0.61). Subsequently, solvent was removed by rotary evaporation and concentrated hydrochloric acid (37%, 4 mL) was added to the solution. The reaction mixture was stirred for 10 min at room temperature, HCl was evaporated and the resulting whitish solid was dried under vacuum.

Yield: 650.0 mg (86 %)

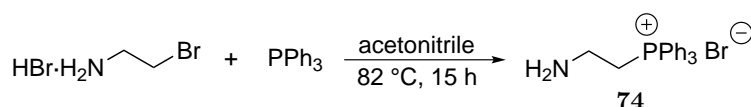
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃/CD₃OD): δ (ppm) 8.97 (dt, 1H, ³J = 5.5 Hz, ⁴J = 1.2 Hz, H^a pyta), 8.93 (s, 1H, H^g pyta), 8.18-8.08 (m, 2H, H^c & H^d pyta), 7.54 (td, 1H; ³J = 5.5 Hz, ⁴J = 4.0 Hz, H^b pyta), 5.45-5.25 (m, 2H, Pyta-CH₂), 3.52 (t, 2H, ³J = 6.6 Hz, NH-CH₂), 2.57 (t, 2H, ³J = 6.6 Hz, CH₂-COOH).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃/CD₃OD): δ (ppm) 173.6 (COOH), 164.4 (CONH), 152.7 (C^f pyta), 149.1 (C^e pyta), 148.6 (C^a pyta), 139.6 (C^c pyta), 128.5 (C^g pyta), 127.7 (C^b pyta), 125.6 (C^d pyta), 122.0, 52.8 (Pyta-CH₂), 35.4 (NH-CH₂), 33.0 (NH-CH₂-CH₂).

IR: 3353, (br, OH), 3129 (w, CH), 2015 (s, CO A₁), 1897.6 (s, CO E), 1719 (s, C=O).

HR-MS (ESI+): m/z calculated for [C₁₅H₁₃ClN₅NaO₆Re + Na]⁺: 603.9995, found: 603.9991, error: -0.7 ppm.

Synthesis of (2-aminoethyl)triphenylphosphonium bromide (**74**)³⁰⁰



(2-Bromoethyl) amine hydrobromide (7.81 g, 38.1 mmol, 1.2 eq.) was dissolved in acetonitrile (50 mL). Then, triphenylphosphine (10.0 g, 38.1 mmol, 1 eq.) was added and the solution was refluxed overnight (82 °C). The reaction completion was monitored by TLC (CH₂Cl₂/EtOH 70:30 v:v, revealed by KMnO₄, Rf(**74**) = 0.39). The precipitate was then filtered, dissolved in water and treated with a saturated aqueous solution of K₂CO₃ until pH > 11. The product was then extracted with dichloromethane (3 × 10 mL). The organic layers were collected, dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated under vacuum to afford **74** as a white solid.

Yield: 4.47 g (30 %)

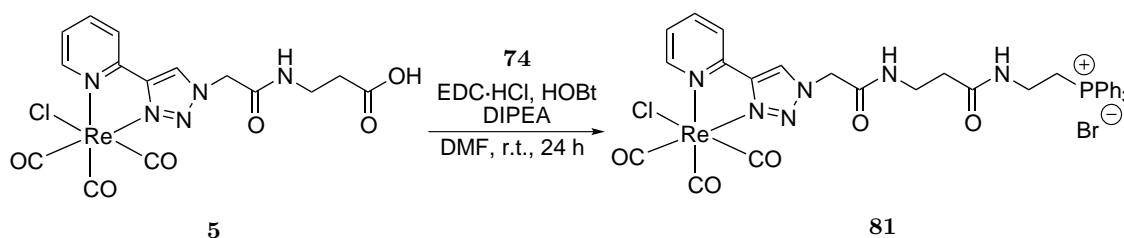
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.75 (m, 15 H, PPh₃), 4.06 (m, 2H, ³J = 1.1 Hz, H₂N-CH₂), 3.15 (m, 2H, ³J = 1.1 Hz, CH₂-PPh₃).

IR: 3316 (w, NH), 2903 (w, CH), 1743 (C=C).

HR-MS (ESI+): m/z calculated for $[C_{20}H_{21}NP]^+$: 306.139502, found: 306.140613, error: -3.6 ppm.

NMR Data in agreement with literature.³⁰⁰

Synthesis of $[Re(CO)_3Cl(PytaCH_2(CONHCH_2)_2PPh_3Br)]$ (81)



5 (100.7 mg, 173.3 μ mol, 1 eq.), EDC·HCl (50.1 mg, 261.2 μ mol, 1.5 eq.) and HOBT (34.9 mg, 258 μ mol, 1.5 eq.) were dissolved in DMF (2.8 mL). After 5 min of stirring, $Br^- + H_3N-CH_2-PPh_3^+ Br^-$ (90.3 mg, 193 μ mol, 1.0 eq.) and DIPEA (100 μ L, 574 μ mol, 3.3 eq.) were added and the reaction mixture was stirred at room temperature (ca. 25 °C) for 48 h. The reaction completion and monitored by TLC (aluminium oxide, $CH_2Cl_2/EtOH$ 80:20 v:v).

The solvent was removed by rotary evaporation, the resulting sticky solid was dissolved in dichloromethane (15 mL) and a saturated solution of $NaHCO_3$ (15 mL) was added. The aqueous layer was extracted with dichloromethane (10 mL) and the organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate. A sticky solid insoluble in water and DCM appeared in the separatory funnel and was dissolved with acetone. The organic layers were combined. The solvent was removed by rotary evaporation to afford a yellow sticky solid, that was purified by column chromatography: aluminium oxide, CH_2Cl_2 (100 mL), $CH_2Cl_2/EtOH$ 98:2 v:v (100 mL), 96:4 v:v (200 mL), 95:5 v:v (100 mL) 90:10 v:v (200 mL), 80:20 v:v (100 mL).

Yield: 74.7 mg (70 %)

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 9.23 (s, 1H, H^g pyta), 8.99 (t, 1H, $^3J = 5.4$ Hz, NH), 8.88 (dd, 1H, $^3J = 5.6$ Hz, $^4J = 1.3$ Hz, H^a pyta), 8.56 (t, 1H, $^3J = 5.1$ Hz, NH), 8.03 (d, 1H, $^3J = 7.6$ Hz, H^d pyta), 7.94 (td, 1H, $^3J = 7.6$ Hz, $^4J = 1.3$ Hz, H^c pyta), 7.82-7.73 (m, 9H, PPh_3), 7.67 (m, 6H, PPh_3), 7.34 (dd, $^3J = 7.6$, 5.6 Hz, 1H, H^b pyta), 5.45 (s, 2H, Pyta- CH_2), 3.80 (m, 2H, CONH- CH_2), 3.59-3.40 (m, 4H, $2 \times CH_2$), 2.32 (t, 2H, $^3J = 5.7$ Hz, CH_2).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 172.5 (CONH), 164.7 (CONH), 152.8 (C^a pyta), 149.6 (C^f pyta), 148.7 (C^e pyta), 139.9 (C^c pyta), 135.5 ($PPh_3 C_{para}$), 135.4 (C^b pyta), 133.8, 133.7 ($PPh_3 C_{ortho}$), 130.8, 130.6 ($PPh_3 C_{meta}$), 125.7 (C^d pyta), 122.9 (C^g pyta), 118.6, 117.4 (Ph_3P-C), 60.3 (Pyta- CH_2), 36.8 (NH- CH_2), 36.3 (NH- CH_2), 27.6 (NH- CH_2-CH_2).

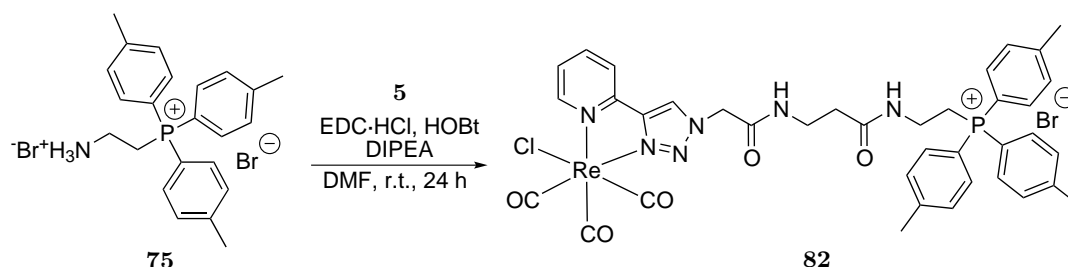
^{31}P NMR (121 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 21.06.

IR: 3207 (br, NH), 3059 (w, CH aromatic), 2927 (w, CH aliphatic), 2020 (S, CO A_1), 1911 (S, CO E), 1885 (S, CO E), 1684 (C=O amide).

HR-MS (ESI+): m/z calculated for $[C_{35}H_{32}ClN_6O_5PRe]^+$: 869.1413 found: 869.1390, error: -2.6 ppm.

HPLC (5 to 100 % of acetonitrile in 10 min): $t_r = 7.3$ min.

Synthesis of [Re(CO)₃Cl(PytaCH₂(CONHCH₂)₂PPh₃*Br)] (82)



5 (100.1 mg, 172 μmol , 1.1 eq), EDC·HCl (45.0 mg, 235 μmol , 1.5 eq.) and HOBT (33.7 mg, 249 μmol , 1.6 eq.) were dissolved in DMF (2 mL). After 5 min of stirring, **75** (79.1 mg, 155 μmol , 1.0 eq.) and DIPEA (97.4 μL , 559 μmol , 3.6 eq.) were added and the reaction mixture was stirred at room temperature (25 °C) for 24 h. The reaction completion was monitored by TLC (aluminium oxide, CH₂Cl₂/EtOH 80:20 v:v).

The solvent was removed by rotary evaporation, the resulting solid was dissolved in dichloromethane (15 mL) and a saturated solution of NaHCO₃ (15 mL) was added. The aqueous layer was extracted with dichloromethane (10 mL) and the organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate. The solvent was removed by rotary evaporation to afford a yellow solid, that was purified by column chromatography: aluminium oxide, CH₂Cl₂/EtOH 100:0 to 80:20 v:v.

Yield: 30 mg (20 %)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 9.20 (s, 1H, *H^g* pyta), 8.94-8.87 (m, 2H, *H^a* pyta & NH), 8.53 (t, 1H, ³*J* = 5.6 Hz, NH), 8.03 (m, 1H, *H^d* pyta), 7.94 (td, 1H, ³*J* = 7.6 Hz, ⁴*J* = 1.5 Hz, *H^c* pyta), 7.64-7.55 (m, 6H, PPh₃), 7.45 (dd, 6H, ³*J* = 8.2 Hz, ⁴*J* = 3.3 Hz, 6H, PPh₃), 7.34 (ddd, 1H, ³*J* = 7.6, 5.5 Hz, ⁴*J* = 1.5 Hz, *H^b* pyta), 5.43 (s, 2H, Pyta-CH₂), 3.69-3.56 (m, 2H, CONH-CH₂), 3.50 (m, 2 \times CH₂), 2.45 (s, 9H, 3 \times CH₃), 2.36 (t, 2H, ³*J* = 5.9 Hz, 2H, CH₂).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 172.4 (CONH), 164.6 (CONH), 149.6 (*C^f* pyta), 148.7 (*C^e* pyta), 146.7, 146.6 (PPh₃ *C_{para}*), 139.5 (*C^a* pyta), 133.6, 133.5 (PPh₃ *C_{ortho}*), 133.5 (*C^c* pyta), 131.4, 131.2 (PPh₃ *C_{meta}*), 125.7 (*C^b* pyta), 123.2 (*C^d* pyta), 122.7 (*C^g* pyta), 115.3, 114.2 (Ph₃), 54.0 (Pyta-CH₂), 33.7 (NH-CH₂-CH₂).

³¹P NMR (121 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 19.94.

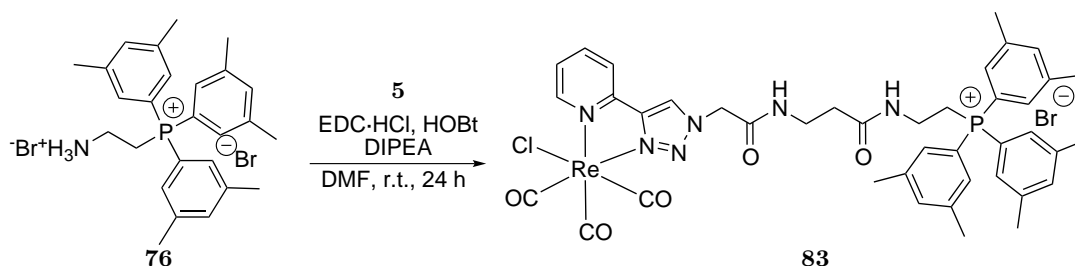
IR: 3225 (br, NH), 3048 (w, CH aromatic), 2924 (w, CH aliphatic), 2020 (S, CO A₁), 1910 (S, CO E), 1882 (S, CO E), 1665 (C=O amide).

HR-MS (ESI+): *m/z* calculated for [C₃₈H₃₈ClN₆O₅Pre]⁺: 911.1875 found: 911.1858, error: 1.9 ppm.

HPLC (5 to 100 % of acetonitrile in 10 min): *t_r* = 8.1 min.

Synthesis of [Re(CO)₃Cl(PytaCH₂(CONHCH₂)₂PPh₃**Br)] (83)

5 (99.8 mg, 172 μmol , 1.1 eq), EDC·HCl (46.1 mg, 240 μmol , 1.5 eq.) and HOBT (31.9 mg, 236 μmol , 1.5 eq.) were dissolved in DMF (2 mL). After 5 min of stirring, **76** (85.8 mg, 156 μmol , 1.1 eq.) and DIPEA (90 μL , 517 μmol , 3.3 eq.) were added and the reaction mixture was stirred at room temperature (25 °C) for 24 h. The reaction comple-



tion was monitored by TLC (aluminium oxide, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 80:20 v:v).

The solvent was removed by rotary evaporation, the resulting sticky solid was dissolved in dichloromethane (15 mL) and a saturated solution of NaHCO_3 (15 mL) was added. The aqueous layer was extracted with dichloromethane (10 mL) and the organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate. The solvent was removed by rotary evaporation to afford a yellow sticky solid, that was purified by column chromatography: aluminium oxide, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 100:0 to 80:20 v:v.

Yield: 62.9 mg (39 %)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 9.18 (s, 1H, H^g pyta), 9.14 (m, 1H, NH), 8.90 (dt, 1H, $^3J = 5.5$ Hz, $^4J = 1.2$ Hz, H^a pyta), 8.56 (m, 1H, NH), 7.96-7.91 (m, 2H, H^d & H^c pyta), 7.37 (s, 3H, PPh_3), 7.34 (m, 1H, H^b pyta), 7.32 (s, 3H, PPh_3), 7.27 (s, 3H, PPh_3), 5.51-5.37 (m, 2H, CONH-CH_2), 5.29 (s, 2H, Pyta- CH_2), 3.60-3.45 (m, 6H, $3 \times \text{CH}_2$), 2.40 (s, 18H, $6 \times \text{CH}_3$ PPh_3).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 172.3 (CONH), 164.5 (CONH), 152.9 (C^a pyta), 149.6 (C^f pyta), 148.7 (C^e pyta), 140.9, 140.7 (PPh_3 C_{meta}), 139.7 (C^c pyta), 137.11, 137.07 (PPh_3 C_{para}), 130.9, 130.8 (PPh_3 C_{ortho}), 125.7 (C^d pyta), 122.6 (C^g pyta), 118.5, 117.4 (Ph_3), 50.0 (Pyta- CH_2), 37.0 (NH- CH_2), 36.4 (NH- CH_2), 33.8 (NH- CH_2 - CH_2), 21.6 (CH_3).

^{31}P NMR (121 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 19.82.

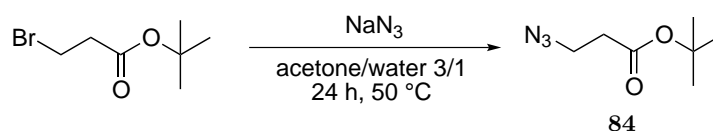
IR: 3224 (br, NH), 3037 (w, CH aromatic), 2922 (w, CH aliphatic), 2020 (S, CO A_1), 1910 (S, CO E), 1883 (S, CO E), 1670 (C=O amide).

HR-MS (ESI+): m/z calculated for $[\text{C}_{41}\text{H}_{44}\text{ClN}_6\text{O}_5\text{PRe}]^+$: 953.2344 found: 953.2312, error: -3.4 ppm.

HPLC (5 to 100 % of acetonitrile in 10 min): $t_r = 8.9$ min.

5.1.2 Par un peptide mitochondrial

Synthesis of 3-azidoacetic acid *tert*-butyl ester (84)



tert-butyl-3-bromopropionate (2.51 g, 12.0 mmol, 1 eq.) was diluted in a 3:1 v:v mixture of acetone and water (20 mL). Sodium azide (1.57 g, 24.1 mmol, 2 eq.) was added, the reaction mixture was stirred overnight at 50 °C and the completion was monitored by TLC (silica, cyclohexane/ethyl acetate 80:20 v:v, revealed by KMnO_4 , $R_f(\mathbf{84}) = 0.46$).

The solution was cooled down to room temperature and acetone was removed by rotary evaporation. The solution was then diluted with water (15 mL) and extracted three times with dichloromethane (3×10 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous sodium sulfate and solvent was removed by rotary evaporation to afford **84** as a yellow oil.

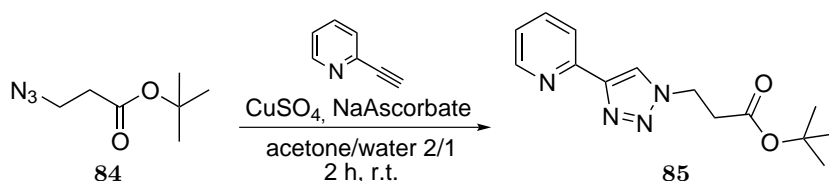
Yield: 1.65 g (80 %)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 3.50 (t, 2H, ³J = 6.5 Hz, CO-CH₂), 2.47 (t, 2H, ³J = 6.5 Hz, N₃-CH₂), 1.45 (s, 9H, -C(CH₃)₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 170. (C=O), 81.42 (-C(CH₃)₃), 47.1 (N₃-CH₂), 35.3 (CO-CH₂), 28.2, 28.1, 27.9 (-C(CH₃)₃).

IR: 2980, 2936 (w, CH), 2099 (S, N₃), 1727 (S, C=O), 1457.

Synthesis of *tert*-butyl-3-(4-(pyrilin-2-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl) propionate (**85**)



tert-butyl 3-azidoacetate (525 mg, 3.07 mmol, 1 eq.) was diluted in a 3:1 v:v mixture of acetone and water (30 mL). Then copper sulfate (118.6 mg, 0.74 mmol, 0.24 eq.), sodium ascorbate (154.4 mg, 0.78 mmol, 0.25 eq.) and ethynylpyridine (310 μL, 3.07 mmol, 1 eq.) were added. The reaction mixture was sonicated and stirred at room temperature until it became green (1 h). More sodium ascorbate (154.4 mg, 0.25 eq.) was added and the mixture was stirred for an additional hour at room temperature (ca. 25 °C). The reaction completion was monitored by TLC (silica, ethyl acetate, revealed with potassium permanganate, Rf(**85**) = 0.53). Acetone was evaporated, dichloromethane was added to the reaction mixture (10 mL) and copper was removed by washing with a solution of ammonia (28 %, 20 mL). The aqueous layer was extracted three times with dichloromethane. Combined organic layers were dried over anhydrous sodium sulfate and filtered. Dichloromethane was removed by rotary evaporation. The resulting brown oil was purified by column chromatography (silica, ethylacetate/cyclohexane 60:40 v:v) to give the desired compound (**85**) after evaporation to dryness.

Yield: 538.8 mg (64 %)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.57 (ddd, 1H, ³J = 4.9 Hz, ⁴J = 1.8 Hz, ⁵J = 1.1 Hz, H^a pyta), 8.20 (s, 1H, H^g pyta), 8.15 (dt, 1H, ³J = 8.0, ⁴J = 1.1 Hz, H^d pyta), 7.77 (td, 1H, ³J = 7.7 Hz, ⁴J = 1.8 Hz, H^c pyta), 7.22 (ddd, 1H, ³J = 7.7, 4.9 Hz, ⁴J = 1.1 Hz, H^b pyta), 4.68 (t, 2H, ³J = 6.7 Hz, N-CH₂-CH₂), 2.92 (t, 2H, ³J = 6.7 Hz, N-CH₂-CH₂), 1.43 (s, 9H, -C(CH₃)₃).

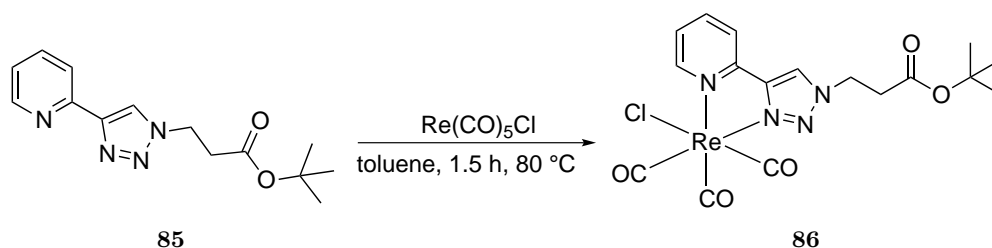
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 169.6 (C=O), 150.4 (C^f pyta), 149.6 (C^e pyta), 148.5 (C^a pyta), 137.0 (C^c pyta), 136.5 (C^g pyta), 122.9 (C^b pyta), 120.3 (C^d pyta), 82.0

(-C(CH₃)₃), 46.1 (N-CH₂-CH₂), 36.0 (N-CH₂-CH₂), 28.2 (-C(CH₃)₃).

IR: 3137 (w, CH Pyta), 2982 (w, CH), 1717 (S, C=O), 1604, 1572.

HR-MS (ESI+): m/z calculated for [C₁₄H₁₉N₄O₂]⁺: 275.1503, found: 275.1491, error: 4.3 ppm.

Synthesis of [Re(CO)₃(Cl)Pyta(CH₂)₂COO^tBu] (**86**)



85 (160.5 mg, 585 μmol, 1 eq.) was dissolved in hot toluene (80 °C, 20 mL). Then Re(CO)₅Cl (232.8 mg, 644 μmol, 1.1 eq.) was added and the reaction mixture was stirred at 80 °C for 1h30 and a yellow precipitate appeared. The reaction completion was monitored by TLC (silica, ethyl acetate, Rf(**86**) = 0.25). The mixture was cooled down with an ice/water bath, then filtered and washed with cold toluene (10 mL) to afford **86** as a pale yellow powder.

Yield: 235.4 mg (70 %)

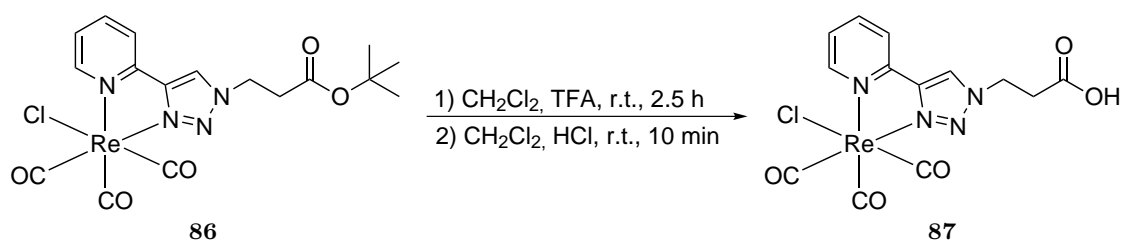
¹H NMR (300 MHz, Acetone-d₆): δ (ppm) 9.03 (dt, 1H, ³J = 5.5 Hz, ⁴J = 1.4 Hz, H^a pyta), 8.36 (s, 1H, H^g pyta), 7.99 (td, 1H, ³J = 7.8 Hz, ⁴J = 1.4 Hz, H^d pyta), 7.80 (m, 1H, H^c pyta), 7.43 (ddd, 1H, ³J = 7.5, 5.5 Hz, ⁴J = 1.4 Hz, H^b pyta), 4.74 (t, 2H, ³J = 5.6 Hz, N-CH₂-CH₂), 2.99 (dt, 2H, ³J = 5.6, 4.6 Hz, N-CH₂-CH₂), 1.46 (s, 9H, -C(CH₃)₃).

¹³C NMR (75 MHz, Acetone-d₆): δ (ppm) 206.5, 206.3, 206.0 (C≡O), 170.1 (C=O), 154.1 (C^f pyta), 150.4 (C^e pyta), 149.5 (C^a pyta), 141.2 (C^c pyta), 127.1 (C^g pyta), 126.5 (C^b pyta), 123.4 (C^d pyta), 82.1 (-C(CH₃)₃), 49.0 (N-CH₂-CH₂), 35.8 (N-CH₂-CH₂), 28.3 (-C(CH₃)₃).

IR: 3086 (w, CH Pyta), 2985 (w, CH), 2016 (S, CO A₁), 1923 and 1893 (S, CO E), 1720 (S, C=O), 1617, 1582.

HR-MS (ESI+): m/z calculated for [C₁₇H₁₈ClN₄NaO₅Re + Na]⁺: 603.0407, found: 603.0404, error: -0.5 ppm.

Synthesis of [Re(CO)₃(Cl)Pyta(CH₂)₂COOH] (**87**)



86 (500.4 mg, 863 μ mol, 1 eq.) was dissolved in dichloromethane (6 mL) and TFA (6.0 mL, 78 mmol, 91 eq.) was added slowly to the solution. The mixture was stirred at room temperature (ca. 25 °C) for 2.5 h. The reaction completion was monitored by TLC (silica, ethyl acetate). The solvent was co-evaporated twice with toluene and the obtained yellow powder was suspended in a mixture of dichloromethane (5 mL) and concentrated HCl (37 %, 5 mL). The mixture was stirred for 10 min and became white. The solvent was evaporated by rotary evaporation and the product was dried under vacuum to afford **87** as a pale yellow powder.

Yield: 435.0 mg (96 %)

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 8.95 (m, 1H, *H^a* pyta), 8.75 (s, 1H, *H^g* pyta), 8.11-7.97 (m, 2H, *H^c* pyta and *H^d* pyta), 7.48 (m, 1H, *H^b* pyta), 4.80 (t, 2H, ³*J* = 6.5 Hz, N-CH₂-CH₂-COOH), 3.08 (t, 2H, ³*J* = 6.5 Hz, N-CH₂-CH₂-COOH).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 172.7 (*C=O*), 153.6 (*C^f*), 145.0 (*C^e*), 149.2 (*C^a*), 140.3 (*C^c*), 126.4 (*C^g*), 125.9 (*C^b*), 122.8 (*C^d*), 48.2 (N-CH₂-CH₂), 34.1 (N-CH₂-CH₂).

IR: 3539, 3436 (br, OH), 3097 (w, CH Pyta), 2019 (S, CO A₁), 1926 and 1883 (S, CO E), 1698 (C=O), 1633, 1618, 1582.

HR-MS (ESI+): *m/z* calculated for [C₁₃H₁₀ClN₄O₅Re+Na]⁺: 546.9781, found: 546.9785, error: 0.8 ppm.

Synthesis of [Re(CO)₃Cl(Pyta-(CH₂)₂-CONH-K-F_{*x*}-r-F_{*x*})] (**88**)

Peptides were synthesized by solid phase peptide synthesis using a Fmoc strategy. Side-chain protected peptides were assembled on Rink-Amide resin (loading 0.43 mmol g⁻¹) manually using HOBt/DIC as coupling agents in basic conditions. Coupling was achieved using standard coupling conditions: 4 equivalents of Fmoc-aa-OH and 4 equivalents of coupling agents in DMF were shaken with the resin for 30 min in a reaction vessel (polypropylene syringe with a frit). Fmoc group removal was performed using a 20 % v:v solution of piperidine in DMF for 1 min, then 15 min and followed by 5 washing with DMF.

Cleavage from the resin and protecting groups removal were performed using a 95:2.5:2.5 v:v:v solution of TFA/H₂O/TIS for 3 h (3 mL for 0.1 mmol). Resin was washed twice with neat TFA. After removal of the solvent, cold diethyl ether was added to precipitate the peptide. The precipitate collected was redissolved in water and freeze-dried. For *N*-terminus acetylated peptides, the acetylation was performed with 10 % acetic anhydride in DCM for 1 h at room temperature. The purity of the peptides was measured by analytical HPLC using a C18 column (PROTOTM 200 C18 3 μ m) and peptides were purified by preparative HPLC using a C18 column (NUCLEODUR® C18 HTec 5 μ m).

For the synthesis of **88**, **87** was coupled to the peptide by SPPS using the same conditions as described above.

Yield: 35 %

IR: 3278, 3181, 3082 (br, NH), 2828, 2855 (CH aliphatic), 2030 (S, CO A₁), 1905 (S, CO E), 1655 (S, C=O amide), 1532.

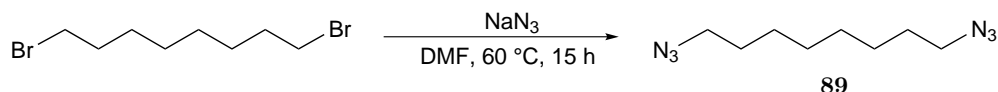
HPLC (5 to 100 % of acetonitrile in 10 min): *t_r* = 6.1 min.

MALDI-TOF-MS (CHCA matrix): 1078.39.

5.2 Marquage du noyau

Synthesis of 1,8-diazidooctane (**89**)³⁰¹

Synthesis performed by François Lambert



1,8-dibromooctane (5.5 g, 20 mmol, 1 eq.) was dissolved in DMF (100 mL) at room temperature. Sodium azide (3.25 g, 50 mmol, 2.5 eq.) was added and the mixture was stirred overnight at 60 °C during which a white precipitate of NaBr formed. Extraction was performed with diethyl ether (100 mL). The organic layer was washed once with water (100 mL) and once with brine (100 mL), dried over anhydrous sodium sulfate and filtered. The solvent was evaporated under vacuum to give **89** as a colorless oil.

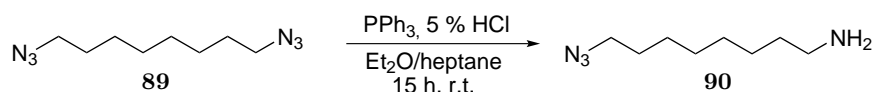
Yield: 3.9 g (quantitative)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 3.21 (m, 4H, 2 \times CH₂-N₃), 1.47 (m, 4H, 2 \times CH₂-CH₂-N₃), 1.27 (m, 8H, CH₂).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 51.4 (2 \times N₃-CH₂), 29.0, 28.8, 26.60 (6 \times CH₂).

Synthesis of 8-azidooctan-1-amine (**90**)³⁰¹

Synthesis performed by François Lambert



89 (3.6 g, 20 mmol, 1 eq.) was dissolved in a 1:1 v:v mixture of diethyl ether (100 mL) and heptane (100 mL) and the mixture was cooled down in an ice bath. An aqueous solution of hydrochloric acid (2 mol L⁻¹, 400 mL) was added to the mixture, which was rapidly stirred to ensure proper emulsification.

Then, a solution of triphenylphosphine (5.24 g, 20 mmol, 1 eq.) in diethyl ether (100 mL) was added slowly over 30 min, keeping the temperature at 0 °C. The mixture was stirred overnight at room temperature (ca. 25 °C). The organic layer was discarded and the aqueous layer was washed three times with diethyl ether to remove the majority of triphenylphosphine oxide. The aqueous layer was brought to pH 11 by adding an aqueous solution of sodium hydroxide (0.36 mol), whereby the solution turned turbid.

The aqueous layer was extracted with diethyl ether (3 \times 50 mL), dried over anhydrous MgSO₄ and the solvent was evaporated under reduced pressure at room temperature.

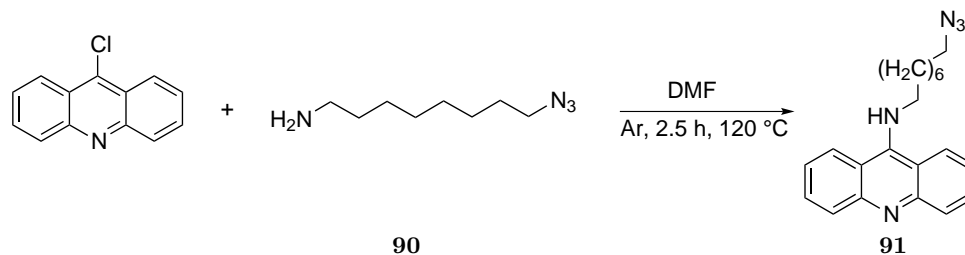
Yield: 3.4 g (quantitative)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 3.24 (t, 2H, ³J = 6.9 Hz, CH₂-N₃), 2.66 (t, 2H, ³J = 6.9 Hz, CH₂-NH₂), 1.72 (broad s, 2H, NH₂), 1.58 (m, 2H, CH₂-CH₂-N₃), 1.36

(m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$), 1.30 (m, 8H, $4 \times \text{CH}_2$).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 51.4 ($\text{CH}_2\text{-N}_3$), 42.0 ($\text{CH}_2\text{-NH}_2$), 33.6 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}_3$), 29.2 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$), 29.0, 28.7, 26.7, 26.6 ($4 \times \text{CH}_2$).

Synthesis of *N*-(8-azidoctyl)acridine-9-amine (**91**)



Under argon, 9-chloroacridine (214.8 mg, 1.01 mmol, 1 eq.) was dissolved in DMF (20 mL) and 8-azidoctan-1-amine **90** (409.1 mg, 2.40 mmol, 2.4 eq.) was added. The mixture was heated to 120 °C, stirred for 2.5 h and the reaction completion was monitored by TLC (aluminium oxide, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 80:20 v:v, $R_f(\mathbf{91}) = 0.39$). Solvent was removed under reduced pressure to afford a brown oil, that was purified by column chromatography (silica, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 100:0 to 90:10 v:v, then $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 80:20 + 1 % NEt_3 v:v). Solvent was removed by rotary evaporation and **91** was obtained as a yellow solid.

Yield: 282.7 mg (81 %)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 9.90 (s, 1H, NH), 8.40 (d, 2H, $^3J = 8.7$ Hz, H^4 & H^5), 8.06 (dd, 2H, $^3J = 8.7$ Hz, $^4J = 1.2$ Hz, H^1 & H^8), 7.49 (ddd, 2H, $^3J = 8.7$, 6.9 Hz, $^4J = 1.2$ Hz, H^3 & H^6), 7.21 (dd, 2H, $^3J = 8.7$, 6.9 Hz, $^4J = 1.2$ Hz, H^2 & H^7), 4.02 (t, 2H, $^3J = 7.5$ Hz, NH- CH_2), 3.17 (t, 2H, $^3J = 6.9$ Hz, $\text{CH}_2\text{-N}_3$), 2.09-1.80 (m, 2H, NH- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 1.46 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}_3$), 1.32-1.18 (m, 8H, CH_2).

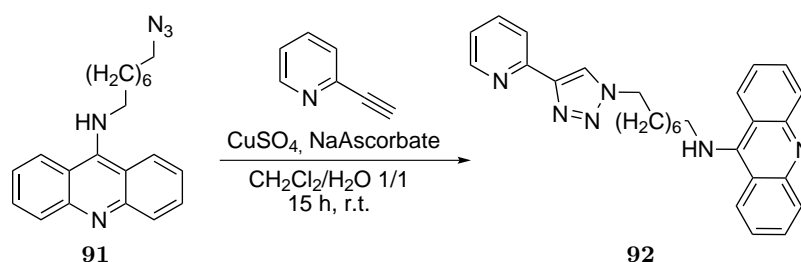
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 156.1 (C^9), 141.5 (C^q), 133.3 (C^4, C^5), 125.1 (C^3, C^6), 123.0 (C^1, C^8), 120.9 (C^2, C^7), 113.1 (N- C^q), 51.4 ($\text{CH}_2\text{-N}_3$), 49.1 (NH- CH_2), 30.3 (NH- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 29.1 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}_3$), 29.0, 28.8, 26.8, 26.6 ($4 \times \text{CH}_2$).

IR: 3189 (CH aromatic), 2929, 2857, 2736 (CH_2), 2088 (S, N_3).

HR-MS (ESI⁺): m/z calculated for $[\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_5]^+$: 348.2183, found: 328.2180, error: 0.8 ppm.

Synthesis of *N*-(8-(4-(pyridin-2-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)octyl) acridine-9-amine (**92**)

91 (198.7 mg, 0.57 mmol, 1 eq.) and 2-ethynylpyridine (87.6 mg, 0.85 mmol, 1.5 eq) were dissolved in 8 mL of a 1:1 v:v mixture of dichloromethane/water. Then anhydrous copper sulfate (14.0 mg, 88 μmol , 0.15 eq.) and sodium ascorbate (32.5 mg, 0.16 mmol, 0.29 eq) were added to the mixture. The mixture was sonicated and stirred at room temperature (ca. 25 °C) overnight and the reaction completion was monitored by TLC



(aluminum oxide, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 80:20 v:v, Rf(**92**) = 0.22). Copper was removed by washing with a solution of ammonia (28 %, 10 mL). The organic layer was then washed with brine (10 mL) and the aqueous layer was extracted with dichloromethane until the organic layer became colourless. Combined organic layers were dried over anhydrous sodium sulfate and solvents were removed by rotary evaporation to give **92** as a dark yellow oil.

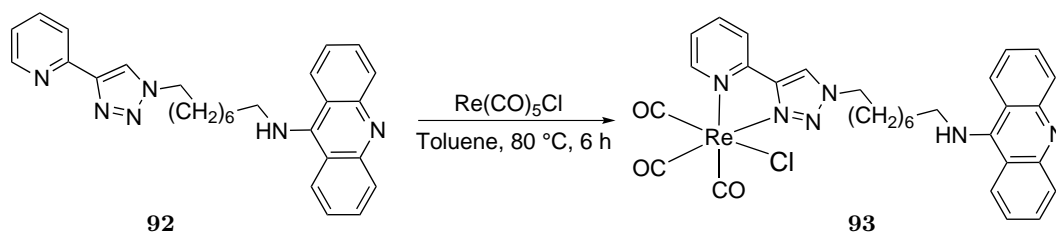
Yield: 251.7 mg (98 %)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8.55 (d, 1H, $^3J = 4.0$ Hz, H^a pyta), 8.15 (d, 1H, $^3J = 7.9$ Hz, H^d pyta), 8.09 (s, 1H, H^g pyta), 8.05-8.08 (m, 4H, H^1 , H^8 , H^4 , & H^5), 7.72 (td, 1H, $^3J = 7.9$, 1.5 Hz, H^c pyta), 7.67-7.57 (m, 2H, H^3 & H^6), 7.31 (dd, 2H, $^3J = 8.8$, 6.5 Hz, H^2 & H^7), 7.21-7.14 (m, 1H, $^3J = 1.5$, 4.0 Hz, H^b pyta), 5.08 (s, 1H, NH), 4.33 (t, 2H, $^3J = 7.0$ Hz, NH- CH_2), 3.73 (t, 2H, $^3J = 7.2$ Hz, Pyta- CH_2), 1.85 (p, 2H, $^3J = 7.0$ Hz, NH- CH_2 - CH_2), 1.68 (p, 2H, $^3J = 7.2$ Hz, Pyta- CH_2 - CH_2), 1.34-1.24 (m, 8H, CH_2).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 151.3 (C^a pyta), 150.4 (C^f pyta), 149.4 (C^e pyta), 148.4 (C^g), 137.0 (C^c pyta), 136.2 (C^q), 129.9 (C^4 & C^5), 129.5 (C^3 & C^6), 123.0 (C^g pyta), 122.9 (C^1 & C^8), 122.8 (C^b pyta), 121.8 (C^2 & C^7), 120.2 (C^d pyta), 116.7 (N- C^q), 50.9 (CH_2 -Pyta), 50.4 (NH- CH_2), 31.7 (NH- CH_2 - CH_2), 30.1 (CH_2 - CH_2 -Pyta), 29.0, 28.8, 26.7, 26.2 (4 x CH_2).

IR: 3300 (br, NH), 3055 (w, CH aromatic), 2927, 2854 (CH aliphatic).

Synthesis of $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{Cl})(\text{Pyta}-(\text{CH}_2)_8\text{-NH-acridine})]$ (**93**)



92 (72.9 mg, 162 μmol , 1 eq.) was suspended in hot toluene (15 mL, 80 °C) and dichloromethane (5 mL) was added for a better solubility of **92**. Then, $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}$ (64.9 mg, 179 μmol , 1.1 eq) was added and the reaction mixture was stirred at 80 °C for 6 h and the reaction completion was monitored by TLC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 98:2 v:v). Solvent was removed by rotary evaporation and the crude was purified by column chromatography (aluminium oxide, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 98:2 v:v) to afford **93** as a yellow solid.

Yield: 47.2 mg (39 %)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.48 (s, 1H, *H^g* pyta), 8.41 (ddd, 1H, ³*J* = 5.6 Hz, ⁴*J* = 1.6 Hz, ⁵*J* = 0.9 Hz, *H^a* pyta), 7.76 (dd, 2H, ³*J* = 8.8 Hz, ⁴*J* = 1.1 Hz, *H⁴* & *H⁵*), 7.61 (ddd, 1H, ³*J* = 8.0 Hz, ⁴*J* = 1.7 Hz, ⁵*J* = 0.9 Hz, *H^d* pyta), 7.55 (m, 1H, *H^c* pyta), 7.40 (dd, 2H, ³*J* = 8.8 Hz, ⁴*J* = 1.1 Hz, *H¹* & *H⁸* acridine), 7.07 (ddd, 2H, ³*J* = 8.8, 6.7 Hz, ⁴*J* = 1.3 Hz, *H³* & *H⁶*), 6.89 (ddd, 1H, ³*J* = 7.3, 5.6 Hz, ⁴*J* = 1.6 Hz, *H^b* pyta), 6.75 (ddd, 2H, ³*J* = 8.8, 6.7 Hz, ⁴*J* = 1.3 Hz, *H²* & *H⁷*), 3.98 (t, 2H, ³*J* = 7.2 Hz, NH-CH₂), 3.34 (t, 2H, ³*J* = 7.2 Hz, Pyta-CH₂), 1.38 (p, 2H, ³*J* = 7.2 Hz, NH-CH₂-CH₂), 1.26 (p, 2H, ³*J* = 7.2 Hz, Pyta-CH₂-CH₂), 0.88-0.66 (m, 8H, CH₂).

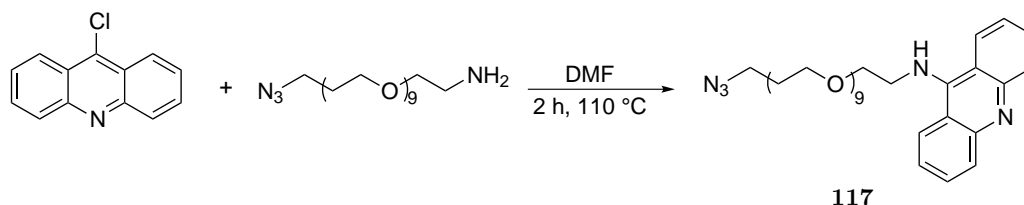
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 152.17 (*C^a* pyta), 148.70 (*C^f* pyta), 147.92 (*C^e* pyta), 146.26 (*C⁹*), 139.07 (*C^c* pyta), 129.82 (*C⁴* & *C⁵*), 125.65 (*C³* & *C⁶*), 125.13 (*C^g* pyta), 124.00 (*C¹* & *C⁸*), 123.35 (*C^b* pyta), 121.71 (*C²* & *C⁷*), 121.65 (*C^d* pyta), 115.05 (N-*C^a*), 51.17 (CH₂-Pyta), 49.35 (NH-CH₂), 29.93 (NH-CH₂-CH₂), 28.68 (CH₂-CH₂-Pyta), 27.58, 25.59, 24.96 (CH₂).

IR: 3080 (br, NH), 3030, 3070 (w, CH aromatic), 2924, 2853 (w, CH aliphatic) 2019 (S, CO A₁), 1880 (S, CO E).

HR-MS (ESI+): *m/z* calculated for [C₃₁H₃₁ClN₆O₃Re]⁺: 757.1690, found: 757.1742, error: 6.8 ppm.

Synthesis of *N*-(azido-PEG400)acridine-9-amine (**117**)

Synthesis performed by François Lambert



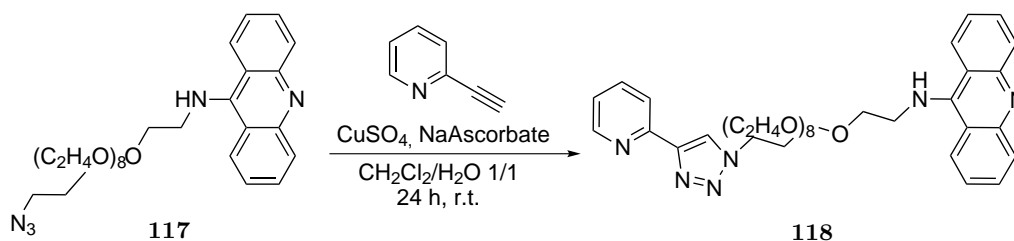
9-chloroacridine (214 mg, 1.00 mmol, 1 eq.) was dissolved in DMF (20 mL) and N₃-PEG400-NH₂ (800 mg, 1.8 mmol, 2.3 eq.) was added. The mixture was heated to 110 °C, stirred for 2 h and the reaction completion was monitored by TLC (silica, CH₂Cl₂/EtOH 90:10 v:v, Rf(**117**) = 0.46). The solvent was removed under reduced pressure to afford a brown oil, that was purified by column chromatography (silica, CH₂Cl₂/EtOH 100:0 to 80:20 v:v). The solvent was removed by rotary evaporation to afford **117**.

Yield: 595 mg (quantitative)

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.35 (d, 2H, d, ³*J* = 8.5 Hz, *H⁴* & *H⁵*), 8.06 (d, 2H, ³*J* = 8.7 Hz, *H¹* & *H⁸*), 7.52 (dd, 2H, ³*J* = 8.5 Hz, *H³* & *H⁶*), 7.24 (m, 2H, *H²* & *H⁷*), 4.16 (m, 2H, NH-CH₂), 3.91 (m, 2H, NH-CH₂), 3.64 (m, 2H, NH-CH₂-CH₂), 3.52-3.27 (m, CH₂ PEG).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 155.8 (*C⁹*), 142.6 (2 × *C^a*), 132.8 (*C⁴*, *C⁵*), 124.6 (*C³*, *C⁶*), 123.2 (*C¹*, *C⁸*), 122.3 (*C²*, *C⁷*), 113.9 (N-*C^a*), 70.4, 69.9, 69.3 (CH₂ PEG), 50.6 (CH₂-N₃), 49.1 (NH-CH₂).

Synthesis of Pyta-PEG400-acridine (118)



N-(PEG400-azido)acridin-9-amine **117** (295.7 mg, 448.2 μmol , 1 eq.) and 2-ethynylpyridine (59.4 mg, 576 μmol , 1.3 eq.) were dissolved in dichloromethane (2 mL) and water (2 mL). Then copper sulfate (II) (19.2 mg, 120 μmol , 0.27 eq.) and sodium ascorbate (23.8 mg, 120 μmol , 0.27 eq.) were added to the mixture. It was stirred at room temperature (ca. 25 °C) for one day and monitored by TLC (silica, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 90:10 v:v, $R_f(\mathbf{118}) = 0.29$). The mixture became dark and was diluted with dichloromethane (10 mL). Copper was removed by washing with a solution of ammonia (28 %, 5 mL). The organic layer was then washed with brine (5 mL) and the aqueous layer was extracted with dichloromethane until the organic layer became colorless. Organic layers were dried over anhydrous sodium sulfate and the solvent was removed by rotary evaporation to give a dark yellow oil. The product was purified by column chromatography (silica, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 80:20 v:v, then $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}/\text{Et}_3\text{N}$ 45:50:5 v:v:v).

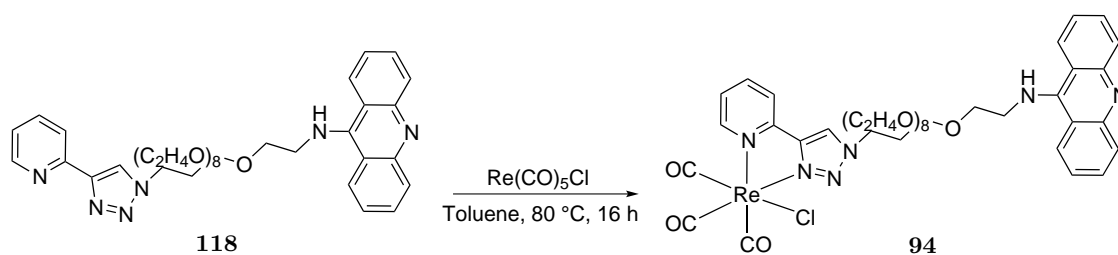
Yield: 198.7 mg (72 %)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8.56 (s, 1H, H^a pyta), 8.30 (m, 1H, H^d pyta), 8.22 (d, 2H, $^3J = 8.7$ Hz, $H^{4,5}$ acridine), 8.13 (m, 3H, H^g pyta & $H^{1,8}$ acridine), 7.75 (m, 1H, H^c pyta), 7.67 (t, 2H, $^3J = 7.6$ Hz, $H^{3,6}$ acridine), 7.37 (m, 2H, $H^{2,7}$ acridine), 7.20 (m, 1H, H^b pyta), 5.29 (s, 1H, NH), 4.59 (m, 2H, NH- CH_2), 4.02 (m, 2H, CH_2 -Pyta), 3.89 (m, 2H, NH- CH_2 - CH_2), 3.80-3.50 (m, 35H, CH_2 PEG).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 150.6 (C^f pyta), 149.5 (C^a pyta), 148.4 (C^e pyta), 137.0 (C^c pyta), 130.9 (C^4, C^5), 127.1 (C^3, C^6), 123.5 (C^g), 123.5 (C^1, C^8), 123.3 (C^2, C^7), 122.9 (C^b pyta), 120.3 (C^d pyta), 70.8, 70.7, 70.6, 70.5, 70.09, 69.6, 50.6, 50.0 (CH_2 PEG).

HR-MS (ESI+): m/z calculated for $[\text{C}_{40}\text{H}_{55}\text{N}_6\text{O}_9]^+$: 763.4025, found: 763.4033, error: -1.1 ppm.

Synthesis of $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{Cl})(\text{Pyta-PEG400-NH-acridine})]$ (94)



118 (198.7 mg, 261 μ mol, 1 eq.) was suspended in hot toluene (15 mL, 80 °C). Then, Re(CO)₅Cl (118.5 mg, 328 μ mol, 1.3 eq) was added and the reaction mixture was stirred at 80 °C overnight. The reaction completion was monitored by TLC (CH₂Cl₂/EtOH 80:20 v:v). Toluene was removed by rotary evaporation and the crude was purified by column chromatography (aluminium oxide, CH₂Cl₂/EtOH 80:20 v:v) to afford **94** as a yellow solid.

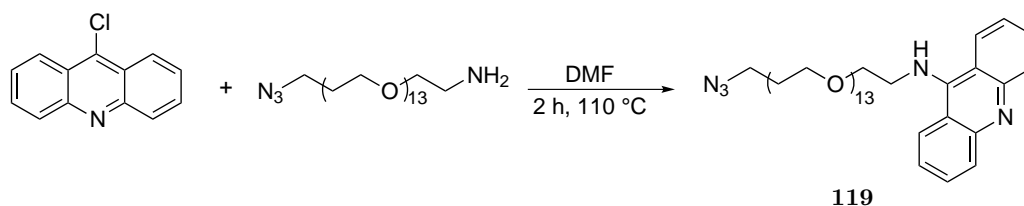
Yield: 180.0 mg (65 %)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.94 (m, 2H, *H^g* & *H^a* pyta), 8.33 (m, 4H, *H⁴*, *H⁵*, *H¹*, *H⁸*), 8.09 (d, 1H, ³*J* = 8.4 Hz, *H^d* pyta), 7.97 (m, 1H, *H^c* pyta), 7.70 (m, 2H, *H³* & *H⁶*), 7.39 (m, 3H, *H^b* pyta, *H²* & *H⁷*), 4.62 (m, 2H, NH-CH₂), 4.27 (m, 2H, Pyta-CH₂), 3.92 (m, 4H, NH-CH₂-CH₂ & Pyta-CH₂-CH₂), 3.99-3.45 (m, 30H, CH₂ PEG).

IR: 3100 (w, CH aromatic), 2869 (br, CH aliphatic), 2019 (s, CO A₁), 1909 and 1881 (s, CO E), 1635, 1587.

Synthesis of *N*-(azido-PEG600)acridin-9-amine (**119**)

Synthesis performed by François Lambert



9-chloroacridine (214 mg, 1.00 mmol, 1 eq.) was dissolved in DMF (20 mL) and N₃-PEG600-NH₂ (1.4 g, 1.8 mmol, 2.3 eq.) was added. The mixture was heated to 110 °C, stirred for 2 h and the reaction completion was monitored by TLC (silica, CH₂Cl₂/EtOH 85:15 v:v). The solvent was removed under reduced pressure to afford a brown oil, that was purified by column chromatography (silica, CH₂Cl₂/EtOH 100:0 to 80:20 v:v). The solvent was removed by rotary evaporation to afford **119**.

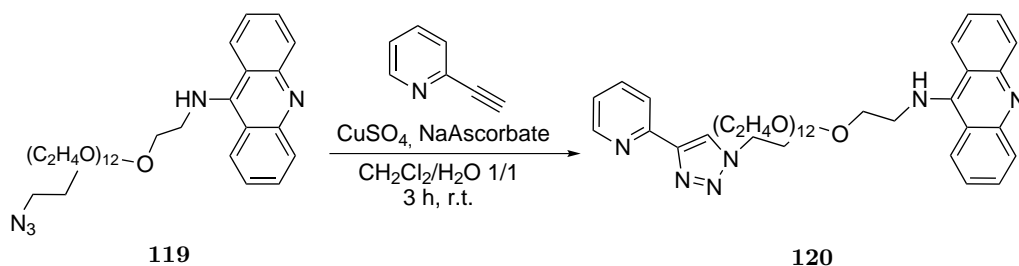
Yield: 600 mg (quantitative)

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.39 (d, 2H, d, ³*J* = 8.6 Hz, *H⁴* & *H⁵*), 8.09 (d, 2H, ³*J* = 8.6 Hz, *H¹* & *H⁸*), 7.52 (t, 2H, ³*J* = 7.7 Hz, *H³* & *H⁶*), 7.23 (m, 2H, *H²* & *H⁷*), 4.29, 4.05, 3.73, 3.59, 3.35 (m, CH₂ PEG).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 156.9 (*C⁹*), 140.7 (2 × *C^q*), 133.6 (*C⁴*, *C⁵*), 124.9 (*C³*, *C⁶*), 123.2 (*C¹*, *C⁸*), 120.5 (*C²*, *C⁷*), 112.8 (N-*C^q*), 70.5, 70.0, 69.1 (CH₂ PEG), 50.6 (CH₂-N₃), 48.8 (NH-CH₂).

Synthesis of Pyta-PEG600-acridine (**120**)

Synthesis performed by François Lambert



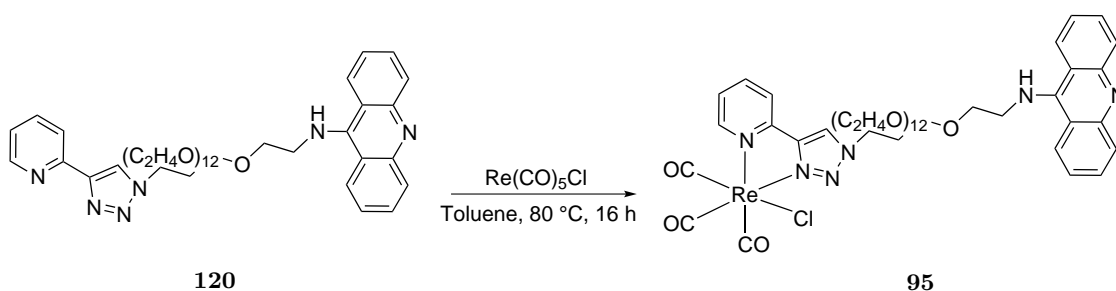
N-(PEG600-azido)acridin-9-amine **119** (600 mg, 0.75 mmol, 1 eq.) and 2-ethynylpyridine (103 mg, 1.0 mmol, 1.3 eq.) were dissolved in dichloromethane (2 mL) and water (2 mL). Then copper sulfate (II) (12 mg, 0.05 mmol, 0.1 eq.) and sodium ascorbate (50 mg, 0.2 mmol, 0.27 eq.) were added. The mixture was stirred at room temperature (ca. 25 °C) for 3 h and monitored by TLC (silica, CH₂Cl₂/EtOH 75:25 v:v). The product was purified by column chromatography (silica, CH₂Cl₂/EtOH 80:20 v:v, then CH₂Cl₂/EtOH/Et₃N 45:50:5 v:v:v).

Yield: 438 mg (65 %)

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.52 (d, 1H, ³J = 4.5 Hz, *H^a* pyta), 8.27 (s, 1H, s, *H^g* pyta), 8.15 (d, 2H, ³J = 8.6 Hz, *H⁴* & *H⁵*), 8.10 (d, 1H, ³J = 7.9 Hz, *H^c* pyta), 7.99 (d, 1H, ³J = 8.7 Hz, *H¹* & *H⁸*), 7.70 (m, 1H, *H^c* pyta), 7.59 (m, 2H, *H³* & *H⁶*), 7.30 (t, 2H, ³J = 8.7 Hz, *H²* & *H⁷*), 7.16 (dd, 1H, ³J = 7.9, 5.4 Hz, *H^b* pyta), 4.55 (m, 2H, NH-CH₂), 3.92 (t, 2H, ³J = 7.3 Hz, CH₂-Pyta), 3.85 (m, 2H, NH-CH₂-CH₂), 3.60 (m, 40H, CH₂).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 152.1 (*C⁹*), 150.4 (*C^f* pyta), 149.3 (*C^a* pyta), 148.3 (*C^e* pyta), 148.1 (2 × *C^q*), 136.8 (*C^c* pyta), 130.2 (*C⁴*, *C⁵*), 128.3 (*C^g* pyta), 123.3 (*C¹*, *C⁸*), 123.1 (*C²*, *C⁷* & *C^b* pyta), 120.1 (*C^d* pyta), 117.1 (*C^q*), 70.5, 70.3, 70.1, 69.3 (CH₂ PEG) 50.4 (CH₂-Pyta), 49.9 (NH-CH₂).

Synthesis of [Re(CO)₃(Cl)(Pyta-PEG600-NH-acridine)] (**95**)



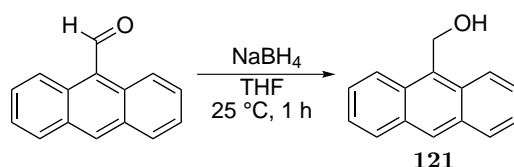
120 (130.0 mg, 138.4 μmol, 1 eq.) was suspended in hot toluene (15 mL, 80 °C). Then, Re(CO)₅Cl (55.1 mg, 152 μmol, 1.1 eq) was added and the reaction mixture was stirred at 80 °C overnight. The reaction completion was monitored by TLC (CH₂Cl₂/EtOH 80:20 v:v). Toluene was removed by rotary evaporation and the crude was purified by column chromatography (aluminium oxide, CH₂Cl₂/EtOH 80:20 v:v) to afford **95** as a yellow solid.

Yield: 70.0 mg (41 %)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.97 (m, 1H, *H*⁹), 8.87 (m, 1H, *H*^a pyta), 8.37 (m, 4H, *H*⁴, *H*⁵ & *H*^d pyta), 8.03 (m, 2H, *H*¹, *H*⁸), 7.75 (t, 2H, *H*³ & *H*⁶), 7.40 (m, 5H, *H*³, *H*⁶, *H*², *H*⁷ & *H*^c, *H*^b pyta), 4.69 (m, 2H, NH-CH₂), 4.30 (m, 2H, Pyta-CH₂), 3.99 (m, 4H, NH-CH₂-CH₂ & Pyta-CH₂-CH₂), 3.75-3.40 (m, 40H, CH₂ PEG).

IR: 3104 (w, CH aromatic), 2867 (br, CH aliphatic), 2019 (S, CO A₁), 1909 and 1881 (S, CO E), 1635, 1587.

Synthesis of 9-anthracenemethanol (**121**) (adapted from literature³⁰²)



Anthracene-9-carbaldehyde (503 mg, 2.43 mmol, 1 eq.) was dissolved in THF (10 mL), then NaBH₄ (142 mg, 3.75 mmol, 1.5 eq.) was added and the mixture, initially green, became orange. The mixture was stirred for 1.5 h at room temperature (ca. 25 °C) and the completion was monitored by TLC (cyclohexane/ethyl acetate 80:20 v:v, Rf(**121**) = 0.40). The mixture was poured into water (40 mL) resulting in a yellow precipitate. The yellow solid was filtered, washed with cold water (10 mL), dried under vacuum and the product was purified by column chromatography (silica, cyclohexane/ethyl acetate 80:20 to 60:40 v:v).

Yield: 392 mg (77 %)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.48 (s, 1H, *H*⁹), 8.43 (dd, 2H, ³*J* = 9.0 Hz, ⁴*J* = 1.1 Hz, *H*^{4,5}), 8.04 (dt, 2H, ³*J* = 8.1 Hz, ⁴*J* = 1.5 Hz, *H*^{1,8}), 7.58 (m, 2H, *H*^{3,6}), 7.49 (m, 2H, *H*^{2,7}), 5.69 (s, 2H, CH₂-OH).

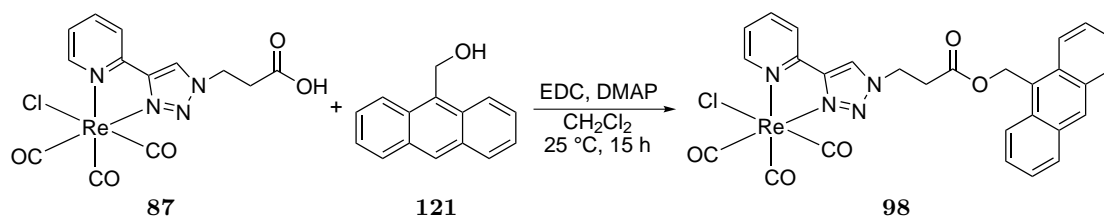
IR: 3419 (br, OH), 3046 (w, CH aromatic), 2951, 2912 (CH aliphatic).

HR-MS (ESI+): *m/z* calculated for [C₁₅H₁₂O + Na]⁺: 231.0780, found: 231.0778, error: 0.8 ppm.

NMR Data in agreement with literature.³⁰²

Synthesis of [Re(CO)₃Cl(Pyta-(CH₂)₂-COO-CH₂-anthracene)](**98**) (adapted from literature³⁰³)

A solution of [Re(CO)₃Cl(Pyta-(CH₂)₂-COOH) **87** (179.3 mg, 0.34 mmol, 1 eq.), 9-anthracenemethanol (85 mg, 0.41 mmol, 1.2 eq.), EDC (100.4 mg, 0.52 mmol, 1.5 eq.) and 4-dimethylaminopyridine (DMAP, 20.8 mg, 0.17 mmol, 0.5 eq.) in dichloromethane (20 mL) was stirred at room temperature (ca. 25 °C) overnight. The reaction completion was monitored by TLC (silica, CH₂Cl₂, Rf(**98**) = 0.72). A solution of HCl (5 %, 20 mL) was added to the mixture. The organic layer was separated, dried over anhydrous sodium



sulfate, filtered and concentrated by rotary evaporation. The crude was purified by column chromatography (silica, CH₂Cl₂/acetone 100:0 to 90:10 v:v).

Yield: 75.6 mg (31 %)

¹H NMR (300 MHz, Acetone-d₆): δ (ppm) 8.94 (m, 1H, *H^a* pyta), 8.62 (m, 1H, *H^g* pyta), 8.52 (m, 1H, *H⁹*), 8.25 (m, 2H, *H^{4,5}*), 8.01 (m, 2H, *H^{1,8}*), 7.8 (m, 1H, *H^d* pyta), 7.62 (m, 2H, *H^c* & *H^b* pyta), 7.48 (m, 4H, *H^{2,7}* & *H^{3,6}*), 6.16 (m, 2H, anthracene-CH₂), 4.83 (q, 2H, ³*J* = 5.9 Hz, Pyta-CH₂), 3.16 (q, 2H, ³*J* = 5.9 Hz, Pyta-CH₂-CH₂).

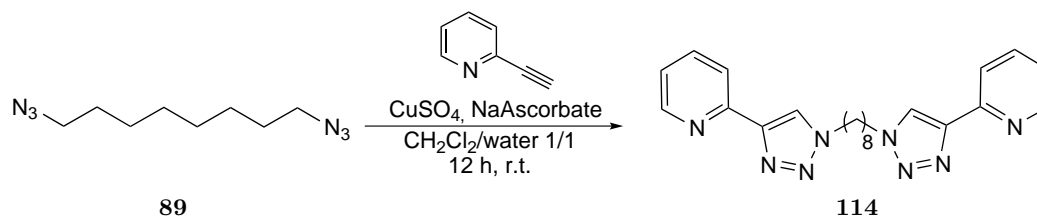
IR: 3087 (w, CH), 2023 (S, CO A₁), 1893 (S, CO E), 1737 (C=O).

HR-MS (ESI⁺): *m/z* calculated for [C₂₈H₂₀ClN₄O₅Re+Na]⁺: 737.0564, found: 737.0588, error: 3.2 ppm.

5.3 Marquage des membranes

Synthesis of Pyta-(CH₂)₈-Pyta (114)

Synthesis performed by François Lambert



1,8-diazidooctane **89** (0.98 g, 5 mmol, 1 eq.) and 2-ethynylpyridine (1.03 g, 10 mmol, 2 eq.) were dissolved in a mixture of CH₂Cl₂ (20 mL) and water (20 mL) at r.t., then copper (II) sulfate pentahydrate (125 mg, 0.5 mmol, 0.1 eq.) and sodium ascorbate (200 mg, 1 mmol, 0.2 eq.) were added. The reaction mixture was stirred 12 h at r.t. (ca. 25 °C). Reaction completion was monitored by TLC. To the crude were added water (50 mL) and a 10 % ammonia solution (10 mL) were added. Aqueous layer was extracted three times with CH₂Cl₂ (3 × 100 mL). The organic layers were combined and dried over anhydrous sulfate magnesium. Solvent was removed under vacuum. The residue was dissolved in a minimum of CH₂Cl₂/MeOH 99:1 v:v and purified by column chromatography on silica (CH₂Cl₂/MeOH, 98:2 to 95:5 v:v) to give **114**.

Yield: 1.7 g (85 %)

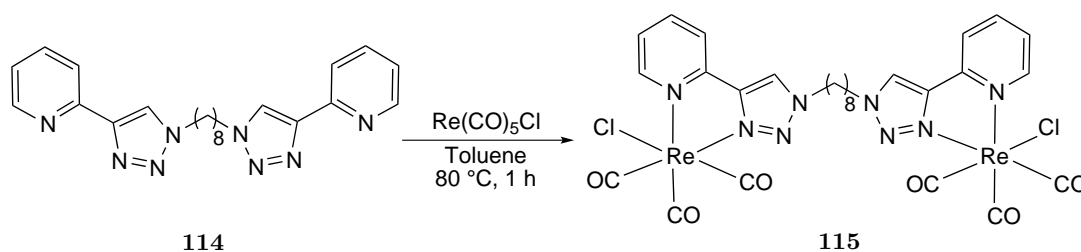
¹H NMR (300 MHz, Acetone-d₆/CDCl₃): δ (ppm) 8.17 (large peak, 2H, *H^a* pyta), 7.93 (s, 2H, *H^g* pyta), 7.74 (m, 2H, *H^d* pyta), 7.51 (m, 2H, *H^c* pyta), 6.98 (large peak,

2H, H^b pyta), 4.08 (m, 4H, $2 \times \text{Pyta-CH}_2$), 1.59 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 1.00 (m, 8H, $4 \times \text{CH}_2$).

^{13}C NMR (75 MHz, Acetone- d_6/CDCl_3): δ (ppm) 149.2 (C^e pyta), 148.5 (C^a pyta), 147.0 (C^f pyta), 137.3 (C^c pyta), 122.8 (C^b pyta), 122.1 (C^g pyta), 120.0 (C^d pyta), 48.7 (Pyta- CH_2), 29.6, 28.2, 25.7 ($6 \times \text{CH}_2$).

HR-MS (ESI+): m/z calculated for $[\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_8 + \text{Na}]^+$: 425.2178 found: 425.2173, error: -1.2 ppm.

Synthesis of $[\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}(\text{Pyta}-(\text{CH}_2)_8\text{-Pyta})\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}]$ (**115**)



114 (100.0 mg, 248.4 μmol , 1 eq.) was dissolved in hot toluene (80 $^\circ\text{C}$, 15 mL), then $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}$ (200.0 mg, 552.9 μmol , 2.2 eq.) was added. The mixture was stirred at 80 $^\circ\text{C}$ and the reaction completion was monitored by TLC (silica, EtOAc). After 10 min, the mixture became yellow and after 1 h, a precipitate formed in the flask. The mixture was cooled down in an ice bath. The precipitate was filtered, washed with cold toluene (0 $^\circ\text{C}$, 10 mL) and dried to give **115** as a yellow powder.

Yield: 192.3 mg (76 %)

^1H NMR (300 MHz, Acetone- d_6): δ (ppm) 9.05 (m, 4H, $2 \times H^{a,g}$ pyta), 8.25 (m, 4H, $2 \times H^{c,d}$ pyta), 7.67 (m, 2H, $2 \times H^b$ pyta), 4.68 (td, 4H, $^3J = 7.3, 1.6$ Hz, $2 \times \text{Pyta-CH}_2$), 8.82 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 1.41 (m, 8H, $4 \times \text{CH}_2$).

^{13}C NMR (75 MHz, Acetone- d_6): δ (ppm) 154.0 (C^a pyta), 150.5 (C^f pyta), 149.6 (C^e pyta), 141.1 (C^c pyta), 127.1 (C^b pyta), 125.9 (C^d pyta), 123.4 (C^g pyta), 53.0 (Pyta- CH_2), 26.7, 26.7 (CH_2).

IR: 3076 (w, CH aromatic), 2923, 2857 (w, CH aliphatic), 2017 (S, CO A_1), 1874 (S, CO E), 1618, 1581.

HR-MS (ESI+): m/z calculated for $[\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{Cl}_2\text{N}_8\text{O}_6\text{Re}_2 + \text{Na}]^+$: 812.1190 found: 812.1230, error: 4.9 ppm.

Bibliographie

- [1] Wrighton, M. and Morse, D.L., Nature of the lowest excited state in tricarbonylchloro-1, 10-phenanthroline-rhenium(I) and related complexes, *Journal of the American Chemical Society* **1974**, *96*(4), 998–1003.
- [2] Fredericks, S.M., Luong, J.C., and Wrighton, M.S., Multiple emissions from rhenium(I) complexes : intraligand and charge-transfer emission from substituted metal carbonyl cations, *Journal of the American Chemical Society* **1979**, *101*(24), 7415–7417.
- [3] Caspar, J.V., Kober, E.M., Sullivan, B.P., and Meyer, T.J., Application of the energy gap law to the decay of charge-transfer excited states, *Journal of the American Chemical Society* **1982**, *104*(2), 630–632.
- [4] Caspar, J.V. and Meyer, T.J., Application of the energy gap law to nonradiative, excited-state decay, *The Journal of Physical Chemistry* **1983**, *87*(6), 952–957.
- [5] Kober, E.M., Caspar, J.V., Lumpkin, R.S., and Meyer, T.J., Application of the energy gap law to excited-state decay of osmium(II)-polypyridine complexes : calculation of relative nonradiative decay rates from emission spectral profiles, *The Journal of Physical Chemistry* **1986**, *90*(16), 3722–3734.
- [6] Lees, A.J., Luminescence properties of organometallic complexes, *Chemical Reviews* **1987**, *87*(4), 711–743.
- [7] Sacksteder, L., Zipp, A.P., Brown, E.A., Streich, J., Demas, J.N., and DeGraff, B.A., Luminescence studies of pyridine .alpha.-diimine rhenium(I) tricarbonyl complexes, *Inorganic Chemistry* **1990**, *29*(21), 4335–4340.
- [8] Worl, L.A., Duesing, R., Chen, P., Ciana, L.D., and Meyer, T.J., Photophysical properties of polypyridyl carbonyl complexes of rhenium(I), *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1991**, page 849.
- [9] Sacksteder, L., Lee, M., Demas, J.N., and DeGraff, B.A., Long-lived, highly luminescent rhenium(I) complexes as molecular probes : intra- and intermolecular excited-state interactions, *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115*(18), 8230–8238.
- [10] Wei, L., Babich, J.W., Ouellette, W., and Zubieta, J., Developing the {M(CO)₃}⁺ Core for Fluorescence Applications : Rhenium Tricarbonyl Core Complexes with Benzimidazole, Quinoline, and Tryptophan Derivatives, *Inorganic Chemistry* **2006**, *45*(7), 3057–3066.

- [11] Coleman, A., Brennan, C., Vos, J.G., and Pryce, M.T., Photophysical properties and applications of Re(I) and Re(I)–Ru(II) carbonyl polypyridyl complexes, *Coordination Chemistry Reviews* **2008**, 252(23-24), 2585–2595.
- [12] Guo, X.Q., Castellano, F.N., Li, L., Szmecinski, H., Lakowicz, J.R., and Sipior, J., A Long-Lived, Highly Luminescent Re(I) Metal–Ligand Complex as a Biomolecular Probe, *Analytical Biochemistry* **1997**, 254(2), 179–186.
- [13] Balasingham, R.G., Thorp-Greenwood, F.L., Williams, C.F., Coogan, M.P., and Pope, S.J.A., Biologically Compatible, Phosphorescent Dimetallic Rhenium Complexes Linked through Functionalized Alkyl Chains : Syntheses, Spectroscopic Properties, and Applications in Imaging Microscopy, *Inorganic Chemistry* **2012**, 51(3), 1419–1426.
- [14] Shen, Y., Maliwal, B.P., and Lakowicz, J.R., Long-Lived Luminescent Re(I) Complexes Containing cis-Carbonyl and Bidentate Phosphine Ligands, *Journal of Fluorescence* **2001**, 11(4), 315–318.
- [15] Lo, K.K.W., Zhang, K.Y., and Li, S.P.Y., Recent Exploitation of Luminescent Rhenium(I) Tricarbonyl Polypyridine Complexes as Biomolecular and Cellular Probes, *European Journal of Inorganic Chemistry* **2011**, 2011(24), 3551–3568.
- [16] Kumar, A., Sun, S.S., and Lees, A.J., Photophysics and Photochemistry of Organometallic Rhenium Diimine Complexes, in A.J. Lees, editor, *Photophysics of Organometallics*, volume 29, pages 37–71, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg **2009**.
- [17] Hostachy, S., Policar, C., and Delsuc, N., Re(I) carbonyl complexes : Multimodal platforms for inorganic chemical biology, *Coordination Chemistry Reviews* **2017**, 351, 172–188.
- [18] Kumar, A., Sun, S.S., and Lees, A.J., Photophysics and Photochemistry of Organometallic Rhenium Diimine Complexes, in *Photophysics of Organometallics*, pages 37–71, Springer Berlin Heidelberg **2009**, doi :10.1007/3418_2009_2.
- [19] Yi, X., Zhao, J., Wu, W., Huang, D., Ji, S., and Sun, J., Rhenium(i) tricarbonyl polypyridine complexes showing strong absorption of visible light and long-lived triplet excited states as a triplet photosensitizer for triplet–triplet annihilation upconversion, *Dalton Transactions* **2012**, 41(29), 8931.
- [20] Li, X.W., Li, H.Y., Wang, G.F., Chen, F., Li, Y.Z., Chen, X.T., Zheng, Y.X., and Xue, Z.L., Blue-Green Luminescent Rhenium(I) Tricarbonyl Complexes with Pyridine-Functionalized N-Heterocyclic Carbene Ligands, *Organometallics* **2012**, 31(10), 3829–3835.
- [21] Vaughan, J.G., Reid, B.L., Ramchandani, S., Wright, P.J., Muzzioli, S., Skelton, B.W., Raiteri, P., Brown, D.H., Stagni, S., and Massi, M., The photochemistry of rhenium(i) tricarbonyl N-heterocyclic carbene complexes, *Dalton Transactions* **2013**, 42(39), 14100.

- [22] Chan, C.Y., Pellegrini, P.A., Greguric, I., and Barnard, P.J., Rhenium and Technetium Tricarbonyl Complexes of N-Heterocyclic Carbene Ligands, *Inorganic Chemistry* **2014**, *53*(20), 10862–10873.
- [23] Laramée-Milette, B., Lachance-Brais, C., and Hanan, G.S., Synthesis of discrete Re(i) di- and tricarbonyl assemblies using a [4 x 1] directional bonding strategy, *Dalton Transactions* **2015**, *44*(1), 41–45.
- [24] Sangilipandi, S., Nagarajaprakash, R., Sutradhar, D., Kaminsky, W., Chandra, A.K., and Rao, K.M., Synthesis, molecular structural studies and DFT calculations of tricarbonylrhenium(I) metal complexes containing nitrogen based N∩N donor polypyridyl ligands, *Inorganica Chimica Acta* **2015**, *437*, 177–187.
- [25] Scattergood, P.A., Sinopoli, A., and Elliott, P.I., Photophysics and photochemistry of 1, 2, 3-triazole-based complexes, *Coordination Chemistry Reviews* **2017**, *350*, 136–154.
- [26] He, M., Ching, H.Y.V., Policar, C., and Bertrand, H.C., Rhenium tricarbonyl complexes with arenethiolate axial ligands, *New Journal of Chemistry* **2018**, *42*(14), 11312–11323.
- [27] Oberholzer, M., Probst, B., Bernasconi, D., Spingler, B., and Alberto, R., Photosensitizing Properties of Alkynylrhenium(I) Complexes [Re(-C≡C-R)(CO)₃(N∩N)] (N∩N = 2, 2*t*-bipy, phen) for H₂Production, *European Journal of Inorganic Chemistry* **2014**, *2014*(19), 3002–3009.
- [28] Yam, V.W.W., Luminescent carbon-rich rhenium(i) complexes, *Chemical Communications* **2001**, *9*, 789–796.
- [29] Yam, V.W.W., Wong, K.M.C., Chong, S.H.F., Lau, V.C.Y., Lam, S.C.F., Zhang, L., and Cheung, K.K., Synthesis, electrochemistry and structural characterization of luminescent rhenium(I) monoylnyl complexes and their homo- and hetero-metallic binuclear complexes, *Journal of Organometallic Chemistry* **2003**, *670*(1-2), 205–220.
- [30] Stephenson, K.A., Banerjee, S.R., Besanger, T., Sogbein, O.O., Levadala, M.K., McFarlane, N., Lemon, J.A., Boreham, D.R., Maresca, K.P., Brennan, J.D., Babich, J.W., Zubietta, J., and Valliant, J.F., Bridging the Gap between in Vitro and in Vivo Imaging : Isostructural Re and ^{99m}Tc Complexes for Correlating Fluorescence and Radioimaging Studies, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*(28), 8598–8599.
- [31] Raszeja, L., Maghnouj, A., Hahn, S., and Metzler-Nolte, N., A Novel Organometallic ReI Complex with Favourable Properties for Bioimaging and Applicability in Solid-Phase Peptide Synthesis, *ChemBioChem* **2011**, *12*(3), 371–376.
- [32] Obata, M., Kitamura, A., Mori, A., Kameyama, C., Czaplewska, J.A., Tanaka, R., Kinoshita, I., Kusumoto, T., Hashimoto, H., Harada, M., Mikata, Y., Funabiki, T., and Yano, S., Syntheses, structural characterization and photophysical properties of 4-(2-pyridyl)-1, 2, 3-triazole rhenium(i) complexes, *Dalton Transactions* **2008**, *25*, 3292.

BIBLIOGRAPHIE

- [33] Bhuvanewari, J., Mareeswaran, P.M., Shanmugasundaram, S., and Rajagopal, S., Protein binding studies of luminescent rhenium(I) diimine complexes, *Inorganica Chimica Acta* **2011**, *375*(1), 205–212.
- [34] Lo, K.K.W., Tsang, K.H.K., Hui, W.K., and Zhu, N., Synthesis, Characterization, Crystal Structure and Electrochemical, Photophysical, and Protein-Binding Properties of Luminescent Rhenium(I) Diimine Indole Complexes, *Inorganic Chemistry* **2005**, *44*(17), 6100–6110.
- [35] Bertrand, H.C., Clède, S., Guillot, R., Lambert, F., and Policar, C., Luminescence Modulations of Rhenium Tricarbonyl Complexes Induced by Structural Variations, *Inorganic Chemistry* **2014**, *53*(12), 6204–6223.
- [36] Fabian, H., Lasch, P., Boese, M., and Haensch, W., Mid-IR microspectroscopic imaging of breast tumor tissue sections, *Biopolymers* **2002**, *67*(4-5), 354–357.
- [37] Dumas, P., Jamin, N., Teillaud, J.L., Miller, L.M., and Beccard, B., Imaging capabilities of synchrotron infrared microspectroscopy, *Faraday Discussions* **2004**, *126*, 289.
- [38] Kazarian, S. and Chan, K., Applications of ATR-FTIR spectroscopic imaging to biomedical samples, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2006**, *1758*(7), 858–867.
- [39] Kazarian, S.G. and Chan, K.L.A., ATR-FTIR spectroscopic imaging : recent advances and applications to biological systems, *The Analyst* **2013**, *138*(7), 1940.
- [40] Policar, C., Waern, J., Plamont, M., Clède, S., Mayet, C., Prazeres, R., Ortega, J.M., Vessières, A., and Dazzi, A., Subcellular Imaging in the Mid-IR of a Metal-Carbonyl Moiety Using Photothermal Induced Resonance, *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50*, 860–864.
- [41] Kopf, I., N'Dongo, H.W.P., Ballout, F., Schatzschneider, U., Bründermann, E., and Havenith, M., Introducing cymantrene labels into scattering scanning near-field infrared microscopy, *The Analyst* **2012**, *137*(21), 4995.
- [42] Gazi, E., Dwyer, J., Lockyer, N.P., Miyan, J., Gardner, P., Hart, C., Brown, M., and Clarke, N.W., Fixation protocols for subcellular imaging by synchrotron-based Fourier transform infrared microspectroscopy, *Biopolymers* **2005**, *77*(1), 18–30.
- [43] Dazzi, A., Prazeres, R., Glotin, F., Ortega, J., Al-Sawaftah, M., and de Frutos, M., Chemical mapping of the distribution of viruses into infected bacteria with a photothermal method, *Ultramicroscopy* **2008**, *108*(7), 635 – 641.
- [44] Sandt, C., Frederick, J., and Dumas, P., Profiling pluripotent stem cells and organelles using synchrotron radiation infrared microspectroscopy, *Journal of Biophotonics* **2012**, *6*(1), 60–72.
- [45] Hildebrandt, P., A Spectral Window to the Cell, *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*(27), 4540–4541.

- [46] Meister, K., Niesel, J., Schatzschneider, U., Metzler-Nolte, N., Schmidt, D., and Havenith, M., Label-Free Imaging of Metal-Carbonyl Complexes in Live Cells by Raman Microspectroscopy, *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*(19), 3310–3312.
- [47] Clède, S., Policar, C., and Sandt, C., Fourier transform infrared (FT-IR) spectromicroscopy to identify cell organelles : correlation with fluorescence staining in MCF-7 breast cancer cells, *Applied Spectroscopy* **2014**, *68*(1), 113–7.
- [48] Clède, S., Lambert, F., Sandt, C., Gueroui, Z., Refregiers, M., Plamont, M.A., Dumas, P., Vessieres, A., and Policar, C., A rhenium tris-carbonyl derivative as a single core multimodal probe for imaging (SCoMPI) combining infrared and luminescent properties, *Chemical Communications* **2012**, *48*(62), 7729–31.
- [49] Clède, S., Lambert, F., Sandt, C., Kascakova, S., Unger, M., Harte, E., Plamont, M.A., Saint-Fort, R., Deniset-Besseau, A., Gueroui, Z., Hirschmugl, C., Lecomte, S., Dazzi, A., Vessieres, A., and Policar, C., Detection of an estrogen derivative in two breast cancer cell lines using a single core multimodal probe for imaging (SCoMPI) imaged by a panel of luminescent and vibrational techniques, *Analyst* **2013**, *138*(19), 5627–38.
- [50] Lasch, P., Boese, M., Pacifico, A., and Diem, M., FT-IR spectroscopic investigations of single cells on the subcellular level, *Vibrational Spectroscopy* **2002**, *28*(1), 147–157.
- [51] Salmain, M., Labeling of Proteins with Organometallic Complexes : Strategies and Applications, in *Bioorganometallics*, pages 181–213, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA **2006**, doi :10.1002/3527607692.ch6.
- [52] Stephenson, G.R., Organometallic Bioprobes, in *Bioorganometallics*, pages 215–262, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA **2006**, doi :10.1002/3527607692.ch7.
- [53] Clède, S. and Policar, C., Metal-carbonyl units for vibrational and luminescence imaging : towards multimodality, *Chemistry - A European Journal* **2015**, *21*(3), 942–58.
- [54] Jaouen, G., Vessieres, A., Top, S., Ismail, A.A., and Butler, I.S., Metal carbonyl fragments as a new class of markers in molecular biology, *Journal of the American Chemical Society* **1985**, *107*(16), 4778–4780.
- [55] Jaouen, G. and Vessieres, A., Transition metal carbonyl oestrogen receptor assay, *Pure and Applied Chemistry* **1985**, *57*(12), 1865–1874.
- [56] Salmain, M., Vessieres, A., Jaouen, G., and Butler, I.S., Fourier transform infrared spectroscopic method for the quantitative trace analysis of transition-metal carbonyl-labeled bioligands, *Analytical Chemistry* **1991**, *63*(20), 2323–2329.
- [57] Vessièrès, A., Kowalski, K., Zakrzewski, J., Stepien, A., Grabowski, M., and Jaouen, G., Synthesis of CpFe(CO)(L) Complexes of Hydantoin Anions (Cp = η^5 -C₅H₅, L = CO, PPh₃), and the Use of the 5, 5-Diphenylhydantoin Anion Complexes as Tracers in the Nonisotopic Immunoassay CMIA of This Antiepileptic Drug, *Bioconjugate Chemistry* **1999**, *10*(3), 379–385.

BIBLIOGRAPHIE

- [58] Kong, K.V., Chew, W., Lim, L.H.K., Fan, W.Y., and Leong, W.K., Bioimaging in the Mid-Infrared Using an Organometallic Carbonyl Tag, *Bioconjugate Chemistry* **2007**, *18*(5), 1370–1374.
- [59] Clède, S., Lambert, F., Saint-Fort, R., Plamont, M.A., Bertrand, H., Vessieres, A., and Policar, C., Influence of the side-chain length on the cellular uptake and the cytotoxicity of rhenium triscarbonyl derivatives : a bimodal infrared and luminescence quantitative study, *Chemistry - A European Journal* **2014**, *20*(28), 8714–22.
- [60] Illien, F., Rodriguez, N., Amoura, M., Joliot, A., Pallerla, M., Cribier, S., Burlina, F., and Sagan, S., Quantitative fluorescence spectroscopy and flow cytometry analyses of cell-penetrating peptides internalization pathways : optimization, pitfalls, comparison with mass spectrometry quantification, *Scientific Reports* **2016**, *6*(1).
- [61] Swiecicki, J.M., Thiebaut, F., Pisa, M.D., Bertin, S.G., Tailhades, J., Mansuy, C., Burlina, F., Chwetzoff, S., Trugnan, G., Chassaing, G., and Lavielle, S., How to unveil self-quenched fluorophores and subsequently map the subcellular distribution of exogenous peptides, *Scientific Reports* **2016**, *6*(1).
- [62] Vessieres, A., Top, S., Ismail, A.A., Butler, I.S., Louer, M., and Jaouen, G., Organometallic estrogens : synthesis, interaction with lamb uterine estrogen receptor, and detection by infrared spectroscopy, *Biochemistry* **1988**, *27*(18), 6659–6666.
- [63] Kitanovic, I., Can, S., Alborzina, H., Kitanovic, A., Pierroz, V., Leonidova, A., Pinto, A., Spingler, B., Ferrari, S., Molteni, R., Steffen, A., Metzler-Nolte, N., Wölfl, S., and Gasser, G., A Deadly Organometallic Luminescent Probe : Anticancer Activity of a ReIBisquinoline Complex, *Chemistry - A European Journal* **2014**, *20*(9), 2496–2507.
- [64] Nasse, M.J., Walsh, M.J., Mattson, E.C., Reininger, R., Kajdacsy-Balla, A., Macias, V., Bhargava, R., and Hirschmugl, C.J., High-resolution Fourier-transform infrared chemical imaging with multiple synchrotron beams, *Nature Methods* **2011**, *8*, 413–416.
- [65] Lasch, P. and Naumann, D., Spatial resolution in infrared microspectroscopic imaging of tissues, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2006**, *1758*(7), 814 – 829.
- [66] Dazzi, A. and Prater, C.B., AFM-IR : Technology and Applications in Nanoscale Infrared Spectroscopy and Chemical Imaging, *Chemical Reviews* **2017**, *117*(7), 5146–5173.
- [67] Mattson, E.C., Unger, M., Clède, S., Lambert, F., Policar, C., Imtiaz, A., D’Souza, R., and Hirschmugl, C.J., Toward optimal spatial and spectral quality in widefield infrared spectromicroscopy of IR labelled single cells, *Analyst* **2013**, *138*, 5610–5618.
- [68] Stelzer, Contrast, resolution, pixelation, dynamic range and signal-to-noise ratio : fundamental limits to resolution in fluorescence light microscopy, *Journal of Microscopy* **1998**, *189*(1), 15–24.

- [69] Dumas, P., Sockalingum, G.D., and Sulé-Suso, J., Adding synchrotron radiation to infrared microspectroscopy : what's new in biomedical applications?, *Trends in Biotechnology* **2007**, *25*(1), 40–44.
- [70] Carr, G.L., Resolution limits for infrared microspectroscopy explored with synchrotron radiation, *Review of Scientific Instruments* **2001**, *72*(3), 1613.
- [71] Miller, L.M. and Dumas, P., Chemical imaging of biological tissue with synchrotron infrared light, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2006**, *1758*(7), 846–857.
- [72] Cotte, M., Dumas, P., Taniguchi, Y., Checroun, E., Walter, P., and Susini, J., Recent applications and current trends in Cultural Heritage Science using synchrotron-based Fourier transform infrared micro-spectroscopy, *Comptes Rendus Physique* **2009**, *10*(7), 590–600.
- [73] Hare, D.J., New, E.J., de Jonge, M.D., and McColl, G., Imaging metals in biology : balancing sensitivity, selectivity and spatial resolution, *Chemical Society Reviews* **2015**, *44*(17), 5941–5958.
- [74] McRae, R., Bagchi, P., Sumalekshmy, S., and Fahrni, C.J., In Situ Imaging of Metals in Cells and Tissues, *Chemical Reviews* **2009**, *109*(10), 4780–4827.
- [75] Hostachy, S., Masuda, M., Miki, T., Hamachi, I., Sagan, S., Lequin, O., Medjoubi, K., Somogyi, A., Delsuc, N., and Policar, C., Graftable SCoMPIs enable the labeling and X-ray fluorescence imaging of proteins, *Chemical Science* **2018**, *9*(19), 4483–4487.
- [76] Rodushkin, I., Engström, E., Stenberg, A., and Baxter, D.C., Determination of low-abundance elements at ultra-trace levels in urine and serum by inductively coupled plasma-sector field mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2004**, *380*(2), 247–257.
- [77] Clède, S., Cowan, N., Lambert, F., Bertrand, H.C., Rubbiani, R., Patra, M., Hess, J., Sandt, C., Trcera, N., Gasser, G., Keiser, J., and Policar, C., Bimodal X-ray and Infrared Imaging of an Organometallic Derivative of Praziquantel in *Schistosoma mansoni*, *ChemBioChem* **2016**, *17*(11), 1004–1007.
- [78] Wedding, J.L., Harris, H.H., Bader, C.A., Plush, S.E., Mak, R., Massi, M., Brooks, D.A., Lai, B., Vogt, S., Werrett, M.V., Simpson, P.V., Skelton, B.W., and Stagni, S., Intracellular distribution and stability of a luminescent rhenium(i) tricarbonyl tetrazolato complex using epifluorescence microscopy in conjunction with X-ray fluorescence imaging, *Metallomics* **2017**, *9*(4), 382–390.
- [79] Hostachy, S., Swiecicki, J.M., Sandt, C., Delsuc, N., and Policar, C., Photophysical properties of single core multimodal probe for imaging (SCoMPI) in a membrane model and in cells, *Dalton Transactions* **2016**, *45*(7), 2791–2795.
- [80] Hostachy, S., *Rhenium tricarbonyl complexes for the labelling and multimodal imaging of peptides and proteins*, Ph.D. thesis, Université Pierre et Marie Curie **2015**.

BIBLIOGRAPHIE

- [81] Clède, S., Delsuc, N., Laugel, C., Lambert, F., Sandt, C., Baillet-Guffroy, A., and Pollicar, C., An easy-to-detect nona-arginine peptide for epidermal targeting, *Chemical Communications* **2015**, 51(13), 2687–9.
- [82] Spatazza, J., Lullo, E.D., Joliot, A., Dupont, E., Moya, K.L., and Prochiantz, A., Homeoprotein Signaling in Development, Health, and Disease : A Shaking of Dogmas Offers Challenges and Promises from Bench to Bed, *Pharmacological Reviews* **2013**, 65(1), 90–104.
- [83] Fuchs, J., Stettler, O., Alvarez-Fischer, D., Prochiantz, A., Moya, K.L., and Joshi, R.L., Engrailed signaling in axon guidance and neuron survival, *European Journal of Neuroscience* **2012**, 35(12), 1837–1845.
- [84] Maizel, A., Bensaude, O., Prochiantz, A., and Joliot, A., A short region of its homeodomain is necessary for engrailed nuclear export and secretion, *Development* **1999**, 126(14), 3183–3190.
- [85] Prochiantz, A. and Joliot, A., Can transcription factors function as cell–cell signaling molecules?, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2003**, 4(10), 814–819.
- [86] Brunet, I., Nardo, A.A.D., Sonnier, L., Beurdeley, M., and Prochiantz, A., The topological role of homeoproteins in the developing central nervous system, *Trends in Neurosciences* **2007**, 30(6), 260–267.
- [87] Carlier, L., Balayssac, S., Cantrelle, F.X., Khemtémourian, L., Chassaing, G., Joliot, A., and Lequin, O., Investigation of Homeodomain Membrane Translocation Properties : Insights from the Structure Determination of Engrailed-2 Homeodomain in Aqueous and Membrane-Mimetic Environments, *Biophysical Journal* **2013**, 105(3), 667–678.
- [88] Krishnamurthy, V.M., Kaufman, G.K., Urbach, A.R., Gitlin, I., Gudiksen, K.L., Weibel, D.B., and Whitesides, G.M., Carbonic Anhydrase as a Model for Biophysical and Physical-Organic Studies of Proteins and Protein-Ligand Binding, *Chemical Reviews* **2008**, 108(3), 946–1051.
- [89] Imai Fujishima, S., Yasui, R., Miki, T., Ojida, A., and Hamachi, I., Ligand-Directed Acyl Imidazole Chemistry for Labeling of Membrane-Bound Proteins on Live Cells, *Journal of the American Chemical Society* **2012**, 134(9), 3961–3964.
- [90] Campbell, N.A. and Reece, J.B., *Biology 8th edition*, Pearson **2007**.
- [91] Hoitzing, H., Johnston, I.G., and Jones, N.S., What is the function of mitochondrial networks? A theoretical assessment of hypotheses and proposal for future research, *BioEssays* **2015**, 37(6), 687–700.
- [92] Fawcett, D.W., *The Cell 2d ed.*, Saunders **1981**.
- [93] Voet, D. and Voet, J.G., *Biochemistry 4th edition*, Wiley **2011**.
- [94] Lodish, H. and coll., *Molecular cell biology 8th edition*, W.H. Freeman **2016**.

- [95] Chrétien, D., Bénil, P., Ha, H.H., Keipert, S., El-Khoury, R., Chang, Y.T., Jastroch, M., Jacobs, H.T., Rustin, P., and Rak, M., Mitochondria are physiologically maintained at close to 50 °C, *PLOS Biology* **2018**, *16*(1), e2003992.
- [96] Wang, C. and Youle, R.J., The Role of Mitochondria in Apoptosis, *Annual Review of Genetics* **2009**, *43*(1), 95–118.
- [97] Sakhrani, N.M. and Padh, H., Organelle targeting : third level of drug targeting, *Drug Design, Development and Therapy* **2013**, *7*, 585 – 599.
- [98] Smith, R.A., Hartley, R.C., and Murphy, M.P., Mitochondria-Targeted Small Molecule Therapeutics and Probes, *Antioxidants & Redox Signaling* **2011**, *15*(12), 3021–3038.
- [99] Ross, M.F., Kelso, G.F., Blaikie, F.H., James, A.M., Cochemé, H.M., Filipovska, A., Ros, T., Hurd, T.R., Smith, R.A.J., and Murphy, M.P., Lipophilic triphenylphosphonium cations as tools in mitochondrial bioenergetics and free radical biology, *Biochemistry (Moscow)* **2005**, *70*(2), 222–230.
- [100] Lewis, M.R. and Lewis, W.H., Mitochondria (and other cytoplasmic structures) in tissue cultures, *American Journal of Anatomy* **1915**, *17*(3), 339–401.
- [101] Smith, R.A.J., Porteous, C.M., Coulter, C.V., and Murphy, M.P., Selective targeting of an antioxidant to mitochondria, *European Journal of Biochemistry* **1999**, *263*(3), 709–716.
- [102] Kelso, G.F., Porteous, C.M., Coulter, C.V., Hughes, G., Porteous, W.K., Ledgerwood, E.C., Smith, R.A.J., and Murphy, M.P., Selective Targeting of a Redox-active Ubiquinone to Mitochondria within Cells : antioxidant and antiapoptotic properties, *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*(7), 4588–4596.
- [103] Dessolin, J., Schuler, M., Quinart, A., Giorgi, F.D., Ghosez, L., and Ichas, F., Selective targeting of synthetic antioxidants to mitochondria : towards a mitochondrial medicine for neurodegenerative diseases, *European Journal of Pharmacology* **2002**, *447*(23), 155 – 161.
- [104] Murphy, M.P., Echtay, K.S., Blaikie, F.H., Asin-Cayuela, J., Cochemé, H.M., Green, K., Buckingham, J.A., Taylor, E.R., Hurrell, F., Hughes, G., Miwa, S., Cooper, C.E., Svistunenko, D.A., Smith, R.A.J., and Brand, M.D., Superoxide Activates Uncoupling Proteins by Generating Carbon-centered Radicals and Initiating Lipid Peroxidation : studies using a mitochondria-targeted spin trap derived from α -phenyl-N-tert-butyl nitron, *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*(49), 48534–48545.
- [105] Dhanasekaran, A., Kotamraju, S., Karunakaran, C., Kalivendi, S.V., Thomas, S., Joseph, J., and Kalyanaraman, B., Mitochondria superoxide dismutase mimetic inhibits peroxide-induced oxidative damage and apoptosis : Role of mitochondrial superoxide, *Free Radical Biology and Medicine* **2005**, *39*(5), 567 – 583.
- [106] Han, J., Han, M.S., and Tung, C.H., A non-toxic fluorogenic dye for mitochondria labeling, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2013**, *1830*(11), 5130 – 5135.

- [107] Zhao, K., Zhao, G.M., Wu, D., Soong, Y., Birk, A.V., Schiller, P.W., and Szeto, H.H., Cell-permeable Peptide Antioxidants Targeted to Inner Mitochondrial Membrane inhibit Mitochondrial Swelling, Oxidative Cell Death, and Reperfusion Injury, *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*(33), 34682–34690.
- [108] Ehrenberg, B., Montana, V., Wei, M., Wuskell, J., and Loew, L., Membrane potential can be determined in individual cells from the nernstian distribution of cationic dyes, *Biophysical Journal* **1988**, *53*(5), 785–794.
- [109] Loew, L., Tuft, R., Carrington, W., and Fay, F., Imaging in five dimensions : time-dependent membrane potentials in individual mitochondria, *Biophysical Journal* **1993**, *65*(6), 2396–2407.
- [110] Horton, K.L., Stewart, K.M., Fonseca, S.B., Guo, Q., and Kelley, S.O., Mitochondria-Penetrating Peptides, *Chemistry & Biology* **2008**, *15*(4), 375 – 382.
- [111] Johnson, I. and Spence, M.T., A Guide to Fluorescent Probes and Labelling Technologies, *Invitrogen Molecular Probes* **2010**, *11*.
- [112] Minamikawa, T., Sriratana, A., Williams, D., Bowser, D., Hill, J., and Nagley, P., Chloromethyl-X-rosamine (MitoTracker Red) photosensitises mitochondria and induces apoptosis in intact human cells, *Journal of Cell Science* **1999**, *112*(14), 2419–2430.
- [113] Fernández-Moreira, V., Thorp-Greenwood, F.L., Amoroso, A.J., Cable, J., Court, J.B., Gray, V., Hayes, A.J., Jenkins, R.L., Kariuki, B.M., Lloyd, D., Millet, C.O., Williams, C.F., and Coogan, M.P., Uptake and localisation of rhenium fac-tricarbonyl polypyridyls in fluorescent cell imaging experiments, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2010**, *8*(17), 3888.
- [114] Amoroso, A.J., Arthur, R.J., Coogan, M.P., Court, J.B., Fernández-Moreira, V., Hayes, A.J., Lloyd, D., Millet, C., and Pope, S.J.A., 3-Chloromethylpyridyl bipyridine fac-tricarbonyl rhenium : a thiol-reactive luminophore for fluorescence microscopy accumulates in mitochondria, *New Journal of Chemistry* **2008**, *32*(7), 1097.
- [115] Skiba, J., Bernaś, T., Trzybiński, D., Woźniak, K., Ferraro, G., Marasco, D., Merlino, A., Shafikov, M., Czerwieńec, R., and Kowalski, K., Mitochondria Targeting with Luminescent Rhenium(I) Complexes, *Molecules* **2017**, *22*(5), 809.
- [116] Fery-Forgues, S. and Delavaux-Nicot, B., Ferrocene and ferrocenyl derivatives in luminescent systems, *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry* **2000**, *132*(3), 137 – 159.
- [117] Giordano, P.J. and Wrighton, M.S., The nature of the lowest excited state in fac-tricarbonylhalobis(4-phenylpyridine)rhenium(I) and fac-tricarbonylhalobis(4,4'-bipyridine)rhenium(I) : emissive organometallic complexes in fluid solution, *Journal of the American Chemical Society* **1979**, *101*(11), 2888–2897.
- [118] Chu, W.K., Ko, C.C., Chan, K.C., Yiu, S.M., Wong, F.L., Lee, C.S., and Roy, V.A.L., A Simple Design for Strongly Emissive Sky-Blue Phosphorescent Neutral Rhenium Complexes : Synthesis, Photophysics, and Electroluminescent Devices, *Chemistry of Materials* **2014**, *26*(8), 2544–2550.

- [119] Ye, R.R., Tan, C.P., Chen, M.H., Hao, L., Ji, L.N., and Mao, Z.W., Mono- and Dinuclear Phosphorescent Rhenium(I) Complexes : Impact of Subcellular Localization on Anticancer Mechanisms, *Chemistry A European Journal* **2016**, *22*(23), 7800–7809.
- [120] Medina, R.A. and Owen, G.I., Glucose transporters : expression, regulation and cancer, *Biological Research* **2002**, *35*(1).
- [121] Louie, M.W., Liu, H.W., Lam, M.H.C., Lam, Y.W., and Lo, K.K.W., Luminescent Rhenium(I) Polypyridine Complexes Appended with an α -D-Glucose Moiety as Novel Biomolecular and Cellular Probes, *Chemistry - A European Journal* **2011**, *17*(30), 8304–8308.
- [122] Imstepf, S., Pierroz, V., Rubbiani, R., Felber, M., Fox, T., Gasser, G., and Alberto, R., Organometallic Rhenium Complexes Divert Doxorubicin to the Mitochondria, *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *55*(8), 2792–2795.
- [123] Noor, F., Wüstholtz, A., Kinscherf, R., and Metzler-Nolte, N., A Cobaltocenium Peptide Bioconjugate Shows Enhanced Cellular Uptake and Directed Nuclear Delivery, *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*(16), 2429–2432.
- [124] Pollard, H., Remy, J.S., Loussouarn, G., Demolombe, S., Behr, J.P., and Escande, D., Polyethylenimine but Not Cationic Lipids Promotes Transgene Delivery to the Nucleus in Mammalian Cells, *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*(13), 7507–7511.
- [125] Nakielny, S. and Dreyfuss, G., Transport of Proteins and {RNAs} in and out of the Nucleus, *Cell* **1999**, *99*(7), 677 – 690.
- [126] Görlich, D. and Kutay, U., Transport Between the Cell Nucleus and the Cytoplasm, *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **1999**, *15*(1), 607–660.
- [127] Chan, C.K. and Jans, D.A., Using nuclear targeting signals to enhance non-viral gene transfer, *Immunology and Cell Biology* **2002**, *80*(2), 119–130.
- [128] Feldherr, C.M., Lanford, R.E., and Akin, D., Signal-mediated nuclear transport in simian virus 40-transformed cells is regulated by large tumor antigen., *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1992**, *89*(22), 11002–11005.
- [129] Conti, E., Uy, M., Leighton, L., Blobel, G., and Kuriyan, J., Crystallographic Analysis of the Recognition of a Nuclear Localization Signal by the Nuclear Import Factor Karyopherin α , *Cell* **1998**, *94*(2), 193–204.
- [130] Puckett, C.A. and Barton, J.K., Targeting a ruthenium complex to the nucleus with short peptides, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, *18*(10), 3564 – 3569.
- [131] Brunner, J. and Barton, J.K., Targeting DNA Mismatches with Rhodium Intercalators Functionalized with a Cell-Penetrating Peptide, *Biochemistry* **2006**, *45*(40), 12295–12302.
- [132] Puckett, C.A. and Barton, J.K., Fluorescein Redirects a Ruthenium Octaarginine Conjugate to the Nucleus, *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*(25), 8738–8739.

BIBLIOGRAPHIE

- [133] Metcalfe, C., Webb, M., and Thomas, J.A., A facile synthetic route to bimetallic ReI complexes containing two dppz DNA intercalating ligands, *Chemical Communications* **2002**, *18*, 2026–2027.
- [134] Lo, K.K.W. and Tsang, K.H.K., Bifunctional Luminescent Rhenium(I) Complexes Containing an Extended Planar Diimine Ligand and a Biotin Moiety, *Organometallics* **2004**, *23*(12), 3062–3070.
- [135] Foxon, S., Phillips, T., Gill, M., Towrie, M., Parker, A., Webb, M., and Thomas, J., A Multifunctional Light Switch : DNA Binding and Cleavage Properties of a Hetero-bimetallic Ruthenium–Rhenium Dipyrrophenazine Complex, *Angewandte Chemie* **2007**, *119*(20), 3760–3762.
- [136] Smith, J.A., George, M.W., and Kelly, J.M., Transient spectroscopy of dipyrrophenazine metal complexes which undergo photo-induced electron transfer with DNA, *Coordination Chemistry Reviews* **2011**, *255*(21-22), 2666–2675.
- [137] Thornton, N.B. and Schanze, K.S., A chromophore-quencher-based luminescence probe for DNA, *Inorganic Chemistry* **1993**, *32*(23), 4994–4995.
- [138] Agorastos, N., Borsig, L., Renard, A., Antoni, P., Viola, G., Spingler, B., Kurz, P., and Alberto, R., Cell-specific and nuclear targeting with [M(CO)(3)](+) (M=(99m)Tc, Re)-based complexes conjugated to acridine orange and bombesin, *Chemistry A European Journal* **2007**, *13*(14), 3842–52.
- [139] Mullice, L.A., Laye, R.H., Harding, L.P., Buurma, N.J., and Pope, S.J.A., Rhenium complexes of chromophore-appended dipicolylamine ligands : syntheses, spectroscopic properties, DNA binding and X-ray crystal structure, *New Journal of Chemistry* **2008**, *32*(12), 2140.
- [140] Esteves, T., Xavier, C., Gama, S., Mendes, F., Raposinho, P.D., Marques, F., Paulo, A., Pessoa, J.C., Rino, J., Viola, G., and Santos, I., Tricarbonyl M(I) (M = Re, 99mTc) complexes bearing acridine fluorophores : synthesis, characterization, DNA interaction studies and nuclear targeting, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2010**, *8*(18), 4104.
- [141] Uhlmann, E., Peyman, A., Breipohl, G., and Will, D.W., PNA : Synthetic Polyamide Nucleic Acids with Unusual Binding Properties, *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, *37*(20), 2796–2823.
- [142] Nielsen, P.E. and Appella, D.H., editors, *Peptide Nucleic Acids : Protocols and Applications*, Humana Press **2014**, doi :10.1007/978-1-62703-553-8.
- [143] Ferri, E., Donghi, D., Panigati, M., Prencipe, G., D’Alfonso, L., Zanoni, I., Baldoli, C., Maiorana, S., D’Alfonso, G., and Licandro, E., Luminescent conjugates between dinuclear rhenium(i) complexes and peptide nucleic acids (PNA) for cell imaging and DNA targeting, *Chemical Communications* **2010**, *46*(34), 6255.
- [144] Li, C., Yu, M., Sun, Y., Wu, Y., Huang, C., and Li, F., A Nonemissive Iridium(III) Complex That Specifically Lights-Up the Nuclei of Living Cells, *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*(29), 11231–11239.

- [145] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P., *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, 5 edition **2007**.
- [146] Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J., *Molecular Cell Biology* (4th edition), *Biochemistry and Molecular Biology Education* **2001**, *29*(3), 126–128.
- [147] Schwarz, D.S. and Blower, M.D., The endoplasmic reticulum : structure, function and response to cellular signaling, *Cellular and Molecular Life Sciences* **2016**, *73*(1), 79–94.
- [148] Shibata, Y., Shemesh, T., Prinz, W.A., Palazzo, A.F., Kozlov, M.M., and Rapoport, T.A., Mechanisms Determining the Morphology of the Peripheral ER, *Cell* **2010**, *143*(5), 774 – 788.
- [149] Meinig, J.M., Fu, L., and Peterson, B.R., Synthesis of Fluorophores that Target Small Molecules to the Endoplasmic Reticulum of Living Mammalian Cells, *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54*(33), 9696–9699.
- [150] Peng, T. and Yang, D., Construction of a Library of Rhodol Fluorophores for Developing New Fluorescent Probes, *Organic Letters* **2010**, *12*(3), 496–499.
- [151] Raszeja, L.J., Siegmund, D., Cordes, A.L., Guldenhaupt, J., Gerwert, K., Hahn, S., and Metzler-Nolte, N., Asymmetric rhenium tricarbonyl complexes show superior luminescence properties in live cell imaging, *Chemical Communications* **2017**, *53*(5), 905–908.
- [152] Verma, S.K., Kumari, P., Ansari, S.N., Ansari, M.O., Deori, D., and Mobin, S.M., A novel mesoionic carbene based highly fluorescent Pd(ii) complex as an endoplasmic reticulum tracker in live cells, *Dalton Transactions* **2018**, *47*(44), 15646–15650.
- [153] Fabene, P.F. and Bentivoglio, M., Editorial, *Brain Research Bulletin* **1998**, *47*(3), 195 – 198.
- [154] Tang, J., Yin, H.Y., and Zhang, J.L., A luminescent aluminium salen complex allows for monitoring dynamic vesicle trafficking from the Golgi apparatus to lysosomes in living cells, *Chemical Science* **2018**, *9*(7), 1931–1939.
- [155] Day, K.J., Staehelin, L.A., and Glick, B.S., A three-stage model of Golgi structure and function, *Histochemistry and Cell Biology* **2013**, *140*(3), 239–249.
- [156] Glick, B.S. and Nakano, A., Membrane Traffic Within the Golgi Apparatus, *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **2009**, *25*(1), 113–132.
- [157] Zhang, J.X., Li, H., Chan, C.F., Lan, R., Chan, W.L., Law, G.L., Wong, W.K., and Wong, K.L., A potential water-soluble ytterbium-based porphyrin–cyclen dual bio-probe for Golgi apparatus imaging and photodynamic therapy, *Chemical Communications* **2012**, *48*(77), 9646.
- [158] Jayakumar, M.K.G., Idris, N.M., and Zhang, Y., Remote activation of biomolecules in deep tissues using near-infrared-to-UV upconversion nanotransducers, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012**, *109*(22), 8483–8488.

BIBLIOGRAPHIE

- [159] Frangioni, J.V., In vivo near-infrared fluorescence imaging, *Current Opinion in Chemical Biology* **2003**, 7(5), 626 – 634.
- [160] Ho, C.L., Wong, K.L., Kong, H.K., Ho, Y.M., Chan, C.T.L., Kwok, W.M., Leung, K.S.Y., Tam, H.L., Lam, M.H.W., Ren, X.F., Ren, A.M., Feng, J.K., and Wong, W.Y., A strong two-photon induced phosphorescent Golgi-specific in vitro marker based on a heteroleptic iridium complex, *Chemical Communications* **2012**, 48(19), 2525.
- [161] Wilchek, M. and Bayer, E.A., The avidin-biotin complex in bioanalytical applications, *Analytical Biochemistry* **1988**, 171(1), 1 – 32.
- [162] Lo, K.K.W., Louie, M.W., Sze, K.S., and Lau, J.S.Y., Rhenium(I) Polypyridine Biotin Isothiocyanate Complexes as the First Luminescent Biotinylation Reagents : Synthesis, Photophysical Properties, Biological Labeling, Cytotoxicity, and Imaging Studies, *Inorganic Chemistry* **2008**, 47(2), 602–611.
- [163] Weissmann, B. and Meyer, K., The Structure of Hyalobiuronic Acid and of Hyaluronic Acid from Umbilical Cord, *Journal of the American Chemical Society* **1954**, 76(7), 1753–1757.
- [164] Shiedlin, A., Bigelow, R., Christopher, W., Arbabi, S., Yang, L., Maier, R.V., Wainwright, N., Childs, A., and Miller, R.J., Evaluation of Hyaluronan from Different Sources : Streptococcus zooepidemicus, Rooster Comb, Bovine Vitreous, and Human Umbilical Cord, *Biomacromolecules* **2004**, 5(6), 2122–2127.
- [165] Pavicic, T., Gauglitz, G.G., Lersch, P., Schwach-Abdellaoui, K., Malle, B., Korting, H.C., and Farwick, M., Efficacy of Cream-Based Novel Formulations of Hyaluronic Acid of Different Molecular Weights in Anti-Wrinkle Treatment, *Journal of Drugs in Dermatology* **2011**, 10(9), 990–1000.
- [166] Kogan, G., Soltés, L., Stern, R., and Gemeiner, P., Hyaluronic acid : a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications, *Biotechnology Letters* **2007**, 29(1), 17–25.
- [167] Humbert, P., *Chimie, dermo-cosmétique et beauté*, EDP Sciences **2016**.
- [168] Abellan, M.A., Ayadh, M., Feulvarch, E., Zahouani, H., and Bergheau, J.M., Caractérisation des paramètres mécaniques de la peau humaine jeune in vivo par essais d'indentation sans contact, *Congrès Français de Mécanique 2015 (Lyon)* **2015**.
- [169] OpenStax, Anatomy & Physiology, <http://cnx.org/contents/14fb4ad7-39a1-4eee-ab6e-3ef2482e3e2208.24>, openStax CNX. Feb 26, 2016.
- [170] Förster, M., Bolzinger, M.A., Fessi, H., and Briançon, S., Topical delivery of cosmetics and drugs. Molecular aspects of percutaneous absorption and delivery, *European journal of dermatology* **2009**, 19, 309–23.
- [171] Merle, C. and Baillet-Guffroy, A., Physical and chemical perturbations of the supramolecular organization of the stratum corneum lipids : In vitro to ex vivo study, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2009**, 1788(5), 1092–1098.

- [172] Cotte, M., Dumas, P., Besnard, M., Tchoreloff, P., and Walter, P., Synchrotron FT-IR microscopic study of chemical enhancers in transdermal drug delivery : example of fatty acids, *Journal of Controlled Release* **2004**, *97*(2), 269–281.
- [173] Garidel, P., Mid-FTIR-Microspectroscopy of stratum corneum single cells and stratum corneum tissue, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2002**, *4*(22), 5671–5677.
- [174] Golden, G.M., Guzek, D.B., Harris, R.R., McKie, J.E., and Potts, R.O., Lipid Thermotropic Transitions in Human Stratum Corneum, *Journal of Investigative Dermatology* **1986**, *86*(3), 255 – 259.
- [175] Jackson, M. and Mantsch, H.H., The Use and Misuse of FTIR Spectroscopy in the Determination of Protein Structure, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **1995**, *30*(2), 95–120.
- [176] Kapuscinski, J., DAPI : a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech Histochem* **70** :220-233, *Biotechnic & Histochemistry* **1995**, *70*, 220–33.
- [177] Portugal, J. and Waring, M.J., Assignment of DNA binding sites for 4,6-diamidine-2-phenylindole and bisbenzimidazole (Hoechst 33258). A comparative footprinting study, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1988**, *949*(2), 158 – 168.
- [178] Chazotte, B., Labeling Nuclear DNA Using DAPI, *Cold Spring Harb Protoc* **2011**.
- [179] Henry, L., Delsuc, N., Laugel, C., Lambert, F., Sandt, C., Hostachy, S., Bernard, A.S., Bertrand, H.C., Grimaud, L., Baillet-Guffroy, A., and Policar, C., Labeling of Hyaluronic Acids with a Rhenium-tricarbonyl Tag and Percutaneous Penetration Studied by Multimodal Imaging, *Bioconjugate Chemistry* **2018**, *29*(4), 987–991.
- [180] Subongkot, T., Pamornpathomkul, B., Rojanarata, T., Opanasopit, P., and Ngawhirunpat, T., Investigation of the mechanism of enhanced skin penetration by ultra-deformable liposomes., *International Journal of Nanomedicine* **2014**, *9*, 3539–3550.
- [181] Ma, S.Y., Nam, Y.R., Jeon, J., Rho, J.K., Lee, D.E., Choi, D.S., Jang, B.S., and Park, S.H., Simple and efficient radiolabeling of hyaluronic acid and its in vivo evaluation via oral administration, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **2015**, *305*(1), 139–145.
- [182] Yin, H., Zhao, F., Zhang, D., and Li, J., Hyaluronic acid conjugated β -cyclodextrin-oligoethylenimine star polymer for CD44-targeted gene delivery, *International Journal of Pharmaceutics* **2015**, *483*(1), 169 – 179.
- [183] Schanté, C.E., Zuber, G., Herlin, C., and Vandamme, T.F., Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications, *Carbohydrate Polymers* **2011**, *85*(3), 469 – 489.
- [184] D’Este, M., Eglin, D., and Alini, M., A systematic analysis of DMTMM vs EDC/NHS for ligation of amines to Hyaluronan in water, *Carbohydrate Polymers* **2014**, *108*, 239 – 246.

- [185] de Nooy, A.E.J., Capitani, D., Masci, G., and Crescenzi, V., Ionic Polysaccharide Hydrogels via the Passerini and Ugi Multicomponent Condensations : Synthesis, Behavior and Solid-State NMR Characterization, *Biomacromolecules* **2000**, *1*(2), 259–267.
- [186] Crescenzi, V., Francescangeli, A., Capitani, D., Mannina, L., Renier, D., and Bellini, D., Hyaluronan networking via Ugi’s condensation using lysine as cross-linker diamine, *Carbohydrate Polymers* **2003**, *53*(3), 311 – 316.
- [187] Maleki, A., niksen, A.L.K., and Nyström, B., Characterization of the chemical degradation of hyaluronic acid during chemical gelation in the presence of different cross-linker agents, *Carbohydrate Research* **2007**, *342*(18), 2776 – 2792.
- [188] Fudala, R., Mummert, M.E., Gryczynski, Z., and Gryczynski, I., Fluorescence detection of hyaluronidase, *Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology* **2011**, *104*(3), 473–477.
- [189] de Belder, A.N. and Wik, K., Preparation and properties of fluorescein-labelled hyaluronate, *Carbohydrate Research* **1975**, *44*(2), 251 – 257.
- [190] F. Lane, C., Sodium Cyanoborohydride - A Highly Selective Reducing Agent for Organic Functional Groups, *Synthesis* **1975**, *03*, 135–146.
- [191] El Kaim, L. and Grimaud, L., Beyond the Ugi reaction : less conventional interactions between isocyanides and iminium species, *Tetrahedron* **2009**, *65*(11), 2153–2171.
- [192] Cheron, N., Ramozzi, R., El Kaim, L., Grimaud, L., and Fleurat-Lessard, P., Challenging 50 years of established views on Ugi reaction : a theoretical approach, *Journal of Organic Chemistry* **2012**, *77*(3), 1361–6.
- [193] Creaser, C.S., Fey, M.A., and Stephenson, G.R., Environment sensitivity of IR-active metal carbonyl probe groups, *Spectrochimica Acta Part A : Molecular Spectroscopy* **1994**, *50*(7), 1295–1299.
- [194] Fernández, E., Rodríguez, G., Hostachy, S., Clède, S., Cócera, M., Sandt, C., Lambert, F., de la Maza, A., Policar, C., and López, O., A rhenium tris-carbonyl derivative as a model molecule for incorporation into phospholipid assemblies for skin applications, *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* **2015**, *131*, 102–107.
- [195] Mendelsohn, R., Flach, C.R., and Moore, D.J., Determination of molecular conformation and permeation in skin via IR spectroscopy, microscopy, and imaging, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2006**, *1758*(7), 923–933.
- [196] Rothmund, P.W.K., Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns, *Nature* **2006**, *440*, 297–302.
- [197] de Oteyza, D.G., Gorman, P., Chen, Y.C., Wickenburg, S., Riss, A., Mowbray, D.J., Etkin, G., Pedramrazi, Z., Tsai, H.Z., Rubio, A., Crommie, M.F., and Fischer, F.R., Direct Imaging of Covalent Bond Structure in Single-Molecule Chemical Reactions, *Science* **2013**, *340*(6139), 1434–1437.

- [198] Murugesapillai, D., McCauley, M.J., Maher, L.J., and Williams, M.C., Single-molecule studies of high-mobility group B architectural DNA bending proteins, *Biophysical Reviews* **2017**, *9*(1), 17–40.
- [199] Henry, L., Bacle, P., and Rossi-Gendron, C., La Microscopie à Force Atomique pour l'observation de molécules avec une résolution atomique **2014**, <http://culturesciences.chimie.ens.fr/>, Consulté le 15.10.2018.
- [200] Binnig, G., Quate, C.F., and Gerber, C., Atomic Force Microscope, *Physical Review Letters* **1986**, *56*(9), 930–933.
- [201] Dazzi, A., Kjoller, K., and Reading, M., High Frequency Deflection Measurement of IR Absorption **2008**.
- [202] Dazzi, A., Konstantin, V., Policar, C., Reading, M., Kjoller, K., and Prater, C.B., High Frequency Deflection Measurement of IR Absorption **2012**.
- [203] Dazzi, A. and Policar, C., Chapter 9 - AFM-IR : photothermal infrared nanospectroscopy : Application to cellular imaging, in C.Pradier and Y. Chabal, editors, *Biointerface Characterization by Advanced IR Spectroscopy*, pages 245 – 278, Elsevier, Amsterdam **2011**, doi :<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53558-0.00009-6>.
- [204] Dazzi, A., Prater, C.B., Hu, Q., Chase, D.B., Rabolt, J.F., and Marcott, C., AFM-IR : Combining Atomic Force Microscopy and Infrared Spectroscopy for Nanoscale Chemical Characterization, *Applied Spectroscopy* **2012**, *66*(12), 1365–1384.
- [205] Dazzi, A., PhotoThermal Induced Resonance. Application to Infrared Spectromicroscopy, in *Thermal Nanosystems and Nanomaterials*, pages 469–503, Springer Berlin Heidelberg **2009**, doi :[10.1007/978-3-642-04258-4_16](https://doi.org/10.1007/978-3-642-04258-4_16).
- [206] Dazzi, A., Glotin, F., and Carminati, R., Theory of infrared nanospectroscopy by photothermal induced resonance, *Journal of Applied Physics* **2010**, *107*(12), 124519.
- [207] Prater, C.B., Kjoller, K., Shetty, R., and Dazzi, A., Spectroscopy : AFM improves resolution of IR spectroscopy, *Laser Focus World* **2011**, *47*, 52–54.
- [208] Mayet, C., Deniset-Besseau, A., Prazeres, R., Ortega, J.M., and Dazzi, A., Analysis of bacterial polyhydroxybutyrate production by multimodal nanoimaging, *Biotechnology advances* **2013**, *31*(3), 369–374.
- [209] Dazzi, A., Prazeres, R., Glotin, F., and Ortega, J., Subwavelength infrared spectromicroscopy using an AFM as a local absorption sensor, *Infrared Physics & Technology* **2006**, *49*(1), 113 – 121.
- [210] Mayet, C., Dazzi, A., Prazeres, R., Allot, F., Glotin, F., and Ortega, J.M., Sub-100 nm IR spectromicroscopy of living cells, *Optics Letters* **2008**, *33*(14), 1611.
- [211] Mayet, C., Dazzi, A., Prazeres, R., Ortega, J.M., and Jaillard, D., In situ identification and imaging of bacterial polymer nanogranules by infrared nanospectroscopy, *Analyst* **2010**, *135*, 2540–2545.

BIBLIOGRAPHIE

- [212] Dazzi, A., Prazeres, R., Glotin, F., and Ortega, J.M., Local infrared microspectroscopy with subwavelength spatial resolution with an atomic force microscope tip used as a photothermal sensor, *Optics Letters* **2005**, *30*(18), 2388.
- [213] Siegel, R., Naishadham, D., and Jemal, A., Cancer statistics, 2012, *CA : A Cancer Journal for Clinicians* **2012**, *62*(1), 10–29.
- [214] Hillard, E., Vessières, A., Thouin, L., Jaouen, G., and Amatore, C., Ferrocene-Mediated Proton-Coupled Electron Transfer in a Series of Ferrocifen-Type Breast-Cancer Drug Candidates, *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*(2), 285–290.
- [215] Yao, D., Zhang, F., Yu, L., Yang, Y., van Breemen, R.B., and Bolton, J.L., Synthesis and Reactivity of Potential Toxic Metabolites of Tamoxifen Analogues : Droloxifene and Toremifene *o*-Quinones, *Chemical Research in Toxicology* **2001**, *14*(12), 1643–1653.
- [216] Keppler, B.K., *Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*, Wiley-VCH, Weinheim **1993**.
- [217] Köpf-Maier, P., Complexes of metals other than platinum as antitumour agents, *European Journal of Clinical Pharmacology* **1994**, *47*(1), 1–16.
- [218] Clarke, M.J., Zhu, F., and Frasca, D.R., Non-Platinum Chemotherapeutic Metallopharmaceuticals, *Chemical Reviews* **1999**, *99*(9), 2511–2534.
- [219] Wang, D. and Lippard, S.J., Cellular processing of platinum anticancer drugs, *Nature Reviews Drug Discovery* **2005**, *4*(4), 307–320.
- [220] Bruijninx, P.C. and Sadler, P.J., New trends for metal complexes with anticancer activity, *Current Opinion in Chemical Biology* **2008**, *12*(2), 197 – 206.
- [221] Jackson, A., Davis, J., Pither, R.J., Rodger, A., and Hannon, M.J., Estrogen-Derived Steroidal Metal Complexes : Agents for Cellular Delivery of Metal Centers to Estrogen Receptor-Positive Cells, *Inorganic Chemistry* **2001**, *40*(16), 3964–3973.
- [222] Top, S., Kaloun, E.B., Vessières, A., Leclercq, G., Laïos, I., Ourevitch, M., Deuschel, C., McGlinchey, M.J., and Jaouen, G., Tamoxifen Derivatives for Delivery of the Antitumoral (DACH)Pt Group : Selective Synthesis by McMurry Coupling, and Biochemical Behaviour, *ChemBioChem* **2003**, *4*(8), 754–761.
- [223] Cassino, C., Gabano, E., Ravera, M., Cravotto, G., Palmisano, G., Vessières, A., Jaouen, G., Mundwiler, S., Alberto, R., and Osella, D., Platinum(II) and technetium(I) complexes anchored to ethynylestradiol : a way to drug targeting and delivery, *Inorganica Chimica Acta* **2004**, *357*(7), 2157 – 2166.
- [224] Jaouen, G., Top, S., Vessières, A., Leclercq, G., and McGlinchey, M.J., The First Organometallic Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs) and Their Relevance to Breast Cancer, *Current Medicinal Chemistry* **2004**, *11*(18), 2505–2517.
- [225] Pigeon, P., Top, S., Vessières, A., Huché, M., Hillard, E.A., Salomon, E., and Jaouen, G., Selective Estrogen Receptor Modulators in the Ruthenocene Series. Synthesis and Biological Behavior, *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *48*(8), 2814–2821.

- [226] Jaouen, G., Top, S., Vessières, A., Pigeon, P., Leclercq, G., and Laios, I., First anti-estrogen in the cyclopentadienyl rhenium tricarbonyl series. Synthesis and study of antiproliferative effects, *Chemical Communications* **2001**, pages 383–384.
- [227] Jaouen, G., Vessières, A., and Top, S., Ferrocifen type anti cancer drugs, *Chemical Society Reviews* **2015**, *44*(24), 8802–8817.
- [228] Wang, Y., Pigeon, P., Top, S., McGlinchey, M.J., and Jaouen, G., Organometallic Antitumor Compounds : Ferrocifens as Precursors to Quinone Methides, *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54*(35), 10230–10233.
- [229] Citta, A., Folda, A., Bindoli, A., Pigeon, P., Top, S., Vessières, A., Salmain, M., Jaouen, G., and Rigobello, M.P., Evidence for Targeting Thioredoxin Reductases with Ferrocenyl Quinone Methides. A Possible Molecular Basis for the Antiproliferative Effect of Hydroxyferrocifens on Cancer Cells, *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *57*(21), 8849–8859.
- [230] Licandro, E., Panigati, M., Salmain, M., and Vessières, A., Organometallic Bioprobes for Cellular Imaging, in *Bioorganometallic Chemistry*, pages 339–392, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA **2014**, doi :10.1002/9783527673438.ch11.
- [231] Gazi, E., Dwyer, J., Lockyer, N.P., Miyan, J., Gardner, P., Hart, C., Brown, M., and Clarke, N.W., Fixation protocols for subcellular imaging by synchrotron-based Fourier transform infrared microspectroscopy, *Biopolymers* **2004**, *77*(1), 18–30.
- [232] Clède, S., Lambert, F., Sandt, C., Gueroui, Z., Delsuc, N., Dumas, P., Vessières, A., and Policar, C., Synchrotron radiation FTIR detection of a metal-carbonyl tamoxifen analog. Correlation with luminescence microscopy to study its subcellular distribution, *Biotechnology Advances* **2013**, *31*(3), 393–395.
- [233] Wang, Y., Heinemann, F., Top, S., Dazzi, A., Policar, C., Henry, L., Lambert, F., Jaouen, G., Salmain, M., and Vessières, A., Ferrocifens labelled with an infrared rhenium tricarbonyl tag : synthesis, antiproliferative activity, quantification and nano IR mapping in cancer cells, *Dalton Transactions* **2018**, *47*, 9824–9833.
- [234] Nguyen, A., Vessieres, A., Hillard, E.A., Top, S., Pigeon, P., and Jaouen, G., Ferrocifens and Ferrocifenols as New Potential Weapons against Breast Cancer, *CHIMIA International Journal for Chemistry* **2007**, *61*(11), 716–724.
- [235] Vessières, A., Top, S., Pigeon, P., Hillard, E., Boubeker, L., Spera, D., and Jaouen, G., Modification of the Estrogenic Properties of Diphenols by the Incorporation of Ferrocene. Generation of Antiproliferative Effects in Vitro, *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *48*(12), 3937–3940.
- [236] Latt, S., Stetten, G., Juergens, L., Willard, H., and Scher, C., Recent developments in the detection of deoxyribonucleic acid synthesis by 33258 Hoechst fluorescence, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **1975**, *23*(7), 493–505.
- [237] Cherukuri, P., Glazer, E.S., and Curley, S.A., Targeted hyperthermia using metal nanoparticles, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, *62*(3), 339–345.

BIBLIOGRAPHIE

- [238] Harmon, B., Takano, Y., Winterford, C., and Gobé, G., The Role of Apoptosis in the Response of Cells and Tumours to Mild Hyperthermia, *International Journal of Radiation Biology* **1991**, *59*(2), 489–501.
- [239] Chatterjee, D.K., Diagaradjane, P., and Krishnan, S., Nanoparticle-mediated hyperthermia in cancer therapy, *Therapeutic Delivery* **2011**, *2*(8), 1001–1014.
- [240] Aimé, C., Mosser, G., Pembouong, G., Bouteiller, L., and Coradin, T., Controlling the nano–bio interface to build collagen–silica self-assembled networks, *Nanoscale* **2012**, *4*(22), 7127.
- [241] Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., and Hori, K., Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics : a review, *Journal of Controlled Release* **2000**, *65*(1-2), 271–284.
- [242] Quignard, S., Mosser, G., Boissière, M., and Coradin, T., Long-term fate of silica nanoparticles interacting with human dermal fibroblasts, *Biomaterials* **2012**, *33*(17), 4431–4442.
- [243] Zhong, Q., Inniss, D., Kjoller, K., and Elings, V., Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy, *Surface Science Letters* **1993**, *290*(1-2), L688–L692.
- [244] Surfaces, B.N., Tapping AFM-IR Provides High-Resolution Chemical Imaging **2019**, <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=17716>, Consulté le 15.03.2019.
- [245] Mathurin, J., Pancani, E., Deniset-Besseau, A., Kjoller, K., Prater, C.B., Gref, R., and Dazzi, A., How to unravel the chemical structure and component localization of individual drug-loaded polymeric nanoparticles by using tapping AFM-IR, *Analyst* **2018**, *143*(24), 5940–5949.
- [246] Kumar, K.S., Kumar, V.B., and Paik, P., Recent Advancement in Functional Core-Shell Nanoparticles of Polymers : Synthesis, Physical Properties, and Applications in Medical Biotechnology, *Journal of Nanoparticles* **2013**, *2013*, 1–24.
- [247] Merrifield, R.B., Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide, *Journal of the American Chemical Society* **1963**, *85*(14), 2149–2154.
- [248] Jung, G., editor, *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries*, Wiley-VCH Verlag GmbH **1996**, doi :10.1002/9783527614912.
- [249] Jung, G., editor, *Combinatorial Chemistry : Synthesis, Analysis, Screening*, Wiley-VCH Verlag GmbH **1999**, doi :10.1002/9783527613502.
- [250] Chan, W.C. and White, P.D., editors, *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis : A Practical Approach (Practical Approach Series)*, Oxford University Press **2000**.
- [251] Plante, O.J., Palmacci, E.R., and Seeberger, P.H., Development of an Automated Oligosaccharide Synthesizer, in *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, volume 58, pages 35–54, Elsevier **2003**, doi :10.1016/s0065-2318(03)58002-7.
- [252] Vaino, A.R. and Janda, K.D., Solid-Phase Organic Synthesis : A Critical Understanding of the Resin†, *Journal of Combinatorial Chemistry* **2000**, *2*(6), 579–596.

- [253] Kates, S.A. and Albericio, F., editors, *Solid-Phase Synthesis : A Practical Guide*, CRC Press **2000**.
- [254] Sarin, V.K., Kent, S.B.H., and Merrifield, R.B., Properties of swollen polymer networks. Solvation and swelling of peptide-containing resins in solid-phase peptide synthesis, *Journal of the American Chemical Society* **1980**, *102*(17), 5463–5470.
- [255] Gouhier, G., Chimie supportée sur phase solide, *Techniques de l'ingénieur Production des médicaments : procédés chimiques et biotechnologiques* **2018**, base documentaire : TIB610DUO.(ref. article : k1260).
- [256] Sherrington, D.C., Preparation, structure and morphology of polymer supports, *Chemical Communications* **1998**, *21*, 2275–2286.
- [257] Malavolta, L., Oliveira, E., Cilli, E.M., and Nakaie, C.R., Solvation of polymers as model for solvent effect investigation : proposition of a novel polarity scale, *Tetrahedron* **2002**, *58*(22), 4383–4394.
- [258] Cilli, E.M., Oliveira, E., Marchetto, R., and Nakaie, C.R., Correlation between Solvation of Peptide-Resins and Solvent Properties1, *The Journal of Organic Chemistry* **1996**, *61*(25), 8992–9000.
- [259] Santini, R., Griffith, M.C., and Qi, M., A measure of solvent effects on swelling of resins for solid phase organic synthesis, *Tetrahedron Letters* **1998**, *39*(49), 8951–8954.
- [260] Malavolta, L. and Nakaie, C.R., Peptide dissociation in solution or bound to a polymer : comparative solvent effect, *Tetrahedron* **2004**, *60*(42), 9417–9424.
- [261] Hudson, D., Matrix Assisted Synthetic Transformations : A Mosaic of Diverse Contributions. I. The Pattern Emerges, *Journal of Combinatorial Chemistry* **1999**, *1*(5), 333–360.
- [262] Rademann, J., Barth, M., Brock, R., Egelhaaf, H.J., and Jung, G., Spatially Resolved Single Bead Analysis : Homogeneity, Diffusion, and Adsorption in Cross-Linked Polystyrene, *Chemistry A European Journal* **2001**, *7*(18), 3884–3889.
- [263] McAlpine, S.R. and Schreiber, S.L., Visualizing Functional Group Distribution in Solid-Support Beads by Using Optical Analysis, *Chemistry A European Journal* **1999**, *5*(12), 3528–3532.
- [264] Rink, H., Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin., *Tetrahedron Letters* **1987**, *28*(33), 3787 – 3790.
- [265] Carter, E.A., Rayner, B.S., McLeod, A.I., Wu, L.E., Marshall, C.P., Levina, A., Aitken, J.B., Witting, P.K., Lai, B., Cai, Z., Vogt, S., Lee, Y.C., Chen, C.I., Tobin, M.J., Harris, H.H., and Lay, P.A., Silicon nitride as a versatile growth substrate for microspectroscopic imaging and mapping of individual cells, *Molecular BioSystems* **2010**, *6*(7), 1316.
- [266] Paunesku, T., Vogt, S., Maser, J., Lai, B., and Woloschak, G., X-ray fluorescence microprobe imaging in biology and medicine, *Journal of Cellular Biochemistry* **2006**, *99*(6), 1489–1502.

BIBLIOGRAPHIE

- [267] Wu, B. and Becker, J.S., Imaging of elements and molecules in biological tissues and cells in the low-micrometer and nanometer range, *International Journal of Mass Spectrometry* **2011**, *307*(1-3), 112–122.
- [268] Jin, Q., Paunesku, T., Lai, B., Gleber, S.C., Chen, S., Finney, L., Vine, D., Vogt, S., Woloschak, G., and Jacobsen, C., Preserving elemental content in adherent mammalian cells for analysis by synchrotron-based x-ray fluorescence microscopy, *Journal of Microscopy* **2016**, *265*(1), 81–93.
- [269] Fahrni, C.J., Biological applications of X-ray fluorescence microscopy : exploring the subcellular topography and speciation of transition metals, *Current Opinion in Chemical Biology* **2007**, *11*(2), 121 – 127.
- [270] Murphy, M.P., Targeting lipophilic cations to mitochondria, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2008**, *1777*(7-8), 1028–1031.
- [271] Zielonka, J., Joseph, J., Sikora, A., Hardy, M., Ouari, O., Vasquez-Vivar, J., Cheng, G., Lopez, M., and Kalyanaraman, B., Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium-Based Compounds : Syntheses, Mechanisms of Action, and Therapeutic and Diagnostic Applications, *Chemical Reviews* **2017**, *117*(15), 10043–10120.
- [272] Smith, R.A.J., Porteous, C.M., Gane, A.M., and Murphy, M.P., Delivery of bioactive molecules to mitochondria in vivo, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, *100*(9), 5407–5412.
- [273] Asin-Cayuela, J., Manas, A.R.B., James, A.M., Smith, R.A., and Murphy, M.P., Fine-tuning the hydrophobicity of a mitochondria-targeted antioxidant, *FEBS Letters* **2004**, *571*(1-3), 9–16.
- [274] Ross, M.F., Prime, T.A., Abakumova, I., James, A.M., Porteous, C.M., Smith, R.A.J., and Murphy, M.P., Rapid and extensive uptake and activation of hydrophobic triphenylphosphonium cations within cells, *Biochemical Journal* **2008**, *411*(3), 633–645.
- [275] Hu, Z., Sim, Y., Kon, O.L., Ng, W.H., Ribeiro, A.J.M., Ramos, M.J., Fernandes, P.A., Ganguly, R., Xing, B., García, F., and Yeow, E.K.L., Unique Triphenylphosphonium Derivatives for Enhanced Mitochondrial Uptake and Photodynamic Therapy, *Bioconjugate Chemistry* **2017**, *28*(2), 590–599.
- [276] McRae, R., Lai, B., Vogt, S., and Fahrni, C.J., Correlative microXRF and optical immunofluorescence microscopy of adherent cells labeled with ultrasmall gold particles, *Journal of Structural Biology* **2006**, *155*(1), 22–29.
- [277] Szeto, H.H., Mitochondria-Targeted Cytoprotective Peptides for Ischemia–Reperfusion Injury, *Antioxidants & Redox Signaling* **2008**, *10*(3), 601–620.
- [278] Yousif, L.F., Stewart, K.M., Horton, K.L., and Kelley, S.O., Mitochondria-Penetrating Peptides : Sequence Effects and Model Cargo Transport, *ChemBioChem* **2009**, *10*(12), 2081–2088.

- [279] Yousif, L.F., Stewart, K.M., and Kelley, S.O., Targeting Mitochondria with Organelle-Specific Compounds : Strategies and Applications, *ChemBioChem* **2009**, *10*(12), 1939–1950.
- [280] Wender, P.A., Mitchell, D.J., Pattabiraman, K., Pelkey, E.T., Steinman, L., and Rothbard, J.B., The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake : Peptoid molecular transporters, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2000**, *97*(24), 13003–13008.
- [281] Szeto, H.H., Cell-permeable, mitochondrial-targeted, peptide antioxidants, *The AAPS Journal* **2006**, *8*(2), E277–E283.
- [282] Zhao, K., Transcellular Transport of a Highly Polar 3+ Net Charge Opioid Tetrapeptide, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2003**, *304*(1), 425–432.
- [283] Birk, A.V., Liu, S., Soong, Y., Mills, W., Singh, P., Warren, J.D., Seshan, S.V., Pardee, J.D., and Szeto, H.H., The Mitochondrial-Targeted Compound SS-31 Re-Energizes Ischemic Mitochondria by Interacting with Cardiolipin, *Journal of the American Society of Nephrology* **2013**, *24*(8), 1250–1261.
- [284] Nash, J.R., Vestling, M.M., and Casey, C.P., MALDI-TOF Mass Spectrometry of Rhenium Organometallics, in *Electronic Conference on Organometallic Chemistry*, Department of Chemistry, University of Wisconsin - Madison, Madison, WI 53706 **1997** .
- [285] Berman, H.M. and Young, P.R., The interaction of intercalating drugs with nucleic acids, *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* **1981**, *10*(1), 87–114.
- [286] Nafisi, S., Saboury, A.A., Keramat, N., Neault, J.F., and Tajmir-Riahi, H.A., Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue, *Journal of Molecular Structure* **2007**, *827*(1-3), 35–43.
- [287] Adams, Crystal Structures of Acridines Complexed with Nucleic Acids, *Current Medicinal Chemistry* **2002**, *9*(18).
- [288] Bowler, B.E., Ahmed, K.J., Sundquist, W.I., Hollis, L.S., Whang, E.E., and Lippard, S.J., Synthesis, characterization, and DNA-binding properties of (1, 2-diaminoethane)platinum(II) complexes linked to the DNA intercalator acridine orange by trimethylene and hexamethylene chains, *Journal of the American Chemical Society* **1989**, *111*(4), 1299–1306.
- [289] Mayer, R.T., Dolence, E.K., and Mayer, G.E., A Real-Time Fluorescence Assay for Measuring N-Dealkylation, *Drug Metabolism and Disposition* **2007**, *35*(1), 103–109.
- [290] Alonso, D., Dorronsoro, I., Rubio, L., Muñoz, P., García-Palomero, E., Monte, M.D., Bidon-Chanal, A., Orozco, M., Luque, F., Castro, A., Medina, M., and Martínez, A., Donepezil-tacrine hybrid related derivatives as new dual binding site inhibitors of {AChE}, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2005**, *13*(24), 6588 – 6597.

BIBLIOGRAPHIE

- [291] Vock, C.A., Ang, W.H., Scolaro, C., Phillips, A.D., Lagopoulos, L., Juillerat-Jeanneret, L., Sava, G., Scopelliti, R., and Dyson, P.J., Development of Ruthenium Antitumor Drugs that Overcome Multidrug Resistance Mechanisms, *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, *50*(9), 2166–2175.
- [292] Vitor, R.F., Correia, I., Videira, M., Marques, F., Paulo, A., Pessoa, J.C., Viola, G., Martins, G.G., and Santos, I., Pyrazolyl–Diamine Ligands That Bear Anthracenyl Moieties and Their Rhenium(I) Tricarbonyl Complexes : Synthesis, Characterisation and DNA-Binding Properties, *ChemBioChem* **2008**, *9*(1), 131–142.
- [293] Zava, O., Zakeeruddin, S.M., Danelon, C., Vogel, H., Grätzel, M., and Dyson, P.J., A Cytotoxic Ruthenium Tris(Bipyridyl) Complex that Accumulates at Plasma Membranes, *ChemBioChem* **2009**, *10*(11), 1796–1800.
- [294] Mechler, A., Stringer, B.D., Mubin, M.S., Doeven, E.H., Phillips, N.W., Rudd-Schmidt, J., and Hogan, C.F., Labeling phospholipid membranes with lipid mimetic luminescent metal complexes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2014**, *1838*(11), 2939–2946.
- [295] Qiu, K., Wang, J., Song, C., Wang, L., Zhu, H., Huang, H., Huang, J., Wang, H., Ji, L., and Chao, H., Crossfire for Two-Photon Photodynamic Therapy with Fluorinated Ruthenium (II) Photosensitizers, *ACS Applied Materials & Interfaces* **2017**, *9*(22), 18482–18492.
- [296] Radford, R.J., Chyan, W., and Lippard, S.J., Peptide-based targeting of fluorescent zinc sensors to the plasma membrane of live cells, *Chemical Science* **2013**, *4*(8), 3080.
- [297] Crosby, G.A. and Demas, J.N., Measurement of photoluminescence quantum yields. Review, *The Journal of Physical Chemistry* **1971**, *75*(8), 991–1024.
- [298] Bonnard, V., Azoulay, S., Di Giorgio, A., and Patino, N., Polyamide amino acids : a new class of RNA ligands, *Chemical Communications* **2009**, *17*, 2302–2304.
- [299] van Dijk, M., van Nostrum, C.F., Hennink, W.E., Rijkers, D.T.S., and Liskamp, R.M.J., Synthesis and Characterization of Enzymatically Biodegradable PEG and Peptide-Based Hydrogels Prepared by Click Chemistry, *Biomacromolecules* **2010**, *11*(6), 1608–1614.
- [300] Maryanoff, B.E., Reitz, A.B., and Duhl-Emswiler, B.A., Stereochemistry of the Wittig reaction. Effect of nucleophilic groups in the phosphonium ylide, *Journal of the American Chemical Society* **1985**, *107*(1), 217–226.
- [301] Wieland, M., Mieusset, J.L., and Brinker, U.H., Cucurbit[6]uril as a potential catalyst for the acidic decomposition of azidoaminoalkanes, *Tetrahedron Letters* **2012**, *53*(33), 4351–4353.
- [302] Yoon, I., Suh, S.E., Barros, S.A., and Chenoweth, D.M., Synthesis of 9-Substituted Triptycene Building Blocks for Solid-Phase Diversification and Nucleic Acid Junction Targeting, *Organic Letters* **2016**, *18*(5), 1096–1099.

- [303] Yang, H.K., Su, M.M., Ren, L.J., Tang, J., Yan, Y.K., Miao, W.K., Zheng, P., and Wang, W., Post-Functionalization of an Anderson-Type Polyoxomolybdate Using a Metal-Free Diels-Alder Click Reaction, *European Journal of Inorganic Chemistry* **2013**, *2013*(8), 1381–1389.

BIBLIOGRAPHIE

RÉSUMÉ

Les questions de la détection intracellulaire et de la localisation en milieu cellulaire de complexes de métaux de transition sont cruciales dans le contexte du développement de complexes métalliques en biologie et médecine. En effet, pour être pharmacologiquement actif, un composé doit atteindre sa cible cellulaire : la localisation est donc un paramètre clef de l'activité. Pour l'étudier, il est nécessaire de disposer de sondes et de techniques d'imagerie cellulaire. Nous avons montré qu'il est possible d'utiliser les métaux carbonyle comme des sondes multimodales en fluorescence classique, infrarouge et fluorescence X, la multimodalité étant portée par un seul cœur moléculaire de type $(L)Re(CO)_3$, L étant un ligand de type bipyridine. Le terme SCoMPI a été introduit pour ces « Single Core Multimodal Probes for Imaging ». Dans le cadre de cette thèse, nous avons préparé et imagé des sondes greffables pour suivre des objets d'intérêt biologique (acide hyaluronique, ferrocifènes) ainsi que des marqueurs en fluorescence X des organites intracellulaires. Dans ce cas, des groupes vecteurs (TPP, peptide...) ont été greffés sur des unités de type Re-tricarbonyle et ces espèces ont été caractérisées en contexte biologique par différentes techniques analytiques et imagées par différentes techniques de microscopie.

MOTS CLÉS

Sonde, multimodale, fluorescence X, infrarouge, marquage, complexe inorganique

ABSTRACT

Questions of intracellular detection and cell-mediated localization of transition metal complexes are major in the context of metal complex development in biology and medicine. A compound must reach its cellular target to be pharmacologically active: the localization is therefore a key parameter of activity. To study it, it is necessary to have probes and cell imaging techniques. Metal carbonyls are ideal candidates for multimodal bioimaging in fluorescence, infrared and X-ray fluorescence imaging. As they have been developed as "Single Core Multimodal Probe for Imaging" (SCoMPI), this thesis deals with the development, the study and the use of a rhenium-tricarbonyl unit $[LRe(CO)_3X]$ ($L = \text{pyridyl-1,2,3-triazole}$, $X = Cl^-$) as X-ray fluorescence probe for cellular imaging. We conjugated the $Re(CO)_3$ graftable probe to compounds of interest (hyaluronic acid, ferrocifens) in order to study their penetration and location in cells or in the skin, and we modified $Re(CO)_3$ conjugates by organelles targeting groups (TPP, peptide, etc.) in order to develop species that were characterized in biological context by different analytical techniques and imaged by different microscopy techniques.

KEYWORDS

Probe, multimodal, X-ray fluorescence, infrared, labeling, inorganic complex