

Développement d'un modèle fluorogénique pour le screening de catalyseurs de palladium en système biologique

Présenté par Maud Decock

Promoteur : Prof. Olivier Riant (UCL/SC/MOST)

Lecteurs : Prof. Olivier Feron (UCL/FASB/FATH)
Prof. Michael Singleton (UCL/SC/MOST)

Mémoire de fin d'études présenté en vue de l'obtention
du diplôme de **Bioingénieur : Chimie et Bio-industries**

Remerciements

Au terme de ce projet de recherche, je tiens à remercier tout particulièrement le Professeur Olivier Riant de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, et de m'avoir encadrée et conseillée au cours de cette année.

Je remercie également le Professeur Olivier Feron de m'avoir permis de faire toutes les manipulations en biologie au sein de son équipe et de m'avoir guidée tout au long de la deuxième partie de ce travail.

Je tiens à remercier grandement mes deux encadrants sans qui je n'aurais pas pu apprendre autant de choses en si peu de temps : Mathieu au labo de chimie organique et Charline au labo de biologie. Mathieu pour la direction de ce projet tout au long de l'année, son expertise, son aide, ses conseils et ses anecdotes en toute circonstance. Charline pour son aide lors de mes débuts en culture cellulaire et pour ses précieux conseils lors de la mise en place d'une expérience en biologie.

Mes remerciements s'adressent aussi à toute l'équipe du Prof. Riant pour leur bonne humeur et la bonne ambiance toute l'année : Mathieu, Céline, Mathilde, Sébastien, Martin, Keven, Saroj, Gilles, Gilles « chaton », Audric sénior, Audric junior, Antonin, Corentin, Michael, Ricky et François.

Je n'oublie pas non plus toute l'équipe du Prof. Feron et mes collègues de bureau Charline, Laurence, Céline, Roxane et Delphine.

Je remercie ma famille et mes amis pour le soutien et les encouragements apportés au cours de cette année mais aussi durant mes cinq années d'étude.

Je remercie finalement mes lecteurs, le Professeur Olivier Feron et le Professeur Michael Singleton, pour avoir accordé du temps et de l'attention à l'évaluation de ce travail de recherche.

Table des matières

Liste des abréviations et symboles.....	I
Résumé.....	III
1 Introduction.....	1
1.1 Cancer et biologie des tumeurs.....	1
1.1.1 « The hallmarks of cancer »	1
1.1.2 Microenvironnement tumoral	2
1.1.3 Métabolisme des cellules cancéreuses.....	3
1.1.4 Thérapies.....	5
1.2 Chimie bioorthogonale.....	7
1.2.1 Définition et caractéristiques.....	7
1.2.2 Réactions de bioconjugaison <i>in cellulo</i>	8
1.3 Chimie bioorganométallique	9
1.3.1 Généralités	9
1.3.2 Réaction de Tsuji-Trost.....	10
1.3.3 Travaux pionniers.....	11
1.3.4 Potentiel en thérapie anticancéreuse.....	15
2 Objectifs.....	16
3 Materials and methods	17
3.1 Chemistry section	17
3.1.1 Chemicals, solvents and purifications.....	17
3.1.2 Equipments.....	17
3.1.3 Synthesis.....	17
3.1.4 <i>In vitro</i> catalyst screening – Umbelliferone model	18
3.2 Biology section.....	20

3.2.1	Cell culture.....	20
3.2.2	<i>In cellulo</i> catalyst activity – Umbelliferone and Rhodamine models.....	21
3.2.3	<i>In cellulo</i> catalyst screening and optimization – Rhodamine model.....	21
3.2.4	<i>In cellulo</i> catalyst activity in normoxia vs hypoxia – Rhodamine model.....	21
3.2.5	Fluorescence images of SiHa cells.....	22
3.2.6	Cell viability assay.....	22
4	Résultats et discussion	23
4.1	Tests en catalyse <i>in vitro</i>	23
4.1.1	Choix des catalyseurs	23
4.1.2	Choix de la réaction modèle.....	24
4.1.3	Modèle Ombelliférone	25
4.2	Tests en catalyse <i>in cellulo</i>	30
4.2.1	Modèle Ombelliférone	31
4.2.2	Modèle Rhodamine.....	33
4.2.3	Comparaison et choix du modèle	34
4.2.4	Criblage des complexes catalytiques	36
4.2.5	Optimisation des conditions	44
4.2.6	Images de fluorescence des cellules SiHa	53
5	Conclusion	56
6	Perspectives.....	58
7	Bibliographie	60
	Appendix.....	64

Liste des abréviations et symboles

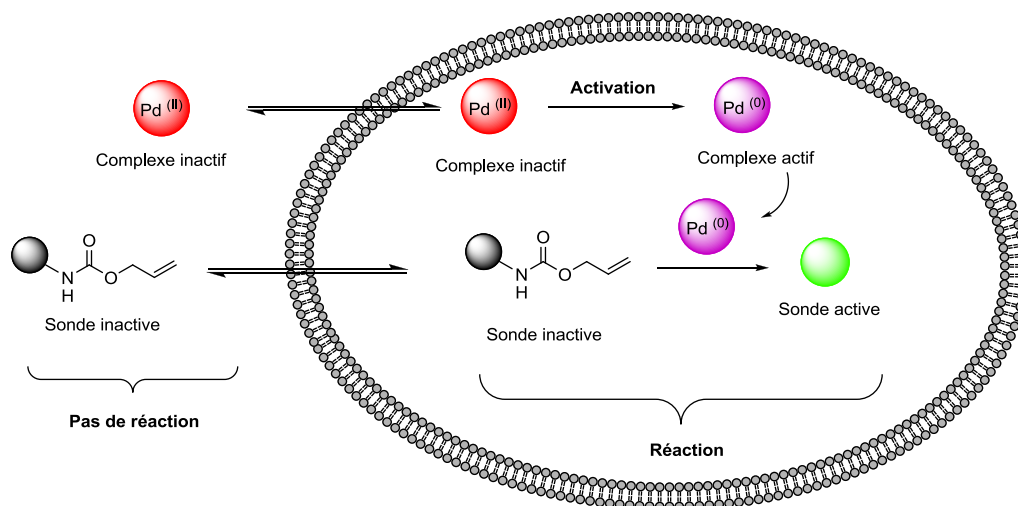
5FU	5-fluorouracile
°C	Degré Celsius
Ac	Acétyle
Acétyl-CoA	Acétyl Coenzyme A
ADN	Acide désoxyribonucléique
Alloc	Allyloxycarbonyle
ATP	Adénosine triphosphate
Bpy	2,2'-bipyridine
Cat.	Catalyseur
Cod	1,5-cyclooctadiène
Cp	Cyclopentadiényl
Cp*	Pentaméthylcyclopentadiényl
δ	Déplacement chimique en ^1H -RMN
DCM	Dichlorométhane
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMF	N,N-diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde / <i>Dimethyl sulfoxide</i>
Dpephos	Diphénylphosphino éther
Dppbz	Diphénylphosphino benzène
Dppe	Diphénylphosphino éthane
Dppf	Diphénylphosphino ferrocène
EDTA	Éthylène diamine tétraacétique
Équiv. / equiv.	Équivalent
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
GSH	Glutathion
GP	Groupe partant
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HeLa	Henrietta Lacks cell line / <i>Human cervix adenocarcinoma</i>
HIF	<i>Hypoxia inducible factor</i>
ICP-MS	Inductively coupled plasma Mass Spectrometry

λ	Longueur d'ondes / <i>Wavelength</i>
LDHA	Lactate déshydrogénase
MCT	<i>Monocarboxylate transporter</i>
M	Métal
Me	Méthyle
NAD ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide (forme oxydée)
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
Nu	Nucléophile
PE	Éther de pétrole
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
p-cym	Para-cymène
Pd	Palladium
PhSH	Thiophénol
Ph	Phényle
Ppm	Part par million
Py	Pyridine
QA	2-quinolinecarboxylate
RMN	Résonance magnétique nucléaire
Rho	Rhodamine
Rho (110) bis-alloc	N,N-bis-allyloxycarbonyl-rhodamine 110
RT	<i>Room temperature</i>
SiHa	<i>Human cervix squamous carcinoma</i>
T.A.	Température ambiante
TBAF	Fluorure de tétra-n-butylammonium
tBu	Tert-butyle
THF	Tétrahydrofurane
Thio	Acide thiosalicylique
TMS	Triméthylsilyl
Xantphos	4,5-bis(diphénylphosphino)-9,9-diméthylxanthène

Résumé

Située à l'interface de la biologie et de la chimie organique, la chimie bioorthogonale est une branche de la chimie composée de réactions se réalisant en milieu cellulaire dans lesquelles les réactifs doivent être sélectifs les uns par rapport aux autres et non toxiques pour le matériel biologique. Depuis les années 2000, la chimie bioorthogonale s'est fortement développée et depuis 2006, l'intérêt s'est porté vers l'emploi de composés organométalliques en chimie bioorthogonale pour leurs propriétés catalytiques. D'un point de vue thérapeutique, exploiter le microenvironnement tumoral pour favoriser des réactions bioorthogonales de catalyse organométallique est un projet ambitieux qui nécessite un travail d'optimisation conséquent. Dans l'optique de pouvoir sélectivement activer des composés cytotoxiques, et donc thérapeutiques, dans le seul environnement tumoral, le choix d'un catalyseur le plus approprié en termes d'efficacité et de cinétique de la réaction souhaitée représente l'objectif principal de ce mémoire.

Pour l'atteindre, différentes étapes ont été nécessaires. La première étape a été le développement d'un modèle en conditions *in vitro* permettant de valider par un système de lecture par fluorescence le décaage d'un composé rapporteur. La seconde étape a été la validation et l'optimisation de ce modèle en système cellulaire. Cette étape a résulté en la sélection du ou des catalyseurs le(s) plus approprié(s) intégrant les notions d'efficacité de la réaction de décaage et d'innocuité vis-à-vis du matériel biologique. Finalement, les catalyseurs les plus prometteurs ont été optimisés en termes de dose mais leur activité a également été testée en conditions hypoxiques, susceptibles d'altérer ou améliorer le rendement de la réaction.



1 Introduction

1.1 Cancer et biologie des tumeurs

1.1.1 « The hallmarks of cancer »

Les cellules cancéreuses résultent d'altérations génomiques leur conférant un potentiel de réplication illimité menant à une croissance anarchique et à l'invasion progressive de tissus voisins et distants (métastases)¹.

En 2015, les cancers étaient la deuxième cause de mortalité dans le monde après les maladies cardiovasculaires². Selon l'Organisation mondiale de la Santé, cette maladie a été à l'origine de 8,8 millions de décès en 2015³. Le nombre de personnes touchées par cette maladie est en progression constante depuis 10 ans. Entre 2005 et 2015, les cas de cancer ont augmenté de 33% et l'incidence ne cessera d'augmenter dans les prochaines années². D'ici 2030, 17 millions de décès dus au cancer par an sont attendus dans le monde⁴. Ces chiffres montrent l'importance de la recherche afin d'améliorer et de développer de nouveaux traitements anticancéreux.

Le cancer est une maladie complexe, hétérogène et extrêmement dynamique, causée par une accumulation de plusieurs altérations au niveau du génome^{1,5,6}. Bien que ces multiples composantes rendent chaque cancer unique, certains traits moléculaires, biochimiques et cellulaires semblent être partagés par de nombreux types de cancers chez l'Homme, nommés « The hallmarks of cancer » par Hanahan et Weinberg¹. Au nombre des premières caractéristiques « communes » identifiées, nous pouvons citer l'indépendance par rapport aux signaux de croissance externes, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance, l'évasion à la mort cellulaire programmée, le potentiel de réplication illimité, l'induction de l'angiogenèse, l'invasion des tissus et la formation de métastases. Cette combinaison de caractéristiques biologiques est acquise par les cellules lors d'un processus multi-étape nommé carcinogenèse^{1,5}. À la suite de multiples altérations génétiques qui confèrent un avantage sélectif pour la croissance de la cellule ainsi transformée par rapport à sa voisine, les cellules normales sont progressivement envahies par les cellules tumorales malignes^{1,7}.

1.1.2 Microenvironnement tumoral

Les tumeurs sont des masses cellulaires complexes composées de multiples types de cellules interagissant les unes avec les autres⁸, comprenant les cellules cancéreuses, mais aussi de nombreuses autres cellules normales recrutées pour créer le « microenvironnement tumoral »⁵. Des fibroblastes, des cellules dendritiques, des lymphocytes et autres cellules du système immunitaire interagissent avec les cellules cancéreuses et constituent ce microenvironnement⁹. C'est ainsi que tout le système de signalisation moléculaire entre les cellules cancéreuses et normales favorise et influence la progression de la tumeur¹⁰. Dès lors, aujourd'hui, il ne suffit plus d'étudier les caractéristiques intrinsèques des cellules cancéreuses, il faut également tenir compte des contributions qu'apporte ce microenvironnement tumoral pour bien comprendre la biologie d'une tumeur et envisager de nouveaux traitements anticancéreux¹¹. Une des particularités importantes de l'environnement d'une tumeur, à la différence d'un tissu normal, est la diminution de disponibilité en oxygène au sein de la tumeur en raison de l'éloignement des cellules vis-à-vis des vaisseaux sanguins ; ce phénomène est appelé hypoxie tumorale (Figure 1)^{12,13}.

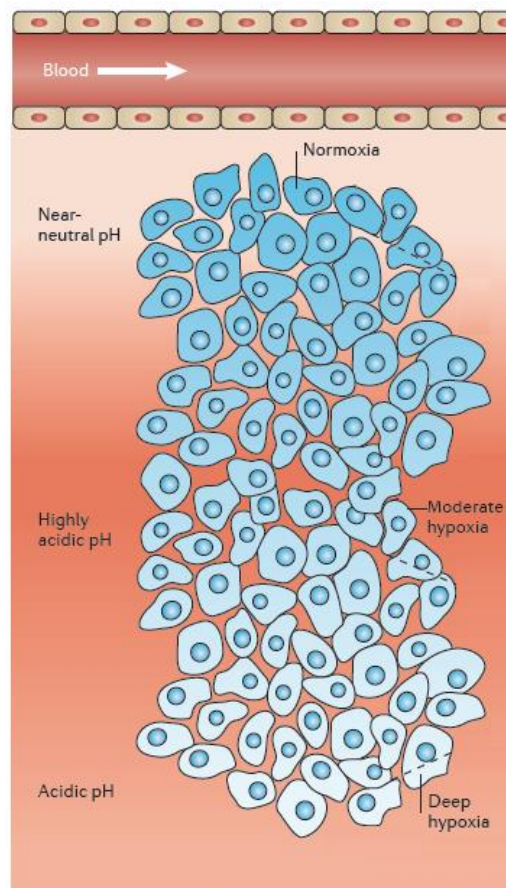


Figure 1 : Modèle présentant le gradient d'oxygène et de pH au sein d'une tumeur¹³

Lors de la croissance d'une tumeur, les cellules transformées et recrutées développent leur propre réseau de vaisseaux sanguins, un processus appelé angiogenèse⁵. En effet, cette néo-vascularisation est d'une importance cruciale puisqu'elle permet de fournir en suffisance l'oxygène et les nutriments aux cellules en croissance pour assurer la viabilité cellulaire et le développement de la biomasse^{5,14}. Toutefois, dans le cas des tumeurs solides, l'angiogenèse est chaotique et n'est pas systématiquement associée à la maturation des vaisseaux néoformés, il s'en suit de sévères anomalies structurales avec pour conséquence une insuffisance ou même une abolition de l'approvisionnement en oxygène^{15,16}. Il en résulte finalement de multiples zones à faible niveau en oxygène au sein même de la tumeur solide. Ces microrégions hypoxiques sont distribuées de manière hétérogène dans la masse tumorale et peuvent être adjacentes à des zones de concentrations « normales » en oxygène^{12,17}. Par ailleurs, les niveaux d'oxygène à l'intérieur de la tumeur peuvent également fluctuer au cours du temps en raison de l'organisation instable des microvaisseaux (Figure 2)^{16,18}. Ces fluctuations spatio-temporelles délimitent de nombreux sous-microenvironnements ayant des caractéristiques spécifiques (par exemple en termes de métabolisme)¹⁶ et des comportements différents. Un degré d'hypoxie plus élevé est souvent associé à un phénotype plus invasif des cellules tumorales¹⁹.

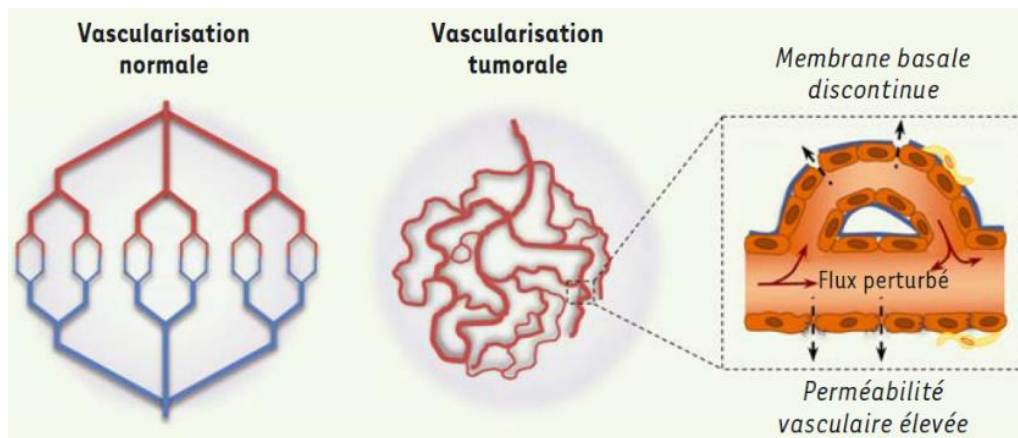


Figure 2 : Comparaison entre la vascularisation normale hiérarchisée et la vascularisation tumorale tortueuse¹⁸

1.1.3 Métabolisme des cellules cancéreuses

La prolifération accrue des cellules cancéreuses nécessite une reprogrammation de leur métabolisme afin de fournir suffisamment d'énergie, essentielle à leur survie et leur croissance^{5,20}. En effet, les cellules ont besoin de ressources énergétiques et organiques en suffisance leur permettant de reproduire leurs composants tels que l'ADN, les membranes et les protéines²¹. Parmi les ressources nutritives, le glucose est essentiel pour les cellules en

prolifération car, outre l'ATP, il fournit de nombreux intermédiaires biosynthétiques qui participent aux réactions anaboliques²⁰.

Une différence importante entre cellules saines et cellules tumorales est le devenir du glucose²². En effet, les cellules normales différenciées métabolisent principalement le glucose en pyruvate *via* la glycolyse dans le cytosol, et le pyruvate est ensuite oxydé dans le compartiment mitochondrial. L'acétyl-CoA généré au départ du pyruvate entre comme substrat dans le cycle de Krebs, ce dernier est couplé à la phosphorylation oxydative où l'oxygène est l'accepteur final d'électrons²³. Cette machinerie métabolique, couplant la glycolyse, le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative, maximise la production d'ATP^{21,22}. Si l'oxygène est limitant, la glycolyse anaérobie est favorisée. Le pyruvate ne rentre pas dans la mitochondrie mais est redirigé pour produire du lactate (Figure 3)^{21,22,24}.

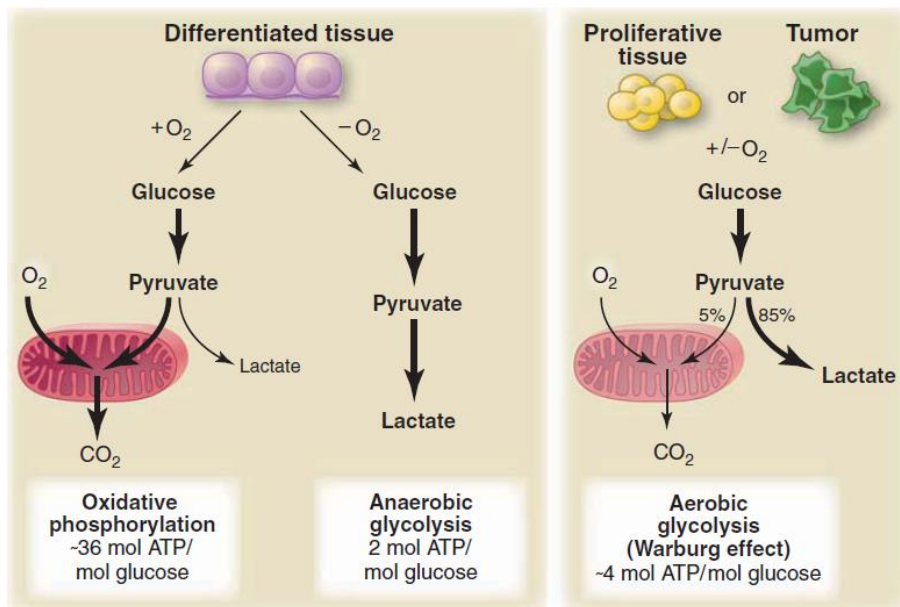


Figure 3 : Représentation schématique des différences entre la phosphorylation oxydative, la glycolyse anaérobie et la glycolyse aérobie (Effet Warburg)²²

Dans le cas des cellules cancéreuses, la capture de glucose et sa métabolisation en pyruvate sont accrues, quelle que soit la disponibilité en oxygène²⁵. Augmenter la glycolyse permet notamment de disposer de grande quantité d'intermédiaires glycolytiques utilisés dans de nombreuses voies biosynthétiques. Pour entretenir cette glycolyse, le pyruvate est réduit en lactate par la lactate déshydrogénase (LDHA) pour régénérer le NAD^+ (Nicotinamide adénine dinucléotide), nécessaire aux premières étapes de la glycolyse²⁶. Il en résulte la libération dans le milieu extracellulaire de grandes concentrations de lactate et d'ions H^+ (*via* l'activité de transporteurs de monocarboxylates ou MCT) qui contribuent à l'acidification progressive du milieu environnant la

tumeur¹³. Ce type de métabolisme énergétique caractéristique de nombreuses cellules tumorales est appelé glycolyse aérobie ou effet Warburg^{27,28}, du nom du premier scientifique ayant observé cette spécificité tumorale (Figure 3)²². Cette dépendance par rapport à la glycolyse est accentuée lorsque les cellules se trouvent en conditions hypoxiques^{5,29}. Dans ce cas, ce *switch* glycolytique est une conséquence immédiate de l'adaptation des cellules tumorales via l'action du facteur de transcription HIF (*Hypoxia inducible factor*) induit par un environnement pauvre en oxygène²⁹.

1.1.4 Thérapies

Le traitement d'un cancer doit être adapté en fonction de la situation du patient en particulier³⁰. Puisque chaque cancer est unique, plusieurs facteurs sont à prendre en compte pour choisir le traitement ou la combinaison de traitements appropriés. En effet, le type de cancer, son degré d'extension, la présence éventuelle d'autres maladies, l'âge de la personne et son état général sont notamment à considérer³¹. Il existe actuellement différents types de traitements : la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie, l'immunothérapie et les nouveaux traitements « ciblés ». Ces traitements peuvent être utilisés seuls ou de manière combinée³².

Parmi tous les traitements existants, la chirurgie est souvent le premier traitement envisagé. Elle est utilisée dans 80% des cas³⁰. La chimiothérapie est également largement utilisée³³, elle cible les cellules à croissance et division rapides, comme c'est habituellement le cas pour les cellules cancéreuses³⁴. Néanmoins, d'autres types cellulaires sains présentent des taux de division élevés et sont en conséquence touchés. Citons par exemple les cellules de la moelle osseuse, les cellules de l'épithélium intestinal et les cellules de la racine des poils et des cheveux^{34,35}. Ce manque de spécificité entre cellules saines et cancéreuses mène à d'importants effets indésirables comme par exemple la diminution du système immunitaire, des douleurs, nausées, diarrhées et la perte des cheveux³⁵. De plus, outre cette toxicité systémique, l'apparition de cellules cancéreuses résistantes peut participer au développement d'un cancer plus agressif^{35,36}. Il est à noter que les thérapies dites ciblées (anticorps ou petites molécules inhibant essentiellement l'activité kinase d'oncoprotéines) sont également sujettes à des effets secondaires parfois mortels et à des phénomènes de résistance³⁷. Un autre type de traitement fréquemment utilisé est la radiothérapie³⁸. Cette technique consiste en l'utilisation de rayons de haute énergie qui ionisent et endommagent les cellules principalement au niveau de l'ADN³⁹. La radiothérapie est considérée comme un traitement plus localisé puisqu'elle cible le tissu dans lequel la tumeur s'est

développée³⁵. Bien que la fatigue soit une conséquence fréquente de la radiothérapie, les autres effets secondaires tendent à être localisés au niveau de l'aire traitée⁴⁰.

Résistance des cellules cancéreuses

La résistance aux thérapies est l'une des principales raisons de l'échec d'un traitement. Différents mécanismes sont mis en place par les cellules cancéreuses pour résister aux médicaments auxquels elles sont exposées. Citons par exemple l'augmentation de l'efflux causé par des protéines de transport qui pompent activement pour expulser les drogues en dehors de la cellule, l'amplification de la réparation de l'ADN par surexpression de certains gènes, l'inhibition de l'apoptose ou encore l'intensification du métabolisme de détoxification⁴¹.

Intéressons-nous plus particulièrement à la résistance causée par l'hypoxie tumorale¹². Concernant la chimiorésistance, plusieurs facteurs sont en cause. Tout d'abord, l'action de la drogue peut être diminuée en absence d'oxygène, en particulier lorsque le mécanisme d'action de celle-ci implique la production d'espèces réactives de l'oxygène. Ensuite, l'éloignement des vaisseaux sanguins à l'origine de cette hypoxie a deux conséquences évidentes. La première est la difficulté d'accès de l'agent chimiothérapeutique. Outre la moindre efficacité thérapeutique, nous savons aujourd'hui que l'exposition à des concentrations « sous-efficaces » en agent cytotoxique favorise le développement de résistance. La seconde est le taux de prolifération réduit des cellules tumorales suite à l'accès limité en nutriments, et donc une moindre sensibilité à des drogues agissant essentiellement sur la réplication de l'ADN ou des processus biochimiques de multiplication cellulaire^{16,42}. Pour ce qui est de la résistance aux radiations, la sensibilité est diminuée quand le niveau en oxygène est faible. En effet, la présence d'oxygène augmente la possibilité de formation de radicaux libres qui endommagent davantage l'ADN et surtout l'oxygène « fixe » ces dommages, les rendant moins susceptibles d'être réparés. En-dessous d'une concentration de 10 mmHg en O₂, il a été déterminé que la dose de radiations nécessaire pour obtenir les mêmes effets biologiques est trois fois plus élevée¹².

Les dispositifs de traitement utilisés actuellement contre les cellules tumorales hypoxiques ne sont pas suffisamment efficaces ou possèdent une toxicité trop élevée. Afin de minimiser ces contraintes, le défi majeur est de gagner en sélectivité pour disposer de thérapies plus efficaces et plus sûres. Une stratégie en particulier vise à développer des systèmes d'activation de prodrogues dans le strict environnement des cellules tumorales, ce compris en tirant profit de caractéristiques telles que l'hypoxie ambiante.

1.2 Chimie bioorthogonale

1.2.1 Définition et caractéristiques

Les systèmes vivants sont composés d'un vaste réseau d'interactions entre des biopolymères, des petites molécules, des ions et des métabolites⁴³. Comprendre la biologie des cellules et des organismes vivants nécessite de nouvelles techniques afin de suivre en temps réel les biomolécules fonctionnant dans leur environnement natif⁴⁴. Le développement de ce type de méthodes marque la naissance de la chimie bioorthogonale. Au contraire de la chimie classique, offrant une grande flexibilité pour les conditions de réaction (choix du solvant, modulation de la température, présence ou non d'air et d'humidité, ajout d'un catalyseur, etc...), la chimie bioorthogonale se réalise dans une matrice chimiquement très complexe qu'est le milieu cellulaire, possédant de nombreuses composantes non contrôlées comme un solvant aqueux à température et pH fixes⁴⁵.

Les réactions bioorthogonales sont des modifications chimiques réalisées au sein même de systèmes biologiques vivants, que ce soit des cultures cellulaires ou des organismes complexes⁴⁵. Pour être qualifiées de réactions bioorthogonales, plusieurs critères sont requis. Tout d'abord, ces réactions ne peuvent pas interférer avec le fonctionnement des processus biologiques. Ensuite, la cinétique de réaction doit être rapide dans des conditions physiologiques, c'est à dire dans l'eau à une température et un pH biocompatibles. De plus, les réactifs incorporés doivent être sélectifs les uns par rapport aux autres et inertes par rapport aux fonctions biologiques. Enfin, les réactifs impliqués doivent être stables cinétiquement, thermodynamiquement et métaboliquement avant la réaction, sans être toxiques pour le système vivant mis en présence⁴⁵⁻⁴⁸.

Bien que remplir toutes ces conditions simultanément ne soit pas aisé, depuis le début des années 2000, un certain nombre de transformations bioorthogonales ont été développées^{47,48}. Celles-ci peuvent être classées en deux catégories principales. La première regroupe les réactions de bioconjugaison dans lesquelles un réactif déterminé atteint sélectivement sa cible et s'y attache de manière covalente. La seconde reprend les réactions dans lesquelles une drogue ou une sonde est activée sélectivement par réaction avec une molécule endogène (enzyme, métabolite), soit par clivage d'un groupe protecteur, soit par transformation de la molécule. Explicitons plus en détails les réactions utilisées comme outil de bioconjugaison.

1.2.2 Réactions de bioconjugaison *in cellulo*

1.2.2.1 Ligation de Staudinger

La ligation de Staudinger se base sur la réaction classique rapportée par Staudinger en 1919⁴⁹, dans laquelle un azoture est réduit en présence d'une phosphine et d'eau. Cette réaction possède les critères requis pour développer une réaction bioorthogonale puisqu'elle met en jeu des espèces abiotiques, tolérant la présence d'eau, mutuellement et sélectivement réactives mais n'interférant pas avec les fonctions biologiques⁵⁰. Adaptée par Bertozzi, la ligation de Staudinger fait intervenir des azotures et des phosphines pour former un lien amide⁵¹. Utilisée comme outil de bioconjugaison, les applications de cette réaction sont multiples⁵². Citons par exemple la modification chimique de surfaces cellulaires⁵³ et le marquage direct de protéines ou de glycoprotéines *in cellulo* et *in vivo* (Schéma 1)^{50,54}.

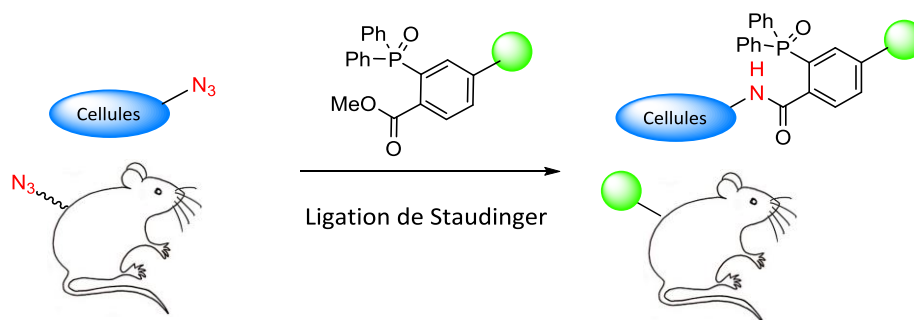


Schéma 1 : Application de la ligation de Staudinger en imagerie *in cellulo* et *in vivo* ; schéma adapté de Sletten et Bertozzi, 2011⁵⁰

1.2.2.2 Chimie click

Les azotures sont également utilisés dans les réactions de cycloaddition (3+2) avec des alcynes (Schéma 2)⁵⁵.

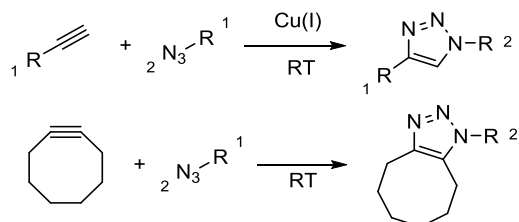


Schéma 2 : Exemples de réactions de cycloaddition (3+2) utilisées en chimie click^{56,57}

Dans sa forme initiale, l'application de cette réaction en systèmes biologiques est limitée en raison de l'utilisation de catalyseurs de cuivre (I) toxiques pour les cellules⁵⁸. Une réaction alternative entre des azotures et des dérivés de cyclooctyne a été développée par Wittig et Krebs⁵⁷, et ensuite adaptée par Bertozzi⁵⁰. Cette réaction ne nécessite plus la présence d'un catalyseur en raison de la tension de cycle qui est relâchée et peut donc se réaliser en conditions physiologiques⁵². Pour l'application en imagerie cellulaire, la réaction *click* permet d'étudier des

biomolécules et des cellules vivantes possédant des fonctions de reconnaissance introduites par ingénierie génétique en les modifiant de façon covalente au niveau des points d'ancrage (Schéma 3)^{50,58}.

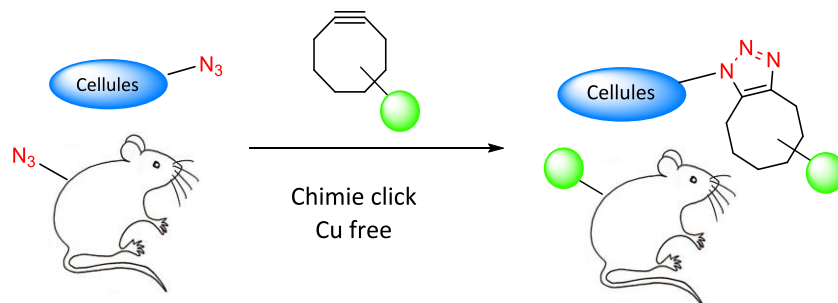


Schéma 3 : Application de la réaction click en imagerie *in cellulo* et *in vivo* ; schéma adapté de Sletten et Bertozzi, 2011⁵⁰

1.3 Chimie bioorganométallique

1.3.1 Généralités

Suite au développement du domaine de la chimie bioorthogonale, l'intérêt s'est porté plus récemment vers l'emploi de composés organométalliques pour leur utilisation en chimie médicinale et bioorthogonale⁵⁹. Les propriétés uniques des complexes impliquant des métaux comme leur géométrie, leur réactivité et la possibilité d'interagir avec des ligands biologiques les rendent très attractifs pour la modulation, l'analyse ou l'imagerie des processus biologiques^{60,61}. Pourtant, ce potentiel attractif des composés métalliques à catalyser des transformations chimiques est encore sous-exploité dans le cadre de la biologie⁶².

Dans le futur, des procédés catalytiques pourraient être davantage utilisés que les réactions stœchiométriques pour déclencher une réaction de manière amplifiée^{61,63}. De multiples applications sont envisageables grâce à l'utilisation de ces catalyseurs, par exemple amplifier un signal par conversion d'un substrat, marquer ou désactiver des biomolécules ciblées, déprotéger un substrat cagé ou activer des prodrugs à leur destination cellulaire⁶². Cependant, mettre au point de tels catalyseurs stables et fonctionnant en conditions physiologiques est un véritable défi sachant que la présence d'air, d'eau et de multiples composants cellulaires sont capables d'inactiver le catalyseur⁶¹. Par ailleurs, le catalyseur doit pouvoir diffuser passivement à travers les membranes des cellules, ce qui amène une difficulté supplémentaire. À l'heure actuelle, peu de catalyseurs bioorthogonaux efficaces ont été décrits dans la littérature mais de plus en plus de recherches aboutissent à des résultats encourageants.

1.3.2 Réaction de Tsuji-Trost

Une des réactions métallo-catalysée la plus employée de nos jours *in cellulo* est la réaction de Tsuji-Trost. À l'origine, il s'agit d'une substitution nucléophile allylique pallado-catalysée d'un dérivé allylique par un nucléophile (Schéma 4)⁶⁴.

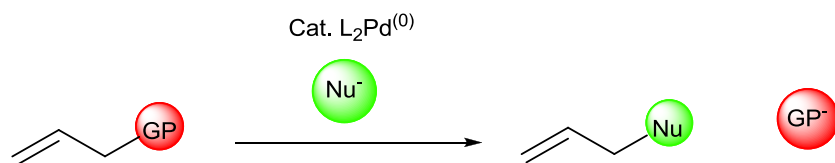


Schéma 4 : Schéma général de la réaction de Tsuji-Trost (GP = groupe partant, Nu = nucléophile) ; schéma adapté de Trost et Van Vranken, 1996⁶⁵

Les différents intervenants de cette réaction sont un dérivé allylique possédant un groupe partant tel qu'un acétate, carbonate, carbamate ou halogène, un nucléophile et un catalyseur de palladium (Pd). Cette réaction nécessite une espèce active de Pd(0) ou un pré-catalyseur Pd(II) qui doit être réduit *in situ*. La première étape consiste en la coordination du complexe de palladium (0) sur la double liaison du substrat allylique pour former le complexe η^2 - π -allyle. Cette étape est suivie d'une addition oxydante donnant le complexe η^3 - π -allyle qui peut être en équilibre avec une forme cationique après départ du groupe partant. Enfin, ce complexe activé subit une attaque nucléophile suivie d'une élimination réductrice, menant au produit désiré et à la régénération du catalyseur de palladium par élimination réductrice (Schéma 5)^{64,65}.

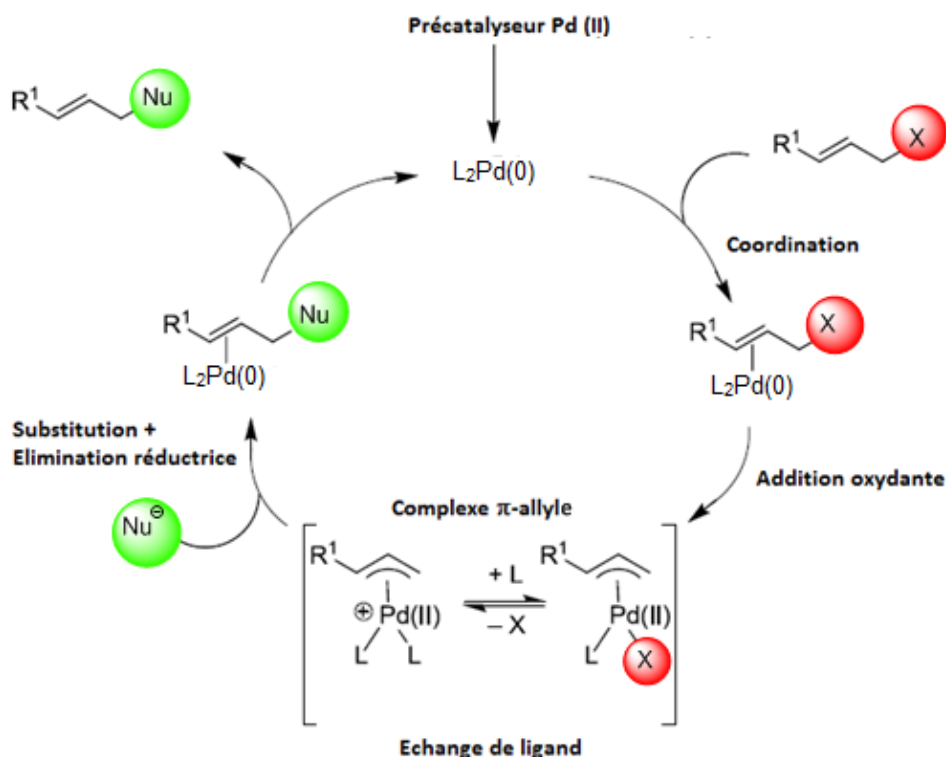


Schéma 5 : Cycle catalytique de la réaction de Tsuji-Trost ; schéma adapté de Li, 2014⁶⁴

1.3.3 Travaux pionniers

Un cas particulier de la réaction de Tsuji-Trost largement utilisé dans la littérature est le cas des allyle carbamates, dont la partie allyloxycarbonyle (alloc) joue le rôle de groupe protecteur (Schéma 6). Ce groupe protecteur est sensible au palladium(0)⁶⁶.

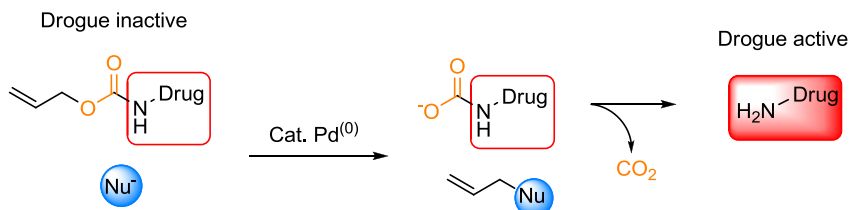


Schéma 6 : Cas particulier de la réaction de Tsuji-Trost⁶⁶

1.3.3.1 Complexes de ruthénium

Meggers et son équipe sont les premiers à avoir reporté une réaction métallo-catalysée *in cellulo*. En 2006, ils ont décrit un exemple de groupe protecteur pouvant être retiré de manière catalytique dans un système biologique vivant⁶². Ils ont mis en évidence que le complexe au ruthénium (II) [Cp*Ru(cod)Cl] (**2**, Schéma 7) – Cp* = pentaméthylcyclopentadienyl, cod = 1,5-cyclooctadiène – est capable de libérer *in vitro* une amine à partir de son allylcarbamate en présence d'eau, d'air et d'un excès de thiophénol (PhSH). Ils ont montré que la présence de thiophénol, agissant comme capteur d'allyle, était nécessaire pour obtenir une conversion complète avec le catalyseur [Cp*Ru(cod)Cl]. Pour évaluer ce clivage dans des conditions qui sont les plus ressemblantes possibles à un environnement physiologique, ils ont utilisé la rhodamine protégée N,N-bis-allyloxycarbonyl-rhodamine 110 (**rhodamine 110 bis-alloc** ; **1**, Schéma 7) en présence d'extraits cellulaires, de glutathion (GSH) et de thiophénol. Le fluorophore cagé est non-fluorescent. Lors de la déprotection de l'allylcarbamate, la rhodamine 110 fortement fluorescente est libérée (**3**, Schéma 7) et le suivi de la réaction peut se faire par analyse de la fluorescence émise. Cette même réaction a aussi été réalisée à l'intérieur de cellules mammaliennes vivantes, signifiant que le catalyseur est capable de passer à travers les membranes des cellules et de délivrer son activité. Les limitations de ce système sont la faible efficacité catalytique et la nécessité d'utiliser du thiophénol, qui est relativement toxique pour les cellules et malodorant⁶².

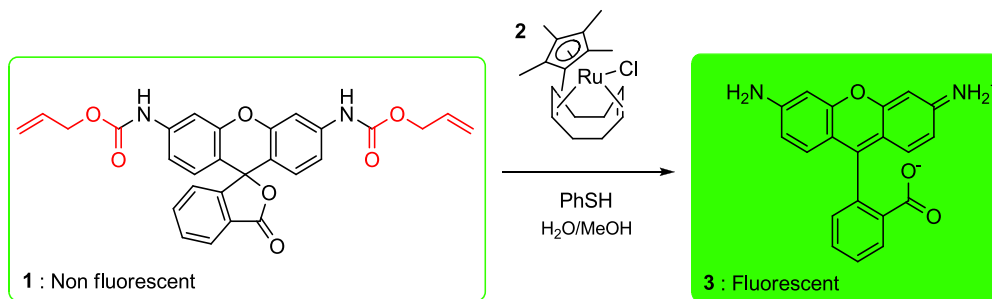


Schéma 7 : Réaction de déprotection de la **rhodamine 110 bis-alloc** catalysée au ruthénium ; schéma adapté de Streu et Meggers, 2006⁶²

Quelques années plus tard, Meggers et ses collaborateurs ont développé une version photoactivable en vue de l'amélioration du système catalytique, le complexe sandwich $[\text{Cp}^*\text{Ru}(\eta^6\text{-pyrène})]\text{PF}_6$ (**Ru2**, Figure 4)⁶⁷. Ce complexe permet un contrôle spatial et temporel de l'activation mais l'utilisation de thiophénol est toujours requise.

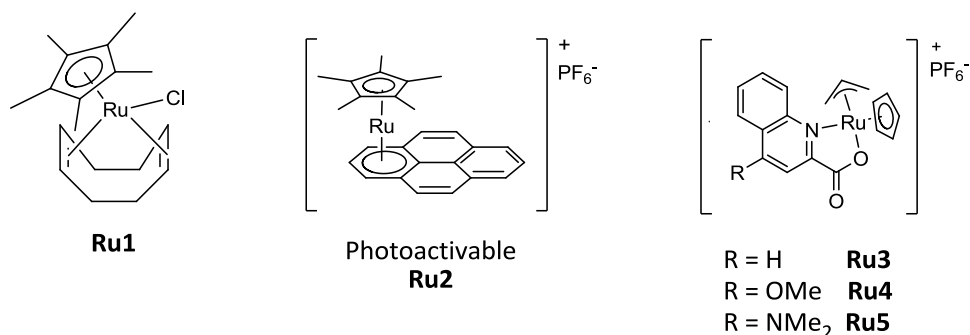


Figure 4 : Représentation des complexes catalytiques au ruthénium développés par Meggers et ses collaborateurs^{62,67,68}

Plus récemment, une nouvelle génération de catalyseurs au ruthénium a été mise en évidence, comprenant les complexes $[\text{CpRu}(\text{QA-R})(\text{allyl})]\text{PF}_6$ (**Ru3**, **Ru4** et **Ru5**, Figure 4)⁶⁸ – Cp= Cyclopentadiényl, QA= 2-quinolinecarboxylate. Ces catalyseurs sont capables de déprotéger la N-alloc-aminocoumarine (**1**, Schéma 8) avec une grande efficacité et dans des conditions biologiques davantage pertinentes. En présence de 5 mM de GSH, seulement 5 mol% de catalyseur sont nécessaires pour la conversion complète de l'aminocoumarine protégée.

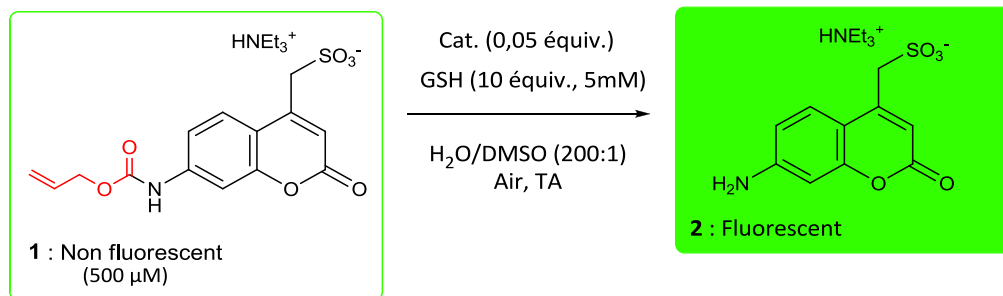


Schéma 8 : Réaction de déprotection de l'aminocoumarine alloc catalysée au ruthénium ; schéma adapté de Völker et al., 2014⁶⁸

Ces nouveaux catalyseurs ont également été testés *in cellulo* pour réaliser la réaction de déprotection de la rhodamine 110 bis-alloc comme présentée au Schéma 7. Suite à l'ajout de 20 μM de catalyseur, une augmentation de fluorescence (jusqu'à un facteur 130) a été observée à l'intérieur du cytoplasme des cellules, signifiant que ces catalyseurs sont capables de passer les membranes cellulaires et de catalyser la réaction à l'intérieur de cellules vivantes⁶⁸.

Un prototype d'application thérapeutique de ce système catalytique de clivage au ruthénium d'un groupement protecteur allylcarbamate pourrait être l'activation catalytique d'un agent chimiothérapeutique à l'intérieur même des cellules tumorales. Pour tester l'efficacité de ce système, ils ont imaginé une réaction de déprotection *in cellulo* d'un agent anticancéreux fréquemment utilisé, la doxorubicine (Schéma 9). La prodrogue cagée N-(allyloxycarbonyl)doxorubicine (**5**, Schéma 9) n'induit pas de toxicité tandis que la drogue libérée (**6**, Schéma 9) par l'action du catalyseur (**Ru5**, Figure 4) induit une forte diminution de la viabilité cellulaire suite à l'induction de l'apoptose⁶⁸.

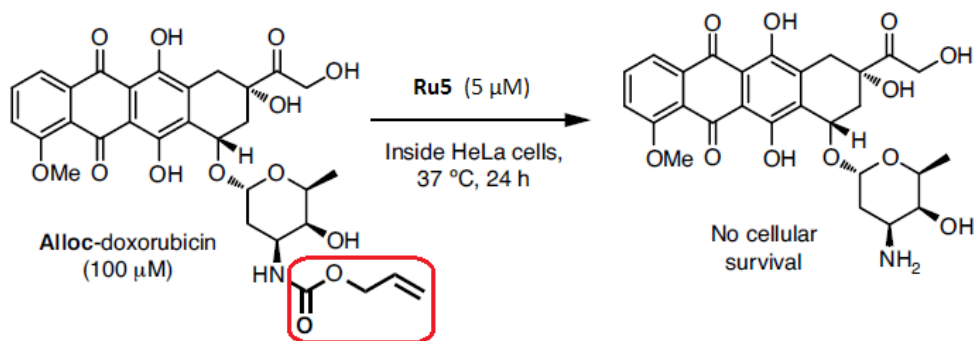


Schéma 9 : Déprotection catalytique de la doxorubicine alloc à l'intérieur de cellules HeLa ; schéma adapté de Völker et Meggers, 2015⁶⁹

1.3.3.2 Nanoparticules de palladium

Dans le but de diminuer la toxicité intrinsèque des catalyseurs, l'idée est venue de mettre au point des catalyseurs supportés afin d'encapsuler les atomes métalliques⁶⁹. À partir de 2011, Bradley *et al.* ont développé une série de systèmes catalytiques hétérogènes dans lesquels le catalyseur est fixé sur un système de transport biocompatible⁷⁰⁻⁷³. Le premier système catalytique consiste en des nanoparticules de Pd⁰ fixées sur des microsphères de polystyrène. Afin de démontrer l'activité catalytique de ce système, Bradley et son équipe ont utilisé la réaction modèle de Meggers avec la rhodamine 110 bis-alloc (Figure 5a). Les analyses par microscopie confocale à fluorescence révèlent que le catalyseur est capable d'être internalisé dans les cellules et de catalyser la réaction de clivage de l'allylcarbamate dans le cytoplasme, en libérant la rhodamine 110 fluorescente (Figure 5b)⁷⁰.

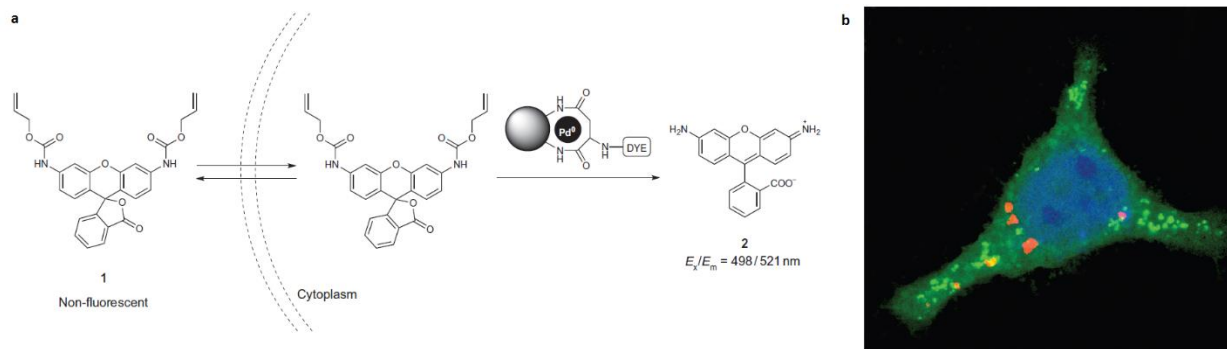


Figure 5 : Clivage de l'allylcarbamate catalysé par le Pd⁰ à l'intérieur de cellules HeLa⁷⁰. (a) Déprotection intracellulaire catalysée au Pd⁰. (b) Superposition de plusieurs images confocales montrant le noyau (bleu), les microsphères de Pd⁰ (rouge) et le composé 2 décafé (vert).

Dans le but d'envisager une future application médicale, un deuxième système catalytique hétérogène a été développé⁷¹. Celui-ci consiste en une résine de polystyrène et de polyéthylène glycol fonctionnalisée avec des nanoparticules de Pd⁰. En implantant ce dispositif au sein d'une tumeur, des composés cytotoxiques peuvent être activés de manière ciblée. Pour ce faire, un précurseur (Pro-5FU ; **1**, Schéma 10) de l'agent chimiothérapeutique 5-fluorouracile (5FU) a été synthétisé. La présence du groupement protecteur propargyl induit la perte de l'activité cytotoxique. Afin de tester l'efficacité du système, la réaction a d'abord été réalisée à 37 °C et à pH physiologique de manière à tester le système dans des conditions biocompatibles. À la suite de l'action du catalyseur, le précurseur a bien été transformé en 5FU (Schéma 10). La même réaction a ensuite été testée en cellules cancéreuses. La prodrogue activée par le catalyseur a retrouvé son activité cytotoxique prouvant que le système catalytique fonctionne en système cellulaire⁷¹.

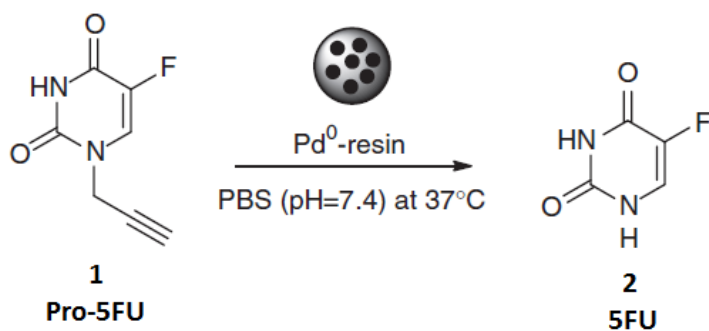


Schéma 10 : Conversion de la prodrogue Pro-5FU en 5FU catalysée par le Pd⁰ en environnement biocompatible⁷¹

1.3.4 Potentiel en thérapie anticancéreuse

La catalyse organométallique offre de nouvelles possibilités pour élaborer des stratégies thérapeutiques innovantes. Elle apparaît comme un nouvel outil pouvant être utilisé pour activer ou libérer une molécule de manière ciblée dans le microenvironnement tumoral de telle sorte que les tissus sains avoisinants ne seraient pas touchés.

Plusieurs stratégies tirant profit des spécificités du microenvironnement tumoral détaillées plus haut sont envisageables. La première stratégie tire parti des conditions « hypoxiques » (environnement réducteur) et/ou « d'acidose » étant plus favorables pour la réaction. Par ailleurs, ces conditions sont la conséquence du métabolisme anormal des cellules cancéreuses. Les acteurs intervenant dans ce changement métabolique sont par conséquent des cibles thérapeutiques potentielles⁷⁴. La seconde stratégie tire profit de la vascularisation immature et tortueuse permettant une meilleure délivrance et une accumulation du composé cagé et/ou du catalyseur¹⁸. Outre la perméabilité accrue des microvaisseaux de la tumeur, l'expression de protéines spécifiques à la surface de l'endothélium vasculaire tumoral (certaines intégrines) ou des cellules tumorales elles-mêmes (récepteur à l'acide folique) représente également une option pour favoriser l'adressage de la thérapie⁷⁵. La troisième option combinant des stratégies exploitant différentes caractéristiques du microenvironnement tumoral est également attractive. Cette stratégie consiste à élaborer de nouvelles techniques de vectorisation⁷⁶. Nous pouvons par exemple imaginer des nanoparticules transportant un catalyseur et ciblant la tumeur grâce à des ligands en surface, ou encore des micelles sensibles au pH et ne délivrant leur contenu que dans l'environnement acide des tumeurs^{77,78}. Ces nanoparticules permettent d'offrir une sélectivité d'action grâce à la chimie bioorthogonale. En d'autres termes, même si l'agent thérapeutique cagé et inactif se disperse partout dans l'organisme, la réaction activant le composé ne se fera que dans la tumeur.

2 Objectifs

Au cours de ce projet de recherche, le premier objectif a été de développer un modèle fluorogénique capable de cribler rapidement une série de catalyseurs en conditions *in vitro* (Schéma 11). Les catalyseurs ont été évalués sur leur capacité à cliver un groupement protecteur alloc *via* une réaction de Tsuji-Trost sur une réaction fluorogénique.

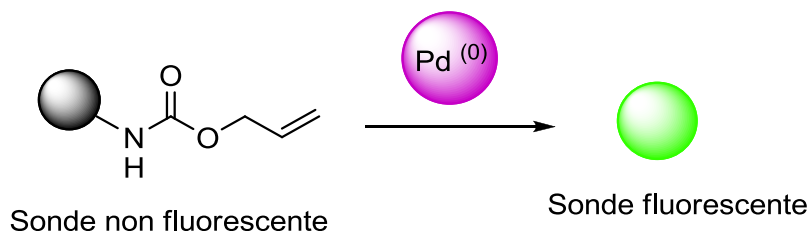


Schéma 11: Modèle fluorogénique développé pour réaliser le criblage des catalyseurs

Une fois le modèle fluorogénique mis au point en conditions *in vitro*, le second objectif a été de valider la méthode en système cellulaire (Schéma 12). Pour se faire, nous avons tenté d'élaborer un protocole expérimental permettant cette validation *in cellulo*. Le criblage a pour but final d'identifier les catalyseurs les plus actifs ainsi que les structures liées à une activité élevée. D'autres paramètres comme la toxicité ont également été pris en compte pour choisir les meilleurs catalyseurs.

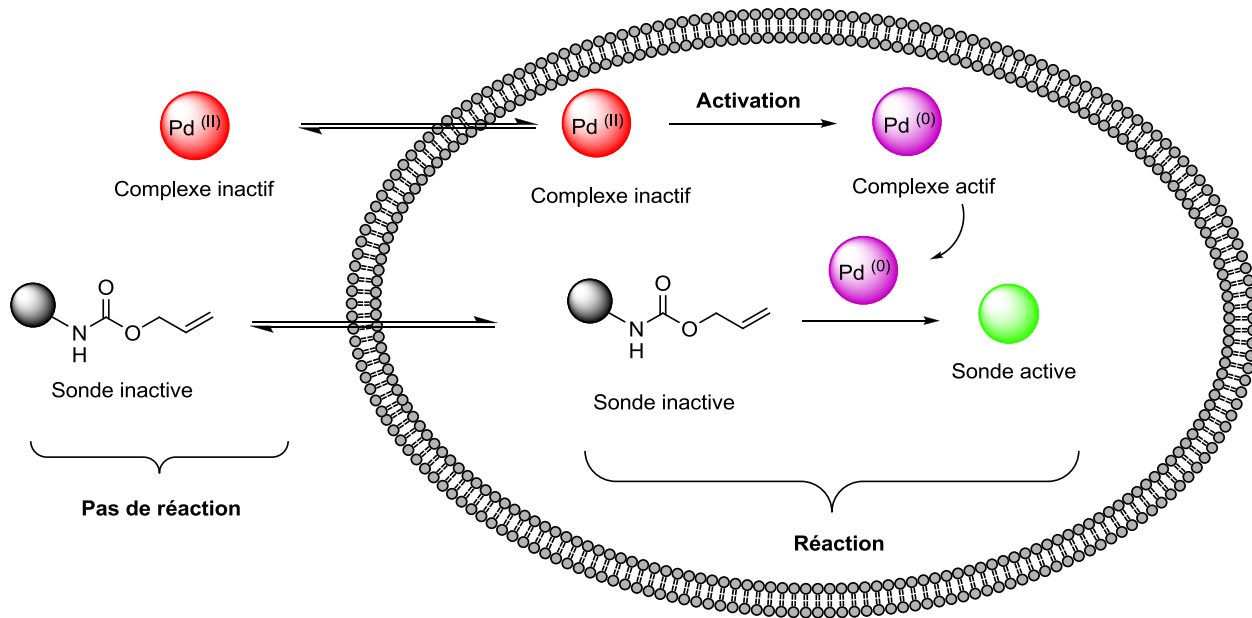


Schéma 12 : Modèle fluorogénique mis au point pour la validation en système cellulaire

3 Materials and methods

3.1 Chemistry section

3.1.1 Chemicals, solvents and purifications

Commercial reagents were purchased from Acros, Sigma-Adrich, TCI and Strem and used without purification unless stated otherwise. Unless specifically mentioned, the reactions were performed under argon atmosphere using flame-dried glassware and distilled solvent. Toluene was distilled on sodium under an argon atmosphere. THF was distilled on sodium/benzophenone under an argon atmosphere. Dichloromethane and acetonitrile were distilled on CaH₂ under an argon atmosphere. Solvents used for work up were of technical grade.

Column Chromatography were carried out on silica gel (ROCC 60, 40-63 Dm). Thin Layer Chromatography analyses were performed on commercial aluminum plates bearing a 0.25 mm layer of Merck Silica gel 60F 254. Components were visualized by illumination with a short wavelength UV light and/or staining in a solution of potassium permanganate or vanillin stain followed by heating. Flash column chromatography was performed on silica gel (ROCC 60, 40-63 μm).

3.1.2 Equipments

Fluorescence spectroscopy

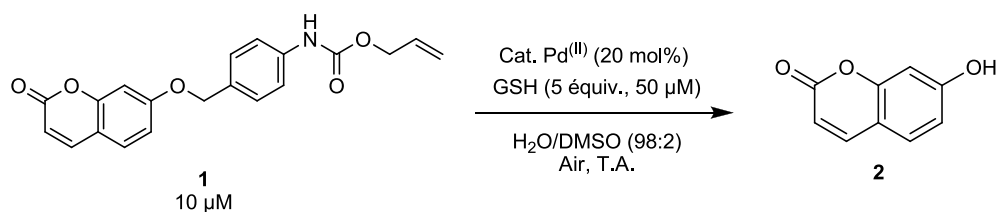
Fluorescence experiments at room temperature were recorded on a Varian Cary Eclipse scanning spectrofluorometer equipped with a Xenon flash lamp. Samples for excitation and emission were contained in 1 cm x 1 cm quartz cuvette (3.5 ml volume). Measurements were performed with appropriate excitation and emission wavelengths (λ) for each fluorophore as shown later.

3.1.3 Synthesis

All fluorescence probes, prodrugs and catalysts have already been synthesized for previous work in the lab. Therefore, the synthesis section is given for information in the appendix.

3.1.4 *In vitro* catalyst screening – Umbelliferone model

3.1.4.1 *In vitro* deprotection of pro-umbelliferone



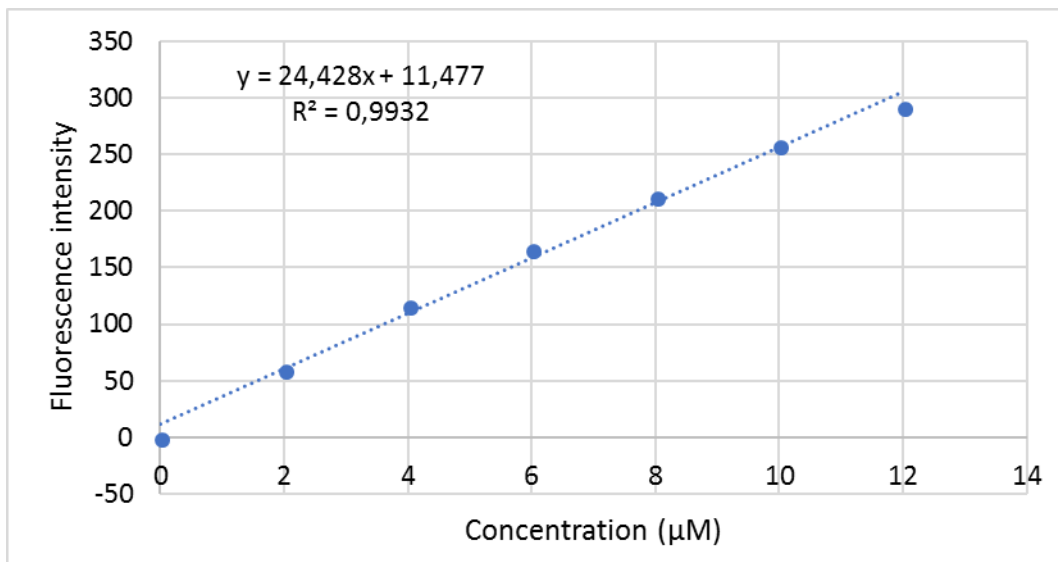
All solid compounds were firstly solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO) and diluted later in water at a ratio of H₂O/DMSO \geq 98:2 to the appropriate concentration, except glutathione. This solution was prepared by dissolving solid GSH in water. All solutions were prepared before use.

3.1.4.2 Calibration curve

A calibration curve was established by measuring the intensity of fluorescence at 454 nm for an excitation wavelength of 325 nm. Each spectrum was recorded 10 times and an average was performed. Increasing concentrations of umbelliferone (0 μM to 12 μM) were chosen and their intensity were measured. A stock solution was prepared by dissolving 16.2 mg of umbelliferone in 10 mL DMSO then the volume was brought to 100 mL by adding water. The calibration standards were prepared according to the table given below.

Standard (μM)	V stock (mL)	V add DMSO (mL)	V tot (mL)
0	0	1.00	100
2	2	0.98	100
4	4	0.96	100
6	5	0.94	100
8	8	0.92	100
10	10	0.90	100
12	12	0.88	100

For uncaging the caged umbelliferone with palladium complexes, the amount of released free umbelliferone was quantified by using the linear equation $I = 24.428.C + 11.477$ ($R^2 = 0.9932$) where I = fluorescence intensity at emission 454 nm and C = concentration of umbelliferone.



3.1.4.3 Kinetics and catalyst screening

In a typical procedure, three stock solutions were prepared. The pro-umbelliferone solution was found to be stable when properly stored in the fridge. The GSH solution and the catalyst need to be freshly prepared as they may undergo degradation or be inactivated. In a 3 mL quartz cuvette, 1 mL of each solution (preparation mentioned in the table below) was introduced and the spectrofluorometer starts recording spectra after introduction of the cuvette.

	C sol stock (µM)	Mass (mg)	Bring up to volume
Pro-umbelliferone	30	5.3	m in 10 mL DMSO Take 2 mL + 1 mL DMSO then bring to 100 mL with water
Glutathione	150	4.6	m in 100 mL water
Catalyst	6	Depends on the MW	m in 5 mL DMSO then bring to 100 mL with water 20 mL diluted in 100 mL water

For each raw data set, each spectrum was set to $I = 0$ at 600 nm. Then, the spectra are plotted $I = f(\lambda)$. Then, a direct reading was performed at $\lambda = 454$ nm and $I(454)$ was plotted in function of the time. Then, using the calibration curve, the intensity can be converted to concentration and eventually, knowing that concentration of pro-umbelliferone is equal to 10 µM, we could access the conversion. No further mathematical treatment was required as the umbelliferone was the only fluorescent species and that no detectable fluorescence quenching was observed.

Parameters used to record spectra are mentioned below.

Parameters	Value
Scan mode	Emission
Excitation	At 325 nm
Range	Acquisition from 350 to 600 nm
Cycle mode – Number of scans	10 every 0.5 min (the average was performed on the 10 spectra)
Slits opening	2.5 mm
Stirring	Medium
Voltage	Medium
Temperature	25 °C

3.2 Biology section

3.2.1 Cell culture

SiHa cells (human cervix squamous carcinoma) were routinely cultured in powder Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with D(+) glucose (10 mM), HEPES (25 mM), PIPES (25 mM), L-glutamine (2 mM), fetal serum bovine (FBS, 10%) and antibiotics (penicillin, 10 units/mL and streptomycin, 10 µg/mL). Cell cultures were performed in a 5% CO₂ atmosphere incubator at 37 °C. Media, sera and antibiotics were purchased from Lonza, Thermo Fisher Scientific and Sigma-Aldrich.

The day before the assays, the medium was removed and cells were washed with Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, 5 mL). To detach the cells from the flask, trypsin/EDTA 0,05% (3 mL) was added and then incubated for 3 minutes at 37 °C. Cells were counted using the automated counting system Cellometer Auto T4 (Nexcelom Bioscience) wherein viable cells were enumerated by Trypan Blue exclusion. Cells were then diluted with normal culture medium to the appropriate concentration.

3.2.2 *In cellulo* catalyst activity – Umbelliferone and Rhodamine models

SiHa cells were seeded in black polystyrene 96-well plates (Greiner bio-one) at a density of 10,000 cells per well. Caged drug (**pro-umbelliferone** or **rhodamine bis-alloc**) was solubilized in DMSO to a concentration of 25 mM. This solution was diluted in cell culture medium to reach the concentration of 50 μ M. Catalysts and thiosalicylic acid were solubilized in DMSO to a concentration of 10 mM. These solutions were diluted in cell culture medium to reach the concentration of 20 μ M. The final concentration of DMSO was about 1/500 v/v. Caged drug diluted the medium – with or without thiosalicylic acid – was added (100 μ L/well), followed by 1 h or an overnight incubation at 37 °C. Thereafter, the culture medium was removed and cells were washed 3 times with phosphate buffered-saline (PBS, 200 μ L/well). Catalyst solutions were then added (100 μ L/well). Fluorescence intensity was read with the multi-mode platform SpectraMax i3 (Molecular Devices). Umbelliferone model: Excitation and emission wavelengths used are 320 ± 15 nm and 458 ± 15 nm respectively. Rhodamine model: Excitation and emission wavelengths used are 505 ± 15 nm and 540 ± 15 nm respectively.

3.2.3 *In cellulo* catalyst screening and optimization – Rhodamine model

SiHa cells were seeded in black polystyrene 96-well plates (Greiner bio-one) (10,000 cells/well). **Rhodamine bis-alloc** was solubilized in DMSO to a concentration of 25 mM. This solution was diluted in cell culture medium to reach the concentration of 50 μ M. Catalysts were solubilized in DMSO to a concentration of 10 mM or 5 mM. These solutions were diluted in cell culture medium to reach the appropriate concentration (20 μ M or 10 μ M for the screening; 10 – 5 – 1 – 0,5 μ M for the optimization). The final concentration of DMSO was between 1/500 and 1/10,000. **Rhodamine bis-alloc** diluted in the medium was added (100 μ L/well) and incubated overnight at 37 °C. Thereafter, the culture medium was removed and cells were washed 3 times with PBS (200 μ L/well). Catalyst solutions were then added (100 μ L/well). Fluorescence intensity was monitored with the multi-mode platform SpectraMax i3 (Molecular Devices). Excitation and emission wavelengths used are 505 ± 15 nm and 540 ± 15 nm respectively.

3.2.4 *In cellulo* catalyst activity in normoxia vs hypoxia – Rhodamine model

SiHa cells were seeded in black polystyrene 96-well plates (Greiner bio-one) (10,000 cells/well). **Rhodamine bis-alloc** was solubilized in DMSO to a concentration of 25 mM. This solution was diluted in cell culture medium to reach the concentration of 50 μ M. Catalysts were solubilized in

DMSO to a concentration of 5 mM. These solutions were diluted in cell culture medium to reach the concentration of 10 μ M. The final concentration of DMSO was about 1/500. **Rhodamine bis-alloc** diluted in the medium was added (100 μ L/well) and incubated overnight at 37 °C in conventional incubator or in Ruskinn INVIVO₂ 400 hypoxia chamber (1% O₂, 5% CO₂). Thereafter, the culture medium was removed and cells were washed 3 times with PBS (200 μ L/well). Catalyst solutions were then added (100 μ L/well). Fluorescence intensity was read with the multi-mode platform SpectraMax i3 (Molecular Devices). Excitation and emission wavelengths used are 505 \pm 15 nm and 540 \pm 15 nm respectively.

3.2.5 Fluorescence images of SiHa cells

SiHa cells were seeded in black polystyrene 96-well plates (Greiner bio-one) at a density of 10,000 cells per well. **Rhodamine bis-alloc** was solubilized in DMSO to a concentration of 25 mM. This solution was diluted in cell culture medium to reach the concentration of 50 μ M. Catalysts were solubilized in DMSO to a concentration of 5 mM. These solutions were diluted in cell culture medium to reach the concentration of 10 μ M. The final concentration of DMSO was about 1/500 v/v. **Rhodamine bis-alloc** diluted the medium was added (100 μ L/well) and incubated overnight at 37 °C. Thereafter, the culture medium was removed and cells were washed 3 times with PBS (200 μ L/well). Catalyst solutions were then added (100 μ L/well). After 2h15 incubation, cells were washed again with PBS (200 μ L/well) and images were taken with fluorescence microscopy Axiovert S100 (Zeiss).

3.2.6 Cell viability assay

SiHa cells were seeded in white polystyrene 96-well plates (Greiner bio-one CELLSTAR) at a density of 10,000 cells per well. For the assay, medium was aspirated and cells were incubated for the time required at 37 °C in fresh media containing caged drugs, drugs, catalysts and the combination of both (100 μ L/well). Cell viability was performed using PrestoBlue® reagent (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific). 10% PrestoBlue® was added to each well for 1 h incubation at 37 °C and absorbance was measured using Perkin Elmer Victor X4 multilabel plate reader. Each experiment was performed in triplicates for each condition.

4 Résultats et discussion

4.1 Tests en catalyse *in vitro*

Comme expliqué précédemment, notre but est de pouvoir réaliser des réactions catalysées par des composés organométalliques, en particulier de palladium, dans un milieu cellulaire tel que des cellules mammaliennes cancéreuses vivantes.

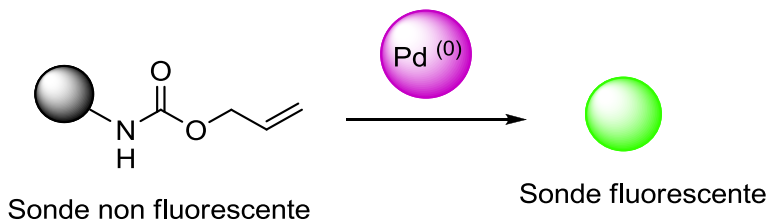


Schéma 13 : Modèle fluorogénique développé pour réaliser le criblage des catalyseurs

Le premier objectif est de mettre au point un modèle permettant le screening rapide d'une série de catalyseurs (Schéma 13). Ce modèle implique une réaction catalysée par une espèce active de palladium (0). Le screening basé sur ce modèle doit pouvoir discriminer directement les catalyseurs qui sont actifs de ceux qui ne le sont pas, pour finalement trouver quelques candidats idéaux ayant la meilleure activité. Ressortiront de ce criblage le ou les catalyseur(s) ayant la meilleure activité, capables de traverser les membranes cellulaires afin de catalyser une réaction de Tsuji-Trost. Pour résumé, une fois le modèle maîtrisé et bien mis en place, les catalyseurs sélectionnés seront testés en série dans les conditions *in vitro* pour ensuite appliquer ce même modèle en cellules dans un second temps.

4.1.1 Choix des catalyseurs

Différents métaux de transition peuvent être utilisés en catalyse organométallique. Cependant nous nous sommes principalement focalisés sur les catalyseurs de palladium pour ce projet ; il s'agit du métal le plus traditionnellement utilisé pour la réaction de Tsuji-Trost. Une série de catalyseurs commerciaux ou déjà synthétisés au sein du laboratoire pour des travaux précédents étaient déjà disponibles. De ce fait, le choix s'est orienté en premier lieu parmi ceux disponibles. Divers ligands dans les complexes η^3 - π -allylpalladium et quelques structures avec d'autres métaux que le Pd ont été sélectionnées afin d'avoir une large gamme de catalyseurs pour le criblage (Figure 6).

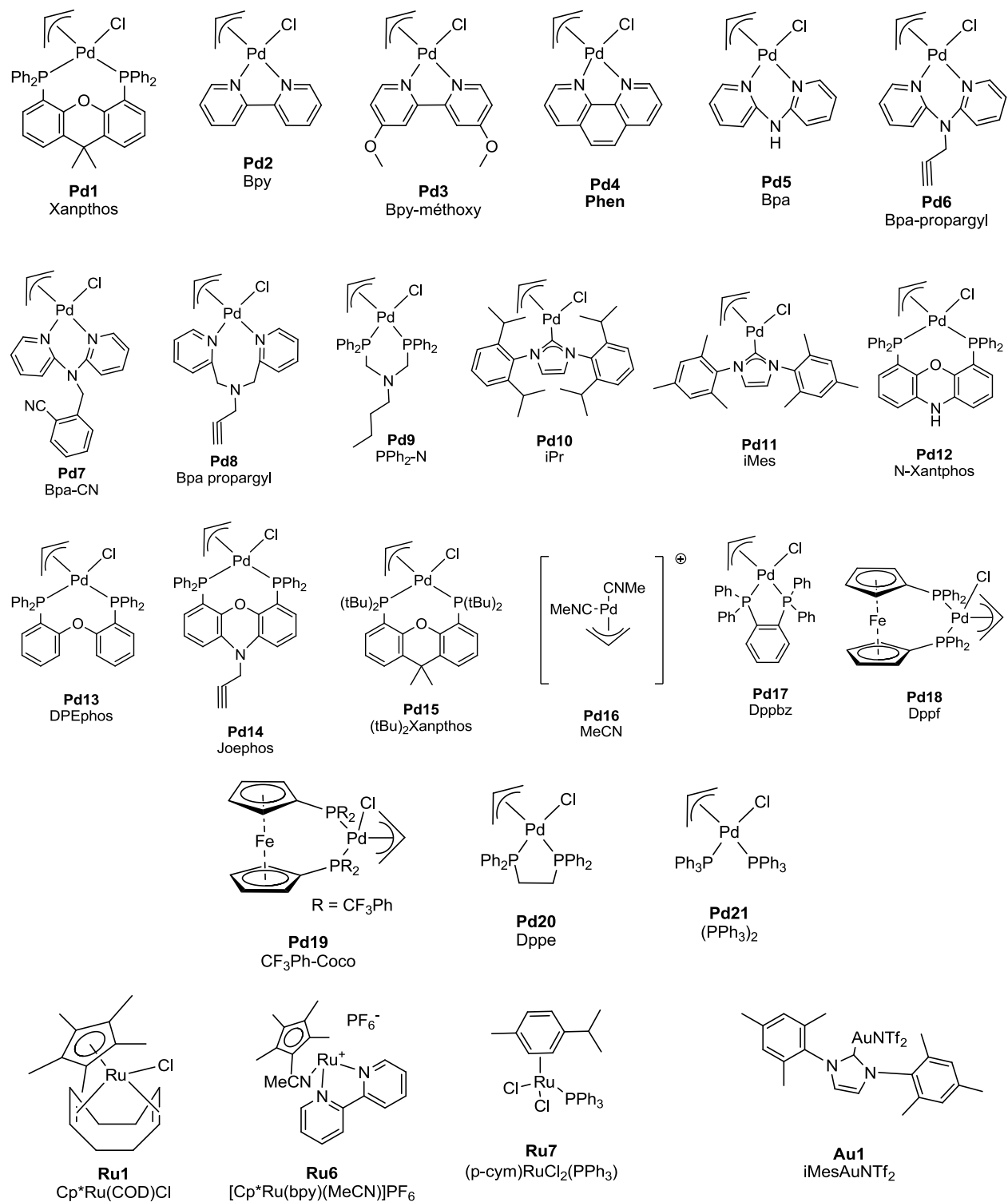


Figure 6 : Structures des catalyseurs sélectionnés pour le screening *in vitro*

4.1.2 Choix de la réaction modèle

La réaction modèle utilisée pour étudier l'activité des différents catalyseurs sélectionnés est de type fluorogénique. Comme dans les travaux pionniers de Meggers *et al.*^{62,65}, l'activité du catalyseur a été évaluée sur sa capacité à cliver un groupement protecteur labile alloc *via* une réaction de Tsuji-Trost et dans des conditions se rapprochant des conditions physiologiques.

Un bon modèle fluorogénique doit répondre à plusieurs critères :

- La synthèse des composés doit être simple à réaliser et à partir de réactifs peu chers
- Les composés impliqués dans la réaction doivent être stables en conditions biologiques et avoir une solubilité suffisante dans les milieux utilisés
- Le fluorophore cagé doit être le moins fluorescent possible tandis que la sonde libre doit l'être la plus fluorescente possible afin de permettre un suivi facile de l'avancement de la réaction
- Le shift de Stokes de la sonde doit être suffisant
- Le fluorophore ne doit être idéalement protégé que par une seule fonction labile
- Le quenching de fluorescence par d'autres éléments présents durant la réaction doit être minime

Deux modèles ont été utilisés dans ce projet. Le premier se base sur une sonde fluorescente ombelliférone et le second utilise une sonde fluorescente rhodamine.

4.1.3 Modèle Ombelliférone

4.1.3.1 Présentation du modèle

Au départ, ce modèle a été inventé de manière rationnelle et développé au sein du labo par Mathieu Soetens pour simplifier le modèle utilisé dans les travaux pionniers de Meggers^{62,65}. La synthèse de la sonde protégée (**1, pro-ombelliférone**) est plus simple à réaliser que dans le cas de la rhodamine de Meggers. Ce modèle est nouveau et sera à comparer avec le modèle utilisé actuellement dans la littérature.

Ce premier modèle se base sur une sonde fluorescente off/on. La molécule protégée **1** (pro-ombelliférone) est non fluorescente tandis que la molécule libérée **2** (ombelliférone) par l'action du catalyseur fluoresce dans le bleu (Schéma 14).

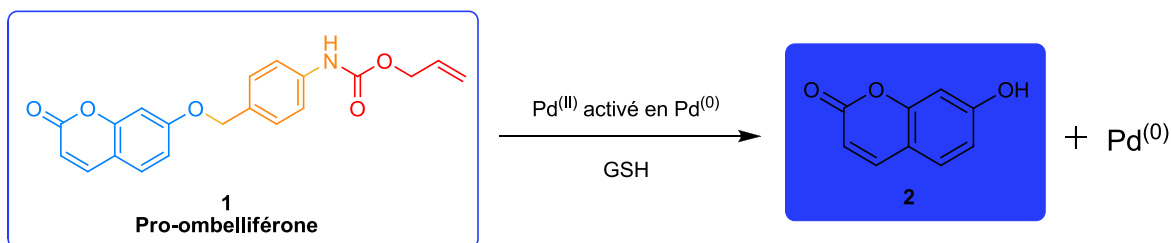


Schéma 14 : Modèle de déprotection catalytique par le Pd⁽⁰⁾ de la pro-ombelliférone

Le mode d'action du catalyseur est le suivant (Schéma 15). Après coordination du complexe métallique de type L_2M^0 à l'allyle, l'insertion oxydante donne lieu au π -allyle. Ce dernier est ensuite attaqué par un thiol (GSH dans notre modèle), menant à la régénération du catalyseur et à l'allylation du thiol. Enfin, le carbamate élimine une molécule de CO_2 et se fragmente pour donner lieu, après hydrolyse, au linker 4-aminobenzyl alcool et à l'ombelliférone.

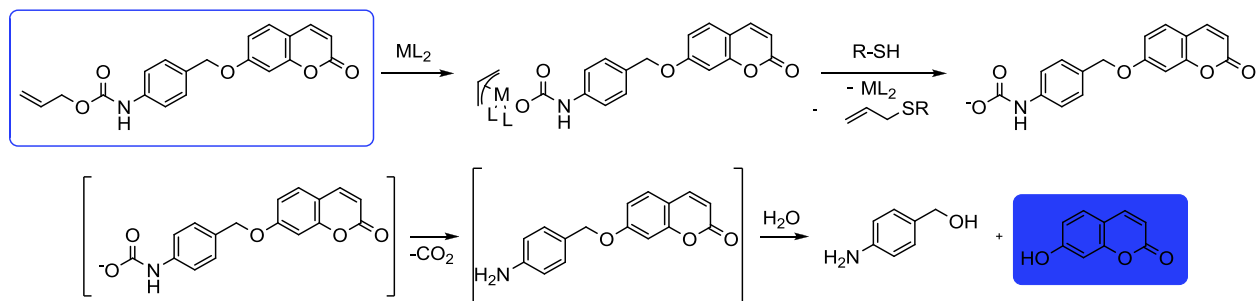


Schéma 15 : Mécanisme de relargage de l'ombelliférone au départ de la **pro-ombelliférone** par l'action du complexe métallique

La molécule cagée utilisée dans ce premier modèle est composée de trois parties distinctes (**1**, Schéma 14) : une partie gâchette (un allyle carbamate, en rouge), un linker (4-aminobenzyl alcool, en orange) et un fluorophore (ombelliférone, en bleu). La partie gâchette est facilement clivée en présence de $Pd^{(0)}$. Les spectres d'émission présentés à la Figure 7 montrent que le fluorophore cagé possède une très faible fluorescence résiduelle. Celle-ci a été considérée comme pratiquement négligeable par rapport à l'intensité qu'émet le fluorophore libre. À une concentration de $10 \mu M$, un rapport d'environ 70 est observé entre l'intensité du fluorophore libre et cagé. Comme la molécule protégée n'est que très peu fluorescente et que les réactifs impliqués dans cette réaction ne quenchent pas la fluorescence, la libération de fluorescence peut être suivie qualitativement et quantitativement par spectroscopie de fluorescence, moyennant une légère correction pour la fluorescence du produit de départ, lors des tests *in vitro*. Le suivi s'est réalisé en excitant le fluorophore ombelliférone à 325 nm (dans l'UV) et en mesurant l'émission de fluorescence à 454 nm (dans le bleu).

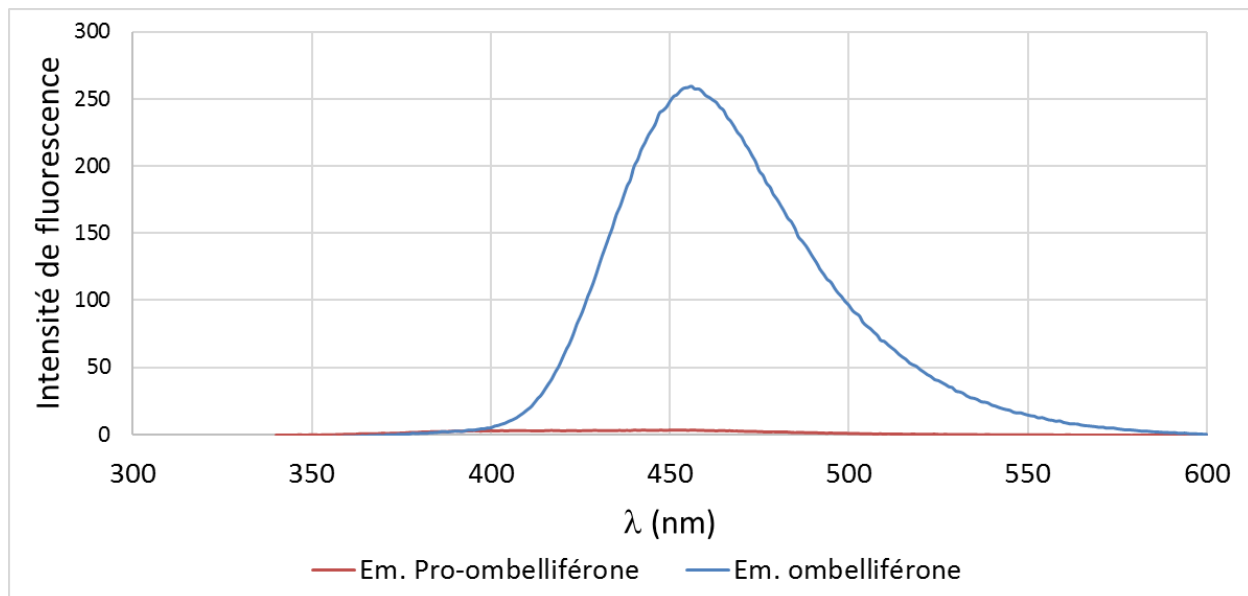


Figure 7 : Spectres d'émission de l'ombelliférone cagée et libre. Conditions : 10 μM dans $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO} \geq 98:2$ à 25°C en présence d'air. Mesure de la fluorescence : $\lambda_{\text{exc}} = 325 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{ém}} = 454 \text{ nm}$.

4.1.3.2 Criblage de catalyseurs

Afin de pouvoir analyser qualitativement et quantitativement la cinétique de décaillage du fluorophore, une calibration a été préalablement réalisée en prenant les mesures d'émission du fluorophore non protégé dans une gamme de concentrations allant de 0 μM à 12 μM en solution $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ 99:1 (Figure 8). Cette calibration est parfaitement reproductible de jour en jour sur l'appareil utilisé.

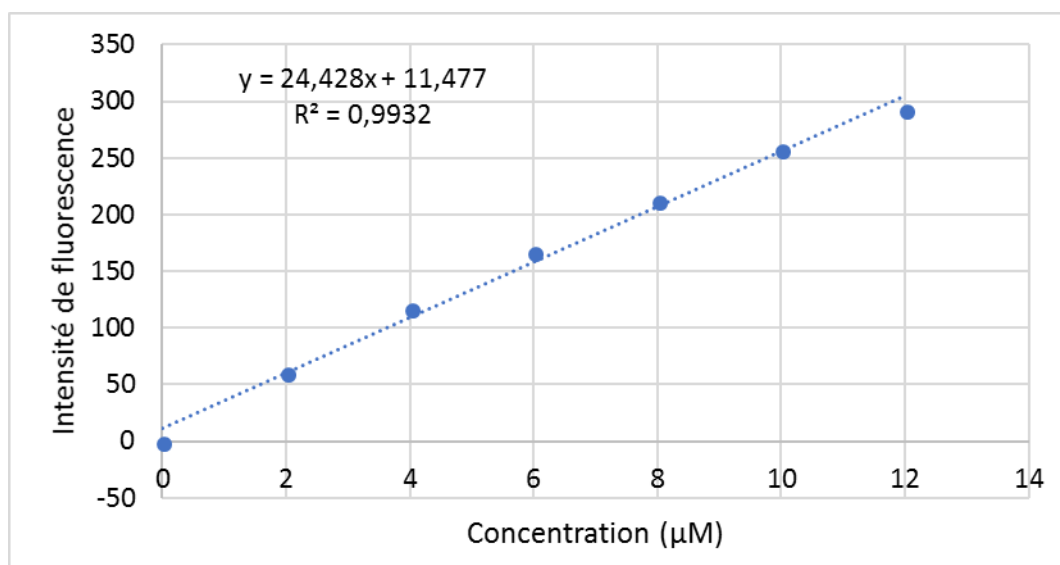


Figure 8 : Droite de calibration de l'ombelliférone en solution $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ 99:1. Mesure de la fluorescence : $\lambda_{\text{exc}} = 325 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{ém}} = 454 \text{ nm}$.

Pour l'expérience en tant que telle, nous avons voulu examiner la capacité des complexes présentés à la Figure 6 à catalyser la réaction de déprotection de la **pro-ombelliférone 1** en

solution aqueuse (H₂O/DMSO 98:2), sous air et en présence d'un excès de glutathion (5 équivalents) (Schéma 16).

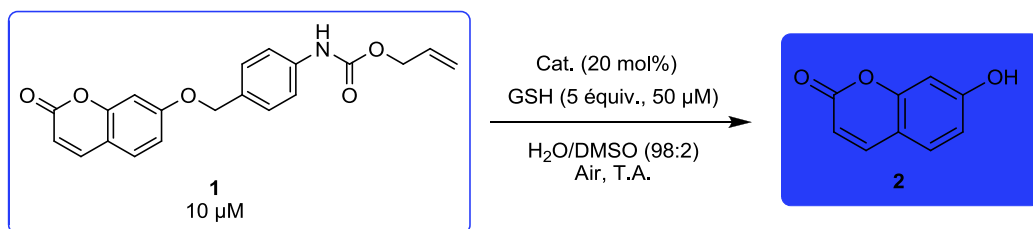


Schéma 16 : Réaction de déprotection catalytique de la **pro-ombelliférone**

Lors de cette expérience, les courbes de fluorescence obtenues pour un complexe sont présentées à la Figure 9. Ce graphique représente l'évolution de la réaction de déprotection de l'ombelliférone alloc par le catalyseur **Pd1** au cours du temps. Nous observons une augmentation considérable de l'intensité de fluorescence à la longueur d'onde d'émission de 454 nm, attribuable à la libération d'ombelliférone.

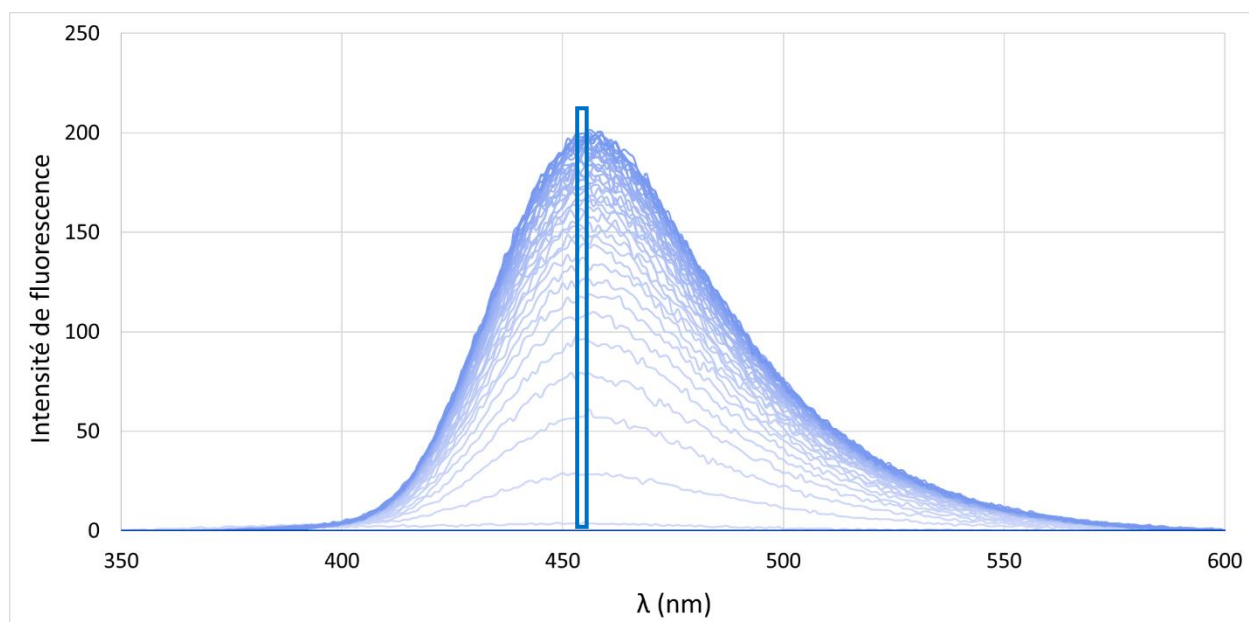


Figure 9 : Cinétique de clivage de l'ombelliférone alloc par le catalyseur **Pd1**. Mesure de la fluorescence : $\lambda_{exc} = 325$ nm et $\lambda_{ém} = 454$ nm.

Une légère correction a été appliquée ; celle-ci vise à faire passer les courbes par zéro à 600 nm afin de garder une référence commune à toutes les courbes. Ensuite, au moyen de la courbe de calibration (Figure 8) et sachant que la prodrogue résiduelle donne une fluorescence de 3,8 unités, nous avons pu transformer les intensités de fluorescence en concentration d'ombelliférone libérée afin d'avoir une estimation de la conversion du fluorophore cagé en fluorophore libre en fonction du temps pour chaque composé testé. Ces cinétiques de conversion

pour tous les complexes testés ayant donné une conversion non nulle sont présentées à la Figure 10.

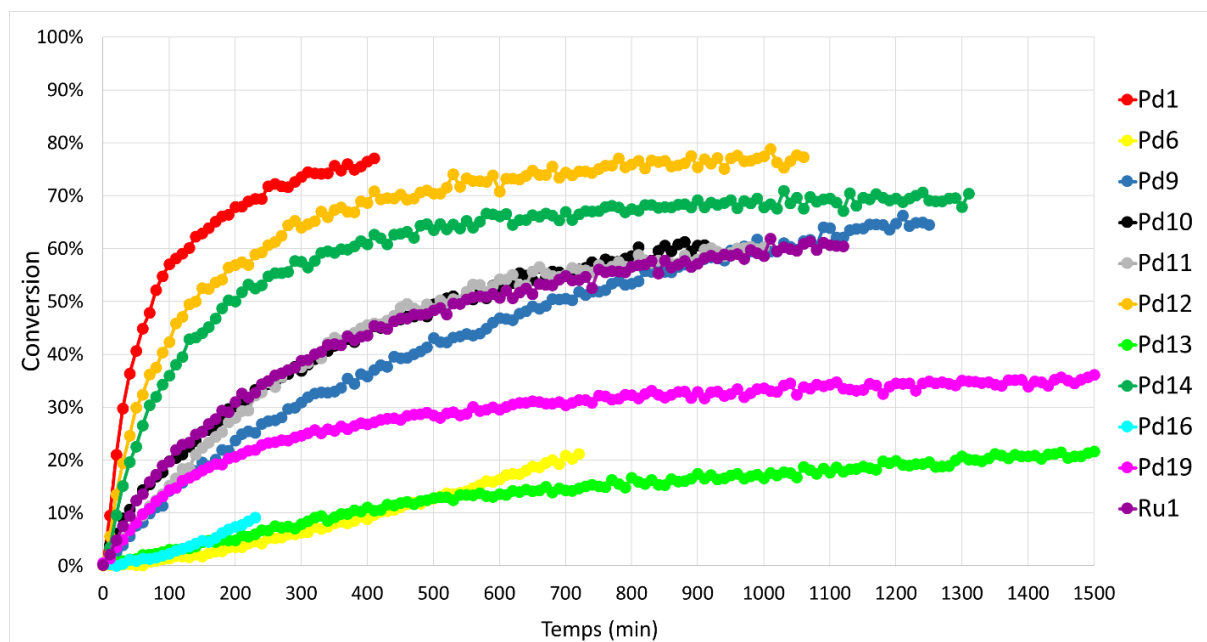


Figure 10 : Cinétique de décaage de la **pro-ombelliférone** par les catalyseurs

Par simple observation du graphique, nous voyons déjà une discrimination nette entre les catalyseurs. Parmi tous les complexes testés (Figure 6), nous avons pu ainsi distinguer les catalyseurs actifs de ceux qui ne le sont pas en conditions *in vitro* (Tableau 1). Ces derniers non actifs ne sont pas représentés à la Figure 10 pour une meilleure visibilité.

Tableau 1 : Résumé des catalyseurs actifs et inactifs lors du criblage *in vitro*

Catalyseurs actifs	Catalyseurs inactifs
<p>Pd1 Xantphos Pd6 Bpa-propargyl Pd9 PPh₂-N Pd10 iPr Pd11 iMes Pd12 N-Xantphos Pd13 DPEphos Pd14 Josephos Pd16 MeCN Pd19 CF₃-Ph-Coco Ru1 Complexe de Meggers</p>	<p>Pd2 Pd3 Pd4 Pd5 Pd7 Pd8 Pd15 Pd17 Pd18 Pd20 Pd21 Ru6 Ru7 Au1</p>

Les trois catalyseurs (**Pd1**, **Pd12** et **Pd14**) qui se distinguent des autres complexes par leur conversion élevée en plus de leur activation rapide ont tous un point commun, la structure de

base du ligand nommée Xantphos. La conversion maximale est atteinte après 3h30 pour le **Pd1** et après 10 h pour les **Pd12** et **Pd14**. Viennent ensuite les complexes **Pd9**, **Pd10**, **Pd11** et **Ru1** qui atteignent une conversion moyenne mais dont l'activation se fait plus lentement. Les catalyseurs les moins actifs sont très lents pour initier la réaction catalytique (**Pd6**, **Pd13** et **Pd16**). Pour la grande majorité des catalyseurs, le maximum de conversion est atteint mais ceux-ci sont encore actifs puisque la courbe se maintient à la même pente et ne devient pas horizontale. Pour les quelques autres catalyseurs, même si leur activation est très lente, leur courbe de conversion est encore en croissance au moment où nous avons arrêté d'enregistrer la fluorescence. Ceux-ci ne sont donc pas encore en fin de vie. Pour comprendre les différences d'activité en fonction de la structure du catalyseur, deux facteurs déterminants sont à prendre en compte. Le premier facteur implique les effets électroniques, nous constatons que tous les ligands azotés sont inactifs, et que les catalyseurs les plus actifs ont tous deux groupement -PPh₂. Les phosphines étant davantage π -acceptrices, elles sont mieux à même de favoriser l'activation du catalyseur et de le stabiliser. Le second facteur est l'angle de pince, un petit angle de pince favorise l'insertion oxydante du palladium dans la liaison C-GP tandis qu'un grand angle de pince favorise l'élimination réductrice, menant à la formation de l'allyl glutathion et à la régénération du catalyseur. Un angle de pince optimum doit donc être moyen afin de ne pas inhiber une des deux étapes. Un angle moyen de 110°, typique de la famille Xantphos, semble être un optimum pour notre réaction.

4.2 Tests en catalyse *in cellulo*

Contrairement à la chimie *in vitro*, de nombreuses composantes ne sont pas contrôlées lors des tests en systèmes cellulaires. L'élaboration et la mise en place d'une expérience est plus fastidieuse pour aboutir à un modèle cohérent et robuste. En validant notre modèle ombelliférone en système cellulaire, nous espérons améliorer le modèle que Meggers a développé dans ses travaux pionniers^{62,65} en diminuant les concentrations du fluorophore cagé et du catalyseur, mais aussi en s'affranchissant de l'utilisation de thiophénol pour arriver à un système employant les thiols endogènes. Ces améliorations ont pour objectif de limiter la toxicité du système vis-à-vis du matériel biologique.

En conditions *in vitro*, nous avons ajouté du GSH à 5 équivalents (soit 50 μ M) pour que le système fonctionne. Ce GSH est présent naturellement dans les cellules et une multitude d'autres nucléophiles endogènes sont également présents, et ce à des concentrations vraisemblablement supérieures à celles de nos tests *in vitro*. Nous espérons donc pouvoir faire fonctionner le système

en cellules sans avoir à ajouter de nucléophiles exogènes et toxiques. Nous avons décidé de travailler avec les cellules cancéreuses du col de l'utérus (cellules SiHa). Ces cellules sont fréquemment utilisées comme modèle *in vitro* et sont faciles à mettre en culture.

4.2.1 Modèle Ombelliférone

Avant de pouvoir réaliser le screening des catalyseurs sélectionnés, différentes questions se sont posées comme par exemple les concentrations en réactifs à utiliser, le temps d'incubation de la molécule cagée ou encore le temps d'incubation du catalyseur. Toutes les conditions de l'expérience ont dû être définies sur base de valeurs trouvées dans la littérature ou bien après plusieurs essais dans notre première optimisation.

4.2.1.1 Développement du protocole

En vue de tester le premier modèle *in cellulo*, deux catalyseurs ont été sélectionnés : le complexe de Meggers **Ru1**, considéré actuellement comme une des références en chimie bioorganométallique dans la littérature, et le catalyseur **Pd1** révélé comme étant le plus actif lors de notre screening *in vitro*. Pour l'expérience, une plaque 96 puits a été utilisée afin de pouvoir tester plusieurs conditions simultanément et réaliser des répliques. Les cellules SiHa ont été incubées avec la **pro-ombelliférone** à 50 μM et deux conditions d'incubation ont été testées : 1 h et 24 h. Plusieurs lavages au PBS ont été réalisés afin d'enlever le fluorophore cagé présent dans le milieu extracellulaire et non internalisé. Les deux catalyseurs à 20 μM ont ensuite été ajoutés dans les puits. Afin de comparer avec les conditions de Meggers, nous avons utilisé un analogue du thiophénol non volatil, l'acide thiosalicylique (thio) à 20 μM (Schéma 17).

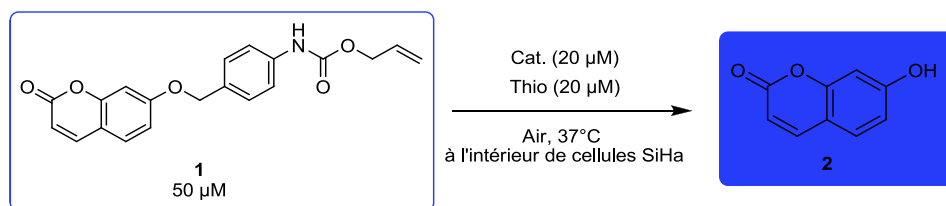


Schéma 17 : Réaction de déprotection catalytique de la **pro-ombelliférone** à l'intérieur de cellules SiHa

Afin de ne pas devoir choisir un seul temps d'incubation pour le catalyseur et ne prendre qu'une seule mesure, l'émission de fluorescence a été suivie par spectroscopie comme nous l'avons précédemment fait en *in vitro*. Le suivi s'est réalisé en excitant le fluorophore ombelliférone à 320 nm (dans l'UV) et en mesurant l'émission de fluorescence à 458 nm (dans le bleu). Les gammes de longueurs d'onde peuvent varier en fonction du solvant utilisé pour l'analyse de fluorescence, ce qui explique le léger décalage des λ d'excitation et d'émission par rapport aux

valeurs de la littérature. La combinaison optimale de λ a été déterminée par la plateforme de détection SpectraMax i3. Les courbes de fluorescence obtenues pour les deux catalyseurs dans les différentes conditions sont présentées à la Figure 11. Différents contrôles ont également été réalisés. Le fluorophore cagé et les catalyseurs ont été incubés seuls afin de vérifier qu'ils ne sont pas fluorescents à ces longueurs d'onde, et c'est bien le cas. Ceux-ci ne sont pas montrés dans la Figure 11 pour une question de visibilité.

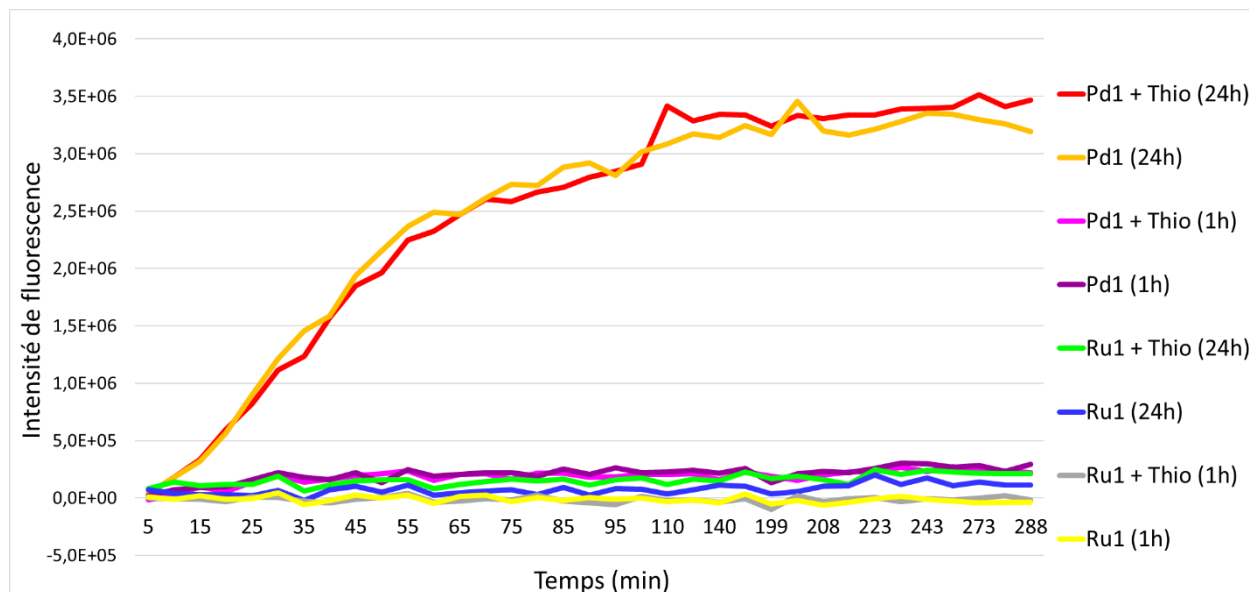


Figure 11 : Cinétique de décaageage *in cellulo* de l'ombelliférone alloc par les catalyseurs **Ru1** et **Pd1**. Conditions : incubation 1 h ou 24 h de la **pro-ombelliférone** à 50 μ M, catalyseurs à 20 μ M et acide thiosalicylique à 20 μ M. Mesure de la fluorescence : $\lambda_{exc} = 320 \pm 15$ nm et $\lambda_{ém} = 458 \pm 15$ nm.

La première observation est que la fluorescence augmente de manière significative dans les puits où le fluorophore cagé a été incubé durant 24 h. La **pro-ombelliférone** est donc capable de pénétrer dans les cellules mais un temps relativement long est nécessaire. C'est pourquoi une incubation d'une heure serait insuffisante pour faire fonctionner le modèle. La seconde observation est la différence d'activité remarquablement élevée entre le complexe **Ru1** et **Pd1**. Le complexe **Pd1** révélé dans notre screening *in vitro* est bien plus actif que le catalyseur **Ru1**, considéré comme une des références actuellement. La fluorescence augmente suite à l'activité du catalyseur **Ru1**, mais cette augmentation est infime comparée à la courbe du **Pd1** et ne représente qu'environ 6,5% en présence d'acide thiosalicylique et 4% en absence de thiol pour la condition 24 h. La fluorescence avec le **Pd1** et l'incubation d'1 h est plus élevée que celle obtenue avec **Ru1** avec une incubation de 24 h. La troisième observation se trouve dans le rôle de l'acide thiosalicylique. Dans la littérature, le thiophénol a été employé à des doses élevées mais non toxiques comme agent de capture d'allyle et est vital à l'activité du catalyseur **Ru1**. Dans notre modèle, la présence de l'acide thiosalicylique, un analogue non volatil, non toxique et inodore,

ne semble pas nécessaire pour améliorer l'activité du catalyseur **Pd1**, mais semble avoir une légère action favorable pour le catalyseur **Ru1**.

Plusieurs problèmes liés au modèle sont survenus. Tout d'abord, la pro-sonde ne pénètre pas rapidement dans les cellules. Ensuite, l'incubation de 24h révélait une toxicité du système et enfin, l'excitation dans l'UV n'est pas idéale pour un fluorophore utilisé en système biologique. Des dommages à l'ADN peuvent survenir en raison de l'irradiation par des UV. Pour ces différentes raisons, nous avons décidé de nous rabattre sur un autre modèle fluorogénique afin d'améliorer ces deux points.

4.2.2 Modèle Rhodamine

Afin de résoudre les problèmes liés au premier modèle, nous avons repris le modèle déjà bien établi dans la littérature avec le fluorophore cagé **rhodamine bis-alloc**, l'expérience réalisée précédemment au paragraphe 4.2.1.1 a été refaite en utilisant un protocole identique à l'exception évidemment du fluorophore cagé ombelliférone alloc remplacé par la **rhodamine bis-alloc**. Les résultats de ces deux expériences ont ensuite été comparés afin de choisir le modèle qui servira au criblage des catalyseurs.

4.2.2.1 Développement du protocole

Le même protocole a été suivi, à savoir l'incubation des cellules SiHa avec la **rhodamine bis-alloc** à 50 μM pendant 1 h ou la nuit. Plusieurs lavages au PBS ont été réalisés afin d'enlever le fluorophore cagé présent extracellulairement. Les deux mêmes catalyseurs **Ru1** et **Pd1** à 20 μM ont ensuite été ajoutés dans les puits, en présence ou en absence d'acide thiosalicylique à 20 μM (Schéma 18).

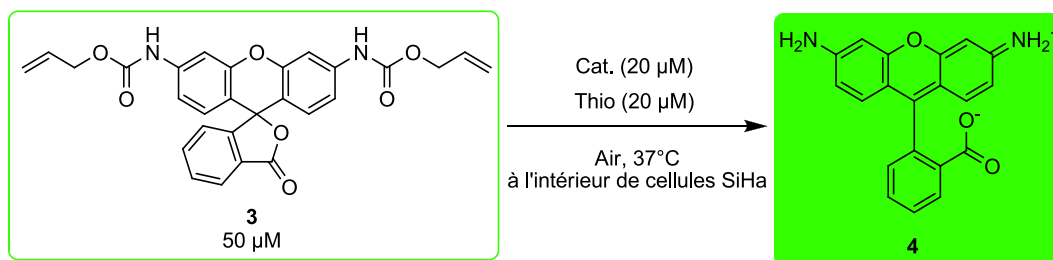


Schéma 18 : Réaction de déprotection catalytique de la rhodamine bis-alloc à l'intérieur de cellules SiHa

L'émission de fluorescence a été suivie par spectroscopie en excitant le fluorophore rhodamine 110 à 505 nm (dans le vert) et en mesurant l'émission de fluorescence à 540 nm (dans le vert). Les λ d'excitation et d'émission optimales ont été déterminées par le SpectraMax i3. Les courbes de fluorescence obtenues pour les deux catalyseurs dans les différentes conditions sont

présentées à la Figure 12. Nous avons pu vérifier qu'à ces nouvelles longueurs d'onde, les catalyseurs seuls ne sont pas fluorescents.

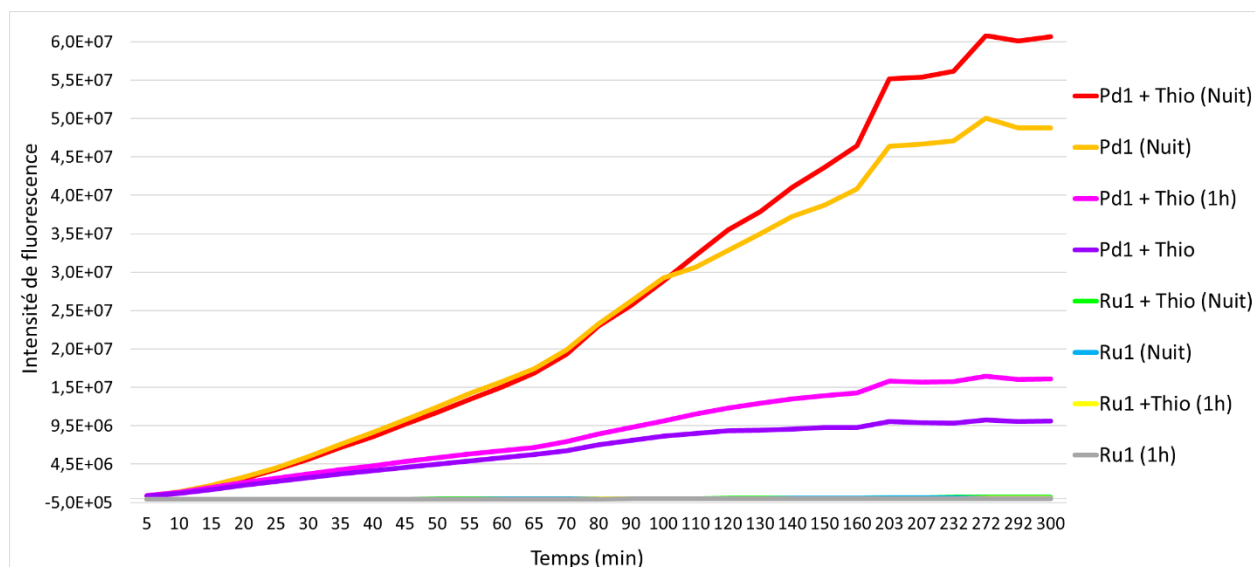


Figure 12 : Cinétique de décaageage *in cellulo* de la **rhodamine bis-alloc** par les catalyseurs **Ru1** et **Pd1**. Conditions : incubation 1 h ou une nuit de la **rhodamine bis-alloc** à 50 μM , catalyseurs à 20 μM et acide thiosalicylique à 20 μM . Mesure de la fluorescence : $\lambda_{\text{exc}} = 505 \pm 15 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{ém}} = 540 \pm 15 \text{ nm}$.

Premièrement, nous observons une augmentation significative de l'intensité de fluorescence quand le catalyseur **Pd1** est ajouté, que ce soit après une incubation d'1 h ou d'une nuit du fluorophore cagé. Cela signifie que la **rhodamine bis-alloc** est capable de traverser les membranes cellulaires plus rapidement que dans le cas de la **pro-ombelliférone**. Ensuite, l'intensité de fluorescence est plus élevée quand l'incubation de la molécule cagée est plus longue. Il semble donc qu'avec une incubation d'une heure, toute la **rhodamine bis-alloc** n'a pas eu le temps de pénétrer dans les cellules. Troisièmement, la différence d'activité entre le complexe **Ru1** et **Pd1** est considérablement élevée tout comme c'était le cas avec le modèle ombelliférone. Pour le même temps d'incubation de 24 h, deux ordres de grandeur de différence (10^7 et 10^5) sont observés. Le niveau d'activité du catalyseur **Ru1** est à nouveau minime en comparaison de l'activité du complexe **Pd1** et un temps d'incubation plus long de la **rhodamine bis-alloc** ne permet pas d'avoir une intensité de fluorescence beaucoup plus élevée. Enfin, l'acide thiosalicylique semble légèrement faciliter le décaageage de la molécule environ 1h30 après le début de la cinétique, et ce pour les deux complexes testés.

4.2.3 Comparaison et choix du modèle

Les expériences réalisées ont démontré que les deux modèles fonctionnent en cellules vivantes. Un catalyseur au palladium ou ruthénium est capable de traverser les membranes cellulaires et

cliver le groupement protecteur alloc afin de libérer l'ombelliférone ou la rhodamine, toutes deux fluorescentes.

Pour le modèle ombelliférone, une heure d'incubation du produit cagé n'est pas suffisante pour observer une intensité de fluorescence significative. Pour optimiser ce premier modèle, il faudrait essayer différents temps d'incubation intermédiaires entre 1 h et 24 h pour voir à partir de quel temps d'incubation une augmentation de fluorescence est observée. Cependant, faute de temps, nous n'avons pas davantage travaillé à optimiser ce paramètre, considéré comme secondaire ici.

Pour le modèle rhodamine, une incubation d'une heure de la molécule protégée permet d'observer une augmentation significative de l'intensité de fluorescence. Ces résultats mènent à l'hypothèse que la **rhodamine bis-alloc** pénètre plus rapidement dans les cellules que la **pro-ombelliférone**. Cependant, faute de temps, nous nous sommes tenus à une nuit d'incubation sans davantage optimiser ce paramètre.

Dans la littérature, des thiols comme PhSH sont souvent utilisés afin d'améliorer le clivage d'une molécule protégée par un groupement alloc. Ces thiols agissent comme des accepteurs d'allyle. Ils permettent ainsi d'activer ou de régénérer le catalyseur *in situ*. Dans nos expériences, l'ajout d'acide thiosalicylique n'a eu aucun impact tangible pour faciliter la déprotection de l'ombelliférone mais un léger impact positif a pu être observé pour le clivage de la **rhodamine bis-alloc**.

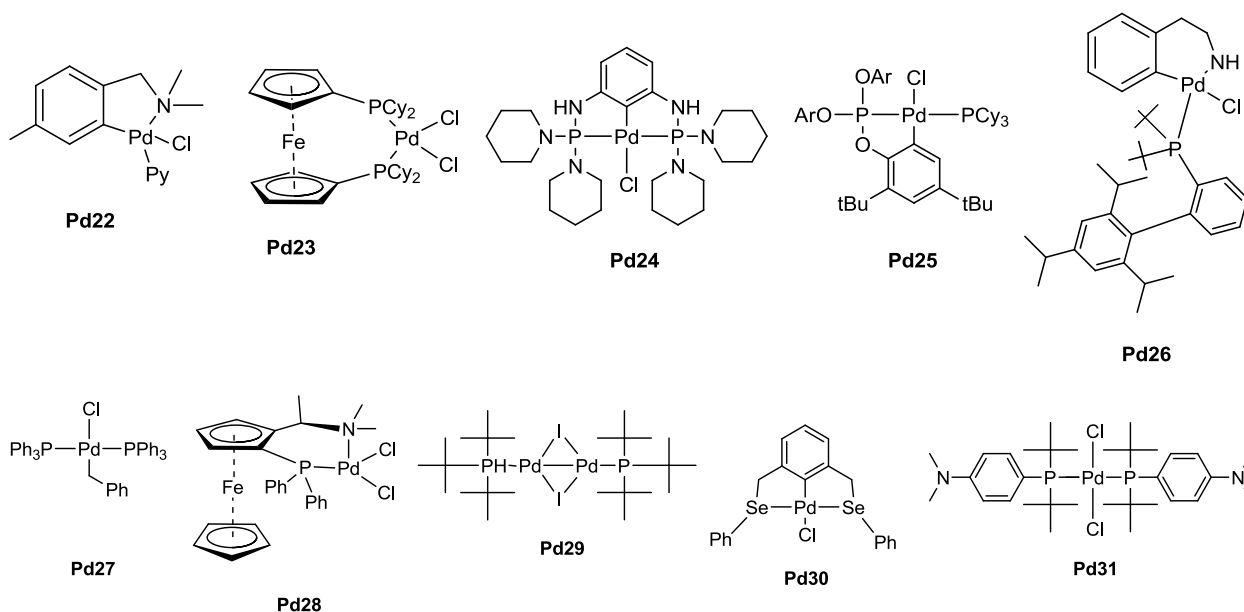
Afin de pouvoir réaliser un criblage efficace d'une série de catalyseurs, le choix s'est donc orienté vers le modèle rhodamine. Le principal critère qui a permis ce choix est la meilleure vitesse de pénétration du fluorophore cagé. En effet, la **rhodamine bis-alloc** pénètre plus rapidement dans les cellules que l'ombelliférone cagée. Une incubation d'une nuit est suffisante afin de pouvoir discriminer l'activité de différents catalyseurs. D'autres raisons techniques ont également orienté ce choix. Les équipements capables d'analyser une plaque 96 puits en fluorescence, comme le microscope Axiovert S100 et le SpectraMax i3, permettent d'observer plus aisément la rhodamine 110, qui émet dans le vert, que l'ombelliférone, qui est excitée dans l'UV et émet dans le bleu en raison des filtres disponibles. Outre les différents critères évoqués précédemment, l'ombelliférone n'est pas un fluorophore idéal pour les tests biologiques à cause de sa zone d'excitation dans l'UV.

4.2.4 Criblage des complexes catalytiques

Le but est d'évaluer pour ensuite comparer l'activité d'une série de catalyseurs. Le modèle retenu pour le criblage est le modèle rhodamine. Le catalyseur servant de contrôle positif est désormais le catalyseur η^3 - π -allylpalladium Xantphos (**Pd1**, Figure 6), sur lequel l'optimisation *in cellulo* a été réalisée. Celui-ci remplace donc le complexe de Meggers (**Ru1**, Figure 6), considéré comme référence dans la littérature, puisque l'activité du **Pd1** est bien plus élevée. Les expériences suivantes ont donc été réalisées en absence d'acide thiosalicylique pour les raisons évoquées plus tôt.

4.2.4.1 Choix des catalyseurs

Deux criblages ont été réalisés. Le premier, de plus petite taille, s'est fait en choisissant quelques catalyseurs actifs et non-actifs du screening des η^3 - π -allylpalladium réalisé *in vitro* (**Pd3**, **Pd10**, **Pd11**, **Pd13**, **Pd18**, **Pd19** et **Pd21**, Figure 6) afin de vérifier si le modèle *in cellulo* est lui aussi capable de discriminer l'activité des catalyseurs. Comme nous soupçonnons qu'il soit peu probable de trouver un meilleur catalyseur parmi les complexes η^3 - π -allylpalladium, car le ligand semble jouer un rôle critique, nous avons réalisé un criblage beaucoup plus large afin d'augmenter les opportunités de découvrir un nouveau hit. Ainsi, les complexes **Pd4** (Figure 6) et **Pd22** à **Pd45** représentés ci-dessous ont été choisis d'une banque de composés déjà présente au laboratoire (Figure 13). Ceci permettra de voir si le mode d'activation joue un rôle ou non.



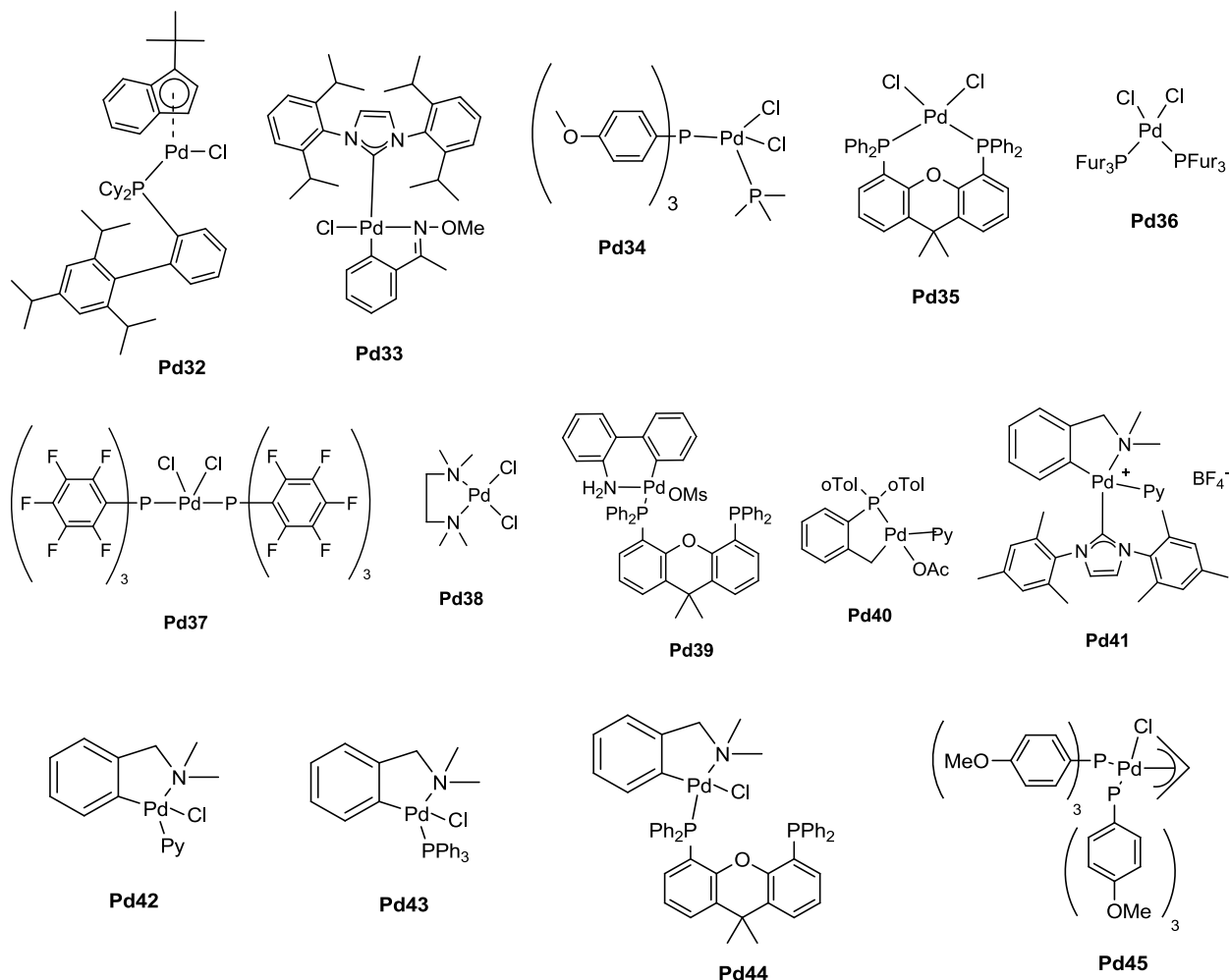


Figure 13 : Structures des catalyseurs sélectionnés pour le screening *in cellulo*

4.2.4.2 Mesure de l'activité

Pour la première expérience, les cellules SiHa ont été incubées avec la **rhodamine bis-alloc** à 50 μM durant la nuit. Plusieurs lavages au PBS ont été réalisés afin d'enlever le fluorophore cagé présent dans le milieu extracellulaire. Les catalyseurs à une concentration de 20 μM ont ensuite été ajoutés dans les puits et l'émission de fluorescence a été suivie par spectroscopie en excitant le fluorophore à 505 nm et en mesurant l'émission de fluorescence à 540 nm. Les courbes de fluorescence obtenues pour les différents catalyseurs sont présentées à la Figure 14. Les contrôles avec les catalyseurs seuls ont été réalisés afin de vérifier qu'ils ne sont pas fluorescents.

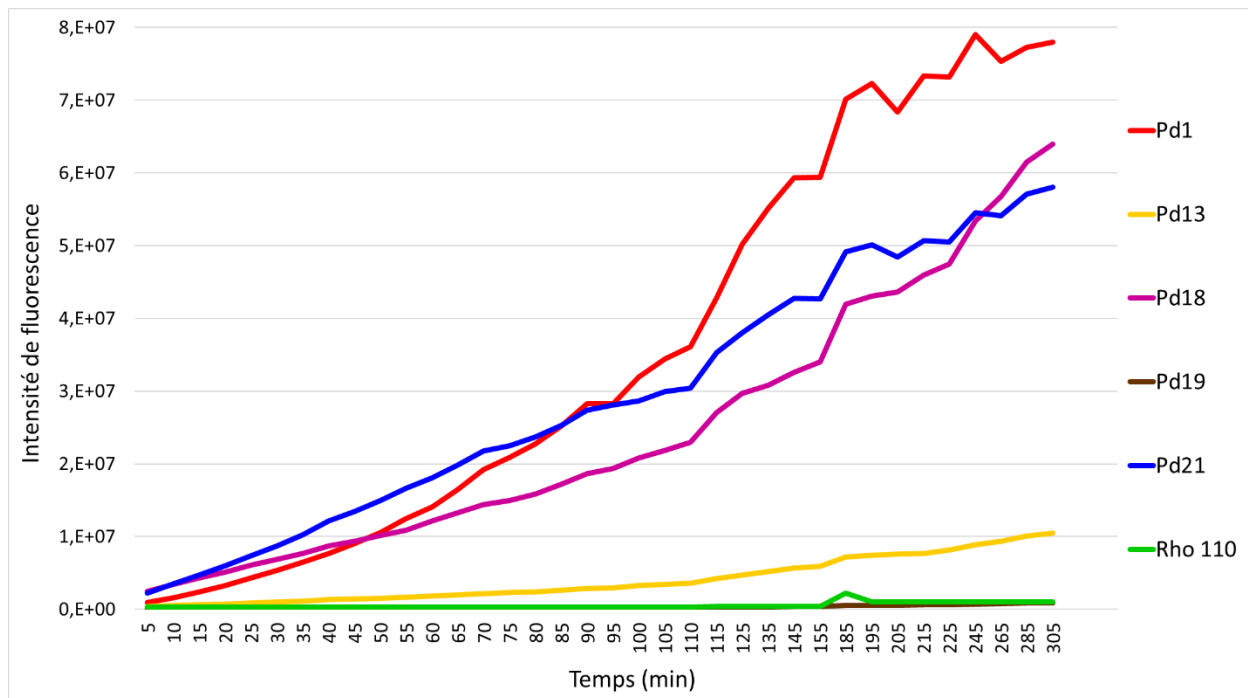


Figure 14 : Cinétique de décaage *in cellulo* de la **rhodamine bis-alloc** par les catalyseurs de palladium. Conditions : incubation d'une nuit de la **rhodamine bis-alloc** à 50 μM et catalyseurs à 20 μM . Mesure de la fluorescence : $\lambda_{\text{exc}} = 505 \pm 15 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{ém}} = 540 \pm 15 \text{ nm}$.

Tableau 2 : Résumé des catalyseurs actifs et inactifs lors du premier criblage *in cellulo*

Catalyseurs actifs	Catalyseurs inactifs
<p>Pd1 Xantphos</p> <p>Pd18 Dppf</p> <p>Pd21 (PPh₃)₂</p> <p>Pd13 DPEphos</p> <p>Pd19 CF₃Ph-Coco R = CF₃Ph</p>	<p>Pd3 Bpy-méthoxy</p> <p>Pd10 iPr</p> <p>Pd11 iMes</p>

Ce premier screening nous a permis de voir une discrimination entre les catalyseurs actifs et non actifs (Tableau 2). Le catalyseur **Pd1** reste le plus performant avec ce modèle, viennent ensuite par ordre décroissant d'activité les catalyseurs **Pd18** et **Pd21**, et enfin le catalyseur **Pd13**. Les autres complexes n'ont pas catalysé la réaction de déprotection de la rhodamine *in cellulo* puisque qu'aucune fluorescence n'a été détectée. Il est à noter que ces catalyseurs considérés

comme inactifs soit réellement incapables de catalyser la réaction, soit inaptes à traverser les membranes cellulaires les empêchant ainsi d'atteindre le cytoplasme où se trouve la **rhodamine bis-alloc**. Mis à part la référence, sept structures ont été testées. Deux sont ressorties comme étant très actives, les complexes **Pd18** et **Pd21**, dont un ligand contient un noyau ferrocène et l'autre une triphénylphosphine respectivement. Le ligand DPEphos du catalyseur **Pd13** avec une faible activité possède une structure de base analogue au ligand Xantphos du meilleur catalyseur **Pd1**. Le modèle catalytique est très sensible aux variations de structures comme l'angle de pince. Trois familles principales de ligands sont ressorties : Xantphos, ferrocène et triphénylphosphine. Une autre observation est la vitesse d'activation. Dans la première heure, le complexe **Pd21** est plus rapide que le **Pd1**, ensuite ce dernier augmente drastiquement. Pour le **Pd13**, l'activation est très lente, son augmentation commence après 3h.

La rhodamine 110 a été incubée seule pour avoir un contrôle de l'intensité de fluorescence émise pour ce fluorophore. Cependant, son intensité se trouve aux environs de $3 \cdot 10^5$, cet ordre de grandeur est bien inférieur à ce que nous observons pour les catalyseurs actifs. Tandis qu'une partie de la rhodamine 110 incubée ne rentre pas dans les cellules à cause de sa forme zwitterionique, l'autre partie, capable de pénétrer, est probablement expulsée par des pompes protéiques des cellules.

Pour la seconde expérience, un protocole presque identique à la première expérience de criblage a été utilisé. Le fluorophore cagé a été incubé à une concentration de 50 μM , mais nous avons décidé de diminuer la charge catalytique à 10 μM afin de diminuer la toxicité des catalyseurs. L'émission de fluorescence a été suivie par spectroscopie en excitant le fluorophore à 505 nm et en mesurant l'émission de fluorescence à 540 nm. Les courbes de fluorescence obtenues pour les différents catalyseurs sont présentées à la Figure 15. Les contrôles avec les catalyseurs seuls ont été réalisés et montrent qu'ils ne sont pas fluorescents (non représentés sur la Figure 15).

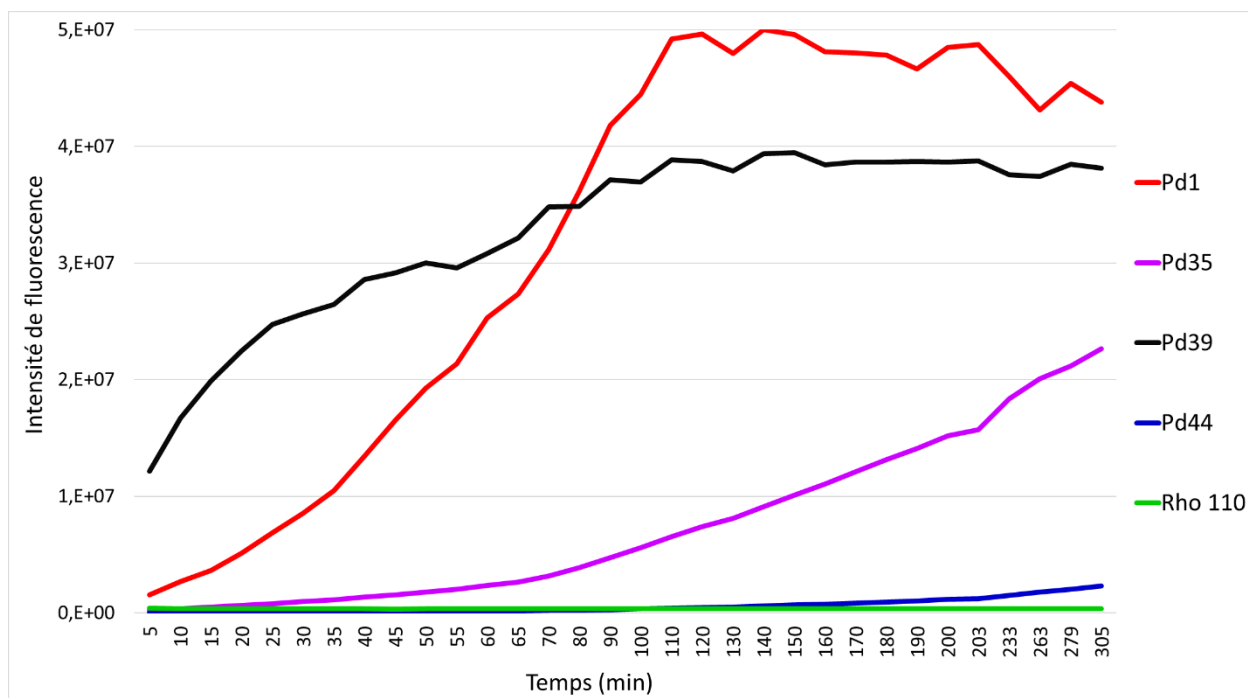
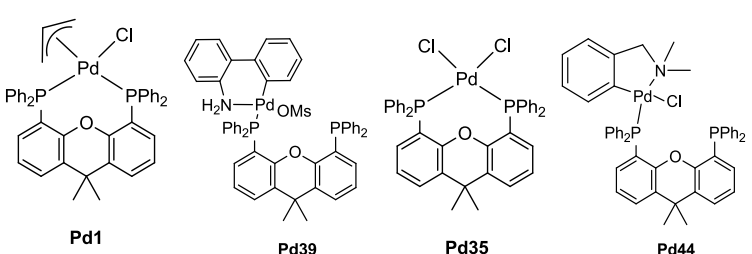


Figure 15 : Cinétique de décaage *in cellulo* de la **rhodamine bis-allocc** par les catalyseurs de palladium. Conditions : incubation d'une nuit de la **rhodamine bis-allocc** à 50 μM et catalyseurs à 20 μM . Mesure de la fluorescence : $\lambda_{\text{exc}} = 505 \pm 15 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{ém}} = 540 \pm 15 \text{ nm}$.

Tableau 3 : Résumé des catalyseurs actifs et inactifs lors du second criblage *in cellulo*

Catalyseurs actifs	Catalyseurs inactifs
 <p>Pd1 Pd39 Pd35 Pd44</p>	<p>Pd4</p> <p>Pd22 à 34</p> <p>Pd36 à 43</p> <p>Pd45</p>

Le meilleur catalyseur est toujours le complexe **Pd1** même lors d'un criblage de 25 catalyseurs. Deux autres complexes ont été révélés ici, le **Pd39** presque aussi performant que notre référence et le **Pd35** moyennement actif. Le dernier avec une très faible activité au bout de 5 h est le complexe **Pd44**. Ces quatre catalyseurs actifs ont tous en point commun le ligand Xantphos dans leur structure. Cela confirme que certaines familles de ligands sont plus aptes que d'autres à catalyser la réaction dans notre modèle, probablement dû à un effet d'angle de pince. La différence entre les vitesses d'activation est considérable dans cette expérience. Le catalyseur **Pd39** est le plus rapide mais il finit par être rattrapé par notre référence après 1 h. Le **Pd45** est

assez lent mais le **Pd46** l'est encore plus puisqu'il met 5 h à débiter son action. Ces différences peuvent être expliquées par les mécanismes impliqués dans l'activation du catalyseur. Bien que le ligand soit similaire, ces mécanismes d'activation changent en fonction de la structure globale qui est impliquée. Les complexes de palladium ayant un allyle comme le **Pd1** sont activés par capture de l'allyle grâce à un nucléophile. Pour les palladacycles de Buchwald comme le **Pd39** c'est une base qui permet l'activation⁷⁹. Pour les complexes PdCl₂ comme le **Pd35**, le mécanisme est encore peu connu. C'est probablement une réduction aspécifique qui permet l'activation⁸⁰. Une base active probablement le complexe **Pd44** comme pour les ligands de Buchwald mais le mécanisme est en cours d'investigation⁷⁹. Une autre hypothèse pour expliquer ces différences peut aussi être la facilité avec laquelle le catalyseur est internalisé dans les cellules. Tout comme les catalyseurs incapables de passer les membranes sont considérés comme non actifs, les catalyseurs ayant des difficultés à entrer dans les cellules sont considérés comme très lents.

4.2.4.3 Toxicité du système

Les criblages nous ont permis de révéler plusieurs catalyseurs actifs en système cellulaire, capables de catalyser une réaction de Tsuji-Trost afin de libérer un fluorophore. Notre but est de trouver un catalyseur actif mais celui-ci, incubé seul, doit être non toxique. Notre modèle combinant un fluorophore cagé et un catalyseur ne doit pas non plus diminuer la viabilité des cellules. Nous avons en conséquence vérifié l'innocuité du modèle vis-à-vis du matériel biologique mis en présence grâce à un test de viabilité cellulaire.

Pour le premier criblage réalisé, la toxicité des sept catalyseurs et de notre référence a été évaluée pour une incubation de 5 h et pour des solutions de catalyseurs à une concentration de 20 μM (Figure 16). Après avoir mis les cellules SiHa en plaque 96 puits, le milieu a été retiré et les solutions de catalyseurs (20 μM) ou du solvant seul (DMSO à 0,2%) ont été ajoutées durant le temps correspondant à une cinétique. La viabilité cellulaire a été déterminée à l'aide du réactif PrestoBlue™. Une fois ajouté aux cellules, le réactif initialement de couleur bleue est transformé par l'environnement réducteur des cellules vivantes en un composé rouge hautement fluorescent. L'intensité de fluorescence émise par le PrestoBlue™ a été mesurée en utilisant un filtre d'excitation de $\lambda_{\text{centrale}}$ égale à 570 nm et un filtre d'émission de $\lambda_{\text{centrale}}$ égale à 615 nm.

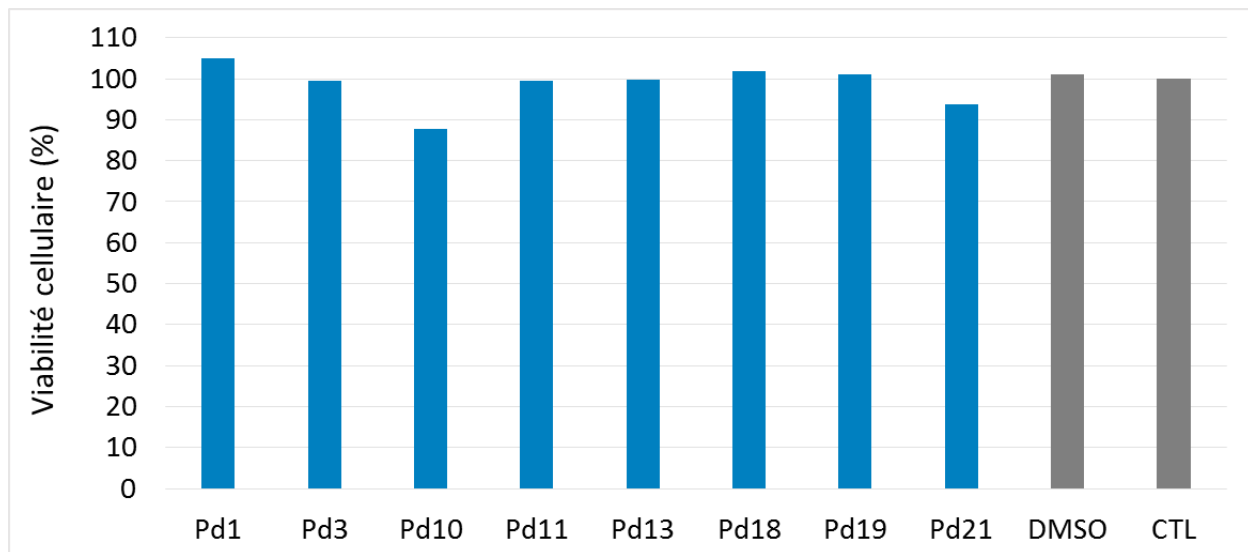


Figure 16 : Toxicité des catalyseurs de palladium testés dans le premier criblage. Conditions : catalyseurs à 20 μM , DMSO à 0,2%, réactif PrestoBlue à 10% et incubation de 5 h. Mesure de la fluorescence : filtre excitation de $\lambda_{\text{centrale}} = 570 \text{ nm}$ et filtre émission de $\lambda_{\text{centrale}} = 615 \text{ nm}$.

Les résultats suggèrent que la plupart des catalyseurs incubés seuls à une concentration de 20 μM ne sont pas significativement plus toxiques que le contrôle sans traitement. De même, le DMSO, utilisé à une concentration de 0,2% pour solubiliser les différents catalyseurs, n'impacte pas la viabilité des cellules.

Pour le second criblage, un test de viabilité préliminaire a été réalisé sur les catalyseurs seuls à une concentration de 10 μM après 5 h d'incubation (Figure 17). Le protocole de l'expérience précédente a été répliqué à l'identique pour ce premier test de toxicité.

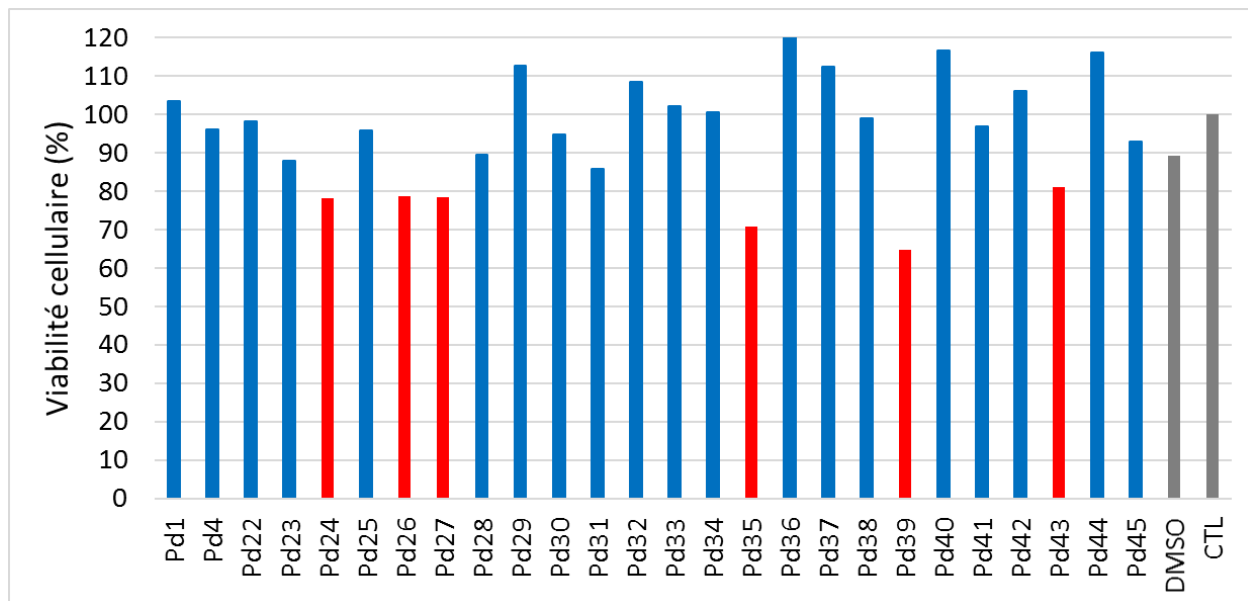


Figure 17 : Toxicité des catalyseurs de palladium testés dans le second criblage. Conditions : catalyseurs à 10 μM , DMSO à 0,2%, réactif PrestoBlue à 10% et incubation de 5 h. Mesure de la fluorescence : filtre excitation de $\lambda_{\text{centrale}} = 570 \text{ nm}$ et filtre émission de $\lambda_{\text{centrale}} = 615 \text{ nm}$.

La majorité des catalyseurs incubés seuls n'impactent pas significativement la viabilité des cellules mises en présence. Quatre catalyseurs (**Pd24**, **Pd26**, **Pd27** et **Pd43**) diminuent la viabilité d'au moins 20% et deux catalyseurs (**Pd35** et **Pd39**) la diminuent d'au moins 30%. Nous savons maintenant que les complexes seuls induisent relativement peu de toxicité donc nous avons voulu vérifier que l'incubation conjointe avec la **rhodamine bis-alloc** est aussi peu toxique que les catalyseurs seuls. C'est pourquoi une deuxième expérience de viabilité a été faite en parallèle de l'expérience de cinétique. Cela permet d'avoir des informations sur la toxicité de notre système qui comprend la combinaison de la **rhodamine bis-alloc** et du catalyseur, ainsi que la libération de la rhodamine 110 en présence d'un catalyseur actif. Réaliser les deux expériences de cinétique et de toxicité en parallèle a permis plusieurs avantages. Respecter les temps d'incubation est plus facile quand c'est réalisé dans la même journée et les dilutions finales des solutions sont identiques puisque celles-ci proviennent des mêmes solutions mères. En plus, la plaque utilisée reste dans l'incubateur pendant toute la réaction. Elle est donc moins sujette à de potentielles contaminations extérieures qui peuvent fausser les résultats de toxicité obtenus.

Pour ce second test de viabilité, les cellules SiHa ont été mises en culture dans des plaques 96 puits et incubées avec la **rhodamine bis-alloc** à 50 μM durant la nuit. Plusieurs lavages au PBS ont été réalisés afin de retirer l'excès de fluorophore cagé. Les solutions de catalyseurs à 10 μM ont ensuite été ajoutées dans les puits pendant 5 h. La viabilité cellulaire a été déterminée à l'aide du réactif PrestoBlue™. La mesure de fluorescence a été réalisée en utilisant un filtre d'excitation de $\lambda_{\text{centrale}}$ égale à 570 nm et un filtre d'émission de $\lambda_{\text{centrale}}$ égale à 615 nm. Les résultats de toxicité qui en découlent sont présentés à la Figure 18.

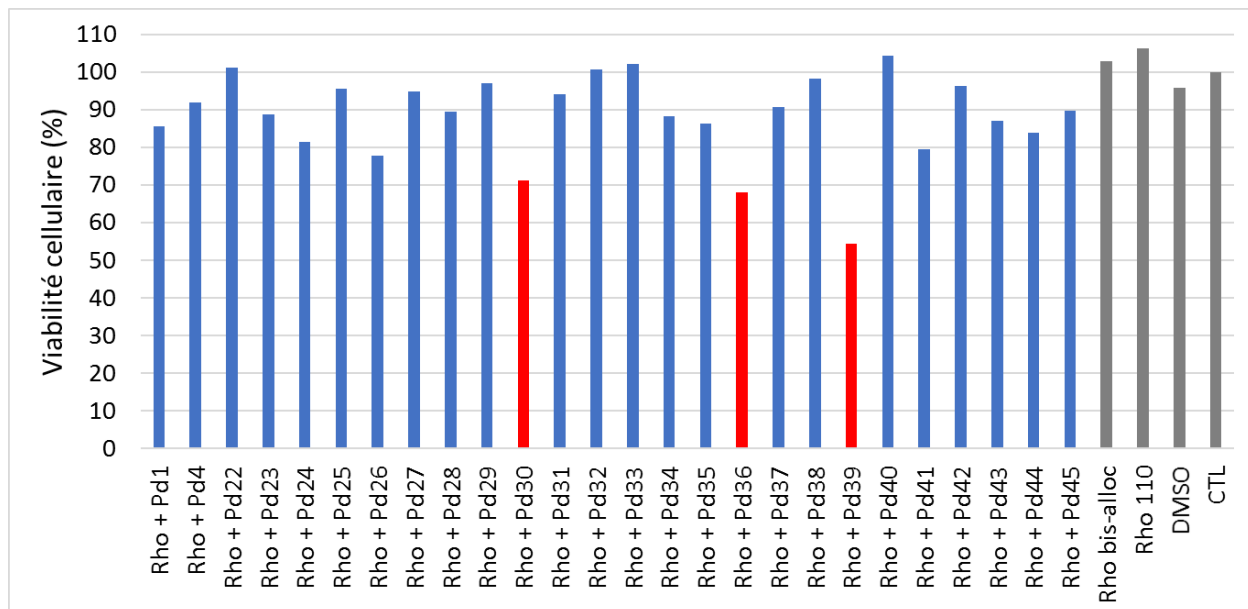


Figure 18 : Toxicité du modèle **rhodamine bis-alloc** en présence des catalyseurs de palladium. Conditions : incubation d’une nuit de la **rhodamine bis-alloc** à 50 μM , catalyseurs à 10 μM , DMSO à 0,2%, réactif PrestoBlue à 10% et incubation de 5 h pour la combinaison rho bis-alloc + catalyseur. Mesure de la fluorescence : filtre excitation de $\lambda_{\text{centrale}} = 570 \text{ nm}$ et filtre émission de $\lambda_{\text{centrale}} = 615 \text{ nm}$.

Les contrôles avec le solvant seul (0,2%), la **rhodamine bis-alloc** (50 μM) et la rhodamine 110 montrent que ceux-ci ne sont pas toxiques, mais c’est la combinaison avec certains catalyseurs qui engendre une toxicité plus ou moins importante. Pour la plupart des catalyseurs, notre modèle est relativement peu toxique pour les cellules par rapport au contrôle sans traitement. Mis en combinaison avec la **rhodamine bis-alloc**, les trois catalyseurs les plus toxiques sont le **Pd30**, le **Pd36** et le **Pd39** pour lesquels la viabilité est inférieure à 70%. Le catalyseur le plus toxique **Pd39** est un des catalyseurs les plus actifs, les deux autres assez toxiques ne sont pas actifs.

4.2.5 Optimisation des conditions

4.2.5.1 Impact de la charge catalytique

Les conditions du modèle et le protocole expérimental étant bien établis, nous avons décidé d’optimiser le système.

4.2.5.1.1 CATALYSE

Pour les cinq meilleurs catalyseurs qui sont ressortis du criblage (**Pd1**, **Pd18**, **Pd21**, **Pd35** et **Pd39**), une première expérience d’optimisation a consisté en la diminution de la charge catalytique, tout en gardant les autres conditions du protocole inchangées. Diminuer les concentrations a pour objectif de limiter la toxicité du système. Les concentrations de catalyseur testées sont 10 – 5 – 1 – 0,5 μM . Le protocole est resté identique, à savoir une incubation d’une nuit pour la **rhodamine**

bis-alloc à 50 μM . Les cellules ont été lavées avant d'ajouter les différentes concentrations de catalyseurs. L'émission de fluorescence a été suivie par spectroscopie en excitant à 505 nm et en mesurant l'émission à 540 nm. Les courbes de fluorescence obtenues pour les différentes concentrations en catalyseurs sont présentées à la Figure 19 à Figure 22.

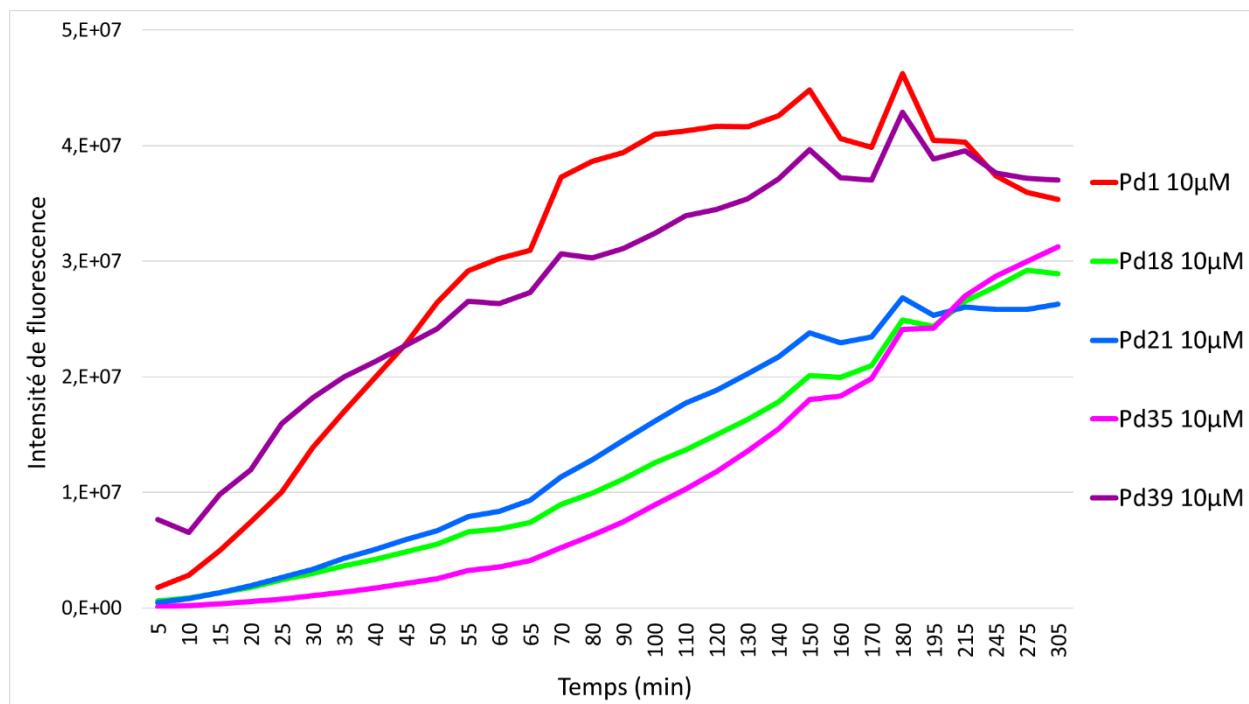


Figure 19 : Cinétique de décaage *in cellulo* de la **rhodamine bis-alloc** avec optimisation de la charge catalytique. Conditions : incubation d'une nuit de la **rhodamine bis-alloc** à 50 μM et catalyseurs à 10 μM . Mesure de la fluorescence : $\lambda_{\text{exc}} = 505 \pm 15 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{ém}} = 540 \pm 15 \text{ nm}$.

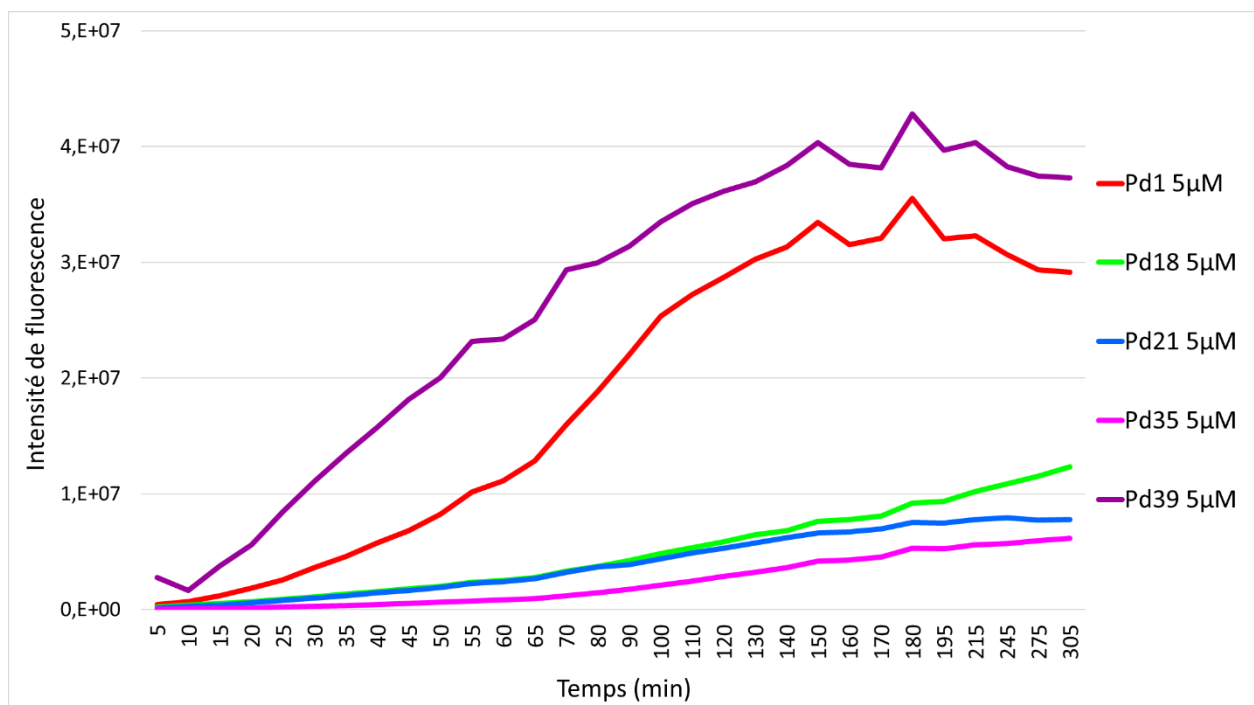


Figure 20 : Cinétique de décaageage *in cellulo* de la **rhodamine bis-alloc** avec optimisation de la charge catalytique. Conditions : incubation d'une nuit de la **rhodamine bis-alloc** à 50 μM et catalyseurs à 5 μM. Mesure de la fluorescence : $\lambda_{exc} = 505 \pm 15$ nm et $\lambda_{ém} = 540 \pm 15$ nm.

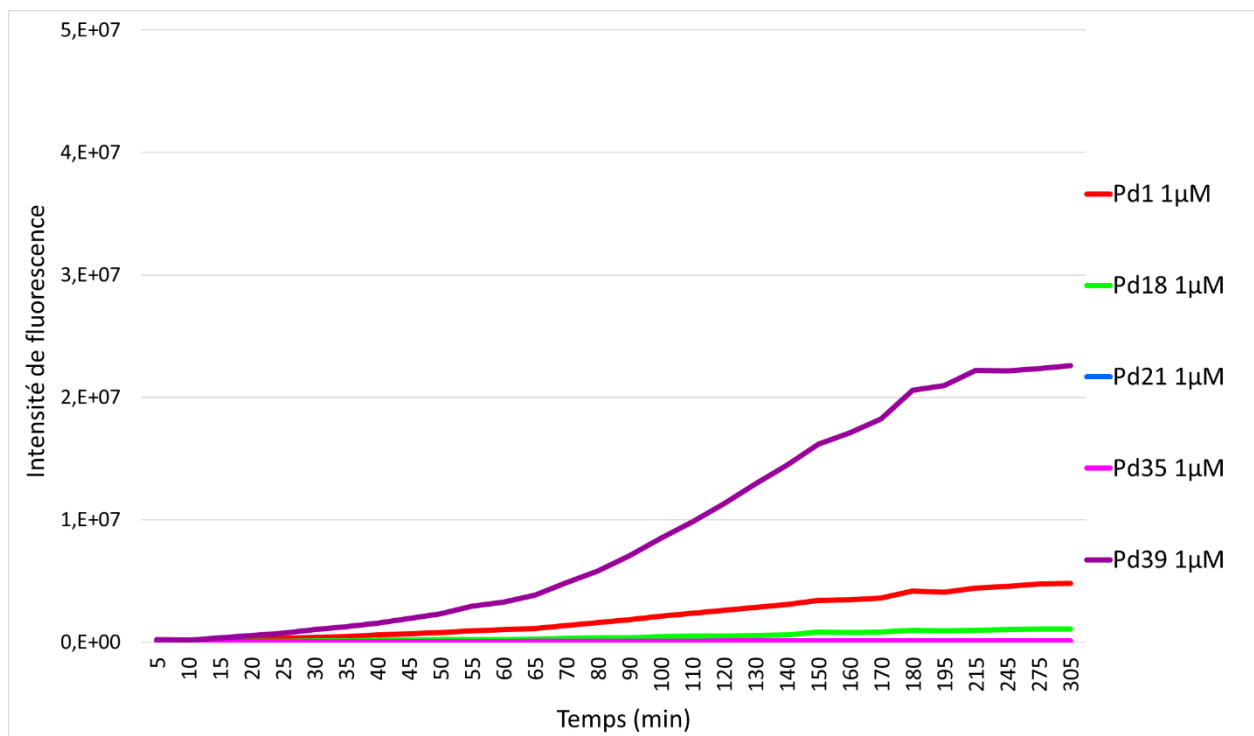


Figure 21 : Cinétique de décaageage *in cellulo* de la **rhodamine bis-alloc** avec optimisation de la charge catalytique. Conditions : incubation d'une nuit de la **rhodamine bis-alloc** à 50 μM et catalyseurs à 1 μM. Mesure de la fluorescence : $\lambda_{exc} = 505 \pm 15$ nm et $\lambda_{ém} = 540 \pm 15$ nm.

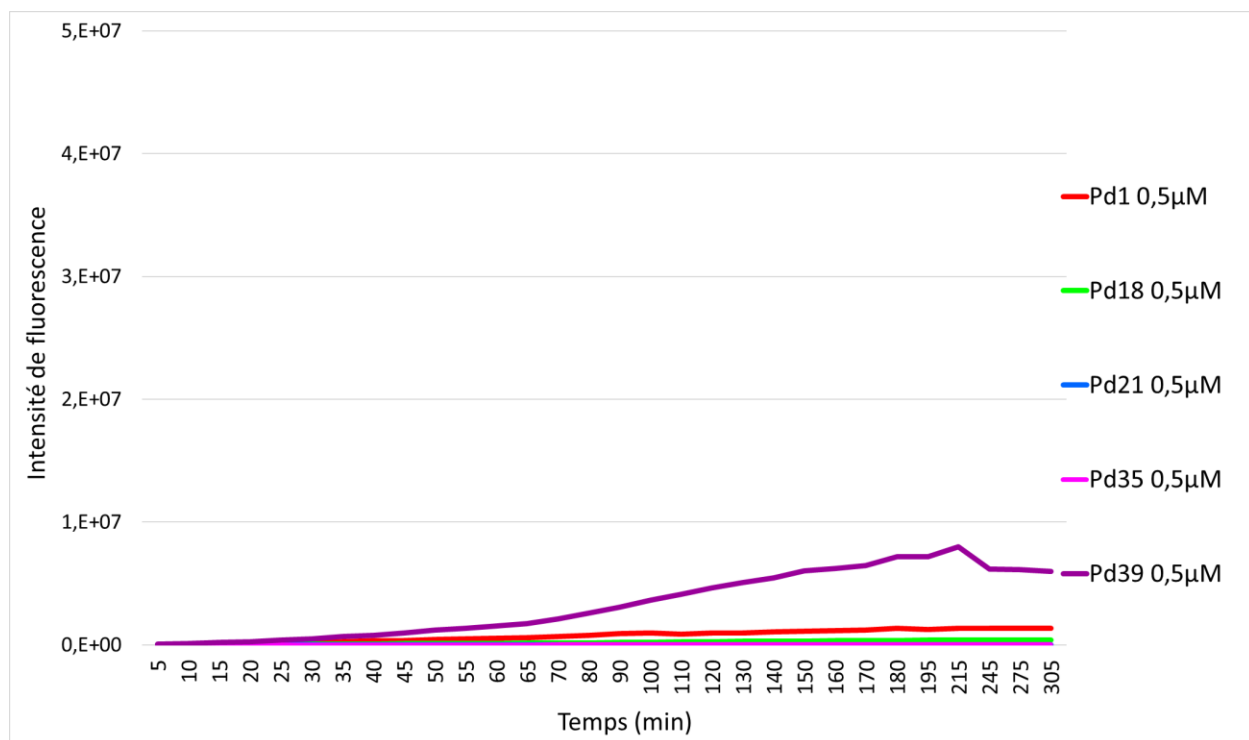


Figure 22 : Cinétique de décaage *in cellulo* de la **rhodamine bis-alloc** avec optimisation de la charge catalytique. Conditions : incubation d'une nuit de la **rhodamine bis-alloc** à 50 μM et catalyseurs à 0,5 μM. Mesure de la fluorescence : $\lambda_{exc} = 505 \pm 15$ nm et $\lambda_{ém} = 540 \pm 15$ nm.

Par observation des courbes de fluorescence, nous voyons qu'à une concentration de 10 μM, il y a un certain ordre de performance entre les cinq catalyseurs. Deux sont proches et très actifs rapidement, les trois autres sont proches et actifs mais leur activation est plus lente. Quand la concentration diminue à 5 μM, l'ordre de performance change. Les deux meilleurs qui avaient une activité très proches ont maintenant des courbes séparées. Le **Pd39** est plus performant que notre référence quand la charge catalytique est réduite de moitié. Le groupe de trois a toujours une activité assez similaire. Le **Pd35** est le plus faible, le **Pd18** est maintenant au même niveau d'activité que le **Pd21** et finit par le dépasser vers la fin de la cinétique. À une concentration dix fois moindre, un seul catalyseur se distingue des quatre autres, le complexe **Pd39**. Notre référence maintient une faible activité et les trois derniers ne sont presque plus actifs. Pour la concentration la plus faible, un seul complexe présente encore une faible activité (**Pd39**). La concentration en espèce active est probablement insuffisante ou le catalyseur est désactivé. Après les 5 h de cinétique, le complexe **Pd39**, à une concentration 10 fois inférieure, atteint quasi le niveau d'activité des trois catalyseurs les plus faibles. Finalement, au plus la charge catalytique diminue, au plus l'activation de la réaction catalytique se fait lentement. À très faible concentration, le catalyseur a moins d'opportunités de trouver son substrat parmi les nombreux composants cellulaires et subit probablement une désactivation.

4.2.5.1.2 VIABILITÉ CELLULAIRE

Afin d'optimiser notre modèle, nous avons non seulement analysé l'activité du catalyseur quand sa concentration est diminuée, mais aussi évalué la toxicité qui en résulte. Pour ce faire, un test au PrestoBlue™ a été réalisé en parallèle de la cinétique et le même protocole a été utilisé. Les résultats de la toxicité du modèle sont présentés à la **FIGURE 23**.

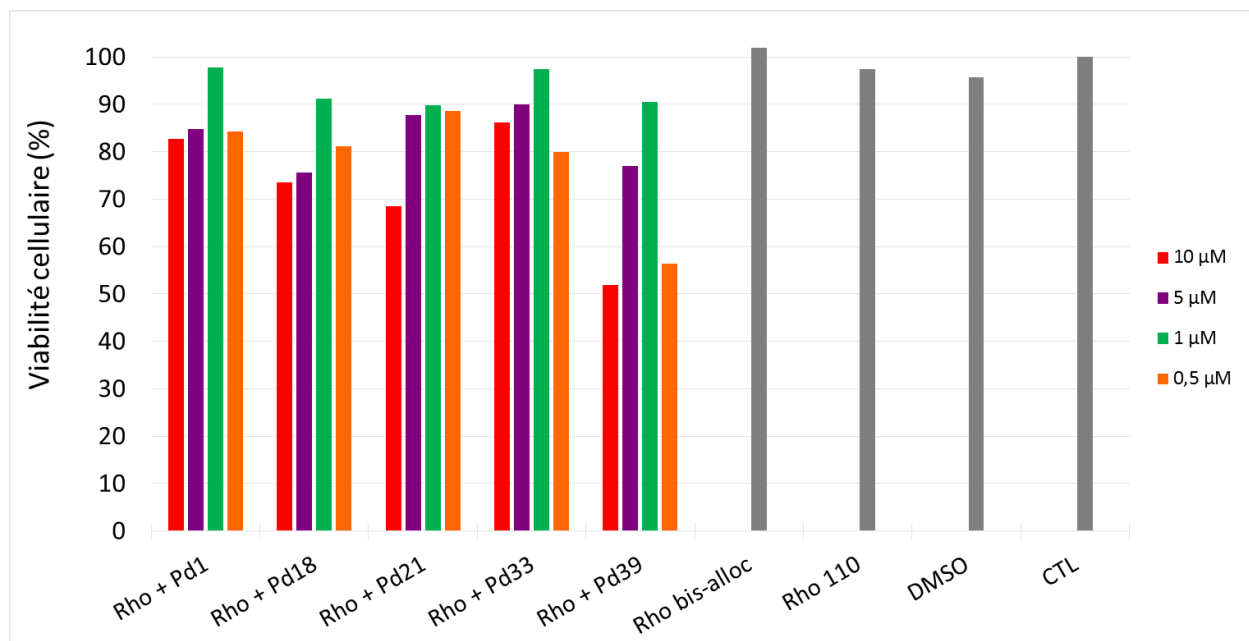


Figure 23 : Toxicité du modèle **rhodamine bis-alloc** optimisé en diminuant la charge catalytique. Conditions : incubation d'une nuit de la **rhodamine bis-alloc** à 50 μM, catalyseurs à 10 – 5 – 1 – 0,5 μM, DMSO à 0,2%, réactif PrestoBlue à 10% et incubation de 5 h pour la combinaison rho bis-alloc + catalyseur. Mesure de la fluorescence : filtre excitation de $\lambda_{\text{centrale}} = 570$ nm et filtre émission de $\lambda_{\text{centrale}} = 615$ nm.

Les composés seuls ne sont pas toxiques, c'est la combinaison rhodamine et catalyseur qui engendre la toxicité. Nous observons peu de différences entre les concentrations 10 μM et 5 μM sauf pour les complexes **Pd21** et **Pd39**. La combinaison la plus viable est celle avec la solution de catalyseur à 1 μM. Nous nous attendions à une diminution de toxicité quand la concentration en catalyseur diminue. Pourtant, la viabilité chute systématiquement quand nous diminuons la concentration à 0,5 μM.

Optimiser le modèle semble être un compromis entre l'activité et la toxicité. En effet, une charge catalytique plus élevée permet une meilleure activité mais entraîne une certaine toxicité. Dans notre modèle, il semble qu'un optimum soit atteint en incubant le complexe **Pd1** à une concentration de 10 μM. Diminuer la concentration à 5 μM ne permet pas d'avoir une viabilité significativement plus élevée. En ce qui concerne le **Pd39**, nous avons un bon compromis entre

l'activité et la toxicité en diminuant la concentration à 5 μM , voire même à 1 μM . Notre système permet difficilement de descendre plus bas en concentration pour les catalyseurs moins actifs.

4.2.5.2 Impact du temps d'incubation

En réalisant les expériences de criblage, nous avons vu que deux catalyseurs étaient particulièrement lents à s'activer. Une deuxième expérience d'optimisation a consisté en la diminution de la charge catalytique et une augmentation du temps de cinétique pour voir si éventuellement l'activité augmentait plus tard pour ces deux catalyseurs.

4.2.5.2.1 CATALYSE

Pour cette manipulation, le protocole est resté identique, à savoir une incubation d'une nuit pour la **rhodamine bis-alloc** à 50 μM . Les cellules ont été lavées avant d'ajouter les différentes concentrations des deux catalyseurs. L'émission de fluorescence a ensuite été suivie par spectroscopie en excitant à 505 nm et en mesurant l'émission à 540 nm. Les courbes de fluorescence obtenues pour les différentes concentrations en catalyseurs sont présentées à la Figure 24 **FIGURE 22**.

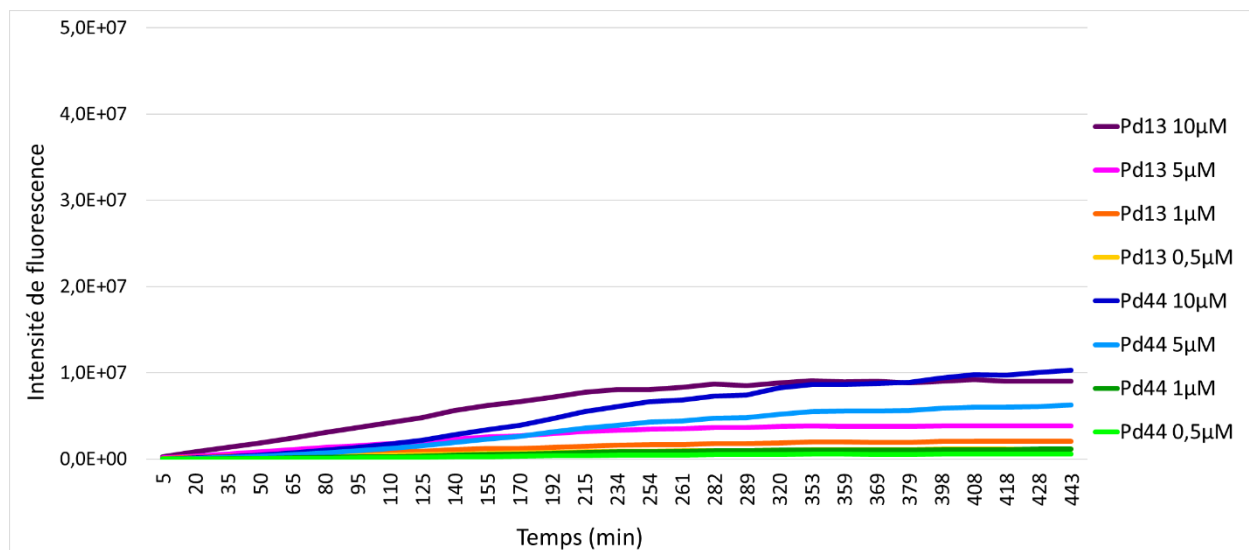


Figure 24 : Cinétique de décaageage *in cellulo* de la **rhodamine bis-alloc** optimisé en diminuant la charge catalytique et en allongeant le temps d'incubation. Conditions : incubation d'une nuit de la **rhodamine bis-alloc** à 50 μM et catalyseurs à 10 – 5 – 1 – 0,5 μM . Mesure de la fluorescence : $\lambda_{\text{exc}} = 505 \pm 15$ nm et $\lambda_{\text{ém}} = 540 \pm 15$ nm.

Allonger le temps de la cinétique n'a pas permis de voir une grande augmentation d'activité. Les catalyseurs à une concentration de 10 μM atteignent leur plafond d'activité après environ 5h20. Ce plafond d'activité représente environ 20% de la valeur attendue pour notre référence **Pd1** à la même concentration. À une concentration de 5 μM , une faible activité est encore perçue et en-dessous de cette concentration, presque plus d'activité n'est observée.

4.2.5.2.2 VIABILITÉ CELLULAIRE

La viabilité cellulaire a de nouveau été déterminée par une expérience réalisée en parallèle de la cinétique à l'aide du réactif PrestoBlue™. Un protocole identique a été suivi. Les résultats de la toxicité du modèle sont présentés à la Figure 25.

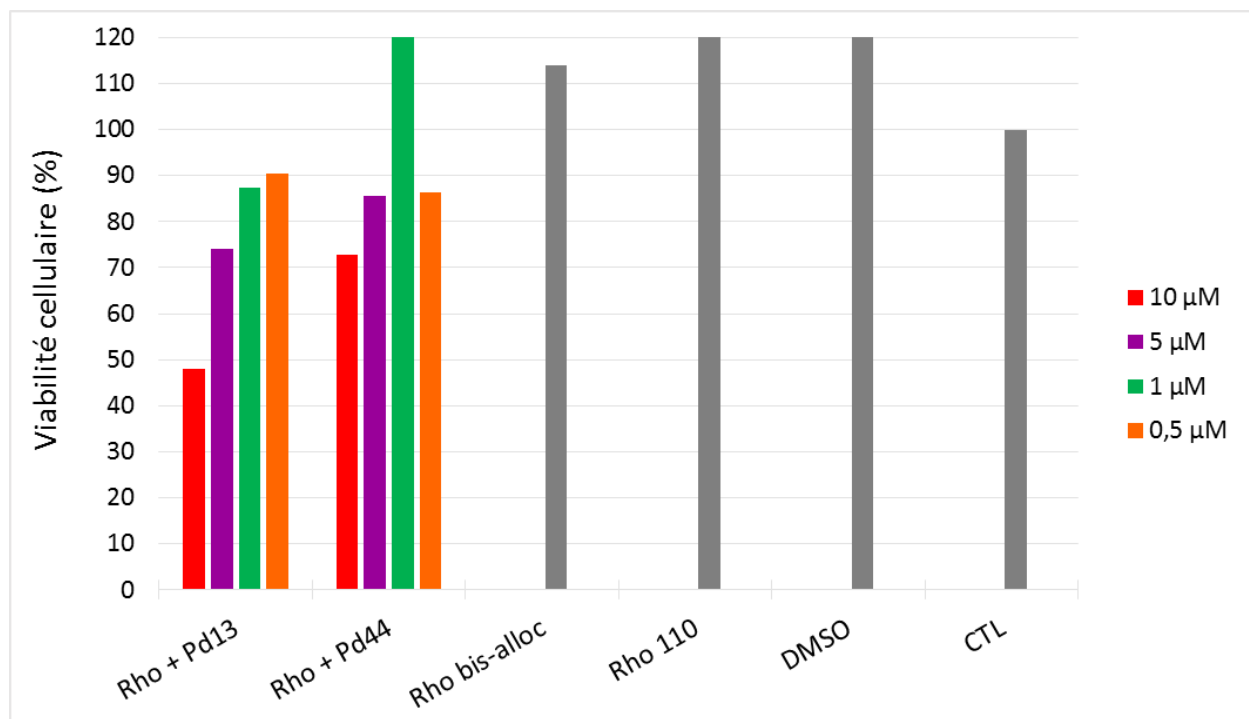


Figure 25 : Toxicité du modèle **rhodamine bis-alloc** optimisé en diminuant la charge catalytique et en allongeant le temps d'incubation. Conditions : incubation d'une nuit de la **rhodamine bis-alloc** à 50 μM, catalyseurs à 10 – 5 – 1 – 0,5 μM, DMSO à 0,2%, réactif PrestoBlue à 10% et incubation de 7h30 pour la combinaison rho bis-alloc + catalyseur. Mesure de la fluorescence : filtre excitation de $\lambda_{centrale} = 570$ nm et filtre émission de $\lambda_{centrale} = 615$ nm.

Comme attendu, le fluorophore cagé, libre et le solvant seul n'induisent pas de toxicité. La combinaison du fluorophore cagé et du catalyseur à 10 μM induit une toxicité élevée et cette toxicité diminue quand la concentration en catalyseur diminue, sauf pour le **Pd44** à 0,5 μM faisant chuter la viabilité. La durée d'incubation semble fortement diminuer la viabilité des cellules quand la charge catalytique est relativement élevée. Nous voyons ici qu'à 10 μM, la viabilité est de 50% et 70% quand l'incubation a été faite pendant plus de 7 h. Lors des précédents tests de viabilité, notre modèle n'était pas aussi toxique à l'exception d'un ou deux catalyseurs. La différence avec cette expérience est le temps d'incubation allongé de plus de 2 h. L'incubation de 5 h semble être un seuil à ne pas dépasser pour éviter une toxicité trop élevée.

4.2.5.3 Normoxie vs hypoxie

Dans les expériences précédentes, la présence d'oxygène lors de l'incubation en cellules peut engendrer la réoxydation du Pd(0) en Pd(II), rendant le catalyseur moins actif, voire inactif. Nous avons choisi d'étudier quelques structures susceptibles d'être plus actives en conditions

hypoxiques (Figure 26). Une troisième expérience a été la comparaison de l'activité des catalyseurs entre des conditions normoxiques et des conditions hypoxiques.

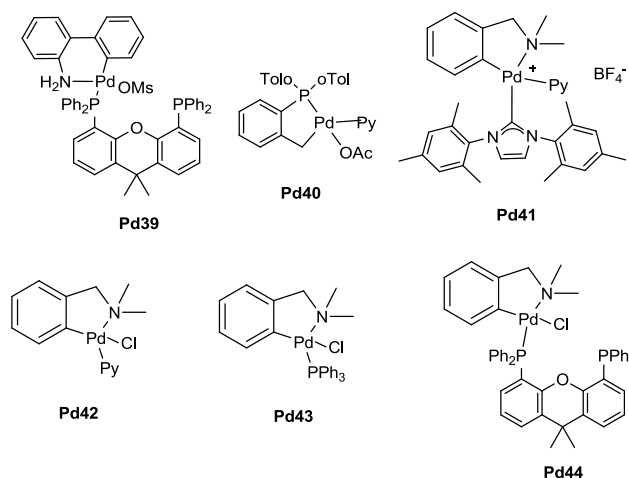


Figure 26 : Structures des catalyseurs testés en conditions normoxiques et hypoxiques

4.2.5.3.1 CATALYSE

Après avoir ajouté la solution de **rhodamine bis-alloc** dans les puits contenant les cellules SiHa, les plaques destinées à étudier l'activité en conditions hypoxiques ont été pré-équilibrées durant la nuit dans une chambre à hypoxie (1% O₂), les autres plaques ont été laissées dans un incubateur conventionnel. Les cellules ont ensuite été lavées avant d'ajouter les solutions de catalyseurs à une concentration de 10 μM. Une cinétique n'a pas pu être réalisée au risque de réoxygéner les cellules et de fausser la réaction complète. L'émission de fluorescence a été mesurée ponctuellement après 1 h et 5 h en excitant le fluorophore à 505 nm et en mesurant l'émission de fluorescence à 540 nm. Les résultats des intensités de fluorescence obtenues pour les six catalyseurs sont présentés à la Figure 27.

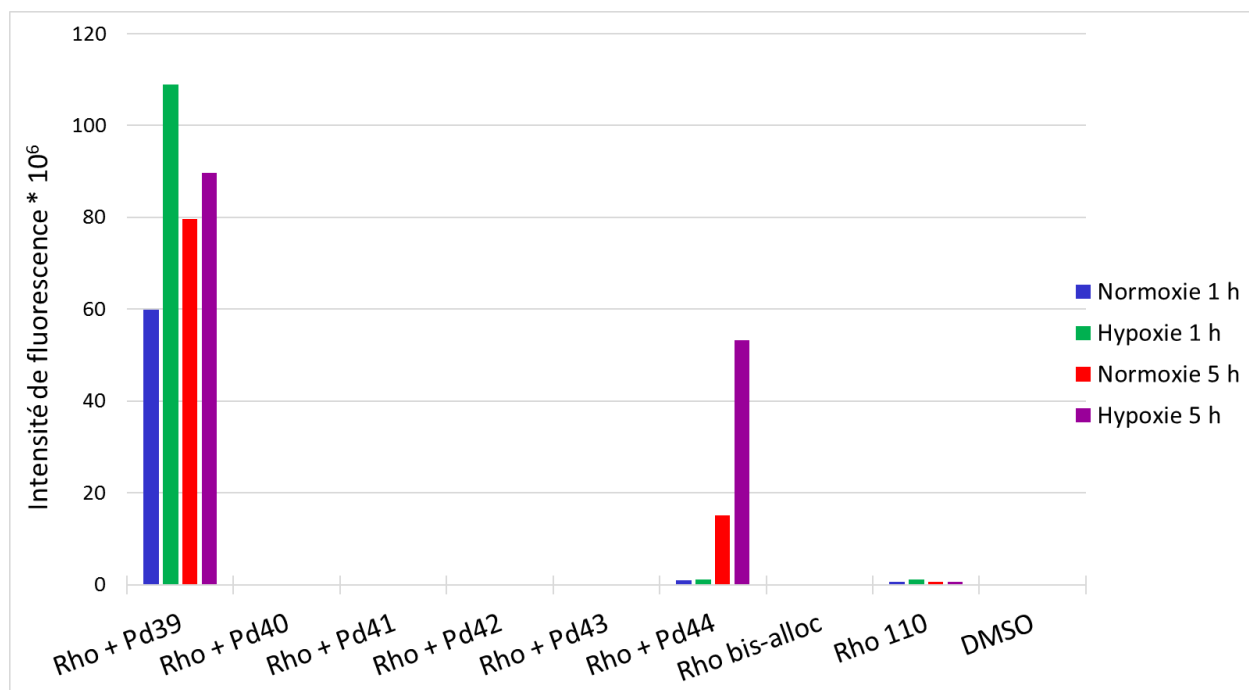


Figure 27 : Intensité de fluorescence lors du décaageage *in cellulo* de la **rhodamine bis-alloc** en conditions normoxiques et hypoxiques. Conditions : incubation d'une nuit de la **rhodamine bis-alloc** à 50 μM , catalyseurs à 10 μM et incubation de 1 h et 5 h pour la combinaison rho bis-alloc + catalyseur. Mesure de la fluorescence : $\lambda_{\text{exc}} = 505 \pm 15 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{ém}} = 540 \pm 15 \text{ nm}$.

Quatre catalyseurs (**Pd40**, **Pd41**, **Pd42** et **Pd43**) ne sont pas du tout actifs, que ce soit en normoxie ou hypoxie. Le complexe **Pd44** est celui qui était plus lent à s'activer, cela se confirme puisqu'après 1 h l'intensité de fluorescence est à peine perceptible. C'est seulement après 5 h d'incubation que son activité augmente un peu en normoxie mais significativement plus en hypoxie. L'absence d'oxygène semble être bénéfique pour son activation ou son absence d'inactivation. Le complexe **Pd39** est celui qui s'activait le plus rapidement parmi tous les complexes criblés. Il était également presque aussi actif que notre référence. Après 1 h, il est déjà bien actif en normoxie mais l'est encore plus en hypoxie. Après 5 h en conditions normoxiques, l'intensité de fluorescence mesurée augmente encore mais en hypoxie l'intensité est diminuée par rapport à la mesure après 1 h. L'activité en hypoxie reste cependant toujours plus élevée qu'en normoxie. Ce catalyseur semble mieux fonctionner à courte durée et l'absence d'oxygène a l'air d'être bénéfique pour maintenir une activité élevée.

4.2.5.3.2 VIABILITÉ CELLULAIRE

La viabilité cellulaire a été déterminée à l'aide du réactif PrestoBlue™. Cette expérience a été réalisée en parallèle de la mesure de fluorescence. Le même protocole est toujours d'application pour les conditions en normoxie. En ce qui concerne l'hypoxie, les plaques ont été pré-équilibrées

en chambre à hypoxie durant la nuit avant d'ajouter les catalyseurs. Les résultats de la toxicité du modèle pour une incubation de 5 h sont présentés à la Figure 28.

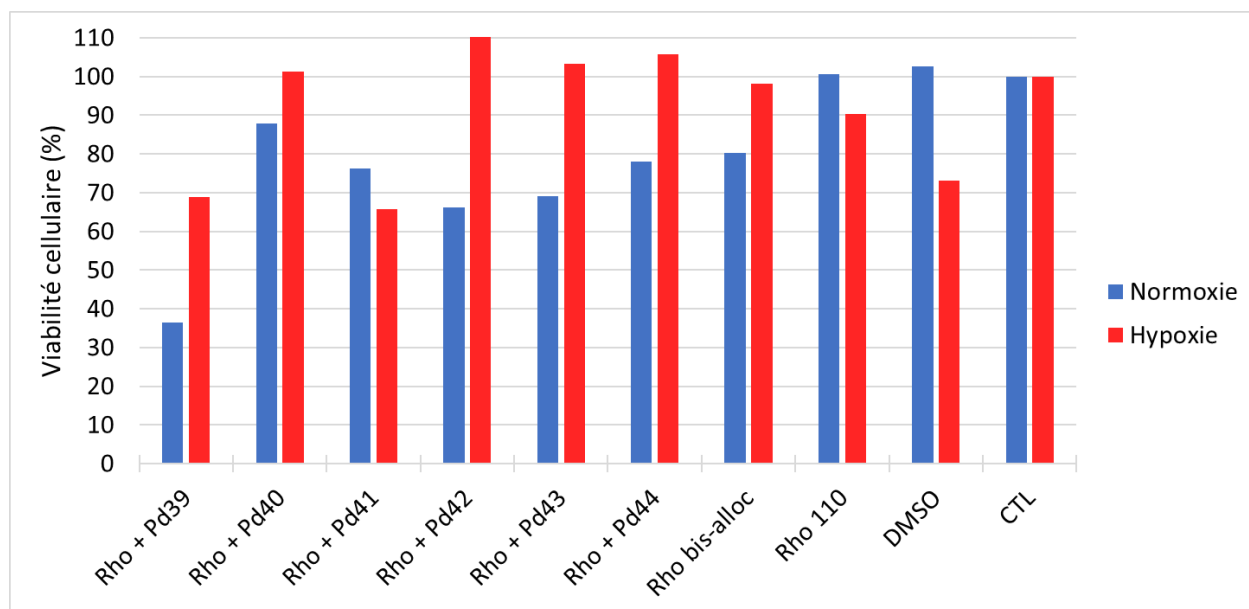


Figure 28 : Toxicité du modèle **rhodamine bis-alloc** en conditions normoxiques et hypoxiques. Conditions : incubation d'une nuit de la **rhodamine bis-alloc** à 50 μM , catalyseurs à 10 μM , DMSO à 0,2%, réactif PrestoBlue à 10% et incubation de 5h pour la combinaison rho bis-alloc + catalyseur. Mesure de la fluorescence : filtre excitation de $\lambda_{\text{centrale}} = 570 \text{ nm}$ et filtre émission de $\lambda_{\text{centrale}} = 615 \text{ nm}$.

La **rhodamine bis-alloc** seule semble moins toxique en hypoxie qu'en normoxie. Le solvant et le fluorophore sont plus toxiques en hypoxie. La majorité des catalyseurs incubés avec le fluorophore cagé sont moins toxiques en hypoxie. Nous pouvons tirer avantage de l'absence d'oxygène puisqu'en plus d'avoir un modèle moins toxiques pour les cellules, certains catalyseurs sont plus actifs dans ces conditions.

4.2.6 Images de fluorescence des cellules SiHa

Pour les cinq meilleurs catalyseurs, nous avons pris des photos des cellules dans le but de montrer que la fluorescence provenait bien du milieu intracellulaire (Figure 29).

Les cellules SiHa ont été mises en plaque 96 puits et incubées durant la nuit avec la **rhodamine bis-alloc** à 50 μM . Après plusieurs lavages retirant le fluorophore cagé en excès, les solutions des cinq catalyseurs à 10 μM ont été ajoutées. Après 2h15 d'incubation, les puits ont ensuite été lavés.

Les cellules ont été observées au microscope Axiovert S100. Comme attendu, le contrôle négatif avec la **rhodamine bis-alloc** n'est pas fluorescent. Le contrôle positif avec la **rhodamine 110** est fluorescent partout dans les quelques puits non lavés et fluorescent dans les cellules pour les

puits lavés. Cela confirme que la **rhodamine 110** est capable de pénétrer dans les cellules. Cependant, bien que plus faible, de la fluorescence est également observée en milieu extracellulaire pendant le temps de faire tous les réglages de l'appareil. Cette observation nous indique qu'une partie du fluorophore semble être expulsé de manière active par les cellules.

Dans les puits où les catalyseurs sont ajoutés, nous distinguons les cellules fluorescentes mais de la fluorescence est également présente à l'extérieur des cellules. Le fluorophore cagé et le catalyseur entrent dans les cellules et la réaction se déroule en intracellulaire. La fluorescence présente à l'extérieur indique que soit il y a une lyse cellulaire, potentiellement causée par la toxicité, qui libère de la **rhodamine bis-alloc**. Cela pourrait signifier que la réaction se déroule aussi dans une moindre mesure dans le milieu extracellulaire, soit la **rhodamine 110** formée *in cellulo* par l'action du catalyseur est expulsée par la cellule grâce à des pompes protéiques.

La fluorescence observée n'est pas identique d'une condition à l'autre. Pour la conditions **rhodamine 110** seule (**a**, Figure 29), la fluorescence est diffuse et répartie de manière homogène dans le cytoplasme. La fluorescence est également diffuse lorsque la **rhodamine bis-alloc** et les catalyseurs **Pd18**, **Pd21** ou **Pd35** sont combinés (**c – e**, Figure 29). Quand le catalyseur **Pd1** est incubé, la fluorescence est diffuse (**b**, Figure 29), mais dans certains puits nous observons des points fluorescents se trouvant à l'intérieur des cellules et parfois à l'extérieur. La fluorescence provenant de l'incubation du complexe **Pd39** n'est pas du tout diffuse, ce ne sont que des points répartis dans la cellule (**f**, Figure 29). La forme des cellules diffère aussi d'une conditions à l'autre. Avec une incubation de la **rhodamine 110** seule ou la combinaison de la **rhodamine bis-alloc** et du complexes **Pd35**, nous observons que des cellules de formes normales c'est-à-dire allongées (**a** et **e**, Figure 29). Lorsque le catalyseur **Pd1** est incubé, nous observons un mélange de cellules allongées et rondes (**b**, Figure 29), tandis que les cellules sont toutes de formes rondes avec les catalyseurs **Pd18**, **Pd21** et **Pd39** (**c**, **d** et **f**, Figure 29).

De manière générale, peu de cellules sont restées bien attachées dans les puits. Elles ont pu être détachées lors des lavages mais il y a aussi une certaine toxicité du modèle qui pourrait entraîner le détachement et la mort cellulaire. Une amélioration du protocole expérimental qui peut être envisagée est le coating de la plaque avec de la gélatine pour permettre une meilleure fixation des cellules.

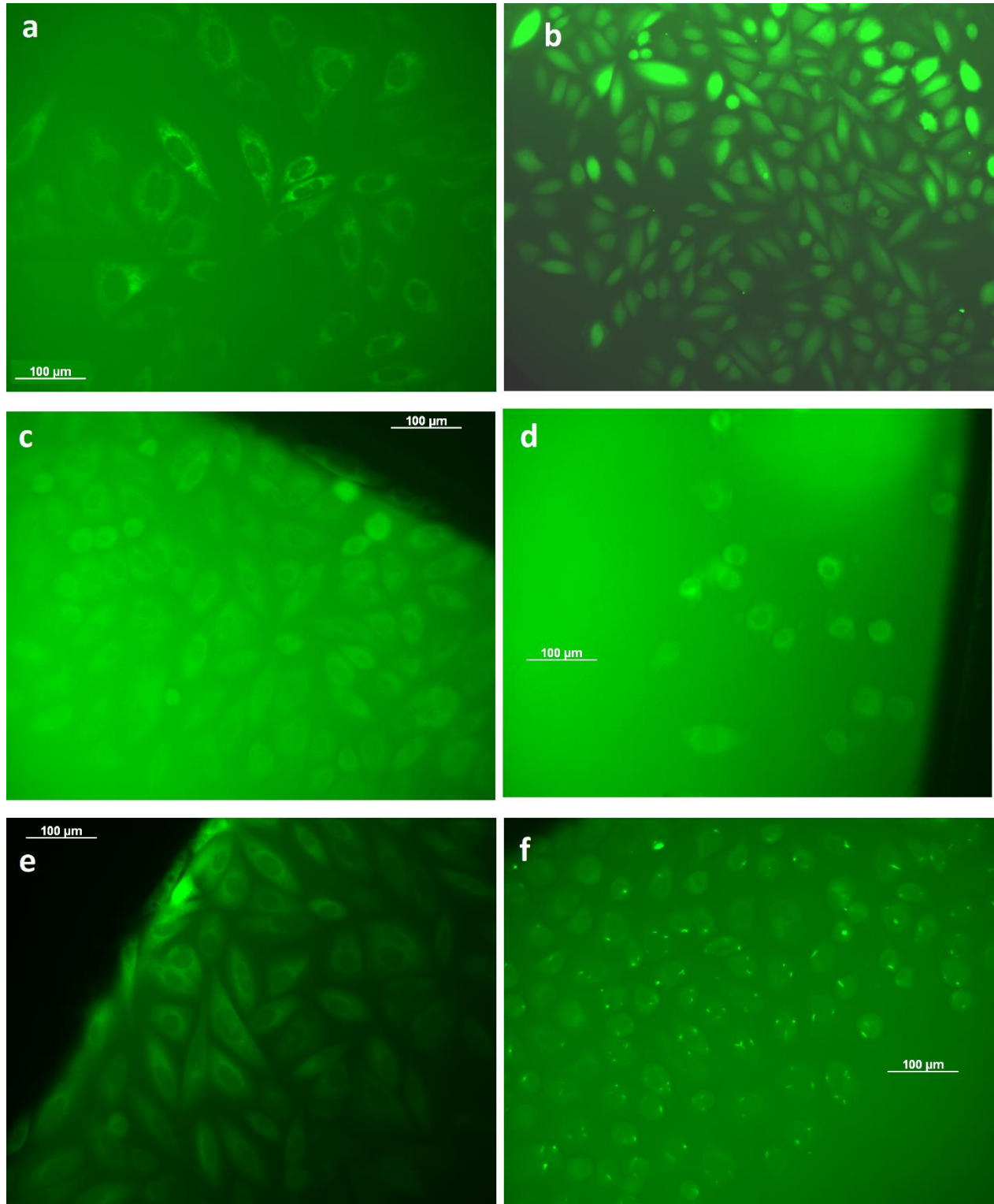


Figure 29 : Images de microscopie de fluorescence de la **rhodamine 110** et du décaageage de la **rhodamine bis-alloc** à l'intérieur de cellules SiHa. (a) Les cellules sont pré-incubées avec la **rhodamine 110** (50 µM) pendant la nuit, lavées au PBS et l'image est prise après les lavages. (b) – (f) Les cellules sont pré-incubées avec la **rhodamine bis-alloc** (50 µM) pendant la nuit, lavées au PBS et traitées avec les solutions de catalyseurs (20 µM ; b = **Pd1**, c = **Pd18**, d = **Pd21**, e = **Pd35** et f = **Pd39**). Après 2h15 d'incubation des catalyseurs, les cellules sont lavées au PBS et les images sont prises avec le microscope Axiovert S100.

5 Conclusion

Au cours de ce mémoire, nous avons développé un modèle fluorogénique *in vitro* capable de cribler des catalyseurs sur leur capacité à cliver un groupement protecteur alloc *via* une réaction de Tsuji-Trost. Ce modèle est basé sur une sonde fluorescence off/on dans lequel la **pro-ombelliférone** non fluorescente libère l'ombelliférone fluorescente dans le bleu suite à l'action du catalyseur (Schéma 19).

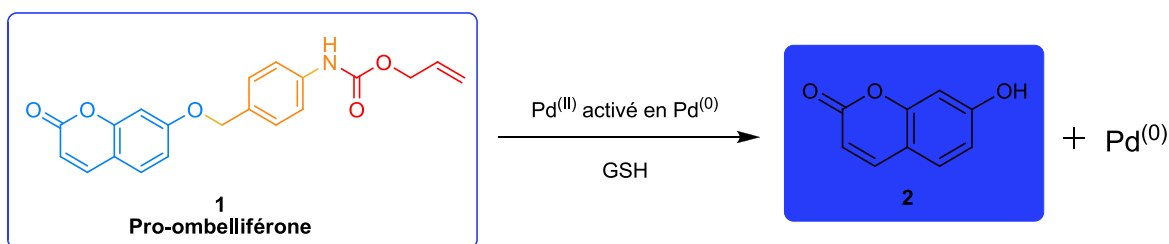


Schéma 19 : Modèle de déprotection catalytique par le Pd⁽⁰⁾ de la **pro-ombelliférone**

Le criblage est facile à mettre en œuvre et les expériences sont reproductibles. De plus, grâce à une droite de calibration vérifiée comme étant stable au cours du temps, nous avons pu obtenir des résultats quantitatifs. Par ce criblage, différents catalyseurs actifs ont été découverts (Figure 30).

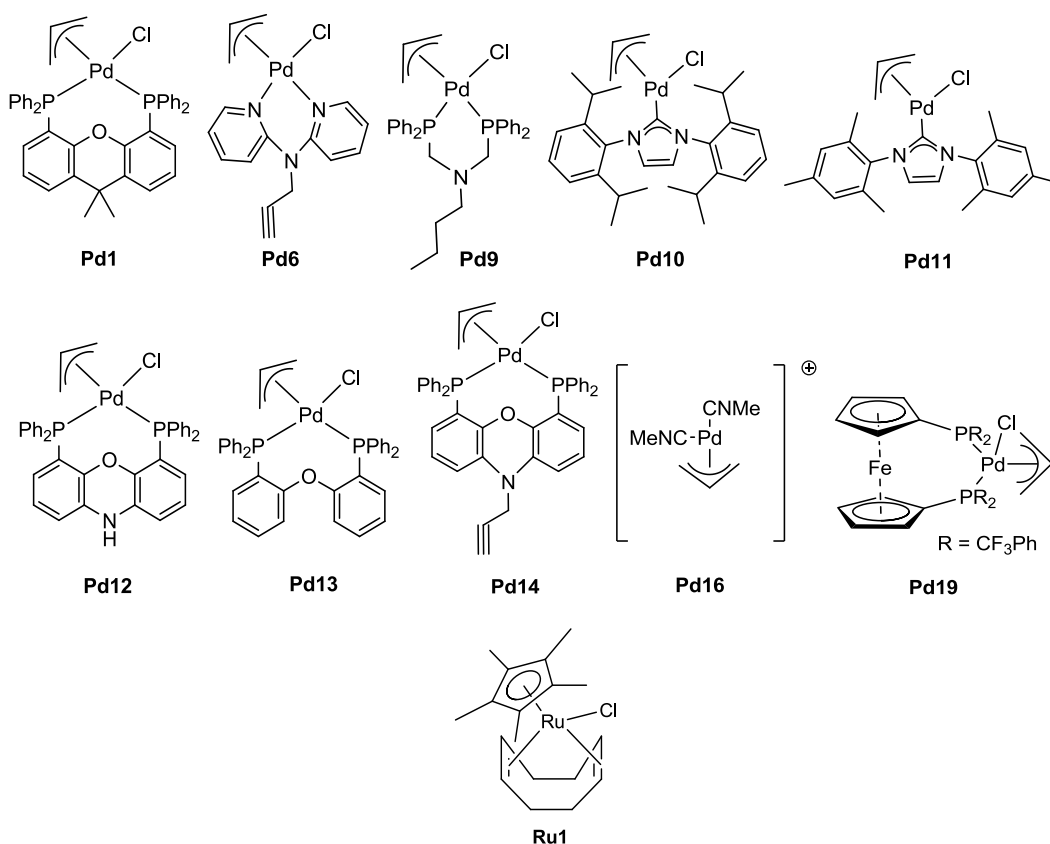


Figure 30 : Structures des catalyseurs ressortis du criblage *in vitro*

Lors de la validation *in cellulo* de notre modèle ombelliférone, plusieurs problèmes sont survenus, et faute de temps, nous avons décidé de nous rabattre sur un autre modèle déjà bien établi dans la littérature : le modèle rhodamine (Schéma 20). Deux criblages ont pu être réalisés sur une large gamme de catalyseurs de structures différentes.

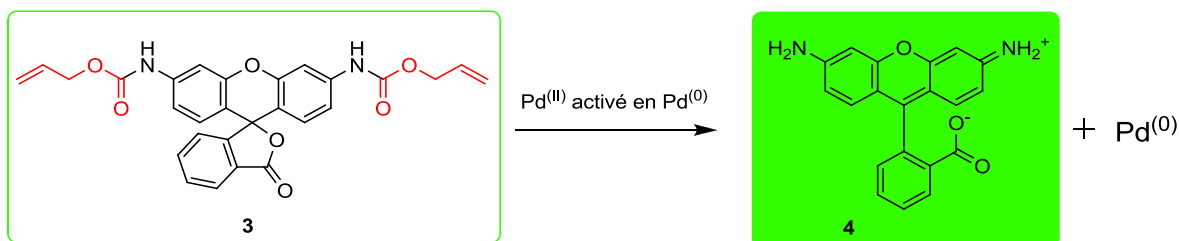


Schéma 20 : Modèle de déprotection catalytique par le Pd⁽⁰⁾ de la **rhodamine bis-alloc**

Cinq catalyseurs de palladium sont ressortis de ces criblages (Figure 31). Les deux complexes ayant la meilleure activité sont le **Pd1** et **Pd39**, les trois autres **Pd18**, **Pd21** et **Pd35** ont une bonne activité mais légèrement inférieure. Ces catalyseurs sont capables de traverser les membranes cellulaires et de catalyser une réaction de Tsuji-Trost dans le cytoplasme de cellules tumorales SiHa.

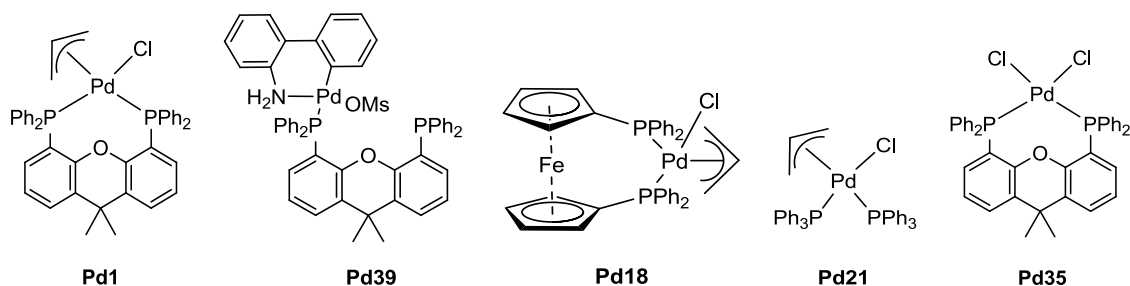


Figure 31 : Structures des cinq meilleurs catalyseurs de palladium ressortis des criblages en cellules

En chimie bioorganométallique, un complexe catalytique approprié doit intégrer les notions d'efficacité de la réaction de décaage mais également d'innocuité vis-à-vis du matériel biologique. Nous avons donc décidé d'optimiser certaines conditions du modèle. L'optimisation a consisté en la diminution de la charge catalytique afin de limiter la toxicité de notre modèle. Les concentrations testées pour les catalyseurs sont 10 – 5 – 1 – 0,5 μM . Les deux plus faibles concentrations n'ont pas permis de maintenir l'activité des catalyseurs suffisamment élevée. Moins d'opportunités de rencontre sont possibles entre l'espèce active et son substrat si la concentration est trop faible, ou bien le catalyseur peut être inactivé. Diminuer la concentration à 5 μM pour le complexe **Pd39** a permis d'avoir une activité élevée en diminuant significativement la toxicité du système. Pour le complexe **Pd1**, maintenir la concentration à 10 μM semble un compromis raisonnable entre activité et toxicité. Enfin, quelques structures susceptibles d'être

plus actives en présence d'une très faible concentration en oxygène ont été testées en conditions normoxiques et hypoxiques. L'activation de deux structures semble être facilitée par l'absence d'oxygène, l'une à plus court terme (**Pd39**) et l'autre à plus long terme (**Pd44**) (Figure 32).

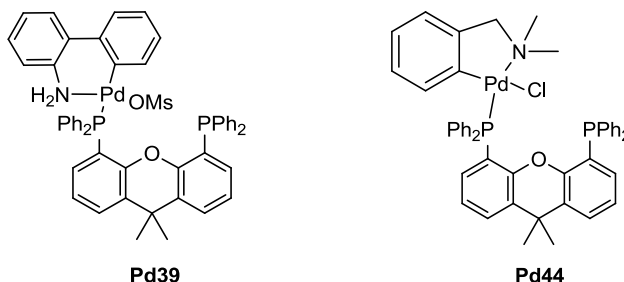


Figure 32 : Structures des catalyseurs plus actifs en hypoxie

6 Perspectives

Ce travail ouvre plusieurs perspectives dans le domaine de la catalyse *in cellulo*.

Tout d'abord, dans la continuité directe de ce projet, plusieurs points peuvent être optimisés. Premièrement, lors de la mise en place du protocole expérimental pour les tests biologiques, nous avons testé deux temps d'incubation et une concentration pour la **rhodamine bis-allo**c mais nous n'avons pas davantage optimisé ces paramètres. Ces deux points peuvent donc être améliorés. Deuxièmement, nous avons pris des images de fluorescence des cellules SiHa. Il faudrait étudier plus amplement le fait que la **rhodamine 110** est peut-être expulsée par les cellules *via* des pompes protéiques pour avoir des preuves que la réaction se fait de manière intracellulaire. Comme autre preuve, il serait également intéressant de filmer la réaction en microscopie confocale. Troisièmement, nous avons mis au point un protocole expérimental et nous savons que le catalyseur entre dans les cellules cancéreuses. Il serait intéressant de doser la quantité de palladium qui est effectivement entrée dans les cellules et qui a réagi. Cette analyse quantitative peut être réalisée par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS)⁸¹. En effet, si l'utilisation de catalyseurs est envisagée à des fins thérapeutiques, un grand pourcentage de catalyseur doit entrer dans les cellules cancéreuses sinon la plupart du catalyseur injecté sera dispersé dans notre système auprès des cellules saines et le traitement n'agira pas de manière optimale.

Ensuite, comme nous avons découvert des catalyseurs capables de traverser les membranes cellulaires, qui sont stables et réactifs en conditions biologiques, pour les meilleurs catalyseurs et

pour les futurs catalyseurs qui seront découverts, il serait intéressant d'optimiser les paramètres de concentration et de temps d'incubation afin d'avoir une activité maximale pour une toxicité minimale. Dans ce cas, il faudrait notamment faire des courbes de dose-réponse. Nous pourrions ensuite étudier la localisation des catalyseurs afin de voir s'ils ciblent ou s'accumulent dans des organites spécifiques de la cellule. Nous avons également commencé l'étude de l'activité des catalyseurs en comparant les conditions en normoxie et hypoxie. Certains catalyseurs ont vu leur activité augmenter en absence d'oxygène. Tester les autres catalyseurs en hypoxie serait donc intéressant. Cela amènerait une perspective thérapeutique innovante dans le cas où un catalyseur serait actif en hypoxie et ne le serait pas en normoxie. De ce fait, des prodrogues cytotoxiques nécessitant l'activation d'un catalyseur serait délivrée de manière ciblée dans le microenvironnement tumoral. Outre l'étude des catalyseurs, d'autres types de sondes pourraient être développées et étudiées. Il est à envisager de développer de nouveaux modèles dans lesquels des agents cytotoxiques plus puissants seraient cagés afin qu'ils perdent leur pouvoir de toxicité. Le but final est que ce soit l'action ciblée d'un catalyseur qui clive le groupement protecteur en libérant l'agent cytotoxique sélectivement au sein même des cellules cancéreuses⁷⁵. Ainsi, les cellules saines avoisinantes ne seraient pas touchées. Nous pouvons également envisager d'augmenter la sélectivité tumorale à l'aide du catalyseur en imaginant de nouvelles techniques de vectorisation comme des nanoparticules transportant le catalyseur⁷⁶. Ces nanoparticules cibleraient la tumeur grâce à des ligands de surface ou des micelles sensibles au pH^{77,78}. Ainsi, le contenu ne serait délivré que dans les cellules cancéreuses qui auraient le récepteur spécifique aux ligands présents en surface des nanoparticules ou dans l'environnement acide des tumeurs.

Pour finir, nous avons validé un modèle *in cellulo* au départ de premières expériences réalisées *in vitro*. Il reste encore une étape très importante à franchir qui sont les expériences *in vivo*, sans lesquelles aucune application thérapeutique future ne sera possible.

7 Bibliographie

1. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *cell* 100, 57–70 (2000).
2. Global Burden of Disease Cancer Collaboration et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol.* 3, 524 (2017).
3. Cancer. Available at: <http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. (Accessed: 24th May 2018)
4. Le cancer en chiffres | Fondation contre le Cancer. Available at: <https://www.cancer.be/le-cancer/le-cancer-en-chiffres>. (Accessed: 26th May 2018)
5. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674 (2011).
6. Moses, C., Garcia-Bloj, B., Harvey, A. R. & Blancafot, P. Hallmarks of cancer: The CRISPR generation. *Eur. J. Cancer* 93, 10–18 (2018).
7. Nowell, P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23–28 (1976).
8. Lorusso, G. & Rüegg, C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochem. Cell Biol.* 130, 1091–1103 (2008).
9. Bhome, R. et al. A top-down view of the tumor microenvironment: structure, cells and signaling. *Front. Cell Dev. Biol.* 3, (2015).
10. Semenza, G. L. The hypoxic tumor microenvironment: A driving force for breast cancer progression. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1863, 382–391 (2016).
11. Albini, A. & Sporn, M. B. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nat. Rev. Cancer* 7, 131–139 (2007).
12. Hockel, M. & Vaupel, P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J. Natl. Cancer Inst.* 93, 266–276 (2001).
13. Corbet, C. & Feron, O. Tumour acidosis: from the passenger to the driver's seat. *Nat. Rev. Cancer* 17, 577–593 (2017).
14. Ellenbroek, S. I. J. & van Rheenen, J. Imaging hallmarks of cancer in living mice. *Nat. Rev. Cancer* 14, 406–418 (2014).
15. Vaupel, P., Kallinowski, F. & Okunieff, P. Blood Flow, Oxygen and Nutrient Supply, and Metabolic Microenvironment of Human Tumors: A Review. *Cancer Res.* 6449–6465 (1989).
16. Michiels, C., Tellier, C. & Feron, O. Cycling hypoxia: A key feature of the tumor microenvironment. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* 1866, 76–86 (2016).
17. Vaupel, P. & Harrison, L. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *The oncologist* 9, 4–9 (2004).
18. Treps, L. & Gavard, J. L'angiogenèse tumorale: Quand l'arbre de vie tourne mal. *médecine/sciences* 31, 989–995 (2015).
19. Semenza, G. L. Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate. *J. Clin. Invest.* (2008). doi:10.1172/JCI37373
20. Pavlova, N. N. & Thompson, C. B. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab.* 23, 27–47 (2016).
21. Razungles, J., Cavallès, V., Jalaguier, S. & Teyssier, C. The Warburg effect: from theory to therapeutic applications in cancer. (2013).
22. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* 324, 1029–1033 (2009).

23. Corbet, C. & Feron, O. Cancer cell metabolism and mitochondria: Nutrient plasticity for TCA cycle fueling. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* 1868, 7–15 (2017).
24. Cairns, R. A., Harris, I. S. & Mak, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer* 11, 85–95 (2011).
25. Sonveaux, P. et al. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J. Clin. Invest.* (2008).
26. Feron, O. Pyruvate into lactate and back: From the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiother. Oncol.* 92, 329–333 (2009).
27. Warburg, O., Wind, F. & Negelein, E. The metabolism of tumors in the body. *J. Gen. Physiol.* 8, 519 (1927).
28. Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309–314 (1956).
29. Fantin, V. R., St-Pierre, J. & Leder, P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* 9, 425–434 (2006).
30. Traitement cancer - Les différents traitements du cancer | Roche. Available at: <http://www.roche.fr/patients/info-patients-cancer/traitement-cancer/traitements-cancer.html>. (Accessed: 8th May 2018)
31. Traitements du cancer | Fondation contre le Cancer. Available at: https://www.cancer.be/le-cancer/traitements-du-cancer?gclid=EA1aIQobChMI_sKG9IT22gIVab7tCh19IAL_EAAYASAAEgKmIPD_BwE. (Accessed: 8th May 2018)
32. La ligue contre le cancer. Les traitements des cancers. (2009).
33. Liu, H., Lv, L. & Yang, K. Chemotherapy targeting cancer stem cells. *Am. J. Cancer Res.* 5, 880 (2015).
34. Connors, T. A. & Knox, R. J. Prodrugs in cancer chemotherapy. *Stem Cells* 13, 501–511 (1995).
35. A Baudino, T. Targeted cancer therapy: the next generation of cancer treatment. *Curr. Drug Discov. Technol.* 12, 3–20 (2015).
36. Padma, V. V. An overview of targeted cancer therapy. *BioMedicine* 5, (2015).
37. Institut National du Cancer. Les thérapies ciblées dans le traitement du cancer - Etat des lieux 2015. (2016).
38. Les traitements - Professionnels de santé | Institut National Du Cancer. Available at: <http://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-traitements>. (Accessed: 23rd May 2018)
39. American Cancer Society. Radiation therapy principles. (2011).
40. Evans, E. & Staffurth, J. Principles of cancer treatment by radiotherapy. *Surg.-Oxf. Int. Ed.* 36, 111–116 (2018).
41. Caley, A. & Jones, R. The principles of cancer treatment by chemotherapy. *Surg.-Oxf. Int. Ed.* 30, 186–190 (2012).
42. Cosse, J.-P. & Michiels, C. Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression. *Anti-Cancer Agents Med. Chem. Former. Curr. Med. Chem.-Anti-Cancer Agents* 8, 790–797 (2008).
43. Patterson, D. M., Nazarova, L. A. & Prescher, J. A. Finding the Right (Bioorthogonal) Chemistry. *ACS Chem. Biol.* 9, 592–605 (2014).
44. Prescher, J. A. & Bertozzi, C. R. Chemistry in living systems. *Nat. Chem. Biol.* 1, 13–21 (2005).
45. Bertozzi, C. R. A Decade of Bioorthogonal Chemistry. *Acc. Chem. Res.* 44, 651–653 (2011).
46. Sletten, E. M. & Bertozzi, C. R. Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality. *Angew. Chem. Int. Ed.* 48, 6974–6998 (2009).

47. Lim, R. K. V. & Lin, Q. Bioorthogonal chemistry: recent progress and future directions. *Chem. Commun.* 46, 1589 (2010).
48. Lang, K. & Chin, J. W. Bioorthogonal Reactions for Labeling Proteins. *ACS Chem. Biol.* 9, 16–20 (2014).
49. Gololobov, Y. G., Zhmurova, I. N. & Kasukhin, L. F. Sixty Years Of Staudinger Reaction. *Tetrahedron* 37, 437–472 (1981).
50. Sletten, E. M. & Bertozzi, C. R. From Mechanism to Mouse: A Tale of Two Bioorthogonal Reactions. *Acc. Chem. Res.* 44, 666–676 (2011).
51. Lin, F. L., Hoyt, H. M., van Halbeek, H., Bergman, R. G. & Bertozzi, C. R. Mechanistic Investigation of the Staudinger Ligation. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 2686–2695 (2005).
52. Zheng, M., Zheng, L., Zhang, P., Li, J. & Zhang, Y. Development of Bioorthogonal Reactions and Their Applications in Bioconjugation. *Molecules* 20, 3190–3205 (2015).
53. Saxon, E. & Bertozzi, C. R. Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *Science* 287, 2007–2010 (2000).
54. Soellner, M. B., Dickson, K. A., Nilsson, B. L. & Raines, R. T. Site-Specific Protein Immobilization by Staudinger Ligation. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 11790–11791 (2003).
55. Ramil, C. P. & Lin, Q. Bioorthogonal chemistry: strategies and recent developments. *Chem. Commun.* 49, 11007 (2013).
56. Himo, F. et al. Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 210–216 (2005).
57. Wittig, G. & Krebs, A. Zur Existenz niedergliedriger Cycloalkine, I. *Chem. Ber.* 94, 3260–3275 (1961).
58. Agard, N. J., Prescher, J. A. & Bertozzi, C. R. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 15046–15047 (2004).
59. Hocharoen, L. & Cowan, J. A. Metallotherapeutics: Novel Strategies in Drug Design. *Chem. - Eur. J.* 15, 8670–8676 (2009).
60. Haas, K. L. & Franz, K. J. Application of Metal Coordination Chemistry To Explore and Manipulate Cell Biology. *Chem. Rev.* 109, 4921–4960 (2009).
61. Sasmal, P. K. et al. Catalytic Azide Reduction in Biological Environments. *ChemBioChem* 13, 1116–1120 (2012).
62. Streu, C. & Meggers, E. Ruthenium-Induced Allylcarbamate Cleavage in Living Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* 45, 5645–5648 (2006).
63. Antos, J. & Francis, M. Transition metal catalyzed methods for site-selective protein modification. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10, 253–262 (2006).
64. Li, J. J. Tsuji–Trost reaction. in *Name Reactions* 605–607 (Springer International Publishing, 2014).
65. Trost, B. M. Asymmetric Transition Metal-Catalyzed Allylic Alkylations. 28
66. MINAMI, I. & OHASHI, Y. PALLADIUM-CATALYZED REACTION OF ALLYL CARBAMATES; ALLYLATION OF CARBONDICLEOPEILRS. AND PROTRCTION-DEPROTECTION OF AMINES. 4
67. Sasmal, P. K., Carregal-Romero, S., Parak, W. J. & Meggers, E. Light-Triggered Ruthenium-Catalyzed Allylcarbamate Cleavage in Biological Environments. *Organometallics* 31, 5968–5970 (2012).
68. Völker, T., Dempwolff, F., Graumann, P. L. & Meggers, E. Progress towards Bioorthogonal Catalysis with Organometallic Compounds. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 10536–10540 (2014).
69. Völker, T. & Meggers, E. Transition-metal-mediated uncaging in living human cells—an emerging alternative to photolabile protecting groups. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 25, 48–54 (2015).

70. Yusop, R. M., Unciti-Broceta, A., Johansson, E. M. V., Sánchez-Martín, R. M. & Bradley, M. Palladium-mediated intracellular chemistry. *Nat. Chem.* 3, 239–243 (2011).
71. Weiss, J. T. et al. Extracellular palladium-catalysed dealkylation of 5-fluoro-1-propargyl-uracil as a bioorthogonally activated prodrug approach. *Nat. Commun.* 5, (2014).
72. Indrigo, E., Clavadetscher, J., Chankeshwara, S. V., Lilienkamp, A. & Bradley, M. Palladium-mediated in situ synthesis of an anticancer agent. *Chem. Commun.* 52, 14212–14214 (2016).
73. Indrigo, E. et al. Intracellular delivery of a catalytic organometallic complex. *Chem. Commun.* 53, 6712–6715 (2017).
74. Kaelin Jr, W. G. & Thompson, C. B. Clues from cell metabolism. 3 (2010).
75. Legigan, T. et al. The First Generation of β -Galactosidase-Responsive Prodrugs Designed for the Selective Treatment of Solid Tumors in Prodrug Monotherapy. *Angew. Chem. Int. Ed.* 51, 11606–11610 (2012).
76. Li, B. et al. A bioorthogonal nanosystem for imaging and in vivo tumor inhibition. *Biomaterials* 138, 57–68 (2017).
77. Miller, M. A. et al. Nano-palladium is a cellular catalyst for in vivo chemistry. *Nat. Commun.* 8, 15906 (2017).
78. Neumann, K., Lilienkamp, A. & Bradley, M. Responsive polymeric nanoparticles for controlled drug delivery: Responsive polymeric nanoparticles for controlled drug delivery. *Polym. Int.* 66, 1756–1764 (2017).
79. Bruno, N. C. & Buchwald, S. L. Buchwald Ligands and Precatalysts. (2018).
80. Graf, N. & Lippard, S. J. Redox activation of metal-based prodrugs as a strategy for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 993–1004 (2012).
81. Soldevila-Barreda, J. J., Romero-Canelón, I., Habtemariam, A. & Sadler, P. J. Transfer hydrogenation catalysis in cells as a new approach to anticancer drug design. *Nat. Commun.* 6, (2015).
82. Johns, A. M., Utsunomiya, M., Incarvito, C. D. & Hartwig, J. F. A Highly Active Palladium Catalyst for Intermolecular Hydroamination. Factors that Control Reactivity and Additions of Functionalized Anilines to Dienes and Vinylarenes. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 1828–1839 (2006).
83. van der Veen, L. A. et al. Origin of the Bite Angle Effect on Rhodium Diphosphine Catalyzed Hydroformylation. *Organometallics* 19, 872–883 (2000).

Développement d'un modèle fluorogénique pour le screening de catalyseurs de palladium en système biologique

Présenté par Maud Decock

Résumé

Située à l'interface de la biologie et de la chimie organique, la chimie bioorthogonale est une branche de la chimie composée de réactions se réalisant en milieu cellulaire dans lesquelles les réactifs doivent être sélectifs les uns par rapport aux autres et non toxiques pour le matériel biologique. Depuis les années 2000, la chimie bioorthogonale s'est fortement développée et depuis 2006, l'intérêt s'est porté vers l'emploi de composés organométalliques en chimie bioorthogonale pour leurs propriétés catalytiques. D'un point de vue thérapeutique, exploiter le microenvironnement tumoral pour favoriser des réactions bioorthogonales de catalyse organométallique est un projet ambitieux qui nécessite un travail d'optimisation conséquent. Dans l'optique de pouvoir sélectivement activer des composés cytotoxiques, et donc thérapeutiques, dans le seul environnement tumoral, le choix d'un catalyseur le plus approprié en termes d'efficacité et de cinétique de la réaction souhaitée représente l'objectif principal de ce mémoire.

Pour l'atteindre, différentes étapes ont été nécessaires. La première étape a été le développement d'un modèle en conditions *in vitro* permettant de valider par un système de lecture par fluorescence le décaage d'un composé rapporteur. La seconde étape a été la validation et l'optimisation de ce modèle en système cellulaire. Cette étape a résulté en la sélection du ou des catalyseurs le(s) plus approprié(s) intégrant les notions d'efficacité de la réaction de décaage et d'innocuité vis-à-vis du matériel biologique. Finalement, les catalyseurs les plus prometteurs ont été optimisés en termes de dose mais leur activité a également été testée en conditions hypoxiques, susceptibles d'altérer ou améliorer le rendement de la réaction.

