

Faculté des sciences

Développement de nouveaux senseurs fluorescents pour l'ion Zn^{2+}

Auteur : Corentin Pochet

Promoteur : Michael Singleton

Lecteurs : Olivier Riant, Benjamin Elias et Yann Garcia

Année académique 2019-2020

Master en sciences chimiques à finalité approfondie

Développement de
nouveaux senseurs
fluorescents pour l'ion Zn^{2+}

Remerciements

Tout d'abord, j'adresse mes remerciements au **Pr. Michael Singleton** de l'Université Catholique de Louvain. C'était un honneur d'apprendre auprès d'un grand esprit comme le sien durant cette année. Le partage de son expertise lors des réunions hebdomadaires fût très enrichissant et m'a permis de développer mon esprit de recherche. Je souhaite le remercier également pour tous les événements qui ont parsemés l'année et que nous avons pu partager avec l'équipe (Thanksgiving, le symposium de Blankenberge, etc.). Enfin, un grand merci pour les séances de « torture » comme nous avons coutume de les appeler. Ses débats constructifs de parfois plusieurs heures m'ont permis d'améliorer mes compétences de recherche et d'élargir mes connaissances dans le domaine de la synthèse organique et de la chimie supramoléculaire.

Je tiens à remercier vivement mon encadrant durant ce mémoire, **Akin Aydogan**. Sa patience et son sérieux m'ont permis de développer mes connaissances dans la recherche en laboratoire. Son aide a également été précieuse durant les dernières semaines du confinement afin d'obtenir les derniers résultats d'analyse.

Je remercie également toute l'équipe du laboratoire de Singleton (**François, Maëlle, Jérôme, Jérémie, Jiajung, Cuilian, Chio, Yazhou**) pour leur accueil dans cette équipe de recherche. Chacun d'entre eux a pu m'aider lorsque j'en avais besoin et leur expérience a été plus qu'instructive. Je n'oublie pas également de remercier **Micha** qui n'a été présent que peu de temps.

Sans oublier mes amis de l'université **Jonathan, Romain, Elyes** et plus particulièrement **Geofrey** qui réalisait son mémoire dans l'équipe de Singleton à mes côtés. Nos discussions de tout et de rien et le soutien mutuelle nous ont permis d'évacuer beaucoup de pression accumulée au cours de l'année et de se motiver.

Je remercie également **Gabriella Barozzino Consiglio** et **Alain Jancart** qui ont mis à disposition les RMN et les ont entretenues, et **Laurent Collard** et **Raoult Rozenberg** qui ont réalisés les analyses par spectrométrie de masse.

Finalement, je tiens à remercier ma famille avec qui j'ai passé de longues semaines confinés à cause du Coronavirus et qui m'a encouragé durant toute l'écriture de ce mémoire.

Résumé

Depuis maintenant de nombreuses années, les scientifiques cherchent à comprendre les mystères qui entourent le fonctionnement des mécanismes du corps humain et les maladies qui le frappent. Cette compréhension passe par l'observation et la quantification de tout ce qui compose ses cellules. Parmi tous ces composants, les cations métalliques dont Zn^{2+} y jouent des rôles variés et extrêmement importants allant de la contraction musculaire au bon fonctionnement d'une enzyme. Plusieurs techniques existent déjà pour quantifier le zinc et l'une des plus pratiques à utiliser directement en milieu biologique sont les sondes fluorescentes car elles permettent une observation continue des événements se produisant dans une cellule. Celles-ci sont régies à la fois par les lois de la photophysique, qui vont dictées leur comportement en présence de lumière au travers de plusieurs mécanismes, et par les lois de la chimie supramoléculaire et la chimie de coordination, qui vont définir leur sélectivité vis-à-vis d'un cation bien spécifique sur base des interactions qu'elles peuvent faire ou de leur structure. Le nombre d'exemples de ces sondes ainsi que leur diversité ont explosé ces dernières années. Par hasard, la synthèse de nouveaux ligands à base de noyaux pyridazines, dont l'objectif premier n'était pas le suivant, a mis en lumière de nouvelles sondes potentiels pour l'ion Zn^{2+} . Sur base de ce constat, des recherches ont été menées afin d'étudier plus en détails le phénomène et de pousser un cran plus loin, le développement de nouvelles sondes fluorescentes sélectives, non-affectées par le pH et plus accessibles.

Ce mémoire se concentre donc sur la synthèse et l'étude des propriétés d'un nouveau type de sondes dites à activation pour l'ion Zn^{2+} à base de noyaux aromatiques pyridazines. D'abord, une voie de synthèse générale a été empruntée pour obtenir ces ligands faisant appel à une substitution nucléophile ou à une amination réductrice. Ensuite, les spectres d'absorption et d'émission de ces composés, ainsi que des complexes qu'ils pouvaient formés avec différents cations métalliques tel que Cd^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} ou Ni^{2+} , ont été relevés pour étudier la sélectivité de fluorescence. Finalement, quelques tests de sélectivité ont été réalisés afin d'évaluer le comportement des ligands en présence de plusieurs métaux simultanément et d'en mesurer la sélectivité vis-à-vis du cation Zn^{2+} .

Summary

For many years now, scientists have been trying to understand the mysteries surrounding the workings of the human body's mechanisms and the diseases that affect it. This understanding involves observing and quantifying everything that makes up its cells. Among all these components, metal cations, including Zn^{2+} , play various and extremely important roles, from muscle contraction to the proper functioning of an enzyme. Several techniques already exist to quantify zinc and one of the most practical to use directly in a biological environment are fluorescent probes because they allow continuous observation of the events occurring in a cell. These are governed both by the laws of photophysics, which dictate their behaviour in the presence of light through several mechanisms, and by the laws of supramolecular chemistry and coordination chemistry, which define their selectivity towards a specific cation on the basis of the interactions they can make or their structure. The number of examples of these probes as well as their diversity have exploded in recent years. By chance, the synthesis of new ligands based on pyridazine nuclei, whose primary objective was not the following, has brought to light new potential probes for the Zn^{2+} ion. On the basis of this finding, research was carried out in order to study the phenomenon in more detail and to take it one step further, the development of new fluorescent probes that are selective, unaffected by pH and more accessible.

Therefore, this thesis focuses on the synthesis and study of the properties of a new type of probes known as Zn^{2+} activation probes based on aromatic pyridazine nuclei. First, a general synthesis route was used to obtain these ligands using nucleophilic substitution subject or reductive amination. Then, the absorption and emission spectra of these compounds, as well as the complexes they could form with different metal cations such as Cd^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} or Ni^{2+} , were recorded to study the fluorescence selectivity. Finally, a few selectivity tests were performed to evaluate the behaviour of the ligands in the presence of several metals simultaneously and to measure their selectivity towards the Zn^{2+} cation.

Table des matières

I.	Introduction	11
1.	L'importance biologique des métaux dans le corps humain	11
1.1.	Généralités	11
1.2.	Familles et rôles des cations métalliques	11
2.	La photochimie et la photophysique ³¹	22
2.1.	Introduction	22
2.2.	L'absorption de la lumière	22
2.3.	Les règles de sélection	23
2.4.	La désexcitation de l'état excité	25
3.	Les sondes fluorescentes pour cations	27
3.1.	Historique et définition	27
3.2.	Structure d'une sonde fluorescente	28
3.3.	Mécanismes de fluorescence	29
3.4.	Sondes fluorescentes pour Zn ²⁺ <i>via</i> le PET	33
3.5.	Sondes fluorescentes pour Zn ²⁺ <i>via</i> le PCT	41
3.6.	Sondes fluorescentes pour Zn ²⁺ <i>via</i> le FRET	43
II.	Présentation et objectif du mémoire	46
III.	Résultats et discussions	49
1.	Synthèse des ligands	49
2.	Analyse spectroscopiques et fluorométriques	55
2.1.	Ligand tétrakispyridazine-éthylènediamine (L1)	58
2.2.	Ligand bispyridazinebispyridine-éthylènediamine (L3)	60
2.3.	Ligand tétrakispyridine-éthylènediamine (L5)	62
2.4.	Sélectivité du ligand L3	64
IV.	Conclusion et perspectives	66

Table des figures

Figure 1 : Réaction de Fenton.	13
Figure 2 : Site actif de la carboxyanhydrase II.....	14
Figure 3 : Régulateurs majeurs de l'homéostasie du zinc chez les bactéries Gram-négatives. Les protéines impliquées dans l'élimination du zinc sont en rouges, celles pour l'apport sont en bleus et les protéines chaperonnes sont en gris.	16
Figure 4 : Courbe dose-réponse pour les éléments trace métalliques essentiels potentiellement toxique (ETMPT) et les éléments trace métalliques non essentiels (ETM).	17
Figure 5 : Structure de la cobalamine.....	19
Figure 6 : Illustration schématique du principe de Franck-Condon du point de vue quantique (gauche) et classique (droite).	24
Figure 7 : Diagramme de Jablonski utilisé pour décrire les états fondamental et excités d'une molécule ainsi que les processus photophysiques.....	25
Figure 8 : Complexation de l'aluminium par le morin..	27
Figure 9 : Aspects principaux des senseurs fluorescents pour cations.....	29
Figure 10 : Mécanisme de transfert d'électron photoinduit d'une sonde fluorescente pour cations.....	30
Figure 11 : Déplacement de spectre de sondes PCT résultant de l'interaction entre un cation et des groupes électrodonneurs ou électroattracteurs.....	31
Figure 12 : Conditions du FRET.	32
Figure 13 : Mécanisme de Förster.....	33
Figure 14 : Détection de Zn^{2+} par ZP1.....	34
Figure 15 : Structure des sondes ZP2, ZP3, ZP4 et ZPP1.....	35
Figure 16 : Sondes développées par le groupe Nagano.	36
Figure 17 : Sondes développées par le groupe de Mikata.....	37
Figure 18 : Complexation d'un métal par la sonde cyclène-benzimidazole du groupe de Chuburu.....	38
Figure 19 : Complexation de Zn avec la sonde 1,4,8,11-tétraazacyclotétradécane- benzimidazole (haut), avec la sonde cyclène-azaxanthone (bas).	39
Figure 20 : Structures de sondes fluorescentes.	40
Figure 21 : Sonde à base de BODIPY développée par O'Halloran (gauche), différents stades du développement de la cellule (droite).	41
Figure 22 : Structure des sondes ratiométriques FuraZin, IndoZin, Zinbo-5, CZ1 et CZ2.....	42

Figure 23 : Changement de conformation des sondes génétiquement codées par complexation de Zn ²⁺	43
Figure 24 : Distribution hétérogène de Zn ²⁺ dans une cellule mammalienne.....	45
Figure 25 : Structures des complexes de fer à base de pyridazines étudiés par le groupe de Singleton.....	46
Figure 26 : Ligands précédemment synthétisés par le groupe de Singleton. ⁶⁵	47
Figure 27 : Nouveaux ligands à synthétiser.	47
Figure 28 : Schéma général de synthèse des ligands pyridines/pyridazines.....	49
Figure 29 : Schéma de synthèse du cycle pyridazine au départ de l'alcool furfurylique.	50
Figure 30 : Synthèse du 3-chlorométhylpyridazine au départ du 3-méthanolpyridazine via le chlorure de thionyl.	51
Figure 31 : Synthèse des N,N'-diméthylpyridine-diamine.....	51
Figure 32 : Synthèse du triacétoxyborohydrure de sodium.....	51
Figure 33 : Synthèse des ligands L1, L2, L3 et L4.	53
Figure 34 : Synthèse des ligands L5 et L6.	54
Figure 35 : Spectres d'absorption UV-visible des différents métaux en solution aqueuse de concentration 8.10 ⁻⁵ mol/L.	55
Figure 36 : Spectres d'absorption UV-visible des ligands L1, L3 et L5 en solution aqueuse de concentration 8.10 ⁻⁵ mol/L.	56
Figure 37 : Spectre d'émission des ligands L1, L3 et L5 en solution aqueuse de concentration 8.10 ⁻⁵ mol/L.....	56
Figure 38 : Photo d'échantillons de complexes L5-cation sous une lumière UV de 254 nm, de gauche à droite : L5, L5-Mg, L5-Ca, L5-Mn, L5-Fe, L5-Co, L5-Ni, L5-Cu, L5-Zn, L5-Cd, L5-Hg et L5-Pb.	57
Figure 39 : Spectres d'absorption UV-visible des complexes L1-cation en solution aqueuse de concentration de 8.10 ⁻⁵ mol/L.	58
Figure 40 : Spectres d'émission des complexes L1-cation en solution aqueuse de concentration 8.10 ⁻⁵ mol/L.	59
Figure 41 : Spectres d'absorption UV-visible des complexes L3-cation en solution aqueuse de concentration 8.10 ⁻⁵ mol/L.	60
Figure 42 : Spectres d'émission des complexes L3-cation en solution aqueuse de concentration 8.10 ⁻⁵ mol/L.	61
Figure 43 : Spectres d'absorption UV-visible des complexes L5-cation en solution aqueuse de concentration 8.10 ⁻⁵ mol/L.	62

Figure 44 : Spectres d'émission des complexes L5-cation en solution aqueuse de concentration 8.10^{-5} mol/L.	63
Figure 45 : Spectres d'émission des complexes L3-Zn (bleu), L3-Fe (orange), L3-Fe-Zn au temps zéro (gris) et L3-Fe-Zn après 1h (jaune) en solution aqueuse de concentration $6,67.10^{-5}$ mol/L.	64
Figure 46 : Spectres d'émission des complexes L3-Zn (bleu), L3-Cd (orange), L3-Cd-Zn au temps zéro (gris) et L3-Cd-Zn après 1h (jaune) en solution aqueuse de concentration $6,67.10^{-5}$ mol/L.	65

Liste des abréviations

°C	Degrés Celsius
¹H RMN	Résonance magnétique nucléaire du proton
¹³C RMN	Résonance magnétique nucléaire du carbone
A	Absorbance
ADN	Acide désoxyribonucléique
CFP	Cyan fluorescent protein
c	Centi
d	Chemin optique
DCF	Dichlorofluorescéine
DMF	Diméthylformamide
DPA	Di-2-picolylamine
E	Energie
EDTA	Ethylènediaminetétraacétique
ETM	Eléments de trace métalliques non-essentiels
ETMPT	Eléments de trace métalliques potentiellement toxiques
FRET	Förster resonance energy transfer
g	gramme
HOMO	Highest occupied molecular orbital
I	Intensité transmise
I_o	Intensité incidente
K_d	Constante de dissociation
L	Litre
LMCT	Ligand to metal charge transfer
LUMO	Lowest unoccupied molecular orbital
λ_{abs}	Longueur d'onde du maximum d'absorption
λ_{em}	Longueur d'onde du maximum d'émission
ROS	Reactive oxygen species
m	Milli ou mètre
M	Molaire
MLCT	Metal to ligand charge transfer
mol	Moles

μ	Micro
n	Nano
PCT	Photoinduced charge transfer
PET	Photoinduced electron transfer
pH	Potentiel hydrique
ppb	Part par milliards
S	Singulet
T	Triplet
TPEN	N,N,N',N'-tétrakis(2-pyridylméthyl)éthylènediamine
TQEN	N,N,N',N'-tétrakis(2-quinolylméthyl)éthylènediamine
UV	Ultra-violet
YFP	Yellow fluorescent protein
ZapCR	Zap Clover/Ruby
ZapCY	Zap Cyan/Yellow
ZapOC	Zap Orange/Cherry

I. Introduction

1. L'importance biologique des métaux dans le corps humain

1.1. Généralités

Depuis les débuts de la biologie et de la médecine, les scientifiques se démentent à comprendre le fonctionnement du corps humain et à en découvrir tous ses mystères. Les recherches ont été poussées par le développement de nouvelles techniques d'analyse (et inversement) et les ont progressivement menés vers la découverte des structures enzymatiques et des mécanismes de régulation du métabolisme. L'une des premières macromolécules biologiques caractérisée fut la double hélice d'ADN par Watson et Crick en 1953 grâce aux analyses cristallographiques aux rayons X développées par Rosalind Franklin.¹ Ce n'est que bien plus tard que les mécanismes liés à la réplication et la transcription de l'ADN ont été compris et ont permis d'y démontrer le rôle clé du magnésium. Il ne s'agit ici que d'un exemple parmi d'autres mais il avance l'hypothèse que la majeure partie des métaux présents en nous ont leur importance. Ce ne sera qu'en étudiant leur déplacement, leur stockage et leur régulation dans les êtres vivants que les chercheurs seront à même d'approcher un peu plus d'une meilleure compréhension de la vie. Parmi les techniques que l'homme a à sa disposition, les sondes fluorescentes sont des outils extrêmement utiles pour observer ces cations libres au niveau cellulaire et plus particulièrement ceux des métaux de transitions dont la concentration est plus faible que les autres mais dont le rôle est tout aussi essentiel.

1.2. Familles et rôles des cations métalliques

Toutes les formes de vie absorbent les éléments dans leur environnement pour leur développement et leur croissance. Parmi eux, on peut y retrouver les éléments clés des structures organiques tels que le carbone, l'hydrogène, l'oxygène, l'azote ou encore le soufre mais également des éléments catégorisés comme des métaux. Ceux-ci, bien que largement minoritaire comparée aux précédents cités, jouent un rôle important dans un nombre colossal de processus biologiques, incluant la régulation osmotique, la catalyse de réactions cellulaires, la régulation du métabolisme ou encore le transfert de signaux nerveux.

1.2.1. Les métaux des groupes I et II

Les métaux des groupes I et II, aussi appelés alcalins et alcalino-terreux tel que le sodium, le potassium, le calcium ou le magnésium, sont les plus abondants dans la plupart des organismes biologiques. Cette abondance biologique s'explique d'une part par leur nécessité

métabolique et la faculté qu'ont les organismes vivants a sélectionné ce qui leur faut dans leur environnement et d'autre part, par leur abondance naturelle.¹ Le rôle des ions des métaux des groupes I et II se situe majoritairement au niveau de la régulation osmotique, de la génération de potentiel d'action, entre d'autres termes, de la contraction des muscles et de la transmission de signaux. Dans ces différents phénomènes, leur méthode d'action reste relativement identique : la création d'un gradient de concentration de ces ions va générer un signal électrique qui sera transmis ou une différence de concentration qui va induire un déplacement d'eau.²

1.2.2. Les métaux de transition

Les métaux de transition reconnu comme jouant des rôles importants en biologie incluent le fer, le zinc, le cuivre, le manganèse, le cobalt, le nickel, le molybdène, le tungstène, le chrome et le vanadium.³ Ces éléments sont souvent référencé à l'état de trace car ils sont présents dans des quantités bien moindre que les métaux des groupes I et II, bien qu'il est important de noter que le fer et le zinc sont retrouvés en quantité importantes et de ce fait, leur caractérisation en tant qu'éléments retrouvés à l'état de trace est parfois incorrecte. L'abondance et les utilisations des métaux de transitions différent, entre autres, entre les différents règnes. Par exemple, les eucaryotes dédient une plus grande proportion de leur protéome au liaison avec le zinc que les bactéries ou les archées et inversement avec le fer, le manganèse et le cobalt.⁴ Pour ajouter plus de complexité, une nouvelle étude protéomique a suggéré que la distribution de tous les métaux utilisé par l'organisme est largement inconnue et il est possible qu'il y ait d'autres métaux de transition comme le cadmium, l'uranium, l'arsenic ou le plomb non-reconnu comme étant bénéfique pour l'organisme.⁵ Avant de déterminer l'utilisation de métaux par les organismes, l'inventaire des métaux doit donc être établi en mesurant leur quantité dans les cellules et tissus. Ceux-ci peuvent exister sous différentes formes dont les ions hydratés ou les cofacteurs dans les protéines La quantité total de métaux consiste donc en la somme de toutes ces diverses formes.

De plus, leur homéostasie dans les cellules doit être régulée et dans les cas anormaux, elle est liée à plusieurs maladies telles que les maladies neurodégénératives, le cancer et le diabète. Bien que leurs rôles exact dans ces pathologies ne sont pas toujours clairs, un nombre croissant d'affections ont été caractérisés par un non-équilibre d'ions métalliques. Dans un état malade, l'homéostasie métallique est souvent perturbé, provoquant un mauvais contrôle d'ions potentiellement toxique. Une accumulation anormale d'ions de métaux de transition tels que le cuivre, le fer ou le zinc a été observée dans cellules cérébrales de patients atteint de neurodégénérescence.⁶

a) Le fer

Le fer est le métal de transition le plus abondant dans le corps humain ; un humain adulte moyen en contient approximativement 3 à 5 g et la concentration cellulaire totale est d'environ 50-100 μM . Le fer est impliqué dans de nombreux processus du métabolisme, du transport d'électron et de la synthèse d'ADN. Dans la myoglobine et dans l'hémoglobine, le Fe^{2+} lié à un hème joue le rôle critique de cofacteur dans le transport de l'oxygène dans le corps. Il est également retrouvé dans les clusters fer-soufre de certaines protéines (l'aconitase) et dans certaines enzymes (le cytochrome P450 ou la ribonucléotide réductase). Le fer biologique existe exclusivement sous forme ferreux (Fe^{2+}) ou ferrique (Fe^{3+}) bien que d'autres étages d'oxydation soient possibles durant des cycles catalytiques.⁷

Les cellules doivent contrôler scrupuleusement la concentration, la distribution et la différenciation du fer ; en effet, la perturbation de la régulation du fer provoque des désordres biologiques tels que l'anémie, l'hémochromatose voire la maladie d'Alzheimer. De plus, le potentiel de réduction du cytosol favorise Fe^{2+} par rapport à Fe^{3+} mais l'ion Fe^{2+} libre peut participer à la réaction de Fenton (**Figure 1**) générant des espèces radicalaires nocives ; à ce titre, la concentration cellulaire en Fe^{2+} libre doit être maintenue au minimum.⁸

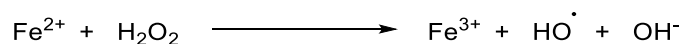


Figure 1 : Réaction de Fenton.

b) Le zinc (Zn^{2+})

Depuis donc la découverte du zinc comme élément essentiel au développement de l'être humain mais également de tous les autres êtres vivants et la découverte de la première enzyme activé par le zinc,⁹ de nombreuses recherches se sont penchées sur son effet sur les systèmes biologiques allant des effets sur l'organisme entier jusqu'aux détails thermodynamiques, cinétiques et structurelles des interactions protéines-zinc en passant par l'identification de protéines importantes liant le zinc.¹⁰ Le zinc (Zn^{2+}) est donc omniprésent chez tous les êtres vivants et est le second métal de transition le plus abondant dans le corps humain après le fer. Zn^{2+} ne réalise pas de réactions rédox dans l'environnement cellulaire et reste donc présent à l'étage d'oxydation +II. Les cellules mammaliennes séquestrent des hauts taux de zinc de l'environnement extracellulaire : la concentration moyenne de zinc dans une cellule mammalienne est de l'ordre de centaines de micromolaires, alors que la concentration de Zn^{2+} dans le plasma est d'approximativement 1-10 μM . La grande majorité du zinc est lié aux protéines, enzymes, métabolites et autres ligands de faible poids moléculaire de telle sorte que la concentration de Zn^{2+} libre dans la cellule est de l'ordre du picomolaire. Cette dernière concentration représente la disponibilité biologique du zinc pour les protéines nouvellement

synthétisées.¹¹ Les travaux menés par Andreini et *al.* ont montré que 9 % des protéines humaines nécessitent du zinc pour fonctionner correctement et que plus de 15 % des protéines encodées par le génome humain contiennent au moins un site de liaison pour Zn^{2+} , soulignant l'importance du zinc dans les systèmes biologiques.¹² De nombreuses enzymes emploient donc le zinc comme acide de Lewis tel que la carboxyanhydrase II, l'alcool dehydrogénase ou encore thermolysine.¹³

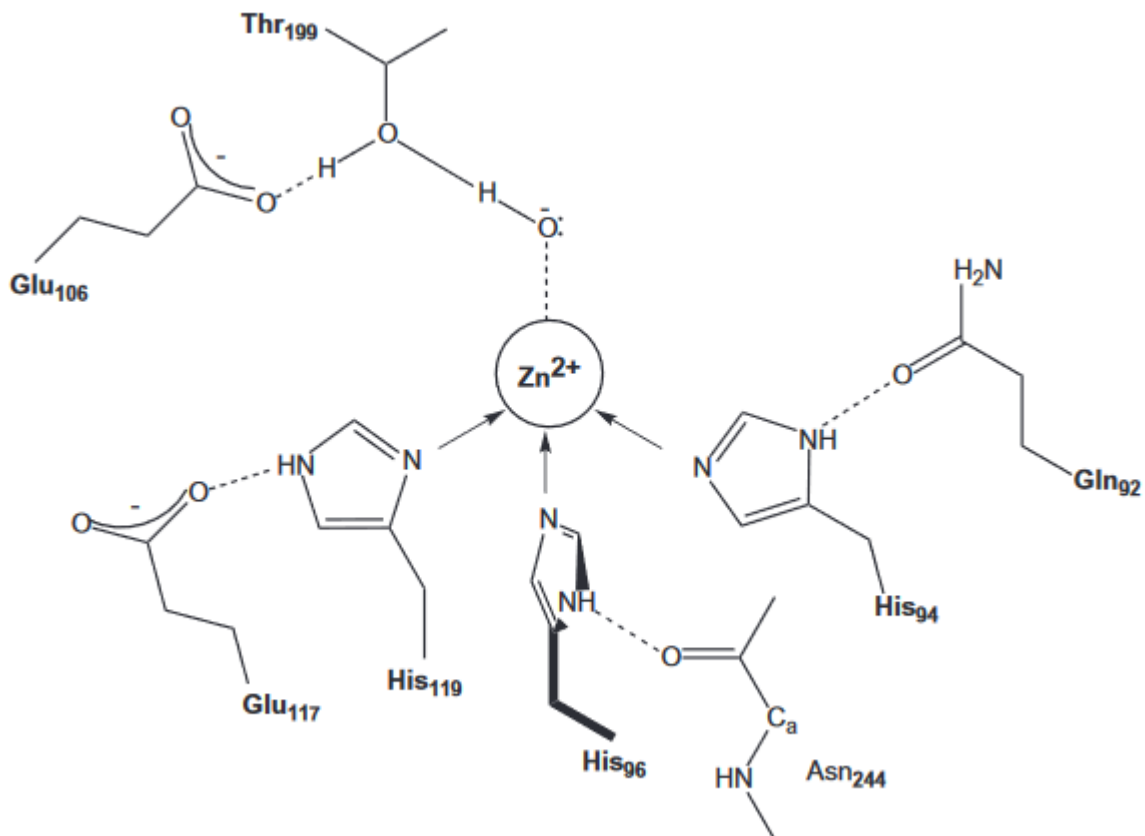


Figure 2 : Site actif de la carboxyanhydrase II.

Chez l'humain, la déficience en zinc affecte plus de 2 milliards d'individus autour du globe. Ses effets systémiques sont multiples et incluent un retard de croissance, une perte de poids, l'infertilité, des désordres mentaux et émotionnels, une fonction immunitaire affaiblie, des lésions épidermiques et la perte des cheveux. La reconnaissance la plus marquante de l'importance du zinc pour la santé humaine a été exprimée par le consensus de Copenhague en 2008,¹⁴ lequel a statué que fournir du zinc et de la vitamine A à plus de 100 millions d'enfants en conditions de malnutrition étaient leur priorité absolue pour avancer vers un bien-être global. Au-delà des conséquences dramatiques d'une déficience sévère en zinc, l'homéostasie de Zn^{2+} affecte le vieillissement, les maladies neurodégénératives - typiquement la maladie

d'Alzheimer- , le cancer - principalement celui de la prostate -, le système immunitaire et le métabolisme énergétique.¹⁰

Son importance crucial pour la santé humaine mise à part, le zinc joue également un rôle vital dans la physiologie des autres organismes. L'impact sur les plantes s'illustre par une augmentation de 600% de croissance par fertilisation de sols pauvres en zinc, déficience des sols qui pourrait contribuer à la déficience en zinc chez l'homme.¹⁵ De plus, la croissance du phytoplancton varie suivant la disponibilité du zinc qui n'est pas identique dans toutes les régions des océans avec des conséquences sur l'équilibre d'absorption du carbone.¹⁶ L'importance du zinc est moins bien comprise chez les bactéries mais au vu de la présence de systèmes spécifiques d'absorption du zinc et de leur réponse à une carence en zinc, ce cation métallique serait également un nutriment essentiel pour toutes les bactéries. La réduction de la disponibilité en zinc pendant la phase de réponse à une infection bactérienne vient confirmer cette hypothèse, d'autant plus que le zinc impacte la virulence de certains agents pathogènes. Influencer l'homéostasie du zinc offre donc des nouvelles voies pour la thérapie antimicrobienne, par exemple, l'inhibition de la virulence de l'anthrax par chélation de Zn^{2+} . *A contrario*, il a été montré que le Zn^{2+} libre est une toxine cellulaire d'une puissance assez inattendue, expliquant sa très faible concentration et soulignant l'importance et l'efficacité des mécanismes homéostatiques.¹⁷

Cette régulation du zinc dans les cellules va dépendre de l'abondance des transporteurs à l'endroit approprié et de la concentration en zinc disponible pour le transport. L'abondance des transporteurs (**Figure 3**) peut être régulée au niveau transcriptionnel par des facteurs de transcription ainsi qu'aux niveaux post-transcriptionnel et post-traductionnel mais l'activité des transporteurs peut également être modulée de façon allostérique par le Zn^{2+} . D'autre part, les eucaryotes synthétisent des métallothionéines, petites protéines riches en résidus cystéines dont les propriétés sont idéales pour tamponner la concentration en zinc intracellulaire.

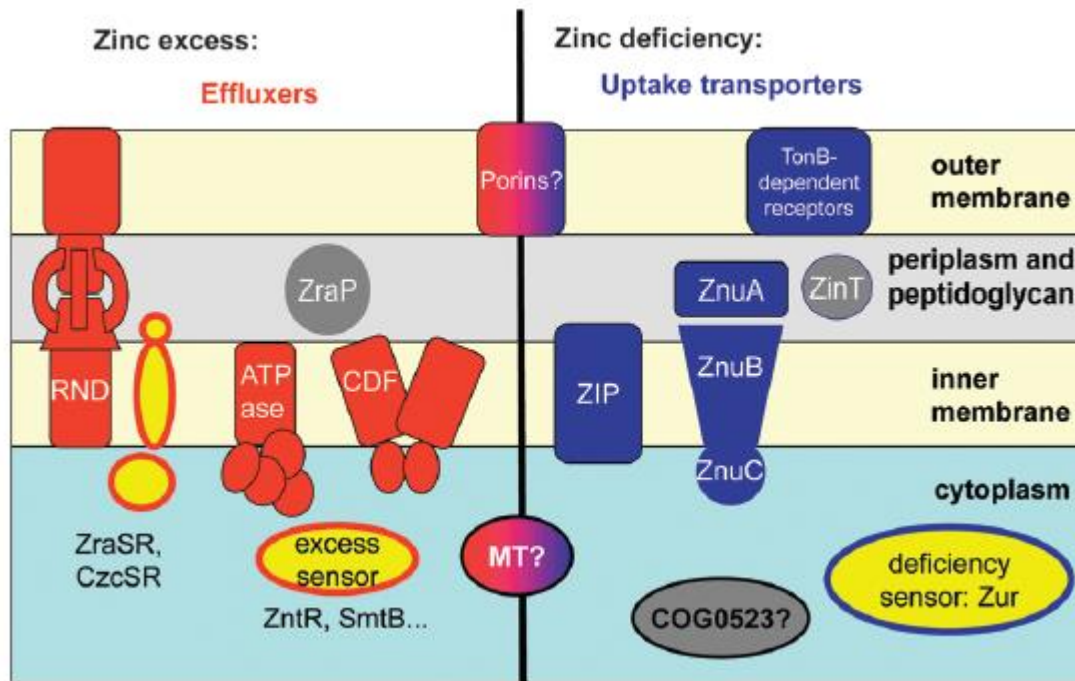


Figure 3 : Régulateurs majeurs de l'homéostasie du zinc chez les bactéries Gram-négatives. Les protéines impliquées dans l'élimination du zinc sont en rouges, celles pour l'apport sont en bleus et les protéines chaperonnes sont en gris.

En général, l'homéostasie des métaux est contrôlée par la cinétique mais plusieurs avancées dans le domaine ont montré par introduction d'étapes irréversibles que la thermodynamique des liaisons métal-ligands sont au cœur de cette homéostasie. De ce fait, une détermination précise des constantes d'affinité est exceptionnellement importante. En règle générale, les constantes de dissociation des protéines cytoplasmiques liés au zinc inférieur au nanomolaire doivent être approchés avec scepticisme car ces faibles affinités ne sont pas susceptibles d'être pertinentes en conditions habituelles. *A contrario*, des constantes de l'ordre du micro- au nanomolaire sont rencontrées dans les protéines liées au zinc extracellulaires aussi bien que dans les transporteurs membranaires. Ces règles concernent à la fois les enzymes et les protéines homéostatiques et posent la complexité des relations entre les paramètres thermodynamiques et cinétiques des interactions métal-ligands.¹⁰

c) Le cuivre

Le cuivre est un métal essentiel nutritif pour la plupart des formes de vie et il est le troisième métal de transition le plus abondant chez l'humain. Le cuivre sert de cofacteur structurel et catalytique pour beaucoup de protéines et d'enzymes incluant d'importants facteurs métaboliques tels que la cytochrome *c* oxydase et la superoxyde dismutase cuivre-zinc.¹⁸ Dans les systèmes biologiques, le cuivre apparaît communément à deux étages d'oxydation, soit oxydé (Cu^{2+}), soit réduit (Cu^+). On pense que Cu^+ est l'état d'oxydation

dominant du cuivre labile dans les cellules, où cette spéciation est largement attribuée à la fonction des réductases membranaires qui réduisent le Cu^{2+} extracellulaire avant l'entrée dans la cellule ainsi que l'environnement réducteur maintenu dans le cytosol.¹⁹

L'activité rédox du cuivre est critique pour plusieurs processus physiologiques clés ; cependant, une concentration de cuivre non régulée induit un stress oxydatif et de la toxicité dans les cellules. La toxicité est la mesure de la capacité d'une substance à provoquer des effets néfastes chez les êtres vivants (**Figure 4**), ou pour citer Paracelse : « Tout est poison, rien n'est poison, seule la dose fait le poison ».²⁰ Tout comme pour le zinc, la dérégulation de l'homéostasie est associée à plusieurs désordres neurodégénératifs : la sclérose latérale amyotrophique, la maladie d'Alzheimer, de Menkes (déficiency en cuivre), de Parkinson et de Wilson (excès de cuivre). La cellule doit donc maintenir une concentration et une spéciation optimales en cuivre par une fine régulation de l'entrée, la distribution, le stockage, la mobilité et le flux de cet ion. Une grande partie du cuivre cellulaire est lié avec une grande affinité à des protéines et le cuivre libre est tamponné par une pléthore de ligands qui minimise le cuivre libre.²¹

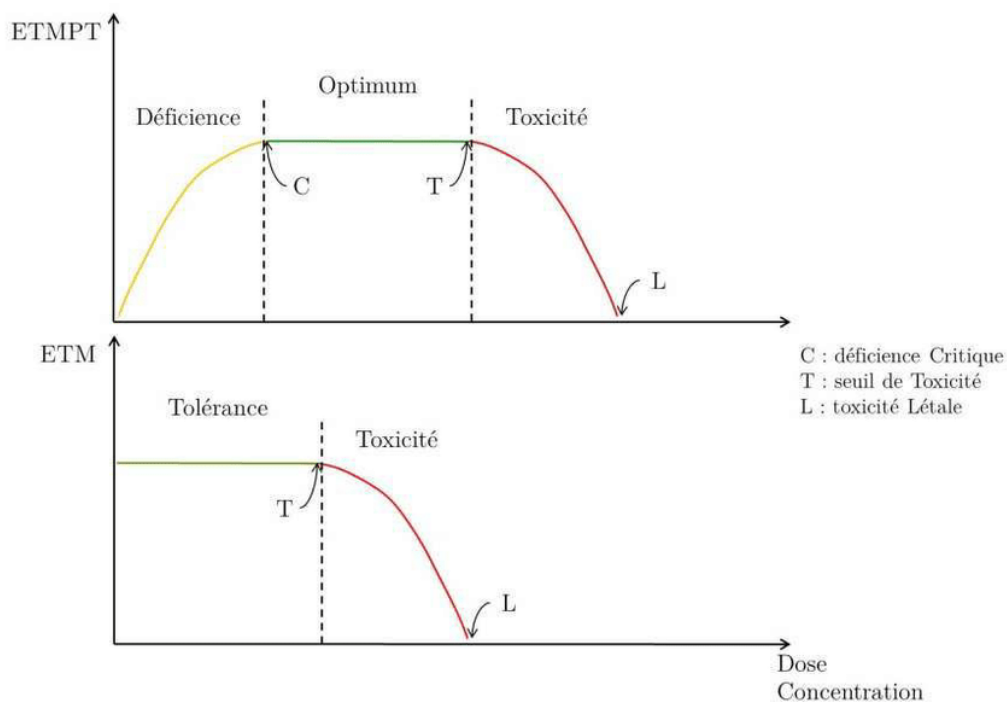


Figure 4 : Courbe dose-réponse pour les éléments trace métalliques essentiels potentiellement toxique (ETMPT) et les éléments trace métalliques non-essentiels (ETM).

d) Le manganèse (Mn^{2+})

Le manganèse est un élément des plus abondants dans la croûte terrestre et est un micronutriment essentiel aux trois règnes de la vie. Le manganèse est un cofacteur nécessaire

pour une variété de processus biologiques critiques tels que l'évolution de l'oxygène dans les chloroplastes, le maintien de l'équilibre rédox dans les mitochondries, la formation de désoxyribonucléotides, donc la création de blocs de construction essentiels pour la synthèse de l'ADN et plein d'autres transformations enzymatiques. En outre, de plus en plus de preuves tendent à montrer que le manganèse joue un rôle dans l'adaptation cellulaire face au stress oxydatif, le déplacement de vésicules dans les cellules mammaliennes et les fonctions neuronales.²²

Alors que le manganèse peut exister à beaucoup d'étages d'oxydation, la forme la plus abondante semble être le Mn^{2+} et comme pour les autres métaux, un excès de Mn^{2+} est toxique. L'un des sites primaires de sa toxicité chez l'humain est le cerveau ; son action, en tant qu'agent neurotoxique, est connue depuis près de 150 ans et une surcharge de manganèse fait apparaître des troubles neurologiques similaires à la maladie de Parkinson.²³

e) Autres

Le nickel est un cofacteur essentiel pour diverses enzymes qui jouent des rôles importants chez les bactéries et les plantes, particulièrement dans les métabolismes de l'énergie et de l'azote. Comparé aux autres métaux biologiques, le nickel se retrouve en bien plus faible concentration ; son utilisation est relativement répandue chez les microorganismes mais plus limitée chez les eucaryotes.²⁴

Le cobalt est un oligo-élément essentiel pour tous les organismes, cependant, il apparaît beaucoup moins fréquemment dans la nature que les autres métaux de transition. La forme biologique du cobalt, le Co^{2+} , est principalement trouvée dans les complexes métalliques corrinoides. Les motifs corrinoides sont des groupes protéiques ressemblant à la porphyrine, essentiels à la fonction biologique des métalloenzymes chez les bactéries et les eucaryotes. Les métalloenzymes associées au Co^{2+} catalysent les transferts d'électrons, la transméthylation et des réactions de réarrangements. Un exemple des plus notables est la vitamine B12, la cobalamine (**Figure 5**). Celle-ci est un coenzyme essentiel pour un large panel de processus métabolique aussi bien que pour la synthèse d'ADN.²⁵

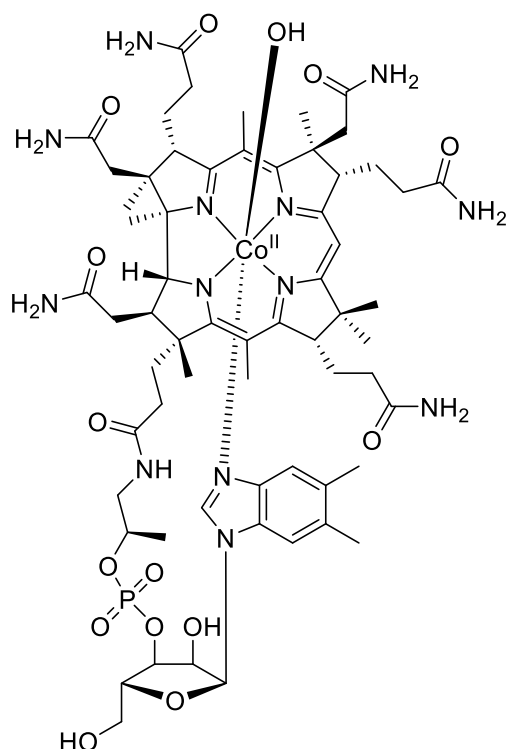


Figure 5 : Structure de la cobalamine.

Chez les animaux, le cobalt est requis pour former les globules rouges et pour la croissance, le développement et la maintenance du système nerveux. Cependant, tout comme les autres cations possédant une activité rédox, une concentration de Co^{2+} non-réglée est toxique pour la cellule. Sa toxicité survient par la génération d'espèce réactive oxygénée (ROS) mais plus couramment, elle est due à une compétition avec les métaux biologiquement essentiels. Chez l'être humain, sa toxicité est associée à des maladies et conditions variées tel que l'asthme allergique, la dermatite de contact, la pneumonie et parfois même le cancer.²⁶

1.2.3. Métaux lourds et toxiques

Le plomb présente un sérieux danger pour la santé car il est directement absorbé par les cellules hors de l'environnement et même à faibles concentrations (+- 15 ppb), il interfère avec de nombreux processus biologiques ce qui finalement résulte par de la toxicité. La préoccupation croissante des effets neurologiques, cardiovasculaires et reproductifs du Pb^{2+} chez l'homme a incité des investigations sur les molécules et les mécanismes responsables de cette toxicité. Ces études ont suggéré que Pb^{2+} est capable d'entrer dans les cellules par une variété de mécanismes incluant les voies de transport et d'assimilation des cations essentiels. Ainsi, Pb^{2+} interagit avec une protéine-hôte par imitation et compétition avec les effets physiologiques de métaux divalents, Ca^{2+} et Zn^{2+} . Quelques-uns des facteurs susceptibles d'influencer l'entrée de Pb^{2+} incluent les canaux ioniques « voltage-gated », canaux ioniques

« ligands-gated », calmoduline, protéine kinase C, calcineurine, protéine kinase II dépendante de Ca^{2+} /calmoduline et synaptotagmine.²⁷

Dans un même temps, le cadmium Cd^{2+} , également toxique, provoque des œdèmes pulmonaires, des dysfonctionnements rénaux et des maladies osseuses. Comme pour le Pb^{2+} , sa toxicité trouve sa source dans les interférences avec les processus biologiques du Ca^{2+} et de Zn^{2+} . Cd^{2+} provoque également des dommages oxydatifs par augmentation des espèces oxygénées réactives car il diminue le taux de glutathion et de protéines à base de thiols. Pour ces raisons et en conséquence de sa longue demi-vie (10-30 ans) d'élimination du corps humain, il a été classifié comme carcinogène, agent qui cause ou qui peut causer le cancer.²⁸

Concernant le mercure, la toxicité et les cibles biologiques de Hg^{2+} dépendent de sa composition chimique. Les méthylmercures sont facilement absorbés par le tube digestif humain, traversent la barrière encéphalique et attaquent le système nerveux central. En absence d'empoisonnement accidentel, la seule source connue d'exposition à des méthylmercures passe par la consommation de produits de la mer. Les problèmes neurologiques associés avec une intoxication aux méthylmercures sont nombreux et incluent des lésions cérébrales prénatales et cognitives, des troubles du mouvement, la perte de vision et d'audition et la mort. Le cas tragique de Karen Wetterhahn, décédée le 8 juin 1997 des suites d'une exposition au diméthylmercure, a démontré l'extrême toxicité de ce dernier.²⁹ Cette chimiste américaine travaillait sur les effets des métaux lourds sur la santé et l'influence du mercure sur la réparation de l'ADN et utilisait le diméthylmercure comme référence pour les analyses RMN. Le 14 août 1996, quelques gouttes de diméthylmercure ont traversé ses gants et pénétré sa peau, avec les conséquences qui suivirent. Le taux de diméthylmercure dans son sang s'élevait à 4 mg/L alors que sa toxicité est avérée au-delà de 200 $\mu\text{g/L}$. À la suite de cet accident, la communauté scientifique a remplacé le diméthylmercure par le tétraméthylsilane comme référence dans les analyses RMN. Aux niveaux moléculaires et cellulaires, les méthylmercures provoquent un stress oxydatif et la peroxydation des lipides, et il inhibe la division et la migration des neurones. Ils s'accumulent dans les astrocytes, empêchant l'absorption du glutamate et provoquent ainsi des lésions excitotoxiques aux neurones. En d'autres termes, une exposition au méthylmercure altère et détruit les neurones par hyperactivation de l'acide glutamique et de ses analogues. De son côté, le mercure inorganique Hg^{2+} cible les cellules de l'épithélium rénal causant nécroses tubulaires et protéinurie. C'est aussi une neurotoxine et il provoque des défaillances du système immunitaire.³⁰

Etant donné l'importance des cations et leur rôle au niveau biologique et afin de comprendre leur distribution dans la cellule, les sondes fluorescentes se révèlent être

d'excellents outils pour observer cette distribution. Il est important de noter que ces sondes n'ont accès qu'aux cations dits libres dans le cytosol ou dans les organites. En effet, il est peu probable que ces molécules arrivent à interagir avec les cations présents dans les enzymes et on ne peut donc quantifier que ceux-là exclusivement.

2. La photochimie et la photophysique³¹

2.1. Introduction

L'excitation par la lumière avec un photon d'énergie adaptée fait passer une molécule de son état fondamental à un état électroniquement excité. Cette excitation provoque des changements dans la structure électronique de la molécule de telle façon que chaque état excité possède sa propre structure électronique différente de celle de l'état fondamental. Puisque les propriétés physiques et chimiques d'une molécule dépendent de sa structure électronique, chaque état excité a ses propres propriétés physiques et chimiques.

L'état fondamental d'une molécule est impliqué dans les réactions chimiques conventionnelles, parfois appelées les réactions thermiques car elle nécessite de la chaleur pour se produire. L'état fondamental est également responsable du spectre d'absorption de la molécule et donc de sa couleur. Les états excités sont, quant à eux, responsables des processus de désactivation qui peuvent être chimiques (les réactions photochimiques) ou qui peuvent impliquer une perte d'énergie soit radiative (luminescence) ou non-radiative. Par conséquent, l'activation par la lumière ouvre de nouvelles possibilités en chimie et physique. En chimie, les états excités peuvent réagir différemment par rapport à l'état fondamental tandis qu'en physique, les états physiques possèdent des spectres d'absorbance différents mais peuvent également se désexciter par des processus photophysiques qui leur sont propres.

Pour déterminer la tendance qu'ont les molécules excitées à suivre tel ou tel processus de désexcitation ou de réaction (fluorescence, phosphorescence, réaction chimique ou autres), on définit le rendement quantique ϕ_i de ces processus. Le rendement quantique d'un processus est défini comme le nombre de molécules réalisant ce processus sur le nombre de photons absorbés par le réactif pendant un même intervalle de temps.

2.2. L'absorption de la lumière

L'interaction de la lumière avec un système moléculaire est généralement une interaction entre une molécule et un photon. L'absorption de lumière monochromatique par une substance se décrit par la loi de Beer-Lambert $I = I_0 \times 10^{-\varepsilon dc}$ qui lie l'intensité de la lumière transmise I à l'intensité de lumière incidente I_0 , le coefficient d'absorption molaire ε (en $M^{-1} \text{cm}^{-1}$), le chemin optique d (en cm) et la concentration molaire de la solution c . En pratique, les spectrophotomètres mesurent l'absorbance, $A = \log(I/I_0) = \varepsilon dc$. Le coefficient d'absorption molaire ε représente la capacité d'une substance à absorber la lumière et dépend de la longueur d'onde du rayonnement incident.

Cependant, pour qu'une molécule absorbe un photon, la condition nécessaire est que la variation d'énergie de la molécule et la fréquence la lumière doivent être liées par la relation de Bohr $h\nu = E_f - E_i$ où E_f et E_i sont respectivement les énergies de l'état excité et de l'état fondamental. De plus, il doit y avoir une interaction spécifique entre le champ électromagnétique du rayonnement et la molécule. Pour la plupart des molécules et des ions, le champ magnétique peut être ignoré car les transitions générées par le champ magnétique oscillant sont généralement beaucoup plus faible que les transitions entre le dipôle et le champ électrique.

2.3. Les règles de sélection

Si cette condition de compatibilité énergétique est respectée, la transition électronique peut se produire. Cependant, toutes les transitions ne se produisent pas mais des règles de sélection permettent de prédire l'intensité des transitions électroniques en se basant sur les termes de l'équation suivante : $TM = \int \phi_i \hat{\mu} \phi_f d\tau_e \int S_i S_f d\tau_s \int \theta_i \theta_f d\tau_N$.³² Le premier terme correspond au moment de transition électronique dont la valeur dépend de la symétrie et du recouvrement spatiale des orbitales initiales et finales. Le second est l'intégrale de recouvrement de spin dont la valeur dépend des états de spin initial et final de l'électron promu. Le troisième terme, l'intégrale de recouvrement des fonctions d'onde initiale et finale pour des vibrations nucléaires est la base du la mécanique quantique du principe de Franck-Condon.

Cette équation montre donc que le moment de transition peut être exprimé comme un produit de trois intégrales séparées que, suivant les approximations utilisées, sa valeur sera zéro si une seul des termes vaut zéro. Lorsque cela se produit, la transition est dite interdite, *a contrario*, lorsque le moment de transition est non-nul, la transition est dite permise. En pratique, à cause des approximations employées, les transitions interdites peuvent être observées mais avec des intensités bien moindres que les transitions permises.

Le moment de transition électronique, le premier terme de l'équation précédente, est lié à la symétrie des orbitales. En d'autres termes, les transitions permises sont celles qui se produisent entre des orbitales de même symétrie (*gerade* -> *gerade* ou *ungerade* -> *ungerade*) tandis que les transitions sont interdites lorsqu'elles se produisent entre deux orbitales de symétrie opposée (*gerade* -> *ungerade* ou *ungerade* -> *gerade*). En pratique, les transitions interdites par symétrie ont une intensité faible mais observable en raison de la faible séparabilité des fonctions électroniques et nucléaires (limite de l'approximation de Condon). Cela peut être traité comme une perturbation, appelé couplage vibronique. Dans ce cas, la transition acquiert

une certaine intensité car des vibrations de symétrie appropriée conduisent à un mélange de l'état excité « interdit » par un état « autorisé ».

L'effet du spin de l'électron sur les transitions est donné par le deuxième terme de l'équation. La transition a lieu s'il n'y a pas de changement de multiplicité de spin. Par conséquent, les transitions singulet \rightarrow singulet et triplet \rightarrow triplet sont autorisées. Cette règle de sélection de spin est valable dans la mesure où les fonctions spatiales des orbitales et fonctions de spin peuvent être séparées. Les écarts par rapport à cette approximation peuvent être traités en termes d'une perturbation appelée le couplage spin-orbite. Cette perturbation augmente à mesure que la masse des atomes impliqués augmentent. Ainsi, les transitions interdites dans les molécules organiques classiques sont en fait presque inobservables, alors que les transitions de spin interdites des complexes métalliques (par exemple, les complexes de métaux 5d avec des transitions de type MLCT) peuvent atteindre des intensités assez importantes.

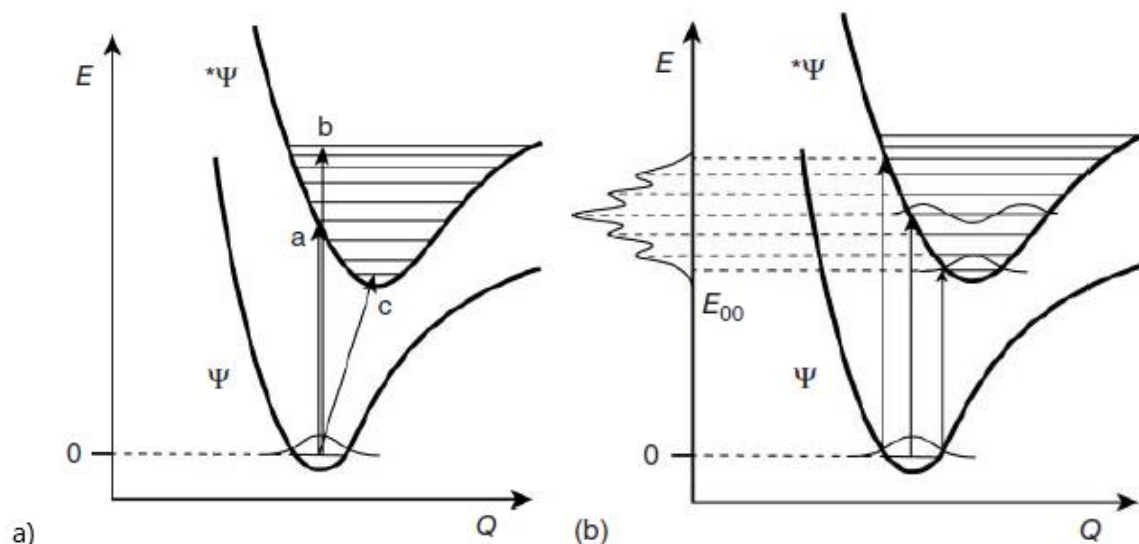


Figure 6 : Illustration schématique du principe de Franck-Condon du point de vue quantique (gauche) et classique (droite).

Le dernier terme de l'équation précédente est lié au principe de Franck-Condon. Ce principe est basé sur l'approximation que les transitions électroniques se produisent à une échelle de temps beaucoup plus rapide que le déplacement des atomes (approximation de Born-Oppenheimer), et donc que la probabilité de transition peut être calculée en considérant les atomes immobiles. Du point de vue « classique », la transition ne peut donc être représentée par la flèche verticale a (**Figure 6a**). La flèche b correspond à une transition qui impliquerait à une variation de l'énergie cinétique et la transition représentée par c induit un changement des positions des noyaux. Du point de vue de la mécanique quantique, il faut également tenir compte du recouvrement des surfaces d'énergies potentielles. La transition la plus probable

serait donc la transition verticale où le recouvrement vibrationnel est maximum. C'est le cas lorsque le niveau vibratoire de l'état excité intercepte la surface d'énergie potentielle de l'état excité à l'équilibre géométrie de l'état fondamental (**Figure 6b**).

2.4. La désexcitation de l'état excité

2.4.1. Diagramme de Jablonski

Les états électroniques excités doivent se désexciter dans un court laps de temps. Cette désexcitation peut se produire par un retour à l'état fondamental de la molécule (processus photophysiques) ou par la formation de nouvelles espèces (processus photochimiques). Les processus photophysiques, incluant l'absorption de lumière, sont communément réunis dans le diagramme de Jablonski (**Figure 7**). Dans ce diagramme, on considère l'état fondamental est un singulet, ce qui est très souvent le cas pour les molécules organiques. Les phénomènes décrits par le diagramme de Jablonski impliquent des changements d'énergie et se déroule au cours du temps.

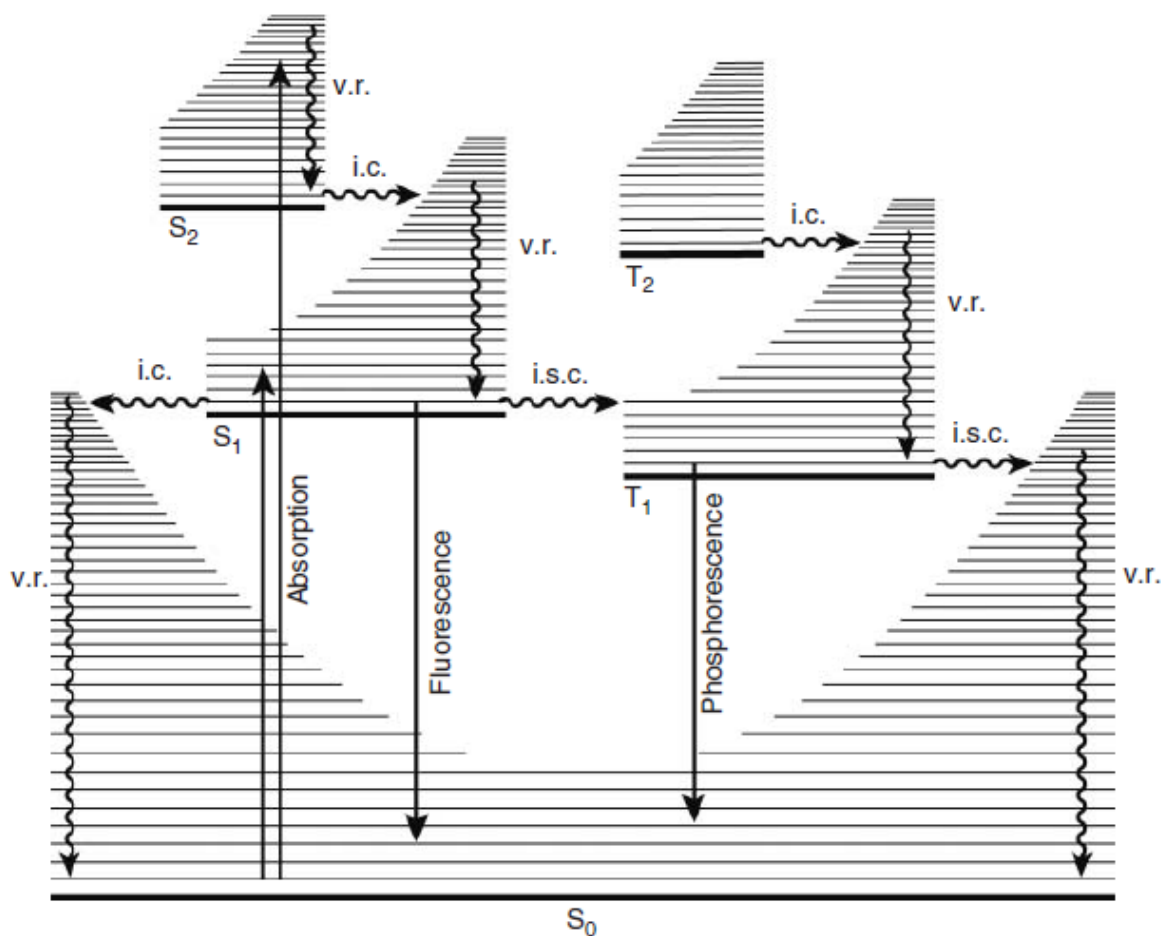


Figure 7 : Diagramme de Jablonski, utilisé pour décrire les états fondamental et excités d'une molécule ainsi que les processus photophysiques.

2.4.2. Désexcitation non-radiative

Les transitions non-radiatives se produisent entre des niveaux vibrationnels isoénergétiques d'états électroniques différents (**Figure 6**). Ces transitions sont des processus souvent irréversibles parce qu'ils sont associés à une augmentation de l'entropie et que la relaxation vibrationnelle, qui les suit, est extrêmement rapide. Parmi ces désexcitations, on retrouve la conversion interne au sein de chaque variété d'états excités pour n'importe quelle multiplicité donnée. Ce phénomène se déroule extrêmement rapidement (de l'ordre de la picoseconde). On retrouve également l'*intersystem crossing* entre les états excités de multiplicité de spin différente, dont la vitesse est de l'ordre de la nanoseconde. Finalement, les désexcitations non-radiatives de l'état excité le plus bas en énergie de n'importe quelle multiplicité à l'état fondamental sont beaucoup plus lentes.

2.4.3. Désexcitation radiative

Dans certains cas, après irradiation sous une lumière de fréquence correspondante à la transition, une espèce excitée peut réaliser une désexcitation vers l'état fondamental par émission d'un photon. Cette émission n'est habituellement observée que de l'état excité le plus bas en énergie vers l'état fondamental. La fluorescence et la phosphorescence sont typiquement les deux types de désexcitations radiatives que l'on va retrouver. Le phénomène de fluorescence consiste en une désexcitation depuis l'état S_1 vers l'état fondamental S_0 . Tandis que la phosphorescence s'accompagne d'abord d'un *intersystem crossing* permettant de passer de l'état S_1 à l'état T_1 . La transition T_1 vers S_0 étant beaucoup plus lente, la caractéristique principale permettant de différencier la fluorescence de la phosphorescence reste le temps de luminescence, souvent beaucoup plus long dans le cas de la phosphorescence.

3. Les sondes fluorescentes pour cations

3.1. Historique et définition

Le premier senseur fluorescent fut découvert par Goppelsröder en 1867 et permettait de détecter le cation Al^{3+} par formation d'un chélate Al-morin extrêmement fluorescent (**Figure 8**). Cela a mené au développement de nombreuses sondes fluorescentes pour de nombreux autres ions métalliques au cours des décennies qui suivirent, marquant en partie la naissance de la chimie analytique tel que nous la connaissons aujourd'hui. Les premiers senseurs se concentraient principalement sur les cations plutôt que sur les anions ou les espèces neutres. La raison de cette « spécification » provient de la grande facilité qu'ont les cations à se lier sélectivement dans l'eau, contrairement aux anions et aux espèces neutres. Cependant, plus récemment et depuis les années 1980, les travaux de Silva et Czarnik ont fait exploser la croissance et le développement dans ces domaines de recherche. Les sondes fluorescentes ont été intensément développées et leurs applications ont été largement étendues à de nombreux analytes biologiques. En particulier, le développement des senseurs pour les cations, anions, les molécules neutres et même les macromolécules biologiques s'est accéléré avec les avancées en matière d'imagerie microscopique.³³

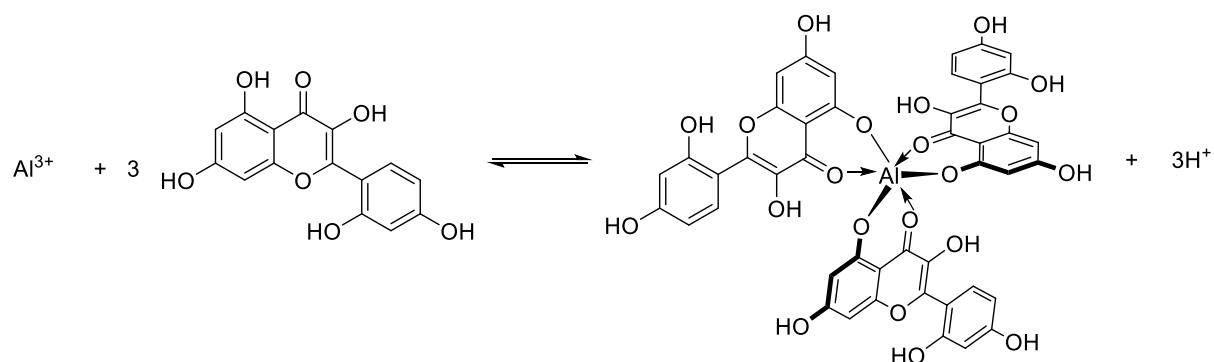


Figure 8 : Complexation de l'aluminium par le morin..

Les sondes chimiques fluorescentes ont été donc développées pour être des outils utiles pour détecter et suivre *in vitro* et *in vivo* des espèces biologiquement importantes tels que les cations métalliques et les anions grâce à la simplicité et la grande sensibilité des tests fluorescents. Typiquement, les composés intégrant un récepteur (site de reconnaissance), un fluorophore qui traduit cette reconnaissance en un signal lumineux, et un moyen de communication entre les deux sont appelés des sondes chimiques fluorescentes. De ce fait, une sonde chimique fluorescente doit posséder 2 propriétés essentielles : premièrement, l'affinité du récepteur pour sa cible doit être la plus élevée possible, ce qu'on appelle la sélectivité de liaison pour d'une part, complexer uniquement le cation désiré et d'autre part, complexer la

totalité de ce cation et limiter les échanges, en d'autres termes, la constante d'affinité entre le ligand et le cation doit être la plus élevée possible ; et deuxièmement, le signal de fluorescence doit être le moins possible sensible aux les interférences environnementales, ce qu'on appelle la sélectivité du signal. En d'autres termes, il faut donc éviter les effets du photoblanchiment, de la concentration de la sonde, de l'environnement où se passe la mesure (le pH, la température, la polarité et autres) et s'assurer de sa stabilité à la lumière.³⁴

3.2. Structure d'une sonde fluorescente

Les senseurs fluorescents sont composés d'un fluorophore lié à un ionophore (site de reconnaissance) et sont donc aussi appelés fluoro-ionophores (**Figure 9**). Dans la conception de ces senseurs, l'attention doit être portée à la fois sur le site de reconnaissance et sur le site de fluorescence. Ce dernier agit comme un transducteur de signal : il convertit l'information (la reconnaissance d'un analyte) en un signal optique exprimé suivant les changements des caractéristiques photophysiques du fluorophore. Ces changements sont dus à la perturbation des processus photoinduits tel que les transferts d'électrons, les transferts de charge, les transferts d'énergie ou la formation/disparition d'excimères ou d'exciplexes. Ces aspects relèvent du domaine de la photophysique.

L'ionophore, quant à lui, est responsable de la sélectivité et de l'efficacité de ses liaisons qui dépendent de la topologie du ligand, des caractéristiques du cation (rayon ionique, charge, nombre de coordination, dureté, etc.) et de la nature du solvant (pH, force ionique dans le cas de solution aqueuse). Ces aspects relèvent du domaine de la chimie supramoléculaire. Il est important de noter que le fluorophore et l'ionophore sont ensemble connectées *via* un espaceur ou pas. Dans ce dernier cas, plusieurs atomes du fluorophore participent également à la complexation du cation. Dès lors, la sélectivité résulte la structure complète de la sonde impliquant l'ionophore et le fluorophore.³⁵

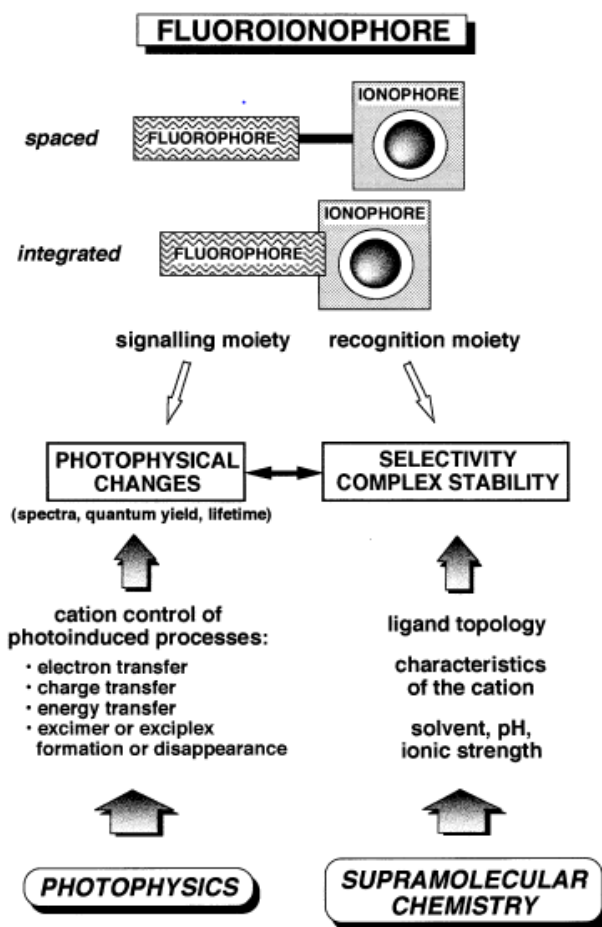


Figure 9 : Aspects principaux des senseurs fluorescents pour cations.

3.3. Mécanismes de fluorescence

3.3.1. La fluorescence par transfert d'électrons photoinduit (PET)

Lors de l'excitation du fluorophore, un électron de sa HOMO (highest occupied molecular orbital) gagne suffisamment d'énergie pour atteindre la LUMO (lowest unoccupied molecular orbital), ce qui entraîne un transfert d'électron photoinduit venant de la HOMO de l'ionophore provoquant l'inhibition de la fluorescence. Lorsqu'un cation vient se lier à l'ionophore, son potentiel rédox augmente de sorte que l'énergie de sa HOMO diminue et devient plus faible que celle de la HOMO du fluorophore. En conséquence, le transfert d'électron photoinduit n'est plus possible et l'inhibition de la fluorescence est supprimée. En d'autres termes, l'intensité de la fluorescence augmente avec la complexation d'un cation (**Figure 10**). Souvent, un espaceur ou connecteur sépare le fluorophore du récepteur et dans ce cas-là, la longueur de cet espaceur, qui garantit la meilleure efficacité du PET, est de moins de 3 atomes de carbone.³⁶ Cependant, cela dépend du système : en 1984, dans le cadre de la théorie

de Marcus, Closs et Miller ont montré que les transferts électroniques intramoléculaires étaient possibles entre de noyaux aromatiques espacés d'une dizaine d'atomes.³⁷

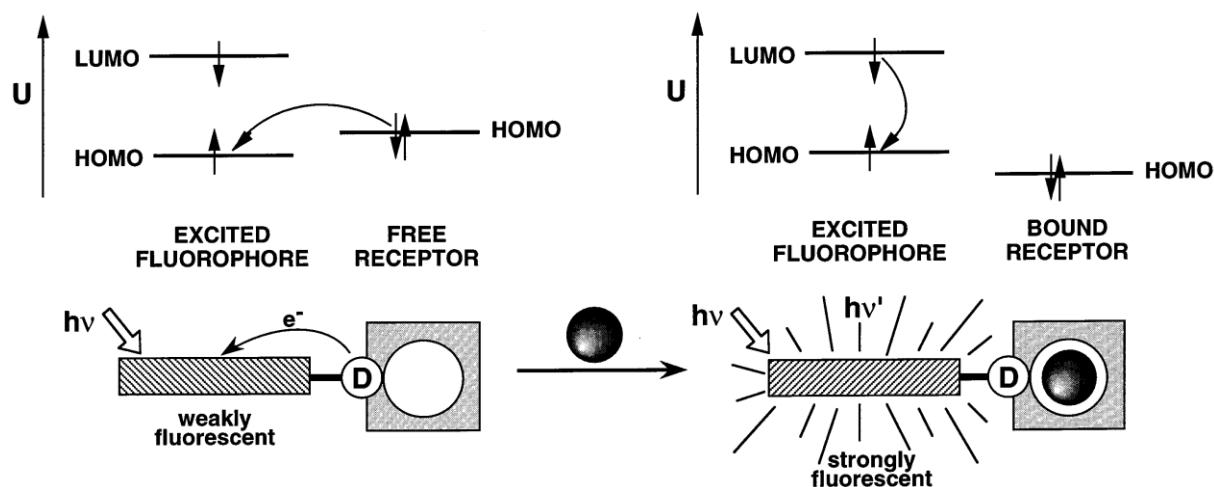


Figure 10 : Mécanisme de transfert d'électron photoinduit d'une sonde fluorescente pour cations.

Dans la plupart des capteurs PET, le récepteur cationique implique des amines aliphatiques ou aromatiques agissant comme inhibiteurs. En effet, on a depuis longtemps découvert que le PET peut avoir lieu des groupes amines aux hydrocarbures aromatiques, provoquant ainsi une inhibition de la fluorescence. La plupart des senseurs fluorescents PET sont basés sur ce schéma, mais d'autres mécanismes PET peut avoir lieu avec des ions de métaux de transition. En fait, chez les métaux de transition, le transfert d'électrons peuvent se produire du fluorophore à la liaison ion métallique par les phénomènes appelées MLCT et LMCT. Dans certains cas, l'échange d'électrons est possible, ce qui entraîne dans l'inhibition du fluorophore par transfert d'énergie non radiatif selon le mécanisme de Dexter.³⁸

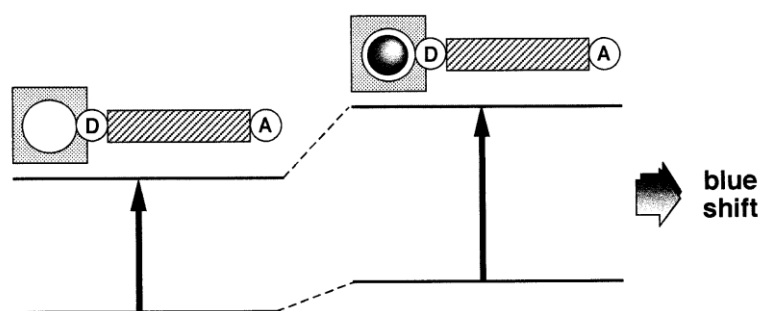
Dans le cas de Zn^{2+} , la plupart des sondes de type PET le détectent par une augmentation de l'intensité du signal lumineux et de ce fait, sont parfois associées aux sondes dites à activation. Cependant, des mesures ratiométriques, c'est-à-dire, l'observation de variations du rapport d'intensité d'absorption ou d'émission à 2 longueurs d'onde, ou plus simplement, l'observation d'une modification du maximum d'absorption ou d'émission, serait plus favorable pour augmenter la sélectivité du signal.³⁴

3.3.2. La fluorescence par transfert de charge photoinduit (PCT)

Lorsqu'un fluorophore contient un groupe donneur d'électrons (souvent un groupe amine) conjugué à un groupe attracteur d'électrons, il se produit un transfert de charge intramoléculaire du donneur à l'accepteur lors de l'excitation à la lumière (**Figure 11**). Lorsqu'un groupe (comme un groupe amine) jouant le rôle de donneur d'électrons au sein du fluorophore interagit avec un cation, ce dernier réduit le caractère électrodonneur de ce groupe

; en raison de la réduction de conjugaison qui en résulte, un décalage vers le bleu du spectre d'absorption est attendu avec une diminution de l'extinction coefficient. Inversement, un cation interagissant avec le groupe accepteur améliore le caractère électroattracteur de ce groupe ; le spectre d'absorption est donc décalé vers le rouge et le coefficient d'absorption molaire est augmenté. Les spectres de fluorescence sont en principe décalés dans le même sens que ceux d'absorption. De plus, des variations dans les rendements quantiques et les durées de vie sont souvent observé. Tous ces effets photophysiques dépendent évidemment de la charge et la taille du cation. De ce fait, ces sondes sont associées aux sondes dites ratiométriques.³⁹

● **Interaction with the donor group**



● **Interaction with the acceptor group**

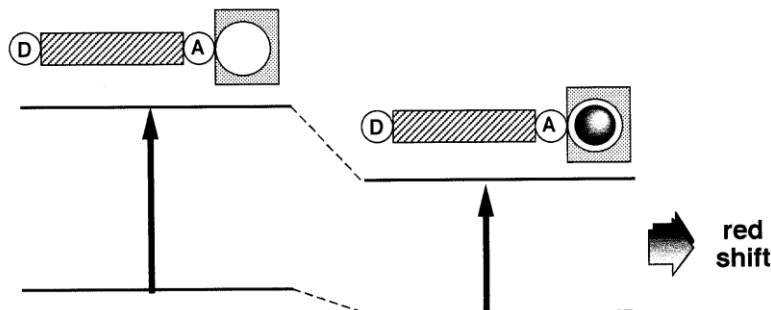


Figure 11 : Déplacement de spectre de sondes PCT résultant de l'interaction entre un cation et des groupes électrodonneurs ou électroattracteurs.

Les changements photophysiques lors de la liaison cationique peuvent également être décrits en termes d'interaction dipolaire. Considérons uniquement le cas où le moment dipolaire dans l'état excité est plus grand que celui dans l'état fondamental. Ensuite, lorsque le cation interagit avec le groupe donneur, l'état excité est plus fortement déstabilisé par le cation que l'état fondamental, et un décalage vers le bleu des spectres d'absorption et d'émission est attendu. Inversement, lorsque le cation interagit avec le groupe accepteur, l'état excité est plus stabilisé par le cation que l'état fondamental, ce qui conduit à un décalage vers le rouge des spectres d'absorption et d'émission.⁴⁰ Par exemple, la coordination de Zn^{2+} par des dérivés quinoléines peut induire un signal fluorescent ratiométrique déplacé vers le rouge.

Il convient de mentionner que la combinaison des mécanismes PET et PCT dans la conception de chimiocepteurs fluorescents serait utile, car une augmentation de l'intensité de fluorescence à longueur d'onde également modifiée amplifiera davantage l'observation de l'événement de reconnaissance du cation.³⁵

3.3.3. La fluorescence par FRET (Förster Resonance Energy Transfer)

Les précédents mécanismes de fluorescence sont les plus courants chez les sondes que l'on pourrait qualifier de synthétiques mais il existe également des sondes codées par une séquence d'acides nucléiques introduites dans la cellule par transfection transitoire ou transduction virale et synthétisées par la cellule. Dans ce cas-ci, elles sont appelées sondes génétiquement codées. Ces senseurs contiennent une ou plusieurs protéines fluorescentes comme fluorophore ainsi qu'un fragment protéique servant de site de liaison au métal. Pour les capteurs contenant une protéine fluorescente, la complexation du métal induit une modification de l'environnement chimique ou électronique autour du chromophore provoquant une variation de l'intensité ou un déplacement dans le spectre d'absorption ou d'émission. Les senseurs contenant deux protéines fluorescentes exploitent le principe du FRET.

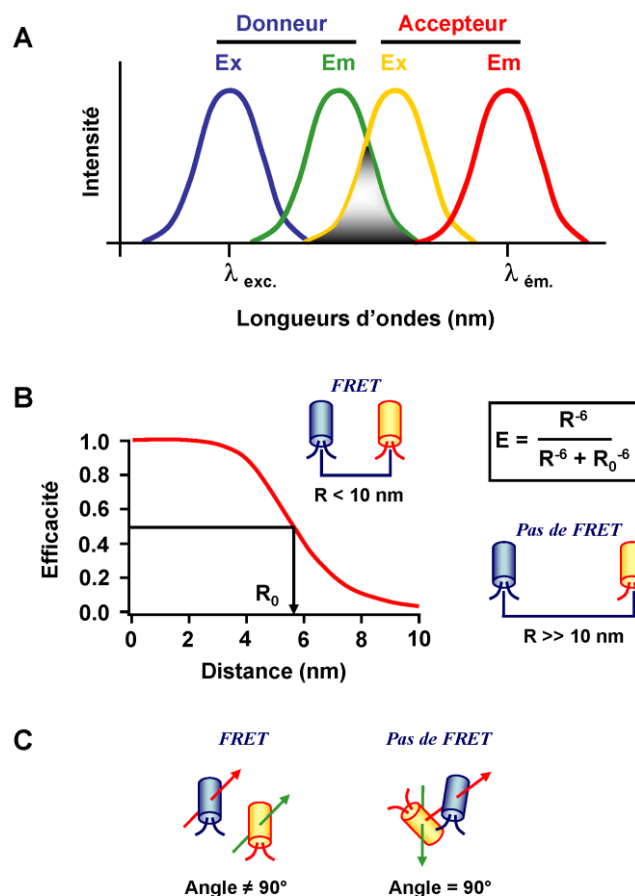


Figure 12 : Conditions du FRET.

Selon Förster, le FRET est défini comme un transfert d'énergie non-radiatif entre deux molécules (donneur et accepteur d'énergie) par interaction dipôle-dipôle (**Figure 12**). Ce phénomène nécessite une compatibilité énergétique entre ces molécules, en d'autres termes, le spectre d'émission du donneur doit recouvrir le spectre d'absorption de l'accepteur. De plus, le FRET est un processus qui dépend de la distance entre les deux molécules. Le plus souvent, la complexation du métal induit un changement conformationnel de la structure protéique favorisant ou perturbant ainsi le FRET entre les deux fluorophores.⁴¹

Expérimentalement, les chercheurs excitent le chromophore donneur d'énergie qui va transmettre une partie de son énergie par FRET et une émission de lumière due à l'autre chromophore est observé ainsi qu'une diminution de l'intensité de fluorescence du premier fluorophore (**Figure 13**). La nature ratiométrique de ces capteurs signifie qu'ils permettent des quantifications plus précises des concentrations de métaux que les sondes dites à activation.⁴¹

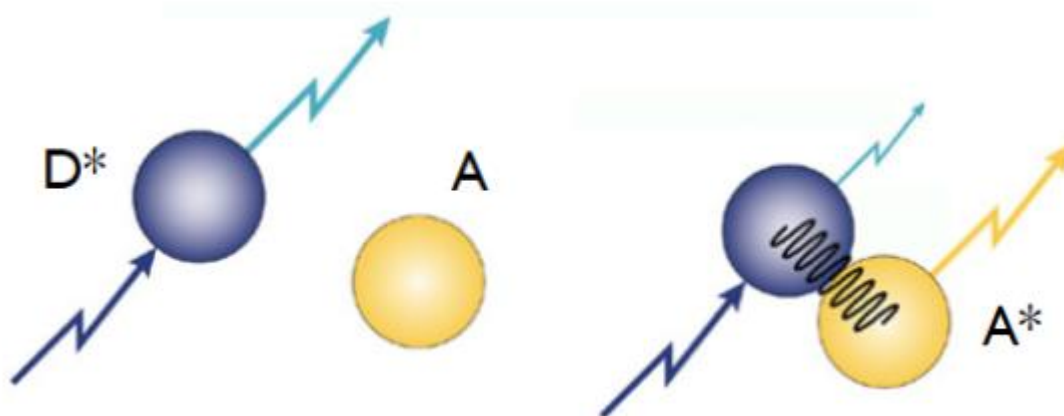


Figure 13 : Mécanisme de Förster.

Les sondes génétiquement codées ne sont pas les seules à utiliser le FRET comme moyen de détection. Le groupe du Prof. Gunnlaugsson a développé un complexe d'ytterbium supporté sur des nanoparticules d'or sensible au pH. A pH 7,4, l'ytterbium est complexé par le ligand et deux molécules d'eau ; ce complexe n'est pas fluorescent. Cependant, en additionnant du xylénol orange, un pic d'émission caractéristique du Yb^{III} apparaît entre 900 et 1100 nm lors de l'excitation du xylénol à 580 nm confirmant la formation d'une structure tertiaire entre le xylénol orange et le complexe d'ytterbium et le transfert d'énergie.⁴⁰

3.4. Sondes fluorescentes pour Zn²⁺ via le PET

La grande majorité des sondes synthétiques pour Zn²⁺ fonctionne suivant le phénomène de PET entraînant une modification de l'intensité de la fluorescence lors de la complexation du cation Zn²⁺. La manipulation du fluorophore et de l'ionophore peut influencer l'efficacité du

PET, affectant la luminosité de la sonde avec et sans métal complexé et donc l'amplitude du changement de fluorescence lors de la complexation de Zn^{2+} . Typiquement, cela peut être accompli par l'incorporation de groupes électro-capteur ou l'altération du connecteur entre l'ionophore.

3.4.1. Sondes à base de fluorescéine

La fluorescéine, ou uranine, est l'une des molécules les plus remarquables quand on parle de fluorescence. D'une part, son coefficient d'extinction molaire à sa longueur d'onde d'excitation (488 nm) est élevé (environ $80000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) lui permettant d'absorber un grand nombre de photons. D'autre part, son rendement quantique de fluorescence s'approche de la valeur de 1 ($\phi_f = 0,85$) lui permettant de réémettre près de 85% des photons qu'elle a absorbés à une longueur d'onde de 515 nm. En conclusion, son rendement quantique élevé, son coefficient d'extinction molaire élevé et ses faibles énergies d'excitation et d'émission adaptées à l'imagerie *in vivo* ont fait de la fluorescéine un outil indispensable aux développements des senseurs à Zn^{2+} . L'une des plus grandes familles de sondes à base de fluorescéine sont les Zinpyr ou famille ZP. Au cours des dernières décennies, cette famille a subi des améliorations de ces propriétés photophysiques, chimiques et thermodynamiques. La première itération de ces sondes fut ZP1, combinaison de 2 groupes di-2-picolylamine (DPA) comme récepteur et la dichlorofluorescéine (DCF) comme fluorophore (**Figure 14**).⁴² Un ratio 1:2 ligand- Zn^{2+} est observé à cause des 2 groupes DPA.

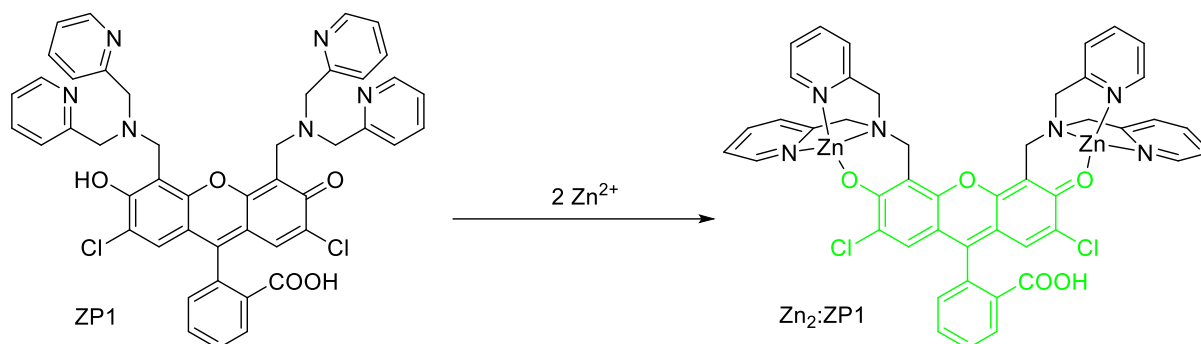


Figure 14 : Détection de Zn^{2+} par ZP1.

Peu après furent développés plusieurs dérivés dont l'objectif était d'optimiser ou d'étudier un paramètre dans la détection du zinc : ZP2 pour développer une méthode de synthèse plus générale de ce type de senseurs,⁴³ ZP3 pour contrôler la sensibilité au pH,⁴⁴ ZP4 qui forme des complexes mononucléaire avec Zn^{2+} ,⁴⁵ ou encore ZPP1 où une pyridine de chaque groupe DPA est remplacée par une pyrazine diminuant la fluorescence résiduel et accentuant l'observation de l'augmentation de l'intensité comparé à son analogue ZP1 (**Figure 15**).⁴⁶

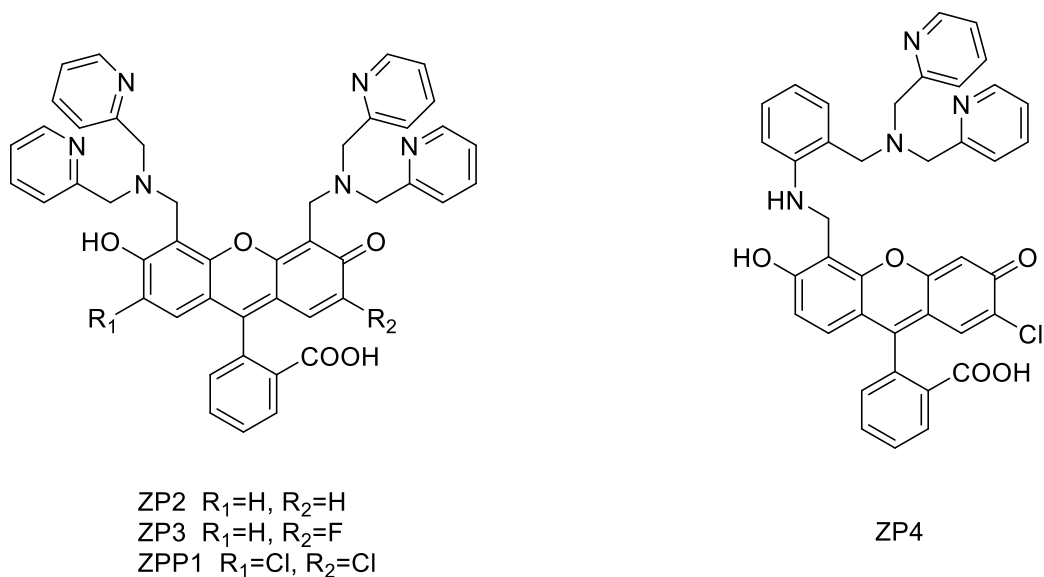


Figure 15 : Structure des sondes ZP2, ZP3, ZP4 et ZPP1.

Parallèlement au développement de la famille ZP, le laboratoire de Nagano a développé d'autres capteurs à base de fluorescéine. Un problème avec les premiers capteurs ZP était la fluorescence en l'absence de complexation de Zn^{2+} , en raison de l'extinction incomplète du fluorophore par le PET. Afin de réduire cet effet, le groupe chélatant DPA a été attaché à diverses positions de la partie acide benzoïque. Leur première génération de sondes, ZnAF-1 et ZnAF-2, présentait un faible rendement quantique en absence de Zn^{2+} , une réponse intense au Zn^{2+} et une valeur de pK_a de 6,2 pour le phénol du fluorophore. Afin de diminuer la fluorescence résiduel en absence de Zn^{2+} et de diminuer le pK_a , le groupe développa deux dérivés de leurs sondes précédentes par substitution de fluor en position *ortho* des groupes phénols, ZnAF-1F et ZnAF-2F. Les rendement quantiques en absence de Zn^{2+} étaient alors encore plus faible qu'avant et la réponse au Zn^{2+} plus intense tandis que la présence des fluors rendait leurs sondes stable dans des conditions légèrement acides (**Figure 16**).⁴⁷

Beaucoup d'autres détecteurs pour Zn^{2+} à base de fluorescéine existent. Certaines ont été développés sur base de sondes existantes pour Ca^{2+} comme la FluoZin-3. Cette dernière a une grande affinité pour Zn^{2+} , est perméable aux membranes et a été utilisé dans des centaines de publications.⁴¹

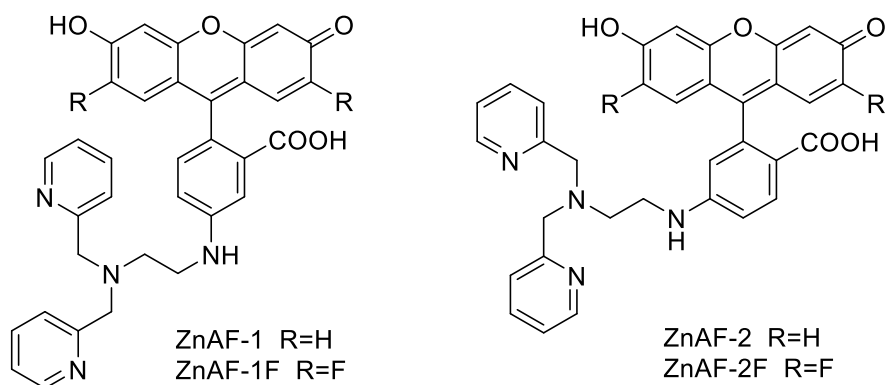


Figure 16 : Sondes développées par le groupe Nagano.

3.4.2. Dérivées de TPEN et de TQEN

Un ligand largement utilisé comme complexant pour les métaux de transition et les lanthanides est le N,N,N',N'-tétrakis(2-pyridylméthyl)éthylènediamine (TPEN) (**Figure 17**). Les structures cristallines ont été étudiées pour les complexes de ce ligand avec Zn^{2+} , Fe^{2+} , Ru^{2+} , Co^{3+} , ReO^{4+} , Tl^{3+} , La^{3+} et d'autres. Dans ces complexes, la haute affinité de ce ligand résulte de la géométrie octaédrique générée par les six azotes du TPEN. Contrairement à l'EDTA, la neutralité du TPEN lui permet de traverser les parois cellulaires et donc, le TPEN est souvent employé comme un agent complexant intracellulaire et perméable aux membranes. Cependant, son utilisation en tant que sonde fluorescente pour Zn^{2+} ne semble pas possible, aucune étude n'a montré que ces complexes étaient fluorescents.⁴⁸

Le groupe de Mikata a donc introduit un premier nouveau ligand dérivé du TPEN à base de quinoléine, le N,N,N',N'-tétrakis(2-quinolylméthyl)éthylène diamine (TQEN) (**Figure 17**). Ils ont montré que la constante d'affinité du TQEN pour Zn^{2+} est très élevée ($K_d < 1\mu M$ dans une solution de DMF/H₂O). De plus, il s'est avéré que TQEN, seul, est faiblement fluorescent mais que l'addition d'une quantité équimolaire de Zn^{2+} provoque une augmentation de 23 fois de l'émission de fluorescence ($\lambda_{em} = 383$ nm). Cependant, l'addition de Cd^{2+} induit également une hausse du signal de fluorescence à raison de 60 % de celle du complexe TQEN-zinc. Cette sélectivité pour Cd^{2+} s'explique par ses propriétés à celles de Zn^{2+} . Finalement, leurs expériences de compétition entre TPEN et TQEN ont révélé que l'affinité de Zn^{2+} pour TQEN reste plus faible que pour TPEN.⁴⁹

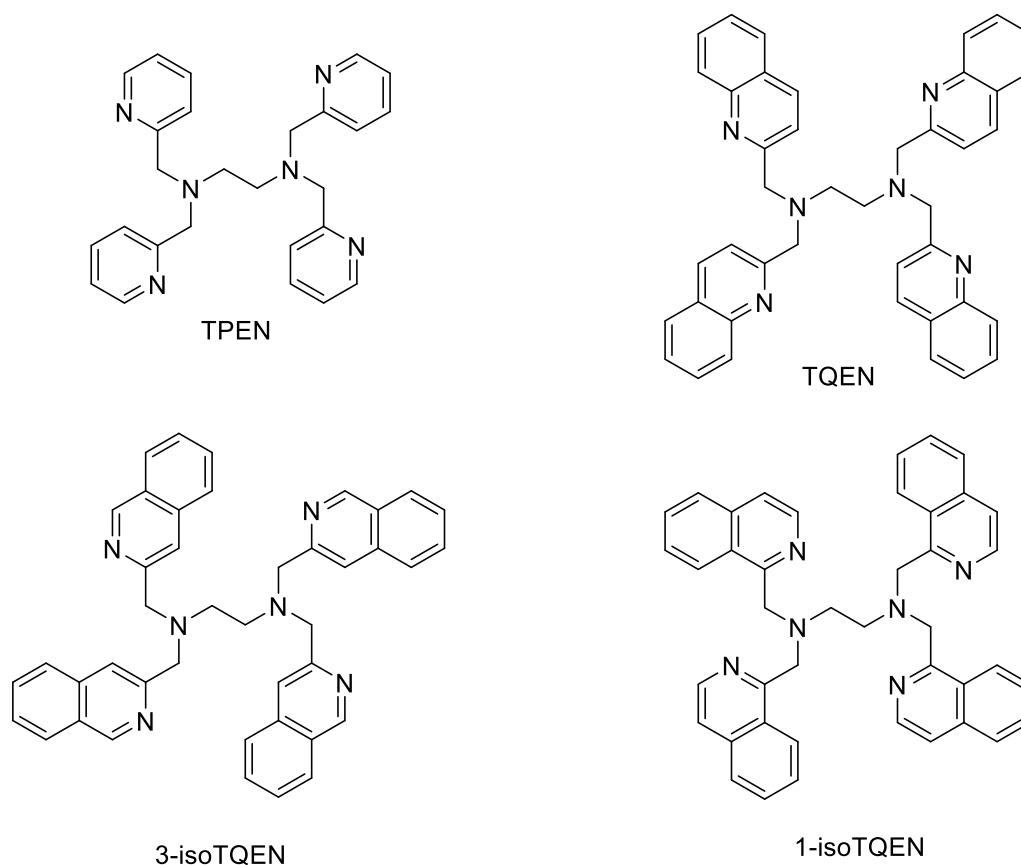


Figure 17 : Sondes développées par le groupe de Mikata.

Plus tard, ce même groupe a poursuivi ces recherches en développant deux nouvelles sondes de la famille de TQEN à base d'isoquinoléine, le N,N,N',N'-tetrakis(1-isoquinolylméthyl)éthylènediamine (1-isoTQEN) et le N,N,N',N'-tetrakis(3-isoquinolylméthyl)éthylènediamine (3-isoTQEN) (**Figure 17**). La modification de la position du cycle benzène pourrait apporter une meilleur affinité métal-ligand par diminution des répulsions stériques entre le cation et le périhydrogène et entre les noyaux quinoléines intramoléculaires. Leur étude a montré que remplacer les quinoléines par des isoquinoléines améliorait l'intensité de la fluorescence, provoquait un déplacement bathochromique des longueurs d'onde d'excitation et d'émission, diminuait l'influence du pH, augmentait la force de la constante d'association du complexe et permettait une meilleure discrimination entre Cd^{2+} et Zn^{2+} .⁵⁰ Pour ce type de sondes, de faibles modifications peuvent induire des variations de sélectivité et d'affinité, parfois extrêmement importantes, pouvant mener à de potentielles applications pour l'ion Zn^{2+} .

3.4.3. Dérivés de tétraazamacrocycles

Parmi les ligands possédant une très grande affinité pour Zn^{2+} , les tétraazamacrocycles et plus spécifiquement, le 1,4,7,10-tetraazacyclododécane, aussi appelé cyclène, ont souvent été des ionophores de choix. Leur sélectivité de complexation pour Zn^{2+} leur donne un avantage

indéniable dans la détection de ce cation. Le groupe de Chuburu s'est donc intéressé à ces ligands et a développé plusieurs sondes différentes basées sur le cyclène. La première fut composée d'un cyclène comme récepteur et d'un groupe benzimidazole comme fluorophore (**Figure 18**). Le choix de ce fluorophore a été dicté d'une part, par l'affinité du zinc pour l'imidazole et l'histidine dans les métalloenzymes et d'autre part, par sa propension à se comporter comme un site de coordination dans les complexes dits scorpionates. Le terme scorpionate vient du fait que le ligand peut lier un métal avec deux sites donneurs comme les pinces d'un scorpion ; le troisième site donneur vient au-dessus du plan formé par le métal et les deux autres atomes donneurs pour se lier au métal. La liaison peut être considérée comme un scorpion saisissant le métal avec deux pinces avant de le piquer. Malheureusement, pour cette sonde, le déplacement de Stokes entre les longueurs d'onde d'émission et d'excitation est trop faible pour garantir une détection optimale du cation et sa longueur d'onde d'émission, proche de 300 nm, n'est pas la plus adaptée pour des analyses en milieu biologiques.⁵¹

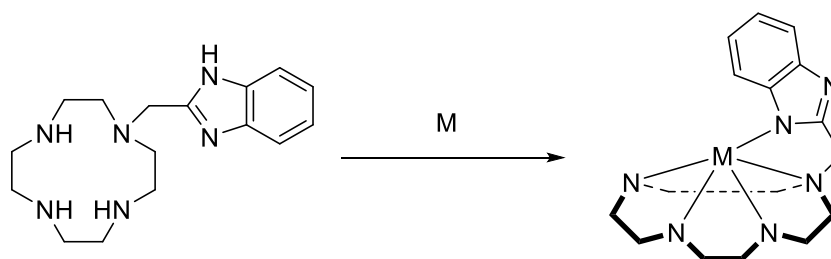


Figure 18 : Complexation d'un métal par la sonde cyclène-benzimidazole du groupe de Chuburu.

Dans leurs travaux suivants, le groupe de Chuburu étudia l'influence de la taille du tétraazamacrocyclole en remplaçant le cyclène par le 1,4,8,11-tétraazacyclotétradécane. Ce nouveau ligand hydrosoluble s'avère ne pas être fluorescent en milieu acide et a contrario, l'est au-delà d'un pH 8. Ils démontrèrent que la sonde se comporte comme un détecteur PET uniquement en présence de Zn^{2+} malgré la présence d'espèces interférentes tels que les alcalins et les alcalino-terreux. Ils montrèrent également que l'augmentation de la fluorescence par complexation de Zn^{2+} est plus importante que chez leur analogue avec le cyclène, car les paires libres des azotes sont plus impliquées dans la complexation, bloquant plus efficacement le PET (**Figure 19**).⁵²

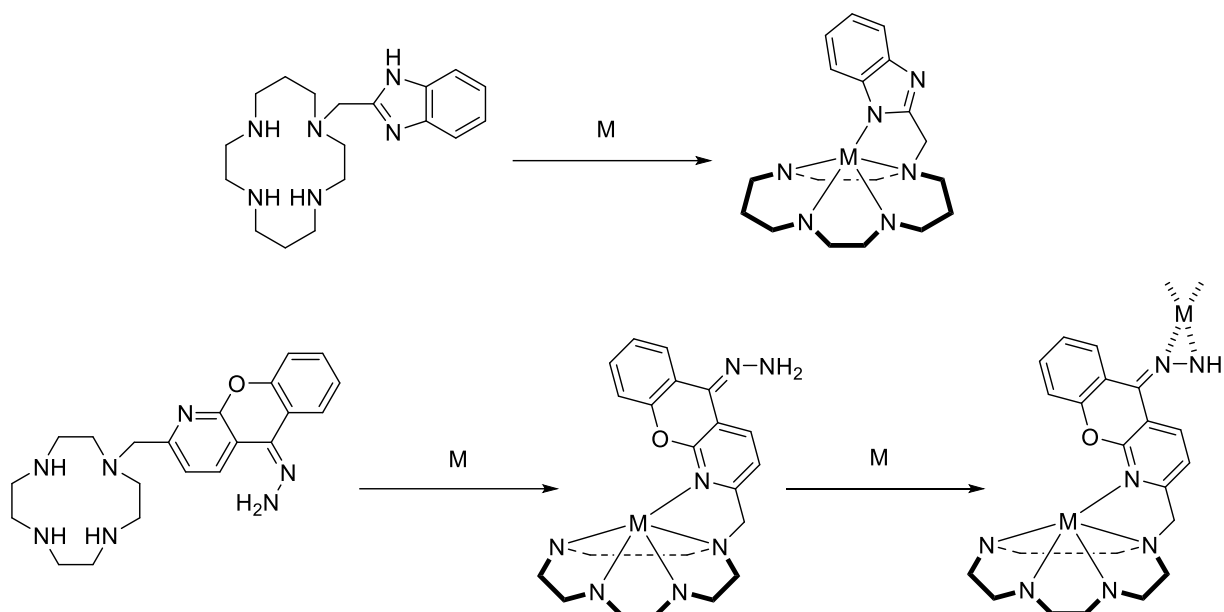


Figure 19 : Complexation de Zn^{2+} avec la sonde 1,4,8,11-tétraazacyclotétradécane-benzimidazole (haut), avec la sonde cyclène-azaxanthone (bas).

D'autre part, le groupe modifia le fluorophore par un groupe azaxanthone utilisé pour détecter des lanthanides afin d'augmenter la différence entre les longueurs d'onde d'émission et d'excitation. Leur étude montra deux augmentations du signal de fluorescence : l'addition d'un premier équivalent de zinc induisait une réponse optique modeste mais l'addition d'un second équivalent était accompagnée d'une augmentation du signal beaucoup plus significative. Le mécanisme de coordination du ligand leur a permis de supposer que le premier signal correspondait à la complexation de Zn^{2+} dans la cavité du macrocycle tandis que le deuxième signal a été associé à la complexation de Zn^{2+} par le fragment hydrazone (**Figure 29**).⁵²

3.4.4. Autres types de sondes

Plusieurs autres types de capteurs existent bien entendu, autres que les dérivés de fluorescéine, de TQEN et les tétraazamacrocycles. Parmi eux, on peut retrouver des dérivés du pyrrole ou de la pyrazole, certaines sondes à base de quinoléine et d'acide salicylique ou à base de rhodamine ou de tricarbocyanine, des macromolécules neutres tels que les calixarènes, des complexes au gadolinium voire même des nanoparticules d'or (**Figure 20**).⁵³⁻⁶⁰

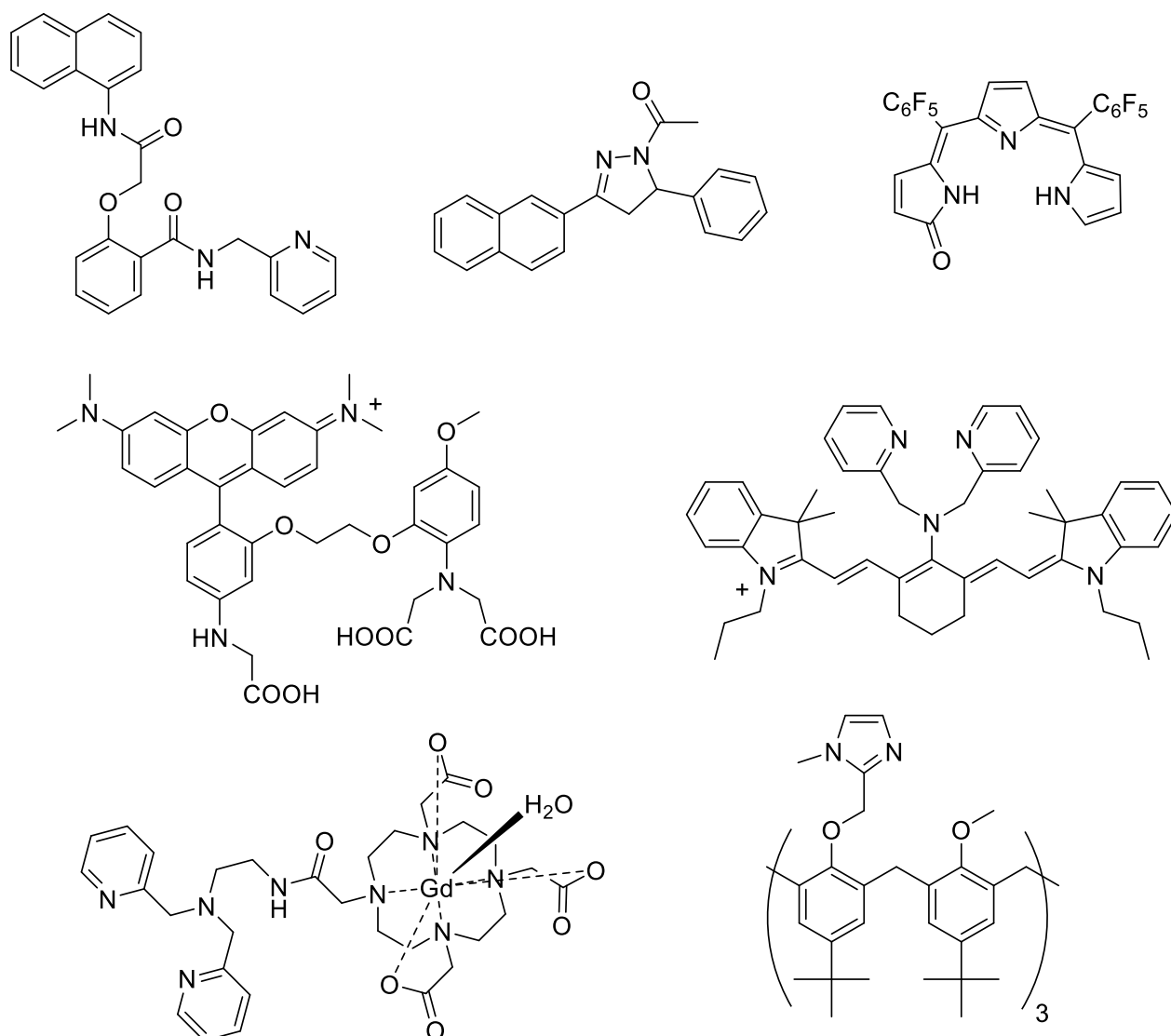


Figure 20 : Structures de sondes fluorescentes.

En 2015, le groupe de O'Halloran utilisa des sondes à base de BODIPY pour démontrer l'origine de la libération de l'ion Zn^{2+} dans le milieu lors de la fertilisation d'un embryon humain (**Figure 21**). La longueur d'excitation de leur sonde vaut 520 nm et sa longueur d'onde d'émission était situé entre 543 nm. Ils montrèrent que la cellule stockait l'ion Zn^{2+} dans des vésicules corticaux et qu'elle diminuait sa concentration de zinc intracellulaire par le déplacement de ces vésicules vers la membrane lors de la fécondation⁶¹ ; un bel exemple de l'utilisation d'une sonde dans une observation continue des événements cellulaires.

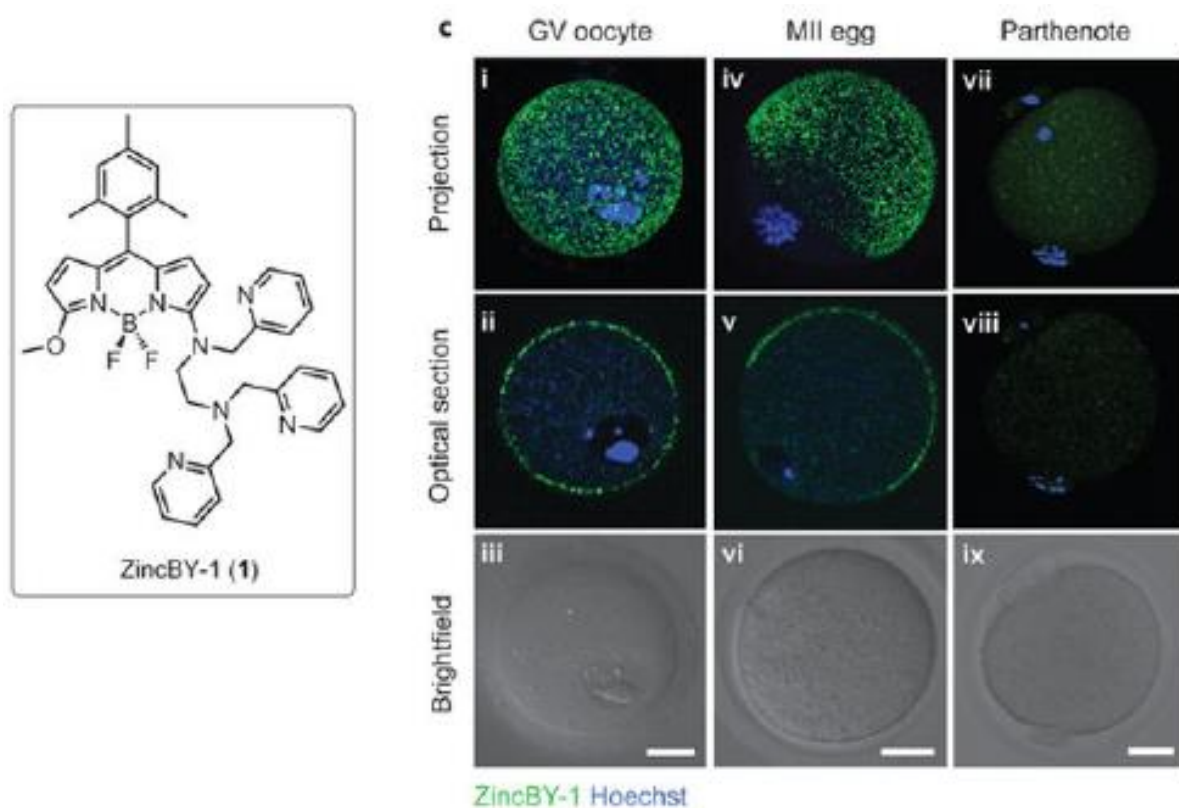


Figure 21 : Sonde à base de BODIPY développée par O'Halloran (gauche), différents stades du développement de la cellule (droite).

3.5. Sondes fluorescentes pour Zn^{2+} via le PCT

Pour les sondes fluorescentes pour Zn^{2+} fonctionnant *via* le PCT ou appelées sondes ratiométriques, la liaison avec Zn^{2+} altère la longueur d'onde d'excitation ou d'émission ou les deux. Avec de telles sondes, les images de fluorescence sont collectées aux maxima de longueur d'onde pour les états liés et non-liés de la sonde et ainsi, les changements de fluorescence sont indiqués sous la forme d'un rapport d'intensité de fluorescence à deux longueurs d'onde, d'où le terme ratiométrique. Bien que cette approche minimise les artefacts dus aux mouvements cellulaires, à l'épaisseur de l'échantillon et à la concentration du capteur, ces sondes ont généralement de plus petits changements de signal lorsque Zn^{2+} s'y lie que les sondes fonctionnant avec le PET. De plus, l'acquisition d'images à deux longueurs d'onde différentes nécessite une instrumentation de microscopie plus sophistiquée. Cependant, un avantage majeur de cette classe de sondes est qu'elles conviennent mieux pour quantifier précisément les concentrations de Zn^{2+} . A l'heure actuelle, le nombre d'exemples de ces sondes est largement moindre que pour les précédentes, notamment parce qu'il est bien plus difficile de développer des sondes qui réalisent un déplacement de longueur d'onde en présence de Zn^{2+} . De ce fait,

ces sondes ont subi beaucoup moins d'optimisations en termes de propriétés photophysiques et d'affinité à Zn^{2+} .⁴¹

Les sondes pour Ca^{2+} , fura-2 et indo-1, ont été modifiées pour pouvoir détecter le zinc à la place du calcium. En présence de Zn^{2+} , la longueur d'onde d'émission de FuraZin se déplace de 378 nm à 330 nm, tandis que celle de IndoZin passe de 480 nm à 395 nm (**Figure 22**). Sur base de ces deux sondes, le groupe d'O'Halloran a développé la sonde Zinbo-5 basée sur un noyau benzoxazole dont son affinité pour Zn^{2+} est de l'ordre du nanomolaire et fonctionne en milieu cellulaire (**Figure 22**). Lorsqu'elle se lie à Zn^{2+} , sa longueur d'onde d'émission se déplace de 407 nm à 443 nm. Ils démontrèrent son efficacité par l'étude des quantités de zinc chez les fibroblastes ainsi que celle du transport de Zn^{2+} chez le parasite *Plasmodium falciparum*.⁶²

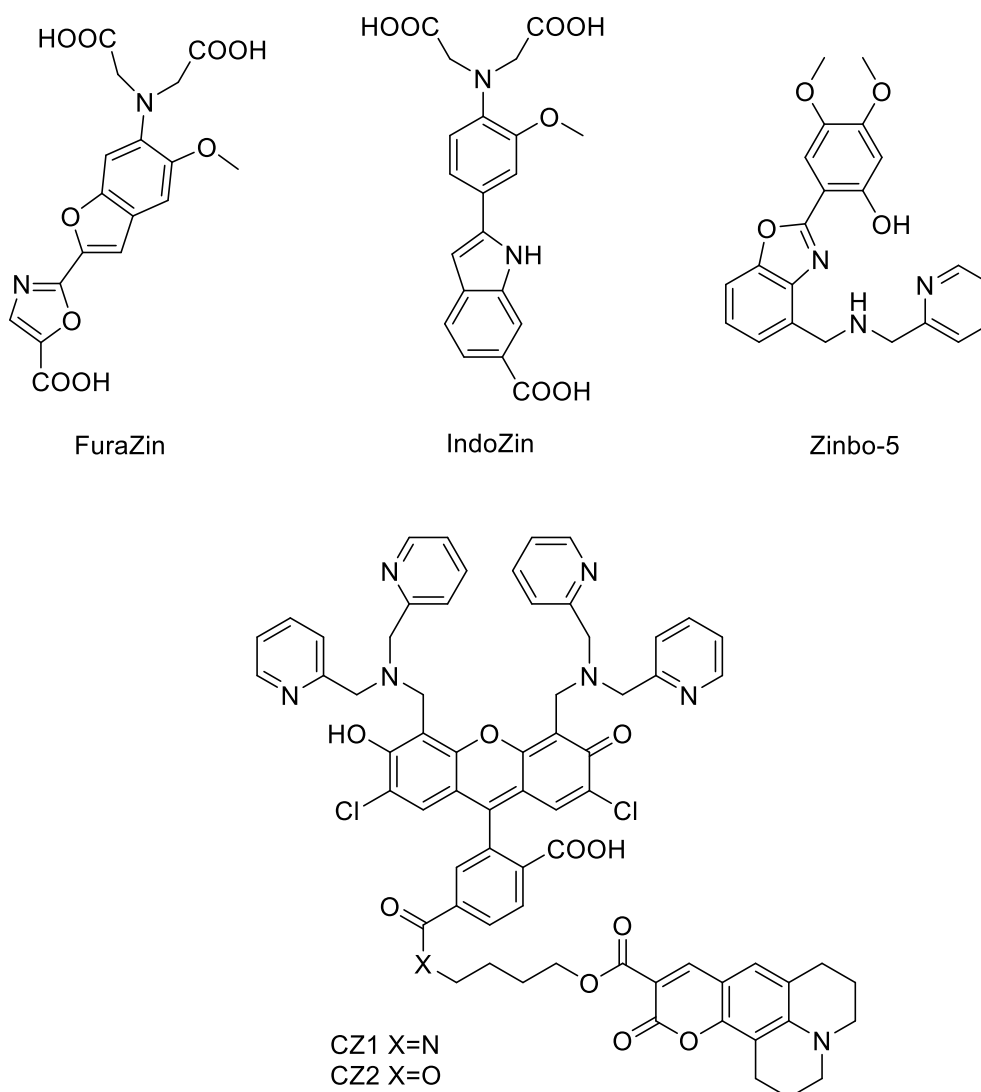


Figure 22 : Structure des sondes ratiométriques FuraZin, IndoZin, Zinbo-5, CZ1 et CZ2.

La fluorescéine et la coumarine ont également été utilisées dans le développement de sondes ratiométriques, CZ1 et CZ2 (**Figure 22**). Ces sondes sont synthétisées en joignant une sonde de la famille des Zinpyr (ZP) à une coumarine par un lien ester. Lorsque ces sondes sont introduites dans une cellule, les estérases présentes clivent la sonde au niveau de la fonction ester pour donner les deux fragments initiaux de ZP et de coumarine. L'intensité de la fluorescence du fragment ZP varie en réponse à la concentration en Zn^{2+} mais l'intensité de fluorescence de la coumarine reste constante et donc joue le rôle de standard interne. En mesurant donc le rapport entre les deux intensités, la concentration en zinc peut être calculée, cependant, des analyses préliminaires sont nécessaires afin de s'assurer qu'après le clivage, les deux fragments ne soient pas localisés différemment ou éjectés de la cellule.⁶³

3.6. Sondes fluorescentes pour Zn^{2+} via le FRET

Cette génération de sondes pour Zn^{2+} sont entièrement basés sur des motifs protéiques ou peptidiques. Ce type de sondes peuvent être introduites dans les cellules, les tissus ou dans l'organisme entier en tant qu'ADN par transfection ou transduction virale. Les senseurs sont alors transcrits et traduits par la machinerie cellulaire et ne nécessite pas l'addition de cofacteur exogène pour fonctionner. Typiquement, toutes les sondes génétiquement codées pour Zn^{2+} opèrent *via* le FRET entre deux protéines fluorescentes. En général, les protéines fluorescentes donneuse et acceptrice sont connectés par l'ionophore qui complexe Zn^{2+} et change la conformation de tel manière que l'efficacité du FRET est affectée (**Figure 23**). Dès lors, les variations des taux de Zn^{2+} peuvent être surveillés continuellement par des changements d'efficacité du FRET.⁴¹

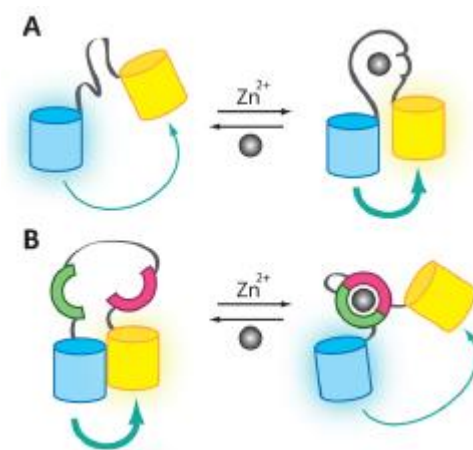


Figure 23 : Changement de conformation des sondes génétiquement codées par complexation de Zn^{2+} .

Les premières sondes génétiquement codées pour suivre l'évolution de Zn^{2+} dans les cellules ont été développées par le laboratoire de Eide et consistaient une paire de « doigts de zinc » provenant d'un facteur de transcription (Zap) d'une levure située entre une CFP (cyan

fluorescent proteins) et une YFP (yellow fluorescent proteins). Ces détecteurs (ZapCY) ont été exprimés dans une levure et ont démontrés que la variation de la concentration en Zn^{2+} induisait un changement du signal de FRET démontrant donc l'efficacité de ce type de sondes.⁶⁴

Alors que la majorité des sondes génétiquement codées utilisent des dérivés de CFP et YFP, plusieurs recherches ont été lancées pour tenter de développer des sondes aux couleurs différentes, plutôt basée sur des systèmes vert-rouge ou orange-rouge. Les avantages de ces systèmes par rapport à CFP-YFP sont au nombre de deux : une augmentation théorique de la brillance et la possibilité d'exciter le donneur avec un laser commun à 488 nm. De plus, une palette de couleurs étendue de capteurs peut permettre une imagerie simultanée de Zn^{2+} dans différents compartiments subcellulaires. Le groupe de Palmer a créé deux nouveaux détecteurs ZapOC pour Zap Orange/Cherry, et ZapCR pour Zap Clover/Ruby. En utilisant simultanément ces nouvelles sondes avec ZapCY, ils ont pu suivre l'apport de Zn^{2+} dans le noyau d'une cellule ainsi que dans d'autres organites.⁶⁵

L'avantage majeur de ces sondes génétiquement codées est leur capacité à cibler relativement précisément certains compartiments cellulaires. De plus, par leur nature ratiométrique et le fait qu'ils ne semblent pas perturber l'accessibilité du Zn^{2+} libre, les capteurs ZapCY ont révélés une forte hétérogénéité dans la distribution de Zn^{2+} dans les cellules mammaliennes (**Figure 24**). En effet, les concentrations de Zn^{2+} semblent être 100 fois moins importante dans l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique que dans le cytosol et elles sont encore plus dans la matrice mitochondriale. Un point important à considérer, c'est que les sondes fluorescentes n'ont accès qu'une partie de la quantité totale de Zn^{2+} , uniquement le Zn^{2+} libre présent dans la cellule. Le reste de Zn^{2+} se situe dans les protéines dans lesquelles il joue un rôle.⁶⁵

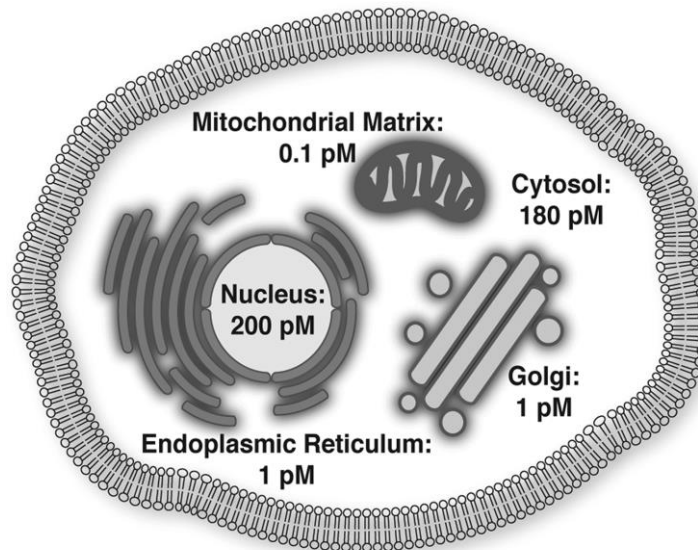


Figure 24 : Distribution hétérogène de Zn²⁺ dans une cellule mammalienne.

Enfin, le nombre de sondes fluorescentes pour l'ion Zn²⁺ est déjà très important. Cependant, elles n'agissent pas toutes de la même façon et certaines entrent dans des compartiments cellulaires auxquels d'autres n'ont pas accès. Elles ne possèdent pas non plus la même stabilité dans divers milieux comme des milieux plus acides. De plus, leur sélectivité n'est pas toujours exclusive vis-à-vis de l'ion Zn²⁺ : le cas de la compétition avec le cadmium a été évoqué bien qu'il ne soit pas normalement présent dans une cellule. Mais cette compétition peut exister avec d'autres cations comme ceux du fer ou du cuivre. Cette compétition soulève le sujet de l'échange entre les cations ainsi que la cinétique et la thermodynamique qu'y se cachent derrière et implique qu'une sonde doit rapidement complexer sa cible. En outre, malgré le nombre de sondes existantes, leur accessibilité reste également un problème : leur structure complexe implique souvent une synthèse longue et fastidieuse menant à un coût monétaire plus élevé. En conclusion, il est encore largement possible d'améliorer les sondes fluorescentes pour l'ion Zn²⁺.

II. Présentation et objectif du mémoire

En 2018, l'équipe du Prof. M. L. Singleton menait des recherches sur de nouveaux complexes à base de pyridazines. En comparaison aux analogues à base de pyridines, les pyridazines ont des propriétés électroniquement différentes pouvant affecter les propriétés du site de liaison du métal. Le second azote diminue son effet σ -donneur mais en fait aussi un meilleur π -accepteur. De plus, en termes de coordination, la pyridazine peut agir comme ligand pontant, menant potentiellement à la formation de structures multimétalliques plus complexes. Cependant, pour la première série des métaux de transition, cela nécessite généralement que la pyridazine fasse partie d'un ligand plus grand ou d'un macrocycle fonctionnalisé avec sites donneurs. En l'absence de cette coopération et notamment dans les métaux à haute valence, les pyridazines se coordonnent de façon monodentée à travers d'un seul azote. Cela semble être dû à la première coordination avec le premier azote qui diminue la basicité du second empêchant l'interaction avec un second métal.⁶⁶

Sur cette base et dans le but d'étudier ces complexes à des fins catalytiques et d'étudier leur stabilité en milieu acide, l'équipe de Singleton a synthétisé plusieurs complexes de fer à base de pyridazine (**Figure 25**). Cependant, lors de la synthèse des complexes, ils remarquèrent de la fluorescence. L'hypothèse proposée était que la présence de traces de Zn^{2+} pourraient être à l'origine de cette fluorescence. Si cette hypothèse se vérifie, cela pourrait ouvrir la voie à un nouveau type de sondes fluorescentes pour le zinc dont la structure et les voies de synthèse seraient plus aisées que les sondes existantes augmentant donc leur accessibilité. De plus, la présence d'un second azote est capable de modifier la stabilité des complexes en milieu acide et d'affecter la vitesse de complexation et la vitesse d'échange de cations en cas de compétition avec d'autres ions biologiques.

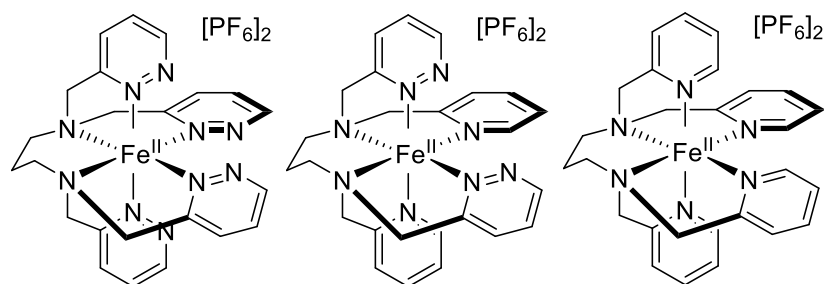


Figure 25 : Structures des complexes de fer à base de pyridazines étudiés par le groupe de Singleton.

C'est dans ce cadre que s'inscrit ce mémoire de fin de master au sein de l'équipe de Singleton. Les différents objectifs du mémoire sont les suivants :

- 1) Répéter la synthèse des ligands précédemment obtenus par l'équipe de Singleton

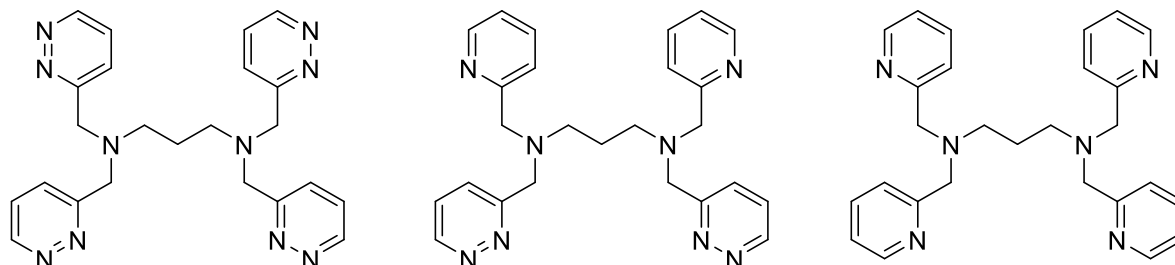


Figure 26 : Ligands précédemment synthétisés par le groupe de Singleton.

- 2) Synthétiser trois nouveaux en remplaçant le fragment propylène-diamine par l'éthylène-diamine. En diminuant la longueur de la chaîne alkyle, la distorsion de la structure augmente et modifie les angles de Bite autour du cation. Cette modification affecte la géométrie octaédrique autour du cation et va probablement influencer l'échange de cations et les propriétés de fluorescence.

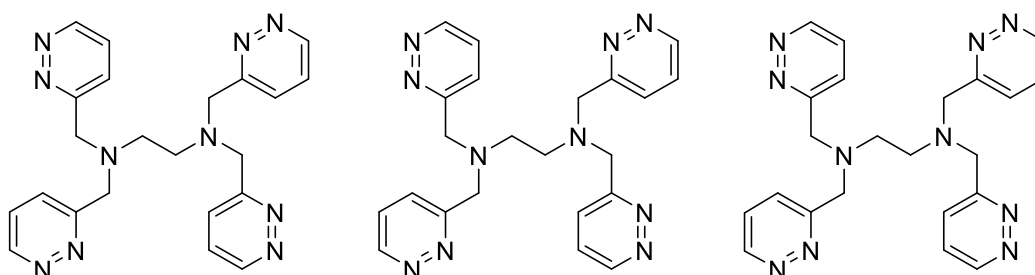


Figure 27 : Nouveaux ligands à synthétiser.

- 3) Réaliser des tests d'absorbance et de fluorométrie avec les différents complexes de zinc dans l'eau afin de confirmer l'hypothèse de départ ; cela permettra également de comparer l'influence de la longueur de la chaîne alkyle sur l'intensité de la fluorescence si notre hypothèse s'avère exacte.
- 4) Réaliser ces mêmes tests avec d'autres métaux pour évaluer la sélectivité de la fluorescence, c'est-à-dire observer si les complexes avec d'autres métaux que le zinc sont également fluorescents.
- 5) Réaliser des tests de sélectivité en plaçant ensemble des complexes de différents métaux et du zinc ; cela permettra également de comparer l'influence des groupes éthylène- et propylènediamine et des azotes secondaires des noyaux pyrazines sur la vitesse

d'échange des métaux ainsi que d'étudier la réversibilité des ligands et la cinétique de formation des complexes.

- 6) Réaliser des tests d'absorbance et de fluorométrie dans d'autres solvants que l'eau et à différents pH.

III. Résultats et discussions

1. Synthèse des ligands

Dans cette section, il est présenté les résultats obtenus et les discussions pour chaque nouvelle synthèse réalisée durant ce projet. Chaque expérience est détaillée de manière individuelle en rappelant la structure des produits, les schémas de réaction et les rendements. Une brève analyse des ^1H RMN (résonance magnétique nucléaire du proton) peut être exposée mais tous les spectres des molécules synthétisées se trouve dans la **Section Annexes** de ce rapport. Une analyse et une discussion des résultats obtenus sont également présentes pour chaque réaction.

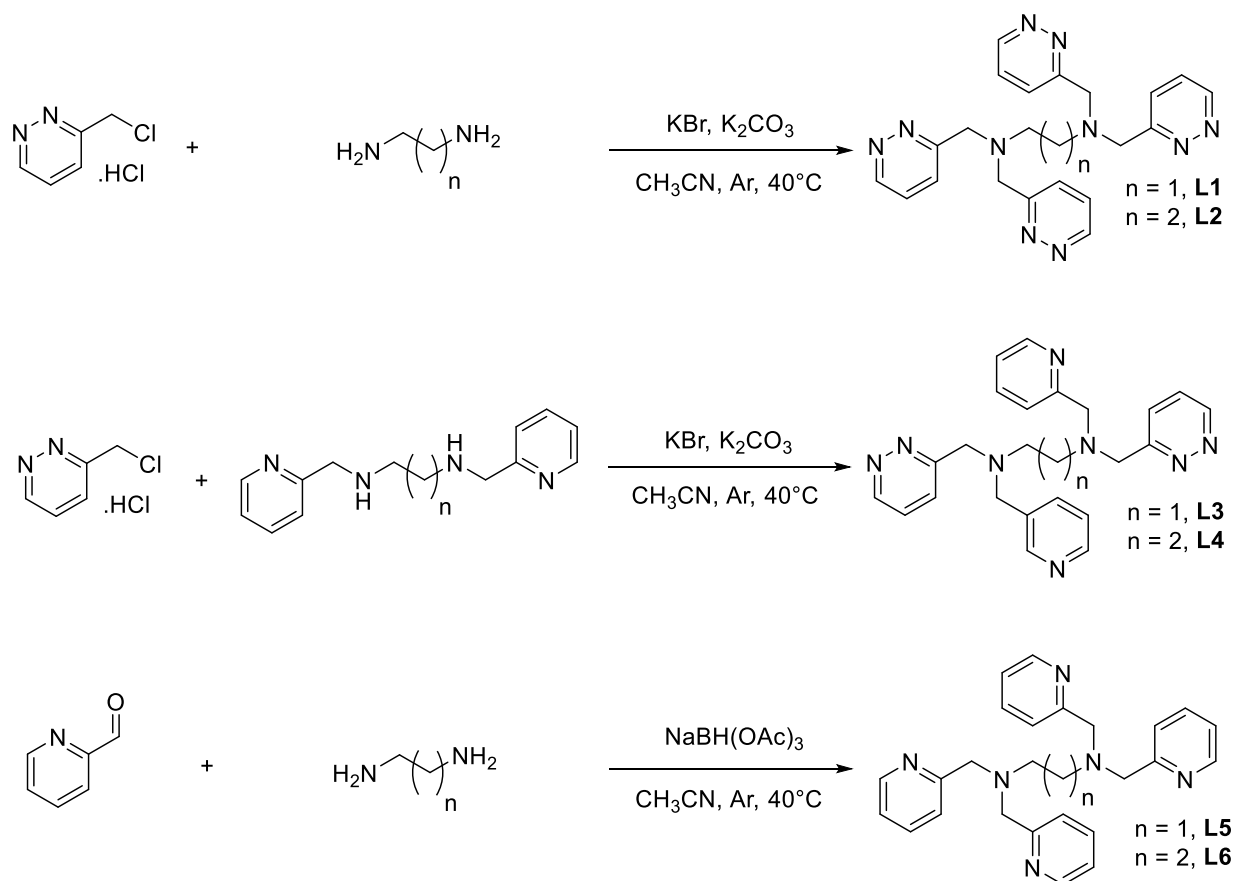


Figure 28 : Schéma général de synthèse des ligands pyridines/pyridazines.

Avant d'aller plus loin, il est nécessaire de rappeler et de présenter les différents ligands qui ont été synthétisés (**Figure 28**). En effet, ils sont au nombre de six et leurs voies de synthèse diffèrent, parfois légèrement, parfois de façon plus conséquente. Les ligands vont varier suivant leur nombre de cycles pyridines et pyridazines (0, 2 ou 4 pour chacun) ainsi que sur le nombre d'atomes de carbone sur le fragment central (2 ou 3). Malgré cela, ce seront tous des ligands hexadentates dont deux sites de chélation sont des azotes aliphatiques et quatre sites de

chélation sont des azotes aromatiques. Concrètement, leur stratégie de synthèse ne va dépendre que du nombre de cycles pyridines/pyridazines à insérer.

La première étape de synthèse pour les ligands contenant des noyaux pyridazines (**L1**, **L2**, **L3** et **L4**) consiste à synthétiser le cycle pyridazine. La première tentative de synthèse commençait avec l'oxydation de l'alcool furfurylique, fraîchement distillé, à l'aide de dibrome dans un mélange méthanol/diéthyléther (**Figure 29**). Cette étape était suivie de l'insertion de l'hydrazine dans le cycle afin d'obtenir le noyau pyridazine et plus exactement le 3-méthanolpyridazine avant d'effectuer une chloration de la position benzylique. Le mécanisme de cette deuxième étape consiste à ouvrir le cycle en milieu acide afin d'obtenir un 1,4-dicarbonyl conjugué. L'hydrazine vient ensuite s'additionner sur la cétone et l'aldéhyde préalablement obtenu pour former le cycle pyridazine.

Plusieurs problèmes ont été rencontrés *via* cette voie. Tout d'abord, la mise en place de la première étape complique sérieusement la synthèse. A l'origine, cette réaction fait appel à de l'ammoniac plutôt qu'au NaOH/NaHCO₃. En passant par NaOH et NaHCO₃, on contourne la dangerosité de l'ammoniac. Cependant, cette réaction doit être réalisée en conditions anhydre et maintenir ces conditions anhydres s'avère pratiquement impossible compte tenu de l'hygroscopicité du l'hydroxyde de sodium et du méthanol. De plus, l'alcool furfurylique et les composés synthétisés ont tendance à se dégrader au cours du temps et en présence d'humidité. Le rendement de la première étape est donc faible, 26 %. Cependant, il s'agit là d'un rendement brut car il n'a pas été possible de séparer le produit désiré du mélange et une séparation par chromatographie sur colonne ne le permettrait pas non plus. Utiliser une base organique, autre que NH₃, plutôt que l'hydroxyde de sodium pourrait être une solution viable pour améliorer cette réaction et pour maintenir les conditions anhydres plus aisément.

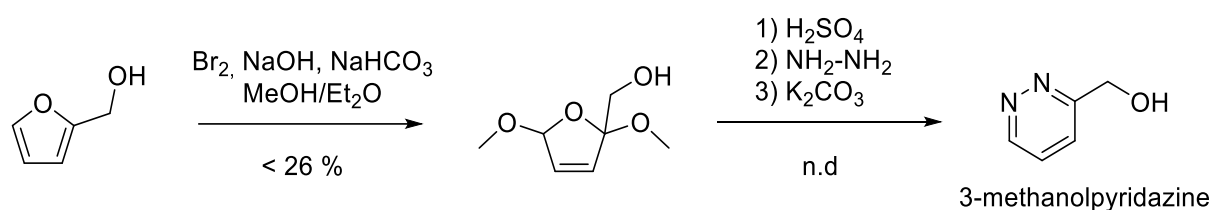


Figure 29 : Schéma de synthèse du cycle pyridazine au départ de l'alcool furfurylique.

Pour pallier aux problèmes de ces premières étapes, la nouvelle voie de synthèse démarre directement du 3-méthanolpyridazine, disponible également dans le commerce. Le nombre d'étapes de synthèse chute irrémédiablement de trois en partant de l'alcool furfurylique à une en démarrant du 3-méthanolpyridazine (**Figure 30**). Cette étape consiste en une chloration de la position benzylique du 3-méthanolpyridazine afin de remplacer l'alcool par un chlore. Mais, le 3-chlorométhylpyridazine n'est pas stable en solution et a tendance à se dégrader. La

chloration transforme en plus le 3-chlorométhylpyridazine en sel solide hydrochloré pour mieux le stabiliser. Le chlorure ainsi obtenu agira comme nucléofuge dans les futures réactions. Ici, le rendement de cette réaction est quantitatif.

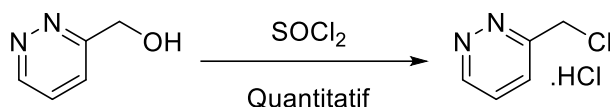


Figure 30 : Synthèse du 3-chlorométhylpyridazine au départ du 3-méthanolpyridazine via le chlorure de thionyl.

Pour synthétiser les ligands **L3** et **L4**, il est également nécessaire d'obtenir l'intermédiaire *N,N'*-diméthylpyridine-diamine. Celui-ci est obtenu par addition nucléophile de la diamine sur le pyridine-2-carboxaldéhyde et réduction de l'imine formée par le borohydrure de sodium (**Figure 31**).

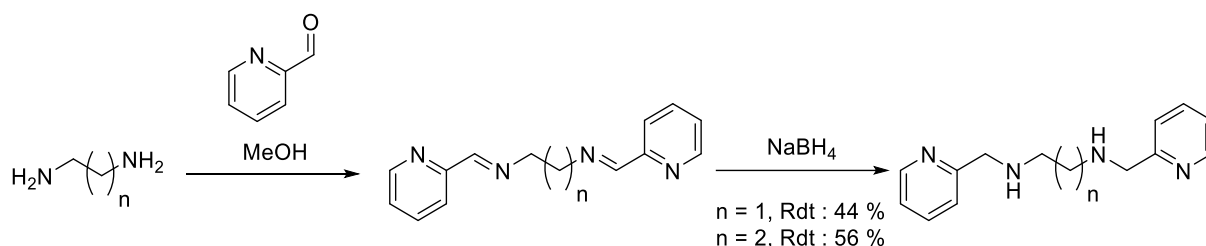


Figure 31 : Synthèse des *N,N'*-diméthylpyridine-diamine.

Enfin, pour la synthèse des ligands **L5** et **L6**, un nouveau réducteur, le triacétoxyborohydrure de sodium, plus doux que NaBH_4 , a été synthétisé par addition d'acide acétique sur le borohydrure de sodium (**Figure 32**). La nature douce de $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ peut être attribuée à la fois à la nature volumineuse du réactif et à la force inductive capteur des trois groupes acétate qui stabilisent la liaison bore-hydrogène. Il présente plus d'avantages par rapport au $\text{NaBH}_3(\text{CN})$ en raison d'une différence de toxicité.⁶⁷ Ce nouveau réducteur peut réduire plus sélectivement les imines que les aldéhydes et permet de réaliser la synthèse de **L5** et **L6** en *one pot*. Cependant, ce composé doit être stocké à l'abri de l'humidité car il réagit avec l'eau pour former l'acide borique et de l'acide acétique.

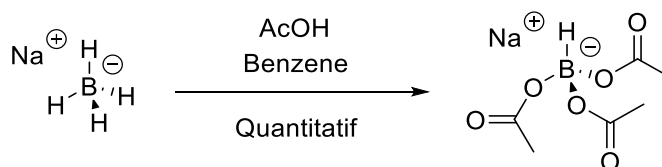


Figure 32 : Synthèse du triacétoxyborohydrure de sodium.

Pour revenir à l'étape de synthèse des ligands à proprement parler, elle consiste en une substitution nucléophile des amines sur la position benzylique du 3-chlorométhylpyridazine pour **L1**, **L2**, **L3** et **L4** (**Figure 33**). Le K_2CO_3 maintient le milieu en conditions basiques augmentant ainsi la solubilité du 3-chlorométhylpyridazine dans l'acétonitrile par réaction

acide-base avec le sel hydrochloré. Le rôle du KBr, quant à lui, est d'accélérer la réaction *via* la réaction de Finkelstein en échangeant le chlorure par un bromure.⁶⁸ Cette réaction se base sur les différences de solubilité entre les sels d'halogénures. La substitution nucléophile se passe donc en réalité en 2 étapes successives. Tout d'abord, le bromure va s'ajouter sur la position benzylique du 3-chlorométhylpyridazine substituant le chlorure. La solubilité du KCl étant moindre que celle du KBr dans l'acétonitrile, l'équilibre de cette réaction est déplacé vers la formation du 3-bromométhylpyridazine. Puis vient ensuite la substitution du bromure benzylique, meilleur groupe partant que le chlorure, par l'amine de l'éthylène- ou du propylène-diamine. Le 3-chlorométhylpyridazine est en large excès dans la réaction car une partie est dégradée au cours du temps et la durée de cette réaction s'étend sur plusieurs jours. En effet, la substitution par l'amine se fait lentement et pour l'accélérer, on fait appel à la réaction de Finkelstein et on ne chauffe qu'à 40°C pour éviter d'accélérer la dégradation du 3-chlorométhylméthylpyridazine.

Les rendements de ces réactions sont, dans le cas de **L1**, assez faible ou dans le cas de **L3**, élevé. Dans le cas de **L2** et **L4**, ils n'ont pas pu être déterminés et aucun spectre RMN correct n'a pu être relevé. Plusieurs hypothèses peuvent tenter d'expliquer ces résultats. Tout d'abord, comme expliqué précédemment, le sel hydrochloré du 3-chlorométhylpyridazine est stable au cours du temps, mais ce n'est pas le cas lorsqu'il est en solution et ce n'est peut-être pas le cas des intermédiaires réactionnels. Ils peuvent se dégrader au cours du temps ou bien réaliser des réactions secondaires non-contrôlées. Une fois la réaction lancée, il est difficile de contrôler la formation de ces intermédiaires et pour limiter leur présence au cours du temps, un excès de 3-chlorométhylpyridazine est toujours ajouté pour pousser la réaction vers la formation des produits tétra-substitués stables. Sur base de cette première hypothèse, on s'attend à ce que le rendement pour **L1** ou **L2** soit inférieur à celui de **L3** et **L4** parce que le nombre d'intermédiaires est plus élevé chez **L1** et **L2** (4 au maximum, les mono-, di- et tri-substitués) que chez **L3** et **L4** (1 seul).

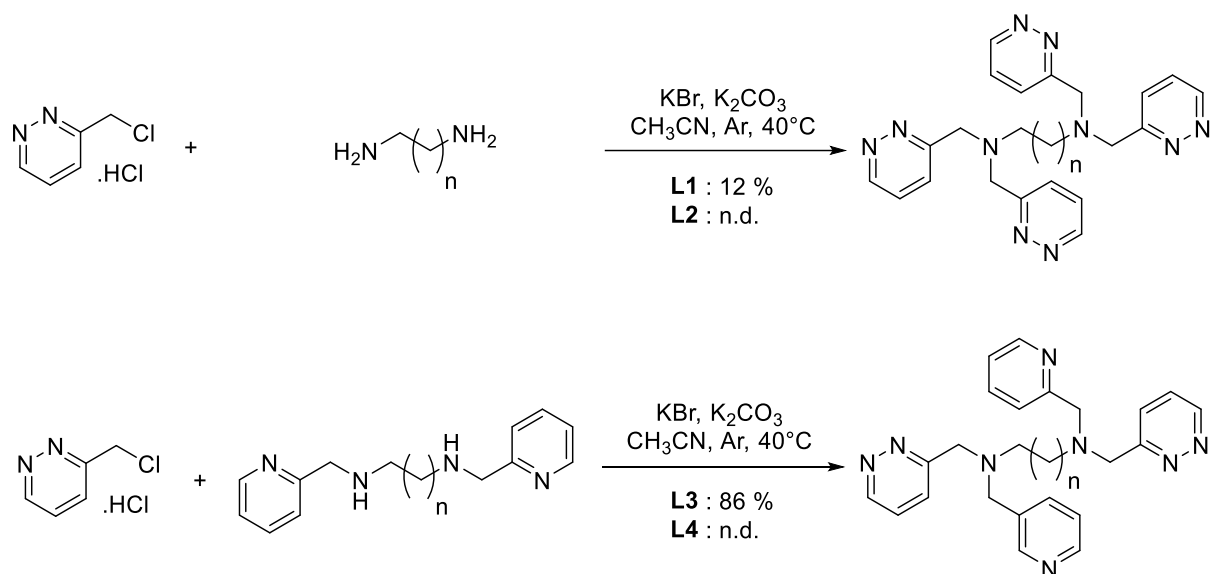


Figure 33 : Synthèse des ligands L1, L2, L3 et L4.

Cette première hypothèse se concentrait sur la réaction en elle-même. La seconde penche pour des problèmes de purification des produits. En effet, le mode opératoire d'origine demandait de réaliser une purification sur colonne d'alumine basique. Cependant, à la fin de ces colonnes, la majeure partie des composés était perdue. Cela peut être dû à des différences d'hydratation de l'alumine influençant ses propriétés et le temps de rétention du produit. Cette purification sur colonne d'alumine a donc été abandonnée et remplacée par une recristallisation dans l'acétonitrile. Cette recristallisation a permis d'isoler les rendements indiqués des ligands **L1** et **L3**, cependant, **L3** est le seul à avoir entièrement précipité. **L1** n'a précipité qu'en partie, ce qui peut expliquer son rendement faible tandis que **L2** et **L4** ont précipité avec les impuretés et leurs rendements n'ont donc pas pu être déterminés. Pour favoriser la recristallisation, il faudrait obtenir un produit brut contenant majoritairement le produit désiré, ce qui est difficile à réaliser au vu des réactions secondaires et de la dégradation évoquées précédemment. En somme, aucun des ligands contenant le fragment central propylènediamine et des cycles pyridazines n'a pu être isolé, en tant que composé pur.

La synthèse des ligands **L5** et **L6** consiste en une amination réductrice. La première voie de synthèse envisagée consistait à utiliser l'intermédiaire dipyridinediamine isolé pour la synthèse des ligands **L3** et **L4**. Néanmoins, la voie de synthèse utilisant le $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ a été choisie parce qu'elle limite le nombre d'étapes (**Figure 34**) et accroît donc potentiellement le rendement global de la réaction. Malheureusement, un rendement faible de seulement 17 % pour **L5** et de 22 % pour **L6** ont été calculés. La sélectivité du triacétoxyborohydrure de sodium n'est peut-être pas si efficace sur ce substrat spécifique et il réduit, malgré tout, le 2-

pyridinecarboxaldéhyde ou bien l'iminium n'a pas été formé substantiellement à cause de la présence d'eau et donc, la réaction était plus lente que prévu.

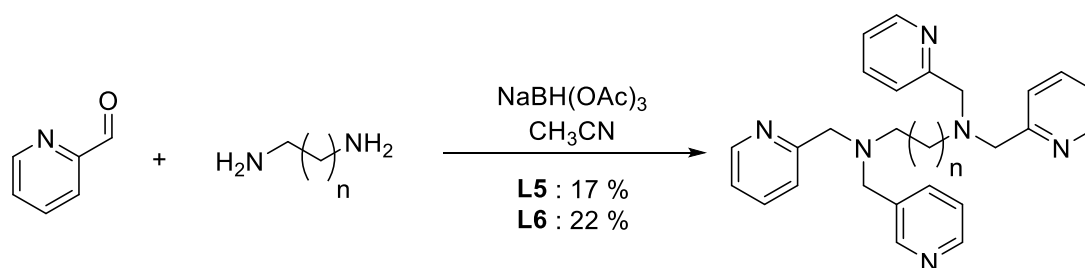


Figure 34 : Synthèse des ligands L5 et L6.

En conclusion, la synthèse des ligands **L1**, **L3**, **L5** et **L6** a été réalisée avec succès malgré plusieurs jours de synthèse et des problèmes purifications. Les ligands **L2** et **L4** n'ont pas pu être isolés de leur brut tandis que **L6** reste sous forme liquide. De ce fait, seuls les ligands à base du fragment éthylène diamine ont été employés pour réaliser les analyses spectroscopiques et fluorométriques suivantes. Sur base de cette observation, il semblerait que les ligands à base de pyridazines et du fragment central propylène-diamine soient les plus difficiles à purifier.

2. Analyse spectroscopiques et fluorométriques

Dans un premier temps, les spectres d'absorption (**Figure 35**) de Zn^{2+} et de différents métaux (Ca^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} et Pb^{2+}) en solution aqueuse ont été mesurés. Les mêmes spectres ont également été relevés pour les ligands en solution aqueuse, préalablement filtrée (**Figure 36**) ainsi que leurs spectres d'émission (**Figure 37**) afin de déterminer les longueurs d'absorption et observer une possible fluorescence des ligands en absence de cations.

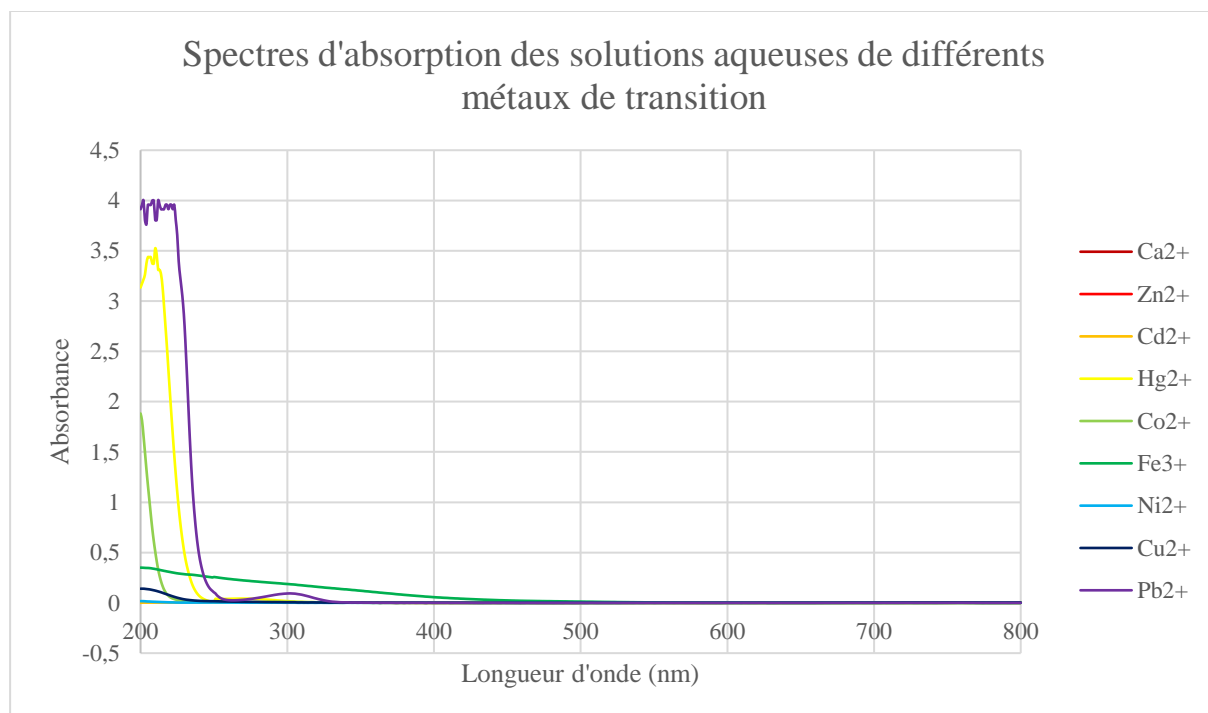


Figure 35 : Spectres d'absorption UV-visible des différents métaux en solution aqueuse de concentration 8.10^{-5} mol/L.

Sur base du spectre d'absorption des cations métalliques (**Figure 35**), la plupart des métaux n'absorbent pas entre 200 et 800 nm. Néanmoins, à partir de 550 nm, le Fe^{3+} commence à absorber et le Hg^{2+} et Pb^{2+} absorbent respectivement à 269 nm et 302 nm suivi d'une saturation de l'appareil respectivement au-delà de 210 nm et 225 nm.

Sur base du spectre d'absorption des ligands (**Figure 36**), on observe des maximums d'absorption des ligands à 247 nm pour **L1** et potentiellement un autre maxima proche des 300 nm, à 260 nm pour **L3** et à 262 nm pour **L5**. Ces longueurs d'onde ont été définies comme les longueurs d'excitation pour l'acquisition des spectres de fluorescence des ligands (**Figure 37**). La longueur d'onde de ces maxima ne diffère pas beaucoup mais on observe une corrélation entre le nombre de noyaux pyridazines et la longueur d'onde d'absorption maximale. En effet, plus le nombre de cycles pyridazines augmente, plus basse est la longueur d'onde d'absorption.

Cette diminution de longueur d'onde pourrait poser un problème dans un milieu biologique car il est fort probable que d'autres molécules absorbent la lumière à des longueurs d'onde proches de celles des ligands.

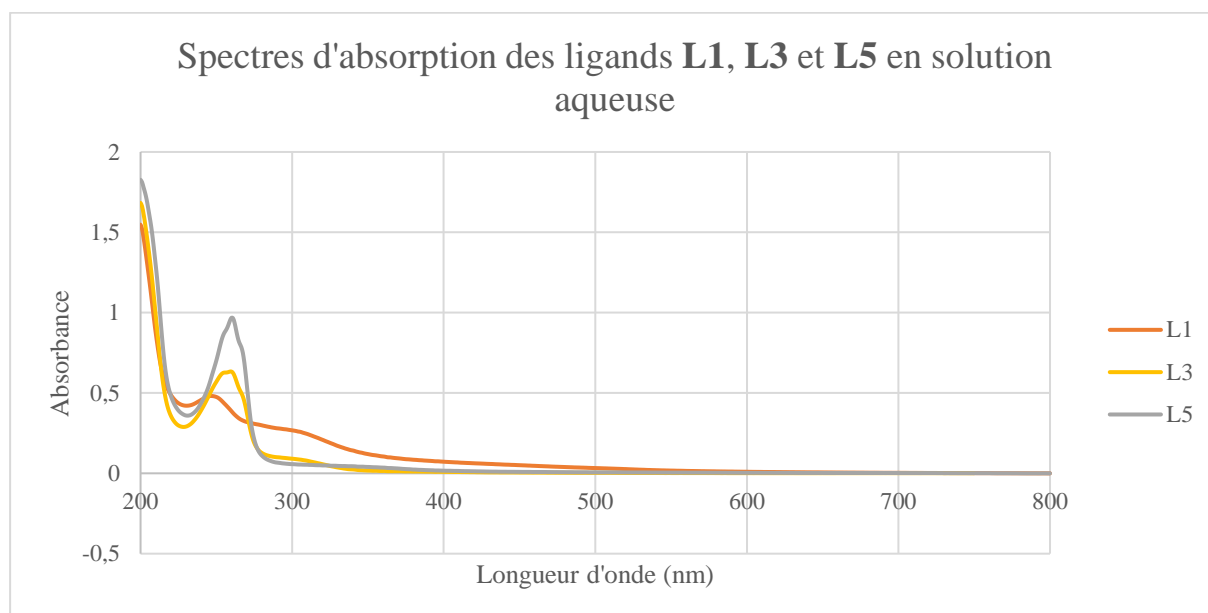


Figure 36 : Spectres d'absorption UV-visible des ligands **L1**, **L3** et **L5** en solution aqueuse de concentration 8.10^{-5} mol/L.

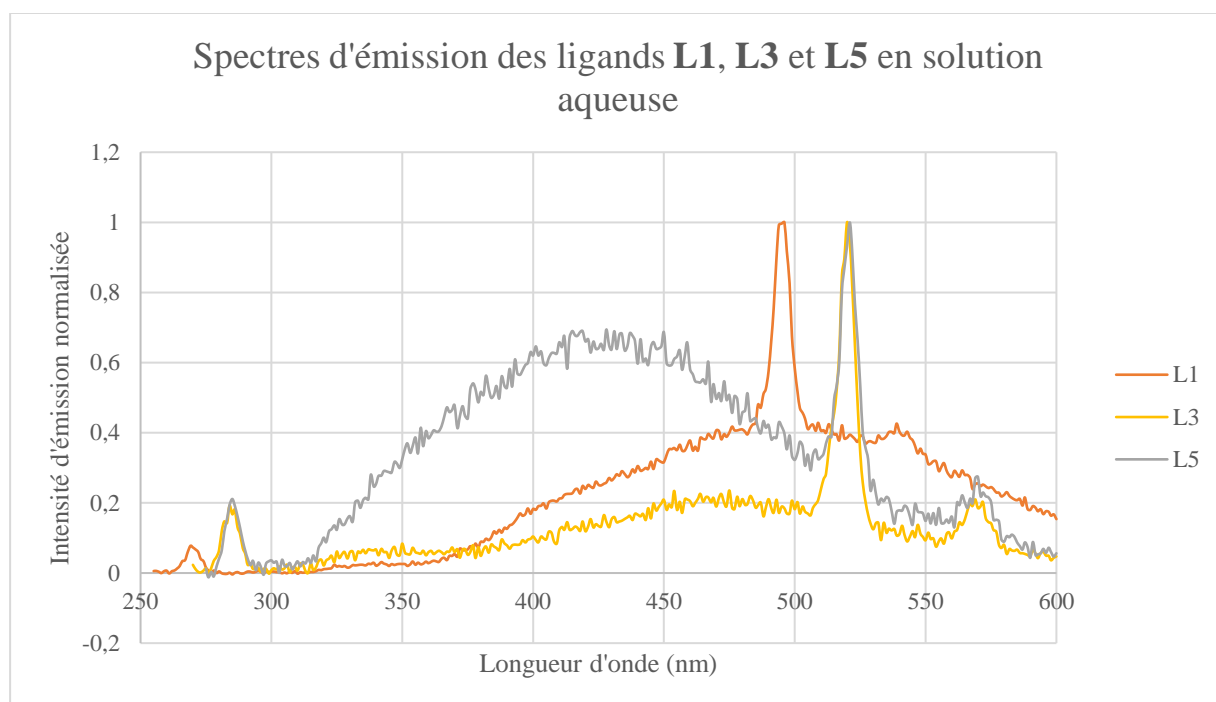


Figure 37 : Spectre d'émission des ligands **L1**, **L3** et **L5** en solution aqueuse de concentration 8.10^{-5} mol/L.

Tout d'abord, les pics observés à 270 et 500 nm pour **L1** et à 285 et 520 nm pour **L3** et **L5** sont des harmoniques (**Figure 37**). En d'autres termes, ils apparaissent peu importe la mesure et ne dépendent pas du composé étudié mais de la longueur d'onde d'excitation. L'harmonique apparaît donc toujours au double de la longueur d'excitation. Ensuite, les

spectres indiquent que les ligands sont déjà fluorescents en absence de cations. Cette mesure vient confirmer des résultats visuels des tests qualitatifs réalisés avant ceux-ci (**Figure 38**). Néanmoins, leur fluorescence diminue l'efficacité de l'observation d'une augmentation de l'intensité de fluorescence lors de la complexation d'un cation. Pour **L1**, son maximum d'émission se situe autour de l'harmonique vers 500 nm ; pour **L3**, celui-ci est situé à 475 nm ; et pour **L5**, il se trouve à 425 nm. Cependant, pour déterminer clairement lequel des ligands émet le plus lumière, de nouvelles mesures sont nécessaires. La meilleure méthode serait alors de calculer des rendements par actinométrie. Ensuite, on constate une augmentation de la longueur d'émission des ligands qui semble corrélée à leur nombre de noyaux pyridazines (4,2 ou 0). Cette diminution de l'énergie d'émission est positive car les composants cellulaires auront moins tendance à absorber à des longueurs d'onde élevées et le signal de fluorescence sera moins perturbé.



Figure 38 : Photo d'échantillons de complexes L5-cation sous une lumière UV de 254 nm, de gauche à droite : L5, L5-Mg, L5-Ca, L5-Mn, L5-Fe, L5-Co, L5-Ni, L5-Cu, L5-Zn, L5-Cd, L5-Hg et L5-Pb.

2.1. Ligand tétrakispyridazine-éthylènediamine (L1)

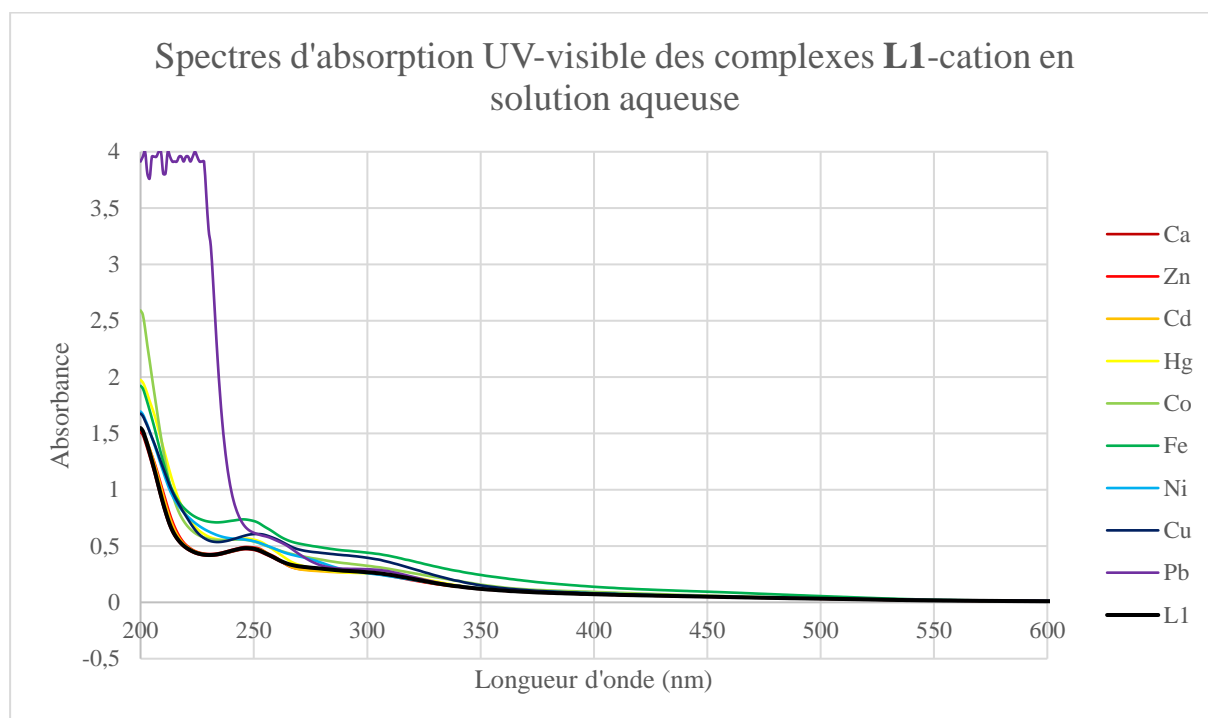


Figure 39 : Spectres d'absorption UV-visible des complexes L1-cation en solution aqueuse de concentration de 8.10^{-5} mol/L.

En fonction du cation, l'allure des spectres d'absorption des complexes (**Figure 39**) varie peu pour certains et plus pour d'autres. Pour le complexe **L1-Ca²⁺**, son spectre d'absorption se superpose exactement à celui du ligand seul sans variation ni de la longueur d'onde du maximum d'absorption à 251 nm ni de l'absorbance. Le ligand et Ca²⁺ sont susceptibles de ne pas interagir l'un avec l'autre et la complexation du cation n'a probablement pas lieu. Pour les complexes à base de Zn²⁺ et Cd²⁺ de très faibles différences sont observées mais à nouveau pas de changement du maximum d'absorption. Ces différences sont plus importantes pour le complexe **L1-Hg²⁺**. Leur comportement semblable à Ca²⁺ met en évidence les similitudes de leur configuration électronique et pour le couple Zn-Cd, leurs propriétés similaires. Les complexes à base de Cu²⁺, Co²⁺ et Fe³⁺ présentent de légères variations du maximum d'absorption (251 nm, 243 nm et 245 nm respectivement) et une augmentation de leur absorbance à ces longueurs d'onde. Le complexe à base de Fe³⁺ présente d'ailleurs une absorbance plus élevée que les autres à sa longueur d'onde d'absorbance déterminée. Le spectre du complexe à base de Ni²⁺ ne permet pas de déterminer un maximum d'absorption tandis que le complexe de Pb²⁺ à un comportement nettement différent des autres. En effet, passé les alentours des 250 nm où les autres complexes absorbent, son absorbance augmente jusqu'à

saturer le détecteur de l'appareil. Cette saturation apparait 8 nm plus tôt que lorsqu'il est seul en solution.

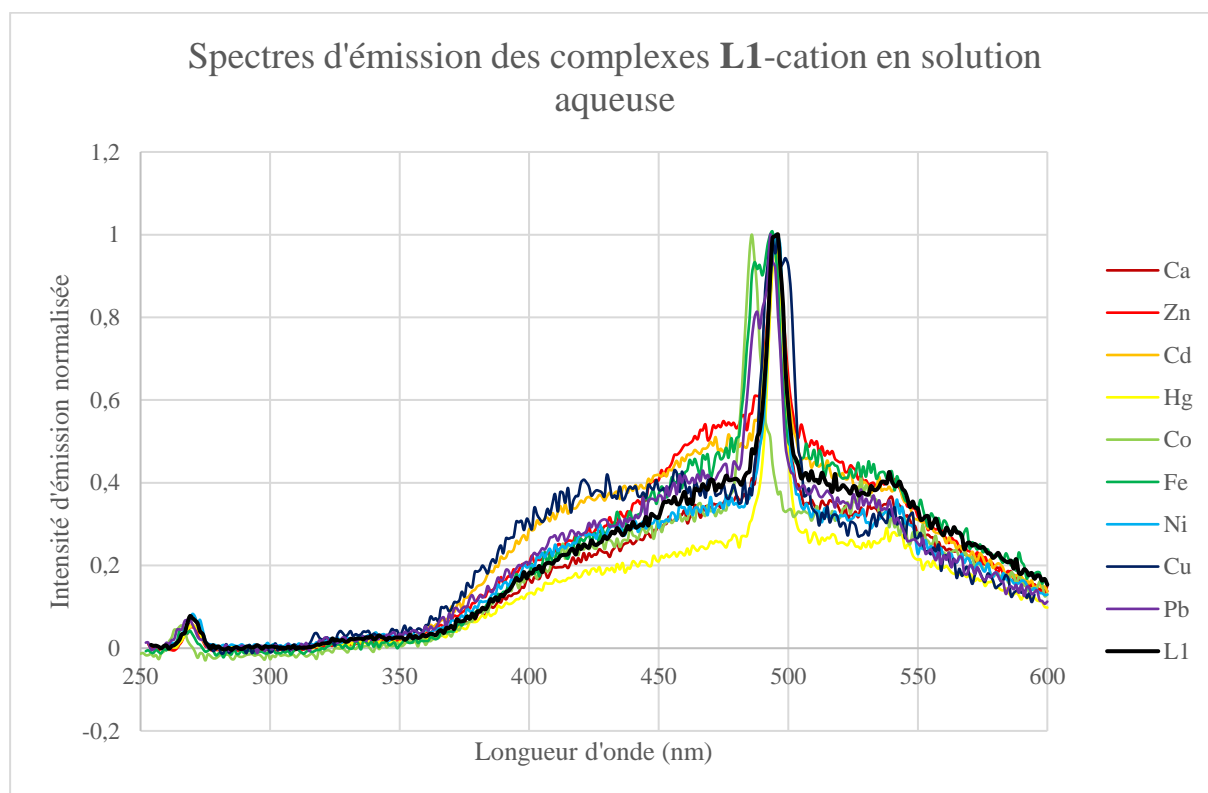


Figure 40 : Spectres d'émission des complexes L1-cation en solution aqueuse de concentration 8.10^{-5} mol/L.

Comme pour le spectre des ligands, les nets pics d'émission à 270 nm et entre 485 et 500 nm correspondent à des harmoniques intrinsèques à la mesure et à la longueur d'onde d'excitation utilisée (**Figure 40**). Les spectres d'émission sont extrêmement large et leur allure des spectres d'émission ne varie à nouveau que de peu entre les différents échantillons. Leur maximum d'émission sont d'ailleurs tous confondus avec l'harmonique à 500 nm excepté le complexe à base de Cu^{2+} où son maximum se situe à 425 nm. Cela pose un problème pour déterminer le maximum d'émission. D'autre part, il est intéressant de constater que même des complexes à base de cations inhibiteurs de fluorescence tels que **L1-Fe³⁺** émettent malgré tout tandis que beaucoup de cations ne semblent pas affecter l'allure du spectre. Afin d'affirmer avec exactitude si certains complexent émettent plus de lumière que d'autres, des nouvelles mesures de rendement quantique sont indispensables.

2.2. Ligand bispyridazinebispyridine-éthylènediamine (L3)

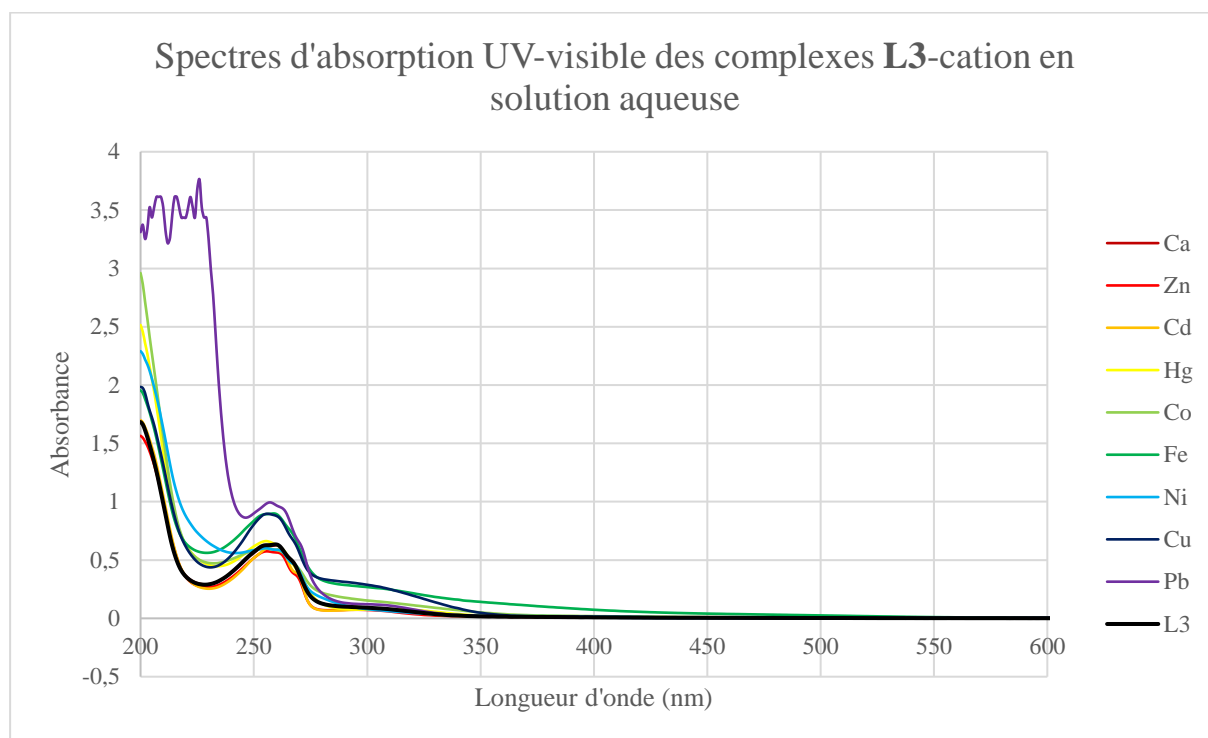


Figure 41 : Spectres d'absorption UV-visible des complexes **L3**-cation en solution aqueuse de concentration 8.10^{-5} mol/L.

En fonction du cation, l'allure des spectres d'absorption des complexes (**Figure 41**) varie peu pour certains et plus pour d'autres. Pour le complexe **L3**- Ca^{2+} , son spectre d'absorption se superpose exactement à celui du ligand seul sans variation ni de la longueur d'onde du maximum d'absorption à 260 nm ni de l'absorbance. Le ligand et Ca^{2+} sont susceptibles de ne pas interagir l'un avec l'autre et la complexation du cation n'a probablement pas lieu. Une diminution d'absorbance est observée chez **L3**- Zn^{2+} et un changement du maximum d'absorption chez **L3**- Cd^{2+} à 262 nm. Leur comportement semblable à Ca^{2+} met en évidence les similitudes de leur configuration électronique et pour le couple Zn-Cd, leurs propriétés similaires. Pour ce complexe **L3**- Hg^{2+} , le maximum d'absorbance est observé à 255 nm. Les complexes à base de Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} et Fe^{3+} présentent un maximum d'absorption à 255 nm, 255 nm, 256 nm et 259 nm respectivement avec une absorbance 50 % plus importante pour **L3**- Cu^{2+} et **L3**- Fe^{3+} . Cette fois, un maximum d'absorbance peut être déterminé pour le complexe à base de Pb^{2+} situé à 257 nm mais son comportement au-delà de 250 nm reste sensiblement identique au complexe **L1**- Pb^{2+} précédent avec une saturation du détecteur.

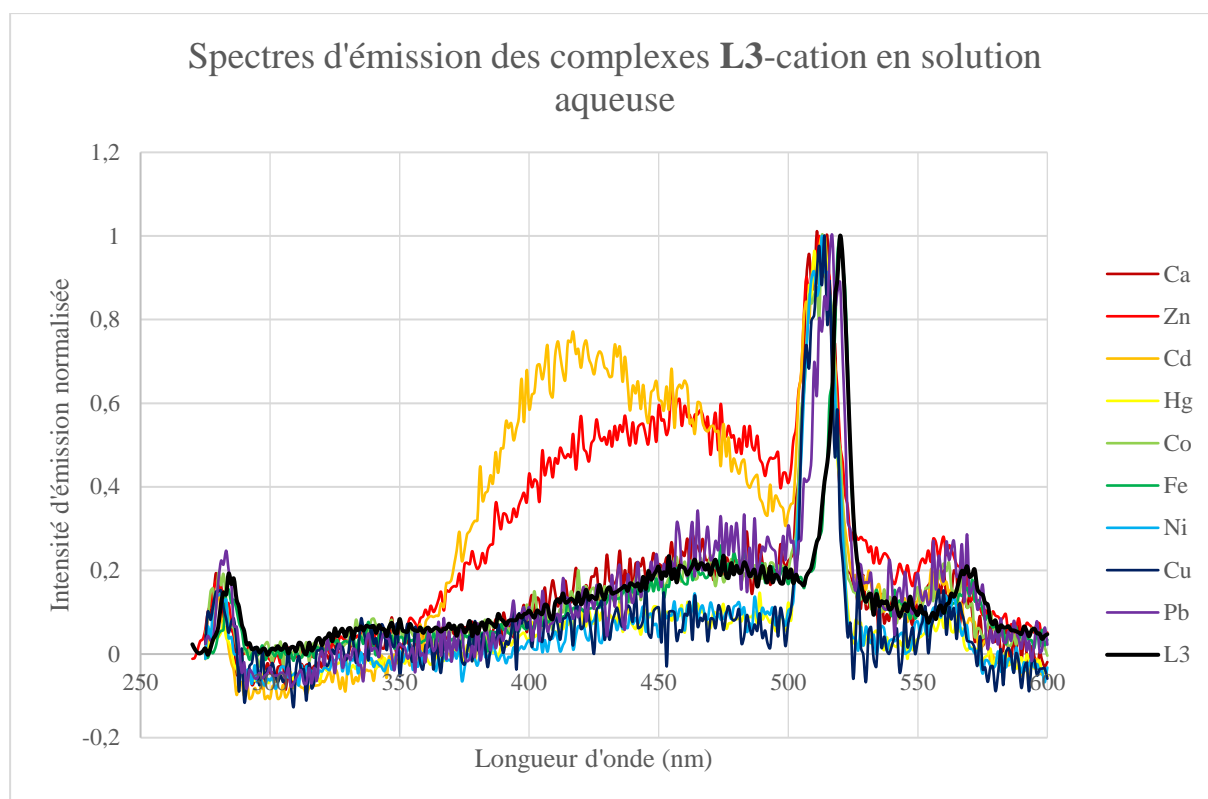


Figure 42 : Spectres d'émission des complexes L3-cation en solution aqueuse de concentration 8.10^{-5} mol/L.

Comme pour le spectre des ligands, les nets pics d'émission à 280 nm et entre 500 et 525 nm correspondent à des harmoniques intrinsèques à la mesure et à la longueur d'onde d'excitation utilisée. Alors que les spectres des complexes de Co^{2+} , Fe^{3+} , Pb^{2+} et Ca^{2+} suivent l'allure du spectre de **L3** avec un maximum d'émission autour de 475 nm et que les complexes de Ni^{2+} , Hg^{2+} et Cu^{2+} émettent très peu, les complexes **L3-Zn²⁺** et **L3-Cd²⁺** se comportent différemment. En effet, pour le complexe à base de Zn^{2+} , le pic d'émission se situe à 458 nm et son intensité semble plus élevée, cependant, on ne peut en être sûr qu'avec des mesures de rendements quantiques. Dans le cas du complexe **L3-Cd²⁺**, le maximum d'émission se situe à 417 nm et l'intensité d'émission semble, ici aussi, plus importante. Au vu des déplacements du maximum de longueur d'émission dans le cas de Zn^{2+} et Cd^{2+} , ce ligand ferait également partie de la famille des sondes ratiométriques.

2.3. Ligand tétrakispyridine-éthylènediamine (L5)

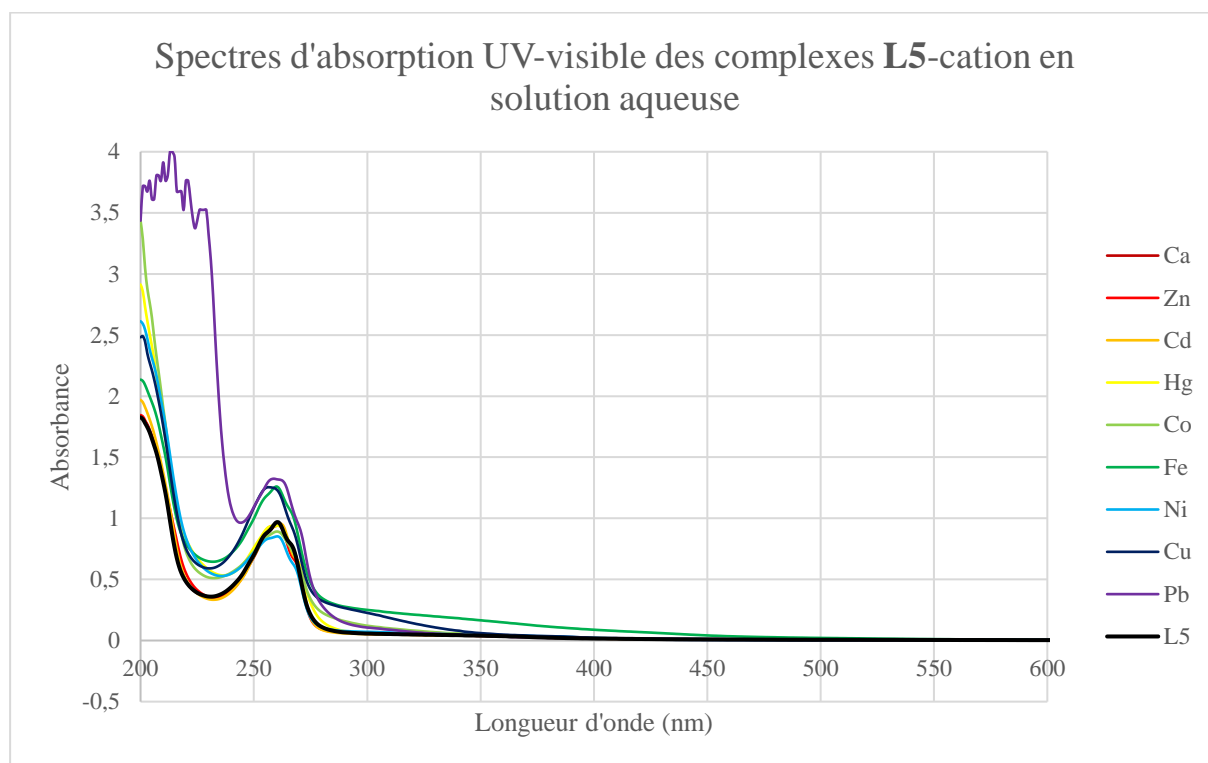


Figure 43 : Spectres d'absorption UV-visible des complexes L5-cation en solution aqueuse de concentration 8.10^{-5} mol/L.

En fonction du cation, l'allure des spectres d'absorption des complexes (**Figure 43**) varie peu pour certains et plus pour d'autres. Pour le complexe **L5-Ca²⁺**, son spectre d'absorption se superpose exactement à celui du ligand seul sans variation ni de la longueur d'onde du maximum d'absorption à 262 nm ni de l'absorbance. Le ligand et **Ca²⁺** sont susceptibles de ne pas interagir l'un avec l'autre et la complexation du cation n'a probablement pas lieu. Chez **L5-Zn²⁺** et **L5-Cd²⁺**, leur spectre se superpose également à celui de **L5**. Leur comportement semblable à **Ca²⁺** met en évidence les similitudes de leur configuration électronique et pour le couple Zn-Cd, leurs propriétés similaires. Pour ce complexe **L5-Hg²⁺**, le maximum d'absorbance est observé à 260 nm. Pour le complexes à base de **Cu²⁺** présente un maximum d'absorption 256-257 nm tandis que les complexes à base de **Ni²⁺**, **Co²⁺** et **Fe³⁺** présentent tous un maximum à 260 nm, avec une absorbance 50 % plus importante pour **L5-Cu²⁺** et **L5-Fe³⁺** mais plus faible pour **L5-Ni²⁺** et **L5-Co²⁺**. Le maximum pour le complexe à base de **Pb²⁺** est situé à 259 nm mais son comportement au-delà de 250 nm reste sensiblement identique aux complexe **L1-Pb²⁺** et **L3-Pb²⁺** précédents avec une saturation du détecteur peu après avoir dépassé cette valeur.

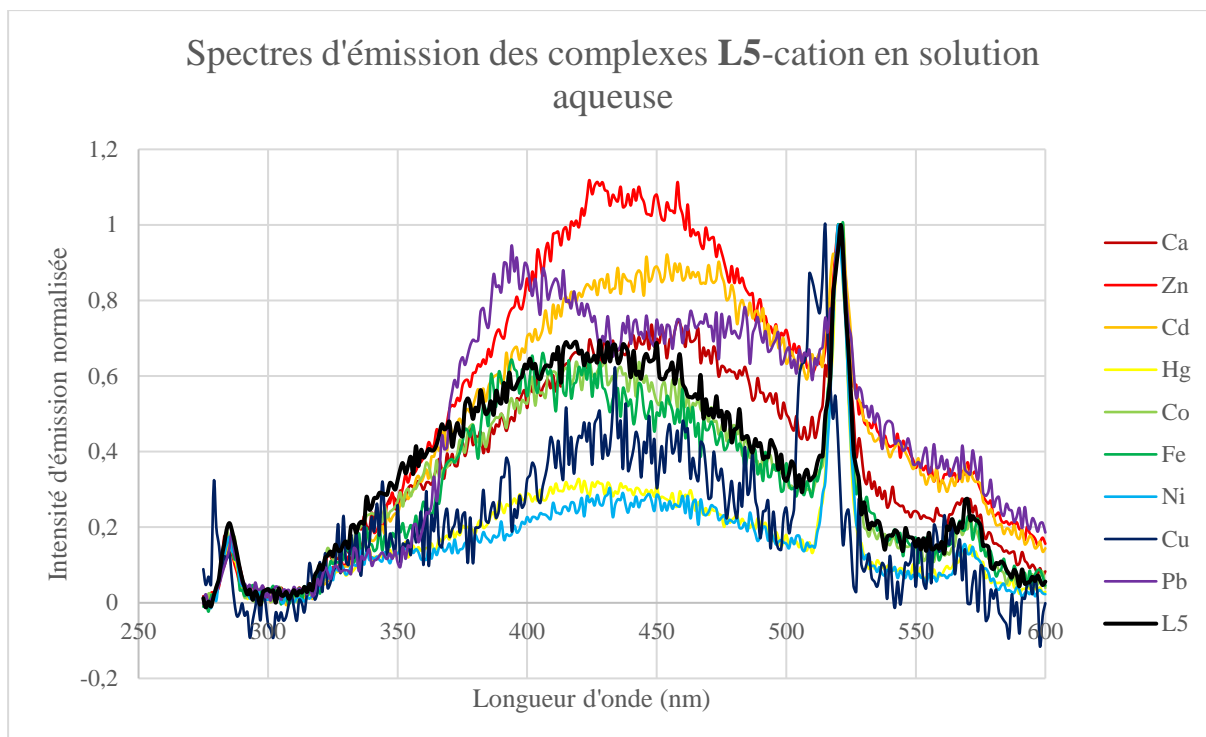


Figure 44 : Spectres d'émission des complexes L5-cation en solution aqueuse de concentration $8 \cdot 10^{-5}$ mol/L.

Comme pour le spectre des ligands, les nets pics d'émission à 280 nm et entre 510 et 530 nm correspondent à des harmoniques intrinsèques à la mesure et à la longueur d'onde d'excitation utilisée. L'observation et l'interprétation de ces spectres sont plus compliquées que pour le ligand précédent L3. Le pic d'émission du complexe L5-Fe³⁺ est légèrement plus hypsochromique à 410 nm que le maximum d'émission du ligand. Les pics d'émission des complexes à base de Cu²⁺, Ni²⁺, Hg²⁺ et Co²⁺ correspondent au maximum d'émission du ligand L5, à 425 nm. Ce maximum est également celui de L5-Zn²⁺. Le complexe L5-Cd²⁺ voit la longueur d'onde de son maximum d'émission déplacée à 454 nm. La longueur d'onde d'émission du plomb est également différente de celle du ligand, 394 nm. Il est intéressant d'observer que même les complexes de cations définis comme inhibiteurs de fluorescence (Fe³⁺, Co²⁺ et Cu²⁺) émettent légèrement contrairement à ce que laissait penser les tests qualitatifs (Figure 38). Ici aussi, pour affirmer l'intensité d'émission des complexes, des mesures actinométriques sont nécessaires.

2.4. Sélectivité du ligand L3

Afin d'évaluer la sélectivité du ligand pour un cation spécifique et l'échange possible entre 2 cations, le complexe L3-Zn a été mis en présence de Fe³⁺ et Cd²⁺ (**Figure 45 et 46**). Ces deux cations ont été choisis car le Fe³⁺ est connu comme inhibiteur de fluorescence et Cd²⁺ a des propriétés similaires à Zn²⁺ et ils ont donc tendance à entrer en compétition.^{41,50}

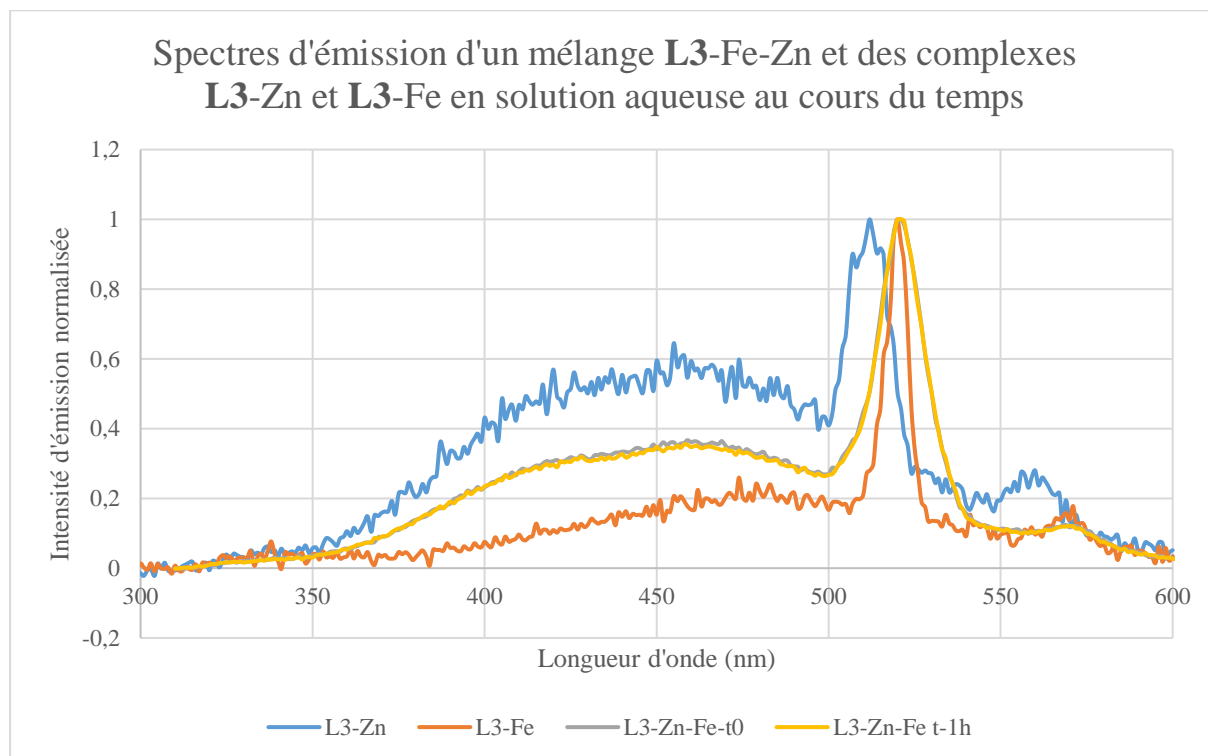


Figure 45 : Spectres d'émission des complexes L3-Zn (bleu), L3-Fe (orange), L3-Fe-Zn au temps zéro (gris) et L3-Fe-Zn après 1h (jaune) en solution aqueuse de concentration $6,67 \cdot 10^{-5}$ mol/L.

Au temps t_0 , le spectre du mélange présente avec un maximum d'émission à 458 nm bien que son intensité normalisée soit plus faible. Le rapport d'intensité d'émission entre les deux longueurs d'onde des complexes de référence vaut 0,921 (intensité normalisée à 475 nm sur intensité normalisée à 458 nm). Ce rapport diffère de celui du complexe de Zn²⁺ de référence qui vaut 0,814. Après 1h, le spectre d'émission est pratiquement identique mais on observe une légère diminution du signal à 458 nm et le rapport des intensités aux longueurs d'onde d'émission des deux complexes de référence a évolué, s'est stabilisé et vaut maintenant 0,958. L'échange de cations entre Fe³⁺ et Zn²⁺ a donc lieu rapidement et que les ions Fe³⁺ et Zn²⁺ sont en compétitions. Plus de mesures sont nécessaires pour calculer une constante d'association et les valeurs de rapport d'intensité indiquées sont à employer avec précaution compte tenu de l'importance du bruit dans les spectres des solution de référence L3-Zn et L3-Fe.

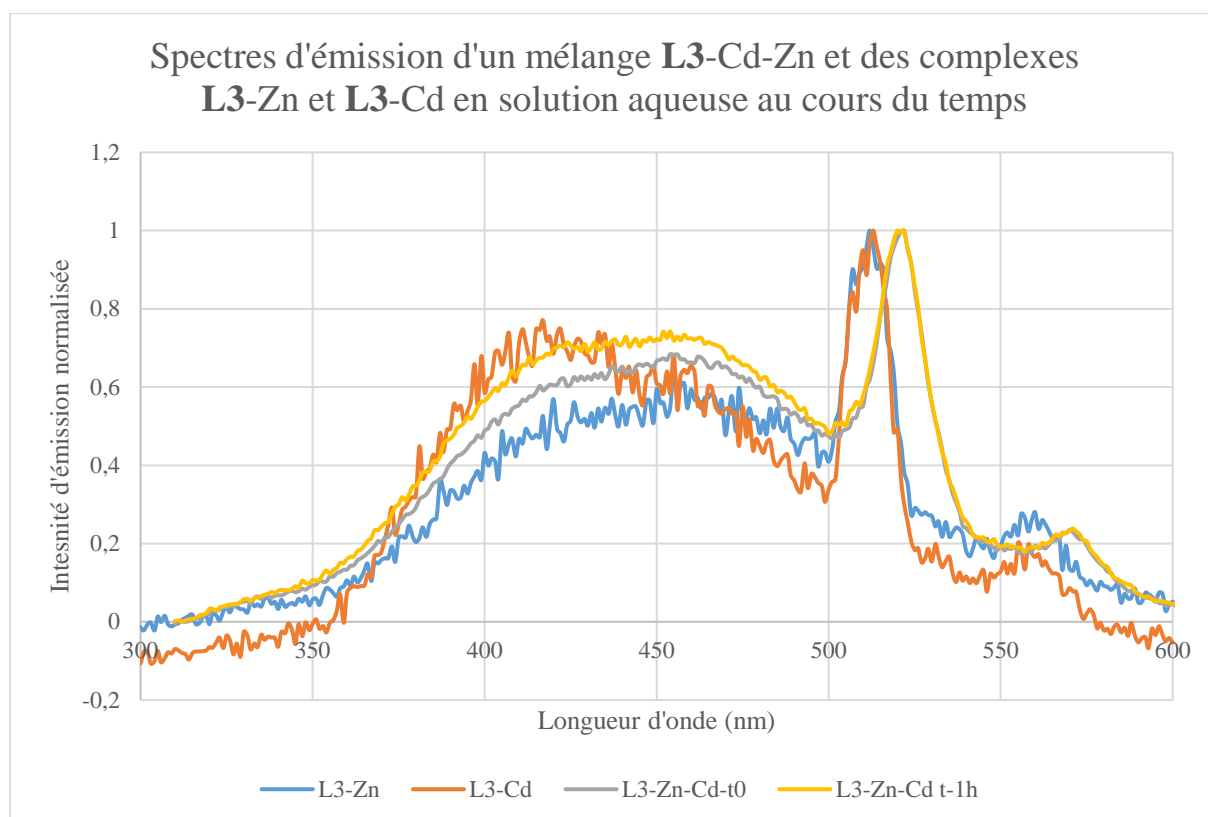


Figure 46 : Spectres d'émission des complexes L3-Zn (bleu), L3-Cd (orange), L3-Cd-Zn au temps zéro (gris) et L3-Cd-Zn après 1h (jaune) en solution aqueuse de concentration $6,67 \cdot 10^{-5}$ mol/L.

Au temps t_0 , le spectre du mélange correspond au spectre du complexe **L3-Zn** avec un maximum d'émission à 458 nm avec une intensité normalisée légèrement plus grande. Après 1h, le spectre d'émission s'éloigne un peu plus du spectre du complexe **L3-Zn**. La différence a à nouveau lieu dans le rapport des intensités aux longueurs d'onde d'émission des complexes de référence (458 nm pour Zn^{2+} et 417 nm pour Cd^{2+}). En effet, au temps t_0 , ce rapport (intensité à 417 nm sur intensité à 458 nm) vaut 0,887 alors qu'après 1h, ce rapport vaut 0.910. Le rapport des intensités pour le complexe de zinc vaut lui 0,864. L'échange de cations entre Cd^{2+} et Zn^{2+} se produit relativement lentement, plus lentement qu'entre les ions Fe^{3+} et Zn^{2+} . Sur base de cette observation, il semblerait que le ligand **L3** ait une préférence pour Zn^{2+} mais celle-ci n'est pas fortement marquée. Ici également, plus de mesures sont nécessaires pour calculer une constante d'association et les valeurs de rapport d'intensité indiquées sont à employer avec précaution compte tenu de l'importance du bruit et donc de la gamme de la tranche d'erreur sur la mesure dans les spectres des solution de référence **L3-Zn** et **L3-Cd**.

IV. Conclusion et perspectives

En conclusion, la synthèse de quatre ligands a été accomplie par substitution nucléophile entre les diamines correspondantes et les noyaux aromatiques pyridines ou pyridazines en utilisant du carbonate de potassium et du bromure de potassium pour accélérer la réaction. La synthèse des deux derniers a été accomplie par amination réductrice. Cependant, les rendements obtenus n'ont pas toujours été satisfaisants et plusieurs hypothèses ont été soulevées pour tenter d'expliquer ces résultats. Cette synthèse peut donc encore être améliorée soit en changeant complètement de voie de synthèse, soit en optimisant les conditions de réaction ou la méthode de purification des produits. Ces deux dernières options ont liées puisque l'amélioration de la purification par recristallisation va de pair avec la « propreté » de la réaction elle-même.

Les spectres d'émission ont permis d'obtenir de premières données concernant les pics d'émission des différents complexes et la sélectivité du signal. En effet, les complexes des différents ligands ont montré des signaux d'émission avec tous les cations testés. Cependant, il est difficile d'estimer ou de mesurer si les intensités d'émissions sont plus intenses chez certains cations en particulier. Pour réellement parler d'augmentation d'intensité d'émission, des analyses actinométriques doivent encore être réalisées pour mesurer le rendement quantique d'émission de ces complexes. Cependant, le ligand **L1** montre des limites en termes d'analyse et pour cause, il n'a pas été possible d'établir les longueurs d'onde d'émission de ses complexes à cause de l'harmonique, intrinsèque à la machine et à la longueur d'onde d'excitation dépendant, elle, du ligand.

Les tests de sélectivité ont laissé entrevoir une compétition entre Fe^{3+} et Zn^{2+} . Bien que Fe^{3+} ne soit pas majoritaire dans les milieux cellulaires, leur compétition risque de poser des problèmes tant au niveau de l'observation du zinc qu'au niveau de sa quantification. Ces tests ont également mis en exergue une certaine préférence de **L3** pour Zn^{2+} par rapport à Cd^{2+} .

Dans le futur, de nombreuses analyses plus poussées seraient encore nécessaires pour évaluer les possibilités que pourraient offrir ces nouveaux senseurs pour le zinc, notamment des mesures de rendements quantiques, beaucoup plus d'analyses de sélectivité et les mêmes tests dans des solvants imitant le milieu cellulaire. De nombreuses modifications des ligands sont également possibles afin d'optimiser l'augmentation d'intensité d'émission ou la longueur d'onde des maxima d'absorption et d'émission entre le ligand en absence de cation et le complexe de Zn^{2+} . A termes, il n'est pas impossible, après un chemin encore long et fastidieux, d'envisager l'utilisation de ces nouveaux ligands ou de leurs dérivés dans des applications

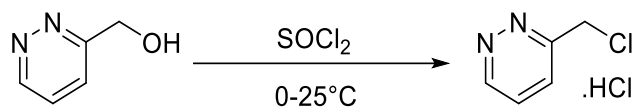
biologiques ou médicales où la santé de chacun serait une priorité, un peu comme en cette période de confinement face à la pandémie du Covid-19.

Annexes

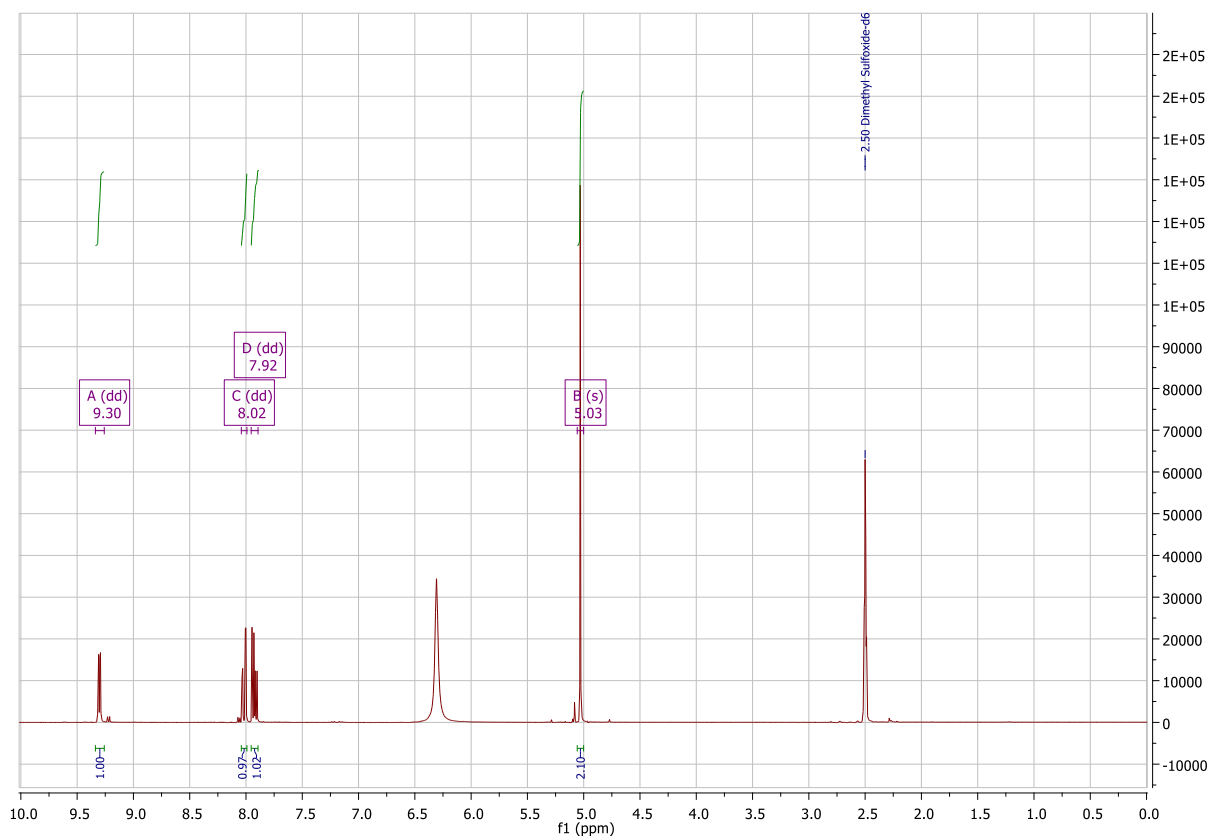
GÉNÉRAL

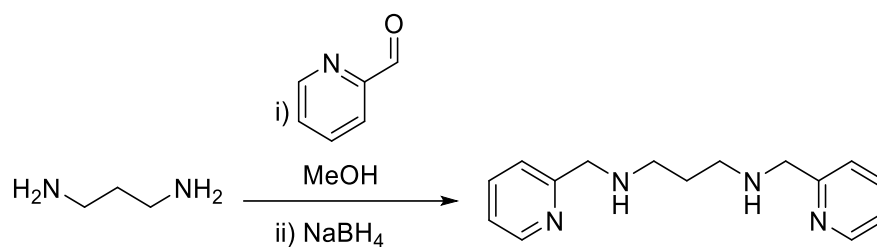
Les réactions menées dans des conditions anhydres ont été réalisées sous une atmosphère inerte d'argon dans une verrerie préalablement séchée à la flamme sous argon. Les produits chimiques ont été obtenus de *Sigma-Aldrich Chemical Company* ou de *Fluorochem*. Les solvants techniques ont été obtenus de *Sigma-Aldrich Chemical Company*. Les CCM ont été réalisées sur de la silice 60 sur un support en aluminium recouvert d'un indicateur fluorescent (*Silicycle Chemical Division*, 0,25 mm, F254). Ces CCM ont été révélées sous UV (254 nm) et par le KMnO_4 . Les proportions dans les mélanges de solvants sont indiquées en v/v. Les concentrations ont été réalisées par évaporation des solvants volatiles à basse pression dans un rotavapor. Les spectres ^1H RMN et ^{13}C RMN ont été réalisés en utilisant les machines *Brüker* AV-300. Le signal dû au solvant non-deutéié a servi de standard interne.

PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES ET DONNÉES DE CARACTÉRISATION ^1H RMN, ^{13}C RMN et HRMS

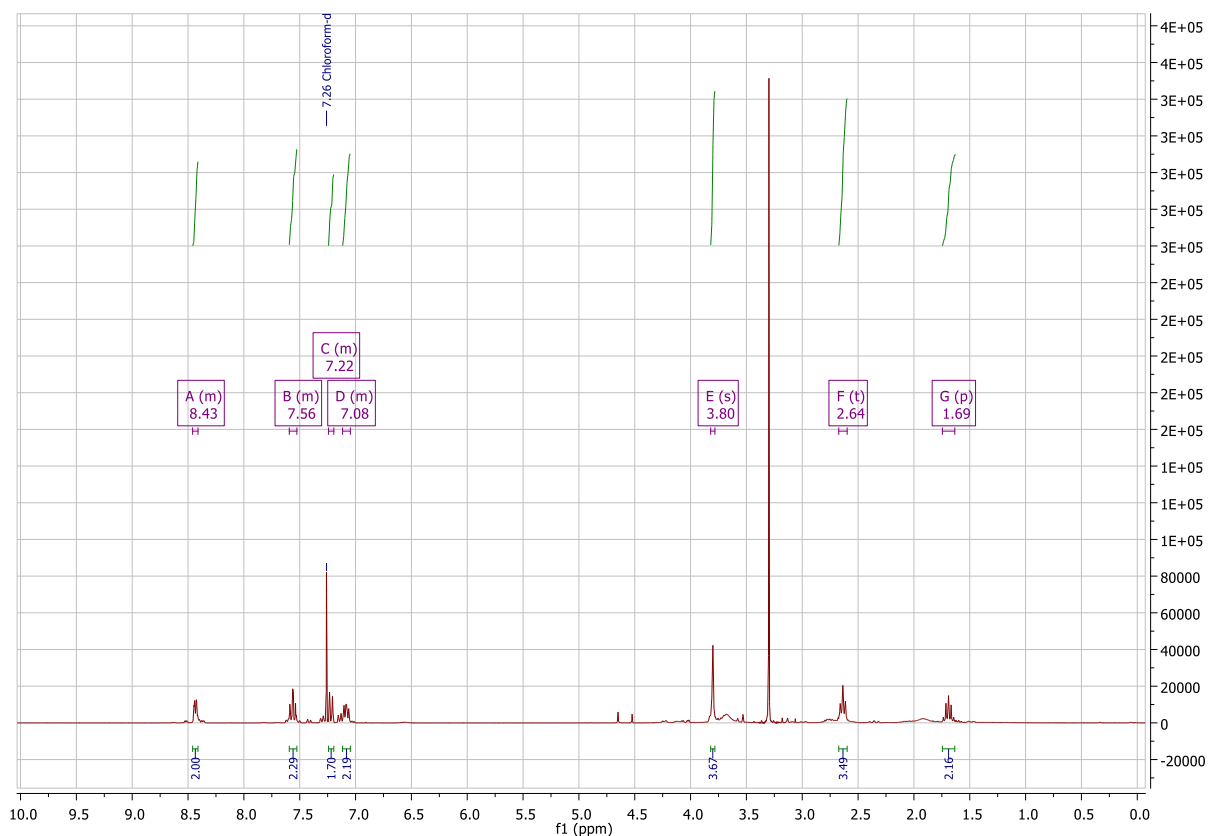


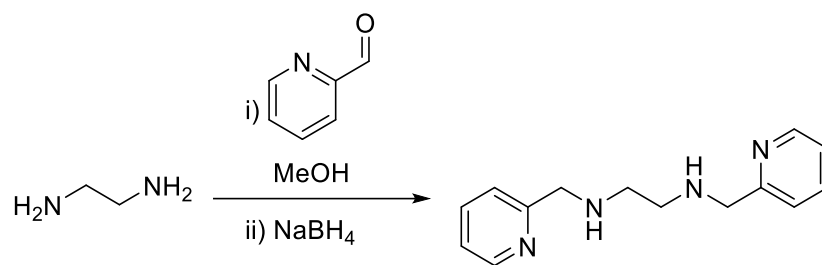
3-chloromethylpyridazine : 4.35 mL thionyl chloride (60.0 mmol; 6.0 eq) were added slowly to an ice-cooled flask containing 1,752 g 3-methanopyridazine (10.0 mmol; 1.0 eq); the reaction mixture was stirred 45 minutes at room temperature and then evaporated under reduced pressure. The residue was further dried by azeotropic distillation with toluene, to yield 1.2845 g (quantitative) of a brown to black solid. ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.30 (dd, $J = 4.9, 1.6$ Hz, 1H), 8.02 (dd, $J = 8.5, 1.6$ Hz, 1H), 7.92 (dd, $J = 8.5, 5.0$ Hz, 1H), 5.03 (s, 2H). Spectral data matched those of the reported compound.⁶⁵



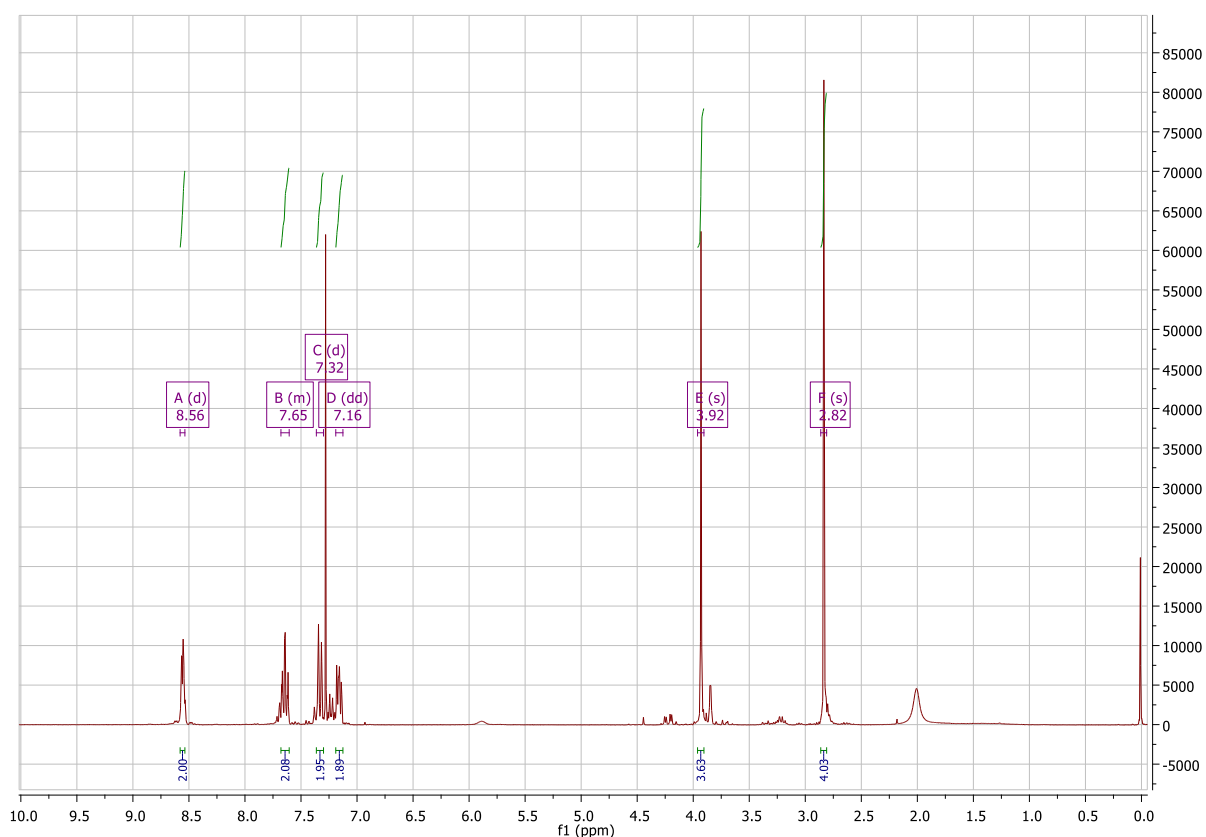


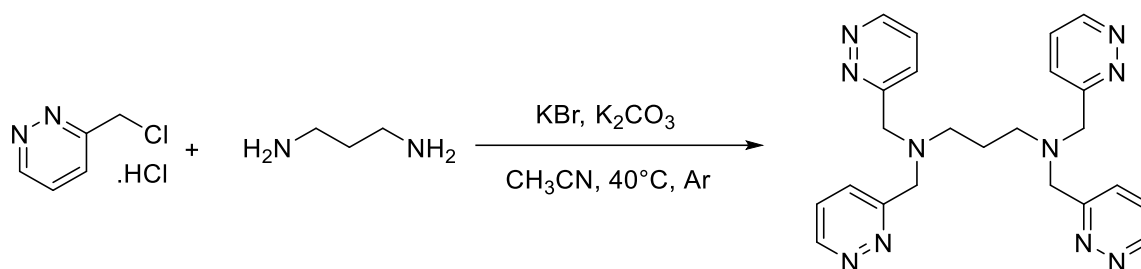
***N,N'*-bis(2-pyridylmethyl)-propane-1,2-diamine** : To a solution of 6.08 mL of 2-pyridinecarboxaldehyde (64 mmol) in 20 mL of methanol cooled in ice bath was added 2.67 mL (32 mmol) of propane-1,2-diamine. After stirring for 5 h at room temperature, the solution was cooled in ice bath. NaBH₄ (3.6288 g, 96 mmol) in 10 mL of methanol was added and the resulting solution was stirred overnight. The mixture was treated with HCl 6 M then with KOH 6 M to reach pH 14. The aqueous solution of the residue was extracted with CHCl₃. The organic layer was dried over sodium sulfate, filtered and the solvent removed under reduced pressure. The product was recovered to yield 4.415 g (54 %) of a yellow oil. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.46 – 8.41 (m, 1H), 7.59 – 7.53 (m, 1H), 7.24 – 7.19 (m, 1H), 7.12 – 7.05 (m, 1H), 3.80 (s, 2H), 2.64 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.69 (p, *J* = 7.0 Hz, 1H). Spectral data matched those of the reported compound.⁶⁵



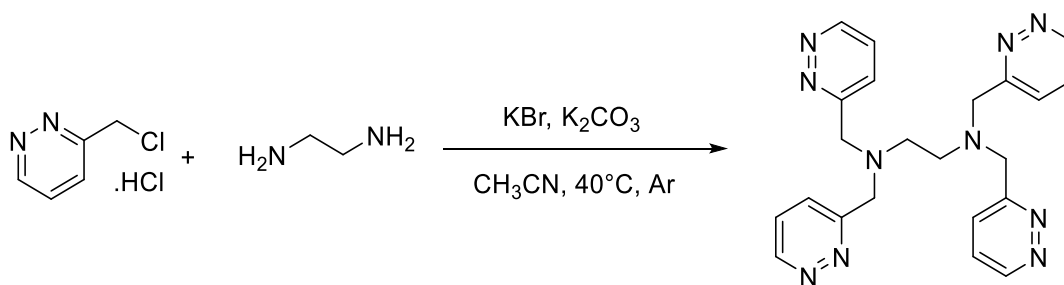


***N,N'*-bis(2-pyridylmethyl)-ethane-1,2-diamine** : To a solution of 6.08 mL of 2-pyridinecarboxaldehyde (64 mmol) in 20 mL of methanol cooled in ice bath was added 2.22 mL (32 mmol) of ethane-1,2-diamine. After stirring for 5 h at room temperature, the solution was cooled in ice bath. NaBH₄ (3.6288 g, 96 mmol) in 10 mL of methanol was added and the resulting solution was stirred overnight. The mixture was treated with HCl 6 M then with KOH 6 M to reach pH 14. The aqueous solution was extracted with CHCl₃. The organic layer was dried over sodium sulfate, filtered and the solvent removed under reduced pressure. The product was recovered to yield 3.501 g (42 %) of a yellow oil. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.56 (d, *J* = 4.2 Hz, 2H), 7.68 – 7.61 (m, 2H), 7.32 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 7.16 (dd, *J* = 7.0, 5.3 Hz, 2H), 3.92 (s, 4H), 2.82 (s, 4H). Spectral data matched those of the reported compound.⁴⁷

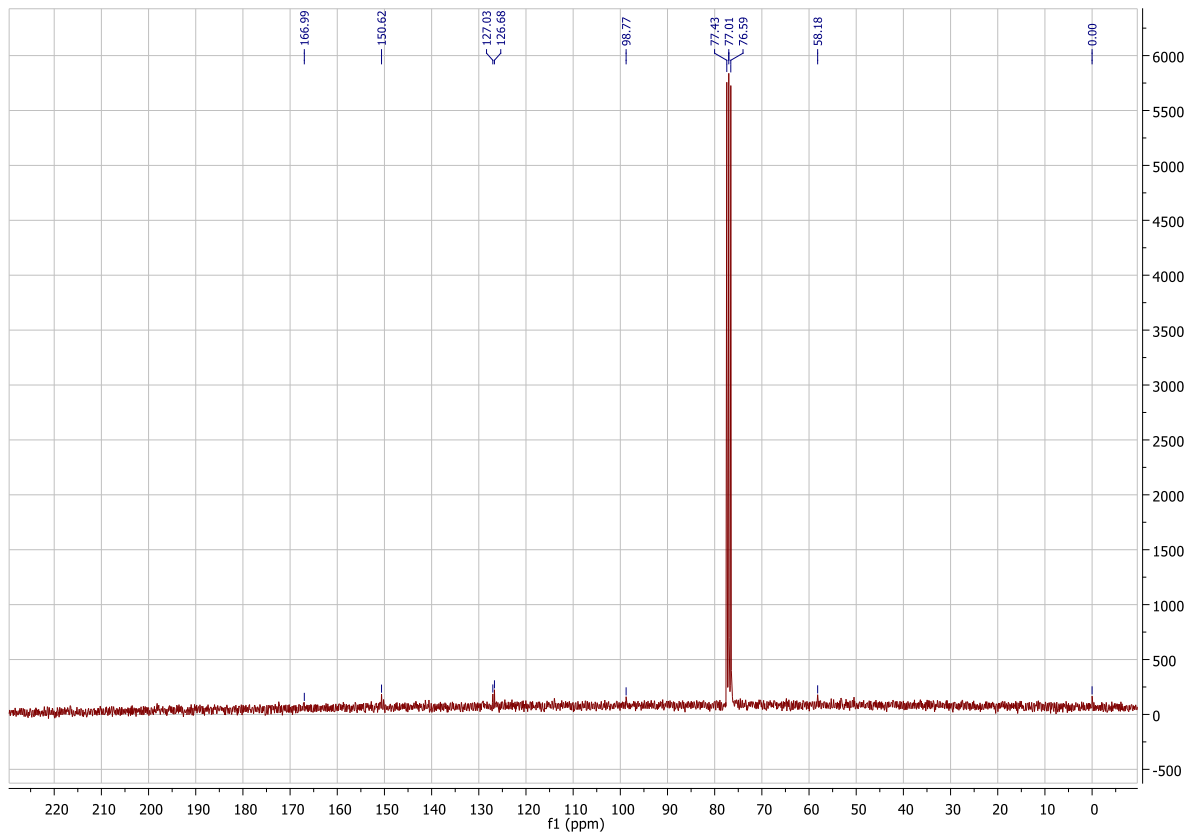
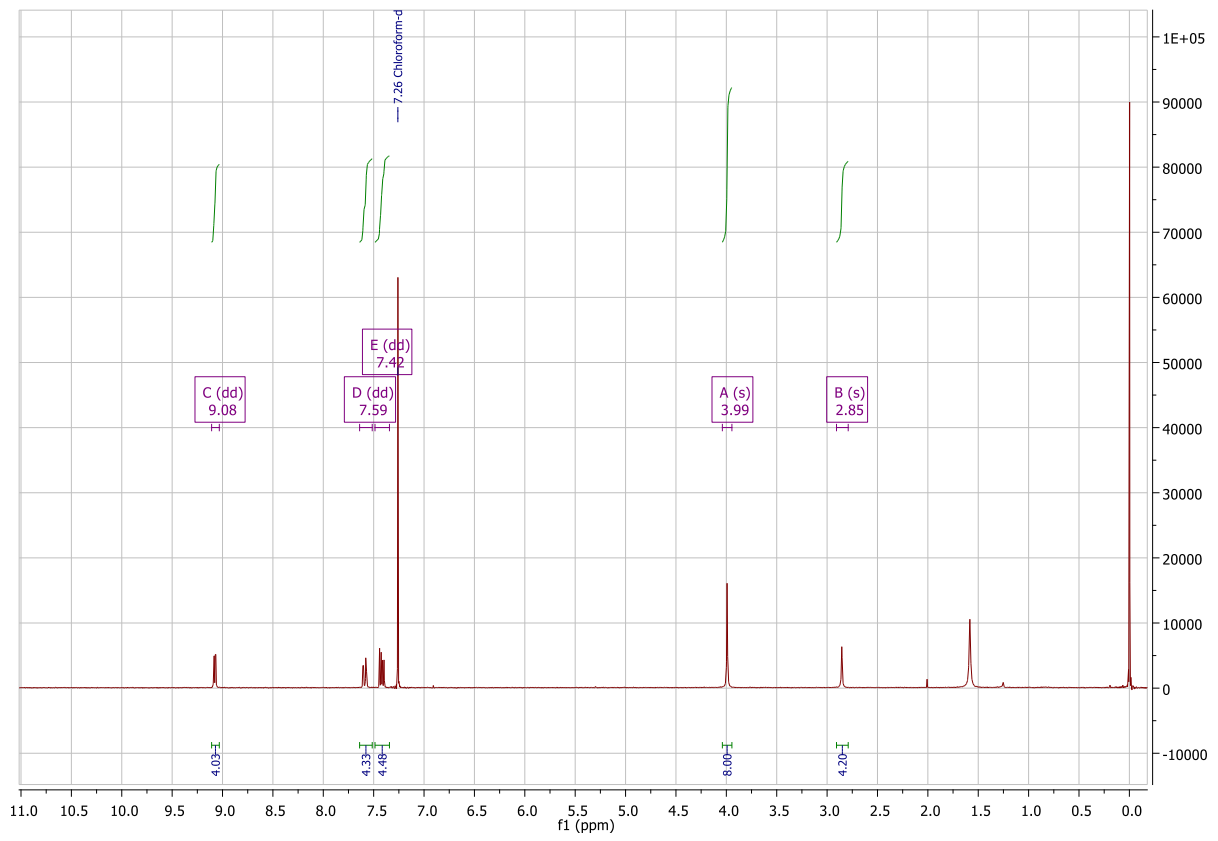


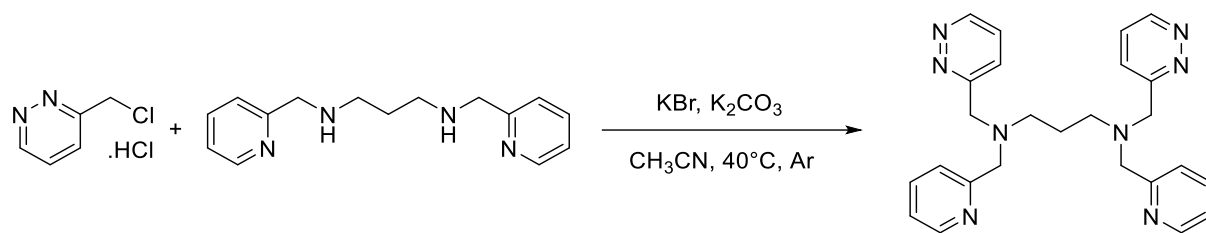


***N,N,N',N'*-Tetrakis(3-pyridazylmethyl)-1,3-propylenediamine (L2)** : : 3-(Chloromethyl)pyridazine hydrochloride (0.986 g, 6 mmol, 6 equiv.) was added to a mixture of 1,3-propylenediamine (0.06 g, 1 mmol, 1 equiv.), K₂CO₃ (1.658 g, 12 mmol, 12 equiv.) and KBr (1.077 g, 9 mmol, 9 equiv.) in dry acetonitrile (50 mL) at room temperature. The mixture was heated to 40°C and allowed to stir for 72 h under argon. The conversion of the reaction was monitored by ¹H NMR using DMSO-d₆ as solvent. Once the complete conversion of the 1,3-propylenediamine was observed, the reaction was cooled to room temperature and filtered through a Celite pad and the solid was washed twice with acetonitrile (2 × 100 mL). The solvent was removed under reduce pressure. The crude product was purified by recrystallization in acetonitrile. Due to difficulties encountered during purification, the pure product could not be isolated.

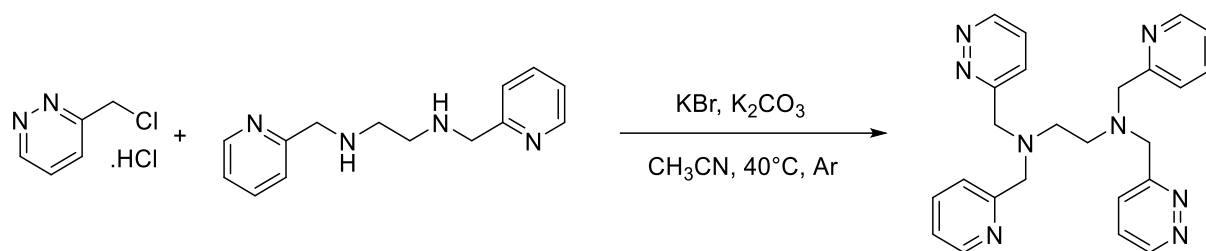


***N,N,N',N'*-Tetrakis(3-pyridazylmethyl)-1,2-ethylenediamine (L1)** : 3-(Chloromethyl)pyridazine hydrochloride (0.986 g, 6 mmol, 6 equiv.) was added to a mixture of 1,2-ethylenediamine (0.06 g, 1 mmol, 1 equiv.), K₂CO₃ (1.658 g, 12 mmol, 12 equiv.) and KBr (1.077 g, 9 mmol, 9 equiv.) in dry acetonitrile (50 mL) at room temperature. The mixture was heated to 40°C and allowed to stir for 72 h under argon. The conversion of the reaction was monitored by ¹H NMR using DMSO-d₆ as solvent. Once the complete conversion of the 1,2-ethylenediamine was observed, the reaction was cooled to room temperature and filtered through a Celite pad and the solid was washed twice with acetonitrile (2 × 100 mL). The solvent was removed under reduce pressure. The crude product was purified by recrystallization in acetonitrile to yield 53.1 mg (12 %). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.08 (dd, *J* = 4.9, 1.7 Hz, 4H), 7.59 (dd, *J* = 8.4, 1.7 Hz, 4H), 7.42 (dd, *J* = 8.4, 4.9 Hz, 4H), 3.99 (s, 8H), 2.85 (s, 4H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 166.99, 150.62, 127.03, 126.68, 98.77, 58.18. HRMS (ESI) *m/z* calculated for C₂₂H₂₄N₁₀ [M+Na]⁺ 451.20776; measured 451.20762.

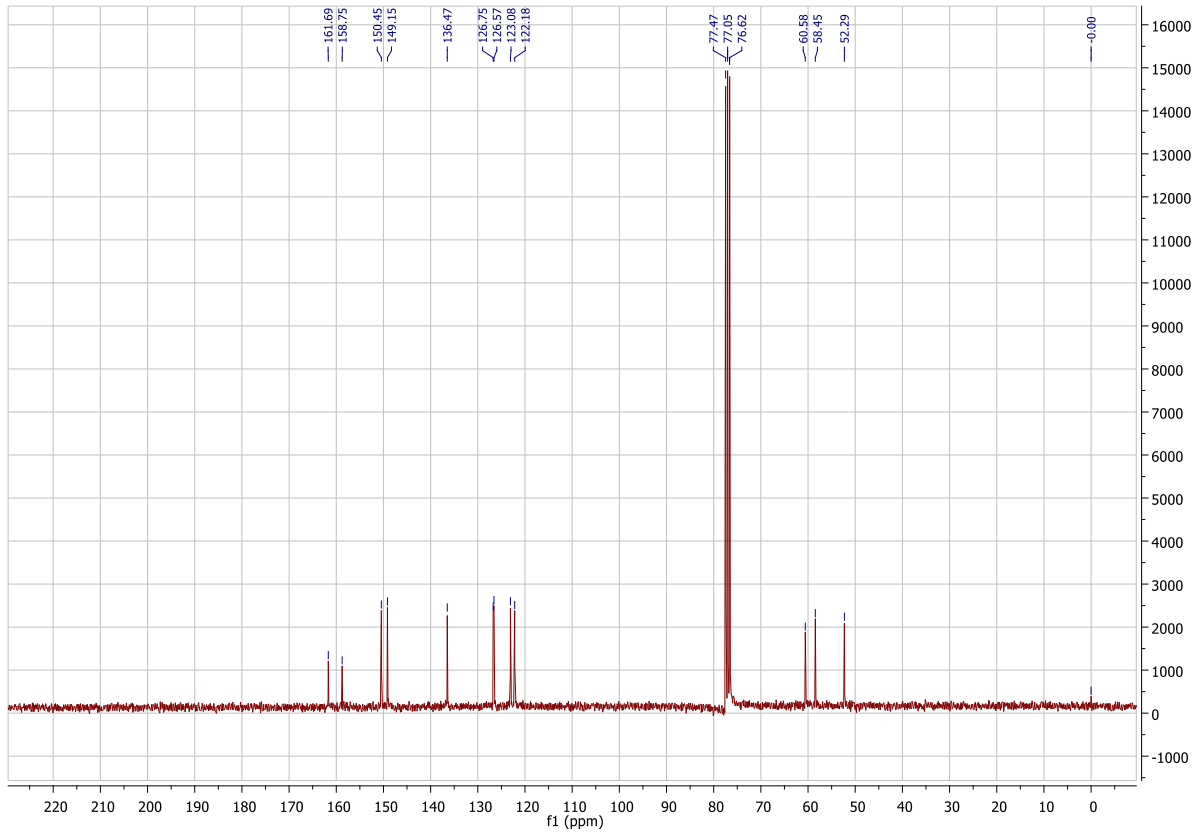
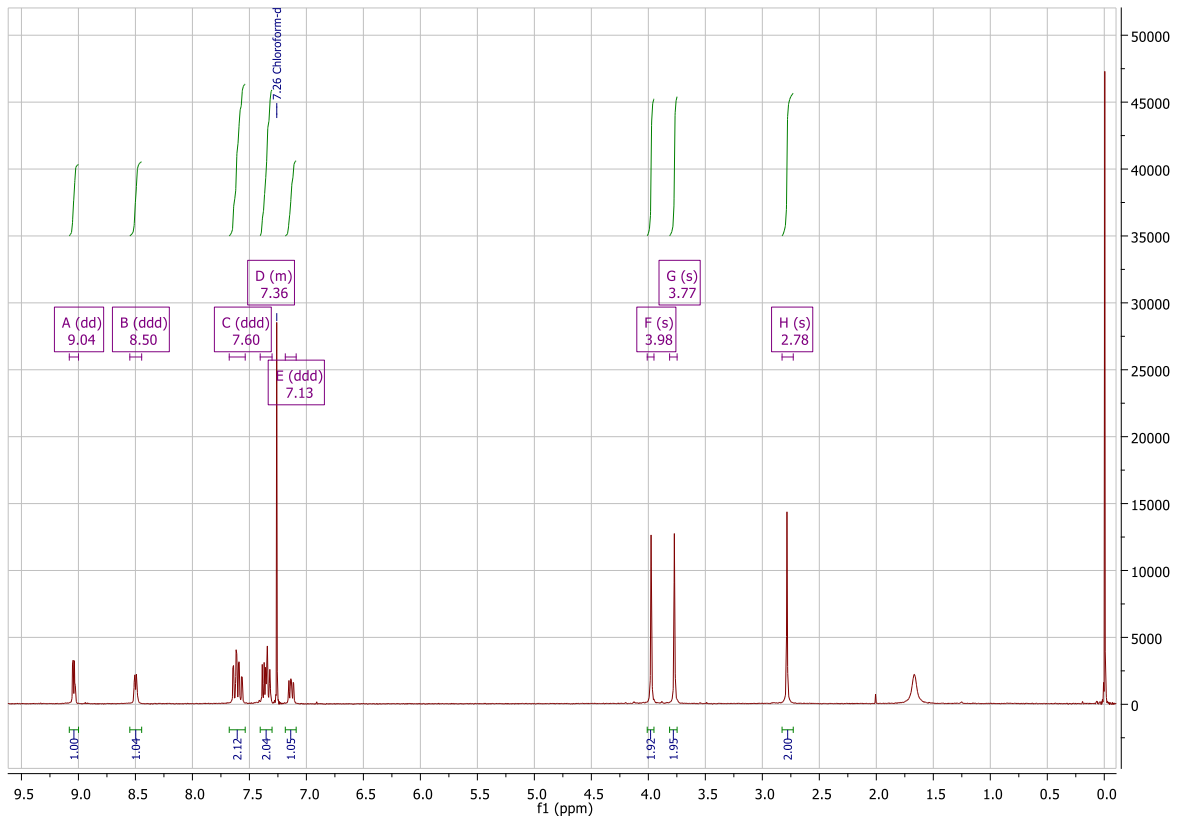


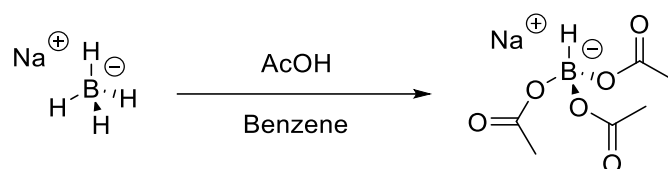


***N,N'*-Bis(3-pyridazylmethyl)-*N,N'*-bis(2-pyridylmethyl)propylenediamine (L4)** : 3-(Chloro-methyl)pyridazine hydrochloride (0.428 g, 2.6 mmol, 4 equiv.) was added to a mixture of *N,N'*-bis(2-pyridylmethyl)propylenediamine (0.166 g, 0.65 mmol, 1 equiv.), K₂CO₃ (1.077 g, 7.8 mmol, 12 equiv.) and KBr (0.696 g, 5.8 mmol, 9 equiv.) in dry acetonitrile (50 mL) at room temperature. The mixture was heated to 40°C and allowed to stir for 24 h under argon. The conversion of the reaction was monitored by ¹H NMR using DMSO-d₆ as solvent. Once the complete conversion of the *N,N'*-bis(2-pyridylmethyl)propylenediamine was observed, the reaction was cooled to room temperature and filtered through a Celite pad and the solid was washed twice with acetonitrile (2 × 100 mL). The solvent was removed under reduce pressure. The crude product was purified by recrystallization in acetonitrile. Due to difficulties encountered during purification, the pure product could not be isolated.

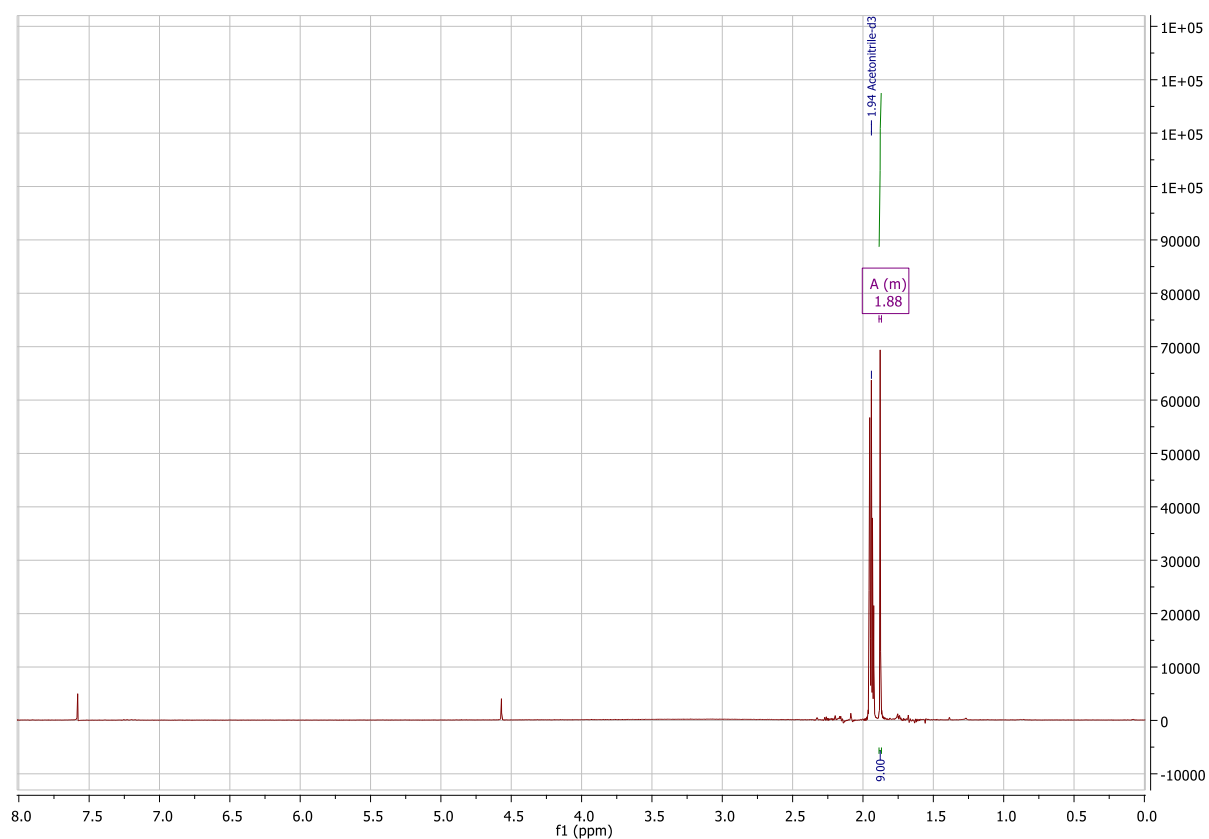


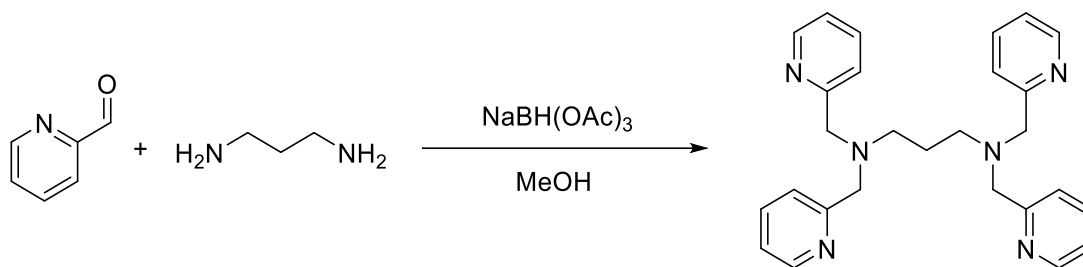
***N,N'*-Bis(3-pyridazylmethyl)-*N,N'*-bis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine (L3)** : 3-(Chloromethyl)pyridazine hydrochloride (0.428 g, 2.6 mmol, 4 equiv.) was added to a mixture of *N,N'*-bis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine (0.157 g, 0.65 mmol, 1 equiv.), K_2CO_3 (1.077 g, 7.8 mmol, 12 equiv.) and KBr (0.696 g, 5.8 mmol, 9 equiv.) in dry acetonitrile (50 mL) at room temperature. The mixture was heated to 40°C and allowed to stir for 24 h under argon. The conversion of the reaction was monitored by 1H NMR using $DMSO-d_6$ as solvent. Once the complete conversion of the *N,N'*-bis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine was observed, the reaction was cooled to room temperature and filtered through a Celite pad and the solid was washed twice with acetonitrile (2×100 mL). The solvent was removed under reduce pressure. The crude product was purified by recrystallization in acetonitrile to yield 0.239 g (86 %). 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.04 (dd, $J = 4.9, 1.7$ Hz, 2H), 8.50 (ddd, $J = 4.9, 1.7, 0.8$ Hz, 2H), 7.60 (ddd, $J = 9.4, 8.1, 1.7$ Hz, 4H), 7.40 – 7.32 (m, 4H), 7.13 (ddd, $J = 7.4, 4.9, 1.1$ Hz, 2H), 3.98 (s, 4H), 3.77 (s, 4H), 2.78 (s, 4H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 161.69, 158.75, 150.45, 149.15, 136.47, 126.75, 126.57, 123.08, 122.18, 60.58, 58.45, 52.29. HRMS (ESI) m/z calculated for $C_{24}H_{26}N_8$ $[M+H]^+$ 427.23532; measured 427.23532.



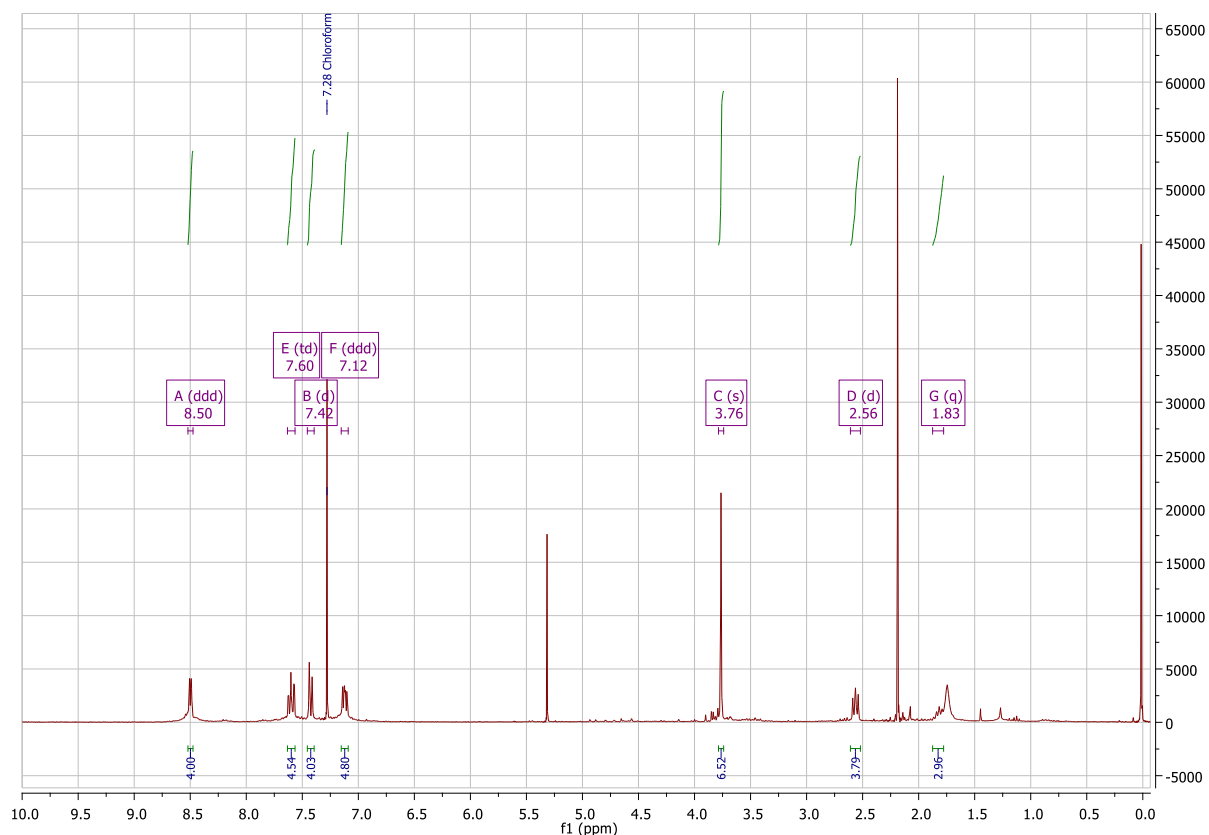


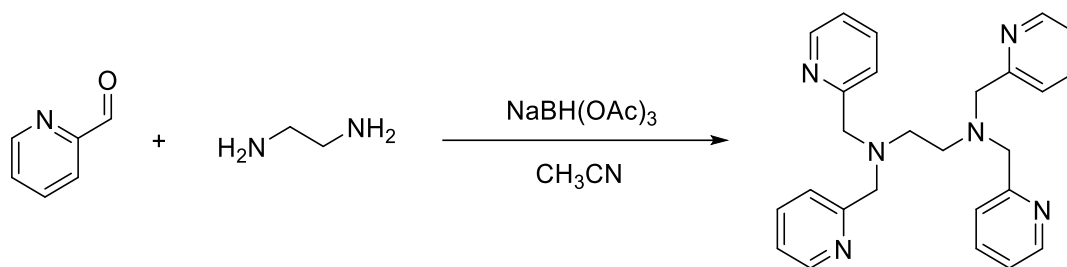
Sodium triacetoxyborohydride : Glacial acetic acid (9.308 g, 155 mmol, 3.1 equiv.) was to a mixture of crushed sodium borohydride (1.892 g, 50 mmol, 1 equiv.) in dry benzene (500 mL) at room temperature. After stirring 18 h under argon, the solution was filtered and the solid was washed twice with dry diethylether. 10.324 g of a white solid were recovered (Yield : quantitative). ^1H NMR (300 MHz, CD_3CN) δ 1.88 (s, 9H). Spectral data matched those of the reported compound.⁶⁶



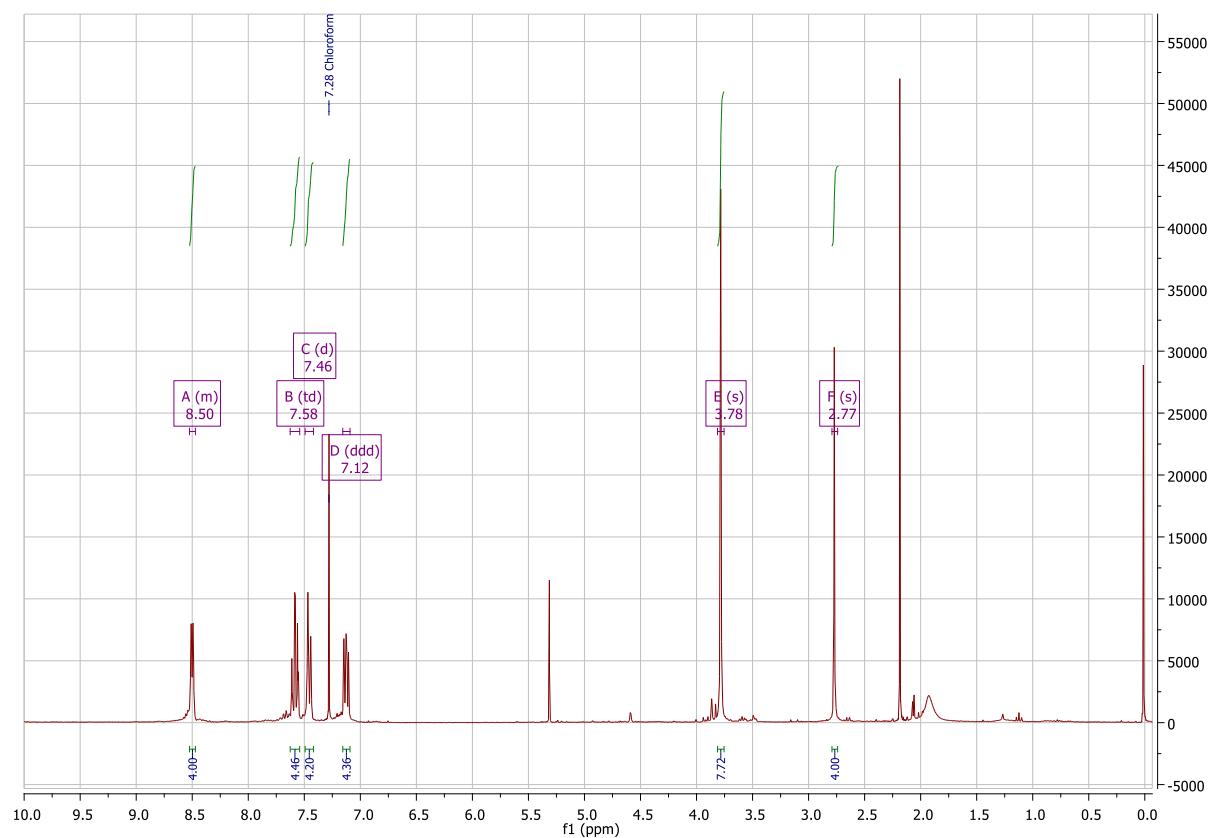


***N,N'*-tetrakis(2-pyridylmethyl)propylenediamine (L6)** : 2-pyridinecarboxaldehyde (4.28 g, 40 mmol, 4 equiv.) was added to a solution of propylenediamine (0.74 g, 10 mmol, 1 equiv.), in dry acetonitrile (20 mL) at room temperature. Then, the triacetoxyborohydride (12.72 g, 60 mmol, 6 equiv.) was added. The mixture was heated to 40°C and allowed to stir for 24 h under argon. Once the complete conversion of the 2-pyridinecarboxaldehyde was observed, the reaction was cooled to room temperature and extracted with DCM. The organic phases were combined, dried on Na_2SO_4 and the solvent was removed under reduce pressure to yield 0.946 g (22 %). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.50 (ddd, $J = 4.8, 1.7, 0.8$ Hz, 4H), 7.60 (td, $J = 7.6, 1.8$ Hz, 4H), 7.42 (d, $J = 7.8$ Hz, 4H), 7.12 (ddd, $J = 7.4, 4.9, 1.1$ Hz, 4H), 3.76 (s, 8H), 2.56 (d, $J = 7.2$ Hz, 4H), 1.83 (q, $J = 7.7$ Hz, 2H). Spectral data matched those of the reported compound.⁶⁵





***N,N'*-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine (L5):** 2-pyridinecarboxaldehyde (4.28 g, 40 mmol, 4 equiv.) was added to a solution of ethylenediamine (0.6 g, 10 mmol, 1 equiv.), in dry acetonitrile (20 mL) at room temperature. Then, the triacetoxyborohydride (12.72 g, 60 mmol, 6 equiv.) was added. The mixture was heated to 40°C and allowed to stir for 24 h under argon. Once the complete conversion of the 2-pyridinecarboxaldehyde was observed, the reaction was cooled to room temperature and extracted with DCM. The organic phases were combined, dried on Na_2SO_4 and the solvent was removed under reduce pressure to yield 0.706 g (17 %). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.52 – 8.47 (m, 4H), 7.58 (td, $J = 7.6, 1.8$ Hz, 4H), 7.46 (d, $J = 7.8$ Hz, 4H), 7.12 (ddd, $J = 7.3, 4.9, 1.1$ Hz, 4H), 3.78 (s, 8H), 2.77 (s, 4H). Spectral data matched those of the reported compound.⁴⁷



Bibliographie

- 1 S. Hermans, Chimie inorganique, *Université Catholique de Louvain* **2018**
- 2 A. Lejeune, Biologie cellulaire, *Université Catholique de Louvain* **2015**
- 3 Biological Inorganic Chemistry, *J. Chem. Educ.* **2007**, *84*, 9, 1432
- 4 C. L. Dupont, S. Yang, B. Palenik, P. E. Bourne, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 17822
- 5 A. Cvetkovic, A. L. Menon, M. P. Thorgersen, J. W. Scott, F. L. Poole, F. E. Jenney, W. A. Lancaster, J. L. Praissman, S. Shanmukh, B. J. Vaccaro, S. A. Trauger, E. Kalisiak, J. V. Apon, G. Siuzdak, S. M. Yannoni, J. A. Tainer, M. W. Adams, *Nature* **2010**, *466*, 779
- 6 X. Qian, Z. Xu, *Chem. Soc. Rev.* **2014**
- 7 S. Epsztejn, H. Glickstein, V. Picard, I. N. Slotki, W. Breuer, C. Beaumont, Z. I. Cabantchik, *Blood* **1999**, *94*, 3593
- 8 W. H. Koppenol, Free Radical *Biol. Med.* **1993**, *15*, 645
- 9 I. Keilin, T. Mann, *Nature* **1939**, *144*, 442–443
- 10 C. A. Blindauer, *Chem. Comm.* **2015**
- 11 W. Maret, Y. Li, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4682
- 12 C. Andreini, L. Banci, I. Bertini, A. J. Rosato, *Proteome Res.* **2006**, *5*, 196
- 13 R. Crichton, *Biol. Inorg. Chem.* **2019**, 339-362
- 14 <https://www.copenhagenconsensus.com/copenhagen-consensus-ii>, consultée le 23 mars **2020**
- 15 I. Cakmak, *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2009**, *23*, 281–289
- 16 F. M. Morel, J. R. Reinfeldt, S. B. Roberts, C. P. Chamberlain, J. G. Lee, D. Yee, *Nature* **1994**, *369*, 740–742
- 17 J. J. Braymer, D. P. Giedroc, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 59–66
- 18 F. Arnesano, L. Banci, I. Bertini, S. Ciofi-Baffoni, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2004**, 1583-1593
- 19 C. J. Fahrni, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 656
- 20 A. Priac, *Thesis Defence* **2014**
- 21 P. S. Donnelly, Z. Xiao, A. G. Wedd, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 128
- 22 T. E. Kehl-Fie, E. P. Skaar, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 218
- 23 A. Takeda, *Brain Res. Rev.* **2003**, *41*, 79
- 24 S. B. Mulrooney, R. P. Hausinger, *FEMS Microbiol. Rev.* **2003**, *27*, 239
- 25 E. Raux, H. L. Schubert, M. J. Warren, *Cell. Mol. Life Sci.* **2000**, *57*, 1880
- 26 S. Okamoto, L. D. Eltis, *Metallomics* **2011**, *3*, 963
- 27 E. J. Martinez-Finley, S. Chakraborty, S. J. B. Fretham, M. Aschner, *Metallomics* **2012**, *4*, 593
- 28 J. Liu, W. Qu, M. B. Kadiiska, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2009**, *238*, 209–214
- 29 https://fr.wikipedia.org/wiki/Karen_Wetterhahn, consultée le 27 avril 2020 et mise à jour le 21 novembre 2019
- 30 M. N. Elizabeth, J. L. Stephen, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 3443–3480

- 31 V. Balzani, P. Ceroni, A. Juris, Photochemistry and Photophysics : light absorption and excited-state deactivation, *Wiley-VCH*
- 32 J. M. Brown, *Molecular Spectroscopy*, Oxford University Press **1998**, New York
- 33 D. Wu, A. C. Sedgwick, T. Gunnlaugsson, E. U. Akkaya, J. Yoon, T. D. James, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 7105
- 34 Z. Xu, J. Yoon, D. R. Spring, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1996–2006
- 35 B. Valeur, I. Leray, *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *205*, 3-40
- 36 R.A. Bissell, A.P. de Silva, H.Q.N. Gunaratne, P.L.M. Lynch, G.E.M. Maguire, C.P. McCoy, K.R.A.S. Sandanayake, *Top. Curr. Chem.* **1993**, *168*, 223
- 37 M. Vérot, http://agregationchimie.free.fr/fichiers/Cours_marcus_2017.pdf consulté le 15 avril **2020**
- 38 R. Bergonzi, L. Fabbrizzi, M. Lichelli, C. Mangano, *Coord. Chem. Rev.* **1998**, *170*, 31–46
- 39 A.P. de Silva, H.Q.N. Gunaratne, T.E. Rice, S. Stewart, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1997**, 1891
- 40 B. Elias, Photochimie, *Université Catholique de Louvain* **2020**
- 41 K. P. Carter, A. M. Young, A. E. Palmer, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4564–4601
- 42 G. K. Walkup, S. C. Burdette, S. J. Lippard, R. Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5644.
- 43 S. C. Burdette, G. K. Walkup, B. Spingler, R. Y. Tsien, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7831
- 44 C. J. Chang, E. M. Nolan, J. Jaworski, S. C. Burdette, M. Sheng, S. J. Lippard, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 203
- 45 S. C. Burdette, C. J. Frederickson, W. Bu, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1778
- 46 D. Buccella, J. A. Horowitz, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4101–4114
- 47 T. Hirano, K. Kikuchi, Y. Urano, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6555.
- 48 C. A. Blindauer, M. T. Razi, S. Parsons, P. J. Sadler, *Polyhedron* **2006**, *25*, 513–520
- 49 Y. Mikata, M. Wakamatsu, S. Yano, *Dalton Trans.* **2005**, 545-550
- 50 Y. Mikata, A. Yamanaka, A. Yamashita, S. Yano, *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 7295-7301
- 51 A. E. Majzoub, C. Cadiou, I. Déchamps-Olivier, B. Tinant, F. Chuburu, *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 4029–4038
- 52 H. Nouri, C. Cadiou, S. Chevreux, I. Déchamps-Olivier, F. Lachaud, F. Chuburu, G. Lemercier, *Dalton Trans.* **2013**
- 53 T.-T. Zhang, J.-T. Liu, L.-Z. Zhang, J.-M. Chu, B.-X. Zhao, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 16973
- 54 Y. Ding, Y. Xie, X. Li, W. Zhang, W. Zhu, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 5431–5433

- 55 P. Li, X. Zhou, L. Yang, X. Tang, W. Dou, Q. Zhao, W. Liu, *Dalton Trans.* **2014**, 43, 706
- 56 E. Tomat, S. Lippard, *J. Inorg. Chem.* **2010**, 49, 9113
- 57 B. Tang, H. Huang, K. Xu, L. Tong, G. Yang, X. Liu, L. An, *Chem. Commun.* **2006**, 3609
- 58 O. Sénèque, M.-N. Rager, M. Giorgi, O. Reinaud, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 6183-6189
- 59 A. F. Martins, V. C. Jordan, S. Chirayil, S. Zhang, S.-T. Lo, X. Wen, A. D. Sherry, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, 140, 17456–17464
- 60 K. Saha, S. S. Agasti, C. Kim, X. Li, V. M. Rotello, *Chem. Rev.* **2012**, 112, 2739–2779
- 61 E. L. Que, R. Bleher, S. A. Garwin, A. R. Bayer, T. K. Woodruff, T. V. O'Halloran, *Nat. Chem.* **2015**, 7, 130-139
- 62 R. G. Marvin, J. L. Wolford, M. J. Kidd, S. Murphy, J. Ward, E. L. Que, M.L Mayer, J. E. Penner-Hahn, K. Haldar, T. V. O'Halloran, *Chem. Biol.* **2012**, 19, 731
- 63 C. C. Woodroffe, A. C. Won, S. Lippard, *J. Inorg. Chem.* **2005**, 44, 3112
- 64 W. Qiao, M. Mooney, A. J. Bird, D. R. Winge, D. J. Eide, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, 103, 8674
- 65 A. J. Lam, F. St-Pierre, Y. Gong, J. D. Marshall, P. J. Cranfill, M. A. Baird, M. R. McKeown, J. Wiedenmann, M. W. Davidson, M. J. Schnitzer, R. Y. Tsien, M. Z. Lin, *Nat. Methods* **2012**, 9, 1005
- 66 A. Hammoud, J.-B. Nshimyumuremyi, J. Bourotte, F. Lucaccioni, K. Robeyns, M. M. Dîrtu, Y. Garcia, M. Singleton, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2018**, 3253–3263
- 67 L. Saikia, *Synlett* **2010**, 11, 1729-1730
- 68 <https://www.organic-chemistry.org/namedreactions/finkelstein-reaction.shtml>
consultée le 02 juin 2020

UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN
Faculté des sciences

Place des sciences, 2 bte L6.06.01, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgique | www.uclouvain.be/sc