



**HAL**  
open science

# Synthèse et étude du mécanisme d'action cytotoxique de complexes organométalliques d'iridium à ligand arène

Robin Ramos

## ► To cite this version:

Robin Ramos. Synthèse et étude du mécanisme d'action cytotoxique de complexes organométalliques d'iridium à ligand arène. Chimie de coordination. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS463 . tel-03727628

**HAL Id: tel-03727628**

**<https://theses.hal.science/tel-03727628>**

Submitted on 19 Jul 2022

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

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

# Sorbonne Université

École doctorale n°406 – Chimie Moléculaire Paris Centre

*Institut Parisien de Chimie Moléculaire / Équipe Chembio*

*Centre de Recherche Saint-Antoine / Équipe Signalisation TGF- $\beta$  et Cancer*

## **Synthèse et étude du mécanisme d'action cytotoxique de complexes organométalliques d'iridium à ligand arène**

Par Robin Ramos

Thèse de doctorat du programme Interfaces Pour le Vivant

Dirigée par Dr. Michèle Salmain et Pr. Joëlle Sobczak-Thépot

Présentée et soutenue publiquement le 06/12/2021

Devant un jury composé de :

Pr. Ewen Bodio (Rapporteur)

Pr. Sylvie Fournel (Rapporteur)

Pr. Arnaud Gautier (Examineur)

Pr. Gilles Lemercier (Examineur)

Dr. Michèle Salmain (Directrice)

Pr. Joëlle Sobczak-Thépot (Co-directrice)

Dr. Candice Botuha (Invitée)

Dr. Anthi Karaiskou (Invitée)

*I started to play him this chord, 59 times the same chord. Diaghilev was a bit surprised.*

*He didn't want to offend me, he asked me only one thing, which was very offending.*

*He asked me: 'Will it last a very long time this way?' and I said, 'To the end, my dear!'*

*And he was silent, because he understood that the answer was serious.*

Igor Stravinsky

# Remerciements

Je remercie tout d'abord les membres du jury de leur intérêt pour ce projet de recherche, dont les rapporteurs Pr. Ewen Bodio et Pr. Sylvie Fournel, qui ont accepté de lire ce manuscrit en cette période de rentrée scolaire. J'espère y faire preuve de clarté, de concision et de précision.

Je remercie les directeurs d'unités, Pr. Louis Fensterbank (IPCM) et Pr. Bruno Fève (CRSA) qui ont facilité mon accueil et mon insertion au sein des différents laboratoires, ainsi que les directeurs d'équipes Pr. Serge Thorimbert et Dr. Céline Prunier pour leurs précieux conseils ainsi que la bienveillance dont ils ont fait preuve à mon égard.

Je souhaite exprimer ma gratitude envers différents collaborateurs qui ont beaucoup apporté à nos réflexions par leurs diverses expertises : Dr. Kevin Passador, Dr. Jeremy Zimbron, Cédric Przybylski, Pr. Damian Plażuk, Dr. Lise-Marie Chamoreau, Jérémy Forte, Claire Troufflard, Benoît Caron, Annie Munier, Angélique Vinit, Romain Morichon, Jean-François Gilles, Dr. Jérémie Gautheron, Pr. Sylvie Demignot.

Je tiens à remercier les nombreuses stagiaires qui ont contribué au projet : Sabrina Messaoud (M1), Anya Saidi-Sief (L2), Yaşine Ben Hadj (L3), Romy Dubosclard (M1). Elles ont chacune à leur manière apporté une pierre à l'édifice, je remercie tout particulièrement Lucile Diot (M1) qui est une biologiste et une pâtissière remarquable. Enfin mes collègues doctorants m'ont prodigué un soutien constant, malgré ma présence intermittente : Anissa Beghennou (chimiste hors-pair), Dr. Nawel Kaabi, Po Kai Ang, Sadek Amhaz, Tiphaine Perron, Edwyn Remadna, Elodie David et Juliane Selot.

Je suis infiniment reconnaissant envers mes encadrantes et mes directrices : Candice Botuha et Anthi Karaiskou partagent une rigueur scientifique que j'admire et ont su me pousser à donner le meilleur de moi-même durant ces 45 mois. Enfin Joëlle Sobczak-Thépôt<sup>a</sup> et Michèle Salmain<sup>b</sup>, merci pour les excellents thés<sup>a,b</sup>, les carrés de chocolat<sup>a</sup> salvateurs et le žurek<sup>b</sup> inoubliable, merci pour les longues conversations scientifiques<sup>a,b</sup> qui furent si enrichissantes et motivantes menant parfois à des fou-rires<sup>a</sup>, merci pour les manips téléguidées<sup>a</sup> et les manipscopilotées<sup>b</sup> menant parfois à des fou-rires<sup>b</sup>, merci pour votre gentillesse<sup>a,b</sup>, votre bonne humeur<sup>a,b</sup> et vos idées de génie<sup>a,b</sup>. Je remercie enfin ma famille et mes proches de leur curiosité pour mon travail, et parfois d'y avoir apporté leur grain de sel.

# Sommaire

Remerciements.....	2
Sommaire	3
Introduction générale.....	6
1. Les chimiothérapies anticancéreuses.....	6
2. Les complexes organométalliques pour des applications en biologie.....	10
3. Les complexes d'iridium à ligand arène ou cyclopentadiényle.....	15
4. Objectif des travaux et méthodologie.....	18
<b>Chapitre 1. Synthèse de complexes d'iridium semi-sandwich et étude de la relation structure-activité</b>	<b>19</b>
Introduction.....	19
1. Étude bibliographique de la relation structure-activité de complexes semi-sandwich d'iridium.....	19
1.1. Le ligand arène.....	19
1.2. Le ligand chélatant.....	19
1.3. Le ligand monodente.....	20
2. Les ERO dans le contexte cellulaire.....	22
2.1. Chimie des ERO.....	22
2.2. Production et détoxification physiologique des ERO dans la cellule.....	24
2.3. Stress oxydant et apoptose.....	25
2.4. Le stress oxydant comme nouvelle stratégie antitumorale.....	26
Résultats et Discussion.....	28
1. Chimiothèque, caractérisation et réactivité.....	28
1.1. Synthèse et nomenclature.....	28
1.2. Données physicochimiques et réactivité.....	34
1.3. Propriétés catalytiques de Ir <sup>0</sup> -10.....	40
2. Étude de la cytotoxicité des complexes.....	43
2.1. Morphologie.....	43
2.2. Détermination de l'IC <sub>50</sub> .....	45
2.3. Inhibition de prolifération.....	46
2.4. Caractérisation de la mort cellulaire.....	47
3. Étude de la réponse cellulaire induite par les complexes dans la lignée HeLa.....	49
3.1. Production intracellulaire de peroxyde d'hydrogène.....	49
3.2. Étude du cycle cellulaire.....	52
Conclusion.....	53
Partie expérimentale.....	56

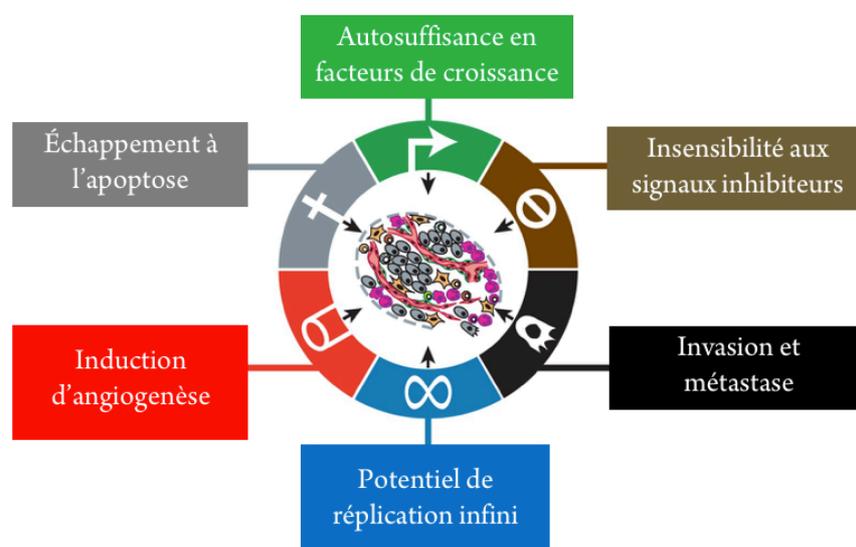
1. Synthetic procedures and characterization .....	56
2. Cell culture conditions and biological assays .....	70
<b>Chapitre 2. Étude de la toxicité d'un complexe sélectionné.....</b>	<b>73</b>
<u>Introduction.....</u>	<u>73</u>
1. Les différentes voies de mort cellulaires .....	73
2. Nrf2 et la réponse au stress oxydant.....	76
3. Le rôle de PIDD dans la survie ou la mort cellulaire induite par les ERO.....	77
<u>Résultats et Discussion.....</u>	<u>80</u>
1. Étude de la toxicité de IrO2.....	80
1.1. IC <sub>50</sub> de IrO2 sur différentes lignées cellulaires.....	80
1.2. Clonogénicité sur lignée HeLa .....	82
1.3. Aspects morphologiques .....	86
2. Analyse de la mort cellulaire induite par IrO2 .....	89
2.1. Étude cinétique .....	89
2.2. Étude de la signalisation de mort cellulaire.....	94
3. Étude de la réactivité de IrO2 .....	100
<u>Conclusion et perspectives .....</u>	<u>103</u>
<u>Partie expérimentale.....</u>	<u>107</u>
<b>Chapitre 3. Conception de métallo-drogues fluorescentes.....</b>	<b>111</b>
<u>Introduction.....</u>	<u>111</u>
1. Fluorophores de type BODIPY .....	111
2. Composés BODIPY utilisés en biologie .....	113
3. Trafic membranaire intracellulaire .....	114
4. Études de la fluorescence de métallo-drogues <i>in cellulo</i> .....	116
<u>Résultats et Discussion.....</u>	<u>119</u>
1. Synthèse et caractérisation.....	119
1.1. Synthèse de complexes d'iridium semi-sandwich fluorescents.....	119
1.2. Propriétés spectrales des complexes Iridium-BODIPY (ligand chélatant) .....	126
1.3. Cytotoxicité de IrB8.....	131
2. Localisation intracellulaire de IrB8.....	134
2.1. IrB8 s'accumule rapidement dans des cellules par diffusion passive .....	134
2.2. IrB8 se localise dans les organites membranaires.....	138
2.3. IrB8 est véhiculé par les gouttelettes lipidiques dans le lysosome .....	144
2.4. IrB8 perturbe le trafic intracellulaire .....	147
2.5. IrB8 donne des adduits fluorescents avec des protéines .....	153
<u>Conclusion .....</u>	<u>159</u>

<u>Partie expérimentale</u> .....	162
1. Synthesis of various fluorescent iridium compounds.....	162
2. Synthesis and intracellular fate of IrB8.....	171
2.1. Synthesis and characterization.....	171
2.2. Cell culture, proliferation monitoring, internalization of IrB8.....	174
2.3. Fluorescent labelling with IrB8.....	175
2.4. Western blots and immunoprecipitation.....	176
<b>Chapitre 4. Synthèse et applications d'un complexe d'iridium clickable</b> .....	<b>180</b>
<u>Introduction</u> .....	180
<u>Résultats</u> .....	183
1. Synthèse d'un complexe comportant une fonction bio-orthogonale.....	183
2. Synthèse du partenaire fluorogène.....	186
3. Applications.....	187
3.1. Optimisation de la réaction de CuAAC <i>in cellulo</i> .....	187
3.2. Effet de IrN <sub>3</sub> sur le cytosquelette d'actine.....	190
3.3. Analyse des adduits de IrN <sub>3</sub> sur les protéines.....	193
<u>Perspectives</u> .....	195
1. Identification des protéines cibles de IrN <sub>3</sub> .....	195
2. Interactions avec le cytosquelette d'actine.....	196
<u>Partie expérimentale</u> .....	198
1. Design of a clickable iridium complex.....	198
2. Applications of a clickable iridium complex.....	201
<b>Conclusion générale</b> .....	<b>203</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>206</b>
<b>Abréviations</b>	<b>214</b>
<b>Table des illustrations</b> .....	<b>216</b>

# Introduction générale

## 1. Les chimiothérapies anticancéreuses

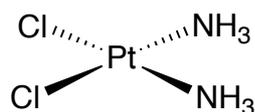
Le cancer est une maladie complexe qui représente en France la première cause de décès chez l'homme et la deuxième chez la femme. On parle généralement "du" cancer mais il existe en réalité plus d'une centaine de types de cancers. Cette maladie résulte de mutations génétiques et peut toucher presque tous les types de tissus. Une cellule cancéreuse produit souvent ses propres facteurs de croissance (stimulation autocrine) et va donc se diviser de façon indéfinie. Les gènes suppresseurs de tumeurs (en particulier *TP53* ou *RB*) y sont mutés ou leurs produits inactivés ce qui signifie que la cellule cancéreuse n'est plus sensible aux signaux inhibiteurs de croissance, entraînant une incapacité à stopper la prolifération cellulaire. De plus, on observe souvent que la cellule tumorale échappe à l'apoptose, la mort cellulaire programmée permettant de limiter la croissance et la prolifération des cellules. Les cellules tumorales sont très énergivores, elles peuvent provoquer la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse) pour satisfaire leurs besoins et réguler un microenvironnement propice à leur prolifération. Elles peuvent enfin développer un phénotype invasif et migratoire qui leur permet d'envahir d'autres tissus : c'est le processus de métastase. La mortalité des cancers provient souvent des métastases qui affectent différents organes au cours de la progression de la maladie.



**Figure 1.** Principales caractéristiques du cancer ("hallmarks") d'après Weinberg et coll., 2011

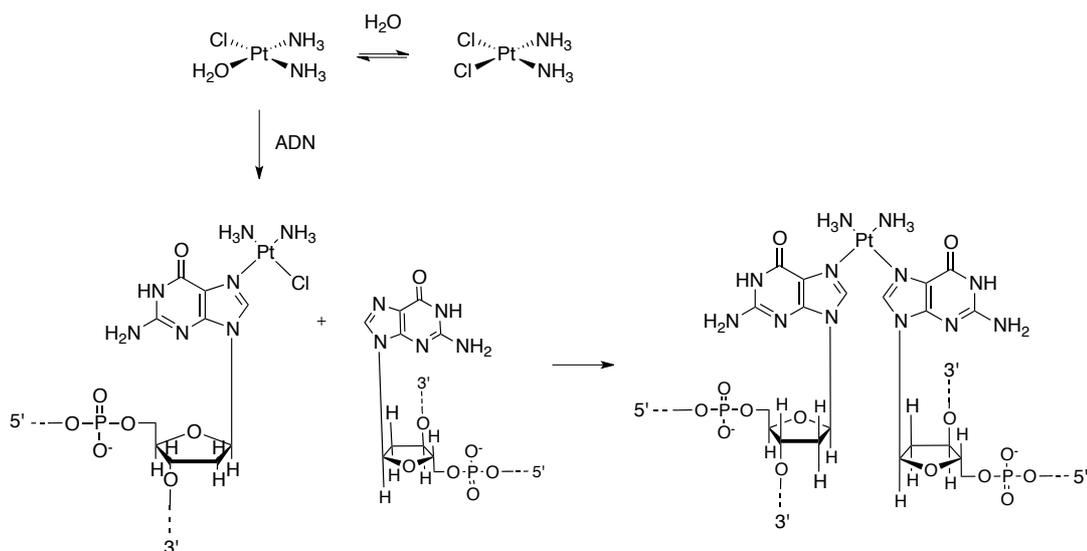
Parmi les caractéristiques communes à toutes les lignées tumorales, on trouve donc la capacité à proliférer de manière illimitée ainsi que l'échappement aux systèmes de régulation.<sup>[1]</sup> Plus récemment, deux nouvelles caractéristiques ont émergé dans la littérature : l'échappement au système immunitaire et la dérégulation des processus énergétiques<sup>[2]</sup> qui fournissent un socle commun pour comprendre et rationaliser la remarquable diversité des maladies néoplasiques et concevoir de nouvelles thérapies.

Trois méthodes sont utilisées pour traiter le cancer : la chirurgie d'exérèse consiste à exciser la zone tumorale, la radiothérapie consiste à appliquer des rayonnements pour détruire les cellules cancéreuses, enfin la chimiothérapie désigne l'usage de substances chimiques. Très souvent une combinaison de ces trois traitements est prescrite aux patients. Enfin on observe un intérêt croissant pour des thérapies impliquant des processus biologiques ciblés comme l'immunothérapie ou la vaccination, encore minoritaires dans le paysage thérapeutique. Concernant les médicaments de chimiothérapie, leur cible est généralement bien précise : action sur l'ADN en bloquant la réplication et en empêchant la transcription, action sur le cytosquelette des cellules en interférant avec la mitose, action sur les protéines kinases participant à la signalisation mitogène qui déclenche le cycle de division cellulaire. Les agents thérapeutiques cytotoxiques représentent la quasi-totalité des chimiothérapies anticancéreuses auxquelles les cliniciens ont actuellement recours, bien que cet arsenal ne suffise pas à couvrir le spectre des maladies du cancer.



**Schéma 1.** Structure du CDDP

Le *cis*-diaminedichloroplatine (II) (CDDP) ou Cisplatine, dont la structure est représentée dans le schéma 1 est l'une des molécules anticancéreuses les plus anciennes. Après sa découverte en 1965 pour ses propriétés cytotoxiques et antibactériennes,<sup>[3]</sup> il n'a fallu qu'une décennie pour qu'elle soit testée chez l'homme.<sup>[4]</sup> Cette chimiothérapie reste aujourd'hui efficace et parmi les plus employées. Il est admis que son mécanisme d'action principal cible l'ADN des cellules à taux de prolifération élevé, ce qui fait de lui un anti-mitotique. Au niveau moléculaire, le CDDP est capable d'échanger un ligand chlorido avec l'eau (aquation) dans le cytoplasme des cellules. Sous cette forme, il pénètre dans le noyau et peut alors ponter l'ADN par coordination à deux atomes d'azote de purines (Schéma 2).



**Schéma 2.** Mécanisme d'action anti-mitotique proposé pour le CDDP

Ce complexe métallique est un agent relativement peu sélectif qui affecte toutes les cellules à prolifération rapide comme le bulbe pileux, le système hématopoïétique ou la muqueuse intestinale, de sorte qu'il présente une toxicité générale à l'origine de sévères effets secondaires. De plus, certains cancers comme le carcinome ovarien, le cancer du sein ou de la prostate développent une résistance à ce médicament. Au fil des années, de nombreux mécanismes généraux de résistance au CDDP et à d'autres chimiothérapies ont été mis au jour, ils ne limitent pas seulement l'efficacité des thérapies mais exposent aussi les patients à une sérieuse toxicité pour les tissus sains. Parmi les mécanismes majeurs de résistance, on trouve l'efflux accru de la molécule par des transporteurs de la superfamille ABC (pompes d'efflux), des modifications chimiques notamment assurées par le cytochrome P450 qui rendent le traitement inefficace ou encore la régulation négative de la cible de la molécule.<sup>[5]</sup> Bien que modéliser la résistance à une seule drogue soit faisable, la plupart des patients atteints de cancer sont en réalité traités avec des combinaisons de médicaments. Les multi-thérapies à base d'agent platineux sont notamment connues pour donner de meilleurs résultats quant à la survie des patients<sup>[6]</sup> et sont largement utilisées.

Certains cancers comme le cancer de la prostate ou du sein sont à cet égard très bien traités, malgré leur forte incidence. Le taux de survie relative après 5 ans (%) est un indicateur communément utilisé pour caractériser le pronostic des cancers. Ces taux de survie sont donnés pour certains cancers dans le tableau 1, d'après des données établies en France par le Réseau Francim, le service de biostatistique des Hospices civils de Lyon (HCL), l'Institut de veille sanitaire (InVS) et l'Institut national du cancer (INCa) entre 1989 et 2007.

	Incidence (2005) <sup>[7]</sup>	Taux de survie relative après 5 ans <sup>[8]</sup>
<b>Bon pronostic</b>		
Prostate	62 245	80 %
Sein	49 814	85 %
Mélanomes	7 401	87 %
<b>Pronostic intermédiaire</b>		
Côlon-rectum	37 413	56 %
Ovaire	4 374	40 %
Col utérus	3 068	70 %
<b>Mauvais pronostic</b>		
Poumon plèvre	31 557	14 %
Pancréas	7 218	6 %
Foie	6 433	8 %

**Tableau 1.** Données françaises de l'incidence de certains cancers et leur taux de survie après 5 ans

Les données épidémiologiques documentent des inégalités territoriales mais aussi sociales, notamment en ce qui concerne la prévention, l'accès au dépistage et le retard au diagnostic des cancers. Il est à noter que ces données varient aussi grandement entre pays riches et pays pauvres. En effet, un des enjeux majeurs du cancer est économique, avec des répercussions considérables et en augmentation. Par exemple, le coût du cancer pour l'année 2010 aux États-Unis était estimé à 1 160 milliards de dollars,<sup>[9]</sup> cette dimension économique constitue également l'un des enjeux de la recherche scientifique. Pour faire face à ces inconvénients, il est nécessaire de trouver de nouvelles alternatives thérapeutiques à la lumière de l'état de l'art actuel. Les agents cytotoxiques employés doivent être plus sélectifs, leur mécanisme d'action doit être multi-cible afin de pouvoir contourner les effets de résistance. L'étude des processus d'oxydoréduction (redox) cellulaires et leurs dérégulations dans le contexte tumoral constituent à cet égard un domaine prometteur. En effet, la modulation du stress oxydant semble être une stratégie innovante<sup>[10,11]</sup> pour viser sélectivement les cellules tumorales, elle sera abordée plus précisément dans le premier chapitre.

Il existe plus d'une centaine de chimiothérapies et la majorité d'entre elles sont des molécules organiques avec un effet antiméiotique. À titre d'exemples, Etoposide (ou VP-16) est un inhibiteur de la Topoisomérase II, une enzyme permettant le démantèlement des nœuds de l'ADN. De même, le Paclitaxel (Taxol) stabilise les microtubules en inhibant leur dépolymérisation et est donc classé comme anti-méiotique, il est utilisé pour traiter de nombreux cancers. Enfin, certains traitements hormonaux sont prescrits contre des cancers du sein ou de la prostate.

## 2. Les complexes organométalliques pour des applications en biologie

L'exploration de métaux de transition alternatifs au platine constitue une avancée majeure dans la recherche de nouveaux agents biologiques.<sup>[12-14]</sup> Elle permet de puiser dans une large variété de modes de réactivité à la lumière de la chimie de coordination contemporaine. Par conséquent, les agents à base de métaux sont largement étudiés pour des applications en chimiothérapie cytotoxique avec des mécanismes d'action originaux et des propriétés redox intéressantes. Par ailleurs, il a été montré que ces espèces pouvaient interagir avec l'interface système immunitaire/tumeur et inverser l'échappement des cancers à la réponse immunitaire (*immune evasion*).<sup>[15]</sup>

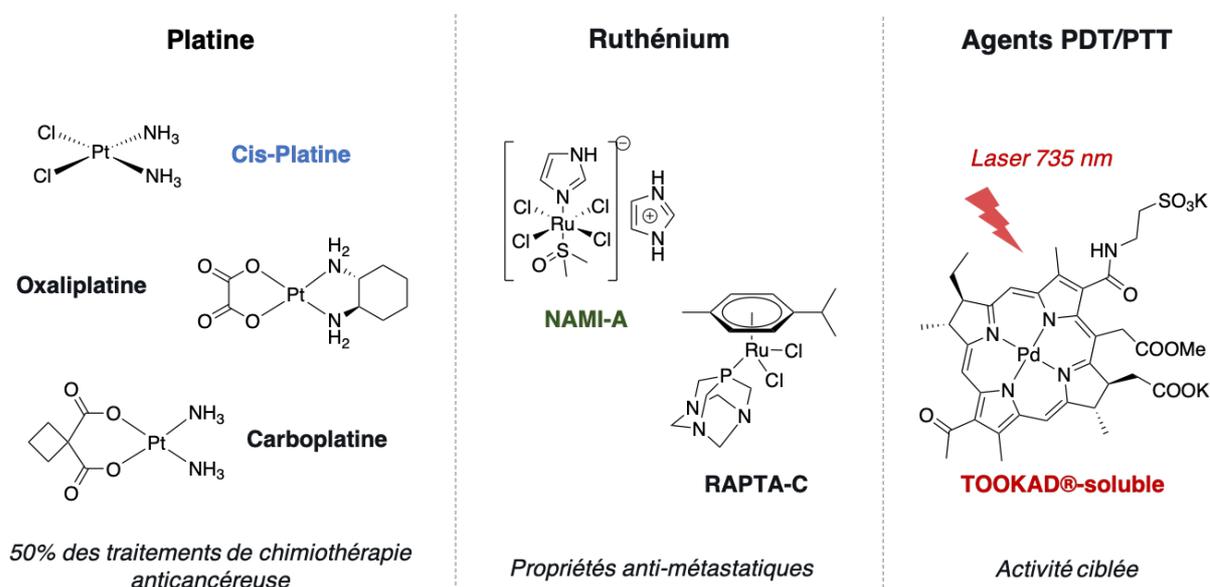


Schéma 3. Quelques complexes organométalliques utilisés en chimiothérapie

Les agents cytotoxiques platineux représentent environ la moitié des chimiothérapies actuellement utilisées. Le Cisplatine et le Carboplatine sont principalement employés pour traiter des cancers de cellules germinales du sein ou du poumon, l'Oxaliplatine est en revanche exclusivement indiqué pour le traitement des cancers colo-rectaux et gastro-intestinaux. L'Oxaliplatine ne tue pas les cellules via un endommagement de l'ADN mais plutôt en induisant un stress de la biogénèse des ribosomes.<sup>[16]</sup> Cette différence de mécanisme d'action explique les implémentations cliniques distinctes entre ces agents cytotoxiques et pourrait permettre de mieux comprendre les processus mis en jeu lors du traitement de tumeurs malignes. Les bénéfices de cette stratégie basée sur un rationnel mécanistique pour

l'interprétation de la toxicité des agents organométalliques sont nombreux et inspirent le développement de nouveaux agents à bases de métaux de transition variés.

En 2017, sept de ces molécules étaient en essais cliniques<sup>[17]</sup> : quatre dérivés platineux (Picoplatin, Lipoplatin, ProLindac, Satraplatin), deux dérivés du Ruthénium (NAMI-A et KP1019) et un agent de radiothérapie à base de Cuivre (64Cu-ATSM). Plusieurs complexes de Ruthénium et d'Osmium sont rapportés dans la littérature en vue d'un développement pré-clinique<sup>[18]</sup> en raison de leurs profils pharmacologiques uniques. Le RAPTA-T présente une capacité à moduler le micro-environnement tumoral permettant un traitement efficace de lignées résistantes, en combinaison avec un agent platineux inactif en l'absence de RAPTA-T.<sup>[19]</sup> Le mécanisme d'action de ce composé reste difficile à définir dans sa globalité, or une composante partagée par ses analogues est la possibilité de se lier dans une poche (*acidic patch*) du dimère d'histones H2A/H2B du nucléosome (ADN).<sup>[20]</sup>

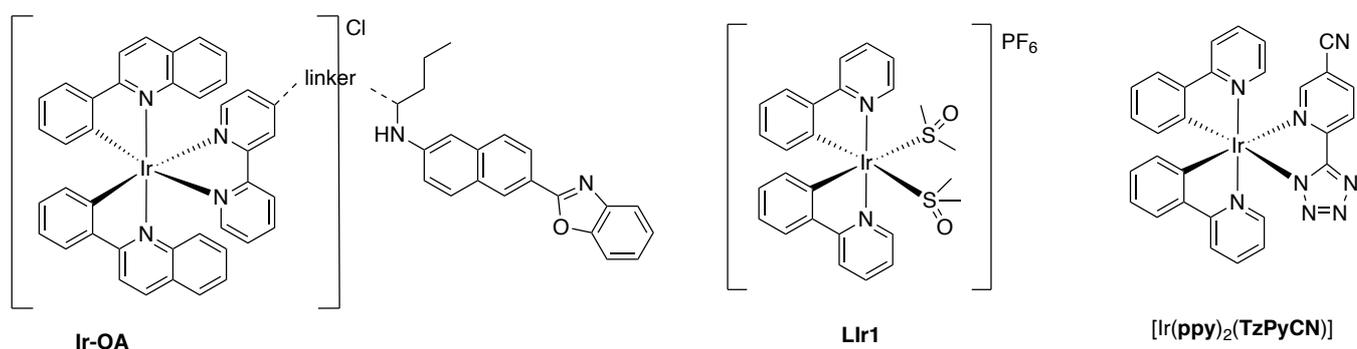
Certaines études mettent en évidence le pouvoir catalytique de certains composés organométalliques présentant une activité anti-cancéreuse, ainsi des complexes capables de catalyser des réactions de transfert d'hydrogène ont émergé dans la littérature cette dernière décennie. Des complexes de type Ruthénium-arène semblables aux catalyseurs de Noyori ont été utilisés pour réaliser la réduction du NAD<sup>+</sup> (Nicotinamide adénosine dinucléotide) en NADH dans des cellules du cancer de l'ovaire (A2780) en utilisant l'ion formate comme donneur d'hydrure.<sup>[21]</sup> Le mécanisme de mort cellulaire a été relié au « stress réducteur » induit par cette modulation du couple redox NAD<sup>+</sup>/NADH intracellulaire. En outre, des complexes de type Osmium(II)-arène ont montré qu'ils catalysaient la réduction énantiosélective du pyruvate en lactate dans cette même lignée cellulaire A2780, avec la même source d'hydrure.<sup>[22]</sup> De façon intéressante, l'activité antiproliférative résultante de la co-administration de ce complexe avec du formate était fortement réduite sur les lignées de fibroblastes MRC-5 et HOF, représentatives de cellules saines. Ce résultat prometteur indique une sélectivité de cet agent cytotoxique à base d'Osmium pour les cellules cancéreuses.

L'activité anticancéreuse de complexes organométalliques de Rhénium est beaucoup moins explorée que celle des groupes 8 et 10 du tableau périodique, cependant des articles récents ont illustré les progrès accomplis avec cet élément. Notamment, des complexes de Rhénium (I) comportant des ligands tricarbonyles se sont montrés capables d'induire la mort cellulaire d'une manière distincte de celle du Cisplatine dans un panel de lignées cellulaires résistantes (KBCP20, A2780CP70, A549CisR et H460).<sup>[23,24]</sup> Les auteurs proposent que la

capacité d'un de ces complexes à coordiner la 9-éthylguanine, la N-Acétyl-Cystéine et la N-Acétyl-Histidine (acides aminés) permet d'exacerber sa toxicité en l'adressant vers un compartiment subcellulaire d'intérêt : la mitochondrie. Enfin, des complexes d'Argent (I) et d'Or (I) ou d'Or (III) ciblent plusieurs voies métaboliques impliquées dans le cancer, notamment des complexes de type NHC (Carbène N-hétérocyclique) qui ont émergé dans la littérature, étudiés pour leurs propriétés cytotoxiques.<sup>[25,26]</sup>

Enfin, la thérapie photo-dynamique est basée sur l'application locale ou systémique d'un composé photosensible qui s'accumule dans les tissus pathologiques. Cette molécule peut alors absorber la lumière à une longueur d'onde définie, initiant un processus d'activation qui conduit à la destruction sélective des cellules tumorales.<sup>[27]</sup> À ce titre, il existe notamment un complexe métallique à base de palladium photo-activable et approuvé cliniquement, le **TOOKAD®**-soluble,<sup>[28]</sup> présenté dans le schéma 3.

À l'image des complexes précédemment cités, les complexes organométalliques d'Iridium(III) présentent eux aussi des propriétés d'un grand intérêt pour des applications en biologie.<sup>[21,29]</sup> Parmi eux on trouve des complexes cationiques bis-cyclométallés qui sont très souvent luminescents et qui peuvent constituer des espèces photosensibles pour la thérapie photo-dynamique.<sup>[30,31]</sup> Les propriétés remarquables de certains complexes phosphorescents permettent leur observation dans les cellules par microscopie résolue en temps de vie de fluorescence (FLIM). Spécifiquement conçu à cet effet, **Ir-OA** (Schéma 4) est une sonde de viscosité qui présente une différence de temps de vie de phosphorescence en fonction son microenvironnement au moyen d'un accepteur de type benzoxazoline.<sup>[32]</sup>

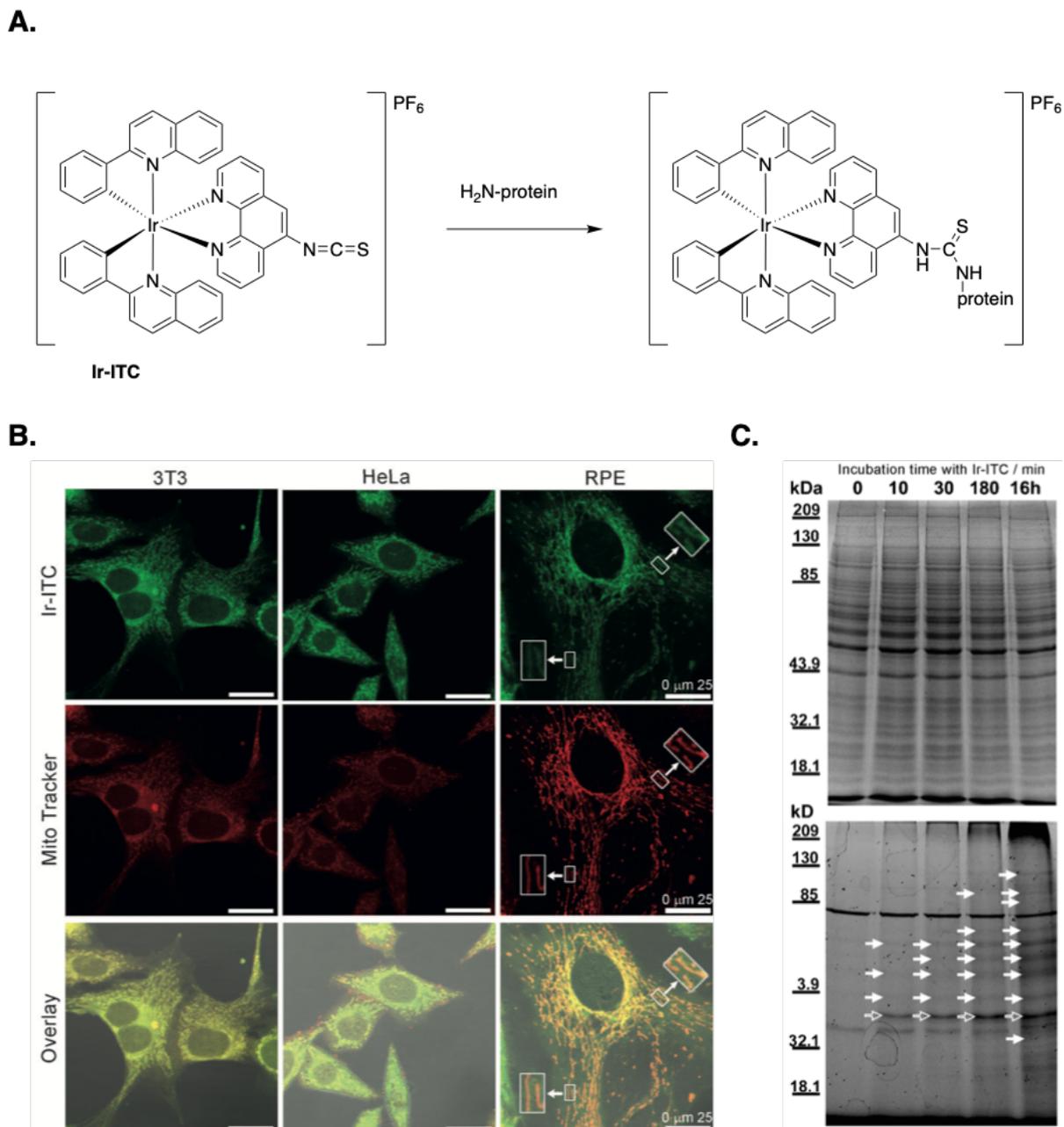


**Schéma 4.** Trois exemples de complexes d'Iridium bis-cyclométallés d'intérêt

D'autres complexes d'Iridium bis-cyclométallés se localisent dans le noyau des cellules. Li et coll. ont rapporté **LIr1** (Schéma 4), un complexe non-émissif lié à deux molécules de solvant diméthylsulfoxyde (DMSO). Ce complexe est fluorogène, il peut réagir avec des nucléophiles intracellulaires et génère alors une intensité de luminescence exacerbée. L'internalisation de ce complexe dans la lignée cellulaire HeLa (10  $\mu$ M, 10 min) révèle un marquage exclusif du noyau des cellules, de surcroît les auteurs ont mis en évidence un mécanisme d'internalisation énergie-dépendant pour ce complexe.<sup>[33]</sup>

En général, des complexes lipophiles ( $\log P > 0$ ) montrent une accumulation préférentielle dans les compartiments sub-cellulaires riches en membranes. Ainsi, certains complexes présentent un tropisme pour le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi des cellules, comme  $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{TzPyCN})]$  un complexe ligandé par un hétérocycle tetrazolato (Tz, Schéma 4). Néanmoins cette localisation peut aussi dépendre de leur charge. En effet, d'autres complexes bis-cyclométallés se localisent vers le compartiment endo-lysosomal, suggérant qu'ils ne sont pas internalisés par diffusion passive à travers la membrane plasmique des cellules. Enfin, certains complexes d'iridium bis-cyclométallés se localisant dans le lysosome des cellules et sont présentés comme des agents de thérapie photo-dynamiques capables de produire après irradiation de l'oxygène singulet qui engendre la mort cellulaire.<sup>[34]</sup>

Enfin, **Ir-ITC**<sup>[35]</sup> (Figure 2) est un complexe d'iridium bis-cyclométallé intrinsèquement luminescent, de formule générale  $[\text{Ir}(\text{pq})_2(\text{phen-ITC})](\text{PF}_6)$  et auquel a été ajouté un groupement électrophile isothiocyanate (ITC). Il est donc capable de former des liaisons covalentes avec des nucléophiles intracellulaires, comme l'illustre la figure 2A. Les auteurs ont mis en évidence que **Ir-ITC** s'accumule dans les mitochondries par une analyse de colocalisation de fluorescence au moyen d'une sonde fluorescente rouge des mitochondries : le MitoTracker (Figure 2B). Les auteurs ont aussi confirmé que leur complexe était capable de former des liaisons covalentes avec les protéines par analyse d'électrophorèse (SDS-PAGE) d'extraits protéiques à partir de cellules exposées à **Ir-ITC** (Figure 2C). Dès 10 min d'incubation, des adduits fluorescents sont détectés sur des protéines qui ont ensuite été analysées par spectrométrie de masse protéomique, permettant l'identification de 12 protéines mitochondriales comme le canal anionique VDAC ou la Peroxyrédoxine 1.



**Figure 2.** Localisation et analyse des protéines marquées par **Ir-ITC**, d'après Wang et coll.

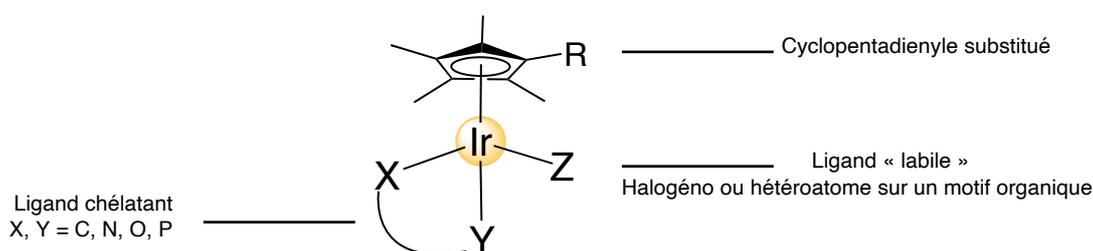
**A.** Schéma représentant la bio-conjugaison d'une protéine avec **Ir-ITC**

**B.** Images de microscopie confocale à fluorescence de cellules 3T3, HeLa et hTERT-RPE1 traitées par le Mitotracker Red CMXRos (50 nM, 15 min) puis **Ir-ITC** (5  $\mu$ M, 10 min). Analyse de la colocalisation (orange, flèches).

**C.** Analyse (SDS-PAGE) de protéines de cellules 3T3 traitées par **Ir-ITC** (5  $\mu$ M, temps indiqué). Comparaison des protéines totales (haut) et des bandes de fluorescence (flèches, bas).

### 3. Les complexes d'iridium à ligand arène ou cyclopentadiényle

Durant la dernière décennie, les complexes d'iridium à ligand arène, également dénommés « semi-sandwich » ont fait l'objet de nombreuses publications rapportant leurs propriétés cytotoxiques.<sup>[36]</sup> Auparavant, ils ont également été décrits comme catalyseurs d'activation de liaison C-H, de transfert d'hydrogène ou de réaction asymétrique de type Diels-Alder.<sup>[37]</sup> Leur nom fait référence à la présence d'un unique ligand arène extrêmement stable,<sup>[38]</sup> à la différence du ferrocène qui en possède deux (complexe « sandwich »).



**Schéma 5.** Structure générale des complexes d'iridium(III) à ligand arène

Leur sphère de coordination est dite « en tabouret de piano », elle comporte un ligand cyclopentadiényle pentasubstitué (typiquement pentaméthylé), un ligand chélatant (ligand  $X^AY$ , Schéma 5), enfin la dernière position est généralement occupée par un ligand halogéno échangeable qui leur confère une réactivité. Une grande variété de complexes d'iridium à ligand arène sont décrits dans la littérature, ils comportent différents ligands chélatants, de type « LX » : ( $C^AN$ ), ( $C^AO$ ) ou de type « LL » : ( $N^AN$ ), ( $P^AP$ ), ( $N^AO$ ). Le complexe peut être neutre, cationique ou bicationique selon la nature de ce ligand chélatant, mais aussi en fonction du type de ligand labile (ligand Z, Schéma 5).

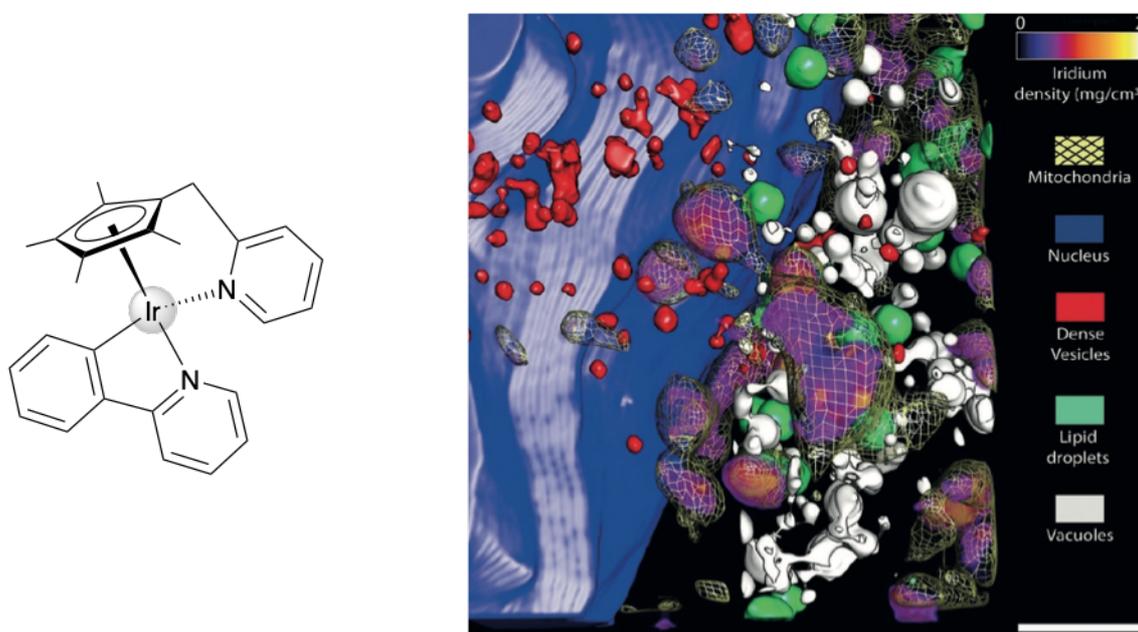
La première description de l'activité biologique de ces complexes d'iridium de type semi-sandwich a été réalisée en 2007 par le groupe de W.S. Sheldrick (Allemagne). Leur travail se focalise sur l'activité d'intercalation de l'ADN pour des complexes cationiques comportant un ligand polypyridyle.<sup>[39]</sup> Ils ont montré que la présence d'un ligand chélatant possédant une structure plane et aromatique étendue était déterminante pour l'activité du complexe.<sup>[40]</sup> Certains complexes se sont révélés très actifs sur les lignées cellulaires du cancer du sein MCF-7 et du colon HT-29, avec des valeurs d' $IC_{50}$  dépendantes de la taille du ligand polypyridyle.

En 2011, P.J. Sadler et coll. (Royaume-Uni) ont décrit et breveté l'usage de nombreux complexes semi-sandwich d'iridium(III) pour leurs propriétés biologiques.<sup>[41]</sup> Ils ont ensuite publié plusieurs articles rapportant la toxicité d'autres dérivés à ligand arène sur de larges panels de lignées cellulaires cancéreuses et non-cancéreuses comme celui du NCI.<sup>[42]</sup> La synthèse d'un complexe cationique comportant un ligand chélatant (N^N)-diméthylphenylazopyridine a été rapportée par cette même équipe.<sup>[43]</sup> Par une approche pharmaco-génomique au moyen de micropuces à protéines, les auteurs ont mis en évidence l'activation de certaines voies de signalisation en réponse au complexe. Notamment, ils ont observé une stabilisation de la protéine p53 induite à temps court (4 h) et à plus long terme (48 h), suggérant que leur complexe a un effet direct sur l'ADN.

De plus, P.J. Sadler et coll. introduisent en 2014 la notion de catalyseur intracellulaire<sup>[44]</sup> prodiguée par la labilité du ligand chlorido et en présence de différentes espèces biologiques réactives comme le NADH. Ainsi dans la plupart de leurs publications, le pouvoir oxydant des complexes vis-à-vis du NADH est mesuré et depuis, d'autres équipes ont étudié le mécanisme précis de cette oxydation catalytique.<sup>[45]</sup> En 2015, Sadler et coll. ont démontré une contribution des substituants d'un même ligand chélatant sur plusieurs caractéristiques d'une série de complexes [Cp\*Ir(ppy)Cl] neutres, comme leur activité anticancéreuse ou leur pouvoir catalytique.<sup>[46]</sup> La stabilité des complexes d'iridium de type semi-sandwich est couramment vérifiée en milieu aqueux dans des études de la relation structure-activité.<sup>[47]</sup> En revanche, un aspect bien souvent omis dans la littérature est la stabilité du complexe dans son solvant d'administration. Les composés sont presque exclusivement administrés aux cellules à partir d'une solution mère préparée dans le DMSO, un très bon ligand des métaux de transition.<sup>[48,49]</sup> Toutefois la vitesse de solvolysse des complexes semi-sandwich d'iridium est modulable en fonction de la nature du ligand labile. Par conséquent, les complexes présentant les ligands Z les plus stables (les moins labiles) conservent vraisemblablement cette spéciation lors de leur internalisation dans les cellules.

Contrairement aux complexes bis-cyclometallés, les complexes de type semi-sandwich ne sont pas luminescents. Cette absence de propriétés photophysiques implique que le ligand arène n'est pas capable de recevoir un transfert de charge métal-ligand (MLCT) et qu'un seul ligand (C^N) est insuffisant pour induire un état excité émissif. Certains auteurs étudient la localisation subcellulaire de complexes d'iridium de type semi-sandwich. Cette étude est réalisable par microscopie de fluorescence, à condition de greffer un fluorophore sur le

complexe,<sup>[50]</sup> une stratégie qui sera détaillée dans le troisième chapitre. Cependant l'étude de l'internalisation de complexes d'iridium peut également être réalisée par fractionnement sub-cellulaire et dosage de l'Iridium (ICP-MS).<sup>[51]</sup> Dans le même esprit, A. Pizarro et coll. (Espagne) ont étudié le complexe **ACC25** comportant un ligand hémi-labile de type pyridine, lié au ligand arène (Figure 3) grâce à une analyse par fluorescence des rayons X (FRX) de l'élément Iridium. Couplée à la cryo-SXT (tomographie par rayons x à faible énergie) et l'emploi de marqueurs fluorescents, cette étude a permis de démontrer que ce complexe s'accumule dans les mitochondries des cellules, modifie leur architecture et entraîne leur découplage.<sup>[52]</sup>



**Figure 3.** Détermination de la localisation intracellulaire de **ACC25**, d'après Conesa et coll.

Structure du complexe **ACC25**. Reconstitution 3D d'une cellule MCF7 traitée avec  $1 \mu\text{M}$  de complexe **ACC25** durant 12 h. Distribution de l'Iridium imagée par tomographie FRX 2D représentée en fausses couleurs (échelle de densité). La cellule a été co-incubée avec différents marqueurs fluorescents, notamment des mitochondries et des lysosomes. Les différentes acquisitions d'épifluorescence et de cryo-SXT ont permis de modéliser la structure de différentes organelles dans la même zone (Bleu : noyau, vert : gouttelettes lipidiques, blanc : vacuoles acides, motif : mitochondries). Échelle  $1 \mu\text{m}$ .

En conclusion, les effets biologiques des complexes d'Iridium de type semi-sandwich publiés à ce jour montrent de façon concordante l'induction de la mort des cellules par la voie intrinsèque (mitochondriale) de l'apoptose. La cinétique de l'apoptose induite par les complexes est suivie par divers critères en particulier comme la dépolarisation de la membrane mitochondriale.<sup>[53]</sup> Dans ce projet, nous tentons de nous intéresser plus profondément aux effets biologiques des complexes d'iridium à ligand arène, afin de rationaliser leur conception et mieux comprendre leur mécanisme d'action cytotoxique.

## 4. Objectif des travaux et méthodologie

Dans le cadre de ce projet, nous nous sommes focalisés sur l'étude d'une classe de composés à base d'iridium : les semi-sandwich C<sup>N</sup>-chélatés. En particulier, la synthèse et la complexation des ligands (C<sup>N</sup>) de type 2-phényloxazoline (phox) substitués constitue un savoir-faire du laboratoire que nous avons mis à profit. Les propriétés antimicrobiennes de certains dérivés (phox) substitués ont été rapportées dans la littérature en 2014,<sup>[54]</sup> concluant à une faible toxicité. Un panel de complexes originaux a été synthétisé afin de caractériser l'influence de substituants lipophiles, donneurs ou attracteurs sur l'activité biologique. Le but de cette étude est également de corrélérer les performances catalytiques des complexes avec leur toxicité, prouver leur capacité à induire l'apoptose dans des lignées cellulaires cancéreuses via la production de ERO et explorer la réponse cellulaire dans des conditions de culture *in vitro*.

Ensuite, un complexe particulièrement actif a été sélectionné pour réaliser une étude plus poussée de son mécanisme d'action sur plusieurs lignées cellulaires. Pour essayer de rationaliser la sélectivité présumée du complexe, la cinétique de mort cellulaire a notamment été étudiée par des méthodes de biologie cellulaire. Ce deuxième chapitre résume les résultats obtenus quant à l'étude de nombreux acteurs biologiques de la réponse cellulaire, par exemple en utilisant des co-traitements avec différents inhibiteurs. Contrairement à une approche basée sur une cible connue, cette méthodologie constitue une approche dite phénotypique. En effet, des réponses ou des fonctions cellulaires sont examinées suite au traitement par le complexe sans connaître à l'avance la ou les cibles de la molécule.<sup>[55]</sup>

Dans un troisième temps, une méthodologie visant à adresser les complexes vers des compartiments subcellulaires par adjonction d'un fluorochrome lipophile a été envisagée. Cette démarche a pour but de mieux comprendre le devenir intracellulaire de cette classe de composés notamment grâce au suivi de leur internalisation par microscopie de fluorescence. Ce type d'étude a été plusieurs fois employé pour des molécules organiques. Notamment, Neamati et coll. ont identifié les cibles d'un composé anticancéreux grâce à cette stratégie.<sup>[56]</sup>

Enfin une quatrième stratégie a été mise au point afin d'obtenir des informations sur un complexe de manière moins biaisée. En effet, la chimie bio-orthogonale est un outil remarquable pour identifier des adduits de métallo-drugues. Dans ce dernier chapitre, les résultats préliminaires obtenus avec un complexe d'iridium semi-sandwich comportant une fonction bio-orthogonale seront présentés, ainsi que les perspectives pour cette approche.

# Chapitre 1. Synthèse de complexes d'iridium semi-sandwich et étude de la relation structure-activité

## Introduction

### 1. Étude bibliographique de la relation structure-activité de complexes semi-sandwich d'iridium

#### 1.1. Le ligand arène

Le ligand arène des complexes semi-sandwich d'iridium est un ligand anionique cyclopentadiényle pentasubstitué, typiquement par des substituants méthyle ( $\text{Cp}^*$ ) afin d'éviter sa dimérisation. Par ailleurs, la charge négative du ligand arène permet une meilleure stabilisation du centre métallique.<sup>[41]</sup> Il est également fréquent d'utiliser deux de ses dérivés substitués :  $\text{Cp}^{\text{xPh}}$  qui contient un phényle à la place d'un méthyle et  $\text{Cp}^{\text{biPh}}$  qui contient un biphenyle à la place d'un méthyle.

Le ligand Cp joue 2 rôles principaux dans le mécanisme d'action des complexes : lorsque le cycle a un système aromatique étendu par des phényles, ces derniers peuvent s'intercaler entre les bases de l'ADN et donc bloquer sa répllication.<sup>[44]</sup> De plus l'ajout d'un substituant phényle, notamment sur le ligand arène, augmente son caractère lipophile,<sup>[41,57]</sup> améliorant ainsi sa pénétration dans les cellules dont les membranes sont hydrophobes. Ainsi il est très fréquemment observé que plus le ligand arène est substitué par des phényles, plus l'activité anticancéreuse est importante.<sup>[41,47,58]</sup>

#### 1.2. Le ligand chélatant

Le ligand chélatant est bidenté, sa nature a vraisemblablement un grand impact sur l'activité anti-cancéreuse des complexes, mais c'est également le ligand dont l'influence est la plus complexe à analyser. Par exemple, des premières études<sup>[41,58,59]</sup> ont conclu à une meilleure efficacité des ligands chélatants ( $\text{C}^{\wedge}\text{N}$ ) par rapport aux ligands ( $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ ), notamment car le complexe  $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{bpy})\text{Cl}]^+$  est inactif alors que  $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{ppy})\text{Cl}]$  possède une bonne activité anticancéreuse. Cependant, d'autres études ont montré un peu plus tard une forte cytotoxicité pour des ligands ( $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ ) comme le ligand (phen).<sup>[60]</sup> Des résultats non convergents ont également été trouvés par rapport à la charge et au caractère donneur ou accepteur des ligands.

Certaines études démontrent qu'augmenter la charge totale du complexe possède un effet positif sur son activité tandis que d'autres publications montrent le contraire.<sup>[43]</sup> De même, la présence de substituants électroattracteurs sur un ligand (N^N) augmenteraient la cytotoxicité du complexe alors que le même effet est observé avec des substituants électrodonneurs pour des ligands (C^N).<sup>[61]</sup> Le tableau 2 donne l'exemple de quelques complexes et leur valeur d'IC<sub>50</sub> (concentration inhibitrice médiane), une grandeur permettant d'évaluer leur toxicité généralement exprimée en micromolaires. Plus l'IC<sub>50</sub> est petit, plus le complexe est toxique.

Complexe	IC <sub>50</sub> (A2780)
[Cp*Ir(phen)Cl] <sup>+</sup>	> 100 μM
[Cp <sup>biPh</sup> Ir(phen)Cl] <sup>+</sup>	0,72 μM
[Cp*Ir(bpy)Cl] <sup>+</sup>	> 100 μM
[Cp*Ir(ppy)Cl] <sup>+</sup>	10,8 μM
[Cp <sup>xPh</sup> Ir(NMe <sub>2</sub> -azpy)Cl] <sup>+</sup>	0,40 μM
CDDP (Cisplatine)	1,20 μM

**Tableau 2.** Exemples de valeur d'IC<sub>50</sub> de différents complexes sur des cellules du cancer de l'ovaire

D'après ce tableau, la toxicité comparée de complexes chargés positivement montre une grande dispersion entre les effets des ligands chélatant et Cp. En outre, il a été montré par une étude d'activité et de toxicité que la nature du contre-anion avait aussi une influence sur le comportement intracellulaire d'un complexe [Cp<sup>biPh</sup>Ir(bpy)Cl]<sup>+</sup>.<sup>[62]</sup>

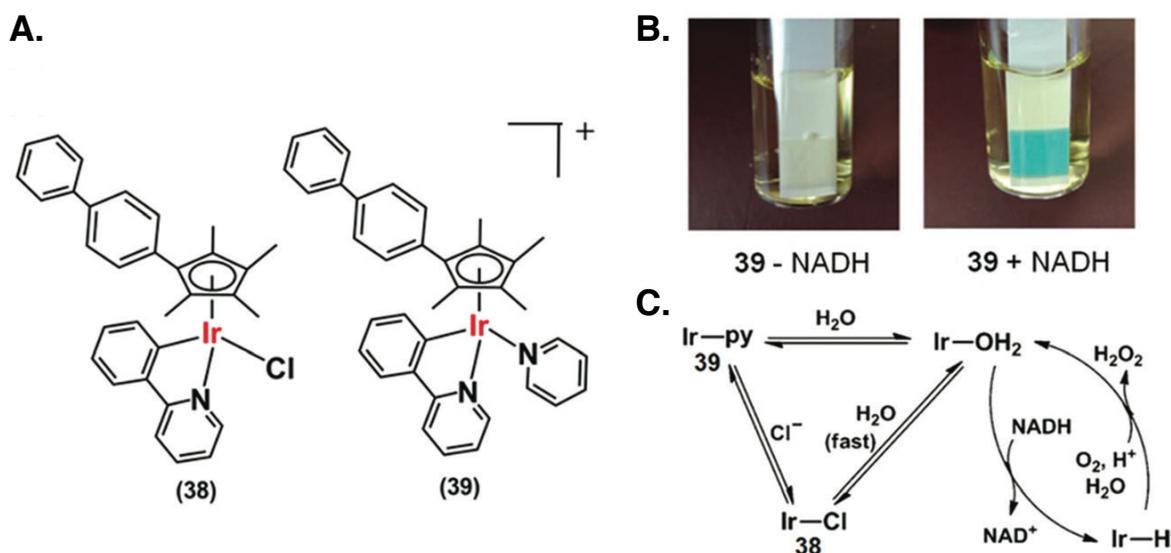
Des efforts sont donc encore nécessaires pour rationaliser l'influence du ligand chélatant sur l'activité des complexes d'iridium semi-sandwich.

### 1.3. Le ligand monodente

Le dimère utilisé classiquement pour la synthèse des complexes d'iridium à ligand arène est [Cp\*IrCl<sub>2</sub>]<sub>2</sub>. Par simplicité de synthèse, on retrouve donc très souvent un ligand chlorido comme ligand monodente. Cependant, il a été montré que remplacer l'atome de chlore par une pyridine pouvait augmenter la cytotoxicité du complexe.<sup>[42,47]</sup> En pratique, ce remplacement est réalisé à partir du complexe chlorido, par ajout d'un sel d'argent (typiquement AgNO<sub>3</sub>) et addition d'un excès de pyridine. Cette méthode a notamment été utilisée pour fixer une sonde ou une molécule fluorescente sur le complexe afin d'observer son comportement dans des cellules,<sup>[50]</sup> nous y reviendrons au Chapitre 3.

De nombreuses études rapportent que les complexes les plus cytotoxiques comportent un ligand monodente fortement lié. La liaison Ir-N s'hydrolyse moins vite que la liaison Ir-Cl pour laquelle l'échange de ligand est souvent très rapide,<sup>[46,52,58,60]</sup> ce qui permettrait au complexe de conserver une forme stable jusqu'à ce qu'il atteigne sa ou ses cibles biologiques.

De par la labilité du ligand monodente, les complexes d'iridium semi-sandwich peuvent présenter une réactivité au niveau du métal. En effet, le NADH est un cofacteur redox connu pour jouer le rôle de donneur d'hydrure en milieu cellulaire et de nombreuses réactions catalysées par des complexes semi-sandwich d'iridium ont été mises en évidence dans la littérature.<sup>[63]</sup> Des complexes de type métal-hydrure sont observés avec formation concomitante de NAD<sup>+</sup> suivant un mécanisme dissociatif étudié par Ritacco et coll.<sup>[45]</sup> L'hydrure peut ensuite être transféré à des accepteurs variés comme le FMN,<sup>[64]</sup> le pyruvate pour former du lactate,<sup>[65]</sup> un proton pour former du dihydrogène,<sup>[66]</sup> des aldéhydes pour former des alcools<sup>[29,67]</sup> ou bien des imines formant des amines.<sup>[68]</sup> Il a aussi été montré par Sadler et coll. en 2014 que le dioxygène pouvait jouer ce rôle d'accepteur d'hydrure en milieu aqueux pour former H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dont la présence est détectée qualitativement après 48 h d'incubation de NADH et de complexes d'iridium dans des solutions aérées (Figure 4).<sup>[42]</sup>



**Figure 4.** Catalyseurs de production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> publiés par Sadler et coll. <sup>[69]</sup>

**A.** Catalyseurs de transfert d'hydrogénation de type [Cp<sup>biPh</sup>Ir(ppy)Z]<sup>+</sup>. **B.** Détection du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans une solution du complexe (39) MeOH/H<sub>2</sub>O (3:7, v/v) en présence de NADH. **C.** Cycle catalytique proposé pour la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les deux complexes.

Par ailleurs, Ritacco et coll. ont montré que la réduction du dioxygène dissous (Figure 4C) procéderait par un mécanisme de sphère externe impliquant un intermédiaire hydroperoxo. En conclusion, Sadler et coll. proposent que cette capacité des complexes à générer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de manière catalytique leur confère un pouvoir oxydant cytotoxique. En effet, le peroxyde d'hydrogène est un oxydant fort connu pour endommager les composants cellulaires lorsqu'il s'accumule à des concentrations supérieures aux niveaux physiologiques.

## 2. Les ERO dans le contexte cellulaire

### 2.1. Chimie des ERO

Trois métabolites sont issus de la réduction du dioxygène: le radical hydroxyle (HO•), le radical-anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) et le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sont désignés par ERO (espèces réactives oxygénées) ou ROS en anglais. Ces ERO primaires peuvent réagir avec de nombreux substrats organiques et conduire à la formation d'espèces intermédiaires comportant des radicaux (ERO secondaires). Leur chimie complexe et interconnectée est régulée *in cellulo* par des processus métallo-enzymatiques modélisés par les réactions de Fenton et de Haber-Weiss présentées dans le schéma 6.

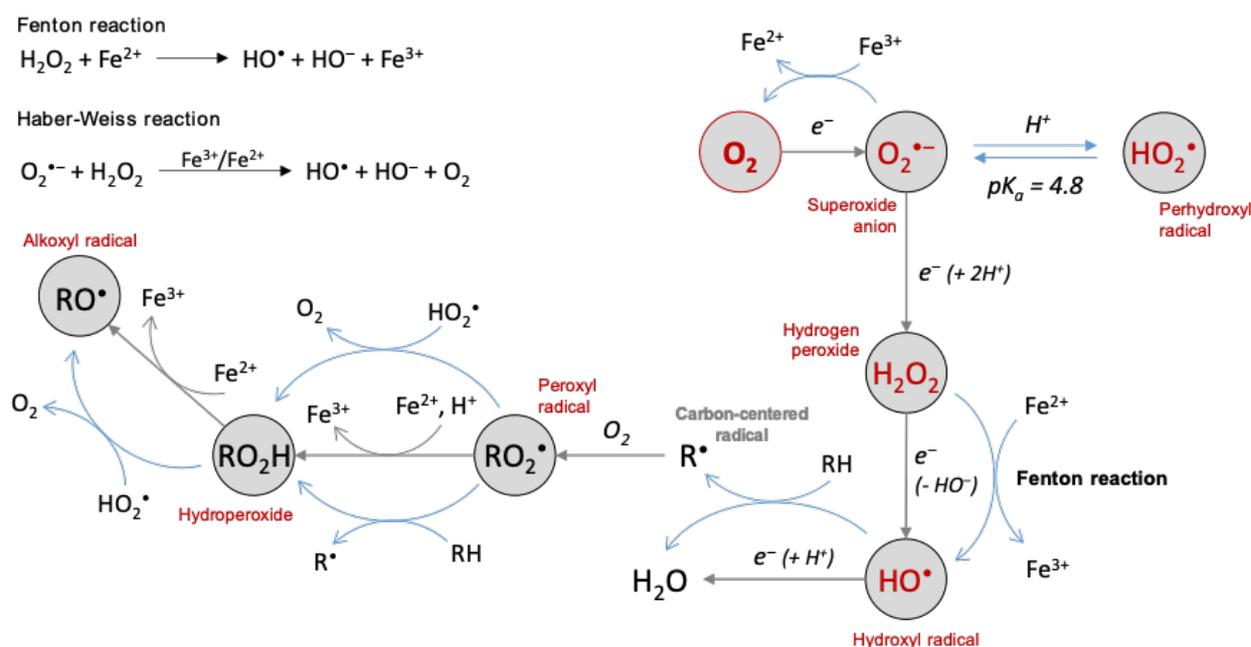
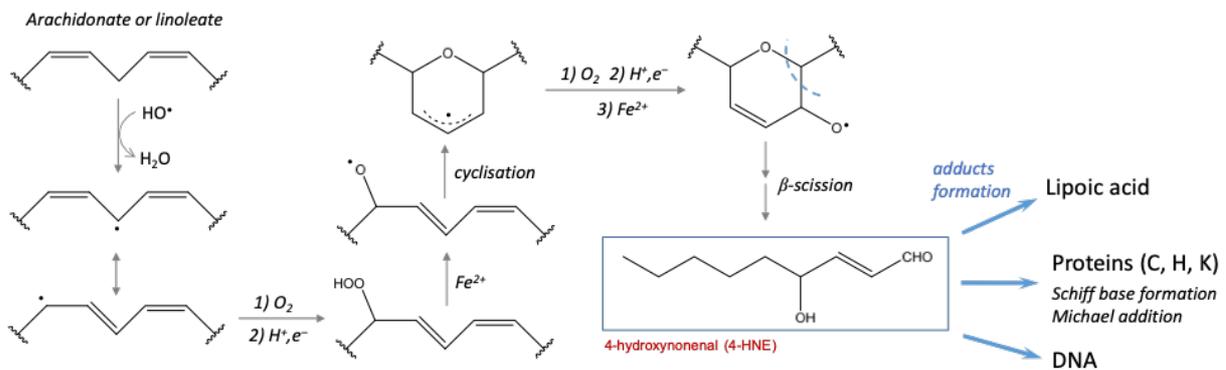


Schéma 6. Réactivité (non-exhaustive) des ERO primaires<sup>[70]</sup>

Le radical-anion superoxyde est généré par la première réduction mono-électronique de l'oxygène ainsi que dans quelques processus biologiques jusqu'à présent identifiés. Il est protoné à pH acide (radical perhydroxyle, pKa = 4,8) et présente deux potentiels standards redox, ce qui signifie qu'il peut agir comme un réducteur ( $E^{\circ}(O_2/O_2^{\bullet-}) = -0,33 \text{ V}$ ) ou un oxydant ( $E^{\circ}(O_2^{\bullet-}/H_2O_2) = 0,93 \text{ V}$ ). Néanmoins cette espèce présente une toxicité indirecte car sa réaction avec des substrats biologiques n'est pas favorisée, elle formera plutôt des intermédiaires qui eux sont très réactifs, à l'image de HO• dans la réaction d'Haber-Weiss. Le radical hydroxyle est en effet le plus puissant oxydant des ERO avec un potentiel  $E^{\circ}$  (HO•/H<sub>2</sub>O) égal à 2,34 V. Ce radical a également une durée de vie très courte de quelques microsecondes et peut réagir de trois façons : par transfert d'électron, par abstraction d'hydrogène ou par addition sur une double-liaison (Schéma 7).



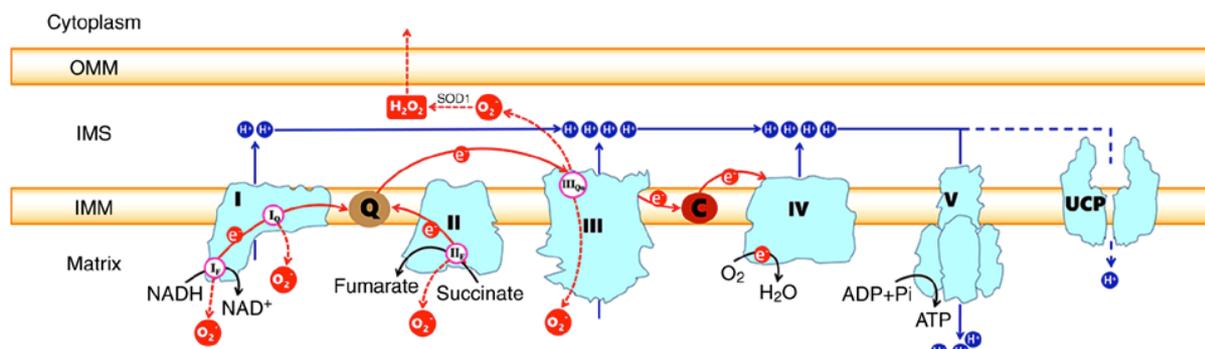
**Schéma 7.** Mécanisme d'oxydation d'un lipide par le radical hydroxyle<sup>[71]</sup>

Enfin, le peroxyde d'hydrogène est produit par la réduction bi-électronique de l'oxygène moléculaire. Cette espèce est plutôt engagée dans des processus redox à deux électrons avec un haut potentiel  $E^{\circ}(H_2O_2/H_2O)$  de 1,32 V. Cependant l'énergie d'activation requise pour sa réaction directe avec des substrats biologiques est généralement haute. Ainsi les effets délétères induits par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> proviennent surtout de sa capacité à générer des radicaux en présence de métaux de transition, comme dans la réaction de Fenton. D'autre part, le peroxyde d'hydrogène apparaît dans la littérature récente comme un acteur de signalisation cellulaire important et son rôle n'est plus restreint au statut de simple métabolite.<sup>[72,73]</sup>

Lorsqu'ils s'accumulent et que leur détoxification est insuffisante, les ERO ont des effets délétères mis en évidence par la détection *in vivo* de lipides oxydés comme le 4-HNE (Schéma 7) mais aussi de protéines et acides nucléiques oxydés.

## 2.2. Production et détoxification physiologique des ERO dans la cellule

Dans les cellules de mammifères, les ERO sont produits de manière physiologique et présentent différentes origines, principalement la membrane plasmique via la NADPH oxydase et la mitochondrie. Dans la mitochondrie, les ERO sont produits durant la biosynthèse de l'ATP qui implique des transferts de protons et d'électrons avec le dioxygène comme accepteur final. La fuite de ces électrons représente 1 à 3% de la production totale en électrons, elle peut avoir lieu dans les complexes I et III de la chaîne respiratoire, menant à la production de  $O_2^{\cdot-}$ .<sup>[74]</sup>



**Figure 5.** Fuite d'électrons et de protons possibles dans la chaîne respiratoire mitochondriale<sup>[75]</sup>

OMM (*outer mitochondrial membrane*) : membrane externe de la mitochondrie ; IMS : section intermembranaire ; IMM : membrane interne comprenant les complexes I-V (NADH déshydrogénase, succinate déshydrogénase, CoQ-cytochrome c réductase, cytochrome c oxydase, ATP synthase), le coenzyme Q (ubiquinone), le cytochrome c et des protéines découplantes (UCP).

Les ERO sont désormais considérés comme d'importants régulateurs de voies métaboliques, il est connu que des niveaux modérés d'ERO sont nécessaires à plusieurs fonctions cellulaires telles que l'expression des gènes.

S'ils atteignent des niveaux trop élevés, leur détoxification est alors assurée par de nombreuses réponses moléculaires. Différentes réductases comme la SOD qui catalyse la dismutation du radical anion superoxyde a une vitesse remarquablement élevée, mais aussi par des vitamines anti-oxydantes telles que la vitamine C et la vitamine E. Il existe également des processus faisant intervenir le Glutathion (GSH) qui possède un très fort pouvoir réducteur. Le GSH est capable d'interagir avec des enzymes redox : les peroxyrédoxines et la glutathion peroxydase pour former un dimère (GSSG) comprenant un pont disulfure. Le peroxydome est un organe siège de ces réactions redox.<sup>[76,77]</sup>

Lorsque cette détoxification est insuffisante, elle peut entraîner l'apoptose des cellules.

### 2.3. Stress oxydant et apoptose

L'apoptose intrinsèque est une mort cellulaire régulée qui peut survenir en réponse à de nombreux autres stress intracellulaires, notamment la déplétion en facteurs de croissance, les dommages à l'ADN, le stress du réticulum endoplasmique, le stress de la réplication, une altération des microtubules ou des processus mitotiques. L'étape critique et irréversible de l'apoptose intrinsèque est la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP) conduisant à sa dépoliarisation (découplage).

Cette étape est contrôlée par les acteurs pro- et anti-apoptotique de la famille de protéines Bcl2 comme Bax, qui peuvent former des pores et entraîner la fuite de nombreuses molécules pro-apoptotiques dans le cytoplasme. Parmi ces dernières on retrouve SMAC, un activateur de caspases, ou encore le cytochrome c qui va se lier avec Apaf1 (*Apoptotic peptidase activating factor 1*) et la pro-caspase-9 pour former un complexe supramoléculaire connu sous le nom d'apoptosome. Lors du découplage des mitochondries, les ERO et le  $Ca^{2+}$  contenus dans la matrice mitochondriale diffusent également dans le cytoplasme et vers d'autres compartiments subcellulaires.

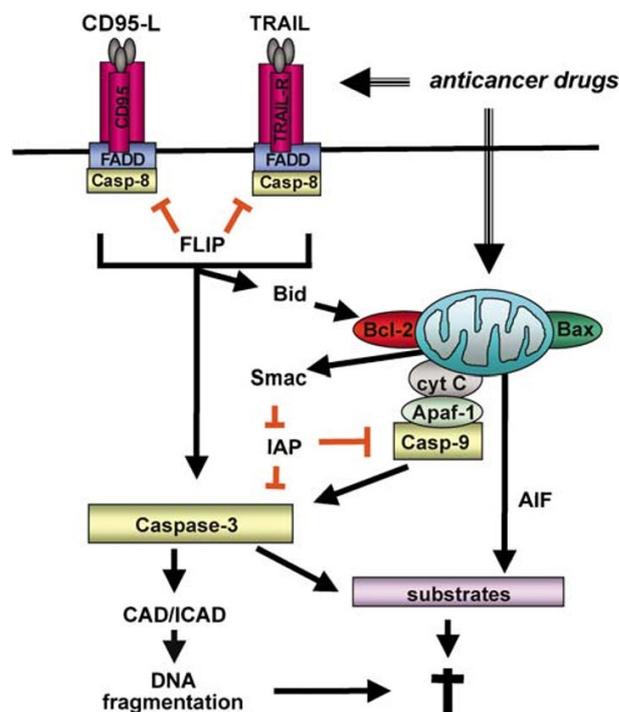


Schéma 8. Voies de l'apoptose extrinsèque et intrinsèque activées en réponse aux chimiothérapies.<sup>[78]</sup>

L'apoptosome est responsable de l'activation de la caspase-9 qui pourra ensuite catalyser l'activation protéolytique des caspases effectrices 3 et 7, principalement considérées comme responsables de la dégradation des composants cellulaires. Certaines protéines comme PARP ou la Lamine A sont connues pour être des substrats de la caspase-3, marquant les étapes finales de la mort cellulaire. Comme l'illustre le schéma 8, l'apoptose extrinsèque diffère l'apoptose intrinsèque quant à l'origine des stimuli, cependant ces deux voies de signalisation sont interconnectées par des acteurs comme la caspase-3 et Bid.

L'apoptose extrinsèque survient suite à des perturbations du microenvironnement extracellulaire, elle est enclenchée par l'activation de deux types de récepteurs transmembranaires dont les récepteurs de mort cellulaire CD95-L et TRAIL (Schéma 8). L'activation de ces récepteurs entraîne différentes cascades signalétiques, notamment la voie NF- $\kappa$ B menant à la survie cellulaire, ou l'activation de la caspase-8 menant à la mort cellulaire.

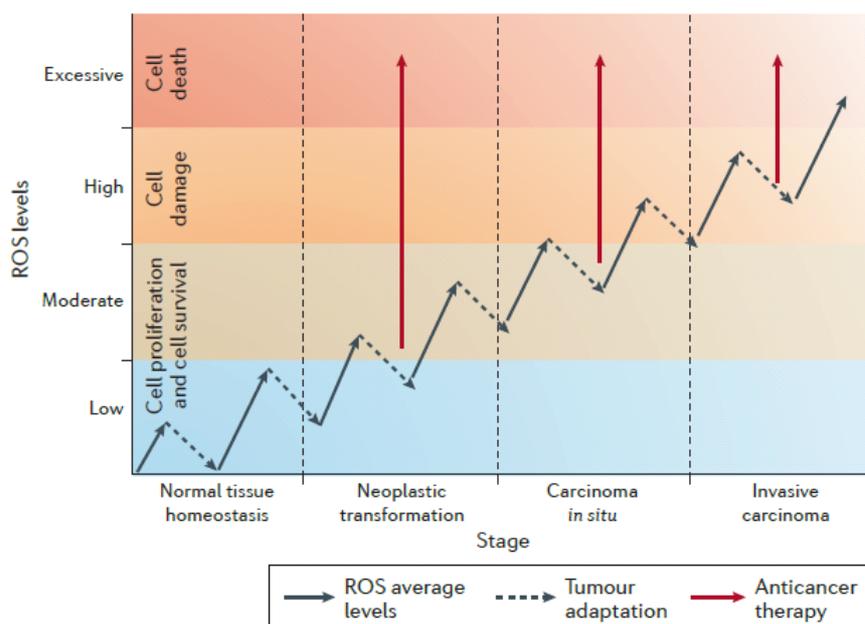
En conclusion, il existe nombreuses techniques pour caractériser une mort cellulaire par apoptose. Les plus courantes sont la mesure du potentiel de la membrane interne mitochondriale au moyen d'une sonde fluorescente, l'observation de l'activation des caspases ou encore le marquage par l'Annexine V des phosphatidylsérines exposées à la surface des cellules apoptotiques.

#### **2.4. Le stress oxydant comme nouvelle stratégie antitumorale**

La glycolyse est une voie métabolique d'assimilation du glucose et de production d'énergie qui produit du pyruvate. Ce dernier peut soit être métabolisé par fermentation en anaérobiose pour produire du lactate, soit entrer dans le cycle de Krebs qui se déroule dans la mitochondrie et qui génère plusieurs espèces anti-oxydantes.

Les cellules cancéreuses qui se divisent exponentiellement favorisent la fermentation, une voie de production d'énergie rapide à défaut d'être efficace. Ce phénomène s'appelle effet Warburg,<sup>[79]</sup> il conduit à un cycle de respiration aérobie beaucoup moins sollicité et en conséquence, un fonctionnement réduit des mitochondries et un niveau plus élevé d'ERO.<sup>[80]</sup> La voie métabolique LKB1-AMPK-p53 illustre également le talon d'Achille métabolique des cellules tumorales. À cause des nombreux autres rôles qu'elles jouent dans le métabolisme, une perte des fonctions de LKB1 ou p53 permet une croissance des cellules indéfinie, mais elle rend aussi les cellules plus susceptibles au stress oxydant.

Il est connu que certains cancers s'adaptent aux effets redox liés à cette prolifération rapide en développant des voies alternatives de réponse au stress oxydant telles que l'autophagie, ou encore la voie Nrf2 qui sera abordée dans le deuxième chapitre. En fonction de leur micro-environnement, les tumeurs peuvent de cette manière reprogrammer leur métabolisme, ce qui leur confère un avantage sélectif.<sup>[81,82]</sup> Ce phénomène a été démontré dans de nombreux types de tumeurs, notamment le cancer du sein (Figure 6).



**Figure 6.** Relations entre les niveaux d'ERO et les différents stades de la tumorigénèse (cancer du sein)<sup>[11]</sup>

C'est pourquoi une stratégie de chimiothérapie originale et plus sélective émerge dans la littérature. Elle consiste à prendre parti de ce différentiel de statut redox entre cellules normales et tumorales.<sup>[83]</sup> De cette manière, toute molécule capable de bloquer la réponse anti-oxydante ou d'élever de façon stable les niveaux intracellulaires d'ERO est susceptible d'intérêt en chimiothérapie, comme l'illustre la figure 6. Ce principe pose une base méthodologique pour ce projet, consistant notamment à évaluer les propriétés oxydantes des différents complexes étudiés.

## Résultats et Discussion

### 1. Chimiothèque, caractérisation et réactivité

#### 1.1. Synthèse et nomenclature

##### 1.1.1. Complexes de l'étude structure-activité

Une chimiothèque de complexes neutres comportant un ligand échangeable chlorido a été construite à partir de précurseurs commerciaux. Les complexes **Ir01-11** comportent des ligands de type 2-phényloxazoline (phox) nommés **L01-11**. Le motif (phox) a été choisi comme ligand chélatant car il permet l'introduction d'une large gamme de substituants électro-donneurs ou électroattracteurs sur les deux cycles, ainsi que d'un centre stéréogène en position 5 de l'oxazoline. Ces 12 complexes se distinguent donc par plusieurs caractéristiques dépendant du ligand chélatant. Les ligands (phox) peuvent par exemple être décorés sur le phényle comme **Ir03** et **Ir06**, ou sur l'oxazoline comme **Ir02** (diméthyle), **Ir07-08** (isopropyle), **Ir09-10** (phényle) et **Ir11** qui comporte un ligand benzoxazoline.

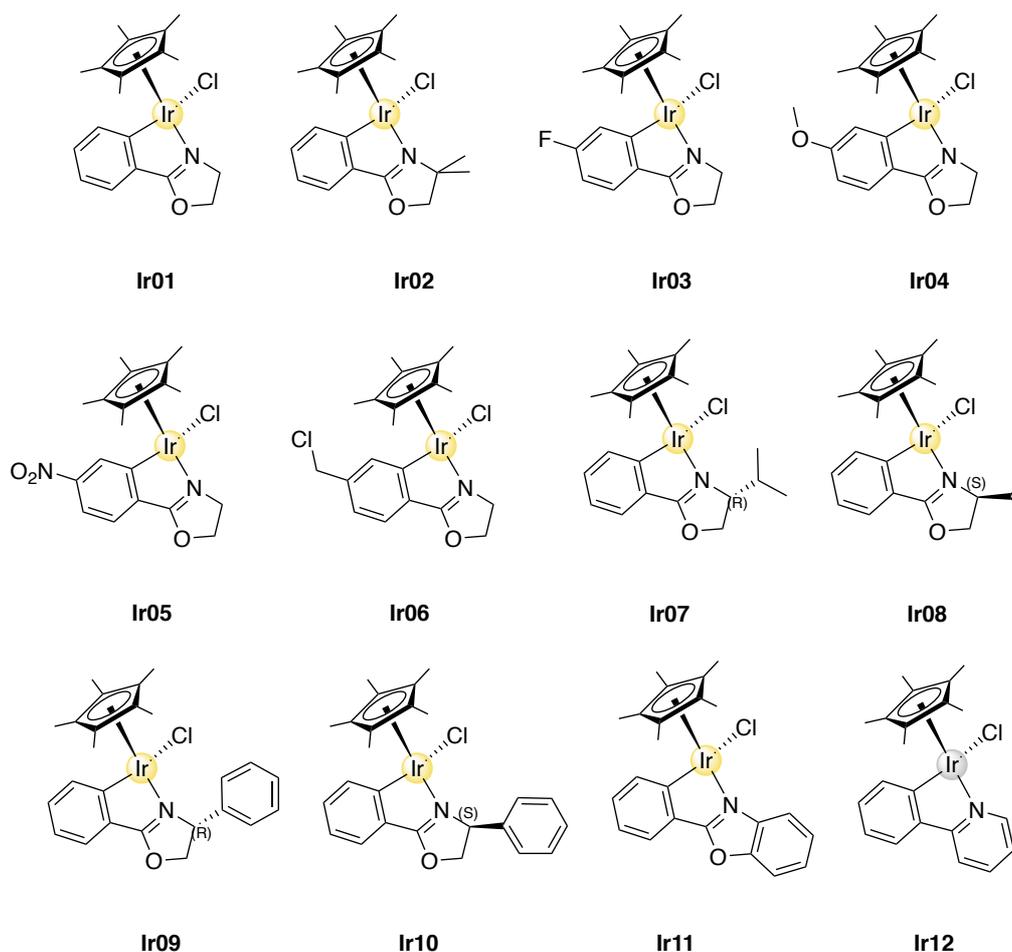
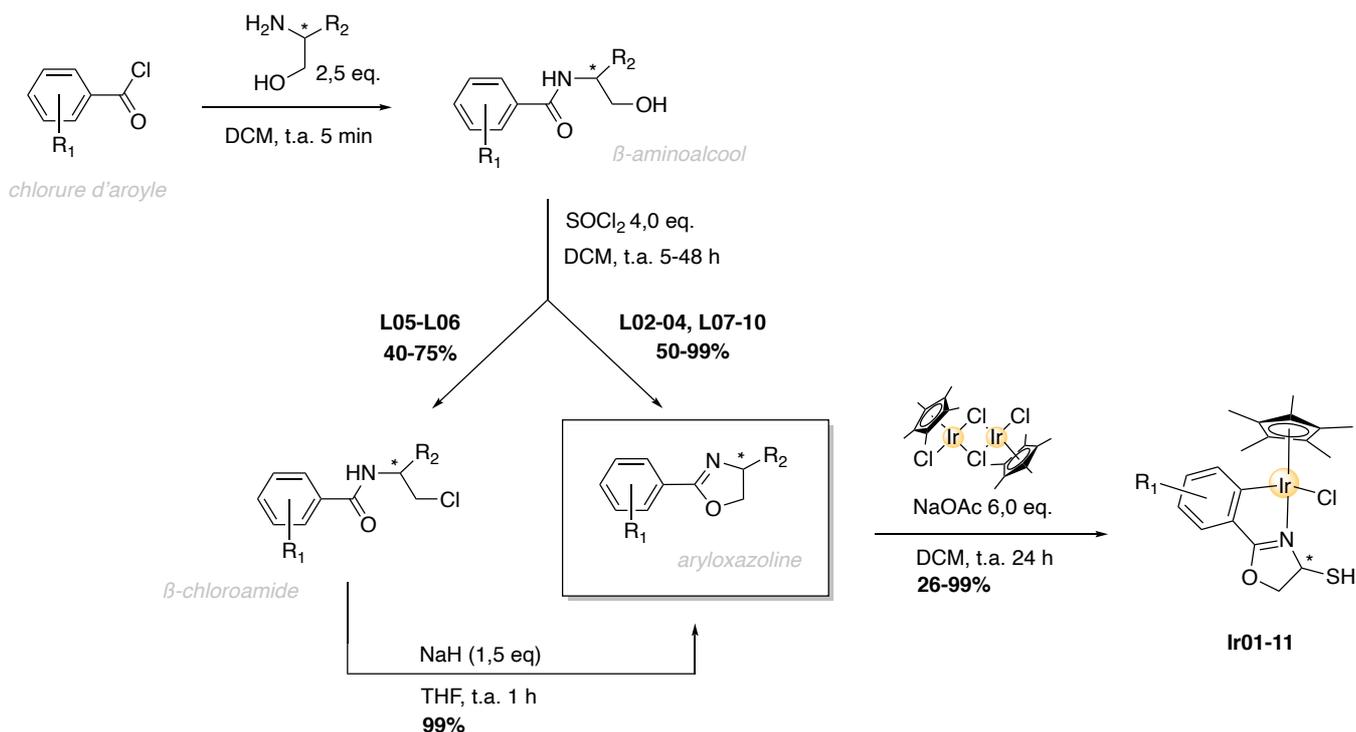


Schéma 9. Chimiothèque et nomenclature des complexes

Enfin, **Ir12** comportant un ligand 2-phénylpyridine a été intégré à la chimiothèque et constituera un point de comparaison. En effet, les propriétés de complexes comportant un ligand chélatant (ppy) ont été extensivement décrites dans la littérature, notamment par notre équipe.

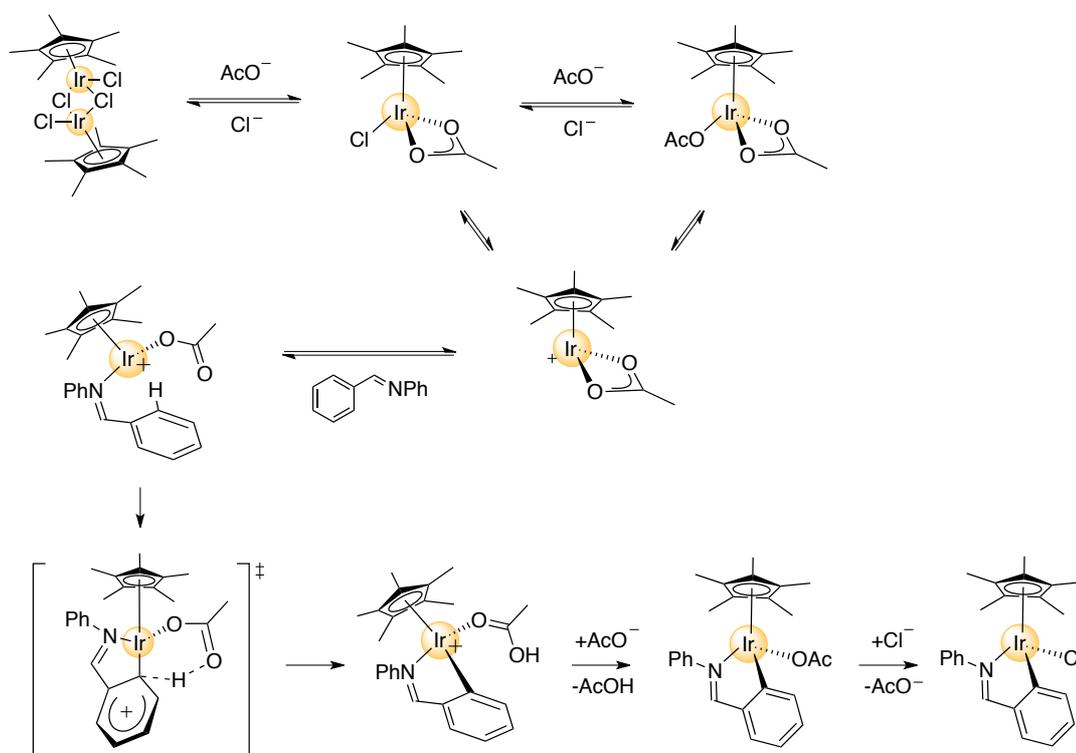
Pour accéder à ces complexes, les oxazolines **L01-10** ont d'abord été synthétisées par condensation d'un  $\beta$ -aminoalcool sur un chlorure d'aroyle suivie d'une cyclisation oxydante réalisée à température ambiante. Cette stratégie s'est révélée efficace pour la synthèse de ligands aryloxazoline substitués par un groupement neutre ou électrodonneur (Schéma 10,  $R_1 = H$  ou EDG). En revanche, lorsqu'un chlorure d'aroyle électro-appauvri est utilisé (**L05-L06**), l'aryloxazoline attendue n'est pas observée mais le  $\beta$ -chloroamide intermédiaire est isolé à la place. En effet, la fonction amide de cet intermédiaire semble désactivée pour réaliser la cyclisation finale. Cette stratégie ne permet donc pas d'obtenir directement les aryloxazolines électro-appauvries. Celles-ci sont par conséquent obtenues aisément avec de bons rendements par un traitement basique du  $\beta$ -chloroamide correspondant au moyen d'hydrure de sodium.



**Schéma 10.** Voies de synthèse employées pour l'accès aux complexes de type (phox)

**Ir01-12** ont été obtenus à partir du dimère  $[\text{Cp}^*\text{IrCl}_2]_2$  d'après une procédure décrite dans la littérature, en présence de six équivalents d'acétate de sodium. Les complexations effectuées pour **L01-12** ont donné de meilleurs rendements lorsque l'acétate de sodium, faiblement soluble dans le dichlorométhane, était broyé au mortier. Notamment, la formation

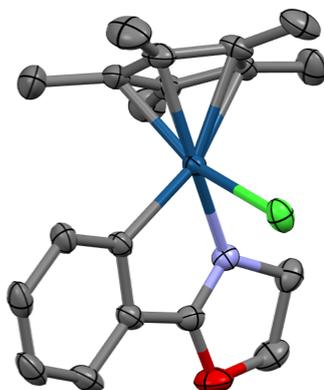
de **Ir02** dans ces conditions a été quasi-quantitative et les autres ligands substitués sur la partie oxazoline (**L07-10**) ont été complexés avec de très bon rendements (80-90%). En revanche la réaction de complexation de **L11** a été réalisée plusieurs fois avec toujours une faible conversion (< 20 %), l'azote d'une benzoxazoline étant moins nucléophile sa coordination était probablement défavorisée. Cette réaction de complexation est décrite pour l'iridium et le rhodium avec une variété de ligands comportant un atome d'azote électro-donneur comme les pyridines, pyrazoles, oximes, oxazolines, imidazoles et triazoles.<sup>[84]</sup> Le schéma 11 présente le mécanisme de complexation supposé par Li et coll. en 2009<sup>[85]</sup> pour des ligands de type phénylimine et phénylpyridine.



**Schéma 11.** Mécanisme de synthèse de complexe semi-sandwich d'iridium comportant un ligand (C<sup>^</sup>N) par C-H activation.

Dans un premier temps, l'acétate de sodium permet de casser le dimère pour former une entité monomérique Cp\*IrCl(OAc) puis la paire libre de l'atome d'azote du ligand coordine le métal. L'acétate joue alors le rôle de base et déprotonne le cycle aromatique. Cette activation de liaison C-H permet la fermeture d'un métallacycle à 5 chaînons de manière assistée par l'acétate. Enfin la coordination d'un chlorure en solution permet de fournir l'espèce neutre par échange de ligand avec l'acétate.

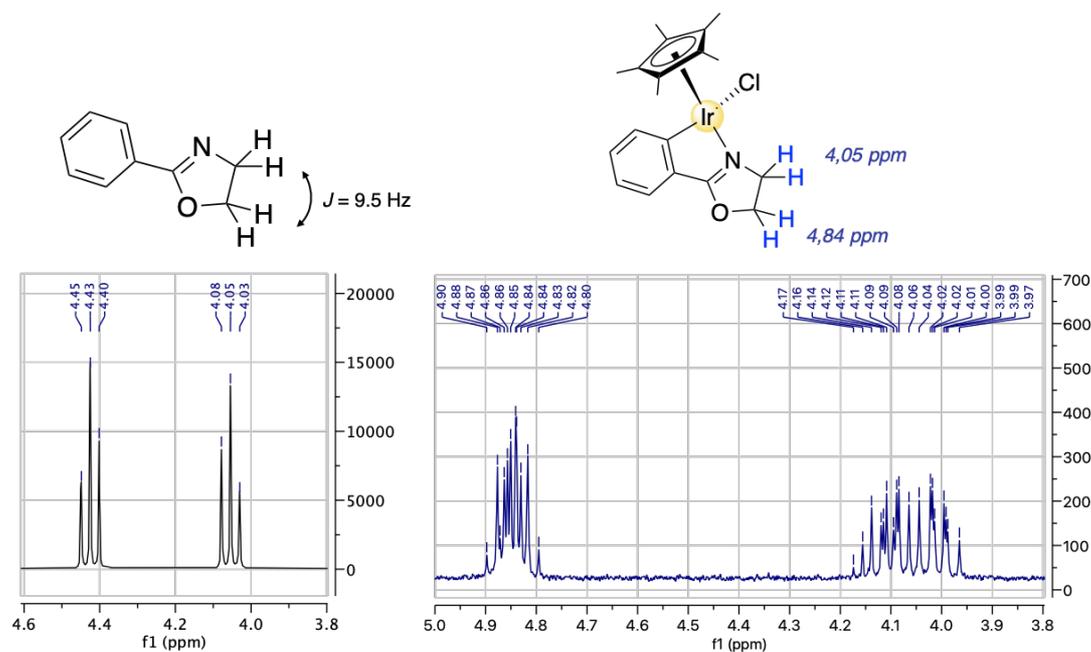
La cristallisation des complexes d'Iridium semi-sandwich neutres se révèle souvent ardue et nécessite parfois l'emploi de techniques inhabituelles.<sup>[86]</sup> Le complexe **Ir01** a néanmoins pu être cristallisé en plusieurs jours à partir d'une solution dans un mélange de méthanol et d'hexane pour l'analyse de sa structure par diffractométrie des rayons X (DRX).



**Figure 7.** Structure de **Ir01** déterminée par DRX (hydrogènes omis)

Quelques longueurs de liaisons (Å) et angles (°): Ir-Cl 2.4084 (9), Ir-N 2.076(3), Ir-C 2.054(3), C-Ir-N 77.89(13).

Quatre composés comportant des ligands chiraux (**Ir07-Ir10**) apparaissent comme mélanges de diastéréoisomères par RMN du proton dans le CDCl<sub>3</sub>. En effet, tous les complexes présentent un centre asymétrique sur l'iridium dont il résulte une inéquivalence magnétique des hydrogènes de l'oxazoline une fois complexée (Figure 8).

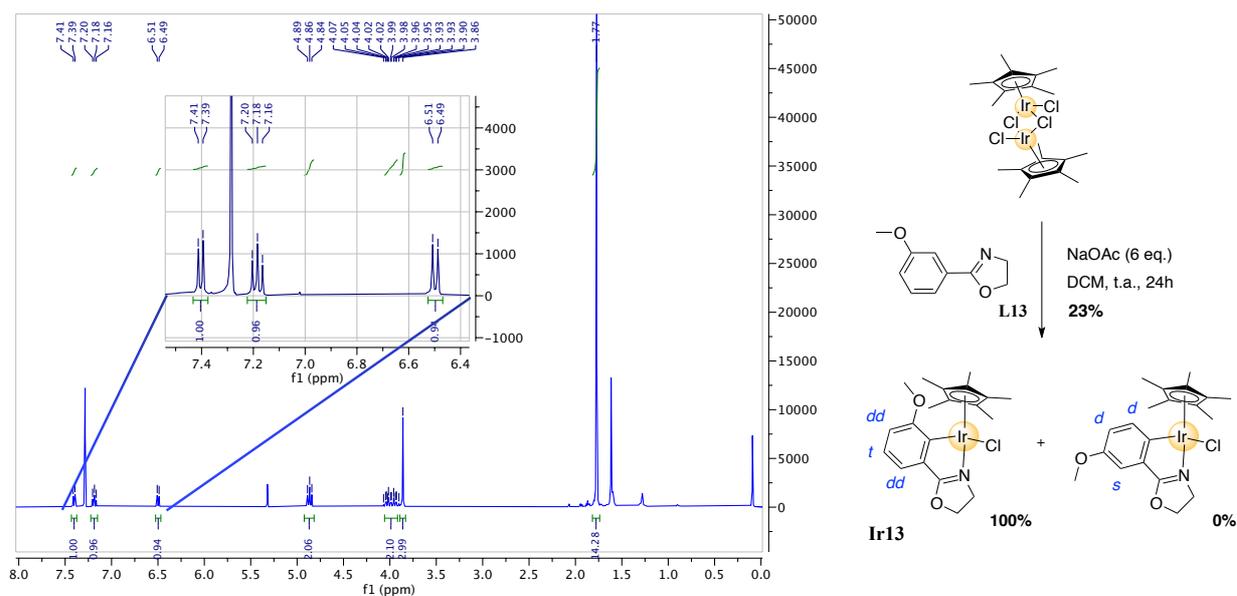


**Figure 8.** Modification de l'environnement chimique des protons de l'oxazoline après coordination (**Ir01**)

Toutefois la labilité du ligand chlorido confère à l'iridium une instabilité configurationnelle<sup>[17]</sup> et on pourra observer par la suite certains signaux diastérotopes coalescer en présence d'espèces coordinantes.

### 1.1.2. Autres complexes semi-sandwich synthétisés

D'autres complexes comportant un ligand (phox) substitué en position 2 et 3 sur le cycle aromatique ont été synthétisés. Ces ligands sont dissymétriques et leur coordination à l'Iridium peut donner deux régioisomères. Pour l'équivalent de **Ir04** comportant un groupement méthoxy en position 3 sur le cycle phényle, un seul régioisomère **Ir13** est obtenu avec un faible rendement de 23% (Figure 9). La réaction de C-H activation sur ce type de ligand est donc facilement défavorisée par des effets électroniques. De la même manière, pour certains ligands comportant des fonctions désactivantes (2-NO<sub>2</sub>, 3-NO<sub>2</sub>, 4-CF<sub>3</sub>), le produit de complexation n'a pas pu être isolé.

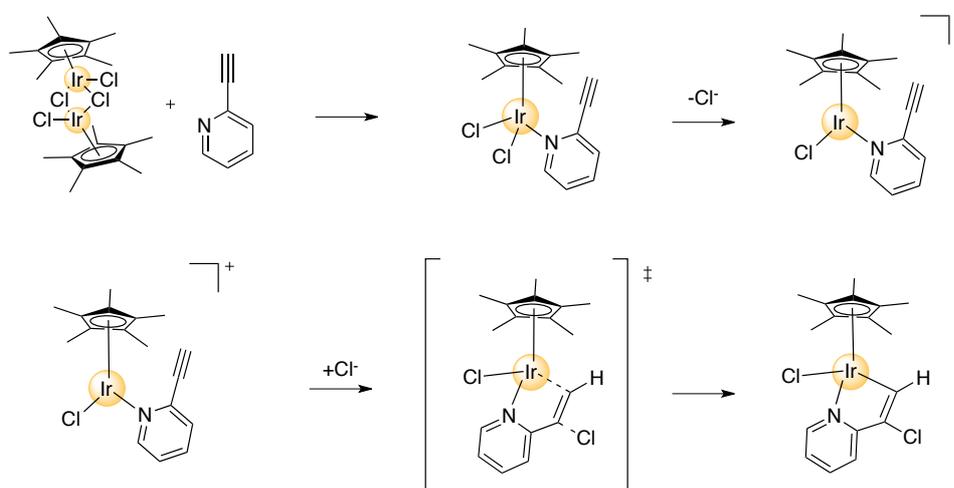


**Figure 9.** Contrôle de la régiosélectivité de la complexation de la 2-(*m*-methoxyphényl)oxazoline

Les signaux aromatiques du produit de complexation (après purification) sont deux doublets et un triplet, correspondant aux signaux attendus pour le régioisomère **Ir13**.

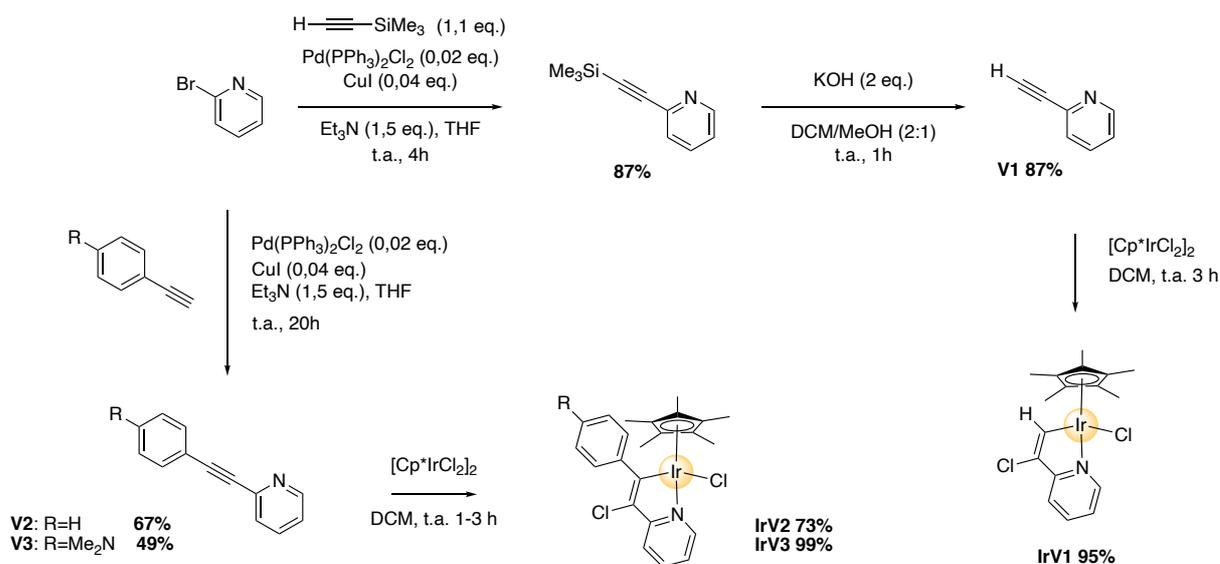
Il a été rapporté dans la littérature que les 2-alcynylpyridines réagissaient avec le dimère d'iridium [IrCl<sub>2</sub>Cp\*]<sub>2</sub> pour former de nouveaux complexes d'iridium possédant un ligand de type « (2-chlorovinyl)pyridine » (vinypy) avec d'excellents rendements. Cette réaction stœchiométrique et généralement quantitative a été décrite pour l'Iridium et le Rhodium à partir des dimères iodido, chlorido et bromido.<sup>[88]</sup> L'ion halogénure se retrouve en solution après

échange de ligand et coordination de la pyridine. Il peut alors attaquer la triple liaison sur la position qui favorise une cyclisation de type « 5 endo dig ». De cette manière, un complexe d'iridium semi-sandwich (C<sup>\*</sup>N)-chélaté est obtenu de manière plus propre, en adéquation avec le principe d'économie d'atomes de la chimie verte (Schéma 12).



**Schéma 12.** Mécanisme de coordination de ligands de type 2-alkynylpyridine

Nous avons voulu vérifier si ces nouveaux complexes obtenus efficacement étaient susceptibles de montrer une activité anticancéreuse. Trois composés de type 2-alkynylpyridine substituées ont donc été synthétisés par un couplage de Sonogashira à partir de la 2-bromo-pyridine puis mis en présence du dimère d'iridium [Cp<sup>\*</sup>IrCl<sub>2</sub>]<sub>2</sub> pour donner **IrV1-V3** avec des rendements de complexation compris entre 73 et 99% (Schéma 13).

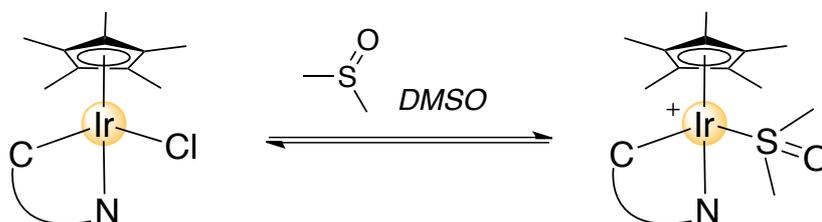


**Schéma 13.** Synthèse de **IrV1-3**

Ces complexes **IrV1-3** ont été obtenus avec une pureté satisfaisante après une étape de précipitation à partir du milieu réactionnel et n'ont pas nécessité une purification par chromatographie sur gel de silice. Par la suite, une étude de viabilité cellulaire préliminaire a montré une activité cytotoxique prometteuse pour **IrV2** sur la lignée du cancer du sein MDA-MB231. Les complexes de la série (vinypy) n'ont cependant pas été intégrés pour l'étude structure-activité en raison de leur mauvaise solubilité dans le DMSO. Cependant nous utiliserons cette réaction de complexation pour l'adjonction d'un fluorophore sur le ligand chélatant au troisième chapitre.

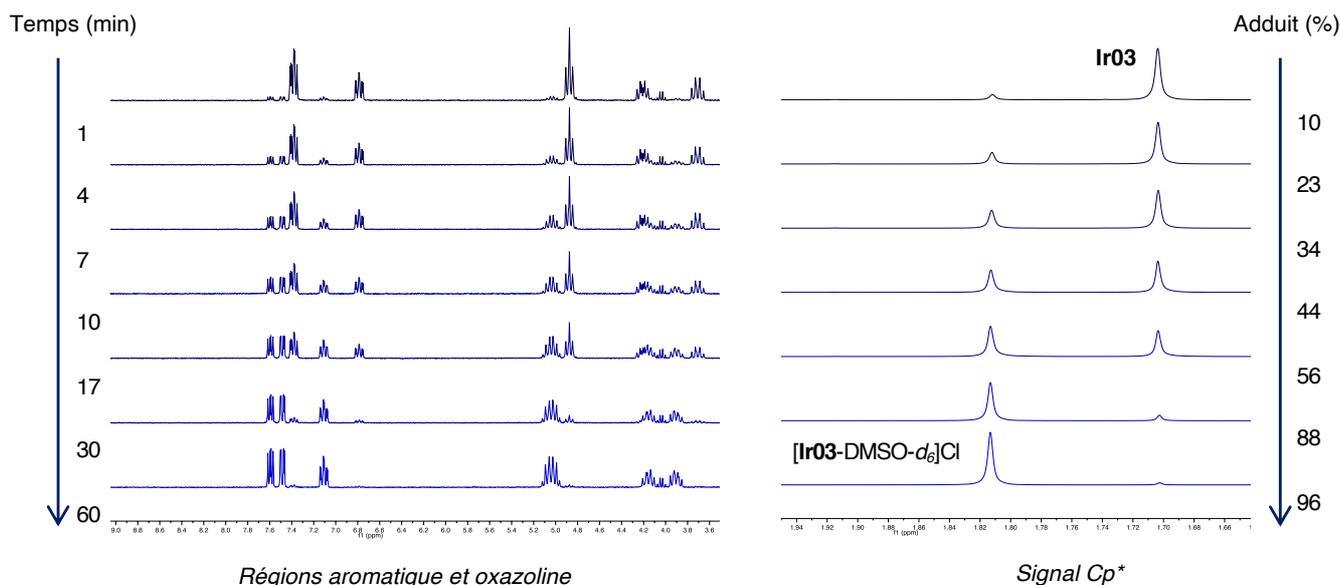
## 1.2. Données physicochimiques et réactivité

Tous les complexes synthétisés possèdent un ligand chlorido plus ou moins labile, susceptible d'être échangé avec une espèce coordinante. Pour les expériences menées sur des cellules, le DMSO sera utilisé comme solvant d'administration. Il s'agit d'un solvant miscible à l'eau, privilégié pour administrer une molécule lipophile en raison de ses bonnes propriétés de solubilisation et de sa faible toxicité.



**Schéma 14.** Formation de l'espèce cationique en solution dans le DMSO

Compte tenu cette réactivité des complexes d'iridium, leur solvolysse a été suivie au cours du temps par spectroscopie RMN dans le DMSO deutéré. Un aperçu des différents spectres enregistrés pour le complexe **Ir03** comportant un ligand 4-fluoro(phényloxazoline) est présenté dans la figure 10.



**Figure 10.** Portions du spectre RMN  $^1\text{H}$  de **Ir03** dans le  $\text{DMSO-}d_6$  à différents temps après dissolution

À l'image de **Ir03**, tous les complexes de cette étude subissent une solvolysse en présence de DMSO qui mène à la formation d'une espèce cationique majoritaire lorsque l'équilibre est atteint. La force de la liaison Ir-Cl est liée à la nature du ligand chélatant : les ligands plus riches en électrons (phox) entraînent un échange rapide ( $\leq 3$  h) à l'exclusion de **Ir11** qui comporte un ligand benzoxazoline moins électrodonneur. En effet, quand la charge du ligand chélatant est délocalisée par mésomérie (ppy > vinypy), la liaison Ir-Cl est plus forte, expliquant que demi-vie des complexes **Ir12** et **IrV1-V3** soit augmentée.

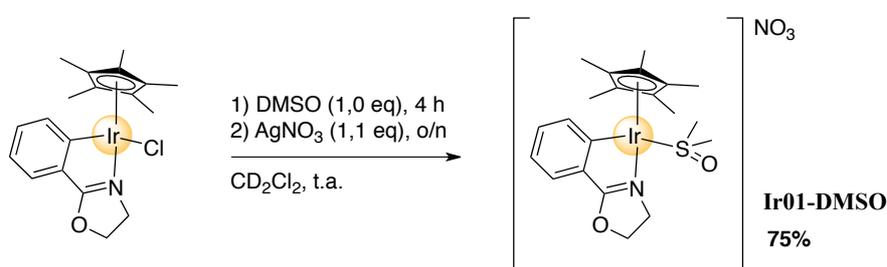
	$\delta\text{Cp}^*(\text{ppm})^{(1)}$	$t_{1/2}$ DMSO $^{(2)}$	Pourcentage à l'équilibre $^{(3)}$
<b>Ir01</b>	1,77	< 2 min	100 %
<b>Ir02</b>	1,75	6 min	90 %
<b>Ir03</b>	1,79	12 min	100 %
<b>Ir04</b>	1,76	5 min	100 %
<b>Ir05</b>	1,80	4,5 h	96 %
<b>Ir06</b>	1,76	9 min	100 %
<b>Ir07</b>	1,77 1,73(m)	3 h	90 %
<b>Ir08</b>	1,77 1,73(m)	3 h	90 %
<b>Ir09</b>	1,54 1,49	5 min	100 %
<b>Ir10</b>	1,54 1,49	5 min	100 %
<b>Ir11</b>	1,83	8 h	98 %
<b>Ir12</b>	1,68	4 h	98 %
<b>Ir13</b>	1,77	5 min	100%
<b>IrV1</b>	1,77	34 h	100 %
<b>IrV2</b>	1,44	> 150 h	Non-déterminé
<b>IrV3</b>	1,42	150 h	73 %

**Tableau 3.** Solvolysse des complexes **Ir01-12** et **IrV1-3** suivie par RMN du proton dans le  $\text{DMSO-}d_6$ .

(1) Déplacement chimique du signal pentaméthylcyclopentadiényle ( $\text{CDCl}_3$ ) montrant l'influence électronique du ligand chélatant. (2) Demi-vie du complexe neutre dans le  $\text{DMSO-}d_6$ . (3) Pourcentage de la forme échangée  $[\text{Cp}^*(\text{phox})\text{Ir-DMSO-}d_6]^+$  à l'équilibre.

Au sein de la série **Ir01-10**, les effets inductifs attracteurs des substituants, caractérisés par la constante de Hammett ( $\sigma$ -I) semblent augmenter la vitesse de l'échange comme pour les complexes **Ir03** (fluoro) et **Ir05** (nitro). De plus, un effet stérique non négligeable est observé pour la substitution sur la partie oxazoline par un groupement isopropyle (**Ir07-08**) qui présentent également une demi-vie étendue à plusieurs heures. En somme, une combinaison d'effets électroniques et stériques semble être à l'origine des écarts entre les valeurs présentées dans le tableau 3.

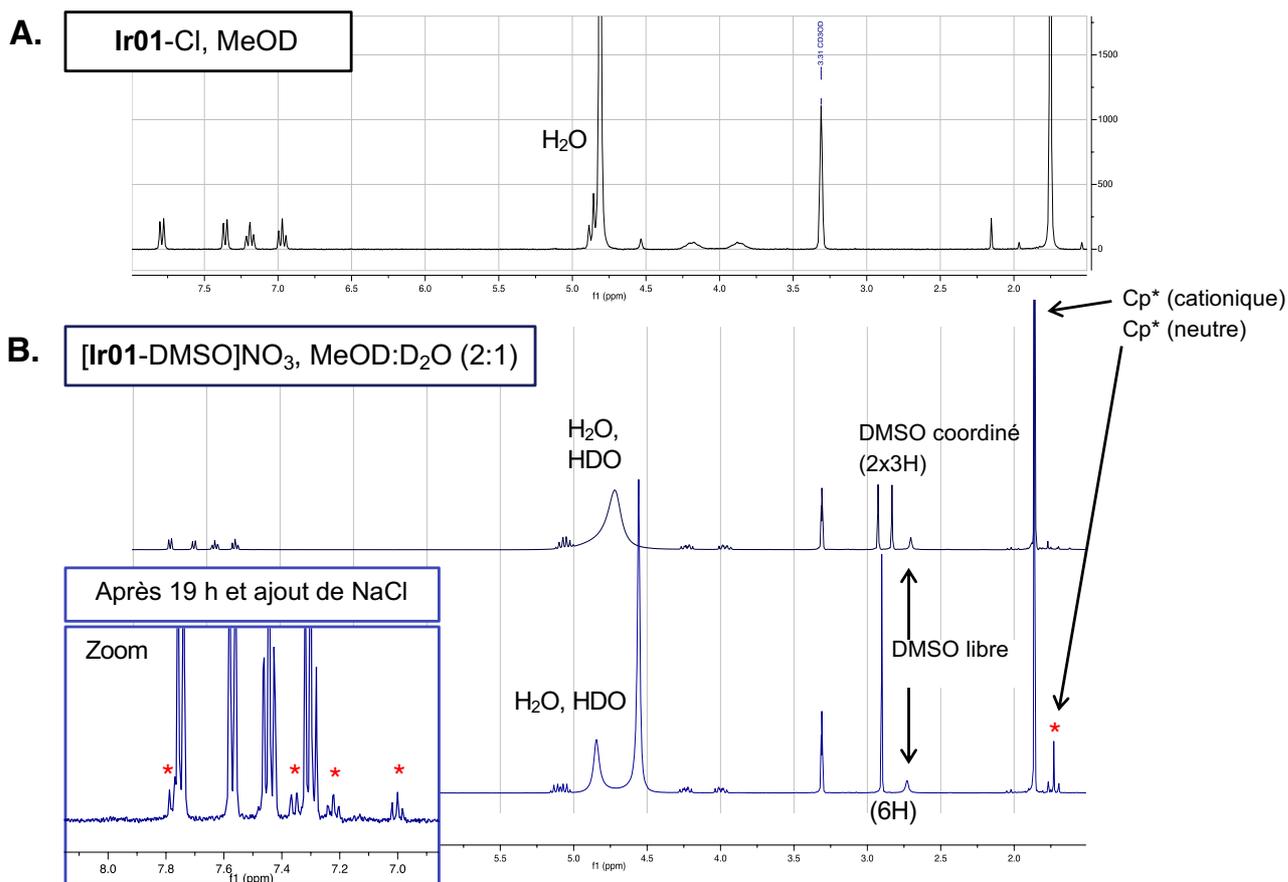
Afin de connaître le devenir de cet adduit *solvento* dans un contexte biologique, l'adduit **Ir01-DMSO** comportant un contre-anion nitrate a été isolé :



**Schéma 15.** Synthèse d'un adduit DMSO par abstraction de ligand chlorido

Cette synthèse a été réalisée dans un solvant deutéré ( $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ) pour permettre un suivi par RMN de l'avancement de la réaction. En présence de 1,0 équivalent de DMSO, aucune coordination du DMSO n'est observée même après 4 h. En revanche lors de l'ajout de nitrate d'argent, 60 % de l'adduit se forme en une quinzaine de minutes. La réaction a été agitée durant une nuit pour atteindre une conversion finale de 75 %. Cette expérience permet de conclure que dans un solvant non-coordinant comme le dichlorométhane, la formation de l'adduit n'est pas observée en présence d'un seul équivalent de DMSO. Il est donc probable que le remplacement du ligand chlorido par le ligand DMSO ne s'effectue pas par substitution nucléophile. En revanche il nécessiterait la rupture de la liaison Ir-Cl par ajout du sel d'argent et précipitation de AgCl pour donner un complexe cationique intermédiaire à 16 électrons.

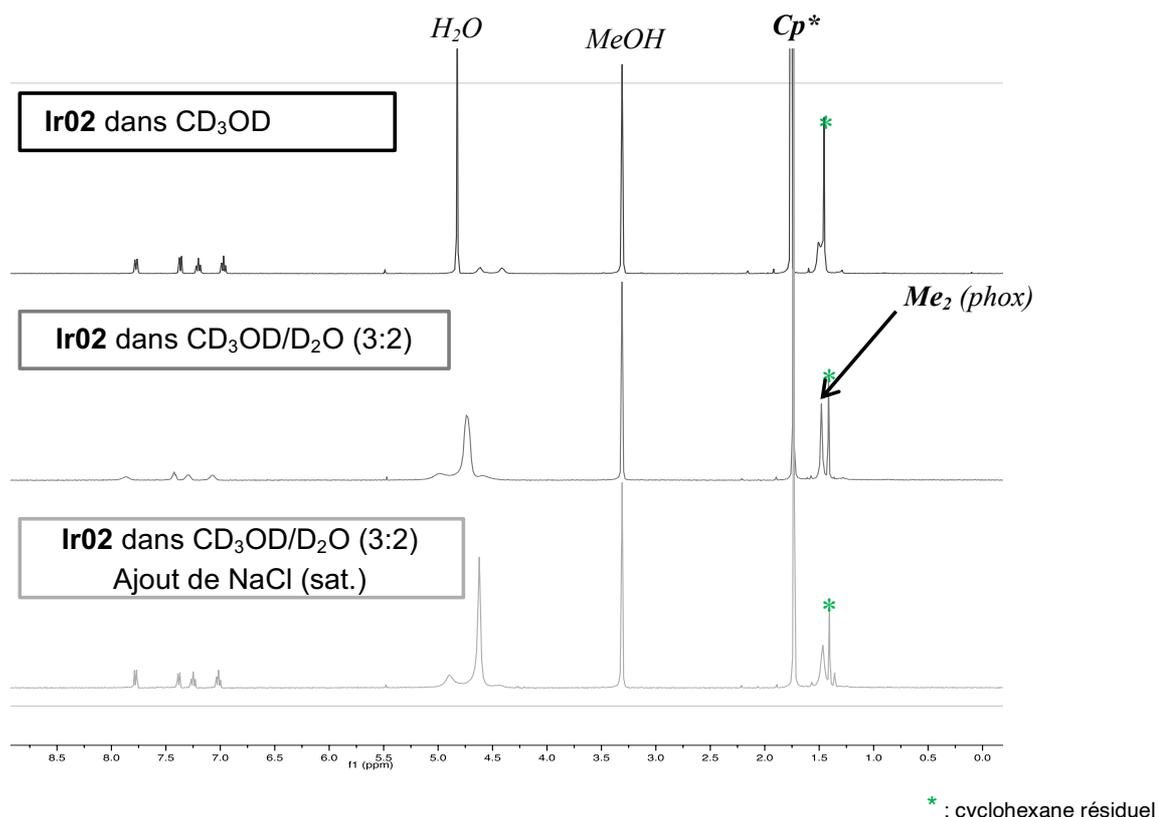
Le spectre  $^1\text{H}$  RMN de **Ir01-DMSO** a ensuite été enregistré dans un mélange  $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$  (2:1) afin de rechercher la possible formation d'une espèce *aqua* (Figure 11).



**Figure 11.** Stabilité de l'adduit **Ir01-DMSO** en milieu aqueux et après addition de NaCl (1,1 M)

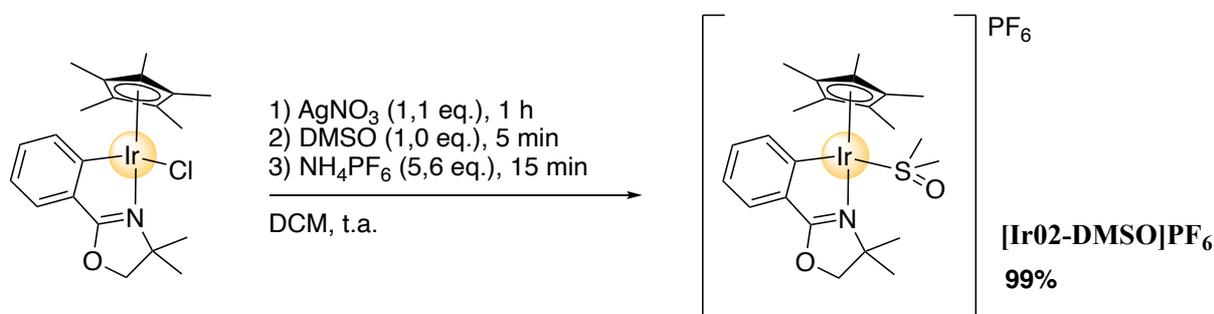
L'ajout d'une concentration saturante de NaCl dans MeOH/H<sub>2</sub>O (2 : 1) (1,1 M) induit la coalescence des deux singulets autour de 2,89 ppm attribués aux deux méthyles du DMSO, marquant un échange très rapide entre le chlorure et le DMSO à l'échelle de la RMN. Cette haute concentration en chlorure a également favorisé le déplacement partiel du DMSO par les ions Cl<sup>-</sup> menant à la formation d'environ 10 % du complexe neutre. Cette expérience démontre que le déplacement par l'eau du ligand DMSO de **Ir01-DMSO** serait très défavorisé, prouvant que la spéciation du complexe réellement administré lors des tests biologiques sera d'au minimum 90 % de cette forme *solvento* cationique.

Afin d'avoir plus d'information sur la labilité du ligand chlorido en milieu aqueux, il est également intéressant de vérifier si son échange avec l'eau est possible. Pour cela, le spectre RMN du proton de **Ir02** (21 mM) a été enregistré dans le méthanol deutéré, puis dans un mélange MeOD/D<sub>2</sub>O (3:2) avant et après l'ajout d'une concentration saturante de NaCl. Ces trois spectres sont superposés dans la figure 12.



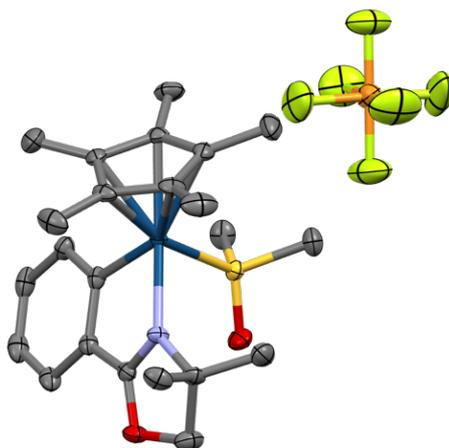
**Figure 12.** **Ir02** est stable sous sa forme chlorido en présence d'un excès d'eau

Hormis un léger élargissement des pics dû à l'addition de D<sub>2</sub>O, aucun changement dans le spectre résultant n'indique la formation d'un complexe aqua **Ir02-OD<sub>2</sub><sup>+</sup>**. De plus, l'addition de NaCl n'a pas induit de déplacement des signaux de **Ir02** mais un resserrement des multiplets de la zone aromatique. En conséquence, dans ces conditions **Ir02** est stable et ne semble pas subir d'aquation à l'échelle temporelle de la RMN. De la même manière que pour **Ir01**, la synthèse d'un complexe **Ir02-DMSO** été réalisée par abstraction de Cl au moyen de nitrate d'argent. La réaction s'est révélée être beaucoup plus efficace sur ce substrat, avec un rendement quasi-quantitatif (Schéma 16).



**Schéma 16.** Synthèse de **[Ir02-DMSO]PF<sub>6</sub>**

**Ir02** prend souvent la forme d'un semi-solide très visqueux d'une couleur orange foncé, après un séchage complet de quelques jours sous pression réduite, on obtient une mousse jaune vif. De fait, l'obtention d'un monocristal de **Ir02** s'est révélée difficile. À l'inverse, le complexe échangé **Ir02-DMSO** a été plus simple à cristalliser, son caractère ionique et l'hexafluorophosphate comme contre anion lipophile ont vraisemblablement facilité ce processus.



**Figure 13.** Structure de **Ir02-DMSO** déterminée par DRX (hydrogènes omis)

Cette structure permet de confirmer que le DMSO coordine l'iridium par l'atome de soufre, ce résultat était prévisible d'après la théorie HSAB. En effet l'Iridium(III) cationique est plutôt mou, tout comme le soufre par rapport à l'oxygène du DMSO.

	Référence	Ir-Z (Å)	Ir-C(phox) (Å)	Ir-N(phox) (Å)	Angle C-Ir-N (°)	Angle dièdre N-C-C-O (°)
<b>[Ir02-DMSO]PF<sub>6</sub></b>	-	2,303	2,068	2,105	77,81	<b>19,80</b>
<b>[Ir02-NCMe]PF<sub>6</sub></b>	[ <sup>89</sup> ]	<b>2,050</b>	2,068	2,118	77,07	9,83
<b>Ir01-Cl</b>	[ <sup>90</sup> ]	2,408	2,054	2,076	77,88	15,77

**Tableau 4.** Comparaison des données cristallographiques de trois complexes semi-sandwich

Lorsque le ligand chlorido de **Ir02** est échangé par l'acétonitrile,<sup>[89]</sup> on constate que l'azote est plus proche du métal que le soufre du DMSO ou le chlorido de **Ir01**. Par ailleurs, la nature du ligand Z semble avoir peu d'influence sur la géométrie en tabouret de piano du complexe d'après les valeurs comparées de l'angle C-Ir-N. Enfin la plus grande torsion du cycle oxazoline est observée pour l'adduit DMSO qui est le ligand le plus encombrant.

### 1.3. Propriétés catalytiques de Ir01-10

Dans le cadre de cette étude, nous postulons que les complexes **Ir01-10** peuvent être activés par aquation de manière transitoire pour catalyser l'oxydation du NADH et produire du  $\text{H}_2\text{O}_2$  dans les cellules. Sadler et coll. proposent en effet une corrélation entre ce pouvoir catalytique et la génération de stress oxydant induit par des complexes apparentés à **Ir12**, observée dans des lignées A2780 et MRC-5 par cytométrie en flux.

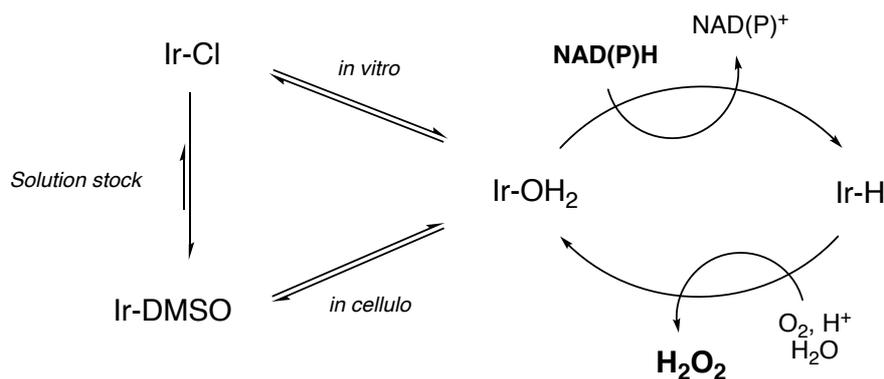


Schéma 17. Cycle catalytique expliquant la production de  $\text{H}_2\text{O}_2$  adapté de Sadler et coll.<sup>[42]</sup>

Afin de valider cette hypothèse, des études de spectroscopie ont dans un premier temps été réalisées dans des conditions physiologiques modèles. Ces analyses sont menées à 37 °C dans du tampon phosphate 5 mM pH 7,4 en présence de NADH 100  $\mu\text{M}$  et 10  $\mu\text{M}$  de complexe. Les solutions mères des complexes sont préparées dans le méthanol, ainsi ils sont sous forme neutre Ir-Cl. Le pouvoir oxydant de **Ir01-Ir10** vis-à-vis du NADH est suivi en observant la décroissance du pic d'absorption caractéristique du NADH à 340 nm. **Ir08** a été choisi comme modèle pour suivre l'évolution du spectre entier (Figure 14) puis trois mesures indépendantes ont été réalisées en triplicats au moyen d'un lecteur de plaque pour chaque complexe.

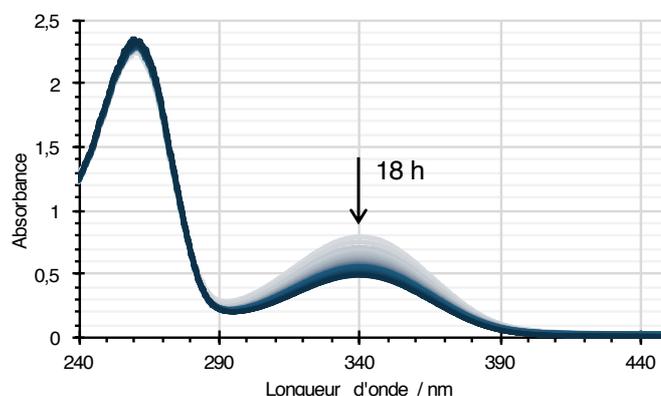
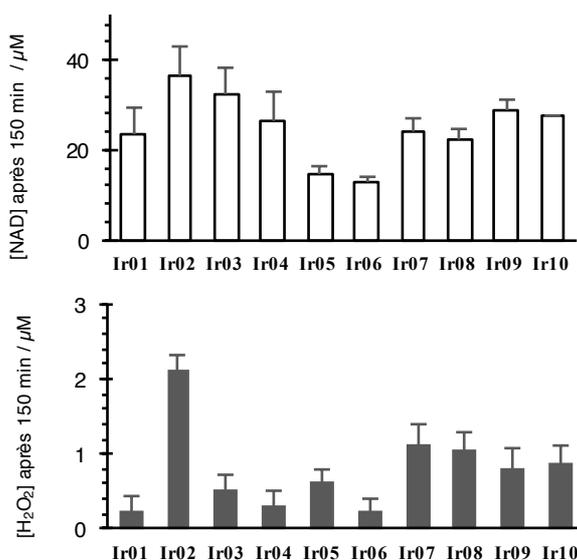


Figure 14. Évolution du spectre d'absorption d'une solution de NADH (100  $\mu\text{M}$ ) en présence de **Ir08** (10  $\mu\text{M}$ ) durant 18 heures

Par la suite, la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence de dioxygène a été mesurée *in vitro* au moyen du test Amplex Red®, un dosage enzymatique HRP-dépendant utilisant un substrat fluorogène. Il a été rapporté dans la littérature que l'auto-oxydation du NADH constituait un faux positif expérimentalement observé lors des premiers essais.<sup>[91]</sup> Les concentrations de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indiquées ci-après et mesurées en triplicats ont donc été obtenues dans des conditions modifiées où l'ajout de 40 U/mL de SOD a permis de prévenir l'oxydation spontanée du substrat Amplex.

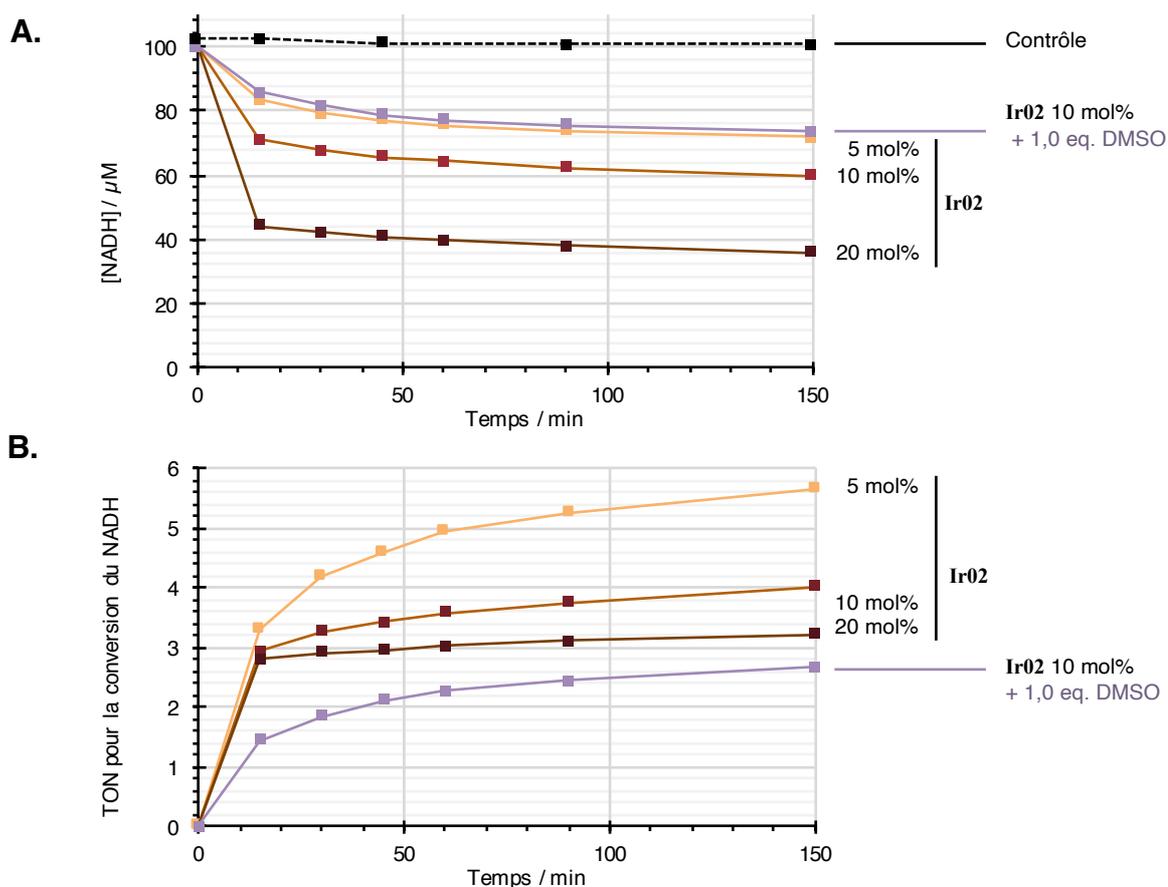
	[NADH] <sup>(1)</sup>	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>(2)</sup>
<b>Ir01</b>	23,4 ± 6,1	0,25 ± 0,18
<b>Ir02</b>	36,8 ± 6,5	2,13 ± 0,18
<b>Ir03</b>	32,6 ± 5,8	0,53 ± 0,20
<b>Ir04</b>	26,7 ± 6,6	0,32 ± 0,19
<b>Ir05</b>	14,6 ± 2,0	0,63 ± 0,16
<b>Ir06</b>	12,9 ± 1,1	0,25 ± 0,13
<b>Ir07</b>	24,3 ± 2,7	1,13 ± 0,27
<b>Ir08</b>	22,1 ± 2,7	1,05 ± 0,25
<b>Ir09</b>	28,7 ± 2,5	0,82 ± 0,26
<b>Ir10</b>	27,4 ± 0,5	0,87 ± 0,25



**Figure 15.** Étude du pouvoir catalytique des composés **Ir01-Ir10**

(1) Concentration (µM) de NADH converti en 150 min (2) Concentration (µM) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produite en 150 min

Les données du tableau précédent sont représentées par des histogrammes afin de comparer visuellement les complexes. D'après ces résultats, si **Ir01-10** sont tous capables d'accepter un hydrure du NADH, seulement les complexes substitués sur l'oxazoline (**Ir02** et **Ir07-10**) peuvent transférer cet hydrure à l'O<sub>2</sub> dissous pour produire des quantités détectables de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cette tendance peut-être due aux différences d'hydricité<sup>[92]</sup> (force du donneur d'hydrure) parmi la série liée au caractère inductif donneur des substituants présents sur le cycle oxazoline. De manière rassurante, les couples d'isomères **Ir07-Ir08** et **Ir09-Ir10** ont montré des résultats similaires entre eux. En somme, **Ir02** est le complexe reproduisant le plus efficacement l'action de la NADH oxydase *in vitro*. La présence de DMSO constitue cependant un frein à cette activité. Les graphes ci-après (Figure 16) illustrent les différences d'activité observées (en concentration de NADH et en TON) pour différents pourcentages molaires de catalyseur, ainsi qu'en présence d'un équivalent de DMSO.



**Figure 16.** Inhibition de l'oxydation du NADH en présence de DMSO

**A.** La fraction de NADH convertie augmente avec le pourcentage de catalyseur. En présence de DMSO, 10 mol% IrO2 présente une efficacité réduite, similaire à 5 mol% IrO2.

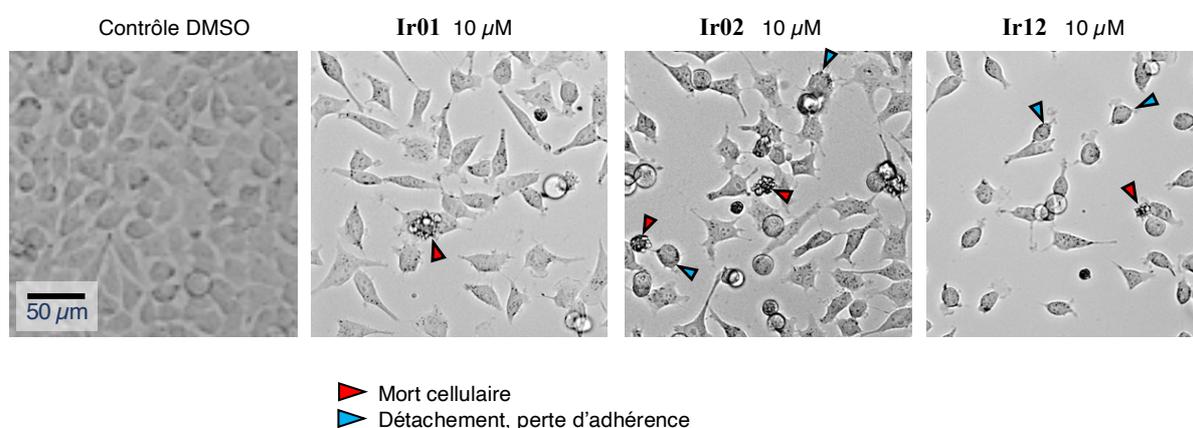
**B.** Dans toutes les conditions, un TON > 1 est obtenu donc le processus d'oxydation du NADH est catalytique. Cependant le DMSO inhibe drastiquement cette activité.

Bien qu'une grande diversité de ligands compétiteurs existe dans le contexte intracellulaire, cette étude conforte l'hypothèse de Sadler vérifiée qualitativement par des bandelettes colorées<sup>[93]</sup> et sera ensuite validée sur des cellules tumorales. Elle démontre la capacité des complexes à oxyder le NADH et à produire des quantités suffisantes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour produire un stress oxydant. En effet, les concentrations physiologiques en NAD(P)H dans des cellules tumorales sont estimées de l'ordre de 100  $\mu M$ ,<sup>[94,95]</sup> bien que la forme oxydée soit dix à cent fois plus concentrée.<sup>[96]</sup> Quant à l'homéostasie du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, elle est maintenue à une concentration basale de quelques nanomolaires.<sup>[97]</sup>

## 2. Étude de la cytotoxicité des complexes

### 2.1. Morphologie

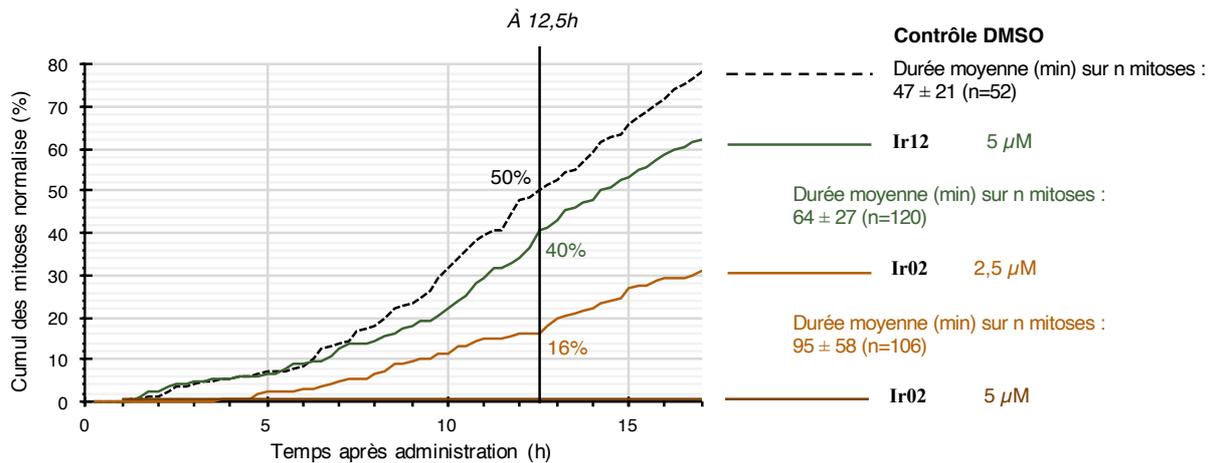
Dans cette deuxième partie, l'effet des complexes sera examiné sur des lignées cellulaires tumorales afin d'obtenir des informations sur leur mécanisme d'action. Dans un premier temps, l'observation de cellules HeLa-HyPer traitées par les composés par microscopie de contraste de phase a permis de démontrer leur toxicité. Les images obtenues après 24 h de traitement sont comparées à celles de cellules traitées par le véhicule (DMSO) et montrent une diminution de la densité cellulaire suggérant un arrêt de prolifération.



**Figure 17.** Images de microscopie en contraste de phase de cellules HeLa après 24 h de traitement

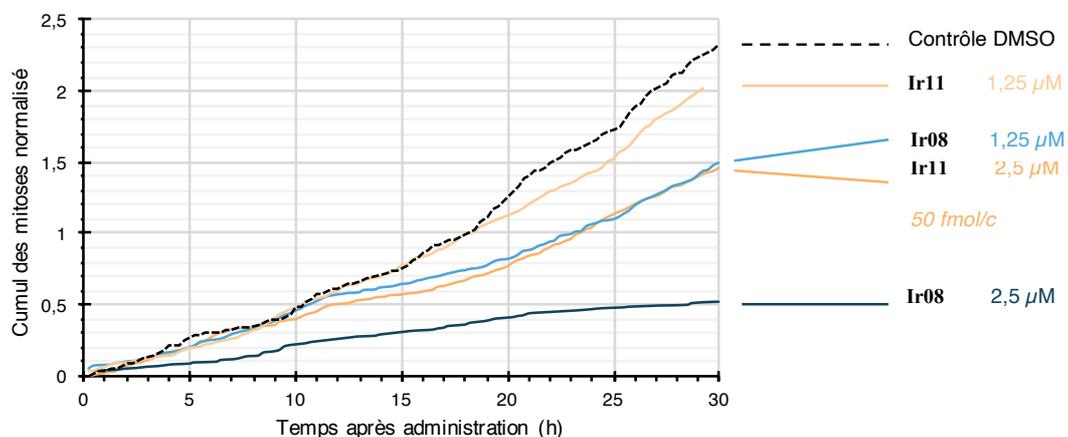
Pour tous les complexes étudiés, un phénotype de mort cellulaire est observé, illustré dans la figure 17 pour **Ir01**, **Ir02** et **Ir12** administrés à une concentration de 10 µM. De plus, la perte d'adhérence est un effet morphologique induit par les trois composés sur la lignée HeLa en particulier pour les cellules exposées à **Ir12**. Afin de comprendre l'évolution des cellules vers cette morphologie, cette même lignée a été suivie par vidéo-microscopie pour une durée de 16 h à raison d'une image toutes les 15 min. Lors du traitement par plusieurs composés à faible concentration, un allongement de la durée de mitose et une inhibition dose-dépendante de l'entrée en mitose sont observés. À partir de 5 µM pour **Ir02** et 10 µM pour **Ir12**, plus aucune cellule n'entre en division, l'effet est cytotatique accompagné d'une perte de motilité.

Cet effet des complexes sur la mitose a été quantifié en décomptant de cellules entrant en mitose puis vérifiant la sortie de mitose et passage en cytotérièse. Des cellules HeLa traitées par les composés ont été observées par vidéo-microscopie et le cumul des entrées en mitoses sur le champ d'observation (duplicat, normalisation par le nombre de cellules initiales) est relevé ci-dessous pour **Ir12** et **Ir02**.



**Figure 18.** Courbes de décompte cumulé des mitoses, normalisé en temps et par le nombre initial de cellules

Les cellules exposées à 5  $\mu\text{M}$  **Ir02** ne rentrent plus en division. Pour la concentration 2,5  $\mu\text{M}$ , les mitoses sont ralenties mais l'effet n'est pas cytotatique donc le passage en cytodiérèse est quand même permis malgré une durée moyenne de mitose doublée. Cela signifie que **Ir02** affecte sévèrement les fonctions du cycle cellulaire. D'après la figure 18, l'effet de **Ir12** est beaucoup moins prononcé : après 12,5 h, 50 % du nombre initial des cellules s'est divisé pour le contrôle, 40 % pour 5  $\mu\text{M}$  **Ir12** et 16 % pour 2,5  $\mu\text{M}$  **Ir02**. Par la suite, cette expérience a été reproduite sur une plus longue durée pour rechercher des effets plus tardifs.

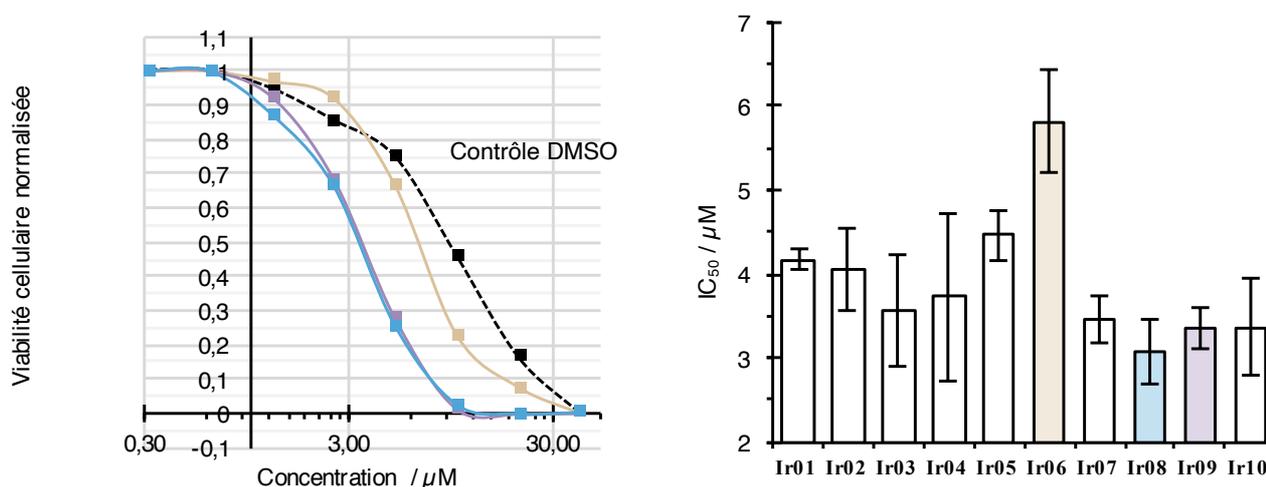


**Figure 19.** Décompte des mitoses sur 30 h pour les traitements par **Ir08** et **Ir11**

Comme l'illustre la figure 19, l'effet de **Ir08** et **Ir11** sur la mitose s'est révélé identique à celui des complexes précédents. Il se caractérise par un décrochage de la courbe par rapport au contrôle qui survient tardivement. De plus, une augmentation significative de la durée des mitoses a été relevée dans toutes ces expériences, elle était en moyenne deux fois supérieure à celle du contrôle pour le traitement par **Ir02**. Pour comprendre l'origine de ces perturbations de la mitose, nous évaluerons par la suite l'effet des complexes sur le cycle cellulaire.

## 2.2. Détermination de l'IC<sub>50</sub>

La toxicité générale des complexes est évaluée au moyen du test colorimétrique MTT. Ce test repose sur l'activité métabolique des cellules étudiées que l'on quantifie par lecture d'absorbance après 96 h de traitement. L'inhibition de prolifération est dépendante de la quantité de formazan générée dans le puits et la concentration inhibitrice médiane (IC<sub>50</sub>) peut ainsi être quantifiée en moyennant trois manipulations indépendantes réalisées en triplicat. Cette méthode a l'avantage de fournir une valeur d'IC<sub>50</sub> d'après une large gamme de concentrations, avec un temps d'analyse relativement rapide. Cependant, la viabilité cellulaire est partiellement liée à l'activité mitochondriale, ce qui peut biaiser l'analyse. De plus, elle permet de constater de la toxicité du DMSO, observable dès 1%<sub>vol</sub> (courbe pointillée correspondant à des volumes équivalents aux doses administrées).



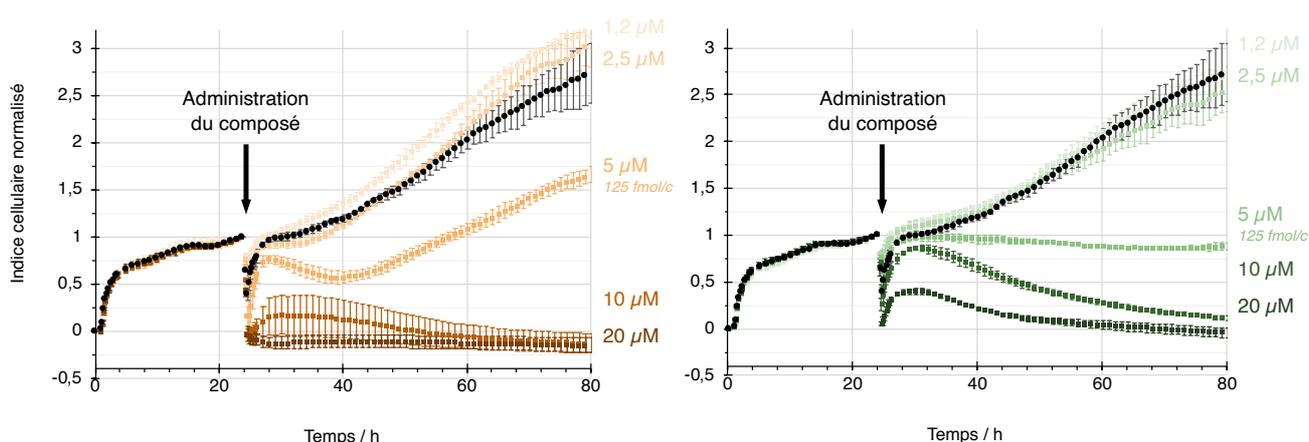
**Figure 20.** Détermination de l'IC<sub>50</sub> de Ir01-10 par le test MTT (16 000 cellules/cm<sup>2</sup>)

Les valeurs d'IC<sub>50</sub> relevées ci-dessus sont obtenues par régression non-linéaire (courbe d'inhibition sigmoïde à 4 paramètres) d'après les données brutes moyennes d'absorbance du triplicat. Pour chaque complexe, l'expérience a été menée trois fois et l'IC<sub>50</sub> est présenté comme moyenne avec écart-type sur l'histogramme. Les composés comportant des groupements lipophiles sont parmi les plus toxiques. Cependant, la substitution du ligand chélatant (phox) ne semble pas jouer un rôle déterminant dans la toxicité générale. En effet, ni la structure du ligand ni la stéréochimie ne montrent d'effet significatif entre les complexes compte tenu des barres d'erreur.

La densité cellulaire lors du traitement a une certaine influence sur la mesure de cytotoxicité. En effet, en faisant l'hypothèse d'une internalisation rapide et totale du composé, des cellules trop denses peuvent entraîner une déplétion de sa concentration dans le milieu de culture. Par conséquent, on désignera dans ce chapitre des concentrations de traitement et leur équivalent en fmol/c (quantité de complexe rapportée au nombre de cellules). À titre de comparaison, l'IC<sub>50</sub> de **Ir02** pour la densité du test MTT correspond à 50 fmol/c.

### 2.3. Inhibition de prolifération

Afin de mieux caractériser les effets antiprolifératifs des complexes, ils ont été administrés en triplicat à des cellules HeLa suivies durant plusieurs jours par impédancemétrie. Le système RTCA (xCELLigence®) offre une mesure d'impédance dépendante de la surface des puits recouverte par le tapis cellulaire. Pour cela, les cellules sontensemencées dans des plaques dont les puits sont recouverts d'électrodes d'or. L'étalement des cellules et l'aire recouverte par le tapis cellulaire sont directement proportionnels aux variations d'impédance (indice cellulaire) mesurées au niveau des électrodes. Cette technique permet donc de suivre la prolifération et l'adhérence des cellules en temps réel et de manière non-invasive. Les profils types de prolifération par impédancemétrie sont différents des courbes de mitoses cumulées : ils comportent une phase d'adhérence, une phase de croissance exponentielle puis la courbe atteint un plateau lorsque les cellules sont confluentes (inhibition de contact). Les courbes d'indice cellulaire normalisé sont présentées pour le complexe **Ir02** (marron) et le complexe (ppy) **Ir12** (vert).



**Figure 21.** Profils de prolifération de la lignée HeLa selon le complexe administré **Ir02** et **Ir12**

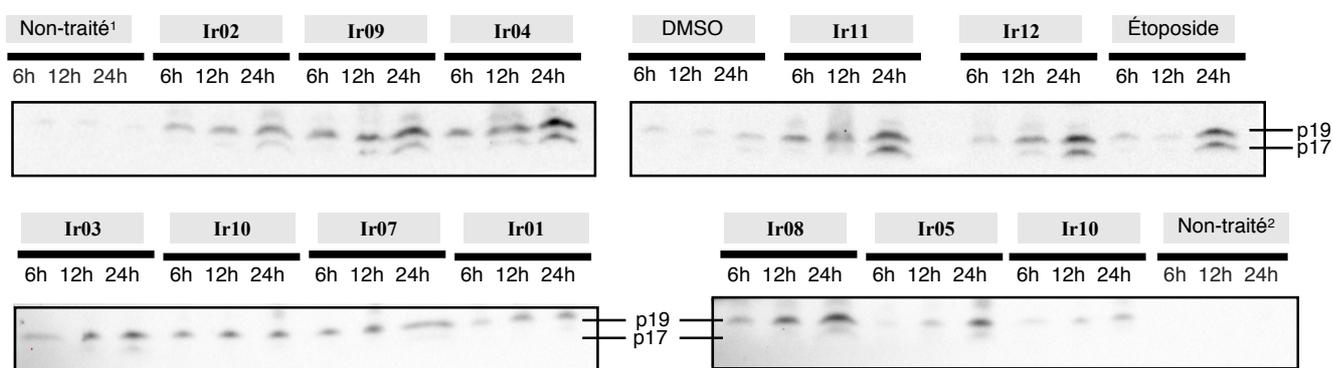
Ces profils montrent qu'à une concentration de 5 μM de **Ir02** les cellules recommencent à proliférer à une vitesse comparable au contrôle. En revanche la même concentration de **Ir12**

présente un phénotype statique même après trois jours. Les prochaines analyses seront donc restreintes à la période de traitement comprise entre 0 et 24 h, pour caractériser la mort cellulaire induite par les composés. Comme la prolifération des cellules HeLa est inhibée par les composés, des perturbations de leur cycle cellulaire seront également explorées par la suite.

La technique RTCA a permis de calculer un  $IC_{50}$  dépendant du temps pour différents complexes. En effet, un nombre suffisant de concentrations permet de tracer une courbe d'inhibition sigmoïde dont la régression est effectuée par le logiciel xCELLigence®. Les  $IC_{50}$  des complexes **Ir02** (5,0  $\mu$ M), **Ir04** (4,7  $\mu$ M), **Ir08** (3,6  $\mu$ M), **Ir10** (4,4  $\mu$ M) et **Ir12** (5,0  $\mu$ M) ont été calculés à 48 h de traitement. Ils sont globalement homogènes et en accord avec les données du test MTT, ils constituent donc une mesure fiable de la toxicité des complexes.

## 2.4. Caractérisation de la mort cellulaire

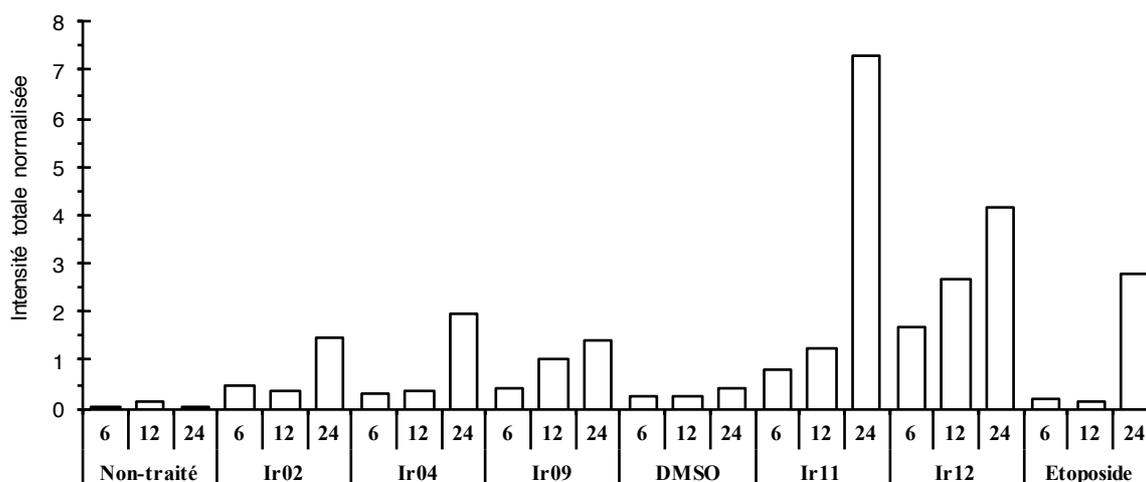
Lors du déclenchement de l'apoptose, différentes caspases sont séquentiellement activées par clivage. La présence de la forme clivée de la caspase-3 dans un extrait protéique de cellules traitées par les composés constitue une preuve de l'exécution d'un processus de mort cellulaire programmée de type apoptotique. Pour explorer comment **Ir01-10** exercent leur toxicité dans la lignée HeLa, des extraits protéiques totaux de cellules traitées par les composés sont préparés et séparés sur gel d'électrophorèse, transférés sur membrane de nitrocellulose puis immunomarqués par un système d'anticorps et la zone d'intérêt est révélée par chimiluminescence (Western Blot). La forme pro-caspase-3 se situe à environ 35 kDa et les formes clivées attendues sont appelés fragments p17 et p19 (Figure 23).



**Figure 22.** Mise en évidence de la caspase-3 clivée dans un extrait de cellules HeLa traitées à haute densité

L'étoposide, un agent chimiothérapeutique induisant indirectement des cassures de l'ADN double-brin, a été utilisé comme contrôle positif. Son mécanisme d'action est marqué par un effet plus tardif pour induire l'apoptose.

Les échantillons sont normalisés par une seconde révélation avec un contrôle de charge représenté par les histones H2Ax, ce calcul a été effectué à partir de la somme des intensités des bandes caspase-3 clivée détectées sur chaque piste et permet de mieux visualiser les différentes cinétiques d'activation (analyse semi-quantitative).



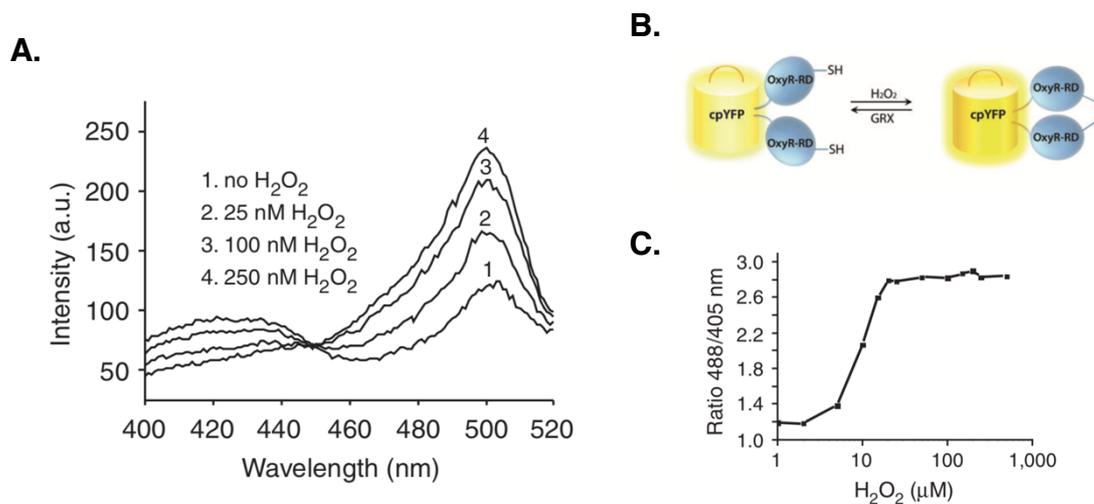
**Figure 23.** Quantification des bandes détectées pour la caspase-3 clivée

D'après ces résultats **Ir11** et **Ir12**, qui possèdent les cinétiques d'échange les plus lentes de la série, sont les plus puissants inducteurs du clivage de la caspase-3. Néanmoins les cinétiques d'activation sont comparables entre les différents complexes d'iridium : activation progressive dès 6 h de traitement et plus prononcée après 24 h suggérant un mécanisme d'action différent de celui de l'étoposide. En conclusion, ces analyses par Western blot apportent une preuve du déroulement d'un processus de type apoptotique, qui est par ailleurs une manière commune pour une cellule de mourir en réponse à une chimiothérapie avec la ferroptose.

### 3. Étude de la réponse cellulaire induite par les complexes dans la lignée HeLa

#### 3.1. Production intracellulaire de peroxyde d'hydrogène

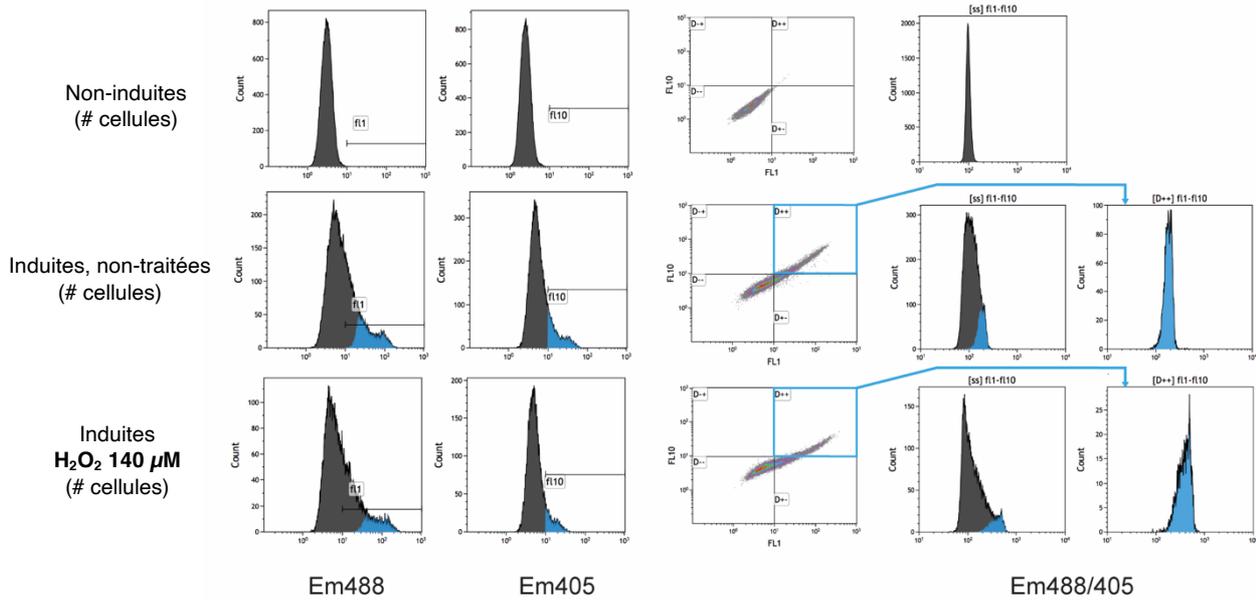
Pour observer le pouvoir oxydant d'agents cytotoxiques, il est commun d'employer des sondes fluorescentes peu sélectives comme le DCFH-DA.<sup>[98]</sup> Dans le cadre de ce projet, l'homéostasie intracellulaire du peroxyde d'hydrogène est observée par cytométrie au moyen de HyPer, une sonde protéique sélective du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> développée par Belousov et coll.<sup>[99]</sup>



**Figure 24.** Fonctionnement de la sonde HyPer de deuxième génération

**A.** Spectres d'excitation de HyPer (Tris-HCl pH 7,5 NaCl 150 mM, β-mercaptoethanol 2,5 mM) pour différentes concentrations en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ajouté.<sup>[100]</sup> **B.** Schéma de la sonde sous forme réduite (gauche) et oxydée (droite) composée d'un groupement protéique fluorescent cpYFP couplé à deux domaines OxyR-RD qui réagissent sélectivement avec le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>[99]</sup> **C.** Réponse de HyPer dans des cellules de mammifères, intensité du ratio d'émission après excitation à 488/405 nm en fonction de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ajouté montrant un domaine de linéarité autour de 10 μM.<sup>[100]</sup>

Le spectre d'excitation de HyPer est dépendant de son état redox, ainsi la mesure ratiométrique de fluorescence après excitation à 405 et 488 nm permet une estimation indirecte de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracellulaire. Une lignée stable de cellules HeLa qui exprime constitutivement la sonde HyPer<sup>[101]</sup> a donc été utilisée pour explorer la réponse au traitement par **Ir01-10**. Dans le contexte de la cytométrie, il convient d'effectuer plusieurs étapes de sélection (*gating*) afin d'élaguer les cellules qui n'expriment pas ou peu la sonde. En effet d'après la figure 25, le signal de fluorescence physiologique des cellules (autofluorescence) est suffisamment proche du signal HyPer pour pouvoir perturber la mesure. L'analyse de la sonde HyPer est donc effectuée sur la population sélectionnée (D++) apparaissant en bleu.



**Figure 25.** Stratégie de sélection employée pour l'utilisation de la sonde HyPer en cytométrie

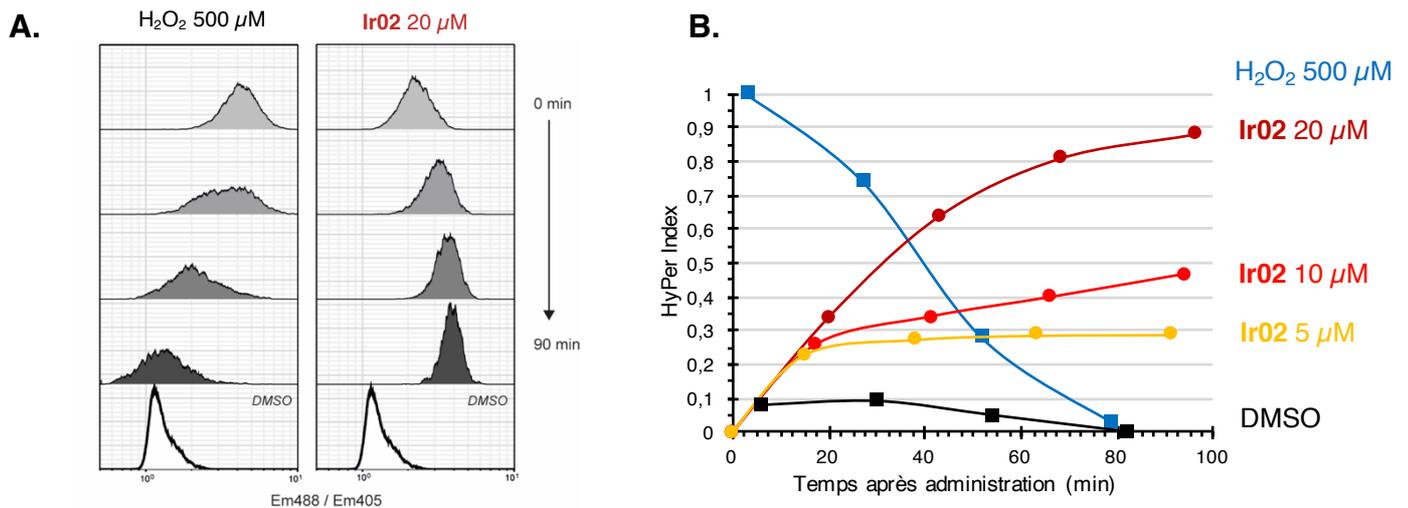
Histogrammes obtenus sur les filtres indiqués (excitation 488 ou 405 nm, émission 505-545 nm), nuages de points correspondants et fenêtre de sélection (cadre bleu). Pour les conditions « induites » les cellules ont été stimulées par la doxycycline pour exprimer la sonde HyPer. Le traitement par 140 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entraîne un décalage de l'histogramme représentant le ratio Em488/405 visible sur la population sélectionnée (distribution en bleu).

Par la suite, la même expérience est réalisée avec des suspensions cellulaires traitées cette fois par **Ir02** et analysées au cours du temps avec les mêmes conditions de sélection. Comme contrôle positif, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est ajouté à une concentration de 500 µM. Cette dose induit un effet sur la sonde observable dès les 30 premières minutes, cependant les cellules récupèrent rapidement et le niveau médian devient similaire à celui du contrôle négatif après une heure. À l'inverse, lorsque l'on emploie **Ir02**, le ratio médian est décalé vers la droite sans retour au niveau basal, indiquant une production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> non compensée par les cellules (Figure 26).

Pour pouvoir comparer les variations parfois subtiles de ce ratio médian (M) représentant la distribution non-gaussienne des cellules, un HyPer index a été calculé en % :

$$H = \frac{(M - M_{DMSO})}{(M_{H_2O_2} - M_{DMSO})}$$

avec M<sub>DMSO</sub> and M<sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub> correspondant à la valeur de ratio médian obtenue pour les contrôles négatif et positif respectivement.

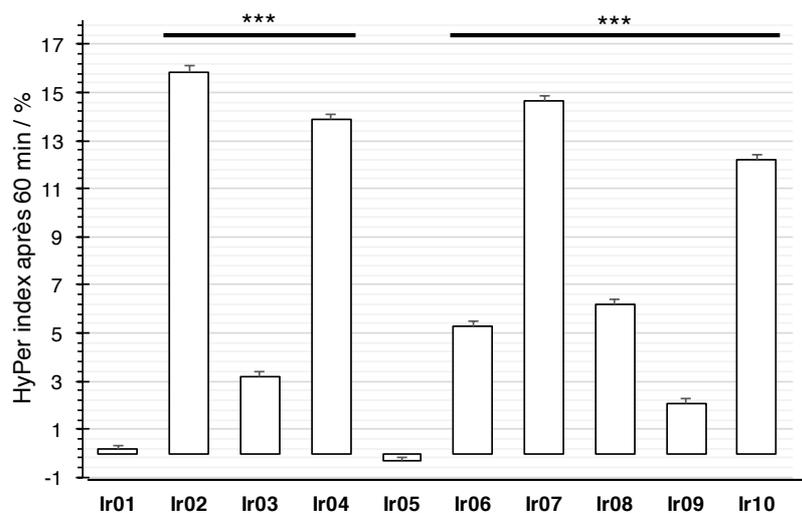


**Figure 26.** Ir02 induit une augmentation irréversible des niveaux intracellulaires de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**A.** Évolution des gaussiennes représentant la population sélectionnée (Intensité HyPer) après ajout d'une concentration saturante de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou de Ir02 à 20 μM (20 fmol/c). Des cellules traitées durant 90 min avec le véhicule (DMSO) sont utilisées comme contrôle négatif (blanc).

**B.** Cinétique de l'évolution du HyPer index montrant une réponse dose-dépendante au traitement par Ir02.

Les variations du Hyper index sont statistiquement significatives pour représenter les taux intracellulaires de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> après un traitement de 60 min. L'expérience a été reproduite pour Ir01-10 à 10 μM avec ce même temps de traitement (Figure 27). Les résultats entre les complexes sont très hétérogènes : Ir02, Ir04, Ir07 et Ir10 présentent des valeurs de HyPer index élevées tandis que Ir01 et Ir05 sont totalement incapables d'induire une production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les cellules HeLa-HyPer.



**Figure 27.** HyPer index de cellules HeLa-HyPer exposées durant 60 min à 10 μM (10 fmol/c) Ir1-10. (5000 évènements) \*\*\* p < 0.0001 (Test de Mann-Whitney)

### 3.2. Étude du cycle cellulaire

Les altérations du cycle cellulaire peuvent laisser supposer des mécanismes d'action typiques d'agents cytotoxiques. Une forte proportion de population cellulaire en phase de division (G2/M), appelée bloc mitotique dépeint par exemple l'effet des poisons des microtubules qui affectent profondément le déroulement de la mitose.

Pour observer l'état du cycle cellulaire après 6 h de traitement par les composés, le contenu en ADN et le pourcentage de cellules en phase S de réplication de l'ADN ont été mesurés. Un kit de chimie click est utilisé pour incorporer un nucléoside profluorescent (EdU) et ainsi discriminer les cellules en phase de synthèse (S), il est employé une heure avant la fixation des cellules au paraformaldéhyde (PAF 4 %). L'ADN des cellules est coloré par le FxCycle® Violet. Les proportions des cellules dans les différentes phases du cycle sont mesurées par cytométrie et reportées dans la figure 28, elles représentent au total plus de 10 000 évènements dans le cycle.

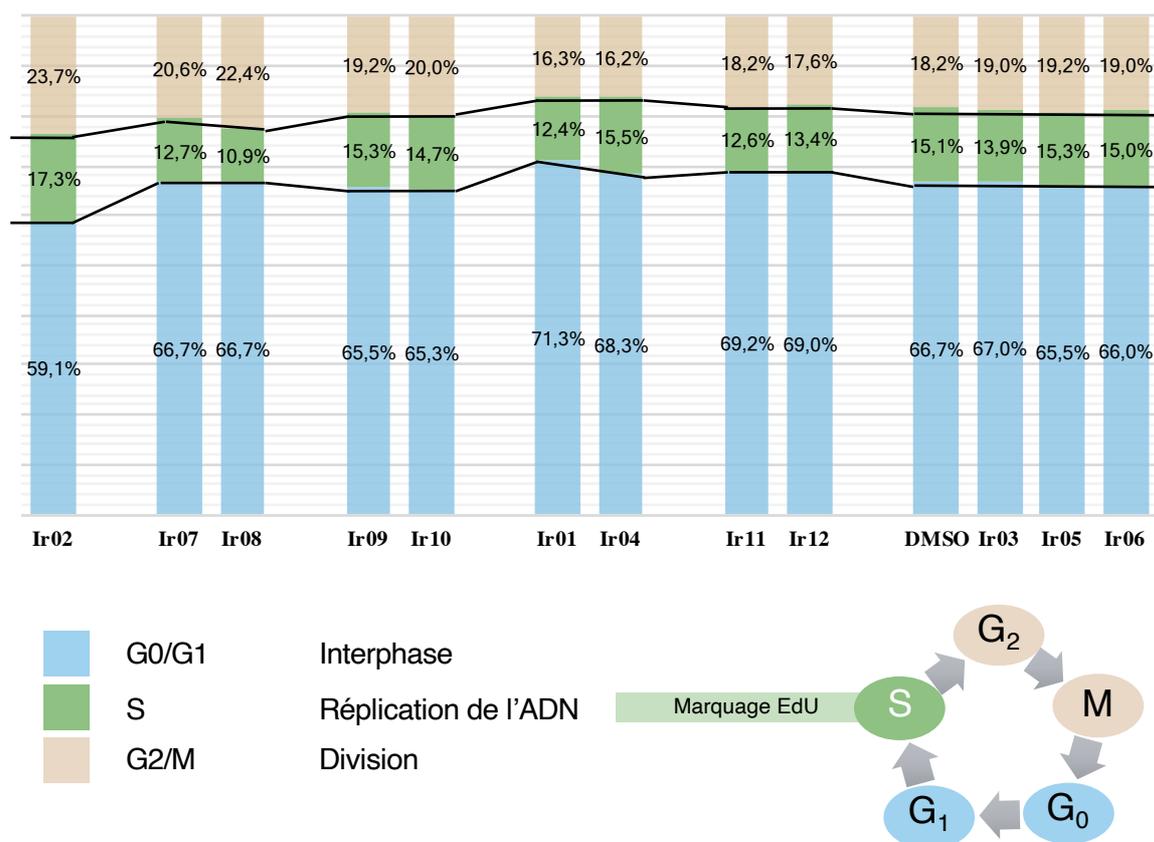


Figure 28. Pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire après 6 h de traitement.

Ces résultats indiquent que le profil de cycle cellulaire n'est pas profondément affecté par les traitements en dépit de leur toxicité. Une légère diminution de phase S est notable pour, **Ir01**, **Ir04**, **Ir07-08** et **Ir11-12**. Elle s'accompagne souvent d'une augmentation de la phase G0/G1 et provient vraisemblablement de la part importante de cellules mortes qui affectent les pourcentages dans ces phases (Sub-G1 : ADN fragmenté).

Le seul composé induisant un bloc mitotique (bloc G2/M) est **Ir02**, son mécanisme d'action perturbe donc soit la transition G2/M soit la mitose elle-même. Ce résultat est cohérent avec le retard d'entrée en mitose observé dans les expériences précédentes suite au traitement par ce complexe.

## Conclusion

En résumé, nous avons synthétisé et caractérisé une chimiothèque de complexes d'Iridium semi-sandwich d'Iridium comportant un ligand Cp\* et un ligand chlorido. Deux familles de ligands chélatants (C<sup>N</sup>) ont été explorées : 2-phényloxazoline (phox) et 2-chlorovinylpyridine (vinypy).

Les complexes de la série (vinypy) se sont montrés beaucoup plus stables vis-à-vis de l'échange du ligand chlorido par le DMSO, avec des demi-vies de plusieurs jours pour le complexe neutre. De plus, ils se sont montrés très prometteurs lors de tests préliminaires de toxicité réalisés sur la lignée MDA-MB231 et présentaient une toxicité exacerbée par rapport aux complexes de la série (phox). Cependant, par manque de temps la synthèse de complexes (vinypy) a peu été exemplifiée et seulement 3 dérivés **IrV1-3** ont été synthétisés et caractérisés. Pour cette étude de relation structure-activité nous nous sommes donc focalisés sur la série (phox) et plus particulièrement les complexes **Ir01-10**.

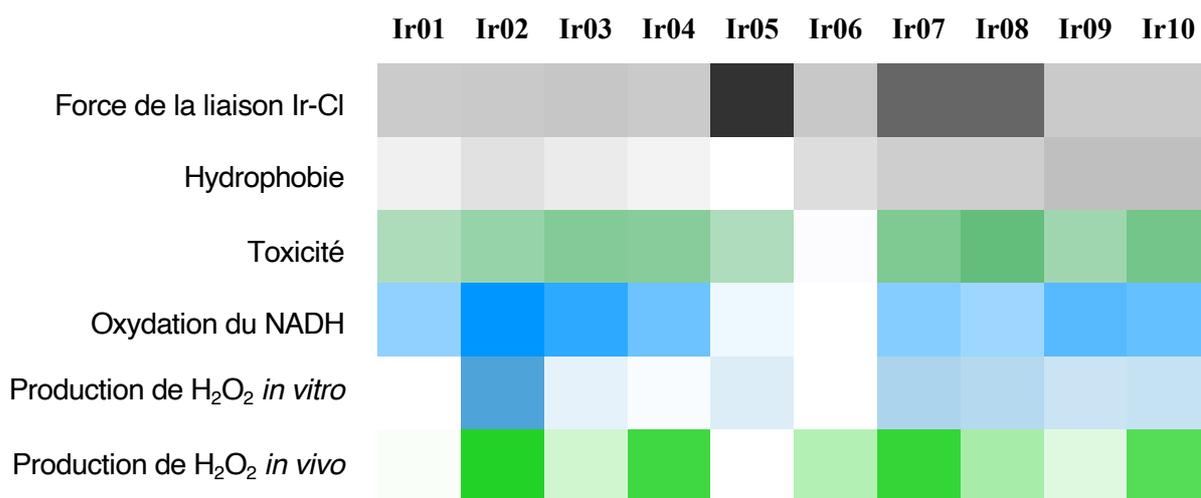
L'étude de leur comportement en solution dans le véhicule (DMSO) a permis de démontrer la stabilité d'un adduit majoritaire *solvento* par substitution du ligand chlorido. Cet adduit est cationique et donc susceptible de montrer une meilleure pénétration à travers les membranes biologiques. Le fort pouvoir coordinant du DMSO à l'iridium suggère que la durée de vie de ces adduits cationiques est longue dans le contexte intracellulaire. Somme toute, il apparaît nécessaire de complètement déterminer la stabilité des complexes métalliques dans leur véhicule, une caractéristique rarement décrite dans la littérature, puisqu'elle peut considérablement influencer leur activité biologique.<sup>[49]</sup>

Cette étude a également permis de mettre en évidence l'influence modeste des modifications structurales au sein de la série **Ir01-10** sur la viabilité des cellules HeLa. Ces complexes sont tous capables d'induire la mort cellulaire par apoptose en quelques h de traitement sur la lignée HeLa. Les complexes de la série (phox) ont montré de puissantes activités antiprolifératives ( $IC_{50}$  compris entre 3 et 6  $\mu M$ ) caractérisées par un effet direct sur l'adhérence et la vitesse de division cellulaire, parfois en contraste avec le complexe (ppy) **Ir12**.

Dans des conditions expérimentales modélisant un environnement physiologique (*in vitro*), **Ir01-10** peuvent accepter un hydrure du coenzyme NADH mais ils n'ont pas montré la même capacité à transférer cet hydrure au dioxygène pour produire  $H_2O_2$ . De manière originale, nous avons quantifié la production intracellulaire de  $H_2O_2$  induite par **Ir01-10** dans des cellules vivantes (*in vivo*) au moyen d'une lignée HeLa transformée exprimant une sonde fluorescente sélective de cet ERO. Nous avons ainsi découvert qu'au sein de cette série, les complexes portant un substituant sur la partie oxazoline (**Ir02** ; **Ir07-10**) étaient les catalyseurs de production de  $H_2O_2$  les plus efficaces *in vitro*. De façon remarquable, parmi ces molécules, **Ir02**, **Ir07** et **Ir10** ont aussi généré des niveaux élevés de  $H_2O_2$  *in vivo* dès une heure de traitement. De plus la machinerie cellulaire de détoxification des ERO n'est pas capable de compenser ce stress oxydant avec le temps, contrairement à la réponse observée suite à une simple addition de peroxyde d'hydrogène.

Ainsi nous formulons l'hypothèse, appuyée pour **Ir02**, que la production rapide d'un stress oxydant explique en partie la toxicité de cette famille de composés sur les cellules HeLa. Cependant, **Ir01** et **Ir05** ne se sont montrés efficaces ni *in vitro*, ni dans des cellules pour produire  $H_2O_2$  malgré une activité antiproliférative comparable. Il est donc très probable que d'autres mécanismes participent à la toxicité des complexes semi-sandwich d'Iridium menant à l'activation rapide de la caspase-3 et la mort cellulaire subséquente par apoptose. Ce caractère multi-cible des organoiridiums est un élément encourageant pour continuer à rechercher quels sont les effets cellulaires induits par les composés **Ir01-10**.

Le graphique ci-après (Figure 29) représente les résultats obtenus dans différentes expériences telles que le test de toxicité MTT (vert clair) ou la production de  $H_2O_2$ . Ces données sont mises en regard avec des paramètres physico-chimiques telles que l'hydrophobie du ligand (log P) ou la force de la liaison Ir-Cl interprétée d'après la demi-vie des complexes dans le DMSO.



**Figure 29.** Graphique comparatif de la relation structure-activité de **Ir01-10**

Échelles de couleur représentant les écarts de valeurs obtenues pour les complexes : temps de demi-vie dans le DMSO deutéré, valeur calculée du log P du ligand chélatant, valeur d'IC<sub>50</sub> mesurée par le test MTT, quantité de NADH oxydé *in vitro* après 150 min, quantité de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit *in vitro* après 150 min, production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans des cellules vivantes après une heure de traitement.

D'après ce graphique, **Ir02** apparaît donc comme le composé le plus intéressant pour une étude plus poussée de ces différentes cibles. En effet, il présente les meilleures corrélations entre les expériences de chimie et de biologie quant à la production de peroxyde d'hydrogène. En conséquence, le prochain chapitre comportera une étude approfondie de la réponse cellulaire induite par **Ir02**. D'autre part, la forte augmentation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> observée dans les cellules après traitement peut avoir une seconde origine : la membrane interne des mitochondries. En effet, une étude récente a montré qu'un complexe d'iridium semi-sandwich apparenté possède un tropisme mitochondrial et induit des distorsions de la membrane interne.<sup>[52]</sup> Bien que cette hypothèse soit moins probable au vu de la rapidité et du caractère irréversible des effets observés pour **Ir02** sur la lignée HeLa-HyPer, il est possible qu'une seconde production d'ERO soit engendrée dans le cytoplasme si les mitochondries sont découplées par l'effet des complexes. Par ailleurs, le découplage de la membrane mitochondriale est justement l'un des événements survenant lors de l'apoptose par voie intrinsèque.

Si l'effet toxique majeur des complexes provient d'une production d'ERO, les conséquences sont délétères quelle que soit la phase du cycle en cours. En accord avec cela, nous avons montré que le cycle cellulaire est figé après 6 h de traitement par **Ir01-10**. Aucune accumulation à une phase particulière n'est observée excepté pour **Ir02** qui induit un léger bloc G2/M. Nous examinerons donc par la suite d'où peut provenir ce phénotype, à travers la morphologie de mitose, les dommages à l'ADN et l'activation de p53.

## Partie expérimentale

### 1. Synthetic procedures and characterization

Compounds **L01-L04**, **L06**, **L08-L11** are commercially available but all synthesized compounds are herein fully described. **L07** was reported in the literature<sup>[102]</sup> without synthetic description nor characterization. **Ir01**,<sup>[103]</sup> **Ir02**,<sup>[104]</sup> **Ir08**,<sup>[84]</sup> and **Ir12**<sup>[46]</sup> were previously reported in the literature. Reagents were purchased as reagent-grade and used without further purification. All reactions were performed under nitrogen atmosphere, were monitored by analytical TLC on silica gel 60 F254 plates 0.25 mm, and visualized under UV light ( $\lambda = 254$  and 365 nm). Silica gel (SDS 60 ACC 35–70 mm) was used for column chromatography. NMR spectra were recorded on Bruker Avance III 300 MHz or 400 MHz spectrometers at rt. Chemical shifts ( $\delta$ ) are expressed in part per million (ppm), reported as s = singlet, d = doublet, t = triplet, m = multiplet; and referenced to the solvent peak of respectively  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$  ( $^{13}\text{C}$  NMR:  $\delta = 77.23$ ; 53.84; 39.52 ppm;  $^1\text{H}$  NMR:  $\delta = 7.26$ ; 5.32; 2.50 ppm). Optical rotation measurement of **L7** was performed with a Jasco P-200 digital polarimeter. ESI-HRMS analysis were carried out using a LTQ-Orbitrap XL from Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) and operated in positive ionization mode.

#### **General procedure A, 2-phenyl-4,5-dihydrooxazoles L02-L04 and L07-L10:**

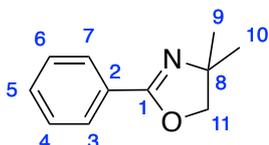
At rt,  $\beta$ -amino alcohol (2.5 eq.) was added slowly to a solution of aroyl chloride in dichloromethane (1.0 eq, 0.5 M). The reaction mixture was stirred at rt for 1 to 16 h. The whole mixture was transferred in a separating funnel containing water. The organic layer was discarded and the aqueous layer was extracted with EtOAc. The combined organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated in vacuo to afford the corresponding  $\beta$ -arylamide alcohol. At rt,  $\text{SOCl}_2$  (4.0 eq.) was added dropwise to a solution of  $\beta$ -arylamide alcohol in dichloromethane (1.0 eq, 0.1 M). The reaction mixture was stirred overnight at rt. The mixture was poured into ice water/EtOAc (1:1), and neutralized to pH = 6-8 by adding solid  $\text{NaHCO}_3$ . The whole mixture was transferred in a separating funnel and the aqueous layer was extracted with EtOAc. The combined organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated in vacuo. The crude product was purified by silica gel column chromatography using cyclohexane (Cy) and EtOAc to afford the corresponding 2-phenyl-4,5-dihydrooxazoles as pure products.

### General procedure B, 2-phenyl-4,5-dihydrooxazoles L05 and L06:

Using deactivated aroyl chloride (4-nitro-benzoylchloride and 4-(chloromethyl)benzoyl chloride) and  $\beta$ -amino alcohol, procedure A afforded the corresponding intermediate  $\beta$ -arylamide chloride as a crude product. Without purification, the crude  $\beta$ -arylamide chloride was dissolved in dry THF (1.0 eq, 0.2 M) and NaH (60% in oil, 1.5 eq.) was slowly added at rt. The reaction was stirred for 1 h and quenched by adding sat. aq.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution. The whole mixture was transferred in a separating funnel. The organic layer was discarded and the aqueous layer was extracted twice with EtOAc. The combined organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated in vacuo to afford the expected 2-phenyl-4,5-dihydrooxazoles as a pure products.

#### L02: 4,4-dimethyl-2-phenyl-4,5-dihydrooxazole

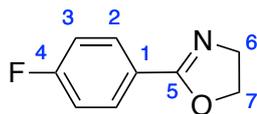
Obtained following procedure A as a colorless oil, purified using Cy/EtOAc (8:2) to yield 65%



$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7.95 (d, 2H,  $J = 6.7$  Hz,  $\text{H}_{3,7}$ ), 7.51-7.35 (m, 3H,  $\text{H}_{4,5,6}$ ), 4.12 (s, 2H,  $\text{H}_{11}$ ), 1.39 (s, 6H,  $\text{H}_{9,10}$ ).  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  NMR (75 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  (ppm): 162.03 ( $\text{C}_1$ ), 131.12 ( $\text{C}_5$ ), 128.24 ( $\text{C}_{4/6}$ ), 128.20 ( $\text{C}_{4/6}$ ), 128.08 ( $\text{C}_2$ ), 79.11 ( $\text{C}_{11}$ ), 67.56 ( $\text{C}_8$ ), 28.41 ( $\text{C}_{9,10}$ ). HRMS (ESI+):  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NONa}$ : 198.0889; found: 198.0889  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

#### L03: 2-(4-fluorophenyl)-4,5-dihydrooxazole

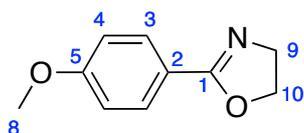
Obtained following procedure A as pale pink crystals, purified using Cy/EtOAc (5:5) to yield 41%



$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 8.01 (ddd, 2H,  $J = 8.9, 5.2, 2.4$  Hz,  $\text{H}_2$ ), 7.12 (m, 2H,  $\text{H}_3$ ), 4.49 (t, 2H,  $J = 9.6$  Hz,  $\text{H}_7$ ), 4.09 (t, 2H,  $J = 9.5$  Hz,  $\text{H}_6$ ).  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 166.34-163.01 ( $\text{C}_4$ ,  $J = 251.7$  Hz), 163.82 ( $\text{C}_5$ ), 130.48-130.36 ( $\text{C}_2$ ,  $J = 8.9$  Hz), 123.90 ( $\text{C}_1$ ), 115.61-115.32 ( $\text{C}_3$ ,  $J = 22$  Hz), 67.79 ( $\text{C}_7$ ), 54.81 ( $\text{C}_6$ ). HRMS (ESI+):  $m/z$  calculated for  $\text{C}_9\text{H}_9\text{FNO}$ : 166.0663; found: 166.0661  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### L04: 2-(4-methoxyphenyl)-4,5-dihydrooxazole

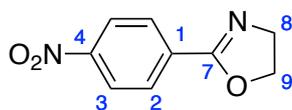
Obtained following procedure A as pink crystals, purified using 100% Cy to Cy/EtOAc (5:5 +1%  $\text{Et}_3\text{N}$ ) to yield 52%



$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7.90 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz,  $\text{H}_3$ ), 6.92 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz,  $\text{H}_4$ ), 4.42 (t, 2H,  $J = 9.5$  Hz,  $\text{H}_{10}$ ), 4.04 (t, 2H,  $J = 9.3$  Hz,  $\text{H}_9$ ), 3.86 (s, 3H,  $\text{H}_8$ ).  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 164.37 ( $\text{C}_1$ ), 161.97 ( $\text{C}_5$ ), 129.81 ( $\text{C}_3$ ), 120.27 ( $\text{C}_2$ ), 113.62 ( $\text{C}_4$ ), 67.44 ( $\text{C}_{10}$ ), 55.28 ( $\text{C}_8$ ), 54.82 ( $\text{C}_9$ ). HRMS (ESI+):  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{NO}_2$ : 178.0863; found: 178.0860  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**L05: 2-(4-nitrophenyl)-4,5-dihydrooxazole**

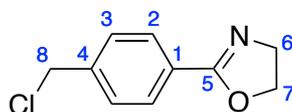
Obtained following procedure B as a yellow solid, 75%



$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 8.29 (m, 2H,  $\text{H}_2$ ), 8.14 (m, 2H,  $\text{H}_3$ ), 4.52 (t, 2H,  $J = 9.5$  Hz,  $\text{H}_9$ ), 4.15 (t, 2H,  $J = 9.5$  Hz,  $\text{H}_8$ ).  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 162.87( $\text{C}_7$ ), 133.52( $\text{C}_4$ ), 129.17( $\text{C}_2$ ), 123.52( $\text{C}_3$ ), 68.14( $\text{C}_9$ ), 55.24( $\text{C}_8$ ). HRMS (ESI+):  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{NO}_2$ : 193.0608; found: 193.0608  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**L06: 2-(4-(chloromethyl)phenyl)-4,5-dihydrooxazole**

Obtained following procedure B as a yellow solid, 99%

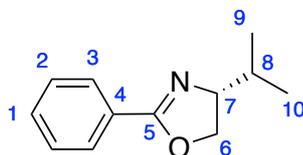


$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7.94 (d, 2H,  $J = 8.2$  Hz,  $\text{H}_3$ ), 7.43 (d, 2H,  $J = 8.2$  Hz,  $\text{H}_2$ ), 4.61 (s, 2H,  $\text{H}_8$ ), 4.44 (t, 2H,  $J = 9.5$  Hz,  $\text{H}_7$ ), 4.07 (t, 2H,  $J = 9.5$  Hz,  $\text{H}_6$ ).

$^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 164.28( $\text{C}_5$ ), 140.64( $\text{C}_4$ ), 128.71( $\text{C}_3$ ), 128.63( $\text{C}_2$ ), 127.97( $\text{C}_1$ ), 67.83( $\text{C}_7$ ), 55.15( $\text{C}_6$ ), 45.76( $\text{C}_8$ ).

**L07: (R)-4-isopropyl-2-phenyl-4,5-dihydrooxazole**

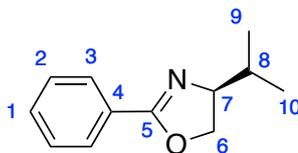
Obtained following procedure A as a yellow oil, purified using Cy/EtOAc (95:5) to yield 74%



$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7.98(dt, 2H,  $J = 6.9, 1.5$  Hz,  $\text{H}_3$ ), 7.44(m, 3H,  $\text{H}_{1,2}$ ), 4.43(m, 1H,  $\text{H}_7$ ), 4.15 (m, 2H,  $\text{H}_6$ ), 1.89 (m, 1H,  $\text{H}_8$ ), 1.05(d, 3H,  $J = 6.8$  Hz,  $\text{H}_{9,10}$ ), 0.95(d, 3H,  $J = 6.8$  Hz,  $\text{H}_{9,10}$ ).  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 163.39( $\text{C}_5$ ), 131.18( $\text{C}_1$ ), 128.25( $\text{C}_{2,3}$ ), 127.87( $\text{C}_4$ ), 72.51( $\text{C}_6$ ), 70.09( $\text{C}_7$ ), 32.80( $\text{C}_8$ ), 18.93( $\text{C}_{9,10}$ ), 18.04( $\text{C}_{9,10}$ ). HRMS (ESI+):  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{NO}$ : 190.1226; found: 190.1227  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $[\alpha]^{22}_{\text{D}} = +81.651^\circ$  (c 0.63,  $\text{CHCl}_3$ )

**L08: (S)-4-isopropyl-2-phenyl-4,5-dihydrooxazole**

Obtained following procedure A as a yellow oil, purified using Cy/EtOAc (9:1) to yield 74%

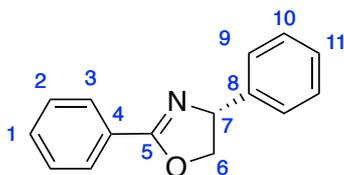


$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  (ppm): 7.88 (m, 2H,  $\text{H}_3$ ), 7.55 (m, 1H,  $\text{H}_1$ ), 7.47 (m, 2H,  $\text{H}_2$ ), 4.43 (m, 1H,  $\text{H}_7$ ), 4.10 (m, 2H,  $\text{H}_6$ ), 1.75 (m, 1H,  $\text{H}_8$ ), 0.96 (d, 3H,  $J = 6.6$  Hz,  $\text{H}_{9,10}$ ), 0.88 (d, 3H,  $J = 6.6$  Hz,  $\text{H}_{9,10}$ ).

$^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  NMR (75 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  (ppm): 162.34( $\text{C}_5$ ), 131.70( $\text{C}_1$ ), 128.92( $\text{C}_3$ ), 128.20( $\text{C}_2$ ), 128.05( $\text{C}_4$ ), 72.39( $\text{C}_6$ ), 70.28( $\text{C}_7$ ), 32.83( $\text{C}_8$ ), 19.03( $\text{C}_{9,10}$ ), 18.63( $\text{C}_{9,10}$ ).

**L09: (R)-2,4-diphenyl-4,5-dihydrooxazole**

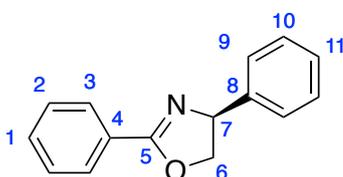
Obtained following procedure A as a pale orange solid, purified using Cy/EtOAc (9:1) to yield 66%



$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm): 7.97 (m, 2H,  $\text{H}_3$ ), 7.60 (t, 1H,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{H}_1$ ), 7.52 (m, 2H,  $\text{H}_2$ ), 7.38 (m, 2H,  $\text{H}_9$ ), 7.32 (m, 3H,  $\text{H}_{10,11}$ ), 5.42 (dd, 1H,  $J = 10.0, 8.1$  Hz,  $\text{H}_6$ ), 4.85 (dd, 1H,  $J = 10.1, 8.5$  Hz,  $\text{H}_6$ ), 4.21 (t, 1H,  $J = 8.3$  Hz,  $\text{H}_7$ ).  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$   $\text{NMR}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm): 163.71( $\text{C}_5$ ), 143.12( $\text{C}_4$ ), 132.12, 129.10, 129.00, 128.45, 127.76, 127.10, 74.86( $\text{C}_6$ ), 69.56( $\text{C}_7$ ).

**L10: (S)-2,4-diphenyl-4,5-dihydrooxazole**

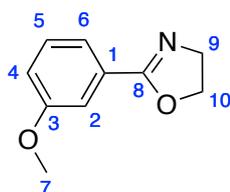
Obtained following procedure A as an orange solid, purified using Cy/EtOAc (9:1) to yield 49%



$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm): 7.97 (m, 2H,  $\text{H}_3$ ), 7.60 (t, 1H,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{H}_1$ ), 7.52 (m, 2H,  $\text{H}_2$ ), 7.38 (m, 2H,  $\text{H}_9$ ), 7.32 (m, 3H,  $\text{H}_{10,11}$ ), 5.42 (dd, 1H,  $J = 10.0, 8.1$  Hz,  $\text{H}_6$ ), 4.85 (dd, 1H,  $J = 10.1, 8.5$  Hz,  $\text{H}_6$ ), 4.21 (t, 1H,  $J = 8.3$  Hz,  $\text{H}_7$ ).  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$   $\text{NMR}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm): 163.71( $\text{C}_5$ ), 143.12( $\text{C}_4$ ), 132.12, 129.10, 129.00, 128.45, 127.76, 127.10, 74.86( $\text{C}_6$ ), 69.56( $\text{C}_7$ ). **HRMS** (ESI+):  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{NO}$ : 224.1070; found: 224.1068 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ .

**L13: 2-(3-methoxyphenyl)-4,5-dihydrooxazole**

Obtained following procedure A as a pale yellow oil, purified using Cy/EtOAc 7:3>5:5 + 1%  $\text{Et}_3\text{N}$  to yield 23%



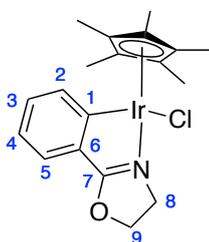
$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7.82 (dd, 1H,  $J = 7.9, 1.8$  Hz,  $\text{H}_6$ ), 7.45 (ddd, 1H,  $J = 8.4, 7.4, 1.8$  Hz,  $\text{H}_5$ ), 7.00 (m, 2H,  $\text{H}_{4,2}$ ), 4.40 (t, 2H,  $J = 9.6$  Hz,  $\text{H}_{10}$ ), 4.14 (t, 2H,  $J = 9.6$  Hz,  $\text{H}_9$ ), 3.95 (s, 3H,  $\text{H}_7$ ).  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$   $\text{NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 163.02( $\text{C}_8$ ), 158.48( $\text{C}_3$ ), 132.30( $\text{C}_5$ ), 131.27( $\text{C}_6$ ), 120.21( $\text{C}_4$ ), 116.81( $\text{C}_1$ ), 111.58( $\text{C}_2$ ), 66.63( $\text{C}_{10}$ ), 56.02( $\text{C}_7$ ), 55.55( $\text{C}_9$ ). **HRMS** (ESI+):  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}_2$ : 178.0863; found: 178.0862 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ .

### General procedure C used for the complexation of L02-L11<sup>[84]</sup>:

[Cp\*IrCl<sub>2</sub>]<sub>2</sub> (1.0 eq.) and NaOAc (6.0 eq.) were added to a solution of 2-phenyl-4,5-dihydrooxazole in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.2 eq, 0.02 M). The reaction mixture was stirred 1 to 2 days at rt. Then, the reaction mixture was filtered over a pad of celite, the resulting filtrate was concentrated to dryness in vacuo to afford the crude product. Purification was then carried out using silica gel column chromatography (indicated eluent) or recrystallization.

#### Ir01: Chlorido( $\eta^5$ -pentamethylcyclopentadienyl)(2-(phenyl- $\kappa C^2$ )-4,5-dihydrooxazole- $\kappa N$ )Iridium(III)

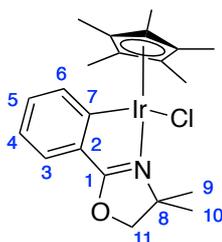
Obtained following procedure C as a yellow powder, purified using CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc (9:1) to yield 82%, crystallized from MeOH/hexane



<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\delta$  (ppm): 7.77 (d, 1H,  $J$  = 7.5 Hz, H<sub>2</sub>), 7.38 (dd, 1H,  $J$  = 7.5, 0.9 Hz, H<sub>5</sub>), 7.20 (td, 1H,  $J$  = 7.5, 1.3 Hz, H<sub>3</sub>), 6.99 (td, 1H,  $J$  = 7.5, 1.1 Hz, H<sub>4</sub>), 4.88 – 4.76 (m, 2H, H<sub>9</sub>), 3.96 – 3.87 (m, 2H, H<sub>10</sub>), 1.75 (s, 15H, H<sup>Cp\*</sup>). <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 180.30 (C<sub>1</sub>), 164.10 (C<sub>7</sub>), 135.65 (C<sup>Ar</sup>), 132.36 (C<sup>Ar</sup>), 130.71 (C<sub>6</sub>), 126.45 (C<sup>Ar</sup>), 121.79 (C<sup>Ar</sup>), 87.69 (C<sup>Cp\*</sup>), 71.40 (C<sub>9</sub>), 50.38 (C<sub>8</sub>), 9.48 (CH<sub>3</sub><sup>Cp\*</sup>). HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  calculated for C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>IrNO: 474.1404; found: 474.1400 [M-Cl]<sup>+</sup>.

#### Ir02: Chlorido( $\eta^5$ -pentamethylcyclopentadienyl)(2-(4,4-dimethylphenyl- $\kappa C^2$ )-4,5-dihydrooxazole- $\kappa N$ )Iridium(III)

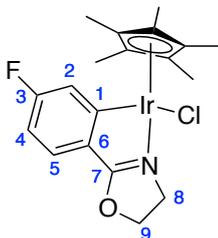
Obtained following procedure C as an orange oil, purified using Cy/EtOAc (8:2) to yield 76%



<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\delta$  (ppm): 7.74 (d, 1H,  $J$  = 7.7 Hz, H<sub>6</sub>), 7.38 (d, 1H,  $J$  = 7.5 Hz, H<sub>3</sub>), 7.21 (td, 1H,  $J$  = 7.5, 1.3 Hz, H<sub>5</sub>), 6.98 (t, 1H,  $J$  = 7.3 Hz, H<sub>4</sub>), 4.54 (d, 1H,  $J$  = 8.2 Hz, H<sub>11a</sub>), 4.39 (d, 1H,  $J$  = 8.2 Hz, H<sub>11b</sub>), 1.75 (s, 15H, H<sup>Cp\*</sup>), 1.47 (s, 6H, H<sub>9,10</sub>). <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 177.91 (C<sub>7</sub>), 162.57 (C<sub>1</sub>), 135.11 (C<sup>Ar</sup>), 132.05 (C<sup>Ar</sup>), 132.00 (C<sub>2</sub>), 126.23 (C<sup>Ar</sup>), 121.59 (C<sup>Ar</sup>), 87.80 (C<sup>Cp\*</sup>), 82.71 (C<sub>11</sub>), 67.27 (C<sub>8</sub>), 28.61 (C<sub>9/10</sub>), 26.27 (C<sub>9/10</sub>), 9.92 (CH<sub>3</sub><sup>Cp\*</sup>). HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  calculated for C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>IrNO: 502.1717; found: 502.1701 [M-Cl]<sup>+</sup>.

**Ir03: Chlorido( $\eta^5$ -pentamethylcyclopentadienyl)(2-(4-fluorophenyl- $\kappa C^2$ )-4,5-dihydrooxazole- $\kappa N$ )Iridium(III)**

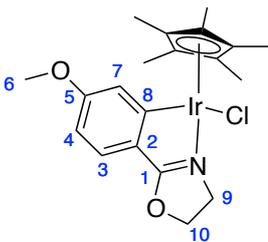
Obtained following procedure C as a yellow powder, purified using  $CH_2Cl_2/EtOAc$  (95:5) to yield 38%



$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 7.46 (m, 2H,  $H_{2,4}$ ), 6.71 (m, 1H,  $H_5$ ), 4.84 (m, 2H,  $H_9$ ), 4.04 (m, 2H,  $H_8$ ), 1.79 (s, 15H,  $H^{Cp*}$ ).  $^{13}C$  { $^1H$ } NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 179.24( $C_1$ ), 167.09-167.02( $C_7$ ,  $J = 5.9$  Hz), 166.86-163.48( $C_3$ ,  $J = 256$  Hz), 128.31-128.18 ( $C_5$ ,  $J = 9.6$  Hz), 126.88-128.89( $C_6$ ,  $J = 1.4$  Hz), 121.71-121.48( $C_2$ ,  $J = 17.7$  Hz), 109.39-109.07( $C_4$ ,  $J = 23.8$  Hz), 87.76( $C^{Cp*}$ ), 71.39( $C_9$ ), 50.24( $C_8$ ), 9.33( $CH_3^{Cp*}$ ). HRMS (ESI+):  $m/z$  calculated for  $C_{19}H_{22}FIrNO$ : 492.1309; found: 492.1297 [ $M-Cl$ ] $^+$ .

**Ir04: Chlorido( $\eta^5$ -pentamethylcyclopentadienyl)(2-(4-methoxyphenyl- $\kappa C^2$ )-4,5-dihydrooxazole- $\kappa N$ )Iridium(III)**

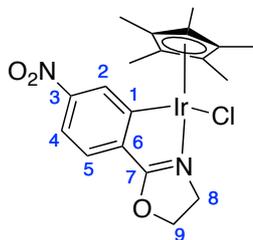
Obtained following procedure C as an orange solid, purified using recrystallization (hexane) to yield 69%



$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 7.35 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz,  $H_3$ ), 7.32 (d, 1H,  $J = 2.0$  Hz,  $H_7$ ), 6.53 (dd, 1H,  $J = 8.2, 2.0$  Hz,  $H_4$ ), 4.81-4.72 (m, 2H,  $H_{10}$ ), 4.09-3.91 (m, 2H,  $H_9$ ), 3.86 (s, 3H,  $H_6$ ), 1.76 (s, 15H,  $H^{Cp*}$ ).  $^{13}C$  { $^1H$ } NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 179.35 ( $C_8$ ), 165.86, 162.22, 127.57, 123.50, 120.00, 107.87, 87.35 ( $CH_3^{Cp*}$ ), 71.11 ( $C_{10}$ ), 54.81 ( $C_6$ ), 49.94 ( $C_9$ ), 9.19 ( $C^{Cp*}$ ). HRMS (ESI+):  $m/z$  calculated for  $C_{20}H_{25}IrNO_2$ : 504.1510; found: 504.1530 [ $M-Cl$ ] $^+$ .

**Ir05: Chlorido( $\eta^5$ -pentamethylcyclopentadienyl)(2-(4-nitrophenyl- $\kappa C^2$ )-4,5-dihydrooxazole- $\kappa N$ )Iridium(III)**

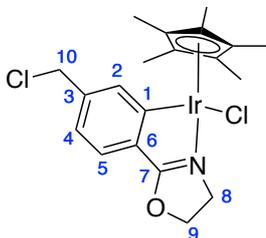
Obtained following procedure C as a brick red solid, purified using  $Cy/EtOAc$  (5:5) to yield 61%



$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 8.59 (s, 1H,  $H_2$ ), 7.85 (d, 1H,  $J = 8.3$  Hz,  $H_5$ ), 7.52 (d, 1H,  $J = 8.3$  Hz,  $H_4$ ), 4.90 (m, 1H,  $H_9$ ), 4.08 (m, 1H,  $H_8$ ), 1.80 (s, 15H,  $H^{Cp*}$ ).  $^{13}C$  { $^1H$ } NMR (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 179.24( $C_1$ ), 165.27( $C_7$ ), 149.74( $C_3$ ), 136.73( $C_6$ ), 129.71( $C_2$ ), 126.88( $C_{4/5}$ ), 117.37( $C_{4/5}$ ), 88.61( $C^{Cp*}$ ), 71.93( $C_9$ ), 50.84( $C_8$ ), 9.53( $CH_3^{Cp*}$ ). HRMS (ESI+):  $m/z$  calculated for  $C_{19}H_{23}ClIrN_2O_3$ : 519.1255; found: 519.1269 [ $M+H$ ] $^+$ .

**Ir06: Chlorido( $\eta^5$ -pentamethylcyclopentadienyl)(2-((4-chloromethyl)phenyl- $\kappa C^2$ )-4,5-dihydrooxazole- $\kappa N$ )Iridium(III)**

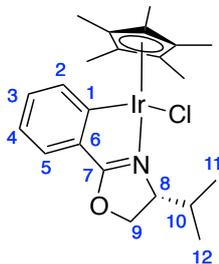
Obtained following procedure C as a pale yellow solid, purified recrystallization (acetone/pentane) to yield 57%



$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  (ppm): 7.78 (s, 1H,  $\text{H}_2$ ), 7.38 (d, 1H,  $J = 7.8$  Hz,  $\text{H}_5$ ), 7.03 (dd, 1H,  $J = 7.8$ , 1.6 Hz,  $\text{H}_4$ ), 4.83 (m, 2H,  $\text{H}_9$ ), 4.72 (d, 1H,  $J = 11.5$  Hz,  $\text{H}_{10a}$ ), 4.63 (d, 1H,  $J = 11.4$  Hz,  $\text{H}_{10b}$ ), 4.09 (ddd, 1H,  $J = 12.4$ , 9.9, 7.6 Hz,  $\text{H}_{8a}$ ), 3.91 (ddd,  $J = 12.3$ , 10.4, 9.1 Hz,  $\text{H}_{8b}$ ), 1.76 (s, 15H,  $\text{H}^{\text{Cp}^*}$ ).  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  (ppm): 180.04( $\text{C}_1$ ), 165.22( $\text{C}_7$ ), 141.14( $\text{C}_3$ ), 136.27( $\text{C}_2$ ), 131.77( $\text{C}_6$ ), 126.62( $\text{C}_4$ ), 122.53( $\text{C}_5$ ), 88.41( $\text{C}^{\text{Cp}^*}$ ), 72.27( $\text{C}_9$ ), 50.90( $\text{C}_8$ ), 47.46( $\text{C}_{10}$ ), 9.66( $\text{CH}_3^{\text{Cp}^*}$ ). HRMS (ESI+):  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{IrNO}$ : 522.1170; found: 522.1160  $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ .

**Ir07: Chlorido( $\eta^5$ -pentamethylcyclopentadienyl)((*R*)-4-isopropyl-2-(phenyl- $\kappa C^2$ )-4,5-dihydrooxazole- $\kappa N$ )Iridium(III)**

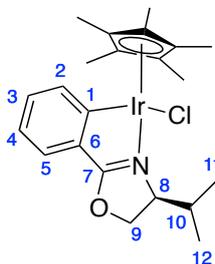
Obtained following procedure C as a yellow solid, purified using Cy/EtOAc (8:2) to yield 83% (2 diastereomers 1:0.1)



$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7.73 (d, 1H,  $J = 7.3$  Hz,  $\text{H}_5$ ), 7.36 (dd, 1H,  $J = 7.5$ , 1.0 Hz,  $\text{H}_2$ ), 7.20 (td, 1H,  $J = 7.5$ , 1.5 Hz,  $\text{H}_3$ ), 6.97 (td, 1H,  $J = 7.4$ , 1.0 Hz,  $\text{H}_4$ ), 4.71 (m, 1H,  $\text{H}_{9a}$ ), 4.63 (t, 1H,  $J = 9.3$  Hz,  $\text{H}_{9b}$ ), 4.16 (m, 1H,  $\text{H}_8$ ), 2.30 (m, 1H,  $\text{H}_{10}$ ), 1.77 (Cp\*dia)-1.73 (s, 15H,  $\text{HCp}^*$ ), 0.97 (d, 2H,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{H}_{11/12}$ ), 0.89 (d, 2H,  $J = 6.6$  Hz,  $\text{H}_{11/12}$ ).  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 179.15( $\text{C}_1$ ), 164.47( $\text{C}_7$ ), 135.50( $\text{CH}^{\text{Ar}}$ ), 132.46( $\text{CH}^{\text{Ar}}$ ), 130.09( $\text{C}_6$ ), 126.15( $\text{CH}^{\text{Ar}}$ ), 121.62( $\text{CH}^{\text{Ar}}$ ), 87.37( $\text{C}^{\text{Cp}^*}$ ), 71.09( $\text{C}_9$ ), 68.19( $\text{C}_8$ ), 28.98( $\text{C}_{10}$ ), 19.72( $\text{C}_{11/12}$ ), 15.40( $\text{C}_{11/12}$ ), 9.24( $\text{CH}_3^{\text{Cp}^*}$ ). HRMS (ESI+):  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{IrNO}$ : 516.18729; found: 516.18730  $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ .

**Ir08: Chlorido( $\eta^5$ -pentamethylcyclopentadienyl)((*S*)-4-isopropyl-2-(phenyl- $\kappa C^2$ )-4,5-dihydrooxazole- $\kappa N$ )Iridium(III)**

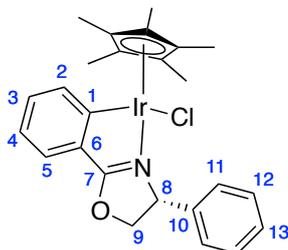
Obtained following procedure C as a yellow solid, purified using Cy/EtOAc (8:2) to yield 80% (2 diastereomers 1:0.1)



$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7.66 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz,  $\text{H}_5$ ), 7.30 (d, 1H,  $J = 7.5$  Hz,  $\text{H}_2$ ), 7.14 (t, 1H,  $J = 7.5$  Hz,  $\text{H}_3$ ), 6.90 (t, 1H,  $J = 7.4$  Hz,  $\text{H}_4$ ), 4.60 (m, 2H,  $\text{H}_9$ ), 4.09 (m, 1H,  $\text{H}_8$ ), 2.23 (m, 1H,  $\text{H}_{10}$ ), 1.66 (s, 15H,  $\text{H}^{\text{Cp}^*}$ ), 0.9 (d, 3H,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{H}_{11/12}$ ), 0.83 (d, 3H,  $J = 6.6$  Hz,  $\text{H}_{11/12}$ ).  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$   $\text{NMR}$  (101 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  (ppm): 178.90( $\text{C}_1$ ), 164.86( $\text{C}_7$ ), 135.73( $\text{CH}^{\text{Ar}}$ ), 131.97( $\text{CH}^{\text{Ar}}$ ), 130.49( $\text{C}_6$ ), 125.79( $\text{CH}^{\text{Ar}}$ ), 121.31( $\text{CH}^{\text{Ar}}$ ), 87.45( $\text{C}^{\text{Cp}^*}$ ), 71.26( $\text{C}_9$ ), 68.11( $\text{C}_8$ ), 28.91( $\text{C}_{10}$ ), 19.32( $\text{C}_{11/12}$ ), 15.12( $\text{C}_{11/12}$ ), 8.93( $\text{CH}_3^{\text{Cp}^*}$ ). **HRMS** (ESI+):  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{IrNO}$ : 516.1874; found: 516.1925  $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ .

**Ir09: Chlorido( $\eta^5$ -pentamethylcyclopentadienyl)((*R*)-2-(phenyl- $\kappa C^2$ )-4-phenyl-4,5-dihydrooxazole- $\kappa N$ )Iridium(III)**

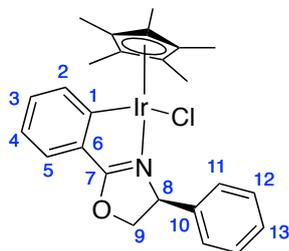
Obtained following procedure C as an orange solid, purified using Cy/EtOAc (9:1) to yield 87% (2 diastereomers 1:1)



$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  (ppm): 7.85 (d, 1H,  $J = 7.7$  Hz,  $\text{H}_5$ ), 7.78 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz,  $\text{H}_5$ ), 7.72 (dd, 2H,  $J = 8.1, 1.2$  Hz,  $\text{H}_3$ ), 7.57 (dd, 1H,  $J = 7.6, 1.1$  Hz,  $\text{H}_4$ ), 7.44–7.30 (m, 11 $\text{H}^{\text{Ar}}$ ), 7.08 (dd, 1H,  $J = 7.6, 0.9$  Hz,  $\text{H}_2$ ), 7.06 (dd,  $J = 7.5, 0.9$  Hz,  $\text{H}_2$ ), 5.45 (dd, 1H,  $J = 11.7, 9.6$  Hz,  $\text{H}_{9a}$ ), 5.27 (dd, 1H,  $J = 10.1, 6.1$  Hz,  $\text{H}_{9a}$ ), 5.19 (dd, 1H,  $J = 9.5, 8.7$  Hz,  $\text{H}_{9b}$ ), 5.06 (dd, 1H,  $J = 9.9, 8.5$  Hz,  $\text{H}_{9b}$ ), 4.59 (dd, 1H,  $J = 8.5, 6.1$  Hz,  $\text{H}_8$ ), 4.36 (dd, 1H,  $J = 11.8, 8.6$  Hz,  $\text{H}_8$ ), 1.54 (s, 15H,  $\text{H}^{\text{Cp}^*}$ ), 1.49 (s, 15H,  $\text{H}^{\text{Cp}^*}$ ).  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$   $\text{NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 182.10–181.14 ( $\text{C}_1$ ), 164.02–163.29( $\text{C}_7$ ), 141.18–137.92( $\text{C}_6$ ), 135.54–135.18, 133.07–132.22, 131.21–130.55, 129.77–129.18, 129.03–128.56(4C,  $\text{C}_{11}$ ), 128.72–128.18, 128.43–127.68(4C,  $\text{C}_{12}$ ), 126.93–126.65, 121.84–121.77, 88.17–87.60( $\text{C}^{\text{Cp}^*}$ ), 80.08–78.04( $\text{C}_8$ ), 69.03–68.24( $\text{C}_9$ ), 9.38–9.23( $\text{CH}_3^{\text{Cp}^*}$ ). **HRMS** (ESI+):  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{IrNO}$ : 550.1716; found: 550.1721  $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ .

**Ir10: Chlorido( $\eta^5$ -pentamethylcyclopentadienyl)((*S*)-2-(phenyl- $\kappa C^2$ )-4-phenyl-4,5-dihydrooxazole- $\kappa N$ )Iridium(III)**

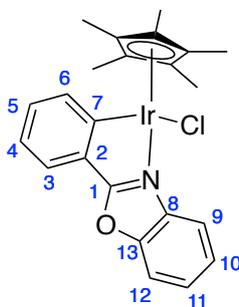
Obtained following procedure C as an orange solid, purified using Cy/EtOAc (9:1) to yield 87% (2 diastereomers 1:1)



$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7.84 (d, 1H,  $J = 7.7$  Hz,  $\text{H}_5$ ), 7.79 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz,  $\text{H}_5$ ), 7.74 (dd, 2H,  $J = 8.1, 1.2$  Hz,  $\text{H}_3$ ), 7.57 (dd, 1H,  $J = 7.6, 1.1$  Hz,  $\text{H}_4$ ), 7.49 (dd, 1H,  $J = 7.6, 1.2$  Hz,  $\text{H}_4$ ), 7.47 – 7.25 (m, 10 $\text{H}^{\text{Ar}}$ ), 7.08 (dd, 1H,  $J = 7.6, 0.9$  Hz,  $\text{H}_2$ ), 7.03 (dd,  $J = 7.5, 0.9$  Hz,  $\text{H}_2$ ), 5.42 (dd, 1H,  $J = 11.7, 9.6$  Hz,  $\text{H}_{9\text{a}}$ ), 5.29 (dd, 1H,  $J = 10.1, 6.1$  Hz,  $\text{H}_{9\text{a}}$ ), 5.14 (dd, 1H,  $J = 9.5, 8.7$  Hz,  $\text{H}_{9\text{b}}$ ), 5.05 (dd, 1H,  $J = 9.9, 8.5$  Hz,  $\text{H}_{9\text{b}}$ ), 4.56 (dd, 1H,  $J = 8.5, 6.1$  Hz,  $\text{H}_8$ ), 4.33 (dd, 1H,  $J = 11.8, 8.6$  Hz,  $\text{H}_8$ ), 1.54 (s, 15H,  $\text{H}^{\text{Cp}^*}$ ), 1.49 (s, 15H,  $\text{H}^{\text{Cp}^*}$ ).  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$   $\text{NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 182.10( $\text{C}_1$ ), 164.01-163.28( $\text{C}_7$ ), 141.18-137.91( $\text{C}_6$ ), 135.54-135.18, 133.07-132.23, 131.21-130.55, 129.77-129.18\*, 129.03-128.56(4C,  $\text{C}_{11}$ ), 128.72-128.18, 128.43-127.68(4C,  $\text{C}_{12}$ ), 126.93-126.65, 121.84-121.78, 88.17-87.60( $\text{C}^{\text{Cp}^*}$ ), 80.08-78.04( $\text{C}_8$ ), 69.04-68.24( $\text{C}_9$ ), 9.38-9.22( $\text{CH}_3^{\text{Cp}^*}$ ). **HRMS** (ESI+):  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{IrNO}$ : 550.17164; found: 550.17159  $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ .

**Ir11: Chlorido( $\eta^5$ -pentamethylcyclopentadienyl)(2-phenyl- $\kappa C^2$ )-1,3-benzoxazole- $\kappa N$ )Iridium(III)**

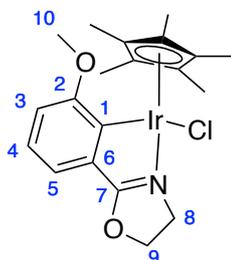
Obtained following procedure C as an orange solid, purified using Cy/EtOAc (8:2) to yield 26%



$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7.96 (d, 1H,  $J = 7.5$  Hz,  $\text{H}_6$ ), 7.79 (d, 1H,  $J = 7.3$  Hz,  $\text{H}^{\text{Ar}}$ ), 7.69 (d, 1H,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{H}^{\text{Ar}}$ ), 7.61 (d, 1H,  $J = 7.34$  Hz,  $\text{H}^{\text{Ar}}$ ), 7.47-7.36 (m, 2H,  $\text{H}^{\text{Ar}}$ ), 7.32-7.27 (m, 1H,  $\text{H}^{\text{Ar}}$ ), 7.12 (t, 1H,  $J = 7.3$  Hz,  $\text{H}^{\text{Ar}}$ ), 1.83 (s, 15H,  $\text{H}^{\text{Cp}^*}$ ).  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$   $\text{NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 176.50 ( $\text{C}_7$ ), 164.58 ( $\text{C}_1$ ), 151.02 ( $\text{C}_{13}$ ), 138.80 ( $\text{C}^{\text{Ar}}$ ), 135.93 ( $\text{C}^{\text{Ar}}$ ), 132.74 ( $\text{C}^{\text{Ar}}$ ), 129.75 ( $\text{C}^{\text{Ar}}$ ), 125.62 ( $\text{C}^{\text{Ar}}$ ), 125.38 ( $\text{C}^{\text{Ar}}$ ), 124.94 ( $\text{C}^{\text{Ar}}$ ), 122.44 ( $\text{C}^{\text{Ar}}$ ), 116.23 ( $\text{C}^{\text{Ar}}$ ), 111.73 ( $\text{C}^{\text{Ar}}$ ), 88.23 ( $\text{C}^{\text{Cp}^*}$ ), 9.77 ( $\text{CH}_3^{\text{Cp}^*}$ ). **HRMS** (ESI+):  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{ClIrNO}$ : 522.1404; found: 522.1405  $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ .

**Ir13: Chlorido( $\eta^5$ -pentamethylcyclopentadienyl)(2-(3-methoxyphenyl- $\kappa^2$ )-4,5-dihydrooxazole- $\kappa^1$ )Iridium(III)**

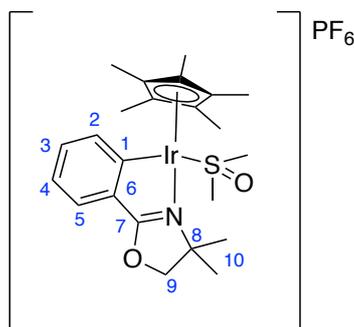
Obtained following procedure C as a red-orange solid, purified by flash chromatography using EtOAc to yield 23%



$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7.40 (dd, 1H,  $J = 7.5, 0.8$  Hz,  $\text{H}_5$ ), 7.18 (t, 1H,  $J = 8.0$  Hz,  $\text{H}_4$ ), 6.50 (dd, 1H,  $J = 8.2, 0.8$  Hz,  $\text{H}_3$ ), 4.86 (t, 2H,  $J = 9.4$  Hz,  $\text{H}_9$ ), 3.97 (m, 2H,  $\text{H}_8$ ), 3.86 (s, 3H,  $\text{H}_{10}$ ), 1.77 (s, 15H,  $\text{H}^{\text{Cp}^*}$ ).  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$   $\text{NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 179.72( $\text{C}_1$ ), 167.88( $\text{C}_7$ ), 158.67( $\text{C}_2$ ), 133.53( $\text{C}_4$ ), 128.64( $\text{C}_5$ ), 118.76( $\text{C}_6$ ), 104.37( $\text{C}_3$ ), 87.78( $\text{C}^{\text{Cp}^*}$ ), 71.55( $\text{C}_9$ ), 55.26( $\text{C}_{10}$ ), 49.75( $\text{C}_8$ ), 9.30( $\text{CH}_3^{\text{Cp}^*}$ ). **HRMS** (ESI+):  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{ClIrNO}_2$ : 504.1509; found: 504.1504  $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ .

**[Ir02-DMSO]PF<sub>6</sub>: [DMSO( $\eta^5$ -pentamethylcyclopentadienyl)(2-(4,4-dimethylphenyl- $\kappa^2$ )-4,5-dihydrooxazole- $\kappa^1$ )Iridium(III)] Hexafluorophosphate**

**Ir02** (200 mg, 372  $\mu\text{mol}$ ) was dissolved in 5 mL of DCM and 5 mL of MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1) were added. 10 mL of MeOH were added to obtain one homogeneous layer. AgNO<sub>3</sub> (69.5 mg, 409  $\mu\text{mol}$ , 1.1 eq) was poured into the solution and a white precipitate immediately appeared, the solution was left stirring for 1 h. DMSO (26.4  $\mu\text{L}$ , 372  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq) was added and the solution turned from golden to pale yellow. Stirring continued for 5 min and NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub> (339 mg, 2.08 mmol, 5.6 eq) was added. After 15 min, the crude mixture was filtered through a p3 sintered glass (with paper filter) and the methanol was evaporated. The obtained suspension was treated with DCM and washed with H<sub>2</sub>O to remove the NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub> excess. The product was isolated from the organic phases, after drying with MgSO<sub>4</sub> and evaporating volatiles, as a pale yellow solid (271 mg, 99%). A single monocrystal was obtained in from a concentrated MeOH solution for X-Ray diffraction analysis.



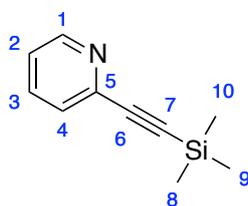
$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, MeOD)  $\delta$  (ppm): 7.71 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 7.59 (dd,  $J = 7.6, 1.5$  Hz, 1H), 7.44 (td,  $J = 7.5, 1.5$  Hz, 1H), 7.29 (td,  $J = 7.5, 1.0$  Hz, 1H), 4.81 (s, 1H), 4.67 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 3.22 (s, 3H), 2.53 (s, 3H), 1.90 (s, 15H), 1.59 (s, 3H), 1.51 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$   $\text{NMR}$  (101 MHz, MeOD)  $\delta$  (ppm): 192.44( $\text{C}_1$ ), 174.73( $\text{C}_6$ ), 136.90( $\text{C}^{\text{Ar}}$ ), 135.29( $\text{C}^{\text{Ar}}$ ), 134.66( $\text{C}_7$ ), 129.27( $\text{C}^{\text{Ar}}$ ), 125.87( $\text{C}^{\text{Ar}}$ ), 98.08( $\text{C}_9$ ), 84.52( $\text{C}^{\text{Cp}^*}$ ), 47.07-41.97( $\text{CH}_3^{\text{DMSO}}$ ), 29.62-26.25( $\text{C}_{10}$ ), 10.08( $\text{CH}_3^{\text{Cp}^*}$ ).

### General procedure D used for complexation of alkynylpyridines:

[Cp\*IrCl<sub>2</sub>]<sub>2</sub> (1.0 eq.) was added to a solution of alkynylpyridine in DCM (2.0 eq, 0.02 M). The reaction was stirred 1-4 h at rt and the crude product was obtained by solvent evaporation. If necessary, purification by column chromatography was carried out (SiO<sub>2</sub>, Cy/AcOEt).

### 2-(Trimethylsilylethynyl)pyridine

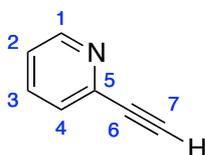
TMSA (964  $\mu$ L, 6.96 mmol, 1.1 eq.), Et<sub>3</sub>N (1.32 mL, 9.49 mmol, 1.5 eq.), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (89 mg, 0.127 mmol, 2 mol%) and CuI (48 mg, 253  $\mu$ mol, 4 mol%) were added to a solution of 2-bromopyridine (1.00 g, 6.33 mmol, 1.0 eq.) in THF (10 mL). The mixture was stirred at r.t. for 4 h and filtered through a pad of Celite® 545. The crude product was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub> 100g, Cy/AcOEt 9:1>8:2, dry loading) to afford 970 mg (5.53 mmol, 87%) of product as a black oil. The starting material and product had the same TLC retention factors.



<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 8.61 (s, 1H, H<sub>1</sub>), 7.67 (d, 1H,  $J$  = 7.5 Hz, H<sub>3</sub>), 7.50 (d, 1H,  $J$  = 7.5 Hz, H<sub>4</sub>), 7.31 (d, 1H, H<sub>2</sub>), 0.31 (s, 9H, H<sub>8,9,10</sub>). <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 149.81 (C<sub>1</sub>), 142.95 (C<sub>5</sub>), 135.99 (C<sub>3</sub>), 127.16 (C<sub>4</sub>), 122.94 (C<sub>2</sub>), 103.63 (C<sub>6</sub>), 94.62 (C<sub>7</sub>), -0.35 (C<sub>8,9,10</sub>). HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  calculated for C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>NSi 176.0890; found: 176.0893 [M+H]<sup>+</sup>.

### V1: 2-(ethynyl)pyridine

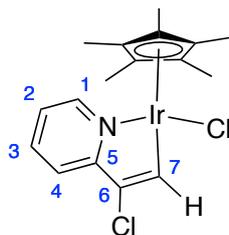
KOH (538 mg, 9.58 mmol, 2.0 eq.) was added to a solution of 2-(trimethylsilylethynyl)pyridine (840 mg, 4.79 mmol, 1.0 eq.) in DCM/MeOH (2:1, 30 mL) and the reaction mixture was stirred at r.t. for 1 h. NaHCO<sub>3</sub> (sat. aq. solution) was added and the aqueous layer was extracted twice with DCM. Then the organic layer was washed with brine, dried with MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under vacuum to afford 430 mg (4.17 mmol, 87%) of the expected product as a dark brown oil.



<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 8.59 (d, 1H,  $J$  = 4.8 Hz, H<sub>1</sub>), 7.66 (ddd, 1H,  $J$  = 7.8, 1.8 Hz, H<sub>3</sub>), 7.48 (ddd, 1H,  $J$  = 7.8 Hz, H<sub>4</sub>), 7.26 (ddd, 1H,  $J$  = 7.8, 1.0 Hz, H<sub>2</sub>), 3.15 (s, 1H, H<sub>7</sub>). <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 150.80 (C<sub>1</sub>), 142.32 (C<sub>5</sub>), 136.15 (C<sub>3</sub>), 127.44 (C<sub>4</sub>), 123.38 (C<sub>2</sub>), 82.68 (C<sub>6</sub>), 77.13 (C<sub>7</sub>). HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  calculated for C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>N: 104.0495; found: 104.0493 [M+H]<sup>+</sup>.

### IrV1: Chlorido( $\eta^5$ -pentamethylcyclopentadienyl)(2-(1-chlorovinyl- $\kappa^2$ )pyridine- $\kappa^N$ )Iridium(III)

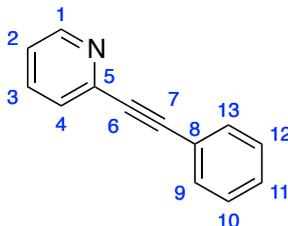
Obtained following procedure D (reaction time: 3 h) as brown solid, 95%



$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 8.65 (s, 1H, H<sub>7</sub>), 8.50 (ddd, 1H,  $J = 8.0, 1.8$  Hz, H<sub>1</sub>), 7.66 (ddd, 1H,  $J = 8.0, 1.3$  Hz, H<sub>3</sub>), 7.58 (ddd, 1H,  $J = 7.8$  Hz, H<sub>4</sub>), 7.05 (m, 1H, H<sub>2</sub>), 1.77 (s, 15H, H<sup>Cp\*</sup>).  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$   $\text{NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 165.63(C<sub>7</sub>), 163.63(C<sub>5</sub>), 151.49(C<sub>1</sub>), 137.77(C<sub>3</sub>), 123.74(C<sub>6</sub>), 121.16(C<sub>2</sub>), 120.15(C<sub>4</sub>), 89.34(C<sup>Cp\*</sup>), 8.86(CH<sub>3</sub><sup>Cp\*</sup>). **HRMS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  calculated for C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>Cl<sub>2</sub>IrN: 466.0908; found: 466.0905 [M-Cl]<sup>+</sup>.

## V2: 2-(phenylethynyl)pyridine

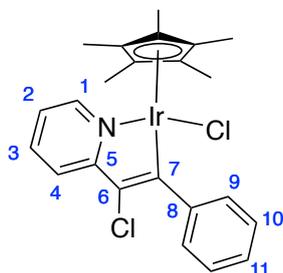
Phenylacetylene (764  $\mu\text{L}$ , 9.49 mmol, 1.1 eq.), Et<sub>3</sub>N (1.32 mL, 9.49 mmol, 1.5 eq.), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (89 mg, 0.127 mmol, 2 mol%) and CuI (48 mg, 253  $\mu\text{mol}$ , 4 mol%) were added to a solution of 2-bromopyridine (1.00 g, 6.33 mmol, 1.0 eq.) in THF (10 mL). The mixture was stirred at r.t for 20 h and filtered through a pad of Celite® 545. The crude product was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub> 100g, Cy/AcOEt 9:1>8:2, dry loading) to afford 760 mg (67%) of product as a black oil.



$^1\text{H NMR}$  (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 8.62 (d, 1H,  $J = 4.8$  Hz, H<sub>1</sub>), 7.86 (ddd, 1H,  $J = 7.8, 1.8$  Hz, H<sub>3</sub>), 7.64 (m, 3H, H<sub>4,9,13</sub>), 7.44 (m, 4H, H<sub>2,10,11,12</sub>).  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$   $\text{NMR}$  (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 149.63(C<sub>1</sub>), 143.00(C<sub>5</sub>), 135.85, 131.65, 128.66, 128.06, 126.81, 122.44(C<sup>Ar</sup>-H), 121.87(C<sub>8</sub>), 88.92(C<sub>6</sub>), 88.36(C<sub>7</sub>). **HRMS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  calculated for C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>N: 180.0808; found: 180.0807 [M+H]<sup>+</sup>.

**IrV2: Chlorido( $\eta^5$ -pentamethylcyclopentadienyl)((*Z*)-2-(1-chloro-2-phenylvinyl- $\kappa$ C<sup>2</sup>)pyridine- $\kappa$ N)Iridium(III)**

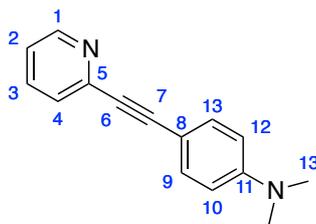
Obtained following procedure D as a bright orange solid (reaction time : 3 h), purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub>, Cy/AcOEt 6:4) to yield 73%



**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\delta$  (ppm): 8.57 (d, 1H, *J* = 5.7 Hz, H<sub>1</sub>), 7.72 (m, 2H, H<sub>2,4</sub>), 7.49 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, H<sub>9</sub>), 7.40 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz, H<sub>10</sub>), 7.25 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz, H<sub>3</sub>), 7.12 (t, 1H, *J* = 6.4 Hz, H<sub>11</sub>), 1.44 (s, 15H, H<sup>Cp\*</sup>). **<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR** (75 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\delta$  (ppm): 175.23(C<sub>7</sub>), 164.66(C<sub>5</sub>), 151.01(C<sub>1</sub>), 146.15(C<sub>6</sub>), 137.54(C<sub>3</sub>), 127.36(C<sub>9/10</sub>), 127.20(C<sub>9/10</sub>), 126.08(C<sub>11</sub>), 120.93(C<sub>4</sub>), 120.52(C<sub>2</sub>), 119.29(C<sub>8</sub>), 89.40(C<sup>Cp\*</sup>), 8.25(CH<sub>3</sub><sup>Cp\*</sup>). **HRMS** (ESI<sup>+</sup>): *m/z* calculated for C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>Cl<sub>2</sub>IrN: 542.1221; found: 542.1215 [M-Cl]<sup>+</sup>.

**V3: N,N-dimethyl-4-(pyridin-2-ylethynyl)aniline**

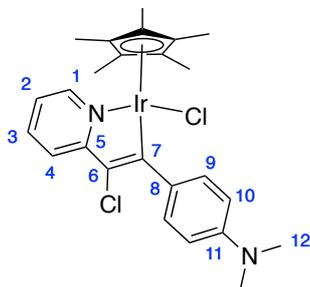
A sealed tube was charged with 200 mg of N,N-dimethyl-4-ethynylaniline (1.38 mmol, 1.4 eq.), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mol%, 35 mg) and CuI (11 mol%, 21 mg). Et<sub>3</sub>N (10 mL, degassed with Argon) was added, and finally 112  $\mu$ L of 2-bromopyridine (1.0 mmol, 1.0 eq.). The mixture was heterogeneous due to the formation of salts. It was placed at 80°C during 18 h, then cooled down to r.t. by dilution in a mixture of AcOEt and DCM and filtered over Celite. After evaporation of the filtrate, about 500 mg of black solid were obtained. <sup>1</sup>H NMR confirmed the presence of the product in majority. It was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub> 20 g, Cy/AcOEt 7:3 > 5:5) to yield 150 mg of light orange solid (675  $\mu$ mol, 49%) exhibiting blue fluorescence under 365 nm light.



**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 8.58 (dd, 1H, *J* = 4.7, 1.2 Hz, H<sub>1</sub>), 7.63 (dd, 1H, *J* = 7.7, 1.8 Hz, H<sub>3</sub>), 7.48 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz, H<sub>9,13</sub>), 7.48 (m, 1H, H<sub>4</sub>), 7.17 (ddd, 1H, *J* = 7.5, 4.9, 1.2 Hz, H<sub>2</sub>), 6.66 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz, H<sub>10,12</sub>), 3.00 (s, 6H, H<sub>13</sub>). **<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 150.68(C<sub>11</sub>), 150.07(C<sub>1</sub>), 144.49(C<sub>5</sub>), 136.11(C<sub>3</sub>), 133.47(C<sub>13,9</sub>), 126.76(C<sub>4</sub>), 122.02(C<sub>2</sub>), 111.86(C<sub>12,10</sub>), 108.96(C<sub>8</sub>), 91.32(C<sub>7</sub>), 87.33(C<sub>6</sub>), 40.29(C<sub>13</sub>).

**IrV3: Chlorido( $\eta^5$ -pentamethylcyclopentadienyl)((Z)-2-(1-chloro-2-(4-N,N-dimethylaminophenyl)vinyl- $\kappa^2$ )pyridine- $\kappa^1$ )Iridium(III)**

Obtained following procedure D (reaction time: 1 h) to yield 83 mg of red solid (99%)



**$^1\text{H}$  NMR** (300 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  (ppm): 8.49 (d, 1H,  $J = 5.4$  Hz,  $\text{H}_1$ ), 7.64 (m, 2H,  $\text{H}_{2,4}$ ), 7.40 (d, 2H,  $J = 7.5$  Hz,  $\text{H}_9$ ), 7.02 (dd, 1H,  $J = 7.4$  Hz,  $\text{H}_3$ ), 6.73 (d, 2H,  $J = 8.1$  Hz,  $\text{H}_{10}$ ), 2.99 (s, 6H,  $\text{H}_{12}$ ), 1.42 (s, 15H,  $\text{H}^{\text{Cp}^*}$ ).  **$^{13}\text{C}$  { $^1\text{H}$ } NMR** (101 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  (ppm): 179.48( $\text{C}_7$ ), 177.44( $\text{C}_5$ ), 151.55( $\text{C}_1$ ), 138.01( $\text{C}_3$ ), 134.75( $\text{C}_6$ ), 129.71( $\text{C}_9$ ), 120.82( $\text{C}_{2/4}$ ), 120.53( $\text{C}_{2/4}$ ), 115.59( $\text{C}_{11}$ ), 111.57( $\text{C}_{10}$ ), 103.22( $\text{C}_8$ ), 90.08( $\text{C}^{\text{Cp}^*}$ ), 40.95( $\text{C}_{12}$ ), 8.93( $\text{CH}_3^{\text{Cp}^*}$ ). **HRMS** (ESI+):  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{Cl}_2\text{IrN}_2$ : 585.1643; found: 585.1632 [ $\text{M}-\text{Cl}$ ] $^+$

**X-ray crystallography analysis.** A single crystal of the compound was selected, mounted onto a cryoloop, and transferred in a cold nitrogen gas stream (Oxford Cryostream 700). Intensity data were collected with a BRUKER Kappa-APEXII diffractometer with  $\text{Mo-K}\alpha$  radiation at 200K. APEX 2 suite and SAINT program (BRUKER) were used to carry out data collection, unit-cell parameters refinement, integration and data reduction. SADABS (BRUKER) was used for scaling and multi-scan absorption corrections. In the Olex2 suite,<sup>[105]</sup> the structure was solved with Sir92<sup>[106]</sup> program and refined by full-matrix least-squares methods using SHELXL-14.<sup>[107]</sup> All non-hydrogen atoms were refined anisotropically. Hydrogen atoms were placed at calculated positions and refined with a riding model. CCDC 1995094 contains the supplementary crystallographic data. The data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre via [www.ccdc.cam.ac.uk/structures](http://www.ccdc.cam.ac.uk/structures).

## 2. Cell culture conditions and biological assays

HeLa, HCT116 p53<sup>+/+</sup> and HCT116 p53<sup>-/-</sup> cell lines were obtained from the American Type Culture Collection. Cells were cultured in DMEM Glutamax High Glucose supplemented with antibiotics (penicillin, streptomycin) and 10 % fetal bovine serum, later denominated as complete medium. All culture reagents were purchased from Invitrogen.

**MTT Cell Viability Assay.** The cell proliferation assay was carried out using Promega CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay according to the supplier's protocol. Briefly, 4000 cells were seeded in 96-well plates and cultured in the presence of **Ir01-10** for 96 h. MTT Dye Solution (15 µL) was added to each well and the plates were incubated at 37°C in a humidified 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere for 4 h. Stop Solution (100 µL) was then added to each well and absorbance was read at 570 nm using Infinite F200 PRO Tecan plate reader, once formazan crystals completely solubilized. Compound concentrations that produce 50% growth inhibition (IC<sub>50</sub>) were calculated from non-linear regressions of the triplicate data using Graphpad Prism software. The experiment was reproduced three times to calculate a mean value and standard deviation of these inhibiting concentrations.

**xCELLigence proliferation assays.** A xCELLigence E-plate was seeded with either HCT116 p53<sup>+/+</sup> or p53<sup>-/-</sup> cells at 4000 cells per well. After cell adhesion (1 hour), **Ir12** was administered at 20, 10, and 5 µM in triplicate and the cell index was measured over a period of 72 h (Real Time Cell Analyzer, Agilent) Control cells were treated with the vehicle and empty wells were used to perform the baseline definition. Next, two xCELLigence E-plates were calibrated for a baseline definition and HeLa cells were seeded at 2000 cells per well in 100 µL of complete medium. After 24 h (adhesion + proliferation), **Ir02**, **Ir04**, **Ir08** and **Ir10** were administered at 20, 10, 5, 2.5 and 1.25 µM or the DMSO vehicle in quadruplicate (in 100 µL serum-free medium, 5%FBS final) and the cell index was measured over a period of 72 h.

**Time-lapse videomicroscopy.** Briefly, 50000 cells were seeded in 24-well plates and treated 24-48 h later with the compounds or DMSO vehicle. The cell behaviour was monitored in real time by differential phase contrast videomicroscopy using an Olympus IX83 inverted microscope with 20x objective (2 fields of ca. 100 cells per condition, triplicate). Time-lapse movies were processed using Fiji.

**HyPer-based assay.** HeLa-HyPer is a stable cell line expressing the 2<sup>nd</sup> generation HyPer probe upon doxycycline induction.<sup>[101]</sup> Cells were cultured in complete medium with Hygromycin B (0.1 mg/mL) and Blasticidin S (7.5 µg/mL). One day after induction, cells were harvested with 0.05% trypsin-EDTA solution, suspended in fresh medium, incubated in suspension for 30 min in standard growth conditions (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) for adaptation to a new environment, and analyzed by flow cytometry (Gallios, Beckman-Coulter, 405/488 nm laser). Before analysis, the suspension was split into a set of samples supplemented with HEPES buffer. During the analysis, cells were gated for HyPer expression and within this gate the median ratio (M) of Ex488/FL525 and Ex405/FL525 signals (denoted after as Em488/405) was determined. Intracellular hydrogen peroxide concentration was assessed using HyPer-index<sup>[108]</sup> which was quantified in % as follows:  $H = (M_{\text{sample}} - M_{\text{DMSO}}) / (M_{\text{H}_2\text{O}_2} - M_{\text{DMSO}})$  where  $M_{\text{DMSO}}$  and  $M_{\text{H}_2\text{O}_2}$  correspond to the median ratio values obtained for the negative and positive controls respectively. Two independent experiments were carried out: first, a kinetic study of the probe state over time after direct administration of **Ir02** at 2.5-20 µM. Second, 10 µM **Ir01-10** were administered and the suspensions were analyzed after 60 min. Both experiments were compared to a 1% DMSO negative control. To induce the complete oxidation of the probe, 140-500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were added and cells were analyzed after 5 min as positive control.

**Cleaved-caspase-3 Western Blot analysis.** 10<sup>6</sup> HeLa cells were seeded in 60 mm culture dishes and incubated for 16 h in complete medium. For each dish, 20 µL of drug was added (1 mM stock in DMSO, 10 µM final). After quick homogenization, cells were incubated at 37°C 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere for 6, 12 or 24 h. Non-treated cells, cells exposed to 1% DMSO or to 10 µM Etoposide were used as negative and positive controls respectively. Cells were harvested in cold PBS and lysed in RIPA buffer, supplemented with protease and phosphatase inhibitors. Protein titration was carried out using the microBCA assay kit (Pierce). Samples were analyzed by SDS-PAGE on 4-20 % gradient polyacrylamide gels (BioRad) and transferred onto 0.2 µm nitrocellulose membranes. Proteins were stained with Ponceau S. Membranes were blocked using 5% BSA in TBS-t (Tris Buffered Saline 0.1 % Tween-20) and incubated with a rabbit-anti-Cleaved caspase-3 (Cell Signaling #9661) antibody, a HRP-linked secondary antibody (Cell Signaling #7074) and the luminol revelation kit (BioRad). The same membranes were incubated with a rabbit-anti-H2ax (Milipore® 07-627) antibody to normalize the protein content. Primary antibodies were used at (1:1000) dilution in the blocking buffer and secondary antibody at (1:10,000) in the washing buffer.

**NADH quantification.** **Ir01-10** (10  $\mu\text{M}$ ) and NADH (100  $\mu\text{M}$ ) were incubated for 150 min at 37°C in 1% MeOH / 99% 5 mM phosphate buffer pH 7.4 (PB). Mixtures were analyzed by UV-Vis spectroscopy at 20°C. The concentration of NADH was calculated using the extinction coefficient  $\epsilon_{340} = 6200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Turnover number (TON) is defined as the number of moles of NADH that a mole of catalyst (**Ir01-10**) can convert within 150 min. The experiment was reproduced three times to calculate a mean and standard deviation.

**Amplex Red® HRP-linked enzymatic assay.** **Ir1-10** (50  $\mu\text{L}$  in PB, 10% mol final) or  $\text{H}_2\text{O}_2$  standards (150 nM - 5  $\mu\text{M}$  final), the Amplex substrate and HRP (25  $\mu\text{L}$ , 5  $\mu\text{M}$  and 1 U/mL final) and NADH containing SOD<sup>[91]</sup> (25  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{M}$  and 40 U/mL final) were sequentially dispensed in a black 96-well plate. Fluorescence emission (exc. 520 nm, em. 595 nm) was recorded every 5 min during 150 min. This experiment was performed three times in triplicate to calculate a mean and standard deviation of the values of produced  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\mu\text{M}$ ).

**Cell cycle analysis.** 800,000 HeLa cells were seeded in 16 60 mm dishes and cultured overnight in 3 mL of complete HeLa medium. Complexes **Ir01-12** were added to the medium at a final concentration of 10  $\mu\text{M}$  from a 1 mM stock solution in DMSO. Three negative control were also performed: DMSO (Vehicle), Non-treated (EdU+), Non-treated (EdU-). All dishes were kept at 37°C in humidified atmosphere, 5%  $\text{CO}_2$  for 5 h. The medium was then carefully withdrawn and replaced with EdU (10  $\mu\text{M}$ ) containing fresh medium except for Non-treated (EdU-). Dishes were incubated one more h (total 6 h), supernatants were collected and cells were harvested by trypsinisation, pelleted and stained according to Invitrogen® EdU kit protocol. (Wash BSA 1 % in PBS, fixation 4 % PFA in PBS 15 min + 3 washes, permeabilization, Click reaction with a picolyl azide Alexa fluorochrome, washes with a saponin-based permeabilization solution and staining of DNA using FxCycle Violet). Samples were kept at 4°C overnight and analyzed by flow cytometry the day after.

# **Chapitre 2. Étude de la toxicité d'un complexe sélectionné**

## **Introduction**

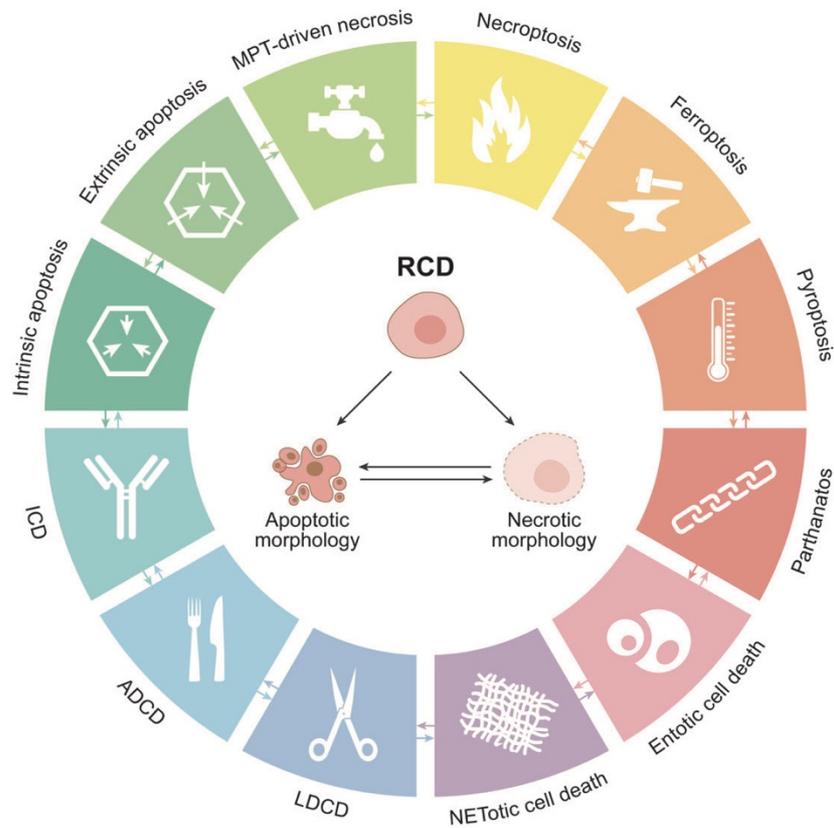
### **1. Les différentes voies de mort cellulaires**

Des cellules de mammifère exposées à des perturbations irréversibles de leur microenvironnement intracellulaire ou extracellulaire peuvent activer de nombreuses cascades de signalisation menant à la mort cellulaire comme l'apoptose, présentée dans le premier chapitre. Historiquement, trois morphotypes de mort cellulaire ont été classifiés. Le Type I correspond à la mort cellulaire apoptotique, se manifestant par une contraction cytoplasmique, la condensation de la chromatine et la fragmentation du noyau (caryorrhexie), avec la formation de blebs (boursouflures) menant à la fragmentation de la cellule. Il en résulte de petites vésicules appelées corps apoptotiques qui sont destinées à la dégradation lysosomale par les macrophages dans un contexte physiologique (phagocytose).

La macro-autophagie, appelée couramment autophagie est un processus de dégradation et de recyclage des composants cellulaires, c'est une réponse adaptative à différents stress qui promeut la survie dans la plupart des cas mais peut, s'il est inefficace, mener à la mort cellulaire. Le morphotype « Type II » est appelé autophagie et se caractérise notamment par une intense vacuolisation cytoplasmique observable en microscopie de contraste de phase et résultant de la fusion d'autophagosomes, limités par une double membrane, avec le lysosome. La macro-autophagie est un processus de dégradation et de recyclage des composants cellulaires. Cette réponse adaptative à différents stress promeut la survie dans la plupart des cas mais peut, si elle est inefficace, mener à la mort cellulaire.

Enfin le troisième morphotype est la nécrose, il ne présente aucune des caractéristiques des types I et II et s'achève avec la dispersion des composants cellulaires suite à la perméabilisation ou rupture de la membrane plasmique. Cependant, la littérature récente révèle que les différentes morts cellulaires programmées sont initiées et propagées par des mécanismes moléculaires présentant un très grand degré d'interconnexion et chaque type de mort cellulaire régulée (RCD) peut se manifester avec un spectre entier de caractéristiques morphologiques.

En 2018, un comité de nomenclature international a mis à jour pas moins de 12 voies distinctes de mort cellulaire régulée.<sup>[109]</sup>

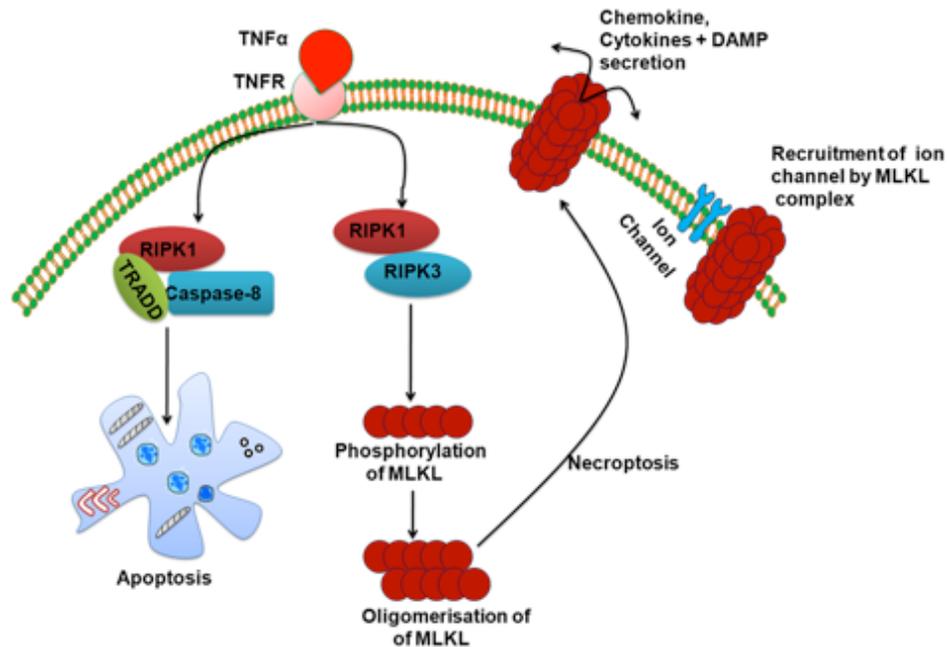


**Figure 30.** Signalisation de l'apoptose et voies de mort cellulaire régulée

Diagramme présentant les 12 RCD identifiées chez les cellules mammifères (2018).<sup>[109]</sup> ADCD : mort cellulaire dépendante de l'autophagie ; ICD : mort cellulaire immunogène ; LDCD : mort cellulaire dépendante du lysosome ; MPT : transition de la perméabilité mitochondriale

Parmi les diverses voies de mort cellulaire, la nécroptose (Figure 30, jaune) a une place particulière car elle peut être mobilisée dans un contexte d'inhibition ou d'échappement à l'apoptose, une stratégie qui comporte d'ailleurs plusieurs avantages sur le plan thérapeutique.<sup>[110]</sup>

La nécroptose est la forme la plus commune et la plus étudiée de nécrose régulée, il existe par ailleurs d'autres RCD menant à un morphotype nécrotique comme la ferroptose, la NETose ou la pyroptose. Contrairement à ces dernières, le processus de nécroptose implique les kinases RIP1 et RIP3 qui activent MLKL par phosphorylation (Schéma 18). Ces complexes sont capables de former des pores dans la membrane plasmique, conduisant à un phénotype de nécrose.<sup>[110,111]</sup>



**Schéma 18.** La voie extrinsèque de l'apoptose et la nécroptose sont médiées par RIP1<sup>[112]</sup>

Le schéma 18 montre que le récepteur de mort cellulaire TNFR (*Tumor Necrosis Factor Receptor*) associé à RIP1 est un acteur clé à la fois de la nécroptose et de l'apoptose par voie intrinsèque. Dans ce contexte, l'inhibition de la caspase-8 permettrait par exemple d'induire un phénotype nécrotique en réponse à des stimuli pro-apoptotiques. Pour cela, il existe plusieurs inhibiteurs dits « pan-caspase » comme le Z-VAD-FMK qui sera utilisé dans ce chapitre.

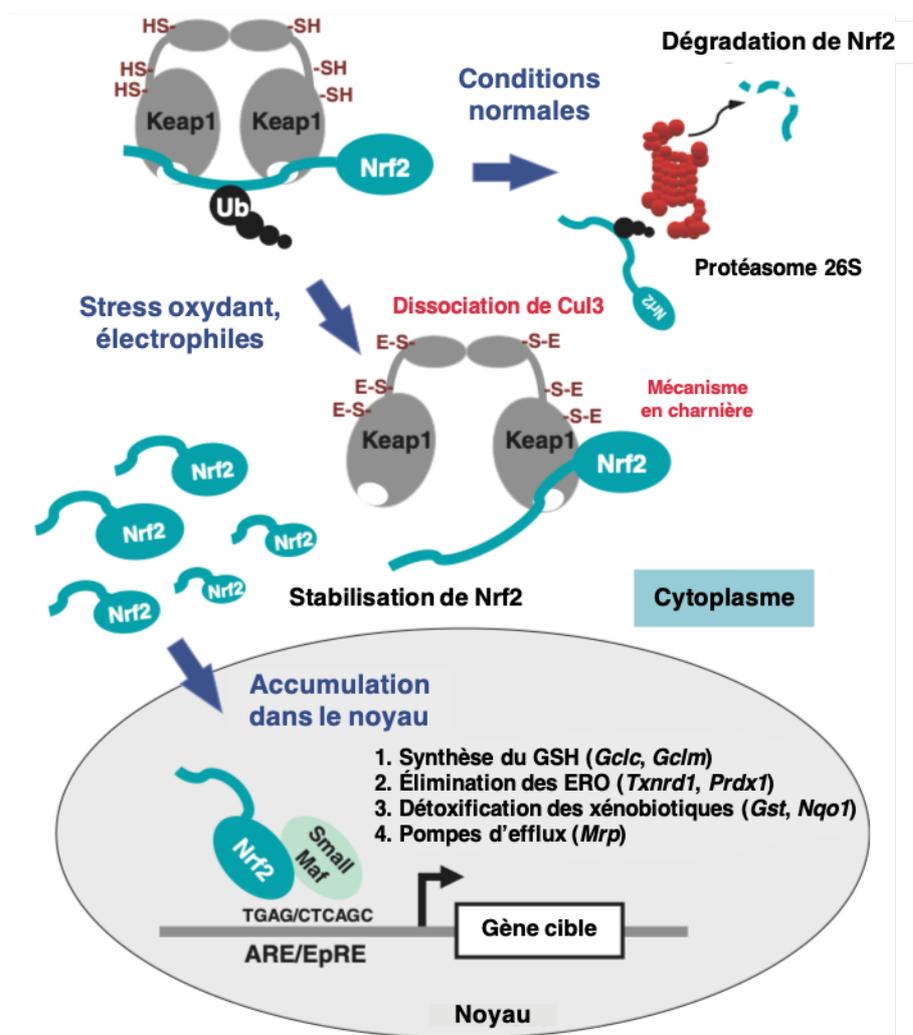
Dans le chapitre précédent, un phénotype et un morphotype apoptotiques ont été mis en évidence. Les complexes **Ir01-10** semblent plutôt mobiliser l'apoptose mitochondriale intrinsèque. Par conséquent nous nous focaliserons sur cette voie, bien documentée en ce qui concerne la réponse aux dommages à l'ADN.

L'apoptose intrinsèque en réponse aux dommages à l'ADN est régulée par p53 dans la plupart des tissus, la stabilité de p53 dépendant de sa phosphorylation par ATM (*Ataxia-Telangiectasia Mutated Kinase*) et Chk2 (*Checkpoint kinase 2*). Ces deux dernières kinases peuvent aussi réguler les E3-ubiquitine ligases contrôlant les niveaux de p53 : MDM2 et MDMX. Dans des cellules saines, les niveaux physiologiques de p53 sont faibles, son activation induit son accumulation dans le noyau et l'activation transcriptionnelle de gènes de la réparation de l'ADN et de l'arrêt du cycle cellulaire afin de prévenir la réplication de l'ADN endommagé. Parmi ces gènes, on trouve *CDKN1A* (*Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A*) qui code pour la protéine p21<sup>Cip1</sup>. Lorsque la réparation de l'ADN est inefficace, p53 peut activer la transcription

de protéines pro-apoptotiques comme BAX et PUMA, elle a donc un rôle de suppresseur de tumeur. Le gène *TP53* est muté dans plus de 50% des cancers, c'est pourquoi il est intéressant d'identifier des voies de mort cellulaires indépendantes de p53 qui peuvent être exploitées pour améliorer l'efficacité des traitements anticancéreux.

## 2. Nrf2 et la réponse au stress oxydant

La voie de signalisation Keap1-Nrf2 est un régulateur majeur de la réponse cellulaire au stress oxydant et électrophile. Dans des conditions normales, le complexe E3-ubiquitine ligase Cul3/Keap1 interagit avec Nrf2, menant à sa poly-ubiquitination et sa dégradation par le protéasome 26S.



**Schéma 19.** La voie de signalisation Keap1-Nrf2, d'après Taguchi et coll.<sup>[113]</sup>

Glutamate-cystéine ligase, sous-unité catalytique (*Gclc*), Glutamate-cystéine ligase, sous-unité modifiatrice (*Gclm*), Thioredoxine réductase 1 (*Txnrd1*), Peroxyrédoxine 1 (*Prdx1*), NAD(P)H déhydrogénase, quinone 1 (*Nqo1*), Glutathion S-transférase (*Gst*), Protéines associées à la résistance multi-drogue (*Mrp*), E (électrophile).

Keap1 est donc une protéine essentielle dans la régulation de l'activité de Nrf2, elle possède de nombreuses cystéines oxydables dont dépendent sa conformation et son interaction avec CuI3. Lors d'un stress oxydant ou électrophile, Keap1 est inactivé par deux mécanismes possibles (Schéma 19, mécanisme en charnière ou dissociation de CuI3). Nrf2 synthétisé *de novo* est transporté dans le noyau, ou il s'hétérodimérise avec des protéines Small Maf pour activer des gènes protecteurs impliqués dans la synthèse du glutathion, l'élimination des ERO et la détoxification des xénobiotiques.

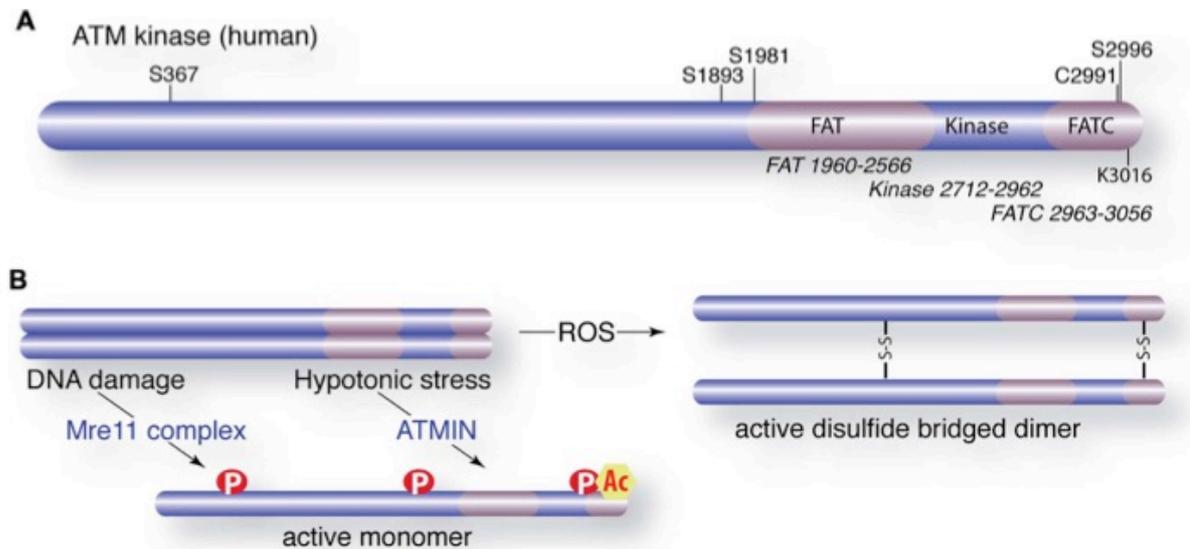
La voie Nrf2-Keap1 est fréquemment dérégulée dans les cancers<sup>[114]</sup> par plusieurs mécanismes, comme par exemple des mutations de Keap1 ou l'activation des oncogènes de la voie MAPK/ERK. Bien que les voies de signalisation enclenchées par Nrf2 préviennent la tumorigénèse dans des tissus normaux ou précancéreux, son activité prodigue un avantage sélectif aux cellules aux stades plus avancés en améliorant leur résistance aux anticancéreux.<sup>[115]</sup> Par exemple, il a été mis en évidence que la voie de signalisation Keap1-Nrf2 protège les cellules d'hépatocarcinome de la mort par ferroptose.<sup>[116]</sup> Dans cette perspective, la dérégulation de Nrf2 confère un avantage sélectif aux tumeurs, de plus en plus de preuves indiquent que des niveaux élevés de Nrf2 sont aussi associés avec une résistance aux agents de chimiothérapie et un mauvais pronostic dans de nombreux cancers.<sup>[117]</sup> L'inhibition de Nrf2 par des molécules électrophiles ou non constitue donc une stratégie prometteuse actuellement en phase d'essais cliniques.<sup>[118]</sup>

### **3. Le rôle de PIDD dans la survie ou la mort cellulaire induite par les ERO**

Dans des cellules saines, ATM est une protéine kinase présente principalement dans le noyau sous forme dimérique ou multimérique. Suite à des cassures double-brin de l'ADN, elle subit une autophosphorylation d'au moins 4 résidus (S367, S1893, S1981, S2996) induisant sa transition sous forme monomérique et démasquant son activité kinase. Par son activité de phosphorylation de MDM2,<sup>[119]</sup> ATM est donc initialement connue pour avoir un rôle central dans la stabilisation de p53 et donc la réponse aux dommages de l'ADN.

Or, des études récentes ont mis en exergue l'implication d'ATM dans la réponse à d'autres stress cellulaires comme le stress hypotonique ou le stress oxydant. En effet, l'activation directe d'ATM par formation de ponts disulfures a été observée *in vitro* après une exposition au peroxyde d'hydrogène (Figure 31). Ainsi les protéines ATM du cytoplasme peuvent être activées indépendamment de leur statut de phosphorylation. Environ un millier de

protéines ont été identifiées comme substrats potentiels de ATM, qui possède une fonction maîtresse dans la transduction des signaux de stress menant à la survie ou la mort cellulaire.



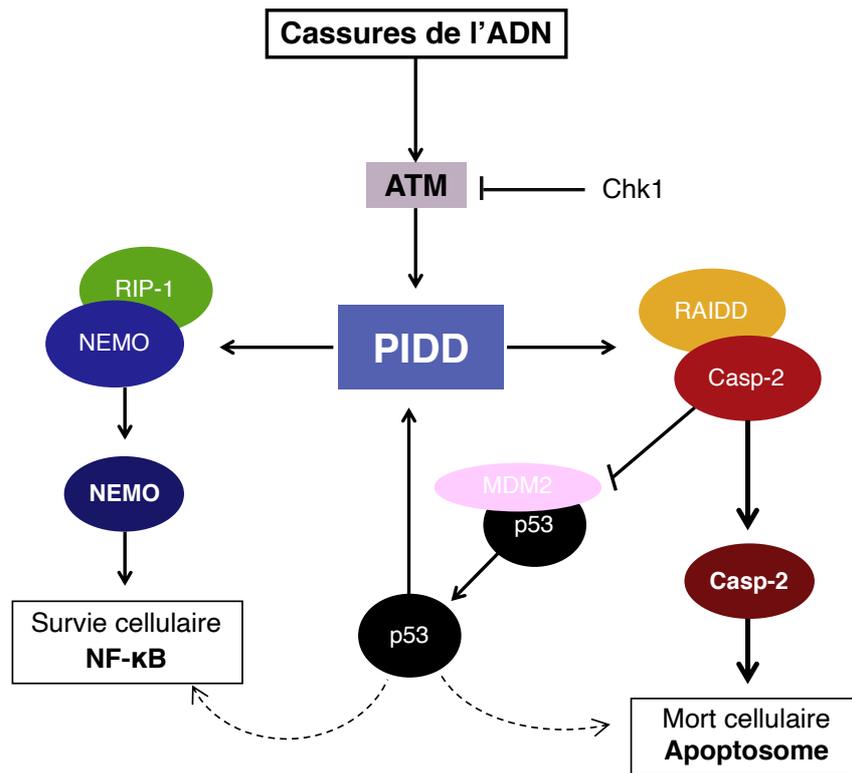
**Figure 31.** La kinase ATM et son activation, d'après Stracker et. al<sup>[120]</sup>

**A.** Schéma des domaines d'ATM (FAT = FRAP ??). Sites d'autophosphorylation principaux (S367, S1893, S1981, S2996), Site d'acétylation par TIP60 (K3016). Cystéine impliquée dans l'activation par les ERO (ROS) (C2991)

**B.** L'activation d'ATM suite aux dommages de l'ADN ou au stress hypotonique nécessite le complexe Mre11 ou ATMIN, respectivement. Alternativement, ATM est activée directement par les ERO qui oxydent des résidus cystéine pour former un dimère ponté.

Il a été rapporté que du  $H_2O_2$  dérivé de la mitochondrie pouvait promouvoir la dimérisation d'ATM. La formation de ces dimères, localisés dans les noyaux de cellules HeLa, est inhibée par la thiorédoxine 1, suggérant l'existence d'une signalisation du stress médiée par les ERO entre la mitochondrie et le noyau.<sup>[121]</sup> Il y a très peu de publications qui rapportent ce phénomène et la méthodologie pour l'analyser reste ardue, car ATM est une protéine de très haut poids moléculaire (350 kDa, dimère de ca. 700 kDa). Il est donc difficile de la visualiser avec des techniques conventionnelles de Western Blot.<sup>[121]</sup>

PIDD (p53-inducible protein with a death domain) est une protéine avec un rôle plateforme de recrutement de différents médiateurs de la mort cellulaire. Dans la littérature récente, il apparaît que PIDD fonctionne comme un senseur des cassures double-brin de l'ADN et que sa phosphorylation, médiée par ATM,<sup>[122]</sup> régule l'activité de nombreuses molécules en aval. En effet, en réponse à un stress génotoxique, PIDD est phosphorylé et forme un complexe avec RAIDD et la caspase-2 connu sous le nom de PIDDosome (~ 700 kDa). Ce complexe active la pro-caspase-2. Cette voie pourrait donc aussi être activée en réponse au stress oxydant.



**Schéma 20.** PIDD et la caspase-2 sont impliqués dans la réponse aux cassures double-brin de l'ADN<sup>[122,123]</sup>

La caspase-2 est la protéine de sa famille la plus conservée, elle est impliquée dans de nombreux processus pro- et anti-apoptotiques. C'est une protéase et parmi ses substrats connus à ce jour on retrouve Bid qui promeut la sortie du cytochrome c de la mitochondrie, elle est donc médiatrice de l'apoptose et peut indirectement activer la formation de l'apoptosome et le clivage de la caspase-3. D'autres substrats de la caspase-2 ont été identifiés comme la Golgine 160 et PARP, des composants cellulaires dégradés pendant l'apoptose mais aussi MDM2, elle peut donc induire la stabilisation de p53 et l'arrêt du cycle cellulaire.<sup>[124]</sup>

En fonction de son état de phosphorylation, PIDD peut être impliqué dans la mort cellulaire, mais aussi dans la survie cellulaire par la voie NFκB.<sup>[125]</sup> Comme l'illustre le schéma 20, RIP1 peut interagir avec NEMO, un peptide de la famille des ubiquitines qui permet un contrôle de la voie NFκB indépendant du protéasome. NFκB est un facteur de transcription contrôlé par un inhibiteur IκB. NFκB est transloqué dans le noyau lorsque IκB est dégradé (par le complexe IKK qui comprend NEMO) pour activer la transcription de gènes protecteurs.

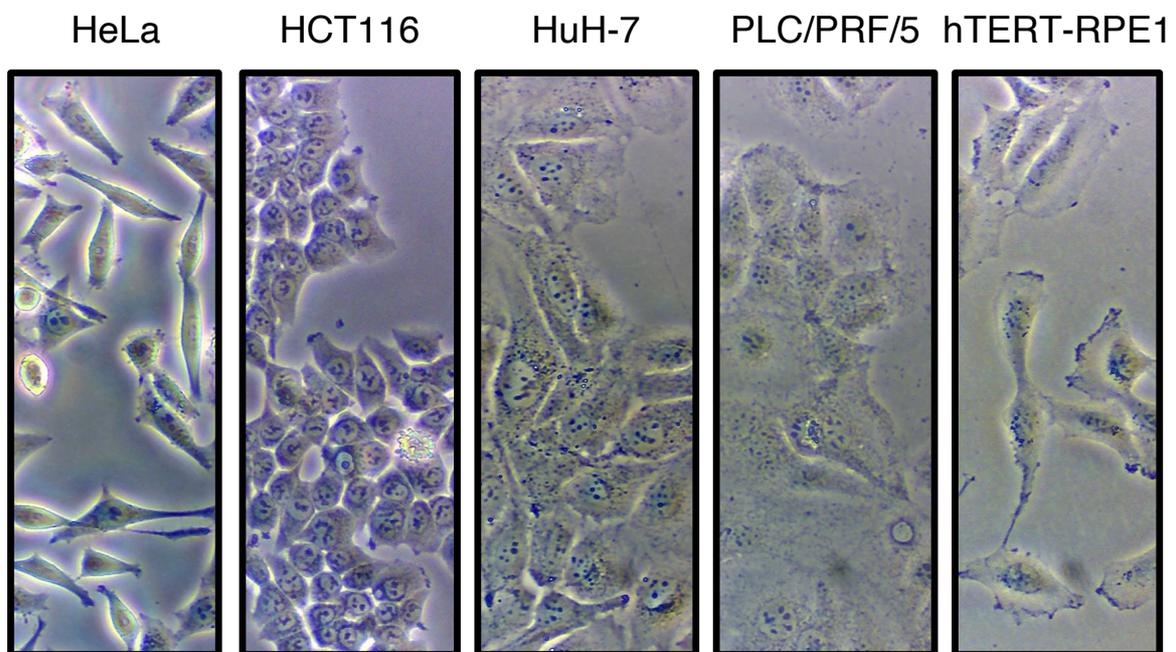
Toutefois, les rôles précis de PIDD et de la caspase-2 restent peu documentés et controversés à ce jour. Avec les acteurs clés de l'apoptose et de la réponse au stress oxydant qui viennent d'être présentés, nous allons nous intéresser dans ce chapitre à ces molécules.

## Résultats et Discussion

### 1. Étude de la toxicité de Ir02

#### 1.1. IC<sub>50</sub> de Ir02 sur différentes lignées cellulaires

Dans le premier chapitre, nous avons restreint notre étude à une lignée cellulaire modèle (HeLa) pour pouvoir comparer l'activité de plusieurs complexes. Dans ce chapitre, nous allons nous focaliser sur un complexe, **Ir02**, qui a montré une capacité élevée à produire du peroxyde d'hydrogène dans les cellules HeLa. La réponse de cellules HeLa sera comparée à celle d'une lignée immortalisée mais non tumorale hTERT-RPE1. Les conséquences moléculaires du traitement par **Ir02** seront aussi étudiées dans d'autres lignées épithéliales tumorales (Figure 32).



**Figure 32.** Images (contraste de phase) des lignées employées dans ce chapitre (grandissement 40x)

La lignée HeLa est un modèle cellulaire *in vitro* déjà employé dans le premier chapitre. C'est la lignée la plus utilisée et la plus décrite dans les laboratoires de recherche, car c'est aussi une des plus anciennes. Elle se caractérise notamment par l'absence de p53 fonctionnelle. De plus la protéine kinase RIP1 n'y est pas exprimée. Nous avons aussi exploré les effets de **Ir02** dans une lignée représentative du cancer du côlon HCT116 qui présente un phénotype p53 sauvage et exprime la protéine RIP1.

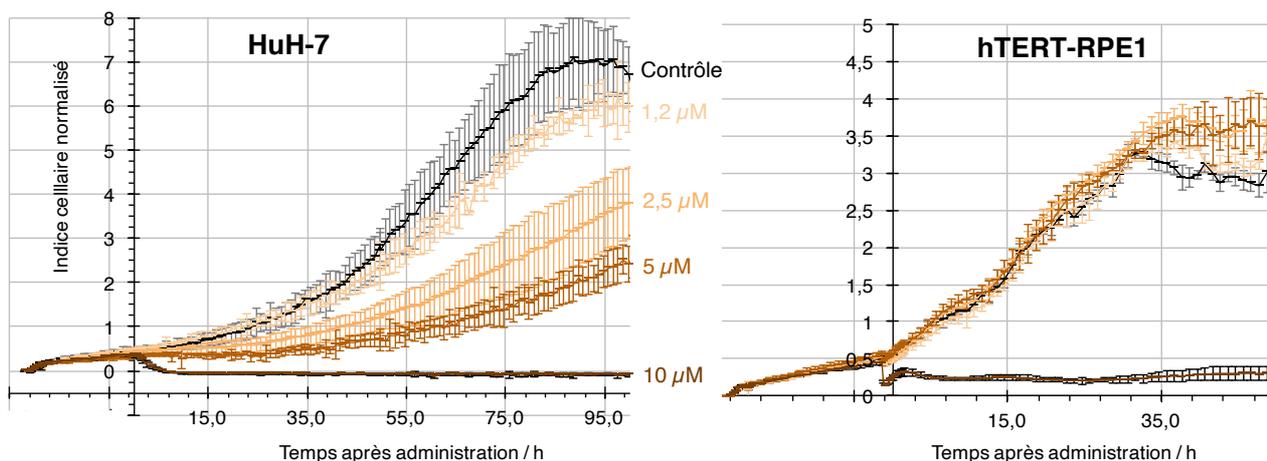
Deux lignées de carcinomes hépatocellulaires (HuH-7 et PLC/PRF/5) sont employées. Les hépatocytes sont des cellules professionnelles de l'excrétion et de la détoxification, ce sont de véritables usines biochimiques qui assurent de nombreuses fonctions liées au métabolisme énergétique comme le stockage des lipides sous formes de grandes gouttelettes. Ces cellules possèdent aussi un arsenal de cytochromes qui permettent la détoxification de nombreuses molécules. Les cytochromes P450 sont des enzymes catalysant des réactions d'oxydation des xénobiotiques pour les rendre hydrosolubles puis les éliminer via des pompes d'efflux transmembranaires de la famille des Mrp (*Multi-drug resistance protein*). Par conséquent, la mesure de toxicité de **Ir02** dans ces lignées (en comparaison avec HeLa et HCT116) peut être un indicateur de la possibilité de détoxification de **Ir02**.

Enfin, une lignée immortalisée (hTERT-RPE1) est employée comme modèle de cellules non-tumorales. Cette lignée humaine diploïde a été générée par l'introduction du gène codant la télomérase dans des cellules primaires de l'épithélium rétinien humain (ARPE-19). Les cellules hTERT-RPE1 sont restées diploïdes, elles présentent une vitesse de prolifération comparable à celle des lignées tumorales mais ont conservé l'inhibition de contact. Les cellules pigmentaires rétiniennes présentent des données non-convergentes dans la littérature quant à leur réponse au stress oxydant. En effet, elles ont montré des phénotypes différents suite aux traitements par le peroxyde d'hydrogène ou par des agents oxydants, allant de nécrotique<sup>[126,127]</sup> à apoptotique.<sup>[128]</sup> Enfin, une étude récente conclut à une plus grande sensibilité au stress oxydant des cellules immortalisées par rapport aux ARPE-19 primaires.<sup>[129]</sup>

L'activité antiproliférative de **Ir02** a été comparée sur ces différentes lignées grâce au système xCELLigence. Les IC<sub>50</sub> approximatifs ci-dessous sont calculés après 48 h de traitement à partir de 4 concentrations de traitement de 1,25 à 10 µM.

Lignée cellulaire	HeLa	HCT116	HuH-7	PLC/PRF5	hTERT-RPE1
IC <sub>50</sub> (µM)	5,1	<10	2,8	3,4	5-10

**Tableau 5.** IC<sub>50</sub> de **Ir02** évalué par xCELLigence sur plusieurs lignées cellulaires



**Figure 33.** Inhibition de prolifération induite par différentes doses de **Ir02** dans deux lignées cellulaires

Les différentes courbes d'indice cellulaire montrent un comportement différent entre les lignées. À l'image des HeLa, les lignées d'hépatocarcinome comme HuH-7 ont donné une réponse dose-dépendante tandis que pour la lignée diploïde hTERT-RPE1 et la lignée colorectale HCT116 seule la plus haute concentration de **Ir02** inhibe totalement la prolifération.

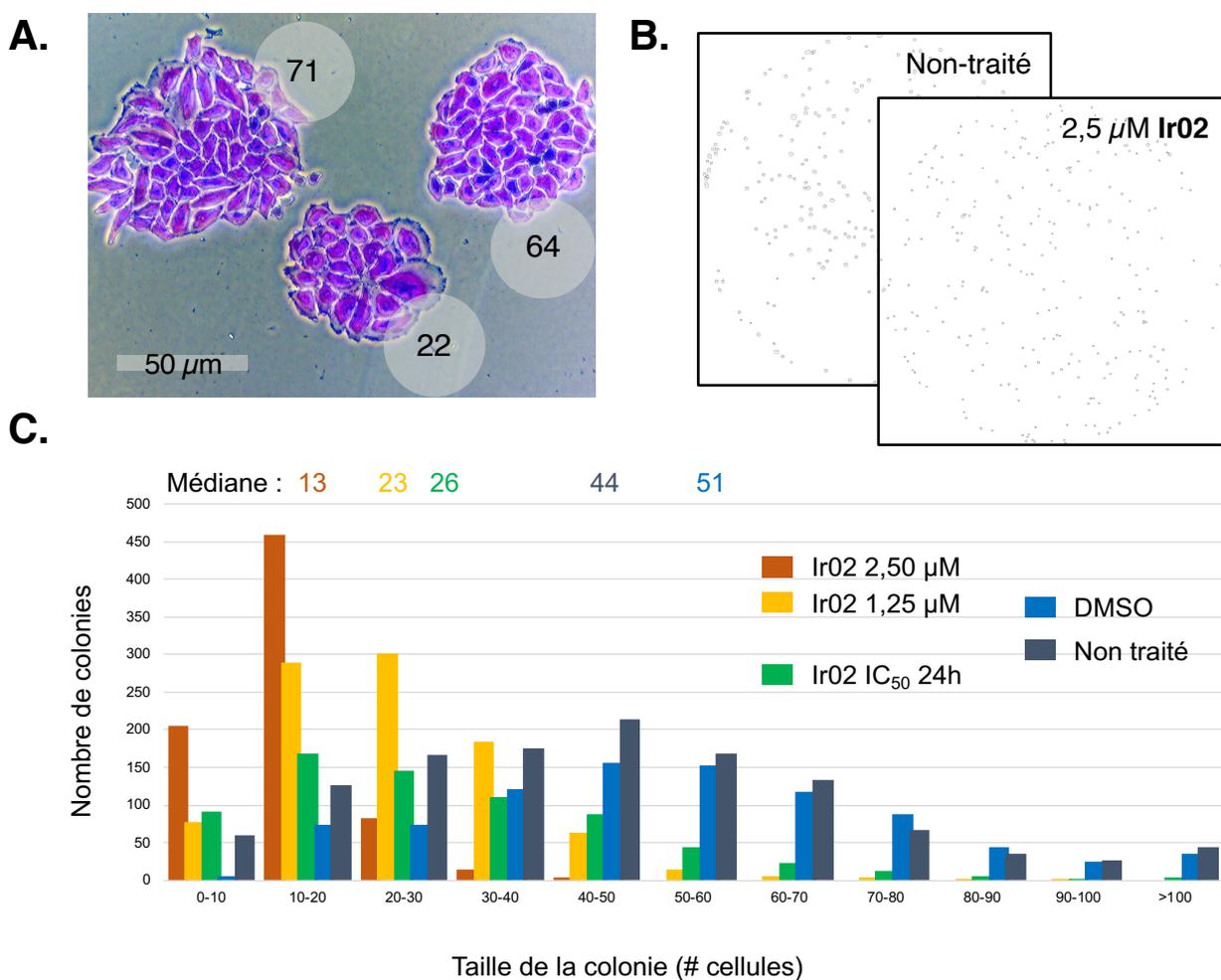
D'après la figure 33, on observe également que pour une concentration de 10 µM, la courbe d'indice cellulaire a un comportement différent dans les premières heures entre les deux lignées. Ce résultat montre une fois de plus l'effet antiprolifératif très rapide de **Ir02** sur les lignées tumorales.

Afin de valider que **Ir02** est internalisé par les cellules rapidement, le contenu en Iridium élémentaire de cellules HeLa et hTERT-RPE1 exposées au complexe pendant 30 min a été mesuré par ICP-OES. Dans la lignée HeLa, pour des concentrations de traitement de 5 et 10 µM,  $405 \pm 3$  et  $855 \pm 14$  ng Ir par million de cellules ont été mesurés respectivement. Les cellules hTERT-RPE1 exposées à 5 µM **Ir02** pendant 30 minutes contiennent moins d'Iridium élémentaire, avec un taux de  $130 \pm 2$  ng Ir/ par million de cellules.

## 1.2. Clonogénicité sur lignée HeLa

Les tests de clonogénicité sont une approche classique pour examiner la capacité des cellules à former des colonies. Pour cela, des cellules sontensemencées à très basse densité (40 cellules / cm<sup>2</sup>) afin d'obtenir des clones uniques, le pourcentage de clones formant colonie

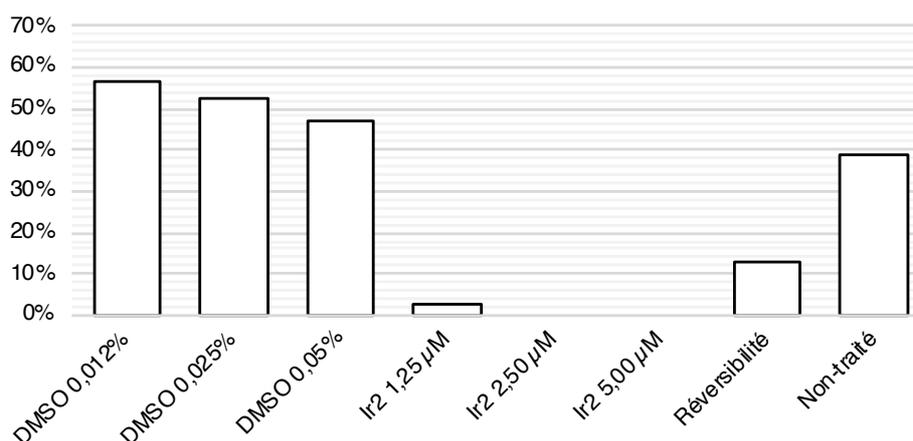
(déterminé à partir d'un seuil de 50 cellules par colonie) après un temps donné correspond à la mesure de clonogénicité. Nous avons employé ce test en exposant les cellules à trois concentrations de **Ir02** de 1,25 à 5  $\mu\text{M}$  dès leur ensemencement. Une seconde expérience avec un ensemencement provenant de cellules non-traitées ou traitées durant 24 h par **Ir02** (conditions  $\text{IC}_{50}$ ) a été réalisée, afin d'examiner la réversibilité du traitement. Au bout de six jours (des colonies contrôle atteignent le seuil de 50 cellules), tous les puits sont fixés et colorés au Cristal Violet 0,05%. Les cellules sont ensuite décomptées afin de relever l'efficacité de clonage, le nombre moyen de cellules par colonie (vitesse de prolifération) et la taille des colonies.



**Figure 34.** Analyse des colonies formées durant les différents traitements

- A.** Grossissement de trois colonies (nombre de clones) utilisé pour le décompte manuel
- B.** Exemple de deux images haute résolution (24 MPx, NikonD3500) traitées par Fiji (détourage des colonies en rouge)
- C.** Résultat du décompte des colonies, histogramme en fonction de la taille des colonies

La condition 5  $\mu\text{M}$  n'a pas donné de colonies et n'apparaît pas dans la figure 34C. Les colonies traitées par **Ir02** à 1,25 et 2,5  $\mu\text{M}$  contiennent nettement moins de cellules que les colonies contrôle après 6 jours. Pour la condition de prétraitement (vert), un histogramme superposable à celui de la condition 1,25  $\mu\text{M}$  (jaune) est obtenu.

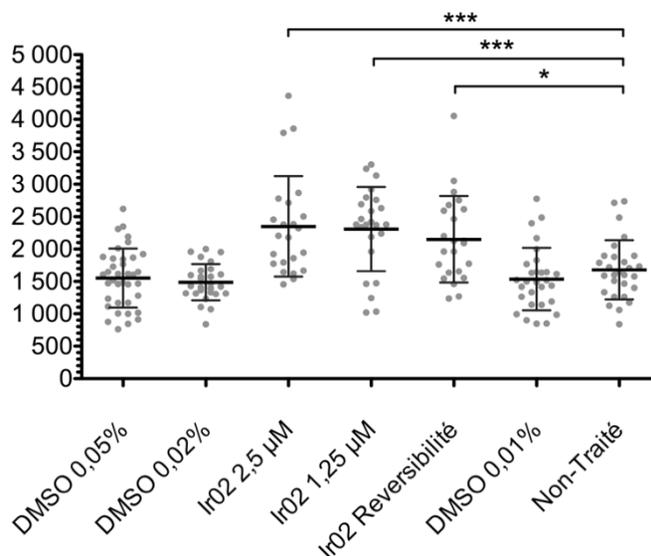


**Figure 35.** **Ir02** réduit l'efficacité de clonage dans la lignée HeLa

Efficacité de clonage, pourcentage de colonies contenant plus de 50 cellules dans chaque condition

En décomptant le nombre de cellules par colonie, les trois contrôles négatifs correspondant au véhicule administré pour les trois concentrations de **Ir02** ne présentaient pas de différence. Cependant on observe une bonne corrélation entre le pourcentage de DMSO de 0,01 à 0,05% et l'efficacité de clonage de 56 à 48 %. En effet, les données de la figure 35 sont obtenues par traitement logiciel de photos haute résolution, elles représentent un décompte d'environ un millier de colonies et sont extrêmement significatives. Par conséquent, les histogrammes présentent un écart type très faible et l'effet toxique du solvant d'administration a été mis en exergue par ce seuil de 50 cellules. Pour les trois concentrations de **Ir02**, l'effet sur l'efficacité de clonage est sévère. À l'inverse, dans l'expérience « réversibilité » l'efficacité est réduite mais n'est pas nulle donc l'effet de **Ir02** est réversible et les cellules peuvent s'adapter lorsqu'elles ne sont plus exposées au complexe.

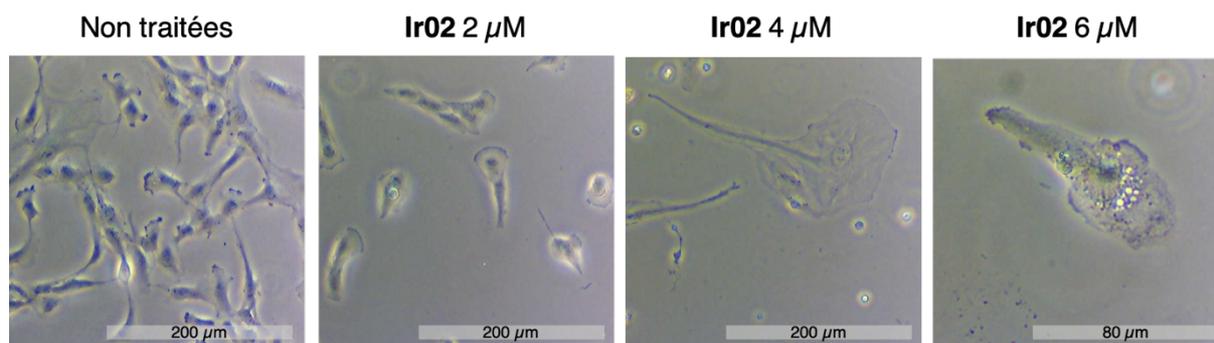
Lors du décompte manuel des colonies au microscope, un effet de **Ir02** sur la taille des cellules a été constaté, il a donc été quantifié plus précisément par microscopie. Pour chaque condition, une trentaine de colonies ont été imagées afin de mesurer leur taille, comparée au nombre de cellules qu'elles contiennent (Figure 36).



**Figure 36.** Effet irréversible du traitement **Ir02** sur la taille des cellules HeLa

Taille de la colonie rapportée au nombre de cellules ( $\mu\text{m}^2$ ) calculée indépendamment pour environ 30 colonies par condition.  
\*  $p < 0.01$  \*\*\*  $p < 0.0001$

Tous les traitements par **Ir02** ont induit une augmentation significative de l'étalement des cellules HeLa. Cet effet s'est montré plus prononcé lors du traitement direct de cellules à basse densité, comme l'illustre la figure 36. Un effet comparable a été constaté lors du traitement chronique de cellules hTERT-RPE1 cultivées de manière chronique avec **Ir02**, c'est-à-dire en ajoutant le composé à faible concentration à chaque passage.



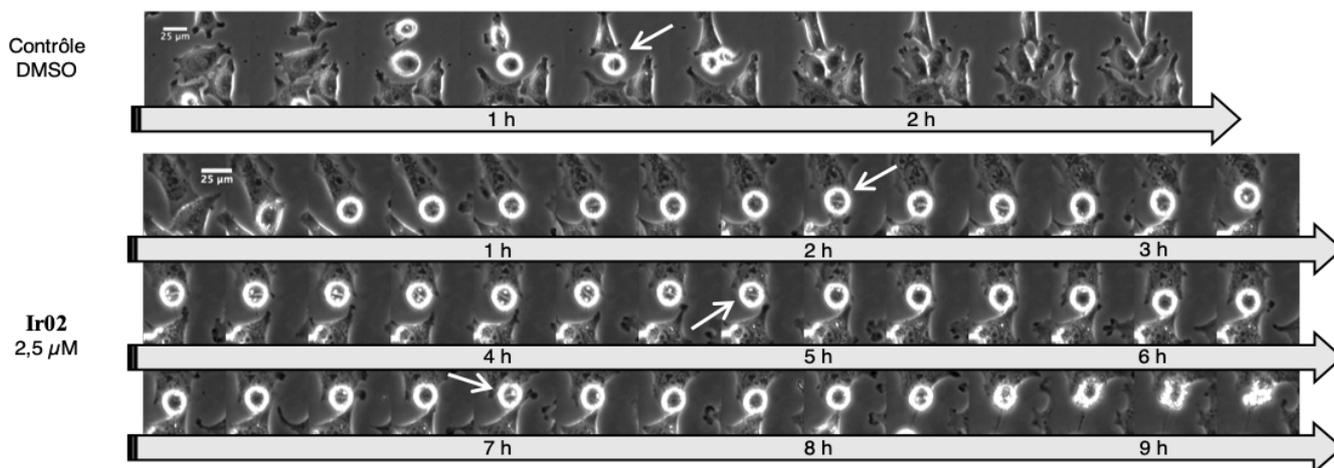
**Figure 37.** **Ir02** induit l'étalement des cellules hTERT-RPE1 lors d'un traitement chronique

Images (contraste de phase) de cellules hTERT-RPE1 cultivé avec des concentrations sub-léthales croissantes de **Ir02**

Lors de cette expérience, des cellules vivantes n'ont pas pu être entretenues à une concentration supérieure à  $6 \mu\text{M}$ . De plus, à cette dose on observe la formation de vésicules réfringentes dans les cellules. Ces observations nous ont incité à étudier les aspects morphologiques des effets cellulaires de **Ir02**.

### 1.3. Aspects morphologiques

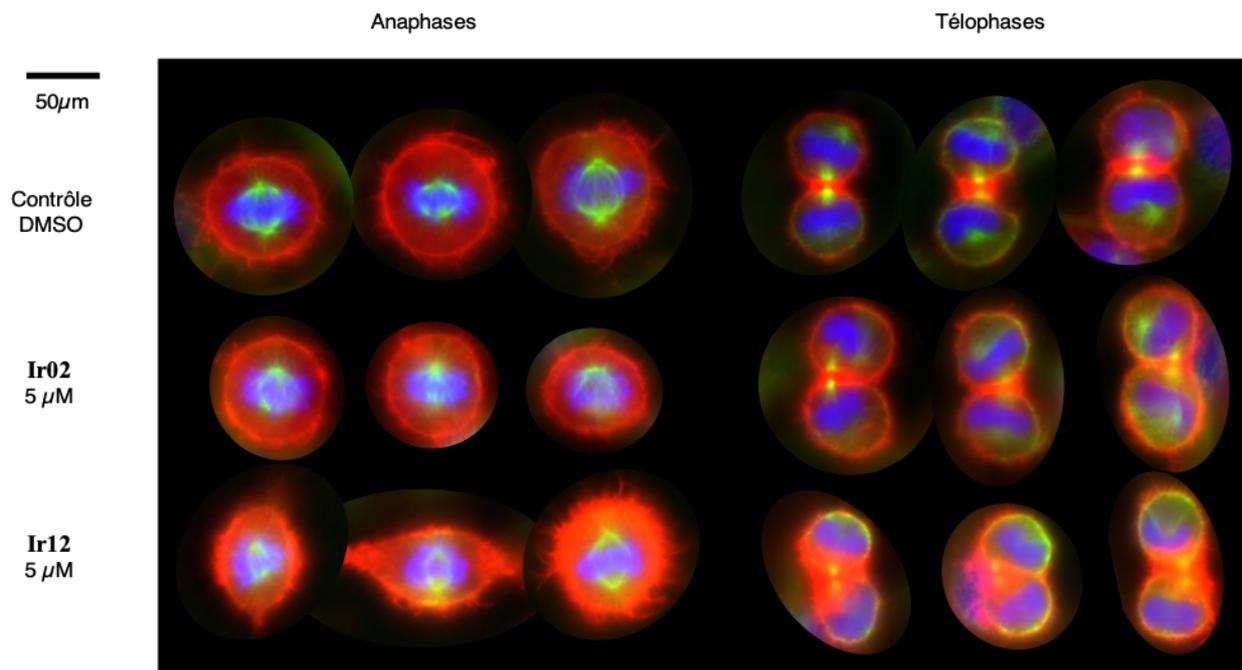
Afin de déterminer les effets biologiques de **Ir02**, la prolifération et le morphotype de la mort cellulaire de cellules HeLa ont été suivis par vidéo-microscopie (voir aussi Chapitre 1, Figure 18). Contrairement aux cellules traitées par le solvant DMSO, des cellules traitées par 2,5  $\mu$ M **Ir02**, soit 0.5 x IC<sub>50</sub>, restent bloquées en métaphase, leurs chromosomes alignés sont visibles durant plusieurs heures (Figure 38).



**Figure 38.** **Ir02** induit un ralentissement de la mitose des cellules HeLa

Ainsi, lors du traitement par 2,5  $\mu$ M **Ir02**, la durée moyenne de mitose est allongée de 47 à 95 min. Parmi la série **Ir01-12**, seuls **Ir02** et dans une moindre mesure **Ir12** ont présenté cet effet. Ce résultat est cohérent avec l'analyse du cycle qui montrait une accumulation en phases G<sub>2</sub>/M pour **Ir02** uniquement. Dans ces vidéos, le morphotype principal de mort cellulaire induite par les complexes était apoptotique, manifesté par une contraction des cellules et la formation de boursofflures puis de corps apoptotiques. Il ne survenait pas exclusivement lorsque les cellules étaient en métaphase, indiquant que la mort cellulaire ne dépend pas seulement de l'arrêt mitotique.

Les perturbations de la division cellulaire ont ensuite été observées plus précisément à plus fort grossissement après marquage fluorescent de différents éléments du cytosquelette. Cette expérience est réalisée dans des cellules fixées après traitement par **Ir02** et **Ir12** durant 16 h (Figure 39). Lors de cette expérience, nous avons retrouvé que l'adhérence des cellules était sévèrement impactée par le traitement **Ir02** et la densité des cellules traitées était donc fortement réduite au bout de 16 h. Pour chaque condition une cinquantaine de cellules dans différentes phases de la mitose ont été imagées par microscopie d'épifluorescence.



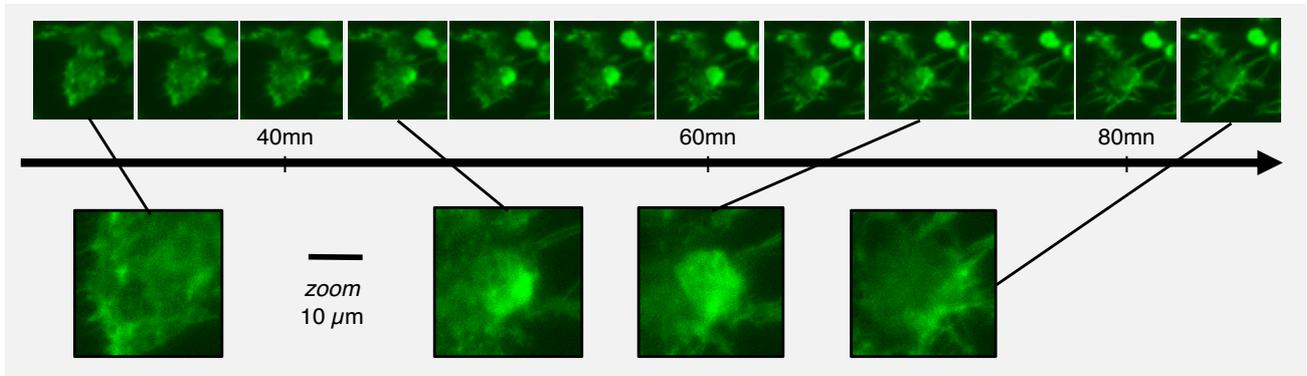
**Figure 39.** Ir02 et Ir12 perturbent la mitose des cellules HeLa après 16 h de traitement

Superposition des canaux rouge (actine), vert (microtubules) et bleu (chromosomes) de cellules représentatives du phénotype observé dans les phases de la mitose indiquées. L'immunomarquage fluorescent des microtubules a été réalisé au moyen d'un anticorps secondaire anti-souris lié à un fluorophore Alexa 488 et d'un anticorps primaire anti-Tubuline de souris. Les chromosomes sont marqués avec le DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole), une molécule qui acquiert une fluorescence bleue lorsqu'elle se lie aux séquences de l'ADN riches en adénine et en thymine. Le cytosquelette d'actine est marqué au moyen d'une phalloïdine, ayant une forte affinité pour les microfilaments, couplée à une rhodamine qui émet dans le rouge.

Pour les deux composés testés, de nombreuses cellules en métaphase étaient observées, de manière cohérente avec le résultat précédent. À plus fort grossissement, on observe des fuseaux mitotiques asymétriques (50% des cellules en métaphase) et la sphéricité des cellules est diminuée (non-quantifié). De plus, les pôles du fuseau semblent moins bien définis pour le traitement par **Ir02**. Comme l'illustre également la figure 39, les cellules traitées par les deux composés présentent une torsion lors de la télophase (60-70% des télophases sont « coudées »). Pour **Ir12**, la concentration en actine filamenteuse semble disproportionnée en comparaison avec le contrôle dans toutes les acquisitions du plan métaphasique. Nous nous sommes intéressés par la suite à la morphologie du cytosquelette d'actine qui est impliqué dans la mitose, mais aussi l'adhérence et la mobilité cellulaire.

Des cellules HeLa et hTERT-RPE1 ont été transfectées par le plasmide LifeAct® qui code pour une actine fusionnée à une GFP et permet de visualiser le cytosquelette d'actine en temps réel. Nous avons visualisé la dynamique du cytosquelette d'actine par vidéo-microscopie durant 3 h après l'administration de **Ir02** et **Ir12**. Les complexes n'ont pas montré de sélectivité préférentielle pour un type cellulaire et des effets similaires ont été observés pour les deux

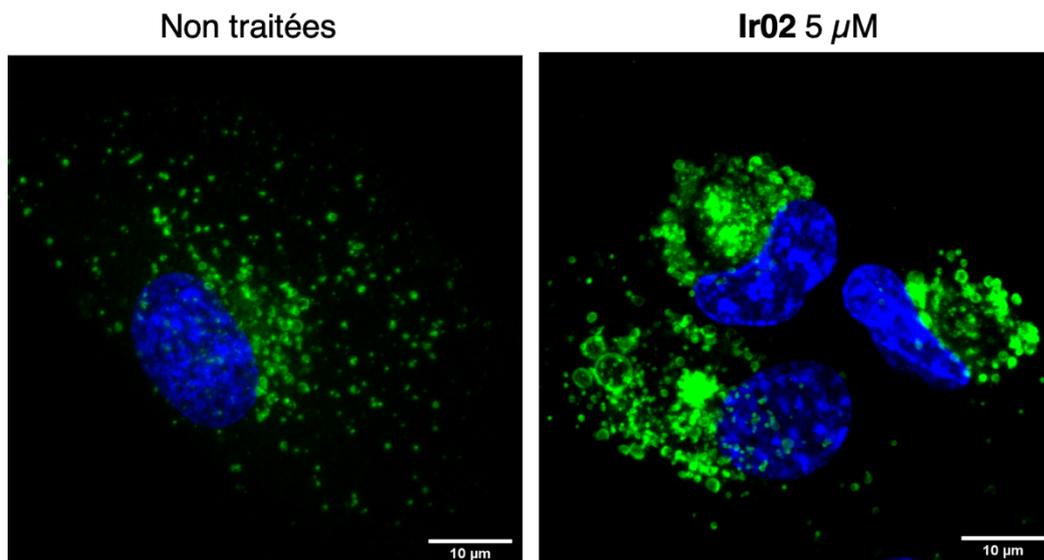
lignées. Le remaniement du réseau d'actine est observé lors de l'apoptose de certaines cellules, il s'accompagne très souvent d'une condensation du réseau d'actine péri-nucléaire illustré ci-après sur la figure 40 pour la lignée hTERT-RPE1. Ces patches d'actine ont été retrouvés dans les deux lignées étudiées.



**Figure 40.** Condensation péri-nucléaire du réseau d'actine lors de l'apoptose d'une cellule hTERT-RPE1

Images et grossissement (épifluorescence, objectif 43x) d'une cellule hTERT-RPE1 transfectée par le plasmide LifeAct et exposée à 10  $\mu$ M de Ir02 au temps indiqué après administration du composé.+

Enfin, un morphotype déjà relevé pour la lignée hTERT-RPE1 est la formation de grandes vésicules semblables à des vacuoles cytoplasmiques (Figure 37, 6  $\mu$ M). Ce phénotype était fréquemment observé lors de l'emploi de doses sub-léthales et a donc été aisément été caractérisé par marquage d'immunofluorescence du compartiment endo-lysosomal. (Figure 41)



**Figure 41.** Ir02 induit la formation de vacuoles cytoplasmiques du compartiment LAMP1+

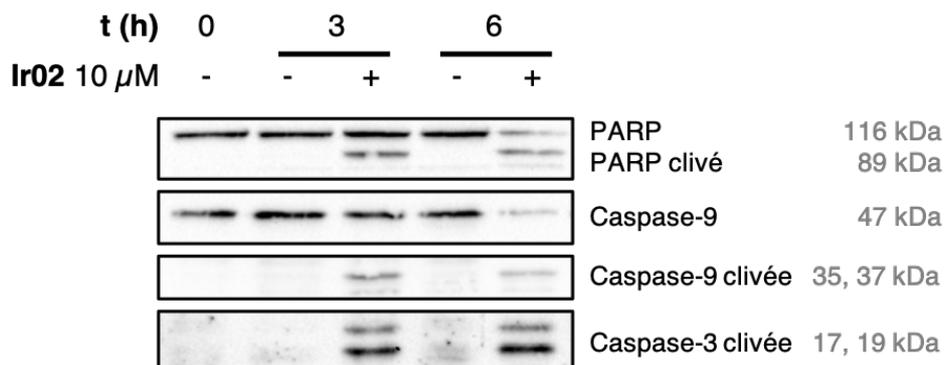
Projections Z de 36 tranches de cellules hTERT-RPE1 exposées ou non durant 24 h avec 5  $\mu$ M Ir02, immunofluorescence de LAMP1 et superposition avec le marquage nucléaire DAPI.

L'immunomarquage de LAMP1 a permis de confirmer que ces vacuoles cytoplasmiques, plus grandes et plus nombreuses lors d'un traitement par **Ir02**, dérivent du compartiment LAMP1 positif. Ce phénotype de vacuolisation suggère l'autophagie des cellules hTERT-RPE1 qui survivent au traitement par **Ir02**. Cependant, comme démontré dans le premier chapitre, la mort cellulaire induite par le complexe relève plutôt d'un phénomène lié à l'apoptose.

## 2. Analyse de la mort cellulaire induite par Ir02

### 2.1. Étude cinétique

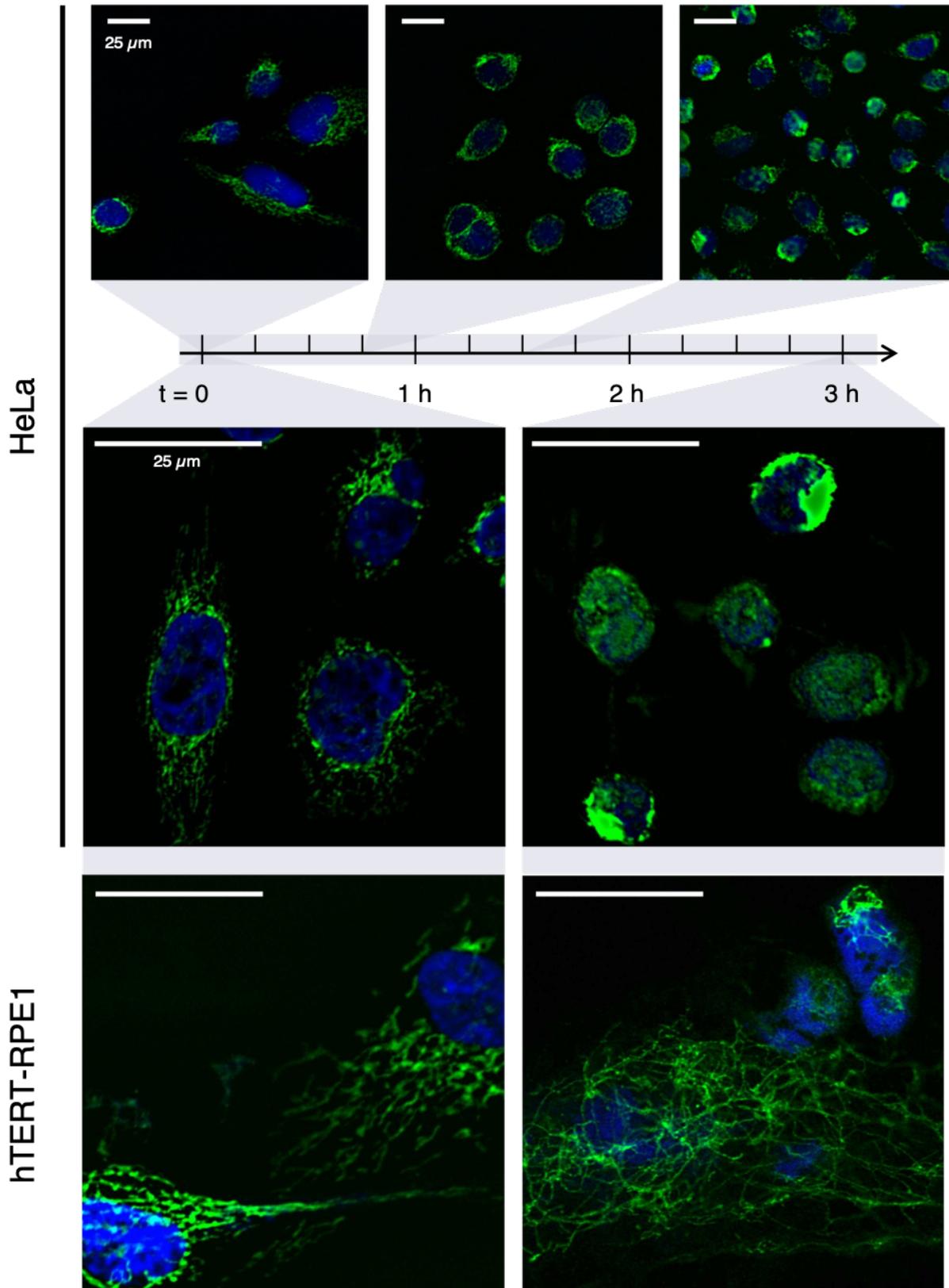
Afin de déterminer précisément quand s'exerce la toxicité de **Ir02** dans les différentes lignées de l'étude, nous allons étudier dans cette partie l'activation de différents acteurs de l'apoptose au cours du temps de traitement avec **Ir02** par Western blot et immunomarquage fluorescent.



**Figure 42.** **Ir02** induit l'activation des caspases 3 et 9 dans la lignée HeLa dès 3 h de traitement

Ce résultat de Western blot montre que chez HeLa, les caspases 3 et 9 sont clivées dès 3 h de traitement, il y a donc une activation très rapide de la voie intrinsèque de l'apoptose. Par conséquent, cette activation des caspases est directe et ne fait pas suite à une réponse transcriptionnelle qui mettrait plus de temps à se mettre en place. Par ailleurs, après 6 h de traitement, **Ir02** est tellement toxique que le taux de protéines totales dans l'échantillon est diminué, en se référant aux niveaux de caspase-9 ou de PARP total comme contrôles de charge.

Comme présenté précédemment, la fuite du cytochrome c des mitochondries vers le cytoplasme constitue un évènement initiateur de la voie intrinsèque de l'apoptose. Nous nous sommes donc intéressés à sa localisation dans les cellules HeLa et hTERT-RPE1.



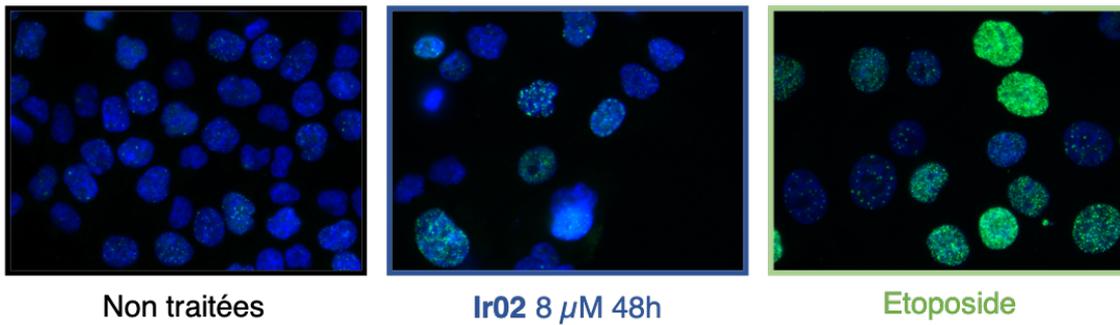
**Figure 43.** Ir02 induit la fuite du cytochrome c dans le cytoplasme chez HeLa uniquement.

Immunofluorescence du cytochrome c dans des cellules HeLa et hTERT-RPE1 suite au traitement par 10  $\mu$ M Ir02 au temps indiqué, imagée par microscopie d'épifluorescence ou microscopie confocale (hTERT-RPE1, 3 h). Comarquage des noyaux en bleu (DAPI). Images représentatives des phénotypes homogènes observés.

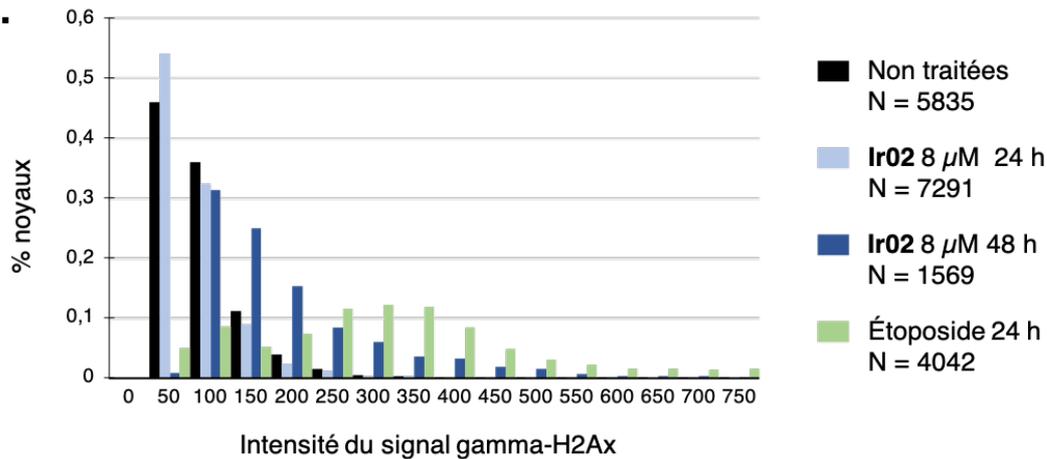
Pour cela, des cellules ont été exposées à 10  $\mu$ M **Ir02** durant 45, 90 ou 180 min puis marquées par un marquage d'immunofluorescence (Figure 43). Dans la lignée HeLa, la distribution intracellulaire du cytochrome c devient progressivement diffuse, la fuite vers le cytoplasme est donc effective en 45 min de traitement par **Ir02**, ce qui est cohérent avec l'activation de la caspase-9 et la mise en œuvre de la voie intrinsèque de l'apoptose. A l'inverse, pour la lignée hTERT-RPE1 le signal reste localisé dans des structures en filaments (mitochondries) même après 3 h de traitement. Ce résultat démontre une différence majeure entre les lignées HeLa et hTERT-RPE1 vis-à-vis de **Ir02**. Par la suite, nous allons caractériser l'activation des caspases 3 et 9 dans les mêmes conditions et obtenir des résultats cohérents (Figure 47).

L'endommagement de l'ADN de cellules traitées par **Ir02** a également été examinée par immunofluorescence. En effet, le découplage des mitochondries résultant de l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose entraîne la production d'ERO qui peuvent induire la formation de cassures de l'ADN. Réciproquement, si des ERO sont produites dans la cellule (tel que le peroxyde d'hydrogène formé en présence d'**Ir02**), celles-ci peuvent diffuser vers le noyau, endommager l'ADN et activer la signalisation qui met en place la voie intrinsèque de l'apoptose. Lors de dommages à l'ADN, l'histone H2Ax est phosphorylée, marquant les sites de cassures observables par microscopie sous forme de points dans le noyau. Des cellules HeLa, hTERT-RPE1 et HCT116 traitées par **Ir02** durant 24 ou 48 h ont donc été immunomarquées par un anticorps anti- $\gamma$ H2ax (Figure 44).

**A.**



**B.**



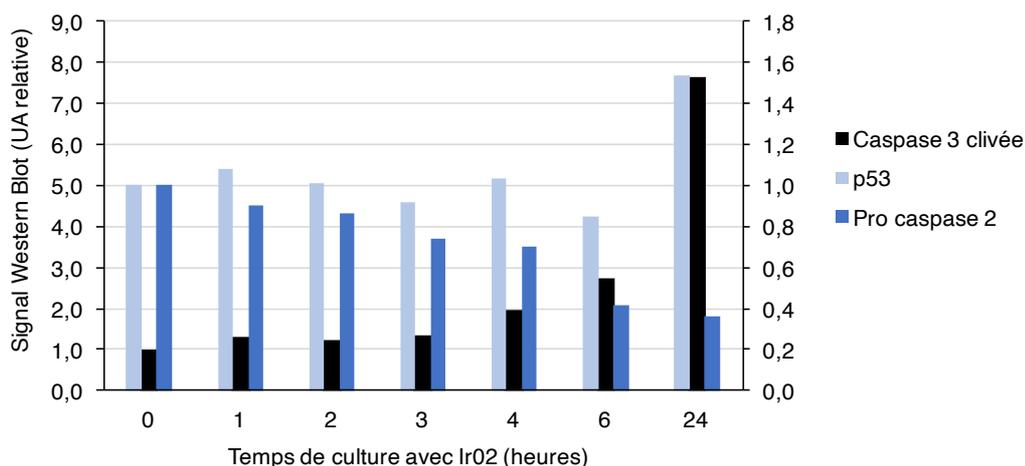
**Figure 44.** Ir02 induit des dommages tardifs et secondaires à l'ADN dans la lignée HCT116

- A. Double marquage des noyaux (DAPI, bleu) et des dommages à l'ADN ( $\gamma$ -H2Ax, vert) de cellules HCT116 p53<sup>+/+</sup>
- B. Quantification de l'intensité normalisée des noyaux dans les différentes conditions

Le résultat observé dans la lignée HCT116 est le même que pour les lignées HeLa et hTERT-RPE1 et montre que Ir02 induit des dommages à l'ADN minoritaires et très tardifs, en net contraste avec l'effet de l'Étoposide, utilisé comme contrôle positif. L'apparition d'ADN endommagé apparaît donc plutôt comme une conséquence de l'activation du programme apoptotique.

Par ailleurs, il a été montré que le peroxyde d'hydrogène peut induire la phosphorylation de H2Ax indépendamment de la présence de cassures double-brin de l'ADN,<sup>[130]</sup> ce qui conforte cette hypothèse.

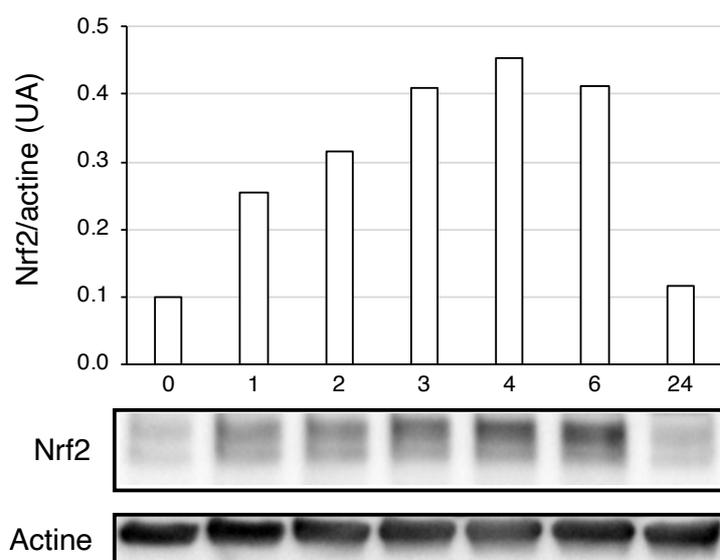
L'étude cinétique dans la lignée hTERT-RPE1 a enfin été complétée par l'observation du statut des caspases 2 et 3, ainsi que de p53 au cours du temps (Figure 45).



**Figure 45.** Cinétique d'activation des caspases et accumulation de p53 chez hTERT-RPE1

**Ir02** induit progressivement l'activation des caspases 2 et 3 mais p53 est stabilisée de manière plus tardive. En outre, le signal normalisé de p53 après 24 h de traitement ne représente pas une stabilisation considérable dans la mesure où le contrôle positif étoposide a donné un signal 10 fois plus important (non-présenté). Ce résultat est cohérent avec l'absence d'endommagements de l'ADN observée à temps court pour le traitement par le complexe de trois lignées cellulaires.

L'interprétation de ces résultats suggère d'explorer la réponse cellulaire au stress oxydant médiée par la voie de signalisation Keap1-Nrf2. Des cellules hTERT-RPE1 exposées à **Ir02** entre 0 et 24 h ont donc été analysées par Western Blot. L'intensité de la protéine Nrf2 est comparée au cours du temps dans la figure 46.

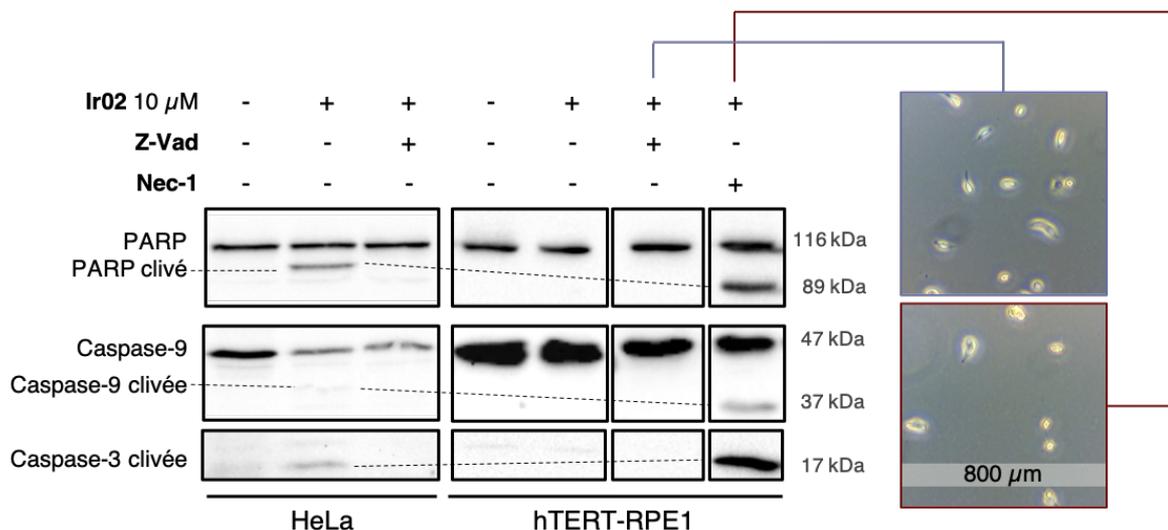


**Figure 46.** **Ir02** stabilise transitoirement Nrf2 dans la lignée hTERT-RPE1

Après 6 h de traitement par **Ir02**, les taux de Nrf2 des cellules hTERT-RPE1 se stabilisent pour finalement revenir au niveau basal après 24 h. Par conséquent, **Ir02** induit la stabilisation transitoire de Nrf2 dans cette lignée, de manière cohérente avec la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> démontrée dans le premier chapitre. Le statut de Nrf2 n'a pas été vérifié dans la lignée HeLa. En effet, du fait de la dérégulation de processus signalétiques de la voie Ras, Keap1 est inactivée dans cette lignée, entraînant l'accumulation de Nrf2 et une traduction exacerbée de ses gènes cibles.<sup>[131]</sup>

## 2.2. Étude de la signalisation de mort cellulaire

Dans les deux lignées, l'activation des caspases a donc été mise en évidence, indiquant une mort cellulaire par apoptose. Nous avons voulu savoir quelle était la réponse cellulaire dans ces deux lignées lorsque les caspases sont inhibées. L'étude des voies de signalisations engagées dans la mort cellulaire induite par **Ir02** a donc été réalisée par Western blot et impédancemétrie au moyen de différents inhibiteurs. Dans un premier temps, la toxicité de **Ir02** après 3 h de traitement a été comparée dans les lignées HeLa et hTERT-RPE1.



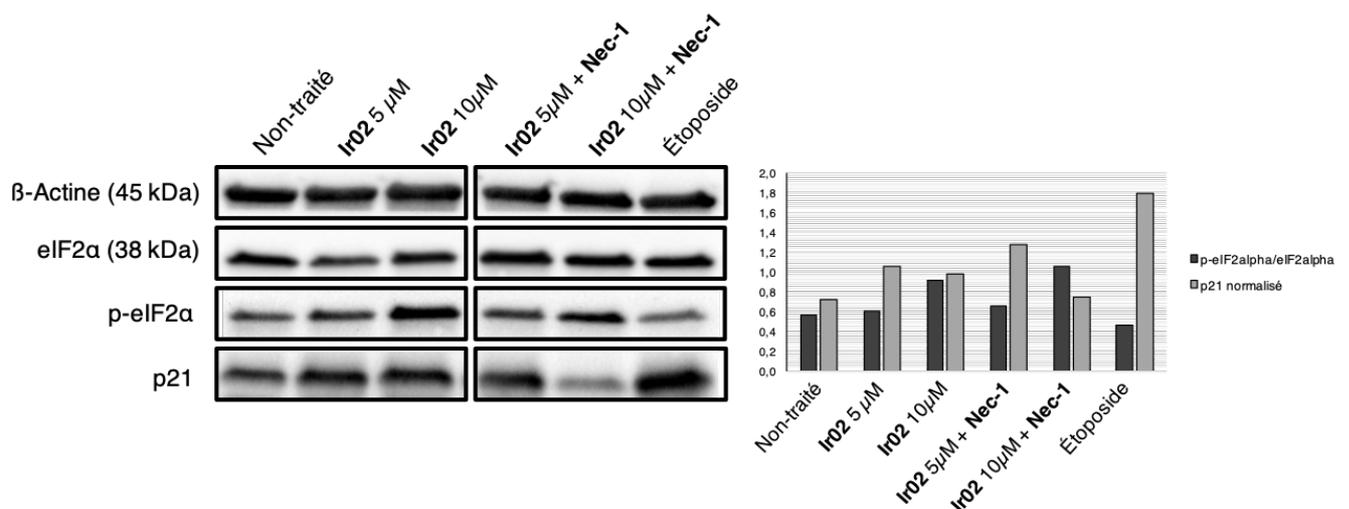
**Figure 47.** Co-traitement de **Ir02** et Z-VAD-FMK ou Nec-1

Z-VAD-FMK est un inhibiteur pan-caspase, Nec-1 est un inhibiteur de la kinase RIP1

Dans les cellules HeLa, **Ir02** a induit l'activation des caspases en trois heures comme précédemment observé dans la figure 42. Cependant, l'emploi de Z-VAD-FMK a prévenu cette activation sans altérer la morphologie de mort cellulaire observée avant leur récolte, suggérant qu'une ou plusieurs voies alternatives peuvent être activées.

Une voie que nous avons suspectée est celle de la nécroptose. L'emploi de Nec-1 comme inhibiteur de RIP1 est connu pour prévenir la mort par nécroptose suite à un stress oxydant.<sup>[82]</sup> Pour la lignée hTERT-RPE1, le co-traitement avec Nec-1 a potentialisé l'effet toxique de **Ir02**, comme l'indique la présence des formes clivées des caspases 3 et 9. En revanche, le traitement par 10  $\mu\text{M}$  de **Ir02** seul durant 3 h n'a pas été suffisant pour induire l'activation des caspases malgré une diminution de l'adhérence cellulaire observée à partir de 1 h de traitement (Figure 47, images). Cette observation est cohérente avec le fait que le complexe n'induit pas un découplage des mitochondries dans ces conditions et dans cette lignée (Figure 43). En somme, ces résultats suggèrent que le stress induit par **Ir02** dans les deux lignées peut conduire à la mort cellulaire indépendamment de l'activation des caspases.

Dans les précédentes expériences, la lignée hTERT-RPE1 a donc montré une réponse différente des lignées tumorales à trois reprises : les cellules traitées à des concentrations inférieures à 10  $\mu\text{M}$  ne semblent pas être affectées d'après leur profil RTCA. En outre le seul traitement toxique de 10  $\mu\text{M}$  **Ir02** n'induit pas la sortie du cytochrome c ni l'activation des caspases 9 et 3 dans cette lignée. Nous avons donc exploré plusieurs voies pouvant être sollicitées durant un stress xénobiotique, après 24 h de traitement. La protéine p21<sup>Cip1</sup> est notamment induite par p53, elle permet de figer le cycle et maintenir la viabilité cellulaire lorsque l'ADN est endommagé, son activation à long terme est un indice que les cellules deviennent sénescents.

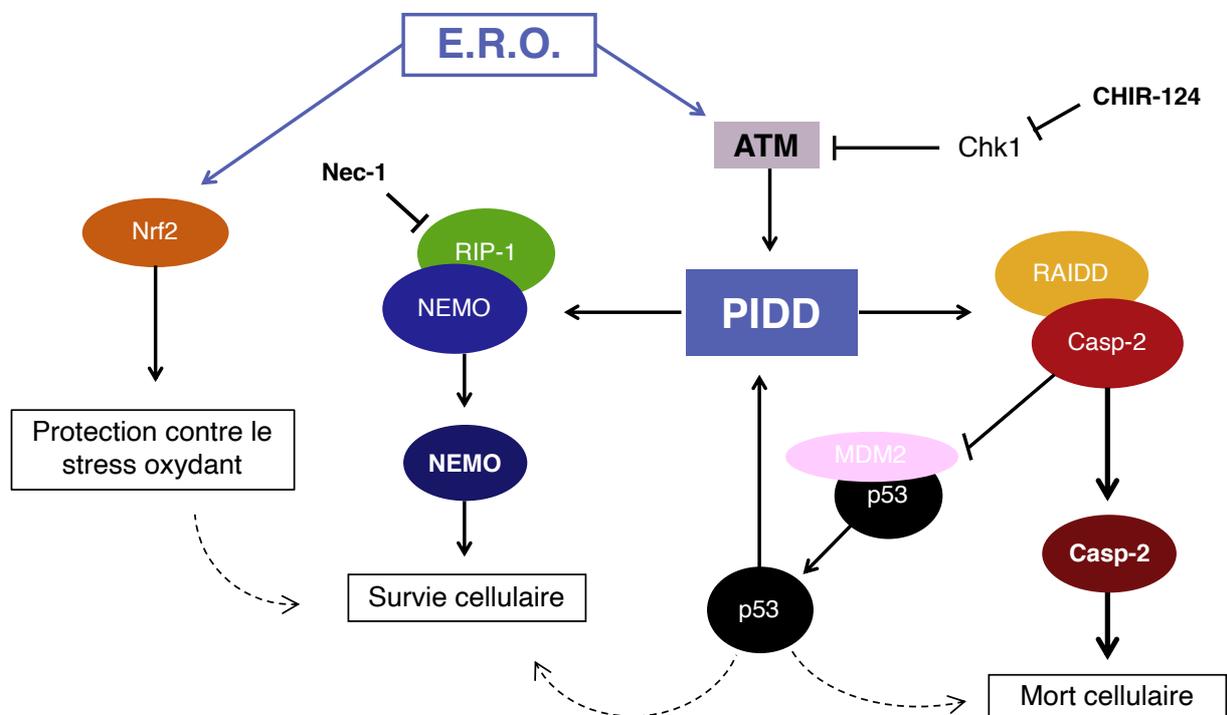


**Figure 48.** **Ir02** n'induit pas la sénescence des cellules hTERT-RPE1 et génère une inhibition modeste de la traduction après 24 h de traitement

D'après ces résultats, le facteur d'initiation de traduction eIF2 $\alpha$  n'est pas phosphorylé de manière significative, indiquant que **Ir02** n'élucite pas ou peu la réponse aux protéines mal

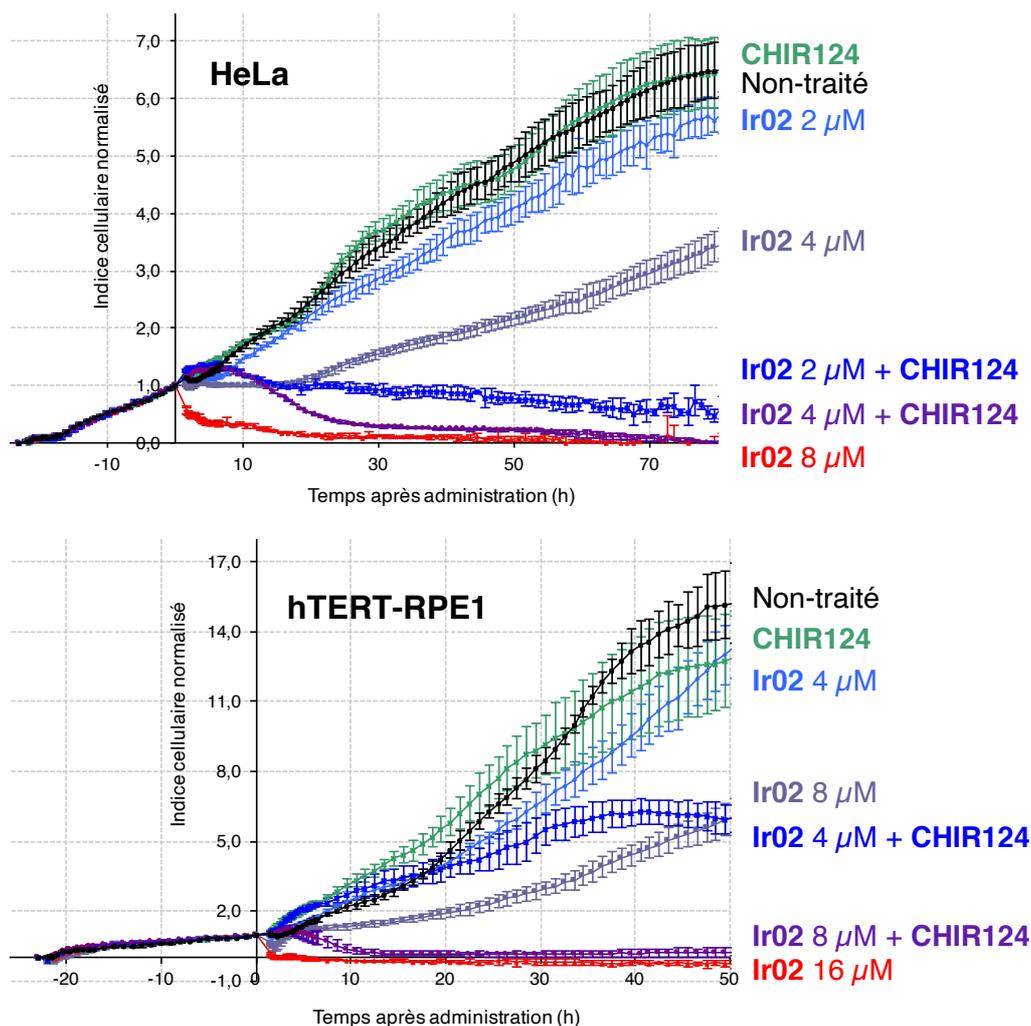
repliées (UPR, *Unfolded Protein Response*, voir Chapitre 3) dans cette lignée. Étoposide est connu pour induire la stabilisation de p53 après 24 h, il est donc logique de trouver un niveau élevé de p21<sup>Cip1</sup> pour cette condition. De la même manière, **Ir02** ne génère qu'une stabilisation modeste de p53 (Figure 45) et il est donc normal de ne pas observer l'accumulation de p21<sup>Cip1</sup>.

En conséquence, d'autres voies de signalisation sont activées dans la lignée hTERT-RPE1 en réponse au traitement par **Ir02**, elles nécessitent certainement que RIP1 soit fonctionnel. Nous avons donc émis l'hypothèse que la réponse au stress oxydant induit par **Ir02** est contrôlée par la voie du PIDDosome. En effet, la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cytoplasmique induite par le complexe pourrait activer ATM par formation de ponts disulfures (Figure 31).



**Schéma 21.** Schéma des voies de signalisation considérées

Pour explorer ces voies du PIDDosome, nous avons évalué dans un premier temps l'effet des plusieurs inhibiteurs co-incubés avec différentes doses de **Ir02** sur la prolifération des cellules par impédancemétrie. L'inhibition de Chk1 au moyen de CHIR-124 a potentialisé l'effet antiprolifératif de **Ir02** dans les lignées HeLa et hTERT-RPE1 (Figure 49), mais aussi dans la lignée HuH-7. Cependant, elle n'a pas pu être interprétée en relation avec **Ir02** dans la lignée HCT116 car CHIR-124 employé seul à une concentration de 500 nM s'est révélé être très toxique dans les deux variants isogéniques de la fonction p53 dont nous disposons, il a aussi diminué la vitesse de prolifération des cellules HuH-7.



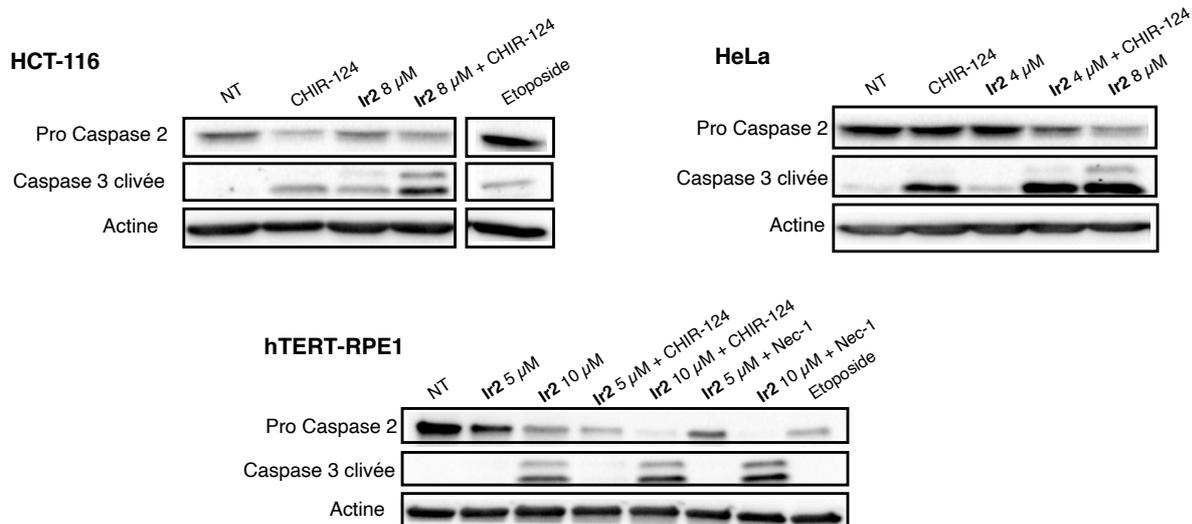
**Figure 49.** Potentialisation de la toxicité de **Ir02** lors d'un co-traitement avec 500 nM CHIR-124

Les concentrations de **Ir02** employées ont été doublées pour la lignée hTERT-RPE1 par rapport à HeLa, compte tenu des précédentes analyses utilisant la technologie xCELLigence. Pour ces deux lignées, l'administration de CHIR-124 seul donne une courbe de prolifération (vert) superposable au contrôle non-traité et comparable au traitement à la plus faible concentration de **Ir02**. À l'inverse, l'inhibition de Chk1 a fortement potentialisé la toxicité du complexe, indiquant que cette kinase est nécessaire à la survie des cellules dans ce contexte.

De la même manière, quatre autres inhibiteurs ont été co-incubés avec **Ir02** et leur effet sur la prolifération des cellules a été analysé par impédancemétrie. De façon cohérente avec le résultat de la figure 47, l'inhibition de RIP1 au moyen de Nec-1 a potentialisé la toxicité de **Ir02** (à 2 et 4  $\mu\text{M}$ ) dans la lignée hTERT-RPE1. D'autre part, l'inhibition des caspases avec Z-VAD-FMK a eu peu ou pas d'effet comparé à l'administration de **Ir02** seul chez HeLa mais a

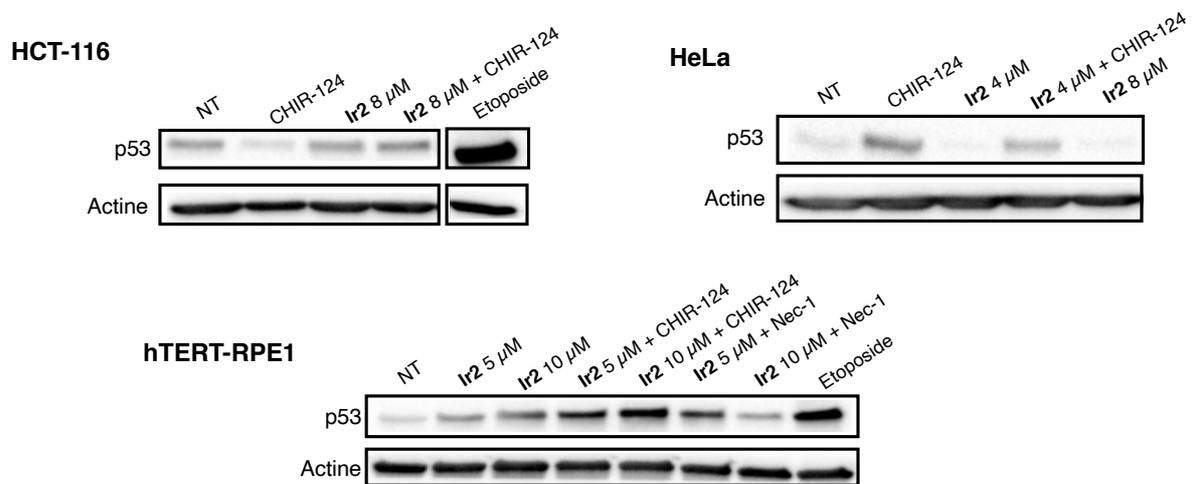
potentialisé l'inhibition de prolifération induite par **Ir02** dans la lignée HuH-7, suggérant que la caspase-2 a pu jouer un rôle anti-apoptotique dans cette lignée HuH-7 en accord avec la littérature.<sup>[123]</sup> L'inhibition d'ATM au moyen de KU55933 n'a pas donné de réponse supplémentaire par rapport aux traitements par **Ir02** dans la lignée HeLa. Enfin la N-acétylcystéine a été utilisée pour son effet protecteur contre les E.R.O., elle a été ajoutée dans le milieu de culture à une concentration de 5 mM 2 h avant le traitement par **Ir02** ou le véhicule. La N-acétylcystéine employée seule s'est révélée délétère sur la vitesse de prolifération mais a néanmoins permis de sauver les cellules HeLa et HuH-7 de l'effet toxique du complexe. Ce résultat confirme donc que l'effet principal de **Ir02** est d'induire un stress oxydant.

Afin d'étudier l'activation de la caspase-2 précédemment observée dans la lignée hTERT-RPE1 (Figure 45) suite au traitement par **Ir02**, la réponse des cellules HCT116, HeLa et hTERT-RPE1 a été examinée par Western Blot après 3 h de traitement par **Ir02**. Le statut des caspases 2 et 3 est présenté dans la figure 50 dans ces trois lignées, pour une concentration équivalente à l'IC<sub>50</sub> et en présence ou non des inhibiteurs.



**Figure 50.** Étude de l'activation des caspases 2 et 3 après 3 h de traitement par **Ir02**

En accord avec les résultats précédents, le traitement par **Ir02** uniquement induit rapidement une diminution du taux de pro-caspase-2, suggérant l'activation de la caspase-2 dans les trois lignées. De même, l'emploi des inhibiteurs semble potentialiser l'effet toxique de **Ir02** dans les trois lignées avec un signal caspase-3 clivée plus prononcé pour les co-traitements. Néanmoins CHIR-124 utilisé seul élicite le clivage de la caspase-3 dans les deux lignées tumorales HeLa et HCT116. Sachant que MDM2 est un substrat de la caspase-2 active (Schéma 20), mais également la E3-ubiquitine ligase de p53, nous avons voulu connaître le statut de p53 dans ces mêmes conditions.



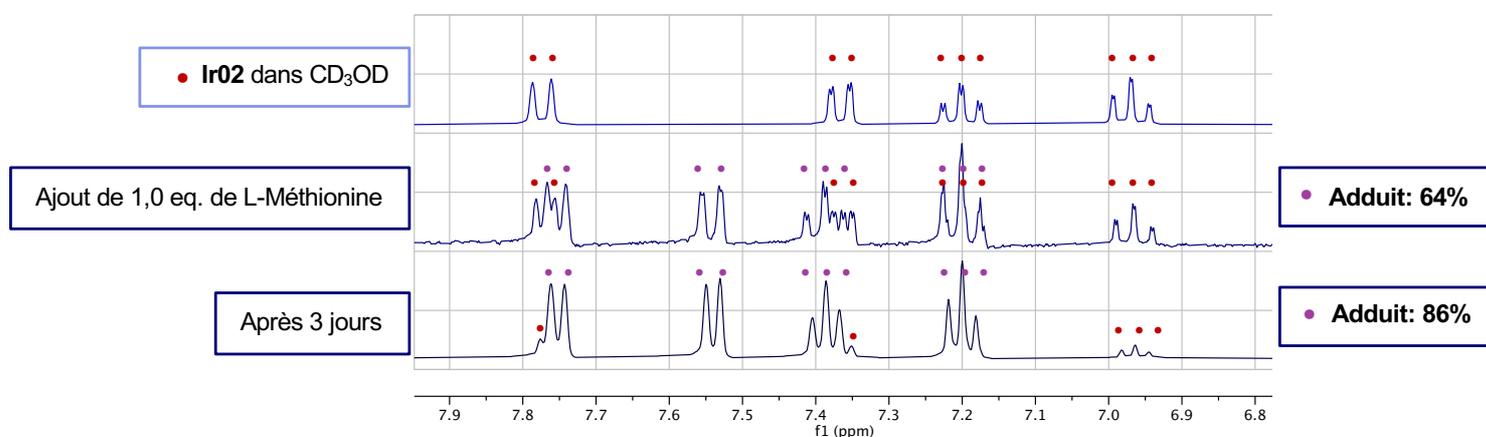
**Figure 51.** Statut de p53 après 3 h de traitement par **Ir02**

Dans la lignée hTERT-RPE1, p53 est activé lors du co-traitement de **Ir02** avec CHIR-124, or ce n'est pas le cas en présence Nec-1. Ce résultat suggère que RIP1 est nécessaire à l'activation de p53 engendrée par **Ir02**, ainsi aucune stabilisation significative de p53 n'est observée dans les lignées tumorales. En conclusion, toutes ces expériences suggèrent que **Ir02** élicite l'activation de PIDD dans la lignée hTERT-RPE1, ce qui constituerait un second mécanisme expliquant leur résistance au complexe.

### 3. Étude de la réactivité de Ir02

Dans cette troisième partie, nous allons sonder la possible formation d'adduits de **Ir02** avec la chaîne latérale des acides aminés. En effet les complexes semi-sandwich possèdent un ligand labile susceptible d'être échangé avec une espèce coordinante. Notamment, le soufre est un élément connu pour son affinité avec les métaux de transition et deux acides aminés comportent un atome de soufre : la cystéine qui possède une fonction thiol et la méthionine.

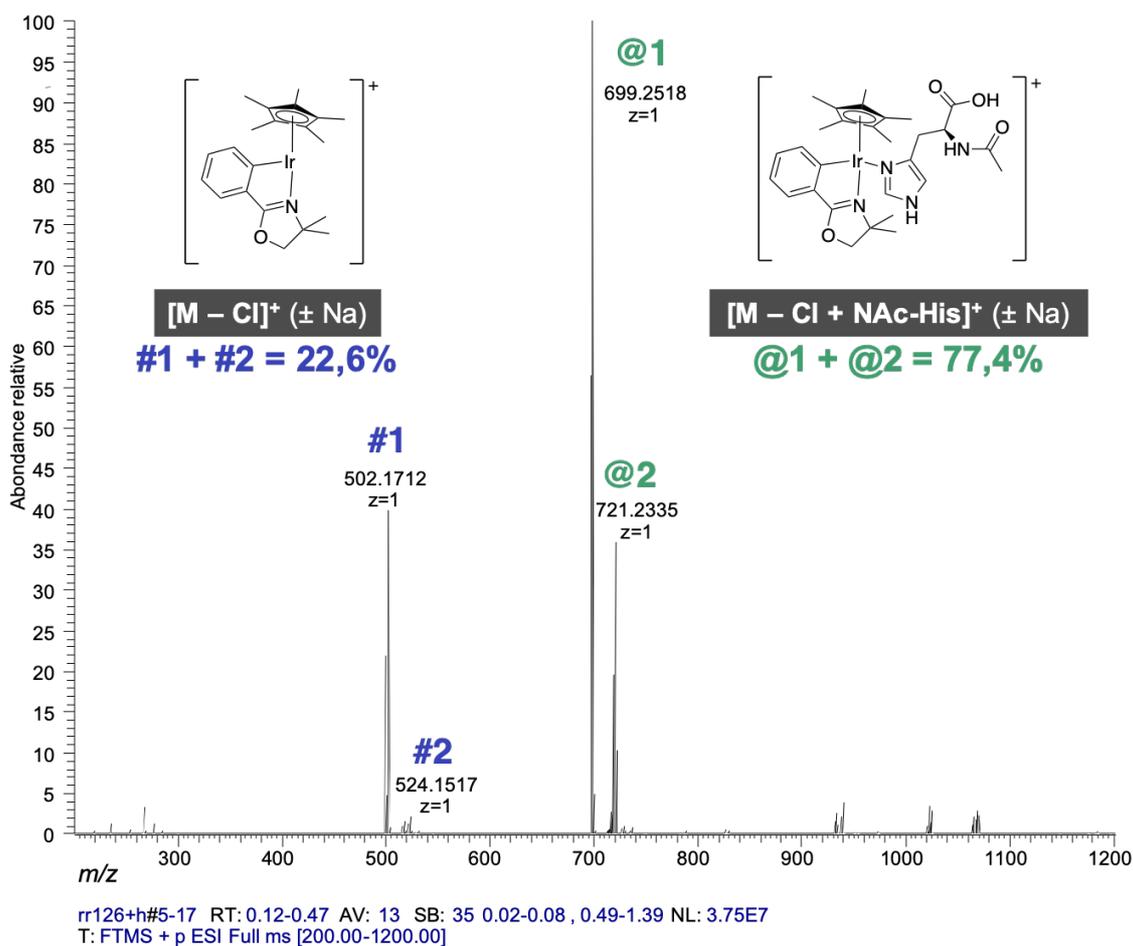
La L-méthionine comporte une fonction thioéther dont l'atome de soufre présente deux doublets donneurs, elle pourrait coordiner l'iridium à l'image du DMSO. La réactivité de **Ir02** avec la L-méthionine a donc été suivie par spectroscopie RMN du proton dans du méthanol deutéré. Les signaux de la méthionine coordinée sont difficiles à interpréter à cause de l'impact de l'environnement asymétrique autour de l'iridium sur leur multiplicité. L'apparition de l'adduit est plus facilement visible dans la partie aromatique du spectre (Figure 52). Par ailleurs un franc décalage du pic correspondant au ligand Cp\* de l'adduit (de 1,76 à 1,87 ppm) est observé de façon similaire aux complexes (phox) décrits dans le premier chapitre.



**Figure 52.** Ir02 (22 mM) dans CD<sub>3</sub>OD et après l'ajout de L-méthionine

Dès l'ajout du substrat, un adduit majoritaire est formé et après trois jours d'incubation à température ambiante, les deux espèces coexistent dans le méthanol deutéré. Pour savoir si ces adduits peuvent également se former dans un environnement aqueux, la réactivité de **Ir02** sera donc étudiée par spectrométrie de masse à haute résolution avec d'autres acides aminés. Cette technique présente l'avantage de pouvoir plus facilement distinguer les différentes espèces formées et d'utiliser des concentrations en substrats plus proches du contexte biologique.

**Ir02** et différents substrats ont été incubés en proportions équimolaires dans un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O durant 1 h à 37°C, puis les échantillons ont été analysés par un spectromètre de masse. L'apparition d'un pic majoritaire correspondant à la coordination du substrat permet de confirmer que le complexe est capable de former des adduits par échange de son ligand chlorido dans ces conditions.



**Figure 53.** Spectre obtenu pour l'interaction avec la N-acétylhistidine dans MeOH/H<sub>2</sub>O

Afin de comparer l'affinité de **Ir02** pour différents substrats, les rapports d'intensité relative entre les pics de la forme **Ir02** libre et ceux de l'adduit sont utilisés, exprimés en %. Ces valeurs dépendent en réalité de l'efficacité d'ionisation et ne représentent pas nécessairement les quantités relatives des espèces initialement présentes en solution. Dans un premier temps, les substrats considérés étaient des acides aminés non-protégés qui ont mené à la formation d'adduits pontés avec leurs fonctions amine et acide (pour Pro < Ala < Ser < Lys < Asp < Met).

Par la suite, nous avons donc employé des acides aminés protégés ou des substrats modélisant leur chaîne latérale, pour être plus proche du contexte intracellulaire. Cette seconde analyse a été réalisée dans le méthanol pur afin de solubiliser toutes les espèces.

	MeOH/H <sub>2</sub> O	MeOH
Alanine	0 %	<i>Nd</i>
Proline	0 %	<i>Nd</i>
Sérine	2 %	<i>Nd</i>
Asparagine	15 %	<i>Nd</i>
Lysine	16 %	<i>Nd</i>
Méthionine	16 %	<i>Nd</i>
Cystéine	34 %	<i>Nd</i>
GSH	36 %	<i>Nd</i>
N-Ac-Histidine	77 %	71 %
NAC	<i>Nd</i>	70 %
Phénylbutylamine	<i>Nd</i>	48 %
Butyramide	<i>Nd</i>	0 %

**Tableau 6.** Adduits détectés par HRMS pour les différents substrats

NAC = Ester méthylique de N-acétylcystéine (diprotégée)

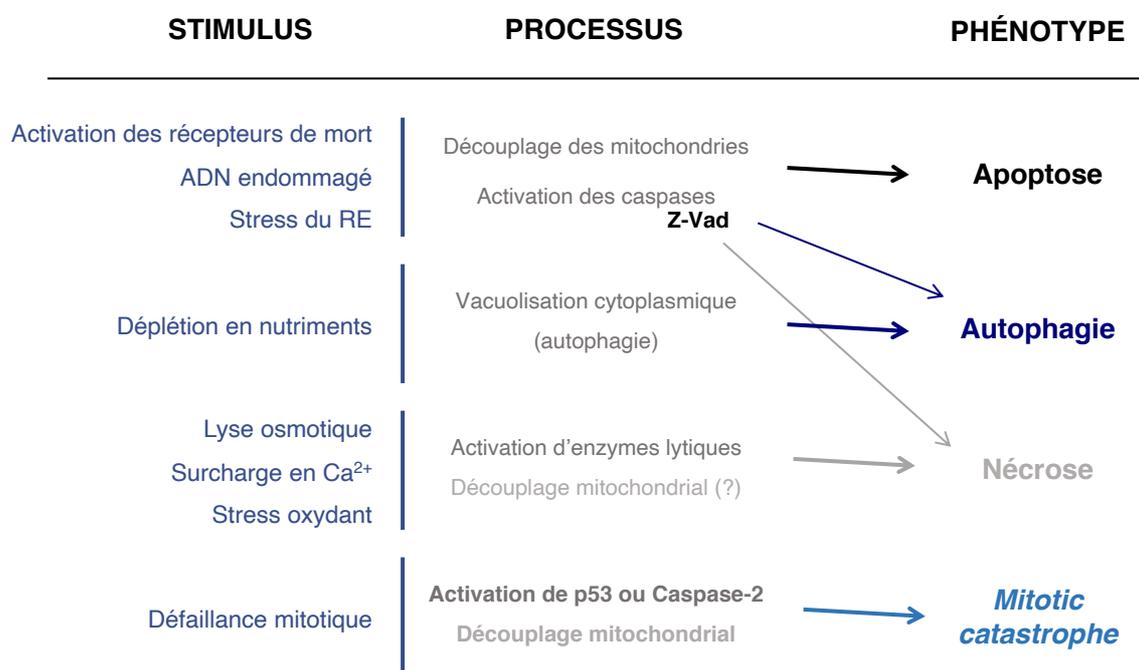
*Nd* = Non déterminé (solubilité)

De façon attendue, **Ir02** n'a pas formé d'adduit avec la chaîne latérale de l'alanine ni de la proline qui sont aliphatiques. En revanche l'échange du ligand chlorido de **Ir02** a été observé avec les acides aminés comportant un atome S ou N donneur de la chaîne latérale des cystéines et histidines, principalement. La formation de ce type d'adduits monovalents est donc caractéristique des complexes présentant cette géométrie en tabouret de piano, elle dépend indirectement de la labilité du ligand monodente.

À l'intérieur des cellules, de tels adduits pourraient se former au niveau du site actif d'enzymes et les inactiver. Par ailleurs, à l'image de l'inactivation de Keap1 par des électrophiles, ils peuvent aussi se lier aux cystéines accessibles de certaines protéines et changer leur conformation, voire leur solubilité. Ce mécanisme pour les complexes d'iridium de type semi-sandwich explique peut-être l'impact de **Ir02** sur la signalisation moléculaire et les processus de division cellulaire qui sont grandement dépendants de ces acteurs.

## Conclusion et perspectives

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés au comportement intracellulaire de **Ir02** et aux effets biologiques qu'il induit dans différentes lignées cellulaires épithéliales. Cette étude visait à interpréter le mécanisme d'action de ce complexe sélectionné, au regard de sa capacité à produire du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracellulaire établie précédemment. En effet, les phénotypes de mort cellulaires observés et l'identification des processus de morts cellulaire impliqués fournissent de nombreux éléments pour rationaliser la cytotoxicité d'une molécule (Figure 54).

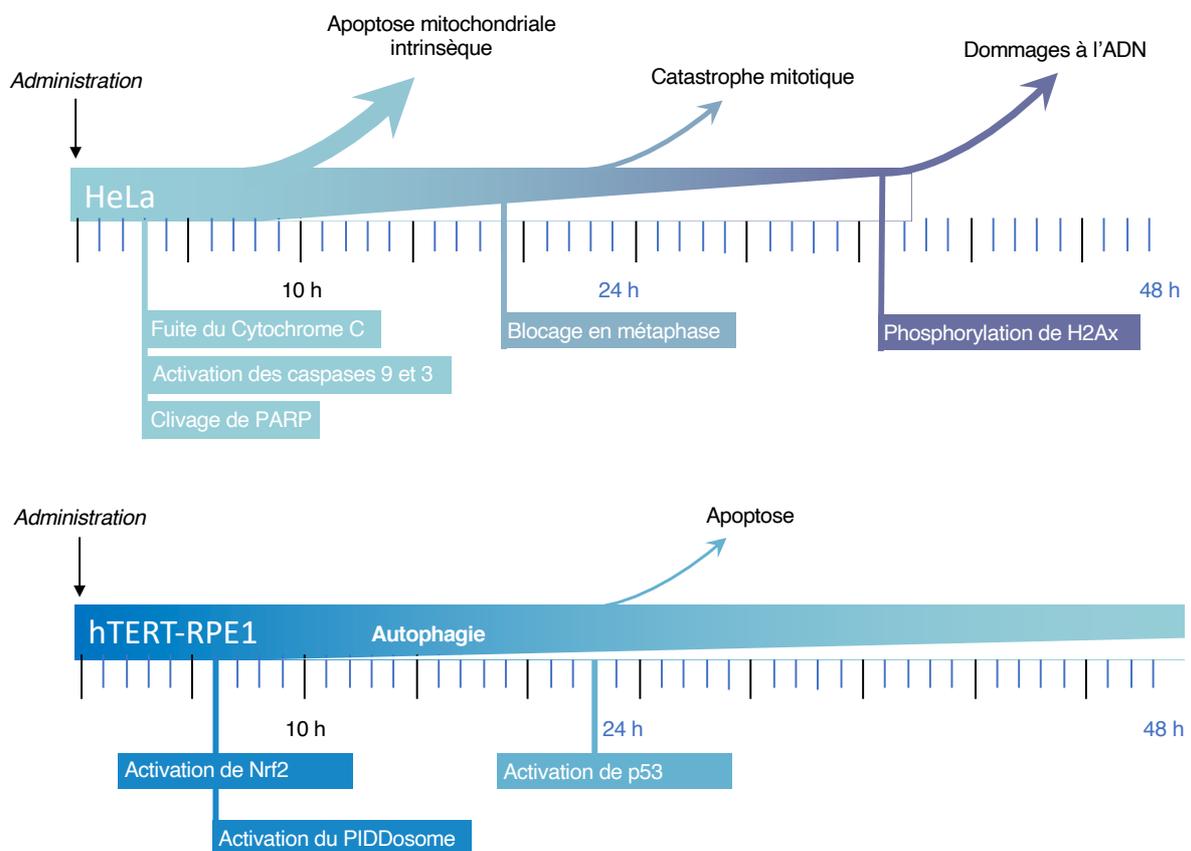


**Figure 54.** Stimulus et processus biochimiques entraînant différents phénotypes de mort cellulaire, adapté de Galluzzi et coll.<sup>[132]</sup>

L'IC<sub>50</sub> de **Ir02** se situe autour de 5 µM dans la lignée HeLa. Grâce au système xCELLigence RTCA, nous avons déterminé un l'IC<sub>50</sub> approximatif de **Ir02** sur quatre autres lignées cellulaires, compris entre 3 et 20 µM. Les lignées HCT116 et hTERT-RPE1 se sont montrées particulièrement résistantes au complexe lors de ce test. À l'inverse, les lignées d'hépatocarcinome HuH-7 et PLC étaient plus sensibles. En vue de proposer un agent anticancéreux plus sélectif, la réponse cellulaire à **Ir02** a été examinée plus précisément sur la lignée hTERT-RPE1, en comparaison avec les lignées tumorales.

**Ir02** inhibe la formation de colonies des cellules HeLa, cependant l'effet d'un traitement à l'IC<sub>50</sub> durant 24 h est réversible et les cellules survivantes peuvent former des colonies. L'activation des caspases-3 et -9 et la fuite du cytochrome c ont été observés en seulement 3 h de traitement pour cette lignée. En accord avec cela, les cellules HeLa exposées à **Ir02** présentent un morphotype de mort cellulaire apoptotique (Type I). Nous avons aussi confirmé que **Ir02** induisait un bloc G2/M en caractérisant son effet marqué sur la mitose. En effet, les cellules présentent un ralentissement lors de l'étape de métaphase de leur mitose qui s'accompagne d'anomalies structurales marquées. Le phénomène appelé catastrophe mitotique (Figure 54) est un mécanisme de contrôle des cellules incapables de se diviser mais ne constitue pas une forme de RCD en elle-même. Il peut mener à l'apoptose ou la sénescence des cellules.

Dans la lignée hTERT-RPE1, la formation de vacuoles cytoplasmiques issues du compartiment endo-lysosomal était fréquemment observée, correspondant au morphotype d'autophagie (Type II) et impliquant que des composants intracellulaires sont endommagés. De plus, contrairement à la lignée HeLa, le cytochrome c des cellules hTERT-RPE1 reste localisé dans les mitochondries malgré un traitement toxique par **Ir02** à une dose de 10 µM.

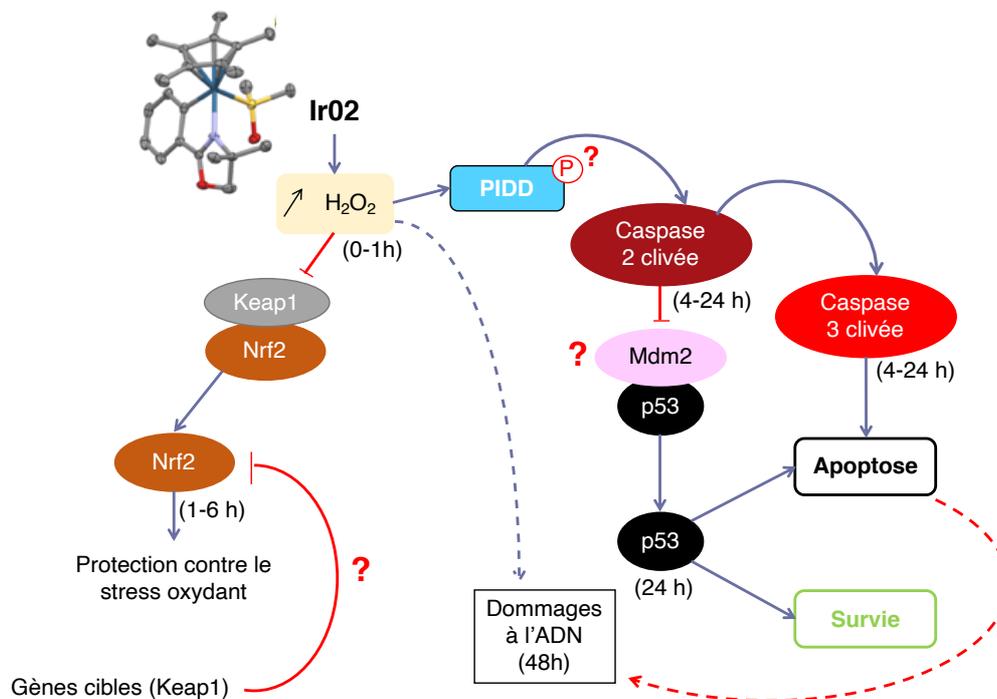


**Figure 55.** Résumé de la réponse au traitement par **Ir02** supposée dans les lignées HeLa et hTERT-RPE1

La stabilisation transitoire de Nrf2 a été observée dans la lignée hTERT-RPE1 dès les premières heures de traitement, confirmant la capacité de **Ir02** à induire un stress oxydant. De façon cohérente, des dommages à l'ADN et une stabilisation modeste de p53 sont visibles très tardivement. Ce phénotype pourrait être une conséquence de la production d'ERO élicitée par **Ir02**. Contrairement à Étoposide, son mécanisme d'action principal n'est donc pas lié à l'endommagement de l'ADN.

Certaines voies de mort cellulaire indépendantes des caspases et de p53 sont connues, elles impliquent des protéines mitochondriales comme AIF et comportent un grand potentiel thérapeutique dans le contexte tumoral où l'apoptose est généralement inhibée.<sup>[133,134]</sup> Ces voies ont pu être mobilisées lors de l'inhibition des caspases par Z-VAD-FMK qui n'a pas montré d'effet protecteur sur des cellules HeLa ni hTERT-RPE1 exposées à **Ir02**. Dans la littérature, on trouve pourtant des résultats contraires pour des cellules HeLa traitées par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>[135]</sup>

Enfin, l'activation de la pro-caspase-2 a été observée dans la lignée hTERT-RPE1. Elle pourrait être une conséquence de l'activation de PIDD, une voie de signalisation initialement connue pour être déclenchée en réponse aux dommages à l'ADN. Nous avons postulé que les ERO produits par **Ir02** pouvaient mobiliser cette voie du PIDDosome (Schéma 22), dans la mesure où elles sont potentiellement capables d'activer ATM par formation de ponts disulfures.



**Schéma 22.** Comparaison du mécanisme d'action de Étoposide et **Ir02**, perspectives

D'autres indices de l'activation de PIDD ont été mis en évidence : l'inhibition de Chk1 et RIP1 ont induit une potentialisation de l'effet toxique de **Ir02** avec une stabilisation de p53 augmentée en trois heures de traitement. Nous avons également pu démontrer que RIP1 est nécessaire pour cette activation de p53. La voie du PIDDosome semble donc rapidement sollicitée en réponse à **Ir02** dans la lignée hTERT-RPE1.

Cependant, plusieurs éléments restent à vérifier (Schéma 22, rouge) pour valider cette hypothèse. Par la suite, nous explorerons le statut de MDM2 en comparaison avec l'activation de p53 et de la pro-caspase-2. Il est également nécessaire de déterminer si la réponse anti-oxydante est bien mise en place, par l'activation des gènes cibles de Nrf2 comme Keap1.

L'étude de la réactivité de **Ir02** par spectrométrie de masse nous a permis de démontrer que ce complexe est capable de former des adduits covalents sur les protéines. Différents substrats modélisant la chaîne latérale d'acides aminés, en particulier ceux possédant un atome S ou N donneur (Met, Cys, His, Lys) interagissent avec le complexe en milieu aqueux via un échange de ligand observé par spectrométrie de masse. Cette propriété intrinsèque aux complexes semi-sandwich explique peut-être les dommages que les cellules doivent réparer. Elle indique également que **Ir02** pourrait directement interférer avec les senseurs du stress oxydant comme Keap1 et sera exploitée dans les prochains chapitres à cet effet.

Enfin, nous avons relevé que **Ir02** induit l'étalement des cellules traitées pendant de longues durées dans les lignées HeLa (clonogénicité) et hTERT-RPE1 (traitement chronique), ce phénotype n'a pas été exploré par manque de temps mais pourrait fournir des informations sur la toxicité du complexe à plus long terme, qui touche de façon similaire les modèles de cellules normales et tumorales. En somme, il est difficile de trouver des modèles convenables de lignées cellulaires saines puisque les lignées immortalisées et les fibroblastes présentent un taux de prolifération élevé. La prochaine étape pour démontrer une sélectivité de la toxicité de **Ir02** serait d'envisager des tests *in-vivo*.

## Partie expérimentale

**Cell Culture.** HeLa and HCT116 cell lines were previously used and described in Chapter 1. hTERT-RPE1 cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and cultured in DMEM/F12. Huh-7 and PLC/PRF/5 human hepatocellular carcinoma cell lines were obtained from ATCC, cultured in Minimum Essential Medium (MEM) supplemented with 1 % sodium pyruvate and 1 % non-essential amino acids (Gibco, Invitrogen®). All media were supplemented with GlutaMAX® (Gibco, Invitrogen®), antibiotics (penicillin, streptomycin) and 10 % fetal bovine serum, and were later referred to as complete medium. Inhibitors used: KU-55933 competitive ATM kinase inhibitor (abcam® ab120637), CHIR-124 (abcam® ab273615), Nec-1s (Santa Cruz), Z-VAD-FMK (Merck® Millipore), N-Acetyl Cysteine (Merck® Millipore).

**ICP-OES analysis.** Briefly, 10 mm culture dishes were seeded with 250,000 HeLa or hTERT-RPE1 cells in complete medium. After two days, each dish was washed with warm PBS and cells were incubated with 10 mL of serum-free medium containing 5 or 10  $\mu\text{M}$  Ir02 for 30 min. Supernatants were collected, cells were washed twice with PBS and harvested. Cell samples were digested ca. 1 h in ultrasonic bath with concentrated  $\text{HNO}_3$  and 1% Triton X-100, and the extract was diluted with water to a final volume of 5 mL and 2%  $\text{HNO}_3$ . Samples were filtered through 0.2  $\mu\text{m}$  nylon filters and analyzed by ICP-OES for content in iridium (212.681 nm) using an ICP-OES 5100 SVDV Agilent analyser. Iridium calibration standards (8, 16, 31, 63, 125, 250, 500 and 1000 ppb in 2%  $\text{HNO}_3$ ) were prepared using a 10 ppm PlasmaCAL SCP Science® multi-element stock solution. Measurements were performed in triplicate.

**Transfection with LifeAct plasmid.** HeLa and hTERT-RPE1 cells were seeded at 50,000 cells per well in a 24-wells plate. The medium was replaced with 1 mL of antibiotic-free media for transfection with the LifeAct-GFP Plasmid (4.5  $\mu\text{g}$  DNA + 9  $\mu\text{L}$  P3000 reagent in 450  $\mu\text{L}$  Opti-MEM transfection medium containing 3% Lipofectamine 3000, 50  $\mu\text{L}$  / well).

**Immunofluorescence assays.** HeLa, HCT116 or hTERT-RPE1 cells were seeded on 14 mm coverslips (25,000 cells per cm<sup>2</sup>) and incubated in complete medium at 37°C 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere. After 24 h, cells were treated with the indicated drug or the DMSO vehicle at the indicated time. Cells were fixed with 4% PFA in PBS and washed 3 times with PBS. Samples were blocked and permeabilized using 3% BSA and 0.5 % Triton X-100 in PBS for 30 min at rt. Coverslips were incubated overnight with a primary antibody (1:100) in PBS 3 % BSA at 4°C, then for 1 h at rt with a fluorescent secondary antibody (Invitrogen® goat anti-rabbit Ig-G (H+L) Alexa Fluor 488 1:500 in PBS) and finally with 1 µg/mL DAPI in PBS for 10 min. Coverslips were mounted using Invitrogen® Prolong Diamond mounting medium. Primary antibodies: rabbit anti-phospho-H2Ax (Ser 139) (Upstate Technology #05-636 clone JBW301), rabbit anti-LAMP1 (Cell Signaling® #9091), Mouse anti-Cytochrome c (6H2.B4) (Cell Signaling® #12963). For the mitosis immunofluorescence assay, 14mm coverslips (thickness #1.5) were coated with Matrigel®, 20 µg/mL for 1 h at 37°C. HeLa cells were seeded in complete medium and treated with 5 µM iridium drugs for 16 h. All wells were washed twice with warm PBS and cells were fixed with 4 % PFA in PBS (15 min at r.t.) and washed five times. Samples were permeabilized using 0.1 % Triton X-100 in PBS for 5 min and blocked using 3 % BSA in PBS for 1 h. Coverslips were incubated for 2 h at r.t. with a mouse anti-alpha-tubulin (Cell Signaling® #3873 1:500, 3 % BSA and 0.1 % Tween-20 in PBS) and washed three times. Finally, coverslips were incubated in the same blocking solution with the secondary antibody (Goat-anti-Mouse Alexa488-linked IgG 1:500), Phalloïdine-Rhodamine (140 nM) and DAPI (1µg/mL) for 1 h. Samples were washed with PBS and mounted using Vectashield® Vibrance mounting medium.

**Microscopy.** Time-lapse phase contrast and fluorescence microscopy were performed using an Olympus IX83 inverted microscope with 40x objective. Confocal images were acquired using a Leica SP5 inverted confocal microscope with 63x immersive objective and 405 (DAPI) and 488 (Alexa488) argon laser excitations.

**Time-lapse videomicroscopy.** After treatment with **Ir02** at the indicated concentration and/or transfection with the LifeAct® plasmid, the cell behaviour was monitored in real time by differential phase contrast or epifluorescence videomicroscopy using an Olympus IX83 inverted microscope with 20x or 40x objective. Time-lapse movies were processed using Fiji.

**Clonogenicity.** Three 6-wells plates were seeded at 400 c/well in 2 mL of complete HeLa medium, the next day (D2) cells were treated with **Ir02** at 1.25, 2.5 or 5  $\mu$ M or the corresponding amounts of DMSO vehicle in triplicate. Final serum concentration was 5 %. At D4, control colonies were of about 8 to 32 cells, cells treated with 5  $\mu$ M **Ir02** didn't form colonies, 2.5  $\mu$ M **Ir02** colonies were of about 2 to 8 cells and 1.2  $\mu$ M **Ir02** colonies were of about 4 to 16 cells. At D5, cells were fixed in 1 mL of PFA 4%/PBS and stained for 30 min at r.t. with 1 mL Crystal Violet 0,05% in PBS. Wells were washed three times with PBS and dried. In a second experiment, a 35mm dish was first seeded with 80 000 cells in 2 mL of complete HeLa medium. The next day, cells were exposed to 5  $\mu$ M Ir02 for 24 h in medium containing 5% FBS. The dish was washed three time with PBS and adherent cells were trypsinized and pelleted. Afterwards, the clonogenicity experiment was reproduced using this cell sample or untreated cells.

**RTCA.** xCELLigence E-plates were calibrated for a baseline definition and cells were seeded at 2,000 cells per well in 100  $\mu$ L complete medium. After 24 h (48 h for HCT116), drugs were added at the indicated concentration in triplicate and the cell index was measured over a period of 72 h (Real Time Cell Analyzer, Agilent). **Ir02** co-treatments with Nec-1 (38.6  $\mu$ M), Z-VAD-FMK (21.5  $\mu$ M), CHIR-124 (500 nM), Ku55933 (10  $\mu$ M), N-acetylcysteine (5 mM) were performed in the same conditions.

**Western blot analyses.** Briefly,  $10^6$  cells were seeded in 60 mm culture dishes, incubated for 16 h in complete medium at 37°C 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere and washed twice with PBS prior to **Ir02** treatment in serum-free medium at the indicated concentration and time. Co-treatments with Nec-1 (38.6  $\mu$ M), Z-VAD-FMK (21.5  $\mu$ M) and CHIR-124 (500 nM) were performed at the indicated time. Cells exposed to 0.1% DMSO or non-treated cells were used as negative controls. Cells were harvested in cold PBS and lysed in RIPA buffer, supplemented with protease and phosphatase inhibitors. Protein titration was carried out using the microBCA assay kit (Pierce). Samples were analyzed by SDS-PAGE on gradient (4-20%, BioRad) or home-made polyacrylamide gels and transferred onto 0.2  $\mu$ m nitrocellulose membranes. Proteins were stained with Ponceau S. Membranes were blocked with 5% BSA in TBS-t (Tris Buffered Saline 0.1 % Tween-20) and incubated with a primary antibody (1:1000) overnight at 4°C, a HRP-linked secondary antibody (1:10'000 in TBS-t) for 1 h at rt and the BioRad® ECL (luminol) detection kit.

Primary antibodies : Rabbit anti-phospho-eIF2 $\alpha$  (Ser51) (Cell Signaling® #9721). Rabbit-anti-eIF2 $\alpha$  (Cell Signaling® #9722). Rabbit anti-Cleaved caspase-3 (Asp175) (5A1E) (Cell Signaling® #9664). Mouse anti- $\beta$ -Actin (Cell Signaling® #4967). Rabbit anti-caspase-9 (Cell Signaling® #9502), Rabbit anti-PARP (Cell Signaling® #9542), Rabbit anti-p21 (Santa Cruz® SC-397), Rabbit anti-caspase-2/p32/p18 (Proteintech® 10436-1-AP), Mouse anti-p53 (Proteintech 60283-2-Ig), Rabbit anti-Nrf2 (Abcam® ab137550).

Secondary antibodies : HRP-linked anti-Mouse IgG (Cell Signaling® #7076). HRP-linked anti-Rabbit IgG (Cell Signaling® #7074)

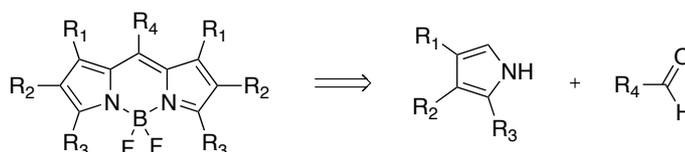
**Mass spectrometry analysis.** ESI-MS experiments were carried out using a LTQ-Orbitrap XL from Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) and operated in positive ionization mode, with a spray voltage at 3.6 kV. Sheath and auxiliary gas were set at a flow rate of 45 and 15 arbitrary units (a.u.), respectively. Applied voltages were 20 and 70 V for the ion transfer capillary and the tube lens, respectively. The ion transfer capillary was held at 275°C. Detection was achieved in the Orbitrap with a resolution set to 100,000 (at m/z 400) and a m/z range between 200-1000 in profile mode. Spectrum was analyzed using the acquisition software XCalibur 2.1 (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). The automatic gain control (AGC) allowed accumulation of up to  $2 \cdot 10^5$  ions for FTMS scans, Maximum injection time was set to 500 ms and 1  $\mu$ scan was acquired. 5 or 20  $\mu$ L were injected using a Thermo Finnigan Surveyor HPLC system (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) with a continuous infusion of methanol or methanol/water mixture at 100  $\mu$ L/min.

# Chapitre 3. Conception de métallo-drogues fluorescentes

## Introduction

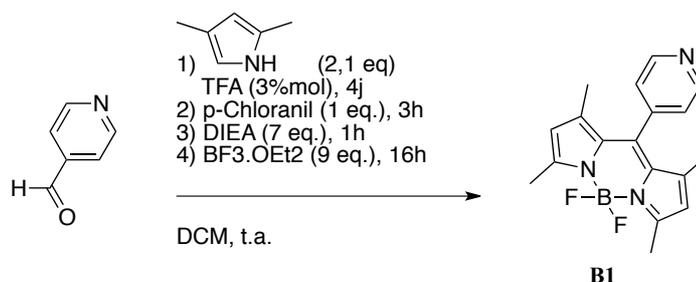
### 1. Fluorophores de type BODIPY

Les BODIPY (difluoro-bora-diaza-indacène) sont l'un des motifs fluorescents les plus utilisés pour l'imagerie cellulaire, appréciés pour leurs hauts rendements quantiques et des bandes d'absorption et de fluorescence étroites. Il est aisé de moduler leurs propriétés optiques en faisant varier les substituants du cœur aromatique R<sub>1</sub>-R<sub>4</sub> (Schéma 23). Dans la littérature, ils sont généralement obtenus par condensation d'un aldéhyde avec deux équivalents de pyrrole, cette réaction est plus efficace avec des aldéhydes aromatiques.



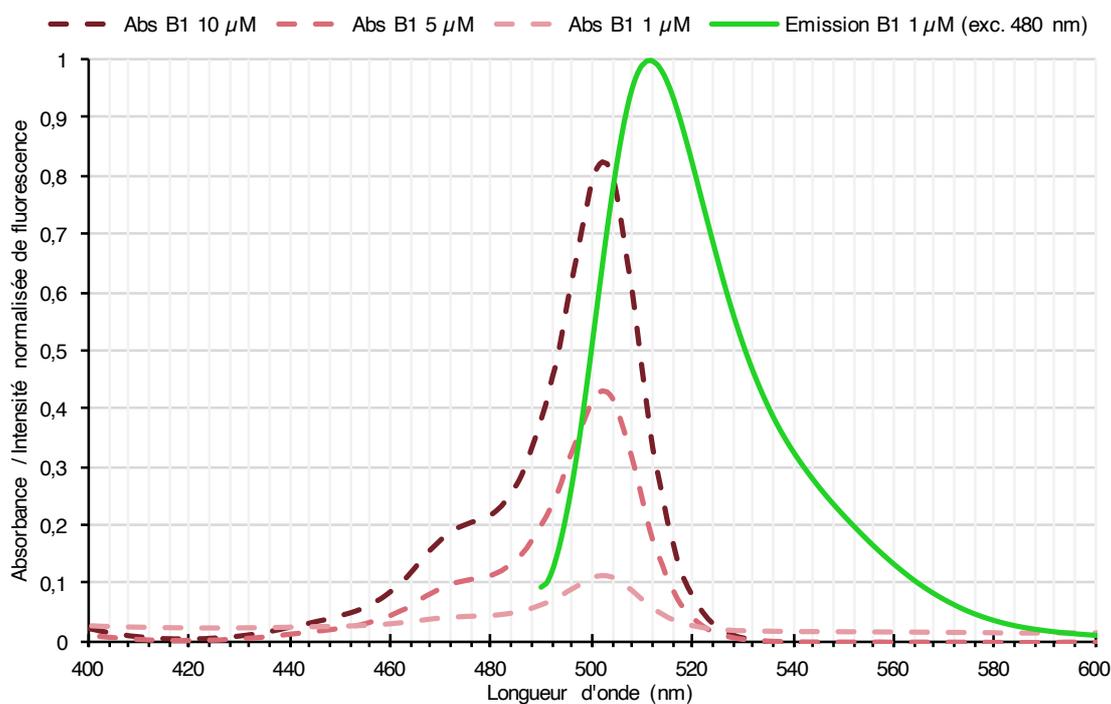
**Schéma 23.** Schéma rétrosynthétique pour l'accès aux BODIPY à partir d'un aldéhyde

En présence d'une base, l'oxydation du dipyrrométhane intermédiaire aromatisé la structure et un excès de BF<sub>3</sub>.OEt<sub>2</sub> permet de former le difluoro-bora-diaza-indacène.<sup>[136]</sup> Les rendements obtenus lors de la synthèse et pour toute réaction impliquant un hétérocycle BODIPY sont très souvent modestes. En effet, de nombreux produits de dégradation sont générés lors de la réaction ou durant une purification classique sur gel de silice. Sous forme pure, les dérivés BODIPY sont des solides d'une couleur intense, et leurs cristaux comportent généralement des reflets proches d'une couleur complémentaire.



**Schéma 24.** Synthèse de **B1**, un *meso*-4-pyridyl-BODIPY émettant une fluorescence verte

Les composés BODIPY possèdent un coefficient d'extinction molaire très élevé (typiquement  $\epsilon \geq 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). La bande principale d'absorption correspond à une transition 0-0  $S_0 \rightarrow S_1$  ( $\pi-\pi^*$ ) comprenant un épaulement de haute énergie assigné à la translation vibrationnelle 0-1.<sup>[137]</sup> Dans la figure suivante, **B1** est excité à 480 nm dans la zone de cet épaulement.



**Figure 56.** Spectres d'absorption et d'émission de **B1** dans le méthanol

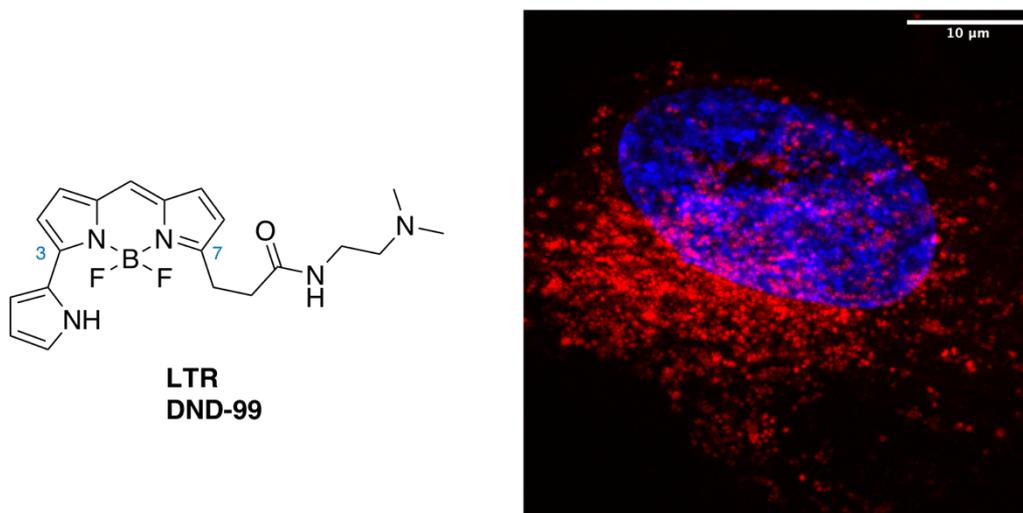
La différence entre les maxima d'absorption et d'émission d'un fluorophore, exprimée en nm ou  $\text{cm}^{-1}$ , s'appelle le déplacement de Stokes. Cette valeur est d'une dizaine de nanomètres pour la plupart des dérivés BODIPY, un faible déplacement de Stokes expliquant qu'ils présentent une intense couleur complémentaire à celle de leur fluorescence. Une autre caractéristique spectrale des dérivés BODIPY est de posséder une bande fine d'émission ce qui facilite leur emploi en microscopie, notamment en combinaison avec d'autres marqueurs fluorescents. C'est le cas de **B1**, un solide rouge obtenu avec un rendement de 22 %, possédant un coefficient d'extinction molaire de  $84\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  dans le méthanol à 502 nm et une présentant bande d'émission dans le vert autour de 500-540 nm (Figure 56).

En principe, les propriétés spectrales des BODIPY les plus classiques comme **B1** sont insensibles aux variations de pH. Cependant le BODIPY est sensible à la viscosité du milieu et cette sensibilité peut être aisément modulée par la nature du substituant en *méso*.<sup>[138]</sup> En effet,

par adjonction de substituants fonctionnels les BODIPY peuvent acquérir des propriétés intéressantes pour l'imagerie de fluorescence sur des échantillons biologiques.<sup>[139,140]</sup> Deux exemples commerciaux de cette stratégie seront présentés par la suite.

## 2. Composés BODIPY utilisés en biologie

Le LysoTracker® Red DND-99 (LTR) est un BODIPY comportant un groupement pyrrole supplémentaire en position 3 qui déplace ses bandes d'absorption et d'émission vers le rouge (au-delà de 590 nm). Ce BODIPY est aussi lié à une base faible en position 7 qui n'est que partiellement protonée à pH neutre. Cette fonction permet son accumulation dans les compartiments acides comme les lysosomes et les endosomes tardifs. Une image d'une cellule HeLa colorée au LTR est présentée ci-dessous par projection maximale de 47 tranches confocales de 210 nm.

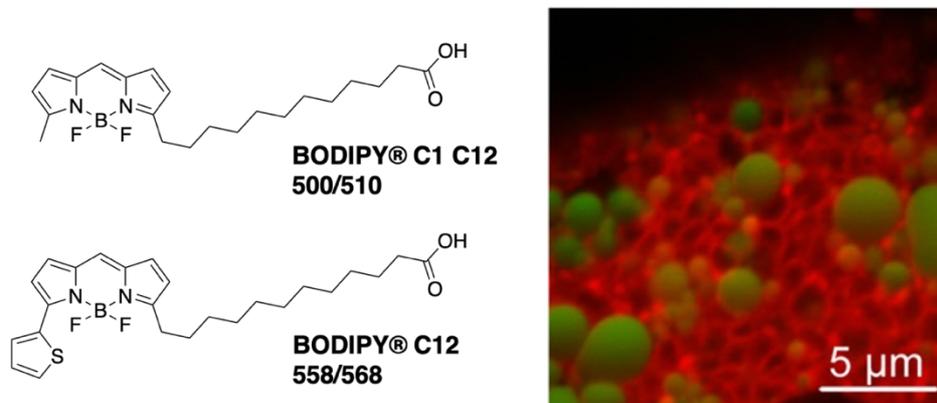


**Figure 57.** Visualisation des compartiments acides (lysosome, endosomes tardifs) grâce au LTR

Structure du LTR et projection de 47 tranches confocales réalisées sur une cellule HeLa vivante colorée au LTR (50 nM, 30 min, rouge) et Hoechst 33342 (bleu)

Le BODIPY-C12 existe sous forme émettant soit dans le vert (500/510 nm), soit dans le rouge (558/568 nm). Ces deux fluorophores comportent une chaîne alkyle en position 7, modélisant un lipide. En pratique, l'administration de ce composé s'effectue en réalisant une émulsion dans le SVF avec de l'acide oléique (AO) induisant la formation de gouttelettes lipidiques, puis en supplémentant le milieu de culture des cellules avec ce SVF dopé. Le BODIPY-C12 et l'acide oléique sont assimilés par endocytose, ils suivent le chemin métabolique des lipides neutres, en passant par le réticulum endoplasmique (RE). Afin d'étudier la dynamique des gouttelettes lipidiques, des cellules sont marquées dans un premier temps par

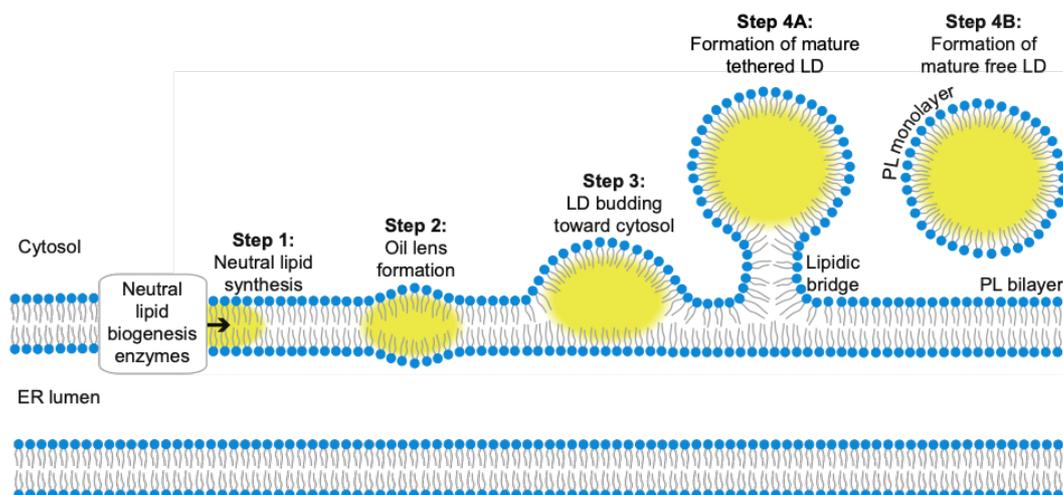
le BODIPY-C12 vert durant une nuit pour marquer les gouttelettes préformées (Figure 58, vésicules vertes). Ensuite, les cellules sont incubées pendant 15 min avec une nouvelle émulsion contenant cette fois le BODIPY-C12 rouge, qui se distribue principalement dans RE comme le montre le marquage de structures réticulées (Figure 58, rouge).



**Figure 58.** Marquage de gouttelettes lipidiques préformées (vert) et naissantes (rouges)<sup>[141]</sup>

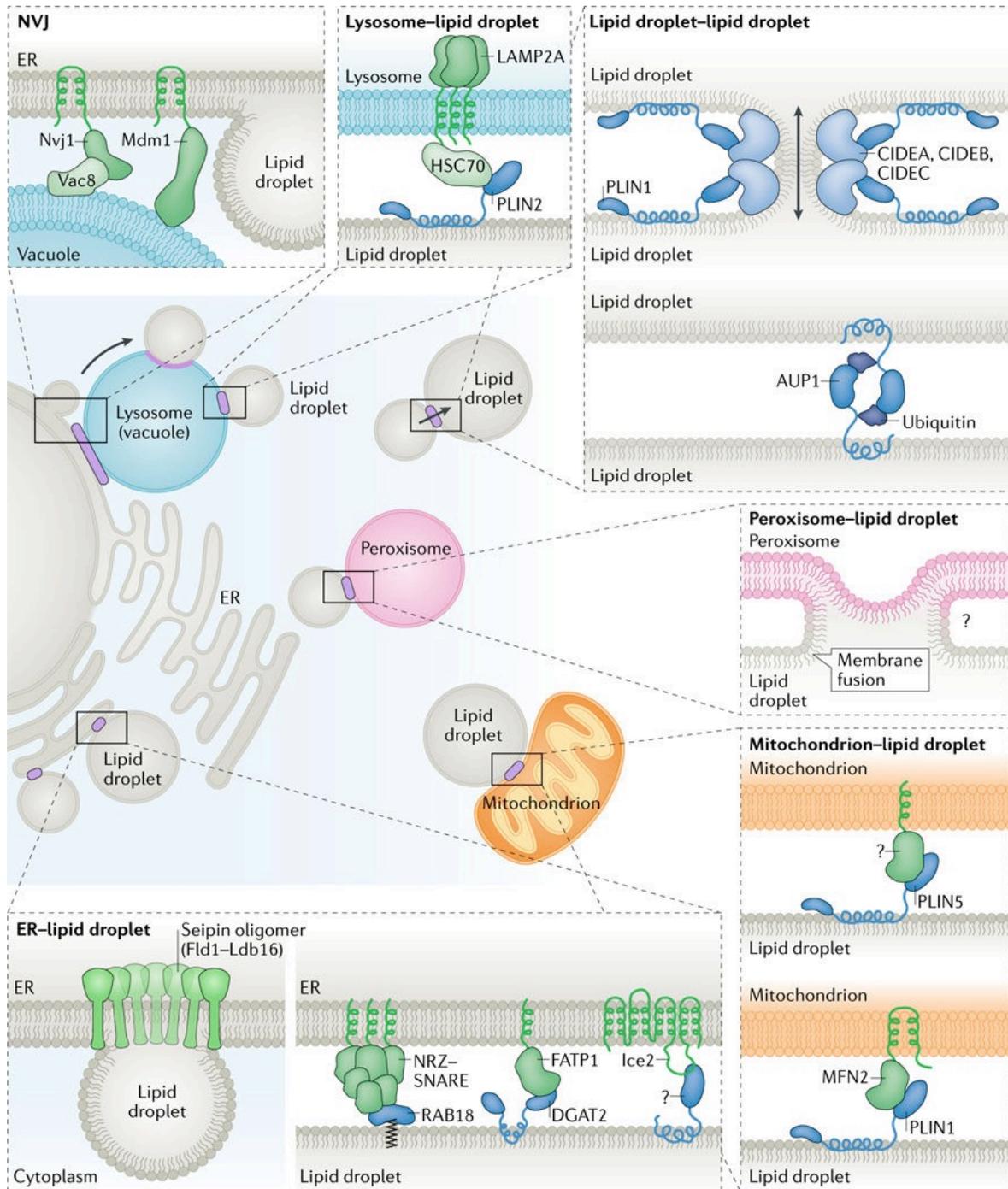
### 3. Traffic membranaire intracellulaire

La biogénèse des gouttelettes lipidiques (GL) commence par la synthèse de lipides neutres (Figure 59, jaune) qui sont accumulés entre les couches phospholipidiques de la membrane du RE (bleu). Ces lipides neutres forment une « *oil lens* » qui bourgeonne depuis la membrane pour former une GL mature recouverte d'une monocouche de phospholipides. Les GL peuvent rester connectées à la membrane du RE par un pont lipidique ou se détacher complètement, on parle alors de GL matures.



**Figure 59.** Biogénèse des gouttelettes lipidiques depuis la membrane du réticulum endoplasmique

Les GL ont une monocouche lipidique à leur surface avec quelques protéines de surface (périlipines), elles contiennent des lipides neutres : triglycérides et dérivés du cholestérol. De nombreux travaux récents ont mis en évidence que les GL sont un organe dynamique dont la fonction est de délivrer des lipides à de nombreux organites acteurs du métabolisme cellulaire, notamment le lysosome et la mitochondrie.<sup>[142]</sup>

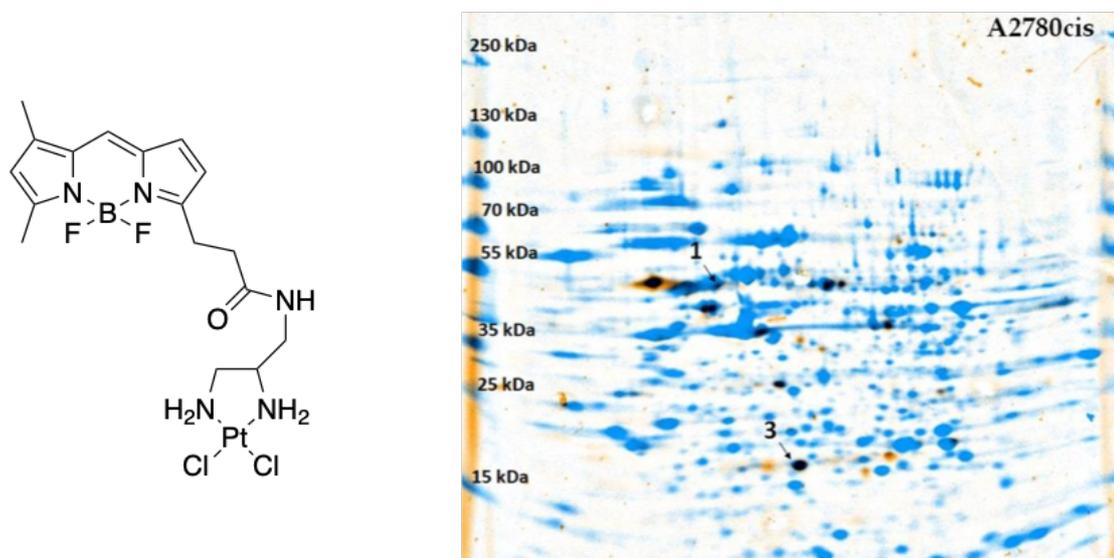


**Figure 60.** Contacts entre les gouttelettes lipidiques et les autres organites<sup>[142]</sup>

Elles peuvent être produites dans le cadre d'un stress du RE, servant de chaperonnes cellulaires pour des protéines mal repliées ou de réservoirs pour des lipides ou protéines endommagés.<sup>[143]</sup> Une étude rapporte par exemple la fusion entre les GL et le lysosome observée par vidéo-microscopie en employant un LysoTracker et un BODIPY C12 dans des hépatocytes de souris. Cette interaction a été également observée par microscopie électronique, montrant plusieurs exemples de gouttelettes lipidiques qui se déversent dans des vésicules du lysosome lors d'un processus lié à l'autophagie.<sup>[144]</sup>

#### 4. Études de la fluorescence de métallos-drogues *in cellulo*

Pour ce chapitre, nous nous sommes focalisés sur l'adjonction d'entités fluorescentes de type BODIPY sur des complexes semi-sandwich à des fins d'imagerie et d'analyse de leur mécanisme d'action. L'objectif de cette stratégie est d'obtenir des informations temporelles et spatiales sur le devenir intracellulaire et l'accumulation de ces métallos-drogues.<sup>[145]</sup> Par exemple, un 4-pyridyl-*meso*-BODIPY a déjà été introduit comme ligand labile du CDDP et montre une colocalisation avec les mitochondries.<sup>[146]</sup> Cette démarche a aussi été employée pour explorer les interactions des complexes platineux avec des partenaires protéiques au moyen d'un dérivé du CDDP comportant un ligand chélatant diamino sur lequel est greffé un BODIPY (Figure 61).



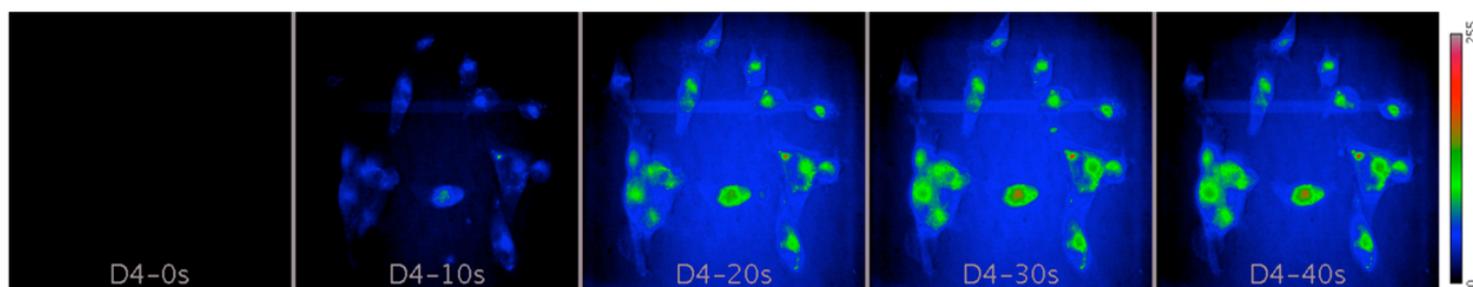
Structure du BODIPY-Cisplatine . Superposition de l'image de fluorescence (orange) et de la coloration des protéines totales (bleu) de gels après électrophorèse 2D de 20  $\mu$ g de fraction cytoplasmique de cellules A2780cis traitées au BODIPY-CDDP. Identification des spots par spectrométrie de masse : Vimentine (1) ; GSTP1 (3).

**Figure 61.** Détection et identification des partenaires protéiques du BODIPY-Cisplatine<sup>[147]</sup>

L'analyse des protéines présentée ci-dessus a permis aux auteurs d'identifier des cibles différentes de ce complexe fluorescent en fonction de la lignée. Par exemple, seule la lignée A2780 résistante au CDDP (A2780cis) présente des adduits sur la Glutathion S Transférase GSTP1, indiquant qu'elle est impliquée dans le mécanisme de résistance au Cisplatine.

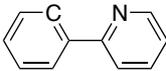
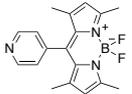
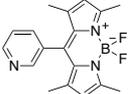
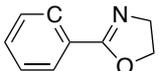
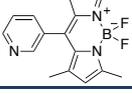
Comme la plupart des complexes organométalliques, les complexes d'iridium à ligand arène sont dépourvus de propriétés de luminescence. Afin d'étudier leur internalisation et leur distribution intracellulaire, il convient donc d'ajouter une entité fluorescente à la structure. À ce titre, des complexes semi-sandwich cationiques ou neutres ont été greffés avec des rhodamines B et G.<sup>[148-150]</sup> Cependant l'interprétation des images de microscopie obtenues peut être ambiguë, notamment à cause de la grande dépendance des propriétés spectrales des rhodamines aux variations de pH ou à la présence d'ions métalliques.<sup>[151]</sup>

Notre équipe a rapporté en 2017 le remplacement du ligand chlorido de **Ir12** par le BODIPY **B1**, pour donner le complexe **Ir12-B1**.<sup>[50]</sup> Les structures cristallographiques de ce complexe et son analogue comportant un ligand meso-3-pyridyl-BODIPY ont été déterminées. Les rendements quantiques des complexes fluorescents rapportés dans cette publication ont été déterminés dans le méthanol, ils sont satisfaisants pour cette application (**B1** : 0,46, **Ir12-B1** : 0,14). **Ir12-B1** a permis de fournir une preuve de concept en microscopie sur l'internalisation de ce type de conjugué iridium-BODIPY.



**Figure 62.** Suivi en temps réel de l'internalisation de **Ir12-B1** dans des cellules MDA-MB231<sup>[50]</sup>

D'après la figure 62, la fluorescence du complexe **Ir12-B1** apparaît dans les cellules quelques secondes après l'ajout du composé à une concentration de seulement 1  $\mu\text{M}$ . L'internalisation du composé dans les cellules est donc extrêmement rapide, indiquant qu'il est capable de diffuser à travers leur membrane plasmique puis de s'accumuler. De plus, l'activité cytotoxique des complexes sur des lignées tumorales a été augmentée par rapport à leurs analogues neutres (Tableau 7).

Complexe	Ligand C^N	Ligand Z	Lignée Cellulaire	IC <sub>50</sub> (μM)	Référence
<b>Ir12</b>		Cl	A2780	<b>14</b>	27
<b>Ir12-B1</b>			A2780	<b>0,56</b>	27
			MDA-MB231	<b>4,12</b>	<i>non publié</i>
<b>Ir12-B1'</b>			A2780	<b>0,59</b>	<i>non publié</i>
			MDA-MB231	<b>0,52</b>	27
<b>Ir01</b>			Cl	A2780	<b>10,2</b>
	MDA-MB231			<b>&gt;10</b>	<i>non publié</i>
<b>Ir01-B1'</b>			MDA-MB231	<b>6,23</b>	<i>non publié</i>

**Tableau 7.** Effet de l'ajout d'un ligand pyridyl-BODIPY sur la cytotoxicité des complexes **Ir01** et **Ir12**

## Résultats et Discussion

### 1. Synthèse et caractérisation

#### 1.1. Synthèse de complexes d'iridium semi-sandwich fluorescents

##### 1.1.1. Adjonction du fluorophore sur le ligand labile

Comme nous venons de le voir, nous disposons de plusieurs complexes avec un fluorophore pyridyl-BODIPY comme ligand Z : **Ir01-B1**, **Ir01-B1'**, **Ir12-B1**, **Ir12-B1'**. Ces travaux préliminaires ont permis d'établir une preuve de concept en vidéo-microscopie sur la vitesse d'internalisation rapide de **Ir12-B1**.<sup>[50]</sup> De plus, ce complexe présente une bonne stabilité dans le DMSO avec un temps de demi-vie de 18 h. Afin de compléter la bibliothèque de ces complexes avec les dérivés de la série (vinypy), un échange de ligand a été réalisé sur le complexe **IrV2** pour donner **IrV2-B1** avec un excellent rendement.

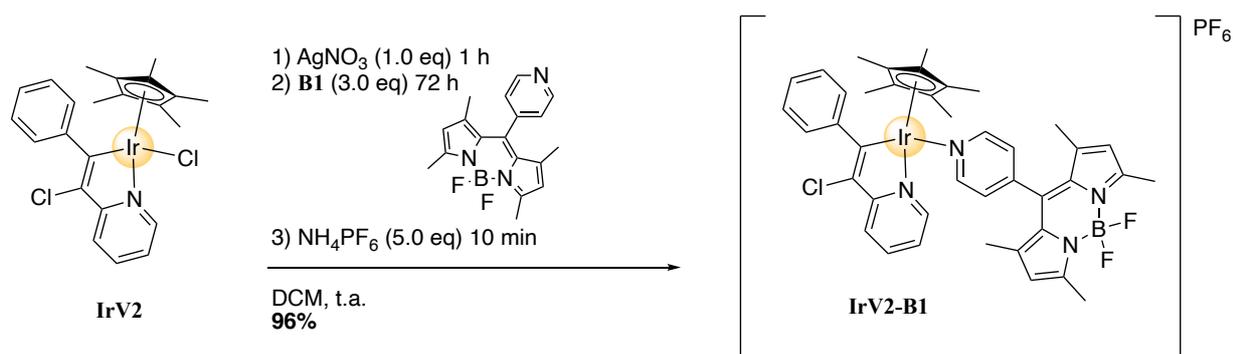
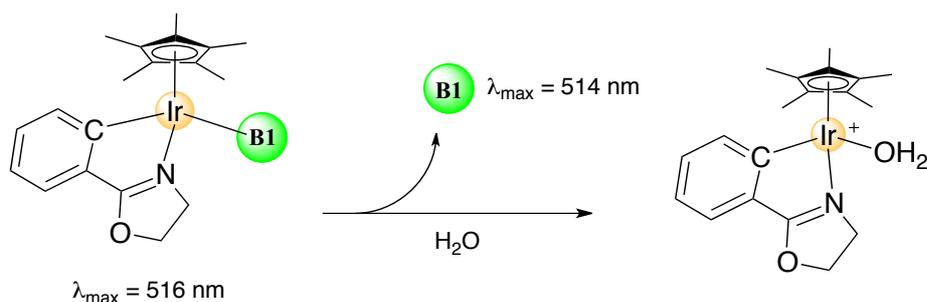


Schéma 25. Synthèse de **IrV2-B1** par abstraction du ligand chlorido

L'insertion du fluorophore est réalisée par échange de ligand. Le complexe est d'abord cationisé par le nitrate d'argent puis laissé plusieurs jours en présence du ligand pyridyl-BODIPY. Une métathèse d'anions est ensuite effectuée afin de le rendre plus lipophile par addition d'hexafluorophosphate d'ammonium. Enfin, le complexe comportant un ligand échangé est purifié par transfert de solvants.

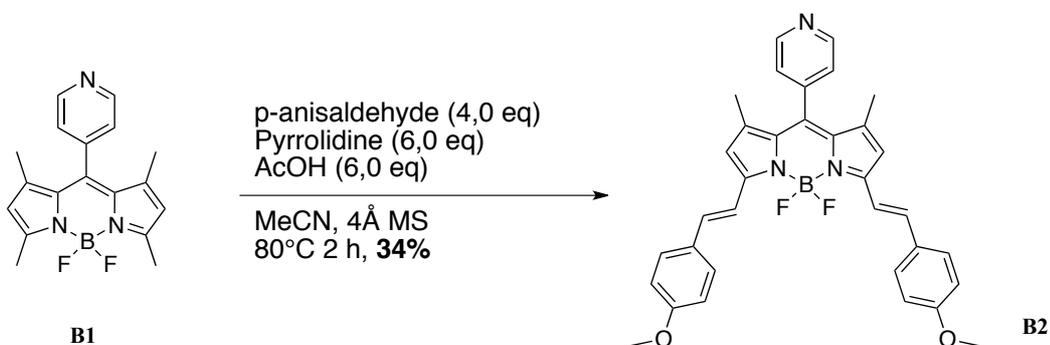
Nous souhaitons initialement utiliser ces complexes et leurs propriétés photophysiques pour obtenir des informations sur la dissociation du ligand labile *in cellulo*. En effet, l'effet de conjugaison au métal peut générer un décalage de la longueur d'onde du maximum d'émission. D'après une mesure d'échange par RMN dans le DMSO deutéré, nous avons déterminé que le complexe **Ir01-B1**, comportant un groupement chélatant (phox) est le moins stable des trois congénères, avec un  $t_{1/2}^{\text{DMSO}} < 1$  h.



**Schéma 26.** Dissociation du ligand de **Ir01-B1** par aquation

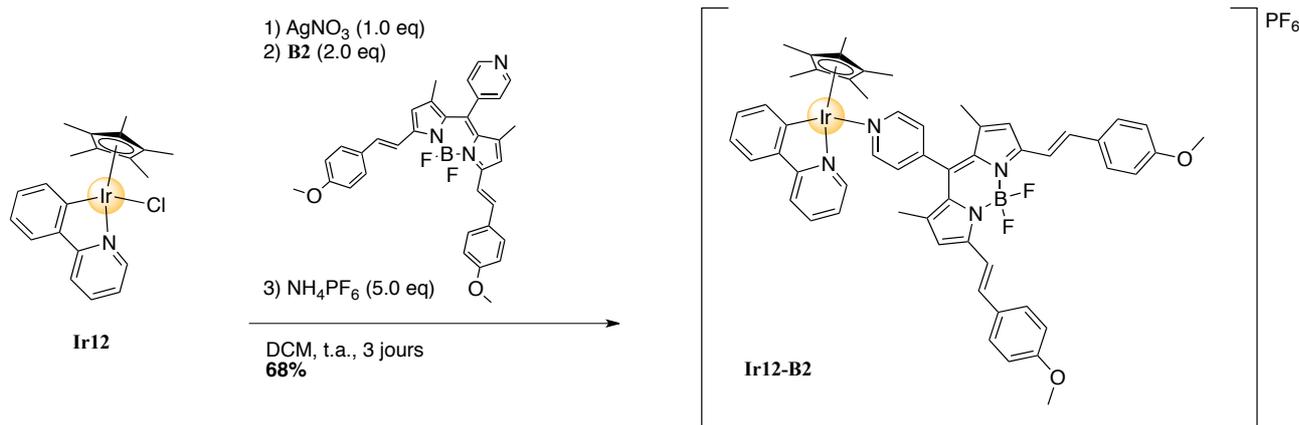
Lors de l'aquation du complexe **Ir01-B1**, nous avons pu mettre en évidence que le complexe **Ir01-B1** et le ligand **B1** ne montraient aucune différence de longueur d'onde au maximum d'émission (environ 1 nm). Ce faible déplacement est donc insuffisant pour avoir une information sur la dissociation du ligand.

Afin de décaler la longueur d'onde d'émission des deux entités vers le rouge, nous avons envisagé de construire un fluorophore comportant des groupements méthoxystyryle électrodonneurs. Ainsi, le BODIPY **B2** est obtenu à partir du BODIPY **B1** par une condensation de Knoevenagel sur les groupements méthyles les plus réactifs en présence d'un excès de para-anisaldéhyde (Schéma 27).



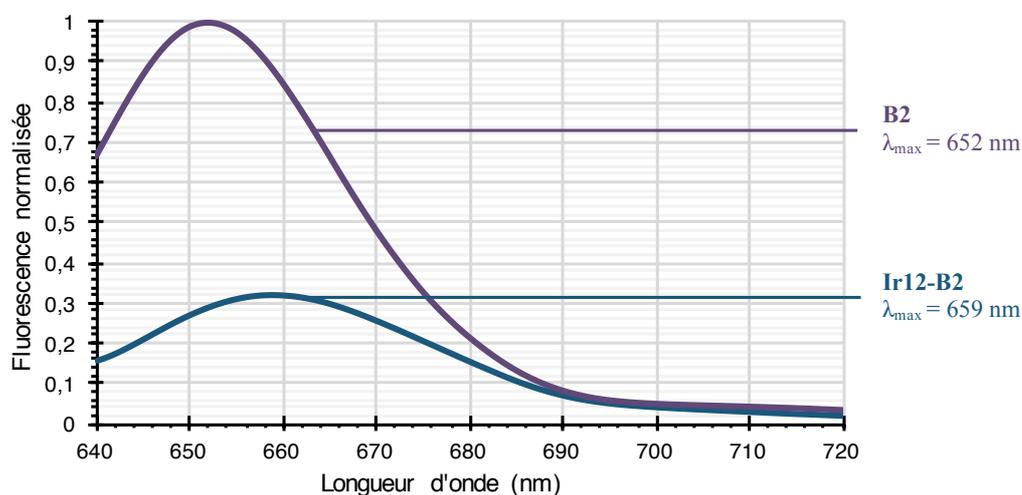
**Schéma 27.** Synthèse d'un BODIPY rouge-émetteur à partir de **B1**<sup>[152]</sup>

Puis **B2** a été complexé à l'iridium par échange de ligand sur le complexe **Ir12** selon la méthode décrite précédemment. **Ir12-B2** a été obtenu avec un rendement de 68% après 3 jours de réaction. Un rendement plus modeste que ceux obtenus lors des précédents échanges de ligand, qui pourrait s'expliquer par le fait que le ligand chlorido de **Ir12** est moins labile que celui des complexes (phox) **Ir01-10**.



**Schéma 28.** Échange du ligand chlorido de **Ir12** par **B2**

Le complexe **Ir12-B2** possède un poids moléculaire élevé, de 1188 g/mol et sa structure suggère qu'il est très lipophile. Experimentalement, sa solubilité s'est révélée limitée dans la plupart des solvants organiques avec une nette tendance à s'agréger, observée notamment dans le dichlorométhane. Néanmoins le ligand et le complexe sont émissifs dans l'acétone à une faible concentration de 1  $\mu\text{M}$ . En dépit de cela, la conjugaison du fluorophore avec l'Iridium a entraîné une diminution de l'intensité de fluorescence d'environ 30%. De surcroît, les bandes d'émission mesurées sont très larges et le décalage de longueur d'onde entre les maxima de **B2** et **Ir12-B2** reste faible.



**Figure 63.** Spectres de fluorescence de **B2** et **Ir12-B2** mesurés dans l'acétone (1  $\mu\text{M}$ , exc. 330 nm, 20 °C)

Afin de s'assurer que le fluorophore reste coordonné à l'iridium *in cellulo*, nous nous sommes tournés vers la synthèse de complexes comportant un fluorophore BODIPY sur le ligand chélatant C<sup>N</sup> pour la suite de ce projet.

## 1.1.2. Adjonction du fluorophore sur le ligand chélatant

### 1.1.2.1. Série (vinypy)

Les pro-ligands fluorescents de la série (vinypy) **B4**, **B4'** et **B5** sont obtenus par une réaction de couplage de Sonogashira de motifs BODIPY. La synthèse et la fonctionnalisation de ces espèces fluorescentes se révèle en pratique ardue car les procédures employées entraînent la formation de nombreux produits secondaires et produits de dégradation. Ainsi les étapes de purification sont généralement doublées. Quelques tentatives de couplage de Sonogashira ont été mises en œuvre pour obtenir **B4** à partir d'un para-bromophényl-BODIPY sans succès. En revanche, l'emploi d'un iodure d'aryle, moins désactivé que son homologue bromé, a permis d'obtenir le pro-ligand **B4**, toutefois avec un faible rendement global de 9% (Schéma 29).

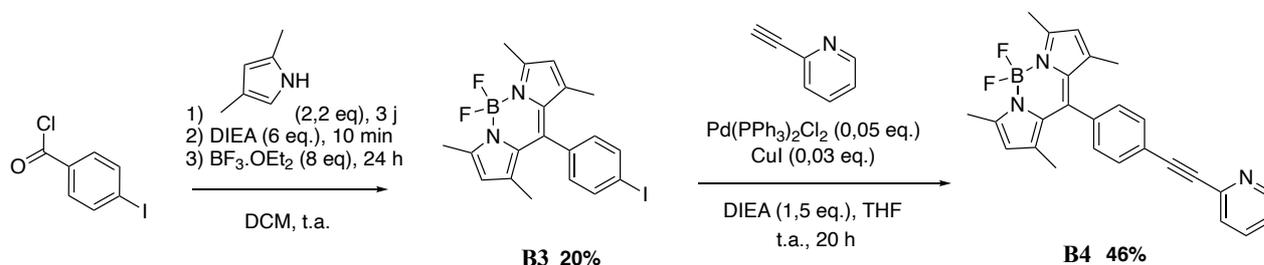


Schéma 29. Synthèse du pro-ligand 2-(4-BODIPY-phénylethynyl)pyridine **B4**

L'addition du dimère d'Iridium au pro-ligand **B4** à température ambiante fournit le complexe cyclométallé **IrB4** de façon quantitative (Schéma 30). Il a été constaté que le complexe **IrB4** s'agrège en solution aqueuse dès 10  $\mu\text{M}$ , un phénomène caractérisé par une coloration rose de la solution, qui sera étudié ensuite par spectroscopie. Par conséquent, son analogue *solvento* cationique a été isolé en utilisant la méthode décrite précédemment.

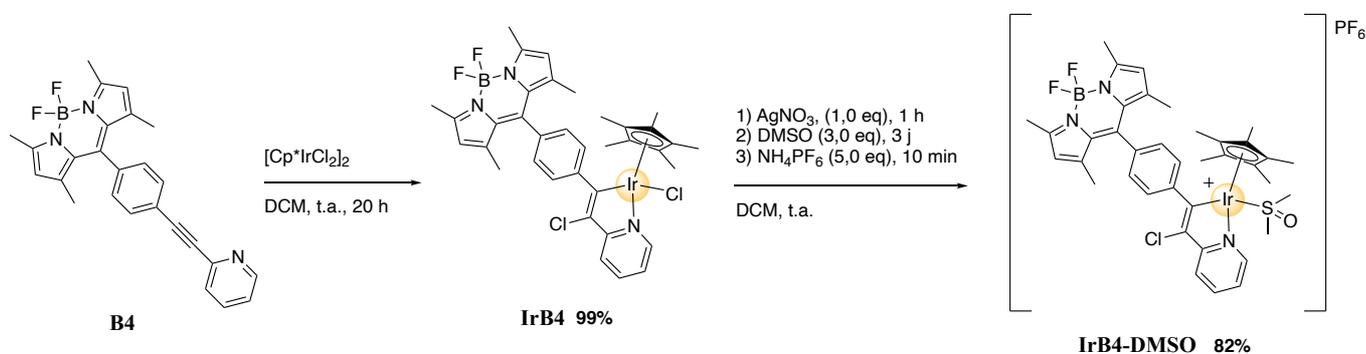


Schéma 30. Complexation du pro-ligand fluorescent **B4** et échange de ligand avec le DMSO

Le complexe **IrB4-DMSO** s'est révélé difficile à purifier. En effet, 0,3 équivalents de DMSO n'ont pas pu être ôtés du produit malgré quelques jours sous pression réduite. Il n'apparaît pas non plus comme un bon candidat pour être administré à des cellules et nous avons donc envisagé de synthétiser un complexe *aqua* par la suite.

Notamment, l'échange d'un ligand fluorido du bore par un ligand méthoxo a été rapporté comme favorisant les propriétés de solubilité de dérivés BODIPY, avec une émission de fluorescence exacerbée.<sup>[153]</sup> Cet échange de ligand sur l'atome de bore est donc réalisé au moyen de triflate de triméthylsilyle et d'un large excès de méthanol à partir du BODIPY **B4** (Schéma 31). La réaction est suivie par CCM et stoppée après 5 min afin de favoriser la formation du produit majoritaire mono-méthoxo **B5**.

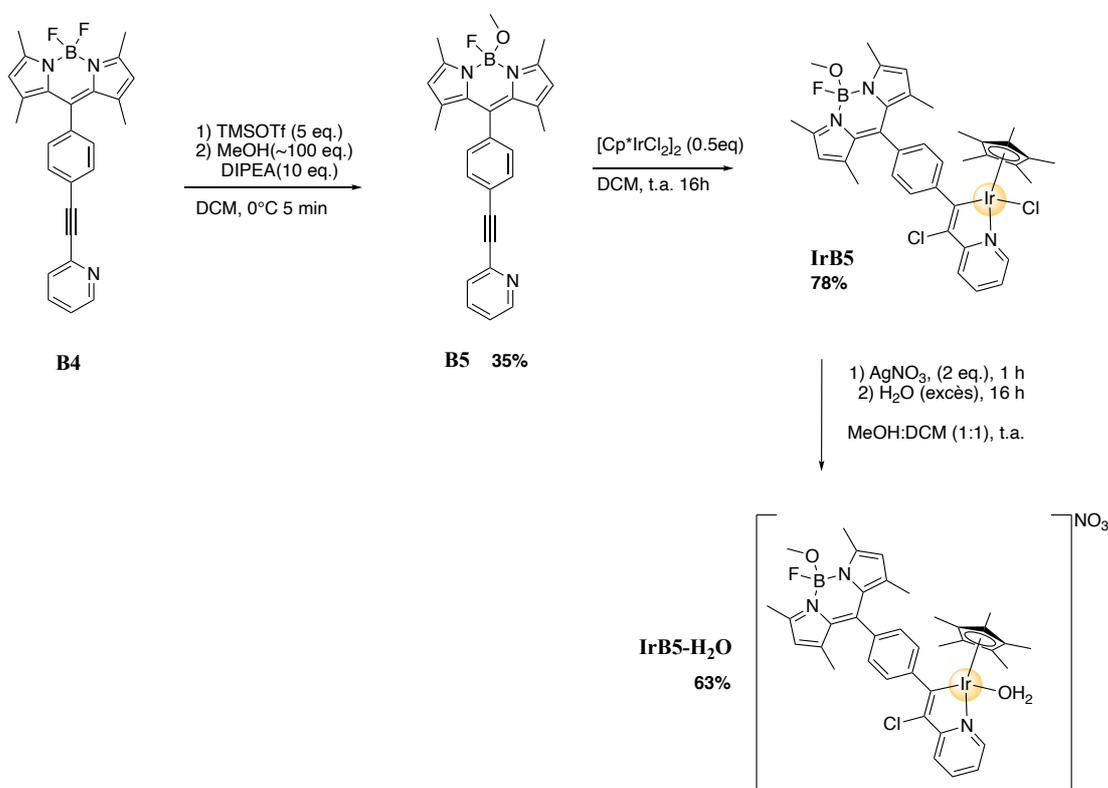
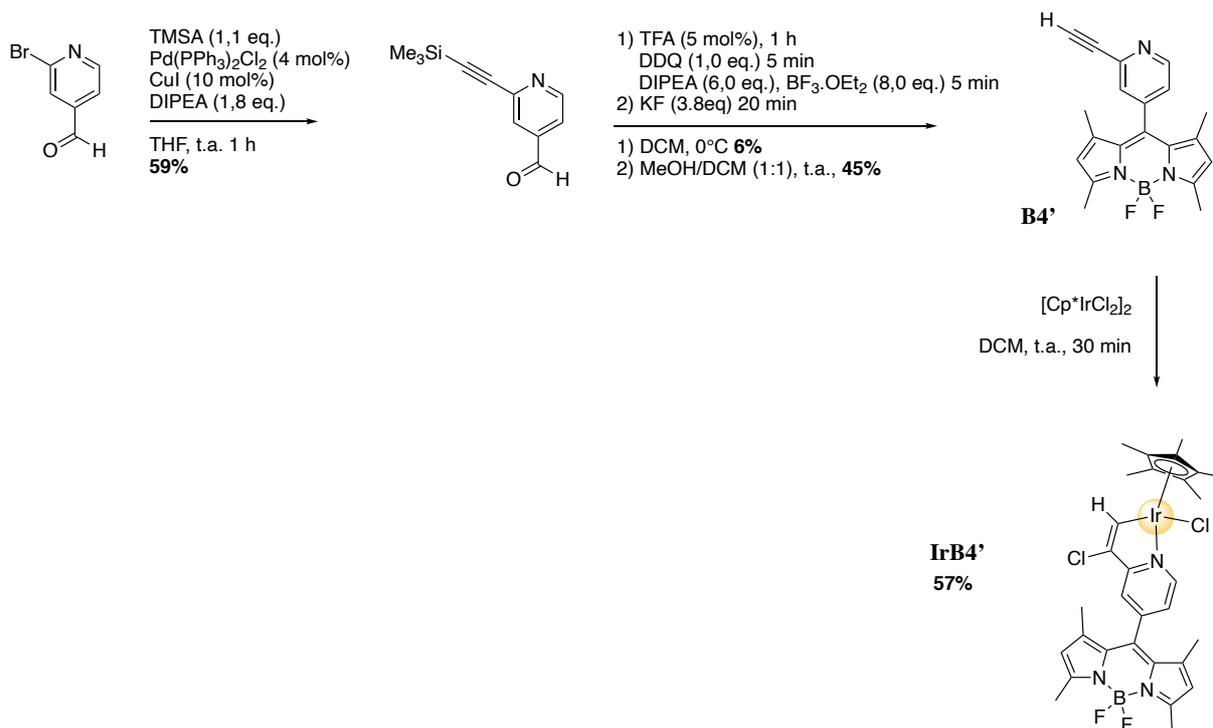


Schéma 31. Synthèse de **IrB5** et **IrB5-H<sub>2</sub>O** comportant un groupement méthoxo<sup>[153]</sup>

Sa complexation ainsi que l'aquation de **IrB5** ont donné des conversions satisfaisantes, permettant d'accéder au complexe **IrB5-H<sub>2</sub>O** avec de bons rendements. Enfin, une dernière stratégie a été envisagée afin d'améliorer la lipophilicité du complexe : l'adjonction d'un BODIPY directement sur la partie pyridine du ligand (vinypy). De cette manière, le complexe **IrB4'** est obtenu en cinq étapes à partir du 2-bromoisonicotinaldéhyde avec un rendement de complexation de 57%.

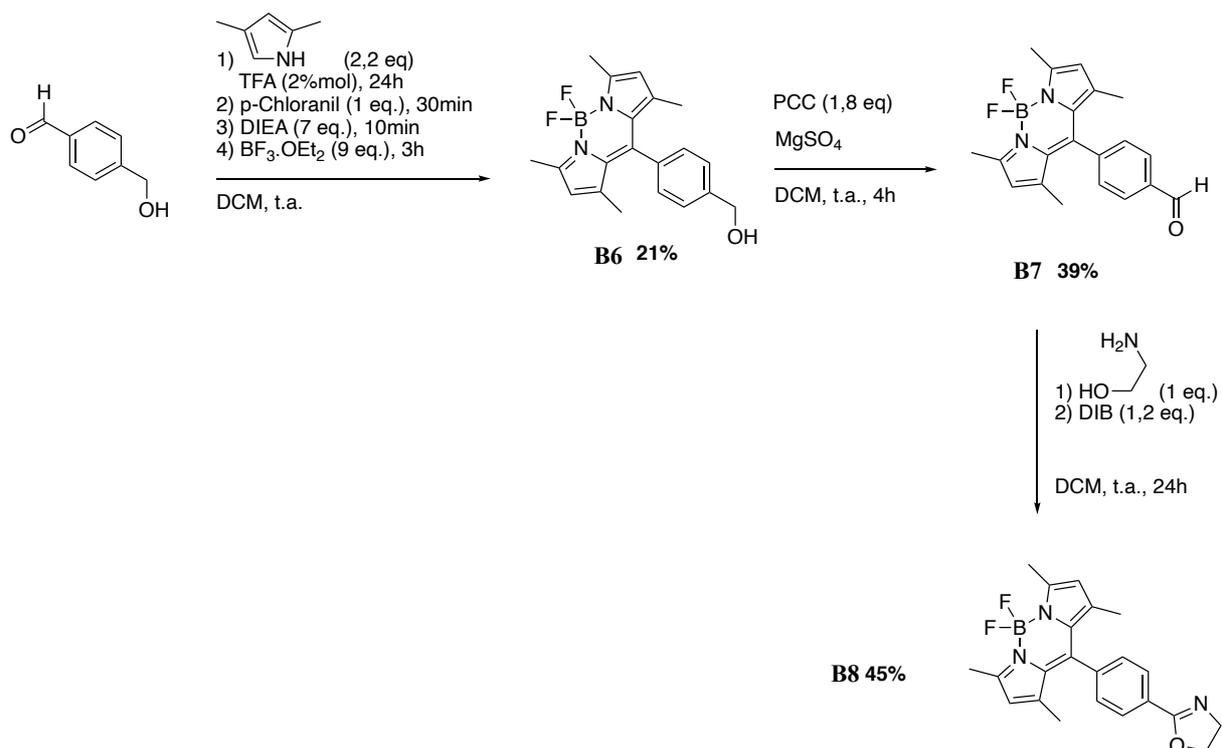


**Schéma 32.** Synthèse de **IrB4'** en cinq étapes

Ce rendement de complexation est le plus faible observé pour la série (vinypy), montrant que le BODIPY rend l'atome d'azote de la pyridine moins nucléophile, ce qui défavoriserait la première étape de la cycloméallation. En outre, **IrB4'** s'est révélé être insoluble dans le DMSO. Il apparaît donc comme un mauvais candidat pour des tests biologiques et ses propriétés spectrales n'ont pas été caractérisées par la suite.

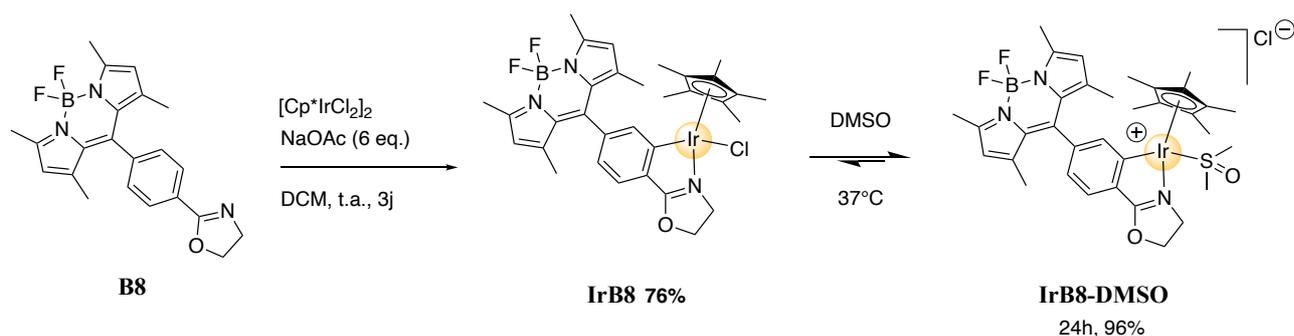
### 1.1.2.2. Série (phox)

Le ligand (phox)-BODIPY **B8** est obtenu à partir du 4-(hydroxyméthyl)benzaldéhyde. Le composé **B7** comportant une fonction aldéhyde est obtenu après déprotection du groupement hydroxyle du BODIPY **B6** suivie par une étape d'oxydation. Enfin la dernière étape de cyclisation de l'oxazoline requiert le DIB, un composé à base d'iode hypervalent employé pour oxyder l'oxazolidine intermédiaire en oxazoline.



**Schéma 33.** Synthèse du ligand (phox)-BODIPY **B8**

Puis l'oxazoline **B8** est complexée en présence du dimère d'iridium et de 6 équivalents d'acétate de sodium suivant la procédure générale de complexation des ligands (phox). Le temps de réaction a été prolongé pour assurer une conversion maximale en produit. **IrB8** n'est pas fluorescent en solution dans un solvant non-coordinant comme le dichlorométhane.



**Schéma 34.** Complexation de **B8** et formation d'un complexe fluorescent dans le DMSO

Tout comme **IrB4** et **IrB5**, **IrB8** a été caractérisé par spectroscopie RMN du proton et du carbone et sa structure a été confirmée par spectrométrie de masse à haute résolution. Comme l'environnement électronique autour de l'atome d'iridium est chiral, les hydrogènes de l'oxazoline et des groupements méthyle du motif BODIPY sont magnétiquement inéquivalents

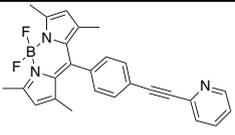
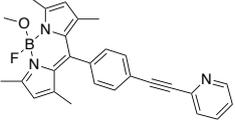
comme observé précédemment pour **Ir01**. La vitesse d'échange du ligand chlorido de **IrB8** pour former un adduit *solvento* cationique a été mesurée par RMN du proton dans le DMSO deutéré (demi-vie d'environ 30 min, pourcentage à l'équilibre 96%). La solution mère du complexe **IrB8** est donc préparée dans le DMSO 24 h avant son utilisation.

Le coefficient de partition octanol-eau (log P) de **IrB8** a été mesuré en utilisant la méthode « shake flask » (recommandation OCDE n°107)<sup>[154]</sup> et des lectures de concentration au moyen d'un spectrophotomètre UV-Visible. La valeur obtenue de 0,95 est en accord avec des valeurs de la rapportées dans la littérature comprises entre -0,95 et 4,2<sup>[155,156]</sup> pour des complexes apparentés, confirmant une nature relativement peu lipophile pour **IrB8** sous sa forme cationique. Néanmoins dans ces conditions expérimentales, la formation d'un complexe *aqua* ne peut pas être exclue. Tout comme dans le contexte intracellulaire, la spéciation de **IrB8** y est difficile à déterminer.

## 1.2. Propriétés spectrales des complexes Iridium-BODIPY (ligand chélatant)

### 1.2.1. Série (vinypy)

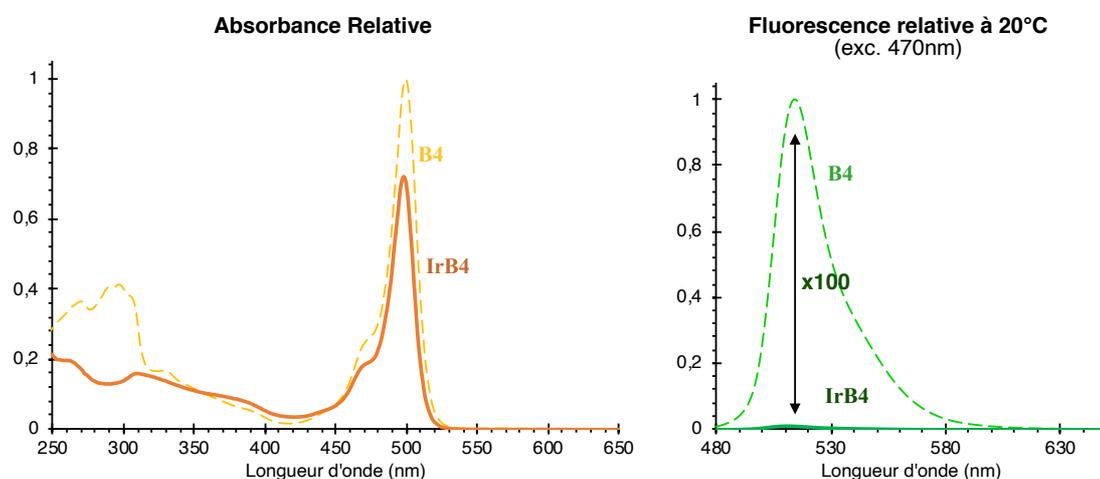
L'étude comparative des BODIPY **B4** et **B5** montre que le remplacement du ligand fluorido par un ligand méthoxo sur le bore induit une diminution du rendement quantique dans le THF d'environ 30%. Leurs maxima d'émission sont proches dans le DMSO et leurs temps de vie de fluorescence sont identiques. Cependant, **B5** n'est pas plus hydrosoluble que **B4** malgré la présence du ligand méthoxo. En effet, lors de leur mise en solution aqueuse à 10  $\mu$ M, les deux BODIPY présentent des bandes d'absorption très larges et irrégulières suggérant que la solution est rendue trouble par une espèce agrégée.

	Structure	$\lambda_{em}^{max}$ (DMSO) / nm	$\Phi$ (THF) / %	$\tau$ (DMSO) / ns
<b>B4</b>		515	$26,4 \pm 1,0$	2,42(46%) 0,05(7%) 2,90(48%)
<b>B5</b>		516	$18,5 \pm 1,0$	2,42(60%) 2,03(14%) 0,02(26%)

**Tableau 8.** Comparaison des propriétés spectrales de **B4** et **B5**

Les propriétés spectrales de **B4** et **IrB4** sont ensuite comparées dans l'acétonitrile. Les deux complexes présentent un spectre d'absorption montrant la bande caractéristique du

BODIPY avec le même maximum de 498 nm. Cependant, une extinction de fluorescence très importante est observée après excitation à 470 nm et le rendement quantique de **IrB4** n'était pas mesurable (< 1%).



**Figure 64.** Spectres d'absorption et d'émission du pro-ligand **B4** (pointillés) et du complexe **IrB4** dans l'acétonitrile

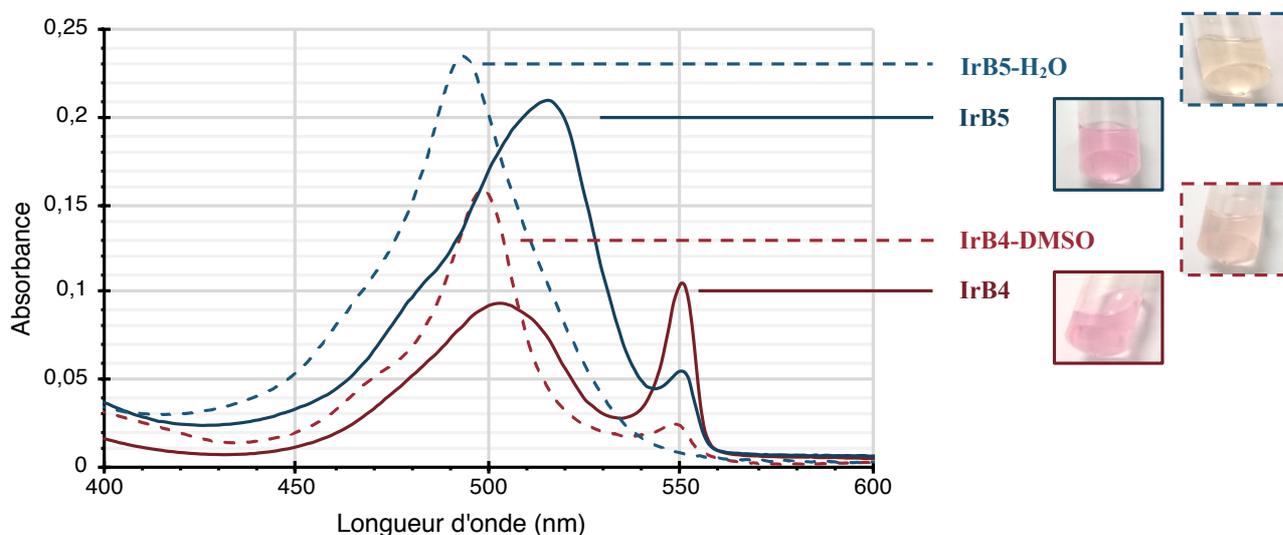
Pour un complexe structurellement apparenté à **IrB4**, de type (ppy)-Phényle-BODIPY, il a été démontré qu'une telle extinction de fluorescence provenait d'un transfert d'électron photoinduit (PET). Dans cette situation, le fragment BODIPY agirait comme accepteur d'électron et le centre iridium comme donneur d'électron suite à l'excitation.<sup>[157]</sup> Nous avons constaté que l'ajout de sels d'argents à une solution de **IrB4** dans l'acétonitrile induisait un retour partiel de la fluorescence par formation de l'adduit cationique **IrB4-NCMe**



**Figure 65.** Étude des propriétés émissives de **B4** et **IrB4** dans l'acétonitrile

Ce résultat inattendu illustré dans la figure 65 reste à rationaliser, il implique que le phénomène de transfert d'électron photo-induit ne puisse pas se réaliser pour la forme cationique de ce complexe **IrB4**.

Dans l'eau, les deux modifications apportées au complexe **IrB4** ont un effet sur leur spectre d'absorption : les maxima des espèces cationiques (**IrB4-DMSO**, **IrB5-H<sub>2</sub>O**) sont déplacés vers le bleu ( $\lambda_{\text{max}} < 500$  nm) et la bande représentant l'espèce agrégée de couleur rose est diminuée lorsque le Bodipy-F<sub>2</sub> est substitué par un groupement méthoxy (**IrB5**, **IrB5-H<sub>2</sub>O**).



**Figure 66.** Spectres d'absorption de différentes espèces (10  $\mu$ M, H<sub>2</sub>O/MeOH 99:1, 20°C)

D'après ces résultats, seul **IrB5-H<sub>2</sub>O** ne s'agrège pas en solution aqueuse et pourrait être employé pour une administration à des cellules. Le rendement quantique de **IrB5-DMSO** mesuré dans le THF est de  $5,35 \pm 1,04$  %.

### 1.2.2. Série (phox)

Nous avons examiné les propriétés photophysiques du complexe **IrB8**, comportant un ligand phényloxazoline. Dans des solvants non-coordinants comme le dichlorométhane, le complexe **IrB8** est sous sa forme chlorido neutre et n'est pas émissif. Cependant, une fois dilué dans le DMSO, le complexe IrB8 forme un adduit cationique ce qui engendre un retour de fluorescence. Les propriétés photophysiques de **IrB8** sont donc similaires à celles du complexe **IrB4** (Figure 65). Par conséquent, afin de mesurer les propriétés spectrales de **IrB8-DMSO**, une solution mère de **IrB8** dans le DMSO à l'équilibre a été employée.

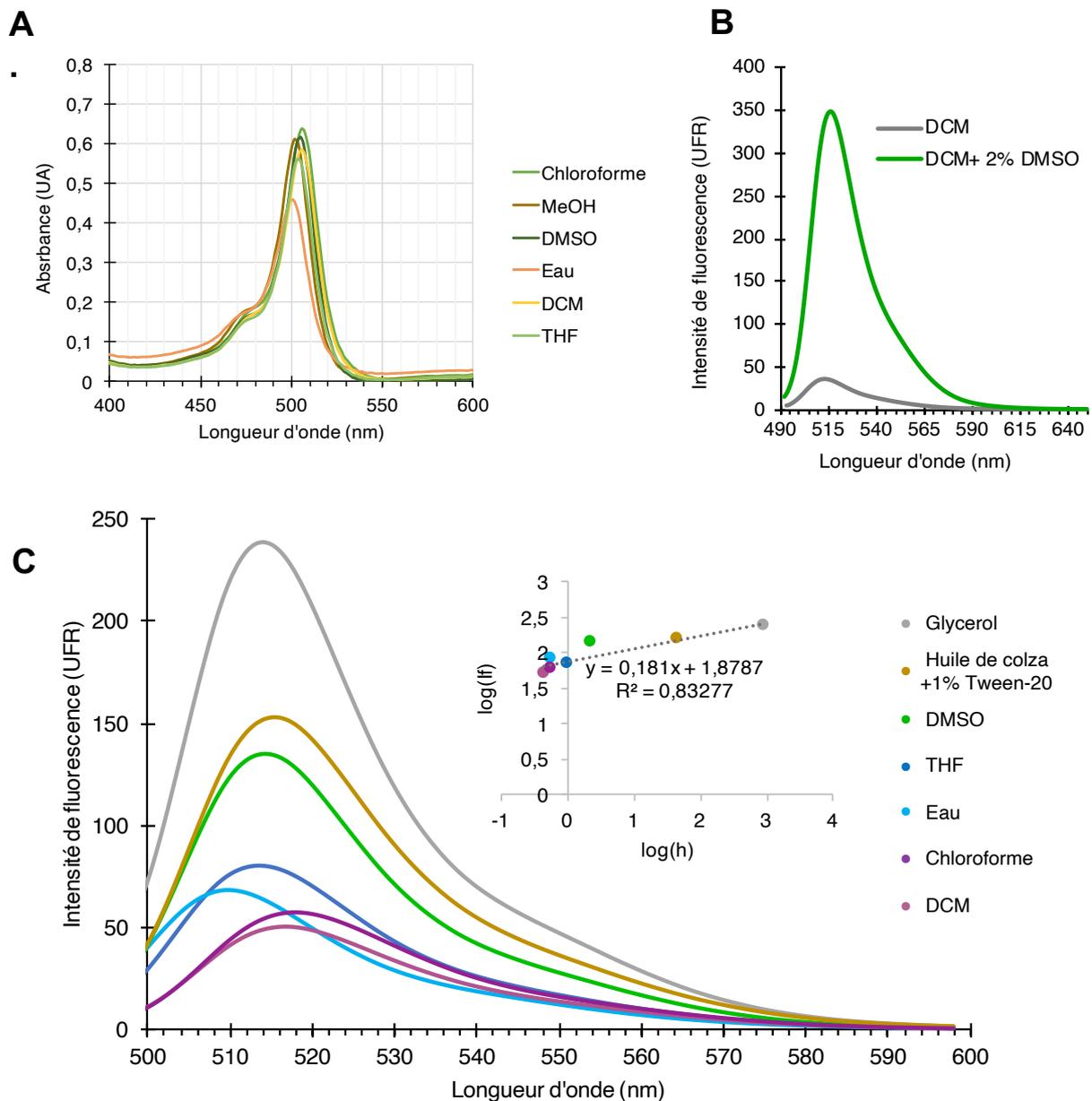
<b>IrB8</b>						
Solvant	Maximum d'absorption $\lambda_{abs}^{max}$ (nm)	Coefficient d'extinction $\epsilon$ (l.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )	Maximum d'émission $\lambda_{em}^{max}$ (nm)	Déplacement de Stokes (cm <sup>-1</sup> )	Rendement Quantique $\Phi$ (%)	Demi-vie de fluorescence $\tau$ (ns)
THF	500	53300	512	4688	Nd	Nd
DCM	501	53400	513	4669	Nd	Nd
<b>IrB8-DMSO</b>						
MeOH	505	61100	512	2707	<b>20,8 ± 1,4</b>	Nd
CHCl <sub>3</sub>	506	64000	518	4578	Nd	Nd
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	506	58300	517	4205	Nd	Nd
THF	504	56000	513	3481	Nd	Nd
DMSO	506	61700	514	3076	Nd	2,7±0,2 (70%)
H <sub>2</sub> O	501	45700	510	3522	Nd	2,78±0,02 (92%)
<b>B8</b>						
MeOH	500	41100	510	3922	25,6 ± 1.6	2,2±0,5 (87%)
DMSO	504	38400	514	3860	Nd	Nd
THF	503	36100	513	3875	Nd	Nd
H <sub>2</sub> O	501	17800	509	3137	Nd	2,8 (74%)

**Tableau 9.** Paramètres photophysiques de **B8**, **IrB8** et **IrB8-DMSO**

Nd : non déterminé

**IrB8-DMSO** présente une bande d'absorption intense dans le domaine visible avec un maximum à environ 500 nm dans la plupart des solvants organiques et dans l'eau. Dans le méthanol, son rendement quantique de  $20,8 \pm 1,4$  % est proche de celui du ligand précurseur **B8** ( $25,6 \pm 1,6\%$ ) et bien plus élevé que celui de **IrB5-DMSO**. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que le complexe IrB8-DMSO possède un ligand chélatant moins conjugué et plus rigide, diminuant l'effet d'atome lourd à l'origine de l'extinction de fluorescence.<sup>[157]</sup> Les temps de demi-vie de fluorescence des deux espèces, de l'ordre de la nanoseconde, sont également similaires et ne varient pas selon le solvant, nous avons donc écarté l'emploi de ces molécules en microscopie résolue en temps de vie (FLIM). Les spectres d'absorption et d'émission de **IrB8-DMSO** sont présentés ci-après dans différentes conditions. L'intensité d'émission de fluorescence de **IrB8-DMSO** est corrélée à la viscosité du solvant : DCM < Eau < DMSO < Glycérol. Ce comportement est caractéristique des rotors moléculaires BODIPY comportant un substituant aryle en position meso, dont le temps de demi-vie de fluorescence dépend aussi généralement de la viscosité. Cependant, la présence des substituants méthyle aux position 1,

3, 5 et 7 du BODIPY a rendu sa réponse de viscosité modeste (Figure 67C) en accord avec la littérature.<sup>[158]</sup>



**A.** Spectres d'absorption de **IrB8-DMSO** (10 μM) dans différents solvants contenant 0,1% DMSO (v/v)

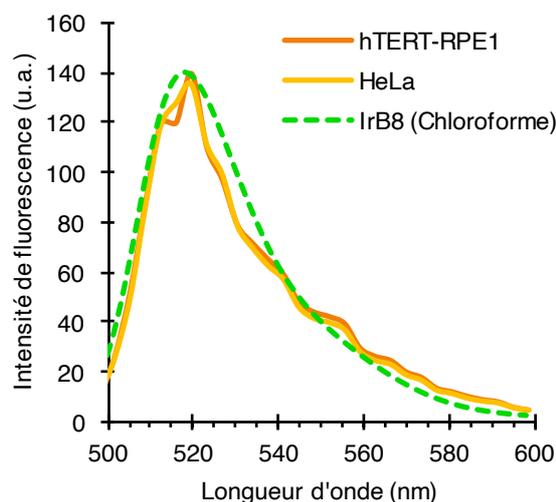
**B.** Spectres d'émission de **IrB8** (10 μM, DCM) et **IrB8-DMSO+** (10 μM, DCM/DMSO 98:2)

**C.** Fluorescence de **IrB8-DMSO+** (10 μM) dans différents solvants contenant 0,1% DMSO (v/v). Encart: Réponse **IrB8-DMSO+** en fonction de la viscosité  $\eta$  (cP)

**Figure 67.** Propriétés spectrales de **IrB8** et **IrB8-DMSO+**

Le maximum d'émission de **IrB8-DMSO** semble légèrement décalé vers le bleu dans l'eau, d'environ 2 nm. Nous avons donc recherché par la suite si cet effet avait une conséquence en microscopie. Le spectre de **IrB8** a été mesuré dans des cellules au moyen d'un microscope confocale à fluorescence. Des cellules HeLa et hTERT-RPE1 traitées pendant 15 min avec **IrB8**

ont pour cela été fixées et montées entre lame et lamelles dans un milieu de montage préservant la fluorescence. Le spectre est enregistré sur des structures cellulaires brillantes avec un pas de 3 nm et la valeur d'intensité est mesurée avec un détecteur hybride à comptage de photons sur une plage de 100 nm.

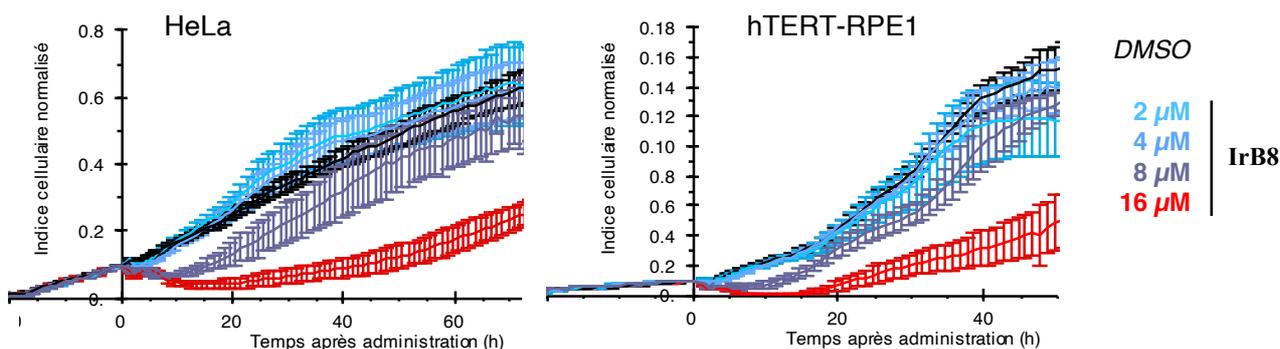


**Figure 68.** Spectre de **IrB8** dans les cellules après 15 min d'incubation

Les spectres d'émission de **IrB8-DMSO** dans les deux lignées cellulaires sont superposables à celui obtenu avec un spectrofluorimètre dans le chloroforme. De plus la position du maximum à 520 nm était identique quelle que soit la région d'intérêt. Ce résultat suggère que le complexe est stable dans le contexte intracellulaire et conserve ses propriétés de fluorescence modélisées par les analyses précédentes. Néanmoins, la microscopie confocale ne permet pas d'obtenir une information sur la spéciation du complexe en milieu cellulaire.

### 1.3. Cytotoxicité de **IrB8**

La réponse cellulaire au traitement par **IrB8** a été étudiée par la technique xCELLigence® RTCA précédemment décrite. Cette expérience a été réalisée sur les deux lignées cellulaires HeLa comme modèle de cellules cancéreuses et hTERT-RPE1 comme modèle de cellules non-tumorales, afin de rechercher un effet de sélectivité.



**Figure 69.** Inhibition de prolifération induite par **IrB8** dans des cellules HeLa et hTERT-RPE1

Pour les deux lignées, **IrB8** induit une diminution dose-dépendante de l'indice cellulaire observée pour les deux lignées, elle est particulièrement marquée à partir de 8  $\mu\text{M}$  mais suivie d'une récupération par les cellules. En outre, les cellules hTERT-RPE1 récupèrent plus rapidement que les HeLa. En accord avec ces résultats, l' $\text{IC}_{50}$  de **IrB8** a été calculé pour la lignée HeLa par le test MTT et la valeur obtenue est de  $8,5 \pm 1,0 \mu\text{M}$  après 48 h de traitement. Afin de fournir une interprétation visuelle de ces profils RTCA, le comportement de cellules HeLa a parallèlement été suivi par vidéo-microscopie à raison d'une image toutes les 5 min en contraste de phase. Les pourcentages de cellules en division et de mort cellulaires ont été décomptés pour différentes conditions durant des périodes d'intérêt de 5 h (Tableau 10).

<b>Controle</b>	Mort	Division	Nombre de cellules
	1 %	16 %	228
<b>B8 8 <math>\mu\text{M}</math></b>	Mort	Division	Nombre de cellules
0-5 heures	1 %	21 %	188
17-22 heures	1 %	12 %	210
40-45 heures	0 %	18 %	438
<b>IrB8 8 <math>\mu\text{M}</math></b>	Mort	Division	Nombre de cellules
0-5 heures	1 %	11 %	321
17-22 heures	21 %	1 %	280
40-45 heures	1 %	12 %	517
<b>IrB8 16 <math>\mu\text{M}</math></b>	Mort	Division	Nombre de cellules
0-5 heures	6 %	1 %	189
17-22 heures	82 %	0 %	35
40-45 heures	12 %	0 %	96

**Tableau 10.** Analyse de la réponse cellulaire à **B8** et **IrB8** par vidéo-microscopie

Pourcentage de divisions et morts cellulaires sur une période de 5 h, 0, 17 ou 40 h après addition de **IrB8** ou **B8** comme témoin. Les événements ont été comptés sur des films (vidéo-microscopie) en contraste de phase.

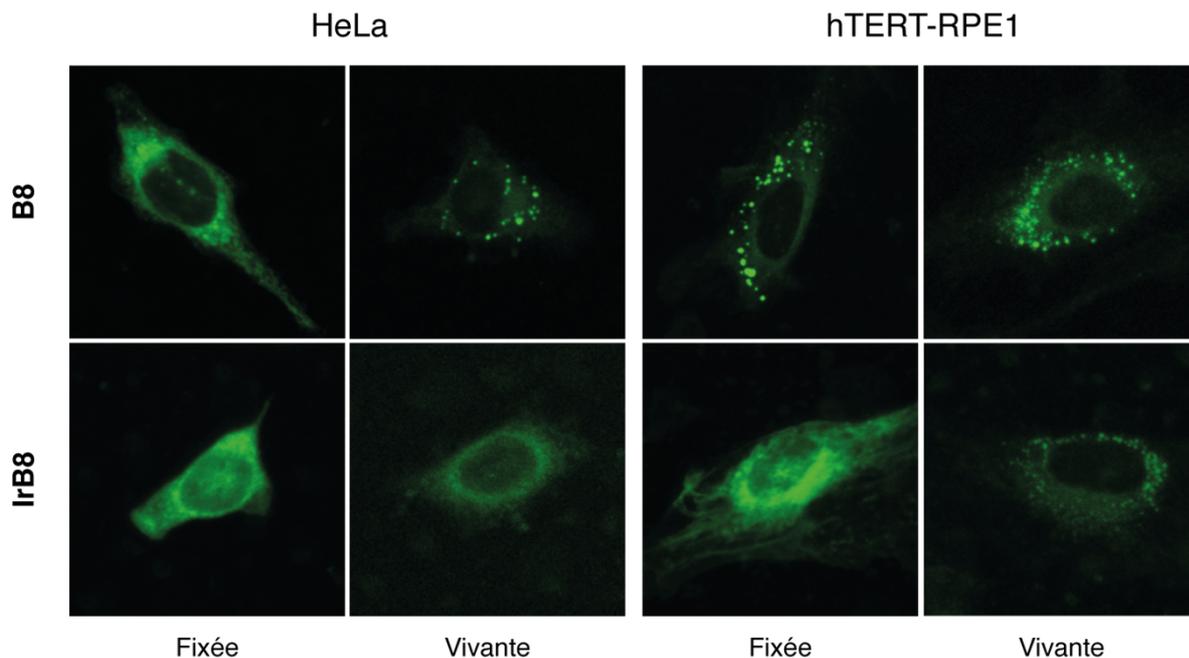
Les cellules traitées par le ligand **B8** montrent des vitesses de division et des taux de mort cellulaire comparables à ceux des cellules traitées par le véhicule, démontrant que la toxicité de **IrB8** n'est pas prodiguée par son ligand. En effet, à 16  $\mu\text{M}$  ( $2 \times \text{IC}_{50}$ ), **IrB8** inhibe drastiquement la division des cellules et induit leur mort avec le pourcentage relevé le plus élevé entre 17 et 22 h après administration. Des cellules exposées à 8  $\mu\text{M}$  **IrB8** ont montré une perte d'adhésion immédiate et transitoire entre 0 et 5 h de traitement. Leur prolifération n'était pas complètement inhibée par cette dose, 20% des cellules succombent pendant la période de traitement 17-22 h néanmoins les 80% restant sont restées adhérentes et ont proliféré à une vitesse réduite entre 40 et 45 h.

En somme, ce nouveau complexe (phox) substitué par un BODIPY paraît moins toxique que ses congénères (Chapitre 1). Contrairement aux effets observés pour **Ir02**, les cellules HeLa et hTERT-RPE1 traitées par **IrB8** survivent à des doses supérieures à 16  $\mu\text{M}$  après un temps d'adaptation d'environ 20 h. Cette reprise de prolifération s'accompagne vraisemblablement d'une déplétion du milieu en composé par les cellules. En effet, l'accumulation intracellulaire de **IrB8** a été mesurée indépendamment dans des cellules HeLa et hTERT-RPE1 traitées avec 10  $\mu\text{M}$  durant 30 min, au moyen d'une mesure des taux d'Iridium élémentaire par ICP-OES. Dans ces conditions,  $310 \pm 8$  et  $440 \pm 7$  ng Ir/ par million de cellules ont été mesurés respectivement.

## 2. Localisation intracellulaire de IrB8

### 2.1. IrB8 s'accumule rapidement dans des cellules par diffusion passive

Des cellules HeLa et hTERT-RPE1 ont été fixées au paraformaldéhyde (PAF 4% durant 15 min) puis colorées avec **B8** ou **IrB8** (1  $\mu$ M) pendant 30 min à 37°C. Enfin, 3 lavages sont effectués (PBS) avant le montage. Ces conditions permettent d'observer la diffusion passive des composés et leur affinité avec les composants cellulaires (Figure 70, « fixée »). Sur ces projections de tranches confocales, de grandes structures périnucléaires sont marquées et le noyau semble exempt de signal. Le complexe tout comme le ligand ne traversent donc pas l'enveloppe nucléaire. Dans un deuxième temps, les cellules sont traitées avec les composés (1  $\mu$ M) pendant 30 min à 37°C et fixées par la suite (Figure 70, « vivante »), on observe le transport actif des molécules qui se sont accumulées, de plus les lavages post-fixation permettent d'éliminer la part diffusible du complexe.

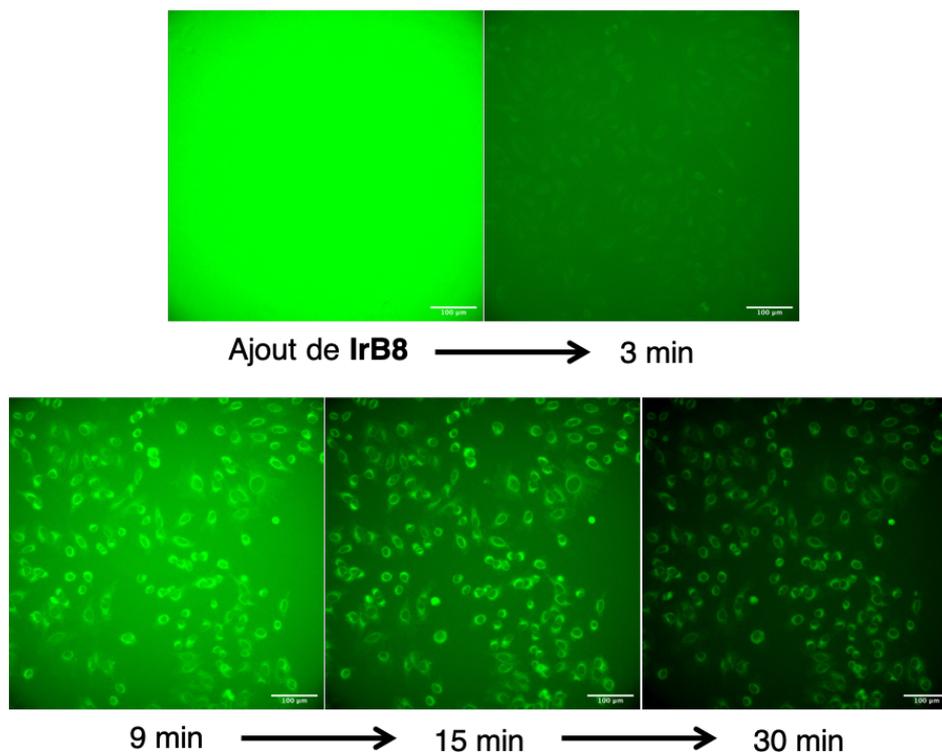


**Figure 70.** Comparaison du marquage fluorescent par **B8** et **IrB8** de cellules vivantes ou fixées

Avec ces conditions, l'intensité de fluorescence est diminuée, les réglages de luminosité et contraste ont donc été réajustés. Dans le milieu extracellulaire, le complexe s'agrège avec les protéines du milieu (sérum 10%). Les lavages ne délogent pourtant pas l'iridium des structures précédemment observées, indiquant la formation de liaisons fortes avec des macromolécules. Le ligand **B8** présente une accumulation préférentielle dans des vésicules. Comme vu

précédemment, les composés BODIPY peuvent avoir un tropisme pour les gouttelettes lipidiques.<sup>[159]</sup> Pour le complexe **IrB8**, les images obtenues sont similaires entre les deux lignées et les conditions de coloration, suggérant qu'il est essentiellement internalisé dans les cellules par diffusion passive à travers leur membrane plasmique.

L'internalisation des deux composés a également été suivie par vidéo-microscopie dans deux manipulations indépendantes dans le but de mesurer la cinétique d'internalisation de **IrB8** à court terme. Pour le ligand contrôle **B8**, l'apparition de structures fluorescentes est instantanée et est conservée après un lavage.

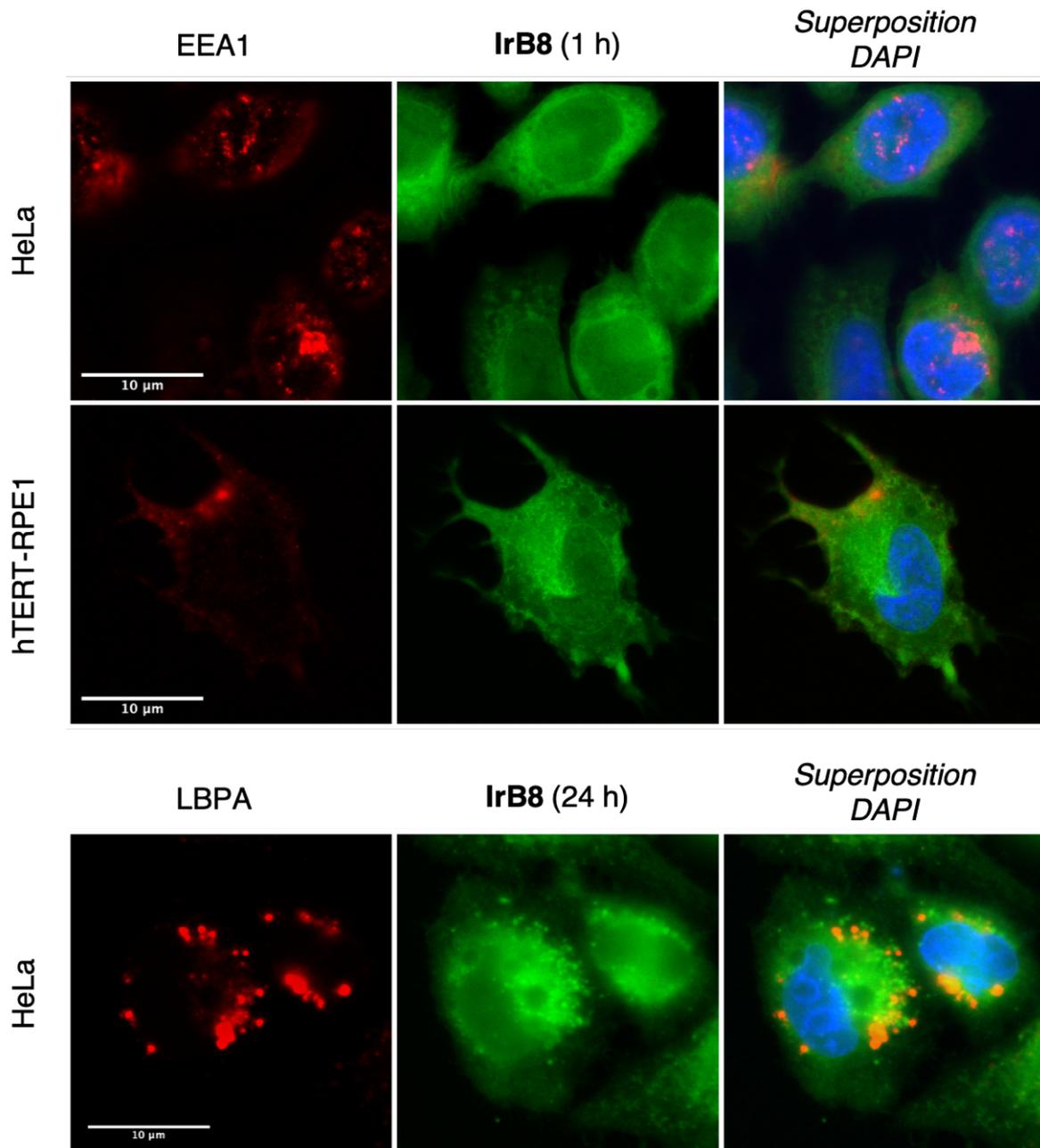


**Figure 71.** Suivi de la fluorescence de cellules vivantes traitées par **IrB8** (10 µM)

Pour le complexe **IrB8**, l'apparition de la fluorescence prend seulement quelques minutes. L'effet sur les cellules est comparable aux observations en contraste de phase avec **Ir02** et **Ir12**, il se manifeste par une perte de motilité et une vitesse de division ralentie.

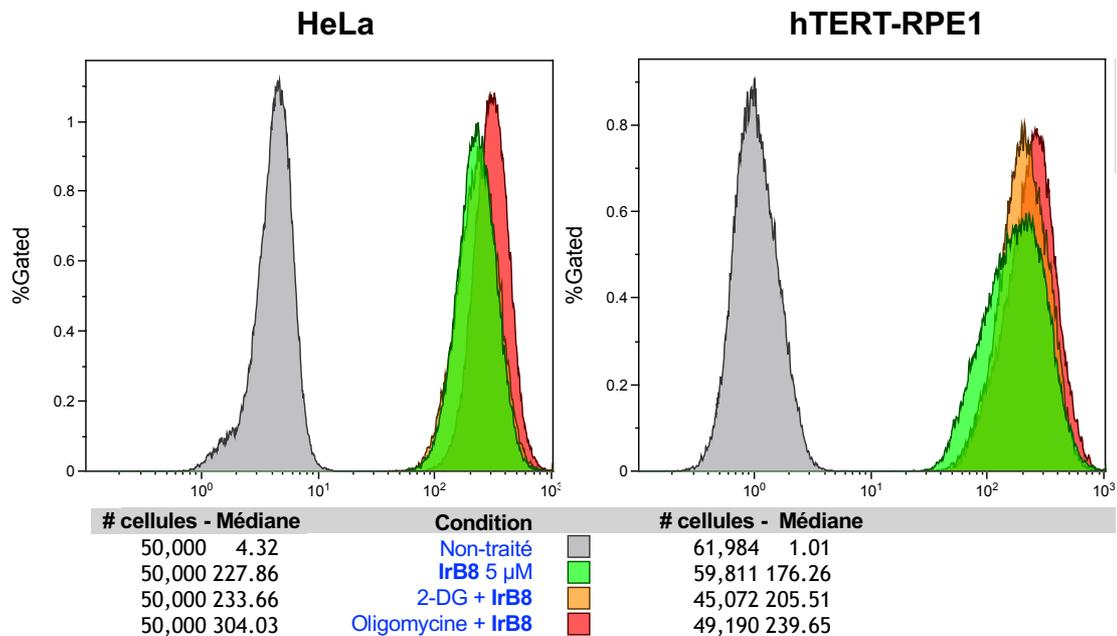
Sauf indication contraire, une concentration de 10 µM sera systématiquement utilisée pour les traitements par **IrB8** car elle permet un contraste optimal par imagerie.

Afin de déterminer si l'internalisation de **IrB8** passe par la voie de l'endocytose, EEA1 (marqueur des endosomes précoces) et LBPA (marqueur des endosomes tardifs) ont été examinés par immunofluorescence. Nous avons voulu vérifier la présence de **IrB8** dans ces structures en analysant sa colocalisation avec ces structures.



**Figure 72.** **IrB8** ne colocalise pas avec EEA1 après une heure de traitement ni LBPA après 24 h de traitement (épifluorescence)

Les vésicules marquées sur le canal rouge ne correspondent jamais à des zones intenses de signal sur le canal vert représentant la fluorescence de **IrB8**. Ce résultat indique que cette molécule n'est pas ou peu internalisée par endocytose. Cependant il pourrait aussi y résider un temps très court. Afin de confirmer que l'endocytose est minoritaire, la fluorescence de cellules exposées à **IrB8** seul ou en présence d'inhibiteurs du transport actif a été examinée.

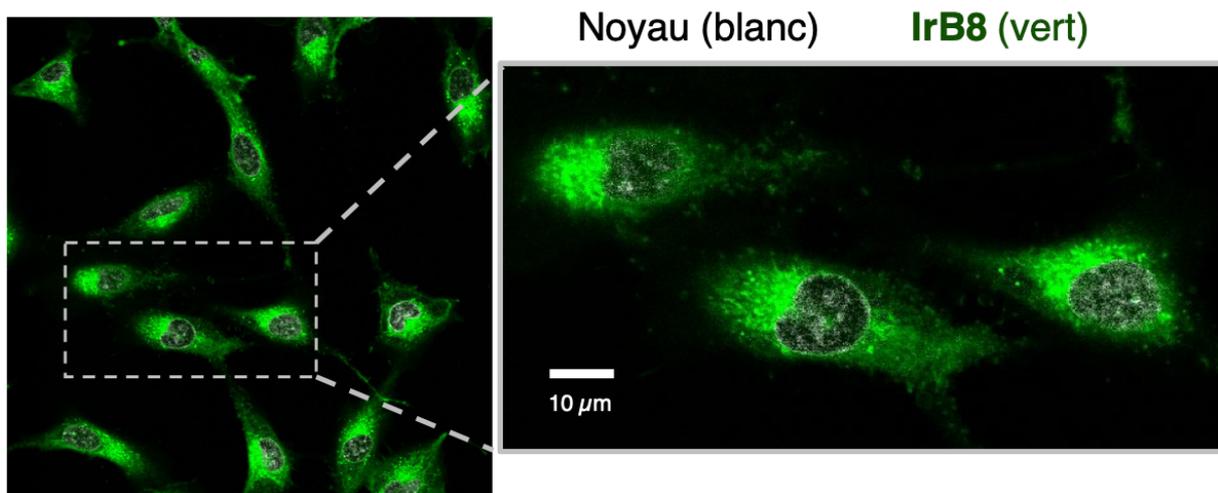


**Figure 73.** Comparaison de la fluorescence des cellules traitées par **IrB8** en présence d'inhibiteurs

Avant un traitement de 15 min par 5 µM **IrB8**, des cellules adhérentes ont été exposées à 50 mM 2-deoxyglucose (2-DG, inhibiteur de la glycolyse) ou 5 µM Oligomycine (inhibiteur de la chaîne respiratoire) durant 30 min afin de bloquer la production d'ATP et ainsi le transport actif du complexe. Puis les cellules ont été détachées, fixées et leur fluorescence a été mesurée par cytométrie (exc. 488 nm, em. 505-545 nm) afin d'avoir une information sur la quantité de complexe internalisé. Les histogrammes obtenus illustrent que les cellules ne sont pas moins fluorescentes dans ces conditions, confirmant que l'internalisation de **IrB8** est principalement due à sa diffusion passive à travers la membrane plasmique des cellules.

## 2.2. IrB8 se localise dans les organites membranaires

Dans cette partie, **IrB8** sera co-administré avec des traceurs fluorescents rouges de différents organites et observé par microscopie confocale. À la différence de l'immunofluorescence, ces marquages sont effectués sur des cellules vivantes avec des marqueurs vitaux qui ne requièrent pas de perméabilisation. Le DRAQ5 est un fluorophore (rouge lointain) qui se localise dans le noyau, nous avons confirmé par un comarquage que **IrB8** est absent du noyau.

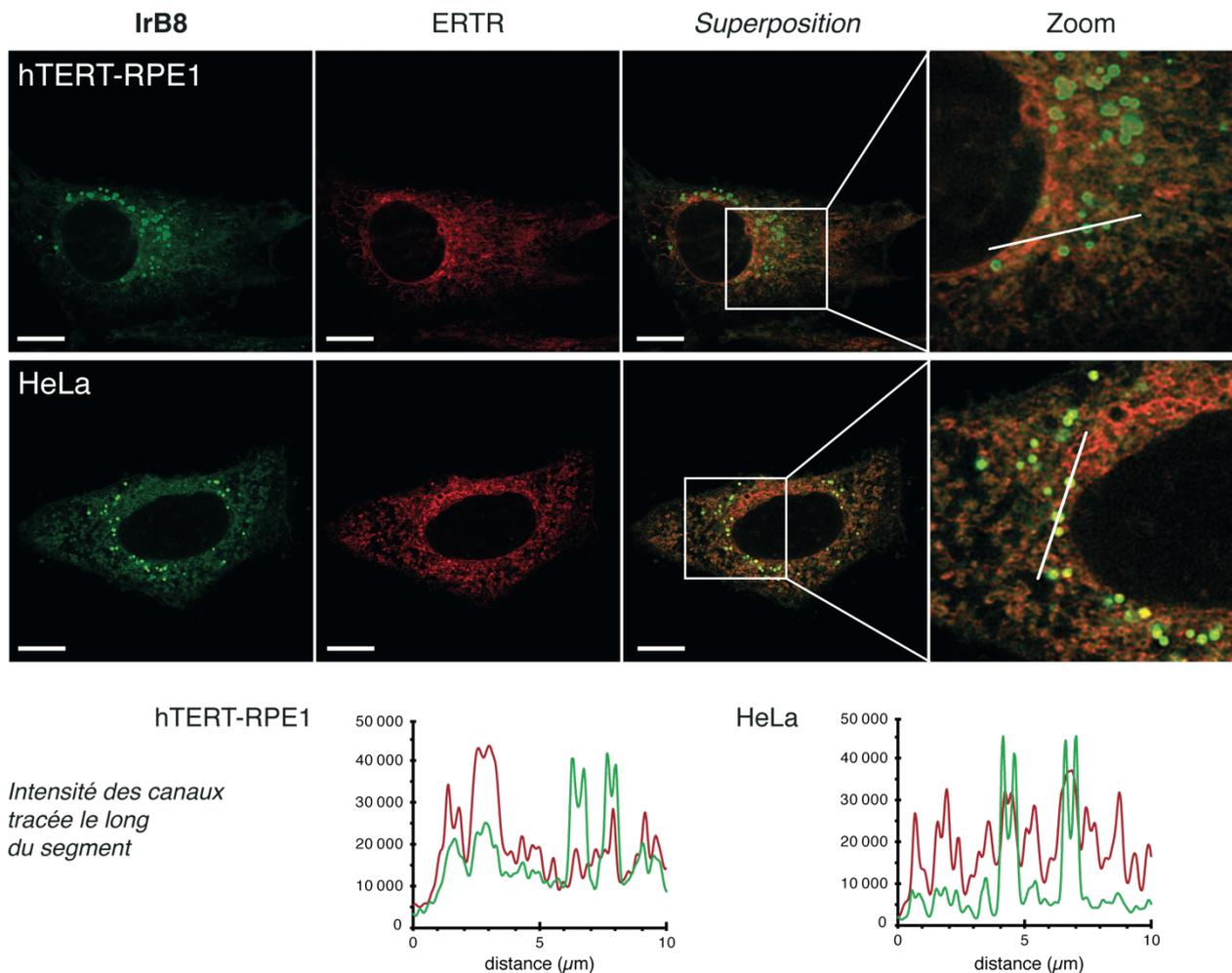


**Figure 74.** Internalisation de **IrB8** (vert) dans des cellules hTERT-RPE1 vivantes, comarquage du noyau (DRAQ5, blanc)

Avec cette haute résolution d'imagerie confocale illustrée dans la figure 74, on observe des structures réticulées similaire à un marquage du RE et ou des mitochondries. De plus, des cellules vivantes exposées à **IrB8** forment après 30 min des points très intenses qui étaient absents des images d'immunofluorescence. Par la suite, nous avons déterminé quels sont les différents organites marqués au moyen de marqueurs fluorescents vitaux du RE (ERTR), des mitochondries (MTR), des gouttelettes lipidiques (BODIPY-C12) et du lysosome (LTR).

### 2.2.1. Réticulum endoplasmique

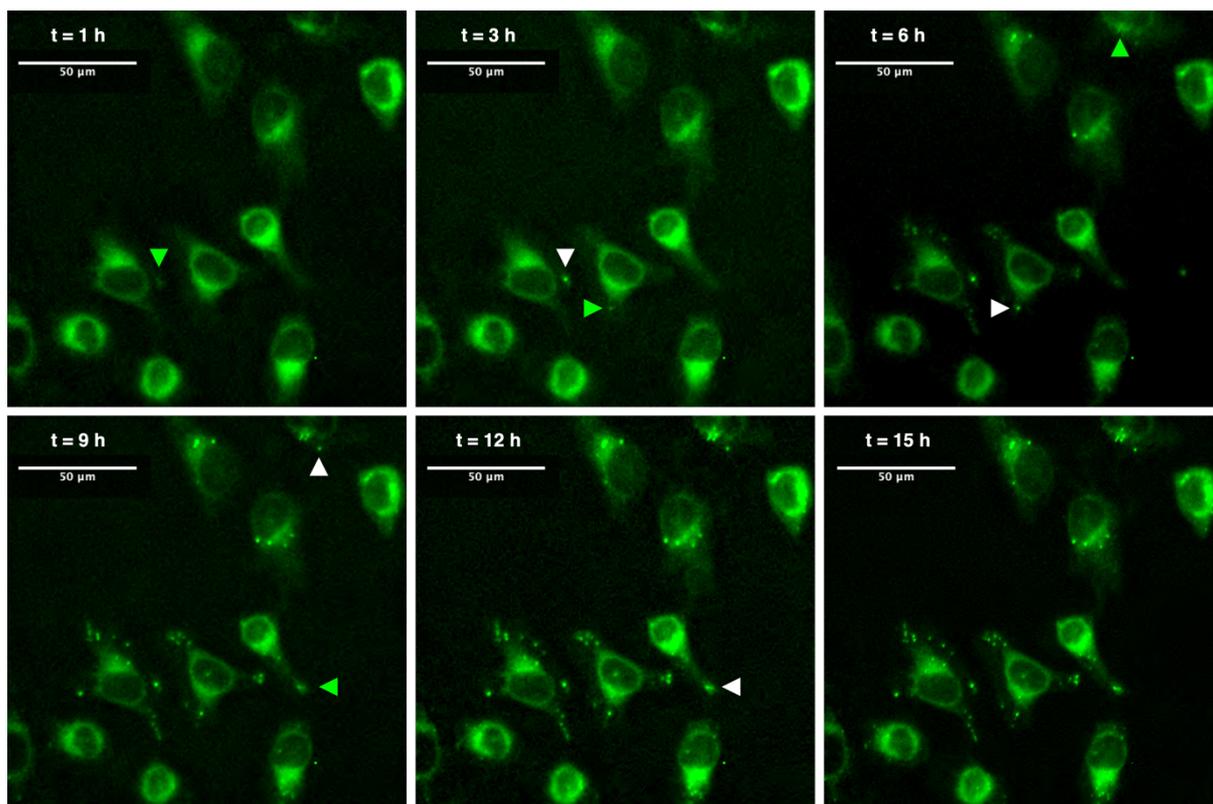
L'accumulation du complexe fluorescent dans le réticulum endoplasmique a été confirmée d'après le résultat de comarquage avec ERTR durant 15 min puis **IrB8** pour 15 min supplémentaires (Figure 75).



**Figure 75.** **IrB8** se localise dans le réticulum endoplasmique

Échelle et segments : 10  $\mu\text{m}$

L'intensité de chaque canal est tracée le long d'un segment de 10  $\mu\text{m}$  pour mieux caractériser les profils des différents marquages. Les profils de **IrB8** et ERTR présentent une bonne corrélation sur les deux lignées cellulaires, démontrant que **IrB8** est retenu dans la membrane du réticulum. Les points intenses précédemment observés correspondent à des zones du réticulum et d'après le profil des pics correspondants (forme de M), la surface de ces vésicules est plus intense que leur contenu. Ces vésicules sont vraisemblablement des gouttelettes lipidiques qui bourgeonnent de la surface du RE et qui contiennent **IrB8**.



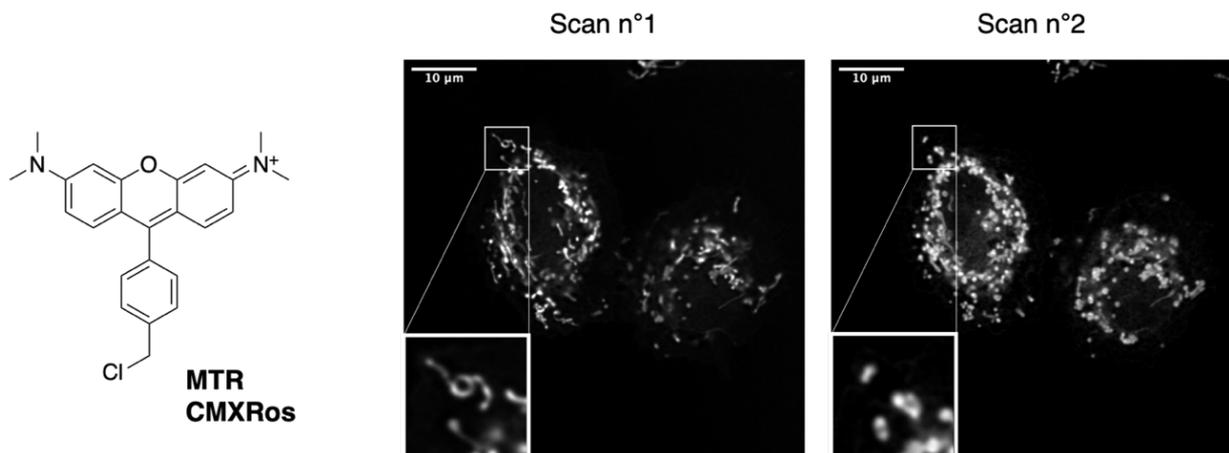
**Figure 76.** Apparition progressive des GL dans des cellules HeLa exposées à **IrB8**

La fluorescence de cellules HeLa traitées par 10  $\mu\text{M}$  **IrB8** durant 45 minutes puis lavées deux fois au PBS a été observée par vidéo-microscopie à faible grossissement durant 16 heures. Cette expérience a permis d'observer l'apparition progressive de ces gouttelettes dans le cytoplasme (Figure 76, flèches vertes) depuis le réticulum, leur immobilité et leur persistance dans le temps (flèches blanches).

### 2.2.2. Mitochondries

Le traqueur des mitochondries MTR n'est pas un BODIPY mais un dérivé de la rosamine. Ce composé est lipophile et cationique et s'accumule donc dans la membrane de la mitochondrie, de plus il possède une fonction électrophile (chlorobenzyle) qui lui permet de réagir avec les fonctions nucléophiles (thiols) des protéines mitochondriales. Ce dérivé de MTR (Mitotracker® Red CMXRos) est aussi commercialisé comme sonde de découplage des mitochondries, sa fluorescence est moins intense si la membrane mitochondriale est dépolarisée. Plusieurs protéines avec lesquelles cette sonde est capable de former des adduits covalents ont été identifiées dans la lignée HeLa. Ce sont principalement des protéines mitochondriales, notamment HSP60 et la Peroxyrédoxine 1 mais aussi des protéines

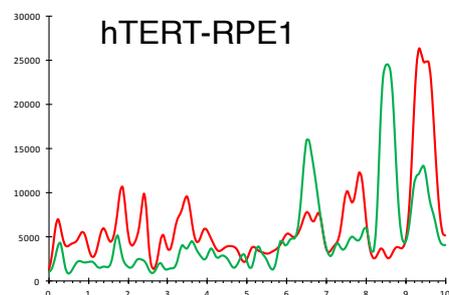
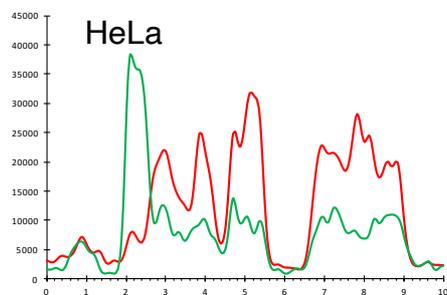
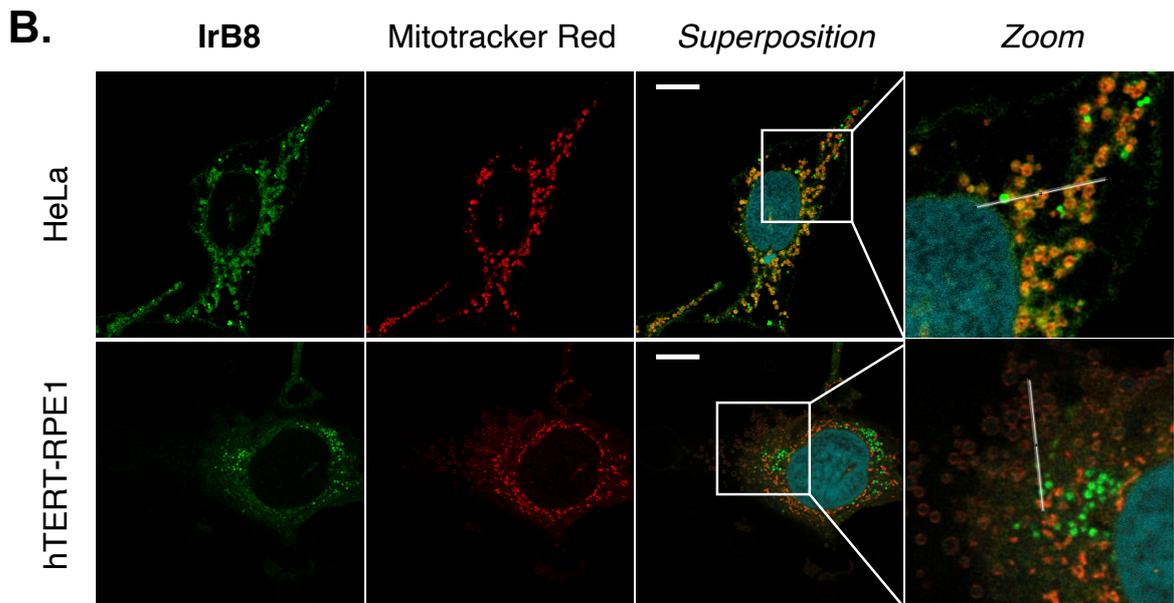
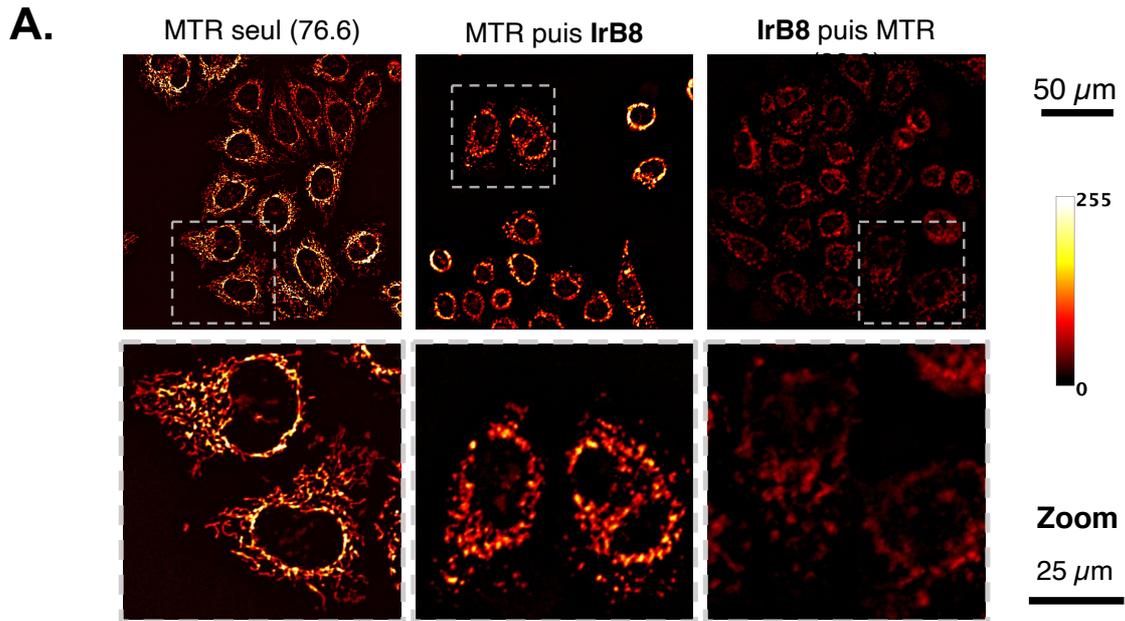
cytosoliques comme l'actine ou la vimentine.<sup>[160]</sup> Les mitochondries marquées par le MTR présentent une morphologie en bâtonnets et apparaissent comme un réseau interconnecté. Cependant, utilisé sur cellules vivantes on peut aisément observer que cette morphologie mitochondriale est dynamique et sensible à l'irradiation par le laser à 561 nm du microscope.



**Figure 77.** Modification de la morphologie des mitochondries après irradiation de cellules vivantes

Cellules HeLa exposées colorées au Mitotracker Red CMXRos durant 20 min et imagées vivantes par microscopie de fluorescence confocale (1 tranche, 210 nm)

Comme des études précédemment citées montrent l'accumulation d'un complexe semi-sandwich dans la membrane des mitochondries,<sup>[52]</sup> nous avons examiné si **IrB8** était retenu dans cet organe. Lorsque l'on administre **IrB8** durant 15 min après un marquage de 20 min par MTR (100 nM), toutes les mitochondries sont marquées par le complexe suggérant une affinité pour la membrane mitochondriale en accord avec sa nature lipophile et cationique. **IrB8** s'accumule donc également dans les mitochondries comme on peut le voir d'après la très bonne corrélation entre les signaux des canaux rouge et vert (Figure 78B). Dans ces conditions, le MTR est administré après l'incubation avec **IrB8**. La démarche inverse mène à une nette réduction du signal rouge, quantifiée par microscopie d'épifluorescence. D'après la figure 78A, l'incubation du complexe altère la morphologie des mitochondries indépendamment de l'irradiation au laser rouge. De plus, ce résultat suggère que **IrB8** agit en empêchant l'accumulation de la sonde dans la membrane mitochondriale. Il est possible que **IrB8** forme des adduits avec des protéines mitochondriales et constitue un ligand compétiteur du MTR de par son accumulation dans cet organe.



**Figure 78. IrB8 se localise dans les mitochondries**

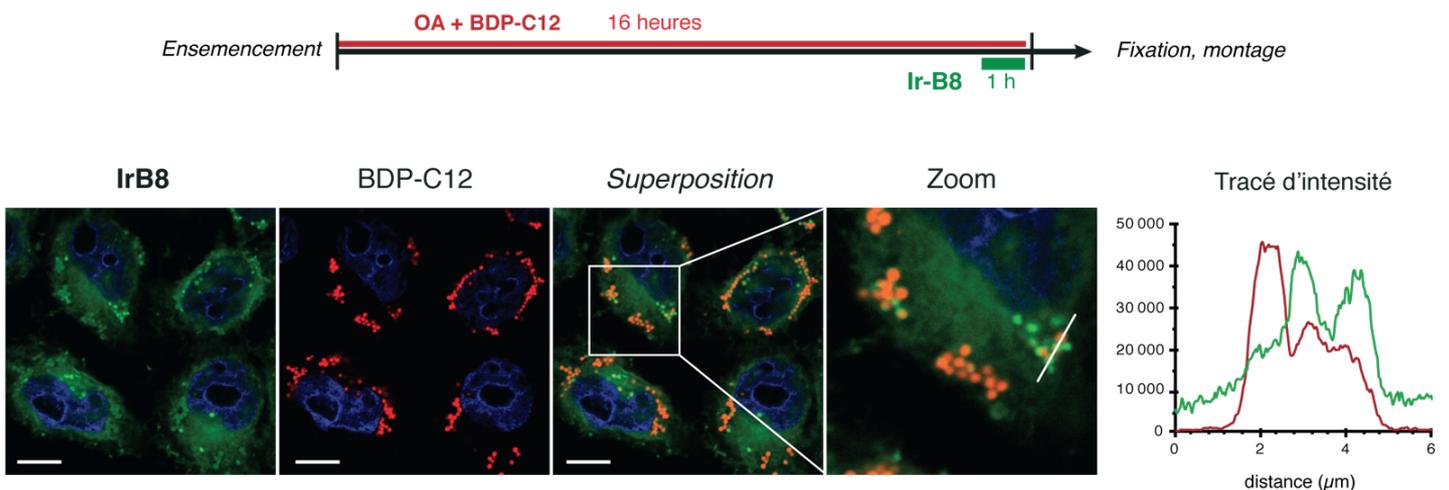
**A.** Effet de l'addition séquentielle de **IrB8** et MTR sur la morphologie et l'intensité du signal (épifluorescence)

**B.** Cellules HeLa et hTERT-RPE1 comarquée avec MTR puis **IrB8**.

Tranche confocale de 210 nm, échelle : 10  $\mu\text{m}$ , Cyan : DRAQ5 (noyau)

### 2.2.3. Gouttelettes lipidiques

Comme les lignées épithéliales HeLa et hTERT-RPE1 contiennent très peu de gouttelettes lipidiques (GL), l'acide oléique (AO) a été employé accompagné du BODIPY-C12 pour induire la formation de grandes gouttelettes fluorescentes. Pour cela, une émulsion est réalisée dans du SVF (adsorption des lipides sur les poches hydrophobes de l'albumine) et ce sérum dopé est administré aux cellules durant 16 h. Enfin, les cellules sont traitées pendant la dernière heure avec **IrB8** (Figure 79).



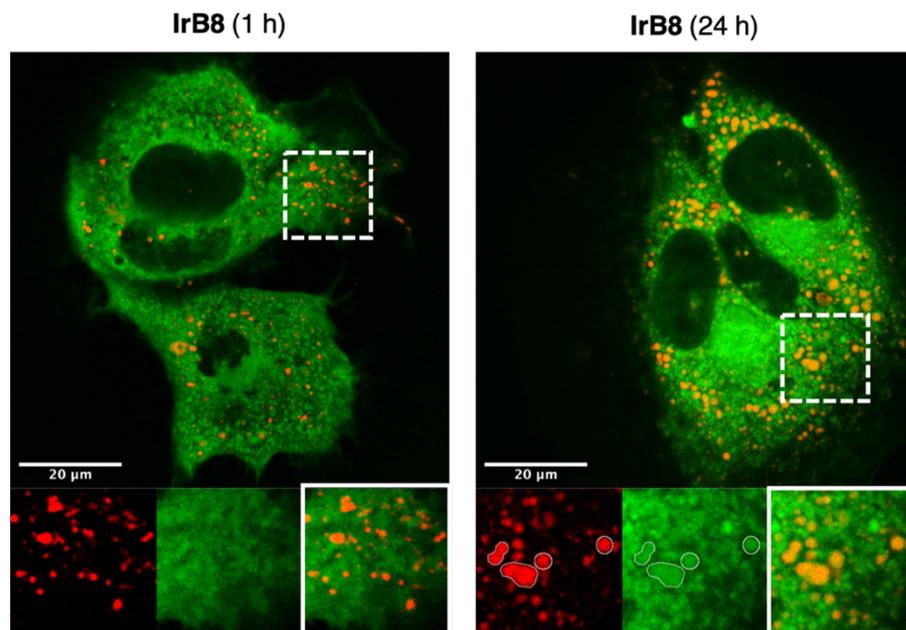
**Figure 79.** **IrB8** est incorporé dans des GL néoformées

Cellules HeLa exposées à AO:BODIPY-C12 (100:1) durant 16 h et marquées par **IrB8** pendant la dernière heure. Une tranche confocale de 210 nm de cellules colorées avec Hoechst 33342 (noyaux, bleu) et montées entre lame et lamelle. Échelle : 10 µm, segment : 6 µm.

Cette expérience montre que **IrB8** colore toutes les gouttelettes lipidiques naissantes identifiées par la fluorescence du BODIPY-C12. L'ajout séquentiel des deux marqueurs fluorescents a probablement induit l'hétérogénéité du marquage, avec un ratio d'intensité entre les deux canaux qui varie entre les différentes gouttelettes. Par conséquent, **IrB8** est incorporé dans les GL nouvellement formées mais, à la différence de BODIPY-C12 il marque également les membranes du réticulum. Nous avons ensuite comparé ce résultat au traitement par **IrB8** de cellules d'hépatocarcinome qui possèdent naturellement de larges gouttelettes matures.

### 2.3. IrB8 est véhiculé par les gouttelettes lipidiques dans le lysosome

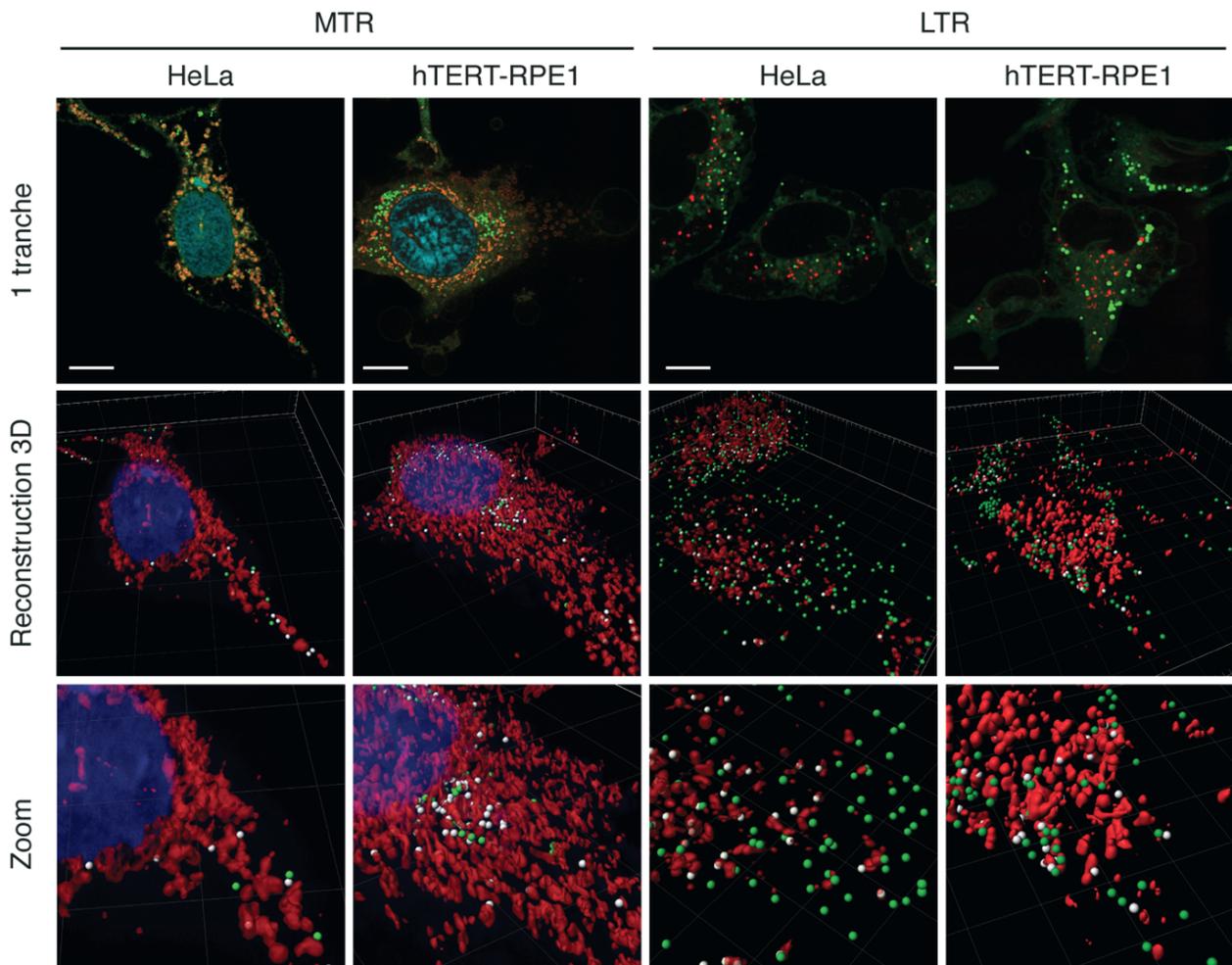
Après différents temps de traitement par **IrB8**, des cellules HuH-7 ont été colorées au Rouge du Nil qui est une sonde fluorogène commerciale communément utilisée pour colorer les gouttelettes lipidiques.<sup>[161]</sup> Il est émissif dans la plupart des solvants organiques mais non-fluorescent en solution aqueuse. Il marque parfois d'autres organites comme le réticulum endoplasmique. Le Rouge du Nil est solvatochromique, ses propriétés spectrales dépendent de la composition en lipides de son environnement (hydrophobie),<sup>[162]</sup> la bande de collection du signal **IrB8** a donc été restreinte (500-530 nm) pour ne pas inclure sa forme fluorescente jaune.



**Figure 80.** Coloration au rouge du Nil de cellules HuH7 après 1 ou 24 h en présence de **IrB8**

Dans cette expérience, **IrB8** est absent des GL après une heure de traitement, suggérant que le tropisme du complexe est restreint aux organites membranaires précédemment étudiés : RE et mitochondries. En revanche après 24 h de traitement, les gouttelettes apparaissent en orange, marquant une colocalisation qui confirme que **IrB8** ne se localise pas directement dans les gouttelettes préexistantes mais s'y accumule en passant par le RE. Par ailleurs, d'autres points intenses sont visibles sur le canal vert et ne sont pas colorés par le Rouge du Nil. Ces zones d'accumulation supplémentaires de **IrB8** visibles après 24 h de traitement peuvent être des vésicules de compartiments dégradatifs comme le lysosome. En effet, quelques publications de l'équipe de Zhe Liu (Qufu, Chine) rapportent l'accumulation de complexes semi-sandwich dans le lysosome.<sup>[163]</sup>

Nous avons dans un premier temps examiné la colocalisation de **IrB8** avec le lysosome à temps court, et constaté que très peu de vésicules LTR-positives étaient également marquées sur le canal vert. En revanche les GL chargées de **IrB8** semblent interagir avec les organites marqués par LTR et MTR (Figure 81).

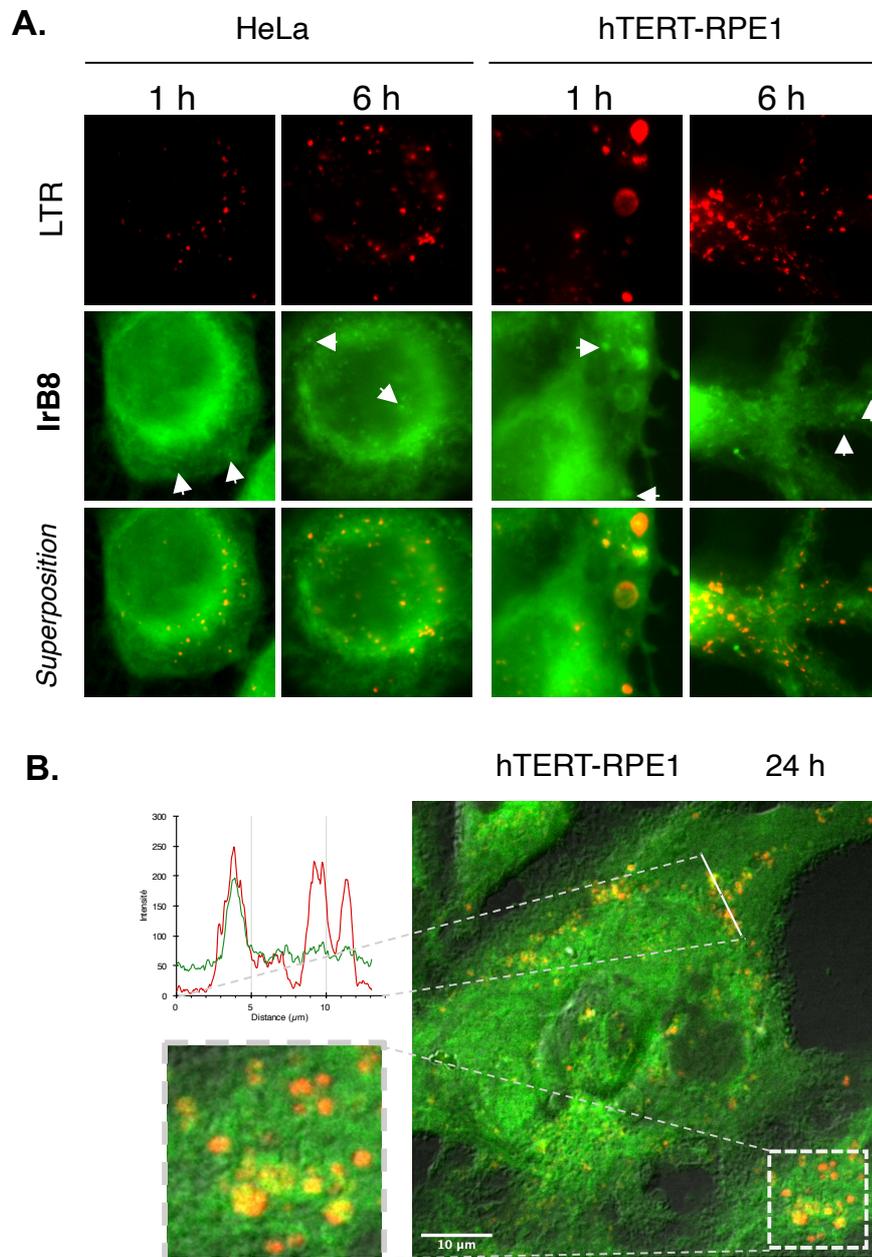


**Figure 81.** Les GL positives pour **IrB8** sont proches du lysosome et des mitochondries.

Projections Z de 31, 47, 50 et 44 tranches confocales de 210 nm imagées sur des cellules vivantes. Les GL sont modélisées par des sphères et les organites marqués (mitochondries, lysosome) apparaissent en rouge. Les GL qui interagissent avec l'organite (seuil 0.5  $\mu\text{m}$ ) sont marquées en blanc. Le noyau (bleu) a été coloré au DRAQ5 pour la condition MTR compatible. Échelle et grille : 10  $\mu\text{m}$

Les GL chargées de **IrB8** ont été modélisées par des sphères et le pourcentage de ces vésicules en interaction avec l'organite a été quantifié en utilisant un seuil de distance de 0,5  $\mu\text{m}$ . Les images 3D reconstruites sur HeLa et hTERT-RPE1 montrent que 68 et 78% de GL sont proches des mitochondries tandis que 23 et 30% d'entre elles sont proches des lysosomes après 30 min de traitement. Ce résultat suggère que les GL peuvent véhiculer **IrB8** du RE vers ces autres compartiments subcellulaires, de plus pour certaines cellules quelques lysosomes colocalisent avec **IrB8** dès 15 min de traitement. Afin de confirmer cette hypothèse nous avons

examiné la colocalisation de **IrB8** avec LTR après 1, 6 ou 24 h de traitement sur des échantillons fixés (Figure 82).



**Figure 82. IrB8 colocalise avec des vésicules du lysosome après 24 h de traitement**

**A.** Cellules traitées durant 1 ou 6 h avec **IrB8** (10  $\mu$ M) et marquées au LTR (30 min, 50nM). Images d'épifluorescence (obj 63x, 15x15  $\mu$ m), les flèches blanches indiquent des vésicules double-positives.

**B.** Cellules hTERT-RPE1 traitées durant 24 h avec **IrB8** (10  $\mu$ M), marquées au LTR (30 min, 50nM). Superposition des canaux : contraste de phase (gris), **IrB8** (vert), LTR (rouge) sur une tranche confocale de 210 nm.

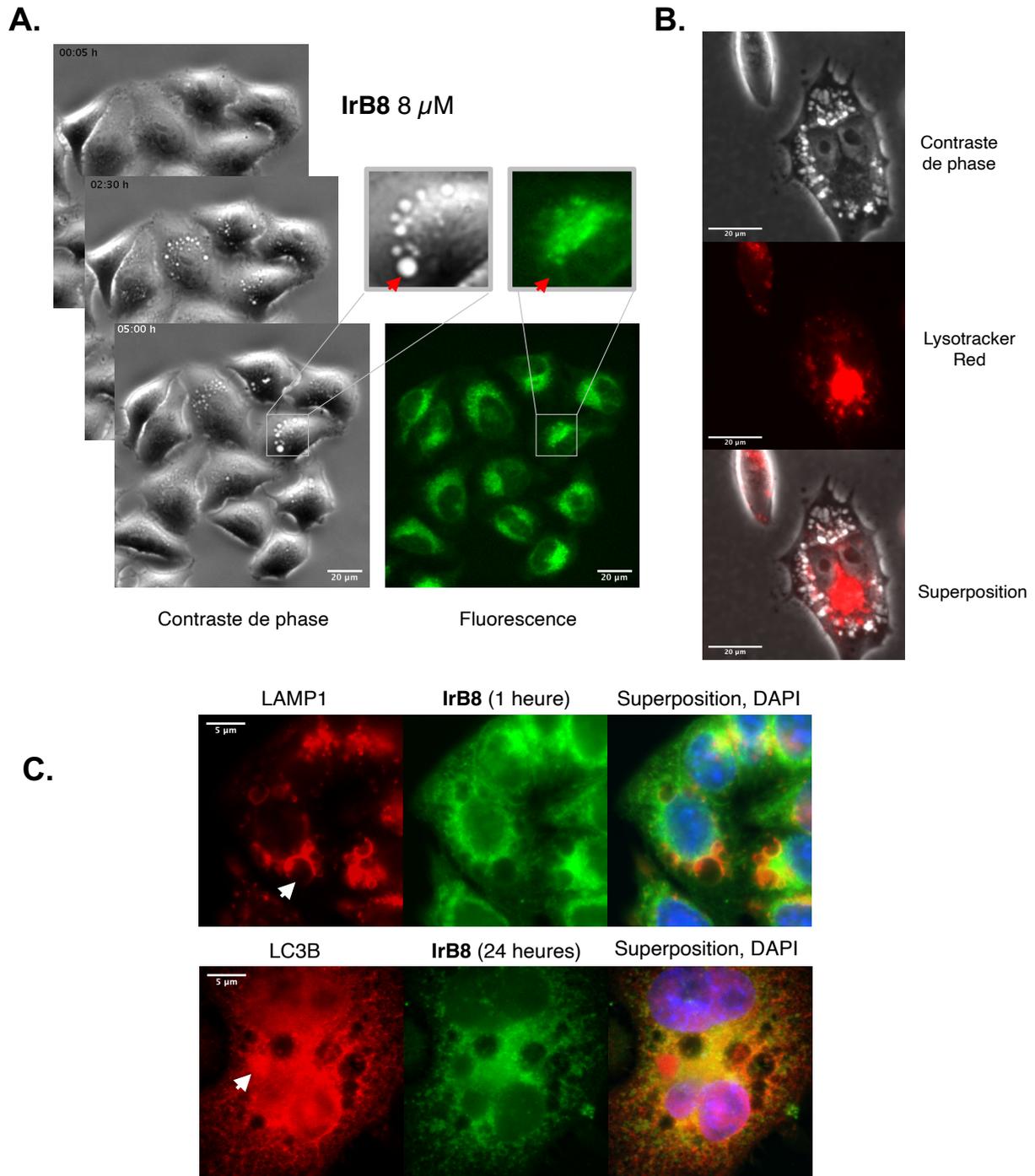
À n'importe quel temps du traitement, la localisation de **IrB8** dans les lysosomes est fréquente mais partielle, illustrant la faible mobilité des GL contenant **IrB8** (Figure 76) qui ont pu le transporter. En résumé, les principaux tropismes identifiés de **IrB8** sont les organites cytoplasmiques riches en membranes, c'est à dire le réticulum endoplasmique et les mitochondries. Nous avons montré que l'internalisation de **IrB8** est rapide et principalement due à la diffusion passive du composé à travers la membrane plasmique, aucun signe d'endocytose du composé n'ayant été détecté. Dans les 15 min suivant l'administration, **IrB8** est accumulé dans des gouttelettes lipidiques qui bourgeonnent de la membrane du RE et redistribuent à terme le complexe vers d'autres compartiments subcellulaires, notamment le lysosome. Par la suite, nous avons recherché les conséquences de cette distribution sur le trafic intracellulaire et le métabolisme.

## **2.4. IrB8 perturbe le trafic intracellulaire**

### **2.4.1. Induction de vacuolisation cytoplasmique**

Des cellules HeLa traitées durant plusieurs heures par **IrB8** présentent des vésicules très réfringentes, observées par microscopie de contraste de phase. Ces vésicules, grandissent et fusionnent avec le temps, elles sont négatives pour la fluorescence de **IrB8**. De plus, ces vésicules sont LTR-négatives donc non-acides et non fonctionnelles, démontrant qu'une vacuolisation cytoplasmique a lieu lors du traitement.<sup>[164]</sup>

La bafilomycine a été employée pour bloquer le flux autophagique et geler ce phénotype transitoire afin de mieux l'observer (Figure 83C). Certaines vacuoles sont positives pour les marquages LAMP1 et LC3B, indiquant qu'elles dérivent du compartiment endo-lysosomal et d'autophagosomes. L'accumulation de **IrB8** dans le réticulum endoplasmique a pu induire un stress osmotique à l'origine de ce phénotype, nous avons donc examiné par la suite les marqueurs de stress du RE et de l'appareil de Golgi.



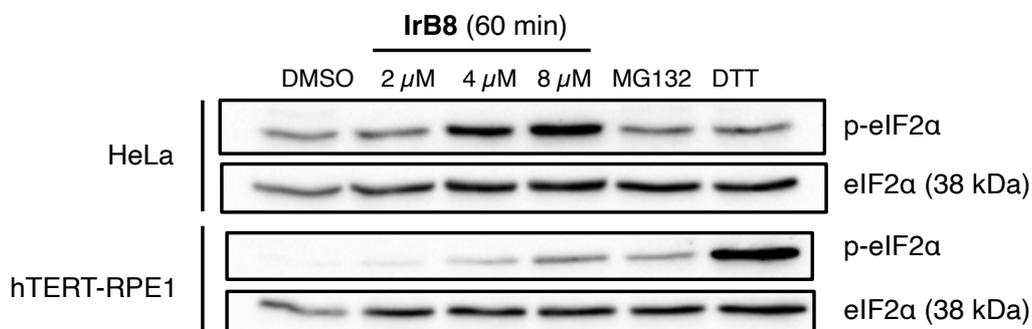
**Figure 83.** Caractérisation des vacuoles cytoplasmiques formées lors du traitement par **IrB8** (HeLa)

- A.** Cellules HeLa traitées par **IrB8** au temps indiqué et observée par microscopie de contraste de phase et de fluorescence.  
**B.** Cellules montrant le même phénotype colorées au LTR.  
**C.** Immunofluorescence LAMP1 de cellules exposées à la bafilomycine (100 nM) durant 4h30 et à **IrB8** (8  $\mu$ M) durant 3h30. Immunofluorescence LC3B de cellules exposées à **IrB8** (10  $\mu$ M) durant 24h et bafilomycine pour 4 h.

## 2.4.2. Induction d'un stress incomplet du RE

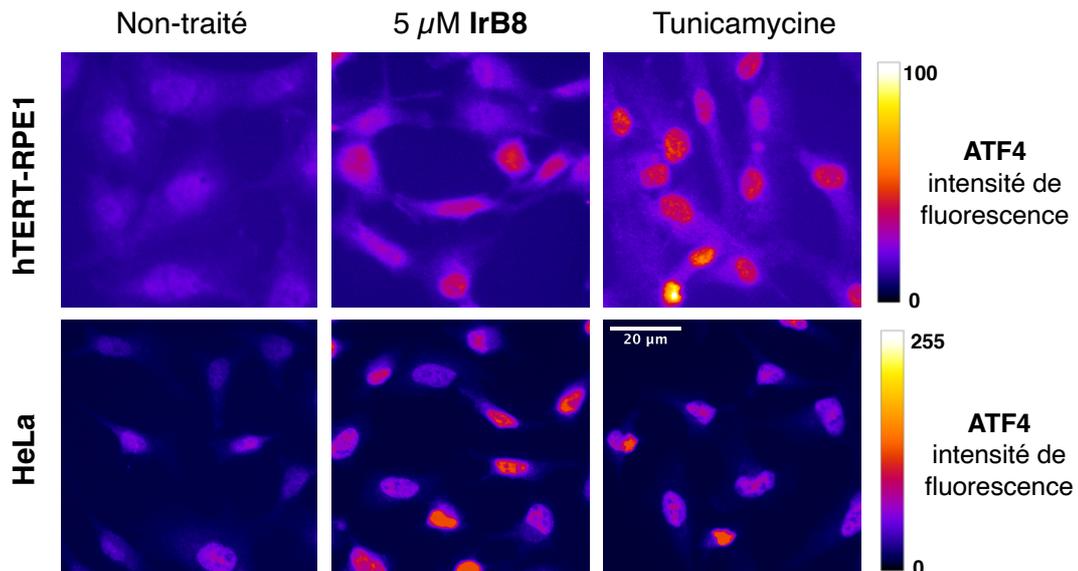
Le réticulum endoplasmique constitue le système le plus important de trafic membranaire intracellulaire. Les protéines y subissent un contrôle de qualité qui les conduira soit vers l'appareil de Golgi pour être sécrétées ou adressées au lysosome, soit vers la dégradation en cas de mauvaise conformation. L'accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE entraîne le recrutement de la chaperonne BIP/GRP78 et l'activation d'une réponse UPR (Unfolded Protein Response). Celle-ci se met en place à partir de l'activation de trois protéines transmembranaires du RE retenues par GRP78 : PERK (PKR-like ER protein Kinase), ATF6 (Activating Transcription Factor 6) et IRE-1 (Inositol Requiring Enzyme 1). Les voies de signalisation induites par ces trois composants de la réponse UPR ont pour but d'augmenter les capacités réparatrices du RE à travers le repliement, la maturation voire la dégradation des protéines mal repliées.<sup>[165]</sup> Plusieurs métallo-drogues rapportées dans la littérature sont capables d'induire un stress du RE et l'activation subséquente de la réponse UPR,<sup>[166]</sup> nous avons donc étudié le statut de plusieurs protéines d'intérêt suite au traitement des cellules par **IrB8**.

Lors d'un stress du RE, la première voie à être mise en place est l'activation de PERK par dimérisation et autophosphorylation. La kinase ainsi activée phosphoryle la sous-unité  $\alpha$  du facteur d'initiation de la traduction eIF-2 (eukaryotic translation Initiation Factor 2),<sup>[167]</sup> permettant de ralentir momentanément la synthèse protéique afin d'éviter un afflux supplémentaire de protéines dans le RE. Le statut de eIF2 $\alpha$  a donc été examiné en réponse à plusieurs doses de **IrB8** par Western blot. MG132, un inhibiteur du protéasome 26S (1  $\mu$ M, 60 min) et le DTT (2,5 mM, 30 min) ont été employés comme contrôles positifs induisant un stress du RE.<sup>[168]</sup>



**Figure 84.** **IrB8** induit un arrêt dose-dépendant de la traduction dans les deux lignées cellulaires

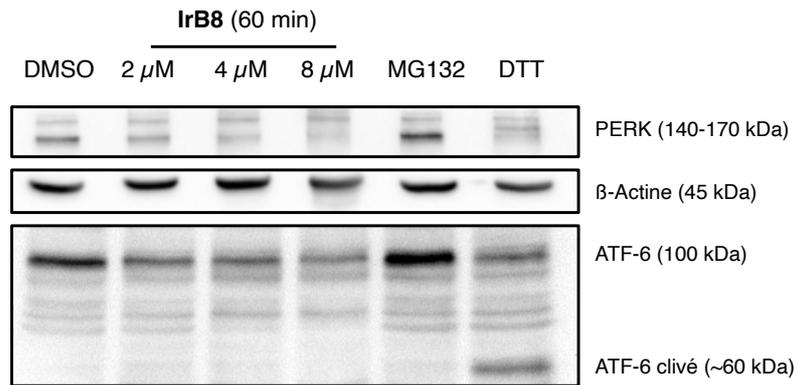
L'arrêt de la traduction induit par **IrB8** est dose-dépendant dans les deux lignées. De plus, le contrôle positif DTT a surtout induit la phosphorylation de eIF2 $\alpha$  dans la lignée hTERT-RPE1. ATF4 est également activé par le dimère de la protéine PERK. Le statut et la localisation de ce facteur de transcription ont donc été examinés par marquage immunofluorescents de cellules hTERT-RPE1 et HeLa exposées au complexe 6 et 3 h, respectivement. La Tunicamycine, un inducteur connu de la réponse UPR a été utilisé comme contrôle positif pour cette expérience.



**Figure 85.** **IrB8** induit une accumulation de ATF4 dans le noyau similaire à l'effet de la Tunicamycine

Pour les deux lignées, l'emploi de 5 μM **IrB8** a induit l'accumulation du facteur de transcription ATF4 dans le noyau des cellules. Ces résultats suggèrent donc l'activation de la voie PERK de la réponse UPR.

Le deuxième bras de la réponse au stress du réticulum est dépendant de ATF6. Lorsque GRP78 est recrutée, il est libéré dans le cytoplasme puis clivé par S1P, une sérine-protéase de la lumière du Golgi puis par S2P, une métalloprotéase de la membrane du Golgi.<sup>[169]</sup> Ensuite, la translocation de ATF6 dans le noyau lui permet d'activer différents gènes cibles de la réponse UPR. Deux formes de ATF6 peuvent donc exister, le précurseur P90 et la forme clivée P50 correspondant à l'intermédiaire cytoplasmique ou nucléaire.

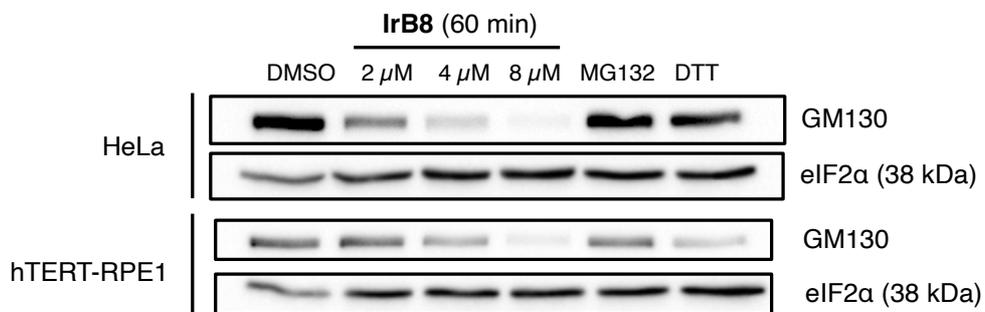


**Figure 86.** **IrB8** induit une réponse UPR incomplète dans la lignée HeLa

D'après la figure 86, **IrB8** induit un déplacement de la bande PERK vers les hauts poids moléculaires suggérant son activation par phosphorylation, ce résultat est également obtenu avec le DTT et est cohérent avec l'activation de eIF2 $\alpha$  et ATF4 observés précédemment. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à confirmer directement cette phosphorylation de PERK avec un anticorps spécifique. En ce qui concerne ATF6, la forme p90 est diminuée suite au traitement par le complexe, sans apparition de la forme clivée. Ce résultat marque une réponse UPR incomplète à l'inverse du traitement DTT. Enfin l'actine, utilisée comme contrôle de charge, montre un profil de migration légèrement altéré par l'action de **IrB8** à l'image de ATF6.

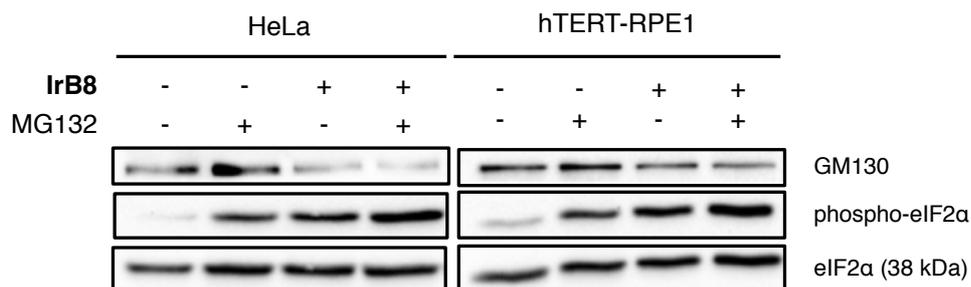
### 2.4.3. Dispersion de l'appareil de Golgi

Comme ATF6 est clivé au niveau de l'appareil de Golgi, nous avons ensuite examiné le statut de la golgine GM130, qui participe au maintien de la structure de cette organite. Dans un premier temps, l'analyse est effectuée par Western blot sur les extraits cytoplasmiques de cellules traitées pendant 1 h avec **IrB8** précédemment étudiés.



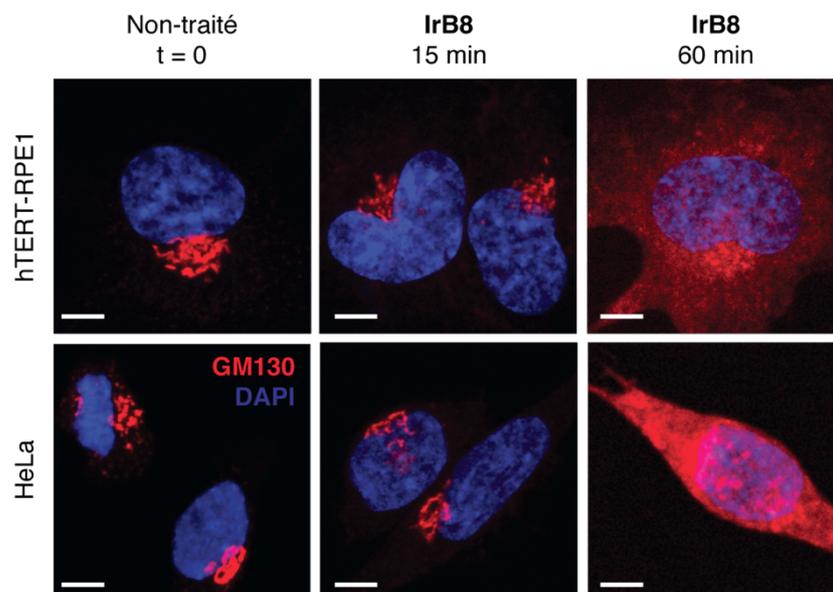
**Figure 87.** **IrB8** induit la disparition dose-dépendante de la bande GM130

La protéine eIF2 $\alpha$  étant abondante, elle a été utilisée comme contrôle de charge pour confirmer la disparition dose-dépendante de GM130 de l'extrait suite au traitement par **IrB8**. Ce résultat peut traduire une dégradation de la protéine par le protéasome, mais il peut aussi provenir de la précipitation de GM130, rendue insoluble dans l'extrait analysé. Dès lors, **IrB8** a été co-administré avec MG132 (10  $\mu$ M, 60 min) qui inhibe le protéasome et donc la possible dégradation de GM130 par cette voie. La figure 88 montre l'absence de stabilisation de GM130 dans ces conditions, ce qui exclut sa dégradation par la voie du protéasome dans les cellules traitées par **IrB8**.



**Figure 88.** Co-administration de **IrB8** et MG132 pendant 60 min

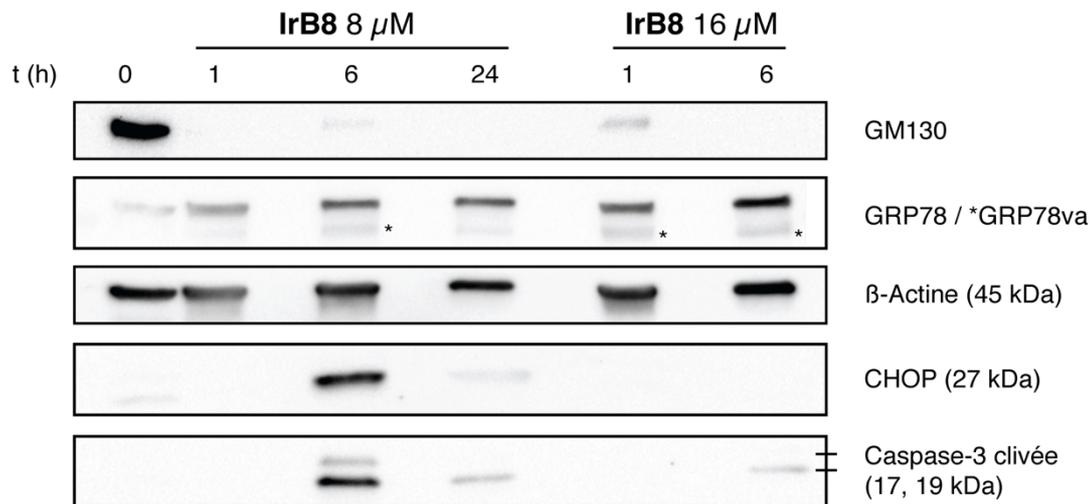
En conclusion, le traitement par **IrB8** induit probablement l'agrégation de la protéine GM130 *in vitro*, ce qui provoque la disparition de la bande de Western Blot. Par la suite, afin de mieux caractériser l'effet de **IrB8** sur l'appareil de Golgi lors du traitement, le statut de GM130 a été étudié par immunofluorescence après 15 et 60 min de traitement.



**Figure 89.** **IrB8** provoque la dispersion du Golgi des cellules HeLa et hTERT-RPE1 en 60 min

Projections Z de tranches confocales. Immunomarquage fluorescent de GM130 (rouge) après un traitement de 15 ou 60 min avec **IrB8** à 4  $\mu$ M. Marquage du noyau (DAPI, bleu). Échelle : 5  $\mu$ m.

Le maintien du repliement des réticules du Golgi est notamment assuré par GM130.<sup>[170]</sup> L'analyse par immunofluorescence de cette protéine a permis de mettre en évidence que **IrB8** provoque en 1 h la dispersion de cet organite, à une concentration 4  $\mu$ M seulement. En immunoblot, après un temps de traitement plus long, la disparition de GM130 est conservée dans la lignée HeLa (Figure 90), l'apparition des formes clivées de la caspase-3 indique que **IrB8** entraîne l'apoptose des cellules.



**Figure 90.** **IrB8** présente une toxicité durable dans la lignée HeLa, analyse par Western blot du statut de plusieurs protéines d'intérêt

Bien que la phosphorylation directe de PERK n'ait pas pu être observée, l'expression de la protéine CHOP a été relevée, de manière corrélée à l'apparition des bandes caspase-3 clivée (Figure 90). CHOP est une protéine pro-apoptotique dont la traduction est maintenue lorsque eIF2 $\alpha$  est phosphorylé,<sup>[167]</sup> son expression confirme l'activation d'ATF-4 observée précédemment par la voie de la réponse UPR dépendante de PERK. En outre, la chaperonne GRP78 présente des bandes plus intenses, suggérant une augmentation de sa synthèse et que le stress du RE induit par **IrB8** est maintenu durant 24 h. Enfin une bande supplémentaire apparaît sous GRP78, correspondant probablement à un variant cytoplasmique exprimé en cas de stress du réticulum endoplasmique.<sup>[171,172]</sup>

## 2.5. IrB8 donne des adduits fluorescents avec des protéines

Dans le deuxième chapitre, nous avons démontré par spectrométrie de masse que **Ir02** était capable de former des adduits avec la chaîne latérale d'acides aminés par échange de ligand. Cette réactivité pouvant être étendue à tous les complexes de type semi-sandwich, nous

disposons avec **IrB8** d'une molécule fluorescente similaire à **Ir-ITC** (complexe bis-cyclometallé fluorescent et capable de faire des adduits intracellulaires, présenté dans l'introduction générale). Dans la suite du chapitre, nous allons démontrer et caractériser une formation d'adduits fluorescents par des méthodes chimiques mais également tenter de visualiser les protéines fluorescentes marquées par **IrB8**.

### 2.5.1. Caractérisation des adduits *in vitro*

Une solution de **IrB8** sous sa forme chlorido, dans un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1) a été analysée par spectrométrie de masse à haute résolution. Le spectre présente deux pics majoritaires à  $m/z = 720,2544$  et  $m/z = 744,2521$ . Ces pics sont respectivement attribués aux formes **[IrB8-Cl]<sup>+</sup>** avec ou sans le remplacement de deux ligands fluorido par des ligands méthoxo sur le bore. Ce phénomène se produit vraisemblablement lors de l'ionisation electrospray, provenant du solvant et impliquant une élimination de HF. Des mélanges équimolaires de **IrB8** et de N-acétylhistidine (N-AcHis), de N-acétylcystéine (ester méthylique) (NAC), de phénylbutylamine modélisant la lysine et de butyramide modélisant l'asparagine ont été analysés de la même façon après une heure d'incubation à 37°C. Des adduits sont détectés pour les trois premiers substrats, l'abondance relative de ces adduits par rapport à la forme neutre est présentée dans le tableau 11. Pour ces pics, le décalage de 23,9977 unités de masse correspondant à l'échange des ligands fluorido du BODIPY n'a pas été observé.

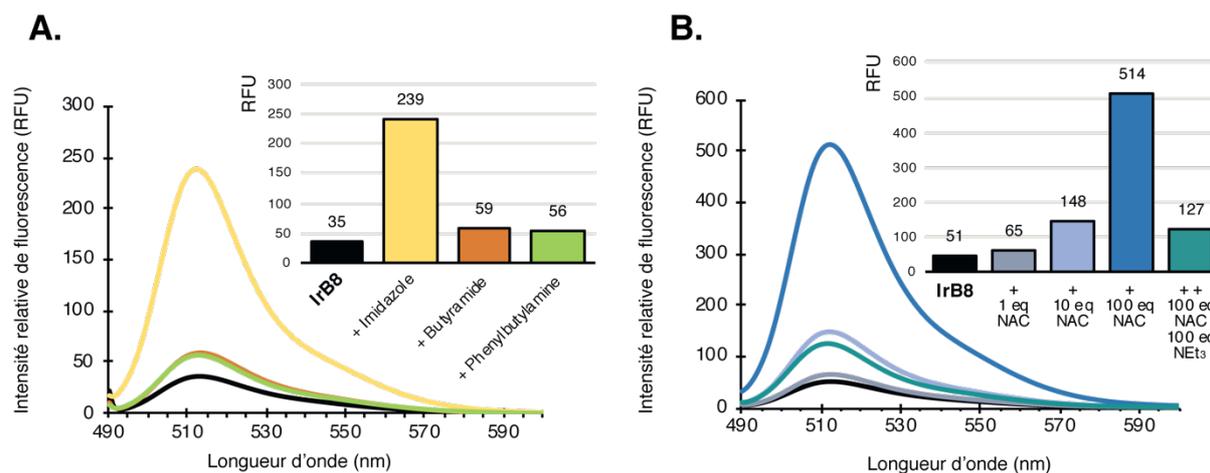
Substrat	N-AcHis*	NAC	Phénylbutylamine	Butyramide
<i>m/z</i> calculé	897,3009	917,3349	869,3753	807,3233
Intensité relative de l'adduit (%)	70,0	49,4	3,8	0
<i>m/z</i> obtenu	897,3008	917,3348	869,3750	-

**Tableau 11.** Adduits observés par HRMS-ESI+ après incubation avec différents substrats

\*Spectre identique pour l'incubation avec 1 eq. de triéthylamine

La réaction ayant été réalisée dans un milieu aqueux, l'eau a pu favoriser la formation de ces adduits via un complexe *aqua* intermédiaire déjà observé pour cette classe de composés.<sup>[42,58]</sup> Nous avons ensuite examiné les propriétés de fluorescence de ces adduits.

La réaction entre **IrB8** (sous forme neutre chlorido) et un excès de différents substrats (imidazole, NAC, phénylbutylamine, butyramide) dans le DCM a été analysée par spectroscopie de fluorescence. Comme indiqué précédemment, **IrB8** est peu émissif dans le DCM sous sa forme chlorido et la présence d'excès d'amine ou d'amide n'a pas grandement le spectre de façon notable. En revanche, l'ajout d'un excès d'imidazole ou de NAC a entraîné une augmentation de la fluorescence de la solution de **IrB8** (Figure 91A).



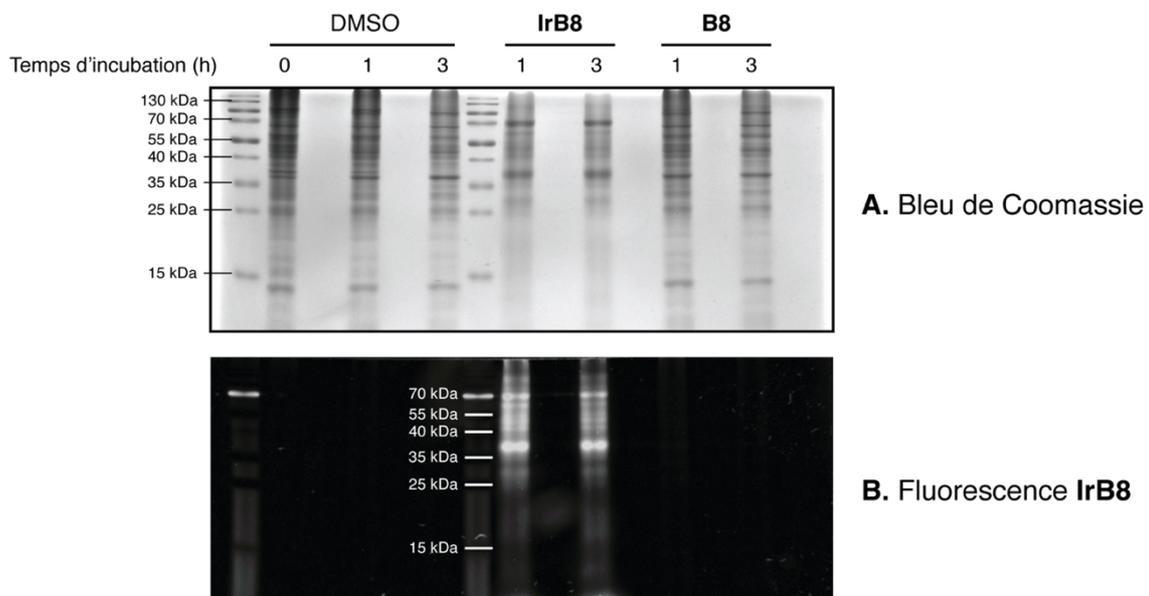
**Figure 91.** Spectres d'émission de **IrB8** incubé avec divers substrats (excitation 488 nm)

Cette observation est en accord avec la formation d'adduits cationiques observée précédemment par spectrométrie de masse, via la substitution du ligand chlorido par l'imidazole ou par la fonction thiol de la NAC. En outre, si l'on ajoute un large excès de triéthylamine au mélange **IrB8** + excès de NAC, l'intensité de fluorescence mesurée affaiblie. Cette diminution de fluorescence indique que la déprotonation du thiol permet la formation subséquente d'un complexe neutre non-émissif (Figure 91B).

En conclusion, ces différentes expériences prouvent que le complexe **IrB8** est capable de réagir avec des modèles de la chaîne latérale d'acides aminés. De plus, les propriétés spectrales des adduits dépendent de la charge au niveau de l'atome d'Iridium. À pH physiologique, aucun acide aminé ne peut se comporter comme un ligand anionique de l'iridium, contrairement aux chlorures en solution. Par conséquent, la formation d'adduits protéiques non-fluorescents est à écarter dans le contexte des expériences de biologie et la totalité des adduits que **IrB8** peut former sur des protéines devraient être détectables.

## 2.5.2. Incubation avec un lysat cellulaire

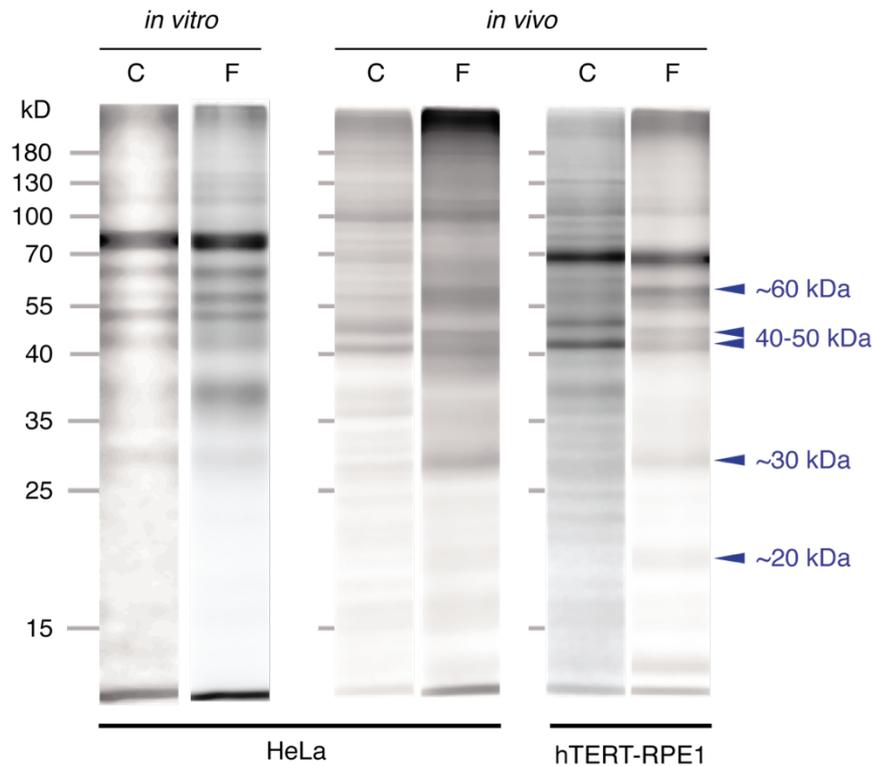
Afin de confirmer cette formation d'adduits sur des macromolécules, la réactivité de **IrB8** a été examinée avec les protéines d'un extrait cellulaire soluble. Pour cela, un extrait total de cellules HeLa est obtenu par solubilisation avec 1% de Triton-X100 puis lyse mécanique des cellules au moyen d'un piston. L'extrait est ensuite incubé avec **IrB8** (10  $\mu$ M) ou **B8** (1  $\mu$ M) et les protéines sont séparées par SDS-PAGE. Les profils de fluorescence du gel de polyacrylamide fixé est comparé à la coloration au bleu de Coomassie représentant le contenu total en protéines (Figure 92A). À l'image de la condition contrôle (extrait incubé avec le DMSO), les pistes de **B8** ne sont pas fluorescentes, confirmant que le motif BODIPY ne forme pas de liaisons fortes avec les protéines.



**Figure 92.** **IrB8** forme des adduits covalents avec les protéines *in vitro*

À l'inverse, **IrB8** rend les protéines fluorescentes avec une intensité comparable après une ou trois heures d'incubation. Les profils de fluorescence sont identiques à ceux du bleu de Coomassie, indiquant que **IrB8** réagit avec la vaste majorité des protéines dans ces conditions et reste fortement lié malgré les conditions dénaturantes et réductrices employées. Enfin, on observe que des bandes disparaissent, suggérant qu'elles ont été rendues insolubles suite à leur réaction avec **IrB8**. Enfin, les profils de ces traitements sont globalement altérés en comparaison avec les pistes contrôle.

Afin de déterminer si ces adduits protéiques pouvaient également être formés *in cellulo*, des cellules HeLa et hTERT-RPE1 vivantes ont été traitées avec **IrB8** pendant une heure à une concentration de 10  $\mu$ M. Après la récolte et la lyse des cellules au moyen de 1% Triton X-100, les extraits protéiques ont été traités et analysés de la même manière que précédemment.

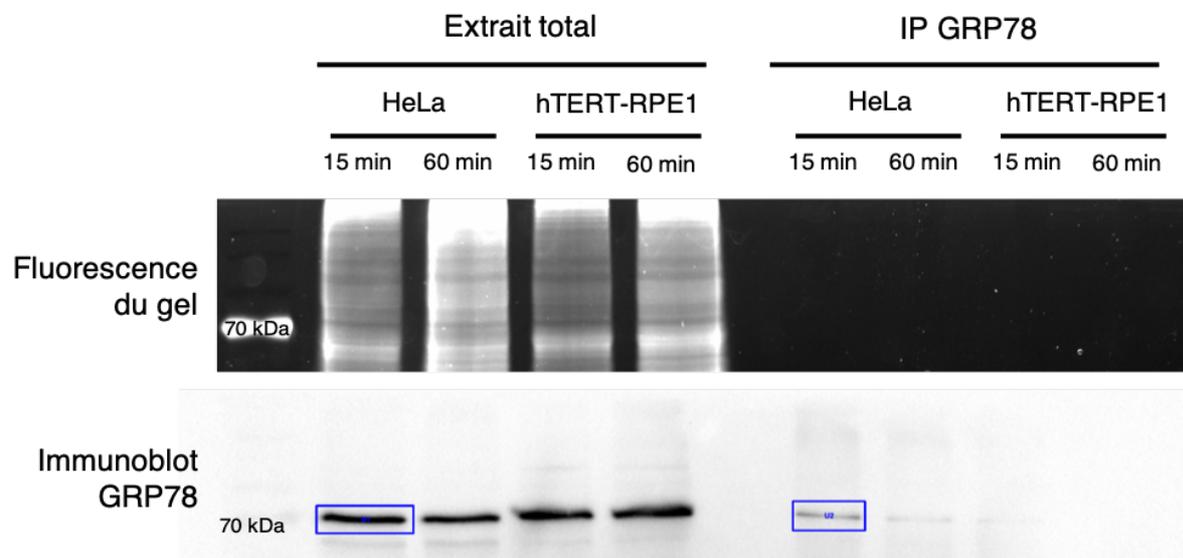


**Figure 93.** Visualisation des adduits protéiques de **IrB8** après traitement de cellules vivantes

Dans les deux lignées cellulaires, et plus particulièrement pour les hTERT-RPE1, les profils de protéines totales (C) et de fluorescence (F) sont différents, démontrant que dans ces conditions, **IrB8** forme des adduits sélectifs avec certaines protéines (Figure 93, flèches). En principe, ces protéines pourraient être localisées dans le réticulum endoplasmique (et les mitochondries), où **IrB8** a montré une accumulation préférentielle.

### 2.5.3. Immunoprécipitation de GRP78

La chaperonne GRP78 est une protéine abondante du RE, elle comporte de nombreuses cystéines accessibles et pourrait être une cible de **IrB8**. Afin de déterminer si cette protéine était rendue fluorescente par **IrB8**, elle a été purifiée par immunoprécipitation. Pour cela, les immunoprécipitats provenant d'extraits de cellules traitées *in vivo* par **IrB8** ont été analysés par électrophorèse dans deux gels. Un des deux gels a été transféré sur membrane et immunomarcqué avec l'anticorps anti-GRP78. La révélation par chimioluminescence de cette membrane est comparée à la fluorescence de l'autre gel (Figure 94). Dans toutes les conditions, une très faible quantité de protéine GRP78 a pu être isolée à partir des extraits totaux.



**Figure 94.** Immunoprécipitation de GRP78 dans des extraits de cellules traitées par **IrB8**

Image de fluorescence et révélation WB de GRP78 pour le traitement *in vivo*. La bande d'immunoprécipitation représente 30% de la bande d'extrait total pour la condition HeLa 15 min.

Comme le montre la figure 94, le gel est exempt de fluorescence dans la partie des immunoprécipitats, bien que l'on retrouve le marquage de l'extrait total. La quantité de protéine purifiée est vraisemblablement trop faible pour que des adduits puissent être détectés. Néanmoins, ce résultat montre également que les bandes d'immunoprécipitation de GRP78 sont affaiblies par le temps de traitement. Il est donc possible **IrB8** puisse former des adduits avec GRP78, causant son agrégation et la rendant insoluble à l'image de GM130.

## Conclusion

Dans ce troisième chapitre, nous avons rapporté la synthèse et la caractérisation de plusieurs complexes d'iridium semi-sandwich comportant un substituant fluorescent de type BODIPY sur leur ligand chélatant. Le dérivé de la série (phox) **IrB8** s'est avéré être le meilleur candidat pour des analyses de biologie. En effet, les complexes de la série (vinypy) se sont montrés relativement peu hydrosolubles, avec une tendance à s'agréger et perdre leurs propriétés d'émission malgré les modifications chimiques envisagées pour les rendre moins lipophiles.

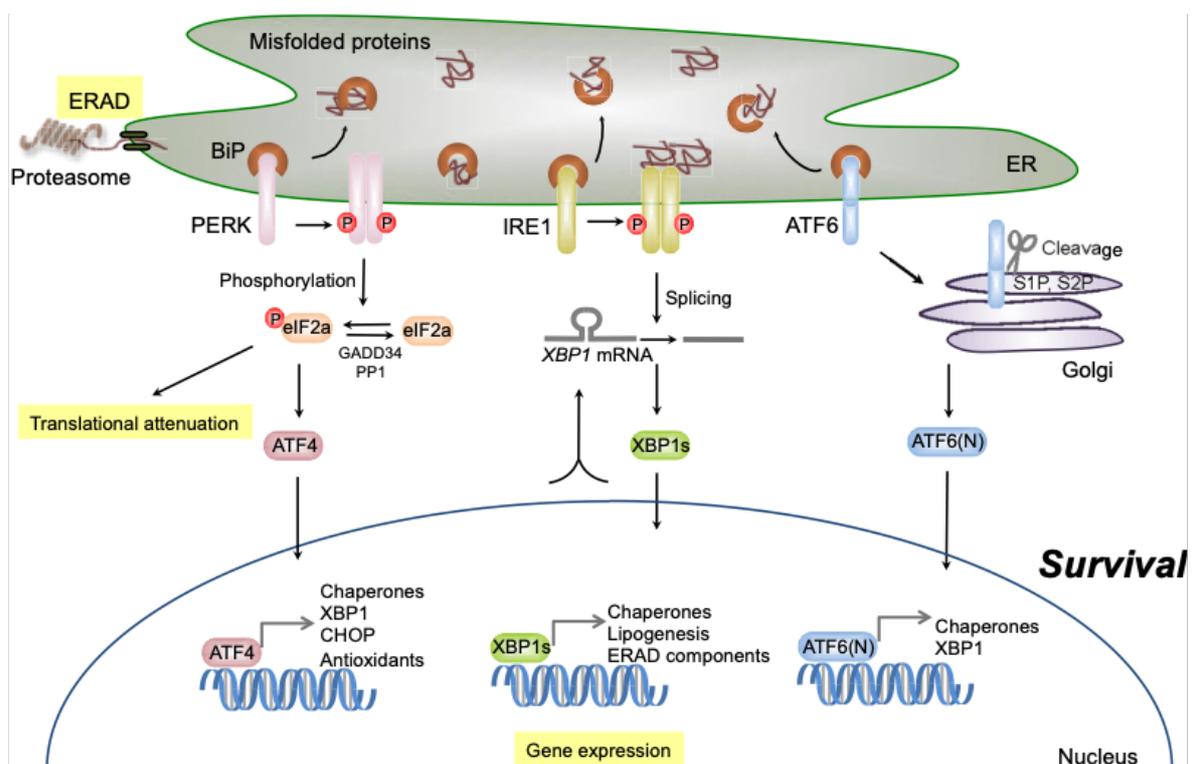
Nous avons anticipé que l'entité lipophile BODIPY adresserait le complexe dans des compartiments subcellulaires riches en membranes tels que le RE et les mitochondries. Ainsi, nous souhaitons examiner quels impacts ont les propriétés oxydantes précédemment décrites pour **Ir02** dans ces organites sièges du métabolisme et du trafic intracellulaire. En outre, les propriétés de fluorescence de **IrB8** nous ont permis de le détecter dans le contexte intracellulaire. En effet, sous sa forme cationique, ce complexe est très émissif et présente un rendement quantique comparable à celui de son ligand. Cette émission de fluorescence concerne donc le complexe sous la forme **IrB8-DMSO** mais aussi les éventuels adduits protéiques.

En analysant la distribution intracellulaire de **IrB8** par microscopie confocale, nous avons démontré qu'il était rapidement internalisé par diffusion passive à travers la membrane plasmique, puis accumulé dans le réticulum endoplasmique et la mitochondrie. Ce tropisme est cohérent avec le caractère cationique et hydrophobe du complexe. Par la suite, des gouttelettes lipidiques contenant **IrB8** bourgeonnent depuis la membrane du réticulum et peuvent l'entraîner vers d'autres organites, notamment le lysosome. Cette localisation ne résulte pas directement de l'endocytose du composé ni du trafic du RE vers le lysosome contrairement à d'autres composés.

Le traitement de cellules par **IrB8** induit l'activation de plusieurs senseurs du stress du RE de la voie PERK comme eIF2 $\alpha$ , ATF4 et CHOP dans les lignées cellulaires HeLa et hTERT-RPE1. L'accumulation de **IrB8** dans le RE altère donc certainement ses fonctions de repliement des protéines. De plus, une dispersion irréversible et dose-dépendante de l'appareil de Golgi est observée dans l'heure suivant l'administration du complexe, marquant un trafic intracellulaire sévèrement affecté. Un phénotype de vacuolisation cytoplasmique survient

fréquemment quelques heures plus tard, comme conséquence de ces stress du RE et du Golgi. Somme toute, ces résultats suggèrent un mécanisme moléculaire menant à la mort cellulaire observée par vidéo-microscopie, impédancemétrie et Western blot.

**IrB8** est le premier complexe semi-sandwich d'iridium rapporté pour induire un stress du RE, d'autres complexes d'iridium présentant ces propriétés sont de type bis-cyclométallés.<sup>[166,173]</sup> Les trois voies principales de la réponse au stress du réticulum sont schématisées ci-dessous, la voie IRE1 n'a pas été étudiée dans ce chapitre et pourrait apporter des éléments de compréhension supplémentaires quant à la survie des cellules traitées par **IrB8**.



**Figure 95.** Voies de survie de la réponse UPR<sup>[174]</sup>

Comment **IrB8** induit-il cette réponse UPR incomplète ? Selon J. Wilson et coll. il existe cinq causes pour l'induction d'un stress du RE par des complexes métalliques : interaction directe avec la machinerie de l'UPR, perturbation des chaperonnes responsables du repliement des protéines, inhibition de la dégradation des protéines, interférence avec le trafic du  $\text{Ca}^{2+}$  et production d'ERO.<sup>[173]</sup> Dans le cas de **IrB8**, plusieurs de ces causes sont reflétées : il pourrait induire directement le recrutement de GRP78 comme le suggère l'expérience

d'immunoprécipitation où GRP78 serait rendue insoluble ou non-fonctionnelle suite à la formation d'adduits. D'un autre côté, **IrB8** a pu produire des ERO à l'image de **Ir02**. En accord avec cette hypothèse, il a été montré qu'une production d'ERO associée à un stress du RE (co-traitement H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et Tunicamycine) pouvait induire l'autophagie de cellules d'hépatocarcinome, en association avec une forte élévation des niveaux de LC3B et une plus modeste activation des caspases 9 et 3 en comparaison à une exposition à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seul.<sup>[175]</sup>

Pourtant, **IrB8** s'est montré 2 fois moins cytotoxique que ses analogues **Ir01-10** en terme d'IC<sub>50</sub> sur la lignée HeLa. Ce résultat contraste avec l'adjonction d'un BODIPY sur le ligand labile (qui diminuait grandement l'IC<sub>50</sub> du complexe **Ir12-B1**), il montre que la toxicité des complexes de type semi-sandwich n'est pas simplement liée à leur caractère hydrophobe.

Finalement, cette approche a permis de démontrer que les complexes d'iridium de type semi-sandwich peuvent former des adduits covalents sur les protéines, principalement via la coordination d'un atome de soufre ou d'azote des résidus de cystéine et d'histidine. Cette réactivité a permis au complexe **IrB8** de marquer les structures subcellulaires dans lesquelles il s'accumule en créant des liaisons fortes avec les protéines qui y sont associées. De manière plus générale, cette stratégie pourrait être adaptée pour adresser des complexes d'iridium à d'autres compartiments par adjonction d'autres groupes fonctionnels. Par exemple, l'adjonction d'un peptide ciblant un récepteur transmembranaire pourrait « forcer » l'internalisation du composé par la voie de l'endocytose, ce qui permettrait de démasquer d'autres propriétés biologiques.

L'identification des protéines marquées par **IrB8** s'avère compliquée en pratique, elle nécessiterait une purification des extraits par une colonne pourvue de détection de fluorescence, et/ou l'analyse par spectrométrie de masse protéomique d'un extrait purifié. Cette analyse est rendue d'autant plus complexe que les adduits de **IrB8** peuvent être situés sur des peptides aléatoires. Pour la suite de ce projet, nous avons donc envisagé une méthode de purification moins biaisée répondant à cette problématique, elle fait l'objet du chapitre suivant.

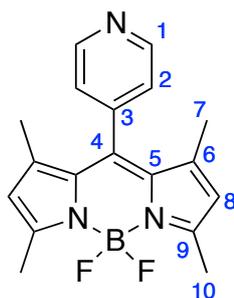
## Partie expérimentale

### 1. Synthesis of various fluorescent iridium compounds

The same materials and instrumentation as in Chapter 1 were used to isolate the following molecules.

#### **B1: 4,4-Difluoro-8-(pyridin-4-yl)-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene**

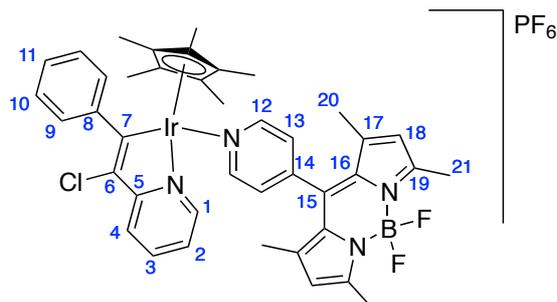
2,4-dimethylpyrrole (1.0 mL, 13 mmol, 2.1 eq.) and 4-pyridinecarboxylaldehyde (570  $\mu$ L, 6.0 mmol, 1.0 eq.) were dissolved in degassed DCM (350 mL). A solution of TFA (100  $\mu$ L, 0.02 mol%) was added to initiate the reaction. The mixture was stirred at r.t. for 4 days. The solution turned black. P-chloranil (1.48 g, 2.8 mmol, 1.0 eq.) was added and the mixture was stirred for 3 h. DIEA (7.3 mL, 42 mmol, 7.0 eq.) was added to the solution and the mixture was stirred for 1 h. Finally,  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  (6.7 mL, 54 mmol, 9.0 eq.) was carefully added and the white smoke formed was evacuated with  $\text{N}_2$  flow. The solution was stirred overnight at r.t. and filtered through a pad of alumina (basis activated Brockmann Type 1), the violet solid was retained and washed with DCM to elute a fluorescent fraction. After purification by chromatography on silica gel with DCM/AcOEt (9:1), the expected product was obtained as red solid (399 mg, 22%).



$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 8.78 (d, 2H,  $J = 5.9$  Hz,  $\text{H}_1$ ), 7.52 (d, 2H,  $J = 5.9$  Hz,  $\text{H}_2$ ), 6.22 (s, 2H,  $\text{H}_8$ ), 2.46 (s, 6H,  $\text{H}_{10}$ ), 1.37 (s, 6H,  $\text{H}_7$ ).  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 156.47( $\text{C}_1$ ), 150.65( $\text{C}_9$ ), 143.58( $\text{C}_4$ ), 142.63( $\text{C}_6$ ), 137.65( $\text{C}_5$ ), 130.34( $\text{C}_3$ ), 123.32( $\text{C}_2$ ), 121.80( $\text{C}_8$ ), 14.58( $\text{C}_{7,10}$ ). HRMS (ESI+):  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{BF}_2\text{N}_3$ : 348.1457; found: 348.1462  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

#### **IrV2-B1: [(4,4-Difluoro-8-(pyridin-4-yl)-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene- $\kappa\text{N}$ )( $\eta^5$ -pentamethylcyclopentadienyl)((Z)-2-(1-chloro-2-phenylvinyl- $\kappa\text{C}^2$ )pyridine- $\kappa\text{N}$ )Iridium (IV)] Hexafluorophosphate**

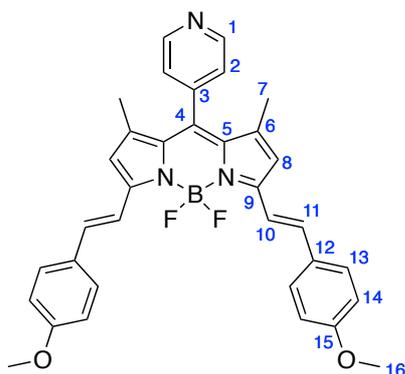
**IrV2** (50 mg, 86  $\mu$ mol, 1.0 eq.) was dissolved in DCM (10 mL) and  $\text{AgNO}_3$  (14.7 mg, 86  $\mu$ mol, 1.0 eq.) was added to the solution. After about 1 h stirring it became turbid (formation of a white salt) and **B1** (84.4 mg, 260  $\mu$ mol, 3.0 eq.) was added. Stirring continued at rt for 3 days.  $\text{NH}_4\text{PF}_6$  (70.5 mg, 432  $\mu$ mol, 5.0 eq.) was added and after 10 min stirring, the solution was filtered through Celite® and evaporated to dryness. The crude product (red semi-solid) was purified by precipitation in a minimum of DCM and cyclohexane to yield 84 mg of pure product as a bright orange solid (96%).



**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ (ppm): 8.74 (d, 1H, *J* = 5.4 Hz, H<sub>1</sub>), 8.65 (d, 2H, *J* = 5.5 Hz, H<sub>12</sub>), 7.83 (t, 1H, *J* = 8.3 Hz, H<sub>3</sub>), 7.71 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz, H<sub>4</sub>), 7.50 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz, H<sub>12</sub>), 7.44 – 7.31 (m, 5H<sub>Ar</sub>), 6.02 (s, 2H, H<sub>18</sub>), 2.49 (s, 6H, H<sub>20</sub>), 1.46 (s, 15H, H<sup>Cp\*</sup>), 1.13 (s, 6H, H<sub>21</sub>). **<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR** (101 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ (ppm): 172.27(C<sub>7</sub>), 164.71(C<sub>5</sub>), 157.96(C<sub>12</sub>), 155.73, 151.31, 147.54, 143.92, 142.55, 140.43, 135.15, 130.20, 128.76, 128.54, 128.45, 128.29, 125.30, 124.98, 122.81, 122.48, 92.57(C<sup>Cp\*</sup>), 27.51-14.99-14.79(C<sub>20,21</sub>), 8.94(CH<sub>3</sub><sup>Cp\*</sup>). **HRMS** (ESI<sup>+</sup>): *m/z* calculated for C<sub>41</sub>H<sub>42</sub>BClF<sub>2</sub>IrN<sub>4</sub>: 867.2783; found: 867.2788 [M]<sup>+</sup> (loss of ligand).

#### **B2: 4,4-Difluoro-8-(pyridin-4-yl)-1,7-dimethyl-3,5-(4-methoxystyryl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene**

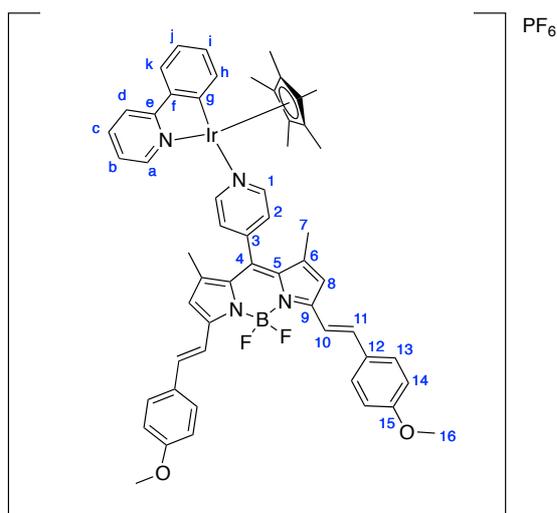
**B1** (205 mg, 630 μmol, 1.0 eq.) was dissolved in dry MeCN (20 mL) with activated 4A MS (400 mg) and the following reactants were added under inert atmosphere while stirring : p-anisaldehyde (306 μL, 2.522 mmol, 4.0 eq.) ; pyrrolidine (311 μL, 3.783 mmol, 6.0 eq.) and acetic acid (216 μL, 3.783 mmol, 6.0 eq.). White smoke was formed when adding the last reagent. The reaction mixture was stirred at 80°C for about 2h and turned from brown-red to dark blue. Work up : the mixture was filtered and diluted with AcOEt (~100 mL), washed three times with 0.05M HCl (~100 mL) and once with brine. Since the combined acidic aqueous phase kept a characteristic dark blue color (protonated pyridin), sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> solution was added until pH>4 and it was extracted with AcOEt. 650mg of crude product were obtained as a black powder. TLC showed a blue spot and a pink minor spot (mono-knoevenagel) while the excess of aldehyde migrated to the top of the plate. The crude product was purified by two column chromatographies over SiO<sub>2</sub> (50g, Cy/AcOEt 3:7 then 40g, DCM->DCM/AcOEt 9:2) to afford the pure product as a golden solid. (120 mg, 34%)



**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ (ppm): 8.77 (d, 2H, *J* = 5.7 Hz, H<sub>1</sub>), 7.60 (d, 4H, *J* = 8.7 Hz, H<sub>13</sub>), 7.56 (d, 2H, *J* = 16.3 Hz, H<sub>10</sub>), 7.37 (d, 2H, *J* = 5.7 Hz, H<sub>2</sub>), 7.28 (d, 2H, *J* = 16.3 Hz, H<sub>11</sub>), 6.96 (d, 4H, *J* = 8.7 Hz, H<sub>14</sub>), 6.68 (s, 2H, H<sub>8</sub>), 3.86 (s, 6H, H<sub>16</sub>), 1.50 (s, 6H, H<sub>7</sub>). **<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR** (101 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ (ppm): 160.76(C<sub>15</sub>), 153.53(C<sub>9</sub>), 150.70(C<sub>1</sub>), 144.11(C<sub>4</sub>), 141.23(C<sub>3</sub>), 136.67(C<sub>5</sub>), 129.57(C<sub>3</sub>), 129.33(C<sub>13</sub>), 124.13(C<sub>2</sub>), 123.04(C<sub>11</sub>), 118.19(C<sub>8</sub>), 117.18(C<sub>10</sub>), 117.07(C<sub>12</sub>), 114.49(C<sub>14</sub>), 55.56(C<sub>16</sub>), 15.03(C<sub>7</sub>).

**Ir12-B2: [(4,4-Difluoro-8-(pyridin-4-yl-κN)-1,7-dimethyl-3,5-(4-methoxystyryl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene)(η<sup>5</sup>-pentamethylcyclopentadienyl)(2-phényl-κC<sup>2</sup>)pyridine-κN]Iridium (IV)] Hexafluorophosphate**

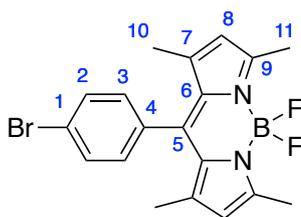
**Ir12** (25 mg, 48 μmol, 1.0 eq.) was dissolved in 5 mL of DCM and AgNO<sub>3</sub> (8.7 mg, 48 μmol, 1.0 eq.) was added to the stirred solution. After about 15 min it became turbid and a solution of **B2** (54.3 mg, 97 μmol, 2.0 eq.) in DCM (10 mL) was added. Stirring continued at rt for 3 days. NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub> (70.5 mg, 432 μmol, 5.0 eq.) was added and after 10 min stirring, the solution was filtered through Celite and evaporated to dryness. The crude product (turquoise solid) was purified by precipitation in a minimum of DCM and using Et<sub>2</sub>O to yield 39 mg of pure product as a dark blue solid (68%).



**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ (ppm): 8.95 (d, 1H, *J* = 5.6 Hz, H<sub>a</sub>), 8.44 (d, 2H, *J* = 6.2 Hz, H<sub>i</sub>), 7.95 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, H<sub>h</sub>), 7.87 (m, 2H, H<sub>c,d</sub>), 7.68 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, H<sub>k</sub>), 7.57 (d, 4H, *J* = 8.3 Hz, H<sub>l</sub>), 7.56 (d, 2H, *J* = 16Hz, H<sub>10</sub>), 7.48-7.41 (m, 2H, H<sub>b,j</sub>), 7.22 (d, 2H, *J* = 6.2 Hz, H<sub>2</sub>), 7.21 (d, 2H, *J* = 16Hz, H<sub>11</sub>), 7.18 (m, 1H, H<sub>i</sub>), 6.94 (d, 4H, *J* = 8.7 Hz, H<sub>14</sub>), 6.59 (s, 2H, H<sub>8</sub>), 3.84 (s, 6H, H<sub>16</sub>), 1.66 (s, 15H, H<sup>Cp\*</sup>), 1.09 (s, 6H, H<sub>7</sub>). **<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR** (101 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ (ppm): 167.56(C<sub>g</sub>), 161.57(C<sub>15</sub>), 161.37(C<sub>e</sub>), 154.36(C<sub>1</sub>), 154.21(C<sub>9</sub>), 151.85(C<sub>a</sub>), 147.30(C<sub>4</sub>), 145.55(C<sub>f</sub>), 141.00(C<sub>5</sub>), 139.88(C<sub>c</sub>), 137.82(C<sub>11</sub>), 135.21(C<sub>h</sub>), 132.96(C<sub>j</sub>), 132.05(C<sub>6</sub>), 131.33(C<sub>3</sub>), 129.73(C<sub>13</sub>), 129.68(C<sub>12</sub>), 127.96(C<sub>2</sub>), 125.51(C<sub>b</sub>), 125.10(C<sub>k</sub>), 124.78(C<sub>i</sub>), 120.15(C<sub>d</sub>), 118.94(C<sub>8</sub>), 116.93(C<sub>10</sub>), 114.97(C<sub>14</sub>), 91.11(C<sup>Cp\*</sup>), 55.98(C<sub>16</sub>), 14.88(C<sub>7</sub>), 8.96(CH<sub>3</sub><sup>Cp\*</sup>). **HRMS** (ESI+): *m/z* calculated for C<sub>55</sub>H<sub>53</sub>BF<sub>6</sub>IrN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: 1043.3853; found: 1043.3863 [M]<sup>+</sup> (loss of ligand).

**4,4-Difluoro-8-(4-bromophenyl)-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene**

2,4-dimethylpyrrole (1.029 mL, 10.0 mmol, 2.0 eq.) was added to a solution of 4-bromobenzoyl chloride (1.097 g, 5.0 mmol, 1.0 eq.) in 20 mL of DCM. The mixture was stirred at r.t. and turned from colourless to red overnight. DIEA (2.613 mL, 15.0 mmol, 3.0 eq.) was added and BF<sub>3</sub>.OEt<sub>2</sub> (2.036 mL, 16.5 mmol, 3.3 eq) was added 15 min later. Stirring continued for 2 more h. The reaction mixture was washed with sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> solution and H<sub>2</sub>O. The aqueous layer was extracted with DCM. 2.7 g of crude product were obtained after solvent removal as a dark purple semi-solid. It was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub> 135 g, Cy(100%) > Cy/AcOEt 95:5) to afford 497 mg of pure product as a red solid (25%).

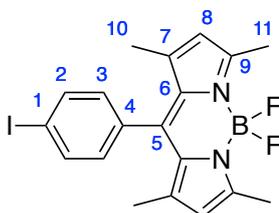


$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7.67 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz,  $\text{H}_2$ ), 7.21 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz,  $\text{H}_3$ ), 6.01 (s, 2H,  $\text{H}_8$ ), 2.58 (s, 6H,  $\text{H}_{11}$ ), 1.44 (s, 6H,  $\text{H}_{10}$ ).  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$   $\text{NMR}$  (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm): 155.90( $\text{C}_9$ ), 142.90( $\text{C}_7$ ), 140.02( $\text{C}_5$ ), 133.96( $\text{C}_6$ ), 132.43( $\text{C}_2$ ), 131.19( $\text{C}_4$ ), 129.84( $\text{C}_3$ ), 123.26( $\text{C}_1$ ), 121.43( $\text{C}_8$ ), 14.64( $\text{C}_{11}$ ), 14.60( $\text{C}_{10}$ ).

### **B3:** 4,4-Difluoro-8-(4-iodophenyl)-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene

Reference protocol : *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135(30), 11330-11344

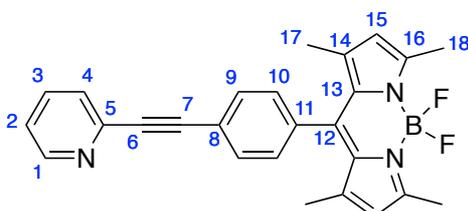
To a solution of 4-iodobenzoyl chloride (1.332 g, 5.0 mmol, 1.0 eq.) in 75 mL of DCM, 2-4-dimethylpyrrole (1.133 mL, 11.0 mmol, 2.2 eq.) was added and the reaction was stirred at rt during 70 h. DIEA (5.225 mL, 30 mmol, 6.0 eq.) was added, and  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  (4.937 mL dropwise, 40 mmol, 8.0 eq.) 15 min later. White smoke was evacuated and stirring continued another 24 h. The solvent was then evaporated and the crude product was filtered through a pad of  $\text{SiO}_2$  (200 g) using Cy/DCM (1:1) to remove the polar residues, followed by column chromatography for refined purification (crude 860mg,  $\text{SiO}_2$  60 g, Cy/AcOEt (95:5)  $R_f=0.3$ ) to give a red solid (20%).



$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7.87 (d, 2H,  $J = 8.3$  Hz,  $\text{H}_2$ ), 7.07 (d, 2H,  $J = 8.3$  Hz,  $\text{H}_3$ ), 6.01 (s, 2H,  $\text{H}_8$ ), 2.57 (s, 6H,  $\text{H}_{11}$ ), 1.44 (s, 6H,  $\text{H}_{10}$ ).  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$   $\text{NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 155.89( $\text{C}_9$ ), 142.91( $\text{C}_7$ ), 140.06( $\text{C}_5$ ), 138.34( $\text{C}_2$ ), 134.57( $\text{C}_6$ ), 131.12( $\text{C}_4$ ), 129.96( $\text{C}_3$ ), 121.42( $\text{C}_8$ ), 94.72( $\text{C}_1$ ), 14.65( $\text{C}_{11}$ ), 14.60( $\text{C}_{10}$ ).

### **B4:** 4,4-Difluoro-8-(4-(pyridin-2-ylethynyl)phenyl)-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene

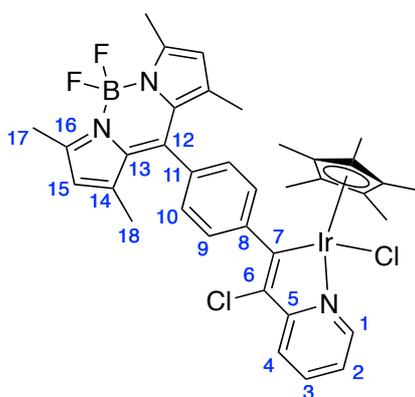
In a vial, **B3** (250 mg, 555  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq.) was dissolved in 10 mL of dry THF. Then 2-ethynylpyridine (84  $\mu\text{L}$ , 833  $\mu\text{mol}$ , 1.5 eq.), DIEA (145  $\mu\text{L}$ , 833  $\mu\text{mol}$ , 1.5 eq.),  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$  (19.5mg, 28  $\mu\text{mol}$ , 5mol%) and  $\text{CuI}$  (3.2mg, 17  $\mu\text{mol}$ , 3mol%) were successively added. The mixture was stirred at 70°C during 20h, filtered over a pad of Celite and concentrated under vacuum. The crude product obtained as a dark paste was finally purified by column chromatography ( $\text{SiO}_2$ , 35g, Cy/AcOEt 8:2 to 7:3) to afford the pure product as a bright orange solid (42%).



**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 8.69 (d, 1H, *J* = 4.7 Hz, H<sub>1</sub>), 7.78 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, H<sub>10</sub>), 7.62 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz, H<sub>4</sub>), 7.34 (m, 4H, H<sub>2,3,9</sub>), 6.02 (s, 2H, H<sub>15</sub>), 2.59 (s, 6H, H<sub>18</sub>), 1.45 (s, 6H, H<sub>17</sub>). **<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 155.82(C<sub>16</sub>), 154.38(C<sub>5</sub>), 150.13(C<sub>1</sub>), 142.97(C<sub>14</sub>), 140.55(C<sub>12</sub>), 136.37(C<sub>3</sub>), 135.73(C<sub>13</sub>), 132.74(C<sub>10</sub>), 131.12(C<sub>11</sub>), 128.28(C<sub>9</sub>), 127.20(C<sub>8</sub>), 123.12(C<sub>4</sub>), 123.10(C<sub>2</sub>), 121.41(C<sub>15</sub>), 89.73(C<sub>6/7</sub>), 88.47(C<sub>7/6</sub>), 14.60(C<sub>17</sub>), 14.55(C<sub>18</sub>). **HRMS** (ESI<sup>+</sup>): *m/z* calculated for C<sub>26</sub>H<sub>22</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>3</sub>: 426.1948; found: 426.1947 [M+H]<sup>+</sup>. **UV-Vis** (MeCN) : λ<sub>max</sub> = 499nm

**IrB4: Chlorido(η<sup>5</sup>-pentamethylcyclopentadienyl)(4,4-Difluoro-8-(4-(2-phenyl(1-chlorovinyl-κC<sup>2</sup>)pyridine-κN)) 1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene) Iridium(III)**

[Cp\*IrCl<sub>2</sub>]<sub>2</sub> (37.5 mg, 47 μmol, 1.0 eq.) was added to a solution of **B4** (40 mg, 94 μmol, 2.0 eq.) in 8 mL of DCM. The reaction mixture was stirred overnight at rt and concentrated under vacuum. The crude product was purified by recrystallization using DCM and pentane to afford 77 mg of pure product as a bright orange solid (99%).

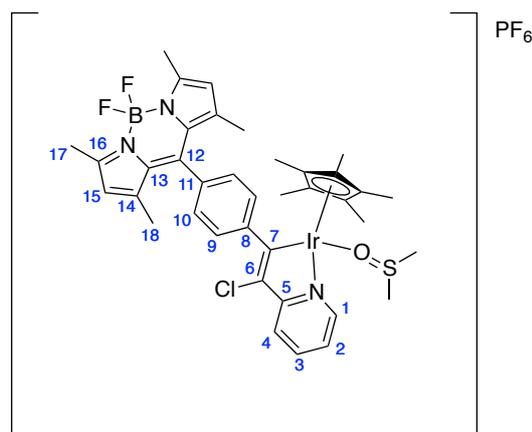


**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ (ppm): 8.58 (ddd, 1H, *J* = 5.7, 1.3, 0.8 Hz, H<sub>1</sub>), 7.73 (ddd, 1H, *J* = 8.4, 7.0, 1.4 Hz H<sub>3</sub>), 7.69 (ddd, 1H, *J* = 8.2, 1.8, 0.8 Hz H<sub>4</sub>), 7.62 (d, 2H, *J* = 7.9 Hz, H<sub>10</sub>), 7.31 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz, H<sub>9</sub>), 7.12 (ddd, 1H, *J* = 7.1, 5.7, 1.9 Hz, H<sub>2</sub>), 6.04 (s, 2H, H<sub>15</sub>), 2.53 (s, 6H, H<sub>18</sub>), 1.59 (s, 6H, H<sub>17</sub>), 1.50 (s, 15H, H<sup>Cp\*</sup>). **<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR** (101 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ (ppm): 173.80(C<sub>7</sub>), 164.98(C<sub>5</sub>), 155.70(C<sub>16</sub>), 151.44(C<sub>1</sub>), 147.64(C<sub>6</sub>), 144.06-144.02(C<sub>12,14</sub>), 143.33(C<sub>8</sub>), 138.24(C<sub>3</sub>), 133.31(C<sub>13</sub>), 132.23(C<sub>11</sub>), 128.91(C<sub>10</sub>), 127.65(C<sub>9</sub>), 121.76(C<sub>2</sub>), 121.61(C<sub>15</sub>), 121.40(C<sub>4</sub>), 89.85(C<sup>Cp\*</sup>), 15.31(C<sub>18</sub>), 14.89(C<sub>17</sub>), 8.48(CH<sub>3</sub><sup>Cp\*</sup>). **HRMS** (ESI<sup>+</sup>): *m/z* calculated for C<sub>36</sub>H<sub>37</sub>BCl<sub>2</sub>F<sub>2</sub>IrN<sub>3</sub>: 788.2361; found: 788.2364 [M-Cl]<sup>+</sup>.

**UV-Vis** (MeCN) : λ<sub>max</sub> = 498nm

**IrB4-DMSO: [Dimethylsulfoxide-(η<sup>5</sup>-pentamethylcyclopentadienyl)(4,4-Difluoro-8-(4-(2-phenyl(1-chlorovinyl-κC<sup>2</sup>)pyridine-κN)) 1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene) Iridium (IV)] Hexafluorophosphate**

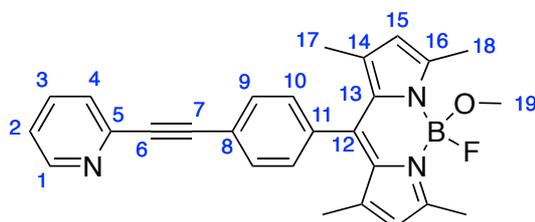
**IrB4** (36 mg, 44 μmol, 1.0 eq.) was dissolved in 10 mL of DCM and AgNO<sub>3</sub> (7.5 mg, 43.7 μmol, 1.0 eq.) was added to the solution. After about 1 h stirring, DMSO (10.2 mg, 131 μmol, 3.0 eq.) was added and stirring continued at rt for 3 days. During the procedure, the orange transparent solution turned brick red and turbid. NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub> (35.6 mg, 218 μmol, 5.0 eq) was added and after 10 min stirring, the solution was filtered through Celite and evaporated to dryness. The crude product (dark red semi-solid) was washed twice with diisopropyl ether to remove the remaining DMSO (seen by <sup>1</sup>H NMR). It was placed under vacuum for 3 days but 0.3eq of DMSO could not be taken off the product, the yield was calculated with the corresponding molar weight 1034.71g/mol (35.8μmol, 82%)



**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ (ppm): 8.83 (d, 1H, *J* = 5.6 Hz, H<sub>1</sub>), 8.03 (dd, 1H, *J* = 7.8, 1.0 Hz, H<sub>3</sub>), 7.92 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz, H<sub>4</sub>), 7.73 (m, 2H, H<sub>10</sub>), 7.61 (ddd, *J* = 7.4, 5.8, 1.4 Hz, H<sub>2</sub>), 7.45 (m, 2H, H<sub>9</sub>), 6.06 (s, 2H, H<sub>15</sub>), 5.32 (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), 3.46 (s, 3H, H<sub>17/18</sub>), 2.55 (s, 4H, DMSO<sub>0.3eq</sub>), 2.54 (s, 6H, DMSO), 2.47 (s, 2H, H<sub>17/18</sub>), 1.63 (s, 15H, H<sup>Cp\*</sup>), 1.56 (s, 6H, H<sub>17/18</sub>). **<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR** (101 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ (ppm): 165.52(C<sub>7</sub>), 165.08(C<sub>5</sub>), 156.20(C<sub>16</sub>), 153.93(C<sub>1</sub>), 144.02(C<sub>6</sub>), 143.58(C<sub>12/14</sub>), 141.92(C<sub>12/14</sub>), 141.60(C<sub>3</sub>), 135.41(C<sub>11</sub>), 131.94(C<sub>13</sub>), 130.16(C<sub>10</sub>), 128.75(C<sub>9</sub>), 125.82(C<sub>2</sub>), 124.69(C<sub>8</sub>), 123.82(C<sub>4</sub>), 121.87(C<sub>15</sub>), 97.95(C<sup>Cp\*</sup>), 54.00(CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), 47.42(C<sup>DMSO</sup>), 41.78(C<sup>DMSO</sup>), 41.61(0.3eq DMSO), 15.29(C<sub>17/18</sub>), 14.91(C<sub>17/18</sub>), 8.86(CH<sub>3</sub><sup>Cp\*</sup>).

#### **B5: 4-fluoro-4-methoxy-8-(4-(pyridin-2-ylethynyl)phenyl)-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene**

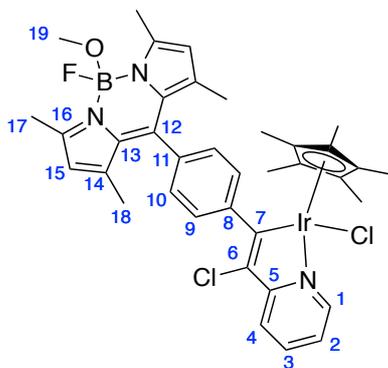
A solution of **B4** (50 mg, 118 μmol, 1.0 eq.) in 60 mL of DCM was placed in an ice bath and stirred while TMSOTf (100 μL, 588 μmol, 5.0 eq.) was added from a 10%vol solution in chloroform. The reaction was allowed to proceed for 2 min and 30 sec (the yellow orange solution turned red) and a premixed solution of methanol (476 μL, ~100 eq.) and DIPEA (205 μL, 10.0 eq.) was rapidly injected. The mixture quickly turned back, translucent and then orange, it was partitioned between (1:1) DCM:H<sub>2</sub>O. The organic layer was washed three times with a 10% brine solution, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and solvents were removed in vacuo (30°C). About 100 mg of red solid were isolated as the crude product. It was first purified on alumina column (Cy(100%) > Cy/AcOEt 1:1). A second purification by column chromatography was carried out (SiO<sub>2</sub> 3 g, Cy(100%) > Cy/AcOEt 6:4) and yielded 18 mg of orange crystals as pure product (35%).



**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 8.65 (d, 1H, *J* = 4.4 Hz, H<sub>1</sub>), 7.73 (m, 3H), 7.55 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, H<sub>4</sub>), 7.32 (m, 3H), 5.98 (s, 2H, H<sub>15</sub>), 2.99 (s, 3H, H<sub>19</sub>), 2.55 (s, 6H, H<sub>18</sub>), 1.42 (s, 6H, H<sub>17</sub>). **<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 156.08(C<sub>16</sub>), 150.37(C<sub>1</sub>), 143.26(C<sub>5</sub>), 142.20(C<sub>14</sub>), 140.65(C<sub>12</sub>), 136.38(C<sub>3</sub>), 136.21(C<sub>13</sub>), 132.83-123.79(C<sub>10</sub>), 131.97(C<sub>11</sub>), 128.62-128.53(C<sub>9</sub>), 127.28(C<sub>8</sub>), 123.19(C<sub>4</sub>), 121.46(C<sub>15</sub>), 89.94(C<sub>6/7</sub>), 88.46(C<sub>6/7</sub>), 49.35(C<sub>19</sub>), 14.76(C<sub>17,18</sub>). **HRMS** (ESI<sup>+</sup>): *m/z* calculated for C<sub>27</sub>H<sub>25</sub>BFN<sub>3</sub>O: 460.1967; found: 460.1968 [M+H]<sup>+</sup>.

**IrB5: Chlorido( $\eta^5$ -pentamethylcyclopentadienyl)(4-methoxy-4-fluoro-8-(4-(2-phenyl(1-chlorovinyl- $\kappa C^2$ ))pyridine- $\kappa N$ )) 1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene) Iridium(III)**

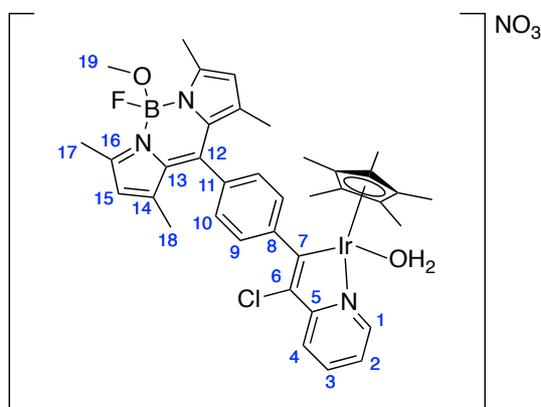
[Cp\*IrCl<sub>2</sub>]<sup>2</sup> (9.1 mg, 11  $\mu$ mol, 1.0 eq.) was added to a solution of **B5** (10 mg, 23  $\mu$ mol, 2.0 eq.) in 5mL of DCM. The reaction mixture was stirred overnight at rt and concentrated under vacuum. The crude product was purified by recrystallization using DCM and pentane to give 15 mg of pure product as a dark red solid (78%)



<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\delta$  (ppm): 8.58 (d, 1H,  $J$  = 5.5 Hz, H<sub>1</sub>), 7.79 – 7.65 (m, 2H, H<sub>2-3</sub>), 7.62 (t, 2H,  $J$  = 6.8 Hz, H<sub>10</sub>), 7.31 (t, 2H,  $J$  = 6.3 Hz, H<sub>9</sub>), 7.12 (t, 1H,  $J$  = 6.1 Hz, H<sub>4</sub>), 6.03 (s, 2H, H<sub>15</sub>), 2.95 (s, 3H, H<sub>19</sub>), 2.51 (s, 6H, H<sub>17</sub>), 1.60 (s, 3H, H<sub>18a</sub>), 1.58 (s, 3H, H<sub>18b</sub>), 1.50 (s, 15H, H<sup>Cp\*</sup>). <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR (101 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\delta$  (ppm): 173.90(C<sub>7</sub>), 164.99(C<sub>5</sub>), 155.80-155.73(C<sub>16</sub>), 151.42(C<sub>1</sub>), 147.47(C<sub>6</sub>), 143.17(C<sub>12</sub>), 143.06-142.91(C<sub>14</sub>), 138.23(C<sub>3</sub>), 133.72(C<sub>11</sub>), 128.91-128.77(C<sub>10</sub>), 127.78-127.74(C<sub>9</sub>), 121.74(C<sub>2</sub>), 121.46-121.40(C<sub>15</sub>), 121.37(C<sub>4</sub>), 89.85(C<sup>Cp\*</sup>), 49.35-49.28(C<sub>19</sub>), 15.44-15.31(C<sub>17</sub>), 14.89-14.87(C<sub>18</sub>), 9.08(CH<sub>3</sub><sup>Cp\*</sup>).

**IrB5-H<sub>2</sub>O: [Aqua( $\eta^5$ -pentamethylcyclopentadienyl)(4-methoxy-4-fluoro-8-(4-(2-phenyl(1-chlorovinyl- $\kappa C^2$ ))pyridine- $\kappa N$ )) 1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene) Iridium (IV)]Nitrate**

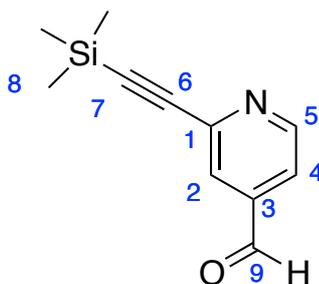
**IrB5** (13 mg, 16  $\mu$ mol, 1.0 eq.) was dissolved in 10mL of MeOH/DCM (1:1) and AgNO<sub>3</sub> (5mg, 2.0eq.) was added to the stirred solution. It became turbid and after 1 h and 1 mL of ultrapure H<sub>2</sub>O was added. Stirring continued overnight and the solution was filtered over a small pad of Celite® 545. All solvents were removed by evaporation. The product was dissolved in DCM, filtered over P4 sintered glass and triturated with pentane to give 8 mg of pale orange solid (63%).



**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ (ppm): 8.91 (ddd, 1H, *J* = 5.7, 1.6, 0.8 Hz, H<sub>1</sub>), 7.79 (ddd, 1H, *J* = 8.1, 7.4, 1.5 Hz, H<sub>3</sub>), 7.70 (ddd, 1H, *J* = 8.1, 1.6, 0.8 Hz, H<sub>4</sub>), 7.47 (m, 2H, H<sub>10</sub>), 7.40 – 7.33 (m, 2H, H<sub>9</sub>), 7.20 (ddd, 1H, *J* = 7.3, 5.7, 1.5 Hz, H<sub>2</sub>), 6.04 (s, 2H, H<sub>15</sub>), 2.96 (s, 3H, H<sub>19</sub>), 2.52 (s, 6H, H<sub>17</sub>), 1.60 (s, 3H, H<sub>18a</sub>), 1.58 (s, 3H, H<sub>18b</sub>), 1.47 (s, 15H, H<sup>Cp\*</sup>). **<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR** (101 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ (ppm): 171.69(C<sub>7</sub>), 165.77(C<sub>5</sub>), 155.92-155.84(C<sub>16</sub>), 152.22(C<sub>1</sub>), 146.46(C<sub>6</sub>), 142.90(C<sub>12</sub>), 143.04-142.90(C<sub>14</sub>), 139.47(C<sub>3</sub>), 134.03(C<sub>11</sub>), 128.83-128.65(C<sub>10</sub>), 128.17-128.11(C<sub>9</sub>), 124.92(C<sub>4</sub>), 122.11(C<sub>2</sub>), 121.55-121.47(C<sub>15</sub>), 89.08(C<sup>Cp\*</sup>), 49.29-49.36(C<sub>19</sub>), 15.43-15.29(C<sub>17</sub>), 14.90-14.88(C<sub>18</sub>), 9.12(CH<sub>3</sub><sup>Cp\*</sup>). **HRMS** (ESI+): *m/z* calculated for C<sub>37</sub>H<sub>42</sub>BClIrN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>: 800.2566; found: 800.2558 [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> and 818.2666; found: 818.2426 [M<sup>+</sup>].

## 2-((trimethylsilyl)ethynyl)isonicotinaldehyde

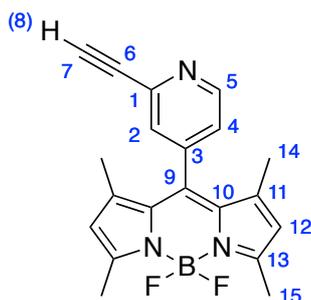
2-bromoisonicotinaldehyde (1.70 g, 9.14 mmol), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (255 mg, 4 mol%) and CuI (174 mg, 10 mol%) were dissolved in 25 mL of dry and argon-degassed THF under magnetic stirring. Then DIPEA (3.0 mL, 1.9 eq.) and TMSA (1.52 mL, 1.2 eq.) were added to the turbid solution. It became darker within 15mn and TLC showed disappearing of the starting material from 1 hr. The reaction mixture was a white solid suspension (iPr<sub>2</sub>EtN salts) in a dark solvent. It was filtered over a pad of Celite and evaporated to 3.19 g of dark oil. It was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub> 97 g, dry loading, Cy/AcOEt 8:2) to give 1.092 g of pure product as a brown oil (59%).



**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ (ppm): 10.03 (s, 1H, H<sub>9</sub>), 8.76 (d, 1H, *J* = 4.9 Hz, H<sub>5</sub>), 7.80 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 7.61 (dd, 1H *J* = 4.9, 1.5 Hz, H<sub>4</sub>), 0.27 (s, 9H, H<sub>8</sub>). **<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR** (75 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ (ppm): 191.34(C<sub>9</sub>), 151.86(C<sub>1</sub>), 145.04(C<sub>5</sub>), 142.30(C<sub>3</sub>), 126.31(C<sub>2</sub>), 121.70(C<sub>4</sub>), 103.45(C<sub>6</sub>), 97.01(C<sub>7</sub>), -0.13(C<sub>8</sub>).

## B4': 4,4-Difluoro-8-(2-ethynyl)pyrid-4-yl-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene

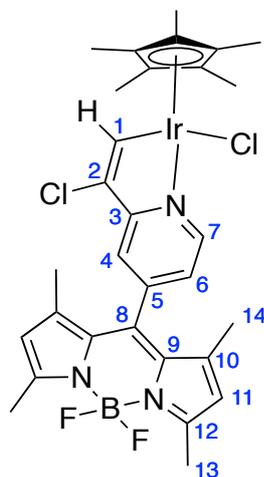
15 mL of DCM were degassed with Argon for 1 h and placed in an ice bath under stirring. Then **2-((trimethylsilyl)ethynyl)isonicotinaldehyde** (813 mg, 4.0 mmol), TFA (15 μL, 5 mol%) and 2,4-dimethylpyrrole (825 μL, 2.0 eq.) were added under inert atmosphere. The solution became opaque and yellow. After 1h stirring at 0°C, DDQ (908 mg, 4.0 mmol, 1.0 eq.) was added and the mixture turned red. After 5 min, DIPEA (5.5 mL, 6.0 eq.) and BF<sub>3</sub>.OEt<sub>2</sub> (48%) (5.193 mL, 8.0 eq.) were quickly injected. The mixture became green and then brick-red, it was stirred another 5 min and volatiles were removed under vacuum. The crude intermediate product was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub> 150 g, DCM) to give 108 mg of red semi-solid (yield: 6%). This batch was dissolved in 10 mL of MeOH and KF (52 mg, 3.8 eq.) was added. 5 mL of DCM were added to the mixture to homogenize and stirring continued 20 min before evaporation of volatiles. The crude product was dissolved in DCM and washed with water. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under vacuum to give 123 mg of crude product as a dark violet powder. It was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub> 28 g, DCM) to give 37 mg of pure deprotected product as dark red crystals (106 μmol, step: 45%).



**$^1\text{H}$  NMR** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 8.75 (d, 1H,  $J = 5.0$  Hz, H<sub>5</sub>), 7.50 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 7.28 (dd, 1H,  $J = 5.0$ , 1.5 Hz, H<sub>4</sub>), 6.02 (s, 2H, H<sub>12</sub>), 3.24 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 2.56 (s, 6H, H<sub>15</sub>), 1.45 (s, 6H, H<sub>14</sub>).  **$^{13}\text{C}$  { $^1\text{H}$ } NMR** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 156.94(C<sub>13</sub>), 151.04(C<sub>5</sub>), 144.21(C<sub>1</sub>), 143.54(C<sub>9</sub>), 142.66(C<sub>11</sub>), 136.66(C<sub>3</sub>), 130.42(C<sub>10</sub>), 127.11(C<sub>2</sub>), 123.19(C<sub>4</sub>), 122.13(C<sub>12</sub>), 82.16(C<sub>6</sub>), 78.83(C<sub>7</sub>), 15.00(C<sub>15</sub>), 14.81(C<sub>14</sub>). **HRMS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{BF}_2\text{N}_3$ : 350.1635; found: 350.1636  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**IrB4': Chlorido( $\eta^5$ -pentamethylcyclopentadienyl)[4,4-Difluoro-(2-(1-chlorovinyl- $\kappa\text{C}^2$ )pyridin-8-yl- $\kappa\text{N}$ )-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene] Iridium(III)**

24 mg (69  $\mu\text{mol}$ , 2.0 eq.) of pure **B4'** were dissolved in 3 mL of DCM and  $[\text{Cp}^*\text{IrCl}_2]_2$  (27 mg, 1.0 eq.) was added. The solution was stirred at rt for 30 min and the reaction was monitored by TLC. The reaction mixture was filtered in a pad of Celite and evaporated to give 70 mg of dark red oil. Trituration using DCM and diisopropyl ether allowed to separate a pure fraction (orange powder, 57%). The product was insoluble in DMSO.



**$^1\text{H}$  NMR** (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  (ppm): 8.78 (s, 1H, H<sub>1</sub>), 8.61 (d, 1H,  $J = 5.6$  Hz, H<sub>7</sub>), 7.57 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 7.07 (d, 1H,  $J = 5.0$  Hz, H<sub>6</sub>), 6.06 (s, 2H, H<sub>11</sub>), 2.52 (s, 6H, H<sub>13</sub>), 1.75 (s, 15H, H<sup>Cp\*</sup>), 1.52 (s, 3H, H<sub>14a</sub>), 1.49 (s, 3H, H<sub>14b</sub>).  **$^{13}\text{C}$  { $^1\text{H}$ } NMR** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 169.05(C<sub>1</sub>), 165.25(C<sub>3</sub>), [157.67-157.65, 156.77-156.74](C<sub>12</sub>), 152.67(C<sub>7</sub>), 145.67(C<sub>8</sub>), 144.25(C<sub>10</sub>), 142.75(C<sub>9</sub>), 137.70(C<sub>5</sub>), 124.27(C<sub>2</sub>), 122.60-122.22(C<sub>11</sub>), 121.25(C<sub>4</sub>), 120.44(C<sub>6</sub>), 90.36(C<sup>Cp\*</sup>), 15.31(C<sub>14a</sub>), 14.99-14.97(C<sub>13</sub>), 14.88(C<sub>14b</sub>), 9.45(C<sup>Cp\*</sup>). **HRMS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{BF}_2\text{N}_3$ : 712.2048; found: 712.2047  $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ .

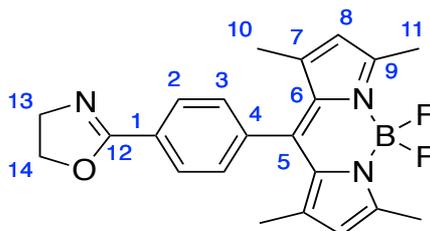
## 2. Synthesis and intracellular fate of IrB8

### 2.1. Synthesis and characterization

**BDP-CHO** was obtained from commercially available starting materials and reagents using a previously described synthetic procedure<sup>[176]</sup>.

#### **B8: 4,4-Difluoro-8-(4-(4',5'-dihydrooxazole)phenyl)-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene**

Ethanolamine (10  $\mu$ L, 170  $\mu$ mol, 1.0 eq.) was added to a solution of **BDP-CHO** (60 mg, 170  $\mu$ mol, 1.0 eq.) in 4 mL acetonitrile. The reaction mixture was stirred at rt during 5 h. DIB (66 mg, 204  $\mu$ mol, 1.2 eq.) was then added and stirring continued overnight. TLC monitoring showed a conversion of about 50% (Cy/AcOEt 7:3), ca. 5 mL of water was added and the aqueous layer was extracted twice with DCM (ca. 10 mL). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum to afford 104 mg of crude product as a dark oil. The residue was purified by column chromatography (SiO<sub>2</sub> 3.5 g, Cy/AcOEt 7:3) to yield the expected oxazoline as a light purple solid (30 mg, 76  $\mu$ mol, 45 %). R<sub>f</sub>(Cy/AcOEt 7:3) = 0.3. Purity: 94% (RP-HPLC)



<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\delta$  (ppm): 8.12 (d, 2H,  $J$  = 8.5 Hz, H<sub>2</sub>), 7.42 (d, 2H,  $J$  = 8.5 Hz, H<sub>3</sub>), 6.06 (s, 2H, H<sub>8</sub>), 4.49 (t, 2H,  $J$  = 9.7 Hz, H<sub>14</sub>), 4.10 (t, 2H,  $J$  = 9.5 Hz, H<sub>13</sub>), 2.55 (s, 6H, H<sub>11</sub>), 1.44 (s, 6H, H<sub>10</sub>). <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR (101 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\delta$  (ppm): 164.20 (C<sub>12</sub>), 156.28(C<sub>9</sub>), 143.81(C<sub>7</sub>), 141.52(C<sub>5</sub>), 138.35(C<sub>1</sub>), 131.66(C<sub>6</sub>), 129.47(C<sub>2</sub>), 129.35(C<sub>4</sub>), 128.86(C<sub>3</sub>), 121.86(C<sub>8</sub>), 68.45(C<sub>14</sub>), 55.68(C<sub>13</sub>), 14.90(t, C<sub>11</sub>), 14.87(s, C<sub>10</sub>). HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  calculated for C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O: 394.1897; found: 394.1897 [M+H]<sup>+</sup> (0 ppm).

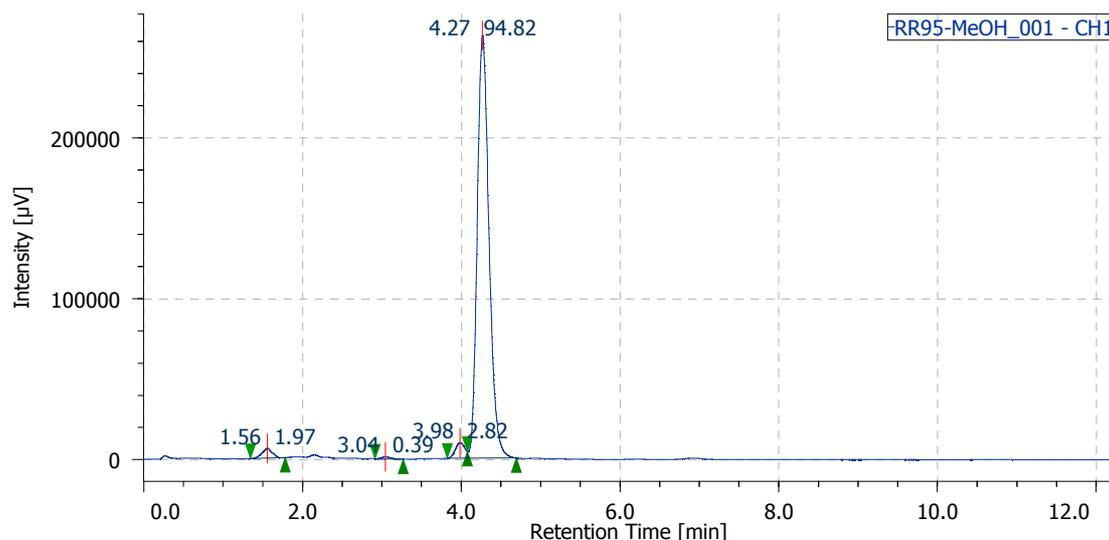
#### Fluorescence data of B8:

**Color coordinates:** x: 0.18852 ; y: 0.70484 ; u': 0.06805 ; v': 0.57247

**Absolute quantum yield(%):** 25.59  $\pm$  1.647 (MeOH)

**Lifetime at lambda max (ns):** MeOH: 2.18(87%), 3.40(4%), 0.08 (10%) ; H<sub>2</sub>O: 1.99(5%), 2.77(74%), 0.02 (20%) . Calculated using a three parameters exponential fit.

#### RP-HPLC chromatogram of B8:

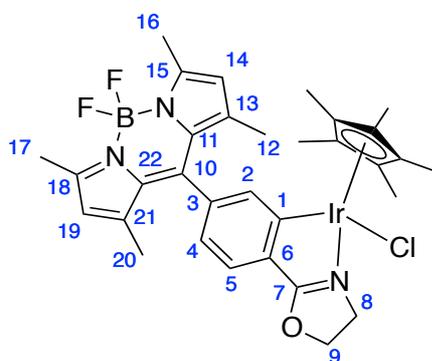


Column: Nucleodur C18 HTec, 150x4.6 mm, 5 µm Macherey-Nagel)

**B8**: 100 µM in MeOH, Eluent: H<sub>2</sub>O / MeOH (2:8) 1 mL/min, wavelength: 254 nm

**IrB8**: Chlorido(η<sup>5</sup>-pentamethylcyclopentadienyl)(4,4-Difluoro-8-(4-(4',5'-dihydrooxazole-κN)phenyl-κC<sup>2</sup>)-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene) Iridium(III)

[Cp\*IrCl<sub>2</sub>]<sub>2</sub> (22.1 mg, 28 µmol, 1.0 eq.) and NaOAc (14 mg, 168 µmol, 6.0 eq.) were added to a solution of **B8** in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (24 mg, 61 µmol, 2.2 eq.). The reaction mixture was stirred 3 days at rt under inert atmosphere. The reaction mixture was then filtered through a pad of Celite® 545 to afford the crude product after solvent removal. Purification was then carried out using column chromatography (SiO<sub>2</sub> 6 g, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt (5:5) + 1% Et<sub>3</sub>N) to give a red solid (32 mg, 42 µmol, 76%). Purity: 97% (RP-HPLC).



<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ (ppm): 7.69 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 7.55 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz, H<sub>5</sub>), 6.97 (dd, 1H, *J* = 7.7, 1.2 Hz, H<sub>4</sub>), 6.07 (s, 1H, H<sub>14</sub>), 6.03 (s, 1H, H<sub>19</sub>), 4.91 (m, 2H, H<sub>9</sub>), 3.98-4.18 (m, 2H, H<sub>8</sub>), 2.56 (ds, 6H, H<sub>16-17</sub>), 1.77 (s, 15H, H<sup>Cp\*</sup>), 1.62 (s, 3H, H<sub>12</sub>), 1.49 (s, 3H, H<sub>20</sub>). <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR (75 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ (ppm): 179.61(C<sub>1</sub>), 164.95(C<sub>7</sub>), 155.49(C<sub>15</sub>), 154.21(C<sub>18</sub>), 144.79(C<sub>13</sub>), 143.09(C<sub>10</sub>), 142.51(C<sub>21</sub>), 138.01(C<sub>6</sub>), 134.21(C<sub>2</sub>), 131.65(C<sub>3</sub>), 126.20(C<sub>5</sub>), 121.19(C<sub>14</sub>), 120.96(C<sub>4</sub>), 120.54(C<sub>19</sub>), 87.85(C<sup>Cp\*</sup>), 71.73(C<sub>9</sub>), 50.51(C<sub>8</sub>), 38.08, 31.06(C<sub>12</sub>), 29.67, 14.57-14.30-13.98(C<sub>16</sub>, C<sub>17</sub>, C<sub>20</sub>), 9.14(CH<sub>3</sub><sup>Cp\*</sup>). HRMS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* calculated for C<sub>32</sub>H<sub>36</sub>BClF<sub>2</sub>IrN<sub>3</sub>O: 720.2543; found: 720.2550 [M-Cl]<sup>+</sup> (1 ppm).

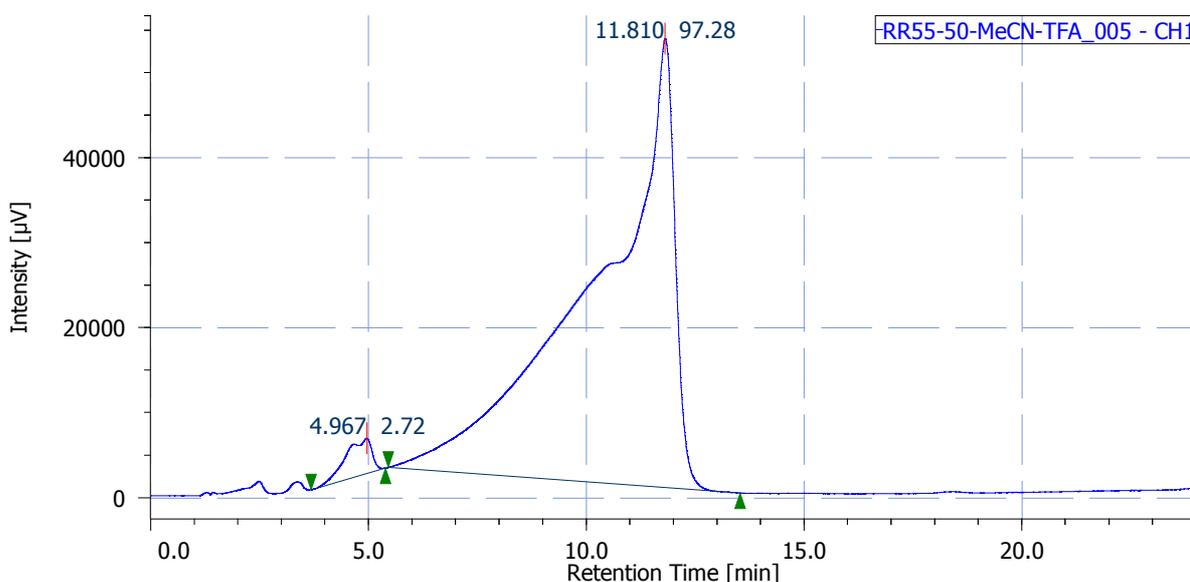
Fluorescence data of [IrB8]-DMSO exchanged complex:

**Color coordinates:** x: 0.19134 ; y: 0.71648 ; u': 0.06824 ; v': 0.57497

**Absolute quantum yield(%):** 20.82 ± 1.377 (MeOH)

**Lifetime at lambda max (ns):** DMSO: 0.03(6%), 2.73(70%), 3.28 (24%) ; H<sub>2</sub>O: 5.00(1%), 2.93(92%), 0.08 (7%). *Calculated using a three parameters exponential fit.*

RP-HPLC chromatogram of IrB8:



Column: Nucleodur C18 HTec, 150x4.6 mm, 5 μm Macherey-Nagel)

**IrB8:** 100 μM in MeCN, Eluent: H<sub>2</sub>O 0.1%TFA / MeCN 0.08%TFA (1:1) 1mL/min, wavelength: 500 nm

**Mass spectrometry analysis.** ESI-MS experiments were carried out using the same instrumentation and conditions as previously described in Chapter 2.

**Photophysical properties of IrB8, IrB8<sup>+</sup> and B8.** Stock solutions of **IrB8** and **B8** (1 or 10 mM) were prepared in DMSO or MeOH or THF. Electronic absorption spectra were recorded on a Cary50 spectrophotometer (Varian) in 1-cm pathlength quartz cuvettes at 20°C. Steady-state fluorescence emission spectra were recorded on a FP-6200 spectrofluorimeter (Jasco) at 20°C with excitation set at 488 nm. Excitation and emission bandwidths were set to 5 nm and scan rate to 125 nm/min. Fluorescence lifetimes were measured on a Fluoromax-4 spectrofluorimeter equipped with a TCSPC accessory (Horiba) using the time domain

technique. Absolute fluorescence quantum yields were measured on the same spectrofluorimeter equipped with the Quanta integrating sphere.

**Log  $P_{o/w}$  determination.** Log P of **IrB8** was determined using the “shake-flask” method from OCDE guideline n°107. Octanol-saturated water (OSW) and water-saturated octanol (WSO) were prepared using analytical grade octanol and ultrapure water. Aliquots of stock solutions of **IrB8** in WSO were added to equal volumes of OSW in triplicate. Mixing was done by tube rotation for 5 min at ambient temperature to establish the partition equilibrium. To separate the phases, centrifugation was carried out at 3000 g for 5 min.  $[\text{IrB8}]_{\text{WSO}}$  was determined by absorbance readout using its molar extinction coefficient at 500 nm and a reference solution ( $\epsilon_{\text{WSO}} = 43500 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Partition coefficient of **IrB8** was calculated using the equation  $\log P = \log ([\text{IrB8}]_{\text{WSO}}/[\text{IrB8}]_{\text{OSW}})$ .

## 2.2. Cell culture, proliferation monitoring, internalization of IrB8

**Cell culture.** HeLa, hTERT-RPE1 and HuH-7 cell lines were previously used and described in Chapters 1 and 2. Long term treatments with **B8** and **IrB8** were performed in media containing 5% FBS. Treatments for less than 1 h with **B8** and **IrB8** were performed in serum-free media. Stock solutions of **IrB8** and **B8** were of 1 and 10 mM, respectively, in DMSO.

**MTT Cell Viability Assay.** The cell proliferation assay was carried out using Promega CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay according to the supplier’s protocol. Briefly, 4,000 HeLa cells were seeded in 96-well plates and cultured in the presence of a range of 8 concentrations of **IrB8** for 48 h in triplicate. MTT Dye Solution (15  $\mu\text{L}$ ) was added to each well and the plates were incubated at 37°C in a humidified 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere for 4 h. Stop Solution (100  $\mu\text{L}$ ) was then added to each well and absorbance was read at 570 nm using Infinite F200 PRO Tecan plate reader, once formazan crystals completely solubilized. Compound concentrations that produced 50% growth inhibition (IC<sub>50</sub>) were calculated from non-linear regressions of the triplicate data using Graphpad Prism software.

**ICP-OES analysis** was carried out using the same materials and methods as in Chapter 2 with HeLa and hTERT-RPE1 cells exposed to 10  $\mu\text{M}$  **IrB8** for 30 min.

**RTCA and time-lapse videomicroscopy.** xCELLigence E-plates were calibrated for a baseline definition and cells were seeded at 2,000 cells per well in 100  $\mu\text{L}$  complete medium. After 24 h, **IrB8** was added to a final concentration of 16, 8, 4, and 2  $\mu\text{M}$  in triplicate and the

cell index was measured over a period of 72 h (Real Time Cell Analyzer, Agilent). In parallel, 25,000 cells were seeded in 24-well plates and treated with either **IrB8**, **B8** or DMSO as control. The cell behavior was monitored in real time by differential phase contrast videomicroscopy using an Olympus IX83 inverted microscope with 20x objective. Images were recorded over 5 h starting either immediately, 16 h or 40 h after treatment. At the end point, a green-fluorescence acquisition was made using a 488nm excitation LED. Time-lapse movies (1 frame per 5 min) were processed using Fiji.

### **2.3. Fluorescent labelling with IrB8**

Time-lapse phase contrast and fluorescence microscopy were performed using an Olympus IX83 inverted microscope with 40x objective. Confocal images were acquired using a Leica SP5 inverted confocal microscope with 63x immersive objective and 405 (DAPI, Hoechst 33342), 488 (**IrB8**), 561 (Alexa 568, LTR, MTR, ERTR) and 633 nm (DRAQ5) Argon laser excitations with 63x objective. Fluorescence spectra in cells were recorded using the same confocal microscope with 488 nm laser excitation. A hybrid detector in photon-counting mode with a 5 nm bandwidth and 3 nm detection step size was used on a confocal slice of HeLa and hTERT-RPE1 cells treated with 8  $\mu$ M **IrB8**.

**Internalization of IrB8 in live cells.** 15,000 HeLa cells were seeded in a 48-well plate in complete medium. After two days, cells were treated with 10  $\mu$ M **IrB8** and were directly monitored by fluorescence time-lapse microscopy in complete medium.

**Internalization of IrB8 (montage).** HeLa and hTERT-RPE1 cells were cultured in Millicell® 8-well EZ-slides and stained with 1  $\mu$ M **IrB8** or **B8** for 30 min at 37°C either before or after fixation using 4% PFA and 3 PBS washes. The slide was mounted with Invitrogen® Vibrance Vectashield Mounting Medium and imaged using a Leica SP2 upright confocal microscope with a 488 nm argon laser excitation.

**Endoplasmic reticulum, mitochondria and lysosome staining.** 8-well IBIDI slides were seeded with 7,500 HeLa or hTERT-RPE1 cells and cultured in 300  $\mu$ L complete medium overnight at 37°C 5 % CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere. Cells were washed with PBS and stained in serum-free medium with ERTR (CellNavigator® ER-Tracker Red, 30 min), MTR (100 nM Mitotracker Red CMX-Ros + DRAQ5, Invitrogen, 20 min) or LTR (50 nM LysoTracker Red DND-99, Invitrogen, 20 min) for the indicated time at 37°C 5% CO<sub>2</sub>.

Afterwards, staining media were replaced with serum-free medium containing 10  $\mu$ M **IrB8** for 15 min in the same conditions. Live cells (MTR, LTR) were imaged in serum-free medium containing 15 mM HEPES. Samples stained with ERTR were fixed *in situ* with 4% PFA in PBS and washed three times prior to acquisition.

**Lipid droplets staining.** HeLa cells were seeded on 14 mm coverslips (25,000 cells per  $\text{cm}^2$ ) and incubated in complete medium at 37°C 5%  $\text{CO}_2$  in a humidified atmosphere. After 24 h, cells were exposed to 100  $\mu$ M Oleic Acid + 1  $\mu$ M BODIPY-C12 for 16 h using supplementing FBS (prepared by sonication) at 10% in serum-free DMEM. During the last h of treatment, **IrB8** was added to a concentration of 10  $\mu$ M. Cells were fixed with 4 % PFA in PBS and nuclei were stained simultaneously with 1  $\mu$ g/mL Hoechst 33342. Coverslips were washed 3 times and mounted using Prolong Diamond mounting medium.

**Immunofluorescencecolabelling.** HeLa cells were seeded on 14-mm coverslips (25,000 cells per  $\text{cm}^2$ ) and incubated in complete medium at 37°C 5%  $\text{CO}_2$  in a humidified atmosphere. After 24 h, cells were treated with **IrB8** and Bafilomycin as indicated or 0.1 % DMSO in serum-free media. Cells were fixed with 4% PFA in PBS and washed 3 times with PBS. Samples were blocked and permeabilized using 3% BSA and 0.5 % Triton X-100 in PBS for 30 min at rt. Coverslips were incubated overnight with a primary antibody (1:100) in PBS 3% BSA at 4°C, then for 1 h at rt with an Alexa Fluor 568 secondary antibody (1:500 in PBS) and finally with 1  $\mu$ g/mL Hoechst 33342 in PBS for 10 min. Coverslips were mounted using Prolong Diamond mounting medium. Primary antibodies: mouse anti-EEA1 (BD Transduction® 610457), mouse anti-GM130 (BD Transduction® 610823), rabbit anti-LC3B (Sigma® L7543), rabbit anti-LAMP1 (Cell Signaling® #9091). Secondary antibodies (Invitrogen®): A-11031 goat anti-mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 568 and A-11011 goat anti-rabbit Ig-G (H+L) Alexa Fluor 568

#### 2.4. Western blots and immunoprecipitation

Briefly, 10<sup>6</sup> cells were seeded in 60 mm culture dishes, incubated for 16 h in complete medium at 37°C 5%  $\text{CO}_2$  in a humidified atmosphere and washed twice with PBS prior to **IrB8** treatment in serum-free medium at the indicated concentration and time. Cells exposed to 0.1% DMSO and to 1  $\mu$ M MG132 (1 h) or 2.5 mM DTT (30 min) were used as negative and positive controls respectively. Cells were harvested in cold PBS and lysed in RIPA buffer, supplemented with protease and phosphatase inhibitors. Protein titration was carried out using the microBCA

assay kit (Pierce). Samples were analyzed by SDS-PAGE on polyacrylamide gels and transferred onto 0.2  $\mu\text{m}$  nitrocellulose membranes. Membranes were blocked and incubated with a primary antibody overnight at 4°C, a HRP-linked secondary antibody for 1 h at rt and the BioRad® ECL (luminol) detection kit.

Primary antibodies: Mouse anti-GM130 (BD Transduction® #610823). Rabbit anti-phospho-eIF2 $\alpha$  (Ser51) (Cell Signaling® #9721). Rabbit-anti-eIF2 $\alpha$  (Cell Signaling® #9722). Rabbit anti-PERK/EIF2AK3 (Proteintech® 20582-1-AP). Rabbit anti-ATF6 (Proteintech® 24169-1-AP). Rabbit anti-GRP78 (Proteintech® 11587-1-AP). Rabbit anti-Cleaved caspase-3 (Asp175) (5A1E) (Cell Signaling® #9664). Mouse anti- $\beta$ -Actin (Cell Signaling® #4967).

Secondary antibodies: HRP-linked anti-Mouse IgG (Cell Signaling® #7076). HRP-linked anti-Rabbit IgG (Cell Signaling® #7074)

***In vitro* incubation of IrB8 with a cell lysate.** A pellet containing  $10^7$  cells was mechanically broken in PBS 1% Triton X-100 (containing protease and metalloprotease inhibitors) at 4°C with a Dounce homogenizer. Proteins were titrated using the microBCA assay kit (ca. 6.8 mg/mL) and the sample was split into 200  $\mu\text{g}$  fractions (representing 1.1 million cells each) for the following treatments: vehicle (0, 1 and 3 h), 110 nmol **IrB8** (1 and 3 h), 11 nmol **B8** at 37°C. All samples were then centrifugated 30 min at 21,000 g and 4°C resulting in a pellet and a supernatant (soluble fraction) that were both denaturated using non-reductive Laemmli buffers for 20 min at 95°C. Equal volumes corresponding to 32  $\mu\text{g}$  of proteins from the supernatant fraction were migrated by SDS-Page electrophoresis on a 12% polyacrylamide gel. Gels were fixed overnight at 4°C with H<sub>2</sub>O/EtOH/AcOH mixture (4:5:1) and fluorescence was acquired using a Bio-Rad Chemidoc XRS+ with a UV trans-illumination and a green filter. The gel was then stained with Coomassie blue (2 h, rt) for another acquisition with a white trans-illumination and a green filter.

**Treatment of live cells with IrB8 and protein analysis.** A 6-well plate was seeded with 500,000 HeLa or hTERT-RPE1 cells in complete medium. The day after, each well was washed three times with warm PBS and media were replaced with serum-free media containing 100 nmol **IrB8** for 1 h at 37°C 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere. Media were discarded and cells were directly scratched and harvested in 2x100  $\mu\text{L}$  PBS 1% Triton X-100 containing

protease and metalloprotease inhibitors. DTT was added to a concentration of 1 mM and samples were centrifugated for 15 min at 14,000 g (4°C). The obtained supernatants were denatured for 5 min at 95°C and migrated by SDS-Page electrophoresis on a 12% polyacrylamide gel. The gel was fixed overnight at 4°C with a mixture H<sub>2</sub>O:EtOH:AcOH (4:5:1) and fluorescence was acquired using a iBright Imager (Invitrogen®) with a blue LED trans-illumination and a green filter. The gel was then stained with Coomassie blue (2 h, rt) for another acquisition of total protein content. Molecular weight analysis was performed using ImageLab (Bio-rad) and Fiji.

### **Immunoprecipitation of GRP78 in various conditions.**

**A.** 2 million HeLa and hTERT-RPE1 cells were seeded in 4 100-mm dishes and incubated in normal growth conditions overnight. Cells were treated during 15 or 60 min with 8 µM **IrB8** in serum free medium and then harvested by scratching on ice with 240 µL of 2X RIPA buffer (without SDS). H<sub>2</sub>O (120 µL / sample) was added to a final concentration of 1X RIPA Buffer and cells were lysed for 30 min at 4°C. Supernatants obtained after 14,000g centrifugation for 15 min at 4°C were titrated for protein content. Sepharose protein A beads were prepared (wetting and 3 PBS washes to a 50% v/v final suspension) and 20 µL of suspension was added to each sample containing 250 µg of proteins (pre-clear control). Samples were incubated for 1 hour at 4°C under mild agitation and the beads were discarded. After addition of 0.36 µL of anti-GRP78 (Proteintech® 11587-1-AP) antibody (0.7 mg/mL), samples were placed under mild agitation overnight at 4°C. Capture was performed by adding 20 µL of sepharose beads suspension and agitating for 1 h at 4°C. Afterwards, the beads were collected, washed 3 times with RIPA buffer and once with a 150 mM NaCl solution. Finally, the protein was eluted by adding 30 µL of 2X Laemmli buffer containing TCEP. Equal volumes of samples were migrated : IP supernatants 25 µg of protein and 25 µL of IP pellets solution in two 12% 1 mm polyacrylamide gels. Samples were distributed (50:50) to each gel (imaging/blotting). The “imaging” gel was fixed overnight at 4°C with a mixture H<sub>2</sub>O:EtOH:AcOH (4:5:1) and fluorescence was acquired using a iBright Imager (Invitrogen®) with a blue LED trans-illumination and a green filter (no fluorescent band in the pellets, fluorescent supernatants). The “blotting” gel was transferred onto a 0.2 µm nitrocellulose membrane (humid transfer 1 h at 60 mA). The membrane was blocked using 5% BSA in TBS 0.1% Tween-20 and incubated with the Rabbit anti-GRP78 (Proteintech® 11587-1-AP) primary antibody overnight at 4°C, a Goat

anti-Rabbit HRP-linked secondary antibody for 1 h at rt and the BioRad® ECL (luminol) detection kit.

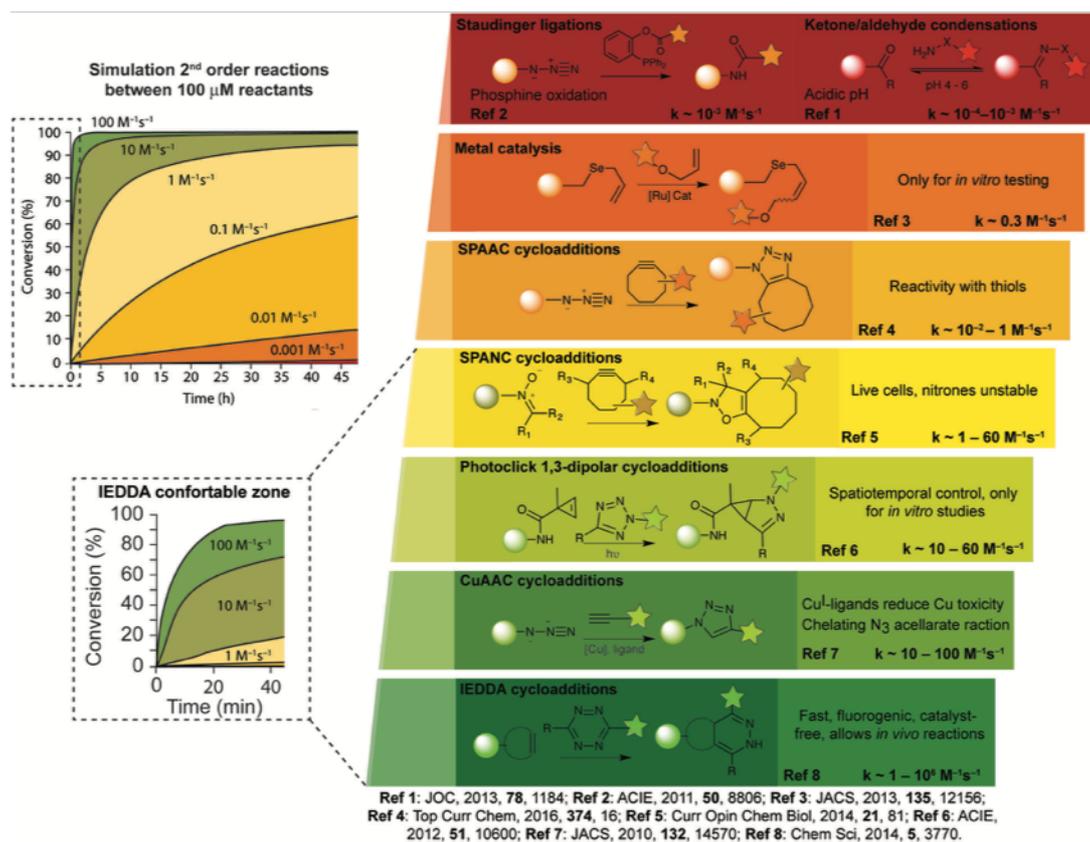
**B.** 2.5 million HeLa cells were seeded in three dishes and cultured overnight in normal growth conditions. A dish was washed with warm PBS and treated with 8  $\mu$ M **IrB8** for 15 min at 37°C. As cells remained adherent, all supernatants were discarded and 500  $\mu$ L of 2X RIPA buffer were added per dish. Cells were scratched on ice and lysed for 30 min at 4°C in 1X RIPA buffer (equilibrated with water). The extracts were centrifuged for 15 min at 14,000 g and 4°C. Proteins of the supernatants were titrated, untreated samples were combined and split: \*IgG (control) 500  $\mu$ g (306  $\mu$ L of control extract) to which was added 0.375  $\mu$ L of IgG (2mg/mL) antibody. \*No treatment 2 mg (1225  $\mu$ L of control extract) to which was added 4.286  $\mu$ L of anti-GRP78 (Proteintech® 11587-1-AP) (0,7mg/mL) antibody \***IrB8 in vivo** 1 mg (711  $\mu$ L of treated extract) to which was added 2.143  $\mu$ L of anti-GRP78 (Proteintech® 11587-1-AP) antibody. Samples were incubated at 4°C overnight under mild agitation. Freshly washed Sepharose-protein A beads (20 $\mu$ L/mg of extract) were added and samples were agitated using a wheel during 90 min at 4°C. Immunoprecipitation supernatants were collected and the beads were washed three times with RIPA buffer. Half of the “No treatment” sample was collected and incubated with 8  $\mu$ L of **IrB8** stock solution at rt for 15 min (**IrB8 in vitro** condition). All samples were washed with a 150 mM NaCl solution containing protease inhibitors. Beads were eluted with 20 or 40  $\mu$ L of 5X denaturation buffer. Immunoprecipitation pellets and supernatants of all 4 conditions were migrated on a couple of 10% polyacrylamide gels (1 mm, 10 wells). Samples were distributed (80:20) to each gel (imaging/blotting respectively). The “imaging” gel was fixed overnight at 4°C with a mixture H<sub>2</sub>O:EtOH:AcOH (4:5:1) and fluorescence was acquired using a iBright Imager (Invitrogen®) with a blue LED trans-illumination and a green filter (no fluorescent band in the pellets). The “blotting” gel was transferred onto a 0.2  $\mu$ m nitrocellulose membrane. The membrane was blocked using 5% BSA in TBS 0.1% Tween-20 and incubated with the Rabbit anti-GRP78 (Proteintech® 11587-1-AP) primary antibody overnight at 4°C, a Goat anti-Rabbit HRP-linked secondary antibody for 1 h at rt and the BioRad® ECL (luminol) detection kit. Revealed bands for GRP78 IP pellets had an apparent molecular weight around 100 kDa because the elution step wasn't done correctly, hence light chains (22 kDa) of the antibody remained attached to the protein.

## Chapitre 4. Synthèse et applications d'un complexe d'iridium clickable

### Introduction

Les réactions de chimie click permettent de greffer une large variété de substrats avec de hauts rendements, des conditions réactionnelles peu contraignantes, elles n'engendrent pas ou peu de sous-produits et leurs constantes de vitesses sont généralement élevées. Depuis sa première description par K.B. Sharpless<sup>[177]</sup> il y a deux décennies, la chimie click fait l'objet d'un intérêt croissant en synthèse tout comme en biologie. La chimie bio-orthogonale est l'application des réactions click avec des substrats biologiques comme des anticorps, ou dans un milieu biologique complexe comme le contexte intracellulaire.

La CuAAC est une cyclo-addition 1,3-dipolaire entre un alcyne vrai et un azoture inspirée de la réaction de Huisgen. Le produit obtenu lors de cette réaction est un 1,2,3-triazole. Lorsque l'activation thermique de cette cyclo-addition est remplacée par une catalyse au Cuivre (I), la CuAAC devient réalisable à température ambiante. Elle remplit donc les conditions de chimie click développées initialement par K.B. Sharpless. Bien que son utilité en chimie bio-orthogonale ait été démontrée dans de nombreuses études (comme par exemple le kit EdU utilisé au premier chapitre), la CuAAC ne permet généralement pas de marquer des cellules vivantes du fait de la toxicité du cuivre. En conséquence, des variantes de cette réaction ne nécessitant pas de cuivre ont été développées, comme la SPAAC (*strain-promoted alkyne-azide cycloaddition*) tirant parti de la haute réactivité de *trans*-cyclooctynes contraints, pour lesquelles la déstabilisation de la liaison triple accélère la vitesse de réaction avec les azotures. Enfin, la IEDDA (inverse electron demand diels-alder) fait intervenir une tétrazine et un alcyne contraint, elle constitue un autre exemple de réaction bio-orthogonale d'intérêt. Comme l'illustre la figure 96, elle constituerait la réaction la plus efficace pour une application *in vivo*. Par conséquent, de nouvelles applications intéressantes de chimie click effectuée avec des alcènes contraints une tétrazine et émergent dans la littérature récente.<sup>[178]</sup> Dans le domaine des anticancéreux, on trouve notamment une étude sur un dérivé du Taxol comportant une fonction *trans*-cyclooctène clickée avec un BODIPY-tétrazine fluorogène.<sup>[179]</sup>

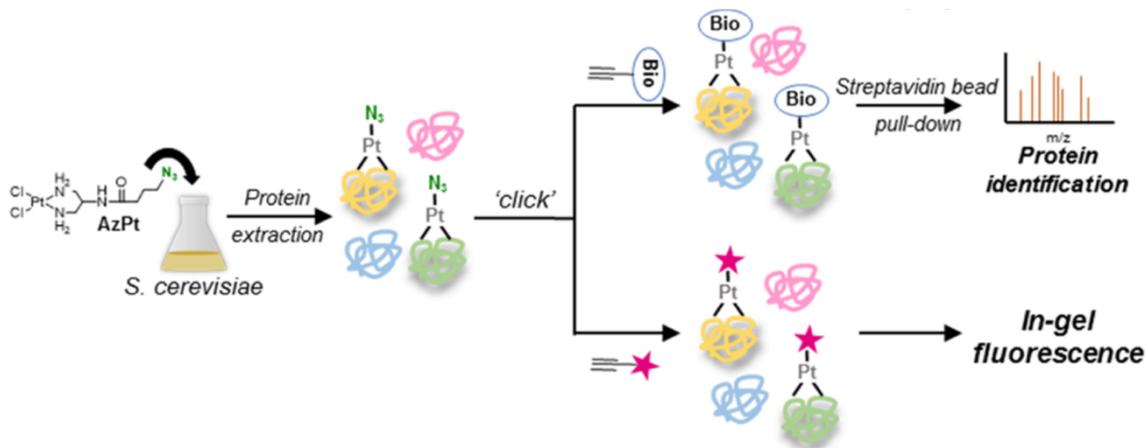


**Figure 96.** Utilisation, vitesse et limitations de différentes réactions de chimie click, d'après Bernardes et coll.<sup>[180]</sup>

L'adjonction d'une entité bio-orthogonale sur des petites molécule bioactives permet souvent de confirmer ou mieux comprendre leur mécanisme d'action.<sup>[181]</sup> En dépit des nombreux exemples de réaction click existants (Figure 96), la CuAAC reste la plus employée. En effet, ses conditions réactionnelles sont très bien maîtrisées et l'emploi de ligands du Cuivre comme le TBTA ou le THPTA permet d'augmenter la vitesse de la réaction. De plus, la CuAAC fait intervenir des fonctions faciles à synthétiser. Dans le domaine des métallo-drugues, c'est donc généralement cette réaction qui est utilisée dans la littérature. Par exemple, des complexes d'iridium bis-cyclométallés fluorogènes ont déjà été utilisés comme sonde de click pour l'analyse de protéines modifiées.<sup>[182,183]</sup> Ces travaux s'inscrivent dans la lignée d'études du mécanisme d'action du Cisplatine (CDDP) par chimie bio-orthogonale initié par l'équipe de V. Derose.

V. Derose et coll. ont pu montrer par des méthodes de chimie bio-orthogonale que leurs analogues du CDDP pouvaient interagir avec l'ARN de transfert et perturber les processus de synthèse des protéines et le ribosome.<sup>[184]</sup> Ils ont ensuite rapporté pour la première fois le post-traitement de cellules HeLa par un complexe de platine clickable qui se localise dans les

nucléoles.<sup>[185]</sup> Dans cette étude, les auteurs comparent la fonctionnalisation du CDDP par une fonction alcyne ou par une fonction azoture, ils observent un meilleur signal de fluorescence pour le dérivé azoture. Cette stratégie a constitué une approche intéressante pour identifier les adduits protéiques du CDDP, comme l'illustre le schéma 35.



**Schéma 35.** Stratégie de chimie bio-orthogonale proposée par DeRose et coll.<sup>[186]</sup>

Cette expérience effectuée sur des levures s'inscrit parfaitement dans le domaine dit de « *chemical biology* », c'est-à-dire l'utilisation d'outils chimiques pour des applications biologiques. Par exemple, l'analyse et la purification d'un protéome qui requiert historiquement un système biotine-streptavidine peut désormais être entreprise par chimie click, on parle de *chemical proteomics* ou *ABPP (activity-based protein profiling)*.<sup>[187-189]</sup> Ces techniques ont l'avantage d'être moins invasives, elles permettent d'identifier les cibles protéiques d'une petite molécule mais aussi des acteurs non-ciblés (*off-targets*) éventuellement responsables d'effets secondaires.<sup>[190]</sup> Cette stratégie a aussi été utilisée pour étudier les propriétés anticancéreuses d'agents à base de Ruthenium et d'Osmium.<sup>[18]</sup>

Seulement deux complexes d'iridium anticancéreux clickables<sup>[191,192]</sup> ont été décrits dans la littérature, par Wang et coll. Ceux-ci possèdent une structure hexacoordinée avec un ligand chélatant de type (C<sup>N</sup>) ou (C<sup>O</sup>), 2 triphénylphosphines et un ligand hydrure. La dernière position est occupée par un ligand labile de type pyridyl comportant une fonction azoture clickable, qui a permis aux auteurs de mettre en évidence les effets élicités par ces complexes dans des cellules HeLa et A2780, notamment leur tropisme pour la mitochondrie.

Une approche bio-orthogonale permettrait de répondre à certaines problématiques posées dans les précédents chapitres, comme l'identification des protéines cibles des complexes semi-sandwich d'Iridium. C'est pourquoi nous avons choisi de synthétiser un nouveau complexe comportant un substrat de la réaction de CuAAC.

## Résultats

### 1. Synthèse d'un complexe comportant une fonction bio-orthogonale

Les résultats du Chapitre 3 montrent que le fluorophore BODIPY est responsable de l'adressage du complexe semi-sandwich d'iridium (phox) **IrB8** vers des membranes biologiques. Cette stratégie nous a fourni plusieurs avantages, notamment la détection et la confirmation de la formation d'adduits intracellulaires entre le composé et les protéines. Par ailleurs, **IrB8** est le premier complexe semi-sandwich décrit pour induire un stress du réticulum suite à son accumulation dans son organelle. Ce n'est pas le cas de **Ir02** qui élicitait dans le Chapitre 2 une inhibition de la traduction modeste dans la lignée HeLa. Par conséquent, le tropisme et les effets intracellulaires de **IrB8** n'est certainement pas représentatif de ceux des autres complexes de cette étude qui possèdent un ligand chélatant moins lipophile. Pour s'abstraire de cet effet et comprendre le mécanisme d'action d'un complexe plus apparenté à la série (phox) **Ir01-10**, un système moins invasif de chimie bio-orthogonale a donc été envisagé. Avec ce système, le complexe doit comporter une fonction réactive en chimie click (Schéma 36, triangle). La réaction de click doit être réalisable en milieu aqueux, physiologique et les fonctions orthogonales doivent être stables dans ces conditions strictes de pH et température, et en présence de nombreuses espèces spectatrices.

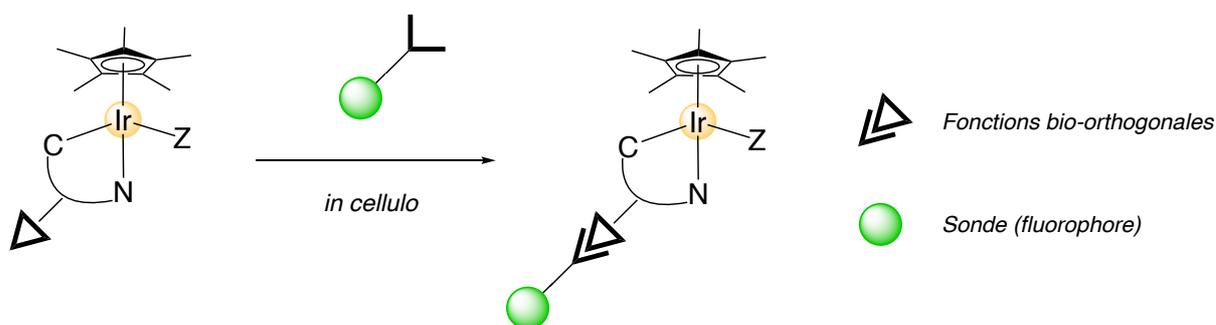
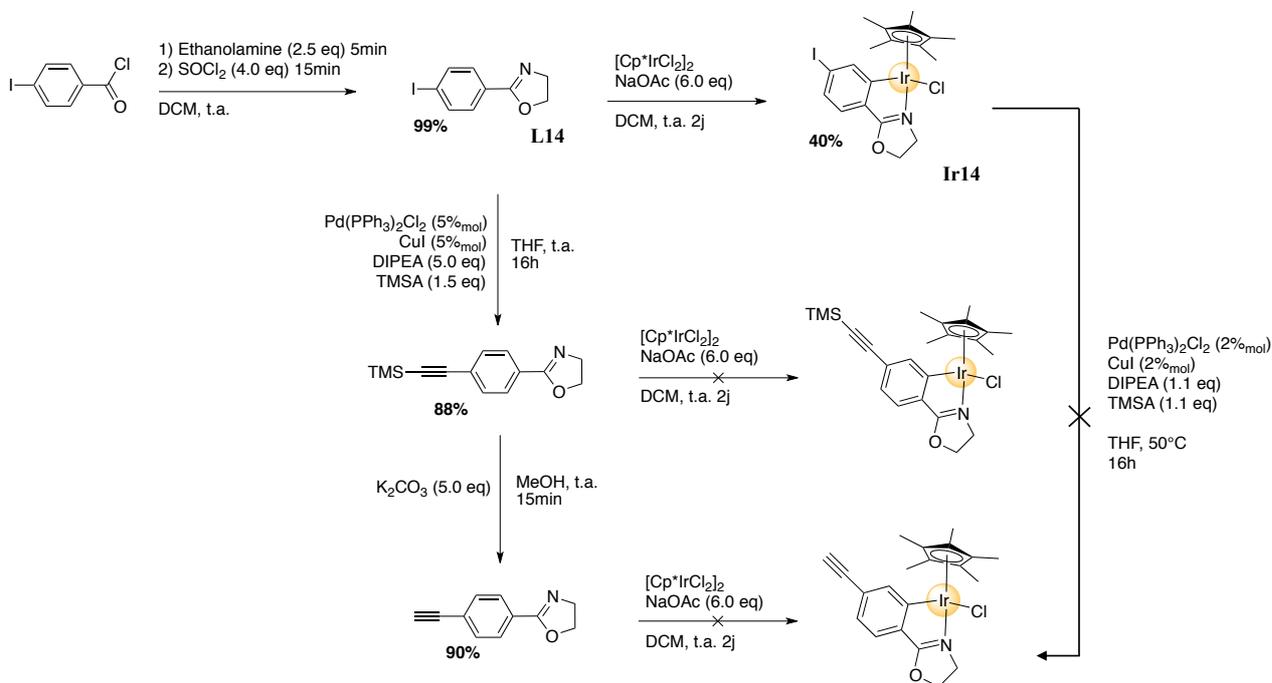


Schéma 36. Description de l'approche bio-orthogonale envisagée

Avec un tel complexe, nous envisageons donc le traitement de cellules puis la détection de sa localisation après fixation. Cette méthode nous donnera une information non-biaisée sur la localisation du complexe originel ayant pu former des adduits sur les protéines. Néanmoins le complexe libre, capable de diffuser dans la cellule, ne sera probablement pas détecté par cette méthode. Nous avons envisagé dans un premier temps de synthétiser un complexe réactif en CuAAC, comportant une fonction alcyne terminale (éthynyle).

Pour cela, une 2-phényloxazoline comportant un alcyne vrai sur la partie phényle a été synthétisée à partir de **L14** au moyen d'un couplage de Sonogashira suivi d'une déprotection de l'alcyne vrai (Schéma 37).



**Schéma 37.** Stratégies de synthèse d'un complexe porteur d'une fonction éthyne clickable

Cependant ni ce ligand (phox)-éthyne ni son précurseur protégé n'ont pu être complexés à l'Iridium en suivant les procédures précédemment décrites. Enfin, la réaction de Sonogashira n'a pas pu être effectuée directement sur le complexe **Ir14**. En somme, aucun des trois chemins réactionnels envisagés n'a permis d'accéder à un complexe comportant une fonction alcyne terminale. Les dérivés comportant des triples liaisons semblent plutôt réagir directement sur l'atome d'iridium du complexe et la destruction des deux réactifs était systématiquement observée. Il est connu dans la littérature que les alcynes peuvent réagir avec les complexes d'iridium qui sont capables de catalyser leur dimérisation,<sup>[193,194]</sup> dans d'autres cas le produit d'insertion de l'alcyne est isolé avec formation concomitante d'un nouveau métallacycle élargi.<sup>[89,195,196]</sup> Afin de pallier à ce problème de réactivité de la fonction alcyne vis-à-vis de l'iridium, la stratégie synthétique a été inversée. Nous nous sommes tournés vers la synthèse d'un complexe comportant une fonction azoture **IrN<sub>3</sub>** et l'emploi d'un partenaire fluorogénique comportant la fonction éthyne. Cette synthèse a très bien fonctionné et a permis d'obtenir le complexe (phox) clickable **IrN<sub>3</sub>** avec un bon rendement global de 73%.

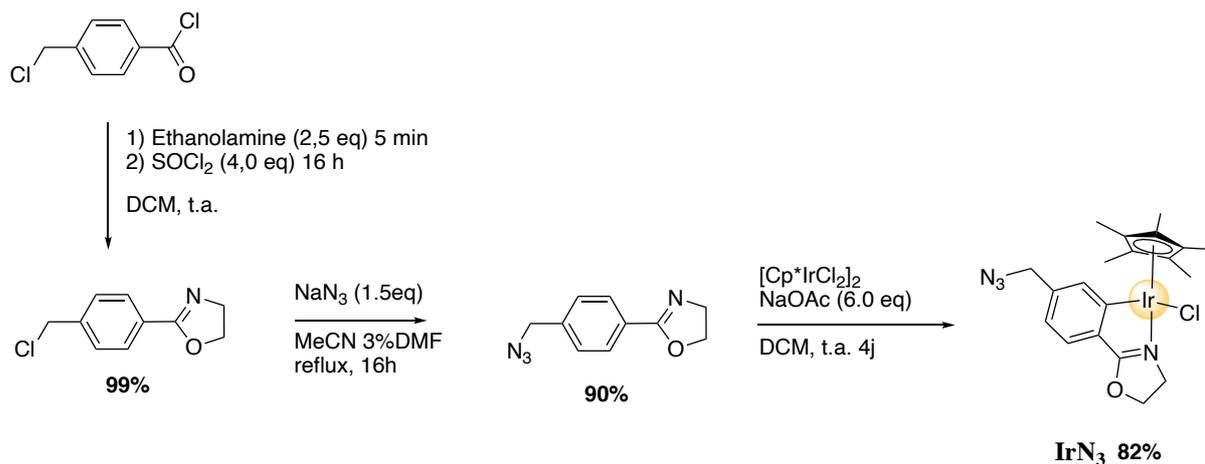


Schéma 38. Synthèse de IrN<sub>3</sub> en 3 étapes

Ensuite, l'échange du ligand chlorido de IrN<sub>3</sub> a été effectué avec le DMSO selon la méthode précédemment décrite, ce qui a permis d'isoler IrN<sub>3</sub>-DMSO, un solide de couleur jaune pâle. Sous forme de poudre, les composés IrN<sub>3</sub> et IrN<sub>3</sub>-DMSO sont particulièrement instables à cause de leur fonction azoture de benzyle, un nouveau complexe se forme avec le temps. Ce produit de dégradation est visible par RMN du proton et présente un singulet caractéristique à 10 ppm, il s'agit vraisemblablement d'une conversion de l'azoture en imine résultant d'une perte de diazote.<sup>[197]</sup> En revanche sous forme cristalline, le composé d'une vive couleur orange est stable durant plusieurs mois à 4°C, une structure cristallographique a pu être obtenue à partir d'un monocristal.

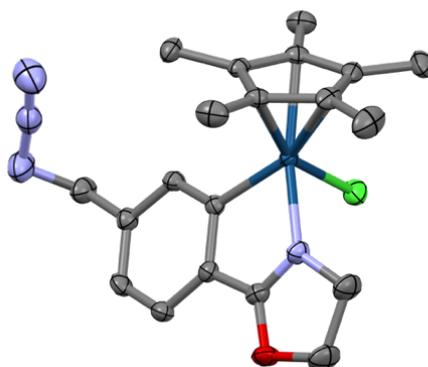


Figure 97. Structure cristallographique obtenue pour IrN<sub>3</sub>

Quelques longueurs de liaisons (Å) et angles (°): Ir-Cl 2.394, Ir-N 2.089, Ir-C 2.045, C-Ir-N 77.16 (très proche de IrO1)

## 2. Synthèse du partenaire fluorogène

Le partenaire fluorescent qui sera conjugué à  $\text{IrN}_3$  doit comporter une fonction réactive vis-à-vis d'un azoture, comme un alcyne terminal. Dans la littérature récente, il existe un BODIPY-*meso*-éthynyle émettant une fluorescence décalée dans le jaune, issue de la rigidité de la liaison triple conjuguée au BODIPY. La réaction entre cette molécule et une fonction azoture donne un 1,2,3-triazole dont la fluorescence est verte dans des solvants organiques.<sup>[198]</sup> Cette différence d'émission de fluorescence entre la sonde sous forme libre ou sous forme clickée nous a conforté dans l'idée d'utiliser cette stratégie pour ce projet. Le BODIPY-*meso*-éthynyle **B9** a donc été synthétisé en deux étapes, d'après la procédure décrite dans la littérature (Schéma 39).

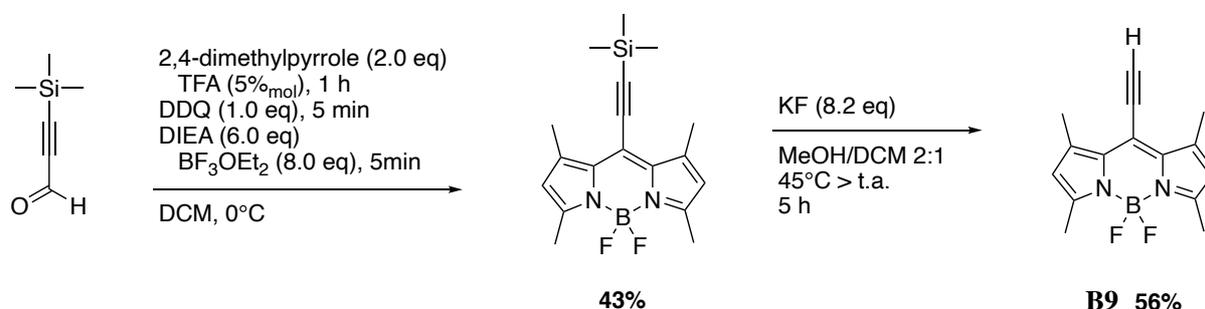


Schéma 39. Synthèse d'un BODIPY-*meso*-éthynyle **B9**

Malheureusement, contrairement à la description de la littérature, le BODIPY **B9** présente 2 bandes de fluorescence dans l'eau, suggérant la présence de deux espèces émissives qui pourraient être une forme agrégée et une forme soluble coexistant dans cet environnement aqueux. En conséquence, une analyse ratiométrique serait nécessaire pour pouvoir distinguer la forme libre (jaune et verte) de la forme clickée (uniquement verte). En outre, la synthèse d'un BODIPY comportant une fonction alcyne terminale moins rigide a été envisagée mais le produit de réaction n'a pas pu être isolé (Schéma 40).

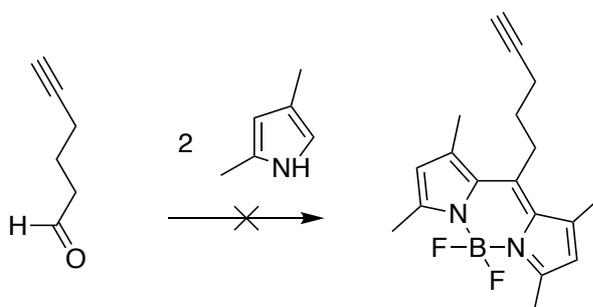
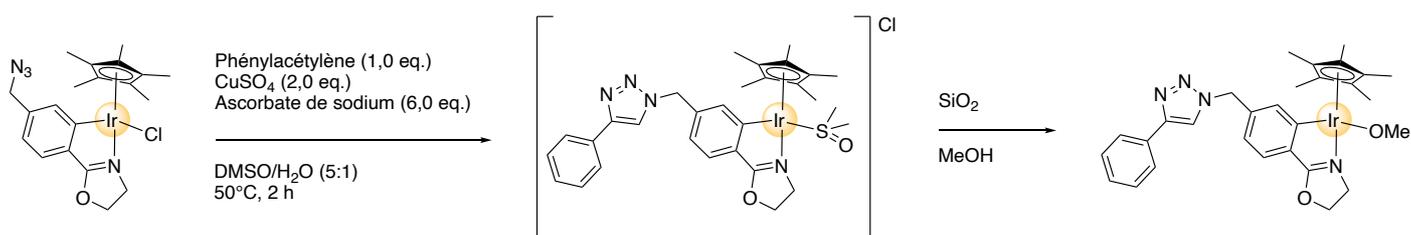


Schéma 40. Synthèse d'un BODIPY- $(\text{CH}_2)_3$ -éthynyle

Faute de résultats prometteurs, la synthèse d'un fluorophore clickable de type BODIPY a été abandonnée. Nous nous tournerons vers l'emploi de partenaires de click commerciaux pour la suite de cette étude sur **IrN<sub>3</sub>**.

Le protocole de CuAAC a été réalisé dans plusieurs conditions *in vitro* avec **IrN<sub>3</sub>** et le phénylacétylène. De nombreux essais ont été mis en œuvre pour isoler le produit de cyclo-addition dans des conditions classiques utilisant du cuivre et de l'ascorbate de sodium dans un mélange MeOH/PBS. Finalement l'utilisation du mélange DMSO/H<sub>2</sub>O (5 : 1) comme solvant de réaction a permis de stabiliser l'adduit **IrN<sub>3</sub>-DMSO** et défavoriser la réaction directe entre l'iridium et la triple liaison du phénylacétylène (Schéma 41). Le produit clické a été isolé avec un rendement très faible. Celui-ci a été purifié par flash-chromatographie sur gel de silice, ce qui a certainement entraîné sa dégradation. Par la suite, une seconde purification a été réalisée par RP-HPLC préparative et un cristal jaune pâle a été isolé et caractérisé par RMN et HRMS, correspondant à l'espèce clickée comportant un ligand méthoxo.



**Schéma 41.** CuAAC réalisée *in vitro* sur Ir-N<sub>3</sub> en présence d'un excès de DMSO

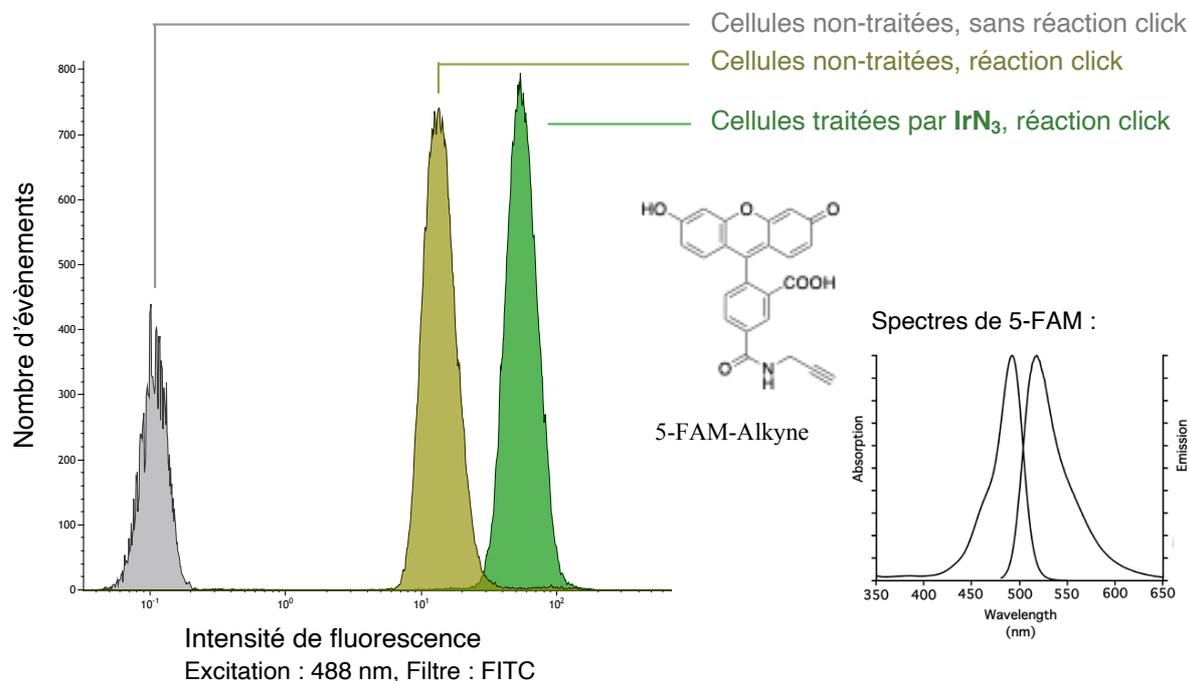
Dans le contexte intracellulaire, **IrN<sub>3</sub>** est vraisemblablement capable de faire des adduits sur les protéines à l'image de **Ir02** et **IrB8**. Dans ces conditions, l'azoture sera la seule fonction réactive vis-à-vis du substrat éthyne et la réaction de click sera favorisée.

### 3. Applications

#### 3.1. Optimisation de la réaction de CuAAC *in cellulo*

Avant d'utiliser **IrN<sub>3</sub>** pour visualiser sa distribution subcellulaire, les conditions optimales de réaction click ont été mises au point par cytométrie avec la 5-FAM-Alkyne (Jena BioSciences®) qui est une 5-carboxyfluorescéine comportant un groupement éthyne. Pour ce protocole, des cellules HeLa ont été perméabilisées avec de la saponine durant 15 min, lavées puis exposée au cocktail de réaction durant 60 min à température ambiante et à l'abri de la

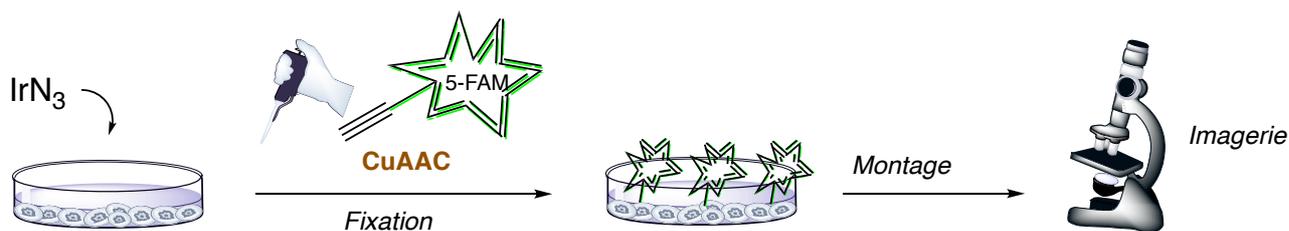
lumière. Le cocktail est un tampon phosphate contenant : l'éthynylfluorescéine à une concentration finale de 4,5  $\mu\text{M}$ , du sulfate de cuivre pour une concentration finale de 1 mM et 10 équivalents d'ascorbate de sodium par rapport au cuivre, ajoutés en dernier.



**Figure 98.** Mise au point de la réaction click avec la 5-FAM *in cellulo*

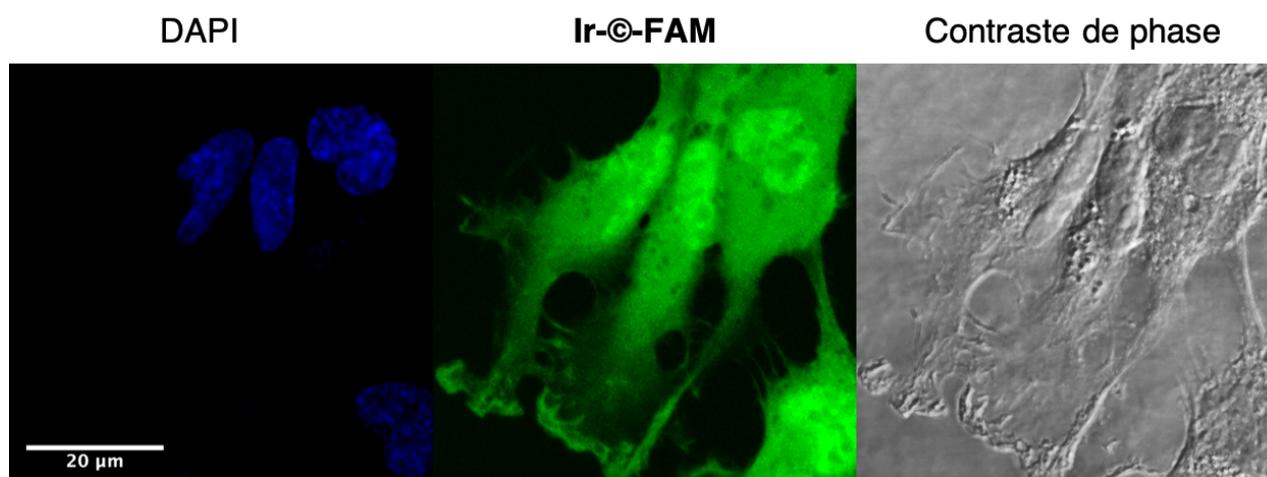
Des cellules traitées par **Ir02** au lieu de **IrN<sub>3</sub>** puis exposées aux réactifs de la réaction click ont donné une distribution superposable à la gaussienne jaune, confirmant que la cycloaddition est bien responsable de la fluorescence des cellules. Bien que dans ces conditions, l'éthynylfluorescéine résiduelle donne un signal, les deux gaussiennes présentent moins de 1% de leur population en commun avec une différence de maxima de plus d'une demi décade logarithmique. Ces conditions devraient donc être adéquates pour visualiser le fluorophore *clické* par microscopie de fluorescence qui sera désigné par **Ir-©-FAM** par la suite.

Pour améliorer la vitesse de la réaction de CuAAC, il est commun d'employer des ligands du cuivre comme le TBTA ou son analogue hydrosoluble le THPTA. Pour la suite des expériences, le catalyseur CuSO<sub>4</sub> a été remplacé par un mélange THPTA/CuSO<sub>4</sub> (5:1) et la réaction click sera réduite à 30 min d'incubation. De plus pour la microscopie, les cellules sont fixées au paraformaldéhyde mais ne sont pas perméabilisées avec un détergent.



**Schéma 42.** Réaction click sur lamelle de microscopie avec la 5-FAM

**IrN<sub>3</sub>** a été administré à 100 nM, 1  $\mu$ M ou 10  $\mu$ M pour subir la réaction de CuAAC sur cellules fixées. L'émission du fluorophore clické n'est détectable par le microscope à partir d'une concentration de traitement en **IrN<sub>3</sub>** de 1  $\mu$ M, avec un contraste optimal pour 10  $\mu$ M. Le contrôle non-traité mais exposé aux réactifs de click ne présente aucune émission de fluorescence, avec des images obtenues comparables à une administration de **IrN<sub>3</sub>** à 100 nM. Nous avons choisi d'incuber le complexe pour des durées inférieures ou égales à une heure, constatant des effets délétères du traitement par le complexe **IrN<sub>3</sub>** sur la morphologie et l'adhérence des cellules, à l'image de **Ir02**.

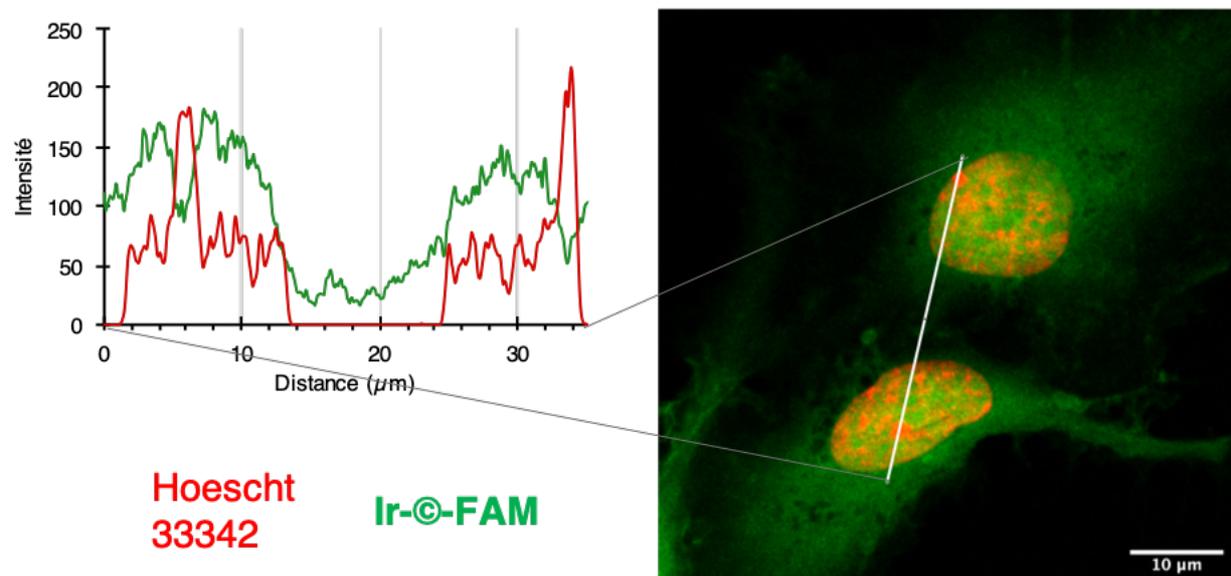


**Figure 99.** Images confocales (projections Z) de cellules hTERT-RPE1 traitées par 10  $\mu$ M **IrN<sub>3</sub>** durant une heure puis clickées avec la 5-FAM-Alkyne (vert).

Ces images de microscopie confocale montrent que **Ir-©-FAM** présente un signal intense dans le noyau, un signal plus diffus dans le cytoplasme, enfin on distingue des structures marquées au niveau des lamellipodes et des filopodes des cellules. Cette localisation indique

qu'après un traitement d'une heure, **IrN<sub>3</sub>** est localisé dans au moins trois compartiments subcellulaires. Notamment, il pourrait avoir un effet important sur le cytosquelette d'actine.

Nous avons dans un premier temps examiné plus en détail le profil de marquage par **Ir-©-FAM** du noyau, plus prononcé à une dose de 10  $\mu$ M, en le comparant à la coloration de la chromatine par le colorant vital Hoechst 33342. Cette molécule se lie aux bases adénine et thymine de l'ADN, elle est excitée dans l'UV et émet une fluorescence bleue compatible pour de l'imagerie multicolore avec la 5-FAM.



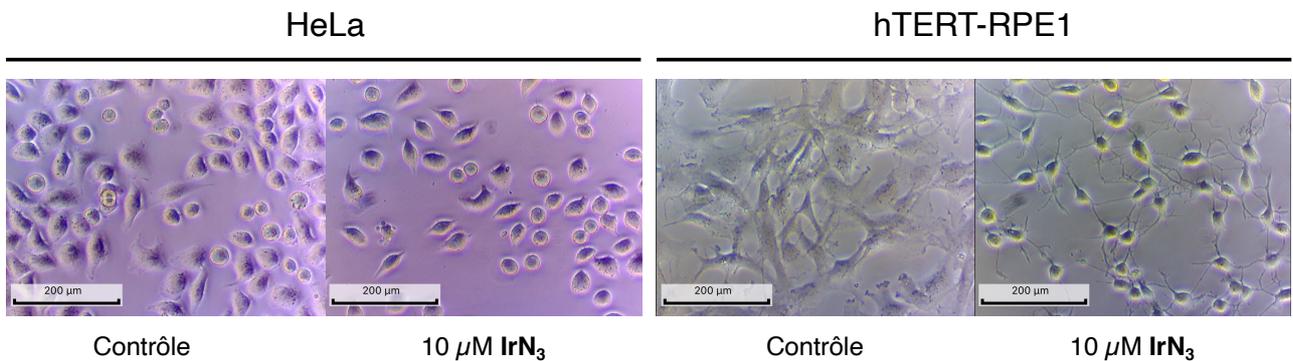
**Figure 100.** Comparaison des marquages nucléaires sur une tranche confocale de 210 nm

D'après le tracé d'intensité, les deux images sont inversement corrélées suggérant que **IrN<sub>3</sub>** se localise principalement sur des protéines nucléaires qui ne sont pas associées à la chromatine. Cette observation invalide de nouveau l'hypothèse de dommages directs à l'ADN induits par les semi-sandwich d'iridium, en accord avec les résultats obtenus pour **Ir02**. Par ailleurs, le marquage **Ir-©-FAM** contraste avec celui de **IrB8** qui ne se localise pas dans le noyau.

### 3.2. Effet de **IrN<sub>3</sub>** sur le cytosquelette d'actine

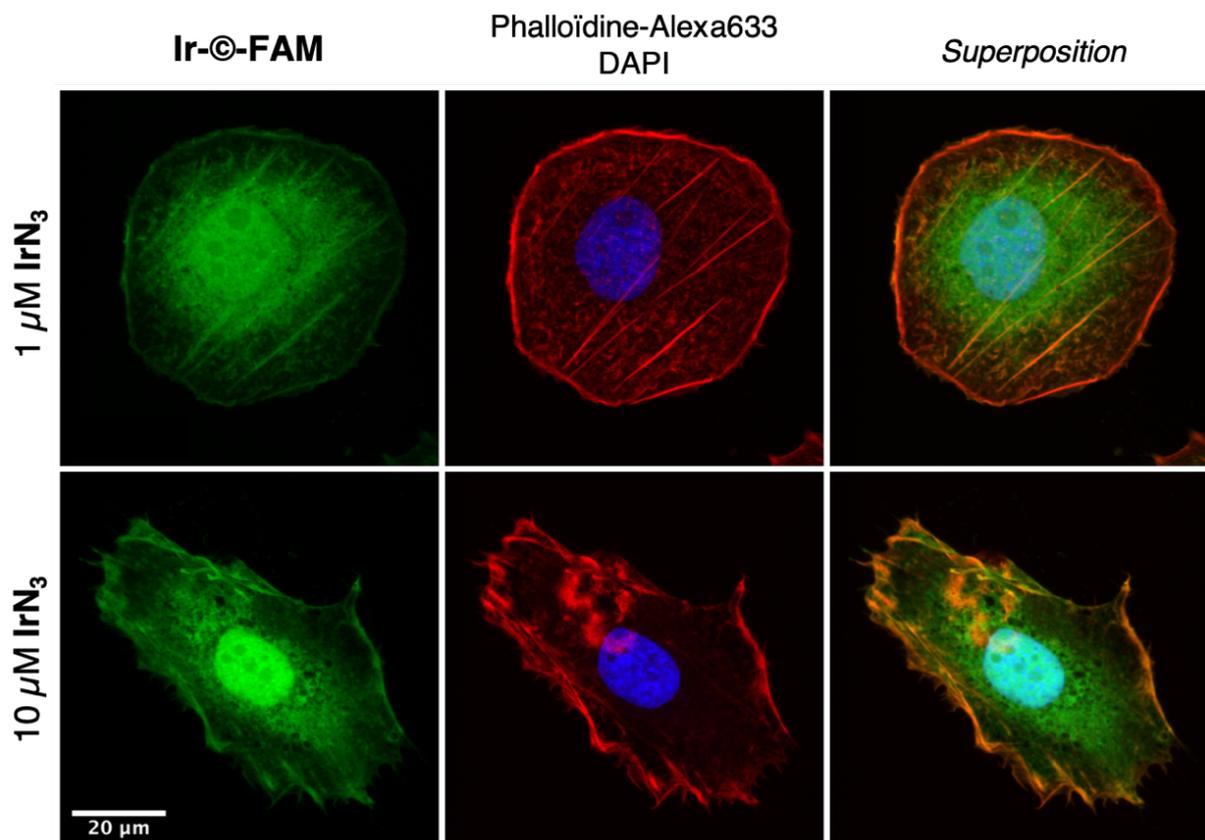
Au-delà d'une heure de traitement et à une concentration de 10  $\mu$ M **IrN<sub>3</sub>**, les cellules ont un comportement similaire aux cellules traitées par **Ir02**, caractérisé par une sévère perte

d'adhérence sur les deux lignées. Ce phénomène suggère que  $\text{IrN}_3$  perturbe le cytosquelette d'actine.



**Figure 101.** Morphologie des cellules après 2 h de traitement par  $\text{IrN}_3$

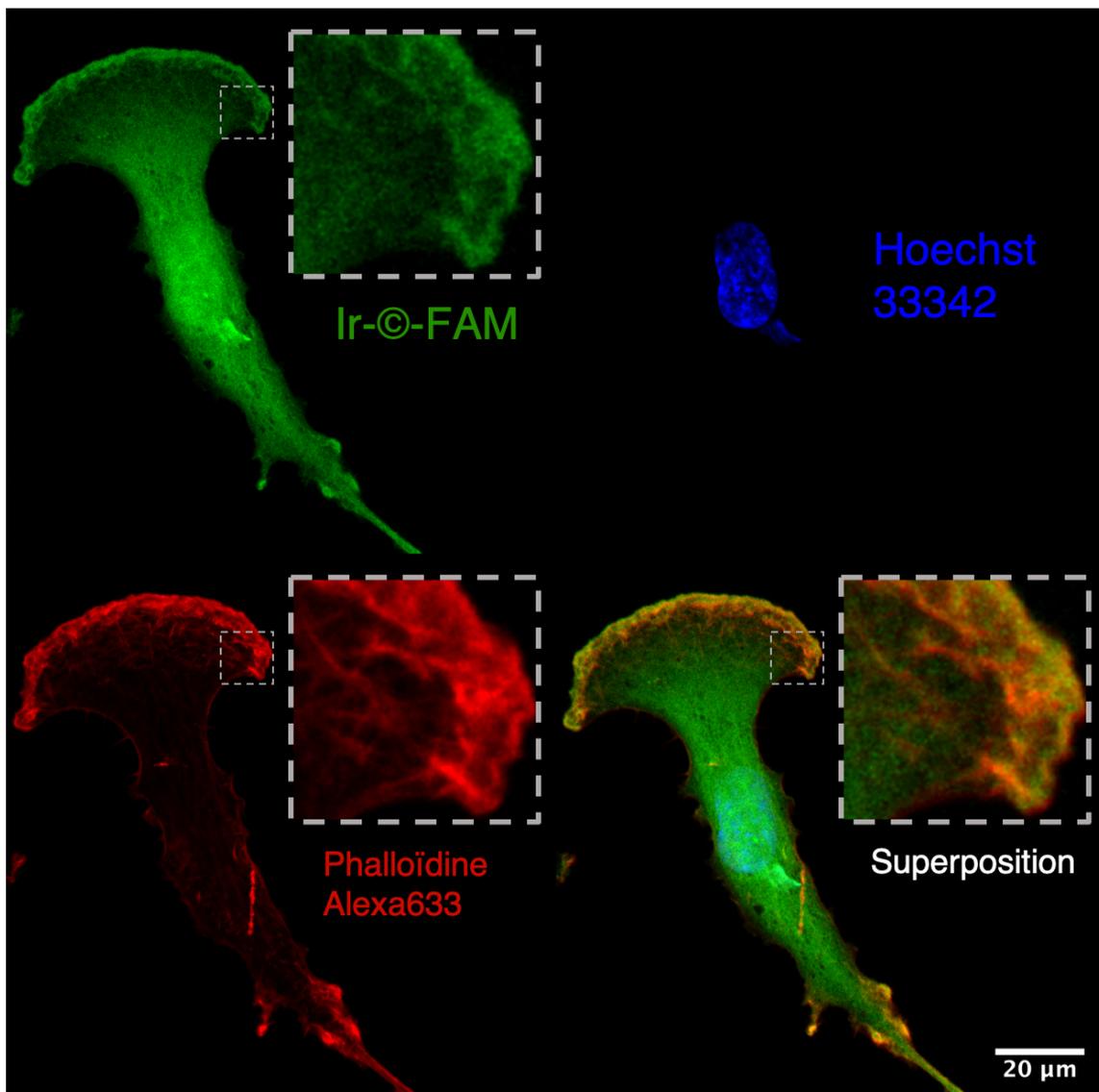
Afin de déterminer si  $\text{IrN}_3$  colocalise avec le cytosquelette d'actine, des cellules HuH-7 ont été choisies pour leur capacité à former des fibres de stress bien marquées.



**Figure 102.** Co-localisation de  $\text{IrN}_3$  avec le cytosquelette d'actine dans la lignée HuH-7

Les cellules ont cette fois-ci été perméabilisées dans une solution bloquante avant l'étape de réaction click. Ensuite, elles sont marquées avec une phalloïdine couplée à un fluorophore émettant dans le rouge lointain, ainsi que par le DAPI. Les cellules ont été montées entre lame et lamelle et imagées par microscopie confocale sur les trois canaux de fluorescence.

Les fibres de stress sont d'épais filaments contractiles constitués de microfilaments d'actine et de myosine, elles sont visibles aussi bien grâce au marquage par la phalloïdine et sur le marquage **Ir-©-FAM** (Figure 102). L'effet toxique de **IrN<sub>3</sub>** est modéré après une heure de traitement et 1  $\mu\text{M}$  **IrN<sub>3</sub>**. Enfin le noyau est moins intensément marqué à cette concentration. À l'inverse, pour 10  $\mu\text{M}$  de **IrN<sub>3</sub>** il y a un effet sur l'organisation des microfilaments et le cytosquelette d'actine semble fortement perturbé. Le réseau d'actine cortical est intensément marqué par les deux canaux et présente une morphologie diffuse. Tout comme les HuH-7, les hTERT-RPE1 adoptent avec un phénotype exploratoire lorsqu'elles sont ensemencées à basse densité, avec des lamellipodes caractéristiques. La morphologie d'un lamellipode a pu être observée dans cette lignée en employant une concentration de **IrN<sub>3</sub>** abaissée à 5  $\mu\text{M}$  (Figure 103).



**Figure 103.** Co-localisation de **IrN<sub>3</sub>** avec le cytosquelette d'actine dans la lignée hTERT-RPE1

En examinant plus précisément les différents marquages, on observe que ce n'est pas spécifiquement l'actine qui est marquée par **Ir-©-FAM**. Sur la superposition des canaux, il apparaît un dégradé de jaune et de rouge déjà aperçu dans le réseau cortical d'actine de la cellule HuH-7 traitée à 10  $\mu\text{M}$ . Il est possible que **IrN<sub>3</sub>** se lie à une protéine ou un complexe en interaction avec les microfilaments, comme par exemple le complexe Arp2/3 présent sur l'actine ramifiée.

### 3.3. Analyse des adduits de IrN<sub>3</sub> sur les protéines

La fonction bio-orthogonale de **IrN<sub>3</sub>** nous a permis dans un deuxième temps d'observer la formation d'adduits covalents sur les protéines. On trouve dans la littérature récente plusieurs protocoles d'analyse par réaction click effectuée directement sur une membrane de PVDF, notamment avec des substrats fluorogènes.<sup>[182]</sup> Ce n'est pas le cas de l'éthynylfluorescéine qui a réagi de manière peu spécifique avec les protéines d'intérêt (Schéma 43, Révélation **B.**). En outre, la fonction azoture est moins stable que l'alcyne vrai dans le contexte intracellulaire tout comme lors de l'extraction, la séparation et le transfert des protéines. Pour préserver le marquage des protéines, nous avons choisi d'effectuer la réaction sur le culot cellulaire perméabilisé, avant la lyse des cellules.

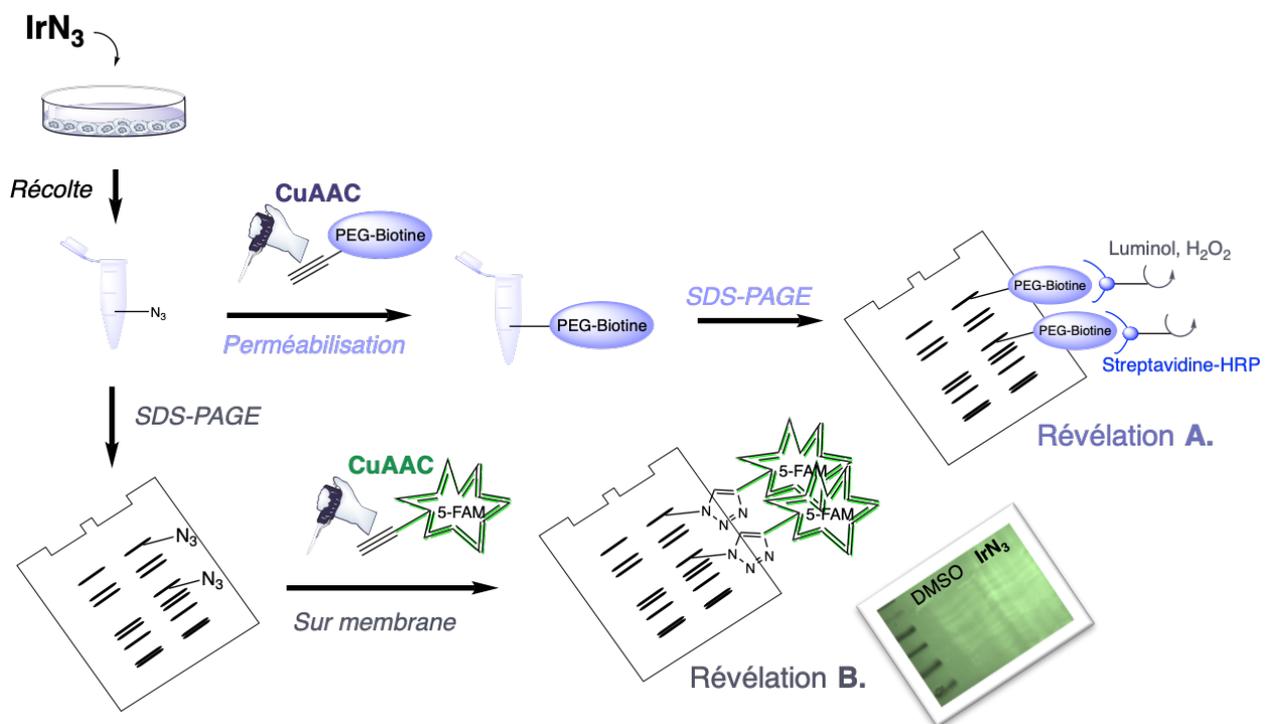
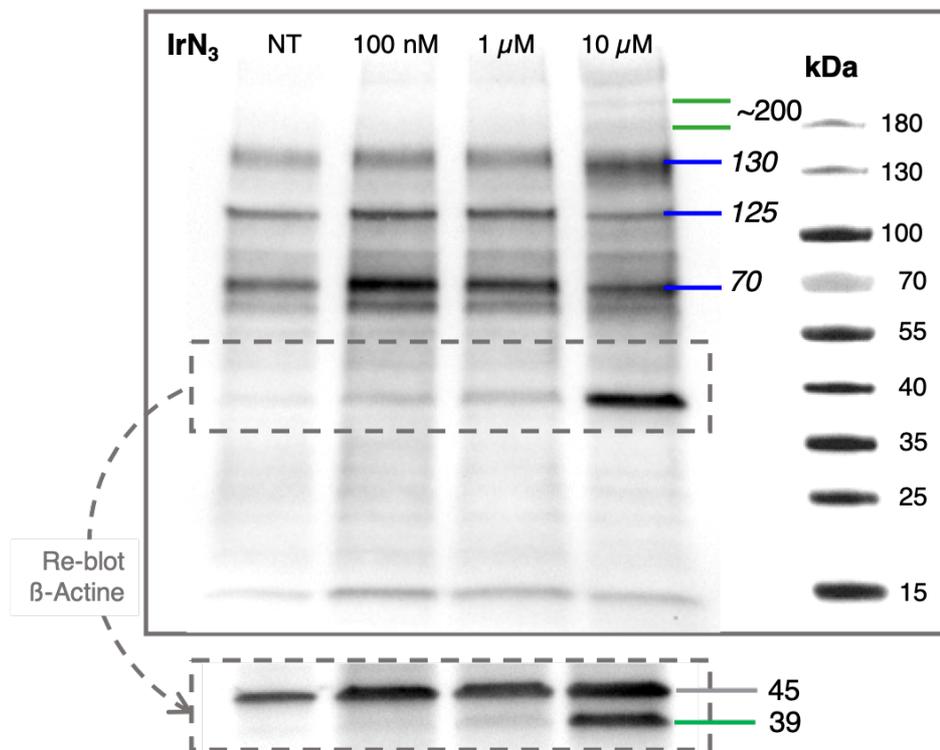


Schéma 43. Analyse des protéines marquées par IrN<sub>3</sub>

La biotine-(PEG)<sub>4</sub>-éthynyle a été utilisée comme substrat de réaction click, la membrane est donc révélée au moyen d'une streptavidine couplée à la HRP en tirant parti de l'interaction très forte et spécifique entre la biotine et la streptavidine. La biotine est certainement plus stable que l'azoture durant les étapes de traitement des échantillons, de plus la révélation enzymatique HRP permet d'obtenir un signal amplifié. Contrairement aux analyses de microscopie, ce protocole n'implique pas la fixation des cellules au paraformaldéhyde mais leur perméabilisation à la saponine, à l'image de l'expérience préliminaire de cytométrie, des petites protéines solubles ont pu être perdues lors de la réaction click. Par ailleurs, les extraits ne représentent que la fraction soluble dans le tampon de lyse, ils contiennent peu de protéines nucléaires.



**Figure 104.** Révélation à la streptavidine-HRP des extraits de cellules hTERT-RPE1 traitées par IrN<sub>3</sub>

Comme on peut le voir par le marquage de la piste non-traitée, cette méthode présente l'inconvénient de révéler les protéines biotinylées endogènes de la lignée hTERT-RPE1. Dans la figure 104, des bandes à 70, 125 et 130 kDa indiquées en bleu sont certainement des acétyl CoA carboxylases cytoplasmiques ainsi que des enzymes biotine-dépendantes de la mitochondrie comme la pyruvate carboxylase, toutes bien caractérisées.<sup>[199,200]</sup> Pour la plus haute concentration, ces bandes sont décalées vers les bas poids moléculaires, suggérant une modification de ces protéines due au traitement par IrN<sub>3</sub>. De manière intéressante, des bandes

spécifiques à la condition 10  $\mu\text{M}$  **IrN<sub>3</sub>** ont pu être détectées, indiquées en vert. Une seule de ces bandes correspondant à **Ir-©-Biotine** est particulièrement intense, à environ 39 kDa. Pour mémoire **IrB8** présentait aussi une bande spécifique dans les traitements *in vivo* avec ce poids moléculaire apparent.

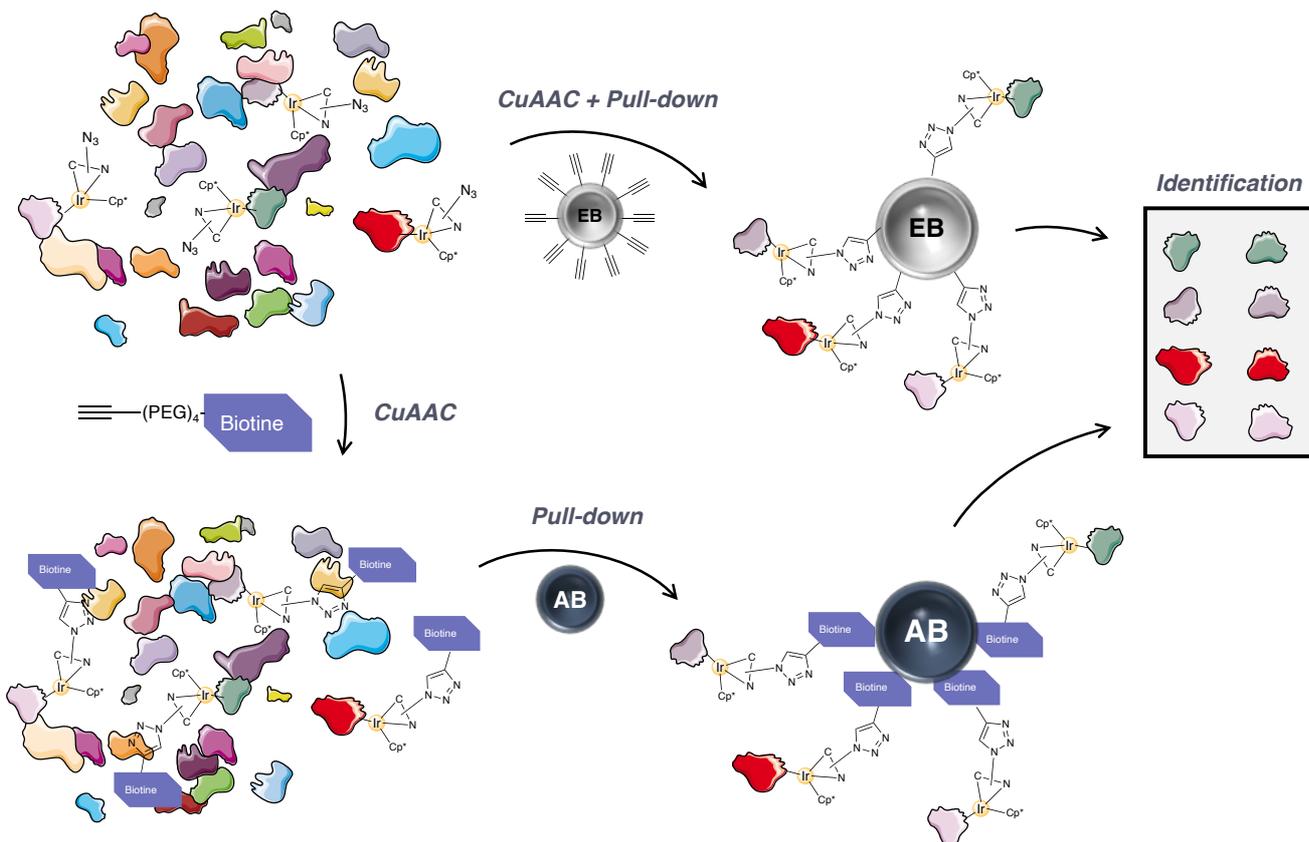
Par la suite, la membrane a été ré-incubée avec un anticorps primaire de souris anti- $\beta$ -Actine (45 kDa) et un anticorps secondaire couplé-HRP afin d'effectuer un contrôle de charge. (Figure 104, gris). Sur la dernière piste, les bandes correspondant à l'actine et à **Ir-©-Biotine** sont nettement séparées, ce qui suggère que **IrN<sub>3</sub>** n'interagit pas directement avec l'actine. Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous envisagerons des protocoles pour identifier ces protéines cibles et mieux analyser le comportement de **IrN<sub>3</sub>** dans les différents compartiments subcellulaires où il s'accumule.

## Perspectives

### 1. Identification des protéines cibles de **IrN<sub>3</sub>**

L'identification des cibles des complexes d'iridium de type semi-sandwich peut être effectuée par spectrométrie de masse protéomique. Avec cette méthode, les échantillons de protéines purifiées sont digérés par la trypsine et l'analyse de masse des peptides qui en résultent permet d'identifier des séquences caractéristiques de protéines connues.

Dans le cadre de ce projet, la purification de l'échantillon protéique représente l'étape clé de cette identification. Afin d'enrichir l'extrait en protéines comportant des adduits, deux stratégies s'offrent à nous : la méthode la plus traditionnelle est la ligation d'une biotine puis la capture des protéines biotinylées au moyen de billes d'avidine. Une option plus directe consiste à réaliser la réaction de CuAAC sur des billes comportant un substrat bio-orthogonal de surface, comme des billes éthynyle (EB) qui existent sous forme magnétique ou à base de sépharose, et peuvent comporter un bras photoclivable permettant de récupérer les protéines greffées.



**Schéma 44.** Deux stratégies de purification (pull-down) des protéines cibles de  $\text{IrN}_3$

La localisation intracellulaire de  $\text{IrN}_3$  indique que des protéines différentes peuvent être ciblées par le complexe qui se localise à la fois dans le cytoplasme sous forme diffuse, sur le cytosquelette d'actine et dans le noyau. Nous envisageons donc d'isoler les différentes fractions subcellulaires, après la réaction de click et avant la purification. Ce protocole permettrait par ailleurs d'obtenir plus d'informations sur la localisation de la protéine à 39 kDa avant d'employer la spectrométrie de masse protéomique.

## 2. Interactions avec le cytosquelette d'actine

Afin d'étudier plus particulièrement les interactions du complexe  $\text{IrN}_3$  avec le cytosquelette d'actine observées précédemment, nous envisageons de déterminer si le complexe perturbe directement les propriétés de polymérisation / dépolymérisation de l'actine purifiée. Pour cela, il conviendrait de réaliser une polymérisation à partir d'une solution de monomère d'actine et en présence d'ATP. Par la suite, les microfilaments seront sédimentés par centrifugation et le contenu en actine des différentes fractions obtenues sera quantifié par Western Blot.

Si par exemple, la présence du complexe induit une diminution du taux d'actine polymérisée, nous pourrions conclure qu'il interagit directement avec le monomère ou le polymère. Dans ce cas, il sera possible de réaliser la réaction de Click sur **IrN<sub>3</sub>** avec un fluorophore pour observer les microfilaments fluorescents. Cette technique a déjà été employée pour visualiser la croissance de microfilaments avec un microscope de fluorescence par réflexion totale interne (TIRFM ou microscope à onde évanescente).<sup>[201]</sup>

En revanche si le complexe ne compromet pas la polymérisation/dépolymérisation de l'actine *in vitro*, ce résultat montrerait que la localisation de **Ir-©-FAM** observée par microscopie relève d'adduits sur des protéines liées au cytosquelette d'actine. L'actine et ses protéines associées comme la gelsoline (GSN) et RhoA (Ras homolog family member A), peuvent notamment réguler le stress oxydant.<sup>[202]</sup> De même, il est connu que la protéine Keap1, mentionnée dans le deuxième chapitre, réside sur le réseau de microfilaments d'actine.<sup>[203]</sup> Afin d'identifier ces éventuelles protéines, une autre stratégie consisterait à isoler des microfilaments d'actine directement à partir de cellules non-traitées, puis incuber cette fraction subcellulaire avec le complexe **IrN<sub>3</sub>** pour former les adduits. Ensuite, l'échantillon serait purifié par chimie click suivi d'un *pull-down* comme présenté dans le schéma 44. Enfin la spectrométrie de masse protéomique nous permettrait de déterminer quelles sont les protéines liées au cytosquelette d'actine sur lesquelles le complexe **IrN<sub>3</sub>** a pu former des adduits.

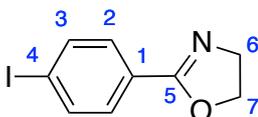
## Partie expérimentale

### 1. Design of a clickable iridium complex

The same materials and instrumentation as in Chapter 1 were used to isolate the following molecules. The BODIPY **B9** was obtained according to a procedure described in the literature and obtained with identical characterization data.

#### L14: 2-(4-iodophenyl)-4,5-dihydrooxazole

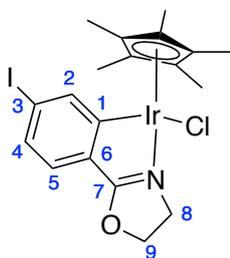
Obtained following procedure A as a white solid to yield 99% without purification needed.



$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7.77 (d, 2H,  $J = 8.5$  Hz,  $\text{H}_2$ ), 7.66 (d, 2H,  $J = 8.5$  Hz,  $\text{H}_3$ ), 4.43 (t, 2H,  $J = 9.4$  Hz,  $\text{H}_7$ ), 4.05 (t, 2H,  $J = 9.6$  Hz,  $\text{H}_6$ ).  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$   $\text{NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 166.89( $\text{C}_5$ ), 162.06( $\text{C}_1$ ), 137.73 ( $\text{C}_3$ ), 129.85( $\text{C}_2$ ), 115.14( $\text{C}_4$ ), 67.91( $\text{C}_7$ ), 55.18( $\text{C}_6$ ).

#### Ir14: Chlorido( $\eta^5$ -pentamethylcyclopentadienyl)(2-(4-iodophenyl- $\kappa\text{C}_2$ )-4,5-dihydrooxazole- $\kappa\text{N}$ )Iridium(III)

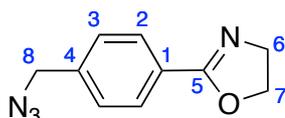
Obtained following procedure C as a yellow solid, purified by precipitation to yield 40%



$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  (ppm): 8.13 (d, 1H,  $J = 1.5$  Hz,  $\text{H}_2$ ), 7.37 (dd, 1H  $J = 8.0, 1.6$  Hz,  $\text{H}_4$ ), 7.14 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz,  $\text{H}_5$ ), 4.82 (m, 2H,  $\text{H}_9$ ), 4.05 (m, 1H,  $\text{H}_{8a}$ ), 3.90 (m, 1H,  $\text{H}_{8b}$ ), 1.74 (s, 15H,  $\text{H}^{\text{Cp}^*}$ ).  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$   $\text{NMR}$  (101 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  (ppm): 180.15( $\text{C}_1$ ), 167.80( $\text{C}_7$ ), 144.58( $\text{C}_2$ ), 131.01( $\text{C}_4$ ), 130.97( $\text{C}_6$ ), 128.02( $\text{C}_5$ ), 102.20( $\text{C}_3$ ), 88.49( $\text{C}^{\text{Cp}^*}$ ), 72.35( $\text{C}_9$ ), 50.92( $\text{C}_8$ ), 9.59( $\text{CH}_3^{\text{Cp}^*}$ ).

## 2-(4-(azidomethyl)phenyl)-4,5-dihydrooxazole

**L06** (500 mg, 2.55 mmol) was dissolved in 20 mL of MeCN and 1 mL of DMF was added.  $\text{NaN}_3$  (250 mg, 1.5 eq.) was added to the stirred solution that was refluxed for 16 h. The reaction mixture was treated with 20 mL of water after it cooled down, and the aqueous layer was extracted three times with DCM. The organic layers were washed three times with  $\text{H}_2\text{O}$ , dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and evaporated to give a yellow oil.  $^1\text{H}$  NMR showed that it was the expected product with 100% conversion and no further purification needed. Only 1 eq. of DMF was left to remove. The product was thus dissolved in  $\text{Et}_2\text{O}$  and washed three times with brine. After drying with  $\text{MgSO}_4$ , filtering and removing the solvent, an yellowish oil was obtained again. It solidified after complete volatiles evaporation. Its final weight was 466 mg (90%).

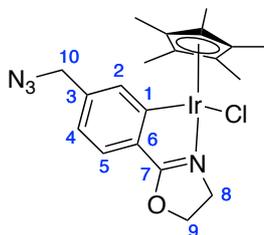


$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7.96 (d, 2H,  $J = 8.2$  Hz,  $\text{H}_3$ ), 7.36 (d, 2H,  $J = 8.1$  Hz,  $\text{H}_2$ ), 4.44 (t, 2H,  $J = 9.5$  Hz,  $\text{H}_7$ ), 4.39 (s, 2H,  $\text{H}_8$ ), 4.07 (t, 2H,  $J = 9.5$  Hz,  $\text{H}_6$ ).  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 164.30( $\text{C}_5$ ), 138.71( $\text{C}_4$ ), 128.80( $\text{C}_3$ ), 128.12( $\text{C}_2$ ), 127.90( $\text{C}_1$ ), 67.82( $\text{C}_7$ ), 55.14( $\text{C}_6$ ), 54.55( $\text{C}_8$ ).

**IR (ATR):**  $\nu(\text{N}=\text{N}=\text{N}) = 2081\text{cm}^{-1}$

## **$\text{IrN}_3$ : Chlorido( $\eta^5$ -pentamethylcyclopentadienyl)(2-((4-azidomethyl)phenyl- $\kappa\text{C}^2$ )-4,5-dihydrooxazole- $\kappa\text{N}$ )Iridium(III)**

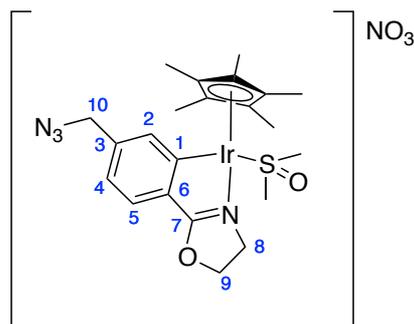
This reaction was attempted three times and needed anhydrous conditions to be performed correctly. DCM was degassed for 15 min over  $4\text{\AA}$  MS and  $[\text{Cp}^*\text{IrCl}_2]_2$  (204 mg, 256  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq.) was dissolved into the mixture. Activated NaOAc (126 mg, 1.537 mmol, 6.0 eq.) was added to the stirred solution and 2-(4-(azidomethyl)phenyl)-4,5-dihydrooxazole (109 mg, 539  $\mu\text{mol}$ , 2.2 eq.) was added after 90 min stirring (until the colour was lighter) under argon atmosphere. The reaction was stirred 1 h at r.t. and became orange, it was filtered over a pad of dry Celite® 545 and evaporated to a semi-solid to a foam weighing 293 mg. This crude product was washed twice with pentane and dissolved in 3 mL of DCM, excess pentane was added and 150 mg of red precipitate containing mostly impurities were formed. The filtrate was a yellow solution from which part of the pure product could be crystallized by slow evaporation from a concentrated solution in DCM (1 week) : 62 mg of pure orange crystals were obtained (8% yield).



$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  (ppm): 7.72 (s, 1H,  $\text{H}_2$ ), 7.41 (d, 1H,  $J = 7.7$  Hz,  $\text{H}_5$ ), 6.97 (dd, 1H,  $J = 7.7$ , 1.3 Hz,  $\text{H}_4$ ), 4.93 – 4.76 (m, 2H,  $\text{H}_9$ ), 4.46 (d, 1H,  $J = 13.6$  Hz,  $\text{H}_{10a}$ ), 4.36 (d, 1H,  $J = 13.6$  Hz,  $\text{H}_{10b}$ ), 4.10 (ddd, 1H,  $J = 12.5$ , 9.7, 7.8 Hz,  $\text{H}_{8a}$ ), 3.91 (ddd, 1H,  $J = 12.5$ , 10.6, 9.2 Hz,  $\text{H}_{8b}$ ), 1.76 (s, 15H,  $\text{H}^{\text{Cp}^*}$ ).  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  NMR (75 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  (ppm): 180.09( $\text{C}_1$ ), 165.54( $\text{C}_7$ ), 139.29( $\text{C}_3$ ), 135.88( $\text{C}_2$ ), 131.67( $\text{C}_6$ ), 126.73( $\text{C}_4$ ), 122.16( $\text{C}_5$ ), 88.37( $\text{C}^{\text{Cp}^*}$ ), 72.25( $\text{C}_9$ ), 55.77( $\text{C}_8$ ), 50.89( $\text{C}_{10}$ ), 9.64( $\text{CH}_3^{\text{Cp}^*}$ ). **HRMS (ESI+):**  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{ClIrN}_4\text{O}$ : 529.1574; found: 529.1574 [ $\text{M}-\text{Cl}$ ] $^+$ . **IR (ATR):**  $\nu(\text{N}=\text{N}=\text{N}) = 2091\text{cm}^{-1}$

**IrN<sub>3</sub>-DMSO: [Dimethylsulfoxide-( $\eta^5$ -pentamethylcyclopentadienyl)(2-((4-azidomethyl)phenyl- $\kappa^2$ )-4,5-dihydrooxazole- $\kappa^N$ )Iridium(III)] Nitrate**

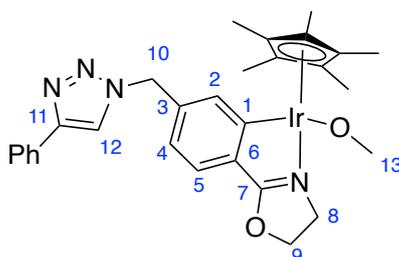
IrN<sub>3</sub> (14 mg, 25  $\mu$ mol) was dissolved in 3 mL of DCM and AgNO<sub>3</sub> (4 mg, 1.0 eq.) was added to the solution. After 10 min, DMSO (2  $\mu$ L, 1.1 eq.) was added and the mixture was stirred at r.t. for 16 h. The mixture went turbid over an hour, and AgCl (brown precipitate) appeared overnight. The suspension was filtered over p4 sintered glass and the obtained clear yellow solution was evaporated to give 15 mg of yellow solid. Residual cyclohexane was removed under vacuum to quantitatively give the product as a bright yellow solid.



<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\delta$  (ppm): 7.63 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 7.58 (d, 1H,  $J$  = 7.8 Hz, H<sub>5</sub>), 7.23 (dd, 1H,  $J$  = 7.8, 1.3 Hz, H<sub>4</sub>), 5.26 – 5.14 (m, 1H, H<sub>9a</sub>), 5.07 – 4.95 (m, 1H, H<sub>9b</sub>), 4.46 (d, 2H,  $J$  = 1.08 Hz, H<sub>10</sub>), 4.20 – 4.01 (m, 2H, H<sub>8</sub>), 3.07 (s, 3H, H<sub>DMSO</sub>), 2.63 (s, 3H, H<sub>DMSO</sub>), 1.85 (s, 15H, H<sup>Cp\*</sup>). <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR (101 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\delta$  (ppm): 182.12(C<sub>1</sub>), 156.04(C<sub>7</sub>), 142.32(C<sub>3</sub>), 135.95(C<sub>2</sub>), 131.07(C<sub>6</sub>), 129.03(C<sub>4</sub>), 125.28(C<sub>5</sub>), 96.85(C<sup>Cp\*</sup>), 73.65(C<sub>9</sub>), 55.05(C<sub>8</sub>), 52.02(C<sub>10</sub>), 46.71 – 44.57(CH<sub>3</sub><sup>DMSO</sup>), 9.48(CH<sub>3</sub><sup>Cp\*</sup>).

**Chlorido( $\eta^5$ -pentamethylcyclopentadienyl)(2-((4-(5-benzyl-1H-1,2,3-triazolyl-4-yl)methyl)phenyl- $\kappa^2$ )-4,5-dihydrooxazole- $\kappa^N$ )Iridium(III)**

IrN<sub>3</sub> (278 mg, 492  $\mu$ mol) was dissolved in 5 mL of DMSO for 10 min at 50°C using a water bath. The colour of the solution became lighter marking the formation of a cationic DMSO adduct. Phenylacetylene (55  $\mu$ L, 500  $\mu$ mol) was added and no change of colour occurred. Copper sulfate pentahydrate (250 mg, 1 mmol, 2.0 eq.) was added in 1 mL of water, the mixture turned green and translucent and sodium ascorbate (600 mg, 3 mmol, 6.0 eq.) was added, the formation of Cu(I) was marked by the sudden yellow colour of the reaction mixture. It was stirred 2 h at 50°C and DMSO was evaporated under reduced pressure for one more h. The crude product was a dark red semi-solid, it was treated with 5 mL of water and 5 mL of DCM. The aqueous layer was extracted twice with DCM and the combined organic layers were washed twice with an aqueous 0.5 M EDTA solution. The crude was evaporated to dryness and filtered through a pad of silica in MeOH. During this operation, the methoxo neutral product could have been formed. The most polar fraction was eluted in reverse phase preparative HPLC column using MeOH to give ca. 5 mg of pure product as pale yellow crystals.



**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ (ppm): 7.84 – 7.73 (m, 3H, 2H<sup>Ph</sup> + H<sub>2</sub>), 7.49 (s, 1H, H<sub>12</sub>), 7.42 – 7.32 (m, 5H, H<sub>5</sub> + H<sup>Ph</sup>), 7.32 (m, *J* 1H, H<sub>5</sub>), 7.05 (dd, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 5.72 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H, H<sub>10a</sub>), 5.62 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H, H<sub>10b</sub>), 4.95 (q, *J* = 8.6 Hz, 1H, H<sub>9a</sub>), 4.79 (q, *J* = 9.5 Hz, 1H, H<sub>9b</sub>), 4.05 – 3.91 (m, 2H, H<sub>8</sub>), 2.21 (s, 3H, H<sub>13</sub>), 1.73 (s, 15H, H<sup>Cp</sup>). **<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR** (101 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ (ppm): 181.12(C<sub>1</sub>), 161.06(C<sub>7</sub>), 138.82(C<sub>3</sub>), 135.11(C<sub>12</sub>), 132.80(C<sub>2</sub>), 131.54(C<sub>6</sub>), 131.34(C<sub>11</sub>), 129.39(2C<sup>Ph</sup>), 128.64(C<sup>Ph</sup>), 127.42(C<sub>5</sub>), 126.13(2C<sup>Ph</sup>), 122.16(C<sub>4</sub>), 120.57, 93.75(C<sup>Cp\*</sup>), 72.69(C<sub>9</sub>), 54.40(C<sub>8</sub>), 51.97(C<sub>10</sub>), 50.96(C<sub>13</sub>), 9.43(CH<sub>3</sub><sup>Cp\*</sup>). **HRMS** (ESI+): *m/z* calculated for C<sub>28</sub>H<sub>30</sub>IrN<sub>4</sub>O: 631.2043; found: 731.2049 [M-Cl]<sup>+</sup> (-0.7 ppm).

**X-ray crystallography analysis.** The structure of IrN<sub>3</sub> was solved using the same instrumentation and software as in Chapter 1

## 2. Applications of a clickable iridium complex

**Cell culture.** HeLa, hTERT-RPE1 and HuH-7 cell lines were previously used and described in Chapters 1 and 2. All treatments with IrN<sub>3</sub> were performed in serum-free media. Stock solutions of IrN<sub>3</sub> was of 20 mM in DMSO.

**Home-made click-cocktail reaction mixture (optimal conditions).** The buffer used was either PBS (Microscopy), or PBS 1% Saponin (Western Blot) or PBS 1% Saponin 3% BSA (Cytometry). A stock solution of catalyst (25X) was used and kept at 4°C : 100 mM CuSO<sub>4</sub> and 500 mM THPTA in water. A stock solution of sodium ascorbate (100X, 200mg/mL) was prepared extemporaneously as its stability is limited in time. The click-cocktail was made by diluting the alkynyl substrate at a concentration of 4.5 to 10 μM in the buffer, then adding the catalyst premixed solution and finally the sodium ascorbate at the last moment. The cocktail turns from blue to yellow, indicating the formation of the Cu(I) species.

**CuAAC of 5-FAM-Alkyne for flow cytometry analysis.** Two 100 mm dishes were seeded with 3.10<sup>6</sup> HeLa cells in 10 mL of complete medium. The next day, cells were washed with 10 mL of warm PBS and treated during 1 h with either 10 μM IrN<sub>3</sub> (density and volume corresponding to 30 fmol/cell) or 0,05% DMSO. Cells were detached using 1 mL of 0.05% Trypsin-EDTA, quenched with 9 mL of PBS containing 1 % FBS, pelleted and fixed with 300 μL of 4 % PFA in PBS for 15 min at rt. Finally, pellets were washed with 9 mL of PBS containing 1 % BSA, permeabilized with 1% Saponin in PBS during 15 min and incubated with 500 μL of click cocktail containing 4.5 μM 5-FAM alkyne. Before fluorescence analysis of the cells by flow cytometry, DNA was stained with FxCycle Violet and samples were resuspended in 0.5 % BSA in PBS.

**CuAAC of 5-FAM-Alkyne for imaging.**  $75 \cdot 10^3$  HeLa or hTERT-RPE1 cells were seeded on coverslips in a 24-wells plate and cultured in complete medium. Wells were washed with warm PBS and treated with  $\text{IrN}_3$  or the DMSO vehicle at concentrations ranging from 0.1 to 10  $\mu\text{M}$  and times from 1-3 h. After treatment, samples were fixed with 200  $\mu\text{L}$  4 % PFA in PBS for 15 min at rt and washed twice with PBS. Coverslips were washed a third time with 3 % BSA in PBS and permeabilized during 20 min with either the 1 % Saponin or 0.5 % Triton X-100 in PBS (same results). Specimens were washed twice with 3 % BSA in PBS and incubated with 70  $\mu\text{L}$  of click cocktail during 30 min in the dark. Finally coverslips were washed twice with 3 % BSA in PBS and once with PBS. Cell nuclei were stained with DAPI in PBS during 15 min and samples were mounted using Invitrogen Prolong Diamond mounting medium.

**CuAAC of 5-FAM alkyne and staining of actin.**  $50 \cdot 10^3$  HuH-7 or hTERT-RPE1 cells were seeded on coverslips in a 12-wells plate containing 14 mm coverslips (#1.5) and cultured in complete medium. The next day, cells were washed and treated for 1 h with  $\text{IrN}_3$  at 100 nM, 1  $\mu\text{M}$  or 10  $\mu\text{M}$  in serum-free media. Cells were fixed with 4 % PFA in PBS and washed three times with PBS. Specimens were blocked and permeabilized using PBS containing 3 % BSA and 0.5 % Triton X-100 during 30 min at rt. Coverslips were washed with PBS and incubated with the same click cocktail during 30 min. Finally, samples were washed 3 times with PBS washes and stained with PBS containing 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Hoechst 33342 and Alexa Fluor 633-Phalloïdin in PBS during 30min. Coverslips were washed with PBS and mounted.

**CuAAC of ethynyl-PEG<sub>4</sub>-biotin on a cell suspension.** 4 dishes (100 mm) were seeded with  $2 \cdot 10^6$  hTERT-RPE1 cells cultured overnight in 10 mL of complete medium. The next day, cells were washed with PBS and treated for 1 h with either the DMSO vehicle or  $\text{IrN}_3$  (0.1, 1 or 10  $\mu\text{M}$ ) in serum free medium. After treatment, cells were washed with PBS and detached with 0.05% Trypsin-EDTA, the dissociation reagent was quenched with PBS containing 1 % BSA. Cells were pelleted and washed 3 times with PBS at 4°C, they were permeabilized with 1 % Saponin in PBS containing protease inhibitors for 15 min at 4°C. Next, pellets were incubated with the click cocktail (10  $\mu\text{M}$  ethynyl-biotin) for 30 min at rt, washed three time with the permeabilization buffer and lysed in 100  $\mu\text{L}$  of RIPA buffer per sample for 30 min at 4°C. Cells were centrifugated at 14 000 rpm and supernatants were denaturated and migrated in a 10 % polyacrylamide gel by SDS-PAGE. Proteins were transferred onto a 0.2  $\mu\text{m}$  nitrocellulose membrane stained with Ponceau S, blocked with 5 % BSA in TBS-t for 1 h. After 1 h incubation with Streptavidin-HRP (1:1000) in TBS-t, three washes with TBS-t and one wash with distilled water, the membrane revelation was carried out using the BioRad ECL kit.

## Conclusion générale

Depuis la découverte de la Cisplatine en 1965 et de ses remarquables propriétés anti-tumorales, la recherche autour de molécules cytotoxiques à base de métaux de transition ne cesse de s'intensifier. L'avantage et l'originalité des complexes organométalliques réside en leur capacité à échanger des ligands, changer de degré d'oxydation ou encore pouvoir être visualisés *in vivo*. Après l'or, l'osmium et le ruthénium, de nouveaux complexes à base d'iridium(III) sont étudiés depuis une dizaine d'années. Les complexes d'iridium(III) à ligand arène ou semi-sandwich ont particulièrement attiré l'attention des chercheurs du fait de leurs propriétés anticancéreuses prometteuses. En effet, ils possèdent une réactivité chimique très riche qui pourrait s'avérer utile dans le contexte intracellulaire. Ce sont précisément ces aspects moléculaires qui ont été étudiés dans ce projet à l'interface entre la chimie et la biologie, dans le but de rationaliser leur toxicité et perfectionner leur conception.

Le mécanisme d'action cytotoxique des semi-sandwich d'iridium comportant un ligand chélatant de type phényloxazoline semble être principalement lié à la production d'ERO qui entraînent l'apoptose des cellules tumorales par la voie mitochondriale intrinsèque. Cette élévation des niveaux d'ERO a été reliée à une production catalytique de  $H_2O_2$  par réduction du dioxygène dissous et en utilisant le NADH comme donneur d'hydrure. Nous avons sélectionné **Ir02**, un complexe semi-sandwich d'iridium montrant une excellente corrélation entre le pouvoir catalytique de réduction du NADH, la production subséquente de  $H_2O_2$  et sa capacité à élever les niveaux intracellulaires de  $H_2O_2$  dans des cellules vivantes.

Le traitement par **Ir02** induit des anomalies de la mitose et du cytosquelette, entraînant des effets délétères sur la morphologie, la vitesse de prolifération et la clonogénicité de cellules tumorales de la lignée HeLa. Son excellente activité

cytotoxique a été démontrée sur un panel d'autres lignées tumorales, montrant que ses effets ne sont pas compensés dans les cellules cancéreuses. Notre modèle de cellules saines (hTERT-RPE1) présente une plus grande résistance à **Ir02** que les lignées tumorales. Ces cellules disposent en effet de mécanismes de régulation du stress oxydant fonctionnels qui sont probablement à l'origine de cette résistance. **Ir02** est donc une puissante molécule cytotoxique dont le mécanisme d'action semble cibler préférentiellement les cellules cancéreuses.

Cependant, ce mécanisme d'action reste mal interprété à l'échelle moléculaire, notamment car la spéciation de ces complexes est difficile à déterminer dans le contexte intracellulaire.<sup>[28]</sup> De plus, les complexes semi-sandwich d'iridium possèdent une position de coordination réactive qui permet leur pouvoir catalytique mais aussi la formation de liaisons covalentes avec la chaîne latérale de certains acides aminés. Par conséquent, cette classe de complexes forme des adduits sur les protéines qui peuvent être à l'origine des perturbations métaboliques observées lors des traitements.

Parallèlement, nous avons souhaité adresser un complexe d'iridium vers des compartiments subcellulaires au moyen d'une ancre lipophile fluorescente de type BODIPY. Plusieurs complexes semi-sandwich comportant un groupement fluorescent BODIPY sur le ligand chélatant ont été synthétisés et caractérisés. Le complexe **IrB8** a été sélectionné pour une étude approfondie en raison de ses bonnes propriétés de fluorescence et de solubilisation dans des milieux aqueux. L'adjonction d'une sonde à cette métallo-drogue a permis de comprendre son devenir intracellulaire lors d'un traitement. **IrB8** est très rapidement internalisé par les cellules et s'accumule dans différents organites (mitochondries, réticulum endoplasmique, gouttelettes lipidiques). Il induit un stress du réticulum et une dispersion de l'appareil de golgi en quelques heures, associés à la dégradation de nombreuses protéines.

Par une approche moins biaisée utilisant des fonctions bio-orthogonales nous avons établi la preuve de concept de l'utilisation de la chimie click dans des cellules pour observer la distribution subcellulaire d'un complexe semi-sandwich dénommé **IrN<sub>3</sub>**. Ce complexe semble s'accumuler dans le noyau des cellules, ainsi que sur le cytosquelette d'actine. De plus, il présente une très grande affinité pour une protéine cytoplasmique qu'il nous reste à identifier.

Une autre perspective pour ce projet réside dans l'utilisation des dérivés de la série (vinypy) qui ont montré des résultats préliminaires prometteurs, notamment dans la lignée du cancer du sein MDA-MB231 où le composé **IrV2** s'est montré dix fois plus actif que ses congénères comportant un ligand (phox).

En somme, cette étude a permis de démontrer la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> élicitée par les complexes **Ir01-10** dans des expériences complémentaires de chimie et de biologie. Ces résultats publiés en 2020 apportent une interprétation du pouvoir oxydant de cette classe de composés et renforcent leur grand potentiel thérapeutique. De plus, nous avons mis en évidence que les complexes d'iridium à ligand arène sont capables de former des adduits avec certaines protéines cibles. Cette découverte ouvre de nouvelles voies pour l'élucidation de leur mécanisme d'action cytotoxique, dont nous avons débuté l'exploration par une stratégie bio-orthogonale innovante.

## Bibliographie

- [1] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2000**, *100*, 57–70.
- [2] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2011**, *144*, 646–674.
- [3] B. ROSENBERG, L. VAN CAMP, T. KRIGAS, *Nature* **1965**, *205*, 698–699.
- [4] S. Dasari, P. Bernard Tchounwou, *European Journal of Pharmacology* **2014**, *740*, 364–378.
- [5] R. H. Wijdeven, B. Pang, Y. G. Assaraf, J. Neefjes, *Drug Resistance Updates* **2016**, *28*, 65–81.
- [6] C. Mörth, A. Valachis, *Lung Cancer* **2014**, *84*, 209–214.
- [7] A. Belot, P. Grosclaude, N. Bossard, E. Jouglu, E. Benhamou, P. Delafosse, A.-V. Guizard, F. Molinié, A. Danzon, S. Bara, A.-M. Bouvier, B. Trétarre, F. Binder-Foucard, M. Colonna, L. Daubisse, G. Hédelin, G. Launoy, N. Le Stang, M. Maynadié, A. Monnereau, X. Troussard, J. Faivre, A. Collignon, I. Janoray, P. Arveux, A. Buemi, N. Raverdy, C. Schvartz, M. Bovet, L. Chérié-Challine, J. Estève, L. Remontet, M. Velten, *Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique* **2008**, *56*, 159–175.
- [8] Réseau des registres français de cancer-FRANCIM, Hospices civils, Eds. , *Survie des patients atteints de cancer en France: étude des registres du réseau FRANCIM*, Springer, Paris Berlin Heidelberg [etc.], **2007**.
- [9] World Health Organization: regional office for Europe, *WORLD CANCER REPORT: Cancer Research for Cancer Development.*, IARC, Hospices Civils de Lyon, **2020**.
- [10] D. Trachootham, J. Alexandre, P. Huang, *Nature Reviews Drug Discovery* **2009**, *8*, 579–591.
- [11] C. Gorrini, I. S. Harris, T. W. Mak, *Nature Reviews Drug Discovery* **2013**, *12*, 931–947.
- [12] L. Zeng, P. Gupta, Y. Chen, E. Wang, L. Ji, H. Chao, Z.-S. Chen, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 5771–5804.
- [13] G. Jaouen, A. Vessières, S. Top, *Chemical Society Reviews* **2015**, *44*, 8802–8817.
- [14] M. Marloye, G. Berger, M. Gelbcke, F. Dufrasne, *Future Medicinal Chemistry* **2016**, *8*, 2263–2286.
- [15] B. Englinger, C. Pirker, P. Heffeter, A. Terenzi, C. R. Kowol, B. K. Keppler, W. Berger, *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 1519–1624.
- [16] P. M. Bruno, Y. Liu, G. Y. Park, J. Murai, C. E. Koch, T. J. Eisen, J. R. Pritchard, Y. Pommier, S. J. Lippard, M. T. Hemann, *Nature Medicine* **2017**, *23*, 461–471.
- [17] U. Ndagi, N. Mhlongo, M. Soliman, *DDDT* **2017**, *Volume11*, 599–616.
- [18] S. M. Meier-Menches, C. Gerner, W. Berger, C. G. Hartinger, B. K. Keppler, *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 909–928.
- [19] T. Riedel, S. Cavin, H. van den Bergh, T. Krueger, L. Liaudet, H.-B. Ris, P. J. Dyson, J. Y. Perentes, *Sci Rep* **2018**, *8*, 10263.
- [20] G. E. Davey, Z. Adhireksan, Z. Ma, T. Riedel, D. Sharma, S. Padavattan, D. Rhodes, A. Ludwig, S. Sandin, B. S. Murray, P. J. Dyson, C. A. Davey, *Nat Commun* **2017**, *8*, 1575.
- [21] J. J. Soldevila-Barreda, I. Romero-Canelón, A. Habtemariam, P. J. Sadler, *Nat Commun* **2015**, *6*, 6582.
- [22] J. P. C. Coverdale, I. Romero-Canelón, C. Sanchez-Cano, G. J. Clarkson, A. Habtemariam, M. Wills, P. J. Sadler, *Nature Chemistry* **2018**, *10*, 347–354.
- [23] K. M. Knopf, B. L. Murphy, S. N. MacMillan, J. M. Baskin, M. P. Barr, E. Boros, J. J. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 14302–14314.

- [24] C. C. Konkankit, A. P. King, K. M. Knopf, T. L. Southard, J. J. Wilson, *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10*, 822–827.
- [25] M. Mora, M. C. Gimeno, R. Visbal, *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 447–462.
- [26] S. Y. Hussaini, R. A. Haque, M. R. Razali, *Journal of Organometallic Chemistry* **2019**, *882*, 96–111.
- [27] S. Kwiatkowski, B. Knap, D. Przystupski, J. Saczko, E. Kędzierska, K. Knap-Czop, J. Kotlińska, O. Michel, K. Kotowski, J. Kulbacka, *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2018**, *106*, 1098–1107.
- [28] E. J. Anthony, E. M. Bolitho, H. E. Bridgewater, O. W. L. Carter, J. M. Donnelly, C. Imberti, E. C. Lant, F. Lermyte, R. J. Needham, M. Palau, P. J. Sadler, H. Shi, F.-X. Wang, W.-Y. Zhang, Z. Zhang, *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 12888–12917.
- [29] S. Bose, A. H. Ngo, L. H. Do, *Journal of the American Chemical Society* **2017**, *139*, 8792–8795.
- [30] P. Zhang, H. Huang, S. Banerjee, G. J. Clarkson, C. Ge, C. Imberti, P. J. Sadler, *Angewandte Chemie International Edition* **2019**, *58*, 2350–2354.
- [31] C. Caporale, M. Massi, *Coordination Chemistry Reviews* **2018**, *363*, 71–91.
- [32] C. Lee, J. S. Nam, C. G. Lee, M. Park, C.-M. Yoo, H.-W. Rhee, J. K. Seo, T.-H. Kwon, *Nat Commun* **2021**, *12*, 26.
- [33] C. Li, M. Yu, Y. Sun, Y. Wu, C. Huang, F. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 11231–11239.
- [34] L. He, Y. Li, C.-P. Tan, R.-R. Ye, M.-H. Chen, J.-J. Cao, L.-N. Ji, Z.-W. Mao, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 5409–5418.
- [35] B. Wang, Y. Liang, H. Dong, T. Tan, B. Zhan, J. Cheng, K. K.-W. Lo, Y. W. Lam, S. H. Cheng, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 2729–2737.
- [36] R. M. Lord, P. C. McGowan, *Chem. Lett.* **2019**, *48*, 916–924.
- [37] J. Liu, X. Wu, J. A. Iggo, J. Xiao, *Coordination Chemistry Reviews* **2008**, *252*, 782–809.
- [38] C. White, A. Yates, P. M. Maitlis, D. M. Heinekey, in *Inorganic Syntheses* (Ed.: R.N. Grimes), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, **1992**, pp. 228–234.
- [39] S. Schäfer, I. Ott, R. Gust, W. S. Sheldrick, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, *2007*, 3034–3046.
- [40] S. Schäfer, W. S. Sheldrick, *Journal of Organometallic Chemistry* **2007**, *692*, 1300–1309.
- [41] Z. Liu, A. Habtemariam, A. M. Pizarro, S. A. Fletcher, A. Kisova, O. Vrana, L. Salassa, P. C. A. Bruijninx, G. J. Clarkson, V. Brabec, P. J. Sadler, *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *54*, 3011–3026.
- [42] Z. Liu, I. Romero-Canelón, B. Qamar, J. M. Hearn, A. Habtemariam, N. P. E. Barry, A. M. Pizarro, G. J. Clarkson, P. J. Sadler, *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53*, 3941–3946.
- [43] J. M. Hearn, G. M. Hughes, I. Romero-Canelón, A. F. Munro, B. Rubio-Ruiz, Z. Liu, N. O. Carragher, P. J. Sadler, *Metallomics* **2018**, *10*, 93–107.
- [44] Z. Liu, P. J. Sadler, *Accounts of Chemical Research* **2014**, *47*, 1174–1185.
- [45] I. Ritacco, N. Russo, E. Sicilia, *Inorganic Chemistry* **2015**, *54*, 10801–10810.
- [46] A. J. Millett, A. Habtemariam, I. Romero-Canelón, G. J. Clarkson, P. J. Sadler, *Organometallics* **2015**, *34*, 2683–2694.
- [47] Z. Liu, I. Romero-Canelón, A. Habtemariam, G. J. Clarkson, P. J. Sadler, *Organometallics* **2014**, *33*, 5324–5333.
- [48] M. Patra, T. Joshi, V. Pierroz, K. Ingram, M. Kaiser, S. Ferrari, B. Spingler, J. Keiser, G. Gasser, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 14768–14772.

- [49] M. D. Hall, K. A. Telma, K.-E. Chang, T. D. Lee, J. P. Madigan, J. R. Lloyd, I. S. Goldlust, J. D. Hoeschele, M. M. Gottesman, *Cancer Research* **2014**, *74*, 3913–3922.
- [50] J. M. Zimbron, K. Passador, B. Gatin-Fraudet, C.-M. Bachelet, D. Plazuk, L.-M. Chamoreau, C. Botuha, S. Thorimbert, M. Salmain, *Organometallics* **2017**, *36*, 3435–3442.
- [51] J. Li, L. Guo, Z. Tian, S. Zhang, Z. Xu, Y. Han, R. Li, Y. Li, Z. Liu, *Inorganic Chemistry* **2018**, *57*, 13552–13563.
- [52] J. J. Conesa, A. C. Carrasco, V. Rodríguez-Fanjul, Y. Yang, J. L. Carrascosa, P. Cloetens, E. Pereiro, A. M. Pizarro, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 1270–1278.
- [53] Y. Yang, L. Guo, Z. Tian, X. Ge, Y. Gong, H. Zheng, S. Shi, Z. Liu, *Organometallics* **2019**, *38*, 1761–1769.
- [54] L. A. de Souzaa, E. T. da Silvaa, M. C. S. Lourençob, M. V. N. de Souzaa, *Mediterr.J.Chem.*, **2014**, *2*, 648–657.
- [55] H. Deng, Q. Lei, Y. Wu, Y. He, W. Li, *European Journal of Medicinal Chemistry* **2020**, *191*, 112151.
- [56] S. Xu, A. N. Butkevich, R. Yamada, Y. Zhou, B. Debnath, R. Duncan, E. Zandi, N. A. Petasis, N. Neamati, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012**, *109*, 16348–16353.
- [57] Y. Han, Z. Tian, S. Zhang, X. Liu, J. Li, Y. Li, Y. Liu, M. Gao, Z. Liu, *Journal of Inorganic Biochemistry* **2018**, *189*, 163–171.
- [58] Z. Liu, A. Habtemariam, A. M. Pizarro, G. J. Clarkson, P. J. Sadler, *Organometallics* **2011**, *30*, 4702–4710.
- [59] Z. Liu, L. Salassa, A. Habtemariam, A. M. Pizarro, G. J. Clarkson, P. J. Sadler, *Inorganic Chemistry* **2011**, *50*, 5777–5783.
- [60] J. M. Hearn, I. Romero-Canelón, B. Qamar, Z. Liu, I. Hands-Portman, P. J. Sadler, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 1335–1343.
- [61] L. Guo, H. Zhang, M. Tian, Z. Tian, Y. Xu, Y. Yang, H. Peng, P. Liu, Z. Liu, *New J. Chem.* **2018**, *42*, 16183–16192.
- [62] H. Zhang, L. Guo, Z. Tian, M. Tian, S. Zhang, Z. Xu, P. Gong, X. Zheng, J. Zhao, Z. Liu, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 4421–4424.
- [63] Y. Okamoto, T. R. Ward, *Biochemistry* **2017**, *56*, 5223–5224.
- [64] S. Shibata, T. Suenobu, S. Fukuzumi, *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52*, 12327–12331.
- [65] S. Betanzos-Lara, Z. Liu, A. Habtemariam, A. M. Pizarro, B. Qamar, P. J. Sadler, *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 3897–3900.
- [66] Y. Maenaka, T. Suenobu, S. Fukuzumi, *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 367–374.
- [67] A. H. Ngo, M. Ibañez, L. H. Do, *ACS Catalysis* **2016**, *6*, 2637–2641.
- [68] M. Soetens, F. Drouet, O. Riant, *ChemCatChem* **2017**, *9*, 929–933.
- [69] S. Banerjee, P. J. Sadler, *RSC Chem. Biol.* **2021**, *2*, 12–29.
- [70] F. Collin, *IJMS* **2019**, *20*, 2407.
- [71] W. A. Pryor, N. A. Porter, *Free Radical Biology and Medicine* **1990**, *8*, 541–543.
- [72] H. J. Forman, F. Ursini, M. Maiorino, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **2014**, *73*, 2–9.
- [73] C. Rampon, M. Volovitch, A. Joliot, S. Vríz, *Antioxidants* **2018**, *7*, 159.
- [74] J. F. Turrens, *The Journal of Physiology* **2003**, *552*, 335–344.
- [75] R. Zhao, S. Jiang, L. Zhang, Z. Yu, *Int J Mol Med* **2019**, DOI 10.3892/ijmm.2019.4188.
- [76] R. L. Auten, J. M. Davis, *Pediatr Res* **2009**, *66*, 121–127.
- [77] J. Liu, W. Lu, B. Shi, S. Klein, X. Su, *Redox Biology* **2019**, *24*, 101167.

- [78] S. Fulda, K.-M. Debatin, *Oncogene* **2006**, *25*, 4798–4811.
- [79] O. Warburg, F. Wind, E. Negelein, *J Gen Physiol* **1927**, *8*, 519–530.
- [80] S. M. El Sayed, A. A. Mahmoud, S. A. El Sawy, E. A. Abdelaal, A. M. Fouad, R. S. Yousif, M. S. Hashim, S. B. Hemdan, Z. M. Kadry, M. A. Abdelmoaty, A. G. Gabr, F. M. Omran, M. M. H. Nabo, N. S. Ahmed, *Medical Hypotheses* **2013**, *81*, 866–870.
- [81] R. G. Jones, C. B. Thompson, *Genes Dev* **2009**, *23*, 537–548.
- [82] I. S. Harris, G. M. DeNicola, *Trends in Cell Biology* **2020**, *30*, 440–451.
- [83] B. Perillo, M. Di Donato, A. Pezone, E. Di Zazzo, P. Giovannelli, G. Galasso, G. Castoria, A. Migliaccio, *Exp Mol Med* **2020**, *52*, 192–203.
- [84] Y. Boutadla, D. L. Davies, R. C. Jones, K. Singh, *Chemistry - A European Journal* **2011**, *17*, 3438–3448.
- [85] L. Li, W. W. Brennessel, W. D. Jones, *Organometallics* **2009**, *28*, 3492–3500.
- [86] L. S. Sharninghausen, S. B. Sinha, D. Y. Shopov, G. W. Brudvig, R. H. Crabtree, *Inorganica Chimica Acta* **2018**, *480*, 183–188.
- [87] H. Brunner, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2001**, *8*.
- [88] J. W. Teo, V. S. Sridevi, W. K. Leong, *Organometallics* **2014**, *33*, 1174–1180.
- [89] D. L. Davies, O. Al-Duaij, J. Fawcett, K. Singh, *Organometallics* **2010**, *29*, 1413–1420.
- [90] R. Ramos, J. M. Zimbron, S. Thorimbert, L.-M. Chamoreau, A. Munier, C. Botuha, A. Karaïskou, M. Salmain, J. Sobczak-Thépot, *Dalton Trans.* **2020**, *49*, 17635–17641.
- [91] T. V. Votyakova, I. J. Reynolds, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2004**, *431*, 138–144.
- [92] A. H. Ngo, L. H. Do, *Inorg. Chem. Front.* **2020**, *7*, 583–591.
- [93] Z. Liu, P. J. Sadler, *Inorg. Chem. Front.* **2014**, *1*, 668–672.
- [94] Q. Yu, A. A. Heikal, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2009**, *95*, 46–57.
- [95] N. Ma, M. A. Digman, L. Malacrida, E. Gratton, *Biomed. Opt. Express* **2016**, *7*, 2441.
- [96] D. H. Williamson, P. Lund, H. A. Krebs, **1967**, *14*.
- [97] O. Lyublinskaya, F. Antunes, *Redox Biology* **2019**, *24*, 101200.
- [98] Z. Xu, Y. Zhang, S. Zhang, X. Jia, G. Zhong, Y. Yang, Q. Du, J. Li, Z. Liu, *Cancer Letters* **2019**, *447*, 75–85.
- [99] D. S. Bilan, V. V. Belousov, *Antioxidants & Redox Signaling* **2016**, *24*, 731–751.
- [100] V. V. Belousov, A. F. Fradkov, K. A. Lukyanov, D. B. Staroverov, K. S. Shakhbazov, A. V. Terskikh, S. Lukyanov, *Nature Methods* **2006**, *3*, 281–286.
- [101] C. Gauron, F. Meda, E. Dupont, S. Albadri, N. Quenech'Du, E. Ipendey, M. Volovitch, F. Del Bene, A. Joliot, C. Rampon, S. Vríz, *Developmental Biology* **2016**, *414*, 133–141.
- [102] S. Daković, L. LiHEiC-Turni, S. I. Kirin, V. Vinković, Z. Raza, A. Suste, V. Sunjić, *J. Mol. Cat.* **1997**, *118*, 27–31.
- [103] J. H. Barnard, C. Wang, N. G. Berry, J. Xiao, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 1234.
- [104] D. L. Davies, O. Al-Duaij, J. Fawcett, M. Giardiello, S. T. Hilton, D. R. Russell, *Dalton Trans.* **2003**, 4132–4138.
- [105] O. V. Dolomanov, L. J. Bourhis, R. J. Gildea, J. A. K. Howard, H. Puschmann, *J Appl Crystallogr* **2009**, *42*, 339–341.
- [106] A. Altomare, G. Cascarano, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, M. C. Burla, G. Polidori, M. Camalli, *J Appl Crystallogr* **1994**, *27*, 435–435.
- [107] G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr C Struct Chem* **2015**, *71*, 3–8.
- [108] O. G. Lyublinskaya, Ju. S. Ivanova, N. A. Pugovkina, I. V. Kozhukharova, Z. V. Kovaleva, A. N. Shatrova, N. D. Aksenov, V. V. Zenin, Yu. A. Kaulin, I. A. Gamaley, N. N. Nikolsky, *Redox Biology* **2017**, *12*, 758–769.

- [109] L. Galluzzi, I. Vitale, S. A. Aaronson, J. M. Abrams, D. Adam, P. Agostinis, E. S. Alnemri, L. Altucci, I. Amelio, D. W. Andrews, M. Annicchiarico-Petruzzelli, A. V. Antonov, E. Arama, E. H. Baehrecke, N. A. Barlev, N. G. Bazan, F. Bernassola, Mathieu J. M. Bertrand, K. Bianchi, M. V. Blagosklonny, K. Blomgren, C. Borner, P. Boya, C. Brenner, M. Campanella, E. Candi, D. Carmona-Gutierrez, F. Cecconi, F. K.-M. Chan, N. S. Chandel, E. H. Cheng, J. E. Chipuk, J. A. Cidlowski, A. Ciechanover, G. M. Cohen, M. Conrad, J. R. Cubillos-Ruiz, P. E. Czabotar, V. D'Angiolella, T. M. Dawson, V. L. Dawson, V. De Laurenzi, R. De Maria, K.-M. Debatin, R. J. DeBerardinis, M. Deshmukh, N. Di Daniele, F. Di Virgilio, V. M. Dixit, S. J. Dixon, C. S. Duckett, B. D. Dynlacht, W. S. El-Deiry, J. W. Elrod, G. M. Fimia, S. Fulda, A. J. García-Sáez, A. D. Garg, C. Garrido, E. Gavathiotis, P. Golstein, E. Gottlieb, D. R. Green, L. A. Greene, H. Gronemeyer, A. Gross, G. Hajnoczky, J. M. Hardwick, I. S. Harris, M. O. Hengartner, C. Hetz, H. Ichijo, M. Jäättelä, B. Joseph, P. J. Jost, P. P. Juin, W. J. Kaiser, M. Karin, T. Kaufmann, O. Kepp, A. Kimchi, R. N. Kitsis, D. J. Klionsky, R. A. Knight, S. Kumar, S. W. Lee, J. J. Lemasters, B. Levine, A. Linkermann, S. A. Lipton, R. A. Lockshin, Carlos López-Otín, S. W. Lowe, T. Luedde, E. Lugli, M. MacFarlane, F. Madeo, M. Malewicz, W. Malorni, G. Manic, J.-C. Marine, S. J. Martin, J.-C. Martinou, J. P. Medema, P. Mehlen, P. Meier, S. Melino, E. A. Miao, J. D. Molkentin, U. M. Moll, C. Muñoz-Pinedo, S. Nagata, G. Nuñez, A. Oberst, M. Oren, M. Overholtzer, M. Pagano, T. Panaretakis, M. Pasparakis, J. M. Penninger, D. M. Pereira, S. Pervaiz, M. E. Peter, M. Piacentini, P. Pinton, J. H. M. Prehn, H. Puthalakath, G. A. Rabinovich, M. Rehm, R. Rizzuto, C. M. P. Rodrigues, D. C. Rubinsztein, T. Rudel, K. M. Ryan, E. Sayan, L. Scorrano, F. Shao, Y. Shi, J. Silke, H.-U. Simon, A. Sistigu, B. R. Stockwell, A. Strasser, G. Szabadkai, S. W. G. Tait, D. Tang, N. Tavernarakis, A. Thorburn, Y. Tsujimoto, B. Turk, T. Vanden Berghe, P. Vandenabeele, M. G. Vander Heiden, A. Villunger, H. W. Virgin, K. H. Vousden, D. Vucic, E. F. Wagner, H. Walczak, D. Wallach, Y. Wang, J. A. Wells, W. Wood, J. Yuan, Z. Zakeri, B. Zhivotovsky, L. Zitvogel, G. Melino, G. Kroemer, *Cell Death Differ* **2018**, *25*, 486–541.
- [110] J. Gautheron, G. J. Gores, C. M. P. Rodrigues, *Journal of Hepatology* **2020**, *73*, 394–408.
- [111] Z. Su, Z. Yang, L. Xie, J. P. DeWitt, Y. Chen, *Cell Death Differ* **2016**, *23*, 748–756.
- [112] Y. K. Dhuriya, D. Sharma, *J Neuroinflammation* **2018**, *15*, 199.
- [113] K. Taguchi, H. Motohashi, M. Yamamoto, *Genes to Cells* **2011**, *16*, 123–140.
- [114] M. J. Kerins, A. Ooi, *Sci Rep* **2018**, *8*, 12846.
- [115] E. Kansanen, S. M. Kuosmanen, H. Leinonen, A.-L. Levonen, *Redox Biology* **2013**, *1*, 45–49.
- [116] X. Sun, Z. Ou, R. Chen, X. Niu, D. Chen, R. Kang, D. Tang, *Hepatology* **2016**, *63*, 173–184.
- [117] B. Harder, T. Jiang, T. Wu, S. Tao, M. R. de la Vega, W. Tian, E. Chapman, D. D. Zhang, *Biochemical Society Transactions* **2015**, *43*, 680–686.
- [118] N. Robledinos-Antón, R. Fernández-Ginés, G. Manda, A. Cuadrado, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2019**, *2019*, 1–20.
- [119] H. S. Gannon, B. A. Woda, S. N. Jones, *Cancer Cell* **2012**, *21*, 668–679.
- [120] T. H. Stracker, I. Roig, P. A. Knobel, M. Marjanović, *Front. Genet.* **2013**, *4*, DOI 10.3389/fgene.2013.00037.
- [121] Y. Zhang, J.-H. Lee, T. T. Paull, S. Gehrke, A. D'Alessandro, Q. Dou, V. N. Gladyshev, E. A. Schroeder, S. K. Steyl, B. E. Christian, G. S. Shadel, *Sci. Signal.* **2018**, *11*, eaaq0702.
- [122] K. Ando, J. L. Kernan, P. H. Liu, T. Sanda, E. Logette, J. Tschopp, A. T. Look, J. Wang, L. Bouchier-Hayes, S. Sidi, *Molecular Cell* **2012**, *47*, 681–693.

- [123] V. Vigneswara, Z. Ahmed, *Cells* **2020**, *9*, 1259.
- [124] T. G. Oliver, E. Meylan, G. P. Chang, W. Xue, J. R. Burke, T. J. Humpton, D. Hubbard, A. Bhutkar, T. Jacks, *Molecular Cell* **2011**, *43*, 57–71.
- [125] F. McCoy, L. Eckard, L. K. Nutt, *Molecular Cell* **2012**, *47*, 667–668.
- [126] J. Hanus, C. Anderson, D. Sarraf, J. Ma, S. Wang, *Cell Death Discovery* **2016**, *2*, 16054.
- [127] K.-H. Jang, Y.-J. Do, D. Son, E. Son, J.-S. Choi, E. Kim, *Cell Death Dis* **2018**, *8*, e2526–e2526.
- [128] D. Matsunaga, P. G. Sreekumar, K. Ishikawa, H. Terasaki, E. Barron, P. Cohen, R. Kannan, D. R. Hinton, *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0165150.
- [129] A. Voisin, C. Monville, A. Plancheron, A. Balbous, A. Gaillard, N. Leveziel, *Experimental Eye Research* **2018**, *177*, 76–86.
- [130] T. Katsube, M. Mori, H. Tsuji, T. Shiomi, B. Wang, Q. Liu, M. Neno, M. Onoda, *Journal of Biochemistry* **2014**, *156*, 85–95.
- [131] B. L. Probst, L. McCauley, I. Trevino, W. C. Wigley, D. A. Ferguson, *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0135257.
- [132] L. Galluzzi, M. C. Maiuri, I. Vitale, H. Zischka, M. Castedo, L. Zitvogel, G. Kroemer, *Cell Death Differ* **2007**, *14*, 1237–1243.
- [133] S. P. Cregan, V. L. Dawson, R. S. Slack, *Oncogene* **2004**, *23*, 2785–2796.
- [134] O. Surova, B. Zhivotovsky, *Oncogene* **2013**, *32*, 3789–3797.
- [135] W. H. Park, *Oncology Reports* **2014**, *31*, 2413–2421.
- [136] A. Loudet, K. Burgess, *Chemical Reviews* **2007**, *107*, 4891–4932.
- [137] J. Zhang, DESIGN AND DEVELOPMENT OF BODIPY-BASED FLUORESCENT PROBES FOR SENSING AND IMAGING OF CYANIDE, Zn (II) IONS, LYSOSOMAL PH AND CANCER CELLS, Doctor of Philosophy in Chemistry, Michigan Technological University, **2015**.
- [138] W. Miao, C. Yu, E. Hao, L. Jiao, *Front. Chem.* **2019**, *7*, 825.
- [139] R. Hu, C. F. A. Gómez-Durán, J. W. Y. Lam, J. L. Belmonte-Vázquez, C. Deng, S. Chen, R. Ye, E. Peña-Cabrera, Y. Zhong, K. S. Wong, B. Z. Tang, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 10099.
- [140] E. Bodio, F. Denat, C. Goze, *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2019**, *23*, 1159–1183.
- [141] H. Wang, E. Wei, A. D. Quiroga, X. Sun, N. Touret, R. Lehner, *MBoC* **2010**, *21*, 1991–2000.
- [142] J. A. Olzmann, P. Carvalho, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2019**, *20*, 137–155.
- [143] W. M. Henne, M. L. Reese, J. M. Goodman, *EMBO J* **2018**, *37*, DOI 10.15252/embj.201898947.
- [144] R. J. Schulze, E. W. Krueger, S. G. Weller, K. M. Johnson, C. A. Casey, M. B. Schott, M. A. McNiven, *Proc Natl Acad Sci USA* **2020**, *117*, 32443–32452.
- [145] B. Bertrand, K. Passador, C. Goze, F. Denat, E. Bodio, M. Salmain, *Coordination Chemistry Reviews* **2018**, *358*, 108–124.
- [146] T. Sun, X. Guan, M. Zheng, X. Jing, Z. Xie, *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2015**, *6*, 430–433.
- [147] S. Möltgen, E. Piumatti, G. Massafra, S. Metzger, U. Jaehde, G. Kalayda, *Cells* **2020**, *9*, 1322.
- [148] W. Ma, Z. Tian, S. Zhang, X. He, J. Li, X. Xia, X. Chen, Z. Liu, *Inorg. Chem. Front.* **2018**, *5*, 2587–2597.
- [149] W. Ma, L. Guo, Z. Tian, S. Zhang, X. He, J. Li, Y. Yang, Z. Liu, *Dalton Trans.* **2019**, *48*, 4788–4793.
- [150] W. Ma, X. Ge, Z. Xu, S. Zhang, X. He, J. Li, X. Xia, X. Chen, Z. Liu, *ACS Omega* **2019**, *4*, 15240–15248.

- [151] A. Leite, A. M. G. Silva, L. Cunha-Silva, B. de Castro, P. Gameiro, M. Rangel, *Dalton Trans.* **2013**, 42, 6110.
- [152] S. Fedeli, P. Paoli, A. Brandi, L. Venturini, G. Giambastiani, G. Tuci, S. Cicchi, *Chemistry - A European Journal* **2015**, 21, 15349–15353.
- [153] A. M. Courtis, S. A. Santos, Y. Guan, J. A. Hendricks, B. Ghosh, D. M. Szantai-Kis, S. A. Reis, J. V. Shah, R. Mazitschek, *Bioconjugate Chemistry* **2014**, 25, 1043–1051.
- [154] OECD, *Test No. 107: Partition Coefficient (n-Octanol/Water): Shake Flask Method*, **1995**.
- [155] V. Novohradsky, Z. Liu, M. Vojtiskova, P. J. Sadler, V. Brabec, J. Kasparkova, *Metallomics* **2014**, 6, 682–690.
- [156] R. P. Paitandi, S. Mukhopadhyay, R. S. Singh, V. Sharma, S. M. Mobin, D. S. Pandey, *Inorganic Chemistry* **2017**, 56, 12232–12247.
- [157] G. M. Chu, I. Fernández, A. Guerrero-Martínez, C. Ramírez de Arellano, M. A. Sierra, *European Journal of Inorganic Chemistry* **2016**, 2016, 844–852.
- [158] X. Liu, W. Chi, A. de J. Gómez-Infante, E. Peña-Cabrera, X. Liu, Y. Chang, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2021**, 42, 91–94.
- [159] P. Held, *Cell Biology* **n.d.**, 5.
- [160] H. Dong, S. H. Cheung, Y. Liang, B. Wang, R. Ramalingam, P. Wang, H. Sun, S. H. Cheng, Y. W. Lam, *ELECTROPHORESIS* **2013**, 34, 1957–1964.
- [161] T. Fam, A. Klymchenko, M. Collot, *Materials* **2018**, 11, 1768.
- [162] G. Diaz, M. Melis, B. Batetta, F. Angius, A. M. Falchi, *Micron* **2008**, 39, 819–824.
- [163] Y. Yang, L. Guo, Z. Tian, Y. Gong, H. Zheng, S. Zhang, Z. Xu, X. Ge, Z. Liu, *Inorg. Chem.* **2018**, 57, 11087–11098.
- [164] A. V. Shubin, I. V. Demidyuk, A. A. Komissarov, L. M. Rafieva, S. V. Kostrov, *Oncotarget* **2016**, 7, 55863–55889.
- [165] F. Fougère, P. Ferré, *Med Sci (Paris)* **2007**, 23, 291–296.
- [166] C. Huang, T. Li, J. Liang, H. Huang, P. Zhang, S. Banerjee, *Coordination Chemistry Reviews* **2020**, 408, 213178.
- [167] W. Rozpedek, D. Pytel, B. Mucha, H. Leszczynska, J. A. Diehl, I. Majsterek, *CMM* **2016**, 16, 533–544.
- [168] C. M. Osowski, F. Urano, in *Methods in Enzymology*, Elsevier, **2011**, pp. 71–92.
- [169] X. Chen, J. Shen, R. Prywes, *Journal of Biological Chemistry* **2002**, 277, 13045–13052.
- [170] A. Eisenberg-Lerner, R. Benyair, N. Hizkiahou, N. Nudel, R. Maor, M. P. Kramer, M. D. Shmueli, I. Zigdon, M. Cherniavsky Lev, A. Ulman, J. Y. Sagiv, M. Dayan, B. Dassa, M. Rosenwald, I. Shachar, J. Li, Y. Wang, N. Dezorella, S. Khan, Z. Porat, E. Shimoni, O. Avinoam, Y. Merbl, *Nature Communications* **2020**, 11, 409.
- [171] M. Ni, **n.d.**, 159.
- [172] M. Ni, Y. Zhang, A. S. Lee, *Biochemical Journal* **2011**, 434, 181–188.
- [173] A. P. King, J. J. Wilson, *Chem. Soc. Rev.* **2020**, 49, 8113–8136.
- [174] H. Kadowaki, H. Nishitoh, *Genes* **2013**, 4, 306–333.
- [175] Z. Wu, H. Wang, S. Fang, C. Xu, *Mol Med Report* **2018**, DOI 10.3892/mmr.2018.9443.
- [176] Y. Yue, Y. Guo, J. Xu, S. Shao, *New J. Chem.* **2011**, 35, 61–64.
- [177] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 18.
- [178] S.-K. Choi, J. Kim, E. Kim, *Molecules* **2021**, 26, 1868.
- [179] N. K. Devaraj, S. Hilderbrand, R. Upadhyay, R. Mazitschek, R. Weissleder, *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, 49, 2869–2872.
- [180] B. L. Oliveira, Z. Guo, G. J. L. Bernardes, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, 46, 4895–4950.
- [181] T. Cañeque, S. Müller, R. Rodriguez, *Nature Reviews Chemistry* **2018**, 2, 202–215.

- [182] J. Ohata, F. Vohidov, Z. T. Ball, *Mol. BioSyst.* **2015**, *11*, 2846–2849.
- [183] W.-Y. Zhang, S. Banerjee, C. Imberti, G. J. Clarkson, Q. Wang, Q. Zhong, L. S. Young, I. Romero-Canelón, M. Zeng, A. Habtemariam, P. J. Sadler, *Inorganica Chimica Acta* **2020**, *503*, 119396.
- [184] M. F. Osborn, J. D. White, M. M. Haley, V. J. DeRose, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 2404–2411.
- [185] R. Wirth, J. D. White, A. D. Moghaddam, A. L. Ginzburg, L. N. Zakharov, M. M. Haley, V. J. DeRose, *Journal of the American Chemical Society* **2015**, *137*, 15169–15175.
- [186] R. M. Cunningham, V. J. DeRose, *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 2737–2745.
- [187] U. Rix, G. Superti-Furga, *Nat Chem Biol* **2009**, *5*, 616–624.
- [188] M. H. Wright, S. A. Sieber, *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 681–708.
- [189] X. Chen, Y. Wang, N. Ma, J. Tian, Y. Shao, B. Zhu, Y. K. Wong, Z. Liang, C. Zou, J. Wang, *Sig Transduct Target Ther* **2020**, *5*, 72.
- [190] B. R. Lanning, L. R. Whitby, M. M. Dix, J. Douhan, A. M. Gilbert, E. C. Hett, T. O. Johnson, C. Joslyn, J. C. Kath, S. Niessen, L. R. Roberts, M. E. Schnute, C. Wang, J. J. Hulce, B. Wei, L. O. Whiteley, M. M. Hayward, B. F. Cravatt, *Nat Chem Biol* **2014**, *10*, 760–767.
- [191] X. Wang, M. Zhu, F. Gao, W. Wei, Y. Qian, H.-K. Liu, J. Zhao, *Journal of Inorganic Biochemistry* **2018**, *180*, 179–185.
- [192] X. Wang, J. Zhang, X. Zhao, W. Wei, J. Zhao, *Metallomics* **2019**, *11*, 1344–1352.
- [193] T. Ohmura, S. Yorozuya, Y. Yamamoto, N. Miyaura, *Organometallics* **2000**, *19*, 365–367.
- [194] H. Kanemitsu, K. Uehara, S. Fukuzumi, S. Ogo, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 17141–17147.
- [195] Y. Boutadla, D. L. Davies, O. Al-Duaij, J. Fawcett, R. C. Jones, K. Singh, *Dalton Transactions* **2010**, *39*, 10447.
- [196] E. A. Giner, M. Gómez-Gallego, A. D. Merinero, L. Casarrubios, C. Ramírez de Arellano, M. A. Sierra, *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 8941–8948.
- [197] L. Hu, Y. A. Liu, X. Liao, *Sci. Adv.* **2017**, *3*, e1700826.
- [198] M. Albrecht, A. Lippach, M. P. Exner, J. Jerbi, M. Springborg, N. Budisa, G. Wenz, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 6728–6736.
- [199] H. L. P. Tytgat, G. Schoofs, M. Driesen, P. Proost, E. J. M. Van Damme, J. Vanderleyden, S. Lebeer, *Microbial Biotechnology* **2015**, *8*, 164–168.
- [200] R. E. Banks, R. A. Craven, P. A. Harnden, P. J. Selby, *Proteomics* **2003**, *3*, 558–561.
- [201] A. Jégou, T. Niedermayer, J. Orbán, D. Didry, R. Lipowsky, M.-F. Carlier, G. Romet-Lemonne, *PLoS Biol* **2011**, *9*, e1001161.
- [202] M. S. Ong, S. Deng, C. E. Halim, W. Cai, T. Z. Tan, R. Y.-J. Huang, G. Sethi, S. C. Hooi, A. P. Kumar, C. T. Yap, *Cancers* **2020**, *12*, 238.
- [203] M.-I. Kang, A. Kobayashi, N. Wakabayashi, S.-G. Kim, M. Yamamoto, *PNAS* **2004**, *101*, 2046–2051.
- [204] R. Ramos, J.-F. Gilles, R. Morichon, C. Przybylski, B. Caron, C. Botuha, A. Karaiskou, M. Salmain, J. Sobczak-Thépot, *J. Med. Chem.* **2021**, acs.jmedchem.1c01335.

## Abréviations

Français

Ac	–	Acétate
ADN / ARN	–	Acide (désoxy)ribonucléique
AO	–	Acide oléique
BODIPY	–	Bore DIPYrométhène
Bpy	–	BiPyridine
CCCP	–	Carbonylcyanure m-chlorophenylhydrazone
CDDP	–	<i>Cis</i> -Diamino-Dichloro-Platine
Cp*	–	$\eta^5$ -pentaméthylCyclopentadiényle
Cy	–	Cyclohexane
DAPI	–	4',6-diamidino-2-phénylindole
DCM	–	Dichlorométhane
DDQ	–	2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DIB	–	(Diacetoxyiodo)benzene
DIEA	–	Diisopropyléthylamine
DMAP	–	Diméthylaminopyridine
DMSO	–	Diméthylsulfoxyde
EdU	–	ÉthynyldésoxyUridine
EDTA	–	Acide Éthylènediaminetétraacétique
GL	–	Gouttelettes Lipidiques
RE	–	Réticulum endoplasmique
ERO	–	Espèce Réactive de l'Oxygène
MTT	–	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tetrazolium
NAD	–	Nicotinamide Adénine Dinucleotide
NaPY	–	Pyrophosphate de sodium
NBS	–	N-Bromosuccinimide
NT / NI	–	Non-traité / Non-induit
PAF	–	Paraformaldéhyde
PDI	–	Protéine Disulfure Isomérase
PEG	–	Polyéthylène glycol
PVDF	–	Polyfluorure de vinylidène
Ph	–	Phényle
PhOx	–	2-PhénylOxazoline
Pq	–	2-PhénylQuinoline
Ppy	–	2-PhénylPyridine
RE	–	Réticulum endoplasmique
RMN	–	Résonance Magnétique Nucléaire
RQ	–	Rendement Quantique
SOD	–	Superoxyde dismutase
t.a.	–	Température ambiante
TBTA	–	Tris((1-benzyl-4-triazolyl)méthyl)amine
THF	–	Tetrahydrofurane
THPTA	–	Tris(3-hydroxypropyltriazolylméthyl)amine
TMSA	–	Triméthylsilylacétylène
UV	–	Ultra-violet

ABPP	–	<i>Activity-based protein profiling</i>
ATF	–	<i>Activating Transcription Factor</i>
ATM	–	<i>Ataxia-Telangiectasia Mutated Kinase</i>
BSA	–	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CDKN1A	–	<i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A</i>
cpYFP	–	<i>circularly permuted Yellow Fluorescent Protein</i>
CuAAC	–	<i>Copper(I)-catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition</i>
DCFH-DA	–	<i>2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate</i>
DMEM	–	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
eIF2 $\alpha$	–	<i>Eukaryotic translation Initiation Factor 2, alpha sub-unit</i>
ER	–	<i>Endoplasmic Reticulum</i>
ERTR	–	<i>ER-Tracker Red</i>
FBS	–	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FLIM	–	<i>Fluorescence-lifetime imaging microscopy</i>
HOF	–	<i>Human Ovarian Fibroblasts</i>
HRMS	–	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
HRP	–	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HSAB	–	<i>Hard and Soft (Lewis) Acids and Bases</i>
ICP-MS	–	<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
ICP-OES	–	<i>Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry</i>
IRE1	–	<i>Inositol Requiring Enzyme 1</i>
KEAP1	–	<i>Kelch-like-ECH-associated protein 1</i>
LD	–	<i>Lipid Droplets</i>
LTR	–	<i>Lysotracker Red</i>
MOMP	–	<i>Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization</i>
4Å MS	–	<i>Molecular Sieve 4 Angstrom</i>
MTR	–	<i>Mitotracker Red</i>
NCI	–	<i>National Cancer Institute</i>
NEaa	–	<i>Non-essential amino-acids</i>
NRF2	–	<i>Nuclear factor erythroid 2-Related Factor 2</i>
OA	–	<i>Oleic acid</i>
OxyR-RD	–	<i>(bacterial peroxide sensor)- Regulatory Domain</i>
PBS	–	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PFA	–	<i>Paraformaldehyde</i>
PCC	–	<i>Pyridinium chlorochromate</i>
PERK	–	<i>PKR-like ER protein Kinase</i>
PIDD	–	<i>p53-induced death domain protein</i>
PDT	–	<i>Photodynamic Therapy</i>
RCD	–	<i>Regulated Cell Death</i>
ROS	–	<i>Reactive Oxygen Species</i>
r.t.	–	<i>Rt</i>
TBS-t	–	<i>Tris Buffer Saline 0.1 % Tween-20</i>
THPTA	–	<i>Tris((1-hydroxy-propyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amine</i>
TIRFM	–	<i>Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy</i>
TNFR	–	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor</i>
VDAC	–	<i>Voltage dependent anionic canal</i>

## Table des illustrations

Figure 1.	Principales caractéristiques du cancer (“hallmarks”) d’après Weinberg et coll., 2011 ..6
Figure 2.	Localisation et analyse des protéines marquées par Ir-ITC, d’après Wang et coll..... 14
Figure 3.	Détermination de la localisation intracellulaire de ACC25, d’après Conesa et coll..... 17
Figure 4.	Catalyseurs de production de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> publiés par Sadler et coll. <sup>[69]</sup> .....21
Figure 5.	Fuite d’électrons et de protons possibles dans la chaîne respiratoire mitochondriale <sup>[75]</sup> 24
Figure 6. du sein) <sup>[11]</sup>	Relations entre les niveaux d’ERO et les différents stades de la tumorigénèse (cancer 27
Figure 7.	Structure de Ir01 déterminée par DRX (hydrogènes omis) ..... 31
Figure 8. coordination (Ir01) .....	Modification de l’environnement chimique des protons de l’oxazoline après 31
Figure 9.	Contrôle de la régiosélectivité de la complexation de la 2-( <i>m</i> -methoxyphényl)oxazoline 32
Figure 10. dissolution	Portions du spectre RMN <sup>1</sup> H de Ir03 dans le DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> à différents temps après 35
Figure 11.	Stabilité de l’adduit Ir01-DMSO en milieu aqueux et après addition de NaCl (1,1 M) 37
Figure 12.	Ir02 est stable sous sa forme chlorido en présence d’un excès d’eau..... 38
Figure 13.	Structure de Ir02-DMSO déterminée par DRX (hydrogènes omis) ..... 39
Figure 14.	Évolution du spectre d’absorption d’une solution de NADH (100 μM) en présence de Ir08 (10 μM) durant 18 heures ..... 40
Figure 15.	Étude du pouvoir catalytique des composés Ir01-Ir10 ..... 41
Figure 16.	Inhibition de l’oxydation du NADH en présence de DMSO..... 42
Figure 17.	Images de microscopie en contraste de phase de cellules HeLa après 24 h de traitement 43
Figure 18. de cellules	Courbes de décompte cumulé des mitoses, normalisé en temps et par le nombre initial 44
Figure 19.	Décompte des mitoses sur 30 h pour les traitements par Ir08 et Ir11 ..... 44
Figure 20.	Détermination de l’IC <sub>50</sub> de Ir01-10 par le test MTT (16 000 cellules/cm <sup>2</sup> )..... 45
Figure 21.	Profils de prolifération de la lignée HeLa selon le complexe administré Ir02 et Ir12... 46
Figure 22.	Mise en évidence de la caspase-3 clivée dans un extrait de cellules HeLa traitées à haute densité 47
Figure 23.	Quantification des bandes détectées pour la caspase-3 clivée ..... 48
Figure 24.	Fonctionnement de la sonde HyPer de deuxième génération ..... 49
Figure 25.	Stratégie de sélection employée pour l’utilisation de la sonde HyPer en cytométrie .... 50
Figure 26.	Ir02 induit une augmentation irréversible des niveaux intracellulaires de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ..... 51
Figure 27.	HyPer index de cellules HeLa-HyPer exposées durant 60 min à 10 μM (10 fmol/c) Ir1- 10. (5000 évènements) *** p < 0.0001 (Test de Mann-Whitney) ..... 51
Figure 28. traitement.	Pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire après 6 h de 52
Figure 29.	Graphique comparatif de la relation structure-activité de Ir01-10 ..... 55

Figure 30.	Signalisation de l'apoptose et voies de mort cellulaire régulée .....	74
Figure 31.	La kinase ATM et son activation, d'après Stracker et. al <sup>[120]</sup> .....	78
Figure 32.	Images (contraste de phase) des lignées employées dans ce chapitre (grandissement 40x)	80
Figure 33.	Inhibition de prolifération induite par différentes doses de Ir02 dans deux lignées cellulaires	82
Figure 34.	Analyse des colonies formées durant les différents traitements.....	83
Figure 35.	Ir02 réduit l'efficacité de clonage dans la lignée HeLa .....	84
Figure 36.	Effet irréversible du traitement Ir02 sur la taille des cellules HeLa.....	85
Figure 37.	Ir02 induit l'étalement des cellules hTERT-RPE1 lors d'un traitement chronique.....	85
Figure 38.	Ir02 induit un ralentissement de la mitose des cellules HeLa.....	86
Figure 39.	Ir02 et Ir12 perturbent la mitose des cellules HeLa après 16 h de traitement.....	87
Figure 40.	Condensation péri-nucléaire du réseau d'actine lors de l'apoptose d'une cellule hTERT-RPE1.....	88
Figure 41.	Ir02 induit la formation de vacuoles cytoplasmiques du compartiment LAMP1+ .....	88
Figure 42.	Ir02 induit l'activation des caspases 3 et 9 dans la lignée HeLa dès 3 h de traitement.	89
Figure 43.	Ir02 induit la fuite du cytochrome c dans le cytoplasme chez HeLa uniquement. ....	90
Figure 44.	Ir02 induit des dommages tardifs et secondaires à l'ADN dans la lignée HCT116.....	92
Figure 45.	Cinétique d'activation des caspases et accumulation de p53 chez hTERT-RPE1.....	93
Figure 46.	Ir02 stabilise transitoirement Nrf2 dans la lignée hTERT-RPE1.....	93
Figure 47.	Co-traitement de Ir02 et Z-VAD-FMK ou Nec-1 .....	94
Figure 48.	Ir02 n'induit pas la sénescence des cellules hTERT-RPE1 et génère une inhibition modeste de la traduction après 24 h de traitement.....	95
Figure 49.	Potentialisation de la toxicité de Ir02 lors d'un co-traitement avec 500 nM CHIR-124	97
Figure 50.	Étude de l'activation des caspases 2 et 3 après 3 h de traitement par Ir02.....	98
Figure 51.	Statut de p53 après 3 h de traitement par Ir02.....	99
Figure 52.	Ir02 (22 mM) dans CD <sub>3</sub> OD et après l'ajout de L-méthionine .....	100
Figure 53.	Spectre obtenu pour l'interaction avec la N-acétylhistidine dans MeOH/H <sub>2</sub> O .....	101
Figure 54.	Stimulus et processus biochimiques entraînant différents phénotypes de mort cellulaire, adapté de Galluzzi et coll. <sup>[132]</sup> .....	103
Figure 55.	Résumé de la réponse au traitement par Ir02 supposée dans les lignées HeLa et hTERT-RPE1.....	104
Figure 56.	Spectres d'absorption et d'émission de B1 dans le méthanol.....	112
Figure 57.	Visualisation des compartiments acides (lysosome, endosomes tardifs) grâce au LTR	113
Figure 58.	Marquage de gouttelettes lipidiques préformées (vert) et naissantes (rouges) <sup>[141]</sup> .....	114
Figure 59.	Biogénèse des gouttelettes lipidiques depuis la membrane du réticulum endoplasmique	114
Figure 60.	Contacts entre les gouttelettes lipidiques et les autres organites <sup>[142]</sup> .....	115
Figure 61.	Détection et identification des partenaires protéiques du BODIPY-Cisplatine <sup>[147]</sup> .....	116

Figure 62.	Suivi en temps réel de l'internalisation de Ir12-B1 dans des cellules MDA-MB231 <sup>[50]</sup>	117
Figure 63.	Spectres de fluorescence de B2 et Ir12-B2 mesurés dans l'acétone (1 $\mu$ M, exc. 630 nm, 20 °C)	121
Figure 64.	Spectres d'absorption et d'émission du pro-ligand B4 (pointillés) et du complexe IrB4 dans l'acétonitrile .....	127
Figure 65.	Étude des propriétés émissives de B4 et IrB4 dans l'acétonitrile.....	127
Figure 66.	Spectres d'absorption de différentes espèces (10 $\mu$ M, H <sub>2</sub> O/MeOH 99:1, 20°C) .....	128
Figure 67.	Propriétés spectrales de IrB8 et IrB8-DMSO <sup>+</sup> .....	130
Figure 68.	Spectre de IrB8 dans les cellules après 15 min d'incubation.....	131
Figure 69.	Inhibition de prolifération induite par IrB8 dans des cellules HeLa et hTERT-RPE1	132
Figure 70.	Comparaison du marquage fluorescent par B8 et IrB8 de cellules vivantes ou fixées	134
Figure 71.	Suivi de la fluorescence de cellules vivantes traitées par IrB8 (10 $\mu$ M).....	135
Figure 72.	IrB8 ne colocalise pas avec EEA1 après une heure de traitement ni LBPA après 24 h de traitement (épifluorescence) .....	136
Figure 73.	Comparaison de la fluorescence des cellules traitées par IrB8 en présence d'inhibiteurs	137
Figure 74.	Internalisation de IrB8 (vert) dans des cellules hTERT-RPE1 vivantes, comarquage du noyau (DRAQ5, blanc).....	138
Figure 75.	IrB8 se localise dans le réticulum endoplasmique.....	139
Figure 76.	Apparition progressive des GL dans des cellules HeLa exposées à IrB8 .....	140
Figure 77.	Modification de la morphologie des mitochondries après irradiation de cellules vivantes	141
Figure 78.	IrB8 se localise dans les mitochondries .....	142
Figure 79.	IrB8 est incorporé dans des GL néoformées.....	143
Figure 80.	Coloration au rouge du Nil de cellules HuH7 après 1 ou 24 h en présence de IrB8....	144
Figure 81.	Les GL positives pour IrB8 sont proches du lysosome et des mitochondries. ....	145
Figure 82.	IrB8 colocalise avec des vésicules du lysosome après 24 h de traitement.....	146
Figure 83.	Caractérisation des vacuoles cytoplasmiques formées lors du traitement par IrB8 (HeLa)	148
Figure 84.	IrB8 induit un arrêt dose-dépendant de la traduction dans les deux lignées cellulaires	149
Figure 85.	IrB8 induit une accumulation de ATF4 dans le noyau similaire à l'effet de la Tunicamycine	150
Figure 86.	IrB8 induit une réponse UPR incomplète dans la lignée HeLa.....	151
Figure 87.	IrB8 induit la disparition dose-dépendante de la bande GM130 .....	151
Figure 88.	Co-administration de IrB8 et MG132 pendant 60 min .....	152
Figure 89.	IrB8 provoque la dispersion du Golgi des cellules HeLa et hTERT-RPE1 en 60 min	152
Figure 90.	IrB8 présente une toxicité durable dans la lignée HeLa, analyse par Western blot du statut de plusieurs protéines d'intérêt .....	153
Figure 91.	Spectres d'émission de IrB8 incubé avec divers substrats (excitation 488 nm).....	155
Figure 92.	IrB8 forme des adduits covalents avec les protéines <i>in vitro</i> .....	156

Figure 93.	Visualisation des adduits protéiques de IrB8 après traitement de cellules vivantes ...	157
Figure 94.	Immunoprécipitation de GRP78 dans des extraits de cellules traitées par IrB8.....	158
Figure 95.	Voies de survie de la réponse UPR <sup>[174]</sup> .....	160
Figure 96.	Utilisation, vitesse et limitations de différentes réactions de chimie click, d'après Bernardes et coll. <sup>[180]</sup> .....	181
Figure 97.	Structure cristallographique obtenue pour IrN <sub>3</sub> .....	185
Figure 98.	Mise au point de la réaction click avec la 5-FAM <i>in cellulo</i> .....	188
Figure 99.	Images confocales (projections Z) de cellules hTERT-RPE1 traitées par 10 µM IrN <sub>3</sub> durant une heure puis clickées avec la 5-FAM-Alkyne (vert). .....	189
Figure 100.	Comparaison des marquages nucléaires sur une tranche confocale de 210 nm .....	190
Figure 101.	Morphologie des cellules après 2 h de traitement par IrN <sub>3</sub> .....	191
Figure 102.	Co-localisation de IrN <sub>3</sub> avec le cytosquelette d'actine dans la lignée HuH-7.....	191
Figure 103.	Co-localisation de IrN <sub>3</sub> avec le cytosquelette d'actine dans la lignée hTERT-RPE1 ..	192
Figure 104.	Révélation à la streptavidine-HRP des extraits de cellules hTERT-RPE1 traitées par IrN <sub>3</sub>	194
Tableau 1.	Données françaises de l'incidence de certains cancers et leur taux de survie après 5 ans 9	
Tableau 2.	Exemples de valeur d'IC <sub>50</sub> de différents complexes sur des cellules du cancer de l'ovaire	20
Tableau 3.	Solvolyse des complexes Ir01-12 et IrV1-3 suivie par RMN du proton dans le DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> .	35
Tableau 4.	Comparaison des données cristallographiques de trois complexes semi-sandwich.....	39
Tableau 5.	IC <sub>50</sub> de Ir02 évalué par xCELLigence sur plusieurs lignées cellulaires .....	81
Tableau 6.	Adduits détectés par HRMS pour les différents substrats .....	102
Tableau 7.	Effet de l'ajout d'un ligand pyridyl-BODIPY sur la cytotoxicité des complexes Ir01 et Ir12	118
Tableau 8.	Comparaison des propriétés spectrales de B4 et B5.....	126
Tableau 9.	Paramètres photophysiques de B8, IrB8 et IrB8-DMSO.....	129
Tableau 10.	Analyse de la réponse cellulaire à B8 et IrB8 par vidéo-microscopie.....	132
Tableau 11.	Adduits observés par HRMS-ESI+ après incubation avec différents substrats .....	154
Schéma 1.	Structure du CDDP.....	7
Schéma 2.	Mécanisme d'action anti-mitotique proposé pour le CDDP.....	8
Schéma 3.	Quelques complexes organométalliques utilisés en chimiothérapie.....	10
Schéma 4.	Trois exemples de complexes d'Iridium bis-cyclométallés d'intérêt .....	12
Schéma 5.	Structure générale des complexes d'iridium(III) à ligand arène .....	15
Schéma 6.	Réactivité (non-exhaustive) des ERO primaires <sup>[70]</sup> .....	22
Schéma 7.	Mécanisme d'oxydation d'un lipide par le radical hydroxyle <sup>[71]</sup> .....	23
Schéma 8.	Voies de l'apoptose extrinsèque et intrinsèque activées en réponse aux chimiothérapies. <sup>[78]</sup> .....	25

Schéma 9.	Chimiothèque et nomenclature des complexes .....	28
Schéma 10.	Voies de synthèse employées pour l'accès aux complexes de type (phox) .....	29
Schéma 11.	Mécanisme de synthèse de complexe semi-sandwich d'iridium comportant un ligand (C <sup>^</sup> N) par C-H activation. ....	30
Schéma 12.	Mécanisme de coordination de ligands de type 2-alkynylpyridine .....	33
Schéma 13.	Synthèse de IrV1-3 .....	33
Schéma 14.	Formation de l'espèce cationique en solution dans le DMSO .....	34
Schéma 15.	Synthèse d'un adduit DMSO par abstraction de ligand chlorido.....	36
Schéma 16.	Synthèse de [Ir02-DMSO]PF <sub>6</sub> .....	38
Schéma 17.	Cycle catalytique expliquant la production de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> adapté de Sadler et coll. <sup>[42]</sup> .....	40
Schéma 18.	La voie extrinsèque de l'apoptose et la nécroptose sont médiées par RIP1 <sup>[112]</sup> .....	75
Schéma 19.	La voie de signalisation Keap1-Nrf2, d'après Taguchi et coll. <sup>[113]</sup> .....	76
Schéma 20.	PIDD et la caspase-2 sont impliqués dans la réponse aux cassures double-brin de l'ADN <sup>[122,123]</sup> 79	
Schéma 21.	Schéma des voies de signalisation considérées.....	96
Schéma 22.	Comparaison du mécanisme d'action de Étoposide et Ir02, perspectives.....	105
Schéma 23.	Schéma rétrosynthétique pour l'accès aux BODIPY à partir d'un aldéhyde.....	111
Schéma 24.	Synthèse de B1, un <i>meso</i> -4-pyridyl-BODIPY émettant une fluorescence verte.....	111
Schéma 25.	Synthèse de IrV2-B1 par abstraction du ligand chlorido .....	119
Schéma 26.	Dissociation du ligand de Ir01-B1 par aquation.....	120
Schéma 27.	Synthèse d'un BODIPY rouge-émetteur à partir de B1 <sup>[152]</sup> .....	120
Schéma 28.	Échange du ligand chlorido de Ir12 par B2.....	121
Schéma 29.	Synthèse du pro-ligand 2-(4-BODIPY-phényléthynyl)pyridine B4.....	122
Schéma 30.	Complexation du pro-ligand fluorescent B4 et échange de ligand avec le DMSO .....	122
Schéma 31.	Synthèse de IrB5 et IrB5-H <sub>2</sub> O comportant un groupement méthoxo <sup>[153]</sup> .....	123
Schéma 32.	Synthèse de IrB4' en cinq étapes.....	124
Schéma 33.	Synthèse du ligand (phox)-BODIPY B8.....	125
Schéma 34.	Complexation de B8 et formation d'un complexe fluorescent dans le DMSO.....	125
Schéma 35.	Stratégie de chimie bio-orthogonale proposée par DeRose et coll. <sup>[186]</sup> .....	182
Schéma 36.	Description de l'approche bio-orthogonale envisagée.....	183
Schéma 37.	Stratégies de synthèse d'un complexe porteur d'une fonction éthyne clickable.....	184
Schéma 38.	Synthèse de IrN <sub>3</sub> en 3 étapes.....	185
Schéma 39.	Synthèse d'un BODIPY- <i>meso</i> -éthynyle B9 .....	186
Schéma 40.	Synthèse d'un BODIPY-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -éthynyle.....	186
Schéma 41.	CuAAC réalisée <i>in vitro</i> sur Ir-N <sub>3</sub> en présence d'un excès de DMSO.....	187
Schéma 42.	Réaction click sur lamelle de microscopie avec la 5-FAM.....	189
Schéma 43.	Analyse des protéines marquées par IrN <sub>3</sub> .....	193
Schéma 44.	Deux stratégies de purification (pull-down) des protéines cibles de IrN <sub>3</sub> .....	196

**Résumé :**

Le développement de complexes organométalliques cytotoxiques constitue un domaine prometteur dans la recherche de nouveaux agents de chimiothérapie. Les complexes d'iridium(III) à ligand arène (ou semi-sandwich) sont actuellement étudiés à cet effet, néanmoins leur mécanisme d'action reste mal défini à l'échelle moléculaire. Dans cet esprit, nous avons introduit une série de dix complexes semi-sandwich originaux comportant un ligand chélatant de type phényloxazoline. La toxicité de ces complexes dans la lignée HeLa a pu être partiellement corrélée à leur capacité à produire du peroxyde d'hydrogène à partir de NADH, démontrée à la fois *in vitro* et *in vivo*. Parmi cette série, un complexe en particulier a montré des propriétés remarquables. Nous avons donc étudié plus précisément la réponse cellulaire suite au traitement par ce complexe. Sur plusieurs lignées cellulaires, il montre un mécanisme d'action différent d'un antimétabolite utilisé en chimiothérapie, conduisant à la mort cellulaire par la voie intrinsèque de l'apoptose. Au niveau moléculaire, la formation d'adduits covalents entre les complexes semi-sandwich et la chaîne latérale de certains acides aminés a pu être mise en évidence par spectrométrie de masse. Afin d'obtenir plus d'informations sur la localisation intracellulaire de ces métallo-drogues, un complexe d'iridium comportant un ligand phényloxazoline-BODIPY fluorescent a été synthétisé. Le substituant BODIPY étant très lipophile, nous souhaitons adresser le complexe vers des compartiments subcellulaires riches en membranes tout en suivant son internalisation par microscopie de fluorescence. Comme attendu, ce complexe se localise principalement dans le réticulum endoplasmique et la mitochondrie et perturbe le trafic intracellulaire. Grâce à ce complexe, des protéines comportant des adduits fluorescents ont pu être visualisées, suggérant une affinité préférentielle pour certaines cibles. Afin de les identifier, nous avons synthétisé un complexe comportant une fonction bio-orthogonale azoture. Grâce à la chimie *click*, la localisation intracellulaire des complexes semi-sandwich a pu être étudiée de façon moins biaisée. De plus, cette stratégie permettra de purifier les protéines ciblées par le complexe et à terme, de les identifier par spectrométrie de masse protéomique.

Mots clés : Iridium, semi-sandwich, anticancéreux, mécanisme d'action, stress oxydant

### **Synthesis and study of the cytotoxic mechanism of half-sandwich organoiridium complexes**

The development of novel transition metal complexes with cytotoxic properties as potential anticancer drugs is of increasing interest. Half-sandwich complexes of iridium(III) including various coligands are currently investigated to this purpose but their molecular mechanism of action is still poorly understood. In this line, we have introduced a series of ten complexes including phenyloxazoline derivatives as chelating ligands and showed that their cytotoxicity on HeLa cells was partly linked to their ability to raise intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels, presumably by catalysis and depletion of intracellular NADH. Amongst this series, one complex in particular showed excellent properties both *in vitro* and in live cells, we undertook to further characterize the cellular response upon exposure to this complex. Several cell lines and biological techniques were employed to unveil some putative mechanisms of cellular response. We also demonstrated using mass spectrometry that half-sandwich complexes are able to form covalent adducts with some amino-acids' side chain. A convenient strategy to get insight into the mechanism of action of metal-based drugs is to append a fluorescent reporter group which enables their intracellular tracking and the analysis of their subcellular distribution. To this end, we designed a half-sandwich iridium complex comprising a modified phenyloxazoline ligand to which was appended a BODIPY entity, also chosen to address the drug to membrane-rich organelles. This complex was able to form fluorescent adducts with a subset of proteins upon treatment of live cells. To identify these binding partners, we synthesized a half-sandwich iridium complex comprising a bio-orthogonal reactive function ready to perform chemoselective ("click") ligations with relevant molecules (fluorophore, biotin). This new complex will allow us to get unbiased insight into its intracellular behaviour and in term identify its protein targets, providing a new entry to the development of half-sandwich iridium-based anticancer drugs.

Keywords : Iridium, half-sandwich, anticancer, mechanism of action, oxidative stress