



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Chimie

Ecole doctorale SDLM

présentée par

Jean-Luc VORNG

préparée à l'unité de recherche UMR CNRS 6164
Institut d'Electronique et de Télécommunication de Rennes
UFR Informatique et Electronique

Synthèse de sondes
moléculaires pour
l'imagerie multimodale
et multi-échelle
appliquée en science
du vivant

Thèse soutenue à Rennes
le 16 Décembre 2013

devant le jury composé de :

Julien Leclaire

Professeur, Institut de Chimie et Biochimie Moléculaire et
Supramoléculaires de l'université Claude Bernard Lyon 1/
Rapporteur

Sylvain Jugé

Professeur, Institut de Chimie Moléculaire de l'université
de Bourgogne, Dijon / *Rapporteur*

Jean-Pierre Bazureau

Professeur, Institut des Sciences Chimiques de l'université
de Rennes 1 / *Examineur*

David Reboutier

Institut de génétique et de développement de l'université
de Rennes 1 / *Examineur*

Olivier Lavastre

Directeur de Recherche CNRS, Université Rennes 1 /
directeur de thèse





THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Chimie

Ecole doctorale SDLM

présentée par

Jean-Luc VORNG

préparée à l'unité de recherche UMR CNRS 6164
Institut d'Electronique et de Télécommunication de Rennes
UFR Informatique et Electronique

Synthèse de sondes
moléculaires pour
l'imagerie multimodale
et multi-échelle
appliquée en science
du vivant

Thèse soutenue à Rennes
le 16 Décembre 2013

devant le jury composé de :

Julien Leclaire

Professeur, Institut de Chimie et Biochimie Moléculaire et
Supramoléculaires de l'université Claude Bernard Lyon 1/
Rapporteur

Sylvain Jugé

Professeur, Institut de Chimie Moléculaire de l'université
de Bourgogne, Dijon / *Rapporteur*

Jean-Pierre Bazureau

Professeur, Institut des Sciences Chimiques de l'université
de Rennes 1 / *Examineur*

David Rebutier

Institut de génétique et de développement de l'université
de Rennes 1 / *Examineur*

Olivier Lavastre

Directeur de Recherche CNRS, Université Rennes 1 /
directeur de thèse

Remerciements

Je remercie la région Bretagne et le CNRS pour le financement de cette thèse.

Je remercie les membres du jury pour leur disponibilité et le temps accordé à la lecture du manuscrit et la soutenance.

Cette thèse a été réalisée au sein de l'équipe Matériaux fonctionnels de l'institut d'électronique et de télécommunication de Rennes (IETR, UMR CNRS 6164).

Je tiens à présenter mes remerciements les plus sincères au Dr Olivier LAVASTRE qui m'a accompagné tout au long de ce projet en sa qualité de directeur de thèse. Ses enseignements et ses conseils m'ont permis de m'initier à la recherche et à la prise en charge de multiples activités au sein d'un laboratoire de recherche. Je remercie également le Dr Eric Pottier directeur de l'IETR au sein duquel notre équipe est rattachée.

Mes remerciements également à toutes les personnes avec qui j'ai pu travailler durant ces trois années :

L'équipe du Pr Claude Prigent et plus particulièrement David REBOUTIER pour son aide, sa patience les enseignements apportés liés à l'aspect biologique de ce projet. Madame Agnès BURREL et Valérie le GOUESBET pour m'avoir accueilli au sein de la plateforme de microscopie afin que je puisse me former aux techniques de préparations d'échantillons qui sans leur aide aurait rendu ce projet bien plus complexe.

Le Dr Alain MOREAC (institut de physique de Rennes) pour sa disponibilité, ses précieux conseils et pour m'avoir initié à la spectroscopie Raman expérimentale. Je le remercie également pour cette visite très agréable de Lille et sa bonne humeur.

Thomas Delhaye (ingénieur plateforme NanoSIMS de l'université de Rennes 1) sans qui les analyses NanoSIMS n'auraient pu être possibles. Un grand merci pour tes conseils tes canulars qui t'ont permis de me piéger un nombre de fois incalculable : alerte incendie, plot d'analyse déformé... J'en passe et des meilleures).

Un grand merci aux gestionnaires de l'IETR mesdames Joëlle DROUET, Yolande SAMBIN et Chantal GORON pour leur aide précieuse lors des différentes démarches administratives auquel j'ai eu à faire face.

Je tiens à remercier très chaleureusement les personnes qui m'ont accueillies lors de mon arrivé au sein de l'équipe, pour leur aide et leur disponibilité m'ont permis de m'adapter aux us et coutumes du laboratoire.

Dans un premier temps honneur "aux anciens", Merci à Alain DARIDOR et Ronan TARTIVEL pour leurs nombreux conseils. Leurs connaissances m'ont permis de m'ouvrir à beaucoup de choses comme les bagadous et la culture bretonne en générale. Je tiens également adresser remercier le Dr Guillaume Husson pour sa disponibilité de l'époque (étant donné qu'il finissait sa thèse) qui a pu m'aider à m'intégrer à l'équipe et trouver de bons repères.

Je tiens à remercier mes camarades et amis de l'équipe avec qui j'ai partagé de très bons moments durant ces trois années que ce soit dans ou en dehors du laboratoire, même si je me demande si je ne devrais pas commencer par "désolé d'avoir été aussi râleur et bougon durant cette période de rédaction (ils savent de quoi je parle...). Dans un premier temps je tiens à remercier mes "colocataires" de bureau : Stéphane (Doudou) DONAT le mec le plus relax de tout ce labo (et plus encore) dont je me demande toujours comment il a pu supporter mes séquences "jrallerie et bougonneries". Matthieu Frobert dont les références musicales ont permis d'animer ce bureau quand ça n'allait pas et même quand ça allait d'ailleurs. Comment ne pas remercier les doctorants de l'autre bout du couloir, les fameux TOTAUX, à commencer par les plus anciens d'entre eux : Dr Kévin FOUYER ou l'homme qui pose des questions plus vite que la lumière donnant aux conversations des tournures des plus bizarres (?), Dr Guillaume DARSY (san) dont les conversations vidéo-ludiques ont conduits à des débats (ou délires) sans fins. Parmi les derniers arrivants dans ce bureau, je tiens à remercier Audrey (MAMAN) CABROL avec qui j'ai pu instaurer le sacro sain vendredi gras permettant en général de clore des bonnes semaines de boulot (sans oublier les pauses papotage cuisine^^, PS : le Daim c'est meilleur!), Boris (Sparring partner) COLIN dont les blagues (à la limite parfois) nous ont permis de bien détendre l'atmosphère. PS : je ne sais pas si je dois te remercier de m'avoir fait replonger dans un jeu auquel je ne pensais plus toucher avant bien longtemps. Merci également à Jonathan (ou yonathan) Thiévin, l'un "des vestiges" de Sens Innov pour ces bons moments passé à l'intérieur et à l'extérieur du labo (sans oublier ses yellow blagues) et au Professeur David Rondeau pour ses conseils, sa bonne humeur et les conversations sur des sujets divers et variés.

Je tiens également à remercier les stagiaires qui sont passé par ce laboratoire, Izy, Dani, Benjamin, Abasse, Eva, Benjamin et Florian qui ont contribué à l'animation dans ce laboratoire.

Je souhaiterai enfin remercier ma famille pour tout le soutien et les encouragements lors des moments difficiles qu'elle a su m'apporter durant ces trois années. Un grand MERCI à mon père Duc, ma mère Vanna et ma sœur Camille (Mimitou) dont les phrases d'encouragement simples mais au combien efficace m'ont permis de mener ce projet à son terme. Je tiens à remercier mes amis de longue date, Florian (Flo) et Adrien (ien-ien) pour leur soutien de tous les instants lors de la rédaction de ce manuscrit mais surtout ces moments, bien que devenus rares, de franche marrade comme au bon vieux temps.

Avant-Propos

Généralités

Toutes les manipulations ont été réalisées sous une rampe à vide sous atmosphère d'argon en utilisant les techniques de Schlenk ou en boîte à gant sous atmosphère d'azote. Les réactifs chimiques ont été commandés chez Sigma Aldrich et Acros Organics, et utilisés sans purification préalable. Tous les solvants de synthèse sont distillés et dégazés avant usage, soit sur sodium/benzophénone pour le THF, soit sur lit de P₂O₅ pour le dichlorométhane.

Toutes les manipulations de marquage cellulaire ont été effectuées au sein du laboratoire de l'IGDR (UMR 6290) en suivant les protocoles d'usages pour ce type d'expérimentation. Les réactifs utilisés ont été commandés chez Life Technologies, Sigma Aldrich et Invitrogen et ont été utilisés sans purification préalable.

Appareillages

Résonance magnétique nucléaire : Les spectres RMN ¹H ont été enregistrés sur un spectromètre Brüker AC 300P, les spectres RMN ¹³C et ¹⁹F ont été enregistrés sur des spectromètres Brüker 400 et 500 MHz. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au tétraméthyle silane (SiMe₄).

Spectroscopie Raman : Les spectres Raman des différents échantillons ont été effectués à l'aide d'un micro-spectromètre Raman LabRam HR 800 de la société HORIBA/Jobin-Yvon avec un laser à 632,818 nm. Les bandes Raman sont exprimées en cm⁻¹.

Préparation des coupes ultra-microtomées : Les échantillons sont préparés à l'aide d'un ultra-microtome Leica UC-5 de la société Leica. Le système est équipé de couteaux diamants Cryotrim 45° et Histo 45° de la société Diatome permettant l'obtention de coupe de 500 nm des blocs de résine.

Spectrométrie NanoSIMS : Les images élémentaires des échantillons ont été obtenues à l'aide de la NanoSIMS 50 de la société CAMECA.

Abréviations

Ac: Anticorps

ADN: Acide désoxyribonucléique

ARNr: Acide ribonucléique ribosomique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATP- γ -SH: adénosine-5-diphosphate- γ -thiophosphate

BBS: Borate Buffer Saline

Br₄U: Bromodeoxyuridine

CARS: Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy

CCD : Charge Coupled Device

CDCl₃ : Chloroforme deutéré

DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole

DCC : dicyclohexylcarbodiimide

DCM : dichlorométhane

DMSO : diméthyl sulfoxyde

EDC: éthyl (diméthylaminopropyl) carbodiimide

ESI : Electrospray ionization

¹⁸F-FDG : Fluodexy glucose

5-FU : Fluoracil

HMR : High Mass Resolution

I₄U: Iododeoxyuridine

(iPr)₂NH: diisopropylamine

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

LMIG : Liquid Metal Ion Gun

m: multiplet

MET: Microscopie électronique à transmission

NA: Numerical Aperture

NEt₃: Triéthylamine

NPM: Nucléophosmine

OD: Optical Density

PBS : Phosphate Buffer Saline

BSA : Bovine Serum Albumin

PNBM : Paranitro-Benzoylmésylate

ppm: Partie Par Million

R_f : Rapport frontal

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

s : singulet

TEP : Tomographie par Émission de Positron

THF : Tétrahydrofurane

SIMS: Secondary Ion Mass Spectrometry

RSF: Relative Sensitivity Factor

Table des matières

Remerciements	3
Avant-Propos	5
Abréviations	6
Introduction générale au manuscrit	13

Chapitre 1 :

Imagerie en science du vivant : adaptation d'un immuno-marquage en imagerie Raman et NanoSIMS

Fiche signalétique	18
Introduction générale du chapitre	19
I. La biologie cellulaire : introduction générale	20
a. La biologie cellulaire	20
b. Historique et évolution de la microscopie	21
II. Immuno-marquage : principe et moyens mis œuvre	25
a. Notions de base sur les anticorps	25
b. L'immuno-marquage	27
III. Présentation du marquage lié au projet	30
a. Choix de la cible de marquage : le nucléole	30
b. Marquage de l'anticorps secondaire	33
c. Application de l'immuno-marquage indirect dans le cadre du projet.....	33
d. Immunofluorescence appliquée au marquage des anticorps : résultats de l'expérience de contrôle	34
i. Présentation de l'expérience.....	34
ii. Présentation des résultats obtenus par immunofluorescence	36
Conclusions	40
Bibliographie	41
Experimental Part	43
Notes	48

Chapitre 2 :

Synthèse organique appliquée à l'imagerie de cellules : préparation de sondes moléculaires

Fiche signalétique	54
Introduction générale du chapitre	55
I. La chimie organique : outil de préparation de sondes moléculaires pour l'imagerie.....	58
a. L'imagerie et la synthèse organique.....	58
b. Préparation de sondes moléculaires : le cahier des charges.....	61
II. Préparation des sondes moléculaires	62
a. Présentation de la chimie liée aux techniques d'imagerie choisies	62
b. Marquage des anticorps.....	66
III. Applications du cahier des charges : préparation des esters de succinimide	68
IV. Préparation d'une nouvelle série de sondes moléculaire : les sondes mésylates	71
a. Marquage de l'ATP-Y-SH : principe du marquage	71
b. Préparation des précurseurs de sondes par couplages de Sonogashira	73
c. Mésylation des précurseurs et préparation des sondes	75
Conclusion	79
Bibliographie	80
Experimental part.....	85
Notes.....	97

Chapitre 3 :

Spectroscopie Raman en science du vivant :

Imagerie par l'intermédiaire de sondes endogènes et exogènes

Fiche signalétique	104
Introduction générale du chapitre	105
I. La spectroscopie Vibrationnelle	107
a. Principe de base : notions de vibration et de symétrie	107
b. L'effet Raman.....	109
i. Description du phénomène.....	109
ii. L'effet Raman au sein des molécules	110
c. Comparatif entre les spectroscopies Raman, infrarouge et la fluorescence.....	111
II. Historique et caractéristiques de la spectroscopie Raman.....	112
a. Évolutions techniques.....	112

b.	<i>Caractéristiques de la technique</i>	113
c.	Présentation de l'appareil	114
III.	La cartographie et l'imagerie Raman	115
a.	<i>Principes, avancées et applications</i>	115
IV.	La spectroscopie Raman adaptée aux études cellulaires	117
a.	La microscopie Raman outil de choix pour la bio-imagerie.....	117
b.	Le matériel biologique : informations chimiques et structurales.....	118
V.	Imagerie Raman par l'intermédiaire de sondes endogènes et exogènes	119
a.	Imagerie Raman des sondes endogènes	119
i.	Étude du montage de microscopie utilisé pour les cellules	119
ii.	Étude de cellules sur lame de CaF ₂	122
iii.	Line scan sur une cellule.....	125
iv.	Imagerie Raman sur cellule	128
b.	La nature des sondes exogènes employées	134
c.	<i>Vérification de la faisabilité de marquage de l'anticorps secondaire</i>	138
d.	<i>Imagerie de cellule par l'intermédiaire d'une sonde</i>	142
VI.	La spectroscopie CARS (coherent anti-stokes Raman spectroscopy)	150
a.	<i>Introduction au CARS</i>	150
i.	Introduction générale	150
ii.	CARS adaptée au matériel biologique.....	151
b.	Test préliminaires sur une molécule sonde	152
c.	<i>Conclusions globales concernant la CARS</i>	154
	Conclusion	155
	Bibliographie	157
	Experimental Part	163
	Notes	170

Chapitre 4 :

Spectrométrie NanoSIMS en science du vivant :

Imagerie par l'intermédiaire de sondes endogènes et exogènes

	Fiche signalétique	176
	Introduction générale du chapitre	177
I.	La Spectrométrie de Masse d'Ions Secondaires (SIMS)	178
a.	Historique	178
b.	Notions liées au SIMS	178
II.	La NanoSIMS	181
III.	Les applications biologiques	184
IV.	La préparation des échantillons	186

a.	Fixation	186
b.	La déshydratation	187
c.	La mise en résine	188
d.	Coupe des blocs de résine par ultra-microtomie	189
V.	La NanoSIMS dédiée à l'imagerie de cellules	192
VI.	Imagerie NanoSIMS de cellules marquées par des sondes moléculaires.....	194
a.	Imagerie de cellule par une sonde iodée.....	196
b.	Imagerie de cellules par une sonde bromée	201
c.	Imagerie de cellules par une sonde fluorée	203
d.	Imagerie de cellule par l'intermédiaire d'une sonde fluorée bimodale	210
	Conclusions.....	214
	Bibliographie	215
	Experimental part.....	219
	Notes.....	226
	<hr/>	
	Conclusion générale.....	228
	Perspectives.....	230

[Create what you feel, create what you see, create what you have never seen]

Nathan Sawaya "the art of brick"

Introduction générale au manuscrit

Les techniques d'imagerie en science du vivant sont essentielles aux méthodes de diagnostics en médecine ainsi qu'en sciences fondamentales et appliquées en biologie. L'imagerie en science du vivant et ses techniques, se trouvent à l'interface de plusieurs domaines des sciences telles que la physique, la chimie, la biochimie, la biologie et les mathématiques. Les techniques d'imagerie n'ont cessé d'évoluer sur le plan instrumental et sont devenues de plus en plus résolutive et leur champ d'applications se sont diversifiés de part les développements à l'interface de différents domaines. Le lien entre localisation et composition moléculaire d'organites cellulaires est donc possible, permettant ainsi de faire un inventaire des différentes espèces intervenant dans certains mécanismes biologiques. Ces techniques se déclinent par des modes d'actions aussi divers que variés, en effet il est possible d'obtenir une image d'un échantillon biologique par observation de phénomènes physiques (Résonance magnétique nucléaire, rayon X, émission de positrons, spectroscopie...) ou optiques (imagerie par contraste de phase).

Une grande partie des techniques d'imagerie biologique se basent sur la microscopie afin d'accéder à l'information au sein du tissu ou de la cellule. L'exploitation de phénomènes optiques tels que la réflexion, la transmission ou la réfraction ont contribué au perfectionnement de cette technique. Cependant l'observation de certains échantillons biologiques est difficile à cause de leur morphologie (épaisseur, non homogénéité de l'échantillon dans le plan focal). Pour pallier à cette contrainte, le développement des microscopes confocaux a rendu accessible l'obtention d'images à faible profondeur de champ. Cette caractéristique permet de visualiser par tranche optique (ou section optique) et donc l'observation d'échantillon en 3 dimensions par reconstitution des sections optiques observées.

Les techniques de microscopie utilisant un système optique confocal sont aujourd'hui déclinées pour de nombreuses applications telles que la microscopie de fluorescence et donnent accès à des informations de plus en plus précises permettant d'accéder à des structures subcellulaires. En parallèle de ces développements instrumentaux, les méthodes de marquage ont facilité la localisation spécifique de certaines molécules d'intérêts biologiques par la visualisation de la fluorescence d'un chromophore. Cependant, les techniques basées sur le phénomène de fluorescence sont limitées par la résolution de l'instrument en lui-même, par le nombre de chromophores visualisables simultanément et enfin par la dégradation progressive du chromophore. C'est pourquoi l'exploration de nouvelles voies d'acquisition d'images constitue un challenge expérimental, technique et scientifique pouvant conduire à des techniques complémentaires à la microscopie de fluorescence.

Ce manuscrit s'intéressera au développement et la mise en application d'un projet d'imagerie permettant l'acquisition et l'exploitation d'images se basant sur l'observation de phénomènes vibrationnels moléculaires et élémentaires dans une cellule. Deux techniques semblent se distinguer par leurs caractéristiques techniques, sensibles et résolutive dans le cadre de la mise en place de ce projet : la micro-spectroscopie Raman et l'imagerie NanoSIMS. La spectroscopie Raman permet l'étude des modes de vibration d'une structure moléculaire à l'échelle micronique tandis que la spectrométrie NanoSIMS donne accès à la constitution élémentaire et isotopique d'un échantillon à

l'échelle submicronique. La combinaison de ces techniques permettrait d'obtenir des informations corrélées. L'introduction d'un élément par marquage commun à ces deux techniques va permettre l'observation d'un organite caractéristique de la cellule par une approche multimodale et multi-échelle. Un travail à l'interface de la chimie, la biologie et des méthodes d'imagerie sera traité dans ce manuscrit.

Le manuscrit de thèse se découpe en quatre chapitres.

Le premier chapitre, se consacrera à la présentation des enjeux biologiques liés à ce projet. Ce chapitre mettra en évidence les notions clés qui serviront de base à la mise en place du projet. Nous présenterons la cible de marquage, sous compartiment du noyau : le nucléole. La méthode de marquage que nous souhaitons utiliser est un immuno-marquage ciblant une protéine majoritairement présente dans le nucléole : la nucléophosmine. Le nucléole est un organite bien connu des biologistes qui est observable par l'intermédiaire de la microscopie par contraste de phase. Il est le centre de synthèse des ARN ribosomiques et fait l'objet de nombreuses recherches qui visent à comprendre la biogénèse des ribosomes. Ce domaine nucléaire dynamique et multifonctionnel est étroitement lié à la croissance et à la prolifération cellulaire. Une présentation bibliographique de la cible de marquage, des anticorps et leur spécificité sera abordée.

Le second chapitre permettra d'introduire les méthodes de synthèse mises au point afin de préparer des sondes moléculaires. Dans un premier temps nous montrerons comment nous envisageons le marquage des anticorps par la sonde moléculaire. Ensuite nous expliciterons comment des sondes spécifiques à chaque technique d'imagerie sont synthétisées. Nous envisagerons également la préparation de sonde bimodale contenant dans la même structure moléculaire les deux éléments à visualiser par spectroscopie Raman et imagerie NanoSIMS. Enfin les étapes préliminaires de la synthèse d'une nouvelle catégorie de sondes moléculaires seront envisagées dans le cadre du marquage de l'ATP- γ -SH. Cette nouvelle famille de sondes permettra une éventuelle ouverture du projet vers une plus grande variété de marquages.

Dans le troisième chapitre nous présenterons le potentiel en imagerie par spectroscopie Raman ainsi que les informations qu'elle peut apporter par l'étude des modes de vibrations des molécules présentes au sein de la cellule. La mise en place des mesures Raman sera détaillée afin de mettre en évidence les contraintes auxquelles il est nécessaire de faire face dans le cadre de ce type d'imagerie. L'observation et l'exploitation des images obtenues après marquage de la cellule permettront de dégager les avantages et les inconvénients de cette technique. En fonction des résultats obtenus, une autre technique dérivée de la micro-spectroscopie Raman sera présentée afin de proposer une alternative à ce projet.

Le dernier chapitre de ce manuscrit présentera la seconde technique d'imagerie du projet : la spectrométrie NanoSIMS. Un historique de la technique ainsi que la présentation de son mode de fonctionnement permettront de mettre en évidence ses caractéristiques et ses avantages pour une application en sciences du vivant. La méthode de préparation des échantillons ainsi que le fonctionnement du système imageur seront détaillés afin de montrer le type d'information auquel il est possible d'accéder au sein d'un échantillon biologique.

Chapitre 1 :

Imagerie en science du vivant : adaptation d'un immuno-marquage en imagerie Raman et NanoSIMS

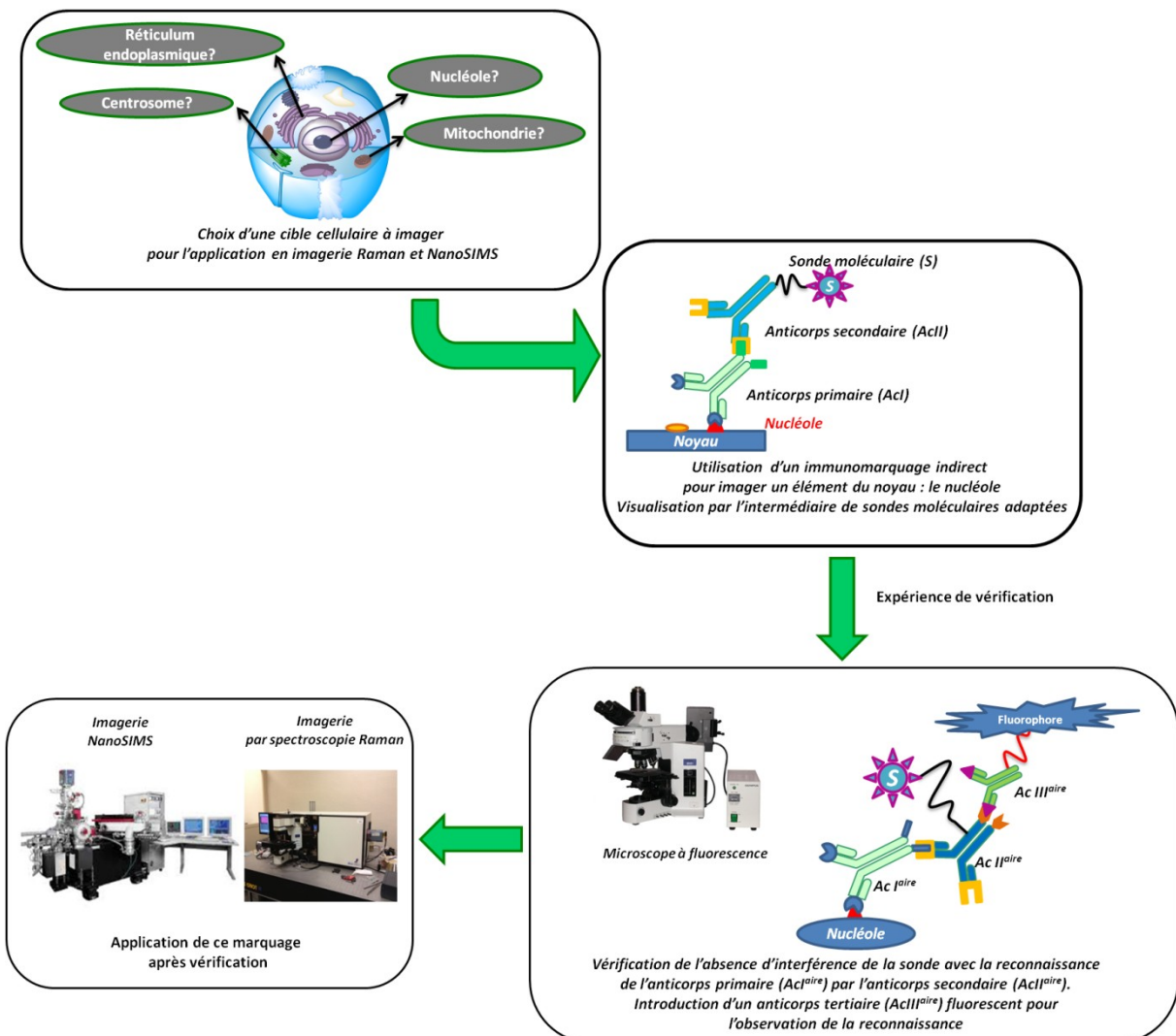
Table des matières

Fiche signalétique	18
Introduction générale du chapitre	19
I. La biologie cellulaire : introduction générale	20
a. La biologie cellulaire	20
b. Historique et évolution de la microscopie	21
II. Immuno-marquage : principe et moyens mis œuvre	25
a. Notions de base sur les anticorps	25
b. L'immuno-marquage	27
III. Présentation du marquage lié au projet	30
a. Choix de la cible de marquage : le nucléole	30
b. Marquage de l'anticorps secondaire	33
c. Application de l'immuno-marquage indirect dans le cadre du projet	33
d. Immunofluorescence appliquée au marquage des anticorps : résultats de l'expérience de contrôle	34
i. Présentation de l'expérience	34
ii. Présentation des résultats obtenus par immunofluorescence	36
Conclusions	40
Bibliographie	41
Experimental Part	43
Notes	48

Fiche signalétique

Objectifs : Développement de nouvelles techniques d'imagerie cellulaire complémentaires à la microscopie de fluorescence qui se basent sur la spectroscopie Raman et l'imagerie NanoSIMS. Utilisation d'une méthode de marquage permettant l'acquisition d'images grâce à l'étude structurale (Spectroscopie Raman) et élémentaire à l'échelle sub-micronique (NanoSIMS) des cellules. La faisabilité de ces techniques sera vérifiée par l'observation d'un organe facilement localisable au sein du noyau de la cellule : le nucléole.

Moyens mis en oeuvre : Utilisation d'un immuno-marquage faisant intervenir deux anticorps pour le marquage : un anticorps primaire pour le marquage de la nucléophosmine (une protéine spécifique du nucléole) et un anticorps secondaire spécifique de l'anticorps primaire. Pour permettre l'observation du marquage par micro-spectroscopie Raman et/ou imagerie NanoSIMS, une sonde moléculaire sera synthétisée (présentation lors du chapitre 2) afin de marquer l'anticorps secondaire. La non interférence de la sonde avec l'anticorps secondaire sera vérifiée par des expériences contrôlées effectuées par l'intermédiaire de la microscopie de fluorescence.



Introduction générale du chapitre

La biologie cellulaire est la science dédiée à l'étude du fonctionnement des cellules. Elle s'intéresse à tous les phénomènes vitaux qui ont lieu à l'intérieur de ces unités biologiques. Il existe de nombreuses méthodes dédiées à la biologie cellulaire. Une importante partie d'entre elles ont pour origine la même technique : la microscopie optique. Cette dernière s'est améliorée au fil du temps permettant d'accéder à des images dont la résolution est de plus en plus grande. Une des avancées les plus significatives est l'exploitation du phénomène de fluorescence combiné à la microscopie pour l'étude des cellules. Elle se base sur la capacité d'une molécule à émettre de la fluorescence sous l'influence d'une radiation lumineuse. Cependant l'utilisation de la microscopie de fluorescence se heurte à des limitations technologiques. Parmi ces limitations, on trouve la résolution optique du microscope qui ne permet pas d'imager des objets dont la taille est inférieure à $0,5 \mu\text{m}$ ou le nombre limité de longueurs d'onde (ou canaux), et donc de structures cellulaires observables simultanément.

L'objectif du projet consiste à développer des approches d'imagerie complémentaires à la microscopie de fluorescence. Pour se faire, nous allons utiliser la micro-spectroscopie Raman et l'imagerie NanoSIMS. Ces techniques permettent respectivement de visualiser les modes de vibration de fonctions chimiques et les éléments naturellement présents ou artificiellement introduits au sein de l'échantillon. L'imagerie de structures cellulaires spécifiques *via* la micro-spectroscopie Raman et/ou l'imagerie NanoSIMS nécessite le développement de sondes chimiques exogènes spécifiques. La visualisation de ces sondes moléculaires exogènes par l'intermédiaire de ces techniques permettrait de dépasser les limitations de la microscopie de fluorescence. La micro-spectroscopie Raman rendrait possible la visualisation d'un plus grand nombre de "canaux", actuellement limité à 4 pour ce qui est de la microscopie de fluorescence. La spectrométrie NanoSIMS permet d'imager des cellules à une échelle submicronique et rend possible l'observation de structures plus fines grâce à une plus grande résolution.

Afin d'appliquer ces deux techniques d'imagerie dans le cadre du projet, une cible facilement identifiable et localisable a été sélectionnée au sein de la cellule. Nous avons donc choisi d'imager un sous compartiment du noyau dont le rôle est la transcription des ARN ribosomiques : le nucléole. Cet organite possède une structure distinguable au sein du noyau et se présente en différents emplacements du noyau. Le noyau de la cellule est composé de plusieurs nucléoles qui disparaissent au moment de la division cellulaire (mitose). Le fait de pouvoir observer plusieurs nucléoles au sein du noyau augmente les chances d'observer cet organite par spectroscopie Raman et imagerie NanoSIMS. L'observation du nucléole sera rendue possible par la mise en application d'un immuno-marquage faisant appel à un anticorps primaire spécifique de la nucléophosmine du nucléole et un anticorps secondaire spécifique de l'anticorps primaire portant la molécule sonde à observer.

Ce premier chapitre du manuscrit va se consacrer à la présentation des enjeux biologiques liés à ce projet. Nous commencerons par une introduction globale sur la biologie cellulaire et les techniques utilisées pour l'étude du fonctionnement des cellules. Par la suite nous nous intéresserons à la présentation du nucléole et de la nucléophosmine. Nous concluons ce chapitre par les expériences qui nous ont permis de valider le fonctionnement du marquage en présence de la sonde moléculaire.

I. La biologie cellulaire : introduction générale

a. La biologie cellulaire

La cellule est l'unité constitutive des organismes vivants. La notion de cellule a été développée au milieu du 17^{ème} siècle. La première observation d'une cellule a été réalisée en 1665 par Robert Hooke au sein d'une fine coupe de liège. ^[1] Il a pu observer à l'aide d'un microscope grossier de petits pores composant son échantillon qu'il nomma "cellules". Cependant Hooke n'a pas pu différencier et caractériser de compartiments particuliers au sein de son échantillon comme le noyau ou la membrane. Par la suite la conception d'outils permettant d'observer des échantillons de très petites tailles permet de mieux appréhender l'observation et l'étude des cellules. La biologie cellulaire ^[2] a pris son plein essor à partir de l'énonciation de la théorie cellulaire en 1838. La biologie cellulaire a pour objectif de décrire avec la plus grande précision possible toutes les structures caractéristiques de cellules animales, végétales ou d'êtres unicellulaires. Elle vise également la compréhension des événements qui régissent le fonctionnement des cellules. Il existe trois axiomes principaux liés à la théorie cellulaire :

- Tout organisme vivant est composé d'une ou plusieurs cellules.
- La cellule est l'unité de base de structure de tout organisme vivant.
- Toutes les cellules proviennent d'une unité cellulaire déjà existante.

La théorie cellulaire a pu se développer grâce aux travaux de trois scientifiques : Theodor Schwann, Matthias Jakob Schleiden et Rudolf Virchow. En 1838, Schwann et Schleiden ont proposé l'hypothèse selon laquelle la cellule est l'unité de base de la vie. ^[3] Puis en 1858, Virchow suggéra que toutes les cellules proviennent d'une entité cellulaire déjà existante. ^[4]

La théorie cellulaire est toujours d'actualité et depuis, la recherche s'intéresse à l'étude des cellules car elle est la source de nombreuses informations liées au domaine du vivant. Il est apparu de plus en plus évident que les processus de fonctionnement et de dysfonctionnement de l'organisme trouvaient leurs sources au sein des cellules. La biologie cellulaire s'est développée comme une discipline en constant progrès aussi bien par son approche fondamentale que par le développement de nouvelles techniques. La description et l'identification des principales structures (Figure 1) et organites cellulaires ont été établies entre les années 1830 et 1900. ^[2] Dans le même temps les techniques d'études morphologiques des cellules isolées (cytologie) et des tissus (histologie) classiques ont été mises au point.

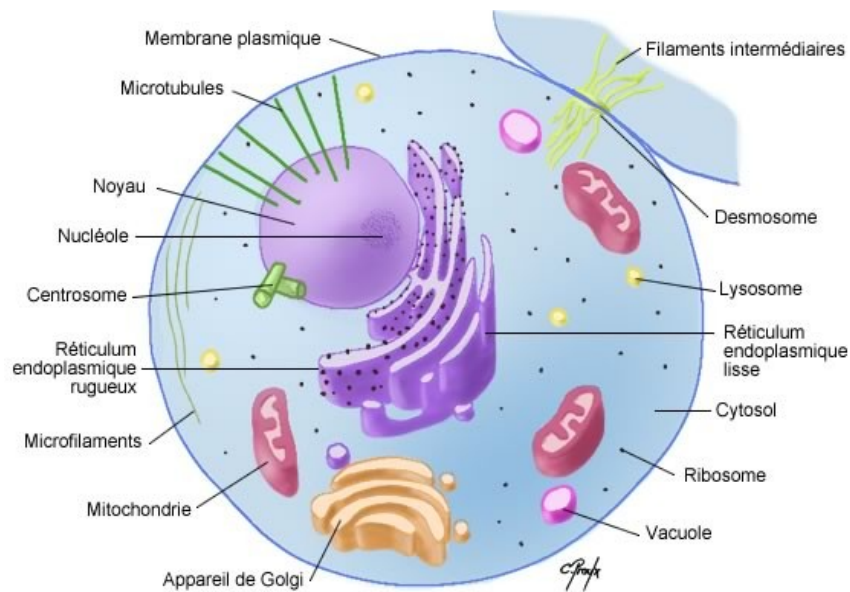


Figure 1 Représentation schématique de la structure générale d'une cellule eucaryote avec la localisation de différents organites (dessin de Chantal Proulx)

La biologie cellulaire a bénéficié de progrès techniques et analytiques qui lui ont permis d'explorer et de mieux comprendre les mécanismes de fonctionnements des cellules tel que la division cellulaire ^[5] ou le trafic membranaire. ^[6] ^[7] De plus, de nouvelles disciplines ont pris leur essor afin de permettre à la biologie cellulaire de répondre à des questions à l'échelle moléculaire. Parmi ces dernières on peut citer la biologie moléculaire, ^[8] la génétique ^[9] et la biochimie. ^[10] Cependant, toutes ces disciplines n'auraient pas pu prendre une telle ampleur dans le domaine de la recherche sans l'évolution du microscope.

b. Historique et évolution de la microscopie

Bien qu'il soit difficile de dater la naissance du microscope, l'une de ses premières utilisations date de 1615 lorsque Galilée utilise un instrument à deux lentilles pour la caractérisation de petits objets. Cependant, à l'époque ces instruments ne sont pas suffisamment fiables. Par la suite, les travaux de Robert Hooke et Anton Van Leeuwenhoek ont contribué à la naissance du microscope optique et de la biologie cellulaire. Anton Van Leeuwenhoek, commerçant et scientifique néerlandais a mis au point un microscope (Figure 2) qui lui a permis de distinguer la qualité des étoffes. Ce système lui donna l'occasion de s'intéresser à l'observation de nombreuses structures. Il a pu mettre en évidence les cellules qui ont été observées une première fois par Hooke lors de l'étude d'algues. ^[11] On peut également lui attribuer la caractérisation de la première bactérie par un microscope optique. ^[12] ^[13]



Figure 2 Photographie du microscope conçu et utilisé par Anton Van Leeuwenhoek (Photo de Jeroen Rouwkema)

Depuis l'instrumentation microscopique s'est considérablement développée devenant par la même occasion l'outil le plus approprié et le plus efficace pour l'observation des cellules. On peut distinguer trois catégories de microscopes :

- Les microscopes optiques permettant d'observer un objet de petite dimension. L'observation se fait à travers des lentilles qui permettent d'ajuster le grossissement et l'illumination de l'échantillon. Les paramètres d'observation (éclairage, polarisation de la lumière, filtre etc) de ce type de microscopes sont ajustables et permettent une modularité à l'appareil. ^[14]
- Les microscopes électroniques se basent sur l'irradiation de l'échantillon par un faisceau d'électrons. Ces derniers vont permettre de reconstruire une image agrandie de l'échantillon. ^[15]
- Les microscopes à sondes locales, sont plus récents que les deux premiers cités. Ce type d'appareil consiste en l'application d'une pointe très fine qui permet de mesurer des grandeurs physiques allant jusqu'à la détection des atomes (ce qui est impossible avec les microscopes cités ci-dessus). Cette sensibilité couplée à la possibilité de déplacer la pointe sur une surface permet d'accéder à des topographies de l'échantillon. ^{[16] [17]}

Nous nous intéresserons plus particulièrement à la première catégorie de microscopes : la microscopie optique également appelée microscopie photonique. Cette technique se base sur l'illumination de l'échantillon par un rayonnement électromagnétique du spectre visible. Cette technique a connu de nombreux changements dont les plus importants sont intervenus au 20^{ème} siècle. Parmi ces derniers on peut citer l'exploitation des phénomènes de contraste de phase et de la fluorescence.

La microscopie de contraste de phase permet de différencier des échantillons parfaitement transparents qui ne sont identifiables que par de très faibles variations d'épaisseurs ou d'indice de réfraction (Figure 3).

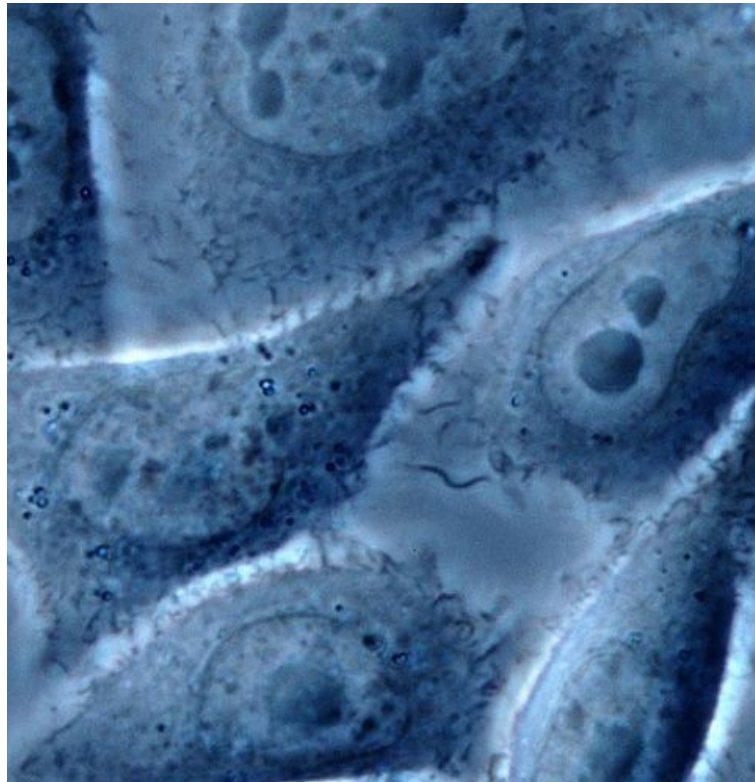


Figure 3 Photographie de cellules par microscopie de contraste de phase. Observation de différents compartiments cellulaires par variation du contraste de l'image due à la variation de l'indice de réfraction du milieu. Il est possible de distinguer le cytoplasme de la cellule, le noyau au centre de chacune de ces dernières ainsi que les nucléoles caractérisés par des tâches plus sombres (© Exothermic, CC by-ncsa 2.0)

La microscopie de fluorescence se base sur la détection de la fluorescence issue de l'échantillon. Cet échantillon peut émettre de la fluorescence par l'intermédiaire d'un groupement chimique fluorescent présent au sein de sa structure ou par l'intermédiaire d'un marquage qui permet l'introduction d'un groupement fluorescent. Dans le premier cas on parle de fluorescence primaire et de fluorescence secondaire dans le second cas. L'étude de la fluorescence secondaire est très importante dans l'observation d'échantillons qu'ils soient vivants ou fixés, car elle permet d'obtenir des images avec un très bon contraste et de différencier l'objet ou la structure d'intérêt par rapport à son environnement.

Nous allons détailler le fonctionnement de ce type de microscope et montrer par la même occasion sa polyvalence en imagerie. Dans le principe, l'observation de la fluorescence se fait de la manière suivante (Figure 4) :

- émission d'un rayonnement dans le spectre du visible par une source lumineuse. Ce spectre est composé de différentes longueurs d'ondes. Il passe dans un filtre d'émission qui permet de sélectionner la longueur d'onde excitatrice de l'échantillon.
- passage de ce rayonnement dans un jeu de miroirs dichroïques qui va permettre d'éliminer les longueurs d'onde résiduelles qui n'ont pas pu être éliminées par le filtre d'excitation.
- L'échantillon est illuminé par la longueur d'onde excitatrice et va émettre de la fluorescence par l'intermédiaire d'un fluorochrome. Cette émission lumineuse va alors être collectée à

travers l'objectif et passer à travers un filtre d'émission qui sera transparent à la longueur d'onde que l'on veut étudier.

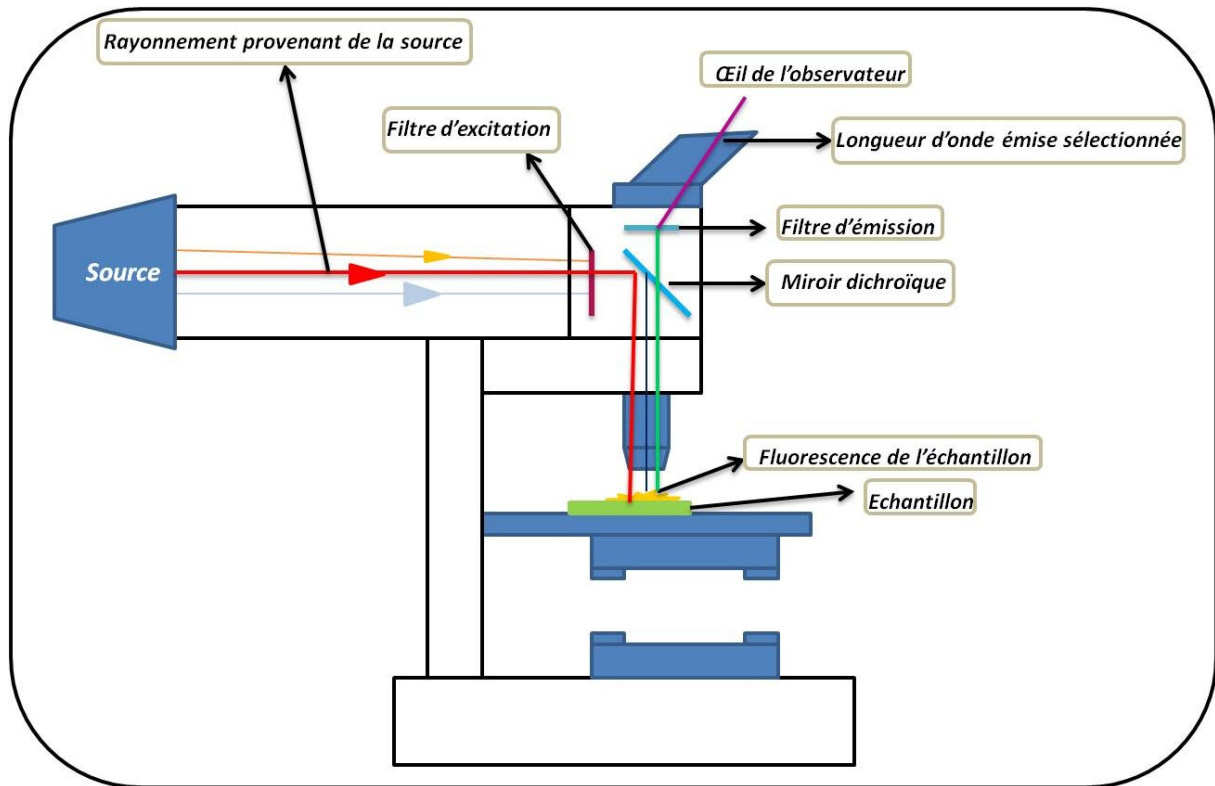


Figure 4 Représentation schématique du fonctionnement d'un microscope de fluorescence

Il est possible d'observer par microscopie de fluorescence un échantillon contenant au maximum quatre marqueurs différents. Ces derniers sont observables par superposition des différentes images. La microscopie de fluorescence possède de nombreux avantages dans le cadre de l'observation d'échantillons biologiques, il est possible par exemple de localiser des structures à l'échelle subcellulaire (Figure 5), ou d'étudier des interactions moléculaires au sein de la cellule.

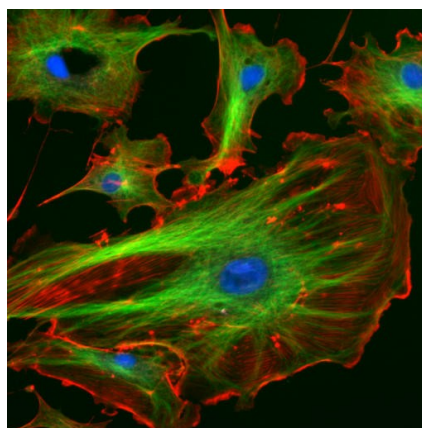


Figure 5 Image de cellules par microscopie de fluorescence. Marquage des trois structures de cellules endothéliales : les noyaux sont marqués par du DAPI en bleu, les filaments d'actine sont marqués par de la phalloïdine en rouge, les microtubules sont marqués par un anticorps anti α -Tubuline en vert (source : base de données ouverte au public d'image J : <http://rsb.info.nih.gov/ij/images/>)

Il est désormais possible d'observer de nombreuses structures par l'intermédiaire de marquages. L'un des marquages qui nous intéresse plus particulièrement est le marquage des anticorps également appelé immuno-marquage. Ce dernier va nous permettre de cibler spécifiquement un élément de la cellule qui est connu et dont nous pourrions vérifier la localisation et la quantité présente par une analyse couramment utilisée en biologie.

II. Immuno-marquage : principe et moyens mis œuvre

a. Notions de base sur les anticorps

L'immunocytologie est une branche récente de la cytologie. Elle permet une localisation très précise des macromolécules à l'échelle de la cellule. Cette méthode implique l'utilisation d'un anticorps couplé à un marqueur permettant la visualisation de l'objet dans la cellule.

Un anticorps ^[18] (figure 6) est une glycoprotéine de la famille des immunoglobulines qui est utilisée par le système immunitaire pour reconnaître et éliminer un corps étranger (virus ou bactérie) dans le corps humain. Les anticorps ciblent un épitope d'une catégorie de biomolécules qui est appelé antigène.

La structure en forme de " Y " des anticorps est décrite pour la première fois en 1959 par Rodney Robert Porter ^[19] lorsque ce dernier montre qu'une enzyme est capable de couper un anticorps provenant d'un lapin en trois parties. Ces trois parties représentent la structure globale d'un anticorps. Dans le même temps, Gerald Edelman met en évidence que les anticorps humains sont composés de chaînes polypeptidiques multiples liées entre elles par des ponts disulfures. Ces deux scientifiques reçurent le prix Nobel de physiologie et de médecine en 1972. ^[20]

Cette protéine se compose de 4 chaînes polypeptidiques, deux chaînes lourdes notées *H* et deux chaînes légères notées *L*. Les chaînes lourdes et légères sont reliées entre elles par un nombre variable de ponts disulfures. La structure d'un anticorps est également composée de deux domaines. Un domaine constant (noté C sur la figure 6) composé de séquences d'acides aminés et qui n'est pas impliqué dans la reconnaissance de l'antigène. Un domaine variable (noté V sur la figure 6) qui se divise en quatre parties et situé à l'extrémité des "bras".

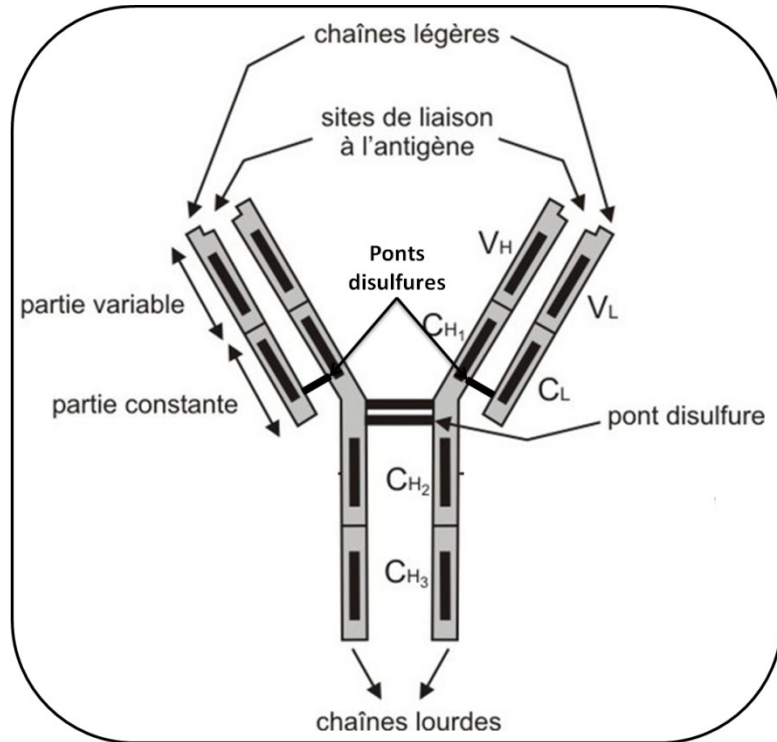


Figure 6 Représentation des différentes parties d'un anticorps (source : passeport.univ-Lille1.fr)

C'est à l'extrémité de ce domaine variable que se situent les parties permettant la reconnaissance des antigènes. L'anticorps identifiera l'antigène grâce à la complémentarité entre une partie de l'anticorps et une partie de l'antigène : l'épitope. Ce dernier est un motif moléculaire également appelé déterminant antigénique qui est reconnu par un motif moléculaire de l'anticorps et est appelé paratope. (Figure 7).

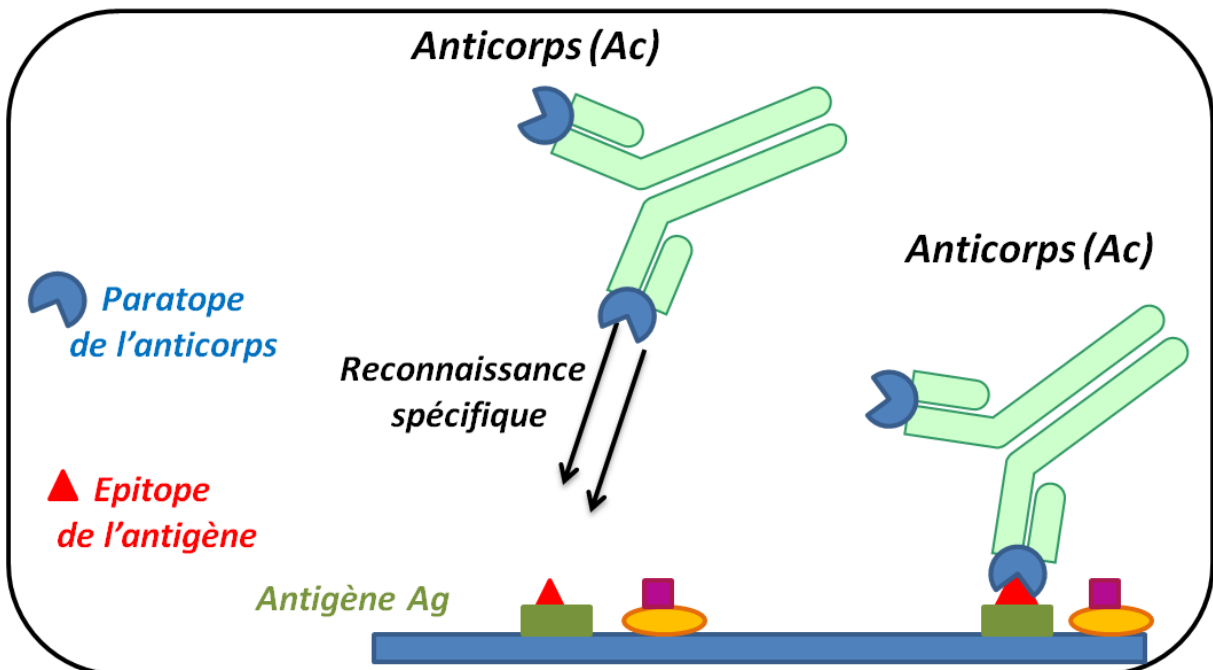


Figure 7 Représentation schématique de la reconnaissance anticorps/antigène

Une autre notion importante est à connaître, elle concerne la spécificité des anticorps à reconnaître les épitopes d'un antigène. Chaque anticorps est synthétisé par une population cellulaire issue d'un seul lymphocyte nommé clone. La synthèse d'anticorps dirigés contre un antigène à épitopes multiples conduit à la formation de différents anticorps dirigés chacun contre les différents épitopes de l'antigène. Ce mélange d'anticorps est appelé polyclonal. Lorsque tous les anticorps sont issus d'un même lymphocyte, on parle d'anticorps monoclonal.

Les anticorps monoclonaux sont obtenus par la technique des hybridomes. Elle a été mise au point par César Milstein et Georges Köhler en 1975. ^[21] Cette technique consiste à fusionner des lymphocytes B immunologiquement actifs vis-à-vis d'un antigène et des cellules tumorales aptes à se multiplier indéfiniment. Les hybridomes sont donc des machines à produire une catégorie d'anticorps unique. Cette technique a été conçue à l'origine pour obtenir des informations sur la synthèse des anticorps et sa régulation. La production d'hybridomes est rapidement devenue une méthode biotechnologique de base pour produire des anticorps monoclonaux. La spécificité de reconnaissance des anticorps combinée à la microscopie de fluorescence permet d'obtenir des images représentant la localisation de certaines molécules d'intérêt dans les cellules, ce type de marquage est appelé immuno-marquage.

b. L'immuno-marquage

Nous avons défini la notion de spécificité anticorps-antigènes, dans cette partie, nous allons présenter l'immuno-marquage. Nous traiterons du principe du marquage et nous décrivons la notion d'immuno-marquage indirect qui sert de base aux expériences menées dans ce chapitre.

Historiquement cette technique est issue des travaux menés par Coons ^[22] et Kaplan. ^[23] L'immunofluorescence est une technique d'imagerie des cellules qui se base sur la reconnaissance spécifique anticorps-antigène et la microscopie de fluorescence. Elle utilise des anticorps couplés à des fluorochromes.

Il existe deux types d'immuno-marquage, l'un est dit direct et l'autre indirect. Dans un premier temps nous décrivons le principe du marquage direct afin de montrer la spécificité et l'utilité de ce dernier en biologie.

Immuno-marquage direct (Figure 8) :

Ce marquage consiste à mettre en contact un anticorps avec un motif moléculaire de l'antigène (épitope). Cet anticorps peut être marqué par des colloïdes ^[24] (colloïde d'or) ou par un ou plusieurs fluorochromes. La figure 8 représente le fonctionnement du marquage direct, l'antigène cible est représenté par un triangle **Rouge**. Sous irradiation UV, le fluorochrome va émettre un photon et permettre la visualisation du composé qui a été marqué. Le rectangle vert et l'ovale jaune représentent d'autres antigènes pour lequel l'anticorps n'est pas spécifique.

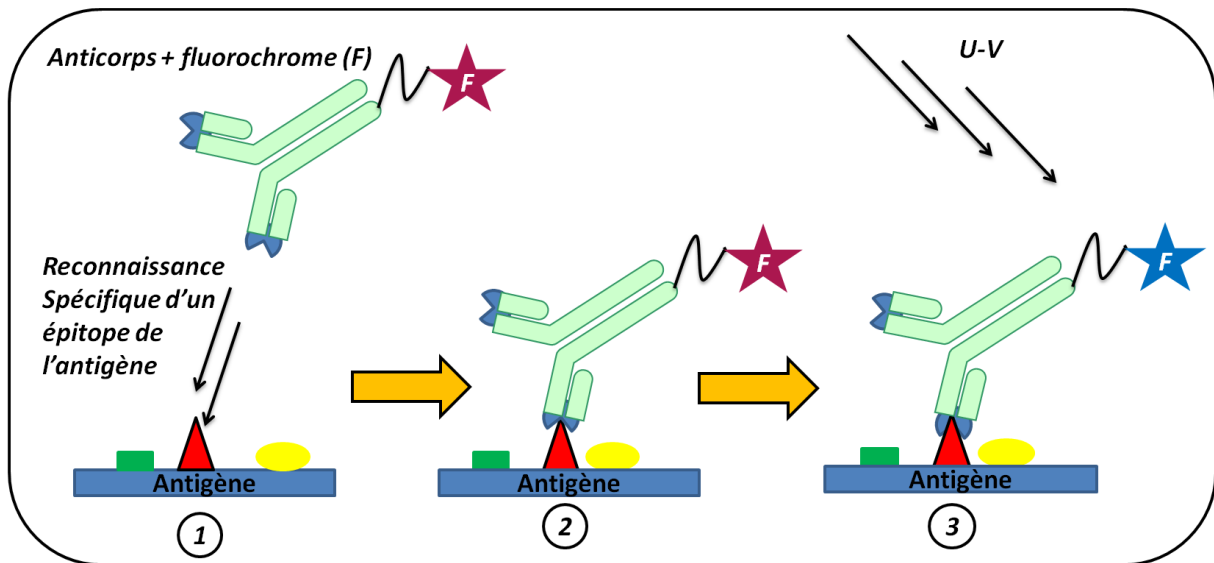


Figure 8 Représentation schématique d'un immuno-marquage direct 1) reconnaissance spécifique d'un épitope de l'antigène 2) marquage grâce à cette reconnaissance 3) visualisation par microscopie de fluorescence de l'émission de fluorescence du fluorophore

Immuno-marquage indirect (Figure 9) :

L'immuno-marquage indirect est une technique dérivée de la méthode directe, elle se base sur un "double" marquage faisant intervenir deux anticorps. Dans un premier temps un anticorps primaire non marqué par un fluorochrome, reconnaît l'épithète (motif moléculaire) de l'organite à marquer. Suite à cette première étape, un anticorps secondaire, marqué par un fluorochrome, va reconnaître l'anticorps primaire. Cette reconnaissance est caractérisée par une interaction entre les paratopes de l'anticorps secondaire et les épithètes de l'anticorps primaire. L'ensemble final est donc un édifice issu de la reconnaissance spécifique entre la cible et l'anticorps primaire d'une part et d'autre part par la reconnaissance entre l'anticorps primaire et secondaire. Cet ensemble est alors observé en immunofluorescence.

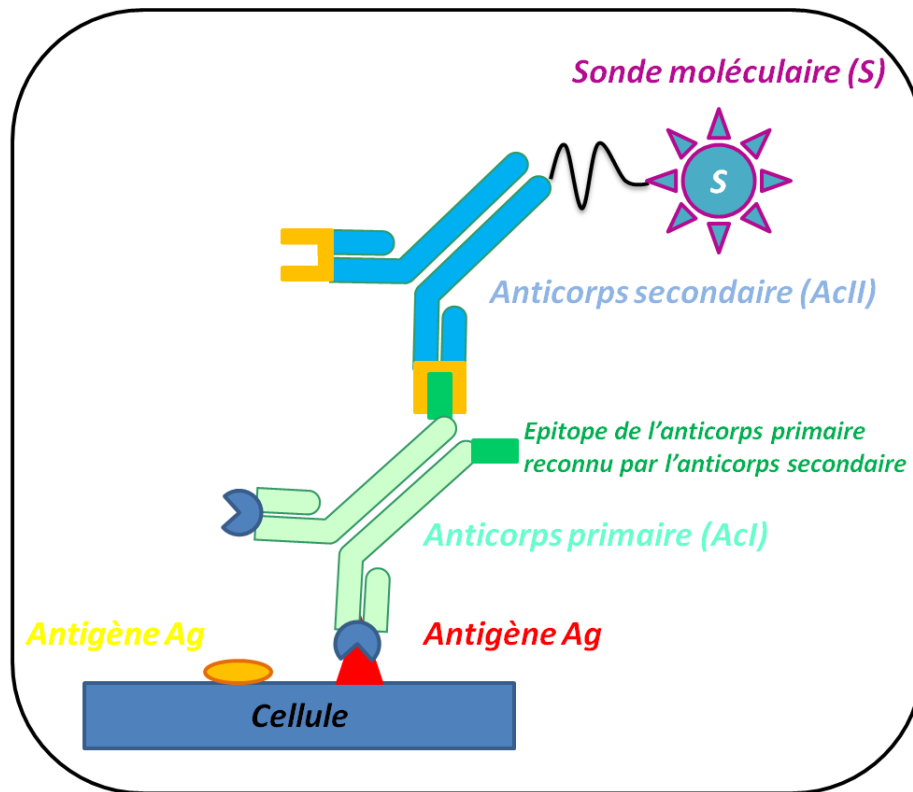


Figure 9 Représentation schématique de l'immuno-marquage indirect

La spécificité de reconnaissance d'un anticorps secondaire vis à vis d'un anticorps primaire est due à sa capacité à reconnaître un motif moléculaire de l'anticorps primaire. En fonction de l'espèce animale dont provient l'anticorps primaire, la partie constante de ce dernier (dont la description a été présentée dans la partie II. a.) sera utilisé pour la préparation d'anticorps secondaires qui reconnaîtront ce motif de l'anticorps primaire provenant de cette espèce. Afin d'illustrer ceci, nous allons présenter les anticorps que nous allons utiliser dans le cadre du projet. Les anticorps primaires utilisés sont produits par des lapins, ces anticorps contiennent dans la partie constante de leurs structures un motif qui leur est caractéristique. Ce motif sera utilisé afin de produire des anticorps secondaires qui reconnaîtront l'anticorps primaire produit chez le lapin. Les anticorps secondaires ainsi obtenus reconnaîtront donc tous les anticorps issus du lapin (Figure 10).

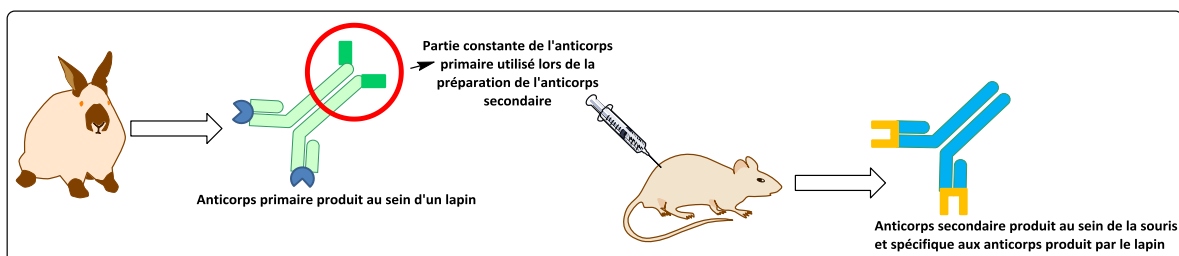


Figure 10 Représentation schématique de la synthèse d'anticorps secondaires spécifique à une espèce donnée : dans un premier temps un anticorps primaire est produit par un lapin, la partie constante de l'anticorps primaire (cercle rouge) est alors utilisée pour produire un anticorps secondaire spécifique à l'anticorps primaire.

Ce type de marquage est très utilisé dans le cadre d'étude de la localisation de différentes protéines au sein d'une même cellule. De plus l'utilisation en simultané d'anticorps distincts permet d'étudier d'éventuelles interrelations entre des structures. ^[25]

III. Présentation du marquage lié au projet

a. Choix de la cible de marquage : le nucléole

Pour pouvoir imager un organe caractéristique de la cellule par spectroscopie Raman et spectrométrie NanoSIMS, il est nécessaire de définir une cible ou un élément à observer. Cet élément devra être reconnaissable sans ambiguïté parmi les différents organites composant la cellule et sa visualisation par microscopie optique devra permettre une comparaison entre les techniques standards et les techniques complémentaires employées dans le cadre de ces travaux de thèse.

L'organe le plus visible d'une cellule et dont les fonctions sont nécessaires au fonctionnement d'une cellule est le noyau. Cet organe cellulaire visible par microscopie possède de nombreux sous compartiments qui peuvent être intéressants à imager dans le cadre de ce projet d'imagerie.

Le noyau (Figure 11) possède un rôle central dans la vie d'une cellule. En effet ce dernier contient toutes les informations nécessaires à la vie de la cellule et participe au contrôle des réactions chimiques du cytoplasme. Il est le plus grand des organites avec un diamètre allant de 5 à 7 μm . Le noyau est séparé du reste de la cellule par une enveloppe nucléaire qui permet de contrôler les échanges entre ce dernier et le cytoplasme. Ces échanges sont assurés par les pores qui composent cette membrane. A l'intérieur de cette membrane se trouve l'ADN (acide désoxyribonucléique), molécule présente dans toutes les cellules, contenant l'ensemble des informations nécessaires au développement et au fonctionnement de l'organisme. A l'intérieur du noyau l'ADN se trouve sous forme de chromatine. Le noyau est également composé de sous compartiments dont le rôle est la transcription des acides ribonucléiques ribosomiques (ARNr) : les nucléoles. ^{[26] [27] [28]}

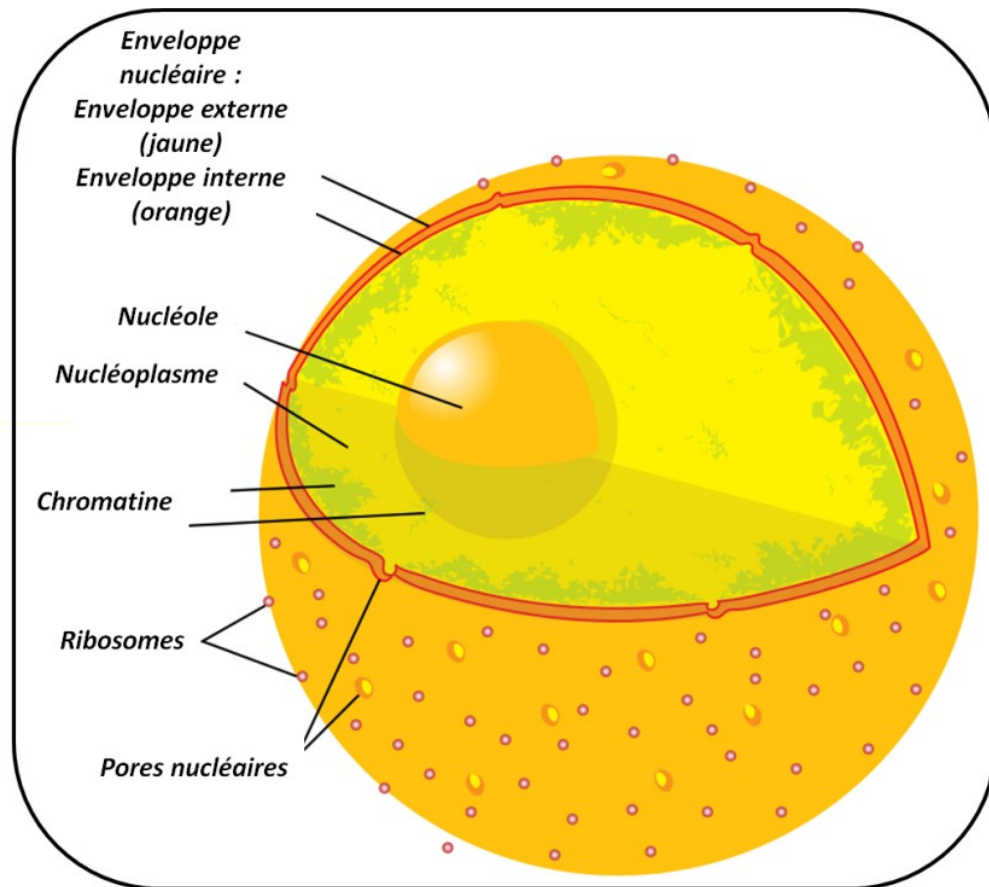


Figure 11 Représentation schématique du noyau de la cellule (dessin de Mariana Ruiz Villarea)

Le nucléole est une structure nucléaire connue depuis les années 1960 comme étant le centre de synthèse des acides ribonucléiques ribosomiques (ARNr). Ces molécules biologiques sont les constituants, avec les protéines ribosomiques, des ribosomes. Ces derniers servent à la traduction des ARN messagers (ARNm) en protéines (Figure 12). Le nucléole est un organite qui est composé de protéines, et majoritairement d'ADN et d'ARN. L'ADN et l'ARN sont des biomolécules très riches en éléments phosphorés par rapport à l'ensemble de la cellule par conséquent, le nucléole est l'organite le plus riche en cet élément de la cellule.

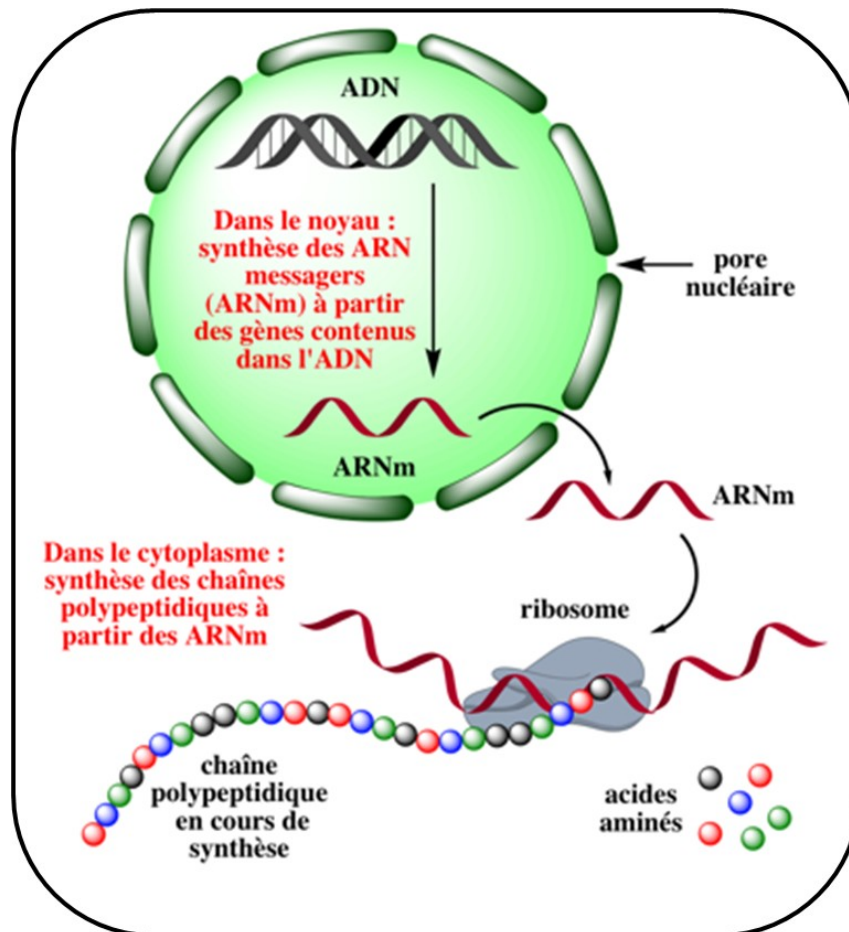


Figure 12 Représentation schématique de la synthèse des protéines : maturation de l'ARN pré messager dans le noyau qui deviendra de l'ARN messager (ARNm), exportation de l'ARN messager à l'extérieur du noyau par les pores nucléaires, traduction de l'ARNm en protéine

La cible de marquage définie dans le cadre de ces travaux de thèse est le nucléole. Cet organe est présent en plusieurs exemplaires au sein du noyau et est facilement localisable dans le noyau. Les techniques que nous souhaitons utiliser nécessitent une préparation spécifique des échantillons, qui rendra possible l'observation du noyau de la cellule et par extension les nucléoles avant toute analyse. De cette façon, nous augmentons nos chances de réussite d'observation de l'organe cible.

La visualisation du nucléole se fera par le marquage d'une molécule de la famille des phosphoprotéines, majoritairement localisée dans le nucléole : la nucléophosmine (NPM).^{[29] [30] [31]}

^[32] La NPM ou Numatrin est impliquée dans la synthèse des ribosomes, la duplication des centrosomes^[33] et la réparation de l'ADN. La NPM se localise majoritairement au niveau des nucléoles, cependant, une partie de la NPM transite en permanence entre le noyau et les centrosomes.^{[34] [35]}

Les nucléoles seront mis en évidence grâce à un immuno-marquage indirect de la NPM. Le marquage se passe en deux étapes distinctes : dans un premier temps, un anticorps produit par une souris va reconnaître spécifiquement la nucléophosmine. Par la suite cet anticorps primaire est reconnu par un anticorps secondaire "anti-souris" produit chez le lapin et marqué par la sonde moléculaire visible par spectroscopie Raman et imagerie NanoSIMS.

b. Marquage de l'anticorps secondaire

Les voies de marquage des anticorps sont nombreuses. On peut par exemple remplacer un atome naturellement présent dans la structure de l'anticorps par un isotope tel que le phosphore 32 ou le tritium. ^[36] Il est également possible d'adjoindre à l'anticorps une molécule comportant un fluorochrome ou un radio-isotope. ^[37] Nous nous intéresserons plus particulièrement à l'accroche d'une sonde moléculaire à la surface de l'anticorps.

Nous présenterons plus en détail les sondes moléculaires que nous avons préparées dans le cadre de ce marquage dans le chapitre 2. Ces dernières comportent une fonction ester de succinimide, groupement fonctionnel réactif qui va pouvoir se fixer de manière covalente sur les anticorps. Les sondes réagiront avec l'anticorps secondaire par l'intermédiaire des fonctions amines primaires qui se trouvent sur ce dernier (Figure 13).

Il est à noter que les sondes préparées sont de petites tailles et l'anticorps secondaire possède plusieurs fonctions amines. Ceci permettra de potentiellement augmenter l'intensité du signal de l'espèce que nous souhaitons visualiser par spectroscopie Raman et par NanoSIMS.

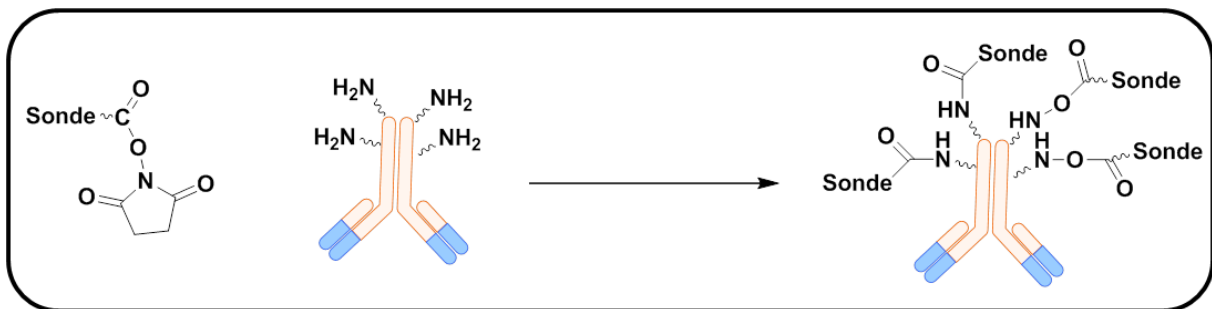


Figure 13 Représentation schématique du marquage des anticorps secondaires par les sondes moléculaires synthétisées

Dans le cadre du projet, l'anticorps secondaire choisi est un anticorps issu du lapin qui est spécifique à un anticorps de souris anti nucléophosmine.

c. Application de l'immuno-marquage indirect dans le cadre du projet

Les cellules utilisées dans le cadre de cet immuno-marquage sont de type U2OS issues d'un ostéosarcome humain. Ces cellules possèdent des gros noyaux permettant ainsi de repérer plus facilement les nucléoles par microscopie.

Comme nous l'avons précisé précédemment nous utiliserons un immuno-marquage indirect pour marquer le nucléole. Cependant à la différence des immuno-marquage "classiques", nous introduirons à la surface de l'anticorps secondaire une sonde moléculaire qui nous permettra de visualiser le nucléole. La figure 14 résume les trois étapes clés du marquage.

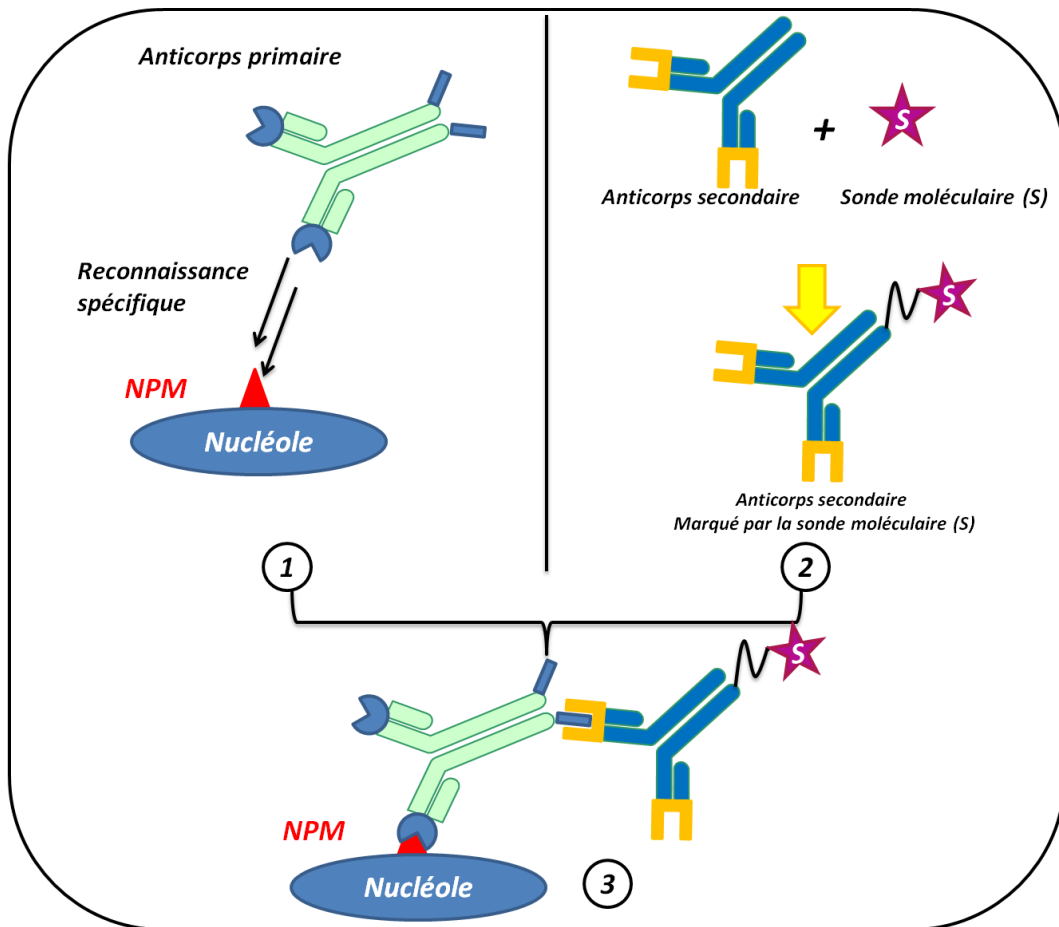


Figure 14 Représentation schématique d'un immuno-marquage indirect adaptée au projet en imagerie Raman et NanoSIMS, 1) marquage de la cellule par l'anticorps primaire ; 2) marquage de l'anticorps secondaire par la sonde moléculaire ; 3) Marquage de l'anticorps primaire par l'anticorps secondaire préparé

Nous avons présenté ci dessus la méthode de marquage, cependant il faut nous assurer que la sonde n'empêche pas l'anticorps secondaire de reconnaître l'anticorps primaire.

d. Immunofluorescence appliquée au marquage des anticorps : résultats de l'expérience de contrôle

i. Présentation de l'expérience

Afin de pouvoir observer les sondes moléculaires par l'intermédiaire de la spectroscopie Raman et l'imagerie NanoSIMS il faut vérifier que l'introduction des sondes ne perturbent pas la reconnaissance de l'anticorps primaire par l'anticorps secondaire. Nous pouvons en effet imaginer que le marquage de l'anticorps secondaire par une sonde moléculaire puisse affecter les sites permettant la reconnaissance entre les deux anticorps en plus des sites d'accroche envisagés. Sans la reconnaissance spécifique entre les deux anticorps, il ne sera pas possible d'imager le nucléole et par conséquent la méthode ne serait pas applicable et exploitable.

Pour vérifier que la capacité de reconnaissance de l'anticorps secondaire n'est pas affectée, nous allons procéder à une expérience de contrôle se basant sur un immuno-marquage faisant intervenir un troisième anticorps pouvant reconnaître l'anticorps secondaire introduit (Figure 15).

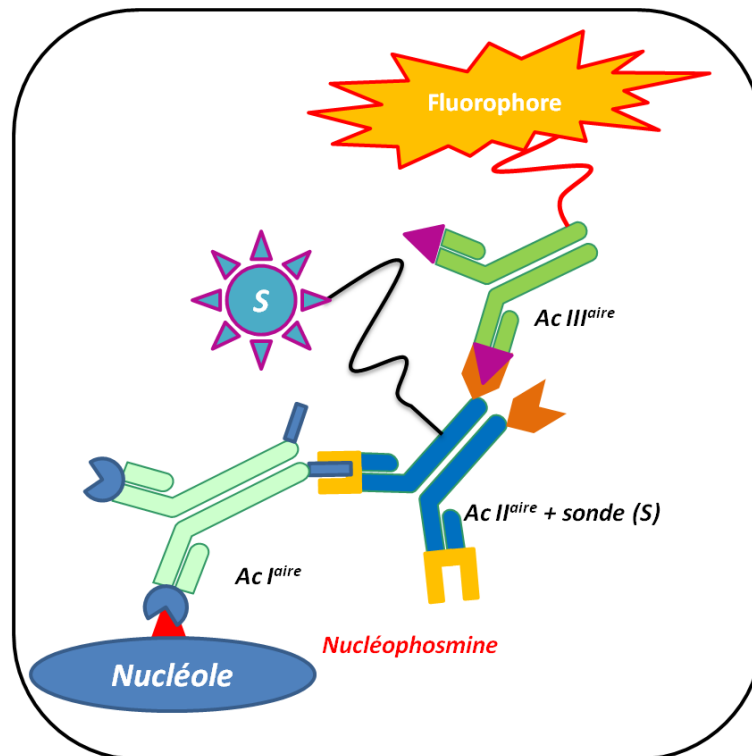


Figure 15 Représentation schématique de la visualisation du marquage par l'intermédiaire d'un anticorps tertiaire

L'anticorps tertiaire utilisé dans le cadre de ce marquage est spécifique de l'anticorps secondaire et est produit chez la chèvre. Lors de cette expérience, l'absence ou l'altération du signal fluorescent peut provenir de différentes interactions envisageables :

- Interaction entre la sonde et l'anticorps primaire et/ou l'anticorps secondaire empêchant la reconnaissance entre l'anticorps primaire et l'anticorps secondaire.
- Interaction entre la sonde moléculaire et l'anticorps secondaire et /ou l'anticorps tertiaire altérant le mécanisme de reconnaissance entre l'anticorps secondaire et tertiaire.
- Interaction entre la sonde et le fluorochrome de l'anticorps tertiaire induisant une extinction ou une modification des propriétés spectrales du fluorophore.

De part les connexions possibles entre chaque élément, le système employé est défini comme un système complet multi-corps.

Lors de ces vérifications, nous avons testé trois catégories de sondes différentes (figure 16) : une sonde spécifiquement dédiée à la spectroscopie Raman comportant une triple liaison alcyne, une sonde spécifique à la NanoSIMS comportant un groupement halogéné, et une sonde moléculaire bimodale regroupant un groupement halogéné et un groupement alcyne dans la même structure. Lors de la visualisation des sondes, deux concentrations de sondes en solution dans le DMSO ont été étudiées : 5mg /mL et 10 mg/mL. Ces deux concentrations ont été choisies afin de montrer que l'augmentation de la concentration de sondes moléculaires n'a pas d'influence dans le mécanisme de reconnaissance entre les anticorps.

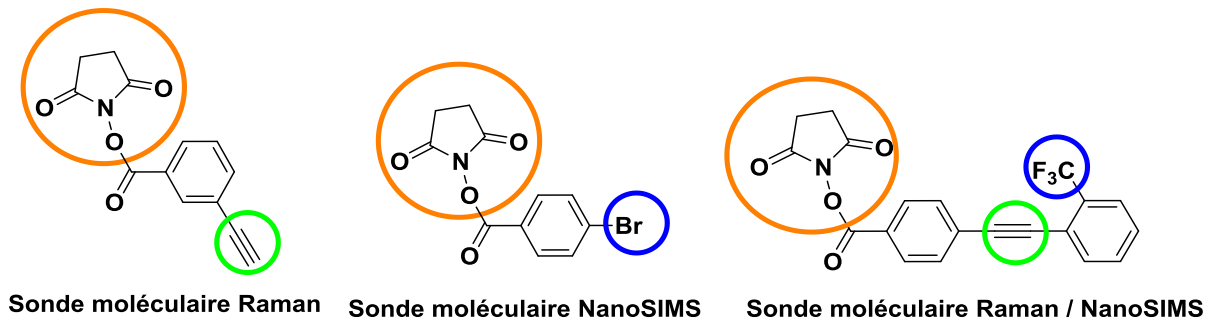


Figure 16 Schéma des molécules utilisées pour la vérification en immunofluorescence

Comme indiqué précédemment, le "sur-marquage" de l'anticorps secondaire peut nuire à sa capacité de reconnaissance de l'anticorps primaire. Les expériences suivantes permettent de nous assurer que les sondes n'ont pas d'influence sur les anticorps que nous avons choisis (Figure 17).

Lorsque les trois anticorps nécessaires sont présents dans la cellule, il est possible de visualiser les nucléoles de la cellule : le contrôle sera dit "positif" (Figure 17a). Lorsque le marquage ne met en présence que les anticorps primaires et tertiaires, les nucléoles ne seront pas visibles et le contrôle sera dit négatif (Figure 17b).

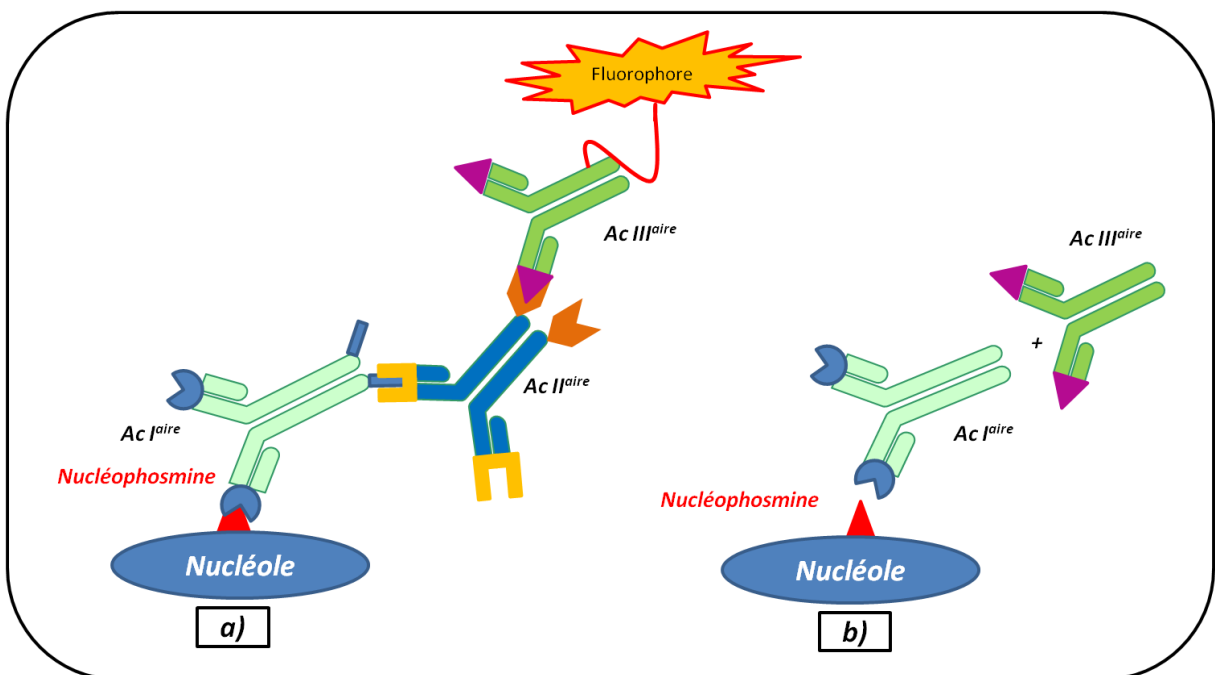


Figure 17 Représentation schématique des deux expériences qui ont permis d'obtenir les images contrôle : a) visualisation des nucléoles par via l'anticorps secondaire et l'anticorps tertiaire (contrôle positif) b) Utilisation d'un anticorps tertiaire sans la présence de l'anticorps secondaire (contrôle négatif)

ii. Présentation des résultats obtenus par immunofluorescence

Nous avons obtenus les images en immunofluorescence correspondant au marquage des anticorps secondaires par les sondes moléculaires présentées précédemment. L'absence d'interférence de la sonde sur le marquage sera validée si les nucléoles sont visibles par cette

immunofluorescence. Dans le cas contraire, nous ne pourrions pas observer le nucléole indiquant que la sonde utilisée interfère avec la reconnaissance de l'anticorps primaire par l'anticorps secondaire.

Pour procéder à cette expérience, les cellules ont été marquées de manière successive par les différents anticorps. Dans un premier temps, les cellules de type U2OS ont été marquées par anticorps primaire spécifique à la nucléophosmine durant une nuit à 4°C et dans l'obscurité. Dans un second temps, l'anticorps secondaire est préalablement incubé en présence d'une sonde moléculaire choisie. Suite à cela les cellules marquées par l'anticorps primaire sont incubées en présence de l'anticorps secondaire durant une heure à température ambiante. La dernière étape de préparation consiste à introduire l'anticorps tertiaire dans le système, cette étape est effectuée par incubation à température ambiante et dans l'obscurité.

La figure 18 regroupe les résultats obtenus en fonction des sondes moléculaires étudiées. Pour chaque cas une image du noyau est obtenue par marquage au DAPI (Figure 18, colonne DAPI), les nucléoles sont quant à eux éventuellement visibles via le chromophore présent sur l'anticorps tertiaire et sont caractérisés par des "tâches vertes" sur l'image (figure 18 colonne GFP). La troisième colonne représente la superposition entre le marquage au DAPI et le marquage du nucléole permettant de mettre en évidence la localisation des nucléoles dans le noyau.

Le premier cas envisagé concerne une sonde dédiée à la spectroscopie Raman. Les concentrations de sonde utilisées lors des expériences de marquage sont les suivantes : 5mg/mL (0,021 mol/L, figure 18c) et 10 mg/mL (0,041 mol/L, figure 18d). Dans un premier temps nous avons observé l'influence du marquage de l'anticorps secondaire par la sonde Raman à 5mg/mL (0,021 mol/L, figure 18c). Nous pouvons observer le noyau de la cellule par l'intermédiaire du marquage au DAPI (1ère colonne Figure 18c), la seconde colonne représente quant à elle la visualisation des nucléoles par l'intermédiaire du fluorochrome de l'anticorps tertiaire. Cette image prouve que la reconnaissance de l'anticorps primaire par le secondaire n'est pas perturbée en présence de la sonde moléculaire à 5mg/mL (0,021 mol/L). Nous avons ensuite procédé à la même expérience en présence de la même sonde moléculaire mais avec une concentration plus élevée : 10 mg/mL (0,041 mol/L, figure 18d). Les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus précédemment, il est dans ce cas également possible de visualiser distinctement les nucléoles par l'intermédiaire de l'anticorps tertiaire. Nous pouvons même constater une augmentation de l'intensité du signal fluorescent collecté. Le marquage de l'anticorps secondaire par cette première famille de sonde n'altère pas de manière significative la capacité de reconnaissance de l'anticorps primaire par l'anticorps secondaire.

Nous avons ensuite vérifié l'influence éventuelle d'une sonde dédiée à l'imagerie NanoSIMS. Comme pour la famille précédente, l'étude de l'influence sur le marquage a été effectuée à 5mg/mL et 10 mg/mL (ou respectivement 0,017 et 0,034 mol/L). Dans le premier cas (5mg/mL ou 0,017 mol/L figure 18e), nous pouvons observer les nucléoles du noyau comme lors de l'immuno-marquage contrôle (figure 18a). De même, une concentration en sonde moléculaire de 10 mg/mL (0,034mol/L, figure 18f) a été testée et nous a permis d'observer les nucléoles. Cependant nous pouvons constater une légère baisse de l'intensité du signal de fluorescence ceci peut être due à une interaction de la part de la sonde sur le système à trois anticorps utilisé. Ces observations montrent que dans ces conditions expérimentales également, la sonde moléculaire n'interfère pas de manière notable dans la reconnaissance entre les anticorps.

Nous avons finalement testé une dernière catégorie de sonde comportant une triple liaison et un groupement halogéné (Figure 18 g et h). Lors de cette étude, nous avons dans un premier temps analysé l'influence du composé après marquage de l'anticorps secondaire à l'aide d'une solution à 5mg/mL (ou 0,013mol/L). Dans ce cas, il est possible de distinguer les nucléoles dans le noyau représenté par les zones vertes de l'image d'immunofluorescence (Figure 18g). Cette première analyse nous a permis de montrer que la capacité de reconnaissance des anticorps n'est pas perturbée par l'introduction de la sonde bimodale. Par la suite la concentration de la sonde fut augmentée à 10mg/mL (0,026mol/L), la même analyse a été effectuée et a permis dans ces conditions également de mettre en évidence l'absence d'interférence de la sonde moléculaire sur l'anticorps secondaire (Figure 18h). L'image obtenue dans ce cas nous indique la présence et la position des nucléoles de manière plus distincte que lors de l'utilisation de cette même sonde à une concentration de 5 mg/mL.

Dans notre cas, il est possible d'observer le nucléole quelque soit la catégorie de sondes utilisées et quelque soit la concentration de sonde en solution dans le DMSO employée. Cette expérience permet de prouver que les sondes moléculaires que nous souhaitons utiliser n'interfèrent pas avec la capacité de reconnaissance des anticorps. De plus, il est important de noter qu'il existe des différences dans la visualisation des nucléoles en fonctions des sondes moléculaires utilisées et des concentrations appliquées sur l'ensemble de la culture cellulaire.

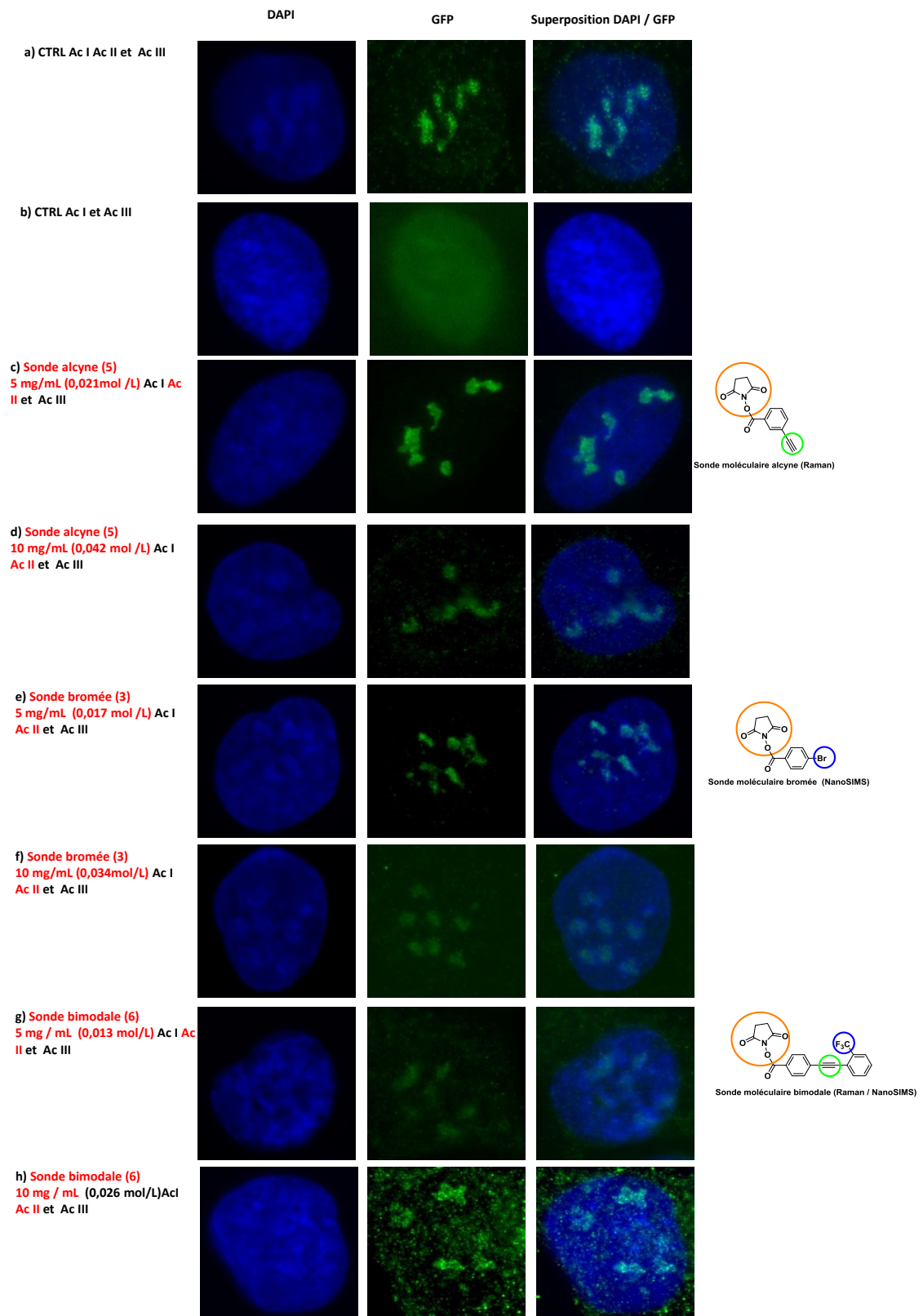


Figure 18 Image obtenues par immunofluorescence, vérification de l'absence d'interférence des sondes lors du marquage de l'anticorps primaire par l'anticorps secondaire

Conclusions

Ce premier chapitre nous a permis d'introduire l'organite que nous souhaitons visualiser dans le cadre d'un projet d'imagerie faisant intervenir la spectroscopie Raman et l'imagerie NanoSIMS.

Nous avons choisi de visualiser les nucléoles du noyau par un immuno-marquage indirect ciblant une phosphoprotéine majoritairement présente au sein de cet organite : la nucléophosmine. Nous avons utilisé dans ce chapitre une expérience d'immunofluorescence permettant de vérifier la non-interférence des sondes moléculaires dans l'immuno-marquage que nous souhaitons appliquer. Trois catégories de sondes ont été testées :

- Sonde Raman comportant seulement la fonction visible par spectroscopie Raman à savoir une fonction alcyne.
- Sonde NanoSIMS comportant seulement la fonction visible par imagerie NanoSIMS à savoir une fonction halogénée.
- Une sonde bimodale Raman / NanoSIMS qui comporte à la fois une fonction alcyne et une fonction halogénée.

Nos résultats montrent que le traitement des anticorps secondaires par les sondes ne perturbe pas de façon notable la capacité de reconnaissance pour l'anticorps primaire. Il sera donc possible d'utiliser ces sondes dans le cadre du projet.

Dans la suite de ce manuscrit nous développerons d'avantage les moyens mis en œuvre pour la préparation des sondes moléculaires et leurs applications en imagerie.

Bibliographie

- [1] Hooke, R.; *Micrographia*. R. Society., **1665**, 488p.
- [2] Callen, J.-C.; *Biologie cellulaire : des molécules aux organismes*. Dunod., **2000**, 475p.
- [3] Karling, J. S.; *Shleiden's contribution to the cell Theory*. *Am. Nat.*, **1939**, 73, 517-537.
- [4] Silver, G. A.; *Virchow, The Heroic Model in Medicine: Health Policy by Accolade*. *Am.J. Public Health.*, **1987**, 77, 82-88.
- [5] Zachariae, W.; *Progression into and out of mitosis*. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **1999**, 11, 708-716.
- [6] Pormorski, T.; Jansen, M.; Hothuis, J.; *Lipidic structure and vesicular trafficking*. *Pathol.Biol.*, **2004**, 52, 367-372.
- [7] Burgo, A.; Proux-Guillardeaux, V.; Sotirakis, E.; Bun, P.; Casano, A.; Verraes, A.; Liem, R. K. H.; Formstecher, E.; Coppey-Moisan, M.; Galli, T.; *A molecular network for the transport of the TI-VAMP/VAMP7 vesicles from cell center to periphery*. *Dev. Cell.*, **2012**, 23, 166-180.
- [8] Karp, G.; *Biologie cellulaire et moléculaire*. D. Boek., **2010**, 810p.
- [9] Carroll, S.; Griffiths, A.; Wessler, S.; Lewontin, R.; *Introduction à l'analyse génétique*. D. Boek., **2010**, 856p.
- [10] Voet, D. and Voet, J. G.; *Biochemistry*. D. Boek., **2005**, 1538p.
- [11] Egerton, F. N.; *A History of the Ecological Sciences, Part 19: Leeuwenhoek's Microscopic Natural History*. *ESA bulletin.*, **2006**, 87, 47-58.
- [12] Porter, J. R.; *Antony van Leeuwenhoek: tercentenary of his discovery of bacteria*. *Bacteriol.Rev.*, **1976**, 40, 260-269.
- [13] Gest, H.; *The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni Van Leeuwenhoek, fellows of the royal society*. *Rec. R. Soc. Lond.*, **2004**, 58, 187-201.
- [14] Roblin, G.; *Microscopie optique. Techniques de l'ingénieur.*, **1999**, r6712, 1-26.
- [15] Ruste, J.; *microscopie électronique à balayage-principe équipement. Techniques de l'ingénieur.*, **2006**, p865, 1-20.
- [16] Salvan, F. and Thibaudau, F.; *Techniques de l'ingénieur.*, **1999**, p895, 1-18.
- [17] Hansma, H. G.; *Surface Biology of DNA by atomic force microscopy*. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **2001**, 52, 71-92.
- [18] Mikkelsen, S. R. and Corton, E.; *Bioanalytical chemistry*. Wiley-Interscience., **2004**, 361p.
- [19] Porter, R. R.; *The hydrolysis of rabbit gamma-gobulin and antibodies with crystalline Papain*. *Biochem. J.*, **1959**, 73, 119-127.
- [20] Porter, R. R.; *Structural studies of immunoglobulins*. Nobel Report., **1972**, 1-10.
- [21] Köhler, G. and Milstein, C.; *Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity*. *Nature.*, **1975**, 256, 495-497.
- [22] Coons, A.; *Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group*. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **1941**, 47, 200-202.
- [23] Coons, A. and Kaplan, M.; *Localization of antigen in tissue cells. II Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody*. *J. exp. Med.*, **1950**, 91, 1-13.
- [24] Jorgensen, A.; Shen, A. C.; Arnold, W.; Leung, A.; Campbell, K. P.; *Subcellular distribution of the 1,4-dihydropyridine receptor in Rabbit skeletal muscle in situ : An immunofluorescence and immunocolloidal gold labelling study*. *J. Cell. Biol.*, **1989**, 109, 135-147.
- [25] Wakabayashi, K.; Hansen, L. A.; Masliah, E.; *Cortical Lewy body-containing neurons are pyramidal cells: laser confocal imaging of double-immunolabeled sections with anti-ubiquitin and SMI32*. *Acta Neuropathol.*, **1995**, 89, 404-408.

- [26] Olson, M. O. J.; Dundr, M.; Szebeni, A.; *The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. Trends. Cell. Biol.*, **2000**, 10, 189-196.
- [27] Hernandez-Vercun, D. and Louvet, E.; *Le nucléole: structure, fonctions et maladies associées. Medecine/Sciences.*, **2004**, 20, 37-44.
- [28] Lam, Y. W.; Trinkle-Mulcahy, L.; Lamond, A. I.; *The nucleolus. J. Cell. Sci.*, **2005**, 118, 1335-1337.
- [29] Feuerstein, N. and Mond, J. J.; *Identification of a prominent nuclear protein associated with proliferation of normal and malignant B cells. J. Immunol.*, **1987**, 139, 1818-1822.
- [30] Schmidt-Zachmann, M. S.; Hügler-Dorr, B.; Franke, W. W.; *A constitutive nucleolar protein identified as a member of the nucleoplasmin family. EMBO J.*, **1987**, 6, 1881-1890.
- [31] Schmidt-Zachmann, M. S. and Franke, W. W.; *DNA cloning and amino acid sequence determination of a major constituent protein of mammalian nucleoli. Correspondence of the nucleoplasmin-related protein NO 38 to mammalian protein B23. Chromosoma.*, **1988**, 96, 417-426.
- [32] Reboutier, D.; Troadec, M.-B.; Cremet, J.-Y.; Fukasawa, K.; Prigent, C.; *Nucleophosmin / B23 activates Aurora A at the centrosome through phosphorylation of serine 89. J. Cell. Biol.*, **2012**, 197, 19-26.
- [33] Okuda, M.; *The role of nucleophosmin in centrosome duplication. Oncogene.*, **2002**, 21, 6170-6174.
- [34] Borer, R. A.; Lehner, C. F.; Eppenberger, H. M.; Nigg, E. A.; *Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. Cell.*, **1989**, 56, 379-390.
- [35] Yun, J. P. and al.; *Nucleophosmin/B23 is a proliferate shuttle protein associated with nuclear matrix. J. Cell. Biochem.*, **2003**, 90, 1140-1148.
- [36] Track, B. F.; Dean, J.; Eliat, D.; Lorenz, P. E.; Schechter, A. N.; *Tritium labeling of proteins to high specific radioactivity by reduction methylation. J. Biol. Chem.*, **1980**, 255, 8842-8847.
- [37] Vaidyanathan, G.; Affleck, D. J.; Zalutsky, M. R.; *Method for Radioiodination of Proteins Using N-Succinimidyl 3-Hydroxy-4-iodobenzoate. Bioconjug. Chem.*, **1997**, 8, 724-729.

Experimental Part

Cells preparation

Experimental part

Cells generality:

U₂OS osteosarcoma cells (American type cells culture: HTB96) were used for all the experiment.

Solution preparation:

All buffer saline solutions use for cells preparation was prepared just before use on cells.

Phosphate buffer saline solution (PBS):

PBS was prepared by dilution of 50mL of 10X PBS (10.6mM KH₂PO₄, 30.0 mM Na₂HPO₄, 2H₂O, 1.54 mM NaCl) in 450 mL of deionised water. pH solution was controlled.

Borate Buffer Saline solution (BBS):

pH 8.4 Borate buffer solution was prepared according to this protocole:

- 10 mM sodium borate
- 150mM NaCl solution
- pH was adjusted to 8.4
-

Glycine solution preparartion:

0.2 M Glycine solution was prepared according to this protocole:

- 750 mg of glycine
- Dissolve in 50mL of deionised water

Bovine Albumin Saline solution BSA:

Bovine albumin solution was prepared according to this protocole:

- 400 mg of BSA
- 40 mL of PBS solution (pH=7.4)
- 4 µL of detergent Twin 20

Cells culture substrate:

Cells were growth on different substrate depending on the type of analysis has been plan.

Raman experiments: Cells were grown on calcium fluoride slide

Immunofluorescence test: Cells were grown on glass cover slips

NanoSIMS experiments: Cells were grown on Petry dishes.

Cells preparation for labelling global procedure:

Cells preparation has been described in this part and more detailed protocol have been described for each kind of experiment.

After growing process, cells were fixed with frozen methanol for 10 minutes at -20°C. After fixation, methanol was removed and immediately replaced by PBS. Three rinses steps were then processed with PBS solution (pH 7.4), for each of them incubation times of 5 minutes were respected.

	Sample
Rinse 1	5min, 1 mL PBS, Room temperature
Rinse 2	5min, 1 mL PBS, Room temperature
Rinse 3	5min, 1 mL PBS, Room temperature

Primary antibody labeling:

Primary antibody Rabbit monoclonal [EP1848Y] specific to Nucleophosmin was diluted 1000 times in BSA solution before labeling. Then cells were labeled with 0.5 mL of primary antibody solution and incubated in dark over night at 4°C. Cells cultures were rinsed three times with PBS (pH 7.4).

	Sample
Rinse 1	5min, 1 mL PBS, Room temperature
Rinse 2	5min, 1 mL PBS, Room temperature
Rinse 3	5min, 1 mL PBS, Room temperature

Secondary antibody preparation:

➤ No labeled secondary antibody:

10µL of secondary antibody (from mouse anti rabbit, Life Technologies) were added in an ependorf containing 250 µL of BBS solution (pH=8.4). This solution was mix for 15 minutes and reaction was stopped by 10 µL of glycine solution at 0.2 M.

58 µL of secondary antibody were put in 0.5 mL of BSA solution. This solution was used for labeling primary antibody previously prepared.

➤ Labeled secondary antibody preparation and introduction:

All probes solution were prepared in dry DMSO sealed and store in fridge.

10µL of secondary antibody (from mouse anti rabbit) were added in a 500 µL ependorf containing 250 µL of BBS solution (pH=8.4). To this solution 25 µL of probe solution was added. This solution was stirred for 15 minutes and reaction was stopped by 10µL of glycine solution at 0.2 M.

58 µL of this solution was put in 0.5mL of previously prepared BSA solution. Then this reactional mixture was mixed with 1mL of BSA solution. This solution was injected on cells and incubated in dark for 1 hour at room temperature (21°C).

Experimental part

Immunofluorescence part

Human osteosarcoma cell lines U2OS (American type cells culture: HTB96) were directly grown in glass cover slips in 16 well plates using standard techniques. Before labeling with molecular probes, cells were fixed in frozen methanol, rinsed with phosphate buffer saline (pH: 7.4).

Primary antibody preparation:

Primary antibody Rabbit monoclonal [EP1848Y] specific to Nucleophosmin (from Life Technologies) was diluted 1000 times in BSA solution before labeling. Then cells were labeled with 0.5 mL of primary antibody solution and incubating in dark over night at 4°C. Cells cultures were rinsed three times with phosphate buffer saline (pH 7.4).

Secondary antibody preparation:

➤ No labeled secondary antibody:

No labeled secondary antibodies were prepared following the previous protocol see cells preparation: "secondary antibody preparation"

Labeled secondary antibody preparation and labelling:

Labeled secondary antibodies were prepared following the previous protocol see cells preparation: "secondary antibody preparation"

Tertiary antibody preparation:

Tertiary antibody (from goat anti mouse, Life Technologies) was diluted 1000 times in BSA solution (e.g: 1µL of Ac III for 1mL of BSA). 1mL of this solution was put in wells plates previously labeled by secondary antibody. Cells were incubated at room temperature in dark. After this step, cells were rinsed according to the following chart.

	Sample
Rinse 1	5 min, 1mL PBS
Rinse 2	5 min, 1mL PBS
Rinse 3	5min, 1µL DAPI*, 1 mL PBS
Rinse 4	5 min, 1 mL PBS

* DAPI able nucleus visualisation by immunofluorescence analysis.

Slide preparation for immunofluorescence analysis:

Glass cover slips were rinse by deeping in deionised water and dried in order to remove water. Microscopy slide were prepared following this procedure:

- Slide identification (day, sample code or identification)
- Spreading of 6µL of Prolong Gold® on the slide surface.
- glass cover slips were put in microscopy slide (cells were oriented front to Prolonggold®)

After preparation immunofluorescence slide were analysed under fluorescence microscope.

DAPI visualisation:

Excitation wavelength: 358 nm

Emission wavelength: 461 nm

GFP's tertiary antibody visualisation:

Excitation wavelength: 395 nm

Emission wavelength: 504 nm

Notes

Chapitre 2 :

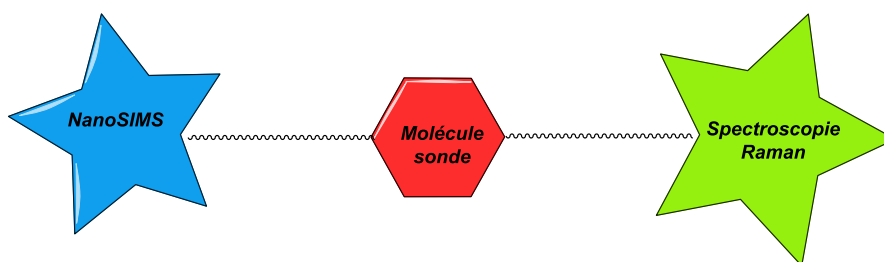
**Synthèse organique appliquée à l'imagerie de cellules :
préparation de sondes moléculaires**

Table des matières

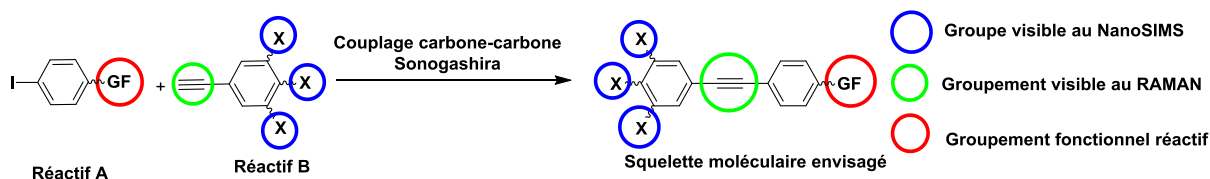
Fiche signalétique	54
Introduction générale du chapitre	55
I. La chimie organique : outil de préparation de sondes moléculaires pour l'imagerie	58
a. L'imagerie et la synthèse organique	58
b. Préparation de sondes moléculaires : le cahier des charges	61
II. Préparation des sondes moléculaires	62
a. Présentation de la chimie liée aux techniques d'imagerie choisies	62
b. Marquage des anticorps	66
III. Applications du cahier des charges : préparation des esters de succinimide	68
IV. Préparation d'une nouvelle série de sondes moléculaire : les sondes mésylates	71
a. Marquage de l'ATP-Y-SH : principe du marquage	71
b. Préparation des précurseurs de sondes par couplages de Sonogashira	73
c. Mésylation des précurseurs et préparation des sondes	75
Conclusion	79
Bibliographie	80
Experimental part	85
Notes	97

Fiche signalétique

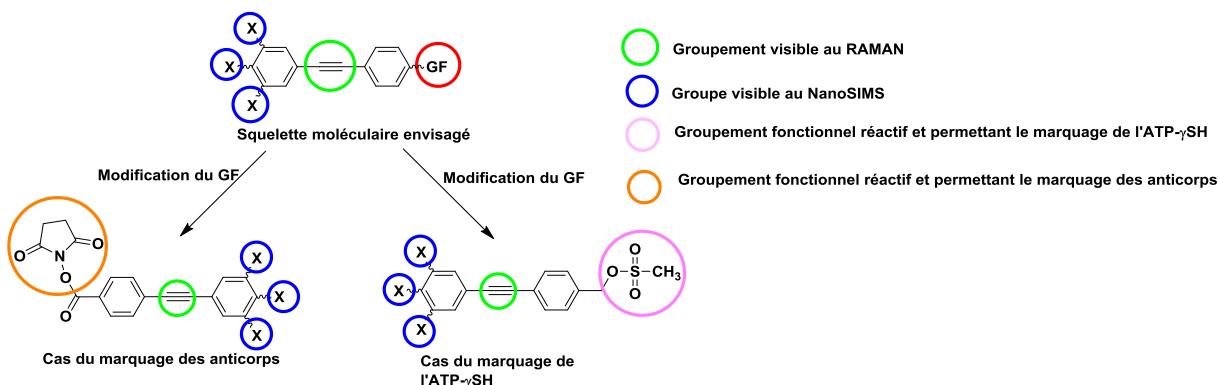
Objectif : Mise au point d'une méthode de synthèse de sondes moléculaires pour l'imagerie en science du vivant. Les sondes élaborées dans ce chapitre permettront de procéder à l'imagerie de cellules par l'intermédiaire de deux techniques : la spectroscopie Raman et la spectrométrie NanoSIMS. Chacune d'entre elles posséderont un groupement fonctionnel observable spécifiquement par ces techniques.



Moyens mis en œuvre : Synthèse d'une plateforme moléculaire "standard" par une voie de préparation se basant sur un couplage carbone-carbone catalysé au palladium plus connu sous le nom de couplage de Sonogashira.



Champs d'applications : A partir du squelette moléculaire mis au point, modification du groupement fonctionnel réactif afin de permettre le marquage sélectif de deux entités biologiques préalablement choisies.



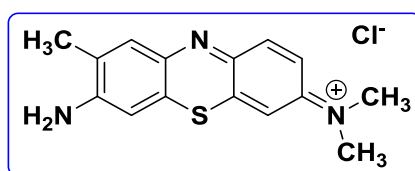
Discussions abordées :

- Stabilité des composés synthétisés.
- Faisabilité des marquages envisagés.
- Choix des molécules pour les expériences en imagerie.

Introduction générale du chapitre

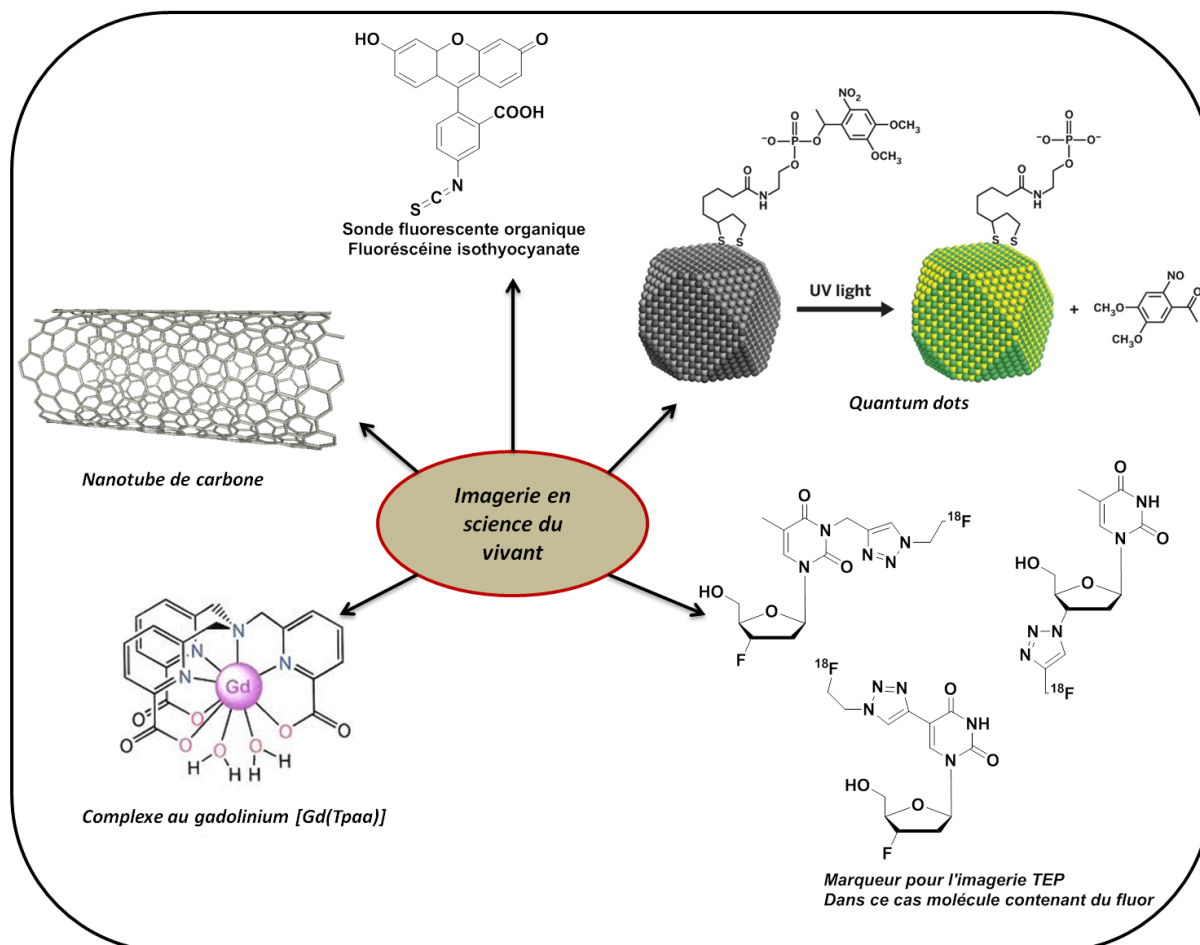
L'observation et l'étude des différents processus ayant lieu dans les cellules, les tissus ou les organes permet la compréhension des mécanismes mis en jeu dans le développement et la survie (reproduction, métabolisme, communication et interaction...) de ces derniers. Une discipline de la science permet l'étude de la cellule et de ces organites : la biologie cellulaire. Cette dernière permet également d'observer l'une des plus importante caractéristique de la cellule : la mort de cette dernière qui en fonction des situations peut être programmée génétiquement (phénomène d'apoptose) ou être le résultat d'une agression (nécrose). La principale technique utilisée est la microscopie optique, c'est finalement elle qui a donnée naissance à la biologie cellulaire (fin du XVIIème siècle par Antoni VAN LEEUWENHOEK). Les techniques employées dans ce domaine sont diverses et variées la majeure partie d'entre elles découlent de la microscopie. Il existe de plus, de nombreuses techniques qui permettent l'élargissement de l'étude biologique tel que l'IRM (imagerie par résonance magnétique), La TEP (tomographie par émission de positron), la TEM (microscopie par transmission d'électron).

L'étude et l'identification des cellules, nécessite parfois de procéder à des colorations. Ces dernières sont préparées à base de solutions aqueuses contenant un composé dont les caractéristiques électroniques (conjugaison des doubles liaisons) permettent de colorer des sites ou un ensemble de site de manière stable au sein de l'organisme à étudier. Par exemple le bleu de toluidine dont l'utilisation permet la localisation du noyau dans une cellule (schéma ci dessous).



Bleu de toluidine

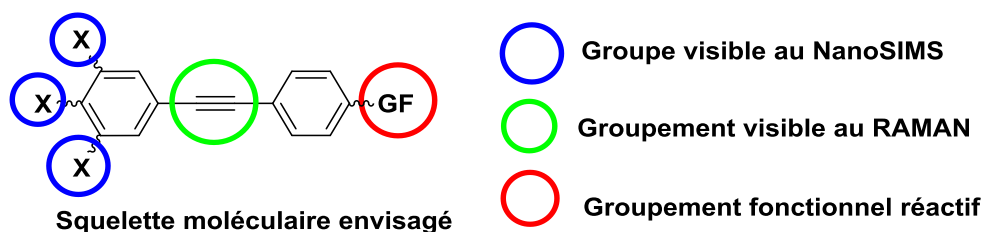
Afin d'obtenir des informations toujours plus précises et détaillées sur le matériel biologique, de nombreux développements sur le marquage d'échantillons biologiques ont été effectués. De nombreux marqueurs moléculaires ont été développés et permettent désormais de visualiser des structures de plus en plus fines, de localiser avec une certaine précision des sites de plus en plus spécifiques de la cellule. On peut par exemple citer les marqueurs fluorescents couramment utilisés en microscopie de fluorescence, ou bien les molécules organiques marquées par des isotopes utilisés en TEP, permettant entre autre d'accéder à la distribution de l'isotope en trois dimensions dans un échantillon cellulaire ou tissulaire lors de l'étude de l'activité métabolique ou moléculaire au sein de l'échantillon. Les marqueurs ne sont pas seulement de nature "organique", certains d'entre eux sont d'origine inorganique telle que certains nanotubes de carbone utilisés dans le cadre des études par TEM. D'autres encore sont composés d'une molécule organique et un cœur métallique, qui donne à ces derniers deux avantages majeurs : la facilité de localisation dans le matériel biologique et la compatibilité avec un environnement biologique. Ce type de marqueur est utilisé dans des études d'IRM car de tels édifices permettent d'obtenir une image de contraste de bonne qualité (schéma suivant).



Bien que les méthodes d'obtention des marqueurs soient pléthoriques, ces molécules dédiées à l'imagerie du vivant se doivent de respecter des paramètres au sein desquels peuvent être mentionnés les propriétés spectrales, l'absence de cyto-toxicité ou la biocompatibilité.

Sans prise en compte de ses paramètres, qui seront détaillés durant ce chapitre, l'efficacité et l'utilité des molécules sont fortement diminuées. Il faut donc trouver un compromis global lors de la préparation.

Au cours de ce chapitre intitulé "Synthèse organique appliquée à l'imagerie de cellules : préparation de sondes moléculaires." nous développerons une voie de synthèse permettant de préparer des molécules sondes dans le cadre d'un marquage spécifique de la cellule. Une étude du design de la sonde sera faite afin de déterminer le type de groupement à introduire dans le cadre de notre étude. La sonde comportera un groupement fonctionnel d'accroche et deux groupements identifiables par les techniques choisies. Il sera élaboré un "squelette moléculaire" contenant les deux groupements à visualiser et qui sera donc adaptable en fonction de la technique utilisée. La voie de synthèse choisie se basera sur la création d'une liaison carbone-carbone par une réaction catalysée au palladium.



Le projet a pour but de relier par une sonde moléculaire de petite taille deux techniques spectroscopiques qui sont utilisées dans le cadre de l'imagerie en biologie et dont l'importance dans ce domaine est grandissant depuis plusieurs années :

- La spectroscopie Raman
- La spectrométrie NanoSIMS

Les sondes préparées contiendront alors un groupement chimique visible par chaque technique et un groupement fonctionnel réactif par ancrage sur un anticorps secondaire. Certaines d'entre elles auront un caractère bimodal. Les sondes auront donc le potentiel d'être utilisée dans le cadre de deux techniques d'imagerie en biologie. Ce type de molécule a également le potentiel de recouper les informations données par la spectroscopie Raman et le NanoSIMS. La spectroscopie Raman permet d'obtenir des informations à l'échelle du micromètre tandis que le NanoSIMS permet d'observer un échantillon à l'échelle de la centaine de nanomètre, certaines sondes moléculaires organiques que l'on souhaite synthétiser dans cette partie du manuscrit auront un caractère bimodal et permettront une analyse multi-échelle d'un même échantillon.

Ce chapitre de thèse va se focaliser sur la synthèse de deux familles de molécules dans le cadre de différents marquages. La première d'entre elles concerne le marquage des anticorps secondaires que nous avons décrit lors du chapitre 1. La seconde famille permettra d'envisager le marquage de l'ATP- γ -SH dans le cadre de travaux futurs. Il sera dans un premier temps discuté du lien qui relie la chimie organique et l'imagerie en biologie. Dans un second temps un cahier des charges sera établi pour la préparation des sondes moléculaires envisagées. Dans une troisième partie nous présenterons les résultats obtenus lors de la préparation de ces molécules.

I. La chimie organique : outil de préparation de sondes moléculaires pour l'imagerie

a. L'imagerie et la synthèse organique

La synthèse organique est une science créatrice de diversité moléculaire qui a su s'adapter à diverses situations. La compréhension et le développement des voies de synthèses spécifiques de "composés à façon" rendent ce domaine des sciences relativement souple dans les domaines d'applications liés à la biologie. ^[1]

Cette activité scientifique se concentre souvent sur la préparation de "petites molécules" dans le but de créer des composés biologiquement actifs. ^{[2] [3]} Cette catégorie de petites molécules a toujours suscité un grand intérêt au sein des chimistes et des biologistes, en effet, ces dernières de part leurs structures et leur propriétés physio-chimiques ont un impact significatif sur le matériel biologique. Chimistes et biologistes ont depuis longtemps exploré et étudié les petites molécules présentes dans le vivant, en commençant par la découverte du glucose, ^[4] des amino-acides, ^{[5] [6]} ou les vitamines. ^[7]

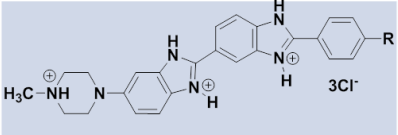
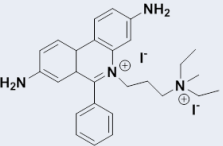
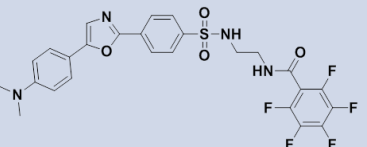
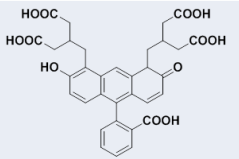
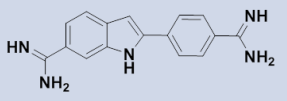
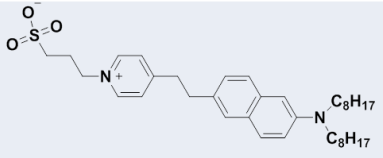
L'insertion de petites molécules au sein de systèmes biologiques complexes permet non seulement leur compréhension par imagerie mais mène également à la découverte de molécules à potentiel thérapeutiques. ^[8] La modification de composés naturellement présents au sein de l'organisme permet également de conduire à des composés à potentiels thérapeutiques ou à des composés ayant un fort potentiel en imagerie. ^{[9] [10]}

Depuis la moitié du 20ème siècle cette branche de la science s'est progressivement tournée vers l'utilisation de petites molécules en tant que sondes moléculaires dans le cadre de l'étude de processus biologiques. Il a été par exemple possible de sonder les canaux ioniques et la neurotransmission, ^{[11] [12]} les protéines des kinases, ^{[13] [14]} ou bien d'observer les éléments du cytosquelette. ^[15]

Dans l'optique d'obtenir des informations de plus en plus précises sur le matériel biologique, de nombreuses sondes ont été imaginées et créées dans le but de pouvoir procéder à l'imagerie par localisation de sites spécifiques en science du vivant. Le design de ces dernières vont de la "simple" modification de composés ayant une activité biologique à la création d'une nouvelle sonde dont la structure est adaptée à une technique d'imagerie. Cette liberté de création est également due à l'essor des techniques d'imagerie ^{[16] [17]} et de marquage ^[18] qui au fil des années deviennent de plus en plus précises et puissantes. La plus connue des techniques d'imagerie dédiée à l'étude cellulaire est la microscopie de fluorescence. ^[19] Cette dernière permet d'imager une cellule et ses organites, il est par exemple possible d'observer le noyau et certains de ces composants grâce au marquage de la cellule par l'intermédiaire de sondes fluorescentes. ^[20] Il existe de nos jours de nombreuses sondes fluorescentes (Tableau 1) pour l'identification au sein de la cellule comme celles marquant la membrane ^[21] ou celles marquant spécifiquement l'ADN. ^[22] Ces marqueurs permettent non seulement d'imager les compartiments d'une cellule mais ils rendent possible la détermination de l'état de la cellule. Par exemple, l'utilisation de l'iodure de propidium permet de déterminer si le noyau d'une cellule a été endommagé ou non. L'iodure de propidium est un agent intercalant des

acides nucléiques tel que l'ADN ou l'ARN, cette molécule va permettre de visualiser les cellules dont le noyau a perdu son intégrité membranaire.

Tableau 1 Exemples de sondes fluorescentes

Sonde fluorescente	Nom	Cible
	Hoechst 33258	Noyau et ADN $\lambda_{\text{excitation}} = 360 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 470 \text{ nm}$
	Iodure de propidium	Noyau et cellules mortes $\lambda_{\text{excitation}} = 633 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 660 \text{ nm}$
	ER-tracker™ blue-white DPX	Réticulum endoplasmique $\lambda_{\text{excitation}} = 374, 504, 587 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 430, 511, 615 \text{ nm}$
	Calcéine	Marqueur de cellules vivantes $\lambda_{\text{excitation}} = 488 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 530 \text{ nm}$
	Dapi	Marqueur du noyau $\lambda_{\text{excitation}} = 350 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 450 \text{ nm}$
	8-di-anepps	Marqueur des membranes de la cellule et des lipides $\lambda_{\text{excitation}} = 498 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 713 \text{ nm}$

Bien que les outils d'imagerie faisant appel à la fluorescence soient très répandus, d'autres techniques d'imagerie via des sondes moléculaires ont été mise au point. ^[23] Parmi ces techniques nous pouvons citer la tomographie par émission de positron ^[24] (TEP ou PET dans sa version anglo-saxonne) qui est une technique se basant sur la désintégration d'un composé radioactif après injection préalable. Cette technique permet d'étudier le métabolisme d'un organe. Les marqueurs utilisés sont en général des molécules qui ont été préalablement marquées par des radionucléides émetteurs de positrons. Le fluor 18 est en grande partie utilisé par cette technique car ce dernier possède des propriétés physiques et électroniques adaptées au TEP parmi ces propriétés nous pouvons citer son temps de demi-vie le rendant facilement observable et le fait qu'il n'a pas de rôle métabolique dans l'organisme. ^[25] Le fluor 18 est souvent utilisé en TEP par l'intermédiaire d'un sucre dont le groupement hydroxyle a été modifié : le fluodexy glucose ou ¹⁸F-FDG (Figure 1). ^[26] Ce

composé a été décrit pour la première fois en 1968 par les docteurs Joseph Pacak, Zdenek Tocik et Miloslav Cerny^[27] et est utilisé dans la localisation de tissus cancéreux.

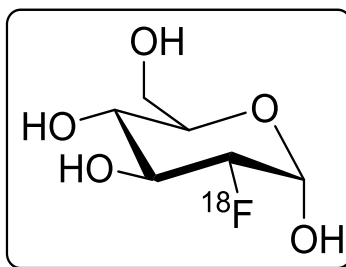


Figure 1 Molécule ¹⁸F-FDG

Une autre technique dont l'utilisation de marqueur moléculaire est régulière est l'imagerie par résonance magnétique (IRM).^[28] Cette technique fait appel aux principes de la résonance magnétique nucléaire des noyaux lorsque ces derniers sont soumis à un champ magnétique. Cette technique permet d'obtenir des images en 2D ou 3D à l'intérieur du corps. Pour obtenir une image correcte des agents de contraste sont utilisés. Ces derniers sont à base de gadolinium III et sont paramagnétiques. Cette propriété permet d'obtenir des images de contraste du tissu étudié en altérant le temps de relaxation de l'eau lors d'un scan par IRM. En général le complexe de gadolinium est injecté par intraveineuse ou voie orale, il existe sous forme de complexe afin de permettre une utilisation plus aisée et d'inhiber sa toxicité (Figure 2). La littérature montre également la possibilité de faire de l'IRM par l'intermédiaire d'autre type de marqueurs qui sont aussi bien organiques^[29] qu'inorganiques.^{[30] [28]}

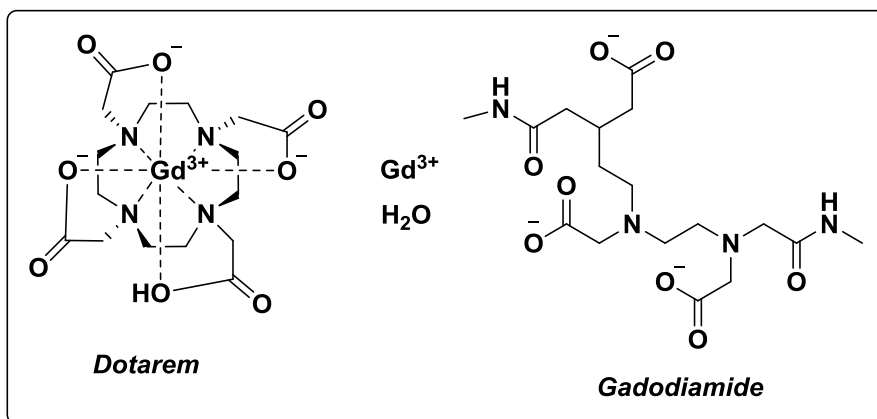


Figure 2 : molécule traceur pour IRM, Dotarem (à gauche), Gadodiamide (à droite)

Les techniques d'imagerie faisant appel à des sondes moléculaires sont donc très nombreuses et leurs descriptions nécessiteraient la rédaction d'un livre entier. Cependant, quelque soit la technique employée, le design de sondes moléculaires pour l'imagerie est un challenge à l'interface de la chimie et la biologie.

b. Préparation de sondes moléculaires : le cahier des charges

Parvenir à synthétiser une bibliothèque de molécules pouvant potentiellement être utilisée en imagerie qu'elle soit cellulaire ou médicale n'est pas des plus aisés. Cependant, du fait de l'adaptabilité de la synthèse organique et des nombreuses voies de synthèses existantes, il est désormais possible d'obtenir une diversité moléculaire très riche.^[31] La préparation de sondes moléculaires demande donc de prendre en compte de nombreux paramètres.^[32] Il est dans un premier temps nécessaire de s'intéresser au moyen d'accéder à la molécule d'intérêt par une méthode de synthèse simple se basant sur les principes généraux de la réactivité en chimie organique^[33]. Dans un second temps, il est nécessaire de prendre en compte la compatibilité des sondes dans le milieu d'étude. En effet les sondes doivent être spécifiques à l'objet d'étude et ne doivent pas provoquer son altération après marquage. Tous ces paramètres doivent être pris en compte au moment de la conception de la molécule.

Comme décrit précédemment, les molécules naturelles font de très bonnes bases pour la préparation de marqueurs. Grâce à cela et aux multiples possibilités qu'offre la synthèse organique la gamme des molécules qu'il est possible de créer n'a cessé de croître.^[34] Dans le cas de la préparation d'une sonde moléculaire à partir de synthons moléculaires, il faut prendre en compte le point d'ancrage et la sélectivité de la sonde sur le matériel biologique à étudier. Les avancées en matière de marquage rendent désormais possible l'accroche de nombreuses molécules. L'accroche peut se faire par liaison covalente^[35] ou par interaction spécifique entre la sonde et l'objet de l'étude comme par exemple des interactions électrostatiques (Figure 3).^[36]

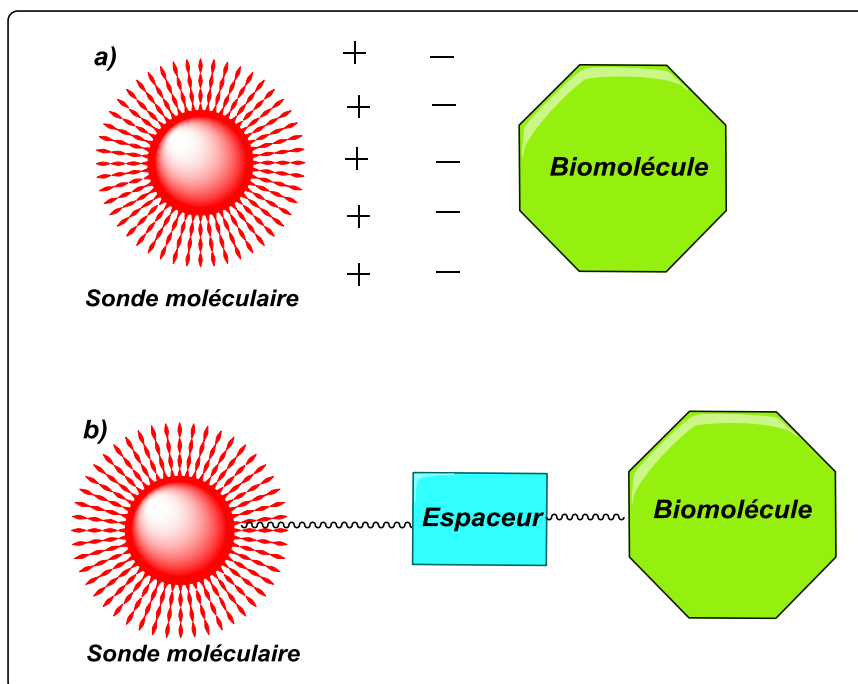


Figure 3 : Exemples d'interactions possibles en marquage a) accroche dite électrostatique b) accroche covalente en présence d'un espaceur.

Dans le cas de l'accroche covalente, il faut définir quel groupement fonctionnel réactif va réagir avec le composé que l'on souhaite visualiser. Une connaissance des groupements fonctionnels existants et susceptibles de réagir avec le composé à marquer est nécessaire. Afin d'obtenir un catalogue de sondes moléculaires conséquent il existe deux grandes familles de stratégie de synthèse que nous allons présenter succinctement. La première se nomme approche combinatoire elle permet de créer une bibliothèque de molécules en se basant sur une même structure de base également appelé squelette moléculaire.^[37] La deuxième catégorie permet la création d'une librairie moléculaire par "diversité orientée", ce terme désigne le fait de synthétiser une bibliothèque de molécule en se basant sur différentes structures cibles. Cette stratégie permet ; comme son nom l'indique ; d'obtenir une série de molécules riche et variées,^[32] De plus par rapport au premier cas, la bibliothèque moléculaire est bien plus riche. Les exemples d'applications de ses stratégies sont nombreux on peut par exemple citer la génomique^[38] ou bien la chimie thérapeutique.^[39]

Dans le cadre de notre projet, l'approche est différente car nous connaissons déjà l'espèce que nous souhaitons marquer à savoir un anticorps secondaire. Nous souhaitons dans un premier temps tester des modèles moléculaires simples afin de pouvoir développer par la suite les méthodes d'imagerie.

II. Préparation des sondes moléculaires

a. Présentation de la chimie liée aux techniques d'imagerie choisies

Dans cette partie du chapitre nous nous intéresserons à la présentation de la voie de synthèse. Avant de présenter plus en détails les composés préparés, il est important de bien définir la stratégie adoptée dans le cadre du projet.

Le projet global se situe à l'interface de la chimie et de la biologie, il fera donc appel aux connaissances des deux domaines afin de mettre en adéquation les spécificités de chacun des deux domaines. Il est envisagé de coupler deux techniques auxquelles la biologie porte un intérêt grandissant :

- La spectroscopie Raman^[40]
- La spectrométrie NanoSIMS^[41]

L'objectif du projet est d'imager les nucléoles par ces deux techniques. L'observation de cet organite se fera par l'intermédiaire d'une sonde moléculaire de petite taille. Il sera également envisagé de corrélérer les deux techniques par l'utilisation d'une sonde bimodale. Pour parvenir à ce type de combinaison, il est nécessaire d'utiliser des groupements chimiques qui sont détectables de manière univoque par chacune des deux techniques. Il a été décidé de se concentrer principalement sur deux catégories de fonctions (Figure 4) :

- La triple liaison carbone- carbone qui est aisément distinguable en spectroscopie Raman, de plus ce type de fonction est très peu présente au sein des systèmes biologiques.
- Les groupements halogénés tel que le brome l'iode ou le fluor qui sont aisément repérables en NanoSIMS et ne sont pas très courants au sein de la cellule.

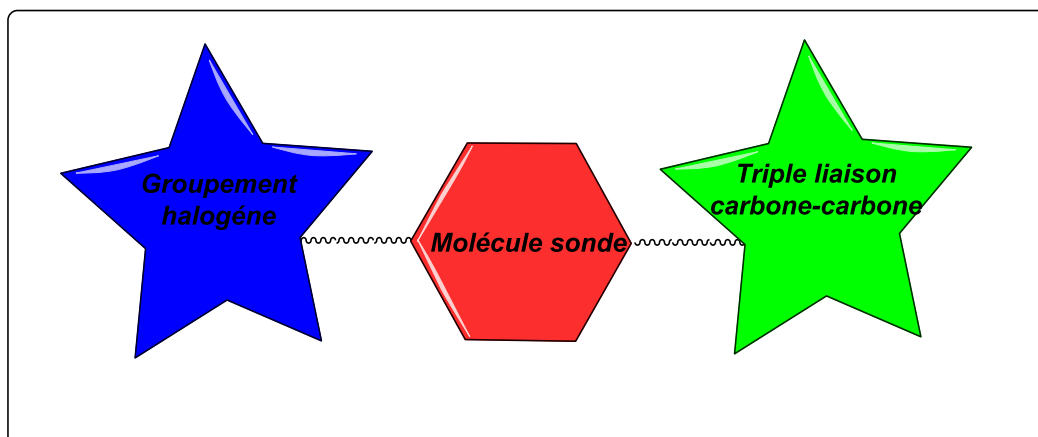


Figure 4 Représentation schématique de la sonde moléculaire envisagée

L'objectif est de synthétiser des petites molécules contenant toutes ces caractéristiques. La première caractéristique concernant les groupements fonctionnels à visualiser étant fixée il faut désormais déterminer une voie de synthèse viable permettant de coupler ces deux groupements fonctionnels. La question qui vient alors concerne la conception du squelette moléculaire de base contenant les deux catégories de groupement chimiques d'intérêts.

Il faut définir les réactifs qui serviront à la préparation du squelette moléculaire qui sera adapté par la suite au marquage qu'il est envisagé d'effectuer (Figure 5). Pour se faire nous allons "décomposer" le squelette moléculaire recherché en réactifs simples afin de pouvoir déterminer une stratégie de synthèse viable et en un minimum d'étape.^[34] D'après le schéma (Figure 5) il est possible de coupler les deux groupements fonctionnels par la combinaison de deux motifs moléculaires.

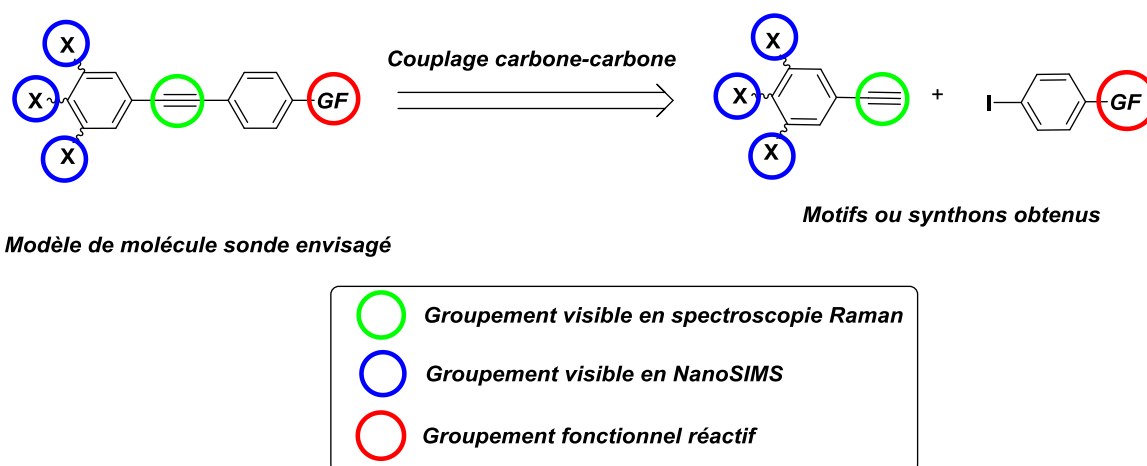


Figure 5 Recherche des réactifs nécessaires pour l'obtention du squelette moléculaire d'intérêt

Il est à noter que le groupement fonctionnel **GF** n'a pas encore été défini dans cette rétro-synthèse modèle. Le **GF** sera détaillé par de nouvelles analyses en fonction des marquages qui seront envisagés. D'après la littérature, le meilleur moyen de créer une triple liaison carbone-carbone est

de procéder à un couplage catalysé au palladium. Cette réaction est appelée couplage de Sonogashira.^[42]

Historiquement, il existait une méthode de préparation des composés acétyléniques en laboratoire cette réaction était appelée réaction de Stephans Castro,^[43] elle mettait en jeu des iodés insaturés (iodoarènes ou iodoalcènes) avec des acétylures de cuivre (I) (Figure 6). Cependant les conditions d'obtention de ces composés étaient relativement dures avec entre autre l'utilisation de la pyridine et la mise en place d'un fort reflux. Cette réaction a été utilisée jusqu'au début des années 1970.

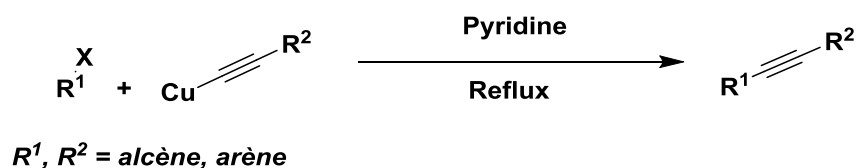


Figure 6 Couplage de Stephans Castro

Une autre voie de synthèse de ces composés permet de coupler un iodure d'aryle ou de vinyle avec un composé acétylénique a été mise au point par Kenkichi Sonogashira, Yasuo Tohda et Nobue Hagihara en 1975. Cette réaction a été mise en évidence par le couplage de composés iodés avec l'acétylène ou le phénylacétylène dans la diéthylamine (NH₂Et) et en présence d'une quantité catalytique de Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0.5%° et de CuI (1%)) (Figure 7).

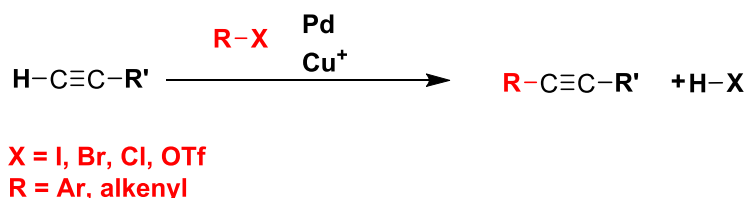


Figure 7 Principe du couplage de Sonogashira

Le mécanisme de cette réaction se base sur un cycle catalytique. Elle fait intervenir le palladium au degré d'oxydation 0 et le cuivre comme co-catalyseur (Figure 8).

Dans un premier temps, il est observé une addition oxydante du dérivé halogéné sur le palladium. (Passage de A à B).

Dans le même temps il y a formation d'un complexe π -acétylénique entre le cuivre et l'alcyne (Passage de D à E). Ce complexe organométallique va réagir avec la base nucléophile et éliminer l'hydrogène du composé acétylénique. (Passage de E à F).

Suite à ces réactions catalysées, les deux complexes ainsi formés vont interagir l'un avec l'autre par une réaction dite de trans-métallation (passage de B à C). Finalement le composé recherché est libéré par une élimination réductrice, et le catalyseur est de nouveau disponible pour un nouveau cycle (Figure 8). Dans certain cas ce couplage peut faire intervenir une étape de

réorganisation des ligands avant la libération du composé finale (cette étape se situerait entre l'étape allant de transmétallation et la libération du composé final).^[44]

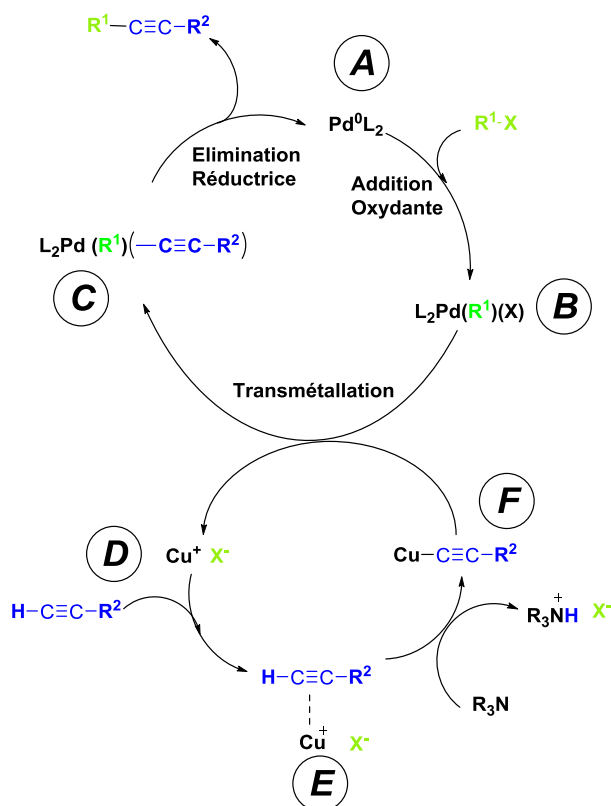


Figure 8 Mécanisme du couplage de Sonogashira

Cette réaction de couplage assistée par un métal de transition est une des voies de synthèse la plus efficace et privilégiée afin d'accéder à une large gamme de composés de type diarylalcyne.^[45] Il est également possible d'accéder à des composés très variés en plus des composés cités précédemment. On peut citer la création de composés carbocycliques à partir des énynes.^{[46] [47] [48]} Le couplage de Sonogashira constitue également une étape dans l'obtention de systèmes hétérocycliques.^[49] Il est également possible d'accéder à la préparation de dérivés de composés naturels.^[50]

Ce couplage a été de plus décliné dans diverses versions, il est alors possible de trouver dans la littérature des réactions de couplage en tandem^[51] se faisant en présence d'une alternative au palladium,^[52] ou même en présence d'un catalyseur au palladium ne comportant pas de ligand.^[53] Dans ce cas, le palladium est supporté par du charbon et est le seul catalyseur présent dans le milieu réactionnel.

A partir de ce motif moléculaire de base, il a été envisagé de préparer des sondes moléculaires pour deux types de marquages : le marquage des anticorps et le marquage de l'ATP-γ-SH. Les molécules ainsi préparées ont l'avantage d'être de petite taille et d'être adaptables en fonction du marquage que l'on souhaite effectuer. Dans la suite de cette partie du chapitre, une présentation des deux marquages envisagés sera effectuée.

b. Marquage des anticorps

Une première catégorie de marquage a été envisagée à partir des molécules préparées. Il a été envisagé de marquer des anticorps secondaire ^[54] grâce à des sondes. Ce marquage a été choisi car il permet d'observer de manière spécifique les nucléoles de la cellule.

Dans un premier temps nous allons faire un bref rappel sur les anticorps que nous souhaitons marquer. L'anticorps est une protéine complexe qui permet la détection et la neutralisation des corps étrangers pathogènes dans l'organisme (Figure 9).

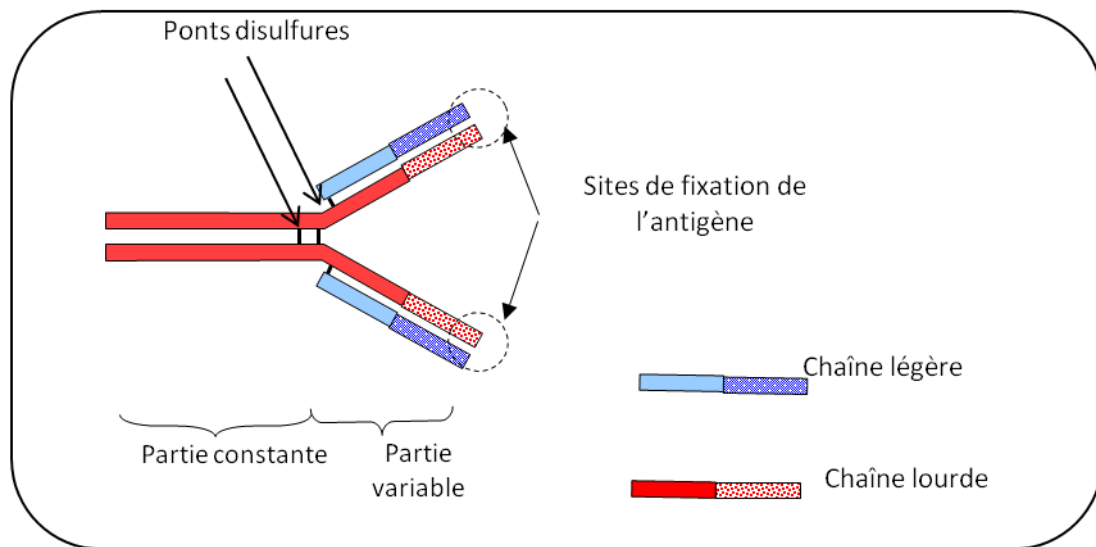


Figure 9 Représentation schématique d'un anticorps

Ce type de protéines comporte des terminaisons amines qui sont potentiellement utilisables dans le cadre d'un marquage. ^[54]

Il est possible de déterminer quel type de groupement fonctionnel se révèle pertinent pour ce type de marquage (Figure 10) en décomposant la structure du composé recherché en réactifs simples.

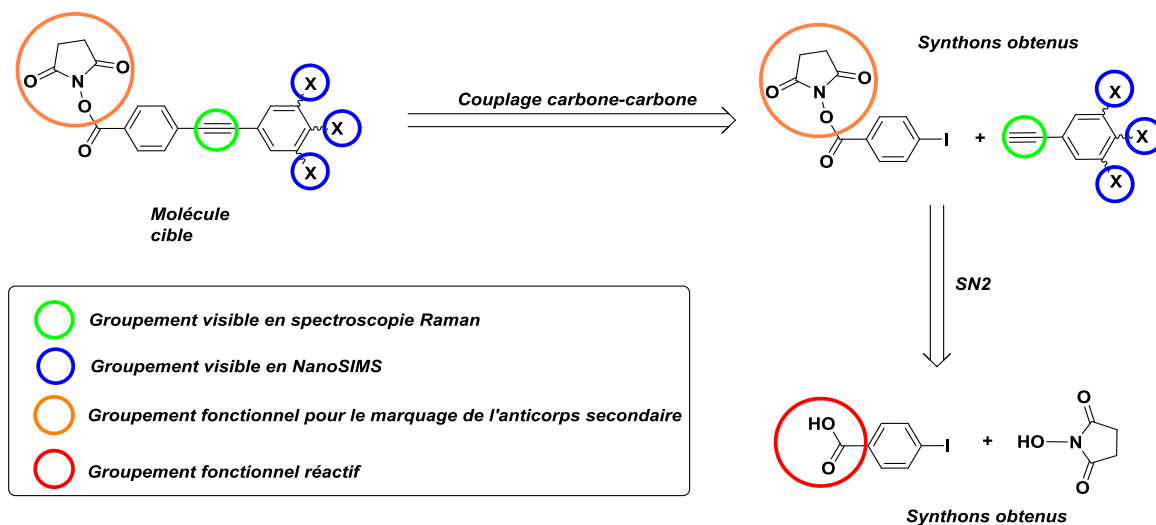


Figure 10 Analyse rétro-synthétique dans le cas du marquage des anticorps

Le point de départ de la stratégie est le composé issu du couplage de Sonogashira. A partir de ce point il a été défini que le composé de base idéal pour obtenir les ester de N-hydroxysuccinimide est un acide carboxylique.

Les esters de succinimide sont de bons groupe partant et sont couramment rencontrés et utilisés dans les domaines de la biologie et de la biochimie où ils sont employés comme "agent" activant des acides carboxyliques dans le cadre de couplage peptidique.^[55] Dans le cadre du projet, il est envisagé de marquer les amines primaires de ces protéines (Figure 11).

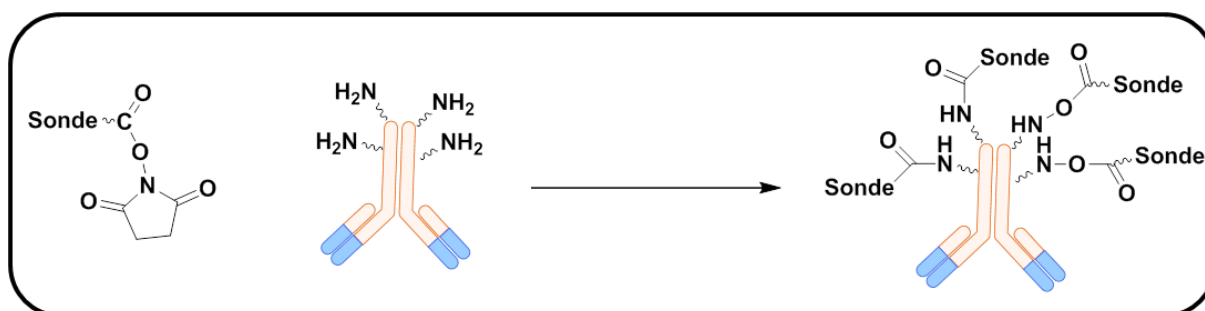


Figure 11 Principe du marquage des anticorps

Il existe une voie relativement simple d'accès à l'obtention de ces produits. Elle consiste en la mise en contact entre un hydroxysuccinimide et un acide carboxylique.^[56] Cette réaction est assistée et facilitée par l'ajout d'un agent de couplage^[57] comme le Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) ou l'éthyl (diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC) (Figure 12). De nombreux travaux font référence à cette voie de synthèse pour l'obtention de ce type de composé dédiés à l'imagerie tel que la tomographie par émission de positrons.^{[58] [59] [60]} De plus les ester de succinimide ou ester de succinate sont utilisés pour la modification de protéines.^[61]

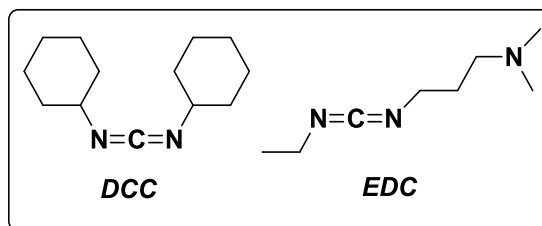


Figure 12 Représentation de la structure du DCC (gauche) et de l'EDC à droite

III. Applications du cahier des charges : préparation des esters de succinimide

La réaction de préparation des esters de succinimide est une réaction de substitution. Elle met en jeu la formation d'un intermédiaire réactionnel nucléophile qui est formé par la présence de l'agent de couplage (DCC ou EDC) (Figure 13).

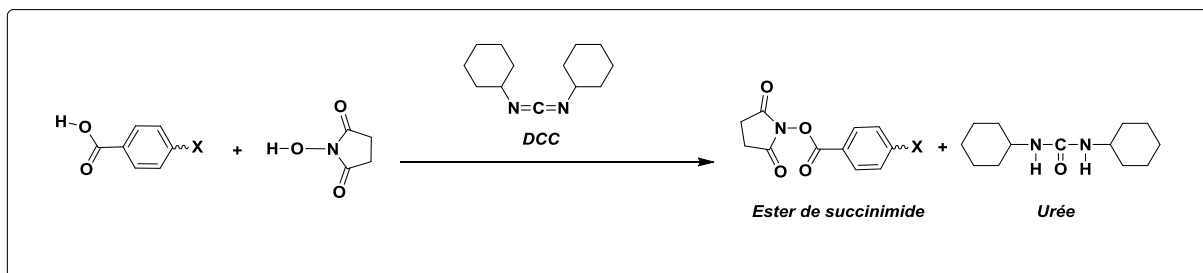


Figure 13 Schéma réactionnel de la préparation des esters de N-hydroxysuccinimide

Dans notre cas, un acide carboxylique comportant un groupement halogéné ou un groupement acétylénique a été mis en présence d'hydroxy-succinimide. La réaction a été faite à température ambiante pendant 12 heures dans le THF anhydre et en présence d'un agent de couplage, le DCC (Figure 14).

Nous avons pu obtenir une série de sondes moléculaires comportant toutes un groupement N-hydroxy-succinimide. ^{[62] [63] [64]}

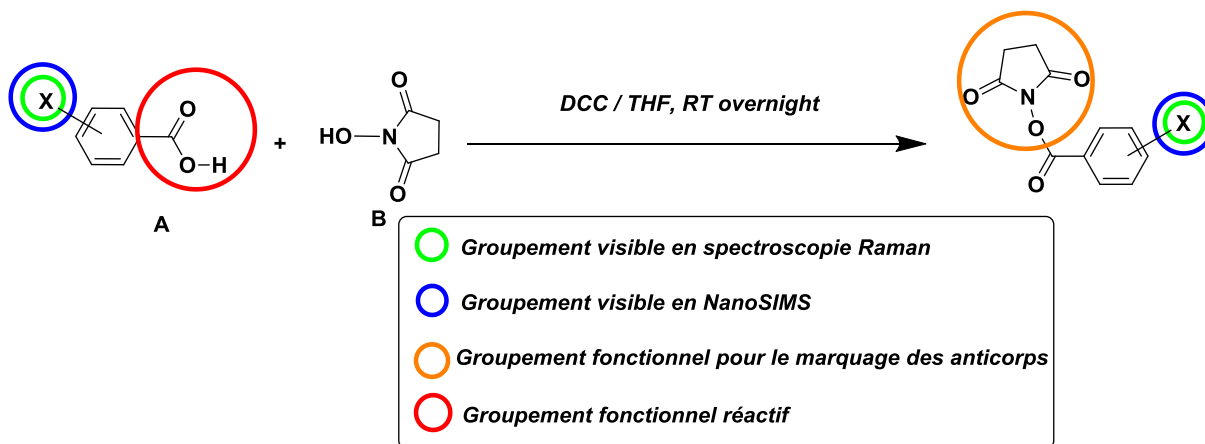


Figure 14 Représentation schématique de la préparation des esters de N-hydroxy-succinimide

Tableau 2 Récapitulatif des précurseurs de sondes utilisés

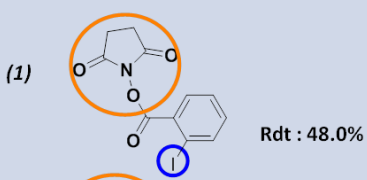
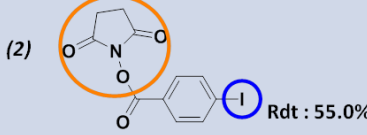
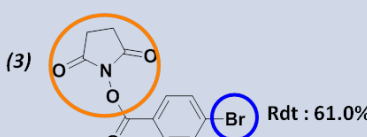
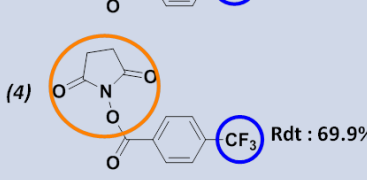
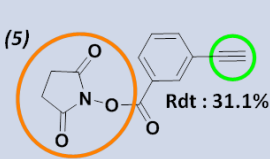
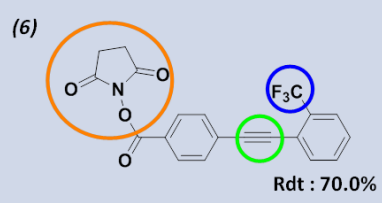
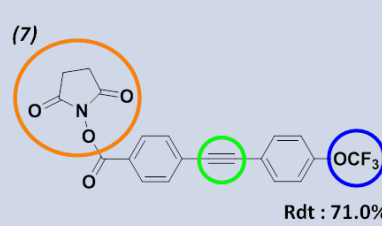
Précurseurs pour sondes NanoSIMS	Précurseur pour sondes Raman	Précurseurs pour sonde bimodales
<p>(A1) </p> <p>(A2) </p> <p>(A3) </p> <p>(A4) </p>	<p>(A5) </p>	<p>(A6) </p> <p>(A7) </p>

Ce tableau (Tableau 2), présente les précurseurs de sondes utilisés afin de préparer différentes catégories de sondes moléculaires. Ce tableau regroupe les précurseurs en 3 catégories :

- Les précurseurs pour sondes NanoSIMS, qui seront appliqués en NanoSIMS après la préparation (molécules allant de A1 à A4).
- Le précurseur pour sonde Raman, qui sera utilisé dans le cadre de l'imagerie par spectroscopie Raman (précurseur A5).
- Les précurseurs pour sondes bimodales qui servent à la préparation de sondes moléculaires qui seront utilisables à la fois en spectroscopie Raman et en imagerie NanoSIMS (Précurseurs A6 et A7).

Les molécules synthétisées sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 3 Tableau récapitulatif des sondes moléculaires préparées

Sondes NanoSIMS	Sonde Raman	Sondes bimodales
<p>(1)  Rdt : 48.0%</p> <p>(2)  Rdt : 55.0%</p> <p>(3)  Rdt : 61.0%</p> <p>(4)  Rdt : 69.9%</p>	<p>(5)  Rdt : 31.1%</p>	<p>(6)  Rdt : 70.0%</p> <p>(7)  Rdt : 71.0%</p>

Dans le cas de la préparation des sondes bimodales, nous sommes partis de la sonde moléculaire (2) comme précurseur afin de procéder à un couplage carbone-carbone selon la réaction de Sonogashira (Figure 15). La sonde (2) possède un atome d'iode qui peut être utilisé pour procéder à de l'imagerie par NanoSIMS si la sonde est utilisée seule ou comme réactif dans l'objectif d'obtenir une sonde bimodale. Il est à noter que les sondes moléculaires 2 à 4 dédiées à la NanoSIMS ont été obtenues à partir de travaux effectués en amont de ce projet.^{[65] [60] [58]} Les réactifs utilisés sont des acétyléniques qui comportent un groupement trifluorométhyle (composés A6 et A7) qui est observable en NanoSIMS par l'intermédiaire des fluors. Nous avons pu obtenir par cette méthode deux sondes bimodales (6) et (7) avec des rendements convenables.

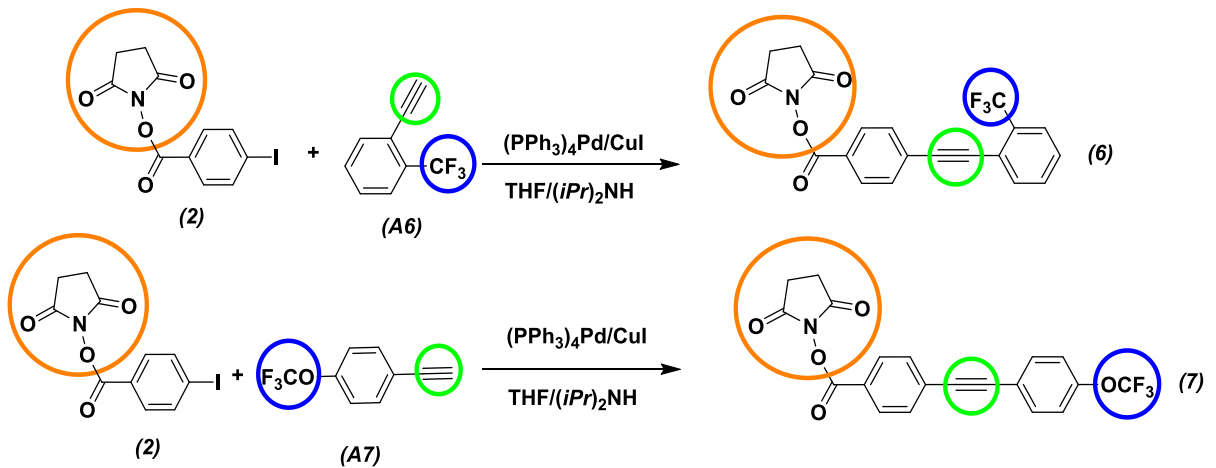


Figure 15 Schéma réactionnel de la réaction de couplage de Sonogashira pour la préparation des sondes bimodales

Dans cette partie du chapitre des sondes moléculaires ont été synthétisées de façon relativement facile dans le cadre du marquage des anticorps. Une série de composés a été obtenue dans le but de procéder à de l'imagerie NanoSIMS seule, de l'imagerie Raman seule et enfin de l'imagerie bimodale en joignant les deux techniques. Ces composés sont prêts à être testés en conditions de marquages. A partir des connaissances acquises lors de cette partie, il a été envisagé un autre type de marquage dans le but de faire de l'imagerie Raman et NanoSIMS. La prochaine partie concerne la préparation de sondes bimodales dans le cadre du marquage de l'ATP- γ -SH.

IV. Préparation d'une nouvelle série de sondes moléculaire : les sondes mésylates

a. Marquage de l'ATP- γ -SH : principe du marquage

Une deuxième série de sondes a été envisagée dans le cadre de marquer l'ATP- γ -SH ou adénosine-5-diphosphate- γ -thiophosphate. Cette molécule est un dérivé de l'adénosine-5-triphosphate (ATP) ^[66] qui est une molécule biochimique présente dans tous les organismes vivants (Figure 16). Ce composé a été découvert en 1929 par Karl Lohmann ^[67] mais sa structure a été déterminée en 1946 par Alexander Robert Todd. ^[68]

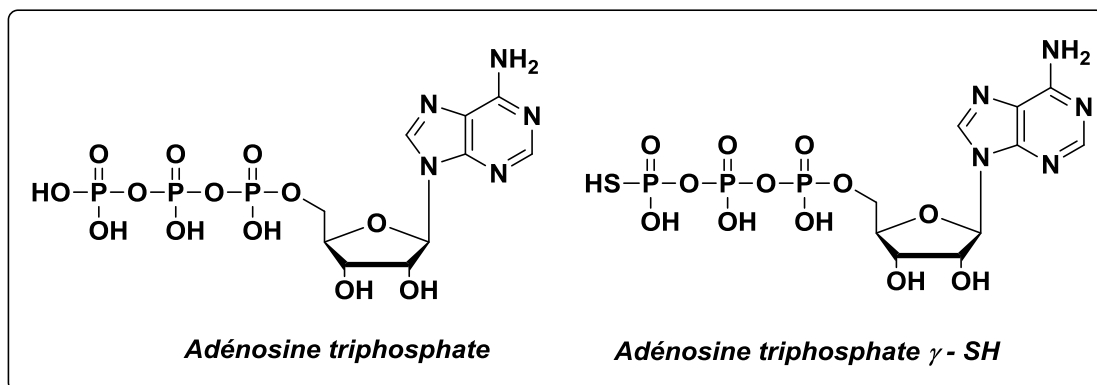


Figure 16 Représentation de la structure de l'ATP (à gauche) et de l'ATP- γ -SH (à droite)

Ce marquage se base sur les travaux de M. Shokat concernant la purification de substrat de kinase dans le cadre de leur identification. [69] Ces travaux ont pour objectif le marquage de l'ATP-γ-SH et de mettre en place une méthode de purification et d'identification des substrats de kinase suite à la digestion de l'ATP marquée. Ce type d'étude permet de conduire à des informations sur le fonctionnement de certaines maladies par l'intermédiaire des mécanismes de phosphorylation.

Dans ces travaux M. Shokat fait référence à la préparation d'un composé mésylé dans le cadre du marquage de l'ATP-γ-SH (Figure 16 droite). Dans le cadre de ses travaux, l'alcool-para-nitrobenzylique a été modifié chimiquement afin d'obtenir son dérivé mésylé le paranitrobenzoylmésylate (PNBM) (Figure 17). [70]

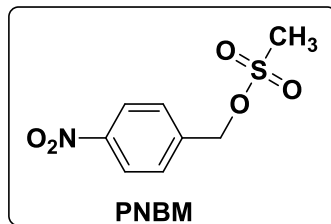


Figure 17 Représentation de la formule du paranitrobenzoylmésylate

Il a été envisagé de préparer des sondes moléculaires afin de les imager par les deux techniques précédemment citées. Afin de préparer ce type de composés, une série de composés comportant un alcool primaire a été choisie. Les sondes ainsi obtenues vont pouvoir potentiellement marquer l'ATP-γ-SH (Figure 18). L'ATP ainsi marqué va transférer le groupement phosphothioester marqué au site actif de la kinase (Figure 19). La kinase va à son tour transférer ce groupement à ses substrats. Les substrats de kinases pourront être localisés dans la cellule grâce aux transferts successifs des groupements phosphothioester de l'ATP-γ-SH marquée (Figure 20).

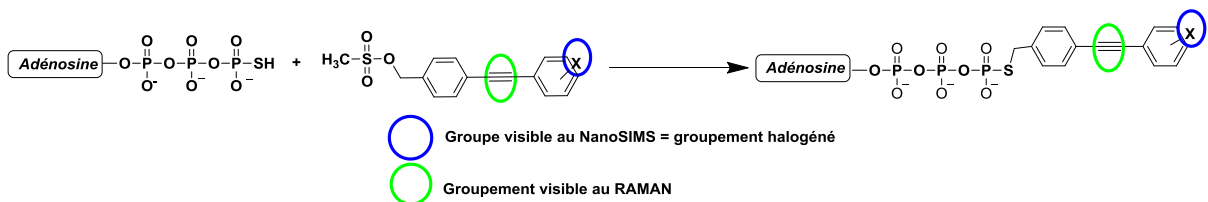


Figure 18 Voie de marquage envisagée

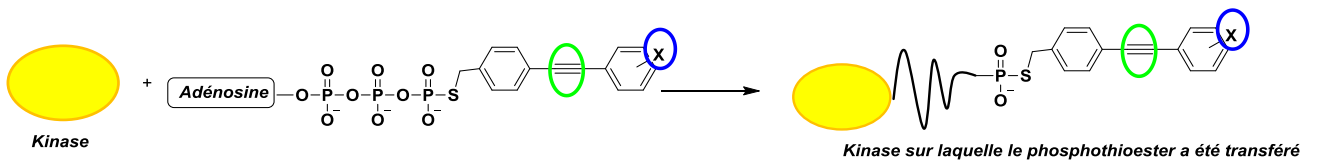


Figure 19 Transfère du groupement phosphothioester de l'ATP vers l'enzyme

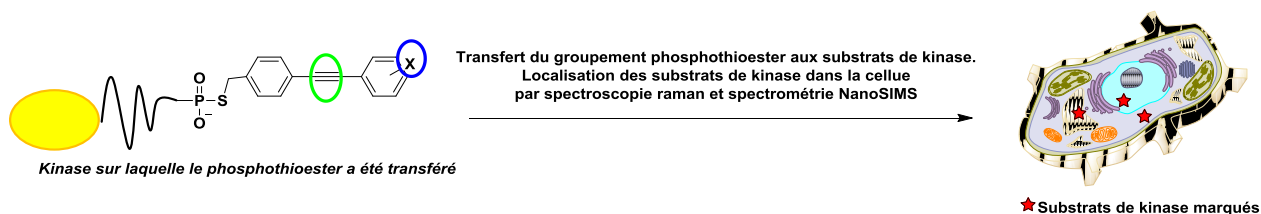


Figure 20 Visualisation des substrats de kinase

Le choix des réactifs à employer dans la préparation de ces sondes moléculaires va être effectué par "fragmentation" du squelette moléculaire en réactifs simples (Figure 21).

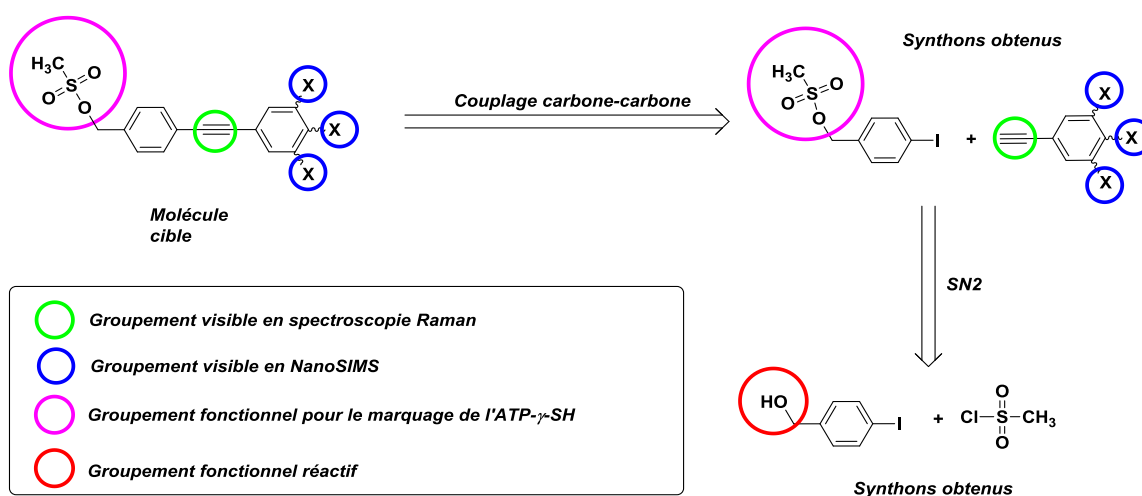


Figure 21 Recherche des réactifs à utiliser pour la préparation des sondes mésylates

Il est envisagé de partir des molécules issues du couplage de Sonogashira. Pour pouvoir marquer l'ATP- γ -SH il faut que la sonde puisse accrocher le soufre du thiophosphate de la molécule, la méthode la plus simple d'obtenir ce type de composé est de procéder à une réaction de méthylation^[71] qui consiste en la substitution d'un groupe hydroxyle d'un alcool par un groupe mésyle.

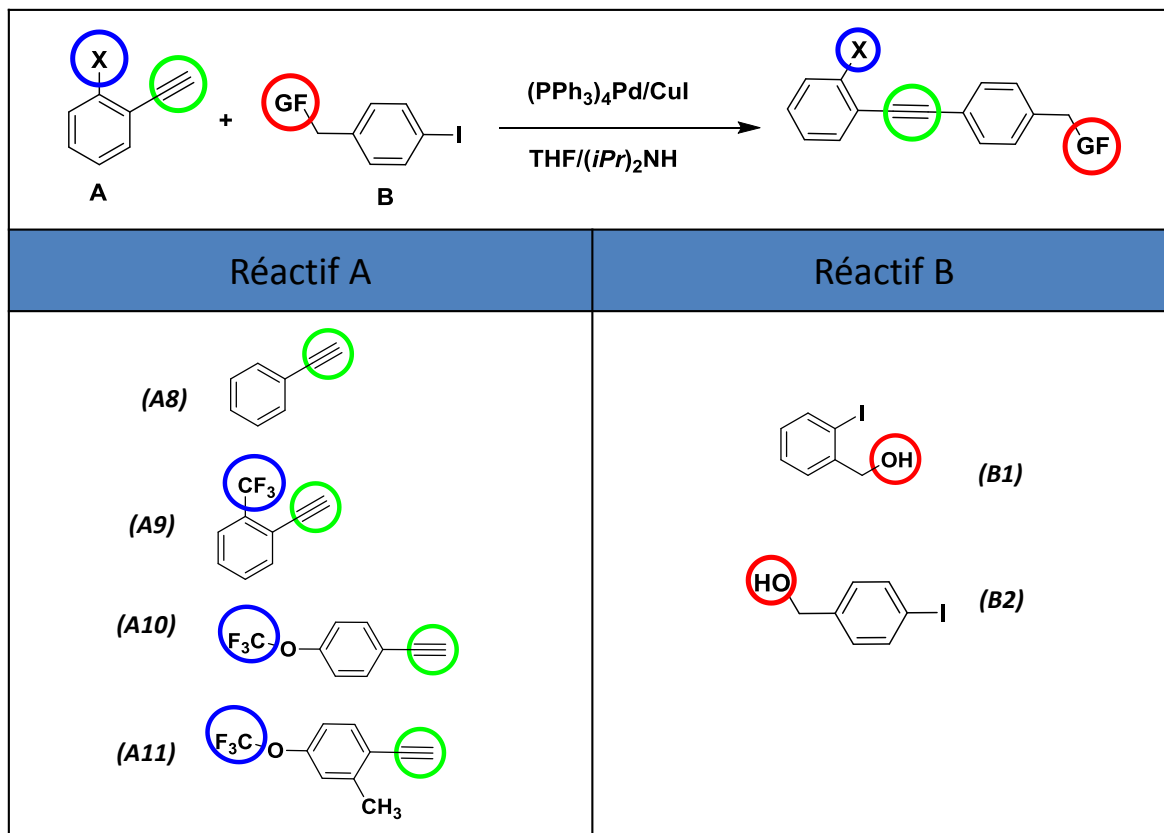
b. Préparation des précurseurs de sondes par couplages de Sonogashira

Durant ce chapitre, nous avons présenté le couplage de Sonogashira et nous avons utilisé ce dernier lors de la préparation des sondes moléculaires pour le marquage des anticorps. Dans cette partie du chapitre nous souhaitons développer une nouvelle série de sondes moléculaire dans le but de marquer l'ATP- γ -SH.

Le Tableau 4 présente les réactifs mis en jeu dans le cadre de cette première étape. Ce tableau répertorie les composés en trois catégories, la première concerne l'acétylénique mis en jeu, la seconde concerne le dérivé iodé choisi pour le couplage.

Dans le cadre de cette préparation, le groupement acétylène présent dans l'un des deux réactifs a un rôle double. En effet ce dernier permet dans un premier temps d'accrocher l'iode d'aryle dans l'optique d'obtenir le diarylalkyne puis dans un second temps, il sera le groupement étudié par spectroscopie Raman.

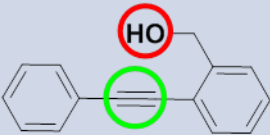
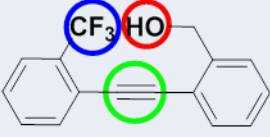
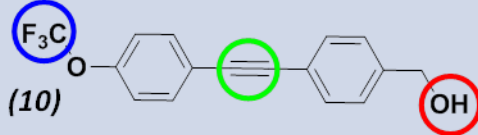
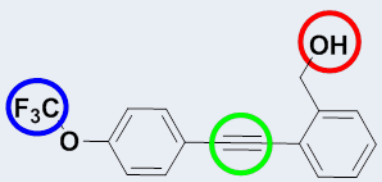
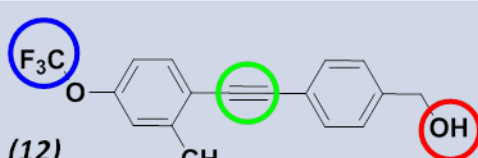
Tableau 4 Précurseur de sondes mésylate préparées



Chacun des composés a été obtenu en suivant le principe de la réaction de Sonogashira, l'amine utilisée est la diisopropylamine. Cette dernière a été distillée avant utilisation. La réaction a été faite à température ambiante et des rendements convenables ont pu être obtenus (Tableau 5). Cette série de composés va servir pour la prochaine étape de préparation des sondes moléculaires dans le cadre de l'obtention de sondes moléculaires pour le marquage de l'ATP- γ -SH. Le tableau présente les deux réactifs A et B utilisés. Le composé A est un alcyne benzylique comportant un groupement trifluorométhyle ou trifluorométhoxy dans les cas allant de A9 à A11 (Tableau 4). Le fluor a été choisi car il possède des propriétés électroniques et stériques qui le rendent compatible avec le matériel biologique.^{[72] [73]} Cet élément est notamment utilisé en imagerie pour ses propriétés peu métabolisantes dans l'organisme et justifie l'intégration du fluor dans le squelette moléculaire de la sonde. De plus, la littérature a permis de décrire de nombreux composés issus du couplage de Sonogashira et permettant d'obtenir des molécules comportant plusieurs atomes de fluor.^[74]

Les alcools benzyliques utilisés sont positionnés en position ortho ou par rapport à l'atome d'iode. Il sera éventuellement possible d'étudier l'influence des gênes stériques liées à la position de l'alcool lors de la prochaine étape. D'après cette première étape, il a été observé que la position de l'alcool benzylique n'était pas contraignante dans le cadre de la préparation de ces précurseurs. Les composés obtenus sont regroupés dans le tableau 5.

Tableau 5 Rendement obtenu pour chaque précurseur

Composé préparé	Rendement (%)
(8) 	75.8
(9) 	64
(10) 	45.8
(11) 	95
(12) 	52.1

Les précurseurs ont pu être obtenus dans des rendements convenables pour être utilisés lors la prochaine étape de préparation. Elle consiste en la préparation de composés mésylés.

c. Méthylation des précurseurs et préparation des sondes

Cette étape permet l'introduction du groupement fonctionnel réactif. Elle consiste en la transformation d'un alcool primaire en mésylate. Pour se faire nous utiliserons le chlorure de méthane sulfonyle comme réactif (Figure 22).

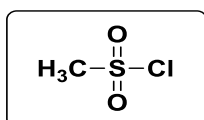


Figure 22 Structure du chlorure de méthane sulfonyle

Le chlorure de méthane de méthane sulfonyle est un composé qui permet de préparer des ester de sulfonate ^{[75] [76] [77]} à partir d'alcool en présence d'une base. Il permet d'obtenir des composés dont la réactivité est plus élevée que les dérivés du tosylate (Figure 23). ^[78]

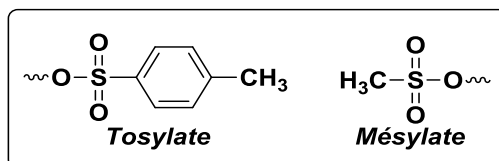


Figure 23 Structure d'un groupement tosylate (gauche) et mésylate (à droite)

Ce composé est également utilisé dans le cadre de nombreuses étapes en synthèse organique comme l'activation des alcools ^[79], des amines ^[80] ou dans le cadre de la chloration de certains composés. La réaction de méthylation permet également la préparation d'intermédiaire de réaction dans le but d'obtenir des dérivés du sucre, ^{[81] [82]} et permet de créer des agents d'alkylation dans le cadre de la synthèse organique grâce à la génération d'une espèce comportant un très bon groupe partant.

Une série de composés comportant une fonction mésylate en se basant sur les travaux de M. Shokat ^[69] a été préparée. La réaction a été faite à basse température en présence d'une base, la triéthylamine. En plus des composés synthétisés à partir des précurseurs issus du couplage de Sonogashira, d'autres composés ont été préparés afin d'obtenir des sondes spécialement dédiées à chacune des techniques que l'on souhaite utiliser (Figure 24).

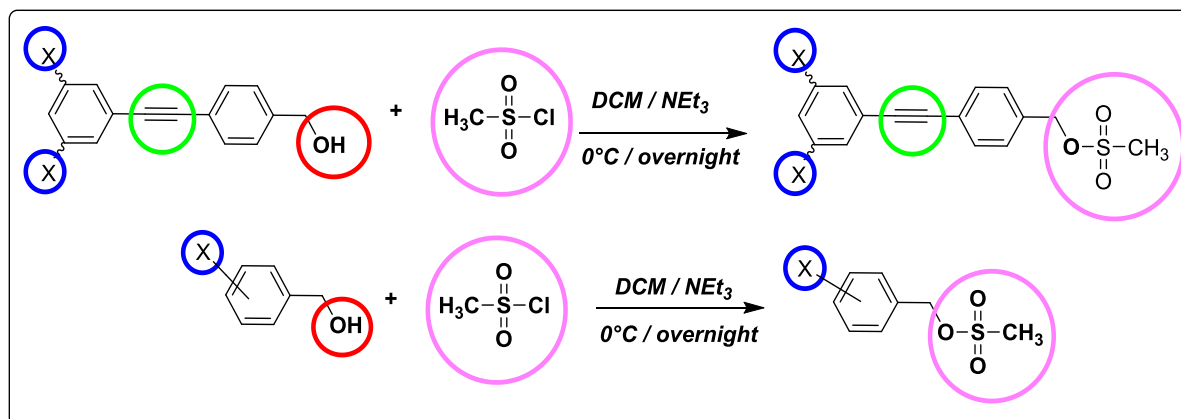


Figure 24 Réaction envisagées pour la préparation des sondes mésylates

Le Tableau 6 présente les différentes molécules précurseur choisies. Ces derrières ont été classés en trois catégories afin de bien distinguer les objectifs que nous souhaitons atteindre. La première catégorie correspond aux molécules dédiées à la spectrométrie NanoSIMS (Tableau 6 : molécule n°13) est un composé commercial qui a été choisi afin d'accéder à une sonde NanoSIMS de manière rapide et servira de molécule modèle dans la mise au point de la technique de marquage et d'imagerie. La seconde catégorie concerne une sonde dédiée à la spectroscopie Raman. La molécule (Tableau 6 molécule n°8) utilisée est issue d'un couplage de Sonogashira et comporte seulement le groupement visible en spectroscopie Raman. Comme pour la première catégorie, ce type de molécule servira de modèle dans la mise au point de la méthode d'imagerie.

Enfin la troisième catégorie concerne un précurseur comportant une triple liaison alcyne et un groupement trifluorométhyle (Tableau 6 : molécule 12). Cette sonde comporte un caractère bimodal et sera utilisable en spectroscopie Raman et spectrométrie NanoSIMS.

Tableau 6 Récapitulatif des précurseurs choisis

Précurseurs de sondes NanoSIMS	Précurseurs de sonde Raman	Précurseurs de sondes bimodales
(13)	(8)	(12)

A partir de ces réactifs, il a été possible d'obtenir les composés mésylés correspondants. Cependant, ces derniers ont été obtenus à des rendements après purification plus faibles que lors de la conception des précurseurs de sondes précédemment présentés. Lors de la préparation de ces composés, l'introduction du chlorure de méthane sulfonyle se fait à basse température du fait du caractère exothermique de la réaction. Cette dernière est ensuite remise à température ambiante progressivement avant le traitement. Les composés correspondants sont regroupés dans le tableau suivant (Tableau 7).

Tableau 7 Récapitulatif des molécules préparées

Sondes NanoSIMS	Sonde Raman	Sondes bimodales
(13) Rdt : 38.0%	(14) Rdt : 20.0%	(15) Rdt : 55.0%

Lors de la préparation de ces composés, des difficultés ont été rencontrées lors de leur traitement. En effet, les composés ainsi obtenus sont relativement instables et semblent se décomposer dans le temps. Il a été observé en RMN du proton l'apparition d'un signal aux alentours de 10 ppm. Ce signal apparaît sous la forme d'un singulet et correspond à la formation de l'acide méthane sulfonique. Il existe dans la littérature des composés dont la structure est très proche du composé n°13^[75] et du composé n°15^[76] les conditions de préparations sont donc très proches de ce qui a été décrit dans la littérature.

Comme lors de la présentation du marquage des anticorps, il est possible de séparer les molécules préparées en trois catégories. La première serait appliquée en imagerie NanoSIMS par l'intermédiaire de la sonde 13. La deuxième famille serait dédiée à la spectroscopie Raman par l'intermédiaire de la sonde 14. Enfin la troisième catégorie concernerait une application en imagerie Raman et NanoSIMS par l'intermédiaire de la sonde bimodale 15.

Les composés synthétisés sont comme dans le cas du marquage des anticorps sont utilisables et prêt pour le marquage. Les composés mésylés sont très réactifs et leur conservation se fait au congélateur sous atmosphère d'argon. De plus les sondes mésylés semblent très réactives et il reste des essais à effectuer pour complètement maîtriser leur réactivité dans le cadre du projet sur le marquage de l'ATP-Y-SH.

Conclusion

Ce chapitre a permis de mettre en évidence le rôle majeur de la chimie organique et les stratégies de synthèse mise en place dans le but de créer des sondes moléculaires pour permettre l'observation et l'étude approfondie des organites cellulaires. Cependant pour concevoir ce type de molécules il est nécessaire d'effectuer un travail à l'interface entre la chimie et la biologie. En mettant en corrélation ces deux sciences, il a été possible de mettre au point une stratégie de synthèse dans le cadre de l'élaboration de sondes moléculaires pour l'imagerie par spectroscopie Raman et spectrométrie NanoSIMS.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la préparation de sondes moléculaires dans le cadre du marquage des anticorps. Pour se faire nous avons décidé de préparer des composés ayant un groupement fonctionnel réactif permettant l'accroche covalente sur les fonctions amine des anticorps. Nous avons procédé à la préparation d'esters de succinimide à partir de différentes molécules contenant une fonction acide carboxylique. Les molécules synthétisées comportent un groupement fonctionnel visible par spectroscopie Raman et/ou par imagerie NanoSIMS. Les sondes moléculaires dont la structure est composée d'une fonction visible en NanoSIMS (groupement halogénés) et en spectroscopie Raman (fonction alcyne) ont été synthétisées à partir d'une réaction de couplage de Sonogashira. Les molécules obtenus de cette façon sont prêtes à l'emploi et vont être exploités dans la suite de ce manuscrit.

A partir du couplage de Sonogashira, il a ensuite été envisagé de créer une nouvelle catégorie de sondes moléculaires qui vise le marquage de l'ATP- γ -SH. Dans un premier temps nous avons mis au point une série de précurseurs réactionnels qui combine une fonction alcyne et un groupement halogéné. Par la suite une fonctionnalisation de cette molécule a été faite afin de permettre le marquage. Pour se faire nous avons utilisé le chlorure de méthane sulfonyle afin de préparer les esters correspondants. Cette voie de synthèse donne accès à de nombreux composés qui sont utilisés comme intermédiaire réactionnel ou agent d'alkylation.

Il a été possible de synthétiser une série de molécules permettant ce marquage. Cependant les composés obtenus semblent relativement instables du fait de la réactivité du mésylate. Il serait intéressant d'envisager de remplacer la fonction mésylate par un équivalent qui serait par conséquent moins réactif. La préparation de sondes tosylate peut éventuellement être une voie à explorer dans le futur. Il reste de nombreux tests à mener concernant cette nouvelle série de sondes et ce projet de sondes mésylates n'en est qu'à ses débuts.

Bibliographie

- [1] Schreiber, S. L.; *Organic synthesis toward small-molecule probes and drugs. PNAS.*, **2011**, 108, 6699-6702.
- [2] Kaiser, M.; Wetzel, S.; Kumar, K.; Waldmann, H.; *Biology-inspired synthesis of compounds libraries. Cell. Mol. Life. Sci.*, **2008**, 65, 1186-1201.
- [3] Luo, T.; *Organic synthesis towards small-molecule probe development. Harvard university department of Chemistry and Chemical Biology*, **2011**, 323p.
- [4] Marggraf, A. S.; *Chemical experiments made with the intention of extracting real sugar from diverse plants that grow in our lands. Geschichte der Königlichen Akademie der Wissenschaften und die schönen Buchstaben zu Berlin.*, **1747**, 3, 79-90.
- [5] Vauquelin, L. and Robiquet, P. J.; *The discovery of a new plant principle in asparagus sativus. Annales de Chimie.*, **1806**, 57, 88-93.
- [6] Anfinsen, C.; Edsall, J.; Richards, F.; *Advances in protein chemistry. N. Y. Press.*, **1972**, 458p.
- [7] Rosenfeld, L.; *Vitamine-vitamin. The early years of discovery. Clin. Chem.*, **1997**, 43, 680-685.
- [8] Raju, T. N.; *The Nobel Chronicles. Lancet.*, **1999**, 353, 1807-1807.
- [9] Tavassoli, A.; Hamilton, A. D.; Spring, D. R.; *Small molecules in biology. Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40, 4269-4270.
- [10] Bij, A.; *Molecular imaging: spawning a new melting-pot for biomedical imaging. Biomed. Imaging. Interv. J.*, **2006**, 2, e28.
- [11] Zlotkin, E.; Shulov, A.; *Recent studies on the mode of action of scorpion neurotoxins. A review. Toxicol.*, **1969**, 7, 217-221.
- [12] Carlsson, A.; *Early psychopharmacology and the rise of modern brain research. J. Psychopharmacol.*, **1990**, 4, 120-126.
- [13] Blumberg, P. M.; *Protein Kinase C as the Receptor for the Phorbol Ester Tumor Promoters: Sixth Rhoads Memorial Award Lecture. Cancer. Res.*, **1988**, 48, 1-8.
- [14] Kresge, N.; Somoni, R. D.; Hill, R. L.; *Yasutomi Nishizuka's Discovery of Protein Kinase C. J. Biol. Chem.*, **2010**, 285, e15-e16.
- [15] Ohashi, T.; Kiehart, D. P.; Erickson, H. P.; *Dual labeling of the fibronectin matrix and actin cytoskeleton with green fluorescent protein variants. J. Cell. Sci.*, **2001**, 115, 1221-1229.
- [16] Park, C.-W.; Rhee, Y.-S.; Vogt, F. G.; Hayes Jr, D.; Zwischenberger, J. B.; Deluca, P. P.; Mansour, H. M.; *Advances in microscopy and complementary imaging techniques to assess the fate of drugs ex vivo in respiratory drug delivery. Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **2012**, 64, 344-356.
- [17] Gross, L.; *Recent advances in submolecular resolution with scanning probe microscopy. Nature. Chem.*, **2011**, 3, 273-278.
- [18] Suzuki, T.; Matsuzaki, T.; Hagiwara, H.; Aoki, T.; Takata, K.; *Recent Advances in Fluorescent Labeling Techniques for Fluorescence Microscopy. Acta. Histochem. Cytochem.*, **2007**, 40, 131-137.
- [19] Valeur, B.; *molecular fluorescence: Principles and applications. Wiley-VCH* **2002**, 399p.
- [20] Gonçalves, M. S. T.; *Fluorescent labeling of biomolecules with organic probes. Chem. Rev.*, **2009**, 109, 190-212.
- [21] Spötl, L.; Sarti, A.; Dietrich, M. P.; Möst, J.; *Cell Membrane Labeling With Fluorescent Dyes for the Demonstration of Cytokine-Induced Fusion Between Monocytes and Tumor Cells. Cytometry.*, **1995**, 21, 160-169.
- [22] Arthanari, H.; Basu, S.; Kawano, T. L.; Bolton, P. H.; *Fluorescent dyes specific for quadruplex DNA. Nucleic. Acids. Res.*, **1998**, 26, 3724-3728.

- [23] Gruit, M.; *Synthèse de molécules sondes pour l'imagerie du vivant et précurseurs pour l'alphathérapie déclenchée*. Science chimique de Rennes UMR 6226 Equipe catalyse et organométalliques, **2008**, 247p.
- [24] Ametamey, S. M.; Honer, M.; Schubiger, P. A.; *Molecular imaging with PET*. *Chem. Rev.*, **2008**, 108, 1501-1516.
- [25] Phelps, M. E.; *PET: the merging of biology and imaging into molecular imaging*. *J. Nucl. Med.*, **2000**, 41, 661-681.
- [26] Yu, J.; *Review of 18F-FDG synthesis and quality control*. *Biomed. Imag. Interv. J.*, **2006**, 2, 1-11.
- [27] Pacak, J.; Zdenek, T.; Cerny, M.; *Synthesis of 2-Deoxy-2-fluoro-D-glucose*. *Chem. Commun.*, **1969**, D, 77-77.
- [28] F.W. Wehrli; *Multi-scale assessment of bone architecture and function by nuclear magnetic resonance imaging*. *J. Clin. Densitometry: Assessment of Skeletal Health.*, **2009**, 12, 110-110.
- [29] Waiczie, H.; Lepore, S.; Drechsler, S.; Qadri, F.; Purfürst, B.; Sydow, K.; Dathe, M.; Kühne, A.; Lindel, T.; Hoffmann, W.; Pohlmann, A.; Niendorf, T.; Waiczies, S.; *Visualizing Brain Inflammation with a Shingled-Leg Radio-Frequency Head Probe for 19F/1H MRI*. *Sci. Rep.*, **2013**, 3, 1280, 1-10.
- [30] Mikawa, M.; Kato, H.; Okumura, M.; Narazaki, M.; Kanazawa, Y.; Miwa, N.; Shinohara, H.; *Paramagnetic Water-Soluble Metallofullerenes Having the Highest Relaxivity for MRI Contrast Agents*. *Bioconjugate.Chem.*, **2001**, 12, 510-514.
- [31] Schreiber, S. L.; *Molecular diversity by design*. *Nature.*, **2009**, 457, 153-154.
- [32] Galloway, W. R. J. D.; Isidro-Llobet, A.; Spring, D. R.; *Diversity-oriented synthesis as a tool for the discovery of novel biologically active small molecules*. *Nat. Commun.*, **2010** 1, 1-13.
- [33] Woodward, R. B. and Hoffmann, R.; *The conservation of orbital symmetry*. *Angew. Chem. Int.*, **1969**, 8, 781-932.
- [34] Corey, E. J. and Cheng, X.; *The logic of chemical synthesis*. Wiley **1989**, 436p.
- [35] Briley-Saebo, K. C.; Shaw, P. X.; Mulder, W. J. M.; Choi, S. H.; Vucic, E.; Aguinaldo, J. G. S.; Witstum, J. L.; *Targeted Molecular Probes for Imaging Atherosclerotic Lesions With Magnetic Resonance Using Antibodies That Recognize Oxidation-Specific Epitopes*. *Circ.*, **2008**, 117, 3206-3215.
- [36] Dubertret, B.; *Un nouveau marqueur fluorescent pour l'imagerie in vivo*. *médecine. sciences.*, **2003**, 19, 532-534.
- [37] Boger, D. L.; Jiang, W.; Goldberg, J.; *Convergent Solution-Phase Combinatorial Synthesis with Multiplication of Diversity through Rigid Biaryl and Diarylacetylene Couplings*. *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 7094-7100.
- [38] Walsh, D. P. and Chang, Y. T.; *Chemical Genetics*. *Chem.Rev.*, **2006**, 106, 2476-2530.
- [39] Galloway, W. R. J. D.; Bender, A.; Welch, M.; Spring, D. R.; *The discovery of antibacterial agents using diversity-oriented synthesis*. *Chem. Commun.*, **2009**, 2446-2462.
- [40] Petry, R.; Schmitt, M.; Popp, J.; *Raman Spectroscopy - a prospective tool in the life science*. *ChemPhysChem.*, **2003**, 4, 14-30.
- [41] McMahon, G.; Glassner, B. J.; Lechene, C.; *Quantitative Imaging of Cells with Multi-Isotope Imaging Mass Spectrometry (MIMS) – Nanoautography with Stable Isotope Tracers*. *Appl. Surf. Sci.*, **2006**, 252, 6895-6906.
- [42] Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N.; *A convenient synthesis of acetylenes : catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromoalkenes, iodoarenes and bromopyridines*. *Tetrahedron. Lett.*, **1975**, 16, 4467-4470.
- [43] Stephens, R. D. and Castro, C. E.; *The Substitution of Aryl Iodides with Cuprous Acetylides. A Synthesis of Tolanes and Heterocyclics*. *J. Org. Chem.*, **1963**, 28, 3313-3315.
- [44] Chinchilla, R. and Najera, C.; *Recent advances in Sonogashira reactions*. *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40, 5084-5121.

- [45] Chinchilla, R. and Najera, C.; *The Sonogashira Reaction: A Booming Methodology in Synthetic Organic Chemistry*. *Chem. Rev.*, **2007**, 874-922.
- [46] Rubina, M.; Conley, M.; Gevorgyan, V.; *Dramatic Acceleration of the Pd-Catalyzed[4+2] Benzannulation Reaction of Enynes and Diynes in the Presence of Lewis Acids and Bases: Expanded Scope and New Mechanistic Insights*. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 5818-5827.
- [47] Gevorgyan, V. and Yamamoto, Y.; *Palladium-Catalyzed Enyne-Yne [4+2] Benzannulation as a New and General Approach to Polysubstituted Benzenes*. *J. Organomet. Chem.*, **1999**, 576, 232-247.
- [48] Saito, S.; Uchiyama, N.; Gevorgyan, V.; Yamamoto, Y.; *Palladium-Catalyzed cross-Benzannulation of Amino-enynes with Diynes. Highly Regioselective Synthesis of Polysubstituted Anilines*. *J. Org. Chem.*, **2000**, 65, 4338-4341.
- [49] Hidebrandt, D.; Hüggenberg, W.; Kanthak, M.; Plöger, T.; Müller, I. M.; Dyker, G.; *A platinum-catalyzed annulation reaction leading to medium-sized rings*. *Chem. Commun.*, **2006**, 2260-2261.
- [50] Nicolaou, K.; Bulger, P.; Sarlah, D.; *Palladium-catalyzed cross-coupling reactions in total synthesis*. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 18, 4442-4489.
- [51] Novak, Z.; Nemes, P.; Kotschy, A.; *Tandem Sonogashira Coupling: An Efficient Tool for the Synthesis of Diarylalkynes*. *Org. Lett.*, **2004**, 6, 4917-4920.
- [52] Beletskaya, I. P.; Latyshev, G. V.; Tsvetkov, A. V.; Lukashev, N. V.; *The nickel-catalyzed Sonogashira-Hagihara reaction*. *Tetrahedron. Lett.*, **2003**, 44, 5011-5013.
- [53] Urgaonkar, S. and Verkade, J. G.; *Ligand-, Copper-, and Amine-Free Sonogashira Reaction of Aryl Iodides and Bromides with Terminal Alkynes*. *J. Org. Chem.*, **2004**, 69, 5752-5755.
- [54] Manjappa, A. S.; Chaudhari, K. R.; Venkattaraju, M. P.; Dantuluri, P.; Nanda, B.; Sidda, C.; Sawant, K. K.; Ramachandra Murthy, R. S.; *Antibody derivatization and conjugation strategies: Application in preparation of stealth immunoliposome to target chemotherapeutics to tumor*. *J. Control. Release.*, **2010**, 150, 2-22.
- [55] Anderson, G. W.; Callahan, F. M.; Zimmerman, J. E.; *Synthesis of N-Hydroxysuccinimide Esters of Acyl Peptides by the Mixed Anhydride Method*. *J. Am. Chem. Soc.*, **1966**, 89, 178-178.
- [56] Anderson, G. W.; Zimmerman, J. E.; Callahan, F. M.; *The Use of Esters of N-Hydroxysuccinimide in Peptide Synthesis*. *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, 86, 1839-1842.
- [57] Han, S.-Y. and Kim, Y.-A.; *Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis*. *Tetrahedron.*, **2004**, 60, 2447-2467.
- [58] Wilbur, D. S. and Hylarides, M. D.; *Radiolabeling of a monoclonal antibody with N-succinimidyl para 77 Br Bromobenzoate*. *Int. J. Radiat. Appl. Instrum. Part B.*, **1991**, 18, 363-365.
- [59] Khalaj, A.; Beiki, D.; Rafiee, H.; Najafi, R.; *a new and simple synthesis of N-Succinimidyl-4-(127-125-I iodobenzoate involving a microwave accelerated iodination step*. *J. Label. Compd. Radiopharm.*, **2001**, 44, 235-240.
- [60] Vaidyanathan, G. and Zalutsky, M. R.; *Labeling Proteins with Fluorine-18 using N-succinimidyl 4-[¹⁸F]Fluorobenzoate*. *Int. J. Radiat. Appl. Instrum. Part B.*, **1992**, 19, 275-281.
- [61] Zheng, H.; Zhan, X. Q.; Bian, Q.-N.; Zhang, X.-J.; *Advances in modifying fluorescein and rhodamine fluorophores as fluorescent chemosensors*. *Chem. Commun.*, **2013**, 49, 429-447.
- [62] Rosssouw, D. D.; *Radioiodine labelling of a small chemotactic peptide, utilizing two different prosthetic groups: A comparative study*. *J. Label. Compd. Radiopharm.*, **2008**, 51, 48-53.
- [63] Beiki, D.; Shahhosseinni, S.; Khalaj, A.; Eftekhari, M.; *Increased selectivity in inflammatory site identification via labelling of IgG with N-succinimidyl-4-[¹²⁵I]iodobenzoate*. *J. Label. Compd. Radiopharm.*, **2002**, 45, 927-934.
- [64] Vaidyanathan, G.; Affleck, D. J.; Zalutsky, M. R.; *Method for Radioiodination of Proteins Using N-Succinimidyl 3-Hydroxy-4-iodobenzoate*. *Bioconjug. Chem.*, **1997**, 8, 724-729.

- [65] Khalaj, A.; Beiki, D.; Rafiee, H.; Najfi, R.; *A New and Simple Synthesis of N-Succinimidyl-4 Iodobenzoate Involving a Microwave-accelerated Iodination Step. J. Label. Compd. Radiopharm.*, **2001**, 44, 235-240.
- [66] Aguilar-Bryan, L. and Bryan, J.; *Molecular Biology of Adenosine Triphosphate Sensitive Potassium Channels. Endocr. Rev.*, **1999**, 20, 101-135.
- [67] Langen, P. and Hucho, F.; *Karl Lohmann and the Discovery of ATP. Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, 47, 1824-1827.
- [68] Todd, A. R.; *Synthesis in the study of nucleotides. J. Chem. Soc.*, **1946**, 647-653.
- [69] Allen, J. J.; Lazerwith, S. E.; Shokat, K. M.; *Bio-orthogonal Affinity Purification of Direct Kinase Substrates. J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 5288-5289.
- [70] Looker, J. H.; *The esterification of certain nitrophenols with methanesulfonyl chloride. J. Org. Chem.*, **1952**, 17, 510-514.
- [71] Blackwells, W.; *Encyclopedia of reagents for organic synthesis.*, **1995**, 5, 3307 .
- [72] Sandford, G.; *Elemental fluorine in organic chemistry (1997-2006). J. Fluorine Chem.*, **2007**, 128, 90-104.
- [73] Smart, B. E.; *Fluorine substituent effects (on bioactivity). J. Fluorine Chem.*, **2001**, 109, 3-11.
- [74] Severin, R.; Reimer, J.; Doye, S.; *One-Pot Procedure for the Synthesis of Unsymmetrical Diarylalkynes. J. Org. Chem.*, **2010**, 75, 3518-3521.
- [75] Vastra, J. and Saint-jalmes, L.; *Catalytic Mesylation of Alcohols: A Highly Productive Process for Trifluoroethyl Mesylate. Org. Process Res. Dev.*, **2006**, 10, 194-197.
- [76] Crossland, R. K. and Servis, K. L.; *A Facile Synthesis of Methanesulfonate Esters. J. Org. Chem.*, **1970**, 35, 3195-3196.
- [77] Yoshida, Y.; Sakakura, Y.; Aso, N.; Okada, S.; Tanabe, Y.; *Practical and Efficient Methods for Sulfonylation of Alcohols Using Ts(Ms)Cl / Et₃N and Catalytic Me₃N.HCl as Combined Base: Promising Alternative to Traditional Pyridine. Tetrahedron.*, **1999**, 2183-2192.
- [78] Storck, P.; Aubertin, A.-M.; Grierson, D. S.; *Tosylation/mesylation of 4-hydroxy-3-nitro-2-pyridinones as an activation step in the construction of dihydropyrido[3,4-b] benzof [1,4]thiazepin-1-one based anti-HIV agents. Tetrahedron. Lett.*, **2005**, 46, 2919-2922.
- [79] Webster, K. T.; Eby, R.; Schuerch, C.; *Selective demesylation of 2-O-(methylsulfonyl)-d-mannopyranoside derivatives with sodium amalgam and 2-propanol. Carbohydr. Res.*, **1983**, 123, 335-340.
- [80] Merlin, P.; Breakman, J. C.; Daloze, D.; *Stereoselective synthesis of (±)-tetraoponerine-8, a defence alkaloid of the ant Tetraoponera sp. Tetrahedron. Lett.*, **1988**, 29, 1691-1694.
- [81] Halmos, T.; Santarromana, M.; Antonikas, K.; Scherman, D.; *Synthesis of O-methylsulfonyl derivatives of D-glucose as potential alkylating agents for targeted drug delivery to the brain. Evaluation of their interaction with the human erythrocyte GLUT1 hexose transporter. Carbohydr. Res.*, **1997**, 15-21.
- [82] Pilgrim, W. and Murphy, P. V.; *alpha-Glycosphingolipids via Chelation-Induced Anomerization of O and S-Glucuronic and Galacturonic Acid Derivatives. Org. Lett.*, **2009**, 11, 939-942.

Experimental part

Experimental part

General details

All manipulations are performed on a vacuum line (argon). The starting materials and reagents, purchased from Sigma Aldrich and Acros Organics, are used without further purification. THF and toluene used for catalysis reaction are dried and distilled before use over sodium and benzophenone. DCM and (iPr)₂NH are dried over CaH₂ before use. Other solvents are analytic grade and used without further purifications. The triethylamine and diisopropylamine used for Sonogashira coupling are distilled before use.

NMR Analyses - ¹H NMR spectra are recorded on Bruker DPX 300 at 300 MHz, ¹³C and ¹⁹F NMR spectra are recorded on a Bruker 400 MHz proton Avance III 400. The usual solvent was CDCl₃.

HRMS (EI) - High resolution mass spectra are obtained on a double focalization VARIAN MAT 311 (EI) or a ZabSpecTOF Micromass (ESI) at CRMPO, and AccuTOF™DART® at Procadec laboratory University of Rennes.

TLC Analysis - the TLC plate used was Silica gel 60 F254, aluminium sheets, Merck; the samples were eluted with eluent mixture (indicated in the different protocol) and revealed under UV lamp at 254 nm.

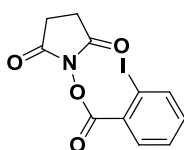
Raman analysis - analysis were performed on a Jobin Yvon Horiba LabRam HR 800 system using a 632.818 nm wavelength excitation line and a x100 (Olympus LMPlanFI, NA 0.80) objective.

1) Preparation of *N*-hydroxysuccinimido esters

- Typical procedure

In a round necked flask under inert atmosphere was prepared a solution of carboxylic acid derivative (**A1**, **A2**, **A3**, **A4**, **A5**) (2.17 mmol) in dry THF (7 mL). The solution was treated successively by *N*-hydroxysuccinimide (**B**) (2.39mmol) and *N,N* dicyclohexylcarbodiimide. The solution was stirred over night at room temperature and under inert atmosphere. The reactionnal mixture was filtered and dried under vaccum. The compound was recrystallized in isopropanol.

2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 2-iodobenzoate (1)



Chemical formula : C₁₁H₈O₄NI

Chemical composition (%) Calc.: C: 38.29; H: 2.34; N: 4.06; I: 36.77; O: 18.54 Exp C: 38.34; H: 2.40; N: 4.01; I: 36.45; O: 18.72;

HRMS (ESI) found: 367.9457 [M+Na], Requires: 367.9459 [M+Na]

MW: 344.95

Aspect: white powder

Starting materials: (2-iodophenyl) carboxilic acid (**A1**), *N*-hydroxysuccinimide (**B**)

R_f: 0.17 (eluent: hexane/ethyl acetate, 1/1)

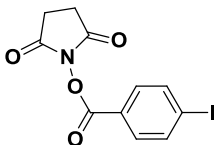
Yield: 48%

¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): δ 8.13 (m, 2H -CH_{arom}); 7.52 (m, 1H, -CH_{arom}); 7.31 (m, 1H -CH_{arom}); 2.94 (s, 4H, 2x-CH₂)

¹³C-NMR (400MHz, CDCl₃): δ 168.95 (s, 2xC=O_{succinimide}); 161.28 (s, C=O_{acid}); 142.15 (s, CH_{aromatique}); 134.56 (s, CH_{aromatique}); 132.25 (s, CH_{aromatique}); 129.42 (s, C_{quat} aromatique-C=O); 128.17 (s, CH_{aromatique}); 95.74 (s, C_{quat} aromatique); 25.71 (s, 2C_{succinimide ring})

Raman (cm⁻¹, 632.818nm): 3081.44 (Medium, CH stretching); 3064.85 (Strong, CH stretch); 3017.37 (Weak, CH); 2990.52 (Weak, CH); 2938.17 (Strong, CH); 1796.69 (Strong); 1769.27 (Strong); 1577.24 (Strong); 1565.71 (Weak); 1463.15 (Weak); 1421.46 (Medium); 1404.29 (Weak); 1288.68 (Weak); 1265.81 (Weak); 1224.22 (Strong); 1163.57 (Medium); 1058.64 (Weak); 1025.94 (Strong); 990.82 (Weak); 842.71 (Strong); 742.21 (Medium); 677.17 (Medium); 641.45 (Strong); 606.75 (Medium); 501.61 (Broad weak); 410.95 (Medium); 330.39 (Weak); 252.71 (Medium); 130.80 (Strong)

2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 4-iodobenzoate (2)



Chemical formula : C₁₁H₈O₄NI

Chemical composition (%) Calc: C: 38.29; H: 2.34; N: 4.06; I: 36.77, O: 18.54; Exp C: 38.34; H: 2.40; N: 4.01; I: 36.45; O: 18.72;

HRMS (ESI) found: 367.9395 [M+Na], requires: 367.9392 [M+Na]

MW: 344.95

Aspect: white powder

Starting materials: (4-iodophenyl) carboxylic acid (A2), N-hydroxysuccinimide (B)

R_f: 0.15 (eluent: hexane/ethyl acetate, 7/3)

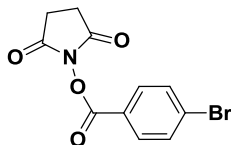
Yield: 55 %

¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): δ 8.10 (d, 2H, -CH_{arom}⁻, J 8.49Hz); 7.80 (d, 2H, -CH_{arom}⁻, J 8.45 Hz); 3.12 (s, 4H, 2-CH₂ succinimide ring)

¹³C-NMR (400MHz, CDCl₃): δ 169.03 (s, 2x C=O_{succinimide}); 161.60 (s, -C=O_{acid}); 138.33 (s, C_{arom}); 131.67 (s, 2x C_{arom}); 124.62 (s, C_{arom}-C=O); 103.36 (s, -C_{arom}-I); 25.67 (s, 2x -CH₂- succinimide ring)

Raman (632.818 nm): 3000.02 (CH_{stretch}, Medium); 1796.07 (Strong); 1777.0 (Strong); 1583.94 (C=C arom); 1238.33 (Medium); 1192.16 (Medium); 1059.61 (Medium); 1016.75 (Weak); 848.76 (Medium); 752.64 (Weak); 691.26 (C-I, Strong); 629.35 (Weak)

2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 4-bromobenzoate (3)



Chemical formula: C₁₁H₈O₄NBr

Chemical composition (%) Calc: C: 44.32; H: 2.71; N: 5.06; Br: 28.81, O: 21.47 Exp C: 44.30; H: 2.71; N: 5.06; O: 23.11; Br: 31.01

HRMS (ESI) found: 297.9712 [M⁺], require: 297.9715 [M⁺]

MW : 298.09 g/mol

Aspect: yellow powder

Starting materials: (4-bromo phenyl) carboxylic acid (A3), N-hydroxysuccinimide (B)

R_f: (eluent: hexane/ethyl acetate, 1/1)

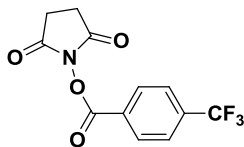
Yield: 61 %

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.02 (d, 2H, -CH_{arom}⁻, J 8.50Hz); 7.69 (d, 2H -CH_{arom}⁻, J 8.51Hz); 2.93 (s, 2x -CH₂-)

¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 169.04 (s, 2 C=O_{succinimide}); 161.31 (s, 1C=O_{ester}); 132.18 (s, 2 C_{aromatique}); 132.04 (s, 2 C_{aromatique}); 130.48 (s, 1 C_{quaternaire aromatique}-C=O); 124.06 (s, 1C_{quaternaire aromatique}-Br); 25.42 (s, 2C_{succinimide ring})

Raman (cm⁻¹, 632.818nm): 3017.28 (Strong, CH stretching); 1791.95 (Strong); 1779.76 (Medium); 1587.07 (Strong), 1404.74 (Weak); 1241.43 (Medium large band); 1182.78 (Medium); 1069.22 (Medium); 1019.63 (Weak); 850.22 (Strong); 699.14 (Strong); 625.35 (Strong); 332.40 (Strong)

2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 4-(trifluoromethyl)benzoate (4)



Chemical formula: C₁₂H₈O₄NF₃

Chemical composition (%) Calc: C: 50.19; H: 2.81; N: 4.88; F: 19.85, O: 22.28; **Exp** C: 50.38; H: 2.81; F: 4.90; O: 22.36

HRMS (ESI) found: 367.9457 [M+Na], require: 367.9465 [M+Na]

MW: 287.19

Aspect: yellow powder

Starting materials: (4-trifluoromethylphenyl) carboxylic acid (A4), N-hydroxysuccinimide (B)

R_f: (eluent: hexane/ethyl acetate, 1/1)

Yield: 69.9%

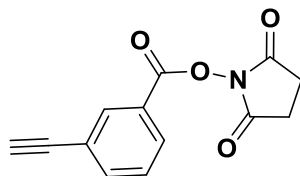
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.29 (d, 2H, -CH_{arom}- J8.12 Hz); 7.82 (d, 2H, -CH_{arom}- J8.63 Hz); 2.95 (s, 4H, 2x-CH₂succinimide ring)

¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 168.87 (s, 2x C=O_{succinimide}); 160.87 (s, 1x C=O_{ester}); 136.25 (q, C_{quat}-CF₃ J^d 0.79Hz; J³ 0.53 Hz; J² 0.26Hz; J¹ 0.22Hz); 131.01 (s, C_{quat}-C=O_{acid}); 125.93 (q, -CF₃ J^d 6.51Hz; J³ 4.34Hz; J² 2.17Hz; J¹ 2.17Hz); 121.90 (s, CH_{arom}); 119.32 (s, CH_{arom}); 25.68 (2xCH₂)

¹⁹F-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ -63.42 (CF₃-)

Raman (cm⁻¹, 632.818nm): 3096.21 (Strong, CH stretching); 199.04 (Strong); 1776.72 (Weak); 1621.48 (Strong); 1589.15 (Weak); 1328.02 (Medium); 1241.63 (Medium); 1071.46 (Medium); 1027.56 (Strong); 1000.39 (Strong); 857.17 (Strong); 788.54 (Strong); 739.27 (Strong); 684.91 (Strong); 634.93 (Strong); 608.59 (Strong)

3-Ethynylbenzyl N-succinimide ester (5)



Chemical formula: C₁₃H₉O₄N

Chemical composition (%) Calc: C: 64.20; H: 3.88; N: 5.76; O: 26.34; **Exp** C: 63.64; H: 3.88; N: 5.50; O: 26.11

HRMS (ESI) found: 246.2637 [M+Na], require: 246.2645 [M+Na]

MS: 243.05

Aspect: yellow powder

Starting materials: 4-ethynyl benzoic acid (A5), N-hydroxysuccinimide (B)

R_f: 0.45 (eluent: hexane/ethyl acetate, 1/1)

Yield: 40 %

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.28 (t, 1H, -CH_{arom}-, J¹ 1.52 Hz, J² 3.08 Hz,); 8.12 (dt, 1H, -CH_{arom}-, J¹ 7.96 Hz, J² 2.96 Hz, J³ 1.52 Hz); 7.80 (dt, 1H, -CH_{arom}-, J¹ 7.80 Hz, J² 2.84 Hz, J³ 1.40 Hz); 8.12 (td, 1H, -CH_{arom}-, J¹ 0.52 Hz, J² 0.56 Hz); 2.95 (s, 4H, -CH₂-succinimide)

¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 168.99 (s, C=O_{succinimide}); 161.16 (s, C=O_{acide}); 138.08 (s, C_{aromatique}-C=O); 134.07 (s, C_{aromatique}-C-C-C=O_{acide}); 130.56 (s, CH_{aromatique}); 128.99 (s, CH_{aromatique}); 125.61 (s, CH_{aromatique}); 123.36 (s, CH_{aromatique}); 81.79 (s, C_{aromatique}-C_{alcyne}); 79.08 (s, H-C_{alcyne}); 25.68 (s, 2x CH₂)

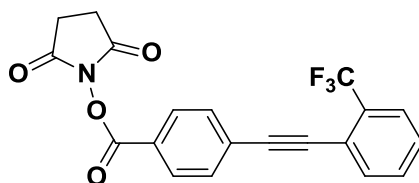
Raman (cm^{-1} , 632.818nm): 3004.73 (Strong, CH stretching); 2117.11 (Strong, Alkyne band stretching); 1799.04 (Weak); 1774.69 (Weak); 1604.82 (Weak); 1259.22 (Weak); 1170.62 (Weak); 998.12 (Strong, CH stretching aromatic ring); 817.71 (Weak); 669.48 (Medium)

2) Sonogashira coupling of succinimide esters compounds

- Typical procedure.

In a schlenk tube under inert atmosphere was prepared a solution of N-hydroxysuccinimide ester derivative (**2**) (0, 29 mmol). In dry THF (2,5 mL). The solution was treated by diisopropyl amine (0,151 mL) and stirred for 10 min (solution **A**). In gloves box, was prepared the acetylenic derivative (0, 29 mmol) in dry THF, dichloro-(bis-triphenyl)phosphine palladium (0, 02 mmol) and copper iodide (0,02 mmol) was then added (Solution **B**). **A** solution was transferred to **B** solution under inert atmosphere. The reaction mixture was stirred for 24h at 50°C. The mixture was filtered and washed with diethyl ether (5 mL). The solvent was removed under rotary evaporator to afford a solid. The crude product was purified by silica gel chromatography in hexane/ ethyl acetate (1/1) to afford after evaporation of the corresponding fraction the Sonogashira coupling compounds.

2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 4-((2-(trifluoromethyl)phenyl)ethynyl)benzoate (**6**)



Chemical formula: $\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{O}_4\text{NF}_3$

Chemical composition (%) Calc: C: 59.65; H: 2.81; N: 3.88; F: 18.45; O: 15.28; Exp C: 58.26; H: 3.31; N: 3.04; O: 15.51; F: 19.86

HRMS (ESI) found: 410.0617 [M+Na], require: 410.0619 [M+Na]

MS: 387.31

Aspect: orange powder

Starting materials: 2, 5-dioxopyrrolidin-1-yl 4-iodobenzoate (**2**), 1-ethynyl-2-(trifluoromethyl)benzène (**A6**)

R_f: 0.64 (eluent: hexane/ethyl acetate, 1/1)

Yield: 70 %

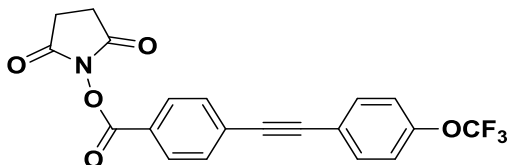
¹H-NMR (300 MHz CDCl_3): δ 8.20 (d, 2H, 2x- CH_{arom} , J 8.615 Hz); 8.16 (d, 2H, - CH_{arom} , J 8.603 Hz); 7.72 (m, 1H, - CH_{arom}); 7.56 (m, 1H, - CH_{arom}); 7.48 (m, 1H, CH_{arom}); 2.95 (s, 4H, 2x- CH_2 -succinimide ring)

¹³C-NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 169.07 (s, 2x N-C=O); 169.00 (s, C-C=O); 138.33 (s, C_{arom}); 133.97 (s, C_{arom}); 131.94 (s, C_{arom}); 131.53 (s, C_{arom}); 130.51 (s, C_{arom}); 128.77 (s, C_{arom} - C_{alkyne}); 125.99 (s, $\text{CH}-\text{C}_{\text{arom}}-\text{CF}_3$); 93.37 (s, C_{alkyne}); 89.49 (s, C_{alkyne}); 25.69 (s, 2x - CH_2 -)

¹⁹F-NMR (400 MHz, CDCl_3): δ -62.21 (s, CF_3)

Raman (632.818 nm): 2228.27 (Strong, C alkyne band); 2180.58 (Weak); 1791.01 (Weak); 1772.73 (Medium); 1602.75 (Strong); 1491.21 (Weak); 1264.57 (Weak); 1184.44 (Weak); 1142.33 (Strong); 1031.44 (Medium)

2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 4-((4-(trifluoromethoxy)phenyl)ethynyl)benzoate (7)



Chemical formula: C₂₀H₁₂O₅NF₃

Chemical composition Calc: C: 59.56; H: 3.00; N: 3.47; F: 14.13, O: 19.83; Exp C: 59.27; H: 3.70; N: 2.90; O: 18.07; F: 14.87

HRMS (ESI) found: 426.0560 [M+Na], require 426.0564 8.16 [M+Na]

MW : 403.31 g/mol

Aspect: Brown powder

Starting materials: 2, 5-dioxopyrrolidin-1-yl 4-iodobenzoate (2), 1-ethynyl-4-(trifluoromethoxy)benzene (A7)

R_f: 0.65 (eluent: hexane/ethyl acetate, 1/1)

Yield: 71 %

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.15 (d, 2H, -CH_{arom}, J 8.443 Hz); 7.67 (d, 2H, -CH_{arom}, J: 8.443 Hz); 7.60 (d, 2H, -CH_{arom}, J 8.803 Hz); 7.26 (d, 2H, -CH_{arom}); 2.95 (s, 4H, 2x -CH₂-succinimide ring)

¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 169.08 (s, N-C=O); 161.34 (s, O-C=O); 149, 46 (s, C-CO=O); 138.33 (s, C-O-CF₃); 133.39 (s, CH_{arom}); 131.67 (s, CH_{arom}); 130.53 (s, CH_{arom}); 124.57 (s, CH_{arom}); 120.94 (s, CH_{arom}); 92.24 (s, C_{alkyne}-CH_{arom(a)}); 88.95 (s, C_{alkyne}-C_{arom(c)}); 25.69 (s, 2x CH₂)

¹⁹F-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ -57.75 (s, O-CF₃)

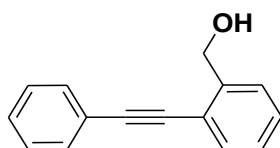
Raman (632.818 nm): 2225.27 (Strong, Alkyne stretching); 1794 (Weak); 1772.73 (weak); 1607.96 (Strong); 1238 (Weak); 1142.33 (Strong); 846.05 (Weak); 546.35 (Weak)

3) Sonogashira coupling of alcohol compounds

- Typical procedure.

In a schlenk tube under inert atmosphere was prepared a solution of alcohol derivative (**B1, B2**) (0, 30 mmol). in dry THF (2,5 mL). The solution was treated by diisopropyl amine (2,5 mL) and stirred for 10 min (solution **A**). In gloves box, was prepared the acetylenic derivative (**A1, A2, A3, A4**) (0, 30 mmol) in dry THF, dichloro-(bis-triphenyl)phosphine palladium (0, 02 mmol) and copper iodide (0,02 mmol) was then added (Solution **B**). **A** solution was transferred to **B** solution under inert atmosphere. The reactional mixture was stirred for 3h at 60°C. The mixture was filtered and washed with diethyl ether (5 mL). The solvent was removed under rotary evaporator to afford a pasty mixture. The crude product was purified by silica gel chromatography in heptane / DCM (3/7) to afford after evaporation of the corresponding fraction the Sonogashira coupling compounds.

(2-(2-phenylethynyl)phenyl)methanol (8)



Chemical formula: C₁₅H₁₂O

Chemical composition (%) Calc: C: 86.51; H: 5.81; O: 7.68; Exp C: 85.68; H: 5.63; O: 8.69

HRMS (ESI) found: 231.0786 [M+Na], require: 231.0782 [M+Na]

MW: 208.09 g/mol

Aspect: brown solid

Starting materials: 1-ethynylbenzene (A8), (2-iodophenyl) methanol (B1)

R_f: 0.35 (eluent: EtOAc / Heptane 2/8)

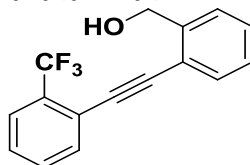
Yield: 75.8%

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.58 (m, 3H, 3 x CH_{arom}); 7.52 (m, 2H, 2x CH_{arom}); 7.40 (m, 3x CH_{arom}); 7.33 (m, 3H, CH_{arom}); 4.95 (s, 2H, -CH₂-); 2.15 (s, 1H, -OH)

¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 142.57 (s, C-CH₂-); 132.19 (s, C_{arom}); 132.05 (s, C_{arom}); 131.55 (s, C_{arom}); 128.75 (s, C_{arom}); 128.55 (s, C_{arom}); 127.29 (s, 3x C_{arom}); 122.94 (s, C_{arom}); 121.35 (s, C_{arom}); 94.19 (s, C_{alkyne}); 86.73 (s, C_{alkyne}); 64.05 (s, -CH₂-OH)

Raman (cm⁻¹, 632.818nm): 2219.59 (Strong, alkyne bond stretching); 2154.77 (Weak); 1597.53 (Strong); 1574.51 (Weak); 1483.77 (Weak); 1196.57 (Medium); 1155.66 (Strong); 1041.60 (Weak); 1005.42 (Strong, CH_{arom} Strech); 793.66 (Weak)

(2-((2-(trifluoromethyl)phenyl)ethynyl)phenyl)methanol (9)



Chemical formula: C₁₆H₁₁F₃O

Chemical composition (%) Calc: C: 69.56; H: 4.01; F: 20.63; O: 5.79 Exp C: 69.26; H: 3.99; F: 21.03; O: 5.45

HRMS (ESI) found: 299.04279 [M+Na], 299.04281 [M+Na]

MW: 276.25

Aspect: Magenta solid

Starting materials: 1-ethynyl-2-(trifluoromethyl) benzene (A9), (2-iodophenyl) methanol (B1)

R_f: 0.29 (eluent: EtOAc / Heptane 2/8)

Yield: 64%

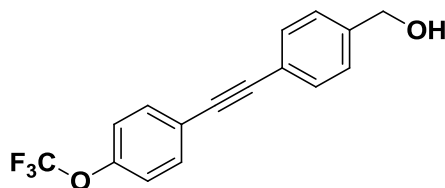
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.77 (m, 1H, 1H_{arom}); 7.52 (m, 1H, 1H_{arom}); 7.35 (m, 1H, 1H_{arom}); 7.26 (m, 1H, 1H_{arom}); 7.24 (m, 1H, 1H_{arom}); 7.20 (m, 1H, 1H_{arom}); 7.15 (m, 1H, 1H_{arom}); 4.92 (s, 2H -CH₂-O);

¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 134.14 (s, C_{sp2arom}); 131.82 (s, C_{sp2arom}); 131.41 (s, C_{sp2arom}); 131.00 (s, C_{sp2arom}); 130.46 (s, C_{sp2arom}); 130.45 (s, C_{sp2arom}); 128.09 (s, C_{sp2arom}); 125.14 (C_{sp2arom}, CF₃); 124.04 (s, C_{sp2arom}); 120.41 (s, C_{sp2arom}); 118.81 (s, C_{sp2arom}, CF₃-C=C-C_{alkyne}); 77.67 (s, C_{sp}, C_{alkyne}); 77.59 (s, C_{sp}, C_{alkyne}); 28.68 (s, C_{sp3}, CH₂-OH)

¹⁹F-NMR (400 MHz, CDCl₃): -62.23 (s, CF₃-)

Raman (cm⁻¹, 632.818nm): 3066.56 (Medium, CH stretching); 2211.52 (Strong, carbon-carbon alkyne bond stretching); 1615.77 (Strong); 1578.74 (Weak); 1479.00 (Medium); 1449.16 (Medium); 1369.69 (Very Weak); 1316.55 (Very Weak); 1286.53 (Very Weak); 1263.65 (Very weak); 1196.73 (Medium); 1150.29 (Medium Broad); 1102.39 (Medium); 1060.91 (Weak); 1041.78 (Medium); 1035.01 (Medium); 795.01 (Weak); 772.77 (Weak); 751.64 (Very Weak); 702.12 (Weak); 651.03 (Weak); 482.13 (Weak); 388.77 (Weak Broad); 337.90 (Weak); 123.15 (Weak)

(4-((4-(trifluoromethoxy) phenyl)ethynyl)phenyl)methanol (10)



Chemical formula: C₁₆H₁₁F₃O₂

Chemical composition (%) Calc: C: 64.56; H: 4.01; F: 20.63; O: 9.79; **Exp** C: 65.76; H: 3.79; F: 19.50; O: 10.70

HRMS (ESI) found: 315.0531 [M+Na], require: 315.0529 [M+Na]

MW: 292.25

Aspect: Yellow solid

Starting materials: 1-ethynyl-4-(trifluoromethoxy) benzene (A10), (4-iodophenyl) methanol (B2)

R_f: 0.31 (eluent: EtOAc / Heptane 2/8)

Yield: 45.8%

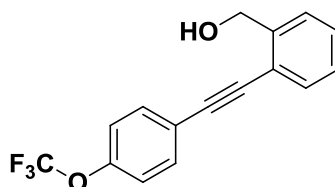
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.58 (m, 4H_{arom}); 7.22 (m, 2H_{arom}); 7.20 (m, 2H_{arom}); 4.90 (s, 2H -CH₂-O)

¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 148.71 (q, C_{sp2arom}, O-C_{arom}, J = 2 Hz); 133.12 (s, 4x C_{sp2arom}, CH-C_{alkyne}); 121.03 (s, 2x C_{sp2arom}); 119.90 (s, 2x C_{sp2arom}); 119.30 (s, 2x C_{sp2arom}, CH_{arom}=C_{alkyne}); 117.61 (s, 2x C_{sp2arom}, CH_{arom}=C_{alkyne}); 79.42 (s, C_{sp}, C_{alkyne}); 73.42 (s, C_{sp}, C_{alkyne}); 28.69 (s, C_{sp3}, CH₂-OH).

¹⁹F-NMR (400 MHz, CDCl₃): -62.23 (s, CF₃-)

Raman (cm⁻¹, 632.818nm): 3047.90 (medium, CH stretching); 2220.16 (Strong, carbon-carbon alkyne band stretching); 1613.81 (strong); 1490.79 (medium); 1288.68 (weak); 1224.22 (medium); 1163.57 (medium); 1138.03 (strong); 1099.02 (strong); 1014.62 (weak); 843.87 (weak); 752.79 (weak); 723.35 (weak); 522.28 (weak); 505.26 (weak); 461.32

2-((4-(trifluoromethoxy)phenyl)ethynyl)phenylmethanol (11)



Chemical formula: C₁₆H₁₁F₃O₂

Chemical composition (%) Calc: C: 69.56; H: 4.01; F: 20.63; O: 5.79; **Exp** C: 65.76; H: 3.79; F: 19.50; O: 10.70

HRMS (ESI) found: 315.0881 [M+Na], require 315.0886

MW: 292.25

Aspect: Yellow solid

Starting materials: 1-ethynyl-4-(trifluoromethoxy) benzene (A10), (2-iodophenyl) methanol (B1)

R_f: 0.29 (eluent: EtOAc / Heptane 2/8)

Yield: 95%

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.56 (m, 2H, 2H_{arom} near alkyne bond); 7.32 (m, 1H, 1H_{arom}); 7.29 (m, 1H, 1H_{arom}); 7.25 (m, 1H, 1H_{arom}); 7.20 (m, 1H, 1H_{arom}); 6.97 (m, 2H, 2H_{arom} near trifluoromethoxy group); 4.95 (s, 2H -CH₂-O)

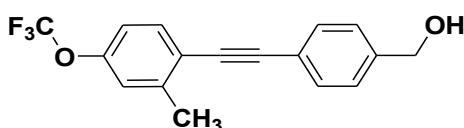
¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 148.72 (s, C_{sp2arom}); 148.69 (s, CH₂-C_{sp2arom}); 148.67 (s, 2x C_{sp2arom}); 148.65 (s, C_{sp2arom}), 133.12 (s, C_{sp2arom}); 124.47 (s, C_{sp2arom}); 121.05 (C_{sp2arom}, CF₃); 119.90 (s, 2x C_{sp2arom});

117.62(s, $C_{sp2arom}$, $CH_{arom}=C-C_{alcyne}$); 114.20(s, $C_{sp2arom}$, $CH_{arom}=C-C_{alcyne}$); 79.42 (s, C_{sp} , C_{alcyne}); 73.43(s, C_{sp} , C_{alcyne}); 28.70 (s, C_{sp3} , CH_2-OH)

$^{19}F-NMR$ (400 MHz, $CDCl_3$): -62.23 (s, CF_3 -)

Raman (cm^{-1} , 632.818nm): 3076.51 (Medium, CH stretching); 2218.16 (Strong, (Strong, carbon-carbon alkyne band stretching); 1602.22 (Strong); 1569.80 (Weak); 1508.69 (Weak); 1483.26 (medium); 1452.37 (Weak); 1195.64 (Medium); 1146.96 (Medium broad); 1097.33 (Weak); 1045.15 (Weak); 856.66 (Weak); 787.99 (Weak)

(4-(2-(2-methyl-4-(trifluoromethoxy)phenyl)ethynyl)phenyl)methanol (12)



Chemical formula: $C_{17}H_{13}F_3O_2$

Chemical composition (%) Calc: C: 66.67; H: 4.28; F: 18.61; O: 10.45; *Exp* C: 66.37; H: 4.58; F: 18.01; O: 11.05

HRMS (ESI) found: 307.0561 [M+H], require: 307.0559

MW: 306.28

Aspect: white solid

Starting materials: 1-iodo-2-methyl-4-(trifluoromethoxy) benzene (A11), (4-ethynylphenyl) methanol (B2)

R_f: 0.29 (eluent: EtOAc / Heptane 2/8)

Yield: 45.8%

^1H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.56 (d, 2 H_{arom} , J 8.40Hz); 7.52 (d, 1 $H_{arom}-C-C_{alcyne}$, J 8.52Hz); 7.39 (d, 2 H_{arom} , J 7.36Hz); 7.11 (s, 1 $H_{arom}-C-C-O$); 7.04 (d, 1 $H_{arom}-C-C-CH_3$, J 8.44Hz) 4.74 (s, 2H $-CH_2-O$); 2.55 (s, 3H CH_3)

$^{13}C-NMR$ (400 MHz, $CDCl_3$): δ 148.96 (s, $C_{aro}-C_{quat arot}-C-F$); 142.41 (s, $-C_{quat aro}-CH_2-$); 133.17 (s, 2 \times $CH_{aro}-C_{quat aro}$); 131.84 (s, $CH_{arom}-C_{quat aro}$); 128.79 (s, 2 CH_{arom}); 119.13 (s, 2 $C_{aro quat}$); 93.87 (s, 1 $C_{quat alcyne}$); 87.17 (s, 1 $C_{quat alcyne}$); 64.93 (s, CH_3); 38.43 (s, CH_2)

$^{19}F-NMR$ (400 MHz, $CDCl_3$): -57.65 (s, CF_3-O)

Raman (cm^{-1} , 632.818nm): 2218.58 (Strong, alkyne bond stretching); 1602.69 (Strong); 1579.68 (Weak); 1487.96 (Weak); 1225.63 (Weak); 1160.56 (Weak); 1142.80 (Strong); 1098.21 (Medium); 750.7

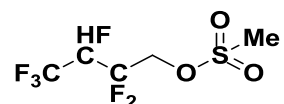
4) Mesylation of Sonogashira's precursors and primary alcohols

- Typical procedure.

In a schlenk tube under inert atmosphere was prepared a solution of trifluoromethylated alcohol (0.55 mmol, 0.064 mL) in distilled THF. The solution was cooled to 0°C. Triethyl amine was then added drop by drop (1 mL). Methane sulfonyl chloride was added to the solution at 0°C. The following mixture was stirred at -10°C for 30 min. The mixture was warmed to room temperature and stirred for 3h at room temperature. The reactionnal mixture was filtered and quenched with a solution of hydrochloric acid (10 mL, 10%) and distilled water (5mL). The reactionnal mixture was extracted with ethyl acetate (10 mL). The aqueous phase was extracted twice time with ethyl acetate

(2x 5 mL). The organic layer was quenched with a saturated solution of NaHCO₃ (10 mL) and separated one more time. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and evaporates to the rotary evaporator to afford a mesylated desired compound.

2,2,3,4,4,4-hexafluorobutyl methanesulfonate (13)



Chemical formula : C₅H₆F₆O₃S

Chemical composition (%) Calc: C: 23.08; H: 2.32; F: 43.82; O: 18.45; S: 12.32; Exp C: 23.57; H: 4.38; S: 21.47; O: 5.79; F: 45.01

HRMS (ESI) found: 261.1489 [M+H], require: 261.1485

MW: 260.15

Aspect: Yellow oil

Starting materials: 2, 2, 3, 4, 4-hexafluorobutan-1-ol (9), methanesulfonyl chloride

R_f: 0.70 (eluent: heptanes/ethyl acetate, 8/2)

Yield: 38 %

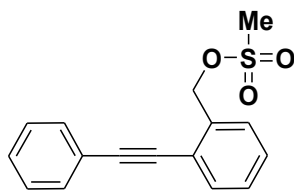
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 5.07 (m, -CHF-); 4.60 (m, -CH₂-O); 3.12 (s, S-CH₃)

¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 108.45 (s, CHF); 105.67 (s, CF₃); 98.12 (s, CF₂); 38.10 (CH₃)

¹⁹F-NMR (400 MHz, CDCl₃): -75.52 (s, 3F, -CF₃), -121.39 (s, 2F, -CF₂-), -213.27 (s, F, -CHF-)

Raman (cm⁻¹, 632.818nm): 2987.15 (Medium, CH stretch); 2944.96 (Strong, CH Stretch); 1461.01 (Medium); 1424.67 (Weak); 1368.72 (Very weak); 1290.85 (broad very weak); 1180.16 (Strong); 1041.74 (Strong); 979.44 (very weak); 948.67 (very weak); 894.74 (Weak); 839.23 (medium); 773.93 (Strong); 755.14 (Strong); 675.98 (Weak); 600.75 (Broad weak); 554.98 (Strong); 530.76 (Strong); 469.99 (Medium); 412.19 (Medium); 341.61 (Broad strong)

2-(2-phenylethynyl) benzyl methanesulfonate (14)



Chemical formula: C₁₅H₁₃O₃S

Chemical composition (%) Calc C: 67.11; H: 4.93; O: 16.76; S: 11.20; Exp C: 66.11; H: 4.73; O: 16.86; S: 11.40

HRMS (ESI) found: 287.2567 [M+H], require: 287.2569

MW: 286, 35

Aspect: Yellow oil

Starting materials: (4-(2-(2-methyl-4-(trifluoromethoxy) phenyl) ethynyl) phenyl) methanol (1), methanesulfonyl chloride

R_f: 0.32 (eluent: heptanes/ethyl acetate, 8/2)

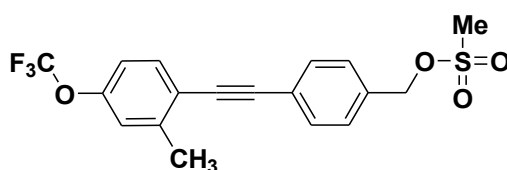
Yield: 20 %

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.55 (m, 2H, $-2\text{-CH}_{\text{arom}}-\text{C}_{\text{alkyne}}$), 7.39(m, 2H, $-2\text{-CH}_{\text{arom}}$), 7.39 (m, 1H, $-1\text{-CH}_{\text{arom}}$), 7.35 (m, 1H, $-1\text{-CH}_{\text{arom}}$), 7.33 (m, 1H, $-1\text{-CH}_{\text{arom}}$), 7.23 (m, 1H, $-1\text{-CH}_{\text{arom}}$), 7.19 (m, 1H, $-1\text{-CH}_{\text{arom}}$) 5.52 (s, CH_2), 3.00 (s, CH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 142.57 (s, C-CH_2 -); 132.19 (s, C_{arom}); 132.05 (s, C_{arom}); 131.55 (s, C_{arom}); 128.75 (s, C_{arom}); 128.55 (s, C_{arom}); 127.29 (s, 3x C_{arom}); 122.94 (s, C_{arom}); 121.35 (s, C_{arom}); 94.19 (s, C_{alkyne}); 86.73 (s, C_{alkyne}); 64.05 (s, $-\text{CH}_2\text{-OH}$); 25.15 (s, CH_3)

Raman (cm^{-1} , 632.818nm): 2943.39 (Weak, CH stretching); 2219.84 (Strong, carbon-carbon alkyne bond); 1591.54 (Strong); 1571.65 (Weak); 1481.94 (Weak); 1209.93 (Weak); 1151.37 (Weak); 1106.85 (Weak); 1041.75 (Weak); 999.91 (Medium); 770.41 (very weak); 553.78 (Very weak)

4-(2-(2-methyl-4-(trifluoromethoxy)phenyl)ethynyl)benzyl methanesulfonate (15)



Chemical formula: $\text{C}_5\text{H}_6\text{F}_6\text{O}_3\text{S}$

Chemical composition (%) Calc: C: 56.25; H: 3.93; F: 14.83; O: 16.65; S: 8.34; Exp C: 55.65; H: 4.38; F: 14.63; O: 16.35; S: 8.35

HRMS (ESI) found: 385.4178 [M+H], require: 385.4182

MW: 384.37

Aspect: Yellow oil

Starting materials: (4-(2-(2-methyl-4-(trifluoromethoxy) phenyl) ethynyl) phenyl) methanol (6), methanesulfonyl chloride

R_f: 0.45 (eluent: heptanes/ethyl acetate, 8/2)

Yield: 55.0%

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.60 (d, 2H, 2CH_{aro} , J8.402 Hz); 7.54 (d, 2H, 2CH_{aror} , J8.363 Hz); 7.45 (d, 2H, 2CH_{aror} , J8.083Hz); 4.621 (s, 2H, $-\text{CH}_2$); 2.980 (s, 3H, $-\text{CH}_3$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 148.96 (s, $\text{C}_{\text{aro}}-\text{C}_{\text{quat arot}}-\text{C-F}$); 142.41 (s, $-\text{C}_{\text{quat aro}}-\text{CH}_2$ -); 133.17 (s, $2\text{x-CH}_{\text{aro}}-\text{C}_{\text{quat aro}}$); 131.84 (s, $\text{CH}_{\text{arom}}-\text{C}_{\text{quat aro}}$); 128.79 (s, 2CH_{aro}); 119.13 (s, $2\text{C}_{\text{aro quat}}$); 93.87 (s, $1\text{C}_{\text{quat alkyne}}$); 87.17 (s, $1\text{C}_{\text{quat alkyne}}$); 64.93 (s, CH_3); 38.43 (s, CH_2); 20.85 (s, CH_3)

$^{19}\text{F-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ -57.66

Raman (cm^{-1} , 632.818nm): 3064 (Medium, CH stretching); 2217.33 (Strong, carbon-carbon alkyne band stretching); 1607.56 (Strong); 1492.92 (Medium); 1225.32 (Medium); 1165.79 (Medium); 1141.38 (Strong); 1100.14 (Medium); 884.36 (Weak); 843.87 (Weak); 799.66 (Weak); 761.01 (Weak); 723.35 (Weak); 525.91 (Weak); 493.08 (Weak)

Chapitre 3 :

Spectroscopie Raman en science du vivant :

**Imagerie par l'intermédiaire de sondes endogènes et
exogènes**

Table des matières

Fiche signalétique	104
Introduction générale du chapitre	105
I. La spectroscopie Vibratoire	107
a. Principe de base : notions de vibration et de symétrie	107
b. L'effet Raman	109
i. Description du phénomène	109
ii. L'effet Raman au sein des molécules	110
c. Comparatif entre les spectroscopies Raman, infrarouge et la fluorescence	111
II. Historique et caractéristiques de la spectroscopie Raman	112
a. Évolutions techniques	112
b. Caractéristiques de la technique	113
c. Présentation de l'appareil	114
III. La cartographie et l'imagerie Raman	115
a. Principes, avancées et applications	115
IV. La spectroscopie Raman adaptée aux études cellulaires	117
a. La microscopie Raman outil de choix pour la bio-imagerie	117
b. Le matériel biologique : informations chimiques et structurales	118
V. Imagerie Raman par l'intermédiaire de sondes endogènes et exogènes	119
a. Imagerie Raman des sondes endogènes	119
i. Étude du montage de microscopie utilisé pour les cellules	119
ii. Étude de cellules sur lame de CaF ₂	122
iii. Line scan sur une cellule	125
iv. Imagerie Raman sur cellule	128
b. La nature des sondes exogènes employées	134
c. Vérification de la faisabilité de marquage de l'anticorps secondaire	138
d. Imagerie de cellule par l'intermédiaire d'une sonde	142
VI. La spectroscopie CARS (coherent anti-stokes Raman spectroscopy)	150
a. Introduction au CARS	150
i. Introduction générale	150
ii. CARS adaptée au matériel biologique	151
b. Test préliminaires sur une molécule sonde	152
c. Conclusions globales concernant la CARS	154
Conclusion	155
Bibliographie	157
Experimental Part	163
Notes	170

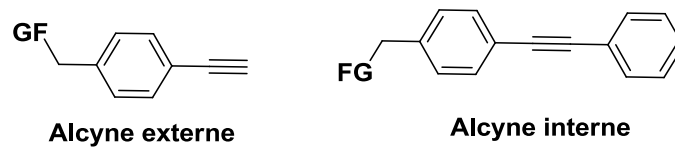
Fiche signalétique

Objectif : Imagerie de cellules en spectroscopie RAMAN par l'intermédiaire de sondes endogènes et exogènes. Étude du marquage par l'intermédiaire de ces sondes au sein des cellules.

Nature des sondes :

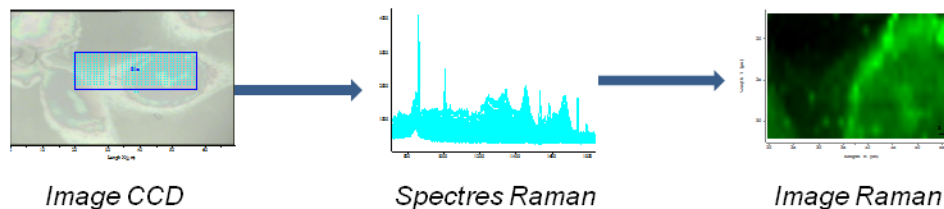
Sondes endogènes : présentes naturellement au sein de la cellule. Sondes caractérisées par des bandes RAMAN spécifiques aux liaisons P-O stretching de l'ADN, bande de la thymine, de la phénylalanine.

Sondes exogènes : introduites par l'intermédiaire des sondes moléculaires comportant un groupement fonctionnel spécifique. La triple liaison carbone-carbone $\text{C}\equiv\text{C}$ détectable aux alentours de 2100 à 2200 cm^{-1} sans interférence avec le matériel biologique.



Études spectroscopiques :

- Cartographie de cellules par l'intermédiaire de sondes endogènes.



- Test de contrôle de marquage par l'intermédiaire d'expériences contrôle de référence
- Cartographie de cellules par l'intermédiaire de marqueurs exogènes spécifiques

Introduction générale du chapitre

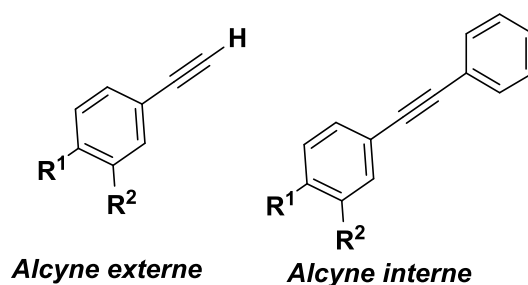
La spectroscopie Raman, comme la spectroscopie infrarouge, est une technique qui se base sur l'interaction entre une source d'excitation et la matière. La technique Raman s'intéresse plus particulièrement à l'étude des transitions vibrationnelles au sein d'un échantillon à partir du phénomène de diffusion inélastique de la lumière. Elle permet d'obtenir des informations sur les fonctions chimiques présentes au sein d'un échantillon. Depuis plusieurs années cette technique connaît un essor considérable dans des domaines très variés telle que la science des matériaux, la chimie organique ou inorganique, les domaines pharmaceutiques, médicaux ou biologiques. Cet engouement est vraisemblablement dû aux nombreuses avancées techniques qui ont rendu l'instrumentation beaucoup plus accessible. Parmi elles, la plus notable réside dans le fait de coupler un microscope confocal au spectromètre. Ceci a eu pour effet de contribuer à l'élargissement des applications possibles et permis l'investigation de systèmes biologiques et/ou moléculaires de plus en plus petit (échelle de l'ordre du micromètre). On parle alors de micro-spectroscopie Raman.

La micro-spectroscopie Raman possède de nombreux avantages que certaines techniques d'analyse de biologie conventionnelles ne possèdent pas. La technique la plus couramment utilisée pour l'observation d'organite cellulaire est la microscopie de fluorescence. Elle fait appel à l'utilisation d'un microscope optique en tirant profit du phénomène de fluorescence. Cette dernière permet l'observation d'objets, substances (organiques ou inorganiques), d'organismes fixés ou vivants. Pour se faire, elle utilise des marqueurs fluorescents (ou fluorophores). Ceux-ci permettent de procéder à de l'imagerie en surface de la cellule (2D) ou en volume (3D). Cependant cette technique est limitée par différents paramètres tels que la taille du fluorophore qui dans certains cas peut entrer en interaction et modifier les propriétés de la molécule à étudier. C'est pourquoi la nature du fluorophore est très importante dans ce type d'imagerie. Notons également d'autres désavantages comme leur faible durée de vie qui conduit à une perte de fluorescence en fonction du temps, ou encore la faible fluorescence des colorants organiques émettant dans le proche infrarouge. Les colorants sont observés avec des filtres et ont des propriétés spectrales telles qu'il est difficile d'observer plus de quatre couleurs simultanément. Cette méthode est donc limitée par le nombre de canaux observables et l'utilisation de molécules de grandes tailles qui peuvent interférer avec l'objet d'étude.

Les sondes moléculaires décrites dans le chapitre 2 ont été préparées dans le but de procéder à un marquage des anticorps pour permettre l'imagerie de cellule par des sondes exogènes. La micro-spectroscopie Raman sera utilisée pour permettre l'observation de ce marquage à une échelle adaptée.

Les motifs moléculaires correspondant aux structures cellulaires que nous cherchons à observer possèdent une signature spectrale se situant dans une fenêtre allant de 500 à 1900 cm^{-1} . Nous envisageons de visualiser des bandes alcynes des sondes moléculaires et dont la signature Raman est caractérisée par l'apparition de bande dans une fenêtre spectrale différente du matériel biologique. Cette fenêtre qui s'étend de 2000 à 2300 cm^{-1} correspond aux triples liaisons carbone-

carbone qui n'existent pas au sein des cellules et sont par conséquent spécifiques à la molécule sonde. Ces dernières existent en configuration alcyne terminal (externe) ou alcyne interne.



Le chapitre sera divisé en cinq parties.

La première partie sera consacrée à une présentation de la spécificité de la spectroscopie vibrationnelle. Dans cette partie nous montrerons l'importance de la "géométrie de la molécule" qui joue un rôle majeur dans l'observation de l'effet Raman au sein d'une molécule. Nous comparerons et mettrons en avant les caractéristiques de la spectroscopie Raman par rapport à la spectroscopie infrarouge et à la fluorescence.

Nous nous intéresserons par la suite aux évolutions techniques qui ont permis à la spectroscopie Raman de se développer. Une présentation de l'instrumentation Raman et des champs d'applications possibles sera faite.

Dans une troisième partie nous traiterons plus précisément de l'imagerie Raman. Nous présenterons le principe de ce type d'acquisition. Afin de mettre en évidence le potentiel grandissant de cette technique, une présentation globale de l'évolution instrumentale et des applications sera mise en avant dans cette partie.

Ce chapitre de thèse se consacrant essentiellement à l'imagerie de cellule par imagerie Raman, nous ferons un état de l'art de ce qui a été fait jusqu'à présent dans ce domaine de l'imagerie en science du vivant.

La cinquième partie sera consacrée aux résultats obtenus. Les travaux liés à l'imagerie Raman ont été mis en place dans le cadre d'un partenariat avec le Docteur Alain Moreac de l'institut de physique de Rennes (UMR 6251 Nanoscience-Nanomatériaux). Cette partie du chapitre décrira les étapes suivies dans l'adaptation de la préparation des échantillons qui ont permis d'imager des cellules. Nous nous intéresserons au choix du support et aux paramètres d'acquisitions sur des échantillons cellulaires. Nous montrerons par la suite la possibilité d'imager des signaux caractéristiques d'une cellule. Un référencement des bandes sera effectué par rapport à ce qui est connu de la bibliographie. A partir des pré-requis développés, nous nous intéresserons à la mise en application des sondes moléculaires dédiées au marquage des anticorps synthétisées durant le deuxième chapitre de la thèse. La première étape consistera en la détection du signal de la triple liaison carbone-carbone par différentes acquisitions spectrales. La seconde étape permettra de justifier le bon fonctionnement du marquage par l'intermédiaire de la spectroscopie Raman. La dernière étape imager le nucléole la méthode de marquage choisie, les résultats obtenus seront détaillés et discutés.

Enfin, nous envisagerons l'exploration d'une alternative à la micro-spectroscopie "standard". Cette technique fait appel à la stimulation du signal Raman et se nomme "Coherent anti stokes Raman spectroscopy".

I. La spectroscopie Vibrationnelle

a. Principe de base : notions de vibration et de symétrie

Nous nous intéresserons dans cette partie à l'introduction de l'interaction onde matière et aux phénomènes se produisant au sein de la molécule.

Afin de décrire le phénomène sur lequel se base la spectroscopie Raman, nous nous intéresserons plus particulièrement aux vibrations moléculaires. La vibration moléculaire est liée aux mouvements périodiques des atomes dans la structure de la molécule induits par la translation et la rotation de ces mêmes atomes. La fréquence de ce mouvement est appelée fréquence de vibration.

Les techniques spectroscopiques tel que la spectroscopie Raman ou la spectroscopie infrarouge se basent sur l'observation des états vibrationnels présents au sein des molécules. Ces dernières sont sujettes à des variations vibrationnelles lorsqu'elles sont soumises à une irradiation électromagnétique d'une fréquence donnée. Les vibrations caractéristiques d'une molécule sont décrites par les degrés de liberté interne donnés par la règle : $3N-6$ (molécules non-linéaires) ou $3N-5$ (molécules linéaires). N étant le nombre d'atomes présents dans la structure de la molécule. Par cette relation il est possible de déterminer les degrés de liberté et le nombre de modes de vibration qu'une molécule peut avoir.

Les modes de vibrations responsables des bandes caractéristiques en spectroscopie s'appuient sur la théorie des oscillateurs harmoniques. Cette théorie se base sur l'observation d'un modèle dérivé de la mécanique classique.^[1] Elle consiste en l'observation de deux atomes de masse distinctes connues m_A et m_B reliés entre eux par un ressort (figure 1). Par oscillation de ce ressort, il est possible d'observer le déplacement de ces deux masses de manière périodique pour en déduire le nombre d'onde caractéristique de la vibration selon la formule suivantes (avec μ = masse réduite des atomes et k constante de raideur du ressort) :

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{m_A} + \frac{1}{m_B} \quad \nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

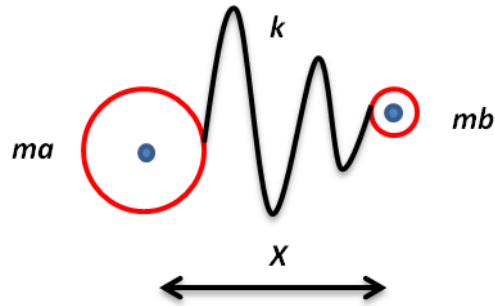


Figure 1 Représentation schématique de l'oscillateur harmonique, X étant la distance entre les noyaux des deux atomes et k la constante de raideur entre les deux atomes.

Le degré de liberté d'une molécule et le nombre d'onde correspondant à une vibration sont très étroitement liés à la notion de symétrie au sein de cette dernière. En effet la présence ou l'absence de symétrie va définir si une vibration est active ou non en spectroscopie Raman. Il existe une méthode de classification des molécules en fonction de leur symétrie, cette méthode se nomme la théorie des groupes. ^[2] Cette discipline applique le concept de symétrie à la spectroscopie vibrationnelle, elle permet de prédire quelle vibration sera active en infrarouge ou en Raman. La figure suivante présente les principaux modes de vibrations qui sont observables en spectroscopie vibrationnelle (Figure 2).

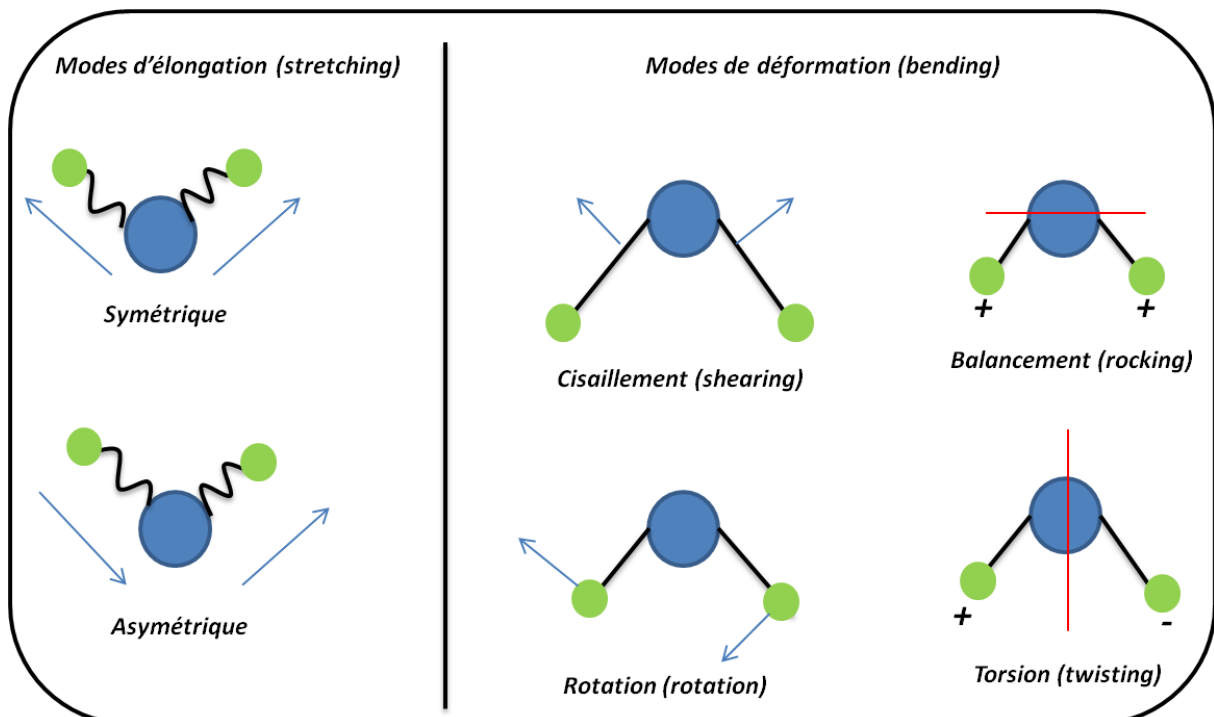


Figure 2 Représentation schématique des différents modes de vibration existants.

Les modes de vibrations peuvent être classés en deux grandes catégories :

- **Les vibrations dites d'élongation** : elles peuvent être symétriques ou asymétriques et font intervenir des variations de longueurs de liaison. Dans ce cas l'angle des liaisons reste constant.

- **Les vibrations dites de déformation** : dans ce cas, ce sont les angles des liaisons qui varient et les longueurs de liaisons restent constantes.

A partir de ces acquis de base, nous allons nous intéresser à l'effet Raman et aux informations qu'il est possible d'obtenir dans les molécules organiques.

b. L'effet Raman

i. Description du phénomène

L'effet Raman est un phénomène physique de diffusion moléculaire de la lumière, mis en évidence expérimentalement en 1928 par le physicien indien Chandrasekhara Venkata Raman, (lauréat du prix Nobel de physique en 1930).^[3]

L'effet Raman ou diffusion Raman est un phénomène optique lié à la diffusion inélastique d'un photon par un milieu. Ce phénomène correspond à un échange d'énergie entre le rayon lumineux incident et la matière. La lumière diffusée par ce phénomène ne possède donc pas la même longueur d'onde que la lumière incidente (Figure 3). On distingue deux cas :

- **Composante Raman Stokes** : correspond à un échange d'énergie entre la matière et le photon incident, on observe la création d'un phonon (grande longueur d'onde, petite énergie). La fréquence des radiations émises est inférieure à la fréquence laser.
- **Composante Raman anti-Stokes** : correspond à un échange d'énergie entre le rayon incident et la matière. On observe dans ce cas l'absorption d'un phonon. La fréquence des radiations émises est alors supérieure à la fréquence laser.

Si aucun échange d'énergie entre la matière et le photon n'est observé, alors la diffusion est dite élastique et la longueur d'onde du photon diffusée reste inchangée. On parle dans ce cas de diffusion de Rayleigh. Cette dernière possède la même fréquence que celle du laser (lumière incidente).

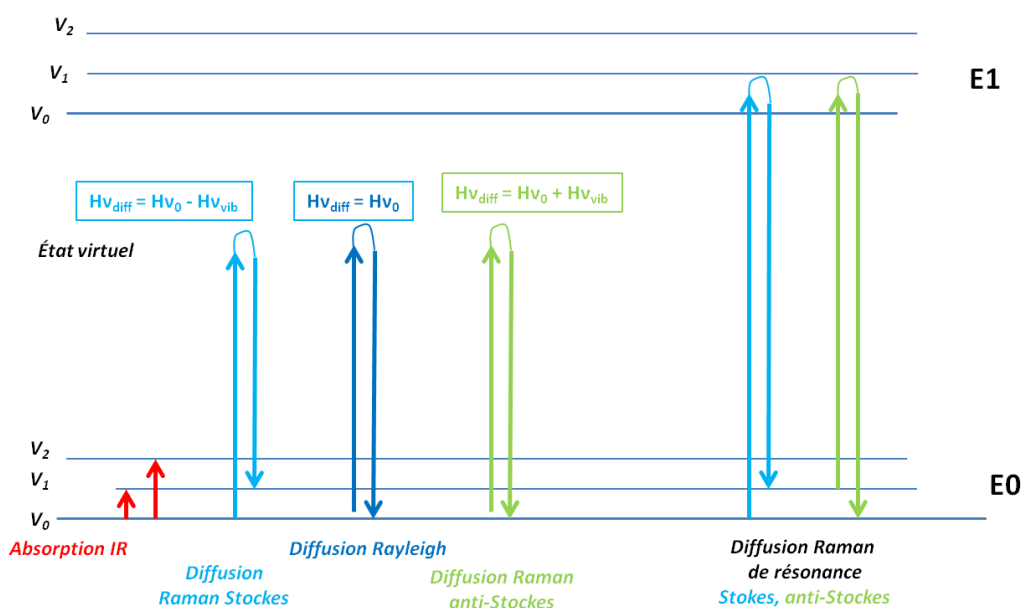


Figure 3 Diagramme de Jablonski représentant le principe de la diffusion Raman

Le phénomène de diffusion Raman, bien que très faibles (1 photon sur 1 million sera émis avec une longueur d'onde différente de la longueur d'onde incidente), donne accès à des informations vibrationnelles et structurales de l'échantillon.

ii. L'effet Raman au sein des molécules

Le phénomène de diffusion de la lumière au sein d'une molécule peut être décrit en termes d'interactions électromagnétiques entre le rayonnement incident et l'effet de dipôle induit au sein de la molécule. La diffusion lumineuse émise de cette façon est composée majoritairement de la composante de Rayleigh et d'une très petite quantité de " lumière Raman diffusée". Le moment dipolaire induit, correspond à la polarisabilité de la molécule. Ce terme fait référence à la déformabilité du nuage électronique sous l'influence d'une onde électromagnétique extérieure. Ce phénomène peut être schématisé comme si un dipôle était placé entre deux plaques de condensateurs chargées (Figure 4).

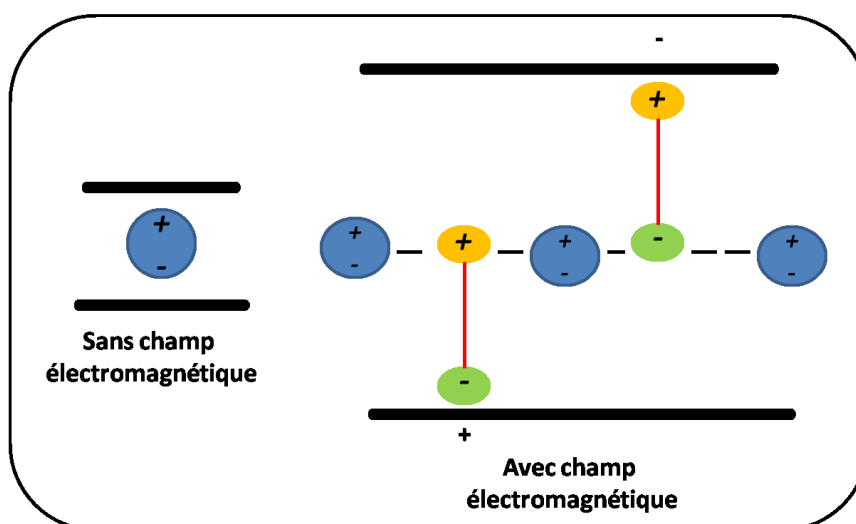


Figure 4 Représentation schématique du moment dipolaire induit

Sans influence, le nuage électronique se trouvera dans un état "stationnaire" le nuage électronique sera alors peu déformé. Lors de l'influence d'un champ électromagnétique, on pourra observer une déformation du nuage électronique du composé allant tantôt d'un côté puis de l'autre de ce champ électromagnétique. A partir de cette description, nous pouvons définir l'effet Raman comme étant une variation du tenseur de polarisabilité au sein d'une molécule. Cet effet peut être également défini par la formule suivante :

$$\mu = \alpha E$$

Où α représente la polarisabilité, E le champ électrique et μ le moment dipolaire induit. Cependant, les notions de bases qui ont été introduites jusqu'à présent ne concernent qu'un modèle diatomique. Il est important de garder à l'esprit qu'une molécule possède une architecture complexe et que dans ce cas la structure est assimilée à un oscillateur couplé. Ceci signifie que lors d'une interaction lumière matière, ce n'est pas une liaison qui va vibrer mais un ensemble de liaisons. Cet ensemble de liaison est appelé groupe de fréquences. Comme décrit plus haut, la symétrie de la

molécule ou du groupement fonctionnel sera un élément clé dans la visualisation des bandes Raman. De manière générale, les vibrations symétriques, en phase et les groupements non polaires seront actifs en spectroscopie Raman.

c. Comparatif entre les spectroscopies Raman, infrarouge et la fluorescence

Cette partie du chapitre nous permettra de faire un comparatif entre les spectroscopies infrarouges, Raman et la fluorescence.

Toute molécule possède un spectre Raman ou infrarouge. Ce spectre représente des modes de vibration caractéristique de la molécule et correspond à son empreinte spectrale. Ces deux techniques ont des capacités de reconnaissance similaires, Cependant les règles de sélection pour l'observation de bande Raman ne sont pas les mêmes que pour l'observation des bandes en infrarouge.

Les deux techniques, toutes les deux basées sur une interaction onde-matière, ne suivent pas les mêmes règles. Dans le premier cas, la spectroscopie Raman se base sur le tenseur de polarisabilité d'une molécule (déformabilité du champ d'électron d'une molécule par un champ électromagnétique externe) et de l'autre, la spectroscopie infrarouge se base sur le moment dipolaire d'une molécule. Finalement les molécules possédant un fort moment dipolaire donneront des bandes infrarouges importantes et les molécules possédant une liaison covalente polarisable seront visibles en spectroscopie Raman. Ces deux techniques sont plutôt complémentaires qu'antagonistes. Elles montrent leur parfaite combinaison lors de l'étude de molécules symétriques car les informations de chacune des méthodes spectroscopiques se recoupent et permettent la caractérisation vibrationnelle complète du composé.

Dans le domaine de la biologie, l'étude des organites cellulaire se fait par microscopie de fluorescence. Cette dernière a été décrite plus longuement dans le chapitre 1. Dans cette partie nous ne ferons qu'un comparatif entre la microscopie de fluorescence et la spectroscopie Raman en présentant les avantages qu'elle peut apporter. La microscopie de fluorescence fait appel à des marqueurs fluorescents. Ces marqueurs sont en général de grande taille et peuvent masquer l'information qui est recherchée, de plus ces derniers se dégradent avec le temps.

Nous nous intéresserons à l'utilisation d'une sonde moléculaire de petite taille, comportant un groupement alcyne dans sa structure, au sein du système à étudier afin de limiter les éventuelles interférences. Ce groupement est parfaitement visible en spectroscopie Raman car il apparaît dans une zone où il n'y a aucun signal provenant du matériel biologique.

Dans cette première partie du chapitre nous nous sommes intéressés à la présentation de la spectroscopie vibrationnelle afin d'en dégager les particularités et nous avons commencé à nous concentrer sur la spectroscopie Raman qui sera le thème principal de ce chapitre.

II. Historique et caractéristiques de la spectroscopie Raman

a. Évolutions techniques

L'effet Raman est à la base du développement de méthodes de spectroscopie Raman cependant le développement des techniques infrarouges ont été privilégiées durant une période s'étalant de 1940 à 1960. Ceci étant principalement dû à la facilité d'utilisation de par le développement de capteur infrarouge et des avancées de l'électronique. Grâce à cela, les analyses infrarouges devinrent plus accessibles alors que les analyses Raman nécessitaient des opérateurs très qualifiés.

Durant les années 60, le développement des lasers a permis différentes avancées techniques. Cependant, la spectroscopie Raman restait confinée au sein des laboratoires de recherche car cette dernière nécessitait toujours la présence de personnes hautement qualifiées pour obtenir des spectres simples. A cette époque, le système nécessitait d'être constamment surveillé et calibré du fait que les échelles de longueurs d'ondes utilisées dépendaient des conditions d'utilisation ambiantes. De plus la spectroscopie Raman souffrait du phénomène de fluorescence qui rendait les acquisitions encore plus difficiles.

En 1986, un interféromètre commercial infrarouge/transformée de Fourier a été combiné à une source d'excitation proche infrarouge afin d'obtenir un spectre Raman. Cette combinaison a permis de réduire le phénomène de fluorescence ^[4] et d'utiliser des sources Laser plus puissantes ne provoquant pas la photo décomposition de l'échantillon. Ces avancées technologiques ont permis de faciliter l'acquisition de spectre Raman et la mise en place de base de données spectrales comparables à celle de l'infrarouge. De nos jours des librairies de spectres d'analyses qualitatives et quantitatives sont accessibles.

Les informations apportées par la spectroscopie Raman sont diverses et variées :

- Identification de phases ou de composés chimiques.
- Caractérisation de matériaux (Étude de systèmes amorphes et cristallins).
- Détermination de la structure moléculaire.

De part ses caractéristiques, la spectroscopie Raman est la méthode dotée de la meilleure résolution (un micron) pour l'identification et la caractérisation de composés ou de phases par imagerie. ^{[5] [6] [7]} Sa capacité à identifier des systèmes amorphes est actuellement inégalée. ^{[8] [9]} Cette technique permet entre autre de déterminer le type de liaison et la structure cristalline des composés étudiés. ^[10]

De plus, les progrès technologiques ^{[11] [12] [13] [14] [15] [16]} tendent à réduire les coûts engendrés par cette technique. Ces progrès permettent également l'amélioration des performances d'acquisition telle que la réduction du temps d'acquisition ou la diminution du phénomène de fluorescence. Le développement de sources lasers variées et couplées à des systèmes de détection de plus en plus sensibles a permis aux spectromètres Raman d'être de plus en plus performants. Ces avancées techniques ont rendu ces instruments commercialisables et utilisables au sein de l'industrie. ^[17]

Les appareils actuels sont de plus en plus évolués et sont relativement compacts afin de permettre une utilisation courante dans les laboratoires de recherche.

b. Caractéristiques de la technique

La spectroscopie Raman possède des caractéristiques qui lui permettent d'avoir des avantages par rapport à d'autres techniques d'analyse :

- L'effet Raman n'est pas dépendant de la longueur d'onde excitatrice utilisée.
- L'échantillon est peu dégradé. La méthode est peu destructive et peu invasive permettant l'étude de systèmes réels.
- Elle est désormais facile à mettre en œuvre. Le temps de préparation est quasi nul et requiert une faible quantité d'échantillons (de l'ordre de quelques milligrammes).
- Elle est facilement couplée à d'autres techniques d'analyses et offre la possibilité d'effectuer des mesures in situ.
- Cette technique est polyvalente et est applicable dans de nombreux cas (analyse de milieux hétérogènes dont la structure des matériaux peut être orientée ou non). Il est également possible de procéder à l'étude de solutions aqueuses, car l'eau diffuse très peu en Raman^[18] par opposition à la spectroscopie infrarouge pour laquelle les bandes d'absorption de l'eau rendent les mesures très difficiles.
- Elle permet l'analyse de molécules à de faibles concentrations (Allant de 10^{-5} M pour les systèmes Raman standard à 10^{-11} M pour les systèmes SERS ou Surface Enhanced Raman Spectroscopy).^[19]
- Elle est sensible aux petites structures comme par exemple l'identification de systèmes amorphes ou l'étude de films très fins pour lesquels les méthodes de diffraction sont parfois difficilement applicables.
- Elle est utilisable sur des échantillons de très petite taille (de l'ordre du μm^3).

Cependant les avantages de la spectroscopie Raman sont contrebalancés par la gêne provoquée par certains phénomènes. Parmi ces phénomènes, la fluorescence^[20] est l'un des principaux inconvénients de cette technique, en effet lorsque le phénomène de fluorescence se produit on constate que ce dernier interfère avec le signal que l'on souhaite étudier et parfois ce phénomène ira jusqu'à masquer le signal Raman recherché. Cependant le fait qu'un échantillon soit fluorescent est fortement lié à la longueur d'onde d'excitation utilisée. En général, ce phénomène est "annulé" par l'utilisation d'une source excitatrice dont la longueur d'onde est proche de l'infrarouge.

D'autres phénomènes peuvent également interférer sur la mesure. Il peut être observé l'émission du corps noir qui provient de l'échauffement de l'échantillon, cet échauffement peut éventuellement conduire à la décomposition de l'échantillon. Il peut être observé des réactions multi photoniques au sein de l'échantillon ainsi que des réactions photochimiques.

c. Présentation de l'appareil

Le système utilisé lors des expériences est un micro spectromètre Raman modèle HR 800 LabRAM^[21] de la société Jobin Yvon Horiba (Figure 5). Cet appareil est équipé d'un microscope "confocal" à objectifs interchangeables : x10 (Olympus MPlan, NA 0.25), x50 (Olympus MSPlan, NA 0.55) et X100 (Olympus LMPlanFI, NA 0.80). Ce dernier combine une source d'excitation laser, un spectrographe, un système de pilotage, d'acquisition et de traitement de données. Une platine motorisée selon 3 axes permettant l'acquisition de données de type cartographie.

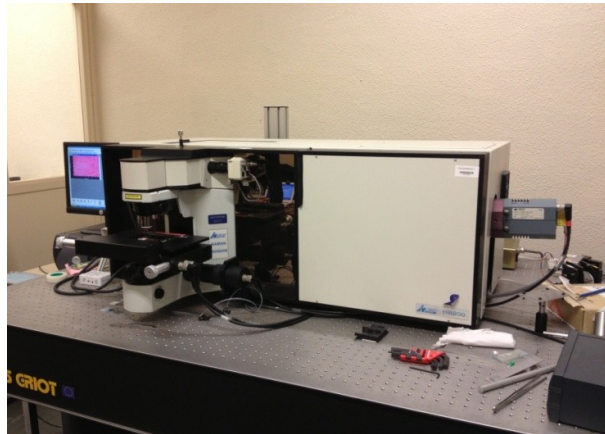


Figure 5 Photographie du micro-spectromètre Raman HR 800

Cet appareil est équipé d'une source laser Hélium/Néon d'une puissance de 17 mW et d'une longueur d'onde de 632.818 nm. Le choix de la longueur d'onde d'excitation dépend, comme décrit précédemment, des propriétés d'absorptions de l'échantillon à étudier. Les principaux éléments d'un spectromètre Raman sont décrits dans la figure 6.

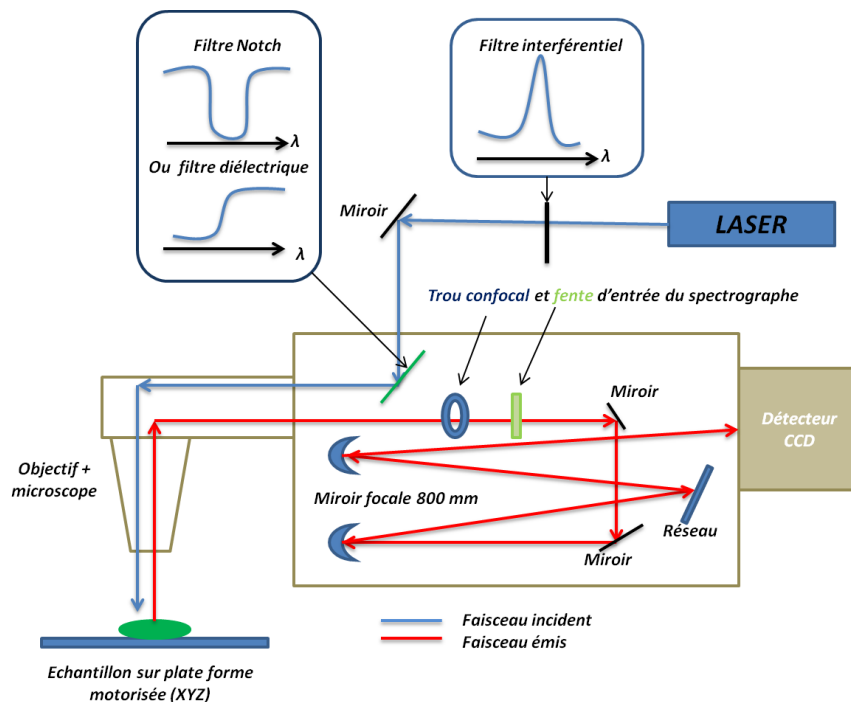


Figure 6 Représentation schématique du trajet optique à l'intérieur du spectromètre Raman

Cet appareil possède un détecteur CCD (dispositif à transfert de charge, CCD pour "charge coupled device") et une distance confocale de 800 mm. Le système de dispersion de la lumière est constitué de deux réseaux de diffraction, un de 600 traits/mm et un second de 1800 traits /mm. La fente d'entrée (slit) utilisée est de 125 μm afin d'obtenir la meilleure résolution spectrale possible sur cet appareil. Le système utilisé est équipé de deux types de filtres spécifiques à la longueur d'onde du laser. Le premier est un filtre interférentiel qui permet d'éliminer les longueurs d'ondes qui ne sont pas caractéristiques du laser utilisé. Le second est un filtre de Notch ou un filtre diélectrique, ce dernier permet de d'atténuer la composante Rayleigh et par conséquent de ne récupérer que le signal Raman.

Afin de procéder à une acquisition Raman, il est nécessaire de prendre en compte deux paramètres importants du microscope, le diamètre d'ouverture du trou confocal et l'objectif à utiliser.

Le trou confocal est ajustable (ouverture possible entre 0 et 1100 μm). Ce réglage dépend essentiellement de l'échantillon à étudier. Plus le diamètre du trou confocal sera petit plus la résolution axiale sera bonne (ce paramètre sera discuté plus en détail dans la partie imagerie). En fonction de la nature de l'échantillon à étudier, le choix de l'objectif va déterminer l'intensité du signal Raman collecté. Sur l'appareil utilisé, l'échantillon peut être analysé par l'intermédiaire de quatre objectifs :

- Objectif X 40mm, analyse macroscopique de l'échantillon, le volume d'analyse est de l'ordre du mm^{-3}
- Objectif X 10, X50, X100, analyse microscopique de l'échantillon, le volume d'analyse est de l'ordre du μm^{-3} .

La spectroscopie Raman est devenue un outil de choix pour l'imagerie. La résolution spatiale de l'appareil permet de procéder à des analyses topologiques ou cartographique d'excellentes qualités et plus détaillées que celles obtenues par infrarouge dont la résolution spatiale est d'environ 8 μm .

III. La cartographie et l'imagerie Raman

a. Principes, avancées et applications

La spectroscopie Raman a été dans un premier temps utilisée dans le cadre d'analyses qualitatives et quantitatives de systèmes inorganiques ^{[22] [23]}, organiques ^{[24] [25]} ou biochimiques. ^[26] Elle a longtemps été utilisée afin d'obtenir des informations concernant l'orientation moléculaire, la symétrie et la structure des composés étudiés avec une résolution spatiale de l'ordre du micron.

Une étape clé importante dans l'histoire de la spectroscopie Raman a permis d'ouvrir la voie à l'imagerie ou la cartographie Raman. Cette avancée technologique consiste en la combinaison entre un microscope optique et un spectromètre Raman. Cette avancée à été mise au point en 1974 par la mise au point de MOLE™ (Molecular Optics Laser Examiner) par le professeur Michel Delhaye à l'université technique de Lille (Figure 7). ^[28] Ce système implique l'illumination laser de l'échantillon sur une large zone. L'image de l'échantillon ainsi obtenue est transférée sur une caméra après

sélection de la longueur d'onde via le spectrographe. Par cette méthode, il a été démontré que le microscope Raman complète les informations données par une sonde à électron par la description du type de liaison entre les atomes.



Figure 7 Photographie du système d'imagerie MOLE (photo HORIBA Scientific)

Cette méthode permet de dresser des cartes en deux ou trois dimensions^[29] caractéristiques des espèces chimiques présentes dans l'échantillon avec un pouvoir séparateur spatial de l'ordre du micromètre. La cartographie ou l'imagerie Raman a su s'imposer comme un véritable outil analytique au service des scientifiques, au même titre que la microanalyse. Ces dernières décennies ont permis une expansion et une meilleure intégration des composants au sein de ce type de système. Ceci a conféré à ces appareils une meilleure sensibilité, des résolutions spatiales plus importantes grâce à l'utilisation de systèmes confocaux et de meilleures vitesses d'acquisitions.

La notion de confocalité joue un rôle important lors d'une acquisition. Son importance est d'autant plus grande dans le cadre de l'imagerie car Il devient alors primordial pour le système « *imageur confocal* » de pouvoir différencier :

- Les signaux issus de différents points à une hauteur Z donnée par rapport au plan de focalisation sur l'échantillon, on parle alors de **résolution latérale**. La résolution latérale est directement liée à la taille du spot laser dans le plan de focalisation.
- Les signaux issus des plans successifs lorsque l'on déplace l'échantillon selon l'axe des Z, on parle alors de **résolution axiale**. La résolution axiale dépend de la profondeur de champ de l'analyse. Elle sera influencée par le changement de la longueur d'onde d'excitation laser et / ou de l'objectif (type de grossissement, ouverture numérique de ce dernier, diamètre de la pupille). La résolution axiale est fortement améliorée lorsque que l'ensemble de collection du signal diffusé possède un ensemble optique confocal directement couplé au microscope. On parle alors de microscope confocal. Un microscope confocal est un système pour lequel l'illumination et la détection sont limitées à un même volume de taille réduite (Figure 8).

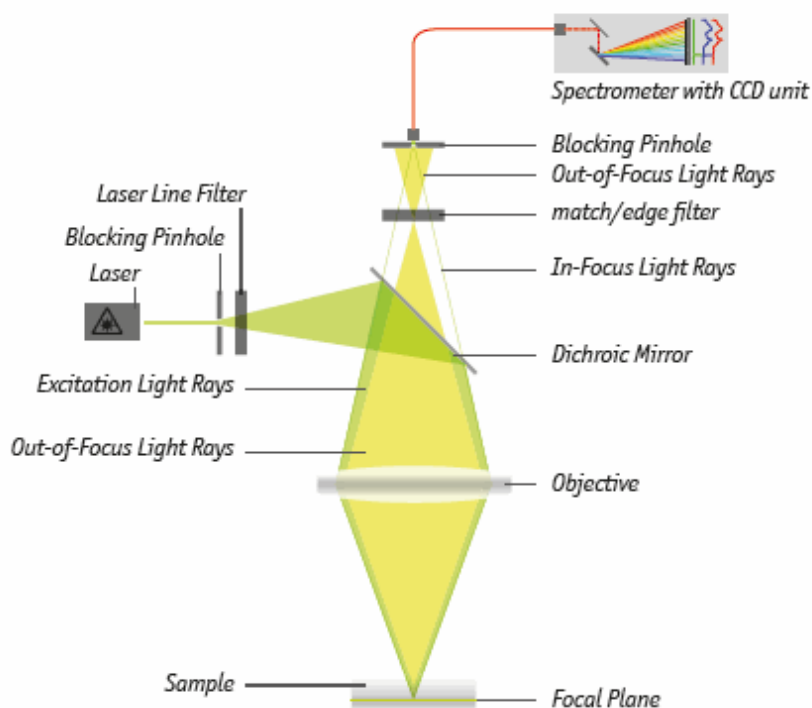


Figure 8 Principe d'un système optique confocal

La microscopie Raman possède des applications dans des domaines aussi divers que variés^[30] allant de l'étude des matériaux^{[32] [33] [34]} ou des semi-conducteurs^{[35] [36] [37]} en passant par l'étude de produits pharmaceutiques,^{[38] [39] [40] [41]} de la conservation d'œuvres d'arts^{[42] [43]} à la sécurité^[44] ou même de la biologie^{[45] [46] [47]} aux sciences de l'environnement.^{[48] [49]} L'imagerie Raman permet de représenter l'échantillon à étudier en deux ou trois dimensions tout en fournissant des informations riches et détaillées sur ce dernier : nature chimique, orientation moléculaire, cristallinité, polymorphisme, tension ou pression. Chacune de ses données étant accessible par l'intermédiaire du spectre Raman pris en chaque pixel de l'image ou de la cartographie obtenue.

IV. La spectroscopie Raman adaptée aux études cellulaires

a. La microscopie Raman outil de choix pour la bio-imagerie

La microscopie Raman est devenue une technique clé dans les domaines de la biologie^[50] et de la biomédecine. En combinaison de l'imagerie par microscopie de fluorescence habituellement utilisée, l'imagerie Raman a permis d'étudier et d'élucider des problèmes aussi divers que variés allant de l'observation de cellules *ex vivo* aux cellules *in vivo* ou même la détermination de structures de molécules ayant une activité biologique.^[51] L'un de ses atouts les plus remarquables est certainement l'utilisation du Raman en tant que sonde biomédicale dans la recherche d'informations chimiques et structurales. Cette technique est de nos jours largement utilisée dans les domaines biomédicaux comme l'étude de la structure des protéines,^[52] de l'ADN^[53] de cellules bactériales^[54] allant même jusqu'à l'étude de virus.^[55] Depuis quelques années, le diagnostic des tumeurs emploie également la spectroscopie Raman.^{[56] [57] [58]} Ce type d'études sont menées sur des tissus malades (*in situ*, *in vivo*,^[59] *in vitro*,^[60] *ex vitro*^[61]).

L'imagerie Raman est devenue de plus en plus employée grâce aux différentes méthodes mises en place dans le traitement du signal qui permettent une réduction significative du temps d'acquisition, une diminution de la multitude de variables analysées rendant ainsi les analyses plus aisées. ^[62] ^[63] Par exemple, ce type de traitement permet de discriminer les signaux d'intérêt par rapport aux signaux issus de la matrice contenant l'échantillon à analyser. ^[64]

b. Le matériel biologique : informations chimiques et structurales

Le matériel biologique en général, que ce soit les tissus ou les cellules, regorge d'informations. La spectroscopie Raman permet entre autre d'en extraire certaines afin de donner au biologiste des informations chimiques et structurales. Il est possible d'observer l'état d'avancement d'un cancer par l'étude des cellules tumorales, les travaux menés par Shapiro ^[57] montrent que l'étude de l'apparition d'une bande caractéristique des cellules épithéliales peut être un moyen de diagnostic dans le cadre du cancer du rein. D'autres travaux effectués en collaboration entre le laboratoire, le CHU de Rennes et le laboratoire de traitement du signal (LTSI) de l'université de Rennes 1 ont permis de mettre au point une méthode de diagnostic sur des tissus tumoraux rénaux. Ces travaux ont permis la mise en place d'une méthode de détection rapide des tissus tumoraux. Chaque résultat obtenu par acquisition Raman a été comparé aux résultats issus des analyses effectuées par les anatomopathologistes (anapath) pour conduire à des résultats tout à fait prometteurs dans le cadre du diagnostic par spectroscopie Raman. ^[65]

Le Professeur Michel Manfait de l'université de Reims a démontré par ses travaux les nombreux avantages de la spectroscopie Raman. En effet la diversité de ses travaux explorent de nombreux aspects de la compréhension du matériel biologique tel que la discrimination et l'identification du signal entre l'objet d'étude d'intérêt et son support de préparation ^[64] ou bien ses travaux sur l'identification de biomolécules. ^[66] Une autre étude intéressante porte sur l'étude et la caractérisation par spectroscopie Raman des céramides, une étude en température a permis de caractériser pleinement ces composés essentiellement présents dans la membrane cellulaire. ^[67]

Le professeur Manfait et ses associés ont également mis place le moyen de discriminer plusieurs fonctions chimiques caractéristiques de différents types de cellules cancéreuses par l'intermédiaire de cette technique. ^[68] Il est également possible de déterminer comme cité précédemment, si un tissu est malade ou sain. Il existe de nombreuses références dans la littérature montrant l'application de la spectroscopie Raman dans le cadre du diagnostic de tissus, les exemples y faisant référence sont divers et traitent par exemple des tissus issus du poumon ^[69] ^[70] ^[71] ou du sein. ^[72] ^[73]

Il est également possible d'obtenir des informations au niveau subcellulaire dans une cellule. Les travaux effectués par Krafft montrent l'influence de la fixation sur la morphologie de la cellule. ^[74]

Les informations fournies par la cellule par l'intermédiaire du matériel biologique sont nombreuses et permettent le diagnostic et la classification de ce dernier (par exemple tissu malade ou non). Il est possible d'accéder à ces informations grâce à des "sondes" présentes dans l'objet de l'étude ou par introduction d'une entité de marquage. Ces deux types de sondes sont dites endogènes et exogènes dans le deuxième cas. Elles seront présentées plus en détail dans la partie suivante.

V. Imagerie Raman par l'intermédiaire de sondes endogènes et exogènes

Il est possible de différencier les types de sondes Raman en deux catégories : les sondes endogènes et les sondes exogènes. Dans le premier cas, les sondes endogènes sont définies comme étant naturellement présentes dans l'échantillon à étudier. Les sondes exogènes sont quant à elles des molécules qui sont introduites dans le système d'étude. De nombreux cas de la littérature ont permis de mettre en évidence la localisation de certains composants d'une cellule. ^[69] ^[75] ^[76] La seconde catégorie fait quant à elle référence aux marqueurs (ou sondes) qui sont introduits par l'intermédiaire d'un marquage. ^[77] Ces derniers sont variés et il existe différentes de façon d'introduire "l'espèce traceuse". Par exemple il est possible de marquer une entité biologique par l'injection de nanomatériaux tels que les nanotubes de carbone, ^[78] ou par la modification d'une biomolécule afin de la détecter par la méthode d'imagerie. ^[79] Cette partie du chapitre s'intéressera dans un premier temps, à l'imagerie par l'intermédiaire de sondes endogènes. Une seconde partie présentera les sondes exogènes dédiées au marquage des anticorps. Enfin, la dernière partie traitera de l'imagerie par l'intermédiaire du marquage des anticorps choisi dans le chapitre précédent.

a. Imagerie Raman des sondes endogènes

La cellule de part sa structure ou son état est un nid d'informations d'une très grande richesse. Nous nous intéresserons dans cette partie à l'imagerie de cellules par spectroscopie Raman. Nous développerons plus en détail le terme de sondes endogènes qui permettent de caractériser les cellules. La microscopie Raman permet l'identification de différentes parties de la cellule.

Avant de procéder à l'imagerie du matériel biologique, des tests préliminaires ont été effectués afin de déterminer les paramètres d'acquisition optimum qui permettront l'obtention d'une image.

i. Étude du montage de microscopie utilisé pour les cellules

Dans un premier temps il a été envisagé d'utiliser un "montage" classique (Figure 9) de microscopie afin de faire de l'imagerie Raman sur cellule. Ce montage a été choisi de part sa large utilisation en microscopie de fluorescence et sa facilité d'utilisation. Le montage comprend les éléments suivants :

- Lame de verre pour microscopie en verre à bord rodé.
- Lamelles de verre sur lesquelles les cellules ont poussé.
- Les cellules ont été fixées par du Prolonggold® (fixateur anti-bleaching couramment utilisé en biologie).

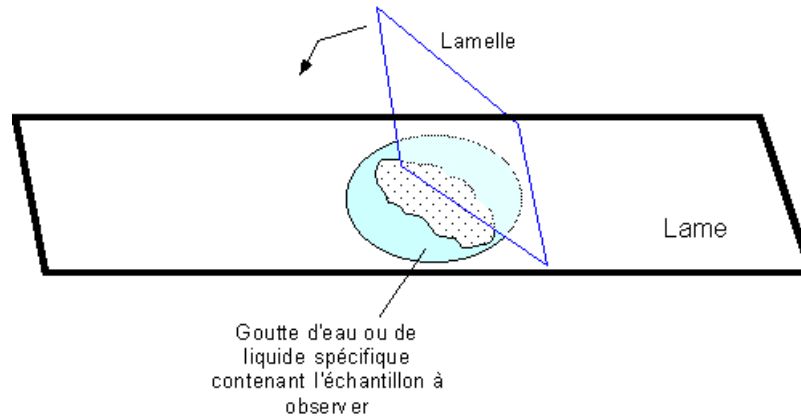


Figure 9 Représentation schématique du montage microscopie

Les spectres suivants montrent les différentes acquisitions effectuées (Figure 10). Le spectre **bleu** montre le signal obtenu sur une lame de microscopie, sur ce dernier on constate la prédominance du signal caractéristique du verre. Le spectre **rouge** représente le spectre de la lamelle de verre ; comme précédemment ; une large bande est observée sur toute la largeur du spectre. Le spectre **vert** représente le mélange de fixation (Prolong Gold) utilisé pour la préparation de l'échantillon, des bandes Raman sont observées et sont caractéristiques de ce composé commercial. En nous basant sur ces données, il a été constaté que dans le cas de l'acquisition de spectre Raman en utilisant un montage microscopie "classique" l'analyse serait rendue difficile par la présence du signal prédominant dû au verre qui semble masquer les autres signaux. Un essai de spectre (spectre **violet**) comprenant l'ensemble de la préparation incluant la culture de cellules (Figure 10) a été effectué afin de vérifier la prédominance de ce phénomène sur l'ensemble. Comme suspecté le signal large provenant du verre est majoritaire par rapport à ce que l'on souhaite observer.

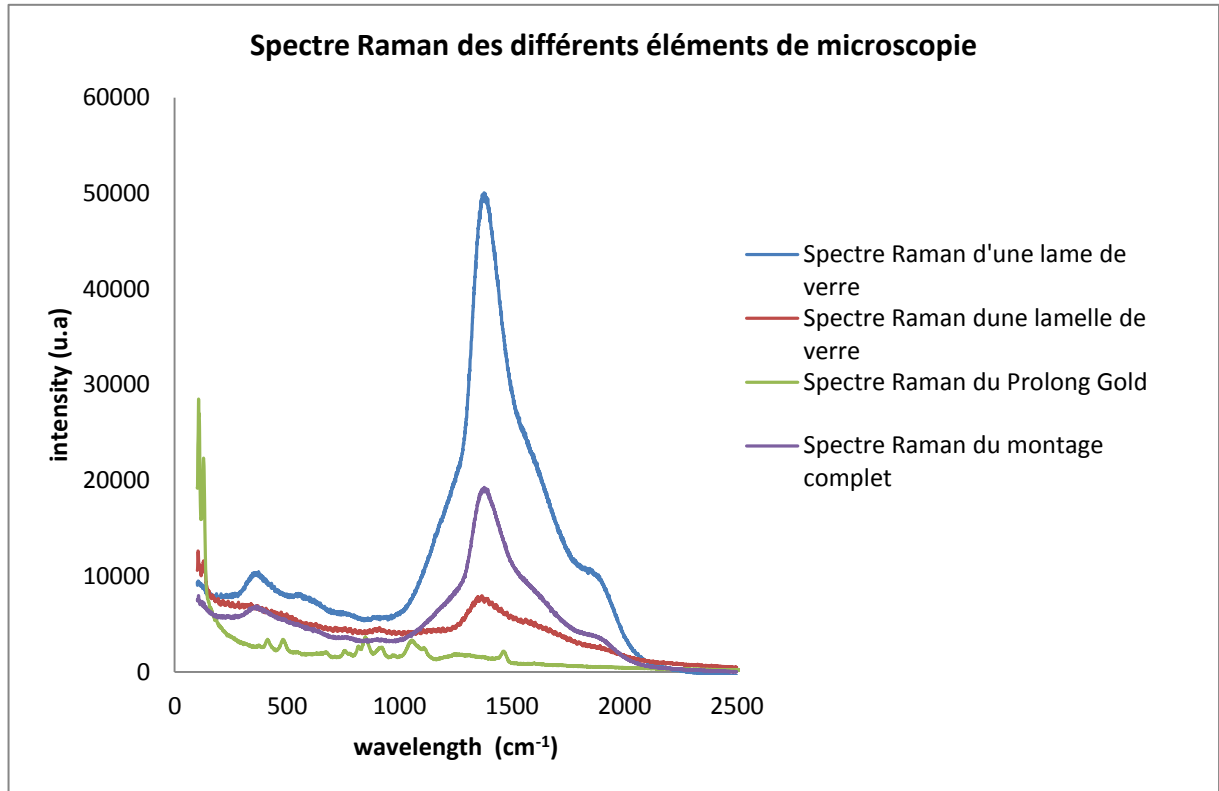


Figure 10 Ensemble des spectres concernant un montage de microscopie

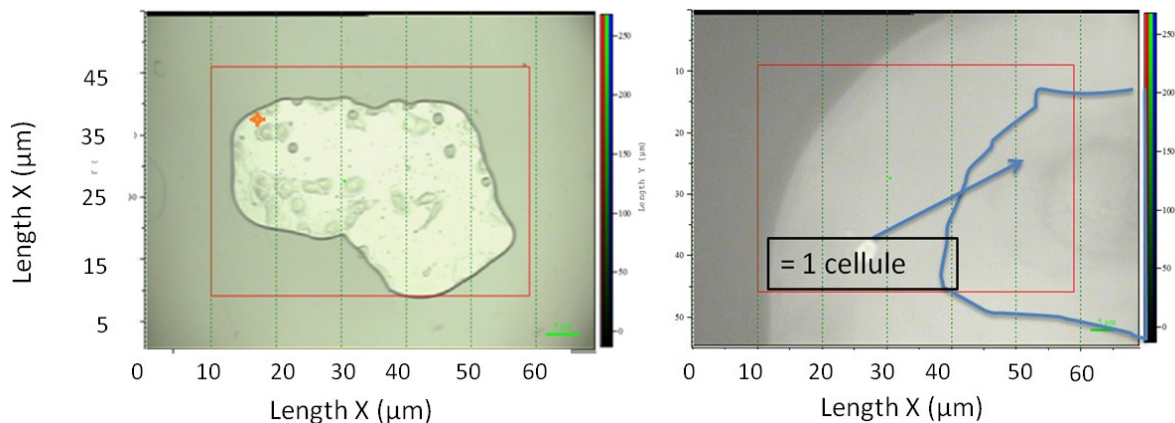


Figure 11 Image CCD du montage de microscopie complet à gauche zoom x10 à droite zoom x100

Bien que les cellules soient visibles (Figure 11), le montage de microscopie classique ne permettra pas de faire de l'imagerie Raman de part la prédominance de la fluorescence. Un autre système a donc été envisagé afin de permettre la localisation et l'imagerie Raman de l'échantillon. Le support choisi dans un second temps est le fluorure de calcium ou CaF_2 . Ce nouveau matériau remplacera la lame de verre classiquement utilisé lors des premiers essais. Le spectre Raman (figure 12) obtenu montre l'absence de fluorescence et une zone vierge dans la zone d'intérêt dans le cadre du marquage.

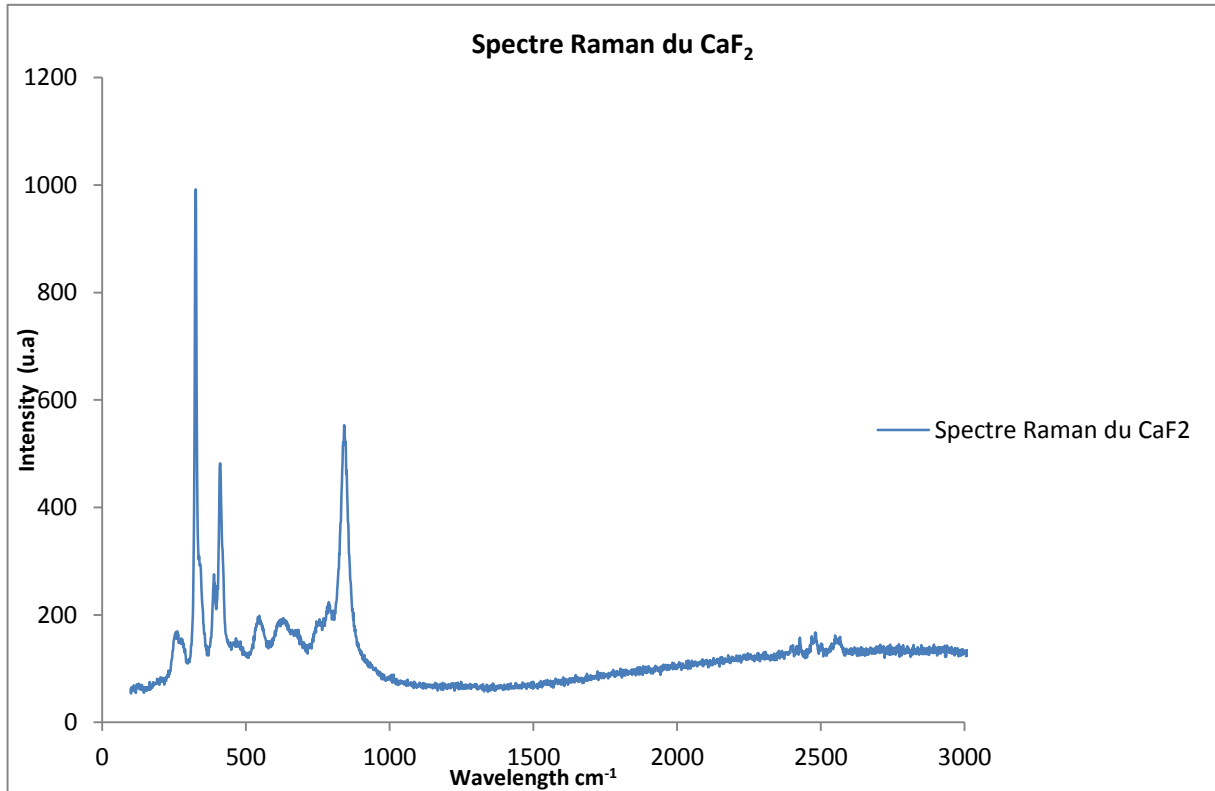


Figure 12 Spectre Raman du fluorure de calcium

Le fluorure de calcium testé est un disque de 1 pouce de diamètre transparent, ce qui permet une identification des cellules par microscopie optique. De plus et d'après le spectre Raman obtenu, ce composé possède une signature Raman qui lui est propre (Figure 12). Le support doit être désormais testé afin de prouver qu'il est possible d'utiliser ce matériau dans le cadre de notre étude.

ii. *Étude de cellules sur lame de CaF₂*

Afin de justifier l'emploi du fluorure de calcium, une série de test a été effectuée pour permettre de différencier le signal d'une cellule par rapport au signal provenant du matériau support choisi. Dans un premier temps, des spectres localisés en plusieurs points de l'échantillon ont été effectués. Il est à noter que les cellules ont été préparées en suivant le protocole du chapitre 1.

Chaque point indiqué sur l'image CCD (Figure 13) correspond à un site précis de la cellule : le point bleu a été pris dans le noyau de la cellule, le point vert correspond au nucléole de la cellule et le point rouge correspond au cytoplasme de la cellule. Pour chacun de ces points un spectre Raman a été obtenu (Figure 14). Ces acquisitions ont été comparées au spectre du support précédemment étudié et il en a été conclu qu'aucun signal provenant du support ne venait interférer avec le signal détecté. Plusieurs bandes ont été détectées et semblent être spécifiques au matériau biologique.

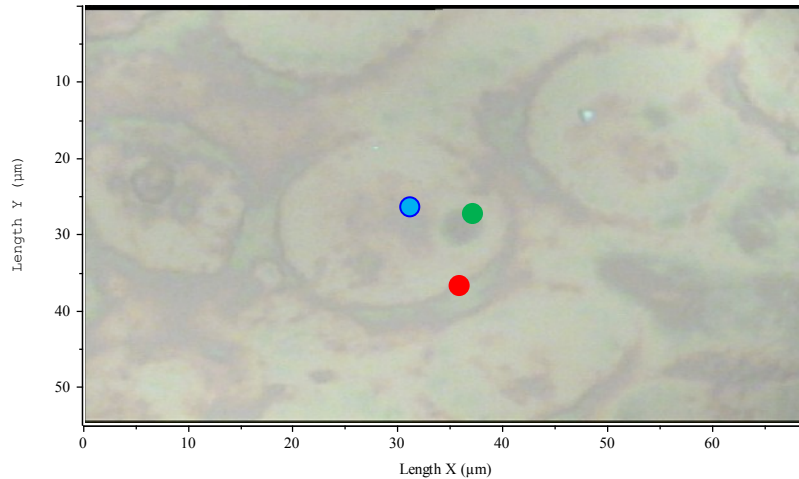


Figure 13 : image CCD de la cellule pour l'étude

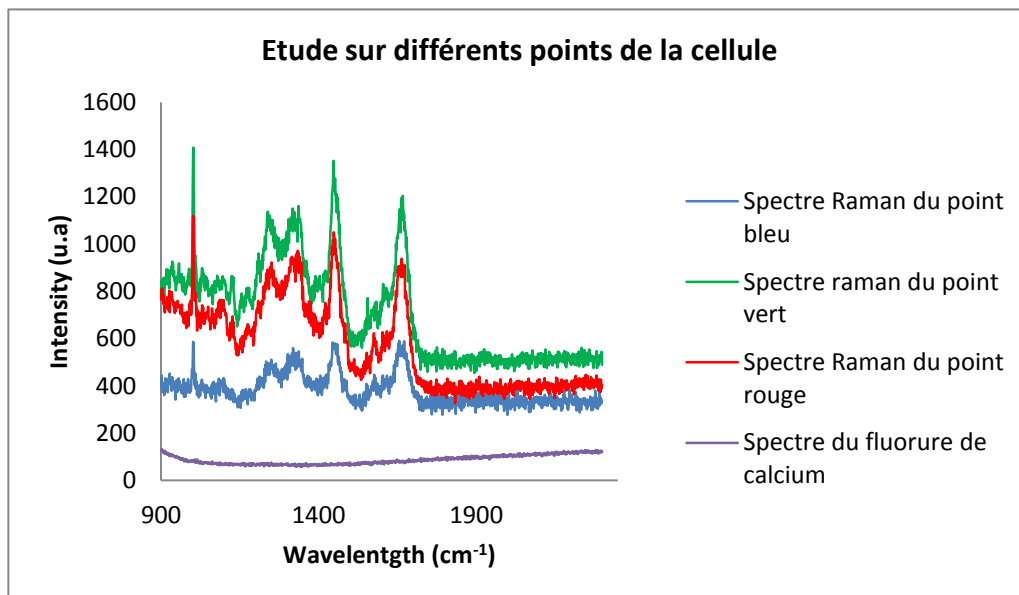


Figure 14 : Spectre Raman sur différents points

Pour chaque spectre obtenu sur la surface de l'échantillon, un temps d'acquisition relativement long a été défini afin de permettre la visualisation du signal. Un test a été mené afin de définir le temps d'acquisition juste nécessaire pour l'obtention d'un signal significatif. L'expérience menée consiste en l'acquisition de trois spectres en un même point avec des temps d'acquisitions différents. Le nombre d'accumulation a été fixé à 2 permettant ainsi l'atténuation des artefacts possibles lors de ce type d'acquisition (Figure15). Les artefacts peuvent provenir de différents éléments de l'instrument et ajouter au spectre des signaux parasites pouvant conduire à l'obtention de spectres erronés.

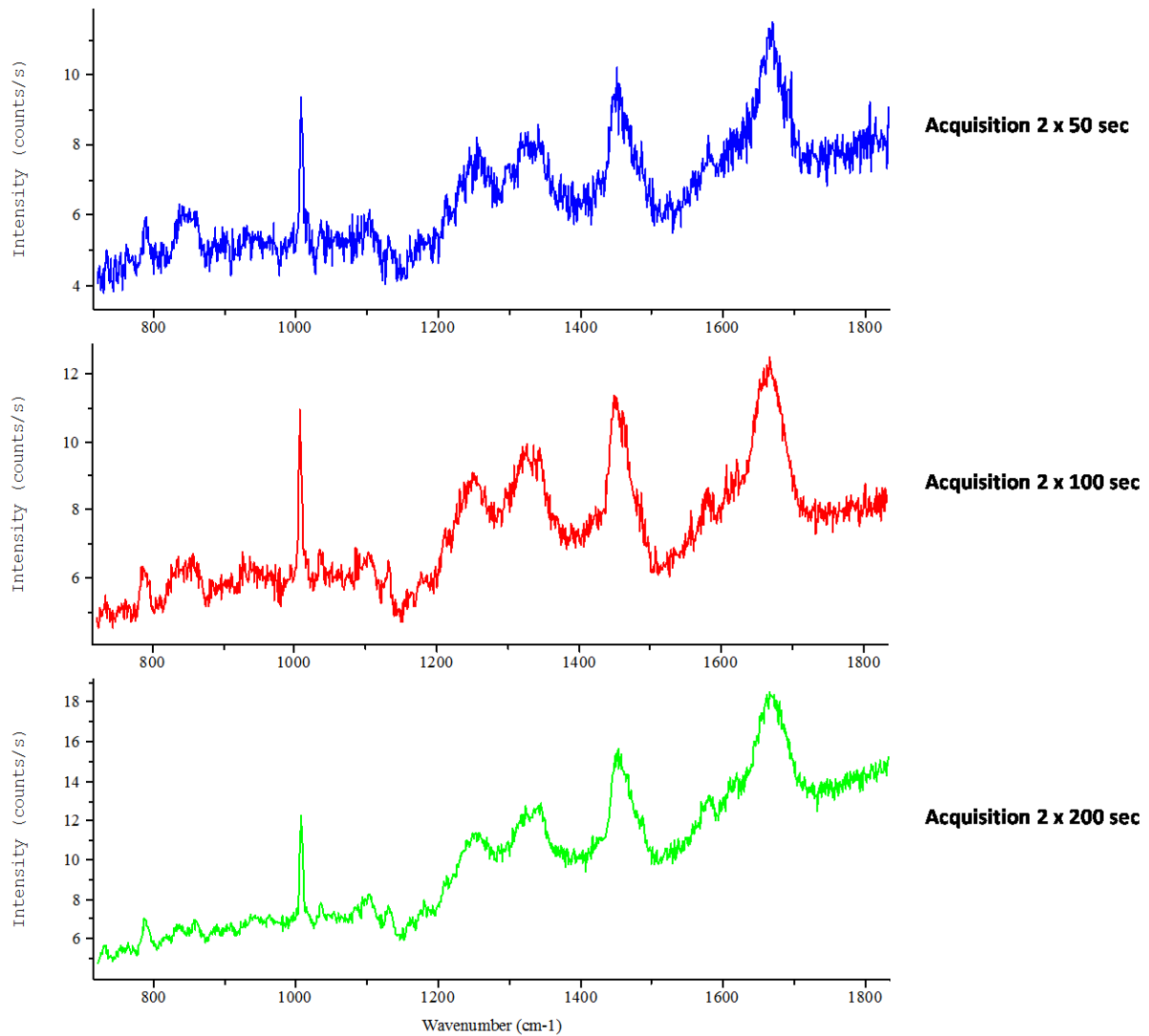


Figure 15 Spectre Raman présentant l'influence du temps d'acquisition.

Ces trois spectres ont été obtenus en un même point de la cellule et l'unité d'intensité de ce signal a été ramenée en "coups /sec" afin de bien montrer l'influence du temps d'acquisition. Nous avons obtenu des spectres dont l'allure globale est similaire. Cependant, il est possible d'observer une diminution du bruit avec l'augmentation du temps d'acquisition. Lorsque que nous procédons à une acquisition en 2x200sec il nous sera possible de clairement définir les bandes observées car le spectre est moins "bruité" que lors d'une acquisition avec un temps de 2x50 sec. Une augmentation de ce temps sera donc préconisée pour les expériences de cartographies

Cette expérience nous conduit aux conclusions suivantes :

- La contribution du signal de la lame de fluorure de calcium est minime dans le cadre de ce type d'acquisition. Il est donc possible d'identifier les échantillons par microscopie optique et d'obtenir le signal Raman de l'échantillon biologique.
- Le temps d'acquisition idéal pour l'observation d'un spectre Raman dans le cadre de ce projet sera de 2 x200 sec. Ce temps d'acquisition permet d'observer le spectre avec le minimum de fluctuation du bruit.

Cependant ces signaux sont ils caractéristiques sur toute la cellule ou ne sont ils localisé qu'en certain points ? Pour répondre à cette question, une nouvelle expérience a été envisagée : le line scan sur cellule.

iii. *Line scan sur une cellule*

Avant de pouvoir mettre en place une expérience de cartographie Raman sur des cellules, une étude dite "line scan" a été mise en place afin de collecter un maximum d'information concernant l'échantillon. Cette étude a pour but d'acquérir des spectres sur une longueur définie par l'utilisateur. L'utilisateur ou l'opérateur peut, sur ce type d'étude, incrémenter un pas qui définira la précision de l'acquisition. Dans le cas de cette étude le pas choisi sera de 1 μm et correspond à la largeur du faisceau laser du spectromètre Raman, la résolution latérale de l'appareil est donc de 1 μm . Les paramètres d'acquisition sont regroupés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : récapitulatif paramètres d'acquisition

Grossissement objectif (X ; NA)	Objectif à air Olympus LMPlan FI X100 ; 0.8
Longueur d'onde d'excitation (nm)	632.818 (He/Ne)
Filtre OD	Sans
Ouverture du trou confocal (μm)	250
Ouverture de la fente (μm)	125
Longueur de l'analyse (μm)	46
Réseau (trait/mm)	600
Pas δ (μm)	1
Temps d'acquisition (nb de sec x nb accumulation)	200 x 2

L'image CCD montre la cellule étudiée (Figure 16). L'échantillon a été étudié sur toute la longueur à savoir 46 μm . Cette ligne traverse l'intégralité de la cellule en partant du cytoplasme et en passant par le noyau. Après acquisition, une série de spectres est obtenue (Figure 17). Chaque point du line scan analysé correspond à un spectre Raman. Sur chacun de ces spectres, on peut observer des signaux correspondants à ce qui a été observé précédemment lors des acquisitions en des points spécifiques de la cellule. Sur cette acquisition, deux points ont été définis : le point a été sélectionné en dehors de la cellule et le point b pris dans le noyau de la cellule (figure 16).

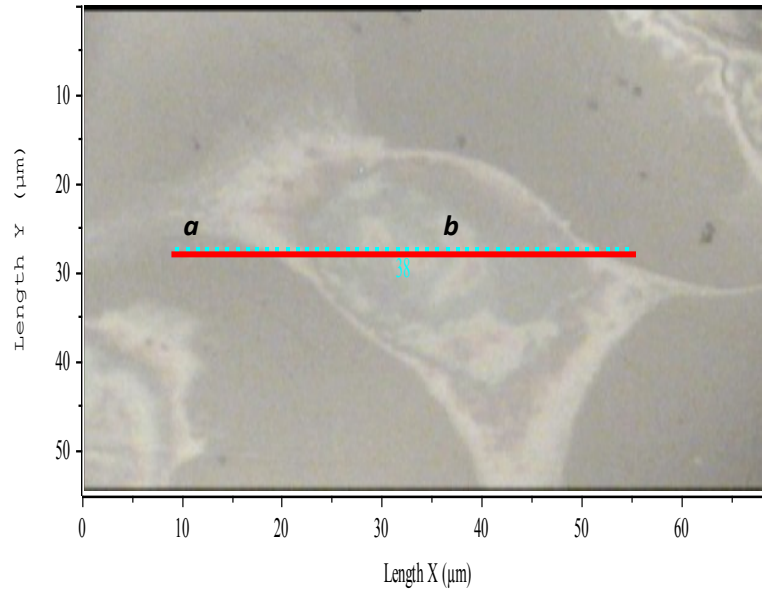


Figure 16 Image CCD de l'échantillon

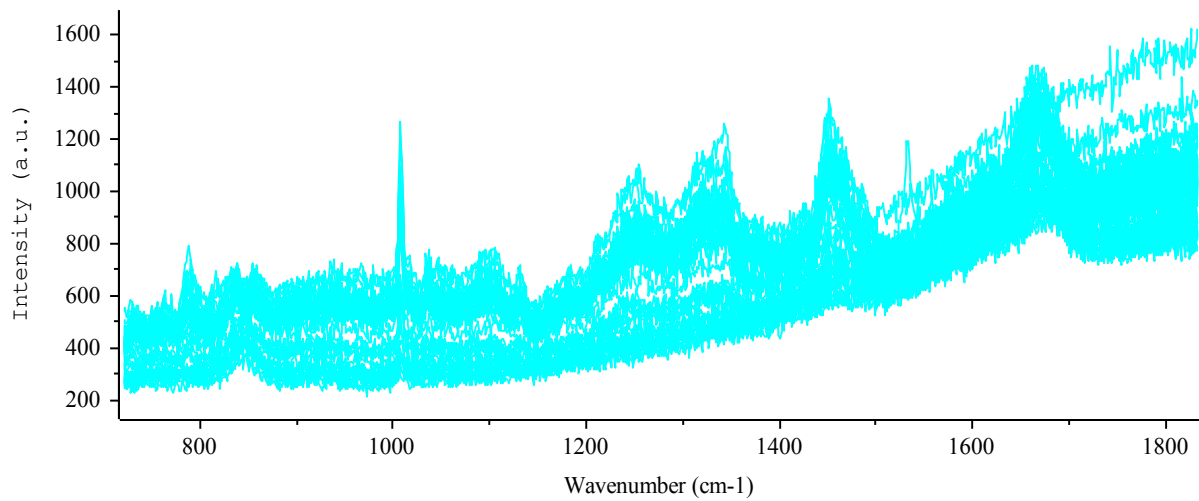


Figure 17 Ensemble des spectres accumulés sur la ligne

En comparant deux spectres en deux point bien distincts (point a et b sur la photo Figure 16) sur cette expérience on constate qu'il est possible de faire la différence entre l'échantillon biologique et l'extérieur de la zone d'intérêt (Figure 24).

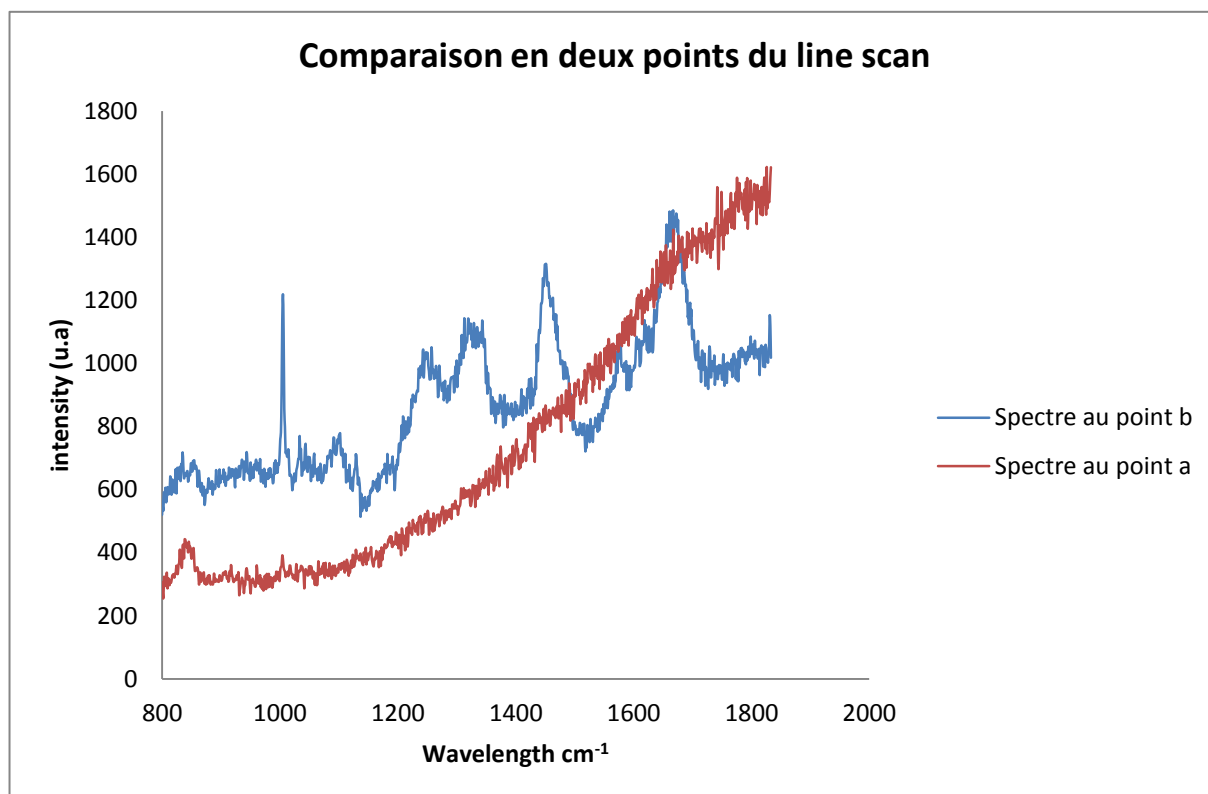


Figure 18 Spectre en deux points différents du line scan

En nous basant sur la bibliographie concernant la spectroscopie Raman liée à l'étude de cellules, ^[60] il a été possible d'identifier plusieurs signaux ou bandes d'intérêts. Ces signaux donnent des informations sur les composants chimiques de la cellule. Le tableau ci-dessous (Tableau 2) présente les bandes caractéristiques qui ont été distinctement identifiées sur ces acquisitions.

Tableau 2 Attribution des bandes du line scan

Wavelength (cm ⁻¹)	attribution
1004	Phénylalanine "ring breathing"
1100	Acide nucléique P-O
1252	Amide tertiaire
1343	Adénine, phénylalanine, C-H déformation
1452	CH ₂ stretch déformation méthylène lipide
1666	Amide primaire

Par l'observation du line scan effectué, il a été constaté que certains signaux sont plus facilement repérables que d'autres car ils représentent des groupements chimiques que l'on retrouve spécifiquement ou en plus grande abondance dans certaines parties de la cellule ou sont caractéristiques de biomolécules spécifiques et constitutives de cette dernière. La prochaine étape consiste en l'acquisition d'une image Raman sur cellule à partir d'une ou plusieurs bandes caractéristiques.

iv. Imagerie Raman sur cellule

A partir des résultats obtenus une série d'expérience en imagerie Raman a été mise en place afin de reconstruire une image Raman de la cellule grâce aux bandes identifiées précédemment. Il est dans un premier temps important de définir le principe de l'acquisition. L'imagerie Raman repose sur l'acquisition de spectres sur une surface définie par l'opérateur. Comme pour le scan line, un pas est incrémenté afin de collecter l'information sur toute la surface de travail. Ce paramètre est fixé dans deux directions ; selon l'axe x et selon l'axe y.

Le tableau (Tableau 3) suivant regroupe les paramètres d'acquisitions qui ont été utilisé lors de l'expérience.

Tableau 3 Paramètres d'acquisition d'une image Raman

Objectif (grossissement ; NA)	Objectif à air Olympus LMPlan FI X100 ; 0.8
Longueur d'onde d'excitation (nm)	632.818 (He/Ne)
Filtre OD	Sans
Trou confocal (μm)	250
Fente (μm)	125
Réseau (trait/mm)	600
Pas δ (μm)	1
Surface de travail (x;y) en μm	40 x 30
Temps d'acquisition (nb sec x nb d'accumulation)	200 x 2

Lors de cette analyse, une cellule a été choisie et la fenêtre de travail s'étend de 700 cm^{-1} à 1833 cm^{-1} . Comme lors du line scan, une série de spectres a été obtenue (figure 25).

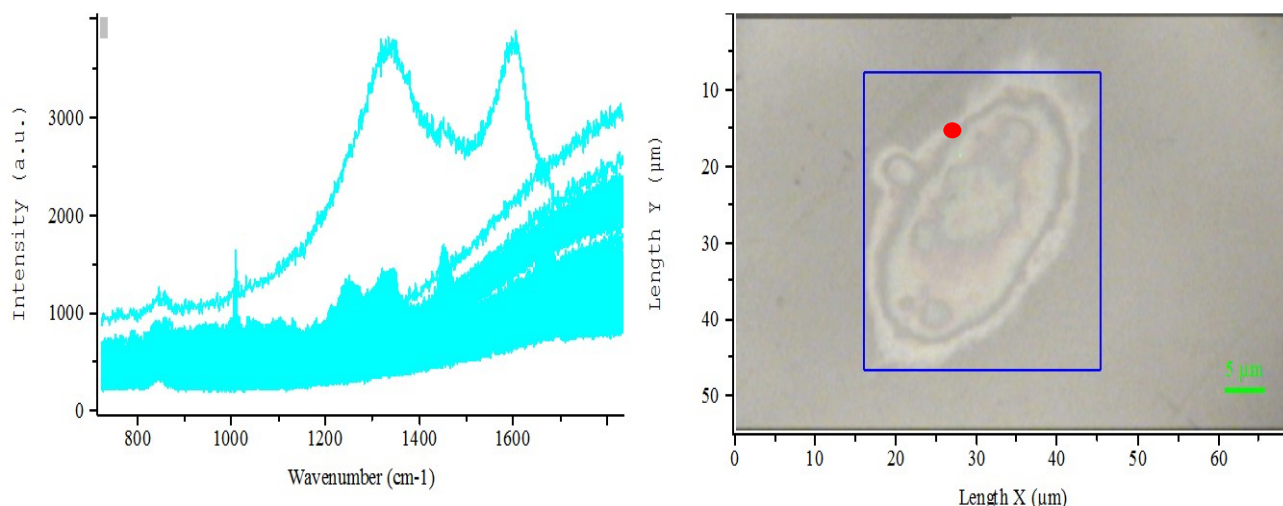


Figure 19 Accumulation des spectres (à gauche) et image CCD de l'échantillon (à droite)

Lors de cette cartographie, la fenêtre spectrale a été définie entre 700 cm^{-1} et 1800 cm^{-1} afin d'observer des signaux supplémentaires. Cette dernière s'étend de 700 à 1800 cm^{-1} . Dans ce cas, deux nouvelles bandes ont été observées et identifiées selon la bibliographie, ^[60] ^[80] ces dernières ont été regroupées dans le Tableau 4. Le spectre au point rouge correspondant au cytoplasme (Figure 20) met en évidence les bandes supplémentaires observées. Sur l'accumulation des spectres obtenus

(figure 19) nous pouvons observer un spectre qui ne suit pas l'allure générale de l'ensemble de la cartographie. Ce spectre semble correspondre à un défaut sur un point lors de l'acquisition.

Tableau 4 Identification de bandes Raman additionnelles

Wavelength (cm ⁻¹)	attribution
758	Phosphatidyléthanolamine
834	ADN / ARN PO ₂ ⁻ out of phase symmetric stretching

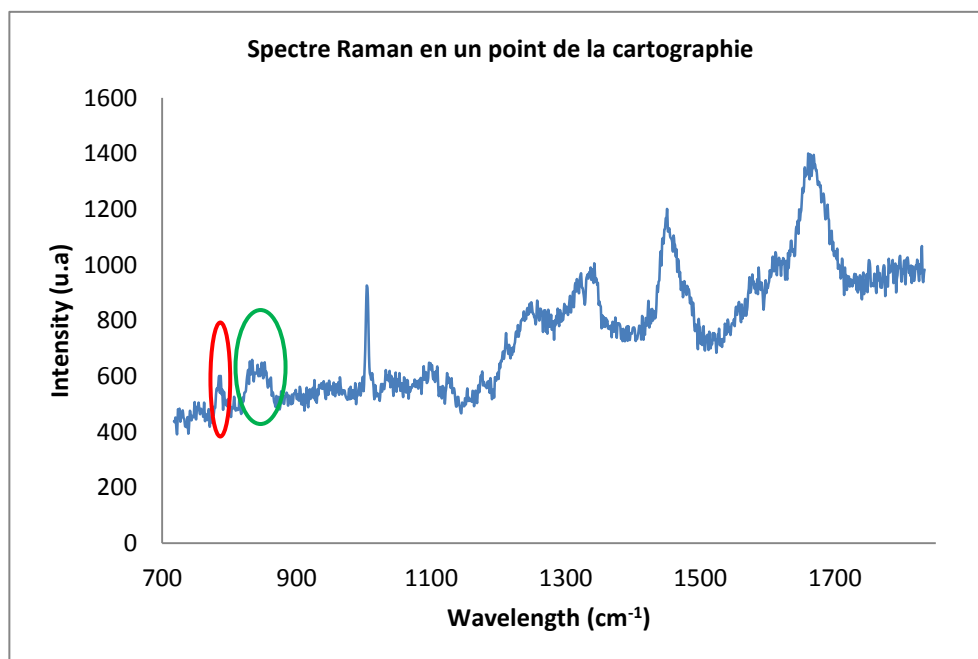


Figure 20 Spectre Raman au point rouge de l'image CCD

Sur cette série de spectre, une bande va être choisie afin de procéder à un fitting ou ajustement du signal. Cette technique d'analyse de courbe expérimentale est basée sur la détermination d'une courbe théorique corrélant avec le spectre expérimental. L'ajustement du signal permet l'observation de la bande choisie sur la surface de travail. L'image obtenue après traitement correspond à la variation d'intensité de la bande sur la surface de travail. Ce type de traitement permet également d'affiner la qualité de l'image finale obtenue.

Le premier cas choisi concerne l'étude d'une bande fine et relativement intense qui apparaît à 1004 cm⁻¹. Le signal apparaissant à cette longueur d'onde correspond comme indiqué précédemment à la phénylalanine.^[81] Ce composé (Figure 21) est un acide aminé aromatique. Selon la littérature le signal observé fait plus précisément référence aux vibrations de type bending de la liaison C-H du cycle aromatique.^{[60] [81]} Les composés aromatiques sont présents sous de nombreuses formes et composent une large catégorie de biomolécules au sein des cellules parmi lesquelles nous pouvons citer les molécules ayant une base adénine ou pyrimidique.

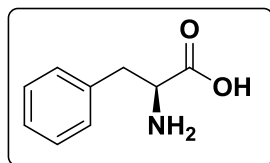


Figure 21 Phénylalanine

Le signal est donc extrait de l'ensemble des spectres afin de procéder à un traitement par fitting de la bande (figure 22 a et b). Le fitting ou ajustement est une technique d'analyse d'une courbe expérimentale qui consiste à construire une courbe théorique à partir d'une fonction mathématique modèle. Les paramètres de cette courbe sont ajustés afin de se rapprocher de la courbe expérimentale. Le modèle choisi pour procéder au fitting est une régression de type Gaussienne Lorentzienne en prenant en compte une correction de la ligne de base.

Après cette manipulation, une image est générée et représente la variation de l'intensité du signal sur la surface de travail. Par la comparaison entre l'image CCD et l'image reconstruite on observe très nettement la cellule (Figure 22 c et d).

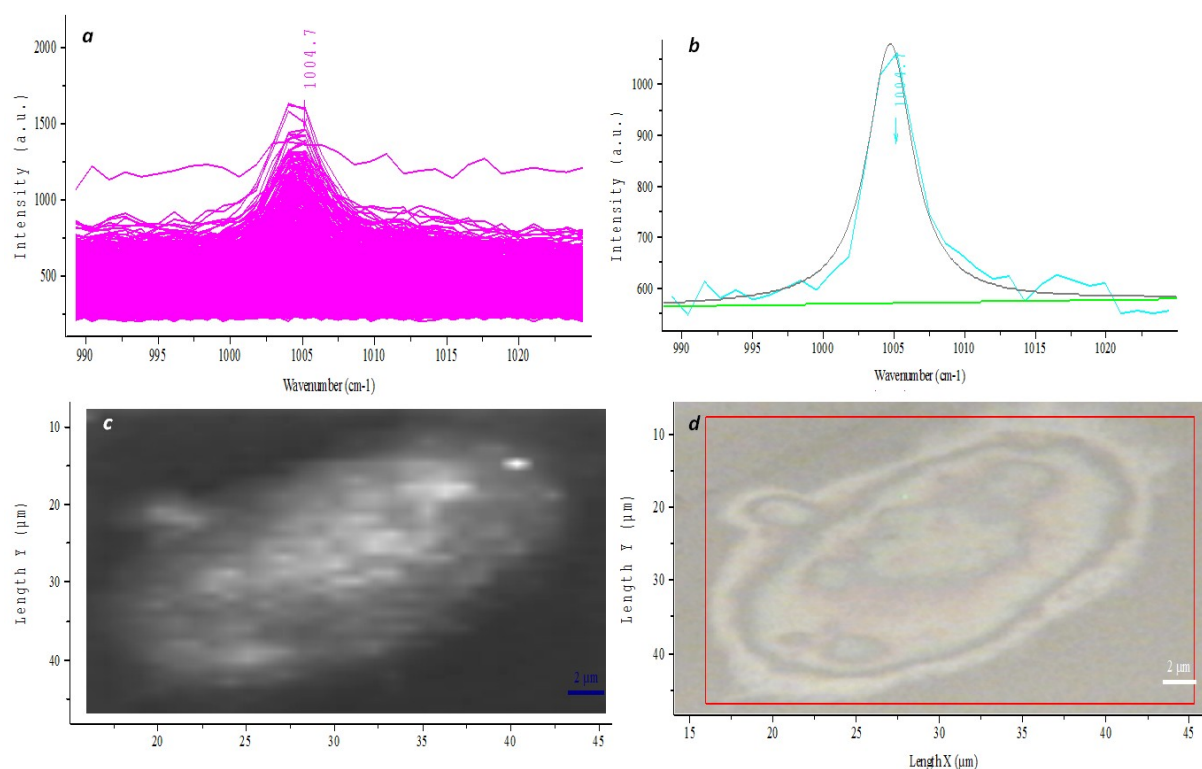


Figure 22 Les étapes de l'étude d'une image Raman, a) extraction de la bande d'intérêt ; b) fitting sur la bande d'intérêt ; c) image Raman de la phénylalanine ; d) image CCD

Par cette méthode il est également possible de procéder à l'imagerie de plusieurs bandes spécifiques de la cellule. Les images obtenues sont ensuite superposées pour montrer la localisation de différentes biomolécules présentes au sein de la cellule. Les expériences menées au laboratoire nous ont permis de reconstruire l'image d'une cellule par l'étude de plusieurs bandes d'intérêt.

Les bandes choisies pour cette étude ont été regroupées dans un tableau récapitulatif (Figure 23), ces dernières ont été choisies car elles permettent de visionner l'ensemble de la cellule (phénylalanine) et dans un second temps l'observation de fonctions chimiques présentes dans le noyau. Une nouvelle cellule a été sélectionnée pour l'expérience (figure 23).

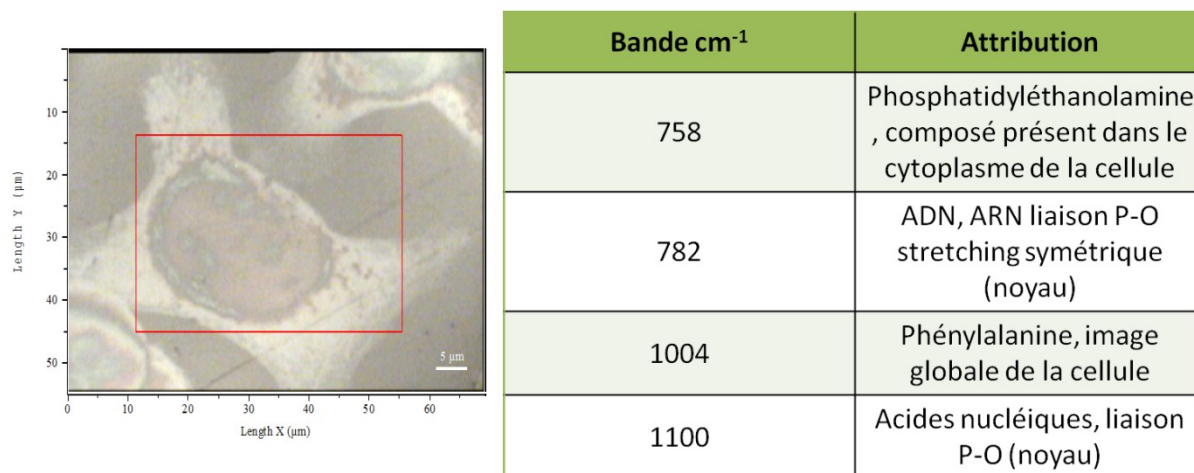


Figure 23 Image CCD de la cellule de l'étude et tableau des bandes choisies

L'acquisition de l'image a été faite sur une surface de $31 \mu\text{m}$ par $44 \mu\text{m}$. Le pas a été fixé à $1,3 \mu\text{m}$ afin de couvrir toute la surface de l'échantillon. Comme lors des acquisitions précédentes les paramètres ont été regroupés dans le tableau suivant (Tableau 5).

Tableau 5 paramètres d'acquisition

Objectif (grossissement ; NA)	Objectif à air Olympus LMPlan FI X100 ; 0.8
Longueur d'onde d'excitation (nm)	632.818 (He/Ne)
Filtre OD	Sans
Trou confocal (μm)	250
Fente (μm)	125
Réseau (trait/mm)	600
Pas δ (μm)	1,3
Surface de travail (x;y) en μm	31,4 x 44,3
Temps d'acquisition (nb sec x nb d'accumulation)	200 x 2

Après acquisition et traitement, une superposition deux à deux des images a été effectuée, cette manipulation permet de mettre en évidence différentes parties de la cellule comme le montre la figure 24. Sur cette acquisition, quatre bandes ont été analysées. Chacune de ces bandes a été comparées à l'image CCD obtenue par le microscope de l'appareil (Figure 24a).

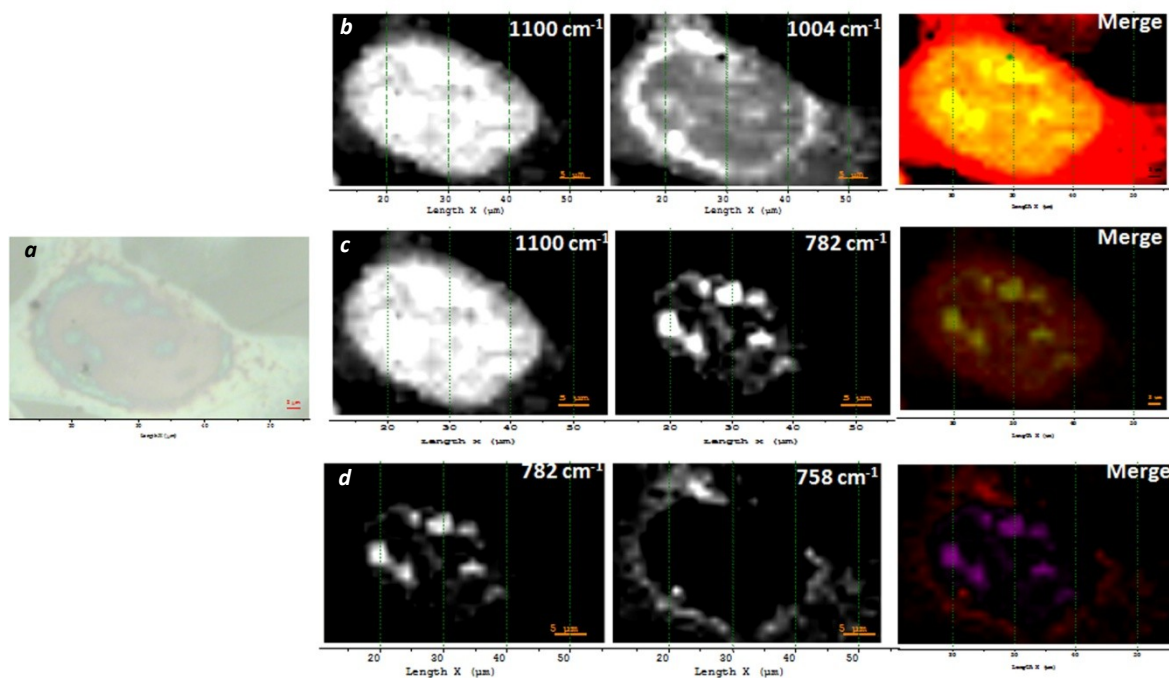


Figure 24 : analyse Raman multi-bandes par imagerie Raman

Sur la Figure 24b ; une étude a été menée sur la bande de la phénylalanine présentée précédemment et le signal apparaissant à 1100 cm^{-1} , ce dernier correspond à la liaison PO_2^- stretching des composés phosphorés. Ces fonctions chimiques sont essentiellement présentes dans le noyau de la cellule. On observe une forte concentration de la bande à 1100 cm^{-1} sur la zone centrale de la cellule, qui correspond au noyau de la cellule. Comme lors de la première cartographie de cellule présentée, le signal à 1004 cm^{-1} donne une image globale de la cellule. De plus on note une forte concentration de la bande à 1004 cm^{-1} à l'extérieur du noyau. Ce signal est observable en tout point de la surface d'analyse en concentration variable. Une superposition de ces deux bandes à été effectuée et une nouvelle image est obtenue. Cette dernière représente la cellule dans son intégralité et permet de délimiter le noyau du cytoplasme de la cellule.

La Figure 24c ; présente une étude au sein même du noyau. L'objectif était de savoir s'il est possible d'obtenir une différenciation entre deux fonctions chimiques ou deux types de vibrations différentes au sein d'un même compartiment. Dans ce cas, les deux bandes étudiées concernent la liaison P-O stretching à 1100 cm^{-1} qui a été décrite dans la littérature comme étant une bande significative du noyau. Le second signal étudié est un signal apparaissant à 782 cm^{-1} caractéristique de l'ARN et de l'ADN de la liaison P-O des fonctions PO_2^- .^[60] L'image Raman obtenue correspondant à la bande à 1100 cm^{-1} est identique à celle obtenue précédemment. Dans le cas de l'étude du signal apparaissant à 782 cm^{-1} on observe des zones bien définies dans le noyau de la cellule qui semblent correspondre aux sites où l'on peut observer la présence de l'ADN et de l'ARN par l'intermédiaire des liaisons phosphates constituant ses biomolécules. Par superposition des images on peut clairement distinguer deux compartiments au sein même du noyau, l'un représentant le noyau dans sa globalité et l'autre représentant une zone riche en ADN et ARN qui pourraient être liée à la localisation des nucléoles.

La Figure 24d correspond à la comparaison entre un signal issue de l'extérieur du noyau et le signal précédemment étudié au sein du noyau. Pour ce cas, les signaux sélectionnés sont dans un premier temps la bande correspondant à la liaison P-O présent dans l'ADN et l'ARN apparaissant à 782cm^{-1} , dont les caractéristiques ont été décrites ci dessus. Dans un second temps le signal sélectionné apparaissant à 758 cm^{-1} ce signal est décrit dans la littérature comme étant caractéristique de la phosphatidyléthanolamine (Figure 25) ^{[60] [80] [83]} La phosphatidyléthanolamine est une molécule de la famille des phosphoglycérides. Cette famille de composés sont constitutifs des membranes biologiques. ^{[83] [84] [85]} Dans le cadre de notre étude, le signal observé par imagerie Raman apparaît essentiellement à l'extérieur du noyau, et représente le cytoplasme de la cellule. Il est observé une forte concentration de la bande autour du noyau. L'intensité de ce signal étant relativement faible, les conditions de traitement de cette bande par ajustement est rendu difficile. Il est nécessaire de procéder à des acquisitions supplémentaires sur ce signal afin de mieux définir la localisation de cette bande sur la surface de l'échantillon. Par superposition des deux images Raman, une image globale de la cellule est obtenue. Dans ce cas il a été possible de visualiser deux fonctions chimiques de molécules constituant des parties différentes de la cellule l'une étant caractéristique du noyau (par la visualisation de la liaison P-O de l'ADN et de l'ARN) et le second signal qui semble lié à la membrane de la cellule.

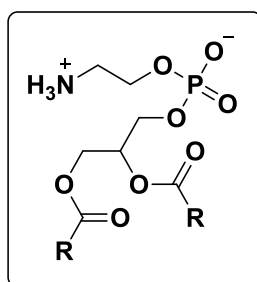


Figure 25 : Structure générique de la Phosphatidyléthanolamine (groupe R variables)

Cette série d'analyse a permis d'obtenir des images par spectroscopie Raman. Grâce à ces analyses il a été possible d'identifier différentes parties de la cellule grâce à l'analyse de certains signaux caractéristiques de la cellule. Comme pour les travaux de M. Manfait, il est possible d'observer des signaux caractéristiques de l'ADN et l'ARN dont les valeurs de longueur d'ondes sont très proches des valeurs obtenues par M. Manfait et ses collaborateurs. ^[75]

Il est à noter que le temps d'acquisition nécessaire pour l'obtention d'image Raman est relativement long (4 jours d'acquisition) sur le système employé. Ce désavantage est dû essentiellement à la faible intensité du signal Raman au sein de cellule. Pour contourner ce désavantage, une autre approche est envisagée dans l'optique de faire de l'imagerie Raman : le marquage de site biologique par l'intermédiaire d'une sonde moléculaire dont le signal Raman est facilement repérable.

b. La nature des sondes exogènes employées

Lors du chapitre 2 différentes séries de sondes ont été synthétisées en fonction de leur potentiel de marquage sur différents types d'organites cellulaires. Ensuite une famille de sonde à été sélectionnée pour permettre le marquage de l'entité biologique d'intérêt ; à savoir le marquage d'un anticorps secondaire.

Nous introduirons dans un premier temps la spécificité de la triple liaison carbone-carbone dans un spectre Raman. Nous présenterons par la suite les différentes étapes successives dans le but de nous rapprocher des conditions de marquages et enfin nous présenterons les résultats obtenus après le marquage.

Les molécules synthétisées comportent une fonction alcyne. Cette fonction peut se décliner en deux types, elle peut être interne ou terminale (en position externe) (Figure 26). Ce type de fonction est facilement visible en spectroscopie Raman.

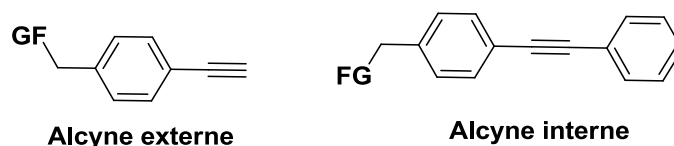
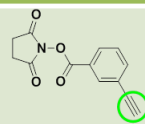
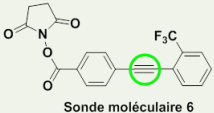
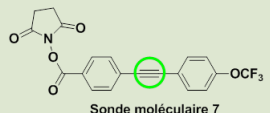


Figure 26 Présentation des alcynes

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons présenté les notions de bases liées à cette technique spectroscopique pour en définir des caractéristiques bien précises. En général la symétrie ou la non symétrie d'une molécule va définir si cette dernière possède un plusieurs modes de vibration Raman Dans notre cas, la liaison carbone-carbone est symétrique, le groupe fonctionnel aura un mode de vibration actif en spectroscopie Raman. ^{[86] [87]}

Il est possible de différencier les deux types d'alcyne tableau 6. Une comparaison entre les deux types d'alcyne est présentée (Figure 27).

Tableau 6 : Alcyne étudiés

Molécules	Type d'alcyne	Longueur d'onde (cm ⁻¹)
 Sonde moléculaire 5	Externe	2100
 Sonde moléculaire 6	Interne	2228
 Sonde moléculaire 7	Interne	2230

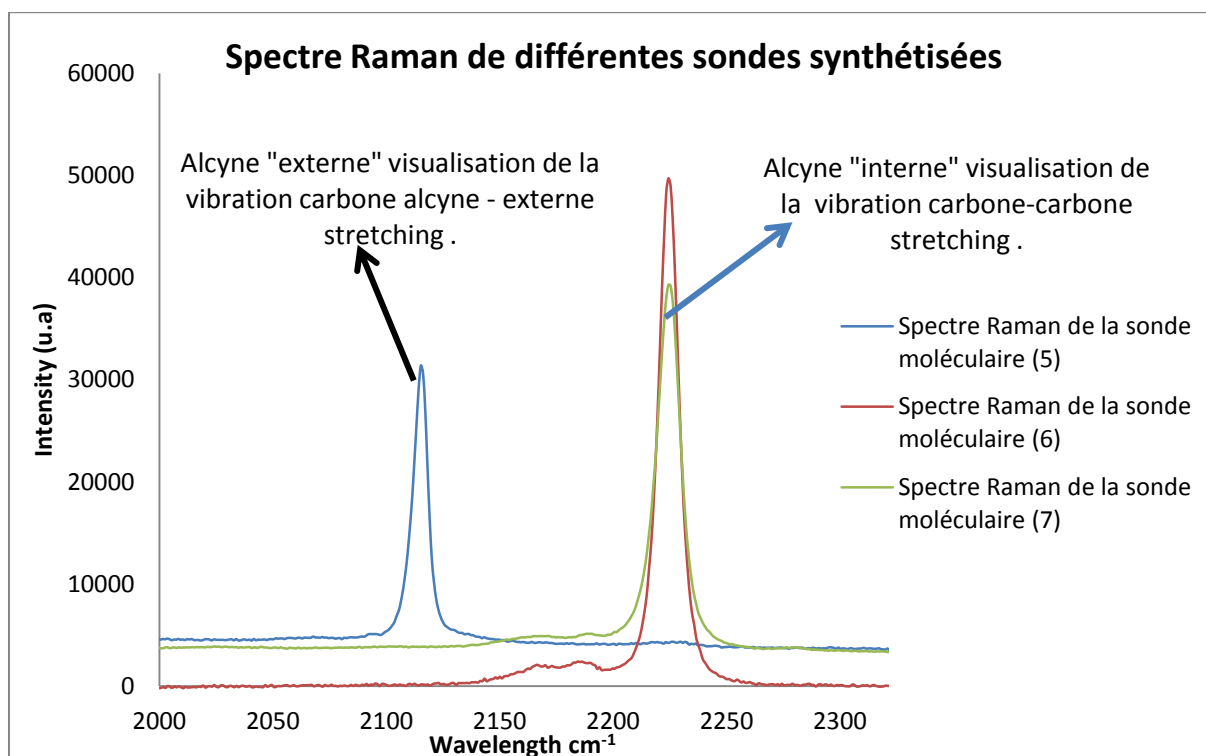


Figure 27 Différentes bandes alcynes

Cette différence s'explique par le type le mode de vibration de la liaison observée. Dans le cadre de l'alcyne externe ou également appelé alcyne terminal, le mode de vibration permettant la visualisation de la liaison alcyne est dû à un mode de vibration de stretching carbone-carbone de l'alcyne terminal. Dans le cas des alcynes internes étudiés la vibration de type stretching carbone-carbone est différente car la liaison est positionnée en position centrale au sein de la molécule et qui plus est entre deux groupes aryle. Il est également possible de distinguer une différence de fréquence entre les triples liaisons interne des composés 6 et 7. Ces composés ayant des structures

relativement similaires, la différence de fréquence peut être liée à la façon dont est substitué le cycle aromatique comportant le groupement fluoré. De cette façon, l'environnement chimique de la triple liaison peut être modifié et conduire à cette différence de fréquence.

Le grand intérêt de la fonction alcyne en spectroscopie Raman vient du fait que le signal correspondant apparaît dans une zone dans laquelle la triple liaison est majoritaire. Cette zone ne contient aucune information provenant de l'échantillon biologique, par conséquent la sonde sera détectable car aucune biomolécule présente dans la cellule ne contient de liaison alcyne. Deux analyses ont été effectuées afin de démontrer qu'il n'y a pas de signaux dus à la triple liaison au sein de l'échantillon. La première analyse est une comparaison entre un spectre Raman sur une cellule dans la fenêtre spectrale d'apparition de la triple liaison et le spectre des sondes moléculaires (figure 28). Dans ce cas on constate bien que cette zone ne présente pas de signal lié au matériel biologique. La seconde expérience consiste en une comparaison entre la triple liaison carbone-carbone et le support que nous allons utiliser pour le marquage : le CaF_2 . Dans ce cas également, il n'y a aucunes bandes qui interfèrent avec le signal qui nous intéresse.

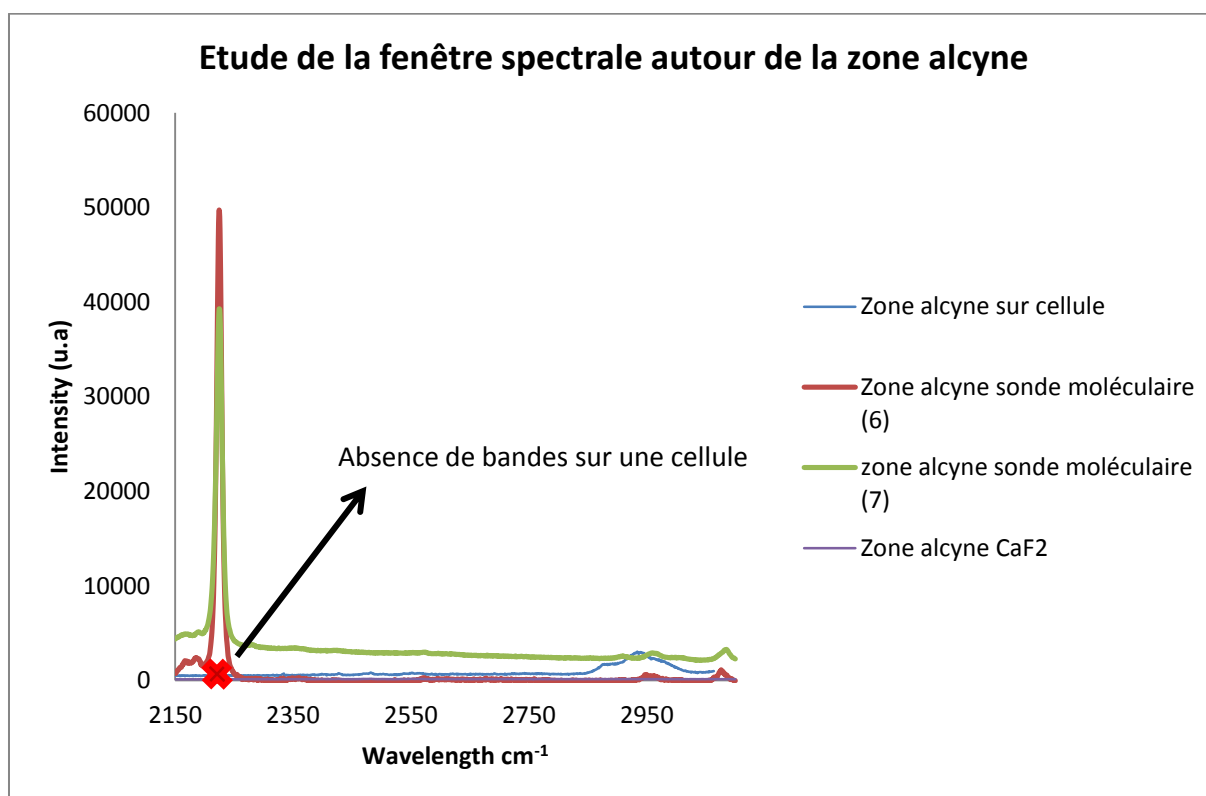


Figure 28 : Spectre Raman fenètre spectrale triple liaison

L'étape qui suit est la mise en solution des sondes dans un solvant compatible avec les cellules et qui ne dégrade pas le composé utilisé. Le solvant sélectionné est le DMSO, ce solvant de la famille des organosoufrés aprotique et polaire est couramment utilisé car la grande majorité des produits organiques sont solubles dans ce dernier. De plus il est miscible avec de nombreux solvants dont l'eau. Cette seconde particularité est très importante car le marquage se fait en milieu aqueux et va permettre de mettre en contact les anticorps et les sondes moléculaires.

Pour cette étude, seule la sonde moléculaire (6) sera étudiée, cette dernière sera mise en solution dans le DMSO. Deux concentrations seront étudiées afin de montrer que la mise en solution de la sonde ne détériore pas le signal de la triple liaison carbone-carbone (Figure 29).

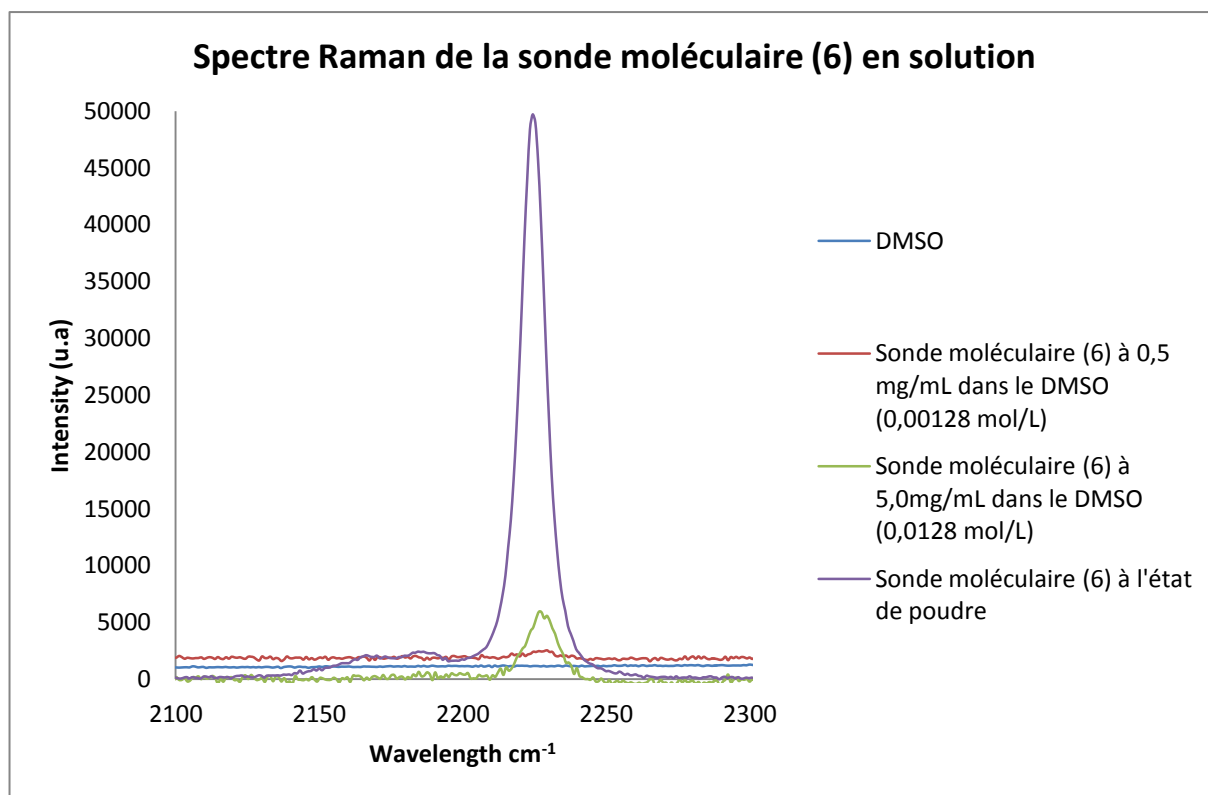


Figure 29 Spectre de la sonde 66 en solution dans le DMSO

Les spectres Raman obtenus ne concernent que la fenêtre spectrale d'intérêt à savoir celle de la bande alcyne. Les deux solutions de sondes utilisées ont été préparées par dissolution de 0,5 et 5,0 mg de sonde (6) dans 1mL de DMSO. Les temps d'acquisitions de cette expérience ont été fixés en 3 accumulations de 120 secondes. D'après les spectres obtenus, la concentration la plus faible (0,5mg/mL ou 0,00128 mol/L) n'est pas décelable dans ces conditions d'utilisation. Lors de l'analyse de la solution à 0,0128 mol/L (5,0mg/mL), le signal de la triple liaison carbone-carbone est détectable. Par comparaison avec la triple liaison carbone-carbone de la sonde à l'état de poudre. Une variation de 1 cm⁻¹ est observé par rapport au signal de la poudre seule et correspond à la résolution spectrale de l'appareil dans ces conditions d'utilisation. Nous pouvons donc en déduire que le signal détecté est bien celui de la triple liaison carbone-carbone. La dissolution de la sonde dans le DMSO a peu d'influence sur le signal de la triple liaison. Les sondes sont donc utilisables dans le DMSO pour le marquage que nous allons décrire par la suite.

c. Vérification de la faisabilité de marquage de l'anticorps secondaire

Après avoir démontré l'intérêt de la liaison alcyne dans le cadre de l'imagerie Raman, une nouvelle série de test a été effectuée afin de montrer que le marquage est possible. Lors du chapitre 1 il a été démontré par microscopie de fluorescence que la sonde n'avait pas d'influence sur la reconnaissance de l'anticorps primaire par le secondaire. Cette partie du chapitre vise à vérifier l'efficacité du marquage de l'anticorps secondaire par l'intermédiaire de la spectroscopie Raman. L'étude sera menée sur un modèle et aura pour objectif de visualiser le signal de la bande alcyne après marquage de l'anticorps secondaire et définir la concentration de marquage idéale.

Pour mettre en évidence le marquage de l'anticorps secondaire, nous allons étudier par spectroscopie Raman l'apparition ou l'absence de la liaison alcyne. Pour se faire nous allons utiliser un modèle qui permettra d'étudier l'anticorps secondaire et la sonde avant de procéder au marquage de la cellule. Cette méthode consiste en l'utilisation d'un support d'analyse contenant une protéine pour lesquelles les anticorps secondaires ont une grande affinité et vont se fixer à la surface.

L'expérience consiste à procéder au marquage de l'anticorps secondaire par une sonde. L'anticorps secondaire utilisé lors de cette expérience sert également au marquage de l'anticorps primaire spécifique à la nucléophosmine. Dans notre cas la sonde modèle utilisée sera la sonde (6) (figure 30). La concentration en sonde sera modifiée pour chaque expérience et l'analyse se fera uniquement sur la fenêtre spectrale de la liaison alcyne.

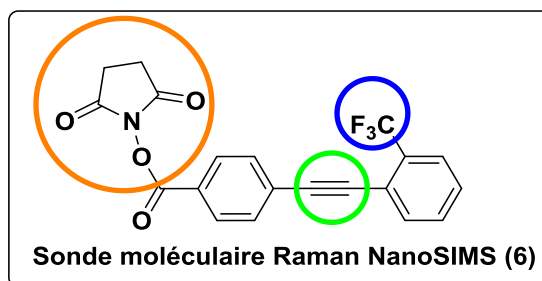


Figure 30 : Sonde moléculaire de l'étude

Suite au marquage, chaque série d'anticorps marqués par la sonde sera mis en présence d'un support. Ce support se présente sous forme de billes de sepharose et est recouvert de protéines G, ces dernières vont capter les anticorps secondaires. Ce support est issu du commerce et aucun test d'affinité n'a été effectué avec la sonde en présence de la protéine G seule. Différentes mesures ont été effectuées et ont permis l'étude de différents cas (figure 31) :

- Billes de protéine G seules (cas n°1)
- Billes de protéines G sur lesquelles sont accrochées des anticorps secondaires (cas n°2)
- Billes de protéines G sur lesquelles sont accrochées des anticorps secondaires marqués par la sonde (6) à des concentrations variables (cas n°3)
- Billes de protéines G sans anticorps secondaires mais en présence de la sonde moléculaire (6) (cas n°4)

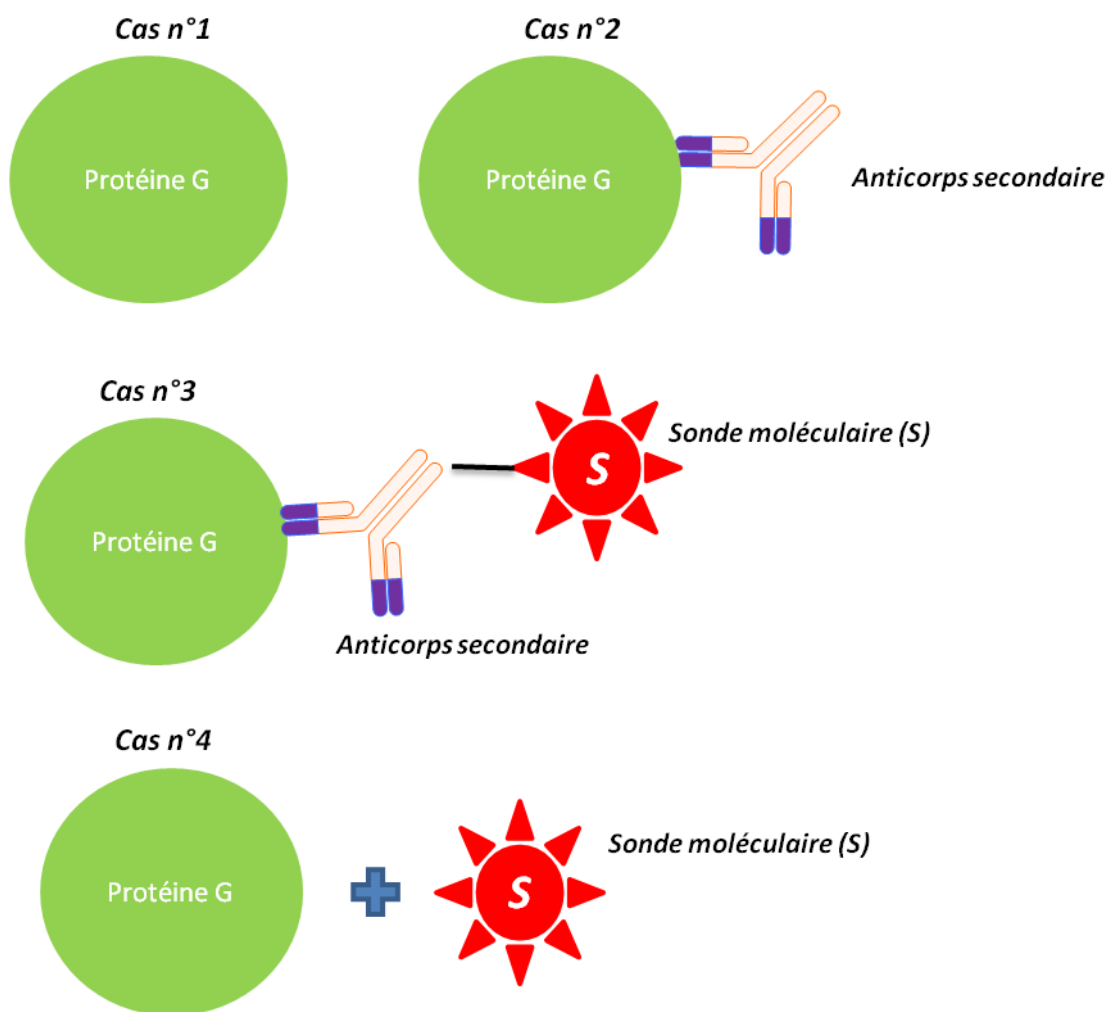


Figure 31 Les différents cas de l'étude envisagé

Pour chaque cas, des spectres ont été effectués pour observer la bande alcyne. Les paramètres d'acquisition ont été regroupés dans le tableau 7.

Tableau 7 Paramètres d'acquisition utilisés

Objectif (grossissement ; NA)	Objectif à air Olympus LMPlan FI X100 ; 0.8
Longueur d'onde d'excitation (nm)	632.818 (He/Ne)
Filtre OD	Sans
Trou confocal (μm)	250
Fente (μm)	125
Réseau (trait/mm)	600
Fenêtre d'acquisition	Centrée à 2475 cm^{-1}
Surface de travail (x;y) en μm	40 x 30
Temps d'acquisition (nb sec x nb d'accumulation)	500 x 3

L'ensemble des spectres est analysé (Figure 32), et pour chaque cas ou le marquage avec l'anticorps secondaire a été effectué on peut observer le signal correspondant à l'alcyne. Lors de

l'étude du cas n°4, la bande caractéristique de l'alcyne n'est pas observée. Ce cas correspond à la mise en contact de la bille de protéine G avec la sonde (6) à une concentration de 5mg/mL (0,0128 mol/L). Aucun signal n'est observé, ce qui signifie que sans la sonde n'est pas visible sans la présence de l'anticorps secondaire et que cette dernière ne reconnaît pas la bille de protéine G.

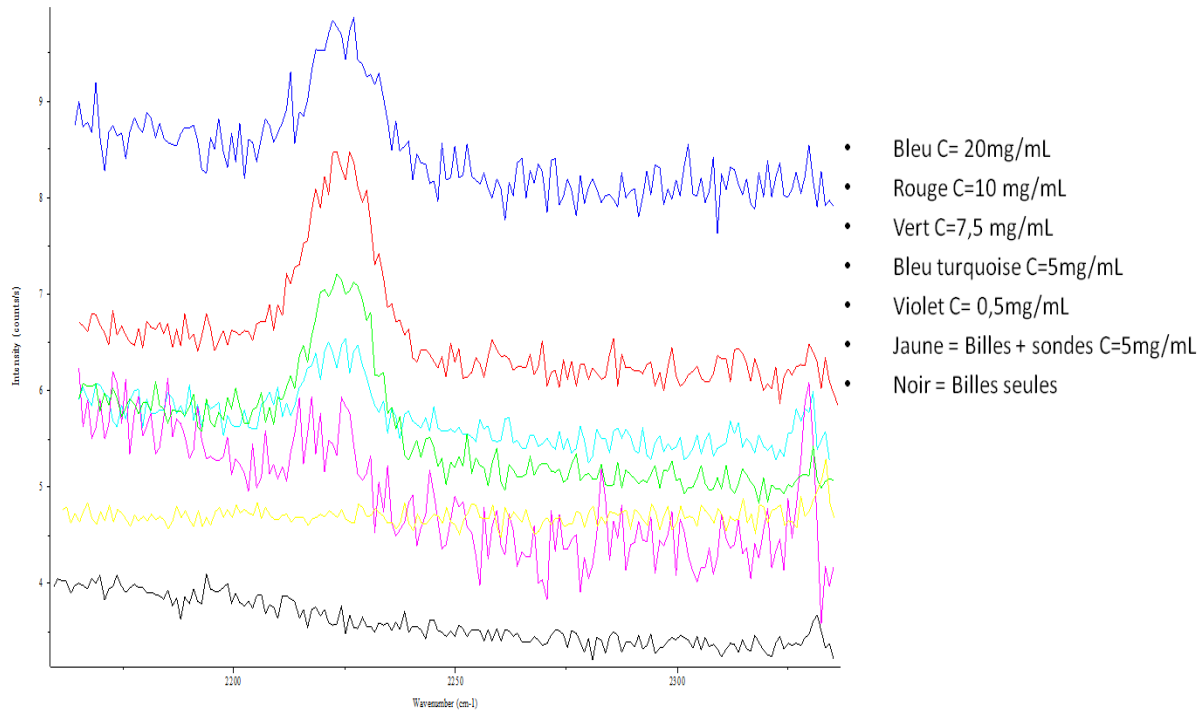


Figure 32 Série d'acquisition sur les billes de protéines G

Suite à ces résultats il a été observé une augmentation de l'intensité du signal de la bande alcyne au fur et à mesure que la concentration en sonde augmentait. Il a été également observé une augmentation moindre de l'intensité du signal après 10 mg/mL (C=0,0257 mol/L). L'aire des pics a été calculée (Tableau 8) pour le signal Raman de la bande alcyne obtenue. L'aire des pics est déterminée par ajustement des courbes obtenue (fitting) à l'aide du logiciel Labspec de Jobin Yvon, il permet d'évaluer avec précision l'influence de l'augmentation de la concentration en sonde. A partir de l'aire des pics obtenus, une courbe a été tracée et représente l'évolution de l'aire du pic en fonction de la concentration de sondes moléculaires utilisée pour le marquage (figure 33).

Tableau 8 Tableau récapitulatif des concentrations étudiées

Concentration (mg/mL)	Concentration (mol/L)	Aire du pic calculé
0	0	0
0,5	0,00128	8,28527
5	0,0128	10,5539
7,5	0,0193	21,6261
10	0,0257	25,5142
20	0,0515	20,5169

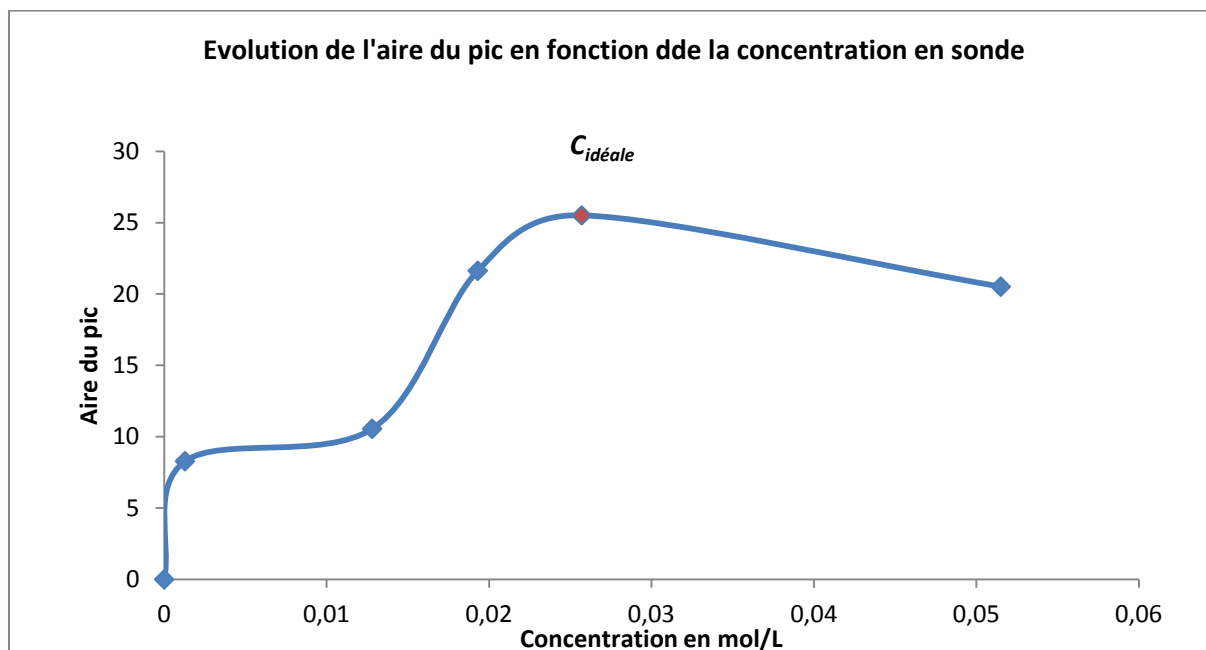


Figure 33 Évolution de l'aire du pic par rapport à la concentration de la solution de sonde

A partir de ce graphique il a été déterminé que la concentration idéale d'utilisation de la sonde Raman est de 0,0257 mol/L. Pour une concentration supérieure à la valeur optimale déterminée, une diminution de l'aire du pic est observée. Cette diminution peut se traduire par une éventuelle saturation des sites d'accroche sur l'anticorps secondaire. L'anticorps secondaire ne disposerait plus d'emplacements libres accessibles dans sa structure pour permettre l'accroche des sondes moléculaires. Pour rappel les sondes moléculaires marquent l'anticorps secondaire en créant une liaison covalente avec les fonctions amines primaires. Ces fonctions amines sont présentes dans la lysine (Figure 34), un acide aminé qui entre dans la constitution des anticorps. Cependant pour confirmer cette tendance, il serait nécessaire de procéder à plusieurs séries d'acquisition.

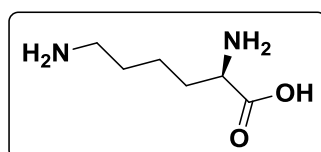


Figure 34 Structure de la lysine

Par ces tests, il a été démontré la faisabilité du marquage et la justification de ce dernier par une analyse spectroscopique. Ce test a permis de mettre en évidence la concentration de sonde maximale à utiliser. Dans le cas présent, il a été déterminé que la valeur idéale est de 10 mg/mL soit 0,0257 mol/L.

La prochaine étape est l'application de ce marquage dans le cadre de l'imagerie Raman.

d. Imagerie de cellule par l'intermédiaire d'une sonde

Suite aux différents essais préliminaires, la prochaine étape consiste à marquer une cellule afin d'obtenir une image par l'intermédiaire de cette dernière. Avant de procéder au marquage, une nouvelle expérience a été effectuée afin de démontrer l'absence de la sonde sur la surface de l'échantillon.

Pour se faire, une cellule a été analysée par spectroscopie Raman en se focalisant cette fois sur la fenêtre spectrale d'apparition de la bande alcyne. Les cellules utilisées pour cette expérience ne possèdent donc aucun marquage, ces dernières ont été préparées sur des lames de CaF₂ (Figure 35). La surface d'étude recouvre l'ensemble de la cellule et représente une surface de 40,5 x 37,7 µm. Le temps d'acquisition a été fixé à 2 x 200 sec (Tableau 9).

Tableau 9 Paramètres d'acquisition de l'image

Objectif (grossissement ; NA)	Objectif à air Olympus LMPlan FI X100 ; 0.8
Longueur d'onde d'excitation (nm)	632.818 (He/Ne)
Filtre OD	Sans
Trou confocal (µm)	250
Fente (µm)	125
Réseau (trait/mm)	600
Fenêtre d'acquisition	Centrée à 2475 cm ⁻¹
Pas δ (µm)	1,3
Surface de travail (x;y) en µm	40,5 x 37,7
Temps d'acquisition (nb sec x nb d'accumulation)	200 x 2

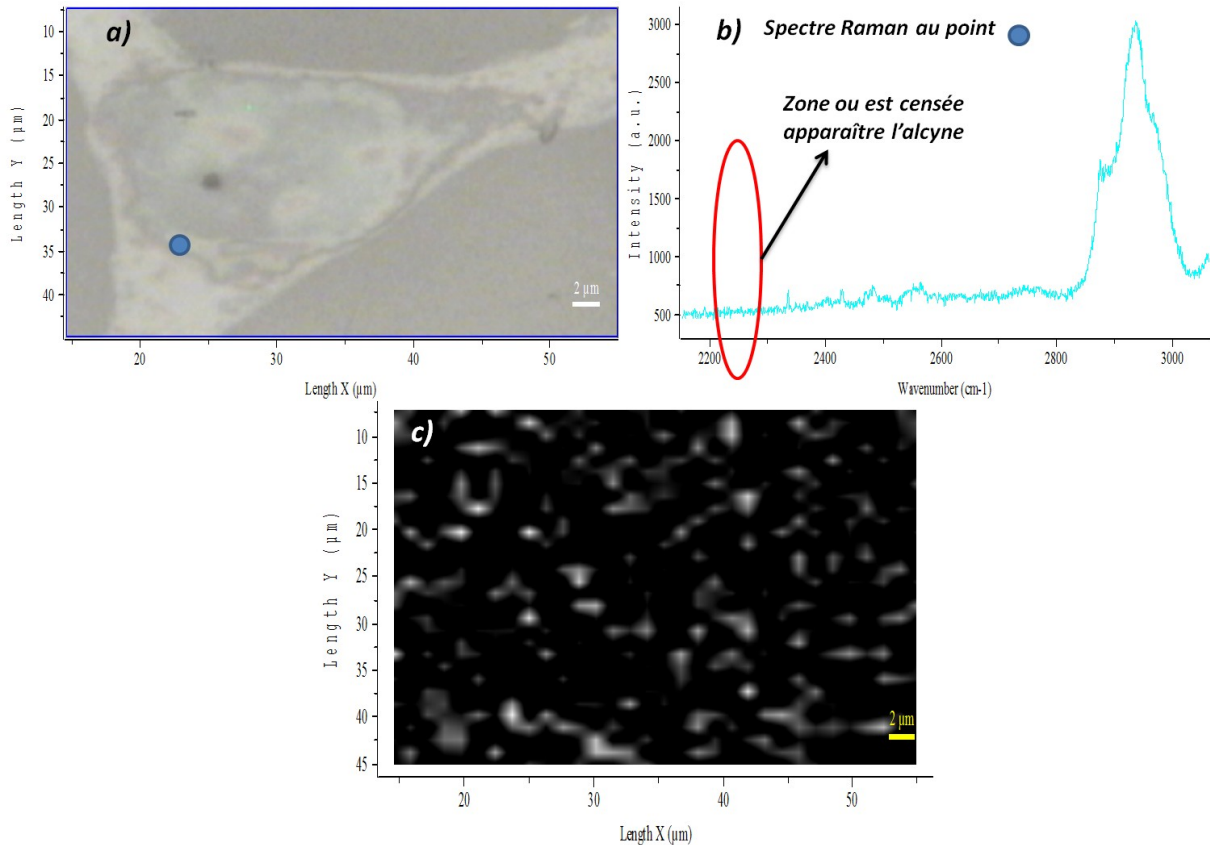


Figure 35 Cartographie la cellule sur la bande alcyne sur une cellule non marquée, a) image CCD de la cellule, b) spectre au point bleu, c) image Raman en fonction du signal collecté autour de 2230 cm^{-1}

La localisation de la bande à 2230 cm^{-1} correspondant à la triple liaison carbone-carbone dans une cellule n'est pas possible car la cellule ne contient pas ce type de fonction au sein de sa structure. L'image Raman obtenue ne permet pas d'identifier une quelconque structure de la cellule, la seule image obtenue correspond au bruit de fond du signal. Cependant il est possible d'observer sur la fenêtre spectrale d'analyse une bande large et relativement intense aux alentours de 3000 cm^{-1} . Ce signal est caractéristique des chaînes carbonées et représente les liaisons carbone-hydrogène stretching de certains groupements tel que les groupes méthyles ou alkyles en général. ^{[86] [87]} Ce signal peut être considéré comme étant caractéristique de la cellule dans ce cas car il correspond aux chaînes carbonées provenant de la cellule. De plus ce signal ne peut pas provenir du support car ce dernier n'est constitué que de matière inorganique.

Pour prouver que l'analyse a bien été effectuée sur la cellule et pas sur une autre partie de la surface d'étude, une analyse de ce signal a été effectuée. Une image riche en composé comportant des liaisons carbonées-hydrogènes a pu être obtenue (Figure 36). L'image obtenue montre que ce signal se localise essentiellement dans le noyau qui est la zone la plus riche en composés carbonés.

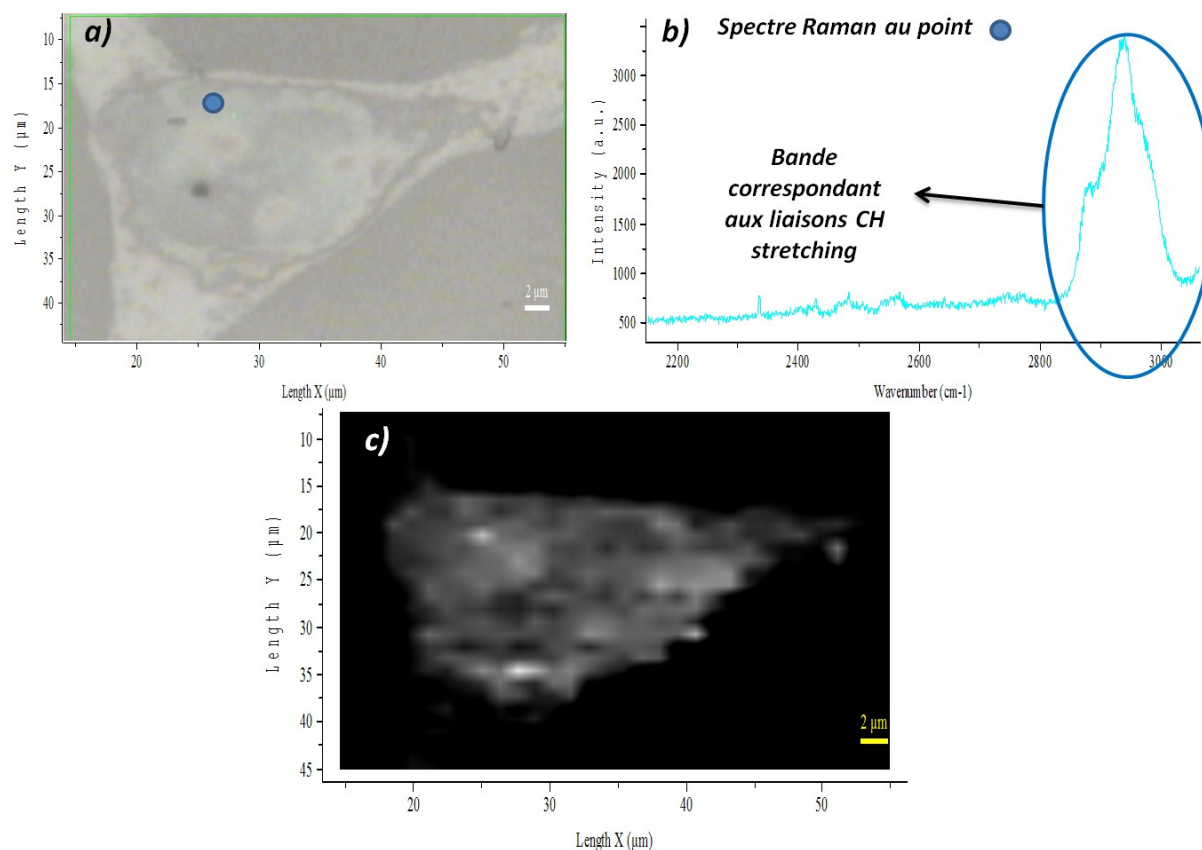


Figure 36 Image Raman de la zone carbone de la cellule : a) image CCD, b) spectre Raman au point bleu, c) image Raman de la bande à 2900 cm^{-1}

Par cette analyse, il a été prouvé qu'aucune interférence ne viendra perturber l'analyse après le marquage. L'analyse du signal apparaissant à 2900 cm^{-1} permet de montrer que la surface d'étude est bien liée à la cellule. De plus cette bande à 2900 cm^{-1} sera très utile par la suite car il sera alors possible de procéder à de l'imagerie endogène par l'intermédiaire de cette bande et exogène par l'intermédiaire des sondes moléculaires. Il nous sera donc possible de vérifier que le marquage se fait bien sur la cellule.

A partir de cette base il est désormais possible de procéder à l'imagerie de la cellule marquée par une sonde qui aura été choisie au préalable. Dans le cadre de notre étude la sonde moléculaire (6) (Figure 37) sera utilisée à une concentration de 5 mg/mL ($0,0193\text{ mol/L}$) dans le DMSO. La méthode est basée sur un double marquage d'immunofluorescence. Dans ce cas le marqueur fluorescent est remplacé par une sonde moléculaire visible en spectroscopie Raman. Le principe du marquage se base sur la reconnaissance entre deux anticorps. Dans un premier temps, un anticorps primaire va marquer spécifiquement une protéine majoritairement présente dans le nucléole : la nucléophosmine. Dans un second temps, l'anticorps secondaire marqué par la sonde moléculaire va reconnaître l'anticorps primaire (Figure 38). Pour rappel, toutes les notions liées à ce marquage sont présentées en détail dans le chapitre 1.

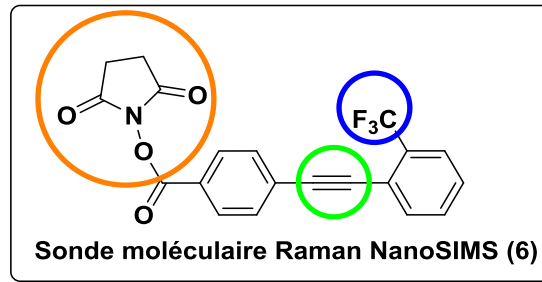


Figure 37 : Sonde n°6

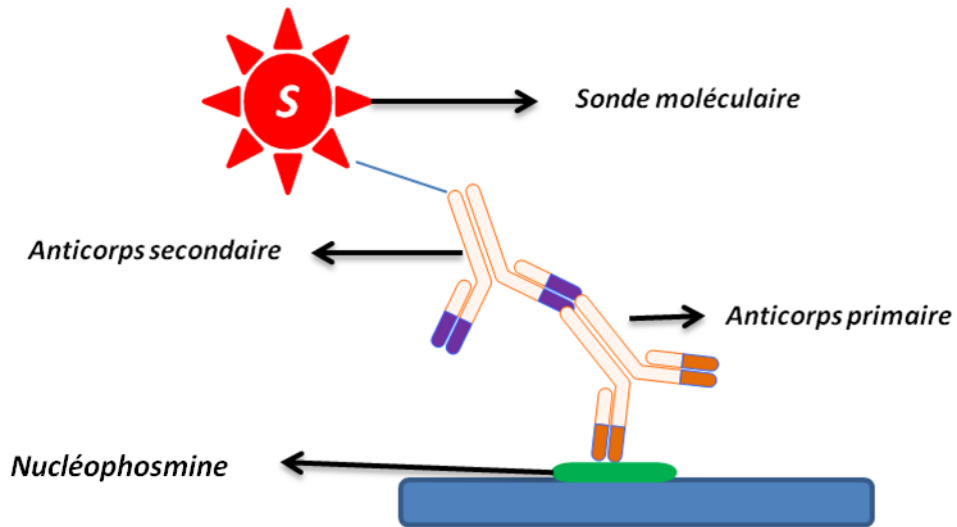


Figure 38 Représentation schématique du principe de marquage de la nucléophosmine du nucléole

Comme lors des acquisitions précédentes, la cartographie va être centrée sur la fenêtre spectrale autour du signal d'intérêt à savoir 2230 cm^{-1} soit le signal correspondant à la triple liaison carbone-carbone. La zone d'étude a été définie sur un zone $21,2\text{ }\mu\text{m}$ par $29,5\text{ }\mu\text{m}$ (Figure 39).

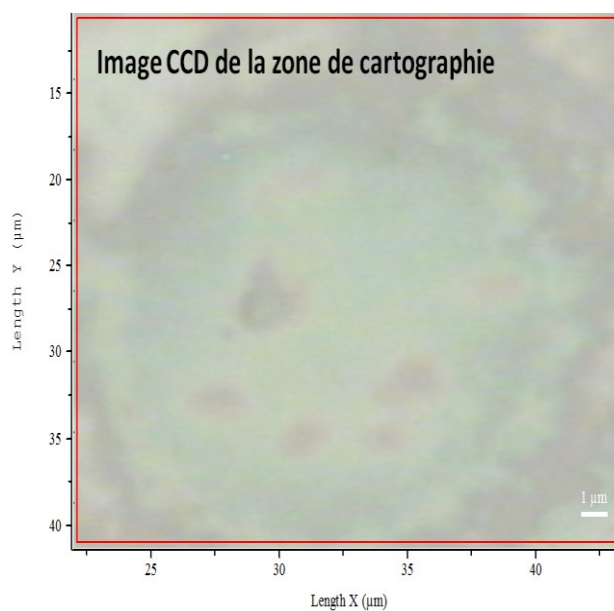


Figure 39 Image CCD de la cellule étudiée

La concentration de sonde dans le DMSO utilisée est de 10 mg/mL (0,0257 mol /mL) et correspond à la valeur optimale déterminée dans le cadre du test en présence des bille couvertes de protéines G. Les cellules utilisées U2OS utilisées ont été cultivée sur des lames de CaF₂ et fixées par une solution de méthanol glacée, le marquage des cellules se fait en deux étapes.

Dans un premier temps la nucléophosmine est marquée par l'anticorps primaire, l'incubation se fait à 4°C durant une nuit et à l'obscurité. La seconde étape consiste à marquer l'anticorps secondaire par la sonde moléculaire choisie. Cette étape se fait dans un tampon borate à pH 8.4, le temps d'incubation de l'anticorps secondaire est de 15 minutes et l'excès de sonde est neutralisé par une solution de glycine. L'anticorps secondaire marqué est ensuite incubé dans la culture cellulaire contenant l'anticorps primaire. Cette dernière étape se fait à température ambiante sur une durée d'une heure.

Une image a été obtenue dans le but d'observer la présence du marquage par la sonde moléculaire **(6)** à l'aide des paramètres d'acquisitions regroupés dans le tableau ci-dessous (Tableau 10).

Tableau 10 Paramètres d'acquisition appliqués dans le cadre d'une acquisition avec une concentration plus élevée

Objectif (grossissement ; NA)	Objectif à air Olympus LMPlan FI X100 ; 0.8
Longueur d'onde d'excitation (nm)	632.818 (He/Ne)
Filtre OD	Sans
Trou confocal (µm)	250
Fente (µm)	125
Réseau (trait/mm)	600
Fenêtre d'acquisition	Centrée à 2475 cm ⁻¹
Pas δ (µm)	1
Surface de travaille (x;y) en µm	21,20 x 29,48
Temps d'acquisition (nb sec x nb d'accumulation)	200 x 2

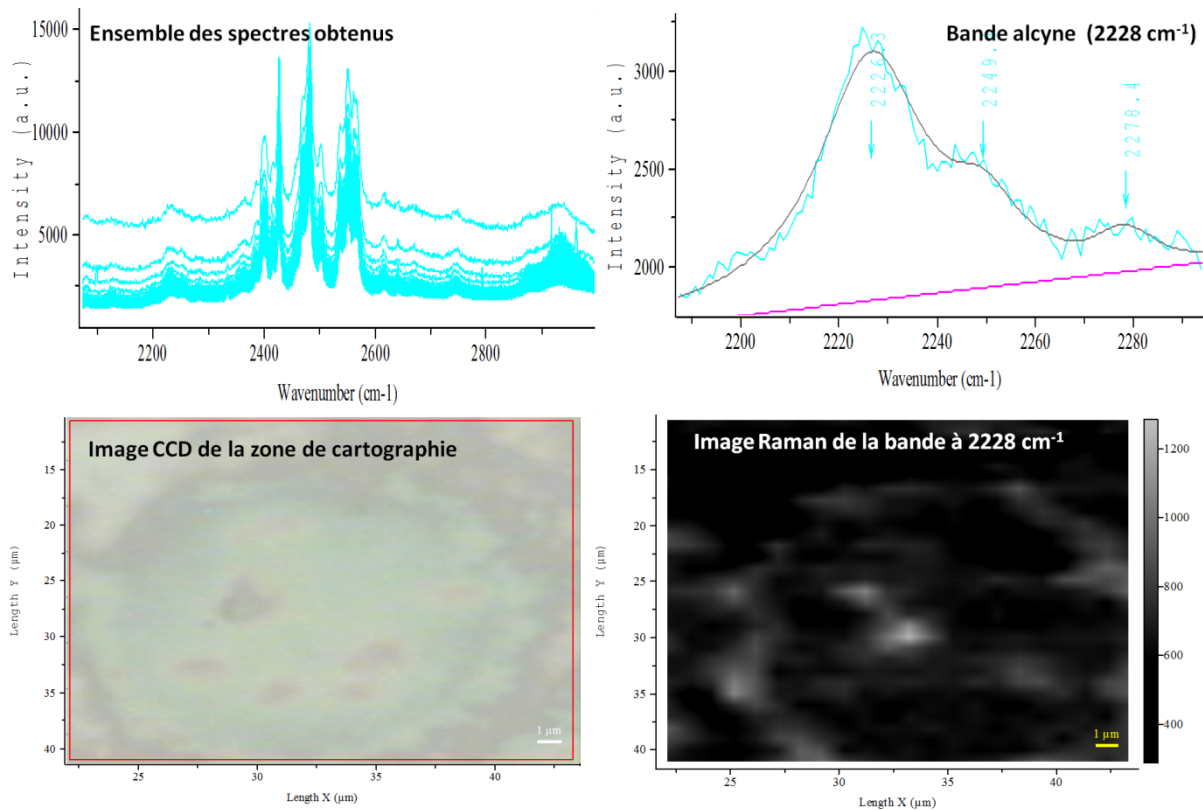


Figure 40 Image Raman d'une cellule marquée en présence d'une sonde moléculaire dont la concentration est de 10mg/mL dans le DMSO

Il nous est possible d'observer très nettement les zones où apparaît clairement le signal de la sonde moléculaire. Nous pouvons constater qu'il est possible de faire un lien entre les nucléoles que nous voyons via la caméra CCD (Tâches noires de la figure 39) et l'image RAMAN (Tâches blanches de la figure 40). En effet nous pouvons voir que la sonde moléculaire utilisée est visible dans les nucléoles. Nous observons également la présence de la sonde à la périphérie du noyau. La présence de la sonde dans ces zones est due au marquage spécifique de la nucléophosmine par l'intermédiaire de l'immunomarquage. La nucléophosmine (ou numatrin B23) est une protéine qui se trouve majoritairement dans les nucléoles du noyau, cependant il est possible de retrouver celle-ci à l'intérieur des unités pré-ribosomales.^[88] Cette protéine transite en permanence entre le nucléole et la membrane nucléaire lors de la synthèse des unités pré-ribosomales^{[89] [90]}. La localisation de la sonde en zone périphérique peut être due à la présence de la nucléophosmine dans les compartiments à la périphérie du noyau. Sur cette acquisition, il est possible de constater que le signal de la sonde est suivi de deux épaulements qui n'apparaissent pas lors de l'observation de la triple liaison seule. Ces épaulements peuvent provenir de la lame de CaF₂ utilisée lors du marquage.

Par la suite, nous avons vérifié sur un second échantillon si un marquage par une solution de sonde à une concentration de 5 mg/mL (0,0128 mol/L) ne serait pas suffisant. Cette nouvelle cartographie a pour but d'étudier la différence sur l'image obtenue avec l'utilisation d'une solution de sonde moins concentrée. La zone d'étude englobe une partie du noyau et s'étend sur une surface de 30 μm x 20,5 μm (Figure 41) les paramètres utilisés dans le cadre de cette acquisition sont regroupés dans le tableau 11.

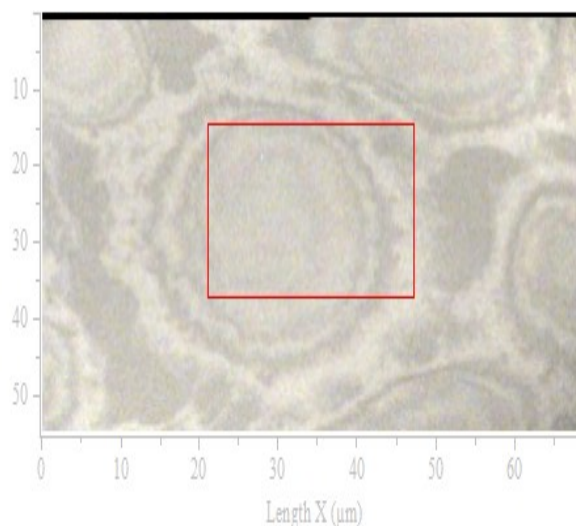


Figure 41 Visualisation CCD de la zone d'étude

Tableau 11 Paramètres d'acquisition de la cartographie

Objectif (grossissement ; NA)	Objectif à air Olympus LMPlan FI X100 ; 0.8
Longueur d'onde d'excitation (nm)	632.818 (He/Ne)
Filtre OD	Sans
Trou confocal (μm)	250
Fente (μm)	125
Réseau (trait/mm)	600
Fenêtre d'acquisition	Centrée à 2475 cm^{-1}
Pas δ (μm)	1
Surface de travail (x;y) en μm	30,1 x 20,5
Temps d'acquisition (nb sec x nb d'accumulation)	200 x 2

Comme dans le cas précédent un ensemble de spectre est obtenu et ce dernier est analysé afin d'observer le marquage. Le signal correspondant à la triple liaison recherché n'est pas très intense et est très bruité par rapport à celui obtenu par la cartographie précédente (figure 42). Cependant il est tout de même possible d'obtenir une image de la zone étudiée.

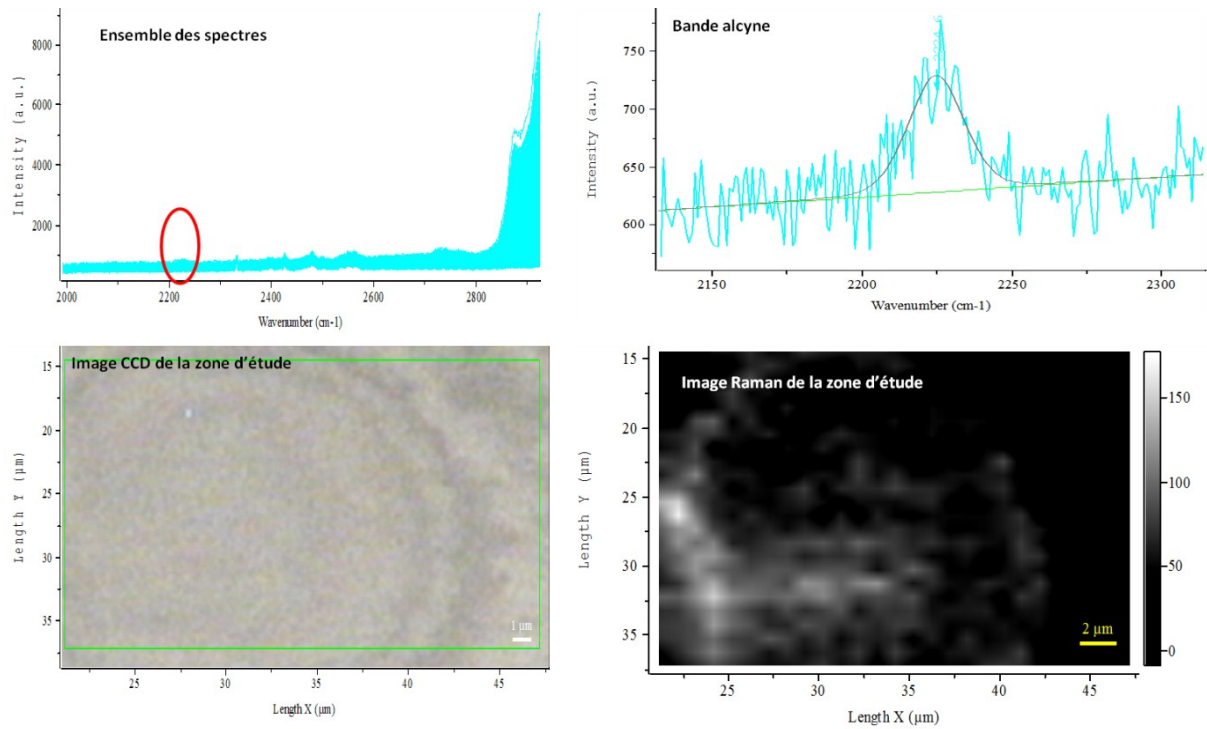


Figure 42 Analyse Raman d'une cellule marquée

Dans ce cas les nucléoles semblent moins marqués que dans le cas précédent et leur localisation n'est pas clairement définie. Le fait de diminuer la concentration de marquage altère fortement la qualité de l'image.

Lors de cette partie du chapitre, nous avons prouvé qu'il est possible de faire de l'imagerie Raman par l'intermédiaire d'une petite molécule sonde dont une fonction chimique apparaît dans une zone spécifique du spectre Raman et sans interférences avec le matériel biologique.

L'acquisition des spectres permettant l'obtention de l'image a nécessité un temps d'acquisition relativement long, l'obtention d'une image dure 3 jours dans les deux cas. Pour éventuellement contrer cette contrainte de temps une autre voie d'investigation a été envisagée : la CARS.

VI. La spectroscopie CARS (coherent anti-stokes Raman spectroscopy)

a. Introduction au CARS

i. Introduction générale

Bien que la spectroscopie Raman d'échantillon biologique ait énormément évolué et ait démontré des progrès conséquents grâce au microscope confocal, cette dernière est limitée par la faible intensité du signal Raman collecté et la puissance laser nécessaire pour l'obtention du signal. Une autre alternative permettant d'obtenir un "contraste vibrationnel" par l'intermédiaire de la microscopie multiphoton a été envisagée. Cette technique est liée au phénomène de la diffusion Raman anti-stokes et porte le nom de *Coherent Anti-stokes Raman Spectroscopy*.^{[91] [92]}

Ce phénomène a été mis en évidence par deux scientifiques de Ford Motor Company; P.D Marker et R.W. Terhune; en 1965^[93] grâce aux études menées sur des phénomènes optiques non linéaires de certains matériaux. Cependant, au départ ce phénomène a été limité par le fond de non-résonance de l'échantillon. La notion de composante non-résonante fait référence à une composante électronique sans signal spectral, qui vient bruite et masquer la composante résonante correspondant au signal recherché. A partir des années 70, l'extraction et l'analyse de la composante résonante Raman a pu être appliquée en spectroscopie grâce aux évolutions apportées aux lasers et aux systèmes liés à l'exploitation de ce type de phénomènes.^[94]

LA CARS est un phénomène optique non-linéaire du troisième ordre basé (Figure 43) sur l'interaction entre deux faisceaux lasers excitateurs de longueurs d'ondes différentes :

- Faisceau pompe ω_p
- Faisceau Stokes ω_s

L'interaction de ces deux faisceaux permet de générer une composante appelée composante anti-stokes. La CARS est une technique en deux étapes qui peuvent être décrites comme suit :

- Dans un premier temps les faisceaux Pompe et Stokes interagissent l'un avec l'autre sur l'échantillon pour générer un rayonnement anti-stokes.
- Ce dernier est exalté si la différence de fréquence entre le faisceau pompe et le faisceau Stokes ($\omega_p - \omega_s$) coïncide avec la fréquence de résonance Raman de l'échantillon à étudier.

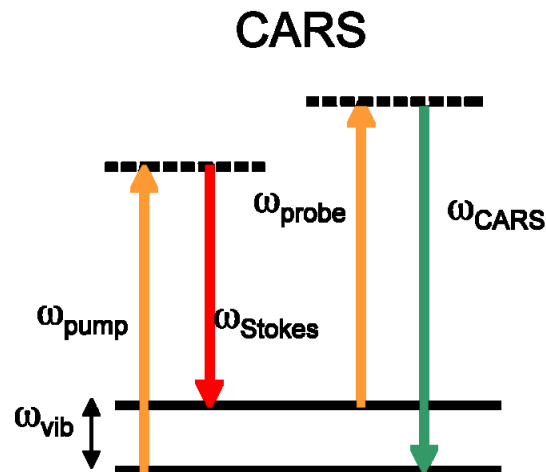


Figure 43 Principe du CARS

La CARS possède de plus de nombreux avantages par rapport à la microscopie Raman classique :

- Une plus grande richesse d'information peut être obtenue par rapport la diffusion Raman classique grâce entre autre aux systèmes dispersifs dédiés à la méthode.
- Technique très peu sensible au phénomène de fluorescence grâce au faisceau pompe.
- Excellente résolution spectrale allant de 0,3 à 1 cm^{-1}
- Le signal obtenu est extrêmement lumineux par rapport à la diffusion Raman classique. Cette caractéristique peut donc induire une diminution significative du temps d'acquisition.

Cependant, cette technique est également limitée par certains désavantages comme pour les techniques faisant appel à un laser, elle est sensible à l'instabilité de ce dernier et peut être sujette à la saturation lorsque des sources laser plus puissantes sont utilisées. La présence d'un fond de non résonance peut limiter la détection du signal recherché.

Malgré ces désavantages, la CARS est utilisé en biologie dans le cadre d'imagerie de contraste en se basant sur les phénomènes mis en valeurs plus haut. Le fait de pouvoir exalter le signal Raman et d'obtenir une meilleur résolution spatiale a permis de procéder à des cartographies très poussées dans le domaine du vivant. ^[95]

ii. CARS adaptée au matériel biologique

La CARS a été utilisé dans le cadre de l'imagerie de cellule afin de pallier aux difficultés rencontrées par la spectroscopie Raman dans ce domaine d'étude. Parmi ces difficultés, nous pouvons citer la fluorescence naturelle de certain échantillon ou le temps de conservation limité des échantillons qui rendent par conséquent les acquisitions difficiles voire impossibles. Cette technique est de plus parfaitement adaptée à l'étude d'échantillons in vivo car ainsi les temps d'acquisition sont diminués ^[96] donnant ainsi la possibilité d'étudier l'activité biologique. Les cellules possèdent de nombreuses fonctions et il est possible d'étudier différents phénomènes au sein de ces dernières telle que la production d'énergie et la migration des cellules voir leur division.

De nombreuses études ont été menées sur les lipides ^{[97] [98] [99]} afin de montrer leur distribution au sein de la cellule, d'autre encore ont été menée dans le but d'étudier la

métabolisation de l'acide oléique. ^[100] L'étude de l'ADN a également été démontré par cette technique, il est entre autre possible de procéder à l'imagerie de l'ADN sous différentes formes, ces travaux ont également mis en évidence les qualités de résolution spatiale de la technique, l'analyse a permis d'imager l'ADN sous forme de réseau. ^[101] La CARS est également applicable à l'étude de tissus issus du cerveau, ^[102] ou de la moelle épinière. ^[103] Comme toutes techniques spectroscopiques, la CARS permet l'étude de fonction chimiques présentes naturellement dans l'échantillon ou introduite via une modification chimique. Par exemple les travaux effectués par Noestheden et ses associés utilisent une protéine modifiée dans le but d'observer une liaison nitrile en CARS. ^[104]

Grâce à ces caractéristiques et aux différentes applications possibles, il a été envisagé de procéder à quelques études préliminaires par l'intermédiaire du CARS.

b. Test préliminaires sur une molécule sonde

La CARS a été envisagée comme technique alternative car elle permet de visualiser une bande spécifique à une molécule et d'en augmenter l'intensité par le couplage de deux lasers.

Une étude a été menée par le laboratoire de Professeur Liao à la National Chiao Tung University à Hsinchu afin de vérifier la faisabilité de la méthode par l'imagerie CARS. La première étape consistait à trouver les longueurs d'ondes d'utilisation possibles pour procéder à l'imagerie.

Dans le cas de cette étude seule la sonde (6) a été étudiée. Pour cet échantillon, les lasers ont été accordés avec les longueurs d'ondes suivantes :

- Laser pompe : 860,5 nm (40 mW)
- Laser Stokes : 1064,0 nm (40 mW)

Les paramètres d'acquisitions sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 12 : paramètres d'acquisition du spectre CARS

Objectif (grossissement ; NA)	Objectif à immersion à eau x60
Longueur d'onde d'excitation (nm)	860,5 / 1064 (laser pulsé)
Filtre OD	Sans
Fente (µm)	50
Réseau (trait/mm)	600
Temps d'acquisition (nb milisec)	30

A partir de ce réglage une acquisition a été faite sur la poudre correspondant à la sonde moléculaire (6) seule afin de déterminer le signal CARS issue de la molécule synthétisé. Dans ce cas le signal a été obtenu cependant ce dernier est relativement faible (figure 44) la valeur de longueur d'onde de 722 nm indiquée sur cette figure correspond à la triple liaison carbone-carbone de la sonde étudiée par cette méthode, le signal est visible à 2222 cm^{-1} . Le signal a été obtenu relativement rapidement et permet de montrer qu'il est possible de gagner un certain pour acquérir

le signal, cependant ce qui est applicable sur un échantillon solide ne l'est pas forcément dans le cas de l'imagerie.

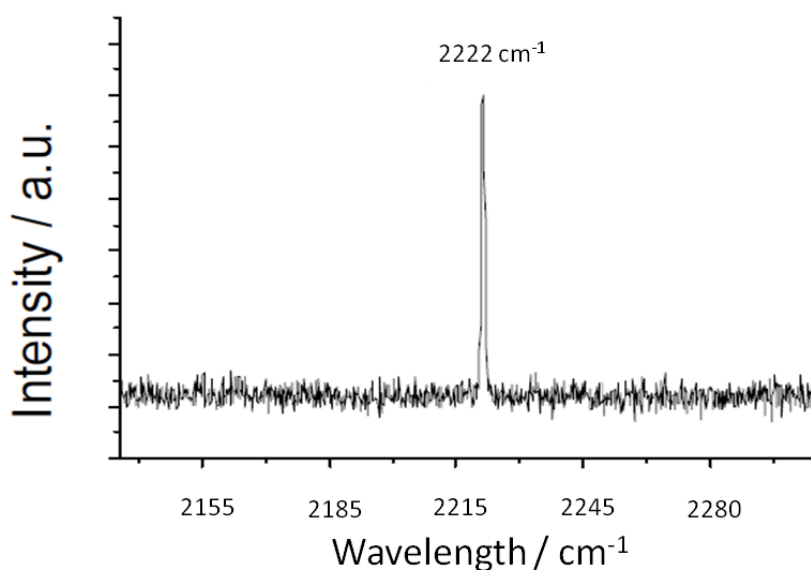


Figure 44 : Spectre Raman CARS de la sonde moléculaire (6)

Une expérience a également été menée afin de vérifier les éventuels temps d'acquisition dans le cadre d'une acquisition type imagerie. Cette analyse a été effectuée sur la poudre (figure 43).

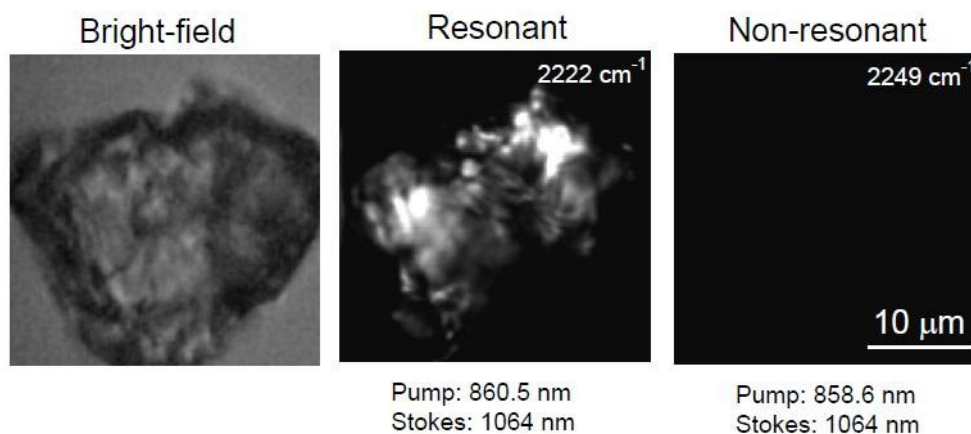


Figure 45 : image CARS de la sonde 6

Il a été possible d'observer l'échantillon par imagerie CARS. Cette image nous a permis d'observer deux composantes : une composante de résonance qui correspond au signal que l'on souhaite étudier et une image de la composante non résonante qui permet de montrer que cette composante n'interférera pas avec le signal que l'on souhaite observer. Le temps d'obtention de cette image est de 25 minutes. Nous constatons une sensible amélioration du temps d'acquisition, à titre de comparaison une cartographie Raman peut prendre jusque 4 jours dans le cadre du projet. Un spectre a été acquis tous les 0,2μm lors de cette expérience.

c. Conclusions globales concernant la CARS

Dans cette partie du chapitre, des tests préliminaires concernant l'imagerie CARS ont été envisagés afin de palier aux temps d'acquisitions relativement longs dans le cadre d'une imagerie par microscopie Raman classique. Il a été possible d'obtenir le signal recherché et de procéder à une image de la sonde moléculaire (6). La CARS semble être une alternative intéressante dans le cadre de l'imagerie et pour ce projet. Cette technique permet d'observer une bande spécifique au sein d'un échantillon donné.

Cependant, il reste encore des essais préliminaires à effectuer. Par exemple dans le cas d'un marquage, la sonde est localisée dans un site spécifique de la cellule à savoir le nucléole, la question est donc de savoir si l'instrument CARS est suffisamment sensible pour exalter le signal recherché et permettre un réel gain en temps et en qualité d'image pour rendre cette technique viable.

Conclusion

Lors de ce chapitre, nous avons étudié une application directe d'une des familles de sondes Raman synthétisées au laboratoire. Le marquage choisi est un immuno-marquage indirect dont l'anticorps secondaire a été marqué par une sonde Raman de petite taille. Cette sonde comporte dans sa structure un groupement fonctionnel caractéristique : la triple liaison carbone-carbone alcyne.

Dans un premier temps, une méthode de préparation de l'échantillon a été développée afin d'adapter l'objet de l'étude au caractère de l'appareil, le choix du support à base de fluorure de calcium a permis d'éliminer le phénomène de fluorescence du verre qui masquait les signaux d'intérêt dans le cadre de l'étude. Les possibilités d'imagerie Raman sur les cellules seules ont été explorées afin d'extraire les signaux caractéristiques issus de la cellule. Ces signaux ont pu être assignés notamment grâce à la littérature et ont permis de bien identifier l'échantillon. Il a été possible d'obtenir des images Raman des sondes endogènes qui composent la cellule. Ces images ont été obtenues sans l'aide d'un fluorophore et ont ensuite servi de résultats de référence dans le but de les corréliser avec les images que nous avons pu obtenir par la suite.

Dans un second temps, des analyses Raman ont été effectuées dans le but de montrer l'intérêt de la fonction chimique introduite permettant l'observation du marquage. Les sondes contenant le groupement fonctionnel ont été testées et comparées par rapport au support et aux cellules, le signal est observable dans une fenêtre spectrale dite "vierge" dans une gamme allant de 2100 à 2230 cm^{-1} . Plusieurs cas ont été testés : en poudre afin de mettre en évidence le signal, en solution dans le DMSO dans le but de se rapprocher des conditions de marquage.

Un marquage modèle à l'aide de billes de protéines G a été effectué. Cette expérience a permis de montrer la possibilité de vérifier le marquage de l'anticorps secondaire par la simple observation du signal de la molécule sonde. Par cette expérience il a été également possible de déterminer la concentration de marquage idéale qui est de 10mg/mL soit 0,0257mol/L. Au delà de cette dernière le signal Raman n'augmente plus de manière significative.

La dernière partie du chapitre se consacrait à l'imagerie d'une cellule par une des sondes synthétisée à la concentration de marquage "idéale" précédemment déterminée. L'organe recherché, le nucléole, a pu être imagé et la localisation de la nucléophosmine a pu être mise en évidence. Cependant le temps d'acquisition d'une image Raman dans ce cas, bien que possédant un signal qui semblait facilement détectable, est relativement long et est de l'ordre de 3 à 4 jours dans ce cas.

Afin de pallier ce désavantage technique, une étude préliminaire concernant une variante de la spectroscopie Raman a été envisagée : la "Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy" (CARS). Cette technique Raman alternative possède le grand avantage de permettre une exaltation du signal et par conséquent une amélioration de la visualisation du signal recherché. Avec cette alternative, il serait possible de visualiser seulement la bande correspondant à la triple liaison carbone-carbone. Cependant la mise en place de cette technique nécessite une configuration particulière du système

Raman car elle met en jeu l'interaction entre deux faisceaux laser excitateurs qui doivent être paramétrés afin de permettre la mise en résonance de la fonction chimique recherchée.

De part les expériences menées et les observations faites tout au long de ce chapitre, il a été possible de mettre en évidence plusieurs contraintes dans le cadre de l'imagerie Raman qui peuvent éventuellement être "contournées" par des techniques alternatives tel la CARS. Il serait également intéressant d'envisager d'étudier avec plus de précision le signal collecté. Nous pourrions procéder à un traitement du signal qui pourrait améliorer le signal analysé.

Bibliographie

- [1] Barrow, G. M.; *Introduction to molecular spectroscopy*. McGraw-Hill., **1962**, 318p.
- [2] Cotton, F. A.; *Chemical applications of group theory*. W. Blackwells., **1963**, 480p.
- [3] Raman, C.; Krishnan, K.; *A new radiation. Indian Journal of physics.*, **1928**, 2, 387.
- [4] Hirschfeld, T. and Chase, B.; *FT-Raman Spectroscopy : development and justification. Appl Spectroscop*, **1986**, 40, 133-137.
- [5] Abdelouahab, F. B.; Olier, R.; Guilhaume, N.; Lefebvre, V.; Volta, J. C.; *A study by in situ laser Raman spectroscopy of VPO catalysts for n-butane oxidation to maleic anhydride. Preparation and pure characterization of pure reference phases. J. Catal.*, **1992**, 134, 151-167.
- [6] Yashima, M.; Arashi, H.; Kakihana, M.; Yoshimura, M.; *Raman scattering study of cubic(tetragonal phase transition in ZR1-xCe_xO₂ solid solution. J. Am. Ceram. Soc.*, **1994**, 77, 1067-1071.
- [7] Colomban, P.; *Imagerie Raman de matériaux et dispositifs hétérogènes. Techniques de l'ingénieur.*, **2002**, .
- [8] Kohl, I.; Winkel, K.; Bauer, M.; Liedl, K. R.; Loerting, T.; Mayer, E.; *Raman spectroscopic study of the phase transition of amorphous to crystalline beta-carbonic acid. Angew. Chem. Int.*, **2009**, 48, 2690-2694.
- [9] Ferrari, A. C. and Roberston, J.; *Raman spectroscopy of amorphous nanostructured, diamond-like carbon, and nanodiamond. Phil. Trans. R. Soc. A*, **2004**, 362, 2477-2512.
- [10] Taylor, L. S.; Zografis, G.; *The quantitative analysis of crystallinity using FT-Raman spectroscopy. Pharm. Res.*, **1998**, 15, 755-761.
- [11] Delhaye, M.; Corset, J.; Bridoux, M.; Baron, M. H.; *Spectroscopie Raman. Techniques de l'ingénieur.*, **1986**, 2865-2894.
- [12] Owen, H.; *The impact of volume phase holographic filters and gratings on the development of raman instrumentation. J. Chem. Educ.*, **2007**, 84, 61.
- [13] Adar, F.; Delhaye, M.; DaSilva, E.; *Evolution of instrumentation for detection of the Raman effect as driven by available technologies and by developing applications. J. Chem. Educ.*, **2007**, 84, 50.
- [14] Denson, S.; Pommier, C. J. S.; Denton, M. B.; *The impact of array detectors on Raman spectroscopy. J. Chem. Educ.*, **2007**, 84, 67.
- [15] Chase, B.; *FT-Raman spectroscopy a catalyst for Raman explosion. J. Chem. Educ.*, **2007**, 84, 75.
- [16] Mann, C. K.; Vickers, T.; *Chapter 6: The quest of accuracy in Raman spectra. Handbook of Raman spectroscopy from the research laboratory to the process line.* **2001**, 28, 251-274.
- [17] Thermo Scientific.; *Introduction to Raman spectroscopy.* **2008**, 1-12.
- [18] Bartlett, J. S.; Voss, K. J.; Sathyendranah, S.; Vodacek, A.; *Raman scattering by pure water and seawater. Applied Optics.*, **1998**, 37, 3324-3332.
- [19] Kneipp, K.; Kneipp, H.; Itzkan, I.; Dasari, R. R.; Feld, M. S.; *Ultrasensitive chemical analysis by Raman spectroscopy. Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2957-2975.
- [20] *Raman Scattering and fluorescence emission- Horiba scientific.* **2013**.
- [21] Horiba, J. Y.; *LabRam series.* **2012**.

- [22] Kress, J.; Zanaletti, R.; Rose, A.; Frey, J. G.; Brocklesby, W. S.; Ladlow, M.; Bradley, M.; *Which Sites React First? Functional Site Distribution and Kinetics on Solid Supports Investigated Using Confocal Raman and Fluorescence Microscopy. J. Comb. Chem.*, **2003**, 5, 28-32.
- [23] Bridges, T. E.; Houlne, M. P.; Harris, J. M.; *Spatially Resolved Analysis of Small Particles by Confocal Raman Microscopy: Depth Profiling and Optical Trapping. Anal. Chem.*, **2004**, 76, 576-584.
- [24] Hibben, J. H.; *Raman Spectra in organic chemistry. Chem. Rev.*, **1935**, 18, 1-232.
- [25] Oliva, M. M.; Casado, J.; Manuela, M.; Raposo, M.; Mauricio, A.; Fonseca, C.; Hartmann, H.; Hernandez, V.; Navarrette, J. T. L.; *Structure-Property Relationships in Push-Pull Amino/Cyanovinyl End-Capped Oligothiophenes: Quantum Chemical and Experimental Studies. J. Org. Chem.*, **2006**, 71, 7509-7520.
- [26] May Colaianni, S. E.; Aubard, J.; Hoime Hansen, S.; Faursov Nielsen, O.; *Raman spectroscopic studies of some biochemically relevant molecules. Vib. Spectrosc.*, **1995**, 111-120.
- [27] Lord, R. C. and Yu, N. T.; *Laser-excited Raman spectroscopy of biomolecules: 1. Native lysozyme and its constituent amino acid. J. Mol. Biol.*, **1970**, 50, 509-524.
- [28] M. Delhaye, P. D.; *Raman microprobes and microscope with laser excitation. J. Raman Spectrosc.*, **1975**, 3, 33-43.
- [29] Kador, L.; Schittkowski, T.; Bauer, M.; Fan, Y.; *Three dimensional materials analysis by confocal Raman microspectroscopy. Applied Optics.*, **2001**, 40, 4965-4970.
- [30] Ruchita S. Das., Y. A.; *Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications. Vib. Spectroscop.*, **2011**, 57, 157-163.
- [31] Lewis, I. R. and Howel, H. G. M.; *Handbook of Raman spectroscopy from the research laboratory to the line process line.* **2001**, 28.
- [32] Nakashima, S.; Harima, H.; Ohtani, N.; Katsuno, M.; *Raman characterization of local electrical properties and growth process in modulation-doped 6H-SiC crystals. J. Appl. Phys.*, **2004**, 95, 3547-3552.
- [33] Jallad, N. K.; Santhanam, M.; Cohen, M. D.; Ben-Amotz, D.; *Chemical imaging of thaumasite formed in sulfate-attacked cement mortar using near-infrared Raman imaging microscopy. Cem. Conc. Res.*, **2001**, 31, 953-958.
- [34] Soares de Campos, R. P.; Pagotto Yoshida, I. V.; Breit Kreitz, M. C.; Jesus Poppi, R.; Fracassi da Silva, J. A.; *Raman imaging spectroscopic characterisation of modified poly(dimethylsiloxane) for micro total analysis systems applications. Spectrochim. Acta Part A.*, **2013**, 100, 67-71.
- [35] Goetz, M.; Drews, D.; Zahn, D. R. T.; Wannemacher, R.; *Near-field Raman spectroscopy of semiconductor heterostructures and CVD-diamond layers. J. Lumin.*, **1998**, 76 & 77, 306-309.
- [36] Alivisatos, A. P.; Harris, T. D.; Carroll, P. J.; Steigerwald, M. L.; Brus, L. E.; *Electron vibration coupling in semiconductor clusters studied by resonance Raman spectroscopy. J. Chem. Phys.*, **1989**, 90, 3463-3468.
- [37] Castro Neto, A. H.; Guinea, F.; Peres, N.; Novoselov, K. S.; Geim, A. K.; *The electronic properties of graphene. Rev. Mod. Phys.*, **2009**, 81, 109-162.
- [38] Geze, A.; Boury, F.; Benoit, J. P.; Chourpa, I.; Dubois, P.; *Direct qualitative and quantitative characterization of a radiosensitizer, 5-iodo-2-deoxyuridine within*

- biodegradable polymeric microspheres by FT Raman spectroscopy. Analyst.*, **2004**, 124, 37-42.
- [39] Gordona, K. C. and McGovern, C. M.; *Raman mapping of pharmaceuticals. Int. J. Pharm.*, **2011**, 417, 151-162.
- [40] Shur, J.; Price, R.; *Advanced microscopy techniques to assess solid-states of inhalation medicines. Advanced Drug Delivery Reviews*, **2012**, 64, 369-382.
- [41] Williams, A. C.; *Chapter 14: Some pharmaceutical applications of Raman spectroscopy. Handbook of Raman spectroscopy from the research laboratory to the process line.* **2001**, 28, 575-591.
- [42] Ruiz-Moreno, S.; Pérez-Pueyo, R.; Gabaldon, A.; Soneira, M. J.; Sandalinas, C.; *Raman laser fibre optic strategy for non-destructive pigment analysis. Identification of a new yellow pigment (Pb, Sn, Sb) from italian XVII century painting. J. Cult. Herit.*, **2003**, 37, 1146-1153.
- [43] Rosi, F.; Manuali, V.; Miliani, C.; Brunetti, B. G.; Sgamellotti, A.; Grygar, T.; Hradil, D.; *Raman scattering features of lead pyroantimonate compounds. Part I: XRD and Raman characterization of Pb₂Sb₂O₇ doped with tin and zinc. J. Raman Spectrosc.*, **2009**, 40, 107-111.
- [44] Golightly, R. S.; Doering, W. E.; Natan, M. J.; *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and Homeland Security: A Perfect Match? ACS Nano*, **2009**, 3, 2859-2869.
- [45] Hildebrandt, P.; *A Spectral Window to the Cell. Angew. Chem. Int.* **2010**, 49, 4540-4541.
- [46] Fabian, H. and Anzenbacher, P.; *New developments in Raman spectroscopy of biological systems. Vib. Spectrosc.*, **1993**, 125-148.
- [47] Uzunbajkava, N.; Lenferink, A.; Kraan, Y.; Willekens, B.; Vrensen, G.; Greve, J.; Otto, C.; *Nonresonant Raman imaging of protein distribution in single human cells. Biopolymers.*, **2002**, 72, 1-9.
- [48] Aminzadeh, A.; *Excitation Frequency Dependence and Fluorescence in the Raman Spectra of Al₂O₃. Appl. Spectroscop.* **1997**, 51, 817-819.
- [49] Nasdala, L.; Smith, L. D.; Kaindl, R.; Ziemann, M.; *Chapter 7: Raman spectroscopy: Analytical perspectives in mineralogical research. EMU Notes.*, **2004**, 6, 281-343.
- [50] Carey, P. R.; *Raman Spectroscopy, the Sleeping Giant in Structural Biology, Awakes. J. Biol. Chem.*, **1999**, 74, 26625-26628.
- [51] Mathies, R. A.; *From femtoseconds to biology: Mechanism of bacteriorhodopsin's light-driven proton pump. Proc. Indian. Acad. Sci.*, **1991**, 103, 283-293.
- [52] Maiti, N. C.; Apreti, M. M.; Zagorski, M. G.; Carey, P. R.; Anderson, V. E.; *Raman Spectroscopic Characterization of Secondary structure in Natively Unfolded Proteins: alpha-Synuclein. J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 2399-2408.
- [53] Tao, N. J.; Lindsay, S. M.; Rupprecht, A.; *Structure of DNA hydration shells studied by Raman spectroscopy. Biopolymers.*, **1989**, 28, 1019-1030.
- [54] Schuster, K. C.; Reese, I.; Urlaub, E.; Gapes, J. R.; Lendl, B.; *Multidimensional Information on the Chemical Composition of Single Bacterial Cells by Confocal Raman Microspectroscopy. Anal. Chem.*, **2000**, 72, 5529-5534.
- [55] Nemecek, D.; Thomas Jr, G. J.; *Raman Spectroscopy in Virus Structure Analysis.*, Encyclopedia of Applied physics., **2009**.
- [56] Kast, R.; Rabah, R.; Wills, H.; Poulik, J.; Auner, G. W.; Klein, M. D.; *Differentiation of small round blue cell tumors using Raman spectroscopy. J. Pediatr. Surg.*, **2010**, 1110-1114.

- [57] Shapiro, A.; Gofrit, O. N.; Pizov, G.; Cohen, J. K.; Maier, J.; *Raman Molecular Imaging : A Novel Spectroscopic Technique for Diagnosis of Bladder Cancer in Urine Specimens. Eur. Urol.*, **2011**, 59, 106-107.
- [58] Taleb, A.; Diamond, J.; McGarvey, J. J.; Beattie, J. R.; Toland, C.; Hamilton, P. W.; *Raman microscopy for the chemometric analysis of tumor cells. J. Phys. Chem. B*, **2006**, 110, 19625-19631.
- [59] Puppels, G. J.; Bakker Schut, T. C.; Caspers, P. J.; Wolthius, R.; Van Aken, M.; Van der Laarse, A.; Bruining, H. A.; Buschman, H. P. J.; Shim, M. G.; Wilson, B.; *Chapter 13: In vivo Raman spectroscopy. Handbook of Raman spectroscopy from the research laboratory to the process line.*, **2001**, 28, 549-574.
- [60] Meade, A. D.; Lyng, F. M.; Knief, P.; Byrne, J. H.; *Growth substrate induced functional changes elucidated by FTIR and Raman spectroscopy in in-vitro cultured human keratinocytes. Anal Bioanal Chem*, **2007**, 1717-1728.
- [61] Lo, W. L.; Lai, J. Y.; Feinberg, S. E.; Izumi, K.; Kao, S. Y.; Chang, C. S.; Lin, A.; Chiang, H. K.; *Raman spectroscopy monitoring of the cellular activities of a tissue-engineered ex-vivo produced oral mucosal equivalent. J. Raman Spectrosc.*, **2011**, 42, 174-178.
- [62] Tfayli, A.; Gobinet, C.; Vrabie, V.; Huez, R.; Manfait, M.; Piot, O.; *Digital dewaxing of RAMAN signals discrimination between Nevi and Melanoma spectra obtained from parffin-embedded skin biopsies. Appl Spectroscop.*, **2009**, 63, 564-570.
- [63] Vrabie, V.; Gobinet, C.; Piot, O.; Tfayli, A.; Bernard, P.; Huez, R.; Manfait, M.; *Independent component analysis of Raman spectra: Application on paraffin-embedded skin biopsies. Biomed. Signal Proc. Control*, **2007**, 2, 40-50.
- [64] Beljebbar, A.; Bouché, O.; Diébold, M. D.; Guillou, P. J.; Palot, J. P.; Eudes, D.; M., M.; *Identification of Raman spectroscopic markers for the characterization of normal and adenocarcinomatous colonic tissues. Critical Reviews in Oncology/Hematology.*, **2009**, 255-264.
- [65] Bensalah, K.; Fleureau, J.; Rolland, D.; Lavastre, O.; Rioux-Leclercq, N.; Guillé, F.; Patard, J.-J.; Senhadji, L.; De Crevoisier, R.; *Raman Spectroscopy: A Novel Experimental Approach to Evaluating Renal Tumours. Eur. Urol.*, **2010**, 58, 602-608.
- [66] Alix, A. J. P.; Bernard, L.; Manfait, M.; *Spectroscopy of biological molecules. J. W. Sons.*, **1985**, 465p.
- [67] A., T.; Guillard, E.; Manfait, M.; Baillet-Guffroy, A.; *Thermal dependence of Raman descriptors of ceramides. Part I: effect of double bonds in hydrocarbon chains. Anal. Bioanal. Chem.*, **2010**, 387, 1281-1296.
- [68] Krishna, C. M.; Sockalingum, G. D.; Kegelaer, G.; Rubin, S.; Kartha, V. B.; M., M.; *Micro-Raman spectroscopy of mixed cancer cell populations. Vib. Spectrosc.*, **2005**, 95-100.
- [69] Bakker Schut, T. C.; Puppels, G. J.; Kraan, Y. M.; Greve, J.; Van der Maas, L. L. J.; Figdor, C. G.; *Intracellular carotenoid levels measured by Raman microspectroscopy: comparison of lymphocytes from lung cancer patients and healthy individuals. Int. J. Cancer*, **1997**, 74, 20-25.
- [70] Beattie, J. R.; Maguire, C.; Gilchrist, S.; Barrett, L. J.; Cross, C. E.; Possmayer, F.; Ennis, M.; Elborn, J. S.; Curry, W. J.; McGarvey, J. J.; Schock, B. C.; *The use of Raman microscopy to determine and localize vitamin E in biological samples. Faseb. J.*, **2007**, 21, 766-776.

- [71] Koljenovic, S.; Schut, T. C. B.; Van Meerbeeck, J. P.; Maat, A.; Burgers, S. A.; Zondervan, P.; Kros, J. M.; Puppels, G. J.; *Raman microspectroscopic mapping studies of human bronchial tissue. J. Biomed. Opt.*, **2004**, 9, 1187-1197.
- [72] Shafer-Peltier, K. E.; Haka, A. S.; Fitzmaurice, M.; Crowe, J.; Myles, J.; Dasari, R. R.; Feld, M. S.; *Raman microspectroscopic model of human breast tissue: implications for breast cancer diagnosis in vivo. J. Raman Spectrosc.*, **2002**, 33, 552-563.
- [73] Haka, A. S.; Shafer-Peltier, K. E.; Fitzmaurice, M.; Crowe, J.; Dasari, R. R.; Feld, M. S.; *Diagnosing breast cancer by using Raman spectroscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2005**, 102, 12371-12376.
- [74] Krafft, C.; Knetschke, T.; Funk, R. H. W.; Salzer, R.; *Studies on stress-induced changes at the subcellular level by Raman microspectroscopic mapping. Anal. Chem.*, **2006**, 78, 4424-4429.
- [75] Draux, F.; Gobinet, C.; Sulé-Suso, J.; Trussardi, A.; Manfait, M.; Jeannesson, P.; Sockalingum, G. D.; *Raman spectral imaging of single cancer cells : probing the impact of sample fixation methods. Anal Bioanal Chem*, **2010**, 2727-2737.
- [76] Meade, A. D.; Clarke, C.; Draux, F.; Sockalingum, G. D.; Manfait, M.; Lyng, F. M.; Byrne, H. J.; *Studies of chemical fixation effects in human cell lines using Raman microspectroscopy. Anal Bioanal Chem*, **2010**, 1781-1791.
- [77] J. Klossa, S. D., X. Troussard, P. Vielh, M. Manfait, J. Angulo, G. Flandrin, A. Beljebbar, V. Untereiner, T. Happillon, C. Gobinet, S. Velasco-Forero, S. Roux, V. Saada, R. Dagiral, V. Coomans, E. Froigneux, P. Rideau, A. Vievard; *La biophotonique au service de l'identification de marqueurs pronostiques intracellulaires. IRBM.*, **2011**, 32, 72-75.
- [78] Liu, Z.; Li, X.; Tabakman, S. M.; Jiang, K.; Fan, S.; Dai, H.; *Multiplexed Multicolor Raman Imaging of Live Cells with Isotopically Modified Single Walled Carbon Nanotubes. J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 13540-13541.
- [79] Fujita, K.; Yamakoshi, H.; Dodo, K.; Palonpon, A.; Okada, M.; Ando, J.; Kawata, S.; Sodeoka, M.; *Raman imaging of alkyne as a small tag for biological molecules. Proc. of SPIES.*, **2012**, 8225, 15-1-15-4.
- [80] Krafft, C.; Neudert, L.; Simat, T.; Salzer, R.; *Near infrared Raman spectra of human brain lipids. Spectrochim. Acta, Part A*, **2005**, 61, 1529-1535.
- [81] Ravikumar, B.; Rajaram, R. K.; Ramakrishnan, V.; *Raman and IR spectral studies of L-phenylalanine L phenylalaninium dihydrogenphosphate and DL phenylalaninium dihydrogenphosphate. J. Raman Spectrosc.*, **2006**, 597-605.
- [82] De Gelder, J.; De Gussem, K.; Vandenabeele, P.; Moens, L.; *Reference database of Raman spectra of biological molecules. J. Raman Spectrosc.*, **2007**, 38, 1133-1147.
- [83] Vance, J. E. and Tasseva, G.; *Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells. Biochim. Biophys Acta.*, **2013**, 1831, 543-544.
- [84] Mishkind, M.; *Phosphatidylethanolamine in a pinch. Trends. Cell. Biol.*, **2000**, 10, 368-368.
- [85] Coleman, R. and Bell, R. M.; *Evidence that biosynthesis of phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine and triacylglycerol occurs on the cytoplasmic side of microsomal vesicles. J. Cell. Biol.*, **1978**, 76, 245-253.
- [86] Larkin, P. J.; *IR and Raman spectroscopy principles and spectral interpretation.*, **2011**, 228p.

- [87] Lin-Vien, D.; Colthup, N. B.; Fateley, W. G.; Grasselli, J. G.; *The handbook of infrared and Raman characteristic frequencies of organic molecules*. A. P. Inc., **1991**.
- [88] Borer, R. A.; Lehner, C. F.; Eppenberger, H. M.; Nigg, E. A.; *Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm*. *Cell.*, **1989**, 56, 379-390.
- [89] Grisendi, S.; Mecucci, C.; Falini, B.; Pandolfi, P. P.; *Nucleophosmin and cancer*. *Nature Reviews: Cancer*, **2006**, 6, 493-505.
- [90] Szebeni, A.; Olson, M. O. J.; *Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities*. *Prot. Sci.*, **1999**, 8, 905-912.
- [91] Cheng, X.; Sunney Xie, X.; *Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy: Instrumentation, Theory, and Applications*. *J. Phys. Chem. B*, **2004**, 108, 827-840.
- [92] Djaker, N.; Lenne, P. F.; Marguet, D.; Colonna, A.; Hadjire, C.; Rigneault, H.; *Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy (CARS): Instrumentation and applications*. *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res A.*, **2007**, 571, 177-181.
- [93] Maker, P. D. and Terhune, R.; *Study of Optical Effects Due to an Induced Polarization Third Order in the Electric Field Strength*. *Phys. Rev.*, **1965**, 137, A801-A818.
- [94] Cheng, J. X.; Xie, X. S.; *Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy: Instrumentation, Theory, and Applications*. *J. Phys. Chem. B*, **2004**, 108, 827-840.
- [95] Rodriguez, L. G.; Lockett, S. J.; Holtom, G. R.; *Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy: A Biological Review*. *Cytom Part A*, **2006**, 69A, 779-791.
- [96] Evans, C. L.; Eric O. Potma, E. O.; Puoris'haag, M.; Côté, C.; Lin, C. P.; Sunney Xie, X.; *Chemical imaging of tissue in vivo with video-rate coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy*. *PNAS*, **2005**, 102, 16807-16812.
- [97] Nan, X.; Cheng, J. X.; Xie, X. S.; *Vibrational imaging of lipid droplets in live fibroblast cells with coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy*. *J. Lipid Res.*, **2003**, 44, 2202-2208.
- [98] Manen, H.-J.; Kraan, Y. M.; Otto, C.; *Single cell Raman and fluorescence microscopy reveal the association of lipid bodies with phagosomes in leukocytes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2005**, 102, 10159-10164.
- [99] Follick, A.; Min, W.; Wang, M. C.; *Label-free imaging of lipid dynamics using Coherent Anti-stokes Raman Scattering (CARS) and Stimulated Raman Scattering (SRS) microscopy*. *Current Opinion in Genetics & Development*, **2011**, 21, 585-590.
- [100] Xie, X. S.; Yu, J.; Yang, W. Y.; *Living cells as test tubes*. *Science*, **2006**, 312, 228-230.
- [101] Tanaka, S.; Cai, L. T.; Tabata, H.; Kawai, T.; *Formation of two dimensional network structure of DNA molecules on Si substrate*. *Jpn. J. Appl. Phys.*, **2001**, 40, L407-L409.
- [102] Evans, C. L.; Xu, X.; Kesari, S.; Sunney Xie, X.; Wong, S. T. C.; Young, G. S.; *Chemically-selective imaging of brain structures with CARS microscopy*. *Opt. Express*, **2007**, 15, 12076-12087.
- [103] Wang, H.; FU, Y.; Zickmund, P.; Shi, R.; Cheng, J.-X.; *Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Imaging of Axonal Myelin in Live Spinal Tissues*. *Biophys J.*, **2005**, 89, 581-591.
- [104] Noestheden, M.; Hu, Q.; Tay, L.; Tonary, A. M.; Stollow, A.; MacKenzie, R.; Tanha, J.; Pezacki, J. P.; *Synthesis and characterization of CN-modified protein analogues as potential vibrational contrast agents*. *Bioorg. Chem.*, **2007**, 35, 284-293.

Experimental Part

Raman spectroscopy

Experimental part

General introduction:

Raman spectra were recorded using a HR 800 confocal micro-Raman spectrometer. Measurements have been performed with the 633 nm 20mW helium-neon laser. Different air objectives have been used: x10 (Olympus MPlan, NA 0.25), x50 (Olympus MSPlan, NA 0.55), x100 (Olympus LMPlanFI, NA 0.80). Specific setup has been described in the corresponding part for each kind of experiments. All cells preparations were described in chapter 1 experimental part.

Raman Spectroscopy:

Raman spectrum acquisition:

Raman spectra acquisitions on cells have been recorded on the spectral range from 500 cm⁻¹ to 1700 cm⁻¹ for biological signal and from 2000 cm⁻¹ to 3100 cm⁻¹ for alkyne band detection.

Cells localisation was performed by air objectives x10 (Olympus MPlan, NA 0.25) and x50 (Olympus MSPlan, NA 0.55).

All Raman spectrum acquisitions were performed by air objective X100 (Olympus LMPlanFI, NA 0.80).

The following chart shows the setup use for acquisition.

Excitation wavelength (nm)	633
Objectives (X; N.A)	Olympus LMPlan FI X100; 0.8
Hole (µm)	250
Slit (µm)	250
Grating	600
OD filters	None
Acquisition time	120 sec X 2

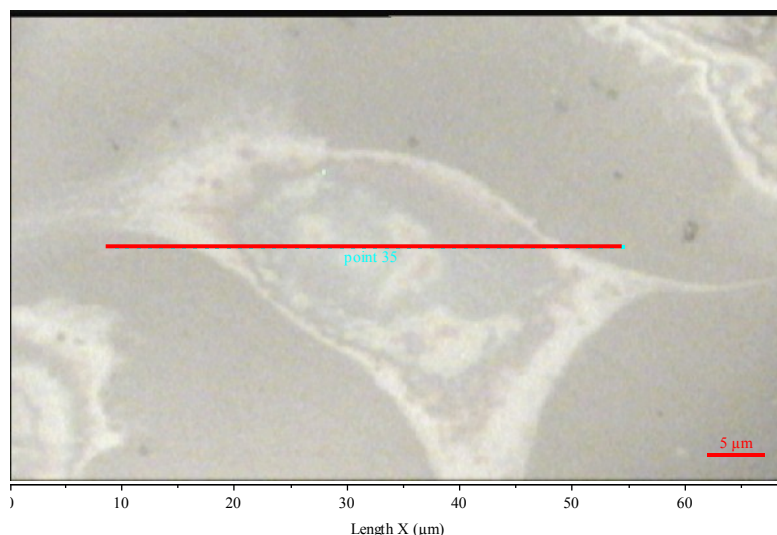
Raman line scans acquisition:

Line scans acquisitions were performed in order to justify Biological signal on cells. Raman spectra have been recorded from 500 cm⁻¹ to 2000 cm⁻¹ for biological material and from 2000 cm⁻¹ to 3100 cm⁻¹ for alkynes band analysis.

Cells localisation was performed by air objectives x10 (Olympus MPlan, NA 0.25), x50 (Olympus MSPlan, NA 0.55).

All Raman acquisitions were performed by air objective X100 (Olympus LMPlanFI, NA 0.80).

A line of 46 µm was defined for this type of acquisition.



Line scans definition (red line)

Motorized XY microscope stage for point by point or laser scanning imaging was used. Raman spectral scan line was obtained by collecting spectra with two accumulations of 200 sec.

Global setup acquisition has been summarized in the following chart:

Excitation wavelength (nm)	633
Objectives (X; N.A)	Olympus LMPlan FI X100; 0.8
Hole (µm)	250
Slit (µm)	250
Grating	600
Step (µm)	1
OD filter	None
Acquisition time	200 sec X 2

Raman curves fitting:

Each band was fitted using a mixed Gaussian Lorentzian profiles. Fit was first performed on one single band in order to determine two parameters; band frequency " p " and width at half maximum " w ". After parameters determination, p and w were fixed for all spectra. Raman profile was obtained after fitting and corresponds to the intensity variation of band studied on the line.

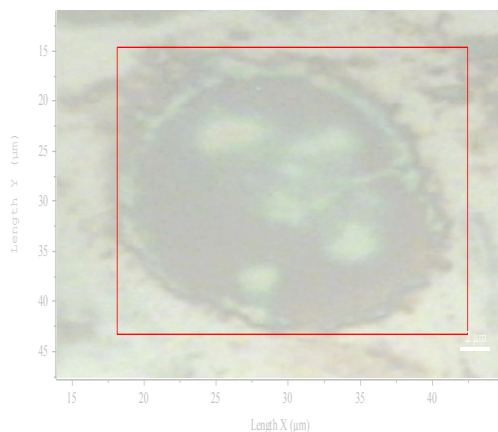
Raman imaging:

Raman spectra were recorded using a HR 800 confocal micro-Raman spectrometer. Measurements have been performed with the 633 nm 20mW helium-neon laser. Different air objectives have been used: x10 (Olympus MPlan, NA 0.25), x50 (Olympus MSPlan, NA 0.55), x100 (Olympus LMPlanFI, NA 0.80). No heating effects have been observed on the samples; consequently; no optical density filter has been used to reduce the laser power focussed trough the objective on the sample. We have recorded the spectral range from 720 to 1820 cm^{-1} and from 2100 to 3000 cm^{-1} ; spectral resolution 4.31 cm^{-1} . The diameter of pinhole was 250µm and the slit opening was 125µm.

Cells localisation was performed by air objectives x10 (Olympus MPlan, NA 0.25), x50 (Olympus MSPlan, NA 0.55).

All Raman acquisitions were performed by air objective X100 (Olympus LMPlanFI, NA 0.80).

Before Raman acquisition a grid was defined on the cell as shown bellow. Surface acquisition was above 900 μm^2 .



Mapping zone definition (red square)

Motorized XY microscope stage for point by point or laser scanning imaging was used. Raman spectral maps were obtained by collecting spectra with two accumulations of 200 seconds and subsequently moving the sample in a raster pattern in increments of 1 μm . Data acquisition was controlled by the Labspec 3 software package (Jobin Yvon Horiba). Data manipulations, analysis and image reconstruction were performed using Labspec 3 curves fitting.

Global setups for Raman image acquisition have been summarized in the following chart:

Excitation wavelength (nm)	633
Objectives (X; N.A)	Olympus LMPlan FI X100; 0.8
Hole (μm)	250
Slit (μm)	125
Grating	600
Step (μm)	1
Surface acquisition (μm^2)	30
OD filter	None
Acquisition time	200 sec X 2

Observed band for cells imaging:

The following data present the principle bands which have been observed in case of Raman mapping in cells.

Cells identification:

The following table presents different spectral data which have been studied for no labeling cells.

<i>Bands (cm⁻¹)</i>	<i>Assignment</i>
758	Phosphatidylethanolamine
782	P-O binding DNA RNA symmetric stretching
1004	Phenylalanine « ring breathing »
1100	Nucleic acid P-O stretching
2900	CH, CH ₂ , CH ₃ stretching

Labelling cells imaging:

Alkyne band have been studied at 2228 cm⁻¹.

Raman curves fitting:

Each band was fitted using a mixed Gaussian Lorentzian profiles. Fit was first performed on one single band in order to determine two parameters; band frequency "*p*" and width at half maximum "*w*". After parameters determination, *p* and *w* were fixed for all spectra. Raman images were obtained after fitting and correspond to the intensity variation of band studied on the surface.

Raman labelling control experiment

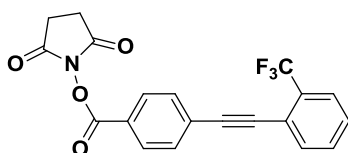
Beads preparation

Raman spectroscopy was performed with Protein G Sepharose beads 4 Fast Flow is recombinant protein G coupled to Sepharose 4 Fast Flow from GE healthcare (2 mg of protein G / mL medium). Beads are in suspension in 20% in ethanol. Protein G sepharose beads are handled with micropipette.

Beads are centrifugated and resuspended in PBS (pH 7.4) and washed three times by PBS. For each experiments 30 μ L of beads were used.

Probes solution preparation

Molecular probe use for this control experiment:



Molecular probe solution were performed in DMSO according to the following chart

Weight molecular probe (6) (mg)	Volume DMSO (mL)	n molecular probe (6) (mol)	Molar concentration (mol/L)
0	1	0	0
0,5	1	$1,28 \cdot 10^{-6}$	$1,28 \cdot 10^{-3}$
5,0	1	$1,28 \cdot 10^{-5}$	$1,28 \cdot 10^{-2}$
7,5	1	$1,93 \cdot 10^{-5}$	$1,93 \cdot 10^{-2}$
10	1	$2,57 \cdot 10^{-5}$	$2,57 \cdot 10^{-2}$
20	1	$5,15 \cdot 10^{-5}$	$5,15 \cdot 10^{-2}$
20	1	$5,15 \cdot 10^{-5}$	$5,15 \cdot 10^{-2}$

Beads modification with labeled secondary antibody

For one experiment, 30 μ L of beads were put in an ependorf. Then 58 μ L of labeled or not labeled secondary antibody (see secondary antibody labelling protocol chapter 1) were added. 1 μ L of Twin 20 detergent was introduced to the reactional mixture. Ependorf were put under slow rotation in a wheel for 1h.

After this step, beads were centrifugated and remaining liquid removed. Beads were rinsed 3 times by PBS (pH 7.4).

Beads modification with molecular probe only

10 mg/mL ($2,57 \cdot 10^{-2}$ mol/L) probe solution concentration were used. 25 μ L of probe solution were mixed in presence of 250 μ L of BBS solution (pH=8.4). This solution was stirred for 15 minutes and 10 μ L of glycine solution at 0,2M was added.

58µL of the previous solution was added to 30µL of sepharose beads. 1µL of Twin 20 detergent was introduced to the reactional mixture. Ependorf were put under slow rotation in a wheel for 1h. After this step, beads were centrifugated and remaining liquid removed. Beads were rinsed 3 times by PBS (pH 7.4).

Beads analysis

Raman spectra were recorded using a HR 800 confocal micro-Raman spectrometer (Jobin Yvon Horiba). Measurements have been performed with the 633 nm 20mW helium-neon laser. Different air objectives have been used: x10 (Olympus MPlan, NA 0.25), x50 (Olympus MPlan, NA 0.55), x100 (Olympus LMPlanFI, NA 0.80). No heating effects have been observed on the samples; consequently; no optical density filter has been used to reduce the laser power focussed through the objective on the sample.

Sample preparation

10 µL of prepared beads were put on calcium fluoride slide. Residual water was slowly removed for 10 minutes under fumehood and analysis was performed on dried beads.

Raman system setup

Raman setup used for the experiment was described on the following chart.

Excitation wavelength (nm)	<i>633</i>
Objective	<i>Olympus LMPlanFI X100, N.A 0.8</i>
Slit (µm)	<i>125</i>
Hole (µm)	<i>250</i>
Grating (t/mm)	<i>600</i>
Spectral window (cm⁻¹)	<i>Centered at 2475 cm⁻¹</i>
Acquisition time	<i>500 sec, 3 times</i>

Raman spectra were obtained by collecting spectra with three accumulations of 500 seconds. Data acquisition was controlled by the Labspec 3 software package (Jobin Yvon Horiba).

Spectra analysis:

Data manipulations and spectra analysis were performed using Labspec 3 curves fitting. For each beads sample 3 spectra were recorded. On each spectra peak area were calculated with Labspec 3 software package. An average area was determined and a curve was drawn. Curve Shown peaks area in function of probes concentration.

➤ Area calculation:

All the following manipulations were performed by labspec 3.0 software package.

Select spectral area for studies and extract this area. Peak picking and baseline correction were performed on 2228 cm⁻¹ band. In order to calculate bands area frequency was fixed and a curve fitting was performed according to a Gaussian Lorentzian model.

Chapitre 4 :

Spectrométrie NanoSIMS en science du vivant :

**Imagerie par l'intermédiaire de sondes endogènes et
exogènes**

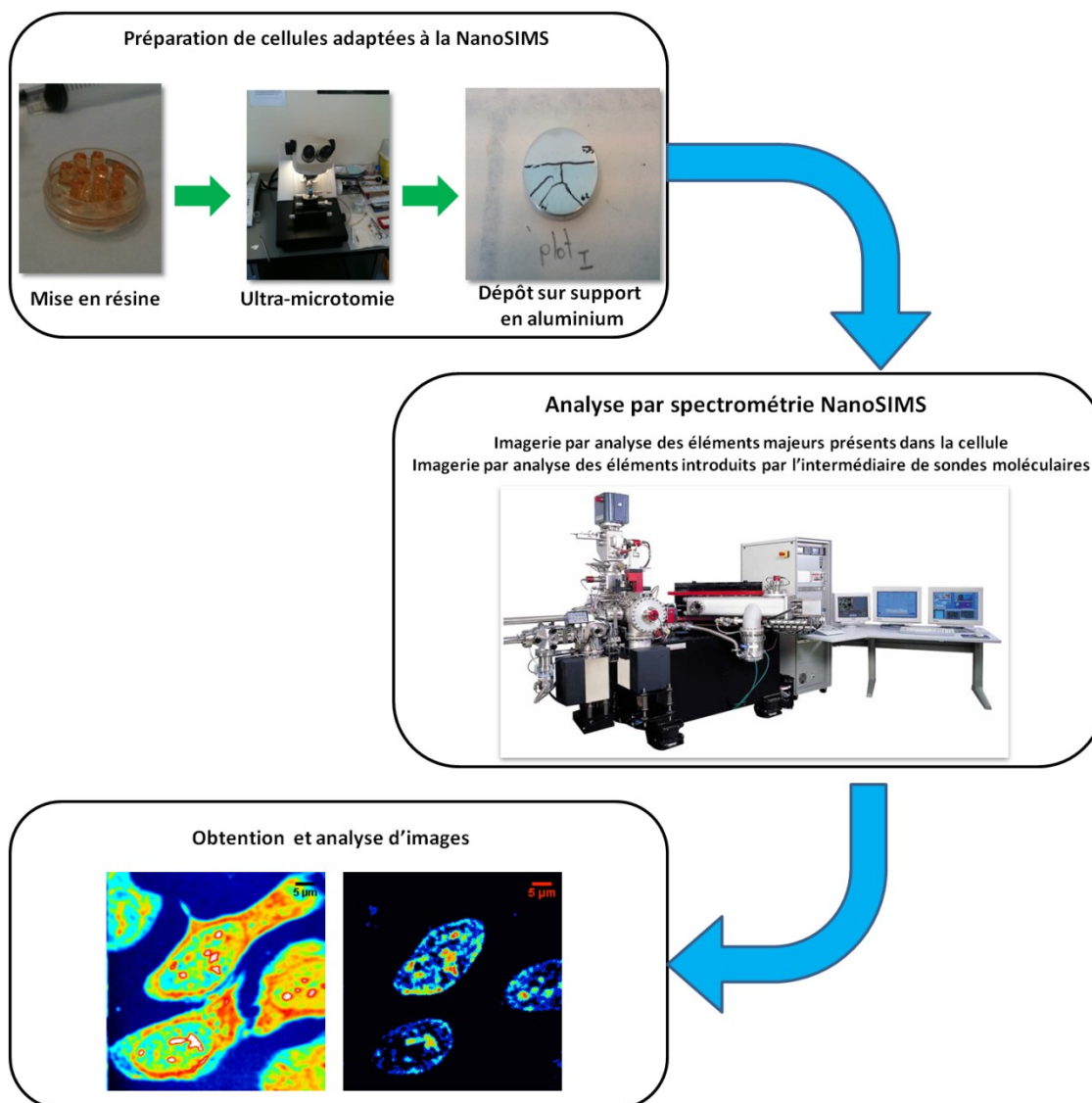
Table des matières

<i>Fiche signalétique</i>	176
<i>Introduction générale du chapitre</i>	177
I. La Spectrométrie de Masse d'Ions Secondaires (SIMS)	178
a. Historique	178
b. Notions liées au SIMS	178
II. La NanoSIMS	181
III. Les applications biologiques	184
IV. La préparation des échantillons	186
a. Fixation	186
b. La déshydratation	187
c. La mise en résine	188
d. Coupe des blocs de résine par ultra-microtomie	189
V. La NanoSIMS dédiée à l'imagerie de cellules	192
VI. Imagerie NanoSIMS de cellules marquées par des sondes moléculaires	194
a. Imagerie de cellule par une sonde iodée	196
b. Imagerie de cellules par une sonde bromée	201
c. Imagerie de cellules par une sonde fluorée	203
d. Imagerie de cellule par l'intermédiaire d'une sonde fluorée bimodale	210
<i>Conclusions</i>	214
<i>Bibliographie</i>	215
<i>Experimental part</i>	219
<i>Notes</i>	226

Fiche signalétique

Objectifs : Imagerie de cellules et étude de leurs éléments constitutifs tels que le phosphore ou un groupe d'atomes tels que les carbones-azotes. Imagerie de cellules marquées par sonde moléculaire contenant chacune un élément distinctif de la famille des halogènes visible par la NanoSIMS.

Moyens mis en œuvre : Préparation de cellules adaptée à la NanoSIMS. Induration en résine et coupe de 500 nm d'épaisseur à l'ultra-microtome des échantillons. Utilisation de cette méthode de préparation sur des cellules non marquées et marquées.



Discussions : Observation du marquage des cellules et localisation de la sonde par rapport aux éléments majeurs de la cellule. Étude du marquage par l'intermédiaire des trois groupements halogénés choisis.

Introduction générale du chapitre

Les techniques d'imagerie des cellules sont nombreuses et donnent accès à des informations concernant la localisation des molécules. Le chapitre précédent illustre la possibilité de faire de l'imagerie par l'étude vibrationnelle des molécules présentes au sein des cellules. Grâce à ce type d'imagerie, nous avons accès à des informations structurales et chimiques.

En science des matériaux, les techniques permettant de caractériser la surface d'un matériau se basent sur un processus commun : l'interaction ion-matière. L'échantillon, bombardé par une source primaire (électrons ou ions) émet des particules pouvant être chargées ou non et ces dernières vont alors être collectées et analysées. De nombreuses techniques actuelles se basent sur ce principe, nous nous intéresserons plus particulièrement à la spectrométrie de masse d'ions secondaire (SIMS) et sa déclinaison qui va nous permettre de faire de l'imagerie sur cellules : la NanoSIMS.

Le processus SIMS se base sur l'interaction d'un faisceau d'ions primaires et de la surface d'un échantillon. Les ions secondaires émis vont être extraits, transportés, filtrés et analysés. Nous souhaitons utiliser cette technique afin d'imager les cellules marquées décrites précédemment. Des informations sur les éléments constitutifs d'une cellule par exemple le phosphore, le carbone ou l'azote peuvent être obtenus.

Le premier avantage de ce type d'imagerie provient du fait que les sondes moléculaires contiennent un ou plusieurs atomes d'halogènes (iode, brome, fluor) qui sont des éléments sensibles à la NanoSIMS. Le second avantage réside dans la résolution sub-micrométrique de l'imagerie. Ces deux avantages permettront la localisation précise de la sonde au sein de la cellule et par conséquent sa cible : la nucléophosmine.

Dans ce chapitre nous introduirons dans un premier temps la spectrométrie de masse d'ions secondaires afin de présenter les notions théoriques. Après avoir présenté la NanoSIMS d'un point de vue instrumental, nous nous intéresserons à la bibliographie liées aux applications biologiques. Dans une troisième partie nous développerons la méthode de préparation des échantillons nécessaire à ce type d'imagerie. Enfin nous présenterons les résultats que nous avons obtenus et discuterons de ces derniers.

I. La Spectrométrie de Masse d'Ions Secondaires (SIMS)

a. Historique

La spectrométrie de masse d'ions secondaire est connue sous l'acronyme anglais SIMS (Secondary Ions Mass Spectrometry). Elle trouve ses origines dans le phénomène de pulvérisation de la matière ionisée sous l'effet d'une source d'ion primaire. Le phénomène a été mis en évidence en 1910 par le physicien britannique Joseph John Thomson lors de l'observation de la libération d'ions positifs et d'atomes neutres sur la surface d'un solide induite par un bombardement ionique.^[1] Ce n'est qu'à partir de 1940 par l'intermédiaire des progrès des systèmes de pompage de vide que l'étude de ce phénomène physique a connu un essor grandissant. En 1949, les travaux d'Herzog et Viehböck^[2] ont mis en place les bases techniques qui ont permis la naissance de la SIMS. Le premier système expérimental SIMS vit le jour par la suite dans les années 50 grâce à Honig.^{[3] [4] [5]}

Dans les années 1960, un projet d'imagerie a été initié à l'université d'Orsay par Raymond Castaing^[6] et développé par son doctorant de l'époque : Georges Slodzian. Leurs travaux ont permis de créer un microscope ionique en se basant sur le phénomène d'émission d'ions secondaires, cet instrument permettait d'obtenir des informations quantitatives sur la composition chimique élémentaire et par la même occasion d'obtenir une image de l'échantillon observé.^[7] En 1967 Liebl développa une microsonde ionique^[8] qui a permis une amélioration des images qu'il est possible d'obtenir par cette technique. En effet l'utilisation de cette sonde ionique a permis de développer l'imagerie d'échantillon à l'échelle micrométrique. En 1976, Benninghoven parvint à obtenir les spectres de masse d'ions secondaires d'acides aminés.^[9] Par la suite la technique s'est continuellement améliorée avec l'introduction de sources d'ionisation primaire de plus en plus variées et de détecteurs de plus en plus précis et sélectifs.^[10]

b. Notions liées au SIMS

Dans cette partie du chapitre, nous nous intéresserons à la description des notions théoriques principales qu'implique cette technique.^[11] La spectrométrie de masse d'ions secondaires se base sur l'interaction entre un faisceau d'ions primaires et la surface de la matière. L'impact généré provoque la pulvérisation d'atomes, d'électrons, de fragments moléculaires ou d'ions positifs ou négatifs (Figure1).

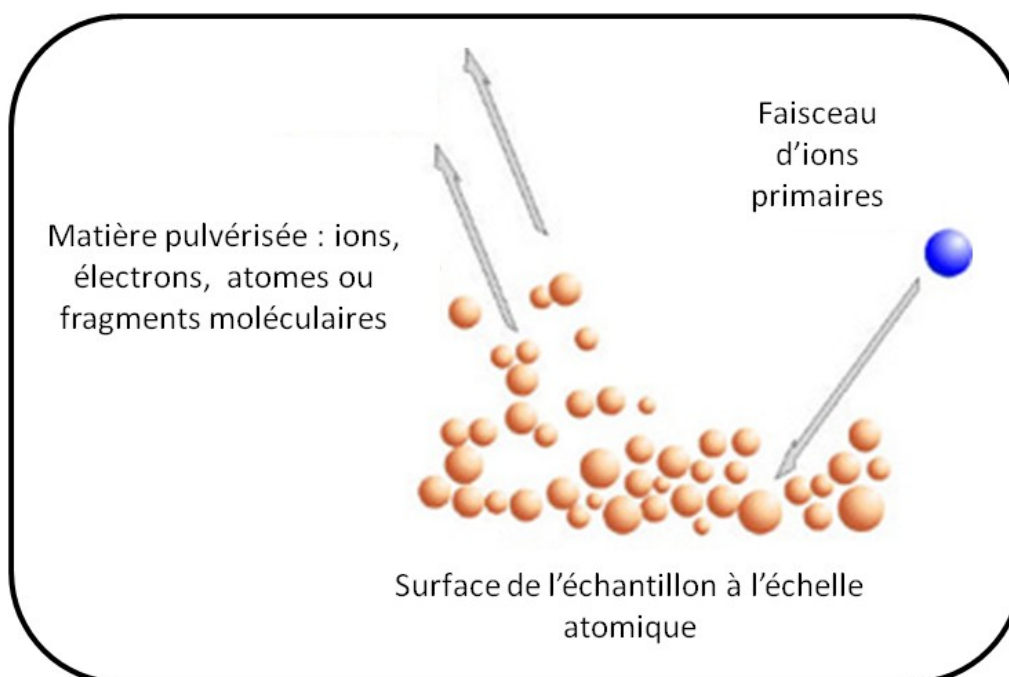


Figure 1 Représentation schématique de l'émission d'ions secondaires

Cette interaction peut être définie comme une série de collision en cascade. Lors de l'impact, le faisceau primaire va provoquer des mouvements dans la structure atomique de l'échantillon. Ces atomes vont par la suite induire les mouvements de leurs proches voisins et atteindre les atomes à la surface pour provoquer leur pulvérisation (Figure 2). Par ce phénomène, il y a une certaine quantité d'ions expulsés. Le nombre de particules produites par ce phénomène pour une espèce donnée (Z) est proportionnel à la concentration de Z dans l'échantillon, elle est caractérisée par la relation suivante :

$$I_{\text{pul}}(Z) = I_p \cdot C(Z) \cdot K(Z)$$

$I_{\text{pul}}(Z)$: Nombre de particules de l'espèce Z

(Z) : élément donné

$C(Z)$: concentration de l'élément (Z)

$K(Z)$: coefficient de pulvérisation

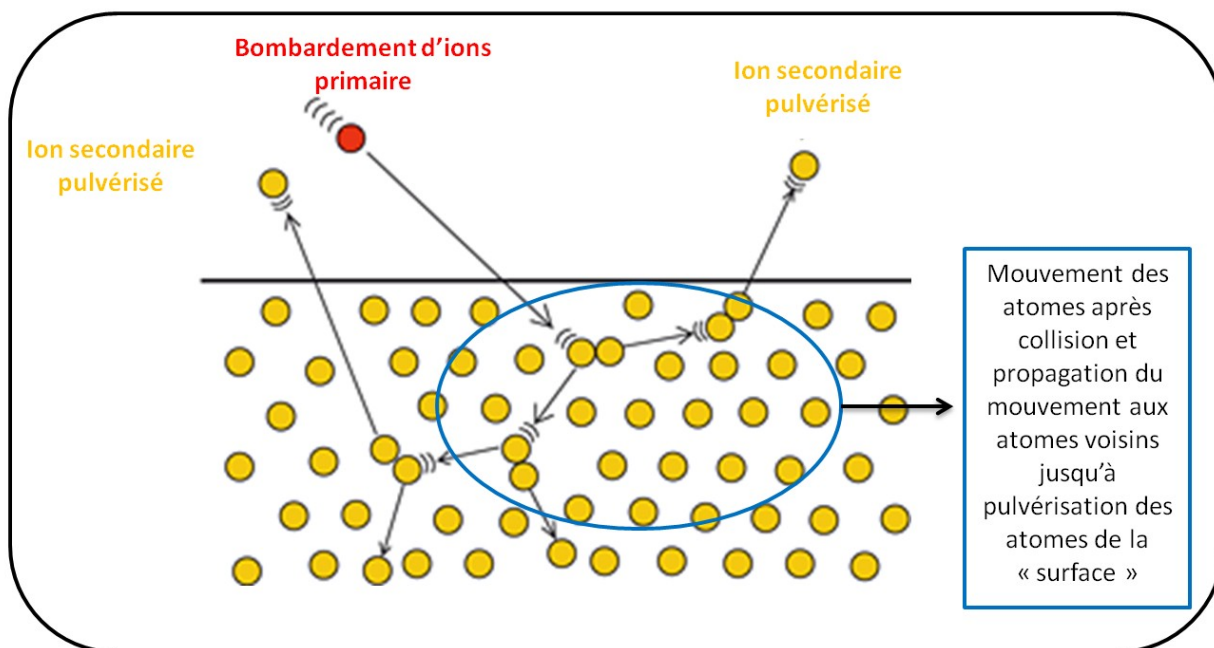


Figure 2 Représentation schématique d'une collision en cascade pour l'émission d'ions secondaires

La quantité moyenne d'ions secondaires émis est décrite par la théorie de Sigmund, ^{[12] [13]} elle représente le nombre moyen d'atomes expulsés de la surface par le nombre de particules incidente et est appelé rendement de pulvérisation. Ce rendement est caractérisé par le potentiel d'ionisation dans le cas de la formation d'ions positifs et l'affinité électronique pour la formation d'ions négatifs.

De plus, ce rendement est augmenté par la nature de la source d'ion primaire qui est utilisée pour le bombardement. L'utilisation d'une source à oxygène O^- augmentera le rendement en ions secondaires positifs alors que l'utilisation d'une source césium Cs^+ augmentera le rendement en ions secondaires négatifs. Les ions de la source primaire sont produits de 3 façons différentes. La première consiste en l'ionisation d'élément gazeux par l'utilisation d'un duoplasmatron, ^[14] cette méthode est particulièrement adaptée à la génération d'ion O^- . Les deux autres méthodes sont utilisées pour la formation d'ion césium positifs Cs^+ : dans le premier cas elle consiste en l'ionisation et la vaporisation d'une surface poreuse contenant des atomes de césium. La troisième quant à elle est appelée LMIG (acronyme anglais signifiant liquid metal ion gun) elle permet l'émission d'ion par l'application d'un champ électrique intense sur un métal à l'état liquide. Il est important de noter que le faisceau d'ions primaires est appelé microsonde ionique. Nous utiliserons le terme de "microsonde" pour désigner le faisceau primaire dans la suite du chapitre.

Quel que soit le type de source utilisée, les particules secondaires émises sont caractéristiques de la nature chimique des éléments composant l'échantillon. Les ions émis, sont extraits par l'intermédiaire d'une lentille d'extraction puis transportés jusqu'à un spectromètre de masse qui les filtre en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z). Il est ainsi possible de faire l'analyse de la composition chimique et isotopique de l'échantillon.

On peut différencier deux catégories de SIMS qui se caractérisent par la puissance du faisceau primaire. Le premier cas appelé "static SIMS" utilise un faisceau primaire de faible intensité inférieur à 10^{12} ions/ cm^{-2} permettant l'analyse moléculaire à la surface d'un échantillon. Le deuxième cas appelé "dynamic SIMS", supérieur à 10^{12} ions/ cm^{-2} , donne accès à l'information élémentaire et isotopique d'un échantillon. La SIMS dans ses deux modes possède également une très grande sensibilité pour la quasi-totalité des éléments de la classification périodique lui permettant ainsi l'analyse de faible concentration élémentaire.

II. La NanoSIMS

Nous allons présenter dans cette partie le système analytique utilisé dans le cadre du projet. Comme indiqué précédemment, le principe de base de ce système découle directement de la SIMS et permet l'analyse qualitative et quantitative de la composition chimique des éléments d'un échantillon à l'échelle submicrométrique.

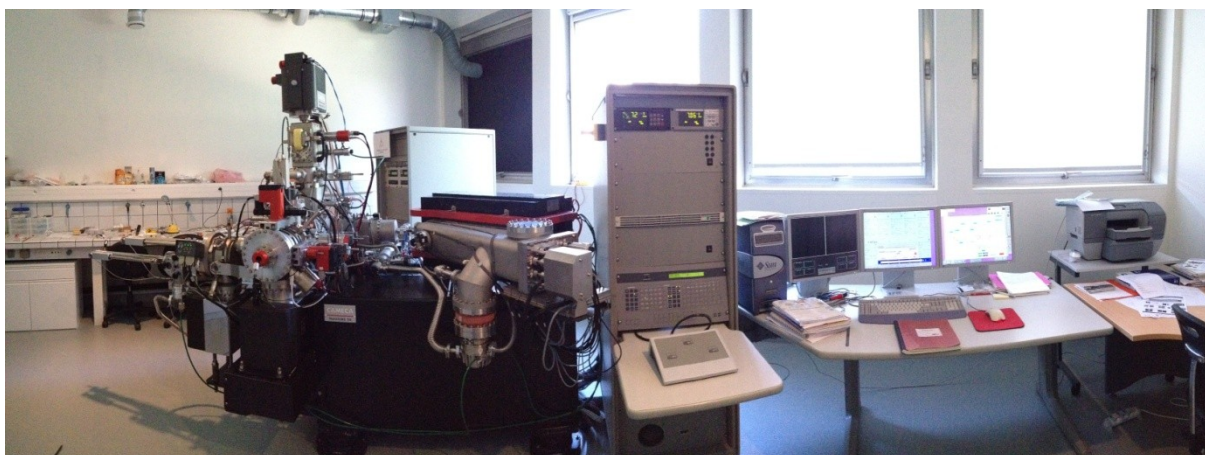


Figure 3 Représentation photographique de la NanoSIMS 50

Le système que nous avons utilisé dans le cadre de ce projet est la NanoSIMS 50 (Figure 3) de la société Cameca. ^[10] Cet appareil est né d'un projet de la fin des années 1980 dirigé par G. Slodzian à l'ONERA (Office National d'Études et de Recherches Aérospatiales) qui avait pour but de combiner un système d'objectifs colinéaires et un spectromètre de masse magnétique proche de celui issu des travaux de Mattauch et Herzog. ^[15] L'objectif était de créer un système comportant une taille de sonde très faible (submicrométrique) combiné à un système d'extraction amélioré des ions secondaires, qui couplé à un spectromètre de masse permettait l'analyse de plusieurs espèces ioniques simultanément. Ce projet d'envergure fut mené à bien avec l'aide de Cameca et la première description de l'appareil fut publiée en 1987 à la "SIMS conference". ^[16] De nombreuses évolutions ont permis à la NanoSIMS d'obtenir, une très bonne résolution spatiale, ^[17] ^[18] et une adaptabilité dans l'analyse de différents types d'ions. Les travaux de développement de F. Hillion ont permis entre autres d'intégrer une source d'ion primaire double (source Césium et source Duoplasmatron de Cameca) permettant de passer d'une source primaire positive à une source primaire négative, ainsi

que d'autres nombreuses améliorations instrumentales ^[19] En 2013, on dénombre 35 NanoSIMS dans le monde.

La NanoSIMS 50 fonctionne sous ultra vide allant jusqu'à 10^{-10} Torr dans la chambre d'analyse. Elle est équipée d'une caméra CCD permettant de visualiser l'échantillon.

Nous allons nous intéresser désormais aux principales parties de l'appareil à commencer par le système d'introduction. L'échantillon est introduit par l'intermédiaire d'un système de canne qui permet de le véhiculer dans les différentes chambres de l'instrument précédant la chambre d'analyse (Figure 4). ^[20] A l'intérieur de cette dernière, l'échantillon sera bombardé par les ions primaires, et seront extrait les ions secondaires caractéristiques.

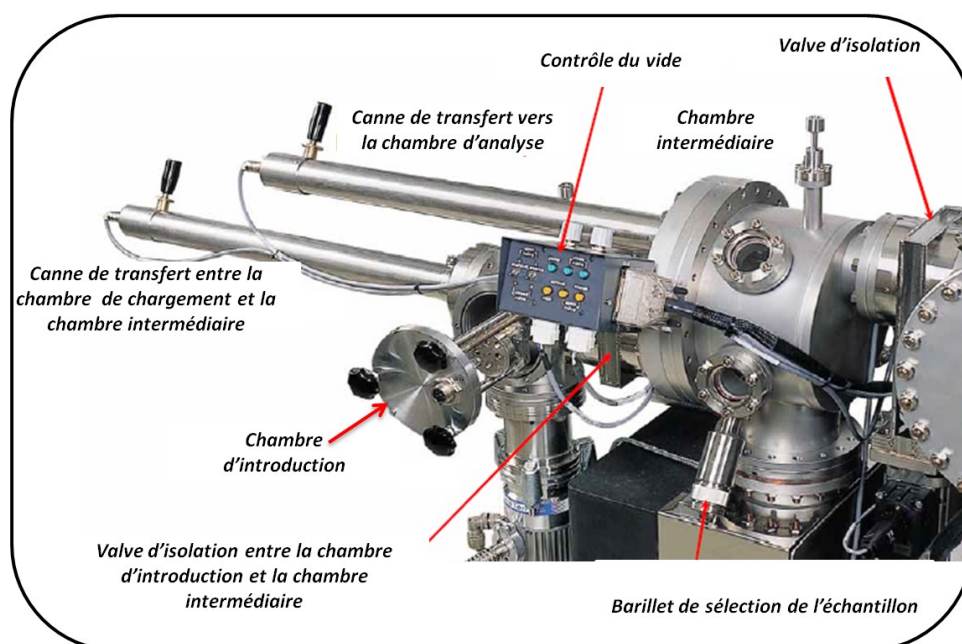


Figure 4 Photographie du système d'introduction des échantillons (photographie propriété de Cameca)

Le système de lentille de focalisation et d'extraction en SIMS focalise dans un premier temps le faisceau primaire sur l'échantillon. Le bombardement de la surface par le faisceau primaire se fait selon un angle dépendant de l'appareil. Suite à cette étape, les ions secondaires émis passent au travers d'une lentille d'extraction avant d'être analysés par le spectromètre de masse. Le paramètre important réside dans la distance entre le bloc "focalisation/extraction" et l'échantillon.

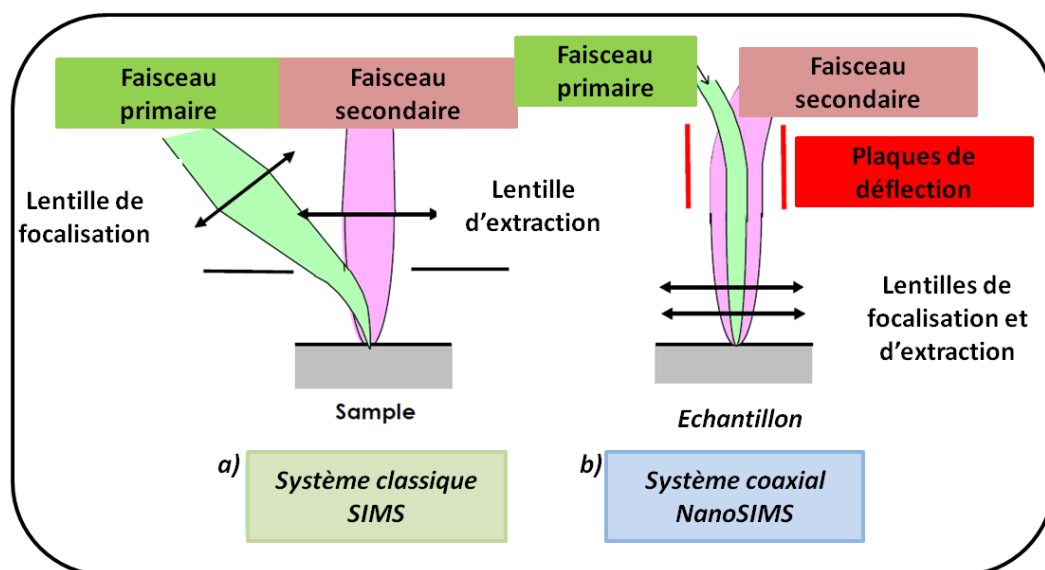


Figure 5 a) Représentation schématique d'un système de lentille de focalisation et d'extraction en SIMS, b) Représentation schématique du système de focalisation et d'extraction coaxiale de la NanoSIMS (schéma propriété de Cameca)

Dans le cas d'un système classique (Figure 5a) le faisceau primaire possède un angle d'attaque non normal. A contrario, le faisceau primaire du système NanoSIMS attaque selon la normale de l'échantillon (Figure 5b). Cette spécificité a permis de réduire la distance entre le bloc "focalisation/extraction" et l'échantillon.

La grande difficulté de la mise au point de ce système réside dans le fait de pouvoir bombarder l'échantillon avec le faisceau primaire sans interférer avec le faisceau de matières extraites. Afin de parvenir à cet équilibre, des plaques de déflexions ont été placées et permettent de faire fonctionner ces faisceaux de manière rapprochée. Ce bloc coaxial possède le grand avantage de générer un diamètre de sonde ionique plus petit et d'augmenter l'efficacité de l'extraction des ions secondaires.

Un système complexe de lentille et de fentes permet de guider les ions secondaires émis dans un spectromètre de masse comportant 4 détecteurs mobiles et un fixe (Figure 6). Ceci permet la détection en parallèle de 5 espèces ioniques différentes. La résolution en masse de ce type de spectromètre est élevée et permet la séparation des isotopes.

Le schéma de la figure 6 illustre les différentes parties de la NanoSIMS. Ce schéma peut être découpé en trois parties :

- Colonne primaire : choix et réglage du faisceau primaire
- Colonne secondaire : focalisation, pulvérisation et extraction des ions secondaires
- Détection et analyse : choix et analyse des ions

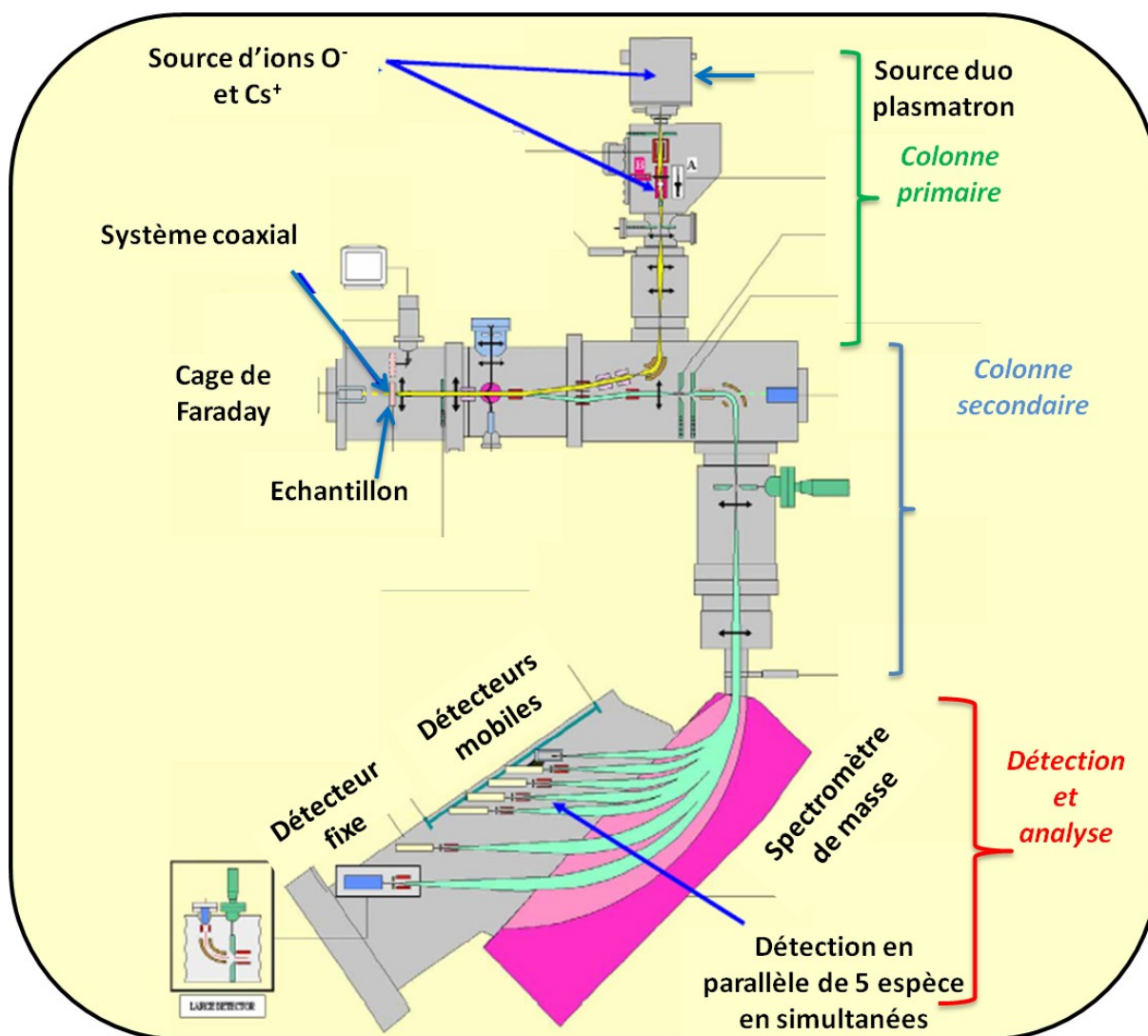


Figure 6 Représentation schématique de la NanoSIMS (schéma propriété de Cameca)

III. Les applications biologiques

Les premiers utilisateurs de la NanoSIMS étaient surtout des géologues pour l'étude des sols^[21] et des cosmo-chimistes qui utilisaient les qualités de la microsonde ionique pour l'étude de poussières cosmiques.^{[22] [23]} Par la suite, la NanoSIMS est devenu un instrument analytique central dans de nombreux domaines tel que la science des matériaux^{[24] [25]} ou la géochimie.^{[26] [27] [28] [29]}

Les applications biologiques utilisant le phénomène d'émission d'ion secondaires existent depuis plus d'une trentaine d'années.^[30] Les limitations techniques de l'époque, telles que la faible résolution latérale (1 à 0,5 μ m) ou la sensibilité, constituaient un frein évident aux développements des applications biologiques.

Historiquement, la première application en science de la vie fut effectuée sur le premier prototype de l'appareil par Galle.^[31] Ces travaux ont permis de mettre en évidence la localisation simultanée de la bromodeoxyuridine (Br_dU), de l'iododeoxyuridine (I_dU) et la fluorouracil (5-FU) qui ont été incubées dans des cellules MCF-7 issu du cancer du poumon. Par l'analyse des ions ¹²C¹⁴N⁻ la structure organique de la cellule a été imagée, dans un second temps l'analyse des ³¹P⁻ image la répartition du phosphore dans la cellule. Il a mis en évidence la localisation de la Br_dU et de l'I_dU dans l'ADN et la présence de la 5-FU dans l'ARN. Une autre application a été l'analyse d'iode présent dans la thyroïde. L'étude discriminait l'isotope naturel de l'iode et l'isotope 129 radioactif de l'iode.^[32] L'étude a permis de mettre en évidence la localisation spécifique de l'iode 127 dans le cytoplasme et son isotope radioactif (l'isotope 129) dans les cellules folliculaires de la thyroïde.

Les avancées instrumentales décrites auparavant ont garanti l'essor des champs d'application. Des travaux menés par le professeur C. Lechene au Harvard medical school à Boston, ont abouti à la possibilité de déterminer des rapports isotopiques *in situ*. Après incubation de cellules en présence de glycine marquée ¹³C ou ¹⁵N, les rapports isotopiques ¹³C/¹²C et ¹⁵N/¹⁴N ont été mesurés à une échelle subcellulaire, rendant ainsi accessible le marquage de cellules par l'utilisation d'un radio-isotope stable.^[33] Une application directe de cette méthodologie est l'étude du transport des oléates après marquage au carbone 13 au sein des adipocytes (cellules dont la fonction est le stockage de la graisse).^[34] L'équipe du Harvard Medical School a également pu mettre en évidence la puissance analytique de l'instrument par de nombreux travaux. On peut citer par exemple la détermination de granules de mélanine présents dans les cheveux humains,^[35] la réplication de l'ADN^[36] ou l'étude du turnover des protéines par imagerie de radio-isotopes (le turnover fait ici référence au cycle de synthèse des protéines/ dégradation).^[37]^[38] Les travaux du Professeur Lechene ont également mis en avant la possibilité d'identifier des domaines subcellulaires par l'identification de compositions chimiques spécifiques.^[39]^[40]

Depuis ces travaux, de nombreuses études ont été faites dans le but d'imager et de quantifier les éléments présents dans la cellule.^[41] Levi-Setti a mis en évidence le rôle des cations dans la préservation de la structure de chromosomes.^[42]^[43] On peut également montrer les avancées dans les études toxicologiques par exemple les travaux de Larass-Regard et Mony ont mis en évidence le rôle des cellules du rein dans l'élimination des médicaments anti-inflammatoires contenant du sélénium.^[44] Nous pouvons également citer les travaux du groupe d'Henri-Noël Migeon qui a pu imager la distribution de l'arsenic dans les cheveux humains^[45] ou les travaux de Pierre Galle concernant la concentration, l'insolubilisation et l'élimination de faibles doses d'aluminium et d'indium (référence). La NanoSIMS permet d'imager des échantillons à l'échelle subcellulaire et permet de quantifier les éléments analysés.^[46]^[47]

La NanoSIMS est un instrument d'imagerie très performant qui, comme nous l'avons décrit jusqu'à présent donne accès à de nombreuses informations chimiques et isotopiques. Cependant cette technique nécessite une préparation bien particulière des échantillons.^[48]^[49]^[50]

IV. La préparation des échantillons

a. Fixation

L'analyse NanoSIMS se fait dans une chambre soumise à un vide de 10^{-10} Torr, l'utilisation de cellule juste après culture n'est donc pas adaptée à ce système. Afin de préserver les cellules dans leur état natif, c'est à dire conserver les structures des composants de la cellule, il est nécessaire de procéder à une préparation de l'échantillon. Il est possible de différencier deux catégories de préparation : la fixation chimique et la cryofixation.^{[51] [52]} Dans le premier cas, les cellules sont fixées chimiquement et immobilisées dans une résine. La seconde méthode permet de congeler rapidement l'échantillon et de conserver la structure et les macromolécules le composant. La cryofixation étant plus adaptée à la préparation matériaux fortement hydratés et des tissus, nous avons opté pour la voie de fixation chimique.

La fixation a différents rôles dans la préparation d'échantillons,^[53] elle permet de conserver les structures et de fixer les constituants présents dans la cellule.

Elle consiste à reconstituer le gel protéique (constitué entre 75% et 95 % d'eau) par une substance chimique qui permettra la conservation des structures. Cette étape a également pour rôle de rendre insolubles à l'eau les molécules de l'échantillon bloquant ainsi les réactions enzymatiques qui peuvent entraîner une modification ultérieure de la structure de la cellule.

Il est possible de classer les fixateurs utilisés en deux catégories, ces dernières sont liées à l'action de ces composants sur les protéines :

- les fixateurs dits "coagulants" qui dénaturent les protéines par une action brutale. Ce type de fixateur altère les protéines globulaires qui vont s'agencer sous la forme d'une trame fibreuse. Les fixateurs coagulants provoquent la rupture de certaines liaisons et l'apparition de groupement thiol peut se produire(S-H). Les fixateurs les plus courants de cette catégorie sont l'éthanol, le méthanol, l'acide acétique ou l'acide picrique.
- les fixateurs "non-coagulant" qui sont en général des solutions aqueuses qui créent des liaisons nouvelles entre le fixateur et les protéines au sein de la structure des cellules. La création de ces nouvelles liaisons va conduire à une solidification de la trame protéique de la cellule. Dans ce cas, les modifications structurales sont peu nombreuses. Parmi les fixateurs non-coagulants nous pouvons citer le bichromate de potassium ou le tétra-oxyde d'osmium.

Il est important de noter qu'il existe de nombreux fixateurs et que le choix de ces derniers se fait en fonction des zones de la cellule que l'on souhaite fixer et de la compatibilité du fixateur avec l'échantillon.

Dans le cadre du projet, nous avons procédé à une fixation au méthanol glacé. Ce solvant organique est classé dans la famille des fixateurs coagulants. Dans notre cas, le méthanol va agir comme un agent déshydratant et coagulant de la cellule pour pouvoir fixer cette dernière.

La préparation des échantillons passe également par une étape dite de "post-fixation" qui va permettre de fixer les lipides des cellules. Le tétra-oxyde d'osmium, composé métallique utilisé en solution aqueuse, a été choisi (Figure 7).^[54]

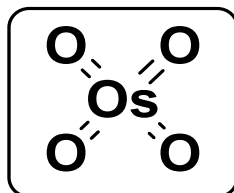


Figure 7 Formule semi développée du tétra-oxyde d'osmium

Ce composé permet l'oxydation des liaisons carbones-carbones insaturés (Figure 8). Grâce à son action sur les liaisons alcènes des acides gras, les membranes lipidiques cellulaires sont préservées. Ce composé possède également l'avantage de noircir les cellules ce qui en fait un très bon agent de contraste dans le cadre de la localisation de l'échantillon par microscopie. Il est important de noter que cet agent de post-fixation est toxique et peut induire une dégradation de l'échantillon si les délais de fixation ne sont pas scrupuleusement respectés.

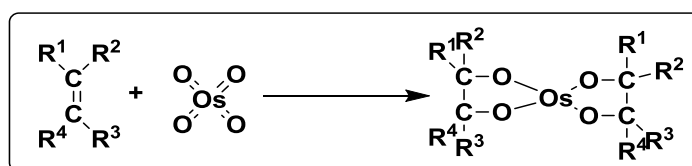


Figure 8 Schéma réactionnel de l'action du tétra-oxyde d'osmium sur les chaînes carbonées insaturées

b. La déshydratation

Suite à la fixation des cellules au support, il est nécessaire de passer par une étape de déshydratation des cellules^[55] permettant d'éliminer l'eau avant la mise en résine de l'échantillon.

Des "bains" successifs de solutions d'éthanol permettent l'élimination et le remplacement des résidus d'eau encore présents dans l'échantillon. Cette étape doit se faire progressivement afin de préserver les structures que l'on souhaite observer. Les solutions d'éthanol sont préparées selon la courbe de Gay Lussac (cf partie expérimentale). L'immersion se fait à température ambiante en partant de la solution la plus diluée jusqu'à finir par la solution d'éthanol pure (Figure 9).

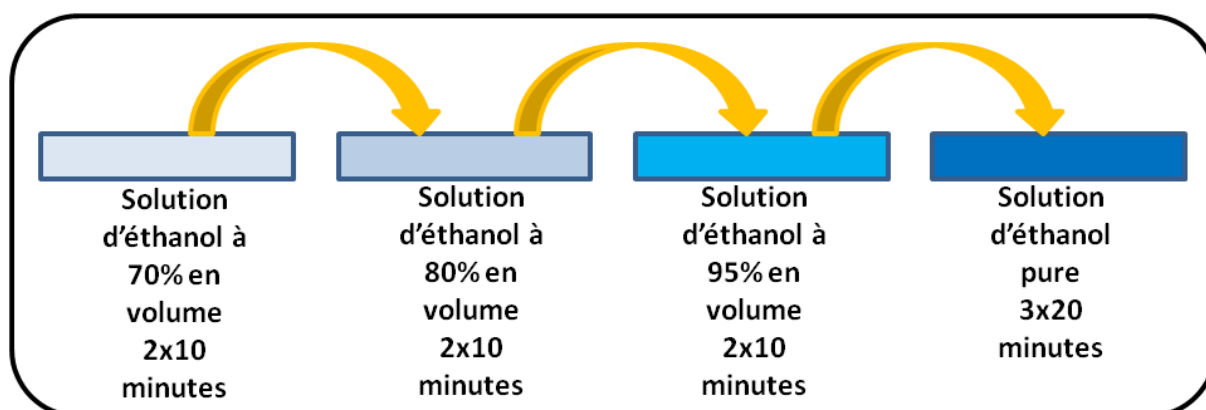


Figure 9 Représentation schématique de l'étape de déshydratation des cellules par bain dans des solutions d'éthanol en concentration croissante

Après cette étape les cellules ainsi fixées et déshydratées sont prêtes à être mise en résine.

c. La mise en résine

La mise en résine est l'étape clé qui va permettre la manipulation et la coupe des cellules pour les analyses NanoSIMS. ^[55] ^[56] Elle se déroule en deux étapes, la première est appelée imprégnation. Elle permet d'évacuer l'alcool résiduel issu de la déshydratation mais aussi une mise en contact des cellules avec la résine. La seconde étape consiste en l'inclusion finale des cellules dans la résine.

En générale les résines utilisées peuvent être de deux familles :

- Les résines de type époxy qui sont utilisées de manière classique dans l'observation des structures cellulaires.
- Les résines de type méthacrylate utilisées sur des échantillons nécessitant une préparation spécifique, comme par exemple les cryotechniques.

Dans notre cas nous utiliserons une résine de type époxy, dont la polymérisation implique : un monomère, un ou plusieurs durcisseurs permettant de moduler la "dureté" de la résine finale et un accélérateur. Les composants que nous avons utilisés sont les suivants (Figure 10) :

- Araldite M : monomère de base constituant la résine. L'araldite est constituée d'un époxyde et d'un agent polymérisant le 1, 4, 7, 10-tétra-azadécane.
- EPON 812 composé de bisphénol-A et d'épichlorhydrine et le DDSA également appelé anhydride dodeceny succinique. Ces deux composants sont les durcisseurs de la résine.
- DMP30 : l'accélérateur de polymérisation qui est un dérivé du phénol, le 2, 4, 6-Tris (diméthylaminométhyle) phénol.



Figure 10 Représentation photographique des quatre composants de résines utilisés de gauche à droite : Araldyte M, EPON 812, DDSA et DMP30

La polymérisation, effectuée dans une étuve à 60°C, permet l'obtention de blocs (Figure 11) dont l'aspect transparent facilite l'observation des cellules par microscopie.

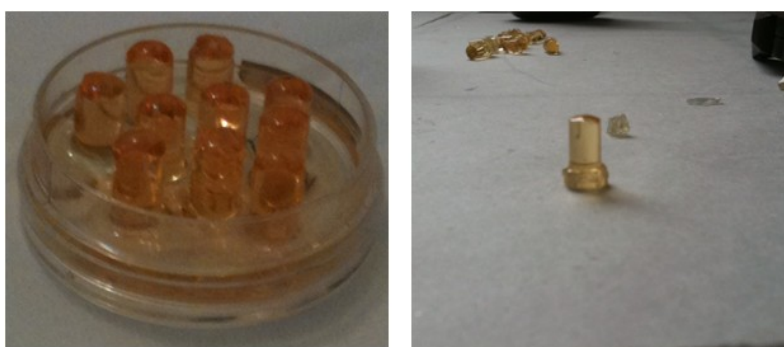


Figure 11 Photographies des blocs obtenus après inclusion en résine

d. Coupe des blocs de résine par ultra-microtomie

Cette dernière étape de l'échantillonnage consiste en la coupe de blocs de 500 nm d'épaisseur, conditionnant la qualité des images obtenues à la NanoSIMS. Il est à noter que la qualité de la coupe est également étroitement liée à la qualité du travail effectué en amont.

L'ultra-microtomie est une technique de coupe mécanique d'un échantillon par le tranchant d'un couteau diamant. Elle permet l'obtention de coupes ayant une épaisseur allant de 30 à 700 nm, épaisseur dépendante de l'objectif de l'étude et de la taille de l'échantillon. Avant la coupe, la surface d'intérêt est sélectionnée et redimensionnée ($\approx 0,1 \text{ cm} \times 0,1 \text{ cm}$). La surface de travail adéquate est façonnée de manière à obtenir une zone de travail plane et parallèle au tranchant de la lame du couteau (Figure 12).

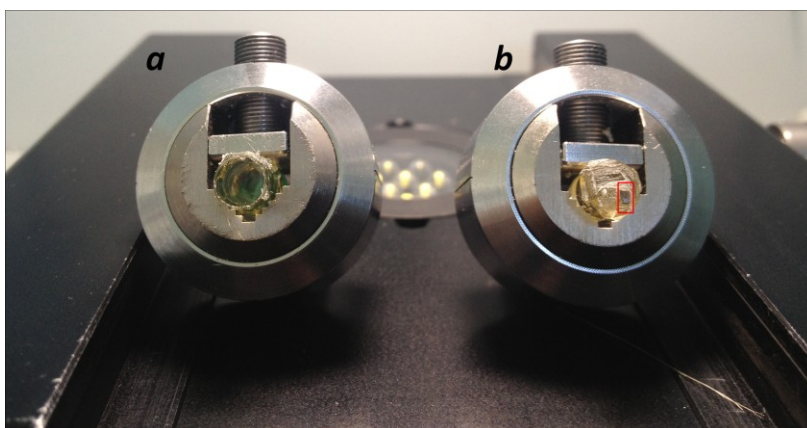


Figure 12 a) Photographie du bloc de résine après démoulage (à gauche), b) après préparation de la surface de travail (cadre rouge)

L'appareil utilisé est un ultra-microtome Leica de type UC6 (Figure 13) muni d'un système de coupe semi automatisée.



Figure 13 Photographie du microtome Leica UC6 utilisé

Cette épaisseur de coupe de 500 nm est préconisée lors d'études NanoSIMS, afin de s'affranchir de phénomènes de charge de l'échantillon lors du balayage du faisceau d'ions primaire. Des couteaux en diamant spécifiques dédiés à ce système (Figure 14) donnent accès à une quarantaine de coupes de 500 nm pour une cellule de 20 μ m d'épaisseur.



Figure 14 Photographie des couteaux en diamant utilisés pour les coupes : Cryotrim 45 pour préparation des blocs à gauche, Histo 45 pour la coupe et la collecte des coupes microtomées à droite

Lors de la coupe, une partie des coupes sont colorées par une solution aqueuse de bleu de toluidine (Figure 15) afin de vérifier si le bloc en cours de coupe contient bien des cellules.

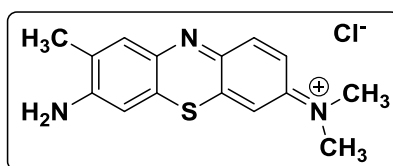


Figure 15 Représentation de la formule chimique du bleu de toluidine

Ce colorant permet de visualiser les noyaux des cellules présents dans les coupes, cette méthode de coloration est la seule à notre disposition à ce stade de l'échantillonnage pour vérifier la présence des cellules sur la séquence de coupes (figure 16). Nous procédons à ce type de vérification une coupe sur deux.

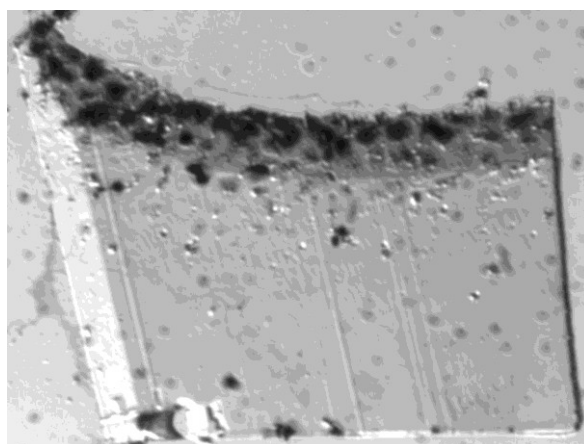


Figure 16 Photographie d'une coupe ultra-microtomée de 500 nm, observation des cellules après coloration au bleu de toluidine. Les points noirs représentent les cellules colorées

Les coupes choisies sont déposées sur un plot en aluminium et l'ensemble est recouvert par une couche de 20 nm d'or à l'aide du système Leica SCD 050 sputter coater. Cette couche d'or

donnera un caractère conducteur à l'ensemble et évitera les phénomènes d'accumulation de charge sur la résine. Après cette étape de préparation, l'échantillon est prêt à être inséré dans la NanoSIMS.

V. La NanoSIMS dédiée à l'imagerie de cellules

Les ions secondaires majeurs utilisés pour l'imagerie biologique d'une cellule, à savoir sa structure et son noyau, correspondent à la détection des ions $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ et $^{31}\text{P}^-$ (Figure 17). Par l'analyse des ions $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ la structure organique de la cellule a été imagée, dans le second temps l'analyse des $^{31}\text{P}^-$ image la répartition des phosphores dans la cellule.

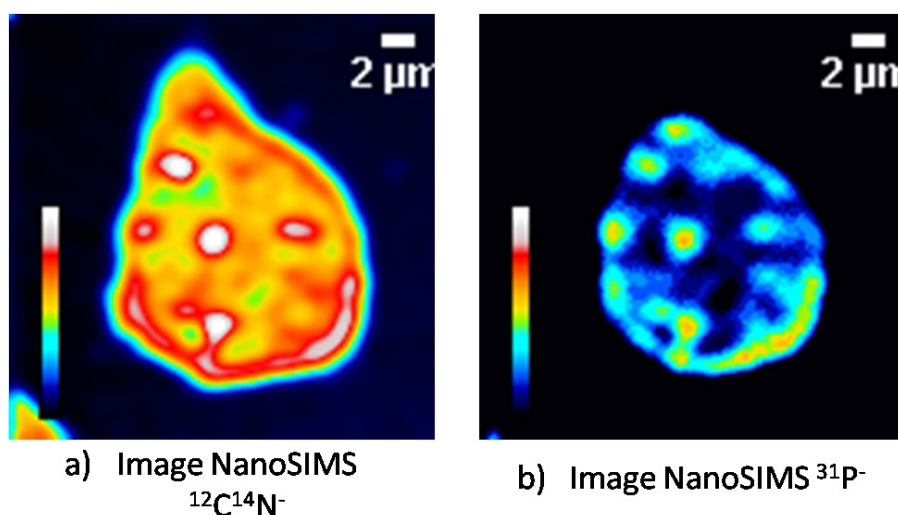


Figure 17 a) Image $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$, b) Image $^{31}\text{P}^-$. Zone de travail : 20 μm x 20 μm

Le balayage du faisceau d'ions primaire à la surface de la coupe permet de cartographier les ions secondaires d'intérêt. Les images obtenues sont constituées de pixels dont l'intensité est fonction de la quantité d'ions secondaires émis. On affecte à l'image une barre de calibration encadrant toutes les valeurs des pixels, barre de calibration à laquelle est affecté un dégradé de couleur. Plus la teinte du pixel se rapprochera du blanc, plus l'intensité du signal correspondant à l'ion recherché est forte, à l'inverse plus les teintes tendront vers le noir moins le signal est intense.

Les deux cartographies, acquises simultanément, peuvent être corrélées. En effet en traçant un line scan (variation de l'intensité du signal en fonction d'une droite) nous confirmons le lien entre les zones riches en $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ et le $^{31}\text{P}^-$. Ces zones particulières du noyau peuvent représenter des sites très riches en ADN car c'est la molécule la plus riche en phosphate du noyau de la cellule et donc en élément phosphore (Figure 18). Cette image ne nous permet cependant pas de différencier précisément les différents compartiments du noyau. Nous allons procéder à la visualisation de la répartition d'une sonde moléculaire introduite par l'intermédiaire d'un immuno-marquage afin d'observer la nucléophosmine du nucléole.

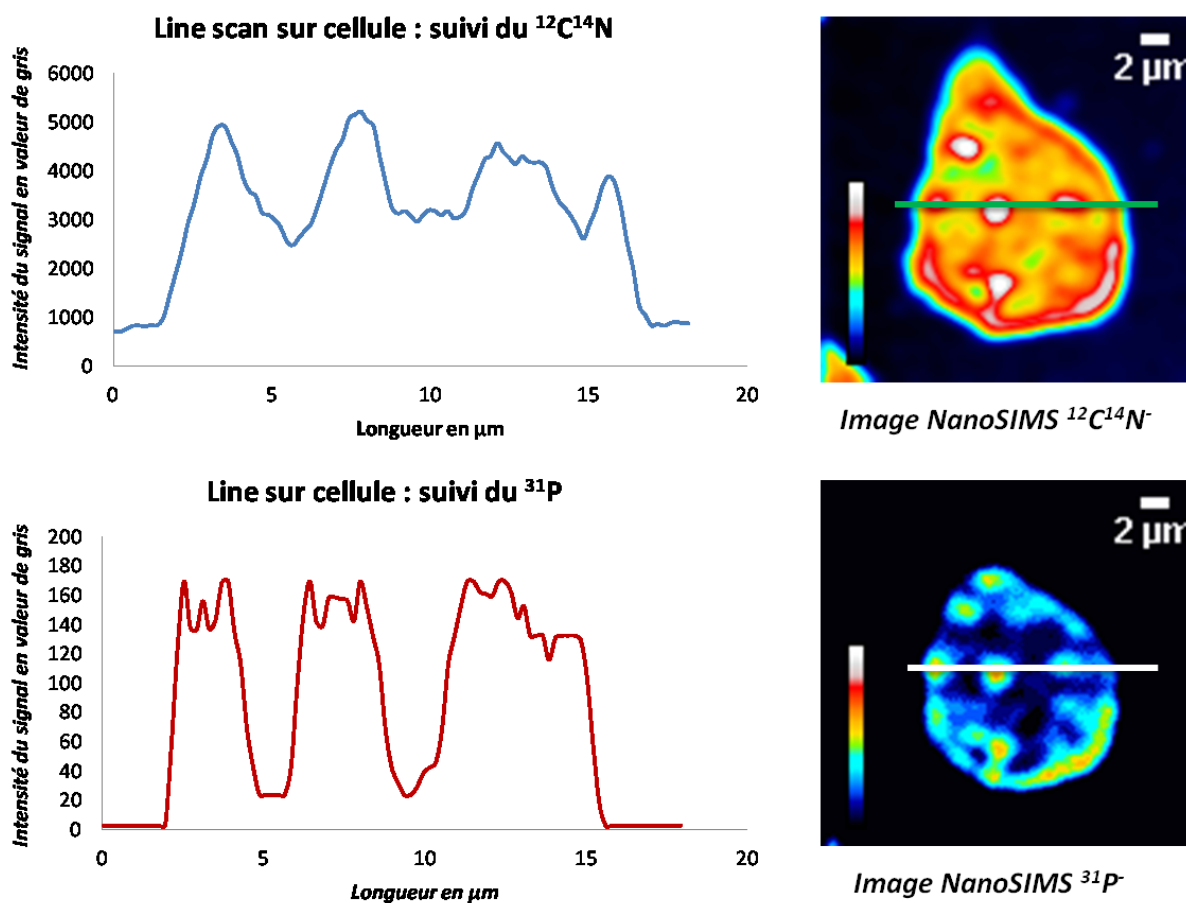


Figure 18 Corrélation entre les deux images NanoSIMS

Ce type d'images servira de référence lors de l'imagerie de cellules marquées par sondes moléculaires halogénées. Les images en $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ et $^{31}\text{P}^-$ sont nécessaires lors de chaque acquisition car il n'est pas possible d'observer optiquement les cellules incluses par l'intermédiaire du microscope de l'appareil.

VI. Imagerie NanoSIMS de cellules marquées par des sondes moléculaires

Chaque sonde synthétisée contient un ou plusieurs atomes d'halogènes qui vont nous permettre d'imager les cellules grâce à la sensibilité de ces éléments par rapport à la source d'ionisation employée, la source césium Cs^+ (Figure 19).

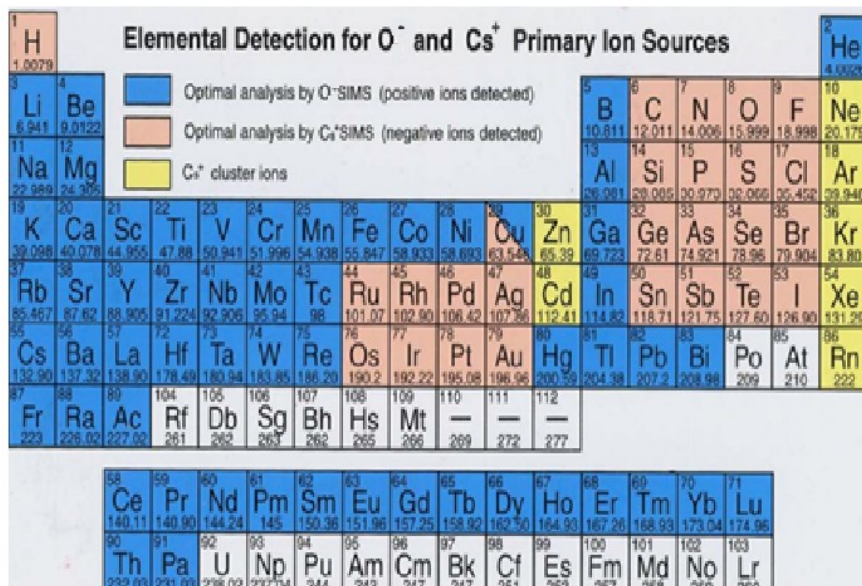


Figure 19 Classification représentant les sensibilités des éléments en fonction des sources d'ionisations

Cette classification présente la sensibilité des éléments en fonction de la source d'ionisation utilisée. De manière globale, les éléments donnant des ions positifs seront plus sensibles à une source ionique négative telle que la source à oxygène O^- . Dans le cas inverse, les éléments ayant une facilité à donner naissance à des ions négatifs seront plus sensibles à une source d'ionisation positive Cs^+ . Les éléments d'intérêt de notre étude sont parfaitement adaptés à l'utilisation de la source Cs^+ .

Le Relative Sensitivity Factor (RSF) est une échelle qui classe les éléments en fonction de leur sensibilité par rapport à une source primaire. Il existe une échelle RSF dédiée aux deux catégories de source primaire (source négative de type O^- et source positive de type Cs^+). Le RSF est exprimé en atomes / cm^3 . Dans le cadre de ce projet nous nous intéresserons à l'échelle RSF liée à la source césium (Figure 20). La figure 20 représente une classification périodique pour laquelle une valeur de RSF est assignée à chaque élément. Ces valeurs sont exprimées sous forme de "gamme" RSF pour chaque élément (ou RSF Range) car elles sont mesurées et dépendent des conditions de mesures. La sensibilité d'un élément sera d'autant plus forte que la valeur du "Relative Sensitivity Factor" est faible. La classification illustre la forte sensibilité des halogènes à la source d'ions césium. L'iode, le brome et le fluor cartographiés par la suite, sont donc parfaitement adaptés à la source Cs^+ .

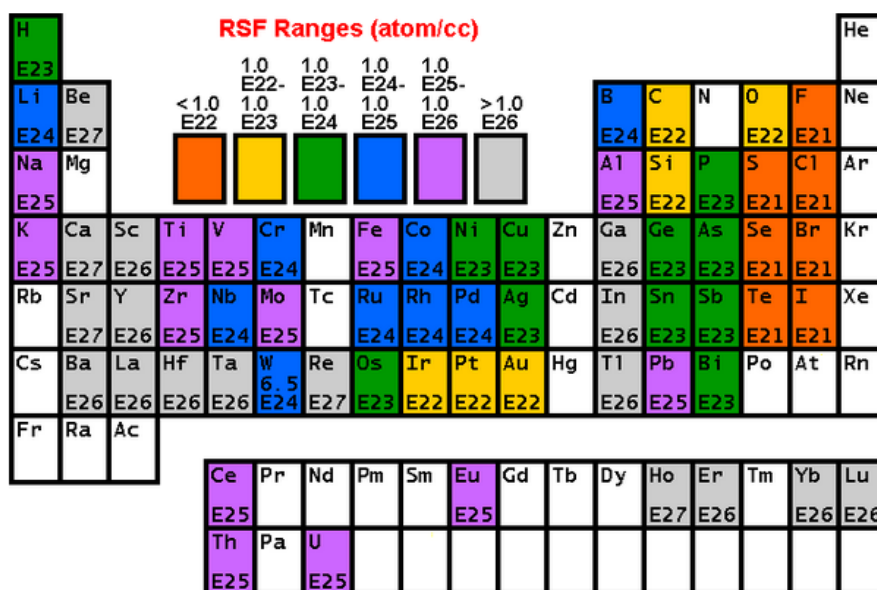


Figure 20 Classification périodique "RSF" représentant les sensibilités relatives des ions en fonction d'une source césium

Pour rappel, les sondes moléculaires sont utilisées dans le cadre d'un immuno-marquage faisant intervenir deux anticorps. C'est par l'intermédiaire de ces sondes moléculaires que nous allons pouvoir procéder à de l'imagerie NanoSIMS (Figure 21). Tous les marquages cellulaires ont été effectués à l'aide d'une solution de sonde moléculaire dans le DMSO à une concentration de $2,57 \cdot 10^{-2}$ mol / L (10 mg / mL). Avant chaque marquage, l'absence d'interférence de la sonde moléculaire dans le mécanisme de reconnaissance des anticorps a été vérifiée par immunofluorescence (expérience présentée en chapitre 1).

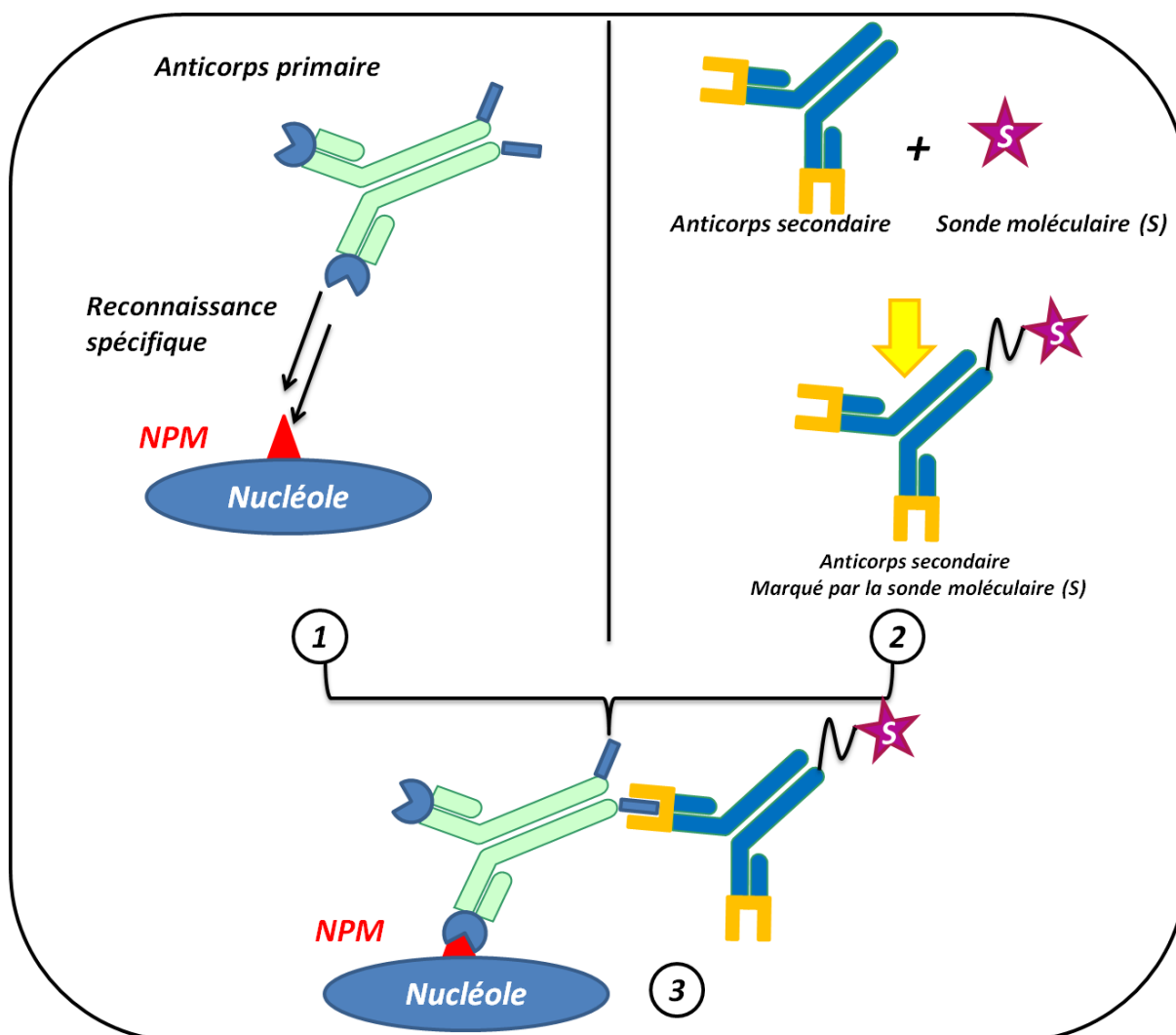


Figure 21 Représentation schématique du marquage des anticorps secondaires par les sondes moléculaires : 1) marquage de la nucléophosmine par l'anticorps secondaire. 2) marquage de l'anticorps secondaire par une sonde moléculaire. 3) marquage de l'anticorps primaire par l'anticorps secondaire marqué par la sonde.

a. Imagerie de cellule par une sonde iodée

Recherche de l'iode sur des cellules non marquées

Nous étudierons dans un premier temps la sonde moléculaire iodée (2) synthétisée dans le chapitre 2 et dont la formule chimique est la suivante (Figure 22). Nous souhaitons de cette façon imager les nucléoles de la cellule par l'intermédiaire de cette sonde exogène, qui introduit un atome d'iode de manière spécifique via les anticorps primaires et secondaires.

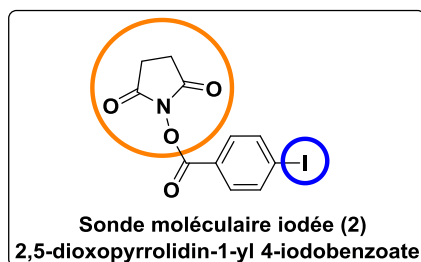


Figure 22 Représentation de la formule moléculaire de la sonde (2)

Avant toutes choses, nous devons nous assurer de l'absence d'iode au sein d'une cellule sans marquage. Sur cette dernière un balayage en masse est réalisé. La masse de l'iode étant de 126,90 u.m.a le balayage en masse a été effectué entre 126,80 et 127,05 u.m.a. Suite à l'impact des ions primaires sur la surface de l'échantillon, les ions secondaires expulsés vont être détectés et analysés par le spectromètre de masse de l'instrument. L'expérience consiste à détecter la masse de l'iode et de reconstituer une image représentant la répartition de l'iode sur la surface de l'échantillon.

Un signal unique apparaît à 126,95 u.m.a. Ce signal ne correspond pas à l'iode car la masse ne correspond pas à l'élément recherché, il peut être due à une interférence en masse. Une image en fonction de la masse 126,90 va être reconstituée. Dans le même temps une image des deux éléments caractéristiques de la cellule a été obtenue afin de vérifier que l'échantillon étudié est bien une cellule et non pas la résine d'inclusion. (Figure 23)

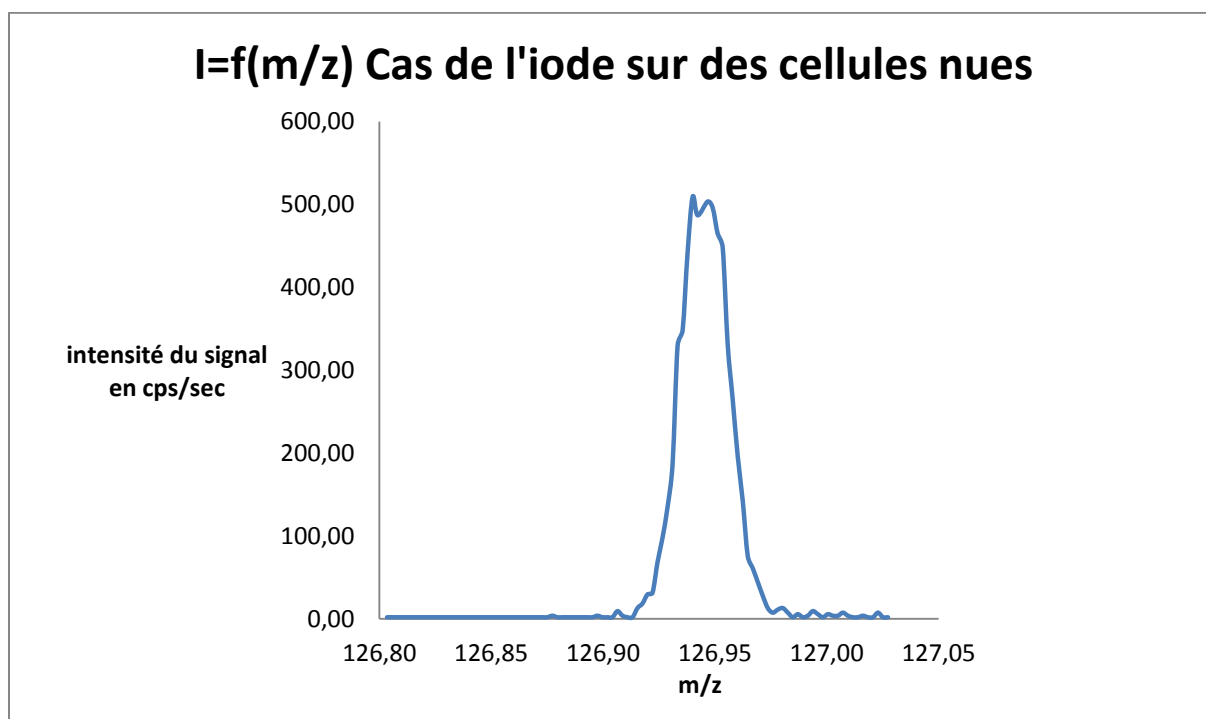


Figure 23 Spectre de masse sur des cellules seules dans la zone de l'iode

Les images des trois espèces ioniques d'intérêt, $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$, $^{31}\text{P}^-$ et $^{127}\text{I}^-$ ont été obtenues (Figure 24) dans une cellule non marquée. Les images en $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ et $^{31}\text{P}^-$ permettent de justifier que

l'échantillon étudié est bien une cellule. L'image de l'iode 127 n'indique pas une localisation spécifique de l'iode dans l'échantillon. Cette image montre qu'il n'y a pas d'iode présent de manière naturelle dans la cellule. Le signal détecté par le spectromètre de masse à la masse 127 ne peut pas être attribué à l'iode. Le signal observé provient vraisemblablement de la résine.

Les images NanoSIMS obtenues montrent une répartition différente des sites riches en éléments $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ et $^{31}\text{P}^-$ par rapport aux images de cellules précédemment obtenues, il est également possible de constater une différence des niveaux d'intensité. Cette différence est liée à la coupe de l'échantillon pour laquelle l'altitude ou se trouve la cellule n'est pas la même d'une résine à une autre. Les études qui vont suivre vont présenter des images pour lesquelles la répartition spatiale des éléments sera liée à la manière dont à été coupé l'échantillon.

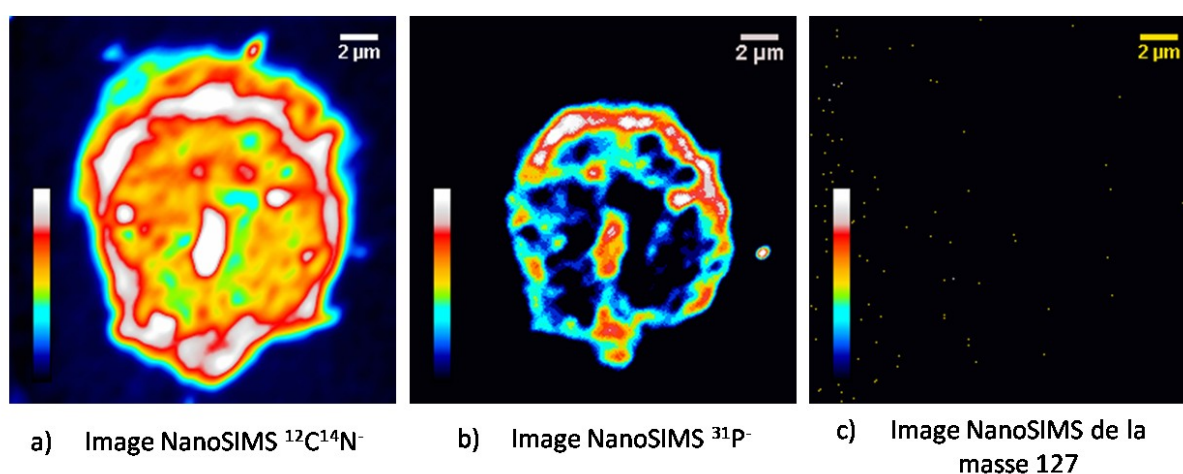


Figure 24 Image NanoSIMS obtenues dans le cadre de l'imagerie de la masse 125 : a) image des $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$, b) image du $^{31}\text{P}^-$, c) image $^{127}\text{I}^-$. Zone de travail : $25\ \mu\text{m} \times 25\ \mu\text{m}$

Recherche de l'iode sur des cellules marquées

Comme précédemment nous avons réalisé un balayage en masse. Nous obtenons un spectre comportant deux pics. Le premier pic, apparaissant à 126.90 u.m.a, correspond au signal de l'iode recherchons. Le second situé à 126.94 u.m.a représente quant à lui l'interférence qui a été observée précédemment lors de l'étude des cellules sans marquage (Figure 25).

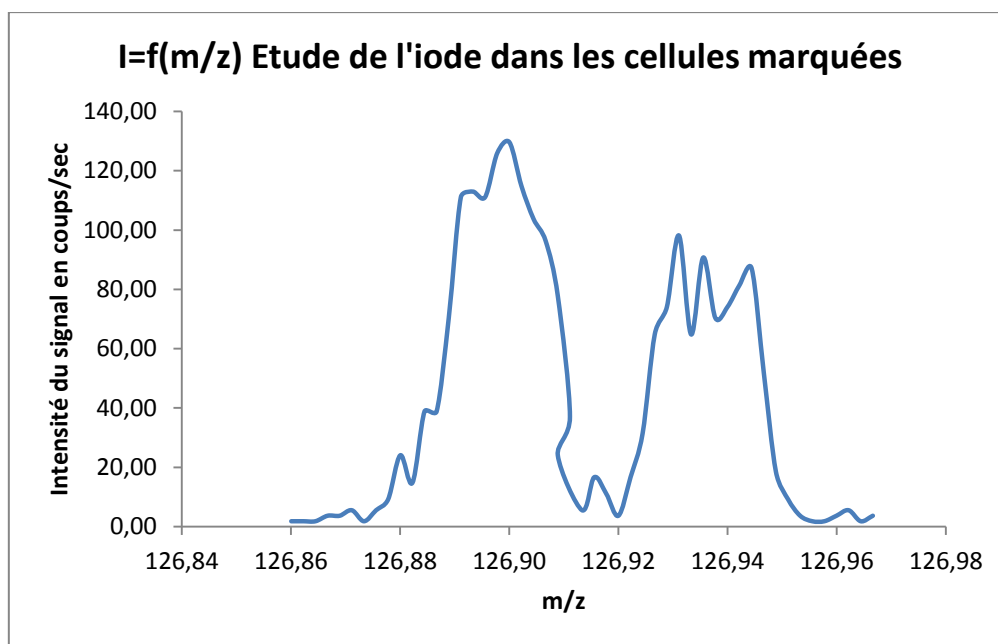
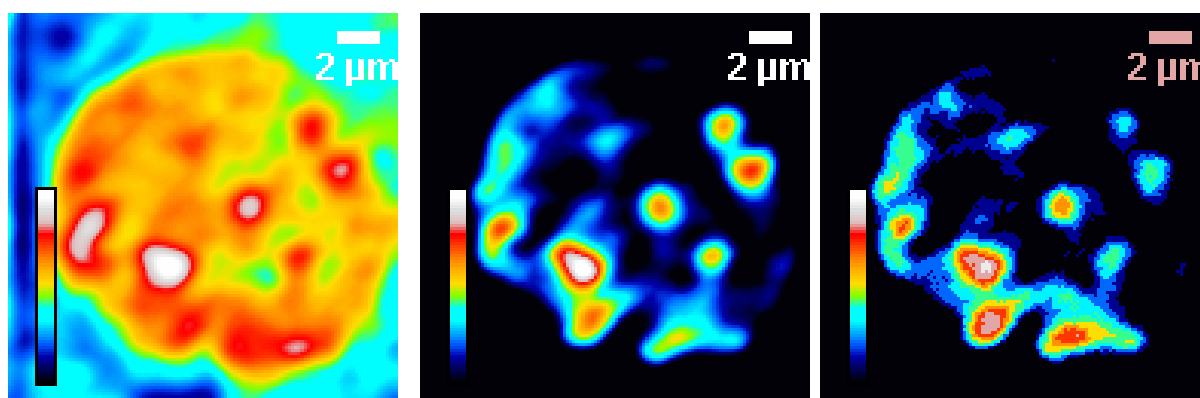


Figure 25 Spectrographe de masse de l'iode dans le cas de cellules marquées par la sonde n°2

A partir du signal à 126,90 u.m.a nous obtenons une image correspondant à la répartition de l'iode dans la cellule, acquises simultanément avec les images $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ et le $^{31}\text{P}^-$ (Figure 26).



a) Image NanoSIMS $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$

b) Image NanoSIMS $^{31}\text{P}^-$

c) Image NanoSIMS $^{127}\text{I}^-$

Figure 26 Image NanoSIMS : a) image des $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$, b) image $^{31}\text{P}^-$, c) image $^{127}\text{I}^-$. Zone de travail : 20 µm x 20 µm

L'image de l'iode met en évidence la co-localisation des zones comportant une forte concentration en phosphore et des zones comportant une forte concentration en iode. Afin de vérifier cette information, nous avons décidé d'effectuer un line scan sur une section traversant l'échantillon (Figure 27).

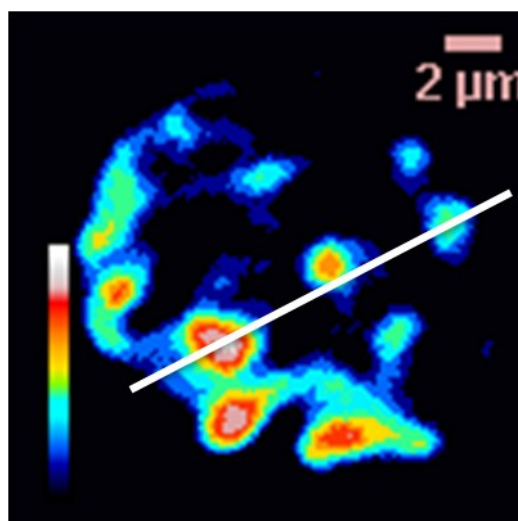


Image NanoSIMS $^{127}\text{I}^-$

Figure 27 Image NanoSIMS $^{127}\text{I}^-$ incluant la ligne choisie pour le line scan (ligne blanche)

En effectuant un line scan, nous obtenons les profils suivants (Figure 28) :

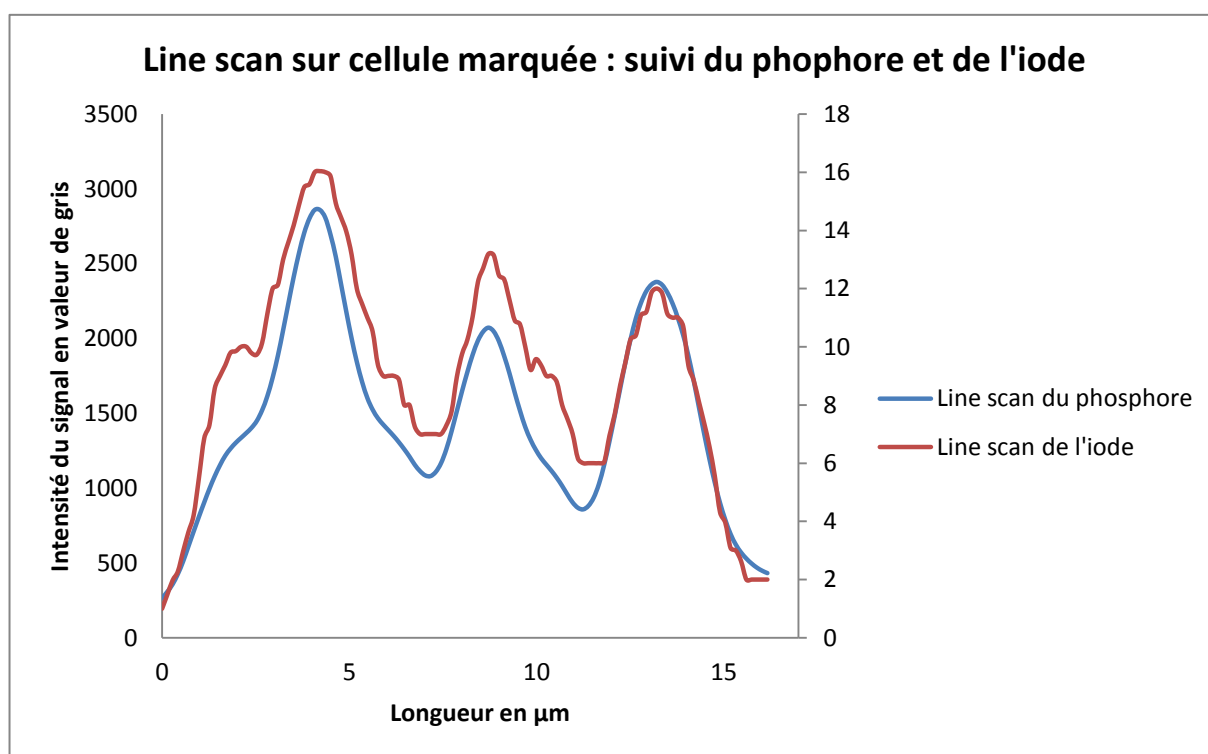


Figure 28 Line scan du phosphore (^{31}P) (bleu) et de l'iode (^{127}I) (rouge) sur une ligne définie

Les deux line scan obtenus confirment la co-localisation de l'iode et du phosphore. Cette analyse prouve donc la possibilité de marquer les nucléoles des cellules à l'aide de la sonde **(2)** fixée sur l'anticorps secondaire spécifique à l'anticorps primaire, lui même spécifique à la nucléophosmine.

b. Imagerie de cellules par une sonde bromée

La seconde étude concernera une sonde moléculaire comportant un atome de brome dans sa structure (Figure 29). Comme lors de l'analyse précédente, nous allons d'abord procéder à la détection du brome dans une cellule non marquée et ensuite sur les cellules contenant la sonde moléculaire.

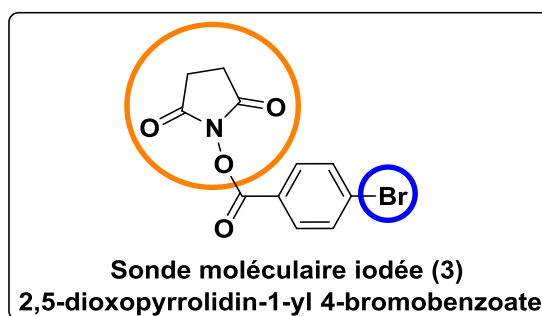


Figure 29 Représentation de la sonde moléculaire bromée (3)

Recherche du brome dans les cellules non marquées

Un balayage en masse est réalisé sur une coupe ultra-microtomée. La masse du brome 81 étant de 80,92 u.m.a, le balayage a été effectué de la masse 80,83 à 81,05 u.m.a (Figure 30).

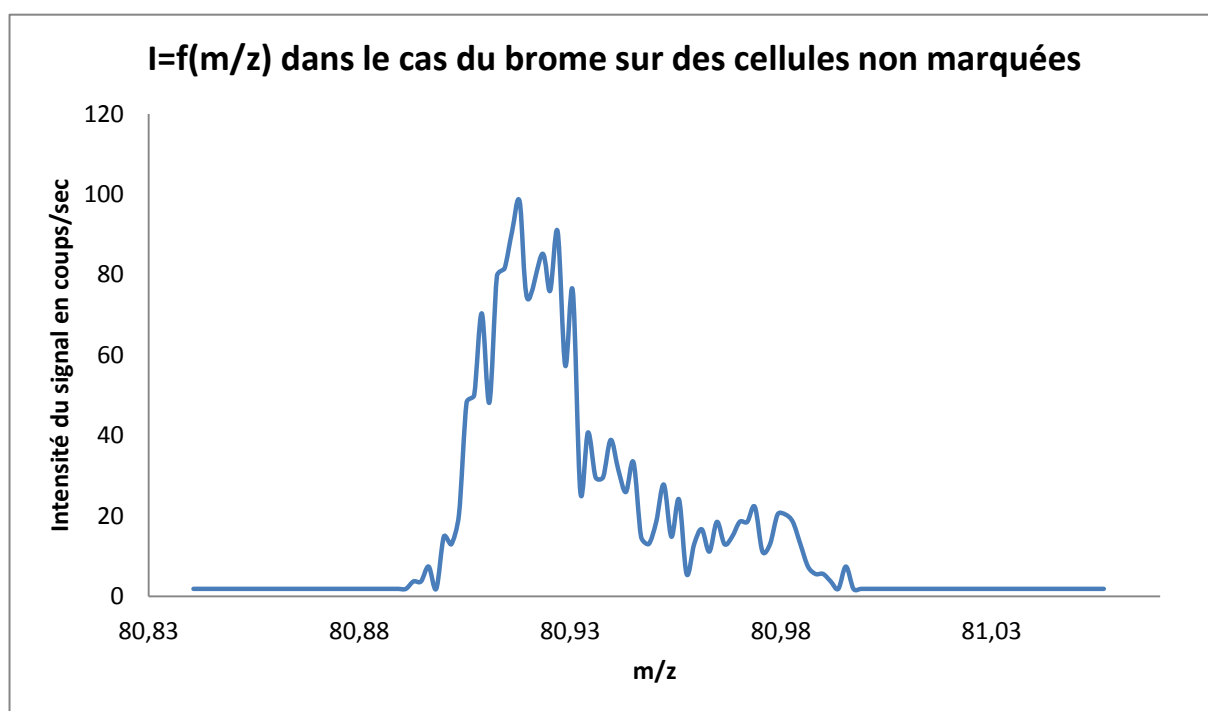


Figure 30 Spectrographe de masse du brome dans une cellule sans marquage au brome

Dans ce cas, on détecte un signal apparaissant à une masse de 80,92 u.m.a correspondant au brome (Figure 30). Nous devons cartographier la répartition de ce brome résiduel au sein de la cellule afin de vérifier que sa répartition n'interférera pas avec le brome que nous introduirons par l'intermédiaire des sondes.

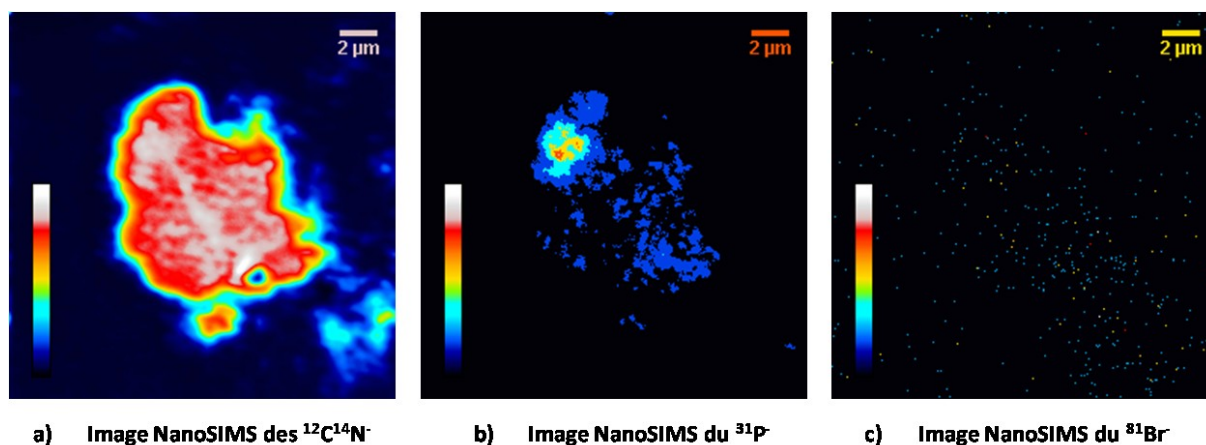


Figure 31 Image NanoSIMS : a) image du $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$, b) image $^{31}\text{P}^-$, c) image du $^{81}\text{Br}^-$. Zone de travail : $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$.

La faiblesse et la répartition homogène du brome 81 dans la cellule ne constituent pas une difficulté pour l'étude de la sonde bromée d'intérêt.

Recherche du brome après marquage dans les cellules

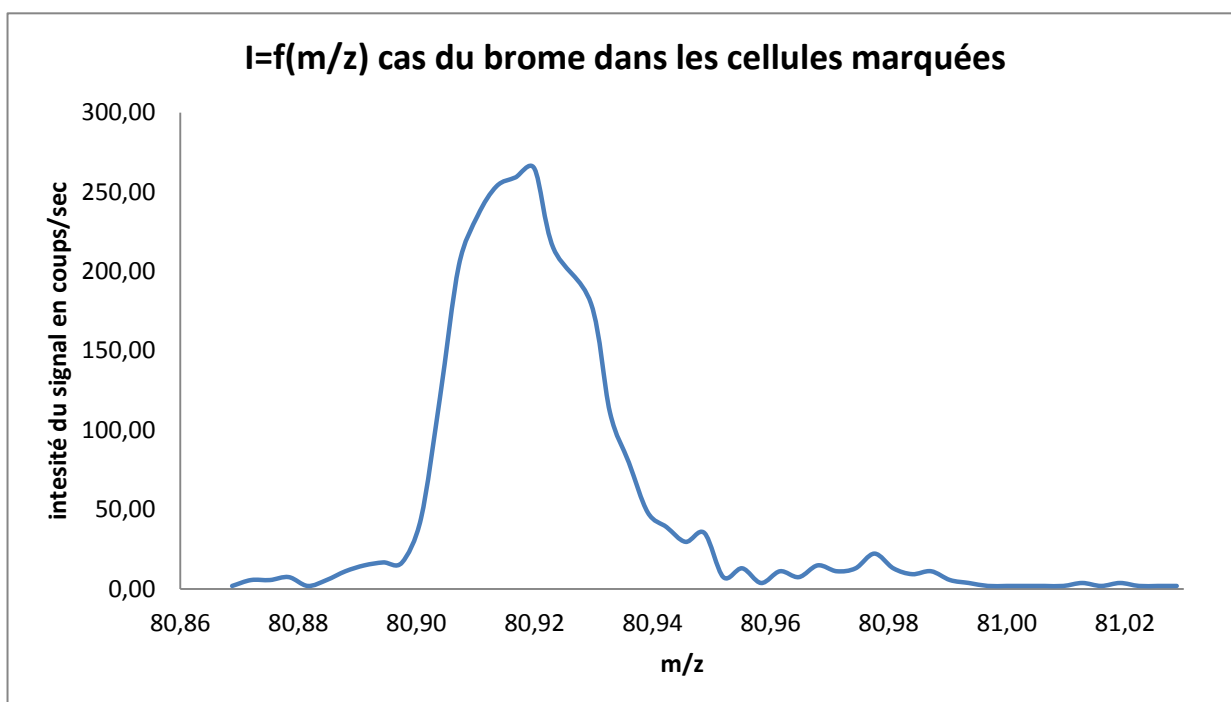


Figure 32 Spectrographe du brome des cellules marquées

Dans ce cas (Figure 32), nous détectons un signal dont le maximum apparaît à 80,92 u.m.a, ce signal est beaucoup plus intense et net que le signal détecté dans les cellules non marquées (Figure 32). Une image de la répartition de ce signal a été effectuée afin de pouvoir la comparer à ce qui a été obtenu précédemment.

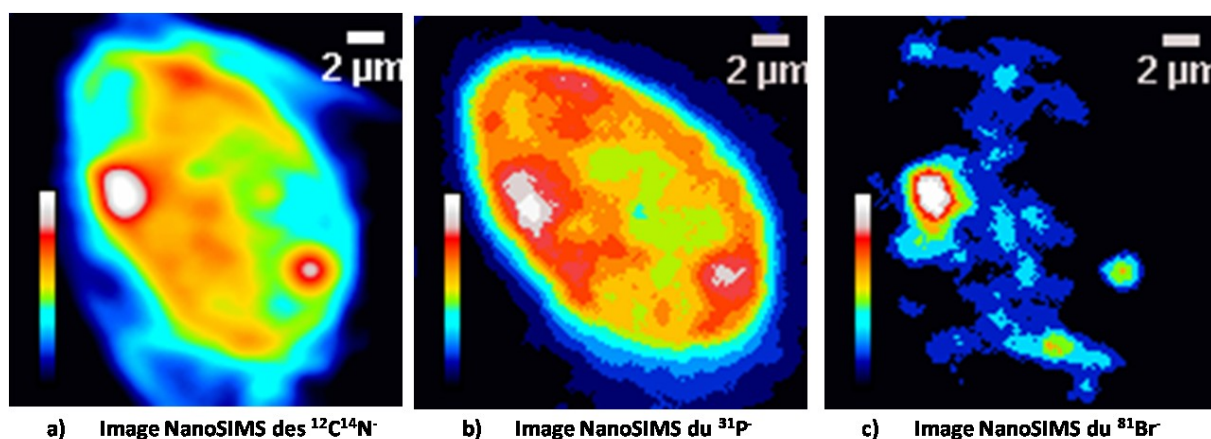


Figure 33 Image NanoSIMS obtenues dans le cadre du marquage avec le brome : a) image du $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$, b) image du $^{31}\text{P}^-$, image du $^{81}\text{Br}^-$. Zone de travail : $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$

L'image de la figure 33 c représente le marquage de la cellule par la sonde (3) sur les anticorps. Dans ce cas nous observons un marquage sur le nucléole ainsi que sur toute la surface de la cellule avec la sonde (3), cependant nous pouvons constater que le brome va tout de même se localiser en grande partie dans le nucléole. Nous avons effectué un line scan traversant le nucléole (Figure 34).

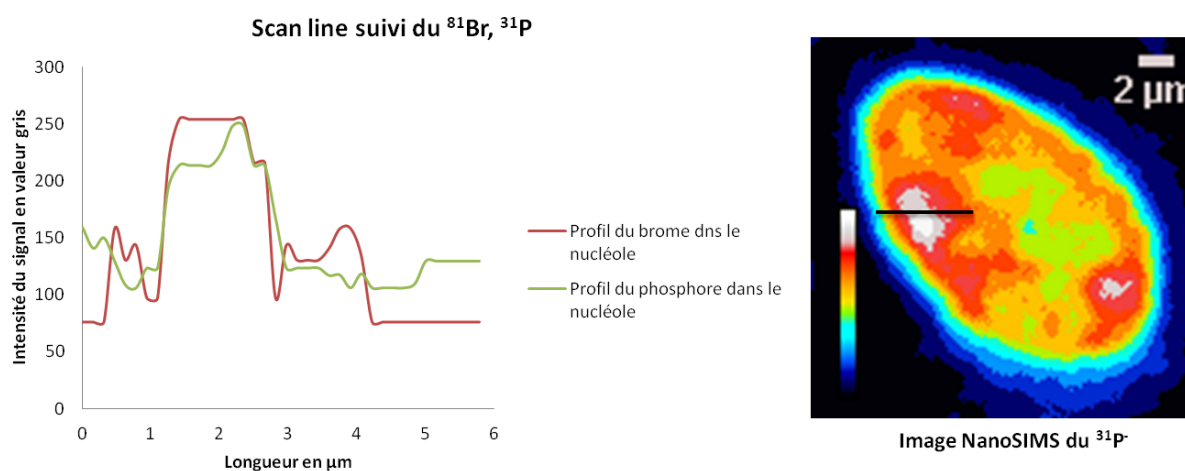


Figure 34 Étude de l'évolution du signal du brome et du phosphore

Le profil obtenu montre une corrélation du signal du brome et du phosphore. Ce graphique justifie également le fait que le marquage va bien se localiser au niveau du nucléole.

c. Imagerie de cellules par une sonde fluorée

Nous allons présenter les résultats obtenus dans le cadre du marquage en présence de la sonde **(4)**, cette dernière comporte trois atomes de fluor dans sa structure (Figure 35).

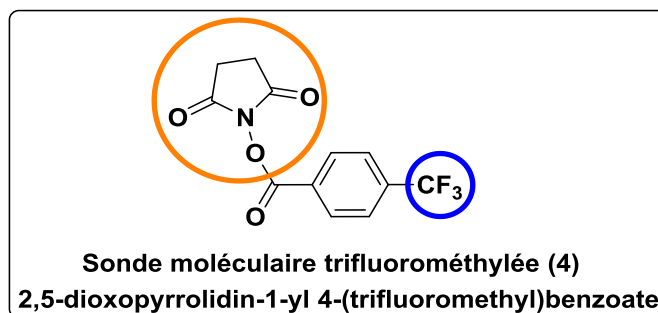


Figure 35 Représentation de la sonde moléculaire trifluorométhylée (4)

Comme lors des cas précédents, nous allons dans un premier temps nous intéresser à la présence du fluor au sein d'une cellule ne contenant aucune sonde moléculaire. Nous allons détecter le fluor présent dans la cellule et déterminer si ce dernier aura une influence sur le signal du fluor provenant d'une sonde moléculaire.

Recherche du fluor dans des cellules non-marquées

Le balayage autour de la masse du fluor (18,988 u.m.a) permet d'obtenir un spectre de masse en haute résolution de cet élément sur une cellule non marquée par la sonde **(4)** (Figure 36).

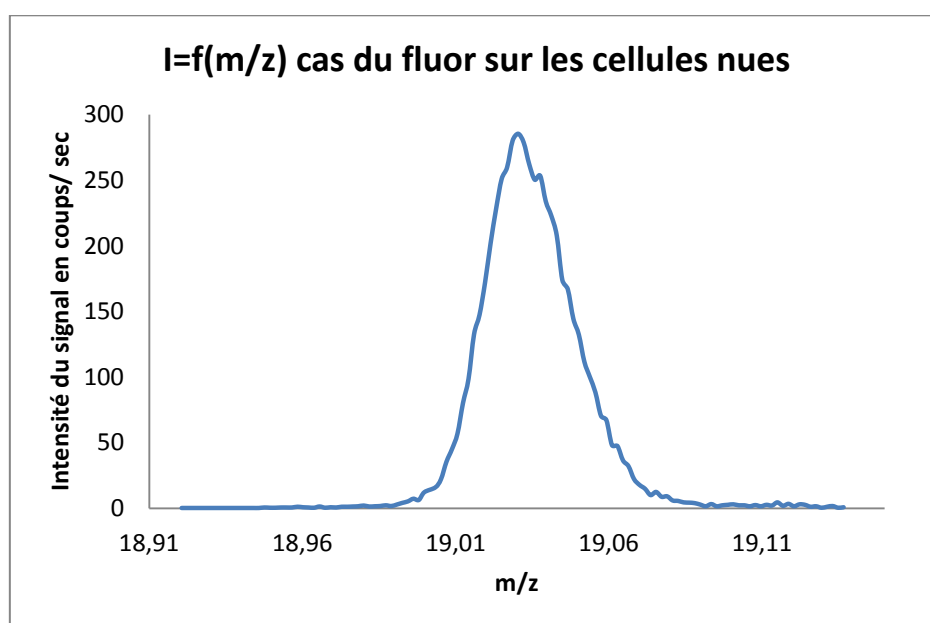


Figure 36 Spectrographe de masse du fluor sur une cellule non marquée

Le spectre de masse suivant nous permet d'observer un signal fin qui pourrait laisser supposer qu'il y a du fluor dans la cellule. Une image de cette masse a été obtenue et comparée à la cellule, sur cette dernière, il n'est pas possible d'observer une structure de cellule (Figure 37). On

observe une image représentant une répartition homogène du fluor sur toute la surface de l'étude. Le signal du fluor détecté correspond vraisemblablement au fluor présent dans la composition de la résine d'inclusion.

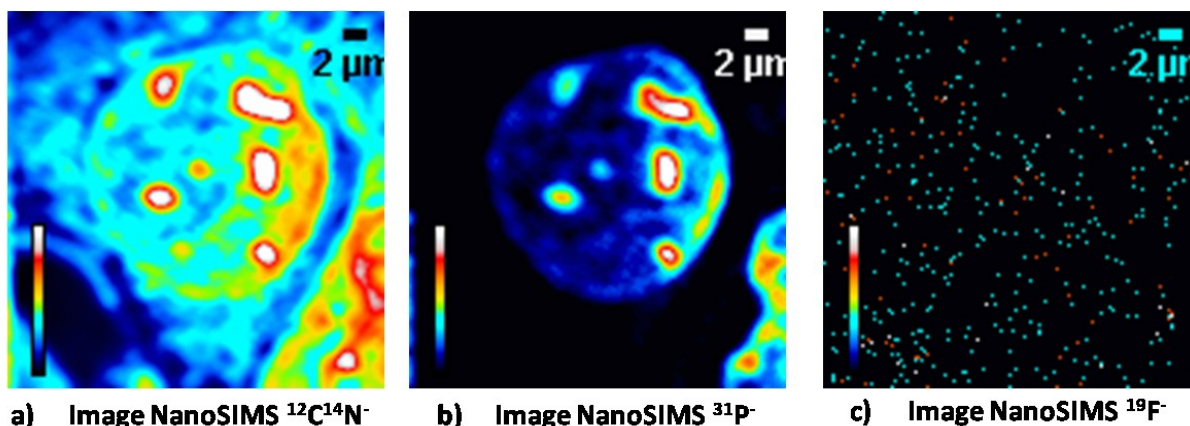


Figure 37 Image NanoSIMS obtenues dans le cas du fluor dans les cellules sans marquage a) image du $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ b) image $^{31}\text{P}^-$ c) image $^{19}\text{F}^-$. Zone de travail : $25\ \mu\text{m} \times 25\ \mu\text{m}$

Recherche du fluor dans des cellules marquées

Dans ce cas, la cellule a été marquée par la sonde fluorée (4). (Figure 38).

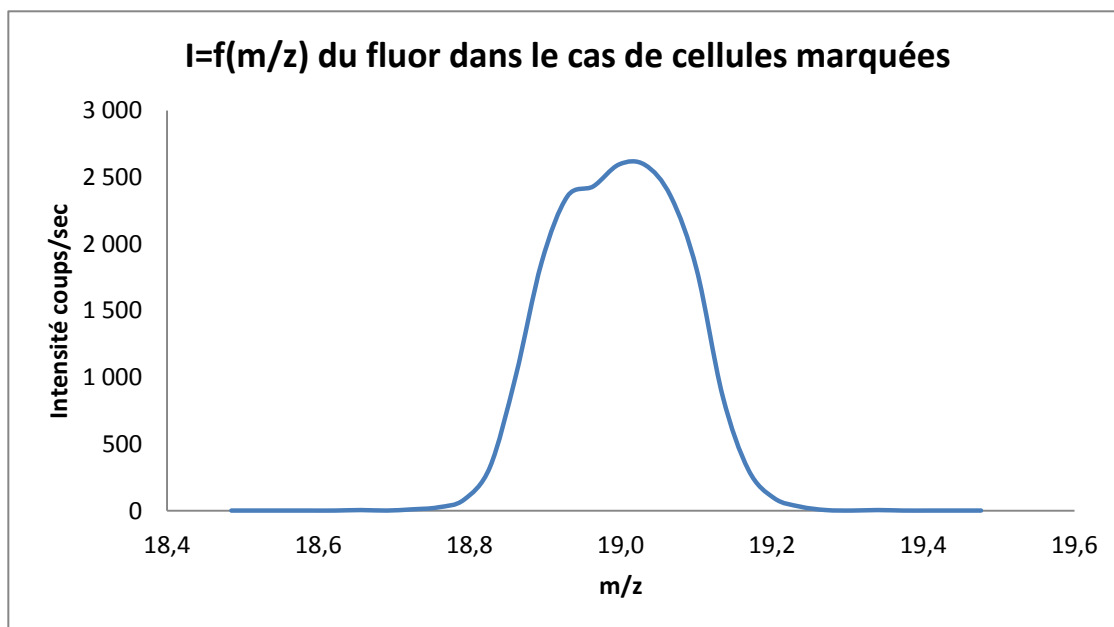


Figure 38 Spectrographe de masse du fluor dans le cas de cellule marquée par la sonde 4

Le spectre de masse nous permet, comme lors du cas de cellules non marquées, de détecter le fluor. Il est possible d'observer un léger plateau au sommet de cette dernière pour laquelle la valeur de masse correspond à 19,00 u.m.a. En nous basant sur ce signal nous allons imager la répartition du fluor sur notre échantillon (Figure 39).

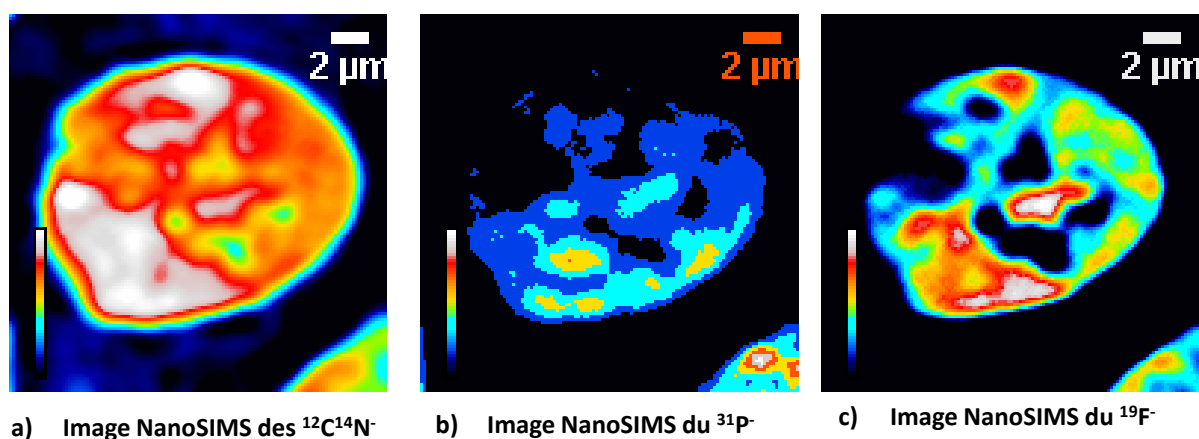


Figure 39 Image NanoSIMS obtenues dans le cas de cellules marquées par l'intermédiaire de la sonde fluorée: a) image du $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$, b) image du $^{31}\text{P}^-$, c) image $^{19}\text{F}^-$. Zone de travail : $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$

L'image du fluor permet de mettre en évidence le marquage de la nucléophosmine des nucléoles de la cellule par la sonde moléculaire. Cette image semble marquer des zones plus étendues que le nucléole pouvant indiquer la présence probable de la nucléophosmine dans d'autres sites que le nucléole. Il est possible de faire des corrélations entre l'évolution du signal du fluor et du phosphore sur une même zone par l'établissement d'un line scan (Figure 40).

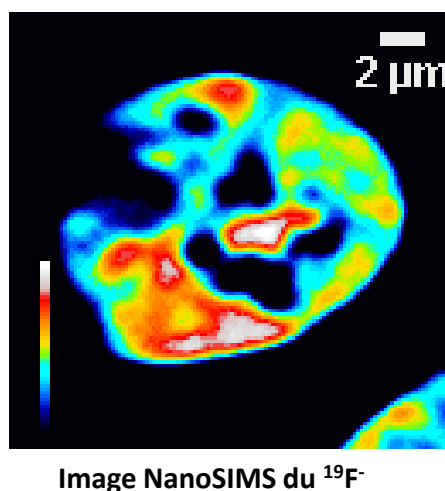


Figure 40 Image NanoSIMS du $^{19}\text{F}^-$ incluant la ligne définie sur le nucléole

Les variations du signal des deux éléments mettent en évidence une variation simultanée de la concentration de ces derniers indiquant par la même occasion une co-localisation du phosphore et du fluor (Figure 41).

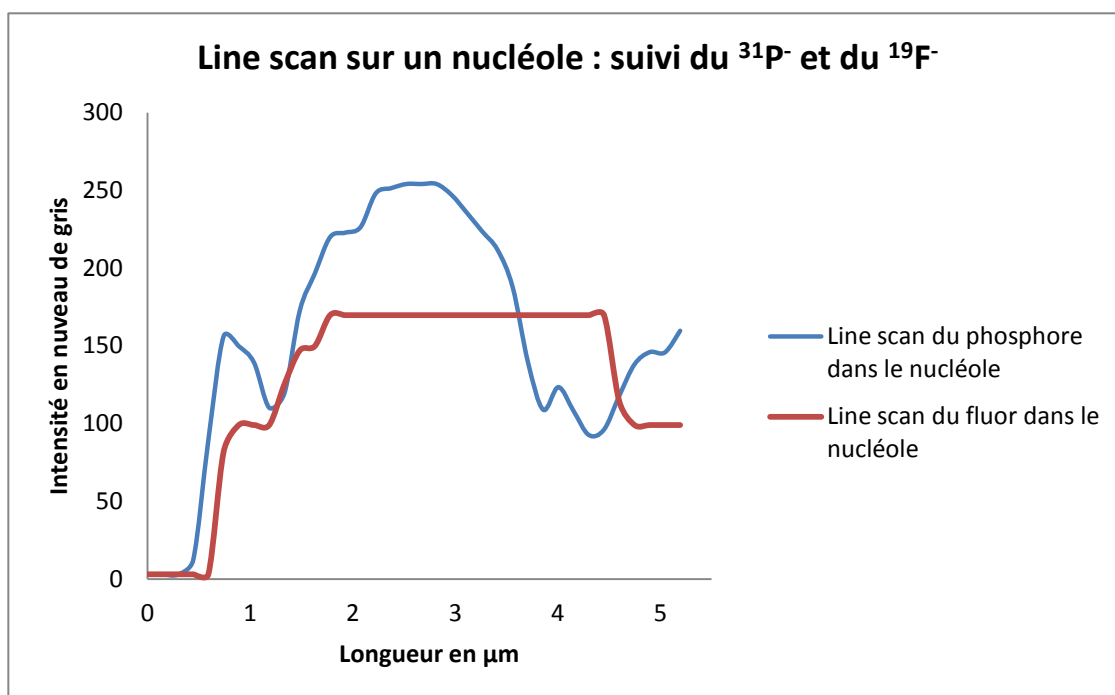


Figure 41 Étude de profil du fluor et du phosphore dans le nucléole

Nous allons désormais nous focaliser sur ce nucléole et imager le fluor et le phosphore dans cette zone par un "depth scan"(Figure 42). Cette expérience va nous permettre de visualiser la localisation avec une plus grande résolution spatiale et d'observer l'organisation en profondeur de la nucléophosmine dans le nucléole. Pour se faire, nous avons effectué une série de 10 images en fluor et en phosphore à différentes hauteurs afin d'observer la distribution de ces éléments en trois dimensions. Nous avons obtenu une image tous les 50 nanomètres en profondeur sur la coupe (Figure 43).

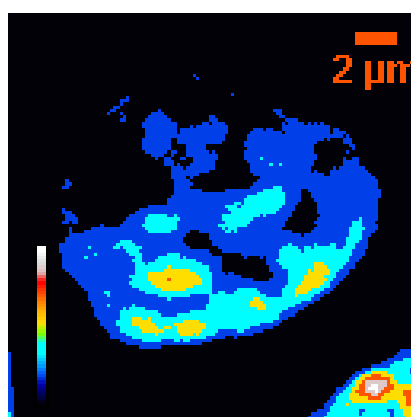


Image NanoSIMS du $^{31}\text{P}^-$

Figure 42 Représentation de la zone de travail (cadre blanc)

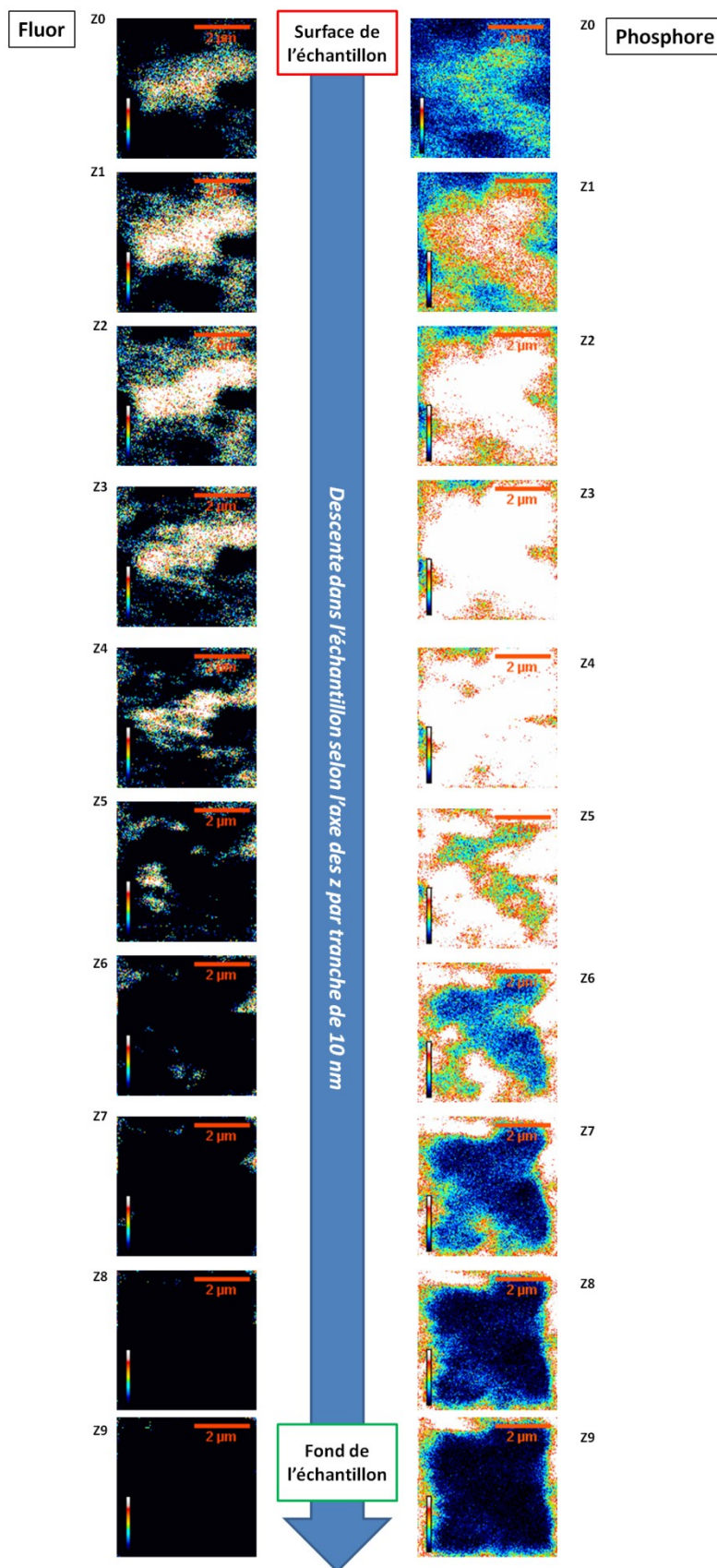


Figure 43 Image NanoSIMS du fluor et du phosphore selon l'axe des z

Cette étude en profil commence à la surface de l'échantillon pour traverser l'intégralité de la coupe. On observe une variation importante du fluor sur la surface d'étude (Figure 43 : Z1 à Z4) correspondant à la localisation de la sonde au sein du nucléole. Par la suite, la concentration de cet élément diminue jusqu'à disparaître lorsque l'échantillon est entièrement traversé (Figure 43 : Z5 à Z9).

Dans le même temps les images du phosphore obtenues montre une localisation très étendue de cet élément (Figure 43 : image Z2 à Z4). Par la suite, la concentration de cet élément diminue au fur et à mesure que l'échantillon est creusé par le faisceau conduisant à une image où le phosphore n'est plus visible (Figure 43 : Z9).

Par comparaison des "étages" un à un, il est possible de différencier la localisation particulière du fluor de la sonde dans le nucléole par rapport au phosphore. Il est possible d'observer (Figure 43 : image Z2 à Z4) une forte concentration du fluor caractérisée par une tâche blanche correspondant à la nucléophosmine du nucléole car le marquage utilisé vise le marquage de ce composé. Ces images semblent montrer une localisation bien définie du fluor et donc de la nucléophosmine dans le nucléole.

Lors de cette acquisition multi-échelle nous avons réussi à imager le fluor que nous avons introduit par l'intermédiaire de la sonde **(4)**. De plus il nous a été possible de visualiser des zones plus concentrées en sonde par rapport au phosphore dans le nucléole par l'intermédiaire d'une étude selon l'axe des z. Cette étude a permis d'observer une organisation spatiale de la nucléophosmine par l'observation du fluor de la sonde moléculaire. Il serait intéressant de déterminer clairement la localisation de la nucléophosmine dans le nucléole et donc de savoir si cette dernière se situerait préférentiellement dans des zones spécifiques du nucléole comme par exemple une zone granulaire ou plutôt fibrillaire du nucléole. D'après la littérature, la nucléophosmine se localiserait dans la région granulaire et la zone fibrillaire dense du nucléole.^{[57] [58]} L'image obtenue par la NanoSIMS montre une zone s'étendant sur 4 µm x 1 µm. Cette dernière, relativement dense ne permet aucune distinction entre les deux composants envisagés. Cependant, la littérature indique que les zones fibrillaires sont des structures fines dont la taille est de l'ordre de la centaine de nanomètre^[58] rendant difficile la localisation de ce type de zone par NanoSIMS. Nous pourrions envisager un couplage entre la microscopie électronique à transmission^[59] (MET) et la NanoSIMS qui nous permettrait de visualiser la structure du nucléole par MET que nous pourrions comparer à l'image des éléments constitutifs obtenue par la NanoSIMS. Nous pourrions ainsi établir une corrélation entre les structures observées et leur composition.

Lors de ces trois études, nous avons pu visualiser trois éléments : l'iode, le brome et le fluor. Il a été possible d'obtenir des images du marquage dans les trois cas, cependant nous avons constaté que les images obtenues après marquage de l'anticorps secondaire par la sonde fluorée **(4)** sont les plus nettes et les plus intenses. De plus, l'image du fluor obtenue nous a permis de mettre en évidence des zones où la sonde est présente en grande quantité dans le nucléole. C'est pourquoi nous envisageons d'imager une sonde bimodale contenant du fluor et une fonction alcyne dans la partie suivante.

d. Imagerie de cellule par l'intermédiaire d'une sonde fluorée bimodale

Nous étudierons dans ce cas une sonde moléculaire **(6)** comportant deux fonctions chimiques : une fonction alcyne et un groupement trifluorométhyle (Figure 44). Lors du chapitre précédent la triple liaison carbone-carbone a été imagée par micro-spectroscopie Raman (chapitre 3), nous souhaitons visualiser les atomes de fluor présents dans un échantillon marqué par cette même sonde rendant ainsi possible la corrélation des informations fournies par l'imagerie par spectroscopie Raman et l'imagerie par spectrométrie NanoSIMS.

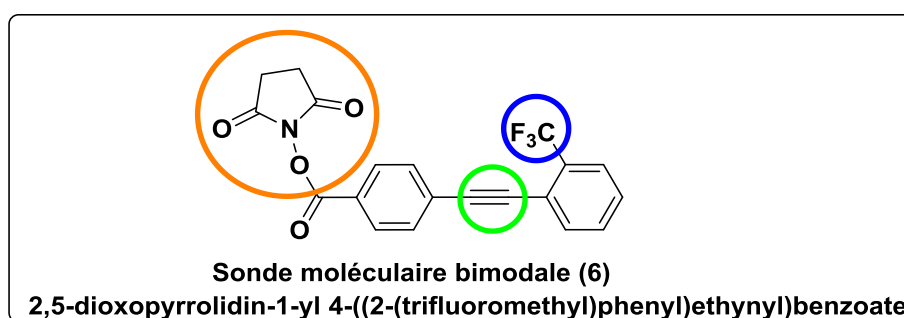


Figure 44 Représentation de la molécule bimodale (6) utilisée

Sur l'échantillon contenant la sonde moléculaire (6), il a été possible de détecter le fluor dans l'échantillon. Il a ensuite été possible de faire des images NanoSIMS de la cellule repérée, nous avons donc pu obtenir une image du $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$, du $^{31}\text{P}^-$ et du fluor (Figure 44).

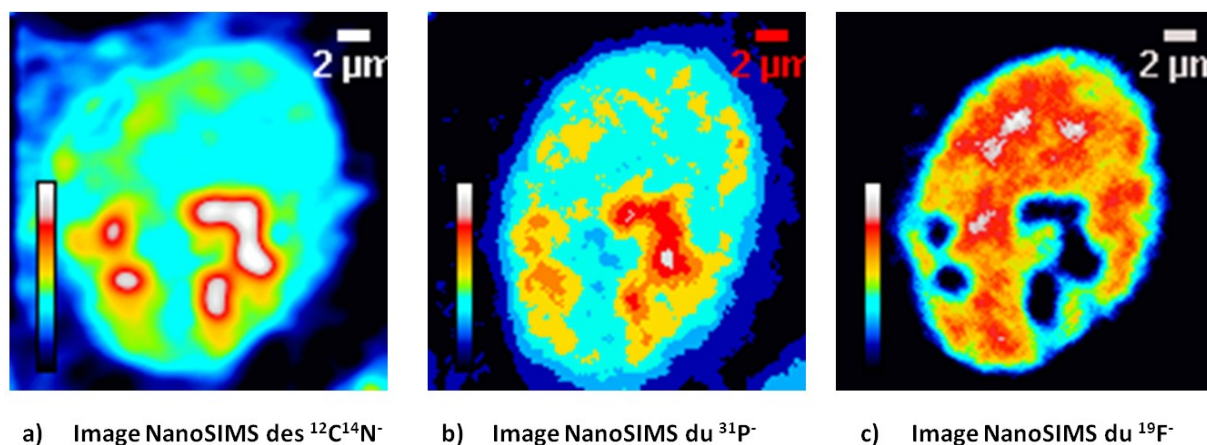


Figure 45 Image NanoSIMS : a) image $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$, b) image $^{31}\text{P}^-$, c) image $^{19}\text{F}^-$

Comme lors des cas précédents, il est possible d'observer l'allure globale de la cellule par l'image obtenue en $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ (Figure 45a) et la disposition du phosphore dans le noyau (Figure 45b). L'image 45c représente la répartition du fluor dans la cellule, nous pouvons observer une zone pauvre en fluor représentée par des tâches noires. Une étude de profil (longueur du profil : $10\mu\text{m}$) sur une des zones noires a été effectuée afin d'observer les variations de ces trois éléments imagés (Figure 46).

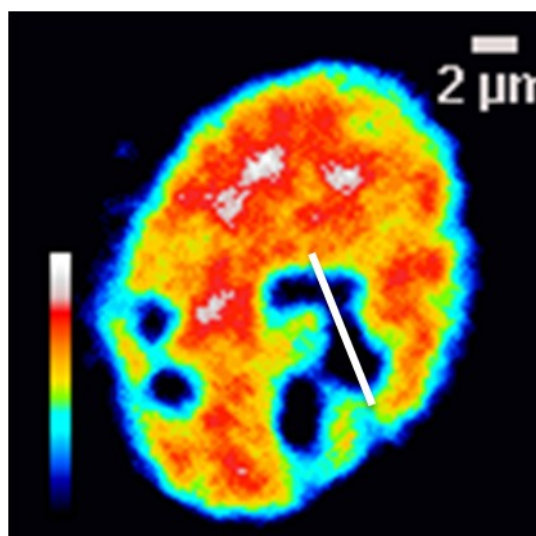


Image NanoSIMS du $^{19}\text{F}^-$

Figure 46 Image NanoSIMS du fluor avec la zone choisie pour le line scan

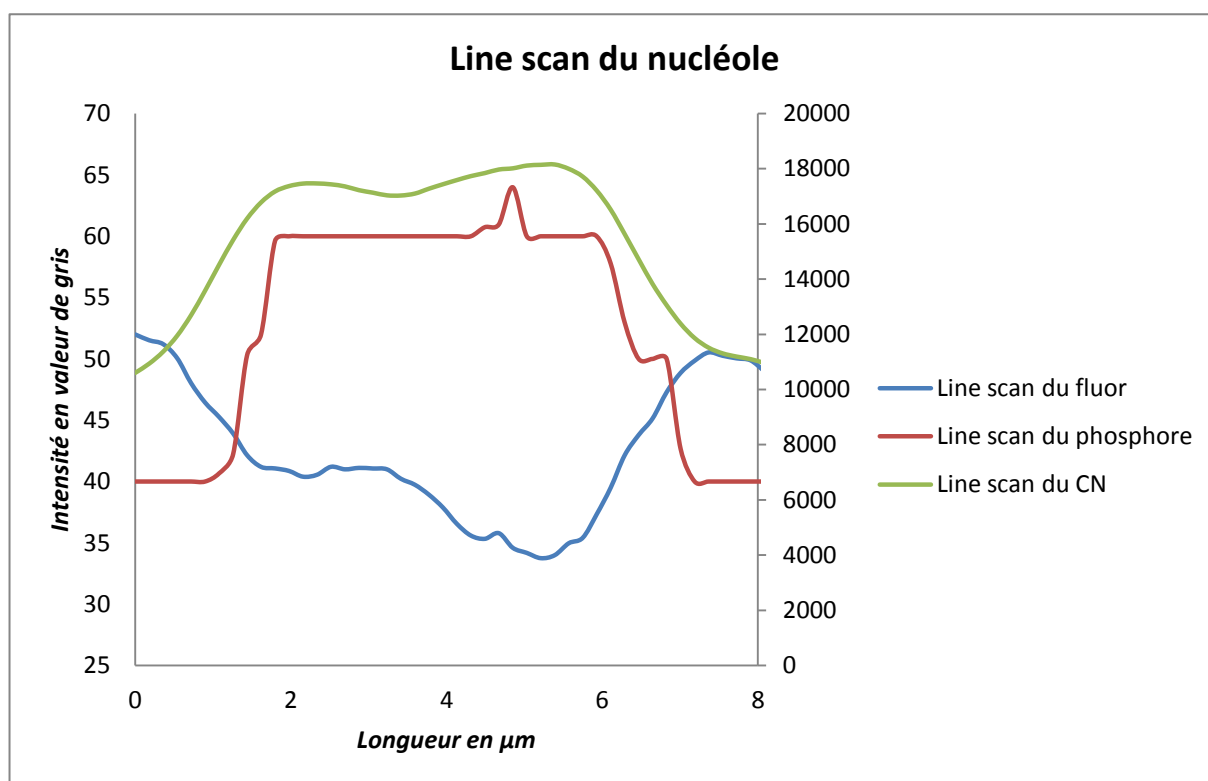


Figure 47 Étude de profil sur la zone choisie comparaison de la variation du fluor, du phosphore et des $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$

Sur ce line scan nous pouvons observer trois profils appartenant au $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$, $^{31}\text{P}^-$, $^{19}\text{F}^-$ (Figure 47). Le profil du $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ montre un maximum stable correspondant à l'image de la figure 44 a), ce qui signifie que cette zone est riche en cet élément. En comparant ce profil avec celui obtenu lors de

l'étude du phosphore, on peut voir que les deux profils se suivent. Lors de l'étude du profil du fluor, nous constatons qu'il n'y a du signal qu'en dehors des zones où le $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ et le $^{31}\text{P}^-$ apparaissent de manière importante.

Nous ne pouvons pas dire que le marquage n'a pas fonctionné car nous avons réussi à prouver que la sonde n'interfère pas au marquage par une analyse par immunofluorescence (Chapitre 2). Cependant nous pouvons émettre plusieurs hypothèses pour tenter d'expliquer l'absence de fluor :

- La zone concernée est bien un nucléole, il faut alors expliquer l'absence de fluor alors que le marquage par la sonde a été validé par immunofluorescence.

Bien que la sonde bimodale comporte également un groupement trifluorométhyle, il y a tout de même une différence au niveau de la structure de cette dernière (Figure 45).

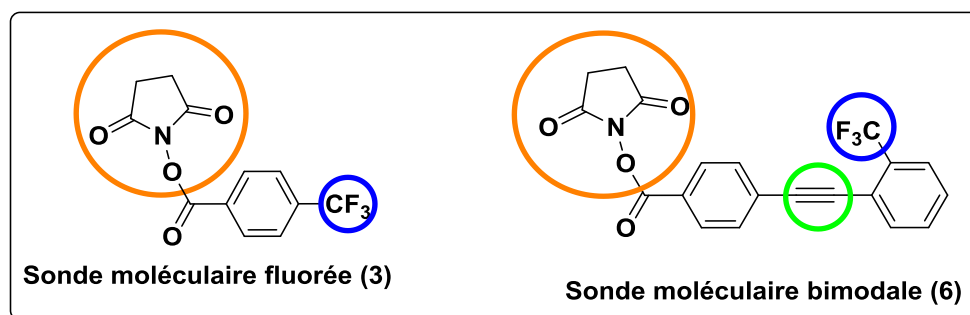


Figure 48 Représentation schématique des sondes moléculaires comportant les groupements trifluorométhyle

Au vu de ces structures, l'un des facteurs pouvant perturber la visualisation du marquage est la triple liaison carbone-carbone. Cette dernière pourrait être sensible au composé post-fixateur (tétraoxyde d'osmium) que nous avons employé dans le cadre de la préparation des cellules. Ce composé réagit en présence des doubles liaisons carbone-carbone de type alcène. De nombreuses méthodes de synthèses font référence à ce métal.^[60] Il est entre autre utilisé dans les réactions de dihydroxylation des alcènes,^{[61] [62] [63]} pour rappel la réaction dihydroxylation des alcènes est la réaction permettant de synthétiser des diols à partir des alcènes. L'osmium est également un réactif oxydant utilisé dans le cas de la préparation de dicétone à partir d'alcyne.^{[61] [64] [65]}

Nous pouvons supposer que le tétra-oxyde d'osmium utilisé dans la post fixation puisse réagir avec l'alcyne de la sonde. Une réaction entre les carbones de la triple liaison et le tétra-oxyde d'osmium peut être envisageable (Figure 49). La littérature relate divers cas de formation de complexes organométalliques osmium-alcyne.^{[66] [67] [68] [69]}

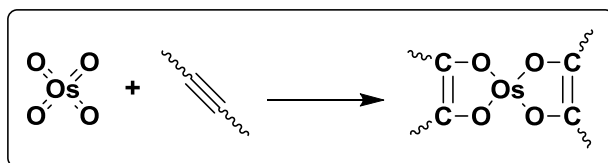


Figure 49 Réaction possible entre l'osmium et l'alcyne

Cette réaction peut potentiellement faire en sorte que le groupement trifluorométhyle de la sonde soit éjecté de la zone contenant les nucléoles. Il est à noter qu'il est également possible de former des complexes organométallique entre le l'osmium et les groupements fluorés par activation de la liaison carbone fluor. ^[70]

Pour contrer ce phénomène il serait intéressant de modifier la méthode de post fixation dans le cas de cette sonde nous pourrions envisager un autre type de post fixateur qui pourrait avoir une influence beaucoup moins importante que le tétra-oxyde d'osmium, comme par exemple le méthanal.

Nous pouvons également envisager une autre hypothèse concernant ce marquage : la zone concernée est un défaut due à une impureté riche en $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ et $^{31}\text{P}^-$ mais pauvre en nucléophosmine. Les nucléoles serait dans ce cas bien marqués en fluor (Tâches blanches en haut à droite de la figure 50 cadre bleu). La partie très riche en $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ correspondant à une "impureté" introduite lors de la préparation de l'échantillon. Dans ce cas, il est nécessaire de procéder à des tests complémentaires pour déterminer quelle est cette "impureté" et éventuellement quelle en est la source (méthode de marquage, méthode de préparation...).

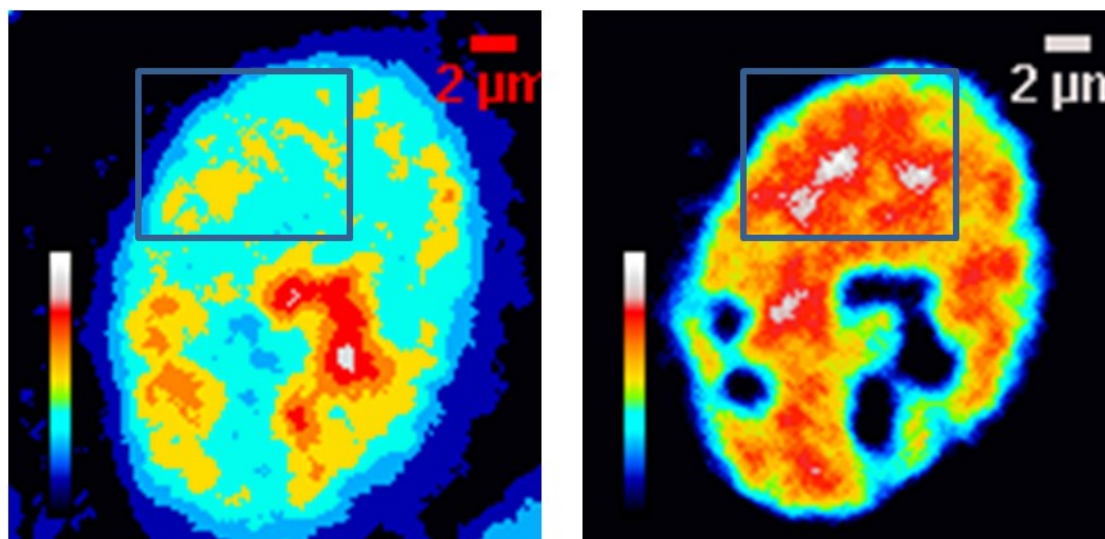


Image NanoSIMS du $^{31}\text{P}^-$

Image NanoSIMS du $^{19}\text{F}^-$

Figure 50 Image $^{31}\text{P}^-$ et $^{19}\text{F}^-$ présentant les zones de localisation possible du nucléole (cadre bleu)

Conclusions

Lors de ce chapitre nous avons présenté l'imagerie par spectrométrie NanoSIMS dédiée à l'imagerie en science du vivant. Nous avons choisi cette technique car elle permet d'observer des échantillons à une échelle de 100 nm, de plus sa résolution latérale très importante nous permet d'obtenir des images de bonnes qualités sur la répartition des éléments sur un échantillon.

Nous avons dans un premier temps présenté la technique et la méthode de préparation des échantillons que nous avons utilisé. Cette première partie du chapitre a permis de mettre en évidence l'importance d'une bonne préparation des échantillons. Dans notre cas la résine employée est une résine de type époxy. Par la suite les blocs de résines sont coupés pour obtenir des coupes de 500nm d'épaisseur. Cette méthode de préparation possède l'avantage de pouvoir observer plusieurs "tranches" ou étages d'une même cellule.

Par la suite, nous avons mis en évidence la possibilité de visualiser des cellules sans marquage par spectrométrie NanoSIMS. L'observation des $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ permet d'obtenir une image globale de la cellule et de localiser la cellule sur la surface de la coupe microtomée. L'observation du phosphore ($^{31}\text{P}^-$) permet de définir le noyau de la cellule, cet élément caractéristique du noyau a permis de mettre en évidence des zones riches en cet élément dans le noyau. Ces zones correspondent aux nucléoles de la cellule. Ces images ont servi de référence lors de l'imagerie de cellules marquées.

La dernière partie du chapitre consistait en l'application des sondes moléculaires synthétisées en chapitre 2 dans le cadre de ce type d'imagerie. Nous avons décidé d'observer trois éléments qui sont très peu présents au sein de la cellule : l'iode, le brome et le fluor. Dans le cas de l'iode du brome et du fluor nous avons pu observer facilement le marquage des nucléoles des cellules.

Nous avons dans un dernier temps envisagé de visualiser le marquage d'une sonde bimodale par cette même méthode. Nous avons pour objectif de faire la corrélation entre l'image obtenue par spectroscopie Raman et celle obtenue par spectrométrie NanoSIMS. L'image de la cellule après marquage par cette sonde indique une absence de fluor dans une zone précise de la cellule. Des études complémentaires pour expliquer une possible élimination des groupes trifluorométhyles ou bien la présence d'une impureté sont nécessaires.

Bibliographie

- [1] Thomson, J. J.; *On rays of positive electricity. Phil. Mag.*, **1910**, 6, 752-767.
- [2] Herzog, R. F. K.; Viehböck, F. P.; *Ion source for mass spectrography. Phys. Rev.*, **1949**, 76, 855-856.
- [3] Honig, R. E.; *Sputtering of surfaces by positive ion beams of low energy. J. Appl. Phys.*, **1958**, 29, 549-545.
- [4] Honig, R. E.; *The development of secondary ion mass spectrometry (SIMS): a retrospective. Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*, **1985**, 66, 31-54.
- [5] Honig, R. E.; *Stone Age Mass spectrometry: the beginning of SIMS at RCA laboratories. Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*, **1995**, 143, 1-10.
- [6] Castaing, R.; *Application des sondes électroniques à une méthode d'analyse ponctuelle, chimique et cristallographique.* PhD Thesis Université de Paris, **1951**.
- [7] Castaing, R. and Slodzian, G. J.; *Optique corpusculaire premiers essais de microanalyse par émission ionique secondaire. J. Microscopie.*, **1962**, 1, 395-399.
- [8] Liebl, H.; *Ion microprobe mass analyzer. J. Appl. Phys.*, **1967**, 38, 5277-5280.
- [9] Benninghoven, A.; Jaspers, D.; Sichtermann, W.; *Secondary -ion emission of amino acids. Appl. Phys.*, **1976**, 11, 35-39.
- [10] De Chambost, E.; *A history of Cameca (1954-2009). Adv. Imag. Elect. phys.* **2011**, 167, 2-113.
- [11] Benninghoven, A.; Rudenauer, F. G.; Werner, H. W.; *Secondary ion mass spectrometry: basic concepts, instrumental aspects, applications and trends.*, **1987**, 1262p.
- [12] Lehmann, C. and Sigmund, P.; *On the mechanism of sputtering. Phys. Status Solidi B.*, **1966**, 16, 507-511.
- [13] Sigmund, P.; *Theory of sputtering. 1. Sputtering yield of amorphous and polycrystalline targets. Phys. Rev. Lett.*, **1969**, 184, 383-416.
- [14] Brown, I. G.; *The physics and technology of ion sources.* Wiley-VCH., **2004**, 396p.
- [15] Mattauch, J. and Herzog, R. F. K.; *Über einen Neuen Massenspektrographen. Zeitschrift fr Physik*, **1934**, 89, 786-795.
- [16] Slodzian, G.; Daigne, B.; Girard, F.; Boust, F.; *High sensitivity and high spatial resolution ion probe instrumentat.* Proceeding of the 6th SIMS Conference, **1987**.
- [17] Levi-Setti, R.; Crow, G.; Wang, Y. L.; *Progress in high resolution scanning ion microscopy and secondary ion mass spectrometry imaging microanalysis. Scan. Electron. Microsc.*, **1985**, Pt2, 535-552.
- [18] Migeon, H. N.; Schuhmacher, G.; Slodzian, G.; *Analysis of insulating specimens with the Cameca IMS 4f. Surf. Interface. Anal.*, **1990**, 16, 9-13.
- [19] Saliot, P.; Davis, A.; Horr ard, F.; Hillion, F.; *Recent instrumental development on the NanoSIMS ion microprobe.* Goldshmidt conference, **2010**.
- [20] *Cameca science and metrology solutions : nanoSIMS 50 50L.* **2013**.
- [21] Badro, J.; Ryerson, F. J.; Weber, P. K.; Ricolleau, A.; Fallon, S. J.; Hutcheon, I. D.; *Chemical imaging with NanoSIMS: a window into deep-earth geochemistry. Appl. Surf. Sci.*, **2007**, 262, 543-551.
- [22] Hoppe, P.; *NanoSIMS: a new tool in cosmochemistry. Appl. Surf. Sci.*, **2006**, 252, 7102-7106.
- [23] Ito, M.; Messenger, S.; *Isotopic imaging of refractory inclusions in meteorites with the NanoSIMS 50L. Appl. Surf. Sci.*, **2008**, 255, 1446-1450.
- [24] Lozano-perez, S.; Schr oder, M.; Yamada, T.; Terachi, T.; English, C. A.; Grovenor, C.; *Using NanoSIMS to map trace elements in stainless steels from nuclear reactors. Appl. Surf. Sci.*, **2008**, 255, 1541-1543.

- [25] Ahmed, S.; Titchmarsh, J. M.; Kilburn, M. R.; Grovenor, C.; *Examination of the influence of boron on the microstructure and properties of low C ferretic steels using NanoSIMS and TEM. Appl. Surf. Sci.*, **2006**, 252, 7062-7065.
- [26] Hermann, A. M.; Ritz, K.; Nunan, N.; Clode, P. L.; Pett-Ridge, J.; Kilburn, M. R.; Murphy, D. V.; O'Donnell, A. G.; Stockdale, E. A.; *Nano-scale secondary ion mass spectrometry a new analytical tool in biogeochemistry and soil ecology: A review article. Soil Biol. Biochem.*, **2007**, 39, 1835-1850.
- [27] Hoppe, P.; Cohen, S.; Meibom, A.; *NanoSIMS: Technical aspects and applications in cosmochemistry and biological geochemistry. Geostand. Geoanal. Res.*, **2013**, 37, 111-154.
- [28] Tachikawa, K.; Toyofuku, T.; Basile-Doelsch, I.; Delhaye, T.; *Microscale neodymium distribution in sedimentary planktonic foraminiferal tests and associated mineral phases. Geochim. Cosmochim. Acta.*, **2013**, 100, 11-23.
- [29] Gicquel, A.; Francez, A. J.; Delhaye, T.; Gruau, G.; Hallaire, V.; Binet, F.; *Understanding the fate and linkage of N and S in earthworm-engineered peat soil by coupling stable isotopes and nano-scale secondary ion mass spectrometry. Biogeochemistry.*, **2013**, 112, 165-177.
- [30] Galle, P.; *Sur une nouvelle méthode d'analyse cellulaire utilisant le phénomène d'émission ionique secondaire. Ann. Phys. Biol. Med.*, **1970**, 42, 83-94.
- [31] Galle, P.; *Cartographie moléculaires ultrastructurales par microscopie ionique. Med. Sci.*, **1991**, 7, 944-952.
- [32] Galle, P.; Escaig, F.; Dantin, F.; Zhang, L.; *Mapping the subcellular distribution of biomolecules at the ultrastructural level by ion microscopy. Cell. Mol. Biol.*, **1996**, 42, 325-334.
- [33] Peteranderl, R. and Lechene, C.; *Isotope ratios in cultured cells. J. Am. Soc.*, **2004**, 15, 478-485.
- [34] Kleinfeld, A. M.; Kampf, J. P.; Lechene, C.; *Transport of ¹³C oleate in adipocytes using multi-imaging mass spectrometry. J Am Soc Mass Spectrom.*, **2004**, 15, 1572-1580.
- [35] Hallegot, P.; Peteranderl, R.; Lechene, C.; *In situ imaging mass spectrometry analysis of melanin granules in the human hair shaft. J. Invest. Dermatol.*, **2004**, 122, 381-386.
- [36] Bonventre, J. and Lechene, C.; *DNA replication and protein turn-over in post ischemic kidney repair studied with multi-isotope imaging mass spectrometry (MIMS). 14th international conference on secondary ion mass spectrometry (SIMS XIV).*, **2003**.
- [37] Lechene, C.; Mroz, E.; Hillion, F.; Benson, D.; *Fast turnover of stereocilia tips links with stable isotope ratio imaging mass spectrometry (MIMS). 14th international conference on secondary ion mass spectrometry (SIMS XIV).*, **2003**, 116-143.
- [38] Mroz, E. and Lechene, C.; *Spatial dynamics of cochlear protein turnover measured with multi isotope imaging mass spectrometry (MIMS). 14th international conference on secondary ion mass spectrometry (SIMS XIV).*, **2003**, 113-140.
- [39] Schwartz, M. and Lechene, C.; *Qualitative chemical analysis of subcellular domains with multi isotope imaging mass spectrometry (MIMS). 14th international conference on secondary ion mass spectrometry (SIMS XIV).*, **2003**, 138-202.
- [40] Lechene, C.; Ito, S.; Hillion, F.; *Sub nucleolar domains excluding newly synthesized RNA revealed by multi isotope imaging mass spectrometry (MIMS). 14th international conference on secondary ion mass spectrometry (SIMS XIV).*, **2003**, 141-202.
- [41] Guerquin-Kern, J. L.; Wu, T. D.; Quintana, C.; Croisy, A.; *Progress in analytical imaging of the cell by dynamic secondary ion mass spectrometry (SIMS microscopy). Biochim. Biophys. Acta.*, **2005**, 1724, 228-238.
- [42] Strick, R.; Strissel, P. L.; Gavrillov, K.; Levi-Setti, R.; *Cation chromatin binding as shown by ion microscopy is essential for the structural integrity of chromosomes. J Cell Biol.*, **2001**, 155, 899-910.
- [43] Levi-Setti, R.; Gavrillov, K.; Strissel, P. L.; Strick, R.; *Ion microprobe imaging of ⁴⁴Ca labeled mammalian chromosome. Appl. Surf. Sci.*, **2004**, 231-232, 479-484.

- [44] Larras-Regard, E. and Mony, M. C.; *Improvements in biomedical imaging by SIMS (IMS 3F and NanoSIMS)*. SIMS XI Proceedings., **1997**, 109.
- [45] Audinot, J. N.; Schneider, S.; Yegles, M.; Hallegot, P.; Wennig, R.; Migeon, H. N.; *Imaging of arsenic traces in human hair by nanoSIMS 50*. *Appl. Surf. Sci.*, **2004**, 231-232, 490-496.
- [46] McMahan, G.; Glassner, B. J.; Lechene, C.; *Quantitative Imaging of Cells with Multi-Isotope Imaging Mass Spectrometry (MIMS) – Nanoautography with Stable Isotope Tracers*. *Appl. Surf. Sci.*, **2006**, 252, 6895-6906.
- [47] Lechene, C.; Hillion, F.; McMahan, G.; Benson, D.; Kleinfeld, A. M.; Kampf, J. P.; Distel, D.; Lyuten, Y.; Bonventre, J.; Hentschel, D.; Park, K. M.; Ito, S.; Schwartz, M.; Benichou, G.; Slodzian, G.; *High-resolution quantitative imaging of mammalian and bacterial cells using stable isotope mass spectrometry*. *J. Biol.*, **2006**, 5, 20-1-20-30.
- [48] Grovenor, C.; Smart, K. E.; Kilburn, M. R.; Shore, B.; Dilworth, J.; Martin, B.; Hawes, C.; Rickaby, R. E. M.; *Specimen preparation for nanoSIMS analysis of biological materials*. *Appl. Surf. Sci.*, **2006**, 252, 6917-6924.
- [49] Kurczy, M. E.; Piehowski, P. D.; Parry, S. A.; Jiang, M.; Chen, G.; Ewing, A. G.; Winograd, N.; *Which is more important in bioimaging SIMS experiments the sample preparation or the nature of the projectile?* *Appl. Surf. Sci.*, **2008**, 255, 1298-1304.
- [50] Goodwin, R. J. A.; *Sample preparation for mass imaging: Small mistakes can lead to big consequences*. *J. Proteom.*, **2012**, 75, 4893-4911.
- [51] Dubochet, J.; Adrian, M.; Chang, J. J.; Lepault, J.; Mc Dowall, A. W.; *Cryoelectron microscopy of vitrified specimens*. *Cryotechniques in biological electron microscopy*. **1987**, 114-131.
- [52] Malm, J.; Giannaras, D.; O Riehle, M.; Gadegaard, N.; Sjövall, P.; *Fixation and drying protocols for the preparation of cell samples for time of flight Secondary Ion Mass Spectrometry Analysis*. *Anal. Chem.*, **2009**, 81, 7197-7205.
- [53] Maunsbach, A. B. and Afzelius, B. A.; *Chapter 2 fixative*. *Biomedical electron microscopy illustrated methods and interpretations.*, **1998**, 31-58.
- [54] Mutasa, H. C. J.; *Applicability of using acrylics resins in post-embedding ultrastructural immunolabelling neutrophil granule proteins*. *Histochem. J.*, **1989**, 21, 249-258.
- [55] Maunsbach, A. B. and Afzelius, B. A.; *Chapter 5: dehydration and embedding*. *Biomedical electron microscopy illustrated methods and interpretations.*, **1998**, 103-124.
- [56] Maunsbach, A. B. and Afzelius, B. A.; *Appendix: practical methods*. *Biomedical electron microscopy illustrated methods and interpretations.*, **1998**, 522-529.
- [57] Okuda, M.; *The role of nucleophosmin in centrosome duplication*. *Oncogene*, **2002**, 21, 6170-6174.
- [58] Biggiogera, M.; Fakan, S.; Kaufmann, S. H.; Black, A.; Shaper, J. H.; Busch, H.; *Simultaneous immunoelectron microscopic visualization of protein B23 and C23 distribution in the HeLa cell nucleolus*. *J. Histochem. Cytochem.*, **1989**, 37, 1371-1374.
- [59] Bozzola, J. J. and Russel, L. D.; *Electron microscopy second edition.*, **1998**, 670p.
- [60] Sanchez-Delgado, R. A.; Rosales, M.; Esteruelas, M. A.; Oro, L. A.; *Homogenous catalysis by osmium complexes. A review*. *J. Mol. Catal. A: Chem.*, **1995**, 96, 231-243.
- [61] Shröder, M.; *Osmium tetroxide cis hydroxylation of unsaturated substrates*. *Chem. Rev.*, **1980**, 80, 187-213.
- [62] Hiram, M.; Oishi, T.; Itô, S.; *Asymmetric dihydroxylation of alkenes with osmium tetroxide: chiral N, N'-dialkyl-2,2'-bipyrrrolidine complex*. *J. Chem. Soc.*, **1989**, 665-666.
- [63] Dupau, P.; Epple, R.; Thomas, A. A.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; *Osmium-catalyzed dihydroxylation of olefins in acidic media: Old process, new tricks*. *Adv. Synth. Catal.*, **2002**, 344, 421-433.

- [64] Schröder, M. and Giriffith, W. P.; *Studies of transition-metal oxo- and nitrido-complexes. Part 4 Reactions of osmium tetraoxide with alkynes and dienes in the presence of tertiary amines.* *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1978**, 1599-1602.
- [65] Omae, I.; *Three characteristic reactions of alkynes with metal compounds in organic synthesis.* *Appl. Organomet. Chem.*, **2008**, 22, 149-166.
- [66] Deeming, A. J. and Senior, A. M.; *Structural aspects of the osmium and ruthenium clusters $[M_3(CO)_{10}(alkyne)]$ and related substituted compounds.* *J. Org. Chem.*, **1992**, 439, 177-188.
- [67] Johnson, B. F. G.; Khattar, R.; Lewis, J.; Raithby, P. R.; *A tris(alkyne) triosmium cluster with an open structure: crystal structure of $[Os_3(CO)_8(Me_2C_2)_3]$.* *J. Organomet. Chem.*, **1987**, 335, C17-C19.
- [68] Jia, G.; *Recent progress in the chemistry of osmium carbyne and metallabenzynes complexes.* *Coord. Chem. Rev.*, **2007**, 251, 2167-2187.
- [69] Esteruelas, M. A.; Lopez, A. M.; Olivan, M.; *Osmium-carbon double bonds: Formation and reactions.* *Coord. Chem. Rev.*, **2007**, 251, 795-840.
- [70] Murphy, E. F.; Murugavel, R.; Roesky, H. W.; *Organometallic fluorides: Compounds containing carbon-metal-fluorine fragments of d-block metals.* *Chem. Rev.*, **1997**, 97, 3425-3468.

Experimental part

Experimental part

Cells inclusion and ultramicrotomy

Cells preparation:

Human osteosarcoma cell lines (U2OS) were directly grown in Petri dish using standard techniques. Before labeling with molecular probes, cells were fixed in frozen methanol, rinsed with phosphate buffer saline (pH: 7.4). Then cells were labeled with primary antibody (rabbit) incubated over night at 4°C. Labelled secondary antibody were added to cells culture and incubated for 1h at room temperature. Cells cultures were rinsed three times with phosphate buffer saline (pH 7.4). For more details see Cells preparation experimental part (Chapter 1 experimental part).

Post fixation and deshydration step:

Cells were post fixed with osmium tetroxyde in solution (2mL of OsO₄ in 3mLPBS pH 7.4) at 4°C for 30 min closing Petri dish (2.5mL per dish). Tetroxyde osmium solution was removed from petri dish and replace by alcohol solution.

Important safety information about osmium tetroxyde: Tetroxyde osmium was purchased from Oxford Instrument and encapsulated in glass bottle with a concentration of 4% in deionized water. All materials in contact with this solution must be immersed in vegetal oil in order to neutralized Osmium tetroxyde.

Then cells were treated by increasing alcohol degrees solution (dilution following Gay Lussac chart) starting from 70 % to 100% in alcohol.

		Alcohol starting concentration													
		100	99	98	97	96	95	90	85	80	75	70	65	60	50
Alcohol final concentration	95	6,5	5,15	3,83	2,53	1,25									
	90	13,25	11,83	10,43	9,07	7,73	6,41								
	85	20,54	19,05	17,58	16,15	14,73	13,33	6,56							
	80	28,59	27,01	25,47	23,95	22,45	20,95	13,79	6,83						
	75	37,58	35,9	34,28	32,67	31,08	29,52	21,89	14,48	7,2					
	70	47,75	45,98	44,25	42,54	40,85	39,18	31,05	23,14	15,35	7,64				
	65	59,37	57,49	55,63	53,81	52	50,22	41,53	33,03	24,66	16,37	8,15			
	60	72,82	70,80	68,8	65,85	64,92	63	53,65	44,48	35,44	26,47	17,58	8,76		
	55	88,6	86,42	84,28	82,16	80,06	77,99	67,87	57,9	48,07	38,32	28,63	19,02	9,47	
	50	107,44	105,08	102,75	100,44	98,15	95,89	84,71	73,90	63,04	52,43	41,73	31,25	20,47	
	45	130,26	127,67	125,11	122,57	120,06	117,57	105,34	93,30	81,38	69,54	57,78	46,09	34,46	11,41
	40	158,56	155,68	152,84	150,02	147,22	144,46	130,8	117,34	104,01	90,76	77,58	64,48	51,43	25,55
	35	194,63	191,39	188,19	185,01	181,85	178,71	163,28	148,01	132,88	117,82	102,84	87,93	73,08	43,59
	30	242,38	238,67	234,99	231,33	227,70	224,08	206,22	188,57	171,05	153,61	136,04	118,94	101,71	67,45
	25	308,9	304,52	300,18	295,86	291,56	287,28	266,12	245,15	224,3	203,61	182,83	162,21	141,65	100,73
20	408,5	403,13	397,79	392,47	387,17	381,9	355,8	329,84	304,01	278,26	252,58	226,98	201,43	150,55	
15	574,75	567,43	560,53	553,55	546,59	539,66	505,27	471	436,85	402,81	368,83	334,91	301,07	233,64	
10	907,09	896,73	886,4	876,1	865,15	855,15	804,5	753,65	702,89	652,21	601,6	551,06	500,50	399,85	

Chart 1 Gay Lussac dilution chart

Example: this chart shows that 105.34 milliliter (green value of distilled water have to be added to 100 mL of dry ethanol in order to obtain an alcohol solution at 45°.

This step was proceeded at room temperature following the chart below.

Alcohol degree (%)	Time proceeding
70	2 x 20 min
80	2 x 20 min
95	2 x 20 min
100	3 x 20 min

Embedding methods:

In a beaker under moderate stirring and at room temperature, embedding compounds was added following this order:

- 2.0mL Araldyte M (*Fluka* purchased from Sigma Aldrich)
- 2.5 mL EPON 812 (*Fluka* for microscopy purchased from Sigma Aldrich)
- 6.0 mL of DDSA (*Fluka* for microscopy purchased from Sigma Aldrich)

The mixture has been stirred at room temperature for 30 minutes. Then 0.16 mL of DMP30 (assay \geq 95% purchased from Sigma Aldrich) was added to solution and stirred for 1 minute. Solution was used immediately after preparation in order to proceed to cells pre-inclusion in Petri dish for 1 h at 37°C. Then embedding mixture was removed replaced by a new one and incubated for 24 h at 37°C. This step corresponds to inclusion step.

Gels capsules were put down to resin and incubated at 37°C for 72 hours. Petri dishes were removed from incubator and gels capsules were filled by a new resin freshly prepared. Petry dishes were incubated at 60°C for 24 hours. Then Petri dishes were removed from incubator and resins blocks were obtained.



Block monitoring for microtome manipulation:

This part concerns blocks preparation to obtain 500 nm thickness slices for NanoSIMS imaging. Each block was monitored according to the following procedure.

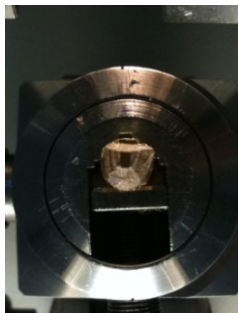
Petri dish was broken in order to get back the cylindrical resins block. All cylindrical resins blocks were labelled on the side according to where they comes from (e.g: center of petri dish = dot; peripheral side = cross). All blocks of the same series were stored in the same box with references (day of fabrication; reference number; type of labeling).

Blocks were selected according to these criteria:

- State of surface: blocks containing any cracks or holes will be avoided.
- Structure of blocks: blocks partly damaged or weakened by releasing part will be avoided.

On the selected blocks working area was defined according to these steps:

- Centred working surface on the block.
- To demarcate area by designing a rectangle. Cut useless part of the resin block.
- Design the following shape on the working area



- Regularize working using a Cryotrim 45 diamond knife on microtome (See below)



Cryotrim 45 diamond knife

500 nm slices monitoring:

All 500 nm slices were performed on Leica UC-6 ultramicrotome system. Slices were made with a 4 mm diamond knife and 45° edge angle from Diatome. The following chart provides standard set up for normal use of the system.



Diamond knife (left) and Leica UC 6 Ultramicrotome system (right)

<i>Speed</i>	1mm/sec
<i>Slices Thickness</i>	500 nm
<i>Bitte angle</i>	6°

After the previous step, block was placed on microtome support and prepared for slicing. This step is the most important and the trickiest phase of cells preparation for NanoSIMS imaging. Block orientation and position play a key role in obtaining 500 nm thickness slices.

Block should be placed front and be parallel to the edge of diamond knife. Parallelism between block and knife was performed with bright light and observation of the horizontal illumination provoke by positioning this two previous elements (diamond blade and resin block).

After positioning, slices were performed and each resins slices were collected in a deionised water pool. Slices were handled with a perfect loop and managed according to the following procedure:

- Odd slice: blank slice, will stain with toluidine blue and observe under binocular magnifying glass.
- Peer slice: put on 1 inch diameter (geology plot) aluminium plot and associated to a mark in order to recognize it for analysis.

Note about toluidine blue solution preparation:

For 100 mL of toluidine blue solution:

- 1gr of toluidine blue (containing 80% dye and certified by the biological stain commission, purchased from Sigma Aldrich).
- 1gr of sodium tetraborate (also known as Borax, ACS reagent, assay ≥99.5%, purchased from Sigma Aldrich)
- Deionised water to obtain 100 mL solution

This solution is a saturated toluidine blue solution and need to be filtered before use.

Each plot were coated with gold nanoparticles and put under vaccum for analysis.

Gold coating for NanoSIMS analysis:

After Ultramicromy step and slice deposition on aluminium plot, 500 nm thickness slices were dry with dry air and put inside a Leica SCD 050 sputter coater. Aluminium plates were coated with 20 nm layer gold nanoparticles.



Gold coater Leica SCD 050

Global setup for gold coating have been summarised in the following chart.

Gold thickness (nm)	<i>20</i>
Gold density (g/cm³)	<i>19,3</i>
Sputtering current (mA)	<i>40</i>
Sputtering time (sec)	<i>100</i>
Working pressure (mbar)	<i>0,05</i>
Working distance (mm)	<i>50</i>

After gold coating on aluminium, plates were introduced to NanoSIMS vaccum chamber.

NanoSIMS acquisition and imaging

General informations:

NanoSIMS analyses were performed at the NanoSIMS platform of the University of Rennes 1, using a CAMECA NanoSIMS 50 (CAMECA, Paris, France) with NanoSIMS ingineer Thomas Delhay. This NanoSIMS is theoretically capable of sub-50 nm lateral resolution whilst imaging negatively charged secondary ions (sputtered with Cs⁺ primary ions) and around 100 nm lateral resolution for positive secondary ions (sputtered with O⁻ primary ions). Four moveable and one static detectors record ion counts from the same sputtered sample volume at five masses simultaneously.

All nanoSIMS analysis were performed with cesium source (positive primary ion source).

Sample introduction:

After microtome step and gold coating, aluminium plot containing samples was introduced successively in different vacuum chamber. This step corresponds to the degassing step for the sample and leads to the analysis chamber.

Chamber 1: loading chamber from atmosphere pressure to 10⁻⁷ Torr.

Chamber 2: vessel chamber 10⁻⁹ Torr.

Chamber 3: analysis chamber 10⁻¹⁰ Torr.

NanoSIMS analysis:

After introducing, the sample was visualized with CCD camera. After localisation, Instrument was switched to SIMS mode and the following procedure was used for cells imaging.

This step corresponds to the surface scan determination. In general this step was proceed with a big raster (100 µm *100 µm) and the raster was reduced just necessary for analysis, for cells analysis raster is about 25 µm. All slit and diaphragm were removed in order to focus the beam on the zone of interest. Implantation time is about 8 minutes.

After this step, different masses can be detected and analyzed. For cells imaging ¹²C¹⁴N⁻ and ³¹P⁻ were analyzed to afford respectively cells and nucleus imaging. For labelled cells different halides were studied: ¹²⁷I, ⁸¹Br and ¹⁹F. These three elements afford to the corresponding NanoSIMS images.

Conclusion générale

L'objectif de ce projet de thèse pluridisciplinaire visait l'application de techniques d'imagerie complémentaire à la microscopie de fluorescence. L'utilisation de ces techniques permettrait d'accéder à des informations structurales et élémentaires liées à l'échantillon. Pour accéder à ce type d'informations, le projet s'est orienté vers l'utilisation de la micro-spectroscopie Raman et de la spectrométrie NanoSIMS.

Lors du premier chapitre les notions de bases permettant la compréhension biologique du projet ont été établies. Nous avons choisi la cible de marquage que nous souhaitons observer par micro-spectroscopie Raman et spectrométrie NanoSIMS. La cible d'intérêt est un sous compartiment du noyau facilement localisable par microscopie : le nucléole. Cet organite cellulaire a été marqué par un immuno-marquage indirect faisant intervenir deux anticorps. Un anticorps primaire spécifique à une protéine fortement présente dans le nucléole : la nucléophosmine et un anticorps secondaire reconnaissant spécifiquement l'anticorps primaire. Dans le cadre de notre étude, l'anticorps secondaire est marqué par une sonde moléculaire que nous souhaitons visualiser c'est pourquoi une expérience contrôle en immunofluorescence a permis de mettre en évidence la non-interférence des sondes moléculaires avec l'immuno-marquage. **Trois catégories de sondes ont été testées : les sondes Raman, les sondes NanoSIMS et les sondes bimodales. Pour chacune des catégories, l'expérience contrôle a permis de prouver que les sondes n'interféraient pas dans la reconnaissance de l'anticorps primaire par l'anticorps secondaire.**

Le second chapitre s'est focalisé sur la présentation et la préparation des sondes moléculaires dans le cadre du marquage des anticorps secondaires. Nous avons pu synthétiser des composés organiques dont la structure comporte un groupement ester de succinimide permettant le marquage des fonctions amines des anticorps secondaires. **Les sondes obtenues ont été classées en trois catégories caractérisant leurs applications : sondes Raman comportant une fonction alcyne, sondes NanoSIMS comportant un ou plusieurs atomes d'halogènes et sondes bimodales Raman-NanoSIMS qui regroupent les deux éléments à savoir une fonction alcyne et un groupement halogène.** La seconde partie du chapitre avait pour objectif une nouvelle série de sondes moléculaires permettant le marquage de l'ATP-Y-SH. Comme dans le cas du marquage des anticorps, trois catégories de sondes ont été envisagées afin de les utiliser ultérieurement en Spectroscopie Raman et imagerie NanoSIMS. Les premières sondes obtenues pourront être utilisées dans le cadre de travaux futurs.

La troisième partie du manuscrit était consacrée à la mise en application des sondes Raman dans le cadre de leur utilisation en imagerie. La préparation des échantillons a été présentée afin d'adapter l'échantillon à ce type d'acquisition. La première partie de ce chapitre a permis d'obtenir des images de cellules sans marquage donnant accès à des informations vibrationnelles sur les principaux composants de la cellule tels que la phénylalanine ou les vibrations des liaisons P-O. Par la suite, nous avons procédé au marquage des cellules par une sonde comportant une triple liaison carbone-carbone en position interne et dont le signal est observable à 2228 cm^{-1} . **Il nous a été possible d'imager la localisation de la sonde dans les nucléoles.** L'intensité du signal collecté est relativement faible et le temps nécessaire à ce type de cartographie est relativement long. C'est

pourquoi des études préliminaires ont été effectuées en faisant appel à une alternative à la spectroscopie Raman : la Coherent Anti-stokes Raman Spectroscopy (CARS). Cette technique possède l'avantage d'amplifier le signal et de diminuer le temps d'acquisition

Le dernier chapitre de la thèse nous a permis d'imager les éléments constituant la cellule et les éléments introduits par l'intermédiaire des sondes moléculaires à la NanoSIMS. Nous avons pu observer des cellules par l'analyse des ions qui les caractérisent : les ions $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ donnant accès à une image de la structure organique, et l'analyse des $^{31}\text{P}^-$ imageant la répartition du phosphore dans la cellule. Par la suite nous avons procédé à l'étude des sondes moléculaires introduites par marquage des anticorps secondaires. Nous avons pu étudier 3 cas : l'iode, le brome, le fluor. Nous avons montré dans un premier temps que les éléments que nous souhaitons étudier sont peu présents au sein de cellules non marquées. **Les images obtenues après marquage nous ont permis de mettre en évidence une co-localisation du signal du phosphore. Cette information nous permet de montrer qu'il est possible d'observer le marquage par la NanoSIMS et que nous marquons la nucléophosmine majoritairement présente dans le nucléole.** Lors de l'étude de la sonde fluorée nous avons effectué une analyse de type "depth scan" nous permettant de suivre la variation de concentration du phosphore et du fluor dans une zone riche en ces éléments. Nous avons pu mettre en évidence une localisation particulière du fluor indiquée par une forte concentration de cet élément. La dernière partie de ce chapitre nous a permis d'imager la localisation d'une sonde bimodale contenant un groupement fonctionnel visible par spectroscopie Raman et un groupement halogéné. L'utilisation de cette sonde avait pour but de montrer qu'il est possible d'imager les cellules par les deux techniques que nous avons utilisé dans ce projet à l'aide d'une seule et même molécule.

L'utilisation de cette sonde avait pour but d'envisager de corréler les résultats obtenus par imagerie Raman, il aurait ainsi été possible de montrer qu'il est possible d'imager le nucléole par deux techniques différentes par l'intermédiaire d'une sonde moléculaire. L'image du fluor obtenue dans ce cas indique une zone pauvre en sonde. Cependant les expériences contrôle ont permis de montrer que la sonde n'interférait pas dans la reconnaissance entre les anticorps, de plus, il a été possible d'obtenir une image Raman de la localisation de la sonde lors du chapitre 3. L'une des hypothèses émises serait la dégradation de la sonde lors de l'étape de post fixation faisant intervenir le tétra-oxyde d'osmium. Ce composé pourrait avoir réagi avec la triple liaison carbone-carbone de la sonde provoquant par la même occasion la libération de la sonde dans le noyau de la cellule. Il existe une autre hypothèse concernant cette image, nous pourrions en effet supposer que la zone où l'absence de marquage est observée n'est pas un nucléole mais une impureté organique.

Perspectives

Nous avons synthétisé des sondes moléculaires qui nous ont permis d'obtenir des images par micro-spectroscopie Raman et spectrométrie NanoSIMS. Par ces travaux, nous avons pu souligner certains points qu'il serait intéressant d'étudier dans le but d'améliorer les méthodes d'acquisition.

Les premiers tests en CARS nous ont permis de mettre en évidence la possibilité de détecter le signal de la bande alcyne interne de la sonde moléculaire utilisée. Cette technique semble particulièrement adaptée à l'étude de bande spécifique de longueur d'onde connue tel que le signal d'un alcyne interne ou externe des sondes moléculaires mise au point. De plus la CARS rendrait possible l'acquisition d'une image sur un temps plus court tout en augmentant sensiblement l'intensité du signal observé. Il serait par conséquent intéressant de tester cette variante de la spectroscopie Raman dans les conditions de marquage.

Lors de l'acquisition des images par la NanoSIMS, nous pourrions envisager d'utiliser une alternative à l'agent de post fixation actuellement utilisé afin de ne pas dégrader la triple liaison carbone-carbone de la sonde moléculaire bimodale introduite. Cet agent de post fixation devrait par conséquent pouvoir fixer les chaînes carbonées insaturées sans dénaturer la triple liaison de la sonde. Nous pourrions également envisager de corréler les informations obtenues par l'imagerie des éléments étudiés dans ce manuscrit par une analyse structurale de l'échantillon. Nous pourrions envisager de visualiser le nucléole par microscopie de transmission électronique en amont de l'analyse NanoSIMS. Cette analyse se ferait sur le même échantillon car les méthodes d'échantillonnage sont similaires.

Résumé

Les travaux décrits dans ce mémoire ont pour objectif d'imager des cellules par des techniques d'imagerie complémentaires à la spectroscopie de fluorescence : la micro-spectroscopie Raman et l'imagerie NanoSIMS. Le présent manuscrit se divise en quatre chapitres et présente les différents aspects menant à la mise en place de ce projet.

Le premier chapitre du manuscrit a pour but de positionner le projet d'un point de vue biologique. Ce chapitre présente l'organite que nous souhaitons marquer, le nucléole, et la façon dont nous avons procédé à sa localisation par l'intermédiaire de sondes moléculaires. Le marquage que nous avons choisi est un immuno-marquage indirect faisant intervenir deux anticorps : un anticorps primaire spécifique à la nucléophosmine, protéine majoritairement présente dans le nucléole et un anticorps secondaire, reconnaissant l'anticorps primaire, marqué par une sonde moléculaire d'intérêt. Ce chapitre a également permis de montrer par une analyse en immunofluorescence l'absence d'interférence des sondes moléculaires dans le cadre de ce marquage.

Le second chapitre se focalise sur la synthèse des sondes moléculaires permettant le marquage des anticorps secondaires. Les sondes envisagées pour ce marquage possèdent un groupement ester de succinimide réactif capable de "s'accrocher" de manière covalente aux fonctions amines de l'anticorps secondaire et un ou plusieurs groupements fonctionnels visible par la technique d'imagerie voulue. Trois catégories de sondes ont été préparées et dépendent de la technique d'imagerie employée. Les sondes Raman comportant une triple liaison carbone-carbone visible par cette technique, les sondes NanoSIMS dont l'acquisition d'image sera possible par les halogènes présents dans la structure et les sondes bimodales comportant les deux éléments dans la même structure. Les sondes bimodales sont obtenues par le couplage pallado-catalysé de Sonogashira. Dans la dernière partie du chapitre, une nouvelle série de sonde a été envisagée dans le cadre d'une application future : le marquage de l'ATP- γ -SH grâce à une fonction mésylate.

Les deux derniers chapitres ont pour but de mettre en application tout ce qui a été présenté dans les chapitres précédents. Les deux techniques employées permettent d'accéder à des types d'informations différentes : la spectroscopie Raman donne accès aux modes de vibrations d'une molécule tandis que l'imagerie NanoSIMS permet d'obtenir des informations élémentaires et isotopiques. Nous présenterons le cheminement suivi pour imager des cellules via leurs constituants par micro-spectroscopie Raman et imagerie NanoSIMS via les sondes moléculaires introduites.

Mots Clés

Imagerie en science du vivant

Sondes moléculaires

Spectroscopie Raman

Imagerie NanoSIMS

Immuno-marquage

Préparation d'échantillon