



HAL
open science

Sondes luminescentes lanthanidiques pour le suivi in situ de l'ATP extracellulaire et des ROS lors de la neuroinflammation

Fabrice Collin, Chantal Galaup, Caroline Fonta, Robert Mauricot, Stéphane Balayssac, I Costache, Francois Couderc, Laure Gibot, Véronique Gilard, Nadine Leygue, et al.

► To cite this version:

Fabrice Collin, Chantal Galaup, Caroline Fonta, Robert Mauricot, Stéphane Balayssac, et al.. Sondes luminescentes lanthanidiques pour le suivi in situ de l'ATP extracellulaire et des ROS lors de la neuroinflammation. 34ème Journée Chimie - biologie - Santé, Jun 2022, Toulouse, France. hal-03685610

HAL Id: hal-03685610

<https://hal.science/hal-03685610v1>

Submitted on 19 Aug 2022

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

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

ILLUMINE_RATP

Sondes luminescentes lanthanidiques pour le suivi *in situ* de l'ATP extracellulaire et des ROS lors de la neuroinflammation

F. Collin¹, C. Galaup², C. Fonta³, R. Mauricot⁴, S. Balaýssac¹, I. Costache², F. Couderc¹, L. Gibot¹, V. Gilard¹, N. Leygue², L. G. Nowak³, L. Perquis¹

projet

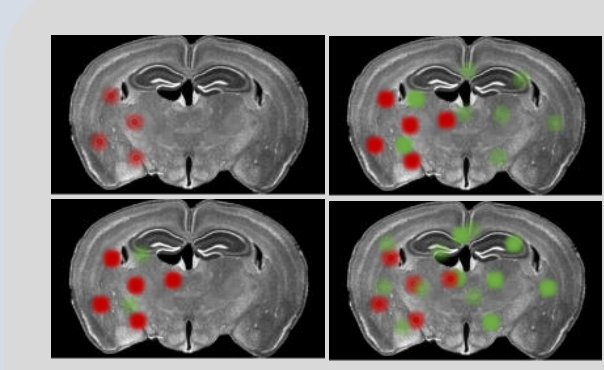
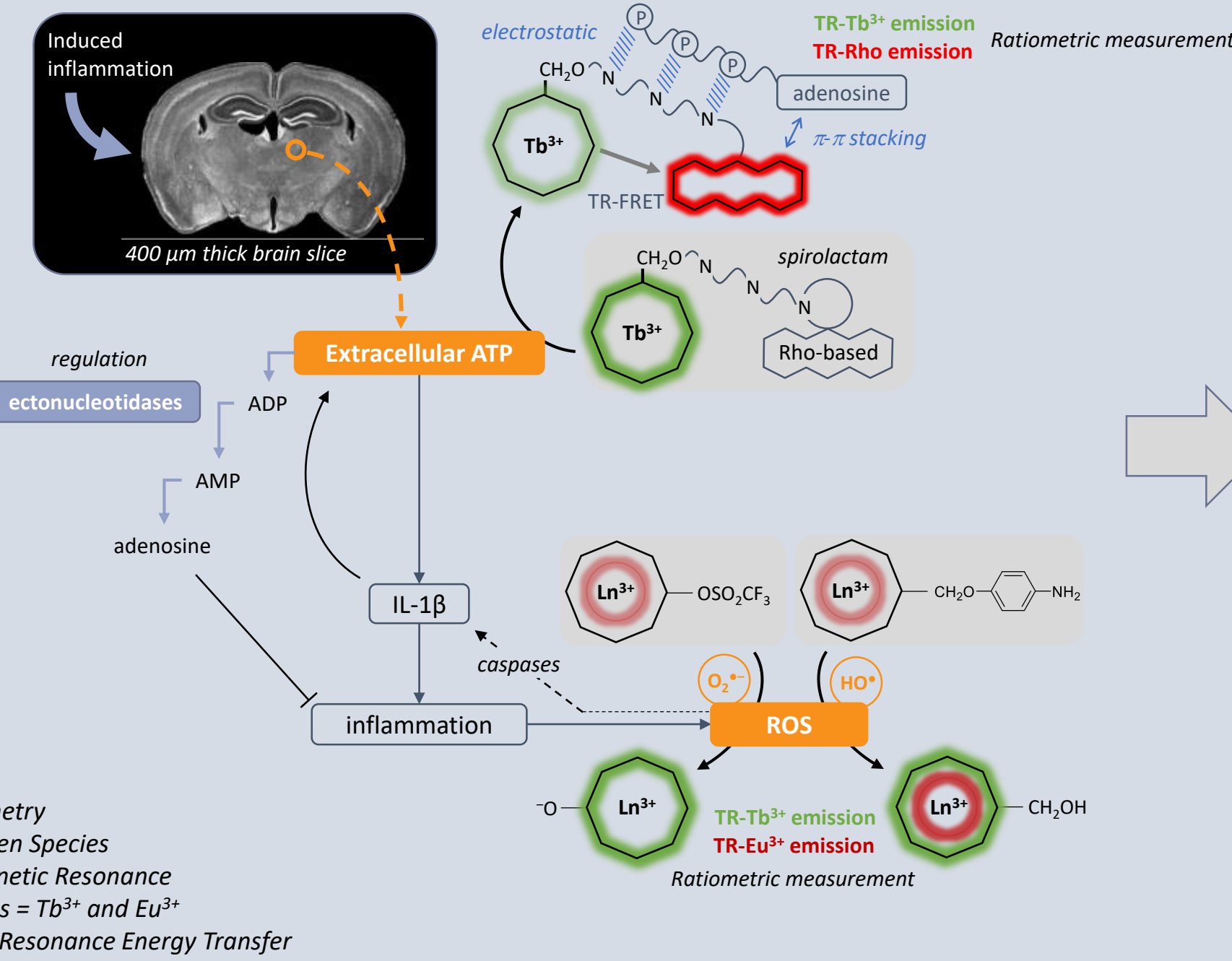
Suivre l'évolution *in situ* des niveaux d'ATP extracellulaire et de ROS intracellulaires sur (i) modèles cellulaires et (ii) tranches de cerveau, en condition d'inflammation.

Développement de **trois sondes luminescentes organométalliques**.

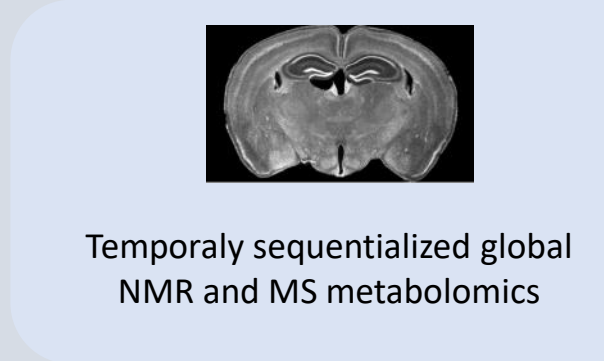
Caractérisation *in vitro* (pH physiologique, LCR artificiel, milieu cellulaire).

Utilisation en **imagerie de fluorescence** (preuve de concept) en milieu cellulaire et tissulaire, après induction de conditions inflammatoires (ajout de IL-1β).

Etude des **perturbations métaboliques** pour relier inflammation et stress oxydant.

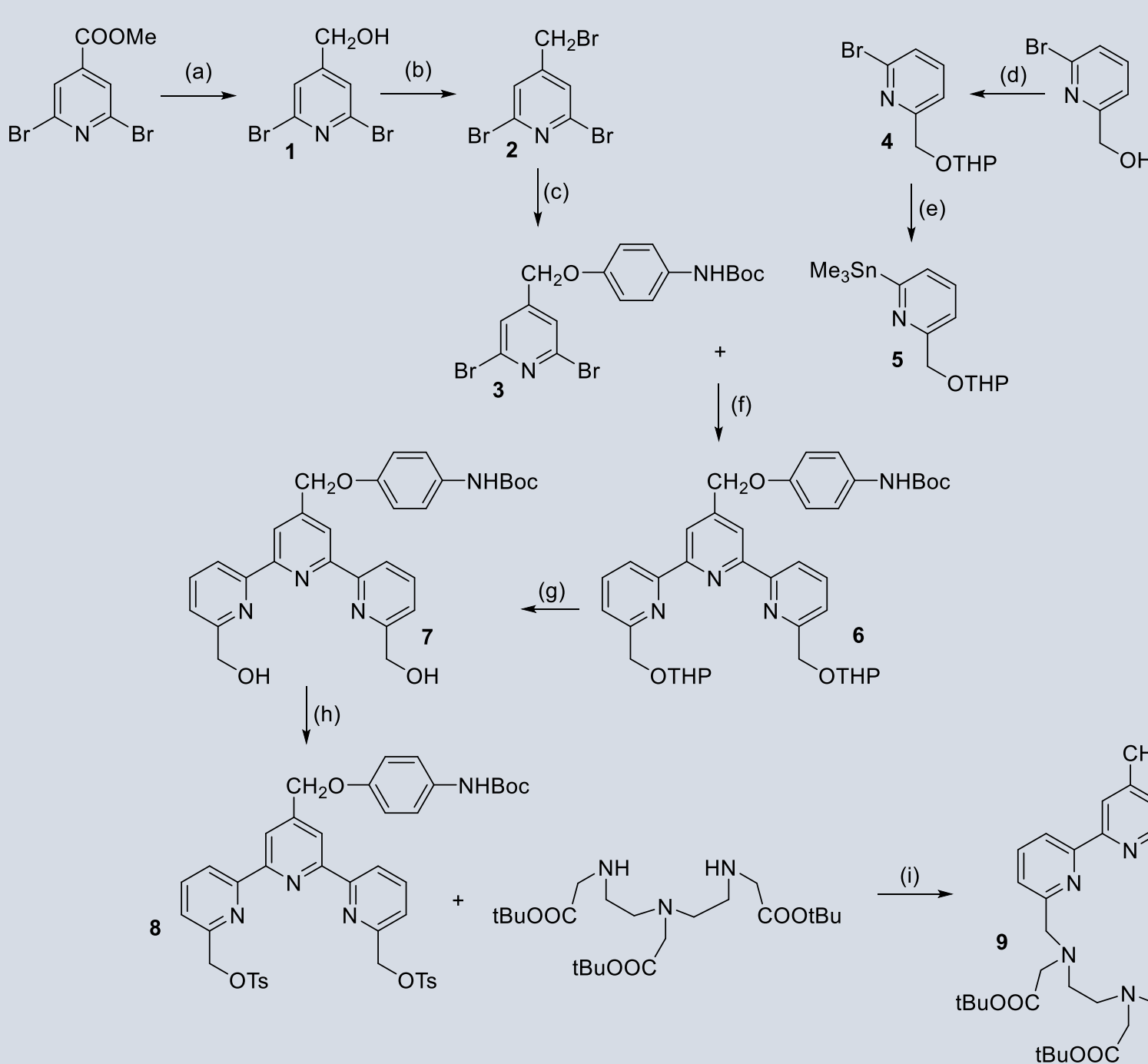


Complexe de lanthanide macrocyclique terpyridinique



résultats

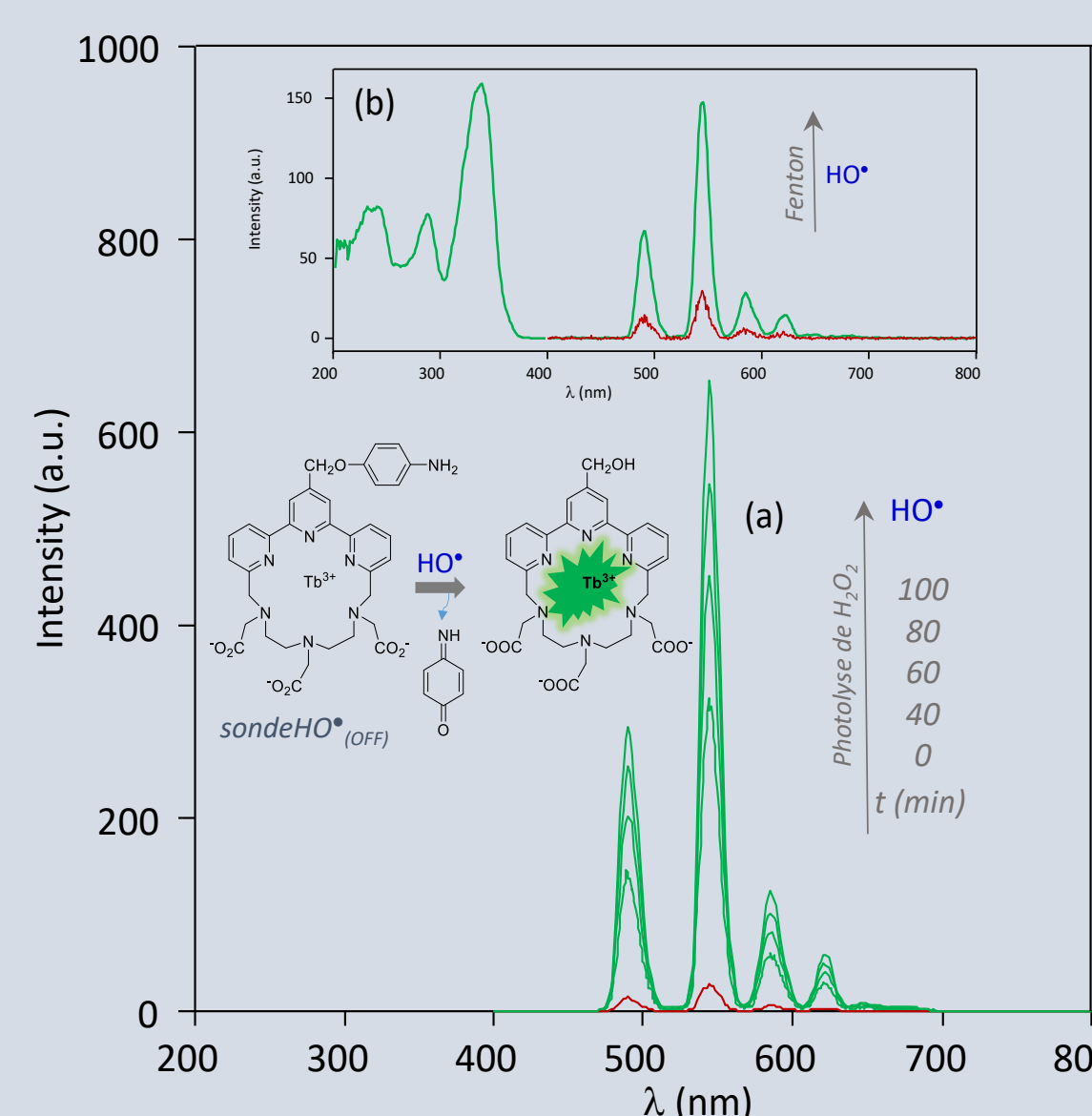
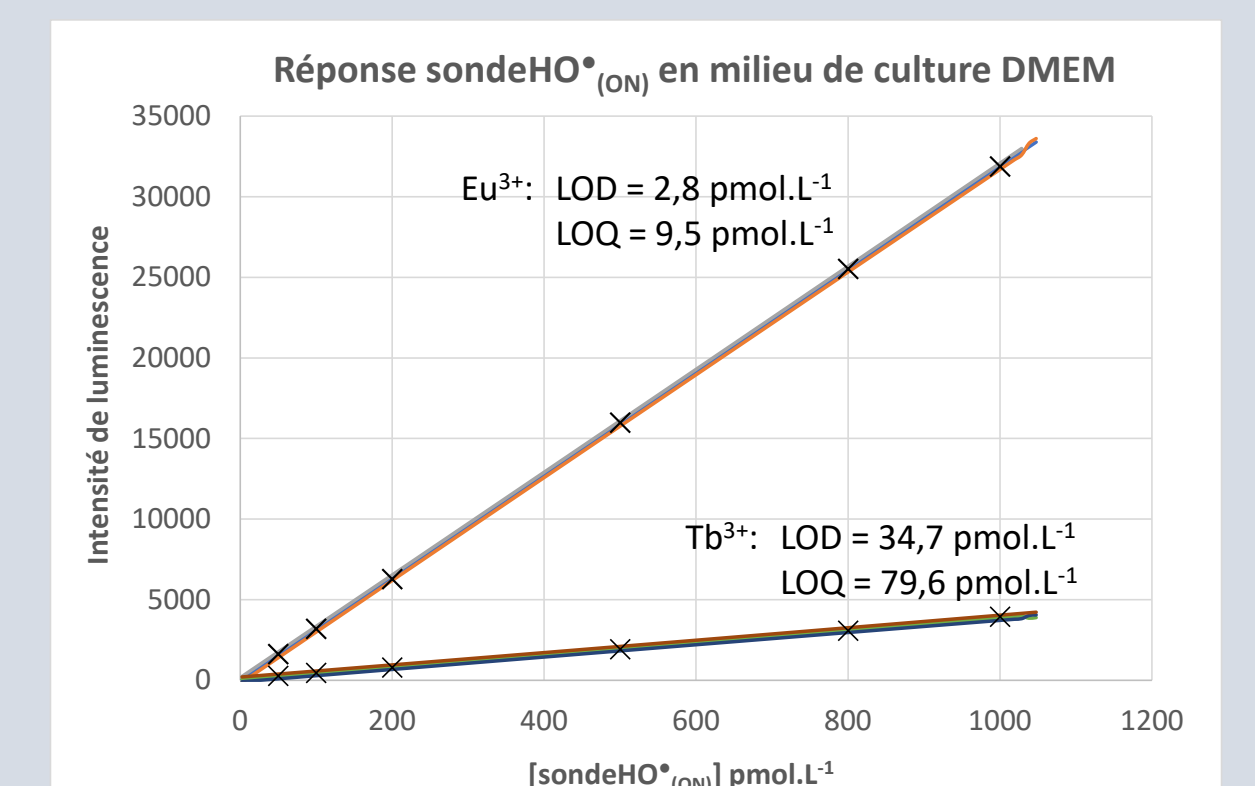
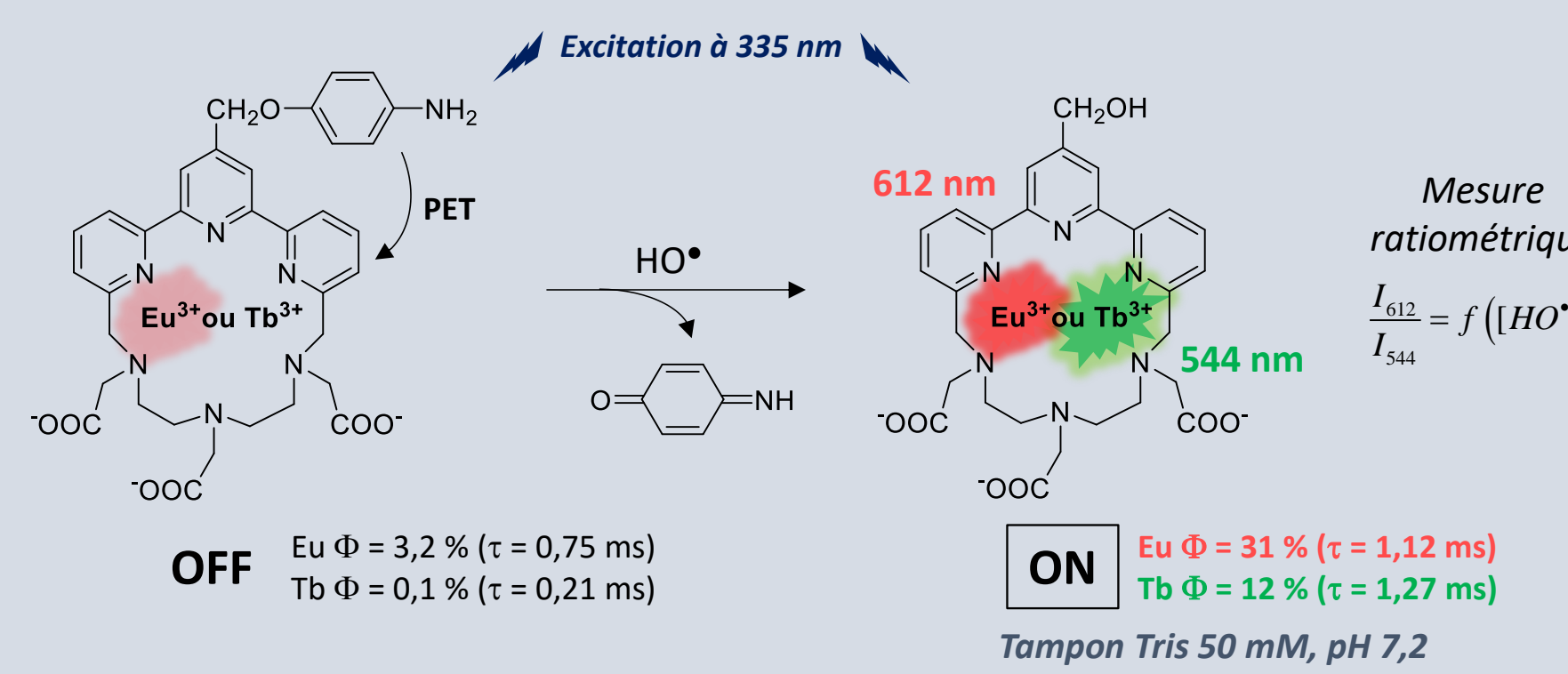
Synthèse de la sonde HO•



Une voie originale de synthèse a été mise en œuvre pour la sonde HO•, qui doit réagir spécifiquement avec les radicaux hydroxyyles : 11 étapes (13%)

Réactifs et conditions (a) NaBH₄, EtOH, reflux, 1 h, 90 %; (b) PBr₃, dioxane, r.t., 16 h, 77 %; (c) tert-butyl (4-hydroxyphenyl)carbamate, K₂CO₃, DMF, r.t., 16 h, 86 %; (d) 3,4-dihydro-2H-pyran, APTS cat., CHCl₃, reflux, 16 h, 83%; (e) (SnMe₂)₂, Pd(Ph₃)₂, Toluene, MW (100 W) 110°C, 30 min, 70 %; (f) Pd(Ph₃)₂, Toluene, MW (100 W) 110°C, 2h, 77 %; (g) NH₄Cl, MeOH, 65°C, 16 h, 77 %; (h) TSCl, Ag₂O, KI cat., CH₂Cl₂, r.t., 16, 91 %; (i) [reagents] = 2 × 10⁻³ M, Na₂CO₃, CH₂CN, reflux, 60 h, 70 %; (j) TFA, CH₂Cl₂, r.t., 16 h, quant. then LnCl₃·6H₂O (Ln = Eu or Tb) aqueous NaOH pH 6, r.t., 12 h, quant.

Spectroscopie de luminescence en temps résolu



La sonde HO•(OFF) (Tb) réagit avec les radicaux HO• de façon dose dépendante, à pH physiologique :

- ✓ Recouvrement des propriétés de luminescence
- ✓ Spectre caractéristique de l'émission du terbium

(a) Spectres d'émission de luminescence (λ_{exc} = 342 nm) de la sonde (10 μM) en présence de HO• (photolyse H₂O₂ 10 μM à 254 nm, 40 à 100 min + contrôle sans irradiation, en rouge).

(b) Spectres d'excitation (λ_{em} = 545 nm) et d'émission (λ_{exc} = 342 nm) de luminescence de la sonde en absence (rouge) et en présence (vert) de HO• (produits par réaction de Fenton, 10/100 éq. Fe²⁺/H₂O₂); [Sonde] = 10 μM, tampon phosphate 10 mM, pH 7.4.

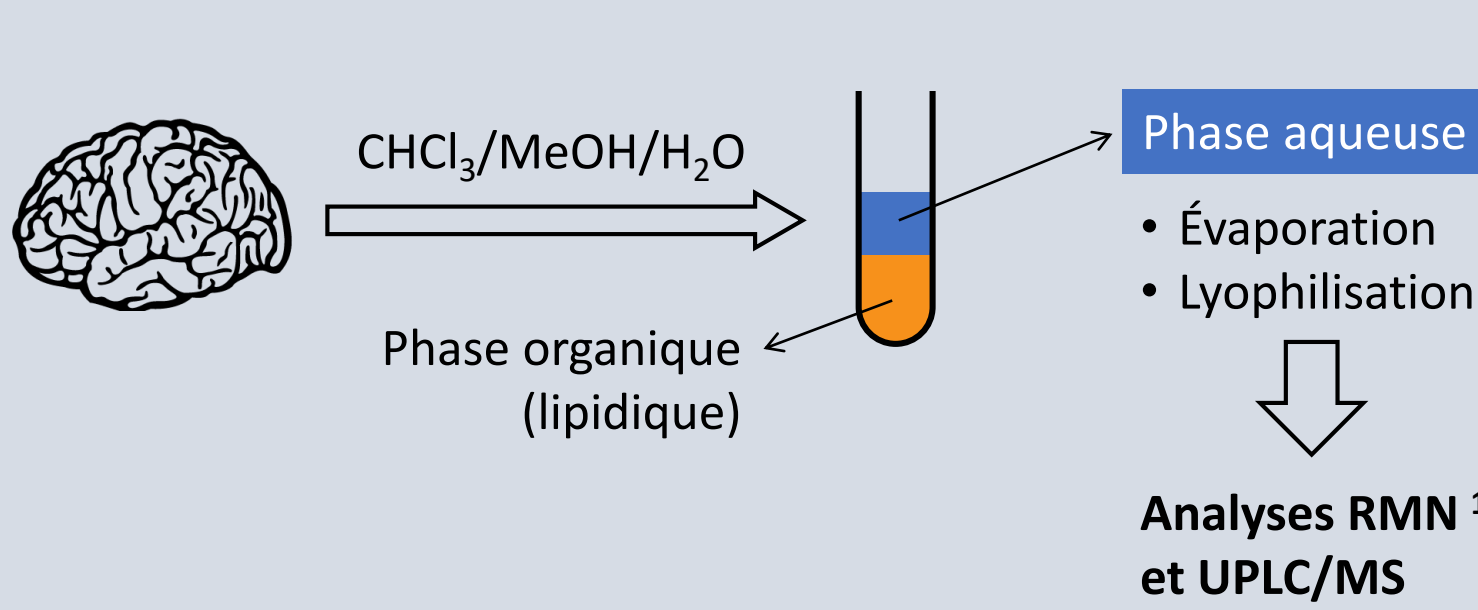
Tranches de cerveau

Des premières analyses métabolomiques ont été réalisées par RMN et spectrométrie de masse sur 6 cerveaux (36 tranches traitées par IL-1β et 36 tranches témoins)

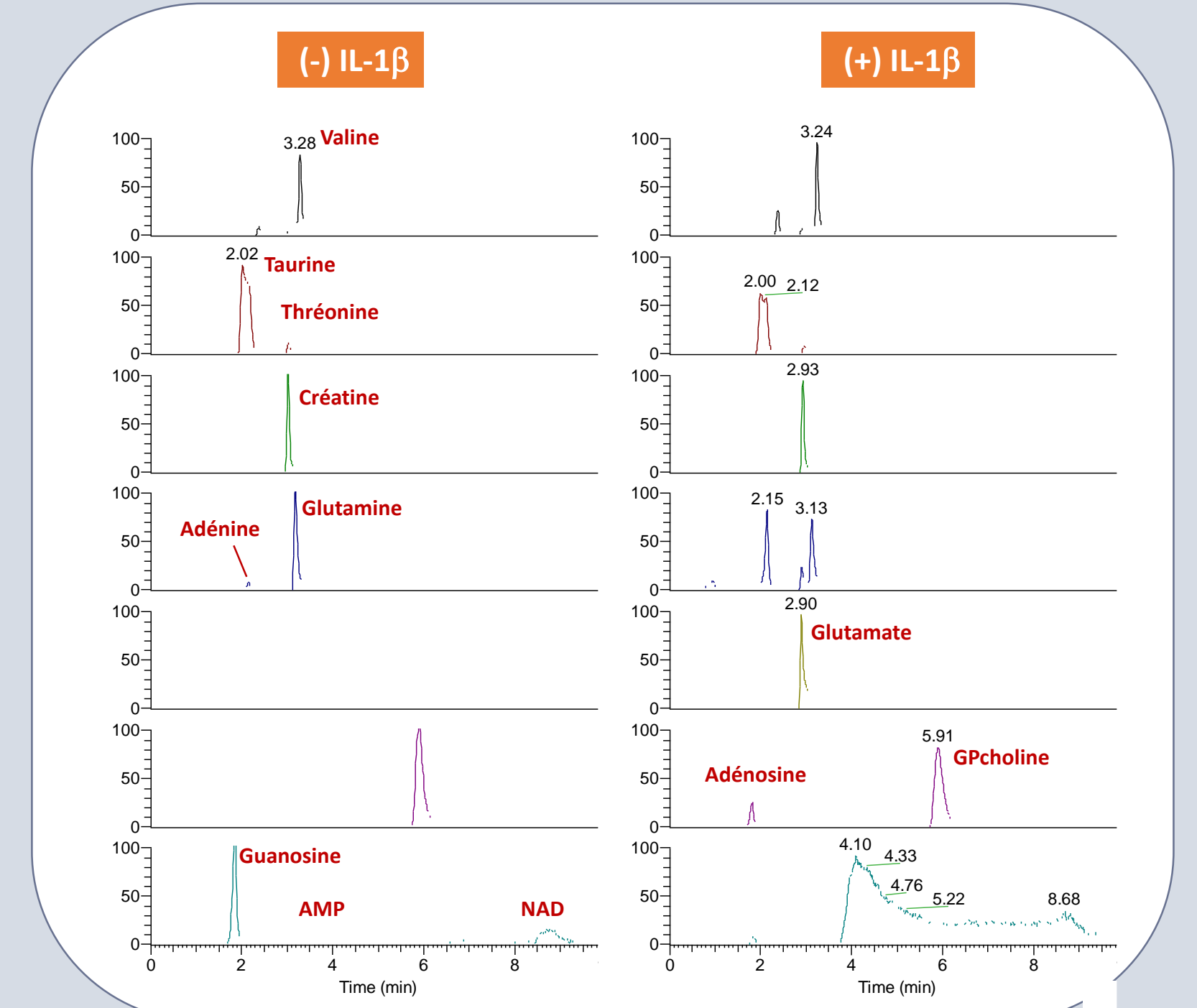


Dispositif d'incubation des tranches de cerveau de souris adultes (400 μm), tranches contrôles (vert) et en présence de IL-1β (bleu).

Extraction des métabolites

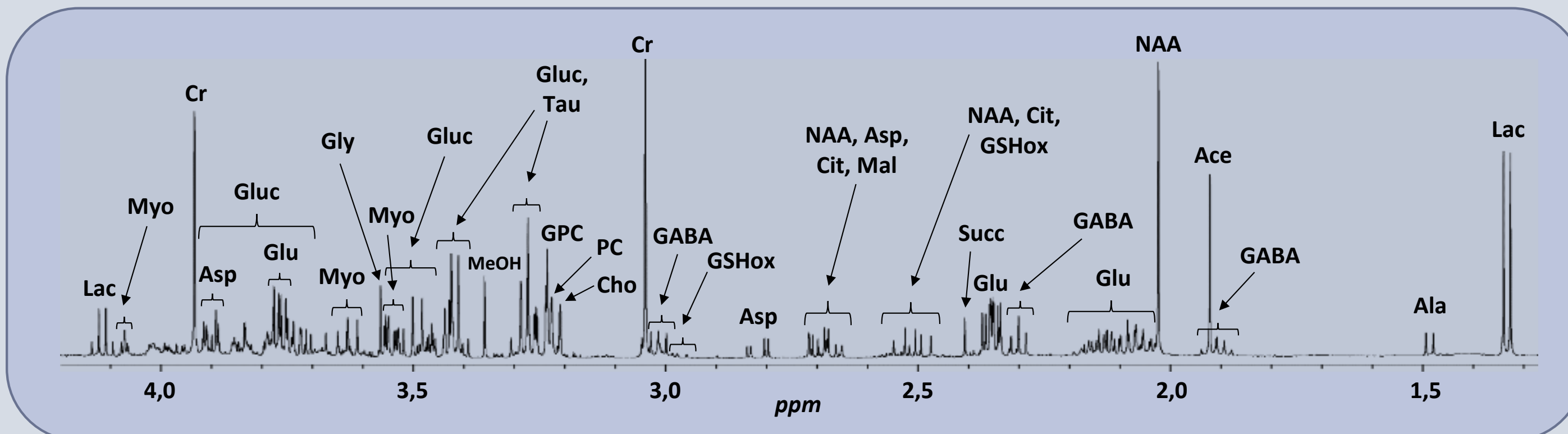


HPLC/MS



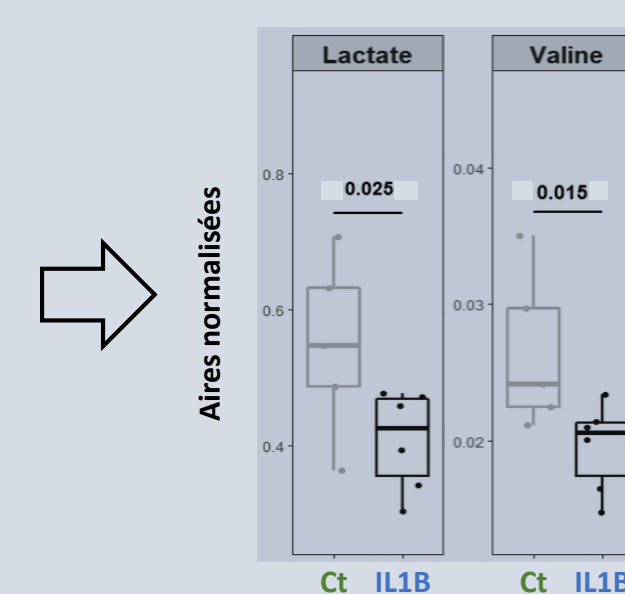
Chromatogrammes traces @5ppm, HPLC/ESI-HRMS (Orbitrap), sur des tranches de cerveau ayant subi ou non un traitement pro-inflammatoire par IL-1β ; recherche ciblée sur les métabolites précédemment identifiés par RMN.

RMN



Région (1,3-4,2 ppm) d'un spectre RMN ¹H enregistré sur un spectromètre Bruker 500 à 25°C de la phase aqueuse d'un échantillon contrôle

Ace : acétate, Ala : alanine, Asp : aspartate, Cho : choline, Cit : citrate, Cr : créatine, GABA : acide γ-aminobutyrique, Glu : glutamate, Gluc : glucose, Gly : glycine, GPC : glycérophosphocholine, GSHox : glutathion oxydé, Lac : lactate, Mal : malate, MeOH : méthanol résiduel, Myo : myo-inositol, NAA : acide N-acétylaspartique, PC : phosphocholine, Succ : succinate, Tau : taurine



Boxplots de métabolites discriminants (lactate, valine) après analyses statistiques ; les valeurs au-dessus des boxplots représentent la valeur de p du test de Mann-Whitney.

perspectives

- Synthèse des sondes ATP et O₂^{•-}.
- Etude de la **réponse in vitro** des sondes (eau pH physio, LCR artificiel et milieu cellulaire) et de leur **spécificité** respective : ADP, AMP vs. ATP et O₂^{•-}, ¹O₂, ONOO⁻ vs. HO• et HO•, ¹O₂, ONOO⁻ vs. O₂^{•-}.
- Optimisation du modèle d'inflammation.
- Optimisation des conditions d'analyse par RMN et MS pour l'obtention des **profils métaboliques** des tranches de cerveau avant/après inflammation ; **analyses chimiométriques** et identification de **métabolites discriminants** (le cas échéant).
- Tests du système d'imagerie de fluorescence résolue dans le temps avec les trois sondes et adaptation du même système pour l'étude des tranches de cerveau.

¹Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique (IMRCP), CNRS UMR 5623, Université Paul Sabatier – Toulouse III, ²Laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique, CNRS UMR 5068, Université Paul Sabatier – Toulouse III, ³Centre de Recherches Cerveau et Cognition (CerCo), CNRS UMR 5549, Université Paul Sabatier – Toulouse III, ⁴Centre d'Elaboration de Matériaux et d'Etudes Structurales (CEMES), CNRS UPR 8011, Toulouse.

